ISSN 2186-7976

March 5, 2019
平成３１年３月５日発行

Annual Meeting of the Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry, 2019

大会講演要旨集

■２０１９年度(平成３１年度)大会[東京]■





公益社団法人日本農芸化学会

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

© Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry

目次

授賞式、受賞者講演、受賞者----------2
一般講演番号の見方----------7
一般講演発表プログラム----------8
一般講演（ポスター発表）プログラム----------76
一般講演発表要旨----------84
大会シンポジウムプログラム----------1,759
大会シンポジウム要旨----------1,768
分野融合連携（他学会連携）シンポジウムプログラム----------1,908
分野融合連携（他学会連携）シンポジウム要旨----------1,909
ランチョンシンポジウムプログラム----------1,921
ランチョンシンポジウム要旨----------1,923
ランチョンセミナープログラム----------1,926
ランチョンセミナー広告要旨----------1,928

日本農芸化学会
（2019 年度）学会賞等授賞式，受賞者講演，受賞者一覧

日時：2019 年 3 月 25 日（月）9 時 00 分～16 時 45 分（開場 8 時 30 分～）
場所：東京農業大学百周年記念講堂（東京都世田谷区桜丘 1-1-1）
進行予定：

(9:00) **2019 年度学会賞等授賞式**　※適宜記念撮影
1　授賞選考委員長報告
2　日本農芸化学会賞授与
3　日本農芸化学会功績賞授与
4　農芸化学技術賞授与
5　農芸化学奨励賞授与

農芸化学女性研究者賞等授賞式　※適宜記念撮影
1　農芸化学女性研究者賞等授賞選考委員長報告
2　農芸化学女性研究者賞授与
3　農芸化学若手女性研究者賞授与
4　農芸化学女性企業研究者賞授与

(9:40) **第 16 回農芸化学研究企画賞表彰式および中小企業研究助成採択報告**
1　産学官学術交流委員長報告
2　農芸化学研究企画賞表彰

(9:45) **BBB 論文賞，BBB Most-Cited Paper Award 及び BBB Most-Cited Review Award 報告**
1　英文誌編集委員長報告

(9:50) **会長祝辞**
(9:55) レイアウト変更（******　休憩 5 分間　******）
(10:00) **受賞者講演開始**
(10:00) 日本農芸化学会賞受賞者講演（2 件，各 25 分）
(10:50) ******　休憩 10 分間　******
(11:00) 農芸化学女性研究者賞受賞者講演（3 件，各 10 分）
(11:30) 日本農芸化学会功績賞受賞者講演（2 件，各 20 分）
(12:10) ******　休憩 50 分間　******
(13:00) 農芸化学技術賞受賞者講演（4 件，各 10 分）
(13:40) 農芸化学女性企業研究者賞受賞者講演（3 件，各 10 分）
(14:10) ******　休憩 15 分間　******
(14:25) 農芸化学奨励賞受賞者講演（10 件，各 10 分）
(16:05) ******　休憩 10 分間　******
(16:15) 農芸化学若手女性研究者賞受賞者講演（3 件，各 10 分）
(16:45) **受賞講演終了**
(18:30～20:30) **懇親会**　京王プラザホテル 5 階「エミネンスホール」

受賞者：

【日本農芸化学会賞】（2 件，50 音順）

入江　一浩　（京都大学大学院農学研究科）
「アミロイドβの毒性配座理論を基盤としたアルツハイマー病の予防戦略」

及川　英秋　（北海道大学大学院理学研究院）
「生合成マシナリー再構築による生理活性物質の生産と多様性創出機構の解明」

【日本農芸化学会功績賞】（2 件 50 音順）

小林　哲夫　（名古屋大学大学院生命農学研究科）
「糸状菌における多糖分解酵素遺伝子群の発現制御に関する研究」

牧　　正敏　（名古屋大学大学院生命農学研究科）
「生体情報応答性カルシウム結合蛋白質およびその相互作用因子に関する構造と機能」

【農芸化学技術賞】（4 件，50 音順）

山内　靖雄・河合　　博　（神戸大学大学院・株式会社 ファイトクローム）
「作物の高温耐性を高める揮発性バイオスティミュラント「すずみどり」の開発」

渡邊　　光・山本　拓生・阿賀　　創・西本　友之　（株式会社 林原）
「新しい水溶性食物繊維イソマルトデキストリン（ファイバリクサ®）の開発」

株式会社　明治
「吸収性に優れ，カラダ作りに最適な革新的乳たんぱく質飲料の開発研究」

永利　浩平・園元　謙二・善藤　威史・手島　大輔（株式会社優しい研究所・九州大学大学院農学研究院・株式会社トライフ）
「乳酸菌バクテリオシン，ナイシンを利用した安全な口腔ケア剤に関する技術開発」

【農芸化学奨励賞受賞】（10 件，50 音順）

石丸　泰寛　（東北大学大学院理学研究科）
「植物の膜輸送体に導かれる生命現象の解明」

笠井　大輔　（長岡技術科学大学技学研究院）
「細菌の酸素添加酵素が関わる代謝系の解析と物質変換技術への応用」

久米　一規　（広島大学大学院先端物質科学研究科）
「正常な細胞機能を保証する細胞構造の制御機構に関する研究」

栗原　　新　（石川県立大学生物資源環境学部）
「腸内細菌のポリアミン代謝・輸送機構の解明」

高妻　篤史　（東京薬科大学生命科学部）
「電気活性細菌のエネルギー代謝と電流生成を制御する分子機構の解明」

兒島　孝明　（名古屋大学大学院生命農学研究科）
「超微細生化学反応系とバイオインフォマティクスを用いた機能性生体高分子の探索技術の開発」

鈴木　道生　（東京大学大学院農学生命科学研究科）
「バイオミネラリゼーションを制御する有機基質の構造と機能に関する研究」

藤枝　伸宇　（大阪府立大学大学院生命環境科学研究科）
「特異な翻訳後修飾アミノ酸を有する金属酵素の機能解析および新規創製」

村井　正俊　（京都大学大学院農学研究科）
「ミトコンドリア呼吸鎖複合体-I の機能解明を目指した生物有機化学的研究」

渡辺　　智　（東京農業大学生命科学部）
「シアノバクテリアから見出された増殖機構・環境適応機構の可塑性と有用物質生産への展開」

【農芸化学女性研究者賞】（3 件，50 音順）

飯島　陽子　（神奈川工科大学応用バイオ科学部）
「植物性食品の香りを主とする質的特性に対するその因子探索とフードメタボロミクスによる展開」

丸山千登勢　（福井県立大学大学院生物資源学研究科）
「抗生物質ストレプトスリシンおよびその類縁化合物の生合成研究で見出した新規ペプチド合成酵素」

室田佳恵子　（島根大学学術研究院）
「食品由来フラボノイドの生体利用性に関わる化学構造の特徴と生体内代謝物の同定」

【農芸化学若手女性研究者賞】（3 件，50 音順）

岡谷（永井）千晶　（国立研究開発法人産業技術総合研究所生命工学領域）
「生理活性ペプチドの機能解明に向けた生物有機化学的研究」

呉　　静　（静岡大学農学部）
「キノコ由来の生物活性 2 次代謝産物に関する化学的研究」

吉田　彩子　（東京大学生物生産工学研究センター）
「アミノ酸代謝酵素を中心とした機能と調節に関する研究」

【農芸化学女性企業研究者賞】（3 件，50 音順）

大室　　繭　（アサヒビール株式会社酒類開発研究所）
「ビール酵母の発酵に寄与する因子解明と産業への利用」

田中　美順　（森永乳業株式会社素材応用研究所）
「アロエベラ由来ステロールの機能性とその応用に関する研究」
冨森菜美乃　（サントリーウエルネス株式会社健康科学研究所）
「ポリフェノールの体内動態に関する研究」

【第 16 回農芸化学研究企画賞】（3 件）

研究領域①　先導的生物活性物質研究と新技術開発

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

甲斐　建次　（大阪府立大学大学院生命環境科学研究科）
「青枯病菌クオラムセンシング機構を標的にしたトマト萎凋病の予防・治療薬の開発」

研究領域②　食領域における新技術開発

⑴　一次生産あるいは食品加工に関する新技術開発
⑵　食あるいは食品の高付加価値化に関する新技術開発
⑶　新規素材開発

渡辺　昌規　（山形大学農学部）
「環境調和型プロセスにより脱脂米糠から回収・精製された完全アレルゲンフリータンパク質及び機能性リン化合物の機能性食品原材料としての用途開発・市場導入に関する研究」

研究領域③　グリーンバイオテクノロジー

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

吉田　信行　（静岡大学工学部）
「微生物の低栄養性に必須なアルデヒド脱水素酵素の工学的利用」

【2019 度日本農学賞（本会推薦）】

本会より推薦した下記の者が日本農学賞を受賞いたしました.
2019 年 4 月 5 日東京大学山上会館で開催される日本農学大会において，日本農学賞授与式並びに受賞者講演が予定されています.

受 賞 者 ：伏木　　亨　（龍谷大学農学部）
受賞題目：食の嗜好性のメカニズムに基づくおいしさの評価法の構築

【2018年（Vol.82）BBB論文賞(掲載順)】(13件)

pp.161～165 Satoru Watanabe, Hiroaki Ozawa, Hiroaki Kato, Kaori Nimura-Matsune, Toshifumi Hirayama, Fumitaka Kudo, Tadashi Eguchi, Katsumi Kakinuma & Hirofumi Yoshikawa
Carbon-free production of 2-deoxy-*scyllo*-inososе (DOI) in cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942

pp.232～237 Tamako Miyazaki, Katsushi Nakata, Takashi Nishimura, Shintaro Abe, Tetsuro Yamashita & Masao Miyazaki
Identification of 2-phenylethanol with a rose-like odor from anal sac secretions of the small Indian mongoose (*Herpestes auropunctatus*)

pp.274～284 Yi Jun Zhou, Keisuke Fukumura & Shinji Nagata
Effects of adipokinetic hormone and its related peptide on maintaining hemolymph carbohydrate and lipid levels in the two-spotted cricket, *Gryllus bimaculatus*

pp.292～303 Tomoko Niwa, Takamasa Suzuki, Yumiko Takebayashi, Rie Ishiguro, Tetsuya Higashiyama, Hitoshi Sakakibara & Sumie Ishiguro
Jasmonic acid facilitates flower opening and floral organ development through the upregulated expression of SlMYB21 transcription factor in tomato

pp.356～362 Mitsuhiro Itaya, Miki Hasegawa, Masaru Tomita & Mitsuru Sato
The first high frequency of recombination-like conjugal transfer from an integrated origin of transfer sequence in *Bacillus subtilis* 168

pp.407～416 Noriko Morimoto, Kotomi Ueno, Masayoshi Teraishi, Yutaka Okumoto, Naoki Mori & Atsushi Ishihara
Induced phenylamide accumulation in response to pathogen infection and hormone treatment in rice (*Oryza sativa*)

pp.689～697 Kyuichi Kawabata, Nobuyuki Baba, Taiken Sakano, Yoshimitsu Hamano, Shu Taira, Akira Tamura, Seigo Baba, Midori Natsume, Takeshi Ishii, Shigeru Murakami & Hajime Ohigashi
Functional properties of anti-inflammatory substances from quercetin-treated *Bifidobacterium adolescentis*

pp.709～715 Yui Iwagaki, Saeko Sugawara, Yasuhisa Huruya, Miki Sato, Qiming Wu, Shuang E, Kazushi Yamamoto & Tsuyoshi Tsuduki
The 1975 Japanese diet has a stress reduction effect in mice: search for physiological effects using metabolome analysis

pp.1207～1215 Kayo Hanafusa, Hiroki Murakami, Takuya Ueda, Erika Yano, Nobuhiro Zaima & Tatsuya Moriyama
Worm wounding increases levels of pollen-related food allergens in soybean (Glycine max)

pp.1377～1383 Ayane Kuboyama, Takashi Sasaki, Makoto Shimizu, Jun Inoue & Ryuichiro Sato
The expression of *Transmembrane Protein 100* is regulated by alterations in calcium signaling rather than endoplasmic reticulum stress

pp.2021～2029 Takuya Yamaguchi & Yasuhisa Asano
Prunasin production using engineered *Escherichia coli* expressing *UGT85A47* from Japanese apricot and UDP-glucose biosynthetic enzyme genes

pp.2118～2129　Seiya Tanaka, Manami Oyama, Miyu Nishikawa, Shinichi Ikushiro & Hiroshi Hara
Simultaneous collection of the portal and superior vena cava blood in conscious rats defined that intestinal epithelium is the major site of glucuronidation, but not sulfation and methylation, of quercetin

pp.2168～2175　Mika Nishiuchi, Kumiko Sakai, Hiroyuki Tajima, Kazuo Katayama, Fumiko Kimura, Seiko Hoshi, Tomoko Goto, Hitoshi Shirakawa & Michio Komai
Orexigenic action of oral zinc: metabolomic analysis in the rat hypothalamus

【Most-Cited Paper Award】被引用回数　17回

Vol.80, No.8, pp.1520～1530
Byoung Ok Cho, Hong Hua Yin, Sang Hyun Park, Eui Baek Byun, Hun Yong Ha & Seon Il Jang
Anti-inflammatory activity of myricetin from Diospyros lotus through suppression of NF-κB and STAT1 activation and Nrf2-mediated HO-1 induction in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages

【Most-Cited Review Award】被引用回数　32回

Vol.80, No.1, pp.23～33
Makoto Kawamukai
Biosynthesis of coenzyme Q in eukaryotes

一般講演番号の見方

○ 講演番号の

最初の１桁の数字は講演発表日

１ ⟶ ３月２４日（日）
３ ⟶ ３月２６日（火）
４ ⟶ ３月２７日（水）

次のアルファベットは階数、その次の数字一桁は、会場番号

Ａ　　１号館１階
Ｂ　　１号館２階
Ｃ　　１号館３階
Ｄ　　１号館４階
Ｅ　　１号館５階

（例：Ｂ５　→　１号館２階　Ｂ５会場）

次の桁の小文字アルファベットは

ａ　は　午前の部
ｐ　は　午後の部

次の数字は、その会場での講演の順番

たとえば、**３Ｂ１ｐ１４**は、

３月２６日（火）、１号館Ｂ１会場、午後の部、１４番目　の講演です。

○ 講演開始の時間は、次の通りです。

ａ［ａｍ］（午前）

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

ｐ［ｐｍ］（午後）

０１．13：50	０２．14：01	０３．14：12	０４．14：23
０５．14：34	14：45（PC 接続時間）	０６．14：55	０７．15：06
０８．15：17	０９．15：28	１０．15：39	15：50（PC 接続時間）
１１．16：00	１２．16：11	１３．16：22	１４．16：33
１５．16：44			

一般講演発表プログラム

1. 講演時間は1題につき，11分 （発表8分，質疑2分30秒，交替時間30秒）.
2 ○は講演者（登壇者）を示す.
3. 座長はプログラム集31～33ページの座長一覧をご覧ください.
4. 講演番号1文字目（数字）は講演日（1：3月24日，3：3月26日,4：3月27日），2～4文字目は講演会場（B1～E8），5文字目（英字小文字1字）のaは午前，pは午後，5～6文字目（数字2桁）は講演順番（01～15）.（例）「3B2p07」は，3月26日，B2会場，午後の部，7番目の講演となります.

第1日(3月24日)

講演番号
開始時間　　演　　題　　発表者氏名(所属)

B1 会場　午前の部(9:00～12:05)

食品―食品機能・栄養 - メタボリック・シンドローム，エネルギー代謝／食品機能・栄養 - 糖質代謝／食品機能・栄養 - 脂質代謝―

a01～a05 発表者の接続時間 8:50～9:00

1B1a01　糖質・脂質バランスの違いが閉経後モデルマウスの肥満に及ぼす影響
9:00　○川和理恵[1]，井上怜子[1]，塩越美春[2]，石川朋子[3]，市　育代[3,4]，藤原葉子[3,4]（[1]お茶大・食物，[2]お茶大院・ライフサイエンス，[3]お茶大・HLI研，[4]お茶大・基幹研究院）

1B1a02　軽度肥満者を対象とした乳酸菌 S-PT84 の継続摂取による体脂肪低減効果と炎症制御
9:11　○前川敏宏，井田正幸，出雲貴幸，北川義徳，柴田浩志（サントリーウエルネス株式会社　健康科学研究所）

1B1a03　スルフォラファンは転写因子 SREBP 前駆体の分解促進を介して食事誘導性肥満や脂肪肝を改善する
9:22　○井上　順[1]，宮田慎吾[2]，正路健太[1]，鈴木　司[1]，山本祐司[1]，清水　誠[2]，佐藤隆一郎[2]（[1]東農大・応生・農化，[2]東大院・農生科・応生化）

1B1a04　食品成分の組み合わせによる作用増強に関する研究
9:33　○正路健太[1]，鈴木　司[1,2]，山本祐司[1,2]，井上　順[1,2]（[1]東農大院・農・農化，[2]東農大・応生・農化）

1B1a05　高脂肪食の時間制限給餌による SAM マウスの聴覚老化の遅延
9:44　○大池秀明，薊　佳代（農研機構／食品研）

a06～a10 発表者の接続時間 9:55～10:05

1B1a06　食後血糖値の上昇を低減させる玄米の加工法とそのメカニズム
10:05　○大木梓織[1]，佐藤千樺[2]，石川匡子[1,2]，秋山美展[1,2]（[1]秋田県大院生物資源，[2]秋田県大生物資源）

1B1a07　ゲニステインはプロヒビチンを介して NAMPT の発現量と NAD+ 合成量を増加する
10:16　○渡邉　駿[1]，三谷塁一[2]，片山　茂[1,2]，中村宗一郎[1]（[1]信州大院・総合理工(農学専攻)，[2]信州大・先鋭領域融合）

1B1a08　北海道自生キノコのインスリン分泌促進能の解析
10:27　○高橋有志[1]，吉田　泉[1]，井出将博[1]，三嶋　隆[1]，山口昭弘[2]，五十嵐友二[1]（[1]日本食品分析セ，[2]酪農大農食環群）

1B1a09　わかめの摂取が食後血糖値およびインスリン分泌に及ぼす影響
10:38　○吉永恵子[1]，仲野隆久[1]，三田村理恵子[2]（[1]理研ビタミン(株)，[2]藤女子大・食物栄養）

1B1a10　食品由来成分による尿中へのグルコース排泄促進作用
10:49　○大川咲希，白川　仁，駒井三千夫（東北大院農）

a11～a15 発表者の接続時間 11:00～11:10

1B1a11　12*a* 胆汁酸負荷により誘導される症状のラットおよびマウスを用いた比較
11:10　○吉田　凌[1]，堀　将太[2]，原　博[2]，石塚　敏[2]（[1]北大農，[2]北大院農）

1B1a12　タウリン摂取によるマウス FXR シグナルと胆汁酸動態の変動
11:21　○宮田昌明，舩木萌浩，江口昌志，住屋佑希乃，杉浦義正（水産機構水大校）

1B1a13　*cis*-バクセン酸摂取により影響を受ける組織の探索
11:32　○甲木孝弘，井土良一（(公財)東洋食品研究所）

1B1a14　バレレン酸が脂肪細胞に与える影響
11:43　○高橋　遵[1]，加藤悠理海[1]，原田洸輔[1]，只今　幹[1]，仁科淳良[2]，清水　誠[1]，服部一夫[1]（[1]東農大院農，[2]日大理工）

1B1a15　炎症による消化管脂質代謝異常の発症メカニズムの解明
11:54　○津山博之[1]，勝間田(坪井)理恵[1]，室田佳恵子[2]，井上博文[1]，上原万里子[1]，高橋信之[1]（[1]東農大農，[2]島根大農生命）

B1 会場　午後の部(13:50～16:55)

食品―食品機能・栄養 - メタボリック・シンドローム，エネルギー代謝／食品機能・栄養 - 糖質代謝／食品機能・栄養 - タンパク質・アミノ酸代謝―

p01～p05 発表者の接続時間 13:40～13:50

1B1p01　質量分析イメージングを用いた魚肉タンパク質摂餌ラットの骨格筋脂質解析
13:50　○森笹瑞季[1]，井上菜穂子[1]，佐藤友彦[1]，藤谷美菜[3]，岸田太郎[3]，内田健志[2]，森　司[1]（[1]日大・生資，[2]日本水産(株)食品機能研，[3]愛媛大院・農・生命機能）

1B1p02　ミャンマー生薬 Vitex trifolia 中の抗糖尿病成分の探索
14:01　○仁科淳良[1]，纐纈　守[2]，二ノ宮真之[2]，平井康昭[3]，若生　豊[4]（[1]日本大学，[2]岐阜大学，[3]昭和大学，[4]八戸工業大学）

1B1p03　徳島県育成香酸カンキツ「阿波すず香」のフラボノイドおよび芳香成分プロファイル解析
14:12　○新居美香[1,2]，堤　理恵[2]，阪上　浩[2]（[1]徳農技セ，[2]徳島大院　代謝栄養学分野）

1B1p04　健康的日本食を摂取したヒトにおける mRNA と miRNA の関係と統合解析
14:23　○浅野将希，山本和史，都築　毅（東北大院農）

1B1p05　miRNA に着目したガーリック由来香気成分の抗肥満作用に関する研究
14:34　○池田彩菜[1]，三浦　徳[2]，瀬尾希来[1]，渡辺高大[2]，増澤(尾崎)依[2]，細野　崇[1,2]，関泰一郎[1,2]（[1]日大院・生資科・応生科，[2]日大・生資科・生命化）

p06～p10 発表者の接続時間 14:45～14:55

1B1p06　骨格筋細胞におけるフェネチルイソチオシアネートの筋タンパク質分解抑制効果の評価
14:55　○千葉麻衣子[1]，伊藤芳明[2]，長澤孝志[2]（[1]岩手大院総合科学，[2]岩手大農）

1B1p07　骨格筋ファイバに対する大麦若葉エキス末の糖取り込み作用
15:06　○正路佳代子[1]，安達亜希[1]，森川琢海[2]，尾上貴俊[2]，鍔田仁人[2]，島　亜衣[3]，竹内昌治[3]（[1]株式会社セルファイバ，[2]株式会社東洋新薬，[3]東大）

1B1p08　AMPK の活性化を制御する新規化合物の探索
15:17　○樋口敬太[1]，鈴木　司[1,2]，井上　順[1,2]，山本祐司[1,2]（[1]東農大院・農・農化，[2]東農大院・応生・農化）

1B1p09　バナナ摂取による運動パフォーマンス向上効果と疲労軽減効果に関する解析
15:28　○増田隆昌[1]，渡邊恵梨子[1]，石川大仁[1]，瀧本陽介[1]，積志保子[2]，堀田拓哉[3]，大滝尋美[3]，荒木雄介[3]，渡辺陽介[3]，長﨑　大[4]　([1]株式会社ヘルスケアシステムズ，[2]ソロス株式会社，[3]株式会社ドール，[4]愛知学院大学 心身科学部 健康科学科)

1B1p10　オオバギ（*Macaranga tanariusu*）実由来抽出物及びその成分の生理活性
15:39　○夏目矩行[1]，渡辺章夫[4]，小塚隆造[3]，米澤貴之[4]，禹　済泰[2,5]，照屋俊明[1]　([1]琉球大院・理工，[2]中部大・応生，[3]中部大院・応生，[4]中部大・生機研，[5](株) 沖縄リサーチセンター)

p11～p15 発表者の接続時間 15:50～16:00

1B1p11　香酸柑橘柚香の腸内細菌叢を介した糖代謝改善作用
16:00　○堤　理恵[1]，新居美香[1,2]，瀬山瑞穂[1]，阪上　浩[1]　([1]徳島大，[2]徳島県立農林水産総合技術支援センター)

1B1p12　“スクロース過剰毒性”は消化管を介して脂肪肝と高中性脂質血症を誘導する
16:11　○小田裕昭[1]，孫　淑敏[1]，梅木美樹[2]，西村直道[3]，望月　聡[4]　([1]名大院生命農，[2]別府大食栄，[3]静岡大農，[4]大分大教育)

1B1p13　肥満モデルマウスにおける *Lactobacillus paracasei* K71 加熱死菌体摂取が腸内細菌叢へ及ぼす影響
16:22　○志波　優[1,2]，伊藤さとみ[3]，松本雄宇[3,4]，鈴木　司[3]，井上　順[3]，石毛太一郎[2]，熊谷武久[5]，藤田信之[1]，山本祐司[3]，田中尚人[1]　([1]東農大生命科学，[2]東農大生物資源ゲノム解析セ，[3]東農大応生化，[4]関東学大機能食研，[5]亀田製菓株式会社)

1B1p14　肥満モデル動物における *Lactobacillus paracasei* K71 加熱死菌体摂取による新規機能性の探索
16:33　○伊藤さとみ[1]，志波　優[2]，松本雄宇[5]，鈴木　司[1,4]，井上　順[1,4]，石毛太一郎[3]，熊谷武久[6]，藤田信之[2]，田中尚人[2]，山本祐司[1,4]　([1]東農大院・農化，[2]東農大・生命科学，[3]東農大・生物資源ゲノム解析セ，[4]東農大・応生化，[5]関東学大・機能食研，[6]亀田製菓株式会社)

1B1p15　*Lactobacillus plantarum* PIC-NBN22 とフラクトオリゴ糖含有食品における体脂肪および腸内フローラに及ぼす影響
16:44　○矢島冬紗子，中西愛美，信田友理子　((株)ビックルスコーポレーション)

B2 会場　午前の部（9:00～12:05）

食品―食品化学 - 糖質，脂質―

a01～a05 発表者の接続時間 8:50～9:00

1B2a01　キクイモオリゴ糖のプレバイオティクスとしての効果
9:00　○森田　朗[1]，原　　崇[2]，城斗志夫[2]　([1]新潟大院自然科学，[2]新潟大農)

1B2a02　*Mycobacterium obuense* によるキクイモ由来イヌリンからのイヌロビオースの選択的生産
9:11　○曽根涼平，川島恭幸，滝口泰之　(千葉工大工)

1B2a03　能登栗の低温貯蔵による遊離糖組成の変化
9:22　○齋藤泰宏，本多裕司　(石川県大・生資環)

1B2a04　清酒に含まれるオリゴ糖の構造に関する研究
9:33　○本田千尋[1]，勝田　亮[1]，岡田奈菜子[2]，馬宮綾音[2]，河村卓也[2]，山田真理子[1]，小林泉美[1]，戸塚　昭[3]，進藤　斉[1]，穂坂　賢[1]，徳岡昌文[1]　([1]東農大院農，[2]東農大応生，[3]感性科学研究所)

1B2a05　糖転移により生成する清酒中新規化合物の構造解析
9:44　○小島悠輔[1]，松村聡美[2]，勝田　亮[1]，小林泉美[1]，本田千尋[1]，我妻いずみ[1]，徳岡昌文[1]，進藤　斉[1]，穂坂　賢[1]　([1]東農大院農，[2]東農大応生)

a06～a10 発表者の接続時間 9:55～10:05

1B2a06　コシヒカリに由来する良食味遺伝子座が及ぼす精白米に含まれる低分子量化合物への影響について
10:05　○辻井良政[1]，木村圭一[1]，米澤加代[1]，齋藤彰宏[1]，堀　清純[2]，高野克己[1]　([1]東京農大応生・農化，[2]農研機構作物開発センター)

1B2a07　窒素施肥がイネ種子のデンプン組成に与える影響
10:16　○酒井孝一朗[1]，黒田昌治[2]，緑川景子[1]，阿部啓子[1,3]，朝倉富子[1]　([1]東大院農生科・応生化，[2]農研機構・中央農研，[3]神奈川科学技術アカデミー)

1B2a08　アルギン酸含有量，ウロン酸組成，タンパク質含有量のコンブ部位の比較
10:27　○平賀捷悟[1]，石島大義[1]，垣田浩孝[1]，関　憧平[2]，四ツ倉典滋[3]　([1]日大文理，[2]北大院環境科学院，[3]北方生物圏フィールド科学センター)

1B2a09　魚の加熱調理が機能性成分量に与える変化とマウスの健康へ与える影響
10:38　○坂之井悠人，都築　毅　(東北大院・農)

1B2a10　質量分析を用いた油脂初期酸化の新規評価法
10:49　○加藤俊治[1,2]，伊藤隼哉[1]，境野眞善[3]，佐野貴士[3]，永塚貴弘[1]，宮澤陽夫[4,5]，仲川清隆[1]　([1]東北大院農・機能分子解析，[2]東海大医・基礎医学・生体防御，[3](株)J-オイルミルズ・ 技術戦略センター，[4]東北大院農・食の健康科学ユニット，[5]東北大・未来科学技術共同研究センター)

a11～a15 発表者の接続時間 11:00～11:10

1B2a11　LC-MS/MS を用いたオリーブ油の酸化メカニズム推定
11:10　○高橋隼登[1]，加藤俊治[1,2]，伊藤隼哉[1]，境野眞喜[3]，佐野貴士[3]，永塚貴弘[1]，宮澤陽夫[4,5]，仲川清隆[1]　([1]東北大院農・機能分子解析，[2]東海大医・基礎医学・生体防御，[3](株)J-オイルミルズ・ 技術戦略センター，[4]東北大院農・食の健康科学ユニット，[5]東北大・ 未来科学技術共同研究センター)

1B2a12　様々な分子種からなるランダムエステル交換油の酸化機構の評価
11:21　○飯田彩未[1]，加藤俊治[1,2]，泉井亮太[3]，久保内宏晶[3]，仲川清隆[1]　([1]東北大院農・機能分子解析，[2]東海大医・基礎医学・生体防御，[3]雪印メグミルク)

1B2a13　ヨメガカサガイの生殖細胞から見いだされた多様な新規 *n*-1 系列のジエン酸構造
11:32　○川島英城　(岩手県立大宮古短大部)

1B2a14　カメリア油の脂質特性
11:43　○ソ　　イ，遠藤泰志　(東京工科大学)

1B2a15　Development of methods for purification of plant sphingolipids, glycosylinositol phosphoceramide and phytoceramide 1-phosphate
11:54　○Rumana YESMIN HASI，Mokoto MIYAGI，Takashi KIDA，Tatsuya FUKUTA，Kentaro KOGURE，Tamotsu TANAKA　(Tokushima Univ. Grad. Sch. of Biomed. Sci.)

B2 会場　午後の部（13:50～16:55）

食品―食品化学 - タンパク質，アミノ酸―

p01～p05 発表者の接続時間 13:40～13:50

1B2p01　ミオシン重鎖における transglutaminase 反応領域の網羅的探索
13:50　○三根健太郎，小南友里，渡邊壮一，潮　秀樹　(東大院農)

1B2p02　乳のアルカリ条件における加熱凝乳機序
14:01　○寺内広行[1]，岡　大貴[2]，野口智弘[3]，高野克己[2]　([1]東京農大院農・農化，[2]東京農大応生・農化，[3]東京農大応生・食加技セ)

1B2p03　ペクチンとの複合体化による β-ラクトグロブリンの高機能化
14:12 ○影山　廉，加藤七菜子，好田　正，服部　誠（東農工大農）

1B2p04　鶏卵卵白加熱ゲル形成におけるシステイン残基の加熱挙動
14:23 ○小山翔大[1]，岡　大貴[2]，辻井良政[2]，野口智弘[3]，半田明弘[4]，高野克己[2]（[1]東農大院農・農化，[2]東農大応生・農化，[3]東農大応生・食加技セ，[4]キユーピー株式会社）

1B2p05　乾燥卵白可溶性凝集体の加熱挙動
14:34 ○根本裕子[1]，小山翔大[1]，岡　大貴[2]，辻井良政[2]，半田明弘[3]，野口智弘[4]，高野克己[2]（[1]東京農大院農・農化，[2]東京農大応生・農化，[3]キユーピー(株)・研究開発本部，[4]東京農大応生・食加技セ）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:55

1B2p06　ハチミツは豆乳タンパク質を凝集させる
14:55 ○西澤果穂，久保　茜，佐藤　瞳，城山彩奈，有井康博（武庫川女子大学）

1B2p07　尿素可溶性が異なる豆腐様沈殿の形成に重要な因子の決定
15:06 ○有井康博，香川千尋，番匠志帆，陶器宏美，長島裕子，西あゆみ，西尾朋子，西澤果穂（武庫川女子大学）

1B2p08　カルボキシメチルセルロースとの複合体化による β-コングリシニンの機能改変
15:17 ○石塚美咲，田中　綾，好田　正，服部　誠（東農工大）

1B2p09　メイラード反応を利用した低メトキシペクチンとの複合体化による β-コングリシニンの機能改変
15:28 ○図師奈緒子，根上　拓，好田　正，服部　誠（東農工大）

1B2p10　大豆 7S グロブリンの α' サブユニットのエクステンション領域におけるエピトープ構造の解析
15:39 ○前田紘夢[1]，佐藤さくら[2]，海老澤元宏[2]，丸山伸之[1]（[1]京大院農，[2]相模原病院）

p11〜p15 発表者の接続時間 15:50〜16:00

1B2p11　冷凍パンの生地物性に及ぼす凍結と酵母の影響
16:00 ○三井悠河[1]，岡　大貴[2]，野口智弘[3]，髙野克己[2]（[1]東京農大院農・農化，[2]東京農大応生・農化，[3]東京農大応生・食加技セ）

1B2p12　小麦登熟過程中の内在プロテインジスルフィドイソメラーゼによるジスルフィド結合形成の挙動解析
16:11 ○小澤佳祐[1]，西堀史也[2]，岡　大貴[3]，野口智弘[2]，高野克己[3]（[1]東京農大院農，[2]食加技セ，[3]東京農大応生）

1B2p13　LOX 添加によるグルテニンサブユニット構成変化メカニズムの解明
16:22 ○久保田淳平[1]，菅原紘貴[2]，白石　玲[2]，夏目　亮[3]，椎葉　究[1,2]（[1]東京電機大学理工学部，[2]東京電機大学理工学研究科，[3]東京電機大学工学研究科）

1B2p14　X 線・中性子小角散乱によるグリアジン／グルテニン複合体の集合構造解析
16:33 ○佐藤信浩，裏出令子，守島　健，井上倫太郎，杉山正明（京大複合研）

1B2p15　純水抽出小麦グリアジンとエタノール抽出小麦グリアジンの機能特性の比較
16:44 ○小林隼斗[1]，中村華恵[1]，殿島利奈[1]，阿部竜典[1]，山口勇将[1]，赤尾　真[1]，二宮和美[2]，熊谷　仁[2]，裏出令子[3]，熊谷日登美[1]（[1]日大・生資科，[2]共立女子・家政，[3]京大・複合研）

B3 会場　午前の部(9:00〜12:05)

食品―食品機能・栄養 - その他／食品工学 - その他／食品工学 - 製造工学，加工学／食品工学 - 物性，分析―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

1B3a01　酒粕甘酒の機能性成分の探索　〜アミノ酸とレジスタントスターチの機能性〜
9:00 ○冨田麻理絵，根来宏明，堤　浩子，秦　洋二（月桂冠(株)）

1B3a02　塩ストレス下で生育したトマト果実中のトランスクリプトーム解析
9:11 ○朝倉浩子，山川　隆，阿部啓子，朝倉富子（東大院農生科）

1B3a03　トランスサイレチン安定化作用を持つカルノシン酸の機能解析
9:22 ○海切弘子[1]，谷本　暁[1]，柴田紗知[2]，味八木茂[3]，松原主典[1]（[1]広島大院・教育，[2]福山大・生命工，[3]広島大病院・未来医療センター）

1B3a04　オートファジー活性を制御する食品成分の探索
9:33 ○藤元　萌，大西康太，坂井麻衣子，福田哲平，大西愛花，増田真志，奥村仙示，河合慶親，竹谷　豊（徳大医）

1B3a05　ローズマリーの加熱処理によって生成された新規化合物の構造解析と生理活性について
9:44 ○酒見裕香[1]，Bu-chin Yu[2]，濱島留梨子[1]，森岡優子[1]，山中大介[3]，伯野史彦[2]，高橋伸一郎[2]，新藤一敏[1]（[1]日女大・家政・食物，[2]東大・院農生・応物，[3]東大・院農生・獣医）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

1B3a06　瀬戸内海沿岸で養殖されたマガキ含有成分の解析および機能性の検討
10:05 礒野千晶[1]，丸田ひとみ[1]，三宅剛史[2]，我如古菜月[1]，花田恭孝[3]，○山下広美[1]（[1]岡山県大，[2]岡山県工業技術センター，[3](株)マルト水産）

1B3a07　ビールのドリンカビリティ新規評価技術の構築
10:16 ○脇平崇浩[1]，宮下聖子[1]，小林　稔[1]，上村和彦[1]，Schlich Pascal[2]（[1]アサヒビール株式会社，[2]INRA, France）

1B3a08　ビールの「飲みやすさ」に及ぼすキレ寄与成分の影響
10:27 ○宮下聖子，脇平崇浩，小林　稔，上村和彦（アサヒビール株式会社）

1B3a09　様々な魚肉を用いたさつま砂糖漬け製法の有用性評価
10:38 ○福田　翼，小林聡子，辰野竜平，古下　学（水産機構・水大校）

1B3a10　筋芽細胞モジュールの積層による培養肉の構築
10:49 ○古橋麻衣[1,2]，森本雄矢[2]，島　亜衣[2]，仲村太志[1]，石川　博[3]，竹内昌治[2]（[1]日清食品HD(株)グローバルイノベーション研究センター，[2]東京大学生産技術研究所，[3]筑波大学医学医療系）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

1B3a11　界面活性剤を利用して作製したポリ乳酸製濾過膜の濾過特性
11:10 ○田中孝明，民部裕洋，水野陽樹，渋谷裕紀，落合秋人，谷口正之（新潟大）

1B3a12　ゲル状食品の力学的特性とテクスチャー評価
11:21 ○鬼島直子[1]，砂押　諒[2]，真坂知克[2]，石川大太郎[2]，藤井智幸[2]（[1]東北大未来研，[2]東北大院農）

1B3a13　凍結・解凍に伴う魚肉タンパク質ゲルの状態変化の解析
11:32 ○門田佳奈，石川大太郎，藤井智幸（東北大院農）

1B3a14　分光学的手法を用いた物理的変換操作による米粉の構造変化解明に関する研究
11:43　○石川大太郎，澤いくみ，楊　嘉敏，藤井智幸　（東北大院農）

1B3a15　5つの基本味溶液嚥下時における表面筋電図と嗜好性の関連解析
11:54　○梅谷華奈[1]，上田玲子[1]，小西史子[2]，安岡顕人[1]，阿部啓子[1,3]，朝倉富子[1]　([1]東大院・農生科，[2]女子栄養大・栄，[3]KISTEC）

B3 会場　午後の部（13:50〜16:55）

食品―食品機能・栄養 - その他／食品機能・栄養 - 消化・吸収，循環・血管―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:40〜13:50

1B3p01　クロロゲン酸摂取による非アルコール性脂肪性肝疾患抑制機序に関する研究
13:50　○渡邉衛央，橋本堂史　（神戸大院・農）

1B3p02　熟成ニンニク抽出液（AGE）によるアルコール代謝促進効果の検証
14:01　○井上雅子[1]，袁　思豪[1]，北風智也[2]，吉岡泰淳[3]，芦田　均[1]　([1]神戸大院農，[2]神戸大院イノベ，[3]甲南女子大）

1B3p03　鮒ずし由来乳酸菌 FS-1 投与による高スクロース食摂取ラットの脂質代謝および便通への影響
14:12　○内田健志[1]，冠野由衣[2]，藤谷美菜[2]，岸田太郎[2]　([1]日本水産株式会社　食品機能研，[2]愛媛大院農）

1B3p04　鮒ずし由来乳酸菌 FS-1 株の免疫賦活による感染症予防効果
14:23　○篠原日菜子[1]，阿久津歩夢[1]，吉田恵里子[2]，内田健志[2]，韓　力[2]，水重貴文[3]，蕪山由己人[3]　([1]宇都宮大農，[2]日本水産株式会社，[3]宇都宮大学学術院）

1B3p05　機能性大麦 BARLEYmax（*Tantangara*）の抗肥満効果と腸内細菌叢との関係
14:34　○野村直生[1]，西村　文[1]，三好孝則[1]，北薗英一[1]，森田英利[2]，松井輝明[3]　([1]帝人株式会社　ヘルスケア新事業部門，[2]岡山大学大学院　環境生命科学研究科，[3]帝京平成大学　健康メディカル学部　健康栄養学科）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:55

1B3p06　食餌脂肪の質の違いがフルクトオリゴ糖摂取ラットの大腸 ALP 活性誘導と腸内環境変動に及ぼす影響
14:55　○岡崎由佳子，粟津瑠姫，木村李華，小檜山聖佳　（藤女子大・人間生活）

1B3p07　グア豆由来水溶性食物繊維は便秘自閉症スペクトラム障害（ASD）児の腸内環境を改善し，ASD 併存症状を緩和する
15:06　○井上　亮[1]，阪上由子[2]，河田祐樹[1]，玉置竜士[1]，安川然太[3]，小関　誠[3]，澤井ちひろ[2]，上羽智子[4]，野々村和男[4]，塚原隆充[5]，内藤裕二[6]　([1]京都府立大学，[2]滋賀医科大学，[3]太陽化学，[4]守山市民病院，[5]栄養病理学研究所，[6]京都府立医科大学）

1B3p08　小麦ファイバーサプリメント摂取による腸内環境への効果
15:17　○松崎光ノ介[1]，岩井克機[1]，三好規之[1]，平本　茂[2]，前川智宏[2]，大橋典男[1]　([1]静岡県立大・食品栄養，[2]日清ファルマ）

1B3p09　*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* GCL2505 とイヌリンによる腸内ビフィズス菌数増加効果の検証
15:28　○安澤大輔，馬渡隆志，田中祥之，山本実央，源田知美，高橋将太，西嶋智彦，釜阪　寛，栗木　隆　（江崎グリコ株式会社）

1B3p10　冠動脈疾患患者大腸フローラモデルによる候補投与物の調査
15:39　○佐々木建吾[1]，吉田尚史[2]，佐々木大介[1]，大澤　朗[3]，山下智也[2]，近藤昭彦[1]　([1]神戸大・科学技術イノベ，[2]神戸大・医，[3]神戸大・農）

p11〜p15 発表者の接続時間 15:50〜16:00

1B3p11　バジルシードガム摂取による DSS 誘導性大腸炎の抑制効果について
16:00　○島田龍太郎，橋本堂史　（神戸大学大学院農学研究科）

1B3p12　ヒト介入試験における黒大豆の血管機能に及ぼす効果
16:11　○山下陽子[1]，仲村明日賀[1]，王　柳青[1]，堂前千晶[1]，難波文男[2]，齋藤　静[2]，鈴木利雄[2]，三樹文男[3]，芦田　均[1]　([1]神大院農，[2]フジッコ(株)，[3](有)ベーカリーミキ）

1B3p13　黒大豆ポリフェノールは一酸化窒素産生を促進して，血管機能を向上させる
16:22　○堂前千晶[1]，難波文男[2]，鈴木利雄[2]，芦田　均[1]，山下陽子[1]　([1]神戸大院農，[2]フジッコ株式会社）

1B3p14　梨幼果抽出成分が出芽酵母の寿命延長およびその関連遺伝子の発現に及ぼす影響
16:33　○長谷川真梨菜[1]，藤井雄三[1]，藤田憲一[2]，田中俊雄[2]，荻田　亮[2,3]，村田和加惠[1]　([1]米子高専物質，[2]阪市大院 理，[3]阪市大健康研セ）

1B3p15　スルフォラファンによるパラベン類の抗菌作用の増幅効果
16:44　○村田和加惠[1]，岩敷里奈[1]，藤田憲一[2]，田中俊雄[2]，荻田　亮[2,3]　([1]米子高専物質，[2]阪市大院理，[3]阪市大健康研セ）

B4 会場　午前の部（9:00〜12:05）

食品―食品機能・栄養 - 酸化，抗酸化，糖化，抗糖化，老化／食品機能・栄養 - 神経，内分泌，味覚・食欲―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

1B4a01　ヒドロキシルラジカルによるリポソーム系の酸化反応に対する *α*-トコフェロールと各種抗酸化物の併用効果
9:00　○南　育子，梅田あゆみ，小林弘司，石川洋哉　（福岡女子大学　国際文理）

1B4a02　高麗人参摂取ヒト血清の ESR スピントラップ法（MULTIS 法）による抗酸化能評価と人参サポニン代謝解析
9:11　○三原憲一[1]，巽　裕希[2]，小林慧子[3]，南山幸子[3]，市川　寛[2]　([1]金氏高麗人参(株)品質保証・研究開発室，[2]同志社大学大学院生命医科学研究科，[3]京都府立大学大学院生命環境科学研究科）

1B4a03　グルコース-6-リン酸脱水素酵素を用いた，化合物のプロオキシダント能および抗酸化能の簡便な評価
9:22　○黒川洋一，伊佐純一，三浦歩馬　（福井県大生物資源）

1B4a04　ベビーリーフの酸素ラジカル消去能（ORAC）および総ポリフェノール 量の年次変動の解明
9:33　○武波洋志[1,2]，恩田浩幸[3]，石川(高野)祐子[2]　([1]茨城大院農，[2]農研機構食研，[3]エスビー食品）

1B4a05　酒粕加水分解物の細胞内グルタチオン上昇作用
9:44　○川上賀代子[1]，新崎由樹[1]，守谷智恵[1]，花房　満[2]，畑中唯史[3]，坪井誠二[1]　([1]就実大薬，[2](株)室町酒造，[3]岡山生物研）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

1B4a06　妊娠・授乳期のコーヒー摂取が子供に与える影響
10:05　○石川春奈，山本和史，都築　毅　（東北大院農）

1B4a07　テロメラーゼをターゲットとした新規発毛成分の探索
10:16　○片倉喜範，松尾花佳　（九大院シス生）

1B4a08　植物発酵液 SW の美白効果に関する機能性の解析
10:27　○田中瑞穂[1]，本藤和彦[2]，及川哲志[3]，松井　彩[3]，大野あぐり[3]，山下慎一郎[1]，原　太一[3]　([1]株式会社オルトメディコ，[2]八雲香産株式会社，[3]早稲田大学 人間科学学術院健康福祉科学科 細胞制御学・食品生命科学研究室）

1B4a09　タチバナ抽出物の皮膚炎症に対する抑制効果
10:38　○渡辺章夫[1]，小林桃佳[2]，佐藤美穂[3]，米澤貴之[1]，禹　済泰[3]　([1]中部大生機研，[2]中部大応生院，[3]中部大応生）

1B4a10　青森県津軽地域伝統野菜「そばもやし」の生理機能性に関する研究
10:49　○岩間直子[1]，小堀真珠子[2]　([1]青森産技セ弘前工研，[2]農研機構食品研究部門)

a11～a15 発表者の接続時間 11:00～11:10

1B4a11　血圧がゲニポシド酸の心房性ナトリウム利尿ペプチド分泌に与える影響
11:10　○高橋伶仁[1]，杉万　直[2]，細尾信悟[2]，平田哲也[2]，山口康代[2]，山崎寛生[2]，山口翔平[1]，南野直人[3]，中村浩蔵[1]　([1]信州大農，[2]小林製薬株式会社，[3]国立循環器病研究センター)
1B4a12　テレメトリー法を用いた抗ストレス成分の自律神経，血圧調節作用評価
11:21　○早坂柚実，高橋佑介，山口翔平，中村浩蔵　(信州大農)
1B4a13　正常血圧ラットにおける経口摂取アセチルコリンによる降圧作用
11:32　○坂本希加子，松本健督，早坂柚実，高橋佑介，中村浩蔵　(信州大農)
1B4a14　酸化食用油によるインスリンシグナル伝達抑制と細胞死誘導
11:43　○上野有紀[1]，川本善之[2]，大澤俊彦[1]　([1]愛知学院大心身科学，[2]中部大生命健康科学)
1B4a15　ファージディスプレイ法を用いた過酸化脂質修飾タンパク質抗体の作製
11:54　○阿南優佑，佐々木栄太，板倉正典，内田浩二　(東大院農生科)

B4 会場　午後の部(13:50～16:55)

食品―食品機能・栄養 - 酸化，抗酸化，糖化，抗糖化，老化／食品機能・栄養 - 神経，内分泌，味覚・食欲―

p01～p05 発表者の接続時間 13:40～13:50

1B4p01　細胞老化におけるタンパク質恒常性異常の解析
13:50　○藤井紗恵莉[1]，高氏裕貴[2,3]，藤井道彦[1,2]　([1]横浜市大国際総合，[2]横浜市大生命ナノシステム，[3]イチバンライフ(株))
1B4p02　包括的ペプチド利用による動脈弛緩反応の加齢による変容の解明
14:01　○小山大貴，孫　星恵，松村成暢，井上和生，大日向耕作　(京都大学)
1B4p03　「EGCG による抗加齢タンパク質 SMP30 の発現制御機構」
14:12　○荒川航太，井上博文，勝間田(坪井)理恵，高橋信之，上原万里子　(東農大農)
1B4p04　高麗人蔘のアンチエイジング効果について
14:23　○沢辺昭義[1,2]，山下敦之[2]，山中咲樂[1]，藤平峻弘[1]，大西夏実[2]，竹田竜嗣[3]，藤田佳孝[4]　([1]近畿大農，[2]近畿大院農，[3]関西福祉科学大・健康福祉，[4]王子食品(株))
1B4p05　摘果柿に含まれる機能性成分の有効利用
14:34　○大西夏実[1]，和田瑞彩[2]，井上美穂[2]，飯田　彰[1,2]，澤邊昭義[1,2]　([1]近畿大院農，[2]近畿大農)

p06～p10 発表者の接続時間 14:45～14:55

1B4p06　フェルラ酸は Nrf2 活性化を介して Aβ 誘導性細胞死および tau リン酸化亢進を抑制する
14:55　○梅田将実[1]，石橋実学[2]，原　　崇[1]，池内　健[3]，城斗志夫[1]，中村澄子[4]，西澤正豊[3]，山崎　彬[5]，小林　篤[5]，大坪研一[4]　([1]新潟大農，[2]新潟大院自然科学，[3]新潟大脳研，[4]新潟薬大応用生命，[5]越後製菓)
1B4p07　シアニジン分解物のアミロイドβ誘導性神経細胞死抑制効果
15:06　○石橋実学[1]，梅田将実[2]，原　　崇[2]，池内　健[3]，中村澄子[4]，城斗志夫[2]，西澤正豊[3]，山崎　彬[5]，小林　篤[5]，大坪研一[4]　([1]新潟大院自然科学，[2]新潟大農，[3]新潟大脳研，[4]新潟薬大応用生命，[5]越後製菓)
1B4p08　黒米糠の経口投与による老齢マウス脳組織における tau リン酸化抑制
15:17　○原　　崇[1]，石橋実学[2]，池内　健[3]，金古堅太郎[1]，中村澄子[4]，城斗志夫[1]，西澤正豊[3]，三ツ井敏明[1]，山崎　彬[5]，小林　篤[5]，大坪研一[4]　([1]新潟大農，[2]新潟大院自然科学，[3]新潟大脳研，[4]新潟薬大応用生命，[5]越後製菓)
1B4p09　カルノシンによる筋脳相関活性化とその分子基盤
15:28　○尾上詩織[1]，佐藤三佳子[2]，片倉喜範[3]　([1]九大院・システム生，[2]日本ハム・中研，[3]九大院・農院)
1B4p10　投与タイミングの違いが生理的濃度のルテオリンによる Nrf2 の活性化に与える影響
15:39　○北風智也[1]，牧山敦志[2]，山下陽子[2]，芦田　均[2]　([1]神戸大院・科技イノベ，[2]神戸大院・農)

p11～p15 発表者の接続時間 15:50～16:00

1B4p11　スピラントールによる塩味増強効果の作用機構の解明に関する研究
16:00　○早坂健史[1]，白川　仁[1]，庄司靖隆[2]，宮澤利男[2]，駒井三千夫[1]　([1]東北大院農，[2]小川香料株式会社)
1B4p12　カルシウム単回経口投与による消化管ホルモン分泌を介した食欲抑制作用機構の検討
16:11　○小笠原奨之，比良　徹，原　　博　(北海道大院・農)
1B4p13　腸管オルガノイドと生体腸組織における内分泌細胞の比較
16:22　○大木淳子[1,2]，坂下陽彦[3]，稲葉明彦[2]，栗飯原永太郎[4]，内山博允[5]，松本征仁[6]，二ノ宮裕三[7,8]，山根拓実[2]，大石祐一[2]，岩槻　健[2]　([1]つく国大医，[2]東農大応生，[3]シンシナティ小児病院，[4]シンシナティ大，[5]東農大ゲノムセンター，[6]順天堂大医，[7]九大五感，[8]モネルセンター)
1B4p14　糖質制限食の長期摂取が腸内細菌叢や寿命に与える影響
16:33　○山本和史，巫　啓明，都築　毅　(東北大院・農)
1B4p15　空腹による味覚の嗜好・忌避性を制御する外側視床下部神経回路の解析
16:44　○傅　　欣[1,2]，岩井　優[1]，三坂　巧[1]，箕越靖彦[2]，中島健一朗[2]　([1]東大農・応生化，[2]生理学研究所)

B5 会場　午前の部(9:11～11:54)

食品―食品機能・栄養 - 免疫，炎症，アレルギー・アレルゲン―

a02～a05 発表者の接続時間 9:01～9:11

1B5a02　マクロファージの自然免疫機能に対するハマナス果実の増強効果
9:11　○小倉エレン，足立卓哉，南　和広，相根義昌，伊藤　実，丹羽光一　(東農大食品香粧)
1B5a03　Toll-like receptor を介した野沢菜によるマクロファージの活性化
9:22　○田中沙智，髙橋楓香　(信大農)
1B5a04　*Pediococcus acidilactici* K15 株のヒトプラズマサイトイド樹状細胞に対する効果
9:33　○碇　菜穂[1]，川島忠臣[1]，久保田芳郎[2]，下条直樹[3]，辻　典子[4]　([1]キッコーマン(株)研究開発本部，[2]キッコーマン(株)キッコーマン総合病院，[3]千葉大院　医学研究院　小児病態学，[4]産総研　バイオメディカル研究部門)
1B5a05　特異に分岐したニシヨモギ由来ペクチンの 2,3 の活性
9:44　○田幸正邦[1,2]，田場日和[2]，北島聖子[2]，与儀琢也[2]，小西照子[2]　([1]健康長寿科研，[2]琉球大農生資科)

a06～a10 発表者の接続時間 9:55～10:05

1B5a06　光センシングによる簡便な未病マーカーの開発
10:05　○數村公子[1]，波多野薫子[1]，玻名城隼[2]，川西寿美[2]，美和登志幸[1]，服部将貴[3]，竹内康造[1]，稲川裕之[2,4]，杣源一郎[2,4]，大澤俊彦[5]　([1]浜松ホトニクス・中研，[2]自然免疫技組，[3]浜松ホトニクス・GSCC，[4]新潟薬大・健康自立，[5]愛知学院大・心身)

1B5a07　ユーグレナおよびパラミロンの特異的抗体産生への影響
10:16　○中島綾香[1]，石塚幹菜[2]，安田光佑[1]，帖佐圭佑[1]，鈴木健吾[1]，後藤康之[2]　([1]株式会社ユーグレナ，[2]東京大学大学院農学生命科学研究科)

1B5a08　食品コウジカビの経口投与による NOD マウスの Th1 応答増強効果
10:27　○宇田佳功[1]，北爪里欧[1]，内田妃音[1]，関口昭博[2]，榎本　淳[1,3]　([1]群大院理工，[2]群馬産技セ，[3]群大食健康セ)

1B5a09　ハニーブッシュ抽出物が脾臓細胞における sIgA 産生に及ぼす影響の解析
10:38　○増田美咲，村松真由子，三浦　豊　(東農工大農)

1B5a10　フラクトオリゴ糖摂取による血中および腸管の部位ごとの IgA 産生の特徴
10:49　○宇野直哉，津田真人，細野　朗，小島菜月，渡辺裕文　(日本大学生物資源科学部)

a11〜a14 発表者の接続時間 11:00〜11:10

1B5a11　ロイコ菌 M048 株摂取における唾液中 s-IgA 分泌促進効果に関するプラセボ対照二重盲検比較試験
11:10　○山本悠太，杉田　玄，川嶋秀治，山岸直子，平岡政信，武田早織，保富宗城　(和医大医)

1B5a12　免疫調整機能を有する味噌由来 *Tetragenococcus halophilus*
11:21　○熊澤利彦[1,2]，西村篤寿[1]，浅井紀之[1]，安達貴弘[2]　([1]イチビキ(株)，[2]東京医科歯科大・難研)

1B5a13　大腸 GALT の胚中心形成と制御性 T 細胞誘導における恒常的な腸内細菌叢と MyD88 シグナルの役割
11:32　○小島菜月[1]，津田真人[1]，渡邉裕文[1]，宇野直哉[1]，石濱文也[1]，八村敏志[2]，高橋宜聖[3]，高橋恭子[1]，上野川修一[1]，細野　朗[1]　([1]日大生資科，[2]東大院農生科・食の安全研セ，[3]感染研・免疫)

1B5a14　腸内細菌由来菌体成分が結腸を介して腸管免疫系細胞応答に与える影響
11:43　○渡邊裕文[1]，津田真人[1]，小島菜月[1]，宇野直哉[1]，高橋恭子[1]，高橋宜聖[2]，細野　朗[1]　([1]日大・生資科，[2]感染研・免疫)

B5 会場　午後の部(13:50〜16:55)

食品―食品機能・栄養 - 免疫，炎症，アレルギー・アレルゲン／食品機能・栄養 - 癌，抗癌―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:40〜13:50

1B5p01　短鎖脂肪酸はマスト細胞のアレルギー性応答を抑制する
13:50　○三浦亮介，藤垣　泉，飯塚雄輝，蔭山あづさ，笠倉和巳，八代拓也，西山千春　(東理大基礎工)

1B5p02　腸内細菌によるマスト細胞の顆粒形成関連分子の発現抑制
14:01　○池谷彩花[1]，高野真衣[1]，笠倉和巳[1,2]，中西祐輔[1]，花澤重正[1]，高橋恭子[1]　([1]日大生資，[2]ラ・ホヤアレルギー免疫研究所)

1B5p03　酪酸は腸管上皮細胞における α-ディフェンシン 5 の発現を増強させる
14:12　○宮下采佳[1]，杉　由高[1,2]，中田一彰[1]，中西祐輔[1]，花澤重正[1]，高橋恭子[1]　([1]日本大学生物資源科学部，[2]協同乳業株式会社)

1B5p04　腸内細菌によるマスト細胞の IgE 受容体発現抑制とその機構
14:23　○深津咲乃，池谷彩花，田中大智，亀井理佐，永田志帆，中西祐輔，高橋恭子　(日大生物資源)

1B5p05　腸管上皮における低分子量 GTP アーゼ ARF4 の役割
14:34　○中田一彰，中西祐輔，津田真人，細野　朗，高橋恭子　(日本大学生物資源科学部)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:55

1B5p06　ザクロポリフェノールと大豆イソフラボンによる接触過敏症抑制効果
14:55　○長野隆男[1]，伊東秀之[2]　([1]石川県大食品，[2]岡山県大栄養)

1B5p07　低分子化ホエイプロテインを用いたウシ乳房炎に対する治療剤の開発
15:06　○田坂　徹[1,3]，前橋克彦[2]，井土侑香[1]，山田久嗣[1]，鵜沼英樹[3]，徳永　彦[3]，早川明夫[3]，呉　明輝[3]，呉　貴卿[4]，宇都義浩[1]　([1]徳島大学大学院社会産業理工学研究部，[2]NOSAI徳島，[3]株式会社皇漢薬品研究所，[4]呉クリニック)

1B5p08　1-Deoxynojirimycin による抗炎症作用の解析
15:17　○本田瑞希[1]，亀井飛鳥[2]，相田美緒[3]，薩　秀夫[3]　([1]前工大院・工，[2]KISTEC，[3]前工大・工)

1B5p09　マクロファージに対するシネフリンの抗炎症効果
15:28　○石田萌子，竹國千尋，西　甲介，菅原卓也　(愛媛大学院農)

1B5p10　SEA による JAK/STAT 系活性化機構およびカテキン類によるその抑制メカニズムの解析
15:39　○黒川亜美[1]，島村裕子[1]，伊藤創平[1]，菅　敏幸[2]，大橋典男[1]，増田修一[1]　([1]静岡県大院・薬食生命，[2]静岡県大・薬)

p11〜p15 発表者の接続時間 15:50〜16:00

1B5p11　香料シトラールの突然変異抑制機構に関する構造解析
16:00　○柴田陶子，加賀谷洋太，石垣美晴，佐藤綺海，藤島直太，髙橋優太，遠藤金吾　(秋田高校)

1B5p12　赤シソ由来メトキシフラバノン PDMF の細胞老化誘導作用とその分子機構
16:11　○前田　陽[1]，平川規子[2]，馬場堅治[2]，河本正次[1]　([1]広島大院・先端・生命機能，[2]三島食品株式会社・研究所)

1B5p13　がん細胞多剤耐性に及ぼす酵素消化低分子化フコイダン抽出物の効果
16:22　○大河内公一[1]，江藤　博[2]，照屋輝一郎[1,3]　([1]九大院生資環，[2]第一産業(株)，[3]九大院農院)

1B5p14　肺癌マウスモデルにおけるヒメマツタケ抽出物の免疫チェックポイント阻害作用
16:33　○原田栄津子[1,2]，コリナダレッサンドロ・ガバザ[2]，森園智浩[1]，安間太郎[2]，戸田雅昭[2]，ガバザエステバン[2]　([1]岩出菌学研究所，[2]三重大医)

1B5p15　マイクロ RNA Let-7b を介したデルフィニジンの抗メラノーマ作用
16:44　○村田　希[1,2]，山田脩平[2]，立花宏文[2]　([1]愛媛大・ADRES，[2]九大院農院・生機科)

C1 会場　午前の部(9:00〜12:05)

微生物―代謝 - 代謝調節，発酵生理，メタボローム―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

1C1a01　解糖系とペントースリン酸経路のフラックス比がメバロン酸の生産に及ぼす影響
9:00　鎌田健太郎，○戸谷吉博，清水　浩　(阪大院・情報)

1C1a02　光照射による大腸菌の中心代謝経路のフラックス制御
9:11　○タンダルセバスティアントミ[1]，妹尾幸枝[2]，戸谷吉博[2]，清水　浩[2]　([1]大阪大学，[2]大阪大学大学院情報科学研究科)

1C1a03　大腸菌の炭素源シフトにおけるオーバーフロー代謝の役割
9:22　○田中　寛[1]，太刀川智之[2]，丹羽達也[1]，田口英樹[1]，斎藤菜摘[3]，島田友裕[4]　([1]東工大研究院，[2]東工大生命理工学院，[3]鶴岡高専，[4]明大農)

1C1a04　新規 L-グルコース資化細菌の単離とその代謝機構の解析
9:33　○谷内田優史，中村　顕　(筑波大 生命環境)

1C1a05　放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3（2）M145 株における低分子化合物の生理学的意義
9:44　○澁井佑生子，佐藤　眸，小川翔太，伊藤晋作，矢嶋俊介，佐々木康幸　（東農大バイオ）

a07〜a10 発表者の接続時間 10:06〜10:16

1C1a07　電極を電子受容体とした微生物アンモニア酸化反応の検討と機構解析
10:16　○齋藤淳貴[1]，橋本和仁[2]，岡本章玄[3]　（[1]東大工，[2]物材研，[3]センサ・アクチュエータ研究開発センター，物材研）

1C1a08　Electrochemical Techniques for Investigating the Isolation and Characterization of Human Gut Bacteria Capable of Extracellular Electron Transport
10:27　○Waheed MIRAN[1]，Divya NARADASU[1,2]，Akihiro OKAMOTO[1,3]　([1]International Center for Materials Nanoarchitectonics（WPI-MANA），National Institute for Materials Science（NIMS），[2]Department of Advanced Interdisciplinary Studies, Rcast, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, [3]Center for Functional Sensor & Actuator, National Institute for Materials Science（NIMS））

1C1a09　Enhancement of synergetic current generation with conductive iron sulphide nanoclusters biomineralized by the Sulphate reducing bacteria（SRB）
10:38　○Muralidharan MURUGAN[1,2]，Akihiro OKAMOTO[1,2,3]　([1]International Center for Materials Nanoarchitectonics（WPI-MANA），National Institute for Materials Science（NIMS），[2]Graduate School of Chemical Sciences and Engineering, Hokkaido University, [3]Center for Functional Sensor & Actuator, National Institute for Materials Science（NIMS））

1C1a10　ユーグレナ油脂生産における硫黄に関する副次的反応の解明
10:49　○山田康嗣[1,2]，新多智明[1]，阿閉耕平[1,2]，城山真恵加[3]，井上小槙[4]，樋口千恵子[1]，新田伸子[1]，大城　聡[5]，持田恵一[2,4,6,7]，岩田　修[1,2]，大津　巌[1,3]，鈴木健吾[1,2]　([1]ユーグレナ，[2]理研BTZ，[3]筑大，[4]理研CSRS，[5]沖縄工専，[6]横市大，[7]岡大）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

1C1a11　*Aspergillus niger* 菌糸を利用したシアン非感受性呼吸系阻害剤の探索
11:10　○松浦貴大，吉岡育哲，桐村光太郎　（早大・先進理工・応化）

1C1a12　コリネ型細菌における RNase III の発現制御解析
11:21　○澤　誠人[1,2]，田中裕也[2]，乾　将行[1,2]　([1]奈良先端大・バイオ，[2]RITE）

1C1a13　コリネ型細菌における転写因子 AnsR によるアスパラギン代謝オペロンの発現制御機構の解析
11:32　○菅谷理貴[1,2]，豊田晃一[2]，須田雅子[2]，平賀和三[2]，乾　将行[1,2]　([1]奈良先端大・バイオ，[2]RITE）

1C1a14　コリネ型細菌における CRISPR - Cas9 システムを使った物質生産株構築のためのゲノム編集法の開発
11:43　○小澤　輝[1]，久保田健[2]，須田雅子[2]，乾　将行[1,2]　([1]奈良先端科学技術大学院大学，[2]RITE）

1C1a15　スピルリナ（*Arthrospira platensis*）での 15N 部分置換状態におけるタンパク質ターンオーバーの数理モデリング
11:54　川端優裕，○上林将大，小南友里，渡邊壮一，潮　秀樹（東大院農）

C1 会場　午後の部（13:50〜16:55）

微生物―細胞 - 栄養，生育，増殖―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:40〜13:50

1C1p01　*Aspergillus niger* E-1 株のペレット形態に与えるクオラムセンシング分子の影響解析
13:50　○小原　賢[1]，村上周一郎[2]　([1]明治大院農，[2]明治大農）

1C1p02　モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* の GPI アンカー型 α-アミラーゼ AgtA による細胞壁多糖 α-1,3-グルカンの分子量制御
14:01　山下雄章[2]，宮澤　拳[2]，○吉見　啓[1]，小泉亜未[2]，矢野成和[3]，佐野元昭[4]，阿部敬悦[1,2]　([1]東北大・未来研，[2]東北大院・農，[3]山形大院・工，[4]金沢工大・ゲノム研）

1C1p03　麹菌 *Aspergillus oryzae* の液体振盪培養における菌糸塊形成メカニズムの解析
14:12　○宮澤　拳[1]，吉見　啓[2]，矢野成和[3]，佐野元昭[4]，阿部敬悦[1,2]　([1]東北大院・農，[2]東北大・未来研，[3]山形大院・工，[4]金沢工大・ゲノム研）

1C1p04　米麹におけるコウジカビの破精込みの蛍光イメージング解析
14:23　○安井瑞稀[1]，高谷直樹[1]，丸山潤一[2]，竹下典夫[1]　([1]筑波大生命環境，[2]東京大応生工）

1C1p05　マイクロ流体デバイスを用いた糸状菌の菌糸の屈性と可塑性の解析
14:34　○福田紗弓[1]，島宗悠太郎[2]，横川雅俊[2]，ウタダアンドリュー[1]，柳沢直樹[3]，高谷直樹[1]，佐藤良勝[3]，竹下典男[1]　([1]筑波大・生命環境，[2]数理物質系，[3]名古屋大・ITbM）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:55

1C1p06　微生物の自家蛍光シグネチャーを用いた一細胞の生理状態変化の可視化
14:55　○川村優樹[1]，平山智弘[2]，渡辺宏紀[1]，清川達則[1]，高部響介[3]，野村暢彦[3]，八幡　穣[3]　([1]筑波大学大学院・生命環境科学研究科，[2]筑波大学・生物資源学類，[3]筑波大学・生命環境系）

1C1p07　奈良八重桜から分離されたストレス耐性酵母で観察された凝集性
15:06　○上原澪來，岩口伸一　（奈良女子大学）

1C1p08　分裂酵母における窒素カタボライト抑制解除機構に関連する因子の探索
15:17　○大澤　晋，八代田陽子，吉田　稔　（理研CSRS・ケミカルゲノミクス）

1C1p09　出芽酵母トリプトファン輸送体 Tat2 の機能と安定性に及ぼす遺伝的要因
15:28　○石井凌賀，望月貴博，阿部文快　（青山学院大理工）

1C1p10　出芽酵母の新規小胞体タンパク質 Ehg1 は高水圧下でアミノ酸輸送体を制御する
15:39　○加藤祐介[1]，黒坂豪祐[1]，望月貴博[1]，伊村咲希[1]，石田夏穂[1]，石井凌賀[1]，上村聡志[2]，阿部文快[1]　([1]青山学院大理工，[2]東北医科薬科大医）

p11〜p15 発表者の接続時間 15:50〜16:00

1C1p11　大腸菌のビスフェノール A 耐性に及ぼす薬剤排出ポンプの影響
16:00　○加賀経元，荷方稔之，酒井保藏　（宇都宮大院・工）

1C1p12　大腸菌増殖における培地成分の寄与度の学習分析
16:11　○インベイウェン，芦野一葉，菅野健太，天笠俊之　（筑波大）

1C1p13　*Pseudomonas* sp. LAB-08 株培養上清による大腸菌の一時的増殖抑制機構の解析
16:22　○本荘雅宏[1]，鈴木研志[2]，田代陽介[1]，二又裕之[1,3]　([1]静大院総合科技，[2]静大院創造，[3]静大グリーン研)

1C1p14　どのような遺伝因子がプラスミド非感受性の発揮に関与しているのか？
16:33　○河野　響[1]，上田朋美[1]，水口千穂[1,2]，岡田憲典[1]，野尻秀昭[1,2]　([1]東大・生物工学セ，[2]東大・微生物連携機構)

1C1p15　細菌が示すプラスミド“非感受性”を利用した新規宿主ベクター系開発の可能性
16:44　○上田朋美[1]，河野　響[1]，水口千穂[1,2]，岡田憲典[1]，野尻秀昭[1,2]　([1]東大・生物工学セ，[2]東大・微生物連携機構)

C2 会場　午前の部(9:00〜12:05)

微生物―細胞 - 情報伝達，細胞応答，ストレス応答―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

1C2a01　出芽酵母のリン酸飢餓誘導性オートファジーにおける Atg11 の役割の解析と特異的因子の発見
9:00　○奥村　俊，横田浩人，五味勝也，新谷尚弘　(東北大院農・生物産業創成)

1C2a02　麹菌における小胞体ストレス条件下での分泌タンパク質遺伝子の転写抑制機構の解析
9:11　○佐藤　駿[1]，杉山優子[1]，田中瑞己[2]，五味勝也[1]，新谷尚弘[1]　([1]東北大農，[2]静県大食栄)

1C2a03　Comparative functional analysis of Fus3-type MAPK cascade and scaffold HAM-5 ortholog in development and cell fusion of *Aspergillus oryzae*
9:22　○Yue Chen[1]，Takuya Katayama[1,2]，Ozgur Bayram[3]，Gerhard H. Braus[4]，Katsuhiko Kitamoto[5]，Jun-ichi Maruyama[1,2]　([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Dept. of Biol., Maynooth Univ., [4]Dept. of Mol. Microbiol. Genet., Georg-August-University Goettingen, [5]Nihon Pharmaceutical Univ.)

1C2a04　A. oryzae のシグナル伝達系 sskA と sskB の浸透圧応答に関する解析
9:33　○森本ちよの，水野克紀，佐野元昭　(金沢工大バイオ・化学)

1C2a05　糸状菌 *Aspergillus nidulans* のエルゴステール合成制御におけるプロテインキナーゼ C の果たす役割
9:44　○高城景子[1]，福嶋真輝恵[1]，福田良一[1,2]，堀内裕之[1,2]　([1]東大院・農生科，[2]東大・微生物連携)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

1C2a06　メタノール資化性酵母 *Candida boidinii* における P-body とメタノール誘導性 mRNA の細胞内動態解析
10:05　○幅田亜香莉，白石晃將，由里本博也，阪井康能　(京大農)

1C2a07　転写因子 Mxr1 による *Komagataella phaffii* のメタノール濃度に応じた遺伝子発現制御機構
10:16　○井上紘一，大澤　晋，由里本博也，阪井康能　(京大農)

1C2a08　高濃度エタノールストレスによる酵母タンパク質の変性とプロテオスタシスにおける Btn2 の関与
10:27　加藤沙枝，○井澤真吾　(京都工繊大院・応生)

1C2a09　大気圧低温プラズマによる効率的殺菌法の開発：高いストレス耐性を持つメラニン産生真菌に対する効果
10:38　○福田志津[1]，川﨑祐子[1]，井澤真吾[2]　([1]同志社女子大院生科，[2]京都工繊大院応生)

1C2a10　メチルグリオキサールの生成を介したジヒドロキシアセトンによる出芽酵母の細胞増殖阻害
10:49　○野村　亘[1,2]，青木美穂[3]，後藤　剛[1,2]，河田照雄[1,2]，井上善晴[3]　([1]京大院・農・食品生物，[2]京大・生理化学研究ユニット，[3]京大院・農・応生科)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

1C2a11　メタボロミクスアプローチによる非常用酵母の凍結耐性関連代謝物の推定
11:10　○菊池成真，森本一輝，浅野祐史，小西正朗　(北見工大)

1C2a12　酵母での一酸化窒素合成における NADPH の必要性の解析
11:21　○吉川雄樹，那須野亮，多和田健人，高木博史　(奈良先端大，バイオ)

1C2a13　酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における *S*- ニトロソ化修飾を介した一酸化窒素の生理的役割
11:32　○示野誠也，吉岡奈津子，吉川雄樹，那須野亮，高木博史　(奈良先端大・バイオサイエンス)

1C2a14　酵母の鉄硫黄クラスタータンパク質合成に関わるジフラビンレダクターゼ Tah18 と相互作用するタンパク質の解析
11:43　○多和田健人，山口悠太，吉川雄樹，那須野亮，高木博史　(奈良先端大　バイオ)

1C2a15　酵母を用いた神経変性疾患に関わる凝集タンパク質の分解機構の解析
11:54　○棚橋亮弥，渡辺大輔，高木博史　(奈良先端大学 先端科学技術)

C2 会場　午後の部(13:50〜16:55)

微生物―細胞 - 情報伝達，細胞応答，ストレス応答―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:40〜13:50

1C2p01　絶対嫌気性菌 *Clostridium acetobutylicum* の O_2 存在下における生育停止機構に関する研究
13:50　○鈴木裕之[1]，田島　怜[1]，永塚健司[1]，宇津智晴[1]，赤間拓海[1]，岡田拓也[1]，佐藤拓海[1,2]，新村洋一[1,2]，川崎信治[1,2]　([1]東農大バイオ，[2]東農大微生物)

1C2p02　*Clostridium* 属細菌の O_2 存在下における生育停止機構について
14:01　○田島　怜[1]，鈴木裕之[1]，宇津智晴[1]，西尾匠人[1]，藤近友三郎[1]，赤間拓海[1]，佐藤拓海[2]，新村洋一[1]，川崎信治[1]　([1]東農大バイオ，[2]東農大微生物)

1C2p03　クロストリジウム属に保存されるヘテロタンパク質複合体による芽胞形成制御機構の解析
14:12　○武藤真輝[1]，尾花　望[2]，野村暢彦[3]　([1]筑波大生命環境，[2]筑波大医学系，[3]筑波大生命環境系)

1C2p04　c-di-GMP 関連遺伝子が *Paracoccus denitrificans* のバイオフィルム形成に与える影響
14:23　○宮崎　俊[1]，森永花菜[1]，永久保利紀[3]，尾花　望[2,4]，豊福雅典[3,4]，野村暢彦[3,4]　([1]筑波大院・生命環境，[2]筑波大学・医学医療系トランスボーダー医学研究センター，[3]筑波大・生命環境系，[4]筑波大・微生物サステナビリティ研究センター)

1C2p05　細胞内封入体がクォラムセンシングに与える影響の解析
14:34　○中島梨花[1]，森永花菜[2]，安田まり奈[2]，野村暢彦[3,4]，豊福雅典[3,4]　([1]筑波大・生命環境，[2]筑波大院・生命環境科学研究科，[3]筑波大・生命環境系，[4]筑波大・微生物サステイナビリティ研究センター)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:55

1C2p06　緑膿菌ムコイドバイオフィルムにおける非ムコイド株の出現及び局在の解析
14:55　○板垣香菜子[1]，尾花　望[2,4]，豊福雅典[3,4]，野村暢彦[3,4]，Andrew S. Utada[3,4]　([1]筑波大・院・生命環境科学研究科，[2]筑波大・医学医療系・トランスボーダー医学研究センター，[3]筑波大・生命環境系，[4]筑波大・微生物サスティナビリティ研究センター)

1C2p07　緑膿菌バイオフィルム形成に伴う自然突然変異株出現の時空間的解析
15:06　○伊澤　徹[1]，豊福雅典[2,3]，清川達則[1]，楊　佳約[1]，尾花　望[3,4]，野村暢彦[2]　([1]筑波大学大学院・生命環境科学研究科，[2]筑波大学・生命環境系，[3]筑波大学・微生物サステナビリティ研究センター，[4]筑波大学・医学医療系・トランスボーダー医学研究センター)

1C2p08　細菌集団中に出現するペプチドグリカン層が分解された細胞の解析
15:17　○兼松周作[1]，野村暢彦[2,3]，豊福雅典[2,3]　([1]筑波大学・生命環境学群，[2]筑波大学・生命環境系，[3]筑波大学・微生物サスティナビリティー研究センター)

1C2p09　大腸菌の D-アラニン飢餓ストレス応答に及ぼす菌密度の影響
15:28　○山川雄大，梅宮真知，佐藤一樹，大内寿一，堀　初弘，安藤太助，米山　裕　(東北大農)

1C2p10　大腸菌のアミノ酸飢餓および薬剤ストレス応答間の情報伝達クロストーク
15:39　○橋本美優[1]，金　世怜[2]，間世田英明[2]，安藤太助[1]，米山　裕[1]　([1]東北大農，[2]産総研)

p11〜p15 発表者の接続時間 15:50〜16:00

1C2p11　好熱好酸性アーキアのマルチプル分子シャペロニンの機能解析
16:00　○魚住奎太，山田芽生，プトリアザレア，福田青郎，藤原伸介　(関西学院大理工)

1C2p12　Functional analysis of multiple chaperonin in thermo-acidophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*
16:11　○Azalea PUTRI，Mei YAMADA，Keita UOZUMI，Wakao FUKUDA，Shinsuke FUJIWARA　(Kwansei Gakuin Univ. of Grad. Sch. Sci. Technol.)

1C2p13　大腸菌 PhoQ センサードメインの SD ポケットの構造と機能
16:22　○吉谷亘平[1,3]，石井英治[1,3]，谷口勝英[3]，杉本　宏[4,5]，城　宜嗣[5]，秋山芳展[1]，加藤明宣[3]，内海龍太郎[6]，江口陽子[2,3]　([1]京大 ウイルス・再生 医科学研究所，[2]近大 生物理，[3]近大 農，[4]理研・放射線センター，[5]兵庫県大 生命理学，[6]阪大・産研)

1C2p14　A-factor 結合型自己調節因子受容体 ArpA の結晶構造
16:33　○夏目　亮，稲葉龍生，藤田雄太，廣沢雄也，和田英嗣，加藤雄己　(東京電機大学)

1C2p15　接合菌 *Mucor circinelloides* の二形成メカニズムを利用した表現型スクリーニングへの応用
16:44　○高野真希[1]，岩倉　遼[1]，石井結菜[2]，星野一宏[1]　([1]富山大院理工，[2]富山大工)

C3 会場　午前の部(9:11〜12:05)

微生物―細胞 - 分離，分類，生態―

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

1C3a02　鰹節（枯節）製造のかび付け発酵工程における好乾性糸状菌の菌叢解析
9:11　○竹中慎治[1]，中林麗奈[1]，小川千晶[2]，横田仁子[3]，土居幹治[3]　([1]神戸大院農，[2]神戸大農，[3]マルトモ(株))

1C3a03　日光東照宮彩色文化財に発生した真菌叢の網羅的解析および光触媒殺菌による真菌防除に向けた事前試験
9:22　○小笠原麻衣[1,3]，三浦菜摘[1]，寺島千晶[2]，藤嶋　昭[2,3]，落合　剛[2,3]，鈴木智順[1,2]　([1]東理大応生，[2]東理大総研，[3]KISTEC)

1C3a04　洗濯工程で検出される微生物の単離とその特徴
9:33　○奥田裕暁[1]，野田浩史[1]，冨岡敏一[3]，脇田克也[2]，松村吉信[3]　([1]関西大・生命生物工，[2]パナソニック(株)，[3]関西大・ORDIST)

1C3a05　ヒトの皮膚常在菌 *Cutibacterium acnes* の MALDI-MS プロテオタイピング
9:44　○寺本華奈江，児嶋浩一，山田賢志，大久保達樹，関谷禎規，岩本慎一，田中耕一　((株)島津製作所)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

1C3a06　メタ 16S 解析による渡良瀬遊水地の環境細菌
10:05　○荒川理彩[1]，田口尚幸[1]，木川田喜一[2]，齊藤玉緒[2]　([1]上智大院・理工，[2]上智大学・理工)

1C3a07　Isolation of actinomycetes from deep-sea sediments of the Pacific Ocean
10:16　○Dana Ulanova[1,2]　([1]Fac. Agric. Mar. Sci. Kochi Univ., [2]Cent. Adv. Mar. Core Res. Kochi Univ.)

1C3a08　循環型汚水浄化槽内における代謝産物要求細菌の分子系統解析および表現形の解析
10:27　○鈴木遥菜，島田紘帆，鈴木智順　(東理大応生)

1C3a09　循環型汚水浄化システムにおける難培養微生物が要求する代謝産物の特定
10:38　○山本晃裕，島田紘帆，鈴木智順　(東理大応生)

1C3a10　嫌気性廃水処理プロセスに生息する未知微生物の分離培養と生理学的性質
10:49　○倉島優仁[1]，千葉有紀[1]，堀沙織里[2]，林真由美[2]，野村一樹[2]，幡本将史[3]，山口隆司[3]，関口勇地[4]，重松　亨[1,2]，井口晃徳[1,2]　([1]新潟薬大院・応生科，[2]新潟薬大・応生科，[3]長岡技術科学大学，[4]産業技術総合研究所)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

1C3a11　D-アスパラギン酸高生産乳酸菌の酵素スクリーニング法の開発と同定
11:10　○梶谷賢吾[1]，石川拓実[1]，柴田公彦[2]，高屋朋彰[3]，阿部勝正[1]，解良芳夫[1]，高橋祥司[1]　([1]長岡技大院工，[2]福島高専 化学・バイオ，[3]小山高専物質)

1C3a12　*Pleurotus salmoneostramineus* NBRC31859 株由来単胞子分離株のスクリーニング
11:21　○平山朋美，佐藤　魁，吉岡詩織，田中亨宗，福田泰久，白坂憲章　(近大農)

1C3a13　陸域深部地下珪藻質泥岩層に生息する未培養 *Bacteroidetes* 門発酵性細菌の分離培養化と生理機能の解析
11:32　○玉澤　聡[1]，上野晃生[1]，玉木秀幸[2]，玉村修司[1]，村上拓馬[1]，木山　保[1]，猪股英紀[1]，宮川和也[3]，長沼　毅[4]，金子勝比古[1]　([1]幌延地圏環境研究所，[2]産総研，[3]原子力機構，[4]広島大院・生物圏科学)

1C3a14　Effect of hydrogen peroxide on microbes colonize on agar plate
11:43　○Motoyuki WATANABE[1,2]，Wataru KITAGAWA[1,2]，Yoichi KAMAGATA[1,2]　([1]Hokkaido Univ. of Agric., [2]AIST)

1C3a15　ナノファイバーセルロースを用いた微生物固体培地の新規作製法の検討
11:54　○津留美紀子，磯部紀之，出口　茂　(海洋機構)

C3 会場　午後の部(13:50〜16:33)

微生物―細胞 - 複合微生物，共生微生物，難培養性微生物―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:40〜13:50

1C3p01　高脂肪食またはコール酸摂取マウス腸内における胆汁酸組成および細菌叢構成の動態解析による胆汁酸仮説の検証
13:50　○坂本佳奈子[1]，相磯知里[1]，松浦史佳[1]，吹谷　智[1]，園山　慶[1]，小椋義俊[2]，林　哲也[2]，横田　篤[1]　([1]北大農，[2]九大医)

1C3p02　高脂肪食中に含まれる脂肪酸がラット盲腸内細菌叢構成に与える影響の解明：脂肪酸仮説の検証
14:01　○阿部隆行[1]，渡辺真通[1]，藤田祐己[1]，小椋義俊[2]，吹谷　智[1]，石塚　敏[1]，林　哲也[2]，横田　篤[1]（[1]北大院農，[2]九大院医）

1C3p03　胆汁酸変換菌の共培養によるウルソコール酸からデオキシコール酸への変換機構の検証
14:12　○北川　更[1]，Tawthep Sarinya[1]，吹谷　智[1]，小椋義俊[2]，林　哲也[2]，横田　篤[1]（[1]北大院農，[2]九大院医）

1C3p04　高糖野菜発酵液－ Kôso 液からの難培養性新規乳酸菌の単離と同定
14:23　○邱　泰瑛[1]，須田　亙[2,3]，大島健志朗[3]，服部正平[2,3]，松﨑千秋[4]，山本憲二[4]，高橋知也[5]（[1]北見工大，[2]理研生医，[3]東京大院新領域，[4]石川県立大，[5]アルソアR&D）

1C3p05　高 LPS 含有の水耕ホウレン草に共生するグラム陰性細菌の解析
14:34　○山下賀容子[1]，重藤和明[1]，稲川裕之[2]，柚源一郎[2]（[1]一般財団法人 雑賀技術研究所，[2]自然免疫制御技術研究組合）

p06～p10 発表者の接続時間 14:45～14:55

1C3p06　Artificial creation of disease suppressive soil by using media immobilized with the microbial ecosystem
14:55　○JAMJAN MEEBOON[1]，Makoto Shinohara[1]，Kazuki Fujiwara[1]，Kenji Miyamoto[2]，Yasuo Kato[3]，Akinori Ando[4,5]，Jun Ogawa[4,5]（[1]NARO, [2]Dept. Biosci. Inform., Keio Univ., [3]Biotech. Res. Cent., Toyama Pref. Univ., [4]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [5]Res. Unit Physiol. Chem. Kyoto Univ.）

1C3p07　有機養液栽培に於ける根の成長促進物質の探索
15:06　○黄　　穎[1]，篠原　信[2]，メツナーリチャード[3]，加藤康夫[3]，安藤晃規[4]，小川　順[4]，宮本憲二[1]（[1]慶應義塾大学，[2]野菜茶業研究所，[3]富山県立大学，[4]京都大学　農学研究科）

1C3p08　Cobalt-dependent inhibition of nitrite oxidation in *Nitrobacter winogradskyi*
15:17　○Richard Metzner[1]，Taiji Nomura[1]，Naoki Kitaoka[1]，Kenji Miyamoto[2]，Makoto Shinohara[3]，Akinori Ando[4,5]，Jun Ogawa[4,5]，Yasuo Kato[1]（[1]Biotech. Res. Cent., Toyama Pref. Univ., [2]Dept. Biosci. Inform., Keio Univ., [3]NARO, [4]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [5]Res. Unit Physiol. Chem., Kyoto Univ.）

1C3p09　Lanthanide-dependent formaldehyde oxidation pathways in *Methylobacterium aquaticum* strain 22A
15:28　○Patcha YANPIRAT，Akio TANI（IPSR, Okayama Univ.）

1C3p10　*Methylobacterium aquaticum*22A 株におけるメチロタキシスの機能解析
15:39　○春名優希[1]，加藤純一[2]，谷　明生[1]（[1]岡山大植物研，[2]広島大先端物質）

p11～p13 発表者の接続時間 15:50～16:00

1C3p11　*Methylobacterium aquaticum* 22A 株における La 誘導性タンパクの機能解析
16:00　○藤谷良子，谷　明生（岡山大植物研）

1C3p12　*Methylobacterium aquaticum* strain 22A におけるランタノイドスイッチのメカニズム
16:11　○宮本稚子，谷　明生（岡山大植物研）

1C3p13　嫌気的アンモニア酸化能を有する酸素非発生型光合成細菌の探索
16:22　○中小路董[1]，成廣　隆[2]，延　　優[2]，嶋田敬三[1]，春田　伸[1]，花田　智[1]（[1]首都大理，[2]産総研）

C4 会場　午前の部（9:11～11:54）

微生物―その他―

a02～a05 発表者の接続時間 9:01～9:11

1C4a02　スギヒラタケの産生する毒性物質に関する生化学的研究
9:11　○中村瑠奈[1]，稲吉里美[2]，崔　宰熏[2,3]，道羅英夫[3]，笹浪知宏[2]，平井浩文[2,3]，河岸洋和[2,3]，鈴木智大[4]（[1]宇大・農，[2]静大・農，[3]静大・グリーン研，[4]宇大・バイオ）

1C4a03　スギヒラタケが産生する毒性物質に関する組織学的研究
9:22　○手塚裕紀[1]，浅川倫宏[2]，前川文彦[3]，木村栄輝[3]，菅　敏幸[4]，河岸洋和[5,6]，鈴木智大[1,7]（[1]宇都宮大・農，[2]東海大・創造技研，[3]国立環境研究所・環境リスク・健康研究センター，[4]静県大・薬，[5]静岡大・農，[6]静岡大・グリーン研，[7]宇都宮大・バイオ）

1C4a04　*Bacillus* 分離株 W-O-1A が産生する抗カビ物質の同定
9:33　○加藤　蒼[1]，佐藤有里華[2]，尾形友朔[2]，松浦成美[2]，稲元民夫[2]，福島　淳[2]，上松　仁[3]，志村洋一郎[2]（[1]秋田県立大生資科院，[2]秋田県立大生資科，[3]秋田高専物質工）

1C4a05　ミドリムシの植物成長促進効果の発見と検討
9:44　○田村ニナ，佐藤美結，辻　敏之（三田国際学園）

a06～a10 発表者の接続時間 9:55～10:05

1C4a06　Mechanism of cholesterol-lowering effects of lactic acid bacteria isolated from fermented seafood
10:05　○Bao LE，Seung-Hwan YANG（Department of Biotechnology, Chonnam National University）

1C4a07　*Bifidobacterium longum 105-A cpsD* 欠損変異株を用いた菌体外多糖の解析
10:16　○足立貴康[1]，タホンアミン[1,2]，桝谷尚慶[1]，エルシャルカウィハネム[1,2]，矢部富雄[1]，野村　泉[1]，鈴木　徹[1]（[1]岐阜大学，[2]カフル エル シェイク大学）

1C4a08　プロバイオティックビフィズス菌 *Bifidobacterium longum* JBL05 株の腸溶性シームレスカプセルによる経口投与がヒト腸内細菌叢に与える効果
10:27　ディサヤナカムディヤンセルジ[1]，河野麻実子[2]，児玉高幸[2]，野村　泉[1]，○鈴木　徹[1]（[1]岐阜大学，[2]森下仁丹（株））

1C4a09　乳酸菌遺伝子組換え体取得効率の改善へ向けた CRISPR/Cas9 ベクターの構築
10:38　○知久　勤[1]，鈴木駿也[1]，横田健治[2]，五十君靜信[2]，梶川揚申[2]（[1]東農大院・農化，[2]東農大・農化科）

1C4a10　黒麹菌Δ *agsE* における形質転換用マーカー遺伝子の検討
10:49　○渡嘉敷直杏[1]，水谷　治[1,3]，山田　修[2]，外山博英[1,3]（[1]鹿児島連大・農，[2]酒総研，[3]琉球大・農）

a11～a14 発表者の接続時間 11:00～11:10

1C4a11　ハイスループット培養を目指した散乱光および蛍光に基づく微生物増殖 W/O ドロップレットの検出
11:10　○大田悠里[1,2]，斉藤加奈子[1,2]，髙木妙子[2]，松倉智子[2]，森田雅宗[2]，常田　聡[1,2]，野田尚宏[1,2]（[1]早大先進理工，[2]産総研バイオメディカル）

1C4a12　重イオンビーム照射によるシオミズツボワムシ大型変異系統の育種
11:21　○常泉和秀[1]，山田美恵子[1]，一瀬勝紀[1]，市田裕之[1]，金　禧珍[2]，萩原篤志[2]，川田実季[3]，片山貴士[3]，崎山一孝[3]，手塚信弘[3]，小磯雅彦[3]，阿部知子[1]（[1]理化学研究所仁科センター，[2]長崎大学，[3]水産研究・教育機構）

1C4a13　細菌の細胞壁成分に対する光触媒反応の影響
11:32　○髙尾綾乃[1,2]，大嶋佑治[1]，岡本歩未[1]，落合　剛[2,3]，藤嶋　昭[2,3]，鈴木智順[1,3]（[1]東理大　応生，[2]KISTEC，[3]東理大総研）

1C4a14　青枯病菌 *Ralstonia pseudosolanacearum* の D-リンゴ酸による twitching 運動抑機構の解明
11:43　○小代安莉，緋田安希子，田島誉久，加藤純一　（広島大院先端物質）

C4 会場　午後の部（13:50〜16:55）

微生物―細胞 - 構造，オルガネラ，小胞，分泌，細胞構成分子―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:40〜13:50

1C4p01　生育温度が *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 の細胞膜に与える影響について
13:50　○王　静雨，亀谷将史，新井博之，石井正治　（東大院・農生科）

1C4p02　出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の Opi1 タンパク質による膜陥入が生じる核膜領域の形態的解析
14:01　○中村珠子，鍵和田聡　（奈良女子大理）

1C4p03　出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 内で大量生産させたトリテルペンの細胞壁分画への溶出
14:12　○水谷泉美[1]，岡田　茂[2]，鍵和田聡[1]　（[1]奈良女子大理，[2]東京大農）

1C4p04　分裂酵母の胞子表面を覆うデコボコ構造の形成に関与する遺伝子の取得と解析
14:23　○増田大輝[1]，田原悠平[1,2]，宮田真人[1,2]，中村太郎[1]　（[1]大阪市大・院理，[2]大阪市大複合先端研究機構）

1C4p05　酵母 *Yarrowia lipolytica* における *n*-アルカンへの吸着と細胞形態に関する研究
14:34　○高橋直熙[1]，石丸千晶[2]，岩間　亮[2]，渡邉夏仁[2]，志波　優[3,4]，兼崎　友[4]，堀内裕之[2,5]，福田良一[2,5]　（[1]東大・農，[2]東大院・農生科，[3]東農大・生命科学，[4]東農大・生物資源ゲノム解析セ，[5]東大・微生物連携）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:55

1C4p06　*Saccharomyces cerevisiae* において，Kre5 は Kre6 と相互作用し，Kre6 の安定性に寄与する
14:55　○難波聖人，依田幸司，足立博之，野田陽一　（東大院・農生科・応生工）

1C4p07　出芽酵母 *β*-1,6-glucan 合成関連蛋白質 Kre6 のリン酸化の解析
15:06　○岡部　凱，依田幸司，足立博之，野田陽一　（東大院農生科）

1C4p08　Svp26 により ER からの搬出が促進される膜蛋白質の解析
15:17　○野田陽一[1]，田辺勇気[1,2]，鎌倉高志[2]，足立博之[1]，荒井斉祐[3]，和田郁夫[3]，依田幸司[1]　（[1]東大院・農生工，[2]東理大・理，[3]福島県立医大）

1C4p09　部位特異的 *in vivo* 光架橋法を用いた大腸菌の LPS トランスロコンサブユニット LptD の生合成過程の解析
15:28　○渡邊哲朗，宮﨑亮次，森　博幸，秋山芳展　（京大ウイルス・再生研）

1C4p10　*Buttiauxella* 属細菌の To-Pal 系欠損による多重膜小胞形成
15:39　髙木航太郎[1]，田原悠平[2]，新谷政己[1]，大熊盛也[3]，宮田真人[2]，二又裕之[1,4]，○田代陽介[1]　（[1]静大院総合科技，[2]大阪市大院理，[3]理研バイオリソースセ，[4]静大グリーン研）

p11〜p15 発表者の接続時間 15:50〜16:00

1C4p11　メンブレンベシクルを介したシグナル伝達の制御
16:00　○森永花菜[1]，Andrew S. Utada[2,3]，尾花　望[3,4]，野村暢彦[2,3]，豊福雅典[2,3]　（[1]筑波大学大学院・生命環境科学研究科，[2]筑波大学・生命環境系，[3]筑波大学・微生物サステイナビリティ研究センター，[4]筑波大学・医学医療系・トランスボーダー医学研究センター）

1C4p12　溶原ファージは MV 形成を介して微生物間相互作用を制御しうる
16:11　○安田まり奈[1]，森永花菜[1]，尾花　望[2,3]，野村暢彦[2,4]，豊福雅典[2,4]　（[1]筑波大学大学院・生命環境科学研究科，[2]筑波大学・微生物サステイナビリティ研究センター，[3]筑波大学・医学医療系・トランスボーダー医学研究センター，[4]筑波大学・生命環境系）

1C4p13　Involvement of a putative LPS-biosynthesis enzyme in the vesicle-mediated protein secretion of Shewanella sp. HM13
16:22　○Yuying LIU，Chen CHEN，Jun KAWAMOTO，Takuya OGAWA，Tatsuo KURIHARA　（Kyoto University）

1C4p14　*Shewanella* sp. HM13 の細胞外膜小胞への積荷輸送における膜表層構造の役割
16:33　○釜阪紘平，チェンチェン，樽林俊樹，川本　純，小川拓哉，栗原達夫　（京都大学化学研究所）

1C4p15　Secretory production of heterologous proteins as cargoes of membrane vesicles by using a cold-adapted bacterium, Shewanella sp. HM13
16:44　○Chen CHEN[1]，Soichiro KAWAI[1]，Jun KAWAMOTO[1]，Tomoya IMAI[2]，Tatsuo KURIHARA[1]　([1]Institute for Chemical Research, Kyoto University, [2]Research Institute for Sustainable Humanosphere, Kyoto University)

C5 会場　午前の部（9:00〜12:05）

微生物―遺伝子 - 構造，機能／遺伝子 - ゲノム解析，メタゲノム，プロテオーム，バイオインフォーマティクス―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

1C5a01　環境試料からの新規自己伝達性プラスミドの取得と解析
9:00　○早川雅也[1]，前島由明[2]，金原和秀[2]，新谷政己[2]　（[1]静大・工，[2]静大院・総合科技）

1C5a02　新規プラスミドグループ PromA 群に属する GC 含量の異なるプラスミドの宿主域比較
9:11　○徳田真穂[1]，柳谷洸輔[2]，井上謙吾[3]，雪　真弘[4]，大熊盛也[4]，水口千穂[5]，野尻秀昭[5]，金原和秀[1,2]，新谷政己[1,2,4]　（[1]静大・工，[2]静大院・総合科技，[3]宮崎大・農，[4]理研・BRC-JCM，[5]東大・生物工学セ）

1C5a03　好気・微好気・嫌気条件下におけるプラスミドの接合伝達性の比較
9:22　○越智健太郎[1]，柳谷洸輔[1]，徳田真穂[2]，大熊盛也[3]，金原和秀[1,2]，新谷政己[1,2,3]　（[1]静大院・総合科技，[2]静大・工，[3]理研・BRC-JCM）

1C5a04　*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* の巨大プラスミドの構造変化を可能にする遊離環状 DNA 分子
9:33　○前田直樹，野澤貴洋，千　菊夫　（信州大・農）

1C5a05　枯草菌プラスミドの安定維持に 関わる新規遺伝子の同定
9:44　○沖田貴弘[1]，渡辺　智[2]，吉川博文[2]，久留主泰朗[1]　（[1]茨大農，[2]東農大生命）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

1C5a06　希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の胞子嚢膜構成タンパク質の同定と機能解析
10:05　○前田聡史[1]，手塚武揚[1,2]，大西康夫[1,2]　（[1]東大院・農生科，[2]東大・微生物連携機構）

1C5a07　希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の胞子鎖成熟に関与するグルコサミニダーゼの同定と機能解析
10:16　○光山京太[1]，手塚武揚[1,2]，大西康夫[1,2]　（[1]東大院・農生科・応生工，[2]東大・微生物連携機構）

1C5a08　希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* において Clp プロテアーゼの ATPase サブユニットは胞子嚢の形成と開裂に関与する
10:27　○鈴木遼太[1]，手塚武揚[1,2]，大西康夫[1,2]　（[1]東大院・農生科，[2]東大・微生物連携機構）

1C5a09　*Lactobacillus agilis* BKN88 が持つ 2 種のフラジェリンの特性解析
10:38　○江口直人[1]，鈴木駿也[1]，辻井良政[2]，須恵雅之[2]，横田健治[2]，五十君靜信[2]，梶川揚申[2]　([1]東農大院・農化，[2]東農大・農化)

1C5a10　*Aphanomyces cochlioides* 被嚢胞子発芽時に発現上昇する遺伝子の同定
10:49　○佐藤優樹，橋床泰之，橋本　誠，崎浜靖子　(北大院農)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

1C5a11　*Mucor circinelloides* が有する低温依存性リパーゼ遺伝子の発現解析
11:10　○田中瑛子[1]，村上周一郎[2]　([1]明治大院農，[2]明治大農)

1C5a12　冬虫夏草（*Cordyceps militaris*）由来レクチンの機能解析
11:21　○小野晶子[1]，柏　　毅[2]，本山高幸[2]，崔　宰熏[3,4]，平井浩文[3]，道羅英夫[3]，長田裕之[2]，河岸洋和[3,4]，鈴木智大[5]　([1]宇都宮大院・農，[2]理研CSRS・ケミカルバイオロジー，[3]静岡大・グリーン研，[4]静岡大・農，[5]宇都宮大・バイオ)

1C5a13　イネいもち病菌における核数制御因子の探索
11:32　○齋藤翔太，菊沢佑斗，黒木美沙，荒添貴之，鎌倉高志　(東理大)

1C5a14　A study on the enzymatic properties and physiological functions of mannan-degrading enzymes in *Neurospora crassa*
11:43　○Yunhan HSU[1]，Minoru YOSHIDA[1,2,3]，Manabu ARIOKA[1,2]　([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]RIKEN CSRS)

1C5a15　Analysis on the physiological function of glucuronoyl esterase (GE) in the model filamentous fungus *Neurospora crassa*
11:54　○Ruijie WANG[1]，Hiep Hung HUYNH[1]，Minoru YOSHIDA[1,2,3]，Manabu ARIOKA[1,2]　([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]RIKEN CSRS)

C5 会場　午後の部(14:55〜16:55)

微生物―遺伝子 - 発現制御，トランスクリプトーム―

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:55

1C5p06　ポリヒドロキシアルカン酸生産菌で機能する転写制御スイッチの確立
14:55　○平山歩夢[1]，折田和泉[1]，中村　聡[1]，梅野太輔[2]，福居俊昭[1]　([1]東京工業大学生命理工学院，[2]千葉大学工学部)

1C5p07　Identification and characterization of b-glycosidase as a factor related to expression regulation of chitin-assimilation genes in Thermococcus kodakarensis
15:06　○YAMIN CHEN[1]，Junqi YAN[1]，Izumi ORITA[1]，Tatsuya NIWA[2]，Hideki TAGUCHI[2]，Satoshi NAKAMURA[1]，Tadayuki IMANAKA[3]，Toshiaki FUKUI[1]　([1]Sch. Life Sci. & Technol., Tokyo Tech., [2]Inst. of Innov. Res., Tokyo Tech., [3]Coll. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

1C5p08　7 セグメントデコーダとして振る舞う単層遺伝子回路の進化デザイン
15:17　○山上和馬，小林一幾，湯本達弥，佐伯和哉，冨永将大，河合繁子，斎藤恭一，梅野太輔　(千葉大院・工)

1C5p09　大腸菌のトキシン－アンチトキシン遺伝子による細胞休眠と遺伝子の水平伝播
15:28　○中島信孝[1]，秋山健太郎[2]　([1]産総研生物プロセス，[2]東工大生命理工)

1C5p10　大腸菌における SulA 依存性溶菌経路の解明
15:39　○大田菜都子[1]，大澤　歩[2]，高坂智之[2]，山田　守[2]　([1]山口大農，[2]山口大学院・創成科学研究科)

p11〜p15 発表者の接続時間 15:50〜16:00

1C5p11　出芽酵母における pre-tRNA capping の発見と機能解析
16:00　○大平高之，菊池一徳，中塚太一，鈴木　勉　(東京大学)

1C5p12　麹菌の固体培養特異的発現を示す遺伝子の転写制御に関与する転写因子 FlbC の細胞内局在と翻訳後修飾
16:11　○荒井　啓[1]，田中瑞己[2]，吉村　緑[1]，新谷尚弘[1]，五味勝也[1]　([1]東北大農，[2]静岡県大)

1C5p13　麹菌 *Aspergillus oryzae* 新規制御因子 KpeR の機能領域の解析
16:22　○工藤駿斗[1]，荒川弦矢[1]，梁瀬惇史[2]，進藤　斉[1]，穂坂　賢[1]，徳岡昌文[1]　([1]東農大院農，[2]東農大応生)

1C5p14　糸状菌 *Aspergillus nidulans* におけるマンナナーゼ遺伝子の発現制御機構
16:33　○玉城彰悟[1]，李　　諾[1]，國武絵美[2]，金丸京子[1]，木村　真[1]，小林哲夫[1]　([1]名大院生命農学，[2]三重大院生物資源)

1C5p15　AreA 転写因子と pH が *Fusarium graminearum* のトリコテセン生合成に及ぼす影響の詳細な解析
16:44　○塩原拓也[1]，中嶋佑一[1]，赤坂まな美[1]，前田一行[2]，鬼頭良幸[1]，金丸京子[1]，小林哲夫[1]，木村　真[1]　([1]名大院生命農，[2]明大院農)

C7 会場　午前の部(9:00〜12:05)

微生物―物質生産 - 醸造，発酵（一次代謝産物）―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

1C7a01　アミノ酸機能工学を活用した大腸菌へのロバスト性の付与
9:00　○磯貝章太，高木博史　(奈良先端大)

1C7a02　メタボロミクス技術を応用した培地の評価と培養予測
9:11　○小西正朗，立花成我，渡辺一樹　(北見工大工)

1C7a03　4-アミノフェニルアラニン発酵における組換え大腸菌の代謝改変
9:22　○川口秀夫[1]，若井桂子[1]，蓮沼誠久[1]，桝尾俊介[2]，高谷直樹[2]，近藤昭彦[1]　([1]神戸大院科技イノベ，[2]筑波大生命環境科)

1C7a04　乳酸菌 *Enterococcus faecalis* の好気性乳酸発酵を利用したグリセロールからの D-乳酸生産
9:33　○土肥裕希　(岡山理大)

1C7a05　Lipid production of cold-adapted oleaginous yeast *Metschnikowia* sp. NBRC 111458 from Mongolia
9:44　○Dolgormaa BATAA[1]，Takao OHASHI[1]，Ryo MISAKI[1]，Enkh-Amgalan JIGJIDDORJ[2]，Kazuhito FUJIYAMA[1]　([1]Osaka Univ., [2]Mongolian Academy of Science)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

1C7a06　油糧糸状菌 *Mortierella alpina* の漏出脂質プロテオーム解析と漏出株の創製
10:05　○島田良美[1]，岸野重信[1]，油屋駿介[1]，青木　航[1]，植田充美[1]，安藤晃規[1,2]，馬場健史[3]，小川　順[1,2]，櫻谷英治[4]　([1]京大院・農・応用生命，[2]京大・生理化学研究ユニット，[3]九州大学・生体防御医学研究所，[4]徳島大・生物資源)

1C7a07　ピルビン酸代謝フロー改変を用いた 2,3-ブタンジオール高生産麹菌の構築
10:16　○張　斯来[1]，若井　暁[1]，荻野千秋[2]，堤　浩子[3]，秦　洋二[3]，近藤昭彦[1]　([1]神戸大院・イノベ，[2]神戸大院・工，[3]月桂冠・総研)

1C7a08　コリネ型細菌内での枯草菌 BioI 酵素の基質解析
10:27　○竹野誠記[1]，中村絵梨[1]，大竹辰徳[1]，梅澤公二[1]，林　幹朗[2]，池田正人[1]　([1]信州大農，[2]協和発酵バイオ)

1C7a09　コリネ型細菌によるパルミチン酸単独発酵
10:38　○青木邦祥[1]，村田紀子[1]，林　幹朗[2]，竹野誠記[1]，池田正人[1]　([1]信州大農，[2]協和発酵バイオ)

1C7a10　コリネ型細菌における脂肪酸の新たな生成機構
10:49　○高橋敬祐[1]，大竹辰徳[1]，井元瞭介[1]，林　幹朗[2]，竹野誠記[1]，池田正人[1]　([1]信州大農，[2]協和発酵バイオ)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

1C7a11　抗菌物質生産能および LPS（Lipopolysaccharide）分解能を持つ食用枯草菌の分離
11:10　○金内　誠，山本　希，根本有子，佐々木瞳，松本菜月，レーティゴックラン　(宮城大　食産業)

1C7a12　酪酸生産菌のフルクトオリゴ糖代謝
11:21　○丹野広貴[1]，藤井　匡[2]，平野勝紹[2]，栃尾　巧[2]，遠藤明仁[1]　([1]東農大生物産業，[2]物産フードサイエンス株式会社)

1C7a13　*Gluconobacter japonicus* NBRC 3271 が持つ膜結合型グルコン酸脱水素酵素に関する研究
11:32　○片岡尚也[1,2]，大田諒子[3]，SAICHANA Natsaran[4]，松谷峰之介[1]，外山博英[5]，藥師寿治[1,2]，松下一信[1,2]　([1]山口大院・創成科学，[2]山口大・中高温微セ，[3]山口大・農，[4]Mae Fah Luang Univ.，[5]琉球大・農)

1C7a14　実用的酢酸発酵を目指した *Acetobacter pasteurianus* の低栄養育種と高温適応育種
11:43　○松本奈実[1]，大澄直樹[2]，パタナタボーンティーリサラ[3]，末吉里帆[4]，松谷峰之介[1]，片岡尚也[1,4,5]，藥師寿治[1,4,5]，ティーラグールガンジャナ[3]，白石　靖[2]，松下一信[1,4,5]　([1]山口大院創成科学，[2]キユーピー醸造(株)，[3]カセサート大，[4]山口大農，[5]山口大中高温微セ)

1C7a15　低栄養育種と高温適応育種を行った *Acetobacter pasteurianus* による実用的酢酸発酵性能評価
11:54　○大澄直樹[1]，松本奈実[2]，パタナタボーンティーリサラ[3]，末吉里帆[4]，藥師寿治[2,4,5]，ティーラグールガンジャナ[3]，松下一信[2,4,5]，白石　靖[1]　([1]キユーピー醸造(株)，[2]山口大院創成科学，[3]カセサート大，[4]山口大農，[5]山口大中高温微セ)

C7 会場　午後の部(13:50〜16:33)

環境科学・バイオマス利用
―バイオマス，バイオマス変換，バイオ燃料，バイオ化成品／資源変換，資源再生利用―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:40〜13:50

1C7p01　生物学的ハーバーボッシュ法の基盤確立
13:50　○宮内友子，高妻篤史，渡邉一哉　(東薬大生命)

1C7p02　*Rhodobacter sphaeroides* における *nifA* 改変および炭酸固定経路遮断による酢酸からの水素収率の向上
14:01　○清水　哲[1]，寺本陽彦[1]，乾　将行[1,2]　([1]RITE，[2]奈良先端大・バイオ)

1C7p03　生分解性プラスチックの高温メタン発酵過程における酢酸消費微生物群の解析
14:12　○曽　厚嘉，田島大貴，蒋　紅与，大西章博，藤本尚志　(東農大農)

1C7p04　嫌気条件下での微生物による腐植物質からメタン生成への試み
14:23　○上野晃生[1]，玉澤　聡[1]，玉村修司[1]，村上拓馬[1]，木山　保[1]，猪股英紀[1]，山口眞司[2]，青山秀夫[2]，中島一紀[3]，五十嵐敏文[3]，長沼　毅[4]，金子勝比古[1]　([1]幌延地圏環境研究所，[2]三菱マテリアル株式会社，[3]北大院・工学研究院，[4]広島大院・生物圏科学)

1C7p05　廃棄雑草のみを原料としたメタン発酵における雑草溶出成分のメタン生産への影響
14:34　○松田修平，大槻隆司　(山梨大院医工農)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:55

1C7p06　小胞体局在型グリセロール 3 リン酸アシル基転移酵素の過剰発現による藻類オイル生産性の飛躍的向上
14:55　福田　智，平澤英里，竹村時空，高橋颯太，チョクシカウミール，パンチャイムラン，田中　寛，○今村壮輔　(東工大・化生研)

1C7p07　単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* における 葉緑体局在脂肪酸輸送体 CmFAX1 の同定とその応用
15:06　○竹村時空，今村壮輔，田中　寛　(東工大・化生研)

1C7p08　アルギン酸ゲル封入培養法による微細藻類 Chlamydomonas debaryana NIES-2212 の細胞凝集体形成と増殖・トリアシルグリセロール蓄積の促進
15:17　○吉冨　徹[1]，神永紗英子[1]，佐藤直樹[1]，豊島正和[1]，森山　崇[1]，吉本敬太郎[1,2]　([1]東大総文・生命，[2]JST・さきがけ)

1C7p09　微細藻類由来不飽和脂肪酸を原料としたメタセシス反応の検証
15:28　○富澤　哲，大島賢治　(熊本高専)

1C7p10　緑色 LED を用いた微細藻類バイオマス増産技術の開発
15:39　○加藤悠一[1]，藤川康夫[2]，三島俊介[3]，泉田智史[4]，蓮沼誠久[1,5]，近藤昭彦[1,5,6]　([1]神戸大先端バイオ工，[2]日亜化学工業，[3]大塚電子，[4]ヒューマン・チップス，[5]神戸大院科技イノベ，[6]神戸大院工)

p11〜p13 発表者の接続時間 15:50〜16:00

1C7p11　脂肪族アルコールを蓄積する細菌から取得した脂肪族アルコール合成遺伝子群について
16:00　○寺本真紀　(高知大農林海洋)

1C7p12　反転を伴う回転振盪による油脂資化性酵母の培養
16:11　○小林由衣乃[1]，川村奈々[2]，竹園　恵[1]，中島敏明[3]，茂野俊也[4]，小野寺正幸[1]　([1]新潟工大院生産開発工，[2](株)プリス，[3]筑波大院生命環境，[4]つくば環微研)

1C7p13　ラビリンチュラ類オーランチオキトリウム属の酢酸資化時のメタボローム解析と脂肪酸生産性向上に向けた育種標的探索
16:22　ペレズチャローズ，○渡邉研志，廣谷　蘭，岡村好子，中島田豊，秋　庸裕　(広島大院・先端)

D1 会場　午前の部(10:05〜12:05)

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

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

1D1a06　外部から加えたスーパーオキシド消去酵素によるアフラトキシン生産の制御機構
10:05　○古川智宏，作田庄平　(帝京大理工)

1D1a07　糸状菌における RNA 結合タンパク質 NrdA の機能解析
10:16　○門岡千尋[1]，泉津弘佑[2]，浅井禎吾[3]，奥津果優[1]，吉﨑由美子[1]，髙峯和則[1]，後藤正利[1,4]，玉置尚徳[1]，二神泰基[1]　([1]鹿児島大・連農，[2]滋賀県立大・環境科学，[3]東京大院・総合文化，[4]佐賀大・農)

1D1a08　麹菌二次代謝系の転写制御の分泌性ルシフェラーゼによる迅速な解析
10:27　○町田雅之，石井智子，佐野元昭　(金沢工大ゲノム研)

1D1a09　トリコテセン系かび毒脱アセチル化酵素遺伝子 *Tri104* の発現様式の解析
10:38　○前田一行[1,3]，富永直樹[2]，兵藤壮一郎[2]，中嶋佑一[3]，杉浦涼介[3]，服部明日希[3]，松山桃子[3]，大里修一[1]，鎌倉高志[2]，木村　真[3]　([1]明大農，[2]東理大・理工，[3]名大院・生命農)

1D1a10　*Fusarium graminearum* のトリコテセン生産制御におけるグリシン開裂系の役割
10:49　○中嶋佑一[1]，前田一行[2]，塩原拓也[1]，赤坂まな美[1]，金丸京子[1]，小林哲夫[1]，西内　巧[3]，木村　真[1]　([1]名大院生命農，[2]明治大院農，[3]金沢大学際科学)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

1D1a11　麹菌におけるステロール合成関連遺伝子の破壊によるポリケタイド化合物の増産効果
11:10　○菅英一郎[1,2]，勝山陽平[1,3]，丸山潤一[1,3]，玉野孝一[4]，小山泰二[2]，大西康夫[1,3]　([1]東大院・農生科・応生工，[2]野田産研，[3]東大・微生物イノベ連携機構，[4]産総研)
1D1a12　ゲノム編集を利用した麹菌 *Aspergillus oryzae* における異種二次代謝産物生産および生産性の向上
11:21　○齋藤直也[1]，片山琢也[1,2]，南　篤志[3]，及川英秋[3]，丸山潤一[1,2]　([1]東大院・農生科・応生工，[2]東大・微生物連携機構，[3]北大院・理)
1D1a13　細胞性粘菌 *D.discoideum* が持つ SteelyB 酵素の産物多様性機構の解明
11:32　○今井　玲[1]，飯島知之[2]，山中彩夏[2]，品川知則[2]，荒木　剛[1]，齊藤玉緒[1]　([1]上智大・理工，[2]上智大院・理工)
1D1a14　細胞性粘菌が生成するハロゲン化有機化合物 LCC-1 の生合成機構の解析
11:43　○小山航平[1]，飯島知之[2]，品川知則[2]，齊藤玉緒[1]　([1]上智大・理工，[2]上智大院・理工)
1D1a15　*Pertusaria laeviganda* から誘導した地衣内生菌が産生する抗酸化活性成分
11:54　○川上寛子，鈴木千尋，山口　遼，原光二郎，小峰正史，山本好和　(秋田県大・生物資源)

D1 会場　午後の部(13:50〜16:33)

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

p01〜p05 発表者の接続時間 13:40〜13:50

1D1p01　赤色海洋酵母由来希少カロテノイドの多様な生理機能解析
13:50　○大塚哲雄[1]，秋田真也[2]，鈴木隆広[2]，浜本牧子[1,2]　([1]明治大院農，[2]明治大農)
1D1p02　ヒト腸内細菌のカロテノイド生合成遺伝子の機能解析
14:01　○松本　航[1]，七浦春風[1]，竹村美保[1]，眞岡考至[1,2]，栗原　新[1]，三沢典彦[1]　([1]石川県大・生資研，[2]生産開発研)
1D1p03　大腸菌による violaxanthin の生産
14:12　○竹村美保[1]，久保亜希子[2]，大段光司[2]，眞岡孝至[3]，佐原健彦[4]，矢追克郎[4]，三沢典彦[1]　([1]石川県大，[2]江崎グリコ，[3]生産開発研，[4]産総研)
1D1p04　海洋性油糧微生物ラビリンチュラ類を用いたステロールの選択的生産
14:23　○石橋洋平[1]，西田裕貴[2]，渡辺　昂[1]，林　雅弘[3]，沖野　望[1]，伊東　信[1,4]　([1]九大院・農・生命機能，[2]九大院・生資環・生命機能，[3]宮大・農・海洋生物，[4]九大院・農・i-BAC)
1D1p05　エルゴチオネイン発酵法開発におけるヒスチジン合成制御系の解除と代謝モデルの活用
14:34　○仲谷　豪[1]，嘉悦佳子[1]，仲島菜々実[1]，野口祐司[1]，石井信佳[1]，厨　祐喜[2]，白井智量[3]，荒木通啓[4]，曽田匡洋[1]　([1]長瀬産業株式会社，[2]神戸大院・科技イノベ，[3]理化学研究所，[4]京大院・医)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:55

1D1p06　放線菌物質生産条件における RNA-Seq 解析とエルゴチオネイン生産株をモデルとした有効性の検証
14:55　○野口祐司[1]，嘉悦佳子[1]，仲島菜々実[1]，仲谷　豪[1]，菅野　学[2]，三谷恭雄[2]，木村信忠[2]，曽田匡洋[1]　([1]長瀬産業株式会社，[2]産総研・生物プロセス)
1D1p07　子嚢菌 *Talaromyces trachyspermus* による Spiculisporic acid の効率的生産
15:06　○林　真人[1]，高野真希[1]，畑下昌範[2]，星野一宏[1]　([1]富山大院理工，[2]若狭湾エネ研)
1D1p08　多種の乳酸菌バクテリオシンを分泌する新奇 ABC トランスポーター EnkT の分子機構の解析
15:17　○和田夏美[1]，須志田浩稔[1]，Perez R.H.[1,2]，善藤威史[1]，園元謙二[1]　([1]九大院・農，[2]フィリピン大・ロスバニョス校)
1D1p09　環状バクテリオシン，エンテロシン NKR-5-3B の環状化を担うタンパク質の解析
15:28　佐戸翔太[1]，PEREZ Rodney H.[1,2]，○善藤威史[1]，園元謙二[1]　([1]九大院農，[2]フィリピン大学・ロスバニョス校)
1D1p10　プロピオン酸菌が生産する抗菌タンパク質の精製と特性評価
15:39　○高屋朋彰，木下葵子　(小山高専・物質)

p11〜p13 発表者の接続時間 15:50〜16:00

1D1p11　ヴィオラセインの抗菌性とその作用機序
16:00　○吉野凌太，滝口泰之　(千葉工業大学工)
1D1p12　Haloduracin 生合成遺伝子クラスターに隣接する機能未知遺伝子の解析
16:11　○片山欣哉，松本英恵，佐藤稲子，田崎弘之　(日獣大獣)
1D1p13　*Lactobacillus plantarum* PUK6 の多成分バクテリオシン遺伝子クラスターの同定および分子解析
16:22　○河原あい[1]，善藤威史[2]，松崎弘美[1,3]　([1]熊本県大院環境共生，[2]九大院農，[3]熊本県大環境共生)

D2 会場　午前の部(9:00〜12:05)

有機化学、天然物化学―天然物 - 生合成，代謝―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

1D2a01　大麻のカンナビノイド生合成に関与する新規プレニル転移酵素の同定
9:00　○棚谷綾介，黒崎文也，田浦太志　(富山大院薬)
1D2a02　クラス IB テルペン合成酵素の触媒反応の解析
9:11　○西　智之[1]，ステパノワラファエラ[1]，菅原　啓[1]，上田大次郎[1]，藤橋雅宏[2]，三木邦夫[2]，保野陽子[3]，品田哲郎[3]，佐藤　努[1]　([1]新潟大院自然，[2]京大院理，[3]阪市大院理)
1D2a03　Mycobacterium 属細菌由来新型セスクアテルペン環化酵素の高感度活性測定法の構築とそれを利用した探索
9:22　○阿部　透[1]，尾崎真夢[1]，吉田優里[2]，三浦彩奈[2]，相良昌寛[2]，上田大次郎[1,2]，金古堅太郎[1]，三ツ井敏明[1,2]，佐藤　努[1,2]　([1]新潟大院自然，[2]新潟大農)
1D2a04　細菌由来テルペン合成酵素の大規模探索と複雑環骨格形成機構の解析
9:33　○村井恵一[1]，三橋隆章[2]，菊池　貴[3]，新家一男[4]，藤田　誠[5,6]，阿部郁朗[2,7]，西山　真[1,7]，葛山智久[1,7]　([1]東大生物生産工学セ，[2]東大院薬，[3]リガク応技センター，[4]産総研，[5]東大院工，[6]分子研，[7]東大微生物イノベ連携機構)
1D2a05　出芽酵母における薬剤排出ポンプ遺伝子の発現に関わる新規因子の探索
9:44　○尾山昌弘[1]，山口良弘[1,2]，荻田　亮[1,3]，田中俊雄[1]，藤田憲一[1]　([1]阪市大院・理，[2]阪市大・複合先端，[3]阪市大・健康研セ)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

1D2a06　高還元型 II 型 PKS 由来 KS-CLF ヘテロダイマー及び ACP-KS-CLF 三者複合体の X 線結晶構造解析
10:05　○杜丹ヤオ[1]，勝山陽平[1,2]，伏信進矢[1,2]，Chen Aochiu[3]，Davis Tony D.[3]，Burkart Michael. D[3]，大西康夫[1,2]　([1]東大院農生科・応生工，[2]東大・微生物イノベ連携機構，[3]University of California, San Diego, Department of Chemistry and Biochemistry)

1D2a07　*Streptomyces griseus* におけるイミニマイシン類の生合成遺伝子群の機能解析
10:16　○堤　隼馬[1]，勝山陽平[1,2]，手塚武揚[1,2]，宮野　怜[3]，稲橋佑起[4]，高橋洋子[4]，中島琢自[4]，大西康夫[1,2]　([1]東大院・農生科，[2]東大・微生物イノベ連携機構，[3]北里大院・感染制御，[4]北里大・生命研)

1D2a08　*in vivo* 解析による多価不飽和脂肪酸生合成酵素の生成物制御ドメインの同定
10:27　林　祥平[1]，中　真以[1]，○佐藤康治[2]，氏原哲朗[3]，大利　徹[2]　([1]北大院総合化学，[2]北大院工，[3]協和発酵バイオ)

1D2a09　*in vitro* 解析による多価不飽和脂肪酸生合成酵素の *cis* 二重結合形成機構の解明
10:38　林　祥平[1]，○小笠原泰志[2]，佐藤康治[2]，丸山千登勢[3]，濱野吉十[3]，氏原哲朗[4]，大利　徹[2]　([1]北大院総合化学，[2]北大院工，[3]福井県大院・生物資源，[4]協和発酵バイオ)

1D2a10　*in vitro* 解析による多価不飽和脂肪酸生合成酵素の炭素鎖長制御機構の解明
10:49　○林　祥平[1]，小笠原泰志[2]，佐藤康治[2]，丸山千登勢[3]，濱野吉十[3]，氏原哲朗[4]，大利　徹[2]　([1]北大院総合化学，[2]北大院工，[3]福井県大院・生物資源，[4]協和発酵バイオ)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

1D2a11　放線菌由来新規 III 型ポリケタイド合成酵素の発見と閉環機構の解析
11:10　○佐々木允人，曽根祐輔，中村修人，安間満彦，長谷部文人，鮒　信学　(静県大食栄)

1D2a12　多価不飽和脂肪酸生合成酵素の論理的機能改変
11:21　○池内健心[1]，中　真以[1]，林　祥平[1]，大塚　慎[1]，小林洸太[1]，佐藤康治[2]，小笠原泰志[2]，氏原哲朗[3]，大利　徹[2]　([1]北大院総合化学，[2]北大院工，[3]協和発酵バイオ)

1D2a13　Recognition mechanism of substrate chirality in UDP-MurNAc-L-Ala-Glu synthetase
11:32　○Ruoyin FENG[1]，Yasuharu SATOH[2]，Hiroyuki MORITA[3]，Yasushi OGASAWARA[2]，Tohru DAIRI[2]　([1]Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., [3]Inst. Nat. Med., Univ. Toyama)

1D2a14　Biosynthetic Gene Cluster of a D-Tryptophan-Containing Lasso Peptide, MS-271
11:43　○Zhi FENG[1]，Yasushi OGASAWARA[2]，Satoshi NOMURA[1]，Tohru DAIRI[2]　([1]Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

1D2a15　放線菌由来 *β*-カルボリン化合物キタセタリン生合成経路の解明
11:54　○木谷　茂[1]，上田祥平[1]，池尻幸範[1]，難波卓司[2]，池田治生[3]，仁平卓也[1]　([1]阪大・生物工学国際交流セ，[2]高知大・農林海洋科学，[3]北里大・北里生命科学研究所)

D2 会場　午後の部(13:50〜16:55)

有機化学，天然物化学―天然物 - 生合成，代謝―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:40〜13:50

1D2p01　ペニシリン結合タンパク質が触媒する非リボソームペプチドの環化反応
13:50　○松田研一[1]，小林雅和[1]，佐野文映[1]，倉永健史[1]，高田健太郎[2]，松永茂樹[2]，脇本敏幸[1]　([1]北大院薬，[2]東大院農)

1D2p02　JBIR-34, -35 と JBIR-126 の生合成に関わる NRPS のモジュール間相互作用
14:01　○角田　毅[1]，勝山陽平[1,2]，新家一男[3]，大西康夫[1,2]　([1]東大院，農生科，応生工，[2]微生物イノベ連携機構，[3]産業技術総合研究所)

1D2p03　放線菌が生産するアラゾペプチンの生合成機構の解析
14:12　○菅谷優子[1]，冨田宏矢[1]，萩原亮太[1]，勝山陽平[1,2]，大西康夫[1,2]　([1]東大院・農生科，[2]微生物連携機構)

1D2p04　*ε*-poly-L-lysine 合成酵素ホモログにおける基質特異性予測手法の確立と新規生理活性ホモポリアミノ酸探索への応用
14:23　○木村ほのか[1]，福本　響[1]，濱野吉十[2]，老川典夫[1]，山中一也[1]　([1]関西大　化生工，[2]福井県大　生物資源)

1D2p05　放線菌 *Streptomyces albulus* の全ゲノム及び網羅的遺伝子発現解析により見出した新奇ペプチド合成酵素遺伝子群の機能解析
14:34　○友杉玲那[1]，藤田彩香[1]，宮本　昂[1]，濱野吉十[2]，老川典夫[1]，山中一也[1]　([1]関西大　化生工，[2]福井県大　生物資源)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:55

1D2p06　*N*-アセチルトランスフェラーゼ様酵素がポリケチドとランチペプチドの新規結合反応を触媒する
14:55　○小境陵介，菅井佳宣，寺本和矢，浅水俊平，尾仲宏康　(東大農生科)

1D2p07　S-N 結合形成に関わる新規多段階反応型酸化酵素の同定
15:06　○淡川孝義，胡　志娟，阿部郁朗　(東大薬)

1D2p08　ホスホマイシン生合成における新規加水分解酵素 FomD の機能解析
15:17　○佐藤秀亮[1]，宮永顕正[1]，工藤史貴[1]，葛山智久[2]，江口　正[1]　([1]東工大理，[2]東大生物工学セ)

1D2p09　カルボサイクリックポリケチド化合物の大員環形成メカニズムの解析
15:28　○大方葉月[1]，行吉裕治[1]，稲橋佑起[2,3]，高橋洋子[2]，大村　智[2]，葛山智久[4,5]，中島琢自[2,3]，荒川賢治[1]　([1]広島大院・先端研，[2]北里大・生命研，[3]北里大院・感染制御科学府，[4]東大・生物工学セ，[5]東大・微生物イノベ機構)

1D2p10　ゲノム情報および網羅的メタボローム解析を基軸にした有用生理活性物質の探索
15:39　○西浦凜貴斗，ファウジアミルディンアフマド，ニンディタヨシ，荒川賢治　(広島大院・先端研)

p11〜p15 発表者の接続時間 15:50〜16:00

1D2p11　安定同位体標識化合物の取込みによるアミプリマシン生合成機構の解析
16:00　○白石太郎[1,2]，池内秀雄[1]，新家一男[3]，西山　真[1,2]，葛山智久[1,2]　([1]東大・生物工学セ，[2]東大・微生物連携機構，[3]産総研)

1D2p12　アザビシクロ環含有ジペプチド ficellomycin の生合成機構に関する研究
16:11　○黒澤　菫[1]，松田研一[1]，長谷部文人[1]，富田武郎[1,2]，葛山智久[1,2]，西山　真[1,2]　([1]東大・生物工学セ，[2]東大・微生物イノベ連携機構)

1D2p13　Maleimycin Biosynthesis is Mediated by Type II Amino-group Carrier Protein in *Streptomyces* sp.
16:22　○Muhammad Prima PUTRA[1]，Kenichi Matsuda[1]，Takeo Tomita[1,2]，Kazuo Shin-ya[1,3]，Tomohisa Kuzuyama[1,2]，Makoto Nishiyama[1,2]　([1]Biotechnology Research Center, The University of Tokyo, [2]Collaborative Research Institute for Innovative Microbiology, The University of Tokyo, [3]The National Institute of Advanced Industrial Science and Technology（AIST））

1D2p14　抗生物質生産を誘導するブテノライド型シグナル分子 SRB を用いた休眠二次代謝の活性化
16:33　○手島愛子[1]，住吉美保[1]，江口雄聡[2]，荒川賢治[1]　([1]広島大院・先端研，[2]広島大学）

1D2p15　放線菌シグナル分子制御遺伝子群の合理的改変を基軸とした二次代謝生産の網羅的解析
16:44　○見﨑裕也，手島愛子，荒川賢治　（広島大院・先端研）

D3 会場　午前の部（9:11〜12:05）

有機化学，天然物化学
―天然物 - ケミカルバイオロジー―，作用機構／その他―

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

1D3a02　代謝産物由来のベタイン誘導体の分子機能（1）　蒸気圧測定法を利用したベタインと水溶性化合物間に働く特異な分子間相互作用の解析
9:11　○青木拓真，須賀ゆかり，甲元一也　（甲南大FIRST）

1D3a03　代謝産物由来のベタイン誘導体の分子機能（2）　ベタイン型添加剤の排他特性を利用した ELISA の効率化
9:22　○三宅子龍，高木琴味，甲元一也　（甲南大 FIRST）

1D3a04　ベンジルアルコール誘導体の構造と香りの関係の検討
9:33　○椛沢靖翔，長谷川登志夫　（埼玉大院理工学研）

1D3a05　希少糖 D-アラビノースの線虫成長阻害メカニズム－糖代謝酵素に対する阻害活性
9:44　小山麻理子[1]，新谷知也[2]，○佐藤正資[1]　([1]香川大農，[2]愛媛大院連合農）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

1D3a06　3,5-ジエステル化フラバン-3-オール誘導体の構造-活性相関研究〜エステル結合の安定性
10:05　○道下　僚[1]，西野祐樹[1]，西村拓哉[1]，平井瑞輝[1]，辻　一成[2]，村上　誠[1]，中島範行[3]，齊藤安貴子[1,2]　([1]大阪電通大院工・先端，[2]大阪電通大工・環境，[3]富山県大・工）

1D3a07　受容体特異的な 3'-alkyl ABA を用いた ABA 受容体機能解析　1. 構造活性相関
10:16　○由田和津子[1]，近藤恭光[1]，岩橋福松[2]，中野雄司[3]，本田香織[1]，永野栄喜[2]，長田裕之[1]　([1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー，[2]住友化学・健康農業研，[3]理研 CSRS・機能開発）

1D3a08　受容体特異的な 3'-alkyl ABA を用いた ABA 受容体機能解析　2. ドッキングシミュレーション
10:27　○近藤恭光[1]，由田和津子[1]，岩橋福松[2]，中野雄司[3]，本田香織[1]，永野栄喜[2]，長田裕之[1]　([1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー，[2]住友化学・健康農業研，[3]理研 CSRS・機能開発）

1D3a09　イネの化学防御を担うモミラクトン B の作用機序に関する研究
10:38　○富田啓介[1]，松尾安浩[2]，川向　誠[2]，八代田陽子[3]，松本　健[3]，吉田　稔[3,4]，野尻秀昭[1]，岡田憲典[1]　([1]東大・生物工学セ，[2]島根大・生物資源，[3]理研CSRS・ケミカルゲノミクス，[4]東大院・農生科・応生工）

1D3a10　疫病菌交配ホルモン生合成酵素の探索
10:49　○有吉　俊，戸村友彦，小鹿　一　（名大院・生命農）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

1D3a11　ホタテガイ中腸腺のオカダ酸アシル化酵素の探索に向けた活性測定法の開発
11:10　○寺内将斗，古用幸愛，長由扶子，山下まり，此木敬一（東北大院農）

1D3a12　電位依存性ナトリウムチャネルに対するサキシトキシン誘導体の阻害活性評価
11:21　○山田智士[1]，安達栞菜[2]，長由扶子[1]，山下まり[1]，此木敬一[1]，長澤和夫[2]　([1]東北大院・農，[2]東農工大院・工）

1D3a13　ソロモン諸島産の海洋生物中の Na_v 阻害活性物質の探索
11:32　○春日政人[1]，Clyde Gorapava Puilingi[2]，角替俊輔[1]，中崎敦夫[3]，長由扶子[1]，西川俊夫[3]，此木敬一[1]，山下まり[1]　([1]東北大院農，[2]Pacific Adventist University，[3]名大院生命農）

1D3a14　海洋天然物アプリロニン A の標的分子における結合位置解析および作用機序の解明
11:43　○井熊純也[1]，瀬口由宇[2]，山岸航大[2]，中根玄貴[2]，臼井健郎[3]，木越英夫[2]，北　将樹[1,4]　([1]名大院生命農，[2]筑波大院数理物質，[3]筑波大院生命環境，[4]JSTさきがけ）

1D3a15　アクチン作用性天然物を基盤とした抗腫瘍性リガンドおよび新規ケミカルツールの開発
11:54　○藤枝あかり[1]，高橋桃子[2]，二木健太郎[2]，木越英夫[2]，北　将樹[1,3]　([1]名大院生命農，[2]筑波大院数理物質，[3]JSTさきがけ）

D3 会場　午後の部（13:50〜16:44）

有機化学，天然物化学
―天然物 - ケミカルバイオロジー―，作用機構―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:40〜13:50

1D3p01　TRPV4 agonist による可逆的タイトジャンクション開口機構解析
13:50　○向山海凪，山崎洋平，南雲陽子，臼井健郎　（筑波大生命環境）

1D3p02　γ-チューブリン特異的阻害剤 gatastatin 類縁化合物の構造活性相関検討
14:01　○新谷佳菜[1]，恵比須春菜[1]，畑中大成[2]，坂倉　彰[2]，早川一郎[2]，南雲陽子[1]，臼井健郎[1]　([1]筑波大生命環境，[2]岡山大院自然）

1D3p03　Vicenistatin による出芽酵母膜形態異常
14:12　○内海由佳[1]，工藤　駿[1]，工藤史貴[2]，江口　正[2]，南雲陽子[1]，臼井健郎[1]　([1]筑波大生命環境，[2]東工大理）

1D3p04　2 次元電気泳動を用いた化合物に相互作用するたんぱく質の解析法（2DE-CETSA）の開発
14:23　○室井　誠，永澤生久子，池野あゆみ，小川直子，川谷　誠，長田裕之　（理研CSRS）

1D3p05　がん細胞に活性酸素種産生を誘導する化合物 RKN9055 の発見と作用解析
14:34　○河村達郎[1,2]，二村友史[3]，室井　誠[1,3]，川谷　誠[1,3]，SHANG Erchang[2]，JANNING Petra[2]，近藤恭光[3]，野川俊彦[3]，ZIEGLER Slava[2]，渡辺信元[1]，WALDMANN Herbert[2]，長田裕之[1,3]　([1]理研CSRS・理研-マックスプランク連携，[2]マックスプランク分子生理学研究所，[3]理研CSRS・ケミカルバイオロジー）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:55

1D3p06　糸状菌 RK17-F0007 より単離した BR-050 立体異性体の構造と活性評価
14:55　○野川俊彦，川谷　誠，岡野亜紀子，青野晴美，清水　猛，長田裕之　（理研 CSRS）

1D3p07　Isolation of Secondary Metabolites from *Streptomyces* sp. Cultured in Different Media
15:06　○Julius LOPEZ[1]，Toshihiko NOGAWA[1]，Yushi FUTAMURA[1]，Takeshi SHIMIZU[1]，Daisuke HASHIZUME[2]，Hiroyuki OSADA[1]　([1]Chemical Biology Research Group, RIKEN CSRS, [2]Materials Characterization Support Team, RIKEN CEMS)

1D3p08　*Candida albicans* に菌糸形態を誘導する化合物 RK-276A の有機合成
15:17　○山本甲斐[1,2]，二村友史[1]，清水　猛[1]，ウソンレイチェル[1]，長田裕之[1,2]　([1]理研CSRS・ケミカルバイオロジー，[2]埼玉大学)

1D3p09　フェノール性抗酸化物質の抗酸化作用とプロオキシダント効果の解析
15:28　○増村　大，水野美麗，福原　潔　(昭和大薬)

1D3p10　金属イオン配位により活性化する抗酸化物質の開発
15:39　○福原　潔[1]，今井耕平[1]，中西郁夫[2]，松本謙一郎[2]，大野彰子[3]　([1]昭和大，[2]放医研，[3]国衛研)

p11〜p14 発表者の接続時間 15:50〜16:00

1D3p11　新規なリンカーとタンパク質架橋剤を用いる生理活性化合物の標的タンパク質精製法
16:00　○穴吹友亮[1]，伊藤祐輔[1]，塚原美宙[1]，高須賀太一[1]，岡本昌憲[2]，松浦英幸[1]，高橋公咲[1]　([1]北大院農，[2]宇都宮大バイオ)

1D3p12　スピロ環をもたない aplysiatoxin 単純化アナログの合成と PKC アイソザイム結合活性
16:11　○押村亜沙美[1]，早川皓太郎[1]，花木祐輔[1]，柳田　亮[2]，入江一浩[1]　([1]京大院農，[2]香川大農)

1D3p13　酵母遺伝子変異株を利用した網膜色素変性症治療薬の探索
16:22　○八代田陽子[1]，大橋佳樹[1,2]，岡本怜衣香[1]，平野弘之[3]，長田裕之[3]，川崎　寿[2,4]，吉田　稔[1,5]　([1]理研CSRS・ケミカルゲノミクス，[2]東電大院工，[3]理研CSRS・化合物リソース，[4]東大・生物工学セ，[5]東大院農・応生工)

1D3p14　ケミカルジェネティクスによるワールブルグ効果制御機構の解析
16:33　○小林大貴[1]，長田裕之[3]，吉田　稔[1,2,4]　([1]理研CSRS・創薬シード，[2]理研CSRS・ケミカルゲノミクス，[3]理研CSRS・ケミカルバイオロジー，[4]東大院農・応生工)

D4 会場　午前の部(9:11〜12:05)

有機化学，天然物化学―合成，反応機構―

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

1D4a02　Pleurospiroketal 類の合成研究
9:11　○帯津陽一，木村真菜，森　直紀，渡邉秀典，滝川浩郷　(東大院農生科)

1D4a03　Paecilonic acid A の合成研究
9:22　○的場充弘，森　直紀，渡邉秀典，滝川浩郷　(東大院農生科)

1D4a04　Bacilosarcin 類の合成研究
9:33　○小川由香子，西　克也，中田恭介，松島芳隆　(東京農業大学・農芸化学科)

1D4a05　カルバペネム系抗生物質中間体の新規合成法の開発
9:44　○中丸夏実，松島芳隆　(東京農業大学・農芸化学科)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

1D4a06　bis-トリクロロアセトイミダートの分子内環化を用いたタキソール側鎖アミノ酸の合成研究
10:05　○折田未奈，石川　萌，松島芳隆　(東京農業大学・農芸化学科)

1D4a07　抗生物質 lemonomycin のデオキシアミノ糖 lemonose の新規合成法の開発
10:16　○中谷俊道，松島芳隆　(東京農業大学)

1D4a08　抗植物病原菌活性を有する Pseudohygrophorone 類の合成研究
10:27　○山本優月，森　直紀，渡邉秀典，滝川浩郷　(東大院農生科)

1D4a09　Phorbasin H および I の合成研究
10:38　○髙橋健輔[1]，久世雅樹[1]，森　直紀[2]，滝川浩郷[2]　([1]神大院農，[2]東大院農生科)

1D4a10　Heliolactone の合成研究
10:49　○山本舜也[1]，新子大樹[2]，森　直紀[1]，杉本幸裕[2]，滝川浩郷[1]　([1]東大院農，[2]神大院農)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

1D4a11　イソニトリルを用いたビス(アルキルアミノ)マレオニトリルの合成
11:10　○田福咲椰佳，福田拓也，千葉一裕，北野克和　(東京農工大学)

1D4a12　陽極酸化を用いたリボース型アザヌクレオシドの合成
11:21　岡本一央，小路貴生，○筒井瑞季，信田尚毅，千葉一裕　(東農工大)

1D4a13　フェナジノン天然物群の全合成研究
11:32　○古波津春希，加茂翔伍，友重秀介，倉持幸司　(東理大理工)

1D4a14　煙に含まれる発芽促進物質 Karrikinolide の 3 工程合成
11:43　○桐田　奏，細川誠二郎　(早稲田大学)

1D4a15　生物活性物質合成に有用な，リパーゼが触媒する位置・官能基選択的反応
11:54　○須貝　威，橋本理一，坂倉彩香，藤田理愛，花屋賢悟，東林修平　(慶應大薬)

D4 会場　午後の部(13:50〜16:55)

有機化学，天然物化学―合成，反応機構―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:40〜13:50

1D4p01　8-Methoxyvestitol の合成研究
13:50　○大江拓人[1]，滝川浩郷[2]，久世雅樹[1]　([1]神戸大農，[2]東京大農)

1D4p02　カーラクトン酸の合成研究
14:01　○溝川孝紀[1]，大倉裕貴[1]，滝川浩郷[2]，三宅秀芳[1]，新子大樹[1]，杉本幸裕[1]，久世雅樹[1]　([1]神戸大，[2]東京大)

1D4p03　Chartelline C の全合成研究
14:12　○中根嘉祈，中崎敦夫，西川俊夫　(名大院生命農)

1D4p04　ジャガイモシスト線虫孵化促進物質ソラノエクレピン A 左側部分の合成研究
14:23　○立松怜史，安立昌篤，西川俊夫　(名大院生命農)

1D4p05　テトロドトキシンの推定生合成中間体の全合成と絶対立体配置の決定
14:34　○宮坂忠親[1]，安立昌篤[1]，工藤雄大[2]，杉本敬太[2]，山下まり[2]，西川俊夫[1]　([1]名大院生命農，[2]東北大院農)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:55

1D4p06　Chaxine 類とその類縁体の合成研究
14:55　○二木美咲[1]，平田裕嗣[1]，中崎敦夫[1]，呉　　静[2]，河岸洋和[2,3,4]，西川俊夫[1]　([1]名大院生命農，[2]静大農・応生科，[3]静大・グリーン研，[4]静大院・創造)

1D4p07　多環テルペンインドールの新合成法
15:06　○山口将司，小野義貴，樋口恵子，杉野公美，安立昌篤，中崎敦夫，西川俊夫　(名大院生命農)

1D4p08　strophasterol C, D 及び glaucoposterol A の合成研究
15:17　○佐藤俊太郎，桑原重文　(東北大院農)

1D4p09　Sinensilactam A の全合成
15:28 ○小宅真理，佐藤俊太郎，小倉由資，桑原重文 （東北大院農）

1D4p10　Amycolamicin の DE ユニットの合成
15:39 ○目黒康洋，小倉由資，桑原重文 （東北大院農）

p11〜p15 発表者の接続時間 15:50〜16:00

1D4p11　Hetiamacin A-D の全合成
16:00 ○塚口頌悟，十和田諒，小倉由資，榎本　賢，桑原重文（東北大院農）

1D4p12　推定生合成経路に基づく Agelamadin C の合成研究
16:11 ○高橋和暉，桑原重文，榎本　賢 （東北大農）

1D4p13　(-)-Isocelorbicol および関連天然物の高立体選択的合成研究
16:22 ○毛利朋世[1]，高橋祐介[1]，權　垠相[2]，桑原重文[1]，小倉由資[1] （[1]東北大院農，[2]東北大院理）

1D4p14　オニテナガエビ *Macrobrachium rosenbergii* のインスリン様造雄腺因子の化学合成
16:33 ○片山秀和 （東海大工・生命化学）

1D4p15　ComXnatto フェロモンの合成
16:44 ○岡田正弘 （神奈川大工）

D5 会場　午前の部（9:11〜12:05）

有機化学，天然物化学
―天然物 - 単離構造決定 - 動物／天然物 - 単離構造決定 - 植物―

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

1D5a02　ワラジムシ由来の防御物質キナルジン酸誘導体の同定と生物活性評価
9:11 ○永井禎己[1]，石丸善明[1]，唐澤重孝[2]，清水伸泰[1] （[1]京都学園大学，[2]鳥取大学）

1D5a03　シキミグンバイ若虫分泌物とその類縁体の抗菌活性評価
9:22 ○高原千尋，清水伸泰 （京都学園大院バイオ環境）

1D5a04　ヒキガエルが持つステロイド毒 bufadienolide 類の化学分析
9:33 ○井上貴斗[1]，氏家里奈子[2]，吉永直子[2]，森　　哲[3]，森　直樹[2] （[1]京大農，[2]京大院農，[3]京大院理）

1D5a05　ヤマカガシ属ヘビ *Rhabdophis pentasupralabialis* が蓄積する毒性ステロイド bufadienolide の由来
9:44 ○氏家里奈子[1]，竹内寛彦[2]，城野哲平[3]，チェンチン[4]，ディンリー[4]，タンイェチョン[4]，ツァイテインシュン[5]，ツァオチェンチャン[6]，アランサビツキー[7]，油屋駿介[1]，青木　航[1]，吉永直子[1]，森　　哲[8]，森　直樹[1] （[1]京都大農，[2]日本大生物資源，[3]琉球大熱生研，[4]成都生物研，[5]ピントン科技大，[6]楽山師範大，[7]ユタ大，[8]京大理）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

1D5a06　マツリカ（*Jasminum sambac*，花部）の成分探索
10:05 ○井上尚樹[1]，二宮清文[1,2]，吉川雅之[1]，村岡　修[1,2]，森川敏生[1,2] （[1]近畿大・薬総研，[2]アンチエイジングセ）

1D5a07　センキュウ（*Cnidium officinale*, 根茎）の新規フタリド配糖体および芳香族化合物
10:16 ○山本紗也，二宮清文，塩谷美幸，森川敏生 （近畿大・薬総研）

1D5a08　タイ天然薬物 *Mammea siamensis* 花部に含まれるプレニルクマリンのアロマターゼ阻害活性
10:27 ○羅　鳳琳[1]，二宮清文[1]，柴谷華苗[1]，チャイペックサワニ[1,2]，ポンピリヤダチャユタナ[2]，村岡　修[1]，森川敏生[1] （[1]近畿大・薬総研，[2]ラジャマンガ工科大）

1D5a09　ギンナンに含まれるギンコライド類の研究
10:38 ○藤野和孝，松本恵実，中塚進一 （長良サイエンス株式会社）

1D5a10　ラノステロール及びジヒドロラノステロールの高純度試薬の量産
10:49 ○田村敦裕，森　拓哉，松本恵実，中塚進一 （長良サイエンス株式会社）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

1D5a11　ツキヨタケ（*Omphalotus guepiniformis*）子実体に含まれるセスキテルペン類について
11:10 ○青木聡樹[1]，網干貴子[1,2]，塩野義人[1,2]，新井大輔[3]，飯塚禎明[3]，村山哲也[1,2] （[1]岩手大院連農，[2]山形大農，[3]FSC）

1D5a12　サンゴジュの花芽に含まれるビブサニン類の分析と生物活性評価
11:21 ○柳田　亮[1]，植松紗和子[2]，西　皓冬[1]，芦田能基[3]，川浪康弘[1]，入江一浩[4] （[1]香川大農，[2]香川大院農，[3]愛媛大院連合農，[4]京大院農）

1D5a13　クマイザサ葉身に含まれる氷核形成阻害物質（過冷却促進物質）の同定
11:32 ○鈴木伸吾，福士幸治，荒川圭太 （北大院農）

1D5a14　暖海性ホンダワラ類から単離したフロロタンニン類の構造解析
11:43 ○谷口凌佑[1]，井藤千裕[2]，村田直輝[1]，松井卓哉[3]，三宅義明[4]，糸魚川政孝[5]，植田充美[6,8]，柴田敏行[1,7,8] （[1]三重大院生資，[2]名城大薬，[3]愛知医科大医，[4]愛知淑徳大健康医療科学，[5]東海学園大スポーツ健康科学，[6]京都大院農，[7]三重大海藻バイオ研，[8]JST・CREST）

1D5a15　ウメ花粉の発達に関与する *p*- クマロイルスペルミジンの新規異性体の同定と *ZZZ* 体のユニークな熱力学的安定性
11:54 ○平井伸博[1]，森信之介[1]，赤松美紀[1]，福井宏至[2]，月岡淳子[3]，後藤勝実[3] （[1]京大院農，[2]香川大農，[3]京都薬大薬用植物園）

D5 会場　午後の部（13:50〜16:33）

有機化学，天然物化学―天然物 - 単離構造決定 - 微生物―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:40〜13:50

1D5p01　落葉由来放線菌二次代謝産物からの新規抗生物質の発見
13:50 ○竹花康弘，木村智之，村松秀行，澤　竜一，梅北まや，林　千草，澁谷優子，五十嵐雅之 （微化研）

1D5p02　18T138A および B, 放線菌の生産する新規アスカマイシン類縁体
14:01 ○菰田俊一[1]，武田　蛍[1]，竹中慶香[1]，鈴木眞依[1]，小関良卓[2] （[1]宮城大学食産業，[2]東北大院）

1D5p03　インドネシア微生物資源からの抗赤痢アメーバ化合物の探索
14:12 ○森美穂子[1,2]，Arif Nurkanto[3]，山下道雄[3]，Danang Waluyo[4]，Amila Pramisandi[2,4]，土橋和之[1]，大村　智[1]，塩見和朗[1,2]，野崎智義[3] （[1]北里生命研，[2]北里大院感染制御，[3]東大院医，[4]インドネシア技術評価応用庁）

1D5p04　Physicochemical screening による新規化合物の探索 -*Trichoderma virens* FKI-7573 株が生産する新規含窒素化合物について-
14:23 ○宮野　怜[1]，松尾洋孝[2]，野中健一[2]，目代貴之[3]，庭野吉己[3]，塩見和朗[2]，高橋洋子[2]，大村　智[2]，中島琢自[2] （[1]北里大院・感染制御，[2]北里大・生命研，[3]東北大院・歯）

1D5p05　*Stenotrophomonas maltophilia* 種内のシデロフォアタイプについて
14:34 ○久富　敦[1]，鈴木智典[2]，志波　優[2]，藤田信之[2]，田中尚人[1,2] （[1]東農大院醸造，[2]東農大生命）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:55

1D5p06　深海由来糸状菌 *Penicillium* sp. FKJ-0123 株が生産する新規シンナモイルトリペプチドについて
14:55　○松尾洋孝[1,2]，目代貴之[3]，野中健一[1,2]，長野由梨子[4]，矢吹彬憲[4]，藤倉克則[4]，庭野吉己[5]，高橋洋子[1]，大村　智[1]，中島琢自[1,2]　([1]北里大・生命研，[2]北里大院・感染制御，[3]東北大・金属材料研，[4]海洋研究開発機構，[5]東北大院・歯)

1D5p07　マクロリドを有するトリコテセンは 12 位エポキシドがなくても毒性を示す
15:06　○松本愛美[1]，西山真未[1]，前多隼人[1]，殿内暁夫[1]，紺野勝弘[2]，橋本　勝[1]　([1]弘前大，[2]富山大和漢研)

1D5p08　New polyketides, fusopoltide derivatives isolated from *Fusarium solani* B-18
15:17　○Nanang Rudianto ARIEFTA[1,2]，Takako ABOSHI[2]，Tetsuya MURAYAMA[2]，Takuya KOSEKI[2]，Yoshihito SHIONO[1,2]　([1]UGAS, Iwate Univ.，[2]Fac. of Agri., Yamagata Univ.)

1D5p09　Cyclohelminthol CP-1,2 の構造
15:28　○田中静也，田中和明，橋本　勝　(弘前大)

1D5p10　イネのアミド型ファイトアレキシンの病原真菌による代謝
15:39　○隠塚修平，木村　塁，香川明慶，西脇　萌，戸嶋浩明，長谷川守文　(茨城大農)

p11〜p13 発表者の接続時間 15:50〜16:00

1D5p11　*Trichoderma sp.*1212-03 の生産する neomacrophorin 類関連物質の構造について
16:00　○西山真未，橋本　勝，殿内暁夫　(弘前大学)

1D5p12　Peribysin O, P 及び Q の構造
16:11　○猪瀬航太[1]，田中和明[1]，山田剛司[2]，越野広雪[3]，橋本　勝[1]　([1]弘前大学農学生命，[2]大阪薬科大学，[3]理研 CSRS)

1D5p13　ECD を用いた Peribysin 類の絶対配置に関する再考察
16:22　○橋本　勝[1]，猪瀬航太[1]，田中和明[1]，山田剛司[2]，越野広雪[3]　([1]弘前大学農生，[2]大阪薬科大学，[3]理研CSRS)

D7 会場　午前の部(9:00〜12:05)

微生物―物質生産 - 酵素，タンパク質―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

1D7a01　放線菌由来植物アルカロイド分解酵素の機能解析
9:00　○木村　澪，熊野匠人，栗崎　誠，橋本義輝，小林達彦　(筑波大院・生命環境)

1D7a02　微生物による赤色色素分解
9:11　○堀　早苗，熊野匠人，寺下柚子，橋本義輝，小林達彦　(筑波大院・生命環境)

1D7a03　*Mycobacterium smegamatis* が産生する hydrazidase の発見と解析
9:22　○栄山　新[1,2]，老沼研一[1,2]，金子幸弘[1,2]　([1]大阪市大院医・細菌，[2]大阪市大院医・感染科学研セ)

1D7a04　乳酸菌 *Lactobacillus sakei* ZH-2 株のアミノ酸ラセマーゼに関する研究
9:33　○松本菜月[1]，戦思彤[2]，金内　誠[1]，佐々木瞳[1]，レーティゴックラン[1]　([1]宮城大 食産業，[2]東北大 農)

1D7a05　クチナーゼ Cut190 の機能や安定性に対する二価金属イオンの影響
9:44　○千賀明香音[1]，判谷吉嗣[1]，木村優希[2]，河合冨佐子[3]，織田昌幸[1]　([1]京府大，[2]京工繊大，[3]岡山大)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

1D7a06　Development of antigen-displaying virus-like particle by SpyTag/SpyCatcher superglue in the silkworm-bacmid expression system
10:05　○Jian Xu[1]，Hamizah Suhaimi[2]，Mikiko Hayashidani[3]，Tatsuya Kato[1,2,3]，Enoch Y. Park[1,2,3]　([1]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.，[2]Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ.，[3]Grad. Sch. of Integr. Sci. Technol. Shizuoka Univ.)

1D7a07　ブチルシアノアクリレートナノ粒子がヤケイロタケのマンガンペルオキシダーゼ生産に与える影響
10:16　○神尾　瑞[1]，山田翔吾[1]，堀沢　栄[1]，飯田大介[2]，小松千景[2]　([1]高知工科大，[2]チカミミルテック株式会社)

1D7a08　*Gluconobacter* 属酢酸菌の膜結合型グルコース脱水素酵素の高発現によるラクトースの高速酸化
10:27　ケオケントラポン[1]，内田侑里[2]，桐生高明[3]，松谷峰之介[4]，片岡尚也[2,4,5]，松下一信[2,4,5]，○薬師寿治[2,4,5]　([1]ラオス国立大，[2]山口大農，[3]大阪産技研，[4]山口大院創成科学，[5]山口大中高温微セ)

1D7a09　酢酸菌 *Komagatabacter europaeus* を宿主とする物質生産の試み
10:38　○植川泰好[1]，繁　宥樹[1]，東久保遥[1]，石井友理[1]，赤坂直紀[2]，佐古田久雄[2]，福田青郎[1]，藤原伸介[1]　([1]関西学院大理工，[2](株)マルカン酢)

1D7a10　*Pseudomonas citronellolis* LA18T 株由来レブリニル CoA 合成酵素の解析
10:49　○羽部　浩[1]，佐藤由也[1]，小池英明[2]，飯村洋介[1]，堀　知行[1]，菅野　学[2]，木村信忠[2]，桐村光太郎[3]　([1]産総研・環境管理，[2]産総研・生物プロセス，[3]早稲田・応化)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

1D7a11　Cloning and sequencing analysis of chitinase and AA10 protein genes in chitinase system of Serratia plymuthica SWSY-3.47
11:10　○IULIIA PENTEKHINA[1,2]，DINH MINH TRAN[3]，TATSUYUKI HATTORI[1]，TAKESHI WATANABE[1]，HAYUKI SUGIMOTO[1]，KAZUSHI SUZUKI[1]　([1]Niigata University, Niigata, Japan，[2]Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia，[3]Tay Nguyen University, Buon Ma Thuot City, Vietnam)

1D7a12　Heterologous production and analysis of cellular responses to the expression of GH11 xylanase from a symbiotic protist in the lower termite
11:21　○Minh Trang PHAM[1]，Gaku TOKUDA[2]，Hirofumi WATANABE[3]，Minoru YOSHIDA[1,4,5]，Manabu ARIOKA[1,4]　([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo，[2]Univ. of the Ryukyus，[3]Nat. Inst. Agrobiol. Sci.，[4]CRIIM, UTokyo，[5]RIKEN CSRS)

1D7a13　*Clostridium perfringens* の T7 発現系による cellulosome 構成酵素の発現
11:32　○澤入駿哉，川畑博暉，加藤実希，森山龍一，宮田　茂　(中部大・応生)

1D7a14　ウェルシュ菌のグリセロール代謝経路と水素生産
11:43　○加藤実希，澤入駿哉，矢野智奈美，和田俊夫，宮田　茂　(中部大院・応生)

1D7a15　枯草菌クオルモン修飾酵素 ComQ の基質認識を担うアミノ酸残基の探索と解析
11:54　○塩田紗希[1]，広岡和丈[1,2]　([1]福山大院工，[2]福山大生命工・生物工)

D7 会場　午後の部（13:50〜16:55）

微生物―物質生産 - 微生物変換，微生物酵素反応―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:40〜13:50

1D7p01　Geraniol dehydrogenase の異種発現による *Acinetobacter* sp. Tol 5 の citral 生物変換に関わる代謝経路の同定
13:50 ○宇佐見享嗣，石川聖人，堀　克敏　（名大院工）

1D7p02　配糖化酵素遺伝子のクローニングと形質転換体によるリナロールなどのアルコールへの反応
14:01 ○鈴木達也[1]，深谷美優[1]，高橋一樹[1]，佐藤浩志[2]，上田　誠[1]　([1]小山高専物質工学科，[2]日生バイオ株式会社）

1D7p03　鉄還元酵素を利用した香気を有するセスキテルペノイド (-)-ロタンドン合成法の開発
14:12 ○梅澤　覚[1,2]，木野邦器[1]　([1]早大院・先進理工・応化，[2]長谷川香料(株)）

1D7p04　非対称カロテノイド生合成経路の代謝進化工学
14:23 ○尾島　匠，関　貴洋，李　　伶，河合繁子，斎藤恭一，梅野太輔　（千葉大・工学部・共生応用）

1D7p05　Simultaneous production of 3-Hydroxypropionic acid and 1,3-Propanediol by psychrophile-based simple biocatalysts in Shewanella sp.
14:34 ○Mohammad MOJARRAD，Takahisa TAJIMA，Akiko HIDA，Junichi KATO　(Hiroshima Univ., Department of Molecular Biotechnology）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:55

1D7p06　組換え大腸菌によるゼアキサンチン代謝物としての新規カロテノイド生産
14:55 ○下出早貴[1]，宮田佳奈[1]，島田裕士[2]，竹村美保[3]，三沢典彦[3]，新藤一敏[1]　([1]日女大・家政・食物，[2]広島大・理，[3]石川県大・生資研）

1D7p07　シトリニン資化性微生物の探索
15:06 ○山下涼香，橘信二郎　（琉球大・農）

1D7p08　アコニット酸イソメラーゼ遺伝子を高発現させた大腸菌生菌体による *Aspergillus niger* クエン酸発酵液からの *trans*-アコニット酸生産
15:17 ○吉岡育哲，小田祐之亮，滝口有沙，桐村光太郎　（早大・先進理工・応化）

1D7p09　基質流入口の拡大によるサリチル酸脱炭酸酵素の基質特異性の拡張
15:28 ○飯塚恭平，石原真奈，荒木優大，石井義孝，桐村光太郎（早大・先進理工・応化）

1D7p10　SDGs に重要なアンモニアを生産する酵母セルファクトリーの構築
15:39 ○渡邉幸夫[1]，黒田浩一[1]，立道祐輝[2]，仲原丈晴[2]，植田充美[1]　([1]京大院・農・応用生命，[2]キッコーマン株式会社・研究開発本部）

p11〜p15 発表者の接続時間 15:50〜16:00

1D7p11　エクオールを水酸化する酵素の発見
16:00 橋本貴史[1]，向井克之[2]，松山彰収[2]，○古屋俊樹[1]　([1]東京理科大理工・応生，[2](株)ダイセル）

1D7p12　菌体反応系を利用したイミダゾールジペプチド生産技術の開発
16:11 ○倉本　歩[1,3]，駒林卓磨[2]，木野邦器[1,2]　([1]早大・理工総研，[2]早大院・先進理工・応化，[3]東海物産）

1D7p13　*Rhodococcus wratislaviensis* C31-06 株の示す α-アミノイソ酪酸代謝の解析
16:22 日比　慎[1,2]，福田　大[2]，間中千尋[2]，○加藤健太[2]，野尻増俊[3]，八十原良彦[3]，高橋里美[2]，小川　順[2]　([1]富山県立大工・生工研セ，[2]京大院農，[3]カネカバイオテクノロジー研究所）

1D7p14　*Rhodococcus wratislaviensis* C31-06 株における新規 α-アミノイソ酪酸代謝経路の全容解明
16:33 ○日比　慎[1,2]，間中千尋[2]，福田　大[2]，油谷駿介[2]，青木　航[2]，植田充美[2]，野尻増俊[3]，八十原良彦[3]，高橋里美[2]，小川　順[2]　([1]富山県立大工・生工研セ，[2]京大院農，[3]カネカバイオテクノロジー研究所）

1D7p15　*Rhodococcus wratislaviensis* C31-06 株由来の新規 α-アミノイソ酪酸水酸化酵素の機能解析と応用
16:44 ○小川　順[1]，間中千尋[1]，福田　大[1]，野尻増俊[2]，八十原良彦[2]，高橋里美[1]，日比　慎[1,3]　([1]京大院農，[2]カネカバイオテクノロジー研究所，[3]富山県立大工・生工研セ）

D8 会場　午前の部（10:16〜11:54）

環境科学・バイオマス利用―資源変換，資源再生利用―

a07〜a10 発表者の接続時間 10:06〜10:16

1D8a07　BIOENGINEERING OF A STABLE MOLYBDATE BINDING SYSTEM USING Saccharomyces cerevisiae
10:16 ○STEPHANIE AUDREY[1]，Mei-Fang CHIEN[1]，Naoya IKEDA[1]，Kengo KUBOTA[2]，Chihiro INOUE[1]　([1]Graduate School of Environmental Studies, Tohoku University, [2]Department of Civil and Environmental Engineering, Tohoku University）

1D8a08　乳酸菌を模倣した金ナノ粒子合成手法の開発
10:27 ○加藤由悟[1]，菊池郁也[1]，吉村悦郎[1,2]，鈴木道生[1]　([1]東大院農，[2]放送大教養）

1D8a09　環境水中から単離した *Vibrio rumoiensis* と *Bacillus simplex* による金ナノ粒子合成機構の解析
10:38 ○LI Yiting，加藤由悟，鈴木道生　（東大院農）

1D8a10　*Collimonas sp.* D-25 による金属ナノ粒子の生成機構の解明
10:49 ○唐　冬林[1]，加藤由悟[1]，張　定坤[1]，安藤　司[2]，亀田　学[2]，鈴木道生[1]　([1]東大院農，[2]ジパング）

a11〜a14 発表者の接続時間 11:00〜11:10

1D8a11　鉄鋼スラグから鉄ナノ粒子を生成する微生物の探索
11:10 ○大竹晟佳[1]，月舘秀典[2]，加藤由悟[2]，吉村　航[3]，鈴木道生[2]　([1]東大農，[2]東大院農，[3]新日鉄住金先端研）

1D8a12　微生物を用いた鉄鋼スラグからの鉄溶出法の開発
11:21 ○月舘秀典[1]，吉村　航[2]，永田宏次[1]，吉村悦郎[3]，鈴木道生[1]　([1]東大院農，[2]新日鐵住金株式会社，[3]放送大）

1D8a13　ウロコフネタマガイ由来の有機高分子を利用した pyrite ナノ粒子の合成
11:32 ○山下達也[1]，松田大輝[1]，アーサンナズムル[2]，岡田至崇[2]，鈴木庸平[3]，鈴木道生[1]　([1]東大院農，[2]東大先端研，[3]東大院理）

1D8a14　線虫を用いた 137Cs 汚染土壌に対する新規除染及び減容化プロセスの構築
11:43 合田　亮[1]，濱野　樹[2]，星　英之[3]，○倉橋健介[4]，吉原静恵[2]，徳本勇人[2]　([1]阪府大院・工，[2]阪府大院・理，[3]阪府大院・人社，[4]阪府大高専）

D8 会場　午後の部（13:50〜16:44）

環境科学・バイオマス利用
―環境汚染物質 / 環境保全，浄化技術工学、バイオレメディエーション / バイオマス、バイオマス変換、バイオ燃料、バイオ化成品―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:40〜13:50

1D8p01　亜硫酸イオンの酸化によるスルホン化芳香族アミン化合物の微生物分解促進
13:50　○早瀬伸樹，近藤美咲，喜多晃久，中川克彦　（新居浜高専　生物応用化）

1D8p02　Construction of efficient bioremediation system by using biomass containing hydrocarbon-degrading bacteria
14:01　○ADI TIYA YANUAR，KIWAKO S. ARAKI，MOTOKI KUBO　（Ritsumeikan University）

1D8p03　ベンタクロロフェノールの微生物分解を促進する固体腐植物質の特徴
14:12　○笠井拓哉[1,2]，ファムデュエンミン[1]，章　春芳[2]，片山新太[1,2]　（[1]名大・未来研，[2]名大院・工）

1D8p04　ポリ塩化ビフェニル類汚染化による土壌微生物生態系への影響評価
14:23　○櫻間晴子[1]，比良岡祐希[1]，山下　舞[1]，澤　誠人[1]，羽賀雄紀[2]，松村千里[2]，乾　秀之[3]，中野　武[4]，萩下大郎[1]　（[1]京都学園大バイオ環境，[2]兵庫県環境研セ，[3]神戸大バイオ，[4]大阪大環境安全研究管理セ）

1D8p05　Identification of phenol as a key metabolite of anaerobic benzene biodegradation by *Azoarcus* sp. DN11
14:34　○Allan DEVANADERA[1]，Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1,2]，Yuki KASAI[3]，Yoh TAKAHATA[4]，Kazunori OKADA[1]，Hideaki NOJIRI[1,2]
([1]BRC, UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Chuo Univ., [4]Taisei Corp.)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:55

1D8p06　回転型スラリーバイオリアクターを用いた A 重油汚染土壌の浄化とその分子メカニズムの解析
14:55　○三好佑奈[1]，岡田　丈[2]，新谷政己[1]，金原和秀[1]　（[1]静大院・総合科技，[2]静大・工）

1D8p07　Characteristics of rapid growth of Paenibacillus sp. strain 4B1 on dibenzofuran in moderate thermophilic condition
15:06　○HA THANH LE THI[1,4]，MASAKI SHINTANI[2]，RYOTA MORIUCHI[3]，HIDEO DOHRA[3]，HOANG LOC NGUYEN[4]，KAZUHIDE KIMBARA[1]
([1]Department of Environment and Energy System, Graduate School of Science and Technology, Shizuoka Univ., Japan, [2]Department of Bioscience, Graduate School of Science and Technology, Shizuoka Univ., Japan, [3]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, Japan, [4]College of Sciences, Hue University, Vietnam)

1D8p08　*Sphingomonas bisphenolicum* AO1 株のビスフェノール A（BPA）分解能の不安定化評価系の構築
15:17　○村上将和[1]，仲野育惠[1]，松村吉信[1,2]　（[1]関西大・生命生物工，[2]関西大・ORDIST）

1D8p09　*Meiothermus ruber* H328 株由来 protein disulfide oxidoreductase（PDO）発現増強株における転写の検討―トリ羽毛分解への影響調査―
15:28　武田梨花[2]，○淺野優希[1]，渡部邦彦[2]　（[1]京府大・生命環境，[2]京府大院・生命環境）

1D8p10　ユーグレナの明暗条件下における生育と内分泌攪乱物質；ノニルフェノールの代謝機能の関連性
15:39　大桑（林）浩孝[1,2]，乾　　博[1,3]，岡井康二[1]，阪本龍司[1,4]，○中野長久[1]　（[1]大阪府大・研究推進機構　生物資源，[2]大阪府立環農水研，[3]大阪府大院・栄養，[4]大阪府大院・生命環境科学）

p11〜p14 発表者の接続時間 15:50〜16:00

1D8p11　Construction of organic soil based on soil fertility index（SOFIX）
16:00　○PITCHAYAPA PHOLKAW，AYAKA MURAJI，QUOC THINH TRAN，KIWAKO S. ARAKI，MOTOKI KUBO　（Ritsumeikan University）

1D8p12　毒素―抗毒素系の多重化により堅牢にした非天然アミノ酸要求性による生物学的封じ込め法
16:11　○加藤祐輔　（農研機構生物機能）

1D8p13　POM を介した魚類と水の関係性構築
16:22　○鈴木漱星[1]，朝倉大河[2]，松本朋子[2]，守屋繁春[1,2]，菊地　淳[1,2,3]　（[1]横市院・生命医，[2]理研・環境資源，[3]名大院・生命農）

1D8p14　紅藻類大型海藻オゴノリによる栄養塩吸収
16:33　○柳岡直樹[1]，鹿川紗希[2]，孝志ちあき[2]，垣田浩孝[2]，小比賀秀樹[3]　（[1]日本大学大学院　総合基礎科学研究科，[2]日大文理，[3]産総研健康工学）

E1 会場　午前の部（9:00〜12:05）

酵素―糖質代謝関連酵素―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

1E1a01　ヒトドリコールキナーゼ hDK の物理的相互作用に重要な領域の解析
9:00　○高橋哲夫，杉村知夏，山本達也　（東海大工）

1E1a02　*Caldanaerobacter subterraneus* 由来 CE-4 酵素のドメインマッピング
9:11　○佐々本康平[1,2]，森芳邦彦[3]，大本貴士[3]，上垣浩一[4]，西矢芳昭[2]，中村　努[1]　（[1]産総研，[2]摂南大学院，[3]大阪産業技術研究所，[4]近畿大学）

1E1a03　分離菌 A34 株 N-アセチルヘキソサミニダーゼの糖転移作用
9:22　○倉掛昌裕，天井裕可里　（福山大海洋生物）

1E1a04　*Gongronella butleri* 由来エキソ-キトビオハイドロラーゼの発現と酵素化学的性質
9:33　○野口晴菜[1]，満行将太郎[1]，関　清彦[1]，永野幸生[2]，後藤正利[1]，光富　勝[1]　（[1]佐賀大農，[2]佐賀大分析セ）

1E1a05　リステリアキチナーゼの機能未知領域の機能
9:44　○坂口政吉，本田翔太郎，木村将大，脇田悟誌，岡　侑司，川喜田正夫　（工学院大先進工）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

1E1a06　*Methylomonas* sp. 由来 D-アルロース 3-エピメラーゼの発現と構造解析
10:05　○吉田裕美[1,3]，吉原明秀[2,3]，加藤志郎[2,3]，望月　進[2,3]，秋光和也[2,3]，何森　健[2,3]，神鳥成弘[1,3]　（[1]香川大・総合生命研究セ,医，[2]香川大・農学部，[3]香川大・国際希少糖研究教育）

1E1a07　イトマキヒトデ膵臓由来の α-L-フコシダーゼの精製，諸性質決定および構造解析
10:16　○鈴木智大[1]，小野晶子[1]，後藤咲季[2]，河野はるか[2]，松井　萌[2]，青木大地[1]，松田　勝[1]，河岸洋和[3,4]，尾形　慎[2]　（[1]宇大・バイオ，[2]福島高専・化学バイオ，[3]静岡大・農，[4]静岡大・グリーン研）

1E1a08　*Microbacterium arabinogalactanolyticum* 由来の組み換え endo-D-arabinase の機能解析
10:27　○藤田清貴[1]，田中悠暉[1]，石渡明弘[2]，伊藤幸成[2]，隅田泰生[3]，北原兼文[1]　（[1]鹿児島大農，[2]理研，[3]鹿児島大院理工）

1E1a09　*Bacteroides thetaiotaomicron* 由来 GH97 酵素：5 つの機能未知パラログの解析
10:38　○菊池麻子，中川雄登，奥山正幸，田上貴祥，木村淳夫（北大院農）

1E1a10　変異型 galacto-*N*-biose/lacto-*N*-biose I phosphorylase を利用した lacto-*N*-tetraose の酵素合成法の開発
10:49　○則岡　翼[1]，後藤愛那[1]，加藤紀彦[1]，諏訪英理子[2]，松尾道憲[2]，北岡本光[3]，片山高嶺[1]　([1]京大院生命，[2]京女大院家政，[3]農研機構　食品研)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

1E1a11　*Bifidobacterium bifidum* 由来スルフォグリコシダーゼ BbhII の X 線結晶構造解析
11:10　○加藤紀彦[1]，山田千早[2]，前渋貴子[1]，芦田　久[3]，伏信進矢[2]，片山高嶺[1]　([1]京大院生命，[2]東大院農，[3]近畿大生物理工)

1E1a12　GH127 β-L-アラビノフラノシダーゼと阻害剤の複合体構造
11:21　○澤野孝太[1]，成田　覚[2,3]，荒川孝俊[1,4]，山田千早[1,4]，藤田清貴[5]，石渡明弘[3]，伊藤幸成[3]，伏信進矢[1,4]　([1]東大院・農生科・応生工，[2]芝浦工大院理工，[3]理研，[4]東大・微生物連携機構，[5]鹿児島大院農)

1E1a13　アラビノース含有糖鎖の分解に関わる *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 由来の GH51 酵素の解析
11:32　○吉原侑希[1]，宮原祐貴[2]，米野雅大[1]，芦田　久[1,2]　([1]近畿大院　生物理工，[2]近畿大　生物理工)

1E1a14　*Bifidobacterium pseudocatenulatum* の *N*-アセチルスクロサミン加水分解酵素の精製と諸性質調査
11:43　○永嶋　誠[1]，吉野貴紘[2]，藤田　宙[2]，平野貴子[1,2]，袴田　航[1,2]，西尾俊幸[1,2]　([1]日大院生資科，[2]日大生資科・生命化)

1E1a15　*N*-アセチルスクロサミンによって誘導される *Bifidobacterium pseudocatenulatum* のグリコシダーゼに関する研究
11:54　○石倉葉月，平野貴子，袴田　航，西尾俊幸　(日大院生資科)

E1 会場　午後の部(13:50〜15:50)

酵素―アミノ酸代謝関連酵素―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:40〜13:50

1E1p01　ヒト腸内細菌 *Bacteroides thetaiotaomicron* の カルボキシスペルミジン脱炭酸酵素の遺伝学的・生化学的解析
13:50　○下川ひろみ[1]，阪中幹祥[1,2]，栗原　新[1]　([1]石川県大・生資環，[2]デンマーク工科大)

1E1p02　*Lactobacillus sakei* LK-145 のアスパラギナーゼホモログ遺伝子の大腸菌を宿主とする高発現系の構築と遺伝子産物の機能解析
14:01　○田村和也，山中一也，老川典夫　(関大 化学生命工)

1E1p03　*Thermobacillus composti* 由来アスパラギン酸アミノ基転移酵素の諸性質
14:12　○三原久明，紀戸彩加，戸部隆太，谷　泰史　(立命大・生命)

1E1p04　超好熱アーキア *Pyrococcus horikoshii* 由来オルニチン：2-オキソグルタル酸アミノトランスフェラーゼの機能・構造解析
14:23　○大志田達也[1]，半澤七菜[2]，大島敏久[3]，櫻庭春彦[1]，川上竜巳[4]　([1]香川大農，[2]徳島大総科，[3]大阪工大工，[4]徳島大院社産理工)

1E1p05　酵母における *N*-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1 依存的な新規アルギニン合成機構
14:34　○那須野亮，神庭拓也，乗船沙紀，高木博史　(奈良先端大・バイオ)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:55

1E1p06　超好熱・好酸性古細菌 *Sulfolobus acidocaldarius* 由来のホモクエン酸合成酵素の構造・機能解析
14:55　○鈴木智大[1]，富田武郎[1,2]，葛山智久[1,2]，西山　真[1,2]　([1]東大生物工学セ，[2]東大CRIIM)

1E1p07　*Staphylococcus condimenti* 及び *Aerococcus sanguinicola* 由来イソロイシン 2-エピメラーゼホモログの機能解析
15:06　○牟田口祐太，春日　和，小嶋郁夫　(秋田県大生資)

1E1p08　D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼを用いた D-アミノ酸生合成酵素遺伝子のスクリーニング
15:17　○那須涼麻[1]，伊藤智和[1]，武藤菜摘[1]，坂神晴菜[1]，邊見　久[1]，森　　寿[2]，吉村　徹[1]　([1]名大院・生命農，[2]富山大院・医学薬学)

1E1p09　超好熱菌由来シスタチオニン β-リアーゼの D-アミノ酸代謝能の解析
15:28　○宮本哲也，松浦美帆，吉田真梨愛，齋藤康昭，関根正恵，片根真澄，本間　浩　(北里大薬)

1E1p10　Lactobacillus sakei Uonuma 株由来アラニンラセマーゼ（AlaR）の解析
15:39　○中山　栞[1]，大越正貴[1]，吉井郁弥[1]，市村　光[1]，平賀晴菜[1]，古川那由太[1]，西脇俊和[2]，井深章子[1]　([1]新潟薬大・応生科，[2]新潟農総研・食研セ)

E2 会場　午前の部(9:00〜12:05)

動物―細胞 - 細胞機能，細胞骨格，オルガネラ，輸送体，細胞接着，細胞内輸送／細胞 - 情報伝達，細胞応答，分化制御，メタボローム／細胞工学 - 物質生産，タンパク質工学，細胞培養，細胞外マトリックス―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

1E2a01　極性脂質に含まれるヒト ABCG4 の輸送基質探索および認識機構の解析
9:00　○末永　光[1]，見月俊吾[1]，木岡紀幸[1]，植田和光[1,2]，木村泰久[1]　([1]京大院農，[2]京大iCeMS)

1E2a02　超音波法によるヒト間葉系幹細胞の接着斑単離とその最適化
9:11　○柴原正和[1]，木村泰久[1]，植田和光[1,2]，木岡紀幸[1,2]　([1]京大農，[2]iCeMS)

1E2a03　ELSD 法を用いたヒト ABC タンパク質の脂質輸送能解析手法の構築
9:22　○高橋　智[1]，北　悠人[1]，木岡紀幸[1]，植田和光[1,2]，木村泰久[1]　([1]京大院・農・応用生命，[2]京大・iCeMS)

1E2a04　AMPK による SRSF1 のリン酸化を介した選択的スプライシング制御機構の解明
9:33　○松本英里[1]，鈴木　司[1,2]，井上　順[1,2]，山本祐司[1,2]　([1]東農大院・農・農化，[2]東農大・応生・農化)

1E2a05　ApoA-I を封入した巨大リポソーム（GUV）の作製
9:44　○坂田和樹[1]，木岡紀幸[1]，植田和光[1,2]，木村泰久[1]　([1]京大院・農・応用生命，[2]京大・iCeMS)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

1E2a06　新規物質生産宿主としてのミミズ細胞培養基盤技術の開発
10:05　○伊佐　猛[1]，赤澤真一[1]，大沼　清[2]，志田洋介[2]，小笠原渉[2]　([1]長岡高専物質工，[2]長岡技大生物)

1E2a07　コラーゲン架橋構造ピリジノリンは糖化タンパク質受容体 RAGE の内因性のリガンドである
10:16　○三宅春奈[1]，村上庸人[1]，岡田楓夏[1]，藤野峻行[1]，倉知遼太郎[1]，長谷川俊樹[1]，臼井照幸[2]，早瀬文孝[1]，渡辺寛人[1]　([1]明治大農，[2]女子栄養大栄養)

1E2a08　アデノウイルス E1A による cyclin A-CDK2 複合体形成促進を介した G2/M 期停滞機構の解析
10:27　○赤池康範，千葉櫻拓　(東農大バイオ)

1E2a09　がん細胞における 5-アミノレブリン酸と温熱ストレスによる細胞周期進行への影響
10:38　○小澤峻一[1]，飯田友貴[2]，高橋　究[2]，中島元夫[2]，田中　徹[2]，千葉櫻拓[1]　([1]東農大農，[2]SBIファーマ(株))

1E2a10　低酸素条件下におけるマウスメラノーマ細胞悪性化の機構解析
10:49 ○川原　唯，橋本康太郎，三浦　豊（東農工大農）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

1E2a11　CDK 阻害因子 p27 の新規な機能抑圧経路
11:10 ○米谷達哉，千葉櫻拓（東農大院バイオ）
1E2a12　NPM1 との相互作用を介した p27 機能抑圧メカニズムの解析
11:21 ○松下凪沙，小林加奈，米谷達哉，千葉櫻拓（東農大院バイオ）
1E2a13　内因性酸化ステロールによるコレステロール恒常性制御
11:32 ○齋藤穂高，山内祥生，佐藤隆一郎（東大院・農生科・応生化）
1E2a14　SCAP 安定化による SREBP プロセシング調節
11:43 ○丸山貴史，官　彦州，清水　誠，山内祥生，佐藤隆一郎（東大院・農生科・応生化）
1E2a15　酸化ステロールは Insig を介して細胞死を誘発する
11:54 ○渡邉雄一，三吉翔子，清水　誠，山内祥生，佐藤隆一郎（東大院・農生科・応生化）

E2 会場　午後の部（13:50〜16:33）

酵素―核酸代謝関連酵素／脂質代謝関連酵素／タンパク質・ペプチド代謝関連酵素―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:40〜13:50

1E2p01　リボヌクレアーゼ H2 を欠損させたマウス線維芽由来 NIH3T3 細胞の作製
13:50 月足元希，馬場美聡，○兒島憲二，姫田康平，滝田禎亮，保川　清（京大院農）
1E2p02　リボヌクレアーゼ H2 を欠損させたマウス線維芽由来 NIH3T3 細胞の性状解析
14:01 ○馬場美聡，月足元希，兒島憲二，姫田康平，滝田禎亮，保川　清（京大院農）
1E2p03　キノロン系抗菌薬の新規構造類縁体である BFF122 の抗結核菌活性と DNA gyrase に対する阻害活性
14:12 ○森茂太郎[1]，金　　玄[1]，田村敏生[2]，前田百美[2]，林原絵美子[1]，Rizzi Menico[3]，柴山恵吾[1]（[1]感染研細菌第二部，[2]感染研ハンセン病研究センター，[3]東ピエモンテ大学薬学部）
1E2p04　*Methanocaldococcus jannaschii* 由来の熱安定性制限酵素 Mja I の特徴解析
14:23 ○青野未来，志田敏夫（信大院繊・応生）
1E2p05　黄色ブドウ球菌の *pptB* 産物によるウンデカプレニル二リン酸およびウンデカプレニルリン酸の脱リン酸化
14:34 ○川上直輝，嶋田圭純，藤田高彬，藤崎真吾（東邦大理）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:55

1E2p06　脂肪酸伸長酵素 ELOVL5 のリン酸化による脂肪酸代謝の制御メカニズム
14:55 ○市　育代[1]，林　優里[2]，安田菜美季[2]，藤原葉子[1]（[1]お茶大・基幹研究院，[2]お茶大院・ライフサイエンス）
1E2p07　*Escherichia coli* 由来新規リゾホスファチジン酸アシル基転移酵素 YihG の基質特異性と生理機能解析
15:06 ○豊竹洋佑，川本　純，西山雅祥，小川拓哉，栗原達夫（京大化研）
1E2p08　カルパイン-1 の制御因子としてのカルパイン-2
15:17 ○大内史子[1]，進藤真由美[2]，秦　勝志[1]，土井奈穂子[1]，小野弥子[1]（[1]都医学研 カルパインPJ，[2]都医学研 基盤技術研究センター）
1E2p09　ナメコ子実体でチロシナーゼを活性化する金属プロテアーゼ
15:28 ○小西康子[1,2]，老泉琴乃[2]，笹木哲也[3]（[1]東京家政大，[2]石川県大，[3]石川県工試）
1E2p10　白癬菌 *Trichophyton mentagrophytes* 由来メタロプロテアーゼ 4 の性状解析
15:39 ○古川那由太[1]，梅田菜摘[1]，風間　愛[1]，高橋佑果[1]，鈴木まゆみ[1]，小瀬知洋[1]，山田　剛[2]，井深章子[1]（[1]新潟薬大応生科，[2]帝京大医真菌研）

p11〜p13 発表者の接続時間 15:50〜16:00

1E2p11　キノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素の活性中心サブユニット生合成に関与するセリンプロテアーゼの機能解析
16:00 ○大関俊範[1]，中井忠志[2]，谷澤克行[1]，岡島俊英[1]（[1]阪大産業科学研究所，[2]広島工大　生命）
1E2p12　*Stenotrophomonas maltophilia* 由来 Dipeptidyl peptidase 7 の基質 P2 認識機構の解析
16:11 ○中村彰宏[1]，橋口太一[1]，本間宣行[1]，鈴木義之[1]，阪本泰光[2]，田中信忠[3]，小笠原渉[1]（[1]長岡技科大，[2]岩手医科大，[3]昭和大）
1E2p13　超好熱古細菌 *Aeropyrum camini* 由来セリンプロテアーゼの生化学的特徴解析
16:22 ○内海雄太，志田敏夫（信大院繊・応生）

E3 会場　午前の部（9:00〜12:05）

動物―個体 - 生理・栄養・代謝，生体機能，生体制御―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

1E3a01　脳梗塞患者の全血を用いた脳梗塞バイオマーカー miRNA の探索
9:00 ○田中まゆひ[1]，阿部　新[2]，斎藤芳和[3]，安岡顕人[3]，阿部啓子[3,4]，朝倉富子[3]（[1]東大農，[2]多摩総合医療センター，[3]東大院・農生科，[4]KISTEC）
1E3a02　高脂肪食給餌マウスのエネルギー代謝に関する研究
9:11 ○世良悠夏[1]，児山有希[2]，渡邊美優[2]，三浦　徳[1]，増澤(尾﨑)依[2]，細野　崇[1,2]，関泰一郎[1,2]（[1]日大院・生資科・応生科，[2]日大・生資科・生命化）
1E3a03　父親の肥満と母親の妊娠期栄養制限がマウス次世代の糖・脂質代謝に及ぼす影響
9:22 ○石井彩香，平井　静，中村絵里，小澤彩花，江頭祐嘉合（千葉大院・園芸・応生化）
1E3a04　MIG12 による ACC 活性化機構の解析
9:33 ○平口遥香[1]，小林里奈[2]，鈴木　司[2]，山本祐司[2]，清水　誠[1]，佐藤隆一郎[1]，井上　順[2]（[1]東大院・農生科・応生化，[2]東農大・応生・農化）
1E3a05　ACC 活性化因子 MIG12 の新規結合タンパク質の同定
9:44 ○小林里奈[1]，平口遥香[2]，菊地瑛登[1]，高橋　舜[1]，鈴木　司[1,3]，山本祐司[1,3]，井上　順[1,3]（[1]東農大・応生・生応，[2]東大院・農生科・応生化，[3]東農大・応生・農化）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

1E3a06　毛髪及び体毛の物性・代謝解析
10:05 ○塚本　楓[1]，坂田研二[2]，菊地　淳[1,2,3]（[1]横市院・生命医，[2]理研・環境資源，[3]名大院・生命農）
1E3a07　刺胞動物ミズクラゲの変態における細胞増殖の解析
10:16 ○藤井夏鈴，小山寛喜，国吉久人（広島大・院生物圏）
1E3a08　カイコの寄主植物選択に関わる味覚受容体の探索
10:27 ○鈴木俊太，木内隆史，嶋田　透，東原和成（東大農）
1E3a09　線虫の環境因子による寿命制御機構の解析
10:38 ○馬場真衣子，近藤春佳，久米一規，水沼正樹（広島大院先端研）
1E3a10　線虫の遺伝子発現および記憶保持能に及ぼす 4-ヒドロキシノネナールの影響
10:49 ○薮田行哲，萩野　侑，井上　和，吉田佳代子，美藤友博，渡邉文雄（鳥取大農）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

1E3a11　胎児期および授乳期のタンパク質欠乏が仔マウスの肝臓 FGF21 発現におよぼす影響
11:10　○加藤　拓，島村紘平，竹中麻子　（明治大農）

1E3a12　アルコール摂取による有害効果への内在性オキシトシン系の抑制機能について
11:21　○大塚彩乃，日出間志寿，西森克彦　（東北大農）

1E3a13　フルクトース摂取過多による肝障害のメカニズム解析
11:32　○松川隼也[1]，酒井真志人[1]，長沼孝雄[1]，赤星志織[1,2]，満島　勝[1]，八木　孝[1,3]，矢野宏行[1,3]，松本道宏[1]　([1]国立国際医療研究センター，[2]横浜市大医，[3]日本医科大生体制御)

1E3a14　薬物性肝障害の再生過程におけるマクロファージ除去の影響
11:43　○三浦　徳[1]，木原正峰[2]，世良悠夏[1]，日高なつみ[2]，渡辺高大[2]，増澤(尾﨑)依[2]，細野　崇[1,2]，関泰一郎[1,2]　([1]日大院・生資科・応生科，[2]日大・生資科・生命化)

1E3a15　転写調節因子 EHF がランゲルハンス細胞において果たす役割の解析
11:54　○中野信浩[1]，矢野堅士[1,2]，八代拓也[2]，西山千春[1,2]，北浦次郎[1]，奥村　康[1]，小川秀興[1]　([1]順天堂大院医，[2]東理大基工)

E3 会場　午後の部(14:01〜16:33)

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

p02〜p05 発表者の接続時間 13:51〜14:01

1E3p02　ドーパミン D1/5 受容体による cAMP 情報伝達経路活性化を介した海馬依存性記憶制御
14:01　○六川智博，長谷川俊介，喜田　聡　（東農大・応生科・バイオ）

1E3p03　海馬における神経炎症性サイトカイン TNFα は恐怖記憶想起を負に制御する
14:12　○高橋翔平，福島穂高，喜田　聡　（東農大院・農・バイオ）

1E3p04　抗肥満ホルモン FGF21 は骨格筋萎縮に応答する
14:23　○清水　誠[1]，三浦雄也[1]，橋詰　力[2]，山内祥生[1]，佐藤隆一郎[1]　([1]東大農，[2]静岡県大食)

1E3p05　筋萎縮時に応答する新規繊維芽細胞増殖因子の同定
14:34　○野口　惇，清水　誠，小田耕司，山内祥生，佐藤隆一郎（東大院・農生科・応生化）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:55

1E3p06　リジン長鎖アシル化タンパク質の網羅的な探索法の開発
14:55　○加藤　竜[1]，則次恒太[1,2,3]，鈴木健裕[4]，堂前　直[4]，吉田　稔[2,3]，伊藤昭博[1,2]　([1]東薬大・生命科学，[2]理研CSRS・ケミカルゲノミクス，[3]東大院・農生科・応生工，[4]理研CSRS・生命分子解析)

1E3p07　転写因子 TEAD のリジン長鎖アシル化修飾を介した転写制御機構
15:06　○則次恒太[1,2,3]，伊藤昭博[2,3]，小川健司[2]，鈴木健裕[4]，堂前　直[4]，吉田　稔[1,2]　([1]東大院農・応生工，[2]理研CSRS・ケミカルゲノミクス，[3]東薬大・生命科学，[4]理研CSRS・生命分子解析)

1E3p08　恐怖記憶消去を制御する脳領野同定による消去機構の組織学的解析
15:17　○立花亮太，喜田　聡　（東農大院）

1E3p09　恐怖記憶想起後に再固定化を停止し，消去誘導を開始する移行プロセスの同定と機構解析
15:28　○福島穂高，喜田　聡　（東農大）

1E3p10　ビタミン B1 欠乏誘導性の記憶障害は脳内炎症と転写因子 CREB 不活性化による海馬神経変性によって引き起こされる
15:39　○辻　竜平，渡辺玉絵，喜田　聡　（東京農大院・農・バイオ）

p11〜p13 発表者の接続時間 15:50〜16:00

1E3p11　FOXO1 の転写活性を指標とした筋萎縮を抑制する化合物の探索　【ビタミン D による FOXO1 の抑制効果】
16:00　○大西拓己，松田凛太郎，広瀬優真，内冨　蘭，畑澤幸乃，亀井康富　（京都府立大学）

1E3p12　海馬神経新生エンハンサーメマンチンによるニコチン依存性記憶忘却の促進
16:11　○南　朱夏，喜田　聡　（東農大院）

1E3p13　海馬神経新生エンハンサーメマンチンによる社会的敗北ストレス後の PTSD 様行動異常の改善
16:22　○石川理絵，内田千晶，喜田　聡　（東農大・生命科学・バイオ）

E4 会場　午前の部(9:00〜11:43)

生物科学―糖鎖科学 - 糖鎖工学／糖鎖科学 - 構造，機能―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

1E4a01　FRET 型プローブを用いた endo-α-mannosidase の活性評価
9:00　○佐野加苗[1]，栗原大輝[2]，黒岩歩美[1]，石井希実[1]，戸谷希一郎[2]，吉原利忠[1]，松尾一郎[1]　([1]群馬大院理工，[2]成蹊大理工)

1E4a02　*N*-アセチルグルコサミンオリゴマーを用いた FRET クエンチング効率の検証
9:11　○白井　彰，佐野加苗，松尾一郎　（群馬大院）

1E4a03　コアフコースを有する糖鎖に作用する ENGase 探索に向けた蛍光プローブの合成
9:22　○松尾一郎[1]，石井希実[1]，永田光穂[1]，佐野加苗[1]，加藤紀彦[2]，山本憲二[3]，飯野健太[4]，松崎祐二[4]，西川宜秀[4]　([1]群馬大理工，[2]京大生命科学，[3]石川県立大生物資源，[4]東京化成工業)

1E4a04　シャペロン融合型 EDEM タンパク質の発現と精製
9:33　○相川順一，伊藤幸成　（理研開拓研究本部）

1E4a05　EDEM タンパク質の人工糖鎖基質に対する活性評価
9:44　○山口実愛[1]，菊間隆志[1]，瀬古　玲[2]，伊藤幸成[2,3]，武田陽一[1]　([1]立命館大生命科学，[2]JST-ERATO，[3]理研)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

1E4a06　*O*-マンノシルグリカンの部分構造，Xylβ1-4Rbo5-P-1Rbo の合成
10:05　○田村敬裕，田村純一　（鳥取大院農）

1E4a07　GH127 β-L-アラビノフラノシダーゼ阻害剤の合成検討
10:16　○石渡明弘[1]，成田　覚[1,2]，藤田清貴[3]，澤野孝太[4]，伏信進矢[1]，伊藤幸成[1]　([1]理研，[2]芝浦工大院理工，[3]鹿児島大院農，[4]東大院農)

1E4a08　糖ペプチド合成を志向したシアル酸カルボキシ保護基の検討
10:27　○伊藤　駿，朝比奈雄也，北條裕信　（大阪大学蛋白質研究所）

1E4a09　脂質膜上でのスフィンゴ脂質頭部基の NMR 配向解析
10:38　○花島慎弥，村田道雄　（阪大院理）

1E4a10　大腸菌の膜タンパク質膜挿入機構解明を目指した蛍光標識 MPIase 類縁体の合成
10:49　○藤川紘樹[1]，梅川雄一[1]，鈴木苑実[2]，西山賢一[2]，島本啓子[1]　([1](公財)サントリー生命科学財団，[2]岩手大農)

a11〜a13 発表者の接続時間 11:00〜11:10

1E4a11　*o*-ホルミルフェニルチオグリコシド用いたグリコシル化法の改善
11:10　○大野勇次[1]，小室晴香[1]，西田芳弘[1,2]，土肥博史[1,2]　([1]千葉大院園芸，[2]千葉大分子キラリティー研究センター)

1E4a12　チオエーテル基を用いた 1,2-*cis* 選択的グリコシル化の反応機構の解明と糖鎖合成への応用
11:21　○須田　栞[1]，前川丈武[1]，西田芳弘[1,2]，土肥博史[1,2]　([1]千葉大学，[2]千葉大学分子キラリティー研究センター)

1E4a13　前方光散乱瞬時測定による糖鎖－レクチン架橋反応のリアルタイム観察
11:32　○尾形　慎[1]，小野田崇司[1]，若松　孝[1,2]　([1]福島高専・化学バイオ，[2]茨城高専・電気電子系)

E4 会場　午後の部(14:01〜16:33)

生物科学―糖鎖科学 - 構造，機能／糖鎖科学 - 糖鎖工学／糖鎖科学 - その他―

p02〜p05 発表者の接続時間 13:51〜14:01

1E4p02　野生エゾジカ（*Cervus nippon yesoensis*）の内臓と軟骨組織に含まれるコンドロイチン硫酸／デルマタン硫酸の組成分析
14:01　○武田-奥田尚子，田村純一　(鳥取大農)

1E4p03　Analytical study on chondroitin sulfate in the internal organs of wild deer, *Cervus Nippon*
14:12　○Su-Jung YEON，Naoko TAKEDA-OKUDA，Jun-ichi TAMURA　(Fac. Agric., Tottori Univ.)

1E4p04　糖鎖合成での単離精製の効率化を実現する極性差増幅法の開発
14:23　○土屋優大[1]，八神なほ子[2]，田中秀則[2]，今村彰宏[1]，石田秀治[1,2]，安藤弘宗[2]　([1]岐阜大・応用生物，[2]岐阜大・G-CHAIN)

1E4p05　2,3-環状保護糖供与体を利用した β-グリセロ糖脂質の効率合成
14:34　八神なほ子[1]，○田中秀則[1]，今村彰宏[2]，石田秀治[1,2]，安藤弘宗[1]　([1]岐阜大・G-CHAIN，[2]岐阜大・応用生物)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:55

1E4p06　セレン原子の性質を利用した多糖ミミックの構築研究
14:55　○野崎竜平[1]，田中秀則[2]，今村彰宏[1]，石田秀治[1,2]，安藤弘宗[2]　([1]岐阜大・応用生物，[2]岐阜大・G-CHAIN)

1E4p07　稀少アミノ糖 4-アミノキノボースを含有する *Acinetobacter baumannii* 由来 O 抗原糖鎖の合成研究
15:06　○須藤成美[1]，中田えりな[1]，田中秀則[2]，今村彰宏[1]，石田秀治[1,2]，安藤弘宗[2]　([1]岐阜大・応用生物，[2]岐阜大・G-CHAIN)

1E4p08　トキソプラズマの感染機構解明に向けたシアロ糖鎖の合成
15:17　○小川明日香[1]，須藤成美[1]，河村奈緒子[2]，田中秀則[2]，今村彰宏[1]，石田秀治[1,2]，安藤弘宗[2]　([1]岐阜大・応用生物，[2]岐阜大・G-CHAIN)

1E4p09　二環性シアル酸を利用した α (2,8) オリゴシアル酸の合成
15:28　○河村奈緒子[1]，田中秀則[1]，今村彰宏[2]，石田秀治[1,2]，安藤弘宗[1]　([1]岐阜大・G-CHAIN，[2]岐阜大・応用生物)

1E4p10　哺乳類 CMP-シアル酸合成酵素の細胞内動態および細胞外分泌の分子機構の解明
15:39　○荒川広夢[1,2]，呉　　迪[1,2]，藤田明子[1,2]，佐藤ちひろ[1,2]，北島　健[1,2]　([1]名大・生物機能セ，[2]名大院・生命農)

p11〜p13 発表者の接続時間 15:50〜16:00

1E4p11　糖鎖合成への応用を指向した溶解性向上のための保護基の有用性検証
16:00　○浅野早知[1]，田中秀則[2]，今村彰宏[1]，石田秀治[1,2]，安藤弘宗[2]　([1]岐阜大・応用生物，[2]岐阜大・G-CHAIN)

1E4p12　ペクチンラムノガラクツロナン II の生合成に関与するアピオース転移酵素の活性検出
16:11　○豊田智優[1]，藤森多恵[1]，梶浦裕之[1]，竹中悠人[1]，三輪京子[2]，石水　毅[1]　([1]立命館大・生命，[2]北海道大院・環境)

1E4p13　マンゴー由来 β1,3-ガラクトース転移酵素遺伝子の同定・機能解析
16:22　○岡田貴裕，池田義孝　(佐賀大医)

E5 会場　午前の部(9:00〜12:05)

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

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

1E5a01　細胞接着活性配列を有するラッソペプチドの異宿主生産
9:00　○小谷真也[1]，不破啓貴[1]，逸見　光[2]　([1]静大院農，[2]農研機構食品研究部門)

1E5a02　ヒト脱アセチル化酵素 SIRT2 の脱アセチル化・脱アシル化制御機構
9:11　○工藤紀雄[1]，新真由美[1]，中田明子[1]，堀江由美[1]，大貫哲男[1]，伊藤昭博[2,3]，吉田　稔[1,2,4]　([1]理研CSRS・創薬シード，[2]理研CSRS・ケミカルゲノミクス，[3]東薬大・生命科学部，[4]東大院農・応生工)

1E5a03　大腸菌で生産された超好熱アーキア *Sulfolobus tokodaii* 由来リコンビナント低活性アルコール脱水素酵素の構造解析
9:22　○郷田秀一郎，髙嶋　翔，梶山晃成，永野結花，内田拓郎，海野英昭，畠山智充　(長崎大院工)

1E5a04　Structural basis for the pH-dependent ferric ion coordination modes and conformations of the periplasmic iron binding protein FbpA from *Thermus thermophilus* HB8
9:33　○Peng LU[1]，Yoshitaka Moriwaki[1]，Yukie Katayama[1]，Yi Lu[1]，Ken Okamoto[1]，Tohru Terada[1]，Kentaro Shimizu[1]，Mengyao Wang[1]，Takehiro Kamiya[1]，Toru Fujiwara[1]，Michio Suzuki[1]，Etsuro Yoshimura[2]，Koji Nagata[1]　([1]The University of Tokyo, [2]The Open University of Japan)

1E5a05　*Microbacterium hydrocarbonoxydans* 由来 ABC トランスポーター基質結合サブユニットの結晶構造解析による基質認識機構の解明
9:44　○島村香穂[1]，秋山友了[1]，竹野谷美穂子[2]，伊藤晋作[2]，佐々木康幸[2]，矢嶋俊介[2]　([1]東農大院バイオ，[2]東農大生命バイオ)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

1E5a06　特異性を改変した制限酵素・DNA・二価カチオン複合体の X 線結晶構造解析
10:05　○出口賢児[1]，坂　直樹[2]，三上文三[2]，喜多恵子[2]　([1]京大農，[2]京大院農)

1E5a07　炭酸カルシウム中のマグネシウム含量を調節する因子の探索
10:16　○山口　暸[1]，山下達也[2]，鈴木道生[2]，川野　潤[3]　([1]東大農，[2]東大院農，[3]北大院理)

1E5a08　抗真菌性ディフェンシンにおけるターゲット分子の探索
10:27　○落合秋人[1]，福田美南海[1]，小川広大[1]，鈴木雅規[1]，提箸祥幸[2]，田中孝明[1]，谷口正之[1]　([1]新潟大・自然研，[2]農研機構・北農研)

1E5a09　ダイズ由来ペプチド，ルナシンの抗がん作用機構の解析
10:38　○飯田季里子[1]，鈴木友璃葉[2]，張　迷敏[2]，片山幸江[2]，盧　翌[2]，岡本　研[2]，鈴木道生[2]，名倉敬仁[2]，西　宏起[2]，伯野史彦[2]，片岡直行[2]，高橋伸一郎[2]，川上　浩[1]，永田宏次[2]（[1]共立女子大院，[2]東大院農生科）

1E5a10　プラスミド免疫法による狂犬病ウイルス核タンパク質に特異的な IgY 抗体の調製
10:49　○久保七彩[1]，井上　智[2]，野口　章[2]，志和　望[3]，朴　天鎬[3]，八田　一[1]（[1]京都女子大学，[2]感染研，[3]北里大学）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

1E5a11　TNF-α 結合活性を持つ SUMO2 変異体クローンの親和性および特異性の改良
11:10　○牧野祥嗣，植前光基，伊藤伸哉（富山県大工）

1E5a12　L-glucose を基質としうる scyllo-inositol dehydrogenase の 結晶構造解析
11:21　○鈴木麻佑[1]，小澤国生[1]，深野和紘[1]，伊藤晋作[1]，佐々木康幸[2]，中村　顕[3]，矢嶋俊介[2]（[1]東農大院バイオ，[2]東農大生命バイオ，[3]筑波大生命環境）

1E5a13　超好熱性アーキア由来クランプ PCNA 上で働く DNA 複製タンパク質の生化学および構造の解析
11:32　○石野園子[1]，真柳浩太[1]，白井　剛[2]，清成信一[1]，今井奈美子[1]，大山拓次[3]，山上　健[1]，石野良純[1]（[1]九州大，[2]長浜バイオ大，[3]山梨大）

1E5a14　コリネ型細菌由来アシル CoA カルボキシラーゼ ε サブユニットの機能解析
11:43　○川内優輝，川崎　寿，夏目　亮（東電大院・工・物質工）

1E5a15　土壌細菌由来新規糖化産物応答性転写調節因子
11:54　○三上あかね[1]，アリヤニファオザニ[2,3]（[1]東京工科大医療，[2]東京工科大院バイオ，[3]インドネシア国立オイルガス技術研究開発センター）

E5 会場　午後の部（13:50〜16:55）

生物科学―生物工学 - 解析技術・方法論／生物工学 - 生物材料工学，生体医用工学／生物工学 - その他―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:40〜13:50

1E5p01　日本脳炎ウイルス様粒子を利用した薬剤送達技術の開発
13:50　○永盛優浩，曽宮正晴，黒田俊一（大阪大 産研）

1E5p02　蛍光染色された一本鎖抗体提示ファージによる酸化型 LDL の蛍光検出
14:01　○島田武典[1]，佐藤麻里奈[2]，前田　勇[1,2]（[1]宇都宮大院農，[2]宇都宮大農）

1E5p03　神経伝導測定における電位固定法および電流固定法の問題点
14:12　加地麻衣子，○白井　理，北隅優希，加納健司（京大院農）

1E5p04　有用嫌気性菌の遺伝子導入・破壊の効率的検出システム構築
14:23　○深谷愛衣[1]，水口千穂[1,2]，岡田憲典[1]，井上謙吾[3]，野尻秀昭[1,2]（[1]東大・生物工学セ，[2]東大・微生物連携機構，[3]宮崎大・農・応生科）

1E5p05　安定同位体標識ラマンイメージングを用いた糸状菌の代謝ダイナミクスの可視化
14:34　○安田　充[1]，竹下典男[2]，重藤真介[1]（[1]関西学院大理工，[2]筑波大生命環境）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:55

1E5p06　チロシナーゼを用いたテアフラビン 3'-ガレート合成反応の収率向上
14:55　○奈良井朝子[1]，内田有香[1]，川島　彩[1]，中山　勉[2]（[1]日獣大　応生科，[2]東京農大　応生科）

1E5p07　超音波処理による低分子化 Schizophyllan の抗アレルギー作用
15:06　○湯浅凌我[1]，高野真希[2]，星野一宏[2]（[1]富山大工，[2]富山大院理工）

1E5p08　カイコでの単一 BmNPV バクミドによる *Neospora caninum* 抗原タンパク質提示ウイルス様粒子発現
15:17　○町田佑樹[1]，平松利輝人[1]，徐　剣[2]，加藤竜也[1,2]，朴　龍洙[1,2]（[1]静大院・総合農，[2]静大グリーン研）

1E5p09　植物の生育における最適な土壌金属量の解析
15:28　○朴　暁鎮[1]，嶋岡邦彦[1]，荒木希和子[2]，久保　幹[2]（[1]立命大院生命，[2]立命大生命）

1E5p10　有機資材の土壌環境に対する影響の解析
15:39　○前田憲慶[1]，荒木希和子[2]，久保　幹[2]（[1]立命館大院生命，[2]立命館大生命）

p11〜p15 発表者の接続時間 15:50〜16:00

1E5p11　琵琶湖水系におけるセタシジミの生息環境解析
16:00　○庄司知広，荒木希和子，久保　幹（立命館大生命）

1E5p12　珪藻殻への有用タンパク質提示発現による機能性材料開発
16:11　○大西菜月，中島健介，辻　敬典，松田祐介（関西学院大院・理工・生命）

1E5p13　電気化学バイオセンサーによる E 型肝炎ウイルス様粒子の高感度かつ迅速な検出法の開発
16:22　○竹村謙信[1]，ダッタチョードリアンカン[2]，李　天成[3]，鈴木哲郎[4]，朴　龍洙[1,2]（[1]静岡大院・自科教・バイオサイエンス，[2]静大グリーン科技研，[3]ウイルス第[2]部・国立感染研，[4]浜医大・医・医学科）

1E5p14　A fluorometric biosensor for serotype specific Dengue detection
16:33　○Ankan Dutta Chowdhury[1], Takemura Kenshin[2], Fahmida Nasrin[2], Indra M Khorish[3], Enoch Y. Park[1,2,3]（[1]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, [2]Department of Bioscience, Graduate School of Science and Technology, [3]College of Agriculture, Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka University）

1E5p15　Detection of Influenza virus by controlling the distance of fluorescent quantum dots and adjacent gold nanoparticles
16:44　○FAHMIDA NASRIN[1], Ankan Dutta Chowdhury[2], Kenshin Takemura[1], Hiroyuki Honda[3], Enoch Y. Park[1,2]（[1]Lab. of Biotech., Grad. Sch. of Sci. Technol., Shizuoka Univ., [2]Lab. of Biotech., Res. Inst. of Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., [3]Dept. of Biomol. Engineering, Grad. Schl of Engineering, Nagoya Univ.）

E6 会場　午前の部（9:11〜11:54）

植物―植物ホルモン，成長調節物質―

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

1E6a02　複機能性物質カリキンの受容体阻害剤探索とその応用に関する研究
9:11　○酒井寿彦，姜　凱，喜久里貢，徐　玉群，高橋郁夫，太田　鋼，宮川拓也，田之倉優，中村英光，浅見忠男（東大院・農生科・応生化）

1E6a03　ストリゴラクトンシグナルがシロイヌナズナの病害抵抗性に及ぼす影響の解析
9:22　○草島美幸[1,2]，米山弘一[3]，秋山康紀[4]，野村崇人[3]，仲下英雄[1]，浅見忠男[2]（[1]福井県大生資，[2]東大院応生化，[3]宇大バイオ，[4]阪府大院生命環境）

1E6a04　ストリゴラクトンシグナルに関わる転写因子 NF-YC の機能解析
9:33　○石川堯彦[1]，池上佳菜子[1]，長江未有[1]，増口　潔[2]，高橋郁夫[1]，中村英光[1]，浅見忠男[1]　([1]東大院・農生科・応生化，[2]東北大院・生命科学)

1E6a05　ストリゴラクトンとブラシノステロイドによる光形態形成制御における PIF と *STH7* の関係の解析
9:44　○岡本光紗[1]，タッサグンパニトジュティポーン[1]，永井優子[1]，中野雄司[2]，中村英光[1]，浅見忠男[1]　([1]東大院・農生科・応生化，[2]理研・CSRS)

a06～a10 発表者の接続時間 9:55～10:05

1E6a06　ヒマワリにおける ε-カーラクトンのヘリオラクトンへの変換
10:05　○留河愛梨[1]，謝　肖男[2]，米山弘一[2]，秋山康紀[1]　([1]阪府大院・生命環境，[2]宇都宮大・バイオ)

1E6a07　インドール 3 酢酸が海藻組成に及ぼす影響
10:16　○垣田浩孝[1]，小比賀秀樹[2]　([1]日大文理，[2]産総研健康工学)

1E6a08　レイシの花に含まれるオーキシン関連化合物の分析
10:27　○金　倫熙，西野雄人，宮川　恒，宮下正弘，大迫祐太朗，山根久代，田尾龍太郎　(京大院農)

1E6a09　イネにおけるインドール-3-酪酸の代謝およびインドール-3-酢酸との相互変換の分析
10:38　○西野雄人，宮下正弘，宮川　恒　(京大院農)

1E6a10　オーキシン・ブラシノステロイド信号伝達同時制御剤耐性株の解析
10:49　○TANAKA-JAROENSANTI Naiyanate[1]，宮崎　翔[1]，富田憲司[1]，細井昂人[2]，田中啓介[3]，伊藤晋作[2]，井内　聖[4]，中野雄司[5]，小林正智[4]，中嶋正敏[1]，浅見忠男[1]　([1]東大院・農生科・応生化，[2]東京農大・バイオ，[3]東農大ゲノムセ，[4]理研・BRC，[5]理研・CSRS)

a11～a14 発表者の接続時間 11:00～11:10

1E6a11　ブラシノステロイド類と受容体との結合自由エネルギー計算およびそれをもとにした分子設計
11:10　松尾美登理[1]，青木孝憲[1]，幌岩真理[1]，瀧本征佑[1]，山上あゆみ[2]，中野雄司[2]，○中川好秋[1]，宮川　恒[1]　([1]京大院農，[2]理研CSRS)

1E6a12　ソムレ 1 号による作物の増産及び絶滅危惧植物の回復
11:21　○染井　秀，染井和子，染井正徳　(ソメイヤッコ研究所)

1E6a13　食料増産，環境改善を目的とするソムレ 1 号のインドへの展開
11:32　○粟野亮二[1]，ミシュラスネハシ[2]，染井正徳[3]　([1]グローバル・マーケティング・アソシエーション株式会社，[2]KIIT 大学，[3]ソメイヤッコ研究所)

1E6a14　地球温暖化阻止を念頭においたソムレ 1 号による中国ゴビ砂漠の緑化
11:43　○染井正徳，染井　秀，染井和子　(ソメイヤッコ研究所)

E6 会場　午後の部(14:01～16:44)

植物―植物ホルモン，成長調節物質／環境応答，ストレス応答，情報伝達，分化／その他―

p02～p05 発表者の接続時間 13:51～14:01

1E6p02　立体選択的なストリゴラクトン生産に関与するソルガム LGS1 酵素の機能解析
14:01　○依田彬義[1]，森　愛美[2]，齋藤睦美[1]，菊地麻祐[3]，神林瑛瑠[3]，謝　肖男[1,4]，米山香織[5]，秋山康紀[2]，米山弘一[4]，野村崇人[1,4]　([1]宇都宮大院・農，[2]大阪府立大院・生命環境，[3]宇都宮大・農，[4]宇都宮大・バイオ，[5]愛媛大・農)

1E6p03　ソルガムのストリゴラクトン生合成経路におけるソルゴモール合成酵素の同定
14:12　○若林孝俊[1,2]，支田香澄[1]，石輪俊典[1]，水谷正治[1]，杉本幸裕[1,2]　([1]神戸大院・農・生命機能科学，[2]JST/JICA・SATREPS)

1E6p04　ストリゴラクトン受容体 D14 の過剰発現による病害抵抗性誘導機構の解明
14:23　○伊藤瑛子[1]，山野博之[1]，前田　哲[2]，森　昌樹[2]，中村英光[1]，浅見忠男[1]　([1]東京大学 農生科 応生化，[2]農研機構 生物機能利用研究部門)

1E6p05　ジャスモン酸経路を活性化する新規植物免疫活性化剤候補化合物の選抜と作用機構の解析
14:34　○北畑信隆[1,2]，斉藤優歩[1]，中野正貴[1]，石賀康博[3]，来須孝光[4]，浅見忠男[5]，朽津和幸[1,2]　([1]東京理大理工，[2]東京理大IFC，[3]諏訪東京理科大工，[4]筑波大生命環境，[5]東大院農生科)

p06～p10 発表者の接続時間 14:45～14:55

1E6p06　Evaluation of positive feedback system for jasmonic acid biosynthesis using deuterium-labelled jasmonic acid
14:55　○Rishni MASIMBULA，Katsunari OKI，Norio KONDO，Hideyuki MATSUURA，Kosaku TAKAHASHI　(Rec. Fac. Agr., Hokkaido Univ)

1E6p07　酢酸処理が植物ホルモンの生合成による防御応答に及ぼす影響
15:06　○原田惠理[1]，小堀富広[1]，松原　晶[1]，肥塚崇男[2]，松井健二[2]　([1]アース製薬(株)，[2]山口大院創成科学(農))

1E6p08　アブシジン酸誘導性の気孔閉鎖における光合成電子伝達系の重要性
15:17　○山田直隆[1]，岩井純夫[2,3]，緒方　翔[2]，新北大樹[1]，遠城道雄[3]，園池公毅[4]，島崎研一郎[5]　([1]九大農，[2]鹿大農，[3]鹿大農場，[4]早大院教育・総合科学，[5]九大理)

1E6p09　光合成細菌由来 LPS はシロイヌナズナの根の生長を促す
15:28　○岩本康成，岩下彰吾，平川夕貴，林　修平，山本進二郎，宮坂　均　(崇城大応用生命)

1E6p10　エチレン受容体の全長とリガンド結合領域の組換えタンパク質の発現
15:39　○長谷川恵一，陸　　鵬，高橋郁夫，片山幸江，盧　　翌，岡本　研，鈴木道生，中村英光，中嶋正敏，浅見忠男，永田宏次　(東大農)

p11～p14 発表者の接続時間 15:50～16:00

1E6p11　高等植物シロイヌナズナの二次肥厚を活性化するサイトカイニン情報伝達経路の解明
16:00　○島田由里菜，今村美友，權部晃一，山篠貴史　(名古屋大生命農)

1E6p12　タデアイ由来化合物が植物及び植物病原性真菌の生育に及ぼす影響
16:11　○平山遼太[1]，佐々木健郎[2]，中野雄司[3]，浅見忠男[1]　([1]東大院・農生科・応生化，[2]東北医科薬科大・薬，[3]理研・CSRS)

1E6p13　低分子化合物を利用した花成関連転写因子の機能制御
16:22　○坂井優生[1]，川本　望[2]，TANAKA-JAROENSANTI Naiyanate[3]，深澤壽太郎[4]，荒木　崇[2]，中嶋正敏[3]，浅見忠男[3]，三橋　渉[1]，加藤修雄[5]，豊増知伸[1]　([1]山形大・農，[2]京大院・生命科学，[3]東大院・農生科・応生化，[4]広島大院・理，[5]阪大・産研)

1E6p14　植物の抽だい抑制化合物の構造活性相関研究
16:33　○志鎌駿平，荻原　毅，松浦秀幸，高橋公咲　(北大院農)

E7 会場　午前の部（10:16〜11:43）

植物―植物栄養，光合成，オルガネラ，膜輸送／その他―

a07〜a10 発表者の接続時間 10:06〜10:16

1E7a07　水耕栽培におけるリン酸イオン，カリウムイオン及び硝酸イオンの自動濃度管理システムの構築
10:16 ○徐　克彬，阿黒達也，北隅優希，加納健司，白井　理（京大院農）

1E7a08　微生物資材の金属吸収に対する作用機作
10:27 ○内山優里恵[1]，中谷笑鈴[1]，李　　克[2]，西片百合[1]，長谷川雄大[2]，藤原　徹[2]，安保　充[1]（[1]明大農，[2]東大院農）

1E7a09　石灰岩土壌がアブラナ科植物の無機栄養吸収に及ぼす影響
10:38 ○原田英美子，藤村麻由，大塚萌生，中川沙耶，飯村康夫（滋賀県大環境）

1E7a10　珪藻由来光化学系 II アンテナタンパク質 FCP 超複合体のクライオ単粒子構造解析
10:49 ○秋田総理[1,2]，長尾　遼[1]，加藤公児[1]，宮崎直幸[3]，沈　建仁[1]（[1]岡大異分野，[2]JSTさきがけ，[3]阪大蛋白研）

a11〜a13 発表者の接続時間 11:00〜11:10

1E7a11　フィトクロム B を介した赤色光シグナルのリン栄養獲得における役割
11:10 ○桜庭康仁[1]，馬渕敦士[2]，門田慧奈[2]，菅野里美[1]，射場　厚[2]，柳澤修一[1]（[1]東大生セ，[2]九大院理）

1E7a12　イネケイ酸輸送体 Lsi1 の極性分布に関する解析
11:21 ○小西範幸，馬　建鋒（岡山大　植物研）

1E7a13　アメリカネムノキの就眠運動に関与する K+ チャネル SPORK2 の活性制御機構解析
11:32 ○竹内優輔[1]，石丸泰寛[1]，及川貴也[1]，浜本　晋[2]，魚住信之[3]，上田　実[1,4]（[1]東北大院理，[2]東大生物工学セ，[3]東北大院工，[4]東北大院生命）

E7 会場　午後の部（13:50〜16:44）

植物―環境応答，ストレス応答，情報伝達，分化／生物間相互作用／その他―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:40〜13:50

1E7p01　ザゼンソウ植物体のにおい成分の同定
13:50 ○坂巻憲佐[1]，小栗　秀[2]，勝見優子[1]，大久保康隆[1]，小林宗隆[1]（[1]長谷川香料(株)，[2]東農大生物産業・北方圏農学）

1E7p02　ザゼンソウの花の匂い成分の解明
14:01 ○小栗　秀[1]，坂巻憲佐[2]，神津直樹[1]，山本崇勝[1]，坂本　光[1]（[1]東農大生物産業・北方圏農学，[2]長谷川香料(株)）

1E7p03　みどりの香りバーストを駆動するリポキシゲナーゼ活性化機構
14:12 ○松井健二，望月智史（山口大創成科学）

1E7p04　植物における匂い受容体候補の発見
14:23 ○永嶌鮎美[1,2,3]，檜垣　匠[4,5]，肥塚崇男[6]，石神　健[1,7]，細川聡子[1]，渡邉秀典[1]，松井健二[6]，馳澤盛一郎[4]，東原和成[1,2,8]（[1]東大院・農生科・応生化，[2]ERATO東原化学感覚シグナルプロジェクト，[3]東工大・バイオ研究基盤支援総合センター，[4]東大院・新領域・先端生命，[5]熊本大・国際先端科学技術研究機構，[6]山口大院・創成科学，[7]東農大・生命科学，[8]東大ニューロインテリジェンス国際研究機構）

1E7p05　酸化ストレスを受けたシロイヌナズナ葉からのオキシリピン類の分析
14:34 ○西家弘真，清水文一（東洋大院生命）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:55

1E7p06　ズッキーニにおいて同定された汚染物質輸送因子の病原抵抗性への関与
14:55 ○藤田健太郎[1]，乾　秀之[1,2]（[1]神戸大院農，[2]神戸大バイオ）

1E7p07　陸棲藍藻 *Nostoc* sp. HK-01 の休眠細胞の耐性限界温度
15:06 ○木村駿太[1,2]，富田-横谷香織[1]（[1]筑波大・生命環境，[2]学振）

1E7p08　光ストレス順応における葉緑体型アスコルビン酸ペルオキシダーゼの生理学的重要性
15:17 岡安嵩也，三冨　弦，亀岡峰志，菊樂香奈，岩上拓己，小川貴央，石川孝博，○丸田隆典（島根大・生資科）

1E7p09　シロイヌナズナデハイドリンの non-K セグメントの酵素凍結保護活性における役割
15:28 ○大久保智博[1]，神谷慶太[1]，亀山阿由子[1]，原　正和[1,2]（[1]静岡大院，[2]静岡大グリーン研）

1E7p10　鉄取り込みを負に制御するシロイヌナズナ bHLH11 の転写機構の解析
15:39 ○野沢昂太郎[1]，田辺記章[2]，田茂井政宏[1]，重岡　成[1]（[1]近畿大・農・バイオ，[2]NAIST）

p11〜p14 発表者の接続時間 15:50〜16:00

1E7p11　熱ショック蛋白質 70 阻害剤によるシロイヌナズナの熱ショック応答の誘導
16:00 松岡恵里奈[2]，○原　正和[1,2]（[1]静岡大グリーン研，[2]静岡大院）

1E7p12　1,4-ナフトキノン誘導体によるシロイヌナズナの熱ショック応答誘導
16:11 ○加藤直樹[1,2]，松岡恵里奈[3]，橋本佳尚[3]，原　正和[1,4]（[1]静岡大創造，[2]株式会社メニコン，[3]静岡大，[4]静岡大グリーン研）

1E7p13　好熱菌発酵産物を施用した人参の機能性と生産性に関わる根圏微生物群集のオミクス解析
16:22 ○松浦真紀子[1,2]，守屋繁春[3]，坪井亜里沙[2,3]，青野昌彦[4]，富永直樹[4]，西郡湧人[4]，志茂恵理子[4]，石井千歳[2]，中熊照乃[2]，児玉浩明[1]，澤田有司[3]，平井優美[3]，宮本浩邦[1,2,5]，茂田勝美[4]（[1]千葉大園芸，[2](株)サーマス，[3]理研CSRS，[4]タキイ種苗(株)，[5]理研IMS）

1E7p14　土壌肥沃度指標（SOFIX）に基づく薬用植物栽培土壌の環境解析
16:33 ○森谷政孝[1]，原田　栞[1]，荒木希和子[2]，久保　幹[2]（[1]立命大院生命，[2]立命大生命）

講演番号
開始時間　　演　　題　　発表者氏名(所属)

B1 会場　午前の部(9:00〜12:05)

食品―食品機能・栄養 - メタボリック・シンドローム，エネルギー代謝／食品機能・栄養 - 脂質代謝／食品機能・栄養 - 糖質代謝／食品機能・栄養 - タンパク質・アミノ酸代謝―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3B1a01　メタボローム解析を用いた活性ベース代謝物プロファイリング法の構築及びトマトに含まれるアディポネクチン様活性化合物の探索
9:00　○毛利晋輔[1]，高橋春弥[1]，坂井麻衣子[1]，高橋慎吾[2]，脇　尚子[2]，相澤宏一[2]，菅沼大行[2]，荒　　武[1]，松村康生[1]，柴田大輔[1]，後藤　剛[1]，河田照雄[1]　([1]京大院農，[2]カゴメ・イノベーション本部)

3B1a02　*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* GCL2505 株は短鎖脂肪酸受容体 GPR43 を介して宿主のエネルギー代謝を調節する
9:11　○堀内寛子[1]，上門弘平[1]，青木　亮[1]，菅沼名津季[1]，西嶋智彦[1]，中谷明穂[2]，木村郁夫[2]　([1]江崎グリコ(株)健康科学研究所，[2]東京農工大学農学研究院)

3B1a03　フルクトースは皮下脂肪組織の脂肪分化を抑制するが炎症を惹起する
9:22　○山口貴史，江藤　望，服部秀美　(宮崎大院農)

3B1a04　α-グルコシルヘスペリジンによる褐色脂肪細胞化誘導と体脂肪蓄積抑制
9:33　○兵頭拓真[1]，西川　翔[1]，長尾つばさ[1]，中西章仁[2]，タンジャマハマドゥ[2]，津田孝範[1]　([1]中部大学・応生，[2]東洋精糖(株))

3B1a05　プロポリス成分による褐色脂肪細胞化と組織温度上昇機構の解明
9:44　○西川　翔[1]，兵頭拓真[1]，青山広樹[1]，神谷美沙[1]，宮田　椋[2]，吉村一輝[2]，熊澤茂則[2]，津田孝範[1]　([1]中部大・応生，[2]静岡県大・食品栄養)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3B1a06　肝細胞の脂肪蓄積抑制作用を有する脂肪酸アミド化合物のスクリーニングとその作用機構の解明
10:05　○上久保綾祐[1]，板倉正典[1]，佐々木栄太[1]，柴田貴広[2]，赤川　貢[3]，内田浩二[1]　([1]東大院・農生科，[2]名大院・生命農，[3]阪府大院・生環科)

3B1a07　ユズ果皮エタノール抽出物がクロレトン誘発肝障害モデルラットに与える影響
10:16　○平川えりか[1]，鈴木絢子[2]，信岡かおる[1,2]，望月　聡[3]，石川雄一[1,2]　([1]大分大院工，[2]大分大理工，[3]大分大教育)

3B1a08　クルクミンが Trp-NAD 経路における鍵酵素 ACMSD に及ぼす影響
10:27　○髙橋彩夏[1]，松田寛子[1,2]，坂田菜摘[1]，松本奈々[3]，江頭祐嘉合[3]　([1]東京海洋大サラダサイエンス，[2]日本獣医生命科学大応生，[3]千葉大応生)

3B1a09　アオコ由来毒素ミクロシスチン-LR の低濃度投与はラット肝臓コレステロール値を上昇させる
10:38　○清水英寿[1]，河原秀明[2]，蔵田航一[2]，湯浅佳奈[3]，渡辺優太[3]，堀　将太[4]，石塚　敏[4]，岡野邦宏[5]，吉清恵介[1]，山本達之[1]，西村浩二[1]，地阪光生[1]，横田一成[1]，杉浦則夫[6]，清水和哉[6]　([1]島根大・生資，[2]島根大院・生資，[3]島根大院・自然，[4]北大院・農，[5]秋田県大・生資，[6]筑波大・生環系)

3B1a10　プロポリス成分による非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)に対する予防効果の検討
10:49　○小川智弘，貞清悠太，山口雅貴，谷　海人，寺田拓実(近大工)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3B1a11　(−)-Epigallocatechin-3-*O*-gallate の胃粘膜細胞に対するレプチン分泌刺激作用の機構解析
11:10　○佐々木知里[1]，太田裕基[2]，石井剛志[3]，向井克之[4]，松山彰収[4]，赤川　貢[2]　([1]大阪府大・生命環境，[2]大阪府大院・生命環境，[3]神戸学院大・栄養，[4](株)ダイセル)

3B1a12　食後血糖値の予測を目的とした食品の試験管内糖化速度測定法(GR 法)の開発
11:21　○陶山達矢[1]，橋本和彦[1]，村上隆之[1]，西川佳子[2]，阿部　準[2]，中西由季子[3]，佐々木一[4]，木村修一[5]　([1]山崎製パン(株)中央研究所，[2]一般財団法人日本食品分析センター栄養科学部生化学分析課，[3]人間総合科学大学人間科学部，[4]神奈川工科大学栄養生命科学科，[5]NPO法人国際生命科学研究機構(ILSI Japan))

3B1a13　脱脂ごまパウダーを用いた *in vivo* 脂肪吸収抑制試験
11:32　○古賀啓太，山田裕晃，ウォンカールーン，山津敦史，金　武祚　(株式会社ファーマフーズ)

3B1a14　高たんぱく質ヨーグルト摂取によるたんぱく質吸収への影響
11:43　○永渕真也，北村隆也，伊澤佳久平，川島昭浩　((株)明治　研究本部)

3B1a15　乳由来タンパク素材の人工消化によって生成されるペプチドに関する研究
11:54　○梅原将洋，織谷幸太，伊藤良一，内田裕子，守田　稔(森永製菓株式会社)

B1 会場　午後の部(14:12〜16:44)

食品―食品機能・栄養 - 消化・吸収，循環・血管―

p03〜p05 発表者の接続時間 14:02〜14:12

3B1p03　抱合体の違いによる胆汁酸輸送機構の解明
14:12　○宮脇里奈[1]，石川和樹[1]，石井剛志[2]，小林彰子[1]　([1]東大院農，[2]神戸学院栄)

3B1p04　食品成分の消化管における認識機構の解明
14:23　○福田陽大[1]，越阪部奈緒美[1]，安達貴弘[2]　([1]芝浦工業大学，[2]東京医科歯科大学)

3B1p05　腸管を作用場とする機能性ポリフェノールの吸収・代謝挙動の可視化
14:34　○田中　充，グエンフナイ，李　宝瑞，松井利郎　(九大院農)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:55

3B1p06　ラットにおけるフィトスフィンゴシンのリンパ吸収動態
14:55　○西向めぐみ[1]，田村和樹[1]，光武　進[2]，北垣浩志[2]　([1]岩大農，[2]佐賀大農)

3B1p07　マウス反転腸管における糖吸収に及ぼす梅加工品の影響
15:06　○廣瀬仁志，本間知夫　(前工大工)

3B1p08　ムラサキイモ濃縮エキスによるマウス摘出腸管におけるアルコール吸収抑制について
15:17　○鍛治諒太郎[1]，鈴木優香[2]，古我　匠[2]，本間知夫[1]　([1]前工大工，[2]日農化学工業(株))

3B1p09　熱殺菌 *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 327 の経口投与は BALB/c マウスのロペラミド誘発性便秘症状を改善する
15:28　○三原敏敬[1]，志田ちひろ[2]，長谷川芽衣[2]，熊谷武久[1]，城斗志夫[2]，原　　崇[2]　([1]亀田製菓，[2]新潟大農)

3B1p10　ニンニク成分アリシンによるラット腸管起電性イオン輸送制御および腸管蠕動運動との関連性の検討
15:39　○土谷　庸[1]，川俣幸一[2]　([1]東北女子大家政学部，[2]東北生活文化大家政学部)

p11〜p14 発表者の接続時間 15:50〜16:00

3B1p11　コラーゲン由来 X-Hyp-Gly 型トリペプチドのアンジオテンシン変換酵素阻害活性―プロリン水酸化による活性増強
16:00 ○多賀祐喜，林田　治，楠畑　雅，後藤希代子，服部俊治（ニッピ・バイオマトリックス研究所）

3B1p12　アピオス塊茎由来アンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害物質及び阻害ペプチドの探索に関する研究
16:11 ○JIANG Wenqian[1]，上妻由章[2]（[1]茨城大院農，[2]茨城大農）

3B1p13　血管内皮細胞に対するカシスアントシアニンのフィトエストロゲン作用
16:22 ○西山広亮[1]，七島直樹[2]，堀江香代[2]，前多隼人[1]（[1]弘大院農，[2]弘大院保健）

3B1p14　日本酒由来の血栓溶解関連物質
16:33 ○大杉忠則，高橋千里，皆川拓也，馬越美帆（倉敷芸術科学大学）

B2 会場　午前の部（9:00〜12:05）

食品―食品化学 - 色素，香料／食品工学 - 物性，分析―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3B2a01　キシロースの存在下でタンパク質の酸加水分解により形成される新規メイラード色素フルペンチアジネートの構造解析
9:00 ○野田響子[1]，増崎瑠里子[1]，寺内優花[1]，山田眞二[2]，村田容常[1]（[1]お茶大食物，[2]お茶大化学）

3B2a02　カルノシンとキシロースのメイラード反応で形成される低分子黄色色素の同定
9:11 ○能見祐理，山崎健人，佐藤眞治，松本　均（新潟薬大・応用生命）

3B2a03　オービトラップ LC/MS による合成系色素 69 種の一斉分析法の検討
9:22 ○大城沙織，箕川　剛，平岡佑理，浜崎孝治，西山浩司，中島光一（三栄源エフ・エフ・アイ株式会社）

3B2a04　Orbitrap-LC/MS による紫サツマイモアントシアニン成分の網羅的分析法の検討
9:33 ○箕川　剛，石橋　諒，大城沙織，浜崎孝治，西野雅之（三栄源エフ・エフ・アイ）

3B2a05　Orbitrap-LCMS によるクチナシ黄色素成分の網羅的分析法の検討
9:44 ○石橋　諒，箕川　剛，大城沙織，中島光一，西野雅之（三栄源エフ・エフ・アイ株式会社）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3B2a06　ショ糖及びゲル化剤添加によるバラシロップの退色抑制方法の検討
10:05 ○中西未佳，勝野那嘉子，西津貴久（岐阜大学）

3B2a07　核酸によるアントシアニンの深色および安定化効果の検証-細菌由来の核酸について-
10:16 ○渡辺つかさ[1]，内野昌孝[2]，野口治子[3]，高野克己[4]（[1]東京農大院農・農化，[2]東京農大生命・微生物，[3]東京農大農・デザイン，[4]東京農大応生・農化）

3B2a08　乳化剤によるクロロフィルの光退色抑制作用
10:27 ○安田みどり[1]，田端正明[2]，澁谷茉希[1]，城下友花[1]（[1]西九大健栄，[2]佐賀大理工）

3B2a09　アラビカ種コーヒーの特徴香とその形成要因
10:38 ○馬場良子，大和礼奈，樋口可南子，松田知子，熊沢賢二（小川香料(株)）

3B2a10　乳化剤がパンケーキの香気成分リリースに及ぼす影響
10:49 ○恩田佳奈，勝野那嘉子，西津貴久（岐阜大学）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3B2a11　増粘剤が鼻腔内到達香気成分量に及ぼす影響
11:10 ○中田勇二，北田　亮，林　和寛（味の素株式会社）

3B2a12　醸造用ブドウの成熟期における香気成分蓄積への栽培地の影響
11:21 ○小山和哉[1]，ガリドシャロン - マリエ[1]，大浜友子[1]，前島　勤[2]，根本　学[3]，齋藤　浩[4]，後藤(山本)奈美[1]（[1]酒総研，[2]長野果樹試，[3]北農研，[4]山梨県ワイン酒造組合）

3B2a13　亜臨界水処理による和種薄荷の主要芳香成分に対する熱安定性の検討
11:32 ○野村詩織[1]，邱　泰瑛[1]，渡邊大吾[1]，永田裕一[2,3]，齋藤　徹[1]（[1]北見工大，[2]北見ハッカ通商，[3]北見ハッカ研究所）

3B2a14　リノール酸由来異臭成分の抑制効果に対する α-トコフェロールと抗酸化物の相乗効果の検証
11:43 ○太田香穂，石川洋哉，小林弘司，南　育子（福岡女子大院人栄）

3B2a15　複合臭に対するマウス嗅覚受容体の応答　〜香りの相互作用の解明に向けて〜
11:54 ○安永元樹[1]，高井英司[1]，葛西賢造[1]，末田麗華[1]，高垣仁志[1]，山崎智子[2]，立松健司[3]，黒田俊一[3]（[1]曽田香料株式会社，[2]株式会社香味醗酵，[3]大阪大学）

B2 会場　午後の部（13:50〜16:44）

食品―食品化学 - 糖質，脂質／食品化学 - 色素，香料／食品化学 - タンパク質，アミノ酸／食品化学 - その他―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:40〜13:50

3B2p01　麹甘酒の長期摂取による安全性評価
13:50 ○中村彩奈[1]，倉橋　敦[1]，米井嘉一[2]（[1]八海醸造・研究開発，[2]同志社大院・生命医科学）

3B2p02　山田錦の酒造適性の要因の解明
14:01 ○矢嶋雄貴[1]，辻井良政[2]，数岡孝幸[3]，高野克己[2]（[1]東農大院農・農化，[2]東農大応生・農化，[3]東農大応生・醸造）

3B2p03　日本水稲品種における炊飯特性値形質のゲノムワイドアソシエーション解析
14:12 ○望月賢太[1]，辻井良政[2]，堀　清純[3]，高野克己[2]（[1]東京農大院農・農化，[2]東京農大応生・農化，[3]農研機構作物開発センター）

3B2p04　乳酸菌のラクトース資化性とチーズの貯蔵褐変
14:23 ○新井彩佳[1]，井上　葵[1]，井越明日香[1]，筒浦さとみ[2]，村田容常[1]（[1]お茶大食物，[2]新潟大　超域）

3B2p05　発酵種由来の乳酸菌がパンの官能特性に与える影響
14:34 ○山田彬史，伊藤恵介，成島典子，森田亜紀，藤本章人（MCフードスペシャリティーズ(株)製品開発研究所）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:55

3B2p06　全粒粉の品質に与える小麦粒の部位的要因の解明
14:55 ○松田里菜[1]，野口智弘[2]，高野克己[3]（[1]東京農大院・農化，[2]東京農大応生・食加技セ，[3]東京農大応生・農化）

3B2p07　ビール保存時に生成する新規苦味成分群の HPLC 分離と結晶スポンジ法の組合せによる網羅的な迅速構造解析
15:06 ○谷口慈将[1]，菊池　貴[2]，藤田　誠[3,4]（[1]キリン基盤研，[2]リガク応技センター，[3]東大院工，[4]分子研）

3B2p08　豆乳ヨーグルトの「まろやかさ」の解析と製品開発への応用
15:17 ○丸山一樹[1]，西沢啓雄[2]，浅井麻佑子[2]，井上孝司[1]，風見由香利[3]，蔦　瑞樹[3]，早川文代[3]（[1]サッポロホールディングス(株)，[2]ポッカサッポロフード＆ビバレッジ(株)，[3]農研機構・食研）

3B2p09　DART-MS を用いた O/W エマルションのフレーバーリリースの測定とその解析
15:28　○田丸峻次[1]，野田智子[2]，金田弘挙[3]，井倉則之[1]，下田満哉[1]　([1]九州大学院農，[2]九州大学農，[3]九州産業大学生命科学部)

3B2p10　食品ペプチド中の結合態 D-アミノ酸の分析
15:39　○梶山敬至，大森勇門，大島敏久　(大阪工大工)

p11〜p14 発表者の接続時間 15:50〜16:00

3B2p11　マヌカ蜂蜜に特徴的なケミカルマーカーの加熱に伴う変化
16:00　○加藤陽二[1,2]，岡野やや子[1]，河合翔太[1]，菅　尚子[1]　([1]兵庫県大環，[2]兵庫県大先端食セ)

3B2p12　安定同位体比による食品中のグルタミン酸由来判別法の開発
16:11　○八津川洋一，田中政春，松田高博，田辺創一，小林和浩，田中　充　(日清食品ホールディングス株式会社)

3B2p13　カラシナにおける調理加工時の GABA 含量の変動
16:22　○石川千秋[1]，澤井祐典[1]，西場洋一[1]，棚原尚哉[2]　([1]農研機構・九沖農研，[2]沖縄農研)

3B2p14　カプシノイドを含有する新品種とその栽培，応用の検討 (1)
16:33　○関　哲也[1]，太田雅文[1]，杉山立志[2]，三原隆一[1]，織壁　宏[1]　([1]味の素株式会社，[2]味の素株式会社(現.名古屋文理大学))

B3 会場　午前の部(9:00〜12:05)

食品―食品工学 - 製造工学，加工学／食品化学 - 色素，香料―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3B3a01　大豆アレルゲンと小麦アレルゲンを含まない醤油風味調味料の製造方法の確立
9:00　○堀井悠一郎[1]，小林和也[2]，羽田知由[3]，廣井伸行[3]，大坪研一[4]，中村澄子[4]，西脇俊和[1]　([1]新潟農総研・食研セ，[2]新潟県農林水産部農業総務課，[3]山崎醸造，[4]新潟薬大・応生科)

3B3a02　γ-アミノ酪酸生産菌の添加が発酵乳の官能特性に及ぼす影響
9:11　○佐々木啓介[1]，萩　達朗[1]，成田卓美[1]，青沼達也[2]，渡邊源哉[1]，本山三知代[1]，小林美穂[1]，中島郁世[1]，野村　将[1]　([1]農研機構畜産研究部門，[2]宮城畜試)

3B3a03　通電処理によるシカ肉の調理加工性
9:22　○小木曽加奈[1]，古田一匡[2]　([1]長野県大健康発達，[2]富士通株式会社)

3B3a04　The influence of tea leave particle size on catechin extraction and green tea sensory acceptance
9:33　○DONGYANG LI[1,2]，RITSUKO TAMURA[1,2]，TOSHIRO NAKAJIMA[3]，SABINE GOURAUD[2]，JULIEN TRIPETTE[2]，NAMI FUKOTOME[4]，YUKO CABALLERO[1,2]　([1]The Graduate School of Humanities and Sciences, Ochanomizu University, [2]Program for Leading Graduate Schools, Ochanomizu University, [3]Tohoen, Tokyo, [4]Faculty of Core Research, Ocha Univ.)

3B3a05　牛肉パテの冷凍による品質低下に対する大豆ホエーの効果の検証
9:44　○平田芳信[1]，風見真千子[2]，野口治子[2]，岡　大貴[3]，高野克己[3]　([1]東京農大院農・農化，[2]東京農大農学・デザイン，[3]東京農大応生・農化)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3B3a06　製麺におけるグルテン性状がデンプンの糊化に与える影響
10:05　○牧野萌弥[1]，西堀史也[2]，岡　大貴[3]，野口智弘[2]，高野克己[3]　([1]東京農大院・農化，[2]東京農大応生・食加技セ，[3]東京農大応生・化学)

3B3a07　麺物性に対する小麦タンパク質の影響
10:16　○西堀史也[1]，牧野萌弥[2]，岡　大貴[3]，野口智弘[1]，高野克己[3]　([1]東京農大応生・食加技セ，[2]東京農大院・農化，[3]東京農大応生・化学)

3B3a08　パン生地の伸展性に関わるグリアジン分子種の役割
10:27　○岡　大貴[1]，西堀史也[2]，野口智弘[2]，高野克己[1]　([1]東京農大応生農化，[2]東京農大応生食加技セ)

3B3a09　高アミロース米を利用したゲルの澱粉消化性に及ぼす加工条件の影響
10:38　○佐々木朋子，松木順子，徳安　健　(農研機構)

3B3a10　冷凍米飯の品種別老化特性について
10:49　○國枝美沙[1]，橋本朋子[2]，野口由里香[2]，勝野那嘉子[1]，西津貴久[1]　([1]岐阜大学，[2]日本水産株式会社 中央研究所 水産食品研究室)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3B3a11　中高圧処理によって胚乳部へ移行する糠成分について
11:10　○田中愼太郎[1]，佐藤　翼[1]，森下雄太[2]，筒井　歩[1,2]，藤田智之[1,2]　([1]信州大院総合理工，[2]信州大農)

3B3a12　木材を直接発酵して造る，香り豊かなアルコール
11:21　○大塚祐一郎，野尻昌信，ナバロロナルド，楠本倫久，橋田　光　(森林総研)

3B3a13　清酒醸造での焼酎麹変異株による α-EG 生産研究
11:32　○三井雅貴[1]，宮腰祐佳[2]，北野利奈[2]，山下秀行[3]，尾関健二[4]　([1]金工大院，[2]金工大・バイオ・化学，[3]樋口松之介商店，[4]金工大・ゲノム研)

3B3a14　卵黄およびそのマヨネーズ様乳化物の流動特性に及ぼす加熱の影響
11:43　○下山田真[1]，小川夏誉[1]，増田勇人[1]，餅田浩基[2]　([1]静県大食栄，[2](株)鈴与総研)

3B3a15　イサダオイルの乳化特性と粉末化
11:54　フェルミンアントニオ[1]，高重至成[1]，ヘルマワンアリヤント[1]，安達修二[2]，○吉井英文[1]　([1]香大農，[2]京都学園大)

B3 会場　午後の部(13:50〜16:44)

食品―食品工学 - 物性，分析／食品工学 - 保蔵，安全性／食品工学 - 製造工学，加工学―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:40〜13:50

3B3p01　変性 β―グルカンによる難水溶性物質の可溶化(1)―包接複合体の粉末化―
13:50　○甲元一也，児玉歩夢　(甲南大FIRST)

3B3p02　変性 β―グルカンによる難水溶性物質の可溶化(2)―食品，化粧品，医薬品有効成分の包接複合化―
14:01　○桜井　遥，児玉歩夢，甲元一也　(甲南大FIRST)

3B3p03　高脂質ゲルにおける油脂の種類の影響
14:12　○松本拓矩，中島聡史，秋山亜希子，増田麻衣，崎谷宣孝，渡邉裕一，上田佳宏　(ソマール株式会社)

3B3p04　γ-シクロデキストリンによる還元型コエンザイム Q10 の特性改善
14:23　○上梶友記子，寺尾啓二　(シクロケムバイオ)

3B3p05　DIUTHAME へのブロッティングを用いたイメージング質量分析法によるイチゴ果実中の糖，有機酸，およびアントシアニンの可視化
14:34　○榎元廣文[1,2]，山根久和[1]，八田　一[3]，瀧本未羽[4]，小谷政弘[4]，大村孝幸[4]　([1]帝京大理工，[2]帝京大先端機器分析センター，[3]京女大家政，[4]浜松ホトニクス(株))

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:55

3B3p06　Effect of 1-methylcyclopropene concentration on tomato treatment during storage time
14:55　○HERMAWAN DWI ARIYANTO[1,2]，MATHILDE NAEVA BERCIS[3]，HIDEFUMI YOSHII[1,2]　([1]Kagawa Univ. of Agric., [2]Ehime Univ. of UGAS, [3]Agrosup Dijon, France)
3B3p07　ニラの冷凍保存による鮮度評価について
15:06　○新山聡之，端川　繭，清野晃之　(函館高専)
3B3p08　糊化したコーンスターチおよび米粉ゲルの冷蔵保存中における老化度の評価および添加物による老化抑制
15:17　○藤澤　望[1]，大川　陽[1]，浅崎　晶[1]，島田雪那[1]，脇枝里子[2]，深石光男[2]，小澤希望[3]，二宮和美[3]，山口勇将[1]，赤尾　真[1]，熊谷　仁[3]，熊谷日登美[1]　([1]日大・生資科，[2]大塚薬品工業(株)，[3]共立女子・家政)
3B3p09　有機酸を中心とした食品添加物の併用効果によるバイオフィルムの制御
15:28　○塚谷忠之，坂田文彦　(福岡県工技セ)
3B3p10　細菌由来揮発性成分による細菌スクリーニング法の開発
15:39　○小林弘司，阿部萌瑛，太田香穂，南　育子，石川洋哉　(福岡女子大学)

p11〜p14 発表者の接続時間 15:50〜16:00

3B3p11　玄米における貯穀害虫発生マーカーの探索 〜プレノールとイソプレノール
16:00　○田中福代[1]，宮ノ下明大[2]，曲山幸生[2]　([1]農研機構中央農研，[2]農研機構食品部門)
3B3p12　Evaluation of different postharvest treatment in mangosteen (Garcinia mangostana) using metabolomics approach
16:11　○ANJARITHA AULIA RIZKY PARIJADI[1]，Sobir Ridwani[2]，Fenny Martha Dwivany[3]，Sastia Prama Putri[1,3]，Eiichiro Fukusaki[1]　([1]Osaka Univ., [2]Bogor Agriculture Univ., [3]Sch. of Life Sci. and Tech., Inst. Tech. Bandung)
3B3p13　水中短波帯加熱による果実の高速ブランチング
16:22　○植村邦彦，高橋千栄子，小林　功　(農研機構)
3B3p14　高分子電解質膜による水電気分解反応を利用した新規エチレン分解システムの開発
16:33　○木村太郎[1]，浦川稔寛[1]，塚崎守啓[2]　([1]福岡工技セ，[2]福岡農林試)

B4 会場　午前の部(9:00〜12:05)

食品―食品機能・栄養 - ビタミン・ミネラル／食品機能・栄養 - 神経，内分泌，味覚・食欲―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3B4a01　低亜鉛食給餌ラットにおける食塩嗜好上昇と脳中代謝物のメタボローム解析に関する研究
9:00　○袖山尚紘[1]，酒井久美子[2]，後藤知子[3]，白川　仁[1]，駒井三千夫[1]　([1]東北大院農，[2]大分大医，[3]宮城学院女子大生活科学)
3B4a02　ヒト型 PXR マウスを用いたビタミン K2 による PXR 標的遺伝子の発現調節の解析
9:11　○渡邉きみか，Sultana Halima，白川　仁，駒井三千夫　(東北大院農)
3B4a03　ピロロキノリンキノン（PQQ）の LC-MS/MS 分析：牛乳およびヒト母乳の測定
9:22　○加藤主税[1]，河合笑子[1]，小林俊二郎[2]，伊藤隼哉[1]，永塚貴弘[1]，仲川清隆[1]　([1]東北大院農・機能分子解析，[2]雪印ビーンスターク(株))
3B4a04　食品添加物が食品中のビタミン B_{12} に及ぼす影響
9:33　○岡本奈穂[1]，日裏七海[2]，山本彩夏[2]，美藤友博[2]，藪田行哲[1,2]，渡邉文雄[1,2]　([1]鳥取大院連合農学，[2]鳥取大農)
3B4a05　ビタミン B_{12} 欠乏が線虫（*Caenorhabditis elegans*）の中性脂質代謝に及ぼす影響
9:44　○美藤友博[1]，後井俊哉[1]，岡本奈穂[2]，藪田行哲[1]，河野　強[1]，渡邉文雄[1]　([1]鳥取大農，[2]鳥取大院連合農)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3B4a06　JNK シグナルへの作用を介したロスマリン酸のアルツハイマー病予防機構
10:05　○山本　宗[1]，篠原もえ子[2]，濱口　毅[2]，山田正仁[2]，小林彰子[1]　([1]東大院農，[2]金沢大医)
3B4a07　大豆タンパク質由来ジペプチド投与による脳内 BDNF 産生促進効果
10:16　○小出佳奈[1]，清水綾乃[1]，三谷塁一[1]，前渕元宏[2]，中村宗一郎[1]，片山　茂[1]　([1]信州大農，[2]不二製油(株))
3B4a08　線虫 C.elegans における細胞透過性フェルラ酸誘導体の神経保護効果
10:27　○松本果楠子[1]，三谷塁一[1]，Park Hyun Young[2]，Vattem A. Dhiraj[2]，中村宗一郎[1]，片山　茂[1]　([1]信州大院農，[2]オハイオ大)
3B4a09　高カルシウム食は記憶・運動障害を誘発する
10:38　○杉浦亜美，井上達郎，北村美彩，長谷川靖　(室工大院)
3B4a10　ジペプチドライブラリーを用いたグレリン分泌調節ペプチドの包括的探索とその生理作用
10:49　○中戸絢也[1]，青木隼人[1]，徳山雄基[1]，山本雄大[1]，岩倉　浩[2]，松村成暢[1]，井上和生[1]，大日向耕作[1]　([1]京大院・農・食品生物，[2]和歌山県立医科大学・内科学第一講座)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3B4a11　ラットの幼若期における咀嚼刺激が海馬の遺伝子発現と記憶能力に与える影響
11:10　○宮口一勢[1]，永井俊匡[2]，斉藤芳和[1]，安岡顕人[1,3]，阿部啓子[1,3]，朝倉富子[1]　([1]東大院農生科，[2]高崎健大・栄養，[3]神奈川県立産業技術総合研究所)
3B4a12　長期間の咀嚼による小脳の遺伝子発現変動
11:21　○永井俊匡[1]，浅野実久[1]，齊藤美佳[2]，齋藤芳和[3]，阿部啓子[3,4]，朝倉富子[3]　([1]高崎健大・栄養，[2]東京家政大・栄養，[3]東大農・応生化，[4]神奈川県立産業技術総合研究所)
3B4a13　脳幹で甘味を伝達する神経の特定
11:32　○中島健一朗[1]，傅　　欧[2]，岩井　優[2]，近藤邦生[1]，箕越靖彦[1]，三坂　巧[2]　([1]生理学研究所，[2]東大院農生科・応生化)
3B4a14　食脂肪の嗜好性における海馬 PI3K/Akt-mTOR シグナル伝達経路の関与
11:43　○小林賢斗[1]，安達真一[2]，近藤真司[2]，佐藤祐介[3]，吉澤史昭[3]　([1]宇都宮大院・農，[2]宇都宮大・バイオ，[3]宇都宮大・学術院)
3B4a15　ローヤルゼリーの慢性軽度ストレス負荷抑うつ様モデルにおける効果
11:54　○家垣典幸[1]，成田幸夫[1]，服部徳子[1]，平田洋子[2]，市原賢二[1]　([1]アピ(株)長良川リサーチセンター，[2]岐阜大院・連合創薬)

B4 会場　午後の部（13:50〜16:55）

食品―食品機能・栄養 - 神経，内分泌，味覚・食欲／食品機能・栄養 - 酸化，抗酸化，糖化，抗糖化，老化―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:40〜13:50

3B4p01　ヒト甘味受容体安定発現細胞を用いた高濃度糖溶液の甘味評価法の改良
13:50　○井手美里，竹谷千晶，三坂　巧　（東大院農生科・応生化）

3B4p02　ヒト甘味受容体発現細胞の応答強度向上のための培養条件検討
14:01　○竹谷千晶[1]，松谷拓弥[1]，中北智哉[2]，三坂　巧[1]　（[1]東大院・農生科・応生化，[2]京大院・医）

3B4p03　抗炎症剤イブプロフェンの甘味受容体に対する阻害剤としての作用機構解析
14:12　○中北智哉[1,2]，竹谷千晶[1]，成川真隆[1]，小林拓也[2]，三坂　巧[1]　（[1]東大院・農生科・応生化，[2]京大院・医）

3B4p04　コイ味覚受容体の発現解析
14:23　○久保園峻，戸田安香，石丸喜朗　（明治大農）

3B4p05　霊長類 T1R1/T1R3 におけるグルタミン酸受容能獲得の分子基盤：クモザルに注目した検討
14:34　○戸田安香[1]，早川卓志[2,3]，中北智哉[4]，河村正二[5]，今井啓雄[6]，石丸喜朗[1]，三坂　巧[7]　（[1]明大農・農芸化，[2]京大霊長類研・ワイルドライフサイエンス，[3]日本モンキーセンター，[4]京大院・医，[5]東大院新領域・先端生命，[6]京大霊長類研・ゲノム細胞，[7]東大院農生科・応生化）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:55

3B4p06　加齢依存的な味感受性変化における味修飾因子の関与の検討
14:55　○上吉原絢，成川真隆，三坂　巧　（東大院農生科・応生化）

3B4p07　免疫不全モデルマウスにおける味感受性評価
15:06　○高橋涼佳，成川真隆，三坂　巧　（東大院農生科）

3B4p08　味刺激により生じる嗜好性変化に関与する脳領域の解析
15:17　○山口雅裕，成川真隆，三坂　巧　（東大院農・農生科）

3B4p09　希少糖 D-Allulose の GLP-1 分泌促進作用と求心性迷走神経を介した摂食・糖代謝調節作用
15:28　○岩崎有作[1,2]，仙度光麻[2]，出崎克也[2]，比良　徹[3]，中田正範[2,4]，原　　博[3]，Daniel J. Drucker[5]，山田祐一郎[6]，徳田雅明[7]，矢田俊彦[2,8]　（[1]京都府大生命環境，[2]自治医大，[3]北大農，[4]和歌山県医大，[5]ルーネンフェルト・タネンバウム研究所，[6]秋田大医，[7]香川大医，[8]関電病院医学研究所）

3B4p10　ニワトリにおける甘味物質の嗜好性と T1R 非依存的な甘味受容機構の解明
15:39　○川端二功[1]，東田桃子[2]，川端由子[3]，松井優希[2]，西村正太郎[2]，田畑正志[2]　（[1]弘前大農生，[2]九大院農，[3]九大院歯）

p11〜p15 発表者の接続時間 15:50〜16:00

3B4p11　紫キャベツ食餌負荷による血糖コントロールの影響
16:00　○渡邉理江，曽田一美，高橋友梨，吉里優海，中村奎史，黄　詩琦，大城璃紗，西川　愛，若月ふゆみ　（美作大学）

3B4p12　アピオス食餌負荷による血糖コントロールの影響
16:11　○中村奎史[1]，吉里優海[1]，高橋友梨[1]，曽田一美[1]，松永祐輔[2]，渡邊理江[1]　（[1]美作大学，[2](株)津山工業原料）

3B4p13　ブドウ種子抽出物における抗糖化機能および抗酸化機能の解析とその関係性
16:22　○浅野卓也[1,3]，松田萌花[2]，榎元廣文[4]，川崎靖子[1]，淺野悠輔[1]，八田　一[2,3]　（[1]クレオ・インターナショナル株式会社，[2]京女大家政，[3]京女大院家政，[4]帝京大院理工）

3B4p14　各種植物性食品素材の抗糖化作用および抗酸化作用
16:33　○瀬戸山央，橋本知子，廣川隆彦　（(地独)神奈川県立産技総研）

3B4p15　ビタミン B_1 の酸化生成物に関する解析
16:44　○笹月仁詞[1]，吉武　淳[2]，内田浩二[3]，柴田貴広[1]　（[1]名大院生命農，[2]名大未来社会，[3]東大院農生科）

B5 会場　午前の部（9:00〜12:05）

食品―食品機能・栄養 - 免疫，炎症，アレルギー・アレルゲン―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3B5a01　ポリフェノールオキシダーゼによる自然抗体エピトープの生成
9:00　○今堀夏奈美[1]，李　相美[1]，柴田貴広[1]，内田浩二[2]　（[1]名大院・生命農，[2]東大院・農学生命）

3B5a02　アクロレイン修飾タンパク質による IgM 抗体産生機構の解析
9:11　○遠藤龍之助[1]，板倉正典[1]，佐々木栄太[1]，安達貴弘[2]，内田浩二[1]　（[1]東大院・農生科，[2]東京医科歯科大学・難治疾患研）

3B5a03　腸管上皮細胞が分泌するエクソソームによる炎症制御
9:22　○長谷川加奈[1]，桑田啓子[2]，吉武　淳[3]，内田浩二[4]，柴田貴広[1]　（[1]名大院・生命農，[2]名大・ITbM，[3]名大・未来社会，[4]東大院・農生科）

3B5a04　緑茶カテキン EGCG の血管内皮細胞由来エキソソームマイクロ RNA 発現調節とその機能
9:33　○冨岡玲乃，両角麻衣，熊添基文，藤村由紀，立花宏文（九大院農院・生機科）

3B5a05　緑茶カテキン EGCG の経口摂取はマイクロ RNA Let-7b を介してマクロファージの極性を調節する
9:44　○福富拓哉，山田脩平，牧尾彰子，村田京介，立花宏文（九大院農院・生機科）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3B5a06　牛乳由来エクソソームの精製方法の比較検討
10:05　○両角麻衣，和泉裕久，津田宗哉，清水隆司，武田安弘（森永乳業株式会社 研究本部 健康栄養科学研究所）

3B5a07　Mechanism for the intrinsic allergenicity of Ara h 1, a major peanut allergen, excerting activation of human primary macrophages
10:16　○Masako Toda[1,2]，Maren Krause[2]，Peter Crauwels[2]，Martin Globisch[3]，Thomas Henle[3]，Ger van Zandbergen[2]，Stefan Vieths[2]，Stephan Scheurer[2]　（[1]Tohoku University，[2]Paul-Ehrlich-Institut，[3]Technical University Dresden）

3B5a08　魚類寄生性甲殻類におけるエビアレルゲン交叉性タンパク質の分離同定
10:27　○臼井将勝[1]，出水聡之[1]，窪田　暉[1]，杉浦義正[1]，河邉真也[1]，近藤昌和[2]，宮崎泰幸[1]　（[1]水大校・食品科学，[2]水大校・生物生産）

3B5a09　*Flavonifractor plautii* の経口投与による Th2 免疫応答の抑制効果
10:38　○荻田　佑[1]，山本祥也[2]，深澤知夏[3]，三上彩音[3]，下里剛士[1,3,4]　（[1]信州大バイオメディカル研，[2]広島大院生物圏，[3]信州大農，[4]信州大菌類微生物セ）

3B5a10　*Flavonifractor plautii* の経口投与による肥満脂肪組織における抗炎症作用
10:49　○三上彩音[1]，荻田　佑[2]，深澤知夏[1]，下里剛士[1,2,3]　（[1]信州大農，[2]信州大バイオメディカル研，[3]信州大菌類微生物セ）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3B5a11　血中 TGF-β 産生を促す *Lactobacillus plantarum* 22A-3 による抗アレルギー効果
11:10　○藤井美凪[1]，大戸信明[2]，桑原浩誠[2]，水野雅史[1]　（[1]神戸大学大学院農学研究科，[2]丸善製薬株式会社）

3B5a12　食物アレルギーモデル培養評価系における酢酸菌の IL-4 産生抑制作用
11:21 ○中西春霞，足立(中嶋)はるよ，芝原恭子，八村敏志（東大院農生科・食の安全研セ）

3B5a13　マウスアレルギーモデルにおけるエルゴステロールのヒスタミン遊離抑制作用
11:32 ○川井絢矢[1]，森光一郎[1]，平澤典保[2]（[1]ホクト(株)，[2]東北大院薬）

3B5a14　骨量減少を併発する食物アレルギー性小腸炎モデルマウスにおける免疫器官のサイトカイン産生パターンの解析
11:43 ○宇野　智[1]，大町愛子[2]，山田　悟[1]，曽我皓平[1]，高野智弘[1]，清野　宏[3]，八村敏志[1]，足立(中嶋)はるよ[1]（[1]東大院農生科・食の安全研セ，[2]雪印メグミルク(現・雪印ビーンスターク)，[3]東大医科研）

3B5a15　食物アレルギー性下痢に対する抑制効果を示すユズ果皮抽出物成分の解析
11:54 ○松岡歩実，謝　肖男，栗野峻史，千野　晶，東　徳洋，山田　潔（宇都宮大農）

B5 会場　午後の部(13:50〜16:55)

食品―食品機能・栄養 - 免疫，炎症，アレルギー・アレルゲン／食品機能・栄養 - 癌，抗癌―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:40〜13:50

3B5p01　柑橘ジャバラ果皮末のスギ花粉症予防効果の検討
13:50 ○村上能庸[1]，吾妻正章[1,2]，内藤雅人[1,3]，松村人志[1]，松村靖夫[1]，赤坂隆志[4]，佐藤　隆[4]，吾妻英子[2]，馬場きみ江[1]，谷口雅彦[1]（[1]大阪薬大，[2](株)ジャバラボラトリー，[3]済生会兵庫県病院，[4]フマキラー(株)）

3B5p02　テンペ摂食によるアトピー性皮膚炎の改善効果
14:01 ○中馬俊祐[1]，居場嘉教[1]，青木秀之[2]，渡辺睦行[3]，尾山　廣[1]（[1]摂南大理工，[2]池田食研，[3]昭和女子大生活科学）

3B5p03　大型海藻由来の抗アレルギー成分
14:12 ○有本清也[1]，垣田浩孝[2]（[1]日本大学大学院　総合基礎科学研究科，[2]日大文理）

3B5p04　鰹節酵素分解物残渣の抗アレルギー効果に関する研究
14:23 ○河野美帆[1]，石田萌子[1]，西　甲介[1]，土居幹治[2]，松本淳一[2]，菅原卓也[1]（[1]愛媛大学院農，[2]マルトモ(株)）

3B5p05　西ノ島町産 褐藻ノコギリモクの抽出物による抗炎症効果の検討
14:34 ○杉浦義正[1]，木下陽一[2]，山谷裕昭[3]，中西正美[4]，平田文久[4]，林　裕一[5]，村瀬　昇[1]（[1]水産機構水大校，[2]西ノ島町，[3]ノア隠岐，[4]JFしまね，[5]岡部(株)海洋事業部）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:55

3B5p06　米ぬか由来繊維は腸内細菌叢の調節を介して大腸炎を抑制する
14:55 ○田中一己[1,2,3]，アウワンピン[1,2]，鈴木健大[4]，尾花　望[8]，楊　佳約[1,2]，木村彰宏[7]，冨田　勝[1,2]，福田真嗣[1,2,3,5,6,8]（[1]慶大・先端生命研，[2]慶大・院・政策・メディア，[3]神奈川産技総研，[4]環境研・生態環境セ，[5]JST・さきがけ，[6]メタジェン，[7]国立国際医療研究センター，[8]筑波大学）

3B5p07　麹菌摂取による宿主の腸内細菌叢の変化と大腸炎緩和効果
15:06 ○都築　翔[1]，山田和広[1]，榊原　舞[1]，長澤麻央[1]，林　利哉[1]，兒島孝明[2]，中野秀雄[2]，志水元亨[1]，加藤雅士[1]（[1]名城大学院・農，[2]名大院・農）

3B5p08　クワの実凍結乾燥粉末は，大腸粘膜の状態を維持することによってデキストラン硫酸誘発性大腸炎の症状を緩和する
15:17 ○畑生俊光，王　　洋（岡山大農）

3B5p09　植物発酵エキスに含まれる潰瘍性大腸炎抑制成分の評価
15:28 ○藤田佳那[1]，腸坂 むつみ[1]，村上允唯[2]，中川泰輔[2]，本多奈保子[1]，渡辺敏郎[1]（[1]園田学園女大・食栄，[2]機能性食品開発研究所）

3B5p10　イチジク茶に含まれるフロクマリンの低減・除去方法の検討
15:39 ○橋本ゆかり，阿部竜也，西村耕作　((公財)東洋食品研究所）

p11〜p15 発表者の接続時間 15:50〜16:00

3B5p11　*Lactobacillus paracasei* KW3110 の加齢に伴う腸の炎症抑制と網膜神経節細胞死の抑制効果
16:00 ○森田悠治[1]，城内健太[2]，坂本明彦[3]，金内　理[1]，丸山光生[3,4]（[1]キリン株式会社，[2]小岩井乳業株式会社，[3]国立長寿医療研究センター，[4]名古屋大学　医学系研究科）

3B5p12　麹甘酒及び乳酸発酵甘酒によるラットデキストラン硫酸ナトリウム誘発性大腸炎に対する予防効果の検討
16:11 ○櫻井美仁[1]，久保田真敏[1]，井口晃徳[1]，重松　亨[1]，山口利男[1]，倉橋　敦[2]，小黒芳史[2]，西脇俊和[3]，相原浩太郎[3]，佐藤眞治[1]（[1]新潟薬大，[2]八海醸造(株)，[3]新潟農総研食研セ）

3B5p13　マウス dectin-1 のユーグレナ・グラシリス EOD-1 由来パラミロンに対する反応性
16:22 ○石橋健一[1]，西岡満智子[2]，大中信輝[2]，西田典永[2]，高橋　円[2]，山中大輔[1]，安達禎之[1]，大野尚仁[1]（[1]東京薬大薬，[2]神鋼環境ソリューション）

3B5p14　*Euglena gracils*（ミドリムシ）と野菜の同時摂取は，マウスの腸内細菌叢を変化させ抗炎症効果と内臓脂肪蓄積抑制作用を増強する
16:33 ○都築　毅[1]，坂之井悠人[1]，鄂　　爽[1]，山本和史[1]，太田稔邦[2]，関健太朗[2]，今井真由美[2]，太田隆貴[2]，朝山雄太[3]，中島綾香[3]，鈴木健吾[3]（[1]東北大院・農，[2]武田コンシューマーヘルスケア，[3]ユーグレナ）

3B5p15　Effect of dietary ethanolamine plasmalogen on 1,2-DMH-induced colon ACF formation in mice
16:44 ○EPHANTUS BERNARD[1], Yuki TOMINAGA[1], Shinji YAMASHITA[1], Takashi NAKATOMI[2,3], Kiyotaka NAKAGAWA[2], Teruo MIYAZAWA[2], Mikio KINOSHITA[1]（[1]Obihiro Univ., [2]Tohoku Univ., [3]Yaizu Suisankagaku Ind.）

C1 会場　午前の部(9:00〜12:05)

微生物―細胞 - 栄養，生育，増殖―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3C1a01　分裂酵母における長寿命変異株の特性解析と全ゲノム解析によるその責任遺伝子の同定
9:00 ○唐澤健太，山﨑　渉，高久洋暁，山崎晴丈（新潟薬大・応生科）

3C1a02　出芽酵母 Dhog1 株の浸透圧感受性抑圧変異株を用いた新規寿命制御機構の解析
9:11 ○舟木知穂，松上紗千，米北久美子，久米一規，水沼正樹（広島大院先端研）

3C1a03　分裂酵母 *pka1* 欠損株の TBZ 感受性を抑圧する転写関連因子の解析
9:22 竹中航平[1]，田部卓磨[1]，川向　誠[1,2]，○松尾安浩[1,2]（[1]島根大・生物資源，[2]島根大・農生命）

3C1a04　分裂酵母 *pka1* 欠損株で高発現する Mug14 の解析
9:33 ○稲村真一[1]，田部卓磨[1]，松尾安浩[1,2]，川向　誠[1,2]（[1]島根大・生資・生命科学，[2]島根大・農生命系）

3C1a05　グルコース制限はスピンドルチェックポイント因子である Mad1 の機能低下を引き起こす
9:44 ○田部卓磨[1]，松尾安浩[1,2]，川向　誠[1,2]（[1]島根大・生資・生命科学，[2]島根大・農生命系）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3C1a06　*Phytophthora infestans* 遊走子放出阻害物質の同定及びその作用解析
10:05 ○今村　翼，甲斐建次，谷　修治，炭谷順一，川口剛司（阪府大院・生環科）

3C1a07　人為的な発芽不能胞子は正常胞子の助けで発芽できるのか
10:16 ○坂元　仁[1]，古田雅一[1,2,3]，土戸哲明[1]（[1]大阪府大微制研，[2]大阪府大放研セ，[3]大阪府大院工量子）

3C1a08　花と訪花昆虫に生息する嫌気性細菌の生態的意義に関する研究
10:27 ○山本安里沙[1]，鈴木大貴[1]，田中愛里[1]，西村拓海[1]，森　達則[1]，佐藤拓海[2]，川崎信治[1,2]（[1]東農大バイオ，[2]東農大微生物）

3C1a09　継代に伴うサワードウの成熟と乳酸菌叢変化の関係
10:38 ○大城麦人[1,2]，田中　優[1]，善藤威史[1]，中山二郎[1]（[1]九大院・農，[2]山崎製パン・中央研）

3C1a10　ジェランガム培地上での種々の微生物のコロニー性状
10:49 ○細井知弘，佐藤万里（東京都立食技セ）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3C1a11　Anaeromyxobacter 属細菌 PSR-1 株における異化的ヒ酸還元メカニズムの解明
11:10 ○村松郁香[1]，殿村美森[1]，山田樹奈[1]，笠原康弘[2]，天知誠吾[1]（[1]千葉大園芸，[2]北大低温研）

3C1a12　ヨウ素酸呼吸細菌 *Pseudomonas* sp. SCT 株の新規ヨウ素酸還元酵素の同定と呼吸メカニズムの推定
11:21 ○山崎千尋[1]，笠原康裕[2]，天知誠吾[1]（[1]千葉大院園芸，[2]北大低温研）

3C1a13　海洋窒素循環を駆動させる触媒分子の機能を解き明かす
11:32 ○永井孔明[1]，押木　守[1]，荒木信夫[1]，増間智郎[3]，山口隆司[2]，岡部　聡[4]（[1]長岡高専，[2]長岡技科大，[3]豊橋技科大，[4]北海道大）

3C1a14　アルコールデヒドロゲナーゼ AdhX 遺伝子依存的貧栄養環境適応機構の普遍性
11:43 ○酒井洋範，稲葉慎之介，加藤広海，大坪嘉行，津田雅孝，永田裕二（東北大院生命科）

3C1a15　緑膿菌の嫌気脱窒条件下での DNA 合成に及ぼす *cbb*$_3$ 型末端酸化酵素の影響
11:54 ○堀　遥花，亀谷将史，石井正治，新井博之（東大院・農生科）

C1 会場　午後の部（13:50〜16:55）

微生物―代謝 - 代謝調節，発酵生理，メタボローム―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:40〜13:50

3C1p01　遺伝子発現解析による油脂酵母の油脂高蓄積重要遺伝子の同定
13:50 ○風間春香[1]，小林鈴花[1]，荒　学志[1]，山崎晴丈[1]，志田洋介[2]，小笠原渉[2]，矢追克郎[3]，森　一樹[4]，油谷幸代[4]，荒木秀雄[5]，高久洋暁[1]（[1]新潟薬大・応生科，[2]長岡技科大・工，[3]産総研・生物プロセス，[4]産総研・CBBD-OIL，[5]不二製油グループ本社）

3C1p02　油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* のアシル CoA 合成酵素の高発現による油脂生産性の向上
14:01 ○小林鈴花[1]，荒　学志[1]，山崎晴丈[1]，吉田崇伸[2]，志田洋介[3]，小笠原渉[3]，矢追克郎[4]，荒木秀雄[5]，蓮沼誠久[2]，高久洋暁[1]（[1]新潟薬大・応生科，[2]神戸大院・科技イノベ，[3]長岡技科大・工，[4]産総研・生物プロセス，[5]不二製油グループ本社）

3C1p03　油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の中性脂質合成酵素の高発現による油脂生産性の向上
14:12 ○小林彩子[1]，小林鈴花[1]，荒　学志[1]，山崎晴丈[1]，吉田崇伸[2]，志田洋介[3]，小笠原渉[3]，矢追克郎[4]，荒木秀雄[5]，蓮沼誠久[2]，高久洋暁[1]（[1]新潟薬大・応生科，[2]神戸大院・科技イノベ，[3]長岡技科大・工，[4]産総研・生物プロセス，[5]不二製油グループ本社）

3C1p04　*Acetobacter aceti* におけるクエン酸合成酵素遺伝子の高発現による酢酸代謝への影響
14:23 ○中村　匡，亀谷将史，石井正治，新井博之（東大院・農生科）

3C1p05　乳酸菌の好気的流加培養による乳酸生産抑制
14:34 ○一瀬　涼[1]，垣本智美[2]，山崎思乃[2]，片倉啓雄[2]（[1]関西大院理工，[2]関西大化生工）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:55

3C1p06　代謝改変酵母における転写コリプレッサー Tup1-Cyc8 とアルギン酸由来モノウロン酸 DEH の代謝
14:55 松岡史也[1]，柏原貴幸[1]，中田翔太[1]，村田幸作[2]，橋本　渉[1]，○河井重幸[3]（[1]京大院農，[2]摂南大，[3]石川県立大）

3C1p07　グルコース濃度及び cAMP/PKA 経路が分裂酵母におけるコエンザイム Q_{10} の生産性に与える影響
15:06 ○西田郁久，横見和誠，細野耕司，林　和弘，松尾安浩，戒能智宏，川向　誠（島根大生資科）

3C1p08　細菌における高濃度メチオニン存在下でのリグニン由来芳香族化合物の代謝阻害
15:17 ○保里明日香，荒木拓馬，新沼　皐，上村直史，政井英司（長岡技科大・生物）

3C1p09　酵母 Saccharomyces cerevisiae におけるプロリン資化抑制機構の理解とその応用
15:28 ○谷川　翼，渡辺大輔，高木博史（奈良先端大バイオ）

3C1p10　*Vibrio parahaemolyticus* のキチン由来ヘテロ 2 糖によるキチン代謝酵素の遺伝子発現
15:39 ○津田紘伸[1]，平野貴子[1,2]，大久保学[1]，袴田　航[1,2]，西尾俊幸[1,2]（[1]日大院生資科，[2]日大生資科・生命化）

p11〜p15 発表者の接続時間 15:50〜16:00

3C1p11　好塩性アーキアにおける glycolaldehyde 代謝酵素の同定
16:00 ○平田晃右，南　瞭子，佐藤喬章，跡見晴幸（京大院工）

3C1p12　超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* におけるアーキア特異的な新規 dephospho-CoA kinase の同定および解析
16:11 ○下坂天洋[1,2]，MAKAROVA Kira S[3]，KOONIN Eugene V[3]，跡見晴幸[1]（[1]京大院・工，[2]日本学術振興会，[3]NCBI, NLM, NIH）

3C1p13　ランダムトランスポゾン変異導入によるアルドキシムアナログ代謝経路の解析
16:22 ○岸　克洋，橋本義輝，石上佳奈，熊野匠人，小林達彦（筑波大院・生命環境）

3C1p14　Characterization of cross-stress tolerance and stress responses in a thermotolerant L1-1 isolated from oleaginous yeast *Rhodosporidium toruloides* DMKU3-TK16
16:33 ○Chih chan WU[1]，Takao OHASHI[1]，Ryo MISAKI[1]，Savitree LIMTONG[2]，Kazuhito FUJIYAMA[1]（[1]Osaka Univ.，[2]Kasetsart Univ.）

3C1p15　高温育種酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* TH-3 の細胞表層及びアミノ酸代謝と耐熱化機構
16:44 上利浩輝[1]，中西里菜[2]，松本奈実[2]，片岡尚也[1,2,3]，薬師寿治[1,2,3]，○松下一信[1,2,3]（[1]山口大農，[2]山口大院創成科学，[3]山口大中高温微セ）

C2 会場　午前の部（10:05〜12:05）

微生物―細胞 - 情報伝達，細胞応答，ストレス応答―

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3C2a06　G-body が AMPK 経路を介して酵母の代謝に果たす役割
10:05 ○吉村柚紀[1]，平山伶奈[1]，大谷優太[2]，内海亮太郎[1]，三浦夏子[1]，植田充美[2]，片岡道彦[1]（[1]阪府大院・生命環境，[2]京大院・農・応用生命）

3C2a07　Eisososme に局在する Sur7 family と Pil1 は協調的に形質膜ストレス応答に関与する
10:16 ○坂田健太郎[1]，橋井圭介[1]，田原悠平[2]，宮田真人[2]，田中直孝[1]，田淵光昭[1]（[1]香川大・農・応用生物，[2]大阪市立大・院理・生物地球系）

3C2a08　酵母における転写制御を介したスフィンゴ脂質代謝のファインチューニングシステム
10:27 石野裕子[1]，有田頌彬[2]，谷　元洋[2]，小松楠於[1]，上野俊哉[1]，田中直孝[1]，○田淵光昭[1]（[1]香川大農，[2]九州大院理）

3C2a09　高温培養時における耐熱性酵母の抗酸化因子の機能
10:38 ○高橋　諒[1]，東崎愛生[1]，ビチャイリーラバッチャラマス[2]，岸田正夫[1]（[1]阪府大院・生環科・応生科，[2]コンケーン大・工・発酵）

3C2a10　出芽酵母の圧力適応に重要な細胞内シグナル伝達経路の探索
10:49 ○望月貴博，波多野絵梨，藤山未奈，阿部文快（青山学院大理工）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3C2a11　各種化学物質および病原性細菌の同時暴露がそれぞれの毒性変化に及ぼす影響
11:10 ○油井拓哉，内海未央，島村裕子，増田修一（静岡県大院・薬食生命）

3C2a12　Bacillus subtilis ABCF resistance factor VmlR directly protects the ribosome from antibiotics tiamulin, streptogramin A and virginiamycin M
11:21 ○Hiraku TAKADA[1,2]，Gemma Atkinson[2]，Vasili Hauryliuk[1,2]（[1]Laboratory for Molecular Infection Medicine Sweden（MIMS），[2]Department of Molecular Biology, Umea University）

3C2a13　*Paenibacillus* 属細菌の芽胞形成とバイオフィルム形成が相互に与える影響
11:32 ○加藤寛子[1]，有田佳奈[2]，尾花　望[3,4]，久保田浩美[5]，八城勢造[2]，永井　智[2]，野村暢彦[4,6]（[1]筑波大学大学院・生命環境科学研究科，[2]花王株式会社・安全性科学研究所，[3]筑波大学・医学医療系・トランスボーダー医学研究センター，[4]筑波大学・微生物サステイナビリティ研究センター，[5]花王株式会社・スキンケア研究所，[6]筑波大学・生命環境系）

3C2a14　海洋細菌 FT01 が生産する EPS が金属腐食性バイオフィルムに与える影響
11:43 ○伊藤菜々子[1]，渡辺宏紀[2]，稲葉知大[3]，尾花　望[4,5]，宮野泰征[6]，野村暢彦[5,7]（[1]筑波大・生命環境，[2]筑波大院・生命環境，[3]産総研・環境管理，[4]筑波大・医学医療系・TMRC，[5]筑波大・MiCS，[6]秋田大院・理工，[7]筑波大・生命環境系）

3C2a15　*Lactobacillus agilis* における走化性の解析
11:54 ○鈴木駿也[1]，近藤和穂[1]，横田健治[2]，五十君静信[2]，梶川揚申[2]（[1]東農大院・農化，[2]東農大・農化）

C2 会場　午後の部（13:50〜16:55）

微生物―細胞 - 情報伝達，細胞応答，ストレス応答／細胞 - 栄養，生育，増殖―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:40〜13:50

3C2p01　消毒薬の効力に対するアデノウイルスの血清型の違いについて
13:50 ○鈴木潤一[1,2]，松村有里子[1]，梶浦　工[1,2]，岩澤篤郎[1]（[1]東京医療保健大学大学院，[2]吉田製薬株式会社）

3C2p02　病原細菌における tail-to-tail 遺伝子プロファイリング解析
14:01 北田泰平[1]，谷川敦也[1]，兼崎　友[2]，吉川博文[2]，GROISMAN Eduardo[3]，○加藤明宣[1]（[1]近大農，[2]東農大農，[3]Yale Univ.）

3C2p03　大腸菌のアデニル酸シクラーゼ遺伝子変異株の解析
14:12 ○木村茉実[1]，菅原慶太[1]，佐藤緋奈子[1]，早坂俊亮[1]，小林　弘[2]，齋藤浩美[2,4]，井原邦夫[3]，浜本　晋[1,5]，魚住信之[1]（[1]東北大・院工，[2]千葉大・院薬，[3]名大・遺伝子実験施設，[4]現 帝京平成大・薬，[5]現 東大・生物工学セ）

3C2p04　好気性光合成細菌 *Roseobacter denitrificans* における光合成制御と呼吸鎖の関係
14:23 ○山本麻衣子，亀谷将史，石井正治，新井博之（東大院農生科・応生工）

3C2p05　炭素源飢餓における *Roseateles depolymerans* の光合成器官誘導と遺伝子転写産物量の変化
14:34 ○陶山哲志[1]，菅野菜々子[2,4]，花田　智[2]，千原康太郎[1,3]，松倉智子[1]，野田尚宏[1,3]（[1]産総研・バイオメディカル，[2]首都大・院・理，[3]早稲田大学・理工学術院，[4]中央水産研究所）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:55

3C2p06　真核微細藻類で同定された新規な水溶性アスタキサンチン結合タンパク質
14:55 ○山崎敬太[1]，宮田彩実[1]，佐治のどか[1]，豊島拓樹[1]，川崎信治[1,2]（[1]東農大バイオ，[2]東農大微生物）

3C2p07　過酷な環境から単離された微細藻類の新規な光酸化ストレス防御機構の解析
15:06 ○豊島拓樹[1]，吉田梨沙子[1]，佐保好亮[1]，本多秀行[1]，吉田嵩史[1]，石毛太一郎[2]，久保田恵理[2]，高市真一[3]，川崎信治[1,3]（[1]東農大バイオ，[2]東農大ゲノム解析セ，[3]東農大微生物）

3C2p08　バクテリアに分布する水溶性アスタキサンチン結合タンパク質（ AstaP ）ホモログの機能解析
15:17 ○大島一輝[1]，加藤聖子[1]，本間　薫[1]，内田聖人[1]，久保田恵理[3]，石毛太一郎[3]，川崎信治[1,2]（[1]東農大バイオ，[2]東農大微生物，[3]東農大ゲノム解析セ）

3C2p09　紅藻ガルデリアの新規単離株と変異株の従属栄養応答の解析
15:28 ○兼崎　友[1]，宮澤和己[2]，向井瑞梨[2]，重信直人[2]，渡辺　智[2]（[1]静岡大グリーン研，[2]東農大生命）

3C2p10　遺伝子組み換えにより従属栄養増殖を可能にした単細胞紅藻シゾンの解析
15:39 ○向井瑞梨[1]，兼崎　友[2]，宮澤和己[1]，島田尚弥[4]，池内昌彦[4]，藤原崇之[3]，宮城島進也[3]，渡辺　智[1]（[1]東京農大，[2]静岡大・グリーン研，[3]遺伝研，[4]東京大学）

p11〜p15 発表者の接続時間 15:50〜16:00

3C2p11　シアノバクテリア Synechocystis sp PCC 6803 における複製開始機構の解析
16:00 ○山崎脩平[1]，青柳智大[1]，大林龍胆[2]，松根かおり[1]，兼崎　友[3]，渡辺　智[1]（[1]東農大農，[2]遺伝研，[3]静大グリーン研）

3C2p12　シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 における RecA タンパク質の機能解析
16:11 ○青柳智大[1]，山崎脩平[1]，栗原亜実[1]，大林龍胆[2]，兼崎　友[3]，渡辺　智[1]（[1]東京農大，[2]遺伝研，[3]静岡大・グリーン研）

3C2p13　ヒト腸内細菌によるスクロースアナログ二糖の資化
16:22 ○保坂浩貴[1]，川村茉唯[2]，平野貴子[1,2]，袴田　航[1,2]，西尾俊幸[1,2]（[1]日大院生資科，[2]日大生資科・生命化）

3C2p14　次世代プロバイオティクス *Bacteroides* 属細菌による動物宿主由来粘液物質の資化と腸内優占性
16:33 ○佐藤賢宏[1]，久門知也[1]，梶川幹太[2]，村田幸作[3]，橋本　渉[1,2]（[1]京大院農，[2]京大農，[3]摂南大理工）

3C2p15　組織透明化法を用いたムーンライティングタンパク質の腸管付着因子としての解析方法の確立
16:44 ○西山啓太[1]，杉山真言[2]，向井孝夫[2]，岡田信彦[1]（[1]北里大薬，[2]北里大獣医）

C3 会場　午前の部（9:33〜12:05）

微生物―細胞 - 複合微生物，共生微生物，難培養性微生物―

a04〜a05 発表者の接続時間 9:23〜9:33

3C3a04　アザミサンゴ *Galaxea fascicularis* から単離した *Ruegeria* 属細菌の解析
9:33 ○三浦夏子[1]，岡田圭以子[1]，元根啓佑[2,3]，北村瑠璃子[1]，高木俊幸[4]，植田充美[2]，片岡道彦[1]（[1]阪府大院・生命環境，[2]京大院・農・応用生命，[3]日本学術振興会特別研究員，[4]東大大気海洋研）

3C3a05　サンゴに共在する *Ruegeria* 属細菌の分布調査を目的とした新規プライマーの設計
9:44 ○北村瑠璃子[1]，三浦夏子[1]，岡田圭以子[1]，元根啓佑[2,3]，高木俊幸[4]，植田充美[2]，片岡道彦[1]（[1]阪府大院・生命環境，[2]京大院・農・応用生命，[3]日本学術振興会特別研究員，[4]東大大気海洋研）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3C3a06　森林土壌における樹木根分解に関与する真菌群集構造の解析
10:05 ○石山菜々子[1]，堀沢　栄[1]，酒井佳美[2]（[1]高知工科大，[2]森林総研九州支所）

3C3a07　異なる土壌環境における根圏微生物叢の解析
10:16 ○浅見綾香[1]，荒木希和子[2]，久保　幹[2]（[1]立命館大学大学院，[2]立命館大学）

3C3a08　異なる土壌間における微生物集団の移植実験
10:27 ○加藤広海，津田雅孝，永田裕二（東北大院生命）

3C3a09　エマルションドロップレットを用いた土壌微生物の培養
10:38 ○川島万凜，村井雄大，金　相元，森田直樹，久原　哲，田代康介（九大農）

3C3a10　難培養性細菌の培養における細胞外多糖の重要性
10:49 ○高橋紳八[1]，加藤広海[1]，永田裕二[1]，大塚重人[2]，大坪嘉行[1]，津田雅孝[1]（[1]東北大学大学院生命科学研究科，[2]東京大学大学院農学生命科学研究科）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3C3a11　細菌間の接近と拡散が有機塩素系殺虫剤の分解コミュニティに与える影響
11:10 ○羽賀千晃，加藤広海，大坪嘉行，津田雅孝，永田裕二（東北大学大学院生命科学研究科）

3C3a12　空間的・代謝的な相互作用を介した細菌と真菌の新たな相利共生戦略
11:21 ○久知良桃花[1]，Gayan Abeysinghe[1]，桝尾俊介[2,3]，萩原大祐[2,3]，高谷直樹[2,3]，野村暢彦[2,3]，尾花　望[3,4]，竹下典男[2,3]（[1]筑波大学大学院・生命環境科学研究科，[2]筑波大学・生命環境系，[3]筑波大学・微生物サステイナビリティ研究センター，[4]筑波大学・医学医療系・トランスボーダー医学研究センター）

3C3a13　プラスミド NAH7 上の接合伝達における受容菌選択性決定因子の探索
11:32 ○作田郁子[1]，水口千穂[1,2]，岸田康平[3]，津田雅孝[3]，岡田憲典[1]，野尻秀昭[1,2]（[1]東大・生物工学セ，[2]東大・微生物連携機構，[3]東北大院生命）

3C3a14　*Methylobacterium* sp. ME121 株と *Kaistia* sp. 32K 株の共培養環境でのバイオフィルム形成に与える影響
11:43 ○薄井祥明[1]，若林　佑[1]，清水　哲[2]，中村　顕[2]，伊藤政博[1]（[1]東洋大院 生命科学，[2]筑波大 生命環境）

3C3a15　義歯表面ヌメリに関する細菌叢解析とヌメリ再構成の試み
11:54 隅田紗織[1]，濱田昌子[2]，前田晋吾[2]，五味満裕[2]，柴田健一郎[3]，○森川正章[1]（[1]北海道大・院環境，[2]小林製薬（株）中央研究所，[3]北海道大・院歯学）

C3 会場　午後の部（13:50〜16:44）

微生物―細胞 - 分離，分類，生態―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:40〜13:50

3C3p01　トンボ糞由来細菌が産生する新規 C30 カロテノイド
13:50 ○小柳　喬[1]，眞岡孝至[2]，越野雅人[1]，持永彩花[1]，長尾美帆[1]，新藤一敏[3]，三沢典彦[1]（[1]石川県大，[2]生産開発研，[3]日本女子大・家政）

3C3p02　地表下から分離した放線菌の特性解析
14:01 ○北川輝弥[1]，内田牧歩[1]，濱渦亮子[2]，保坂　毅[1,2]（[1]信州大農，[2]信州大バイオメディカル研）

3C3p03　Isolation and characterization of *Geobacter* species, potential drivers of reductive nitrogen transformation in paddy soils
14:12 ○Zhenxing XU[1]，Yoko Masuda[1]，Hideomi Itoh[2]，Keishi Senoo[1,3]（[1]The University of Tokyo, [2]AIST Hokkaido, [3]Collaborative Research Institute for Innovative Microbiology）

3C3p04　淡水域底泥中からの新規硫酸還元磁性細菌の分離・培養
14:23 ○下重裕一[1]，小林英城[2]，島村　繁[2]，水木　徹[1]，井上　明[1]，前川　透[1]（[1]東洋大，[2]海洋研究開発機構）

3C3p05　*Aureispira marina* に見出されたセラミド様脂質の化学的性状
14:34 ○川原一芳，大井菜々子，吉浜紘悠，飯田博一（関東学院大）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:55

3C3p06　ADACHI 酵母の単離と特性評価
14:55 ○榛葉雄一，恩田　亘，野垣祐子，夏目　亮（東京電機大学）

3C3p07　乳酸菌におけるカフェインの影響
15:06 ○齊藤可剛[1]，大野恵理[1]，関　文巳[1]，水木　徹[3]，三浦　健[1,2]（[1]東洋大学・生命科学，[2]東洋大学・ライフイノベーション研究所，[3]東洋大学・バイオナノエレクトロニクス研究センター）

3C3p08　国内産生乳から分離された *Lactobacillus delbrueckii* の遺伝的多様性の解析
15:17 ○土橋英恵，市川愛弓，小泉明子，竹田麻理子，溝口智奈弥，石田達也，木村勝紀（株式会社 明治 乳酸菌研究所）

3C3p09　*Leuconostocaceae* 科乳酸菌の進化学的研究
15:28　○前野慎太朗[1]，谷澤靖洋[2]，有田正規[2,3]，遠藤明仁[1]　([1]東京農業大学　食香粧化学科，[2]国立遺伝学研究所　DDBJ研究センター，[3]理化学研究所　環境資源科学研究センター)

3C3p10　*Lactobacillus acetotolerans* の菌体脂肪酸組成に対する培地酢酸濃度の影響
15:39　○柴野麻由，平塚功尚，中山俊一，門倉利守，鈴木健一朗(東農大醸造)

p11〜p14 発表者の接続時間 15:50〜16:00

3C3p11　Isolation of Bacterial Strains From Compost with Biocontrol Ability Against *Burkholderia glumae* Infection in Rice
16:00　○ABINUBLI MAWARID，ZHENG YU，YASUTERU SAKAI，SUGIHIRO ANDO，HIDEKI TAKAHASHI，AKIRA YOKOTA，KEIETSU ABE，SHUHEI YABE　(Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

3C3p12　日本国内で分離された野菜類病原性 *Pseudomonas* 属細菌における Quorum Sensing の多様性解析
16:11　○諸星知広[1]，伊藤雄大[1]，小笠原祐斗[1]，謝　肖男[2]，染谷信孝[3]　([1]宇大院工，[2]宇大バイオ，[3]農研機構)

3C3p13　細胞性粘菌と植物寄生性線虫の化学コミュニケーションの解析
16:22　○崔　智源[1]，齊藤佑美子[2]，永松ゆきこ[3]，齊藤玉緒[1]　([1]上智大学・理工，[2]上智大院・理工，[3]パネフリ工業株式会社)

3C3p14　細胞性粘菌と様々な植物寄生性線虫の相互作用の比較
16:33　梅山拓也[1]，○鄭　明燮[2]，田川拓哉[2]，齊藤佑美子[2]，宮崎早紀[2]，永松ゆきこ[3]，齊藤玉緒[1]　([1]上智大院・理工，[2]上智大・理工，[3]パネフリ工業株式会社)

C4 会場　午前の部(9:11〜12:05)

微生物―遺伝子 - ゲノム解析，メタゲノム，プロテオーム，バイオインフォーマティクス／その他―

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

3C4a02　NGS を用いた生菌微生物の検出方法の開発とその評価
9:11　○西山依里，臼井敦子，松平崇弘，布藤　聡　(株式会社ファスマック)

3C4a03　MutS 非依存型新規ミスマッチ修復機構の解析
9:22　○竹本訓彦[1]，沼田　格[2]，末次正幸[2]，秋山　徹[1]　([1]国立国際医療研究センター，[2]立教大)

3C4a04　大腸菌 DsbA のレドックスチューニングと構造機能解析
9:33　○田村　隆，周藤慎也，黒川美保子，根本理子，稲垣賢二(岡山大院・環境生命)

3C4a05　放線菌 *Streptomyces vietnamensis* の生産するグラナチシンも有機触媒である
9:44　○西山辰也，榎本成美，長安伶奈，髙野英晃，上田賢志(日大生資科)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3C4a06　*De novo* メタトランスクリプトーム解析とメタボローム解析の併用による捕食性細菌群の代謝戦略の解明
10:05　○佐藤由也，稲葉知大，堀　知行，羽部　浩　(産総研環境管理)

3C4a07　Microbiological characterizations of kefir grown in cow milk and soy milk by high-throughput DNA sequencing
10:16　○Raul Ricardo GAMBA，Takashi Koyanagi，Toshiki Enomoto　(Dep. Food Science, Ishikawa Prefectural Univ.)

3C4a08　健康的日本食とヒトの腸内フローラの関係解析
10:27　○串田　衛，浅野将希，山本和史，都築　毅　(東北大院農)

3C4a09　微生物シングルセルゲノミクスを用いたイヌリン摂食マウスの腸内菌叢変動解析
10:38　○千々岩樹佳[1,2]，小川雅人[1,2]，西川洋平[1,2]，高橋　海[1]，細川正人[3,4]，竹山春子[1,2]　([1]早大・先進理工・生医，[2]産総研・早大 CBBD-OIL，[3]早大・理工総研，[4]JST・さきがけ)

3C4a10　生後 1 年間における乳幼児の腸内真菌叢形成と出産・育児環境因子の関連性解析
10:49　○三島梨子[1]，實藤雅文[2]，諸隈誠一[2,3]，田中　優[1]，百田理恵[1]，園元謙二[1]，小川昌宣[2]，加藤聖子[2,3]，中山二郎[1]　([1]九大院農，[2]九大環境発達医学研究センター，[3]九大院医)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3C4a11　qTnSeq 法の開発と PCB 分解細菌への適用
11:10　○大坪嘉行，永田裕二，津田雅孝　(東北大院生命)

3C4a12　ナノポアシーケンサを用いた遺伝子組換え麹菌のゲノミクスおよびトランスクリプトミクス
11:21　○若井　暁[1]，張　斯来[1]，荻野千秋[2]，堤　浩子[3]，秦　洋二[3]，近藤昭彦[1]　([1]神戸大院・イノベ，[2]神戸大院・工，[3]月桂冠・総研)

3C4a13　人工代謝経路を実現する DNA 配列提案技術の開発
11:32　○田邉麻衣子[1]，伊藤潔人[1]，今一　修[1]，武田志津[1]，柘植謙爾[2]，荒木通啓[3]　([1]日立研開，[2]神戸大院・イノベ，[3]京大院・医)

3C4a14　ゲノム解析による *Aspergilllus luchuensis* 変異株の遺伝子変異の検出
11:43　○山本　希[1]，渡来直生[1]，小谷野仁[1]，澤田和典[2]，山田拓司[1]　([1]東工大生命理工学院，[2](株)ぐるなび)

3C4a15　*Rhodococcus erythropolis* を用いた遺伝子配列改変によるタンパク質発現調節法の開発
11:54　○田島直幸[1]，北川　航[2]，齋藤　裕[1]，西宮佳志[2]，玉野孝一[2]，安武義晃[2]，田村具博[2]，亀田倫史[1]　([1]産総研AIRC，[2]産総研生物プロセス)

C4 会場　午後の部(13:50〜16:55)

微生物―遺伝子 - 発現制御，トランスクリプトーム―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:40〜13:50

3C4p01　枯草菌糖脂質合成酵素遺伝子 *ugtP* の発現制御機構の解析
13:50　○松岡　聡[1]，篠原嵩人[1]，朝井　計[2]，戸澤　譲[1]　([1]埼玉大院・理工研，[2]東農大・生命科学)

3C4p02　ヒト腸内細菌 *Prevotella copri* のキシラナーゼ遺伝子の発現解析
14:01　○高木千尋[1]，林　秀謙[1,2]　([1]前工大院工，[2]前工大工)

3C4p03　*Burkholderia* 属細菌における鉄硫黄クラスター生合成系の転写制御機構の解析
14:12　○野々山翔太，岸田康平，永田裕二，大坪嘉行，津田雅孝(東北大・院生命科)

3C4p04　放線菌 *Streptomyces coelicolor* における内在性 NO による形態分化制御機構
14:23　○本間颯太，伊藤晋作，矢嶋俊介，佐々木康幸　(東農大バイオ)

3C4p05　希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* における胞子嚢形成を制御するσ FliA ファミリーのシグマ因子群の機能解析
14:34　○橋口優一朗[1]，手塚武揚[1,2]，大西康夫[1,2]　([1]東大院・農生科，[2]東大・微生物イノベ連携機構)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:55

3C4p06　酢酸菌ゲノムから切り出されて環状化する DNA 領域の解析
14:55　○布川　渓[1]，上田賢志[2]，髙野英晃[2]　([1]日大院生資科・生命研，[2]日大生資科・生命研)

3C4p07　納豆菌における γ-ポリグルタミン酸生産の光抑制メカニズムの解析
15:06　○秋山るしあ[1]，岡添孝章[2]，見世　光[1]，相澤朋子[3]，浦井　誠[4]，上田賢志[2]，髙野英晃[2]　([1]日大院生資科・生命研，[2]日大生資科・生命研，[3]日大生資科・くらし，[4]東農大・生命)

3C4p08　*Pseudomonas* 属細菌のクラス II LitR を介した光応答メカニズム
15:17　丸山貴史[1]，小林　暢[1]，角　　悟[1]，高野(白鳥)初美[1]，兼崎　友[2]，吉川博文[2,3]，上田賢志[1]，○高野英晃[1]　([1]日大生資科・生命研，[2]東農大・生物資源ゲノム解析セ，[3]東農大・生命科)

3C4p09　コリネ型細菌での pHM1519 由来シャトルベクターの高コピー数変異体の取得とその解析
15:28　○羽城周平，安枝　寿　(味の素・イノベ研)

3C4p10　CRISPR/dCas9 システムを用いた IS 256Bsu1 transposase の枯草菌 168 株への影響の解析
15:39　○片野　亘，徳山麻里，吉川博文，朝井　計　(東農大農)

p11〜p15 発表者の接続時間 15:50〜16:00

3C4p11　大腸菌における CsrD による small RNA CsrB の分解制御と Csr システムの利用
16:00　山田竣太[1]，石黒志実[2]，坂井　航[1]，杉本華幸[1,2]，○鈴木一史[1,2]　([1]新潟大院・自然科学，[2]新潟大・農・応生化)

3C4p12　腸内細菌科細菌の中心炭素代謝オペロン mRNA の制御カスケード
16:11　○宮腰昌利　(筑波大医学医療系)

3C4p13　ビブリオ菌の新生ポリペプチド鎖を介した発現制御における mRNA 二次構造の役割
16:22　○石井英治，秋山芳展，森　博幸　(京大・ウイルス・再生研)

3C4p14　シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 における RNase E の発現制御機構
16:33　○大竹祥太[1]，Claudia Steglich[2]，朝山宗彦[3]，Wolfgang Hess[2]，渡辺　智[1]　([1]東京農大院・バイオ，[2]フライブルク大学，[3]茨城大学・農)

3C4p15　5'UTR ステムループを介した環境に適応するための枯草菌 *rpoA* 発現制御機構の解析
16:44　○蟹谷美有，大坂夏木，朝井　計　(東農大農)

C5 会場　午前の部(9:00〜12:05)

微生物―遺伝子 - 構造，機能―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3C5a01　プラスミドベクター pBBR1MCS の広宿主域性に関する研究
9:00　○岸田康平，永田裕二，大坪嘉行，津田雅孝　(東北大学院生命)

3C5a02　Protein-protein binding affinities of H-NS family proteins encoded on the chromosome of Pseudomonas putida KT2440 and IncP-7 plasmid pCAR1
9:11　○Yue SUN[1]，Zongping Sun[1]，Delyana Vasileva[1]，Chiho Suzuki-Minakuchi[1]，Kazunori Okada[1]，Hideaki Nojiri[1,2]　([1]BRC, UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

3C5a03　核様体タンパク質の一種 NdpA ホモログの多量体形成能の解析
9:22　○佐道陽弘[1]，水口千穂[1,2]，岡田憲典[1]，野尻秀昭[1,2]　([1]東大・生物工学セ，[2]東大・微生物連携機構)

3C5a04　Thermus oshimai JL-2: A model organism to study evolution of aromatic hydrocarbon degradation pathways in thermophiles
9:33　○Joydeep CHAKRABORTY[1]，Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1,2]，Kazunori OKADA[1]，Hideaki NOJIRI[1,2]　([1]Biotechnology Research Center, The Univ. of Tokyo, [2]Collaborative Research Institute for Innovative Microbiology, The Univ. of Tokyo)

3C5a05　Experimental evolution of haloalkane dehalogenases toward degradation of an organochlorine pesticide
9:44　○Nannan CHEN，Yoshiyuki Otsubo，Masataka Tsuda，Yuji Nagata　(Tohoku University)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3C5a06　大腸菌リジン脱アセチル化酵素 CobB の N 末端配列の機能解析
10:05　○楳原琢哉[1]，西山　真[1,2]，古園さおり[1,2,3]　([1]東大・生物工学セ，[2]東大・微生物連携機構，[3]理研CSRS)

3C5a07　*Corynebacterium glutamicum* 由来 PDH-ODH 超複合体の性状解析
10:16　○衣川寛知[1]，小峰(阿部)理乃[1]，西山　真[1,2]，古園さおり[1,2,3]　([1]東大・生物工学セ，[2]東大・微生物連携機構，[3]理研CSRS)

3C5a08　枯草菌芽胞の発芽過程における DNA 結合タンパク質と核様体の構造変化に関する解析
10:27　○桑名利津子，大島裕也，山澤龍治，伊藤　潔，高松宏治　(摂南大薬)

3C5a09　枯草菌における機能改変した RecA による非相同遺伝子間の相同組換えの解析
10:38　○田中竣平，朝井　計　(東農大バイオ)

3C5a10　好酸性従属栄養細菌への外来遺伝子組換え発現系の開発
10:49　○金尾忠芳，藤原孝太，上村一雄　(岡山大院・環境生命)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3C5a11　デアミナーゼ及びハロアルカンデハロゲナーゼドメインから成る新規融合タンパク質の酵素学的研究
11:10　○中鉢千尋，佐藤優花里，大坪嘉行，津田雅孝，永田裕二　(東北大院生命科)

3C5a12　枯草菌 2-オキソグルタル酸脱水素酵素複合体の遷移期における機能解析
11:21　○山口将司，吉川博文，朝井　計　(東農大　バイオ)

3C5a13　枯草菌を用いた分子シャペロンによる変異緩衝作用についての検証
11:32　○加納啓吾，北村夏美，法花津匠，大塚まみ，武井若紗，小菅是子，朝井　計，吉川博文　(東京農大・院・バイオ)

3C5a14　リボソームタンパク質 S14 置換による枯草菌キメラリボソームの作製と解析
11:43　○赤沼元気[1]，河村富士夫[1]，渡辺　智[2]，渡辺正樹[2]，大川典哉[2]，吉川博文[2]，千葉櫻拓[2]，朝井　計[2]，山田康之[1]　([1]立教大生命，[2]東農大生命)

3C5a15　ビフィズス菌のトランスポゾン変異株を用いた α-グルコシダーゼ遺伝子の機能解明
11:54　○阪中幹祥[1,2,3]，中川路伸吾[4]，中島　森[4]，阿部光紗[4]，佐分利亘[4]，森　春英[4]，横田　篤[4]，吹谷　智[4]　([1]デンマーク工大食品，[2]石川県大生資環，[3]日本学術振興会海外特別研究員，[4]北大院農)

C5 会場　午後の部(13:50〜16:55)

微生物―遺伝子 - 構造，機能―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:40〜13:50

3C5p01　*Aspergillus luchuensis* が生産する細胞壁多糖ニゲランの合成システムの解明
13:50　○上地敬子，渡嘉敷直杏，平良東紀，水谷　治　(琉球大農)

3C5p02　麹菌 *A. oryzae* における有性生殖器官形成の誘導条件の探索
14:01　○菅原由香[1]，片山琢也[1,2]，丸山潤一[1,2]　([1]東大院・農生科・応生工，[2]東大・微生物連携機構)

3C5p03　麹菌 *Aspergillus oryzae* の菌核形成に必要な新規転写因子の制御機構の解析
14:12　○遠藤章仁[1]，藤井陽平[1]，中村英淳[1]，片山琢也[1,2]，小川真弘[3]，小山泰二[3]，北本勝ひこ[4]，丸山潤一[1,2]　([1]東大院・農生科・応生工，[2]東大・微生物連携機構，[3]野田産研，[4]日薬大・薬)

3C5p04　麹菌 *Aspergillus oryzae* のもつ HET ドメイン遺伝子の不和合性における機能解析
14:23　○森　法子[1]，片山琢也[1,2]，齊藤亮太[3]，岩下和裕[3]，丸山潤一[1,2]　([1]東大院・農生科・応生工，[2]東大・微生物連携機構，[3]酒総研)

3C5p05　麹菌 *Aspergillus oryzae* の持つ 2 つの分泌型ホスホリパーゼ A_1 の機能解析
14:34　○中川原千咲[1]，菊間隆志[2]，吉田　稔[1,3,4]，有岡　学[1,3]　([1]東大院・農生科・応生工，[2]立命館大・生命科・生物工，[3]東大・微生物連携機構，[4]理研環境資源セ)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:55

3C5p06　海洋性フラボバクテリアにおけるミクソール生合成遺伝子クラスターの単離と機能解析
14:55　○中澤慶翼[1]，高市真一[2]，吉澤　晋[3]，山田昌治[1]，杉山健二郎[1]　([1]工学院大先進工，[2]東農大分子微生物，[3]東京大大気海洋研)

3C5p07　超好熱性アーキア *Pyrococcus chitonophagus* におけるキチナーゼ遺伝子破壊株の作製
15:06　○金井　保，山田将大，中田菜月，ASLAM Mehwish，堀内あゆみ，跡見晴幸　(京大院工)

3C5p08　二員培養系で共生パートナーのアカマツ実生苗を枯らすマツタケ変異体の作出
15:17　○村田　仁[1]，仲野翔太[1]，山中高史[1]，下川知子[1]，阿部知子[2]，市田裕之[2]，林　依子[2]，田原　恒[1]，太田　明[3]　([1]森林総研，[2]理研，[3]琵琶湖環セ)

3C5p09　大規模ゲノム再編誘発酵素の直接導入による実用酵母の育種
15:28　中村隆宏[2]，○安川泰史[1]，井村　誠[1]，増尾直久[1]，小田有沙[2]，太田邦史[2]　([1]興人ライフサイエンス株式会社，[2]東大院総合文化)

3C5p10　分裂酵母胞子表層タンパク質 Isp3 を用いた未知の分泌メカニズムの解明
15:39　○吉川佳里奈，酒井崇史，中村太郎　(大阪市大・院理)

p11〜p15 発表者の接続時間 15:50〜16:00

3C5p11　人工汚染化土壌からの有機塩素殺虫剤分解酵素遺伝子取得の試み
16:00　○蘇　立俊，加藤広海，大坪嘉行，津田雅孝，永田裕二　(東北大・院生命科学)

3C5p12　有機リン系殺虫剤分解細菌 Sphingopyxis wildii 株の有機塩素系殺虫剤分解能に関する研究
16:11　○鄧　文昊[1]，サガリアナポリラクシマ[2]，陳　楠楠[1]，加藤広海[1]，大坪嘉行[1]，津田雅孝[1]，シダヴァタムダヤナンダ[2]，永田裕二[1]　([1]東北大学・大学院生命科学研究科(院生命科)，[2]University of Hyderabad, India)

3C5p13　PCB 分解細菌 *Acidovorax* sp. KKS102 株のカタボライト調節に関与する二成分調節因子 BphPQ の機能調節の解析
16:22　○酒井啓一郎，佐々木春菜，永田裕二，津田雅孝，大坪嘉行　(東北大)

3C5p14　PCB/ ビフェニル分解資化遺伝子群を有す ICE-$_{KKS102}$*4677* の水平伝播宿主域の解析
16:33　○川原昌太郎，岸田康平，永田裕二，大坪嘉行，津田雅孝　(東北大学院生命)

3C5p15　シュードモナス属菌のマンデル酸経路に依存しないベンゾイルぎ酸の分解に関与する遺伝子の同定
16:44　○廣瀬　遵，月俣隆世，宮武宗利，横井春比古　(宮崎大・工)

C7 会場　午前の部(9:11〜11:54)

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

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

3C7a02　電解反応におけるリグニンの効率的分解反応の開発
9:11　○山田知宏[1]，渡邊隆司[2]，前川博史[3]，粳間由幸[1]　([1]米子高専物質，[2]京大生存圏，[3]長岡技大物質)

3C7a03　孟宗竹ヘミセルロース加水分解物中の生理活性成分の分離と精製
9:22　○矢田堀裕聖[1]，関本智登[2]，布施有里奈[2]，藤田誠史[2]，平本　茂[2]，椎葉　究[1,2]　([1]東京電機大学理工学部，[2]東京電機大学理工学研究科)

3C7a04　高リグニン含有植物性バイオマス：ラカンカ残渣の堆肥化が植物の生育に及ぼす影響
9:33　○伊藤雄太，池　桂花，村田雄司　(サラヤ株式会社)

3C7a05　二次細胞壁形成に関わる WRKY 転写因子欠損変異イネの作出とそのリグノセルロース性状解析
9:44　○宮本託志[1]，高田理江[1]，飛松裕基[1]，鈴木史朗[1]，山村正臣[1]，刑部敬史[2]，刑部祐里子[2]，坂本正弘[3]，梅澤俊明[1,4]　([1]京大生存研，[2]徳大生物資源，[3]京大農，[4]京大グローバル生存基盤)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3C7a06　セルラーゼ超高生産 *Trichoderma reesei* 変異株の獲得
10:05　○加川雄介，齋藤悠香，平松紳吾，山田勝成　(東レ(株)先端融合研)

3C7a07　酵母 *Saccharomyces cerevisiae* へのセルラーゼ生産能の付与
10:16　○松崎浩明，渡邉翔介，秦野琢之　(福山大生命工)

3C7a08　*Aspergillus aculeatus* 由来 β-glucosidase 1 の植物バイオマス糖化残渣への吸着が緩和された変異酵素の獲得
10:27　○若宮汐里[1]，馬場祐太朗[1]，谷　修治[1]，柴田　望[2]，炭谷順一[1]，川口剛司[1]　([1]阪府大院・生環科，[2]花王・生科研)

3C7a09　*Clostridium beijerinckii* を宿主とした *Clostridium cellulovoransi* 由来 Endoglucanase O の発現
10:38　須江夏希，平松愛子，矢田百絵，○三宅英雄　(三重大院・生資)

3C7a10　ホテイアオイを原料とするバイオエタノール生産における木材腐朽菌による糖化および発酵
10:49　○山中優花，井上瑛絵，堀沢　栄　(高知工科大)

a11〜a14 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3C7a11　アルギン酸を単一炭素源とするポリヒドロキシアルカン酸合成菌の探索
11:10　○森谷大樹[1]，佐藤文吉[2]，佐々木義己[2]，下飯　仁[1]，山田美和[1]　([1]岩手大・院総合科学，[2]三陸バイオ)

3C7a12　講演取消

3C7a13　ルビスコ経路を利用した組換え大腸菌におけるグリコール酸ポリマー生合成系の構築
11:32　永田暁洋[1]，齋藤樹理[1]，横尾俊憲[1]，工藤悠希[1]，堀　千明[1]，大井俊彦[1]，田口精一[2]，○松本謙一郎[1,3]　([1]北大院工，[2]東農大生命科学，[3]ALCA-JST)

3C7a14　*Pseudomonas* sp. 61-3 のポリヒドロキシアルカン酸生合成におけるモノマー供給系酵素遺伝子のクローニングおよび共重合ポリエステル生合成
11:43　○西上明花[1]，森　恵美[1]，橋本真奈[2]，後藤早希[1]，阿部英喜[3]，松崎弘美[1,2]　([1]熊県大院環境共生，[2]熊県大環境共生，[3]理研-CSRS)

C7 会場　午後の部（13:50〜16:55）

微生物ー物質生産 - 醸造，発酵（一次代謝産物）ー

p01〜p05 発表者の接続時間 13:40〜13:50

3C7p01　上面ビール酵母の New Flo 型凝集遺伝子解析
13:50 ○大竹　麟[1]，竹内　駿[1]，中村建介[2]，尾形智夫[1]（[1]前橋工科大生物工，[2]前橋工科大生命情）

3C7p02　国酒酵母の系統学的検討
14:01 ○森谷千星[1]，門倉利守[1]，中山俊一[1]，田中尚人[2]，藤田信之[2]，鈴木健一朗[1]（[1]東農大醸造，[2]東農大微生物）

3C7p03　酵母の染色体異数性が清酒醸造に与える影響
14:12 ○堀田夏紀[1]，小高敦史[1]，松村憲吾[1]，杉山峰崇[2]，笹野　佑[3]，原島　俊[3]，秦　洋二[1]（[1]月桂冠・総研，[2]阪大院・工，[3]崇城大・生物生命）

3C7p04　セルレニン耐性 / 感受性を指標に得られた清酒酵母のゲノムの特徴と醸造特性
14:23 ○小高敦史，堀田夏紀，松村憲吾，秦　洋二（月桂冠・総研）

3C7p05　清酒酵母の減数分裂染色体組換え不全を相補する遺伝子のクローニング
14:34 ○下飯　仁，川村夏希，山田美和（岩手大農）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:55

3C7p06　エタノール耐性清酒酵母きょうかい 11 号で発見されたアデニル酸シクラーゼ遺伝子変異の実験室酵母のストレス耐性に対する効果
14:55 ○石田義大[1]，山田美和[1]，森中和也[2]，赤尾　健[2]，下飯　仁[1]（[1]岩手大，[2]酒総研）

3C7p07　釜石はまゆり酵母の清酒発酵力の強化
15:06 ○齊藤隆行[1]，澤口なつ美[2]，山田美和[1]，下飯　仁[1]（[1]岩手大院・農，[2]釜石市）

3C7p08　清酒酵母型 *ERC1* 遺伝子がアルコール発酵に及ぼす影響
15:17 ○金井宗良[1]，森本朋子[1]，水沼正樹[2]，渡辺大輔[3]，高木博史[3]，赤尾　健[1,2]，藤井　力[1,4]，向井伸彦[1]（[1]酒総研，[2]広島大・先端研，[3]奈良先端大，[4]広島大・生物圏）

3C7p09　焼酎酵母における Rim15p の欠損が麦焼酎醸造に及ぼす影響
15:28 ○渡辺大輔[1]，田代智史[2]，新谷　大[2]，杉本幸子[1]，岩見明彦[2]，梶原康博[2]，高下秀春[2]，高木博史[1]（[1]奈良先端大，[2]三和酒類）

3C7p10　米麹の破精の構造と白色度の関係
15:39 ○谷野有佳[1]，伊藤一成[1]，五味勝也[2]，狩山昌弘[3]，花房裕子[1]，三宅剛史[1]（[1]岡山県工技セ，[2]東北大院農，[3]株式会社フジワラテクノアート）

p11〜p15 発表者の接続時間 15:50〜16:00

3C7p11　試験製麹における麹菌の転写因子 FlbC の発現と酵素生産との関連
16:00 ○伊藤一成[1]，谷野有佳[1]，五味勝也[2]，狩山昌弘[3]，花房裕子[1]，三宅剛史[1]（[1]岡山県工技セ，[2]東北大院農・生物産業創成，[3]株式会社フジワラテクノアート）

3C7p12　麹菌群の比較ゲノム解析
16:11 ○齊藤亮太[1]，織田　健[1]，岩下和裕[1,2]（[1]酒総研，[2]広先端研）

3C7p13　泡盛黒麹菌 *Apergillus luchuensis* の全ゲノム比較による機能遺伝子の解析
16:22 ○塚原正俊[1]，阿部峻之[1]，東　春奈[1]，外山博英[2]，水谷　治[2]，山田　修[3]（[1]バイオジェット，[2]琉球大農，[3]酒総研）

3C7p14　麹菌のクエン酸生産に関与する推定細胞質膜局在輸送体 CitT の機能解析
16:33 ○中村恵理[1]，門岡千尋[2]，奥津果優[1,2]，吉崎由美子[1,2]，髙峯和則[1,2]，後藤正利[1,3]，玉置尚徳[1,2]，二神泰基[1,2]（[1]鹿児島大・農，[2]鹿児島大・連農，[3]佐賀大・農）

3C7p15　白麹菌のクエン酸生産に関与する推定転写因子 NosA と RosA の機能解析
16:44 ○二神泰基[1,2]，門岡千尋[1]，後藤正利[1,3]，玉置尚徳[1,2]（[1]鹿大連農，[2]鹿大農，[3]佐大農）

D1 会場　午前の部（10:05〜12:05）

有機化学，天然物化学ーその他ー

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3D1a06　フロクマリン類の合成および増殖抑制効果に関する研究
10:05 ○新井隆介[1]，川井　悟[1]，常盤野哲生[2]，吉澤結子[2]（[1]東電大理工，[2]秋田県大生資料）

3D1a07　ピラノクマリン類の合成及び増殖抑制活性に関する研究
10:16 ○松浪悠貴[1]，川井　悟[1]，常盤野哲生[2]，吉澤結子[2]（[1]東電大理工，[2]秋田県立大生資料）

3D1a08　ピラノフラボノイドの合成及び増殖抑制活性に関する研究
10:27 ○澤野美紗[1]，川井　悟[1]，常盤野哲生[2]，吉澤結子[2]（[1]東電大理工，[2]秋田県大生資料）

3D1a09　フッ素と水酸基をベンゼン環上に有する四置換テトラヒドロフラン型リグナンの抗カビ活性
10:38 ○神野公哉[1]，西脇　寿[1]，秋山浩一[2]，山内　聡[1]（[1]愛媛大院農，[2]愛媛大総科支セ）

3D1a10　6 位が alkyl 化された *α*-pyrone 化合物の共役二重結合，alkyl 基の構造が植物の発芽，生長に与える影響
10:49 ○越智良太，西脇　寿，山内　聡（愛媛大院農）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3D1a11　2-azahypoxanthine 誘導体の植物成長調節活性に関する化学的研究
11:10 ○崔　宰熏[1,2]，北野浩之[3]，上田彩果[3]，伊藤英人[3]，萩原伸也[3]，徳山真治[1]，平井浩文[1,2]，菅　敏幸[4]，伊丹健一郎[3]，河岸洋和[1,2]（[1]静大院・総合農，[2]静大・グリーン研，[3]名大 WPI-ITbM，[4]静県大・薬）

3D1a12　フェアリー化合物 2-azahypoxanthine の代謝酵素における生化学的研究
11:21 ○稲木　僚[1]，崔　宰熏[1,2]，徳山真治[1]，道羅英夫[2]，平井浩文[1,2]，河岸洋和[1,2,3]（[1]静大農，[2]静大・グリーン研，[3]静大院・創造）

3D1a13　コムラサキシメジ（*Lepista sordida*）における 2-azahypoxanthine の生合成研究
11:32 ○伊藤彰将[1,2]，古田島美颯[3]，崔　宰熏[3,4]，道羅英夫[4]，平井浩文[3,4]，浅川倫宏[5]，大内仁志[6]，稲井　誠[6]，菅　敏幸[6]，河岸洋和[1,4]（[1]静大院・創造，[2]JSPS，[3]静大院・総合農，[4]静大・グリーン研，[5]東海大・創造，[6]静県大・薬）

3D1a14　コムラサキシメジにおけるフェアリー化合物 ICA 及び AOH の生合成研究
11:43 ○古田島美颯[1]，伊藤彰将[2,3]，崔　宰熏[1,4]，道羅英夫[4]，鈴木智大[5]，徳山真治[1]，平井浩文[1,4]，浅川倫宏[6]，大内仁志[7]，稲井　誠[7]，菅　敏幸[7]，河岸洋和[1,2,4]（[1]静大院・総合農，[2]静大院・創造，[3]JSPS，[4]静大・グリーン研，[5]宇都宮大・バイオ，[6]東海大・創造，[7]静県大・薬）

3D1a15　糖結合性天然色素の二量体を用いた真菌の染色
11:54 ○田浦寛太[1]，小鹿　一[1]，五十嵐康弘[2]，伊藤幸成[3]，中川　優[1,3]（[1]名古屋大，[2]富山県大，[3]理研）

D1 会場　午後の部（14:01〜16:55）

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

p02〜p05 発表者の接続時間 13:51〜14:01

3D1p02　白癬菌が産生する抗生物質とその生合成遺伝子の探索
14:01 ○増田圭恭[1]，二宮章洋[1]，矢口貴志[2]，浦山俊一[1]，萩原大祐[1]（[1]筑波大・生命環境，[2]千葉大・真菌センター）

3D1p03　糸状菌間相互作用による二次代謝活性化の機構解明を目指したモデル共培養系の確立
14:12 ○二宮章洋，浦山俊一，萩原大祐（筑波大生命環境）

3D1p04　複合培養における赤色色素生産非応答性変異株の解析
14:23 ○石塚　匠[1]，浅水俊平[1]，柳澤昌臣[1]，佐藤勝也[2]，尾仲宏康[1]（[1]東大院農生科，[2]量研機構）

3D1p05　複合培養により活性化される二次代謝遺伝子プロモーターの制御機構の解析
14:34 ○桐原正隆，浅水俊平，尾仲宏康（東大院・農学生命科学研究科）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:55

3D1p06　複合微生物系によるウロリチンの生産に関する研究（2）〜新規ヒト腸内由来ウロリチン C 生産菌の取得〜
14:55 ○林　素子，石輪俊典，工藤眞丈，中島賢則，山本浩明（ダイセル・コーポレート研）

3D1p07　複合微生物系によるウロリチンの生産に関する研究（3）〜新規ヒト腸内由来ウロリチン A 生産菌の発見〜
15:06 ○中島賢則，石輪俊典，工藤眞丈，林　素子，山本浩明（ダイセル・コーポレート研）

3D1p08　複合微生物系によるウロリチンの生産に関する研究（4）〜腸内細菌共培養によるウロリチン A 発酵生産〜
15:17 ○石輪俊典，中島賢則，林　素子，工藤眞丈，山本浩明（ダイセル・コーポレート研）

3D1p09　自家蛍光シグネチャー評価による新規スクリーニング法：酵母の油脂代謝性をモデルとして
15:28 ○平山智弘[1]，八幡志央美[2]，高部響介[2]，川村優樹[3]，岡野千草[2]，野村暢彦[2]，八幡　穣[2]（[1]筑波大学・生命環境学群，[2]筑波大学・生命環境系，[3]筑波大学大学院・生命環境）

3D1p10　外的刺激を応用した微生物の単離法
15:39 ○井澤賢一[1]，大場愛斗[1]，五味滉樹[1]，佐藤夏響[1]，天貝啓太[1,2]（[1]三田国際学園，[2]理研CSRS）

p11〜p15 発表者の接続時間 15:50〜16:00

3D1p11　複合培養における *Streptomyces* sp. HEK616 による 5aTHQ の生産機構
16:00 ○浅水俊平[1]，尾崎太郎[1,2]，西村慎一[1,3]，掛谷秀昭[3]，尾仲宏康[1]（[1]東大院農生科，[2]北大理，[3]京大薬）

3D1p12　放線菌の形態異常を引き起こす三種複合培養の解析
16:11 ○加藤愛美，浅水俊平，尾仲宏康（東大院農生科）

3D1p13　抗生物質リンコマイシンが放線菌の二次代謝能を高める仕組みの解析
16:22 ○向井慶一郎[1]，石塚美咲[1]，小林桃子[2]，今井　優[3]，保坂　毅[1,2,4]（[1]信州大院総合理工，[2]信州大農，[3]ノースイースタン大，[4]信州大バイオメディカル研）

3D1p14　放線菌の二次代謝に対する抗生物質タイロシンのユニークな濃度依存的活性化作用
16:33 ○小林桃子[1]，向井慶一郎[2]，石塚美咲[2]，今井　優[3]，保坂　毅[1,2,4]（[1]信州大学・農，[2]信州大院・総合理工，[3]ノースイースタン大，[4]信州大バイオメディカル研）

3D1p15　放線菌から取得したオフロキサシン耐性変異株の特性解析
16:44 ○星野　颯[1]，谷津穂高[2]，保坂　毅[1,2,3]（[1]信州大院総合理工，[2]信州大農，[3]信州大バイオメディカル研）

D2 会場　午前の部（10:05〜12:05）

有機化学，天然物化学―天然物 - 生合成，代謝―

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3D2a06　渦鞭毛藻におけるサキシトキシン生合成の 15N 同位体標識硝酸ナトリウムを用いたメタボロミクス解析
10:05 ○長由扶子[1]，土屋成輝[1]，大村卓朗[2]，小池一彦[3]，及川　寛[4]，此木敬一[1]，大島泰克[5]，山下まり[1]（[1]東北大・院農，[2]水圏科学，[3]広島大・院生物圏，[4]中央水研，[5]東北大・院生命）

3D2a07　タンパク質膜挿入に関与する糖脂質酵素 MPIase の生合成中間体の生成機構
10:16 ○亀本有生[1]，川上真由[2]，船場菜々香[2]，藤川紘樹[3]，島本啓子[3]，西山賢一[1,2]（[1]岩手大大学院　総合科学研究科　農学専攻，[2]岩手大　農学部，[3]サントリー生命科学財団　生物有機科学研究所）

3D2a08　大腸がんリスク因子物質コリバクチン関連化合物の特定
10:27 ○平山裕一郎，玉舟亮太，恒松雄太，渡辺賢二（静岡県大薬）

3D2a09　Aspirochlorine 生合成経路におけるスピロ環形成を担う新規酵素の発見と機能解析
10:38 ○前田直哉[1]，恒松雄太[1]，Christian Hertweck[2]，渡辺賢二[1]（[1]静岡県大薬，[2]Leibniz Institute（HKI））

3D2a10　放線菌由来 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid 合成酵素の同定および酵素学的諸性質
10:49 ○茅根千湖[1]，橋本絢子[2]，小曽根郁子[2]，新家一男[3]，濱野吉十[1]，丸山千登勢[1]（[1]福井県大院・生物資源，[2]JBIC，[3]産総研）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3D2a11　Saprolmycin の生合成に関わる糖転移酵素遺伝子 *sprGT* の機能解析
11:10 ○川崎　崇[1,3]，佐藤美怜[2]，今村信孝[2]，矢崎一史[1]（[1]京大・生存研，[2]立命館大・薬，[3]立命館大・総研）

3D2a12　ロンゲスチン生合成における特異なメチル基導入機構の解明
11:21 ○尾崎太郎[1]，シンデサンディップ[1]，高　　磊[1]，奥泉　諒[1]，劉　成偉[1]，小笠原泰志[2]，大利　徹[2]，南　篤志[1]，及川英秋[1]（[1]北大院理，[2]北大院工）

3D2a13　植物ホルモン Abscisic Acid の生合成における新規環化酵素の機能解析-1-
11:32 ○瀧野純矢，小崎拓登，佐藤芳郎，劉　成偉，尾崎太郎，南　篤志，及川英秋（北大院理）

3D2a14　ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 を用いた糸状菌天然物の異種生産（2）
11:43 ○曽ケ端花帆[1]，尾崎太郎[1]，劉　成偉[1]，丸山潤一[2]，南　篤志[1]，及川英秋[1]（[1]北大院理，[2]東大院農）

3D2a15　抗 HIV 天然物ダウリクロメン酸生産系の開発に向けた基礎研究
11:54 ○飯島未宇，黒崎文也，田浦太志（富山大院薬）

D2 会場　午後の部（13:50〜16:44）

有機化学，天然物化学―天然物 - 生合成，代謝―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:40〜13:50

3D2p01　*Trichoderma* sp. USF-2690 株が産生する sorbicillinoid 類の生合成研究
13:50 ○國方真希[1]，寺島健仁[2]，豊田彩美[3]，菅谷紘一[3]，小野瀬淳一[3]，阿部尚樹[1,2,3]（[1]東農大院・健康，[2]東農大院・食品栄養，[3]東農大・応生・健康）

3D2p02　糸状菌 *Pleosporales* sp. RKB3564 の生産する pyrrolizilactone 生合成経路の解析
14:01　廣澤早香[1,3]，○加藤直樹[2]，野川俊彦[1]，衣笠清美[2]，高橋俊二[2]，長田裕之[1,3]　([1]理研CSRS・ケミカルバイオロジー，[2]理研CSRS・天然物生合成，[3]埼玉大院・理工)

3D2p03　共生型子嚢菌 *Pyrenula* sp. 由来 pyrenulic acid 類の生合成研究
14:12　○佐藤道大[1]，籠浦倫美[1]，恒松雄太[1]，竹仲由希子[2]，棚橋孝雄[2]，渡辺賢二[1]　([1]静岡県大薬，[2]神戸薬大)

3D2p04　レギュレーター遺伝子改変法による *Coprinopsis* 属担子菌の新規天然物生合成経路活性化
14:23　○高西　潤[1]，桝谷貴洋[1]，中沢威人[2]，恒松雄太[1]，佐藤道大[1]，渡辺賢二[1]　([1]静岡県大薬，[2]京大院農)

3D2p05　複雑な酸化経路を含むキノコ由来 lagopodin 類の生合成研究
14:34　桝谷貴洋[1]，平山裕一郎[1]，高西　潤[1]，恒松雄太[1]，佐藤道大[1]，大高潤之介[2]，本山高幸[2]，長田裕之[2]，○渡辺賢二[1]　([1]静岡県大薬，[2]理研CSRS)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:55

3D2p06　糸状菌が生産する酸無水物多量体の生合成に関する研究
14:55　○椎名哲也，長嶺翔太，松　優佑，尾崎太郎，劉　成偉，南　篤志，及川英秋　(北大院理)

3D2p07　糸状菌アントラキノン系ポリケタイドの生合成に関わる酵素遺伝子の機能解析-2-
15:06　○深谷充功[1]，南　篤志[1]，尾崎太郎[1]，劉　成偉[1]，丸山潤一[2]，及川英秋[1]　([1]北大院理，[2]東大院農)

3D2p08　Diels-Alder 反応を触媒する酵素 CghA の基質合成および反応解析
15:17　○成田一仁，岸本真治，横山　葵，恒松雄太，佐藤道大，渡辺賢二　(静岡県大薬)

3D2p09　糸状菌由来酵素 CghA による立体選択的な Diels-Alder 反応の機構解明
15:28　○岸本真治，横山　葵，佐藤道大，前田直哉，恒松雄太，原　幸大，橋本　博，渡辺賢二　(静岡県大薬)

3D2p10　免疫抑制活性物質 FR901483 の生合成研究
15:39　○田村優依[1]，佐藤道大[1]，谷口昌要[2]，笹村智司[2]，永井浩二[2]，渡辺賢二[1]　([1]静岡県大薬，[2]大鵬薬品工業)

p11〜p14 発表者の接続時間 15:50〜16:00

3D2p11　キノコ由来テルペン系天然物の汎用的な生産法の開発-1-
16:00　○劉　成偉[1]，佐藤芳郎[1]，尾崎太郎[1]，呉　　静[2]，丸山潤一[3]，南　篤志[1]，河岸洋和[2]，及川英秋[1]　([1]北大院理，[2]静岡大・農，[3]東大院・農生科・応生工)

3D2p12　キノコ由来テルペン系天然物の汎用的な生産法の開発-2-
16:11　○西下純平[1]，長嶺翔太[1]，小崎拓登[1]，劉　成偉[1]，尾崎太郎[1]，丸山潤一[2]，南　篤志[1]，及川英秋[1]　([1]北大院理，[2]東大院農)

3D2p13　キノコ由来テルペン系天然物の汎用的な生産法の開発-3-
16:22　○長嶺翔太[1]，西下純平[2]，劉　成偉[1]，尾崎太郎[1]，丸山潤一[3]，南　篤志[1]，及川英秋[1]　([1]北大院理，[2]北大理，[3]東大院農)

3D2p14　アーキアに広く保存される「省エネ型」新奇メバロン酸経路を用いた大腸菌でのリコペン生産強化
16:33　○吉田　稜，吉村　徹，邊見　久　(名大院生命農)

D3 会場　午前の部(9:22〜12:05)

有機化学，天然物化学
—天然物 - ケミカルバイオロジー，作用機構—

a03〜a05 発表者の接続時間 9:12〜9:22

3D3a03　抗真菌活性向上を目的とした Bk-1097 類似体の合成
9:22　○佐々木美緒，加藤誠弥，千田　綜，矢野成和，今野博行　(山形大学)

3D3a04　ハロベンジル置換基をもつ新規ホスホン酸エステル類のピレスリン生合成阻害活性
9:33　○髙松元紀[1]，小椋明生[1]，伊原　誠[1]，松尾憲忠[2]，松田一彦[1]　([1]近畿大農，[2]関西学院大理工)

3D3a05　線虫ニコチン性アセチルコリン受容体のタイプ分類に関与する構造因子
9:44　○二木邦浩，重藤　渉，嶋田翔太，野口　晃，伊原　誠，松田一彦　(近大院・農・応生化)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3D3a06　コムネシン類と標的受容体の構造活性相関
10:05　○野口　晃[1]，村田和也[1]，伊原　誠[1]，甲斐建次[2]，林　英雄[2]，松田一彦[1]　([1]近畿大農，[2]阪府大農・生環科)

3D3a07　ネオニコチノイドの選択毒性発現における Loop C の役割
10:16　○嶋田翔太，疋田麻衣，重藤　渉，松本祥太郎，谷河　純，伊原　誠，松田一彦　(近大院・農・応生科)

3D3a08　合成キノン類を用いた呼吸鎖複合体-I のキノン結合ポケットの構造特性の解明
10:27　○宇野晋平，村井正俊，三芳秀人　(京大院農・応用生命)

3D3a09　ミトコンドリア呼吸鎖複合体-I におけるアミロライド類の結合部位の同定
10:38　○木村洋則，村井正俊，三芳秀人　(京大院農・応用生命)

3D3a10　ミトコンドリア呼吸鎖複合体-I からの活性酸素発生を抑制する化合物群（S1QEL 類）の作用機 構研究
10:49　○馬場敦志，辻　諄人，木村洋則，村井正俊，三芳秀人　(京大院農・応用生命)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3D3a11　ペンテンジオール類は出芽酵母ミトコンドリア VDAC1 を特異的に阻害する
11:10　○運天優歩[1]，村井正俊[1]，一丸直哉[1]，山本武範[2]，篠原康雄[2]，三芳秀人[1]　([1]京大院農・応用生命，[2]徳島大・先端酵素学研究所)

3D3a12　エポキシシクロヘキセンジオン類によるミトコンドリア ADP/ATP 輸送体の凝集メカニズムの 解明
11:21　○青山綾希，村井正俊，三芳秀人　(京大院・農・応用生命)

3D3a13　*N*-結合型糖鎖修飾における糖鎖調整能の解明に向けた新規ゴルジ β-ガラクトシダーゼ阻害剤の探索
11:32　○小野寺千尋，袴田　航，平野貴子，西尾俊幸　(日大院生資科)

3D3a14　光親和性標識法による抗ウイルス活性を有する小胞体グルコシダーゼ II 阻害剤の作用ユニットの同定
11:43　○竹本佑平[1]，恩田桃子[2]，袴田　航[1,2]，平野貴子[1,2]，西尾俊幸[1,2]　([1]日大生資科・生命化，[2]日大院生資科)

3D3a15　がん幹細胞の抑制を可能とするゴルジ体マンノシダーゼ阻害剤の開発
11:54　○加納結衣[1]，小山亮祐[2]，菊島香織[1]，袴田　航[1,2]，平野貴子[1,2]，西尾俊幸[1,2]　([1]日大生資科・生命化，[2]日大院生資科)

D3 会場　午後の部（14:01〜16:44）

有機化学，天然物化学
—天然物 - ケミカルバイオロジー，作用機構—

p02〜p05 発表者の接続時間 13:51〜14:01

3D3p02　機能性高分子の ε-poly-L-lysine 修飾による細胞内送達法の確立
14:01 ○武内大和[1]，牛丸和乗[1]，加藤康夫[2]，丸山千登勢[1]，濱野吉十[1]（[1]福井県大院・生物資源，[2]富山県大・生工研セ）

3D3p03　ユビキチンリガーゼ Rsp5 遺伝子変異酵母株を用いた塩ストレスに対する生育回復活性物質のスクリーニング
14:12 ○松浦秀太郎[1]，栗澤尚瑛[2]，西谷直之[3]，高木博史[4]，木村賢一[1,2]（[1]岩手大・農，[2]岩手大院・総合科学，[3]岩手医大薬・情報薬科学，[4]奈良先端大・バイオサイエンス）

3D3p04　遺伝子変異酵母株の生育回復活性を用いたスペイン産とドイツ産琥珀に含まれる生物活性物質の単離精製と同定
14:23 ○井上奈々[1]，下田　希[1]，越野広雪[2]，Menor-Salvan Cesar[3]，木村賢一[1]（[1]岩手大院・総合科学，[2]理研 CSRS，[3]University of Alcala）

3D3p05　重力屈性阻害作用を示すシス桂皮酸誘導体プローブの合成
14:34 ○古澤佑貴[1]，岩田隆幸[2]，新藤　充[2]（[1]九大総理工，[2]九大先導研）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:55

3D3p06　プラディミシン A との複合体形成におけるマンノースの環内酸素原子の寄与
14:55 ○渡邉泰典[1]，小鹿　一[1]，菅原貴弘[2]，相田美砂子[2]，五十嵐康弘[3]，伊藤幸成[4]，中川　優[1,4]（[1]名大院・生命農，[2]広大院・理，[3]富山県大・生工，[4]理研）

3D3p07　Cherimolacyclopeptide E の全合成と生物活性評価
15:06 ○吉田優香，増田裕一（三重大生物資源）

3D3p08　シフォナキサンチン代謝産物の抗炎症作用の評価と作用メカニズムの解明
15:17 ○真鍋祐樹，新多智明，菅原達也（京大院農）

3D3p09　細胞毒性とチオール捕捉能を有する Quinocidin の構造活性相関研究
15:28 ○中川　優，澤木裕紀，小鹿　一（名大院・生命農）

3D3p10　デヒドロセレンテラジン（DCL）および DCL 誘導体の化学合成
15:39 ○森口舞子[1]，滝川浩郷[2]，久世雅樹[1]（[1]神戸大院農，[2]東京大院農生科）

p11〜p14 発表者の接続時間 15:50〜16:00

3D3p11　アミロイド β の凝集を阻害する β-ストランド配座固定ペプチドの設計と合成：ベンゼン環と配座固定の位置の検討
16:00 ○田中郁也，柴田果奈，増田裕一（三重大院生物資源）

3D3p12　アミロイド β の毒性オリゴマー形成阻害能を有する生薬化合物のカルボキシ基の役割
16:11 ○堀井詩織[1]，村上一馬[1]，花木瑞穂[1]，栗野達也[2]，高部圭司[2]，川瀬泰司[3]，廣瀬賢治[3]，入江一浩[1]（[1]京都大学農学研究科食品生物科学，[2]京都大学農学研究科森林科学，[3]日本ウォーターズ）

3D3p13　アミロイドβ42の毒性オリゴマーに対する核酸アプタマーの開発研究と脳組織染色への応用
16:22 ○村上一馬[1]，小畑弥生[1]，関川あさ[1]，上田　遥[1]，泉尾直孝[2]，栗野達也[1]，高部圭司[1]，清水孝彦[2]，入江一浩[1]（[1]京大農，[2]千葉大医）

3D3p14　分子内ジスルフィド結合形成によるアミロイド β42 の毒性配座モデルの合成と機能解析
16:33 ○松島由佳[1]，村上一馬[1]，花木瑞穂[1]，栗野達也[1]，高部圭司[1]，柳田　亮[2]，入江一浩[1]（[1]京大院農，[2]香川大農）

D4 会場　午前の部（9:00〜12:05）

有機化学，天然物化学—合成，反応機構—

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3D4a01　D-体と L-体の糖を構成成分とするシクロデキストリン類縁体の合成研究
9:00 ○後藤楠太[1]，河原直子[2]，井上裕香[2]，勝田　亮[3]，矢島　新[3]，石神　健[3]，額田恭郎[3]（[1]東農大院・農，[2]東農大・応生，[3]東農大・生命）

3D4a02　ゴニオドミン A の DE 環部の合成
9:11 ○斉藤竜男[1]，Zakarian Armen[2]（[1]東農大生命，[2]UCサンタバーバラ）

3D4a03　(*Z*)-2β-Hydroxy-14-hydro-β-santalol の両鏡像体の合成と絶対立体配置の決定
9:22 ○門脇和生[1]，山田慎也[1]，會場翔平[2]，川崎常臣[2]，勝田　亮[3]，矢島　新[3]，額田恭郎[3]，滝川浩郷[1]，渡邉秀典[1]，石神　健[3]（[1]東大院農，[2]東理大理，[3]東農大・生命）

3D4a04　アンフィジノリド L の合成研究
9:33 ○小泉　潤，深谷圭介，占部大介（富山県大工）

3D4a05　17-ヒドロペルオキシドコサヘキサエン酸の合成研究
9:44 ○岩井柚樹，深谷圭介，占部大介（富山県大）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3D4a06　Oscillatoxin D の合成と生物活性評価
10:05 ○花木祐輔[1]，新木悠介[1]，野倉吉彦[1]，中崎敦夫[1]，北　将樹[1]，早川皓太郎[2]，入江一浩[2]，西川俊夫[1]（[1]名大院生命農，[2]京大院農）

3D4a07　RCAI-56 の α-カルバガラクトース部分の新規合成法
10:16 ○牛田直輝[1]，永井伸和[1]，石井保之[2]，西川俊夫[1]（[1]名大院生命農，[2](株)レグイミューン）

3D4a08　クランベシン B 単純化アナログの合成研究
10:27 ○毛利春輔[1]，山下まり[2]，中崎敦夫[1]，西川俊夫[1]（[1]名大院生命農，[2]東北大院農）

3D4a09　リゾホスファチジルグルコシドの合成
10:38 ○狩野航輝[1]，大山純平[1]，齋藤祥吾[2]，グレイメルピーター[3]，松尾一郎[1,2]（[1]群馬大院・理工，[2]群馬大・理工，[3]理化学研究所）

3D4a10　エーテル型リン脂質プラズマローゲン類の合成
10:49 ○安部真人，田中遼太郎（愛大農）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3D4a11　Amorfrutin 類の合成研究
11:10 ○藤田忠文，桑原重文，小倉由資（東北大院農）

3D4a12　立体化学決定を目的とした glyphaeaside C の全合成研究
11:21 ○阿部泰之，桑原重文，小倉由資（東北大農）

3D4a13　NFAT-133 の全合成と立体化学の訂正
11:32 ○佐藤　光[1]，權　垠相[3]，田口優佳[2]，吉田慎一郎[3]，桑原重文[1]，小倉由資[1]（[1]東北大院農，[2]東北大農，[3]東北大理）

3D4a14　パラジウム触媒による環化反応を用いた(+)-muconin の合成研究
11:43 ○納所早弥華，彦坂　源，真壁秀文（信大総合理工学院農）

3D4a15　酸性条件によるメタルフリーピリジン合成と Anibamine の全合成
11:54 ○三原大宙，宮腰　建，今野博行（山形大院理工）

D4 会場　午後の部（15:06〜16:55）

有機化学，天然物化学―医薬／農薬―

p07〜p10 発表者の接続時間 14:56〜15:06

3D4p07　急性 T リンパ芽球性白血病細胞の増殖を特異的に抑制する化合物の開発
15:06 ○吉田千紘[1]，鉢呂佳史[1]，東　智也[1]，八木拓哉[2,3]，中田千尋[2,4]，武智あづさ[2,5]，原　孝彦[2,3,5]，牧昌次郎[1,6]（[1]電通大院・情報理工学，[2]都医学研・幹細胞，[3]東京医歯大院・医歯学総合，[4]中央大学理工学部生命科学科，[5]首都大院・幹細胞制御学，[6]電通大・脳医工学研究センター）

3D4p08　急性 T リンパ芽球性白血病細胞の増殖を抑制する化合物の活性に必須な化学構造の発見
15:17 ○東　智也[1,2]，鉢呂佳史[1,2]，吉田千紘[1,2]，八木拓哉[3,4]，中田千尋[5]，武智あづさ[3,6]，原　孝彦[3,4,6]，牧昌次郎[1,2]（[1]電通大院・情報理工学，[2]電通大・脳医工学研究センター，[3]都医学研・幹細胞，[4]東京医歯大院・医歯学総合，[5]中央大・理工学，[6]首都大院・幹細胞制御学）

3D4p09　インド産マンゴージンジャー（*Curcuma amada* Roxb.）根茎由来ジテルペンと誘導体の α-グルコシダーゼとリパーゼに対する阻害活性
15:28 ○吉村奈緒里[1]，吉岡百合[2]，松村晋一[2]，森本正則[1]（[1]近畿大農，[2]稲畑香料）

3D4p10　アミロイド β を創薬標的としたシリビニン誘導体の開発
15:39 ○水野美麗，土屋圭輔，森　一憲，柴沼質子，福原　潔（昭和大薬）

p11〜p15 発表者の接続時間 15:50〜16:00

3D4p11　プラディミシン A のアミド誘導体の合成と活性評価
16:00 ○宮西　航[1]，小鹿　一[1]，五十嵐康弘[2]，伊藤幸成[3]，中川　優[1,3]（[1]名大院・生命農，[2]富山県大・生工，[3]理研）

3D4p12　ネコブセンチュウの誘引機構の解明とその応用
16:11 ○井田和輝[1]，吉田翔太郎[1]，西川博崇[1]，開出智美[1]，伊藤晋作[2]，石毛太一郎[3]，岩堀英晶[4]，近藤竜彦[1]，小鹿　一[1]（[1]名大院・生命農，[2]東農大・応用科・バイオ，[3]東農大・ゲノムセンター，[4]龍谷大学・農）

3D4p13　質量顕微鏡による *Solanum lycopersicum* におけるネオニコチノイド系農薬の移行の解析
16:22 ○生田宗一郎[1]，岡澤敦司[2]，西脇　寿[3]，福崎英一郎[1]，新間秀一[1]（[1]阪大院・工，[2]阪府大院・生命環境，[3]愛媛大院・農）

3D4p14　ヤーコン葉部腺毛由来セスキテルペンラクトン類の昆虫摂食阻害発現に必要な化学構造因子
16:33 ○綱木海成，森本正則，松田一彦（近畿大農）

3D4p15　環状ペプチド薬の結晶構造と溶液構造を用いた差の可視化
16:44 ○松本　崇，山野昭人（株式会社リガク）

D5 会場　午前の部（9:11〜12:05）

有機化学，天然物化学
―天然物 - 単離構造決定 - 微生物―

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

3D5a02　カイニン酸新規類縁体の探索及び生合成経路の推定
9:11 ○前野優香理[1]，寺田竜太[2]，小瀧裕一[3]，長由扶子[1]，此木敬一[1]，山下まり[1]（[1]東北大院農，[2]鹿児島大院連合農，[3]福島学院大）

3D5a03　東日本で養殖したホタテガイ中の LC-MS/MS による麻痺性貝毒分析
9:22 ○沼野　聡，工藤雄大，長由扶子，此木敬一，山下まり（東北大院農）

3D5a04　Bioorganic chemical studies on the fruiting bodies of *Pleurocybella porrigens*
9:33 ○Arif Yanuaru RIDWAN[1]，Jing WU[2]，Etsuko HARADA[3]，Esteban C GABAZZA[4]，Jae-Hoon CHOI[2]，Hirofumi HIRAI[1,2]，Hirokazu KAWAGISHI[1,2]（[1]Grad. Sch. of Sci. and Technol., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ., [3]Iwade Research Institute of Mycology, [4]Grad. Sch. of Med., Mie Univ）

3D5a05　Elucidation of Absolute Configuration and Structure Activity Relationship of a Novel Bioactive Compound from *Leucopaxillus giganteus*
9:44 ○Irine Yunhafita Malya[1]，Jing Wu[2]，Etsuko Harada[3]，Esteban C Gabazza[4]，Jae-Hoon Choi[2]，Hirofumi Hirai[2]，Hirokazu Kawagishi[1,2]（[1]Grad. Sch. of Sci. and Technol., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ., [3]Iwade Research Institute of Mycology, [4]Grad. Sch. of Med., Mie Univ.）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3D5a06　ニンギョウタケ（*Albatrellus confluens*）子実体由来の生物活性物質の探索
10:05 ○日比琢斗[1]，石岡達郎[2]，呉　　静[1]，崔　宰熏[1,2,3]，平井浩文[1,2,3]，河岸洋和[1,2,3,4]（[1]静大農，[2]静大院・総合農，[3]静大・グリーン研，[4]静大院・創造）

3D5a07　キナメツムタケ子実体由来の生体機能性物質の探索
10:16 ○高橋真奈美[1]，呉　　静[2]，崔　宰熏[1,2,3]，平井浩文[1,2,3]，河岸洋和[1,2,3,4]（[1]静大院・総合農，[2]静大農，[3]静大・グリーン研，[4]静大院・創造）

3D5a08　黒穂菌由来の植物成長調節物質に関する化学的研究
10:27 ○森本悠介[1]，呉　　静[1]，崔　宰熏[1,2,3]，徳山真治[1,2]，平井浩文[1,2,3]，河岸洋和[1,2,3,4]（[1]静大・農，[2]静大院・総合農，[3]静大・グリーン研，[4]静大院・創造）

3D5a09　陸上由来のテトロドトキシン新規類縁体，生合成関連化合物の構造と生理活性
10:38 ○工藤雄大，山下まり（東北大院農）

3D5a10　テトロドトキシン推定生合成中間体のテトロドトキシン含有生物への投与
10:49 ○杉本敬太[1]，工藤雄大[1]，宮坂忠親[2]，安立昌篤[2]，長由扶子[1]，此木敬一[2]，千葉親文[3]，西川俊夫[2]，山下まり[1]（[1]東北大院農，[2]名大院生命農，[3]筑波大生命環境系）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3D5a11　ヤマブシタケ（*Hericium erinaceus*）の生活環各段階における生物活性物質の網羅的探索
11:10 ○呉　　静[1]，石岡達朗[2]，崔　宰熏[1,2,3]，平井浩文[1,2,3]，河岸洋和[1,2,3,4]（[1]静大・農，[2]静大院・総合農，[3]静大・グリーン研，[4]静大院・創造）

3D5a12　サンゴハリタケ（*Hericium coralloides*）由来の生体機能性物質の探索
11:21 ○清宗　大[1]，呉　　静[1]，崔　宰熏[1,2,3]，徳山真治[1,2]，平井浩文[1,2,3]，河岸洋和[1,2,3,4]（[1]静大農，[2]静大院・総合農，[3]静大・グリーン研，[4]静大院・創造）

3D5a13　*Pochonia suchlasporia* の固体培養により生産される糸状菌胞子発芽阻害物質
11:32 ○片岡智範，神崎　浩，仁戸田照彦（岡山大院・環境生命）

3D5a14　LC/Q-TOF MS によるパリトキシン類縁体オストレオシン類の構造研究－ Pseudo-MS3 法の妥当性検証とオストレオシン-E1 構造解析への適用―
11:43 ○寺島健仁[1]，内田秀明[2]，阿部尚樹[1,3]，安元　健[4]（[1]東農大院・食品栄養，[2]アジレント・テクノロジー，[3]東農大・応生，[4]日本食品分析センター）

3D5a15　蓄積された青枯病菌ゲノム情報を活用した新規リポペプチドの探索と単離・構造決定
11:54 ○小松頌子，甲斐建次（阪府院・生命環境）

D5 会場　午後の部（13:50〜16:55）

有機化学，天然物化学―その他―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:40〜13:50

3D5p01　ジベンゾイルメタン類の合成及び HL-60 に対する増殖抑制活性に関する研究
13:50 ○小林玲斗[1]，川井　悟[1]，常盤野哲生[2]，吉澤結子[2]（[1]東電大理工，[2]秋田県大生資料）

3D5p02　ベンゾフェノン類の合成及び増殖抑制活性に関する研究
14:01 ○柳祐太朗[1]，川井　悟[1]，常磐野哲生[2]，吉澤結子[2]（[1]東電大，[2]秋田県立大資料）

3D5p03　アクリドン類の合成および増殖抑制効果に関する研究
14:12 ○坂中宏充[1]，川井　悟[1]，常盤野哲生[2]，吉澤結子[2]（[1]東電大理工，[2]秋田県大生資料）

3D5p04　アピオスイソフラボン誘導体の化学合成とそれらのチロシナーゼ阻害活性
14:23 ○馬酔木奈々，二瓶賢一（宇都宮農）

3D5p05　レゾルシノールアルキルグルコシドおよびヒドロキシアルキルレゾルシノール，それらの強力なチロシナーゼ阻害活性
14:34 ○石岡和佳奈，二瓶賢一（宇都宮農）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:55

3D5p06　2-Methyl-2-butene contributes to generate (*Z*) olefin in dihydrogenation of alkynes to alkenes using Lindlar's catalyst
14:55 ○Vera Fitriya ERSALENA，Kanji MIYAWAKI，Kosaku TAKAHASHI，Hideyuki MATSUURA（Hokkaido University）

3D5p07　水溶性の色素（クロロフィル，カロテノイド）結合タンパク質を HPLC に直接導入する色素分析方法の検討
15:06 ○高市真一[1]，大越　慧[2]，大友征宇[2]，三角将洋[3]，園池公毅[3]，原田二朗[4]（[1]東京農大分子微生物，[2]茨城大理，[3]早稲田大教育，[4]久留米大医化学）

3D5p08　重水素化標識ブラシノステロイドの合成研究
15:17 ○関亦克彦（理研CSRS創薬化学基盤ユニット）

3D5p09　インドネシア産ハリナシバチ由来のプロポリスの化学的研究
15:28 ○宮田　椋[1]，Muhamad Sahlan[3]，石川吉伸[2]，橋本　博[2]，本田沙理[1]，熊澤茂則[1]（[1]静岡県大食品栄養，[2]静岡県大薬，[3]インドネシア大学）

3D5p10　昆虫吐出し液がイネのイソペンチルアミン蓄積に与える影響
15:39 ○飯塚千晶[1]，寺石政義[2]，森　直樹[2]，村山哲也[1]，網干貴子[1]（[1]山形大農，[2]京大院農）

p11〜p15 発表者の接続時間 15:50〜16:00

3D5p11　イネ由来 adenine phosphoribosyltransferase の機能に関する生化学的研究
16:00 ○竹村太秀[1]，崔　宰熏[1,2]，大西利幸[1,2]，徳山真治[1]，平井浩文[1,2]，大内仁志[3]，稲井　誠[3]，浅川倫宏[4]，菅　敏幸[3]，河岸洋和[1,2,5]（[1]静大院農，[2]静大グリーン研，[3]静岡県大薬，[4]東海大創造，[5]静大院創造）

3D5p12　イネにおけるフェアリー化合物の配糖化に関与する糖転移酵素に関する化学的研究
16:11 ○渥美有矢[1]，近藤遼一[2]，崔　宰熏[1,2,3]，徳山真治[1,2]，平井浩文[1,2,3]，浅川倫宏[4]，大内仁志[5]，稲井　誠[5]，菅　敏幸[5]，河岸洋和[1,2,3,6]（[1]静大農・応生化，[2]静岡大院・総合農，[3]静岡大・グリーン研，[4]東海大・創造，[5]静岡県大・薬，[6]静岡大院・創造）

3D5p13　イネにおけるフェアリー化合物の代謝に関する化学的研究
16:22 ○與五澤薫[1]，崔　宰熏[1,2]，平井浩文[1,2]，大内仁志[3]，稲井　誠[3]，浅川倫宏[4]，菅　敏幸[3]，河岸洋和[1,2,5]（[1]静大院・総合農，[2]静大・グリーン研，[3]静岡県大・薬，[4]東海大・創造，[5]静大院・創造）

3D5p14　構造訂正に向けての天然ビベンジル配糖体の化学合成
16:33 ○関下帆乃香[1]，李　佳薇[1]，越野広雪[2]，二瓶賢一[1]（[1]宇都宮農，[2]理研CSRS）

3D5p15　アラビドピロン類の化学合成研究
16:44 ○松本拓也[1]，張間紗希[1]，クリントチャップル[2]，二瓶賢一[1]（[1]宇都宮大農，[2]パデュー大）

D7 会場　午前の部（9:00〜12:05）

微生物―物質生産 - 微生物変換、微生物酵素反応―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3D7a01　ポリエステル重合酵素を用いたオリゴマーの分泌生産
9:00 ○宮原佑宜[1,2]，廣江綾香[1,2]，柘植丈治[2,3]，田口精一[1]（[1]東農大，[2]JST-MIRAI，[3]東工大）

3D7a02　ジオール末端基を有するポリヒドロキシアルカン酸オリゴマーの分泌生産
9:11 ○廣江綾香[1,2]，宮原佑宜[1,2]，柘植丈治[2,3]，田口精一[1]（[1]東農大，[2]JST-MIRAI，[3]東工大院）

3D7a03　ジオール末端を有するポリエステルオリゴマーの分泌生産および構造解析
9:22 ○水野匠詞[1,2]，櫻井徹生[1,2]，廣江綾香[2,3]，田口精一[3]，柘植丈治[1,2]（[1]東工大，[2]JST-MIRAI，[3]東京農大）

3D7a04　微生物産生ポリエステルオリゴマーを用いたウレタン材料の合成
9:33 ○櫻井徹生[1,2]，水野匠詞[1,2]，廣江綾香[2,3]，田口精一[3]，柘植丈治[1,2]（[1]東工大，[2]JST-MIRAI，[3]東京農大）

3D7a05　リパーゼによる水酸化脂肪酸重合体の生産
9:44 ○藤川真理子[1]，岸野重信[1]，外山大地[1]，米島靖記[2]，小川　順[1]（[1]京大院農応用生命，[2]日東薬品工業(株)）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3D7a06　Screening and functional analysis of a medium-chain fatty alcohol oxidative enzyme for microbial production of alkanes
10:05 Shigenobu Kishino[1]，Satoshi Maruyama[1]，○Daniel Makoto Takeuchi[1]，Masakazu Ito[2]，Masayoshi Muramatsu[2]，Shusei Obata[2]，Jun Ogawa[1]（[1]Kyoto University Graduate School of Agriculture，[2]Toyota Motor Corporation）

3D7a07　新規脂肪族アルコール脱水素酵素のバイオアルカン生産への応用
10:16 ○丸山悟史[1]，岸野重信[1]，伊藤正和[2]，村松正善[2]，小畑充生[2]，小川　順[1]（[1]京大院農・応用生命，[2]トヨタ自動車）

3D7a08　固定化糸状菌胞子を用いた非水系微生物還元
10:27 ○小田　忍，林　優佑（金沢工大ゲノム研）

3D7a09　人工細胞系によって醗酵生産のような効率的な低分子合成は可能か？
10:38 ○藤原　慶（慶應義塾大学）

3D7a10　フラボノイド誘導体の酵素合成と抗菌性評価
10:49 ○飯田聡史，服部裕美，中村　涼，中澤昌美，上田光宏，阪本龍司（大阪府大院・生命環境）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3D7a11　多様なリグニン組成に対応できる *Pseudomonas* sp. NGC7 株を利用したムコン酸生産（I）：新規単離微生物株を用いたムコン酸生産株の作出
11:10 ○阿部七瀬[1]，篠田英里[1]，高橋健司[1]，杉田晴佳[2]，上村直史[1]，園木和典[2]，政井英司[1]（[1]長岡技科大・生物，[2]弘前大・農生）

3D7a12　多様なリグニン組成に対応できる *Pseudomonas* sp. NGC7 株を利用したムコン酸生産（II）：針葉樹リグニンからの生産
11:21 ○阿久津美歩[1]，杉田晴佳[1]，高橋健司[2]，上村直史[2]，政井英司[2]，園木和典[1]（[1]弘前大院・農学生命，[2]長岡技大院・工・生物）

3D7a13　EPA 酸化能を有する微生物の探索と反応条件の最適化
11:32 ○野村優太，斎藤一輝，岸野重信，小川　順（京大院農・応用生命）

3D7a14　*N*-アセチルグルコサミン含有ホモ及びヘテロオリゴ糖の酵合成
11:43 ○白井沙也加，平野貴子，袴田　航，西尾俊幸（日大生資科・生命化）

3D7a15　Cyclic GMP-AMP 量産化技術の確立
11:54 ○吉田　晃，石毛和也（ヤマサ醤油・医薬化成品）

D7 会場　午後の部（13:50〜16:55）

微生物―物質生産 - 微生物変換, 微生物酵素反応／物質生産 - 酵素, タンパク質―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:40〜13:50

3D7p01　細菌型 α-1,3-グルカナーゼを用いたニゲロオリゴ糖生産
13:50 ○矢野成和[1]，玉木友理[1]，小黒夏樹[1]，今野博行[1]，若山　守[2]（[1]山形大院理工，[2]立命館大生命）

3D7p02　*P. saccharoketogenes* IFO14483 株の微生物変換における酸化活性の基質特異性
14:01 ○桐生高明，木曽太郎，村上　洋（大阪技術研）

3D7p03　植物由来ヒドロキシニトリルリアーゼによる立体選択的なアミノニトリルの合成
14:12 ○板倉　葵，松井大亮，浅野泰久（富山県大工・生工研セ）

3D7p04　α 置換マロン酸ジエチル加水分解酵素の遺伝子同定と異種発現系の構築
14:23 ○菊川寛史[1]，村上陽亮[1]，大須賀勇人[1]，川端　潤[2,3]，三宅良磨[2]，滿倉浩一[1]，吉田豊和[1]（[1]岐阜大工・化生工，[2]三菱ケミカル株式会社，[3]株式会社エーピーアイコーポレーション）

3D7p05　PLE 代替え酵素を使用したラニレスタットの鍵中間体 ASI-2 の新規生産法
14:34 ○山村栄虎，津﨑和也，北　伸二（協和ファーマケミカル）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:55

3D7p06　α-EG が糸状菌の生育や酵素活性に及ぼす影響について
14:55 ○大森有花子[1]，内野昌孝[2]，高野克己[3]（[1]東京農大院農・農化，[2]東京農大生命・微生物，[3]東京農大応生・農化）

3D7p07　麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来新規リパーゼの特徴付け
15:06 ○市川響太郎，吉田彩花，塩野義人，小関卓也（山形大農）

3D7p08　黄麹菌 *Aspergillus oryzae* における糖鎖欠損型分泌糖タンパク質生産株の解析
15:17 ○李　秋実，竹川　薫，樋口裕次郎（九大院・生資環）

3D7p09　紅麹菌の特性評価に資する加水分解酵素の解析
15:28 ○橘信二郎[1]，比嘉悠貴[2]，金　英寿[2]（[1]琉球大・農，[2]小林製薬株式会社）

3D7p10　糸状菌 *Aspergillus nidulans* のセクレトーム解析から同定された hypothetical protein の機能解析
15:39 ○大堀沙貴子[1]，酒井杏匠[1]，糀谷紗季[1]，山口愛彩[1]，木島尚輝[1]，松江　渚[1]，小栗莉奈[1]，高須賀太一[2]，堀　千明[3]，志水元亨[1]，加藤雅士[1]（[1]名城大農，[2]北大院農，[3]北大院工）

p11〜p15 発表者の接続時間 15:50〜16:00

3D7p11　非天然ボトリオコッセン合成経路の進化デザイン
16:00 ○多田和樹，坂本康二，河合繁子，斎藤恭一，梅野太輔（千葉大院工）

3D7p12　生分解性プラスチック分解酵素を高生産する *Pseudozyma antarctica* セルフクローニング株の構築
16:11 ○山下（鮫島）結香[1]，渡部貴志[1,2]，田中拓未[1]，坪井　隼[1]，鎗水　透[1]，森田友岳[3]，小池英明[3]，鈴木　健[1]，北本宏子[1]（[1]農研機構，[2]群技セ，[3]産総研）

3D7p13　遺伝子破壊ベクター系等による工学的改変ピキア酵母株の作製
16:22 ○渋井達郎，原　宏佳，元山敬太，福井麻由（日本獣医生命科学大学）

3D7p14　工学的改変ピキア酵母株による抗体医薬（ヒュミラ）の生産
16:33 ○福井麻由，渋井達郎，原　宏佳，元山敬太（日本獣医生命科学大学）

3D7p15　メタノールセンサー宿主細胞を用いたメタン酸化生体触媒の開発
16:44 ○矢野龍一[1]，竹谷友之[1]，由里本博也[1]，寶関　淳[1]，緒方英明[2]，嶋　盛悟[2]，阪井康能[1]（[1]京大院農，[2]北大）

D8 会場　午前の部（10:27〜11:54）

環境科学・バイオマス利用―バイオ電池関連―

a08〜a10 発表者の接続時間 10:17〜10:27

3D8a08　光合成をモチーフとした高出力バイオ太陽電池の構築
10:27 ○足立大宜[1]，北隅優希[1]，白井　理[1]，片岡邦重[2]，加納健司[1]（[1]京大院農，[2]金沢大理工）

3D8a09　電極周辺土壌への鉄粉散布による水田発電の出力上昇
10:38 ○猪鼻淑乃，上岡永佳，名古屋美紗，松元陽歩，高妻篤史，渡邉一哉（東薬大生命）

3D8a10　藍染液中の電子伝達に関わる微生物・反応促進物質の探索
10:49 ○中川香澄[1]，多田真奈巳[1]，西林菜華[2]，阪本鷹行[2]，清藤鈴奈[3]，竹内道樹[3]，加納健司[3]，小川　順[3]，櫻谷英治[2]（[1]徳島大院・先端技術，[2]徳島大・生物資源，[3]京大院農・応用生命）

a11〜a14 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3D8a11　高性能バイオカソード構築のための耐熱性酵素の配向固定及び過酸化水素発生量に基づく配向性の確認
11:10 ○多喜俊介[1]，中村卓登[1]，高村映一郎[2]，坂元博昭[1,4]，里村武範[3,4]，櫻庭春彦[5]，大島敏久[6]，末信一朗[1,3,4]（[1]福井大学院・工・繊維，[2]福井大学院・工・総合，[3]福井大学院・工・生物応用化，[4]福井大学・生命セ，[5]香川大農，[6]大阪工大）

3D8a12　酵素分子の配向性と位置制御を目指したペプチド融合酵素を用いたバイオ電池用カソードの構築
11:21 ○二村梨絵[1]，殿岡愛菜[1]，坂元博昭[1,2]，里村武範[2,3]，櫻庭春彦[4]，大島敏久[5]，末信一朗[1,2,3]（[1]福井大学院・工・繊維，[2]福井大学・ 生命セ，[3]福井大学院・工・生物応用化，[4]香川大農，[5]大阪工大）

3D8a13　好熱菌由来脱水素酵素の多段階酸化反応を介した新規バイオ電池用アノードの開発
11:32 ○堀永晃作[1]，高村映一郎[1]，里村武範[1,2]，櫻庭春彦[3]，大島敏久[4]，末信一朗[1,2]（[1]福井大工，[2]福井大ライフ，[3]香川大農，[4]大阪工大工）

3D8a14　分子揺動性を考慮した耐熱性酵素の配向固定による高性能バイオアノードの構築
11:43　○鈴木治人[1]，高村映一郎[2]，坂元博昭[1,3]，里村武範[3,4]，櫻庭春彦[5]，大島敏久[6]，末信一朗[1,3,4]　([1]福井大学院・工・繊維，[2]福井大学院・工・総合，[3]福井大学・生命セ，[4]福井大学・工・生物応用化，[5]香川大農，[6]大阪工大)

D8 会場　午後の部(13:50〜16:55)

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

p01〜p05 発表者の接続時間 13:40〜13:50

3D8p01　生分解性 PBSA マルチフィルムを埋設した 2 種の畑土壌における真菌の推移と PBSA 分解真菌類の分離
13:50　○山元季実子，星野(高田)裕子，山下(鮫島)結香，坪井　隼，岸本文紅，北本宏子　(農研機構・農環研)
3D8p02　脂肪族ポリエステル類の淡水中での生分解
14:01　○中山敦好，川崎典起，山野尚子　(産総研)
3D8p03　疎水性プラスチックを強く吸着する *Cladosporium* sp. TPet-1 株の分離とその諸性質
14:12　○小池　優，橋床泰之　(北海道大学院農)
3D8p04　微生物群集解析による生分解性プラスチックの河川への影響
14:23　○門屋亨介[1,2]，田中尚人[2]，藤田信之[2]，石井大輔[2]，田口精一[2]　([1]東大院農・食の安全セ，[2]東農大生命)
3D8p05　生分解性プラスチックの河川微生物叢への影響
14:34　○田中尚人[1]，門屋亨介[1,2]，石井大輔[1]，藤田信之[1]，田口精一[1]　([1]東農大生命，[2]東大院食の安全セ)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:55

3D8p06　生分解性プラスチックナイロン 4 分解菌の探索
14:55　○錦はるか[1]，橘弘一郎[2]，下飯　仁[1]，山田美和[1]　([1]岩手大・農，[2]理研・CSRS)
3D8p07　繊維強化プラスチック分解微生物の探索
15:06　○門脇美晴[1]，河合盛進[2]，石原真以[2]，鈴木宏昭[2]，橘弘一郎[3]，阿部英喜[3]，下飯　仁[1]，山田美和[1]　([1]岩手大院総合科学，[2]トヨタ紡織・基礎研，[3]理研・CSRS)
3D8p08　海洋性ポリ（ε-カプロラクトン）およびポリエチレンスクシネート分解細菌の特徴付け
15:17　○鈴木美和[1]，橘　熊野[2,3]，大場皓平[2]，滝澤玲香[2]，粕谷健一[2,3]　([1]群馬大，[2]群馬大院理工，[3]群馬大食健康セ)
3D8p09　中温性細菌が生産する芳香族-脂肪族ポリエステル分解酵素の特性解析
15:28　○芝田友香[1]，室井文篤[1]，橘　熊野[1,2]，スレーントーンプウビライ[1]，山本桐子[1]，水野　司[1]，櫻井喬典[1]，小林由紀子[1]，粕谷健一[1,2]　([1]群馬大院理工，[2]群馬大食健康セ)
3D8p10　環境浄化を目指した植物における亜テルル酸特異的還元系の解明
15:39　○渡部翔太[1]，田中里奈[2]，新　晶帆[2]，中條滉叡[2]，武田　徹[1,2]　([1]近畿大院農，[2]近畿大農)

p11〜p15 発表者の接続時間 15:50〜16:00

3D8p11　*Pseudomonas stutzeri* NT-I による水相のテルルの効率的揮発化
16:00　○黒田真史，畠中玄彦，末神悠人，井上大介，池　道彦　(阪大院工)
3D8p12　重金属の分離回収を目的とした微生物と線虫によるバイオプロセスの構築
16:11　岡野凌一[1]，濱野　樹[2]，倉橋健介[3]，吉原静恵[2]，○徳本勇人[2]　([1]阪府大院・工，[2]阪府大院・理，[3]阪府大高専)
3D8p13　線虫による白金還元細菌の細胞破砕と回収プロセスの構築
16:22　○濵野　樹[1]，倉橋健介[2]，吉原静恵[3]，齊藤丈靖[4]，徳本勇人[3]　([1]阪府大・生命環境，[2]阪府大高専，[3]阪府大院・理，[4]阪府大院・工)
3D8p14　*Dietzia timorensis* RD012625 のセシウム蓄積能の解析
16:33　○吉岡潤一[1]，林　秀謙[1,2]　([1]前工大院工，[2]前工大工)
3D8p15　強力な N_2O 消去細菌 *Chitinophaga* sp. STop-15 株は不完全 DNRA 細菌である
16:44　○橋床泰之[1]，ラウシャロン[2]，高津祐太[1]，メリングルリ[2]　([1]北大院農，[2]TROPI)

E2 会場　午前の部(9:11〜12:05)

酵素―酸化還元酵素―

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

3E2a02　Anammox 細菌 "*Candidatus* Kuenenia" が保有する亜硝酸還元酵素の精製および生化学的性状
9:11　○中林豊博[1]，押木　守[1]，荒木信夫[1]，岡部　聡[2]，山口隆司[3]　([1]長岡高専，[2]北大，[3]長岡技大)
3E2a03　アンモニア酸化古細菌 *Nitrososphaera viennensis* が保有する銅含有型亜硝酸還元酵素（NirK）の触媒特性
9:22　○押木　守[1]，小林　駿[1]，平　大輔[2]，吉田圭太朗[3]，豊福雅典[3]，志田洋介[4]，小笠原渉[4]，山口隆司[4]，荒木信夫[1]　([1]長岡高専，[2]崇城大学，[3]筑波大学，[4]長岡技大)
3E2a04　NAD(P)H を電子供与体とする *Lactobacillus plantarum* P1-2 株由来の過酸化物還元酵素
9:33　○高波友希[1]，大山修平[1]，美原直樹[1]，川鍋明久[1]，小林裕太郎[1]，香川一人[1]，金子剛明[1]，木俣真弥[1]，武田晃治[2]，渡邊昭夫[3]，新村洋一[1]　([1]東農大バイオ，[2]東農大教職，[3]大洋香料)
3E2a05　ランダムおよび部位特異的変異導入による一価銅オキシダーゼ CueO の高活性化
9:44　○片岡邦重，高田修平，櫻井　武　(金沢大理工)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3E2a06　担子菌 *Hericium coralloides* 由来 laccase 遺伝子の異宿主発現および物質生産への応用
10:05　○戸田　弘，三矢満里奈，伊藤伸哉　(富県大生工研セ)
3E2a07　*Methylobacterium* sp. FD1 株由来ホルムアルデヒドジスムターゼ遺伝子（*fdm2*）の大腸菌での発現と Fdm2 の精製
10:16　○井元誠志，坂地陸斗，米光　裕　(和歌山高専)
3E2a08　アミノ酸置換による *Ochrobactrum* sp. AIU 033 由来アルコール酸化酵素のグリコール酸酸化活性向上
10:27　○松村健児，天野一清，下飯　仁，山田美和　(岩手大院総合科学)
3E2a09　*Penicillium* sp. KAIT-M-117 株由来 γ-アミノ酪酸オキシダーゼの熱安定性が向上した変異酵素の取得
10:38　○涌嶋　朗[1]，谷　修治[1]，山村　晃[2]，炭谷順一[1]，川口剛司[1]　([1]阪府大院・生環科，[2]神奈川工大・応用バイオ)
3E2a10　好熱性真菌 D-アミノ酸オキシダーゼの耐熱性低下変異体スクリーニング法の開発と取得
10:49　○古市剛大，七五三掛湧也，阿部勝正，解良芳夫，高橋祥司　(長岡技大院工)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3E2a11　環状イミン構造を有する β －カルボリンアルカロイド分解酵素の発見
11:10　永久保利紀[1]，○熊野匠人[1]，太田雄大[2]，橋本義輝[1]，小林達彦[1]　([1]筑波大院・生命環境，[2]山陽小野田市立山口東京理科大学・工学部)

3E2a12　好熱性 *Bacillus smithii* 由来インジゴ還元酵素の機能・構造解析
11:21　○米田一成[1]，吉岡観紗[1]，櫻庭春彦[2]，荒木朋洋[1]，大島敏久[3]　([1]東海大農，[2]香川大農，[3]大阪工大工)

3E2a13　好熱性アーキアに存在する新規色素依存性 L-乳酸脱水素酵素複合体の解析
11:32　○里村武範[1,2]，宇野紘平[1]，角間真人[1]，黒沢則夫[5]，櫻庭春彦[3]，大島敏久[4]，末信一朗[1,2]　([1]福井大工，[2]福井大ライフ，[3]香川大農，[4]大阪工大工，[5]創価大)

3E2a14　シアノバクテリアのビオチン生合成経路に見出された新規脱水素酵素の機能と構造に関する研究
11:43　○榊　　渓[1]，大石恵太[1]，清水　哲[1]，小林一幾[3]，富田武郎[1,2]，田中　寛[3]，葛山智久[1,2]，西山　真[1,2]　([1]東大・生物工学セ，[2]東大・微生物イノベ連携機構，[3]東工大・化生研)

3E2a15　リンゴ酸デヒドロゲナーゼの構造変化と基質認識メカニズムの関係
11:54　○下澤勇弥[1,2]，西矢芳昭[1]，佐々木康平[1,2]，氷見山幹基[2]，中村　努[2]　([1]摂南大院　理工　生命，[2]国立研究開発法人産業技術総合所)

E2 会場　午後の部(13:50〜16:55)

酵素―糖質代謝関連酵素／その他―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:40〜13:50

3E2p01　土壌から単離した *Penicillium* sp. KU-1 株が生産する新規ポリオール酸化酵素を利用する希少糖 L-Gulose の生産
13:50　○黒石川嵩幸[1]，渡邉　彰[2]，吉原明秀[2,3]，何森　健[2,3]，麻田恭彦[2]　([1]愛媛大院連合農，[2]香川大農，[3]香川大国際希少糖研究教育機構)

3E2p02　*Arthrobacter globiformis* 由来トランスケトラーゼを用いたヘプトース生産
14:01　○山根一倖[1]，久住優花[1]，加藤志郎[2]，望月　進[2]，吉原明秀[2]，秋光和也[2]，何森　健[2]　([1]香大農，[2]香大・希少糖)

3E2p03　麹菌 hydrophobin RolA-cutinase CutL1 間の相互作用における親和性は N 末端側配列に依存する
14:12　○佐藤　一[1]，田中拓未[1]，寺内裕貴[1]，高橋　徹[1]，七谷　圭[1]，吉見　啓[2]，阿部敬悦[1,2]　([1]東北大院・農，[2]東北大・未来研)

3E2p04　芳香族ジカルボン酸に対する新規可逆的脱炭酸酵素の探索
14:23　西田穂高，○青野　陸，吉原朋矢，木野邦器　(早大院・先進理工・応化)

3E2p05　4-hydroxyisophthalic acid に対する新規可逆的脱炭酸酵素の同定と遺伝子解析
14:34　○吉原朋矢，青野　陸，木野邦器　(早大院・先進理工・応化)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:55

3E2p06　植物における翻訳後セレン取り込みによる NAD 依存 GAPDH の活性化機構
14:55　高貝俊生[1]，高山せい花[2]，小竹未季子[2]，廣瀬啓自[2]，米田大輝[2]，○武田　徹[1,2]　([1]近畿大院，[2]近畿大農)

3E2p07　鉄型ニトリルヒドラターゼの翻訳後活性化因子の解析
15:06　○橋本義輝，宇部優子，熊野匠人，小林達彦　(筑波大院・生命環境)

3E2p08　メタロ-β-ラクタマーゼ IMP-1 における亜鉛結合解析
15:17　○加藤善輝，野澤裕介，古川那由太，井深章子　(新潟薬大・応生科)

3E2p09　ピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ 1 のアロステリック制御の解明
15:28　○廣政恭明，熊野友里花，海谷京香，西本悦子　(九大院農)

3E2p10　放線菌トランスグルタミナーゼの基質認識部位の探索
15:39　東海彰太[1]，裏地美杉[2]，○畑中唯史[1]　([1]岡山生物研，[2]神戸大院・科技イノベ)

p11〜p15 発表者の接続時間 15:50〜16:00

3E2p11　タマネギ由来催涙因子合成酵素の触媒機構
16:00　○佐藤優太[1]，荒川孝俊[1,2]，高辺潤平[1]，青柳守紘[3]，加藤雅博[3]，鴨井享宏[3]，正村典也[3]，柘植信昭[3]，今井真介[3]，伏信進矢[1,2]　([1]東大院・農生科・応生工，[2]東大微生物連携機構，[3]ハウス食品・中央研究所)

3E2p12　馬尿酸加水分解酵素の機能改良
16:11　○今井　皐[1]，名越健太郎[2]，新木翔太[2]，馬場利明[3]，西矢芳昭[1,2]　([1]摂南大院理工生命科学専攻，[2]摂南大理工生命科学，[3]ニプロ総研第三研究開発)

3E2p13　バイオ研究者が考えた HI・AI 融合型人工タンパク質設計技術
16:22　○伊藤創平，中野祥吾　(静県大 食栄)

3E2p14　機械学習に基づく新規配列データマイニング法の開発と高機能化人工酵素配列設計への応用
16:33　○中野祥吾[1]，本山智晴[1]，宮下由里奈[2]，石塚由紀[1]，松尾直也[2]，常盤広明[2]，篠田　優[3]，浅野泰久[3]，伊藤創平[1]　([1]静岡県大食栄，[2]立教大理，[3]富山県大工)

3E2p15　人工抗体設計技術の構築〜細胞質内で発現する人工 VHH 〜
16:44　○三村健太[1]，中野祥吾[1]，宮下由里奈[2]，鈴木智英子[1]，常盤広明[2]，伊藤創平[1]　([1]静県大院・食栄，[2]立教大・理)

E3 会場　午前の部(9:22〜11:54)

動物―個体 - 生理・栄養・代謝，生体機能，生体制御／その他―

a03〜a05 発表者の接続時間 9:12〜9:22

3E3a03　Eker rat の経時的代謝変動の解析
9:22　○松丸公輔[1]，鈴木　司[1,2]，井上　順[1,2]，山本祐司[1,2]　([1]東農大院・農・農化，[2]東農大・応生・農化)

3E3a04　遺伝子改変動物を用いたインスリン中間因子 TSC1 の機能解析
9:33　○蔵前和輝[1]，鈴木　司[1,2]，井上　順[1,2]，山本祐司[1,2]　([1]東農大院・農・農化，[2]東農大・応生・農化)

3E3a05　Ketogenic Diet による肝臓ケトン体合成の亢進が Eker rat の腎腫瘍形成に与える影響の解析
9:44　○上野晋平[1]，鈴木　司[1,2]，井上　順[1,2]，山本祐司[1,2]　([1]東農大院・農・農化，[2]東農大・応生・農化)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3E3a06　胆汁酸受容体 TGR5 が骨格筋代謝に及ぼす影響の解析
10:05　○佐々木崇，久保山文音，清水　誠，山内祥生，佐藤隆一郎　(東大院農生科応生化)

3E3a07　新規筋萎縮関連遺伝子 Tmem100 の機能解析
10:16　○久保山文音，佐々木崇，清水　誠，山内祥生，佐藤隆一郎　(東大院・農生科・応生化)

3E3a08　絶食時の肝臓における胆汁酸受容体 TGR5 の発現制御機構解析
10:27　○洪　子文，佐々木崇，清水　誠，山内祥生，佐藤隆一郎　(東京大学)

3E3a09　神経性疼痛物質オピオイドの腸管免疫における炎症抑制作用
10:38　○長田和樹[1]，三浦亮介[1]，長瀬　博[2]，八代拓也[1]，西山千春[1]　([1]東理大基礎工，[2]筑波大IIIS)

3E3a10　葉酸欠乏によるうつ症状のメカニズム解析 －神経成熟異常およびエピゲノム変動の関与－
10:49　○西田将治，竹村　凌，橘　　新，浅利颯太，荒木良太，矢部武士　(摂南大薬・複合薬物解析学)

a11〜a14 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3E3a11　脳卒中発症ラット SHRSP の遅筋特異的発育低下における MuRF1 の発現上昇
11:10　○井上敬夫[1]，前西　修[1]，萩山　満[1]，水口信行[2]，木村竜一朗[1]，筑後孝章[1]，木村雅友[1]，伊藤龍生[3]，佐藤隆夫[4]，伊藤彰彦[1]　([1]近大医病理，[2]近大ライフサイエンス研，[3]近大農食品栄養，[4]近大病院病理診断科)

3E3a12　ロスマリン酸摂食によるアルツハイマー病発症遅延に関与する血漿マイクロ RNA の探索とその機能の解析
11:21　○家山智子[1]，長谷知輝[1]，山下　玲[1]，嶋田耕育[2]，濱口　毅[3]，篠原もえ子[3]，山田正仁[3]，阿部啓子[1,2]，小林彰子[1]　([1]東大院農，[2]産技総研，[3]金沢大医)

3E3a13　RNA 干渉による害虫防除は有効か？
11:32　○宮田恵多[1,2]，小澤壮太[3]，長谷川浩一[4]　([1]川崎医福大臨床栄養，[2]中部大生命医科，[3]森林総研東北，[4]中部大環境生物)

3E3a14　LC-MS/MS を用いたステロールプロファイリングによるカイコ組織のステロール動態の解析
11:43　○竹島実加，片岡宏誌　(東大院・新領域)

E3 会場　午後の部(14:01〜16:33)

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

p02〜p05 発表者の接続時間 13:51〜14:01

3E3p02　Translational buffering: consequent to splicing inhibition
14:01　○Jagat Krishna Chhipi Shrestha[1,2]，Tilman Schneider-Poetsch[1]，Shintaro Iwasaki[3,4]，Minoru Yoshida[1,2]　([1]Chem. Genomics Res. Gr., RIKEN CSRS, [2]Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo, [3]RNA Syst. Biochem. Lab., RIKEN, [4]Dept. Comput. Biol. and Med. Sci., GSFS, Univ. Tokyo)

3E3p03　Prdm6 の心筋分化における機能解析
14:12　○須和田拓耶，馬場　映，土井信太郎，久原　哲，田代康介　(九大院 生資環)

3E3p04　最終分化に空気暴露を必須とするヒト表皮立体培養細胞の性状解析
14:23　○手島裕文，栗林美樹，加藤まなみ，辰川英樹，人見清隆　(名大院創薬科学)

3E3p05　再摂食時に発現が変動する遺伝子の網羅的解析
14:34　○渡邉杏子[1]，岩瀬将盛[2]，鈴木　司[1,3]，山本祐司[1,3]，井上　順[1,3]　([1]東農大院・農・農化，[2]東大院・農生科・応生化，[3]東農大・応生・農化)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:55

3E3p06　樹状細胞における免疫チェックポイント分子 PD-L2 の遺伝子発現制御機構の解明
14:55　○稲葉啓人[1,2]，渡辺良介[2]，八代拓也[2]，西山千春[2]　([1]東大新領域，[2]東理大基礎工)

3E3p07　内因性 HIF-1*α* 活性化因子 N-アシルドーパミンの生合成経路の解析
15:06　○林　洋樹[1]，前本佑樹[1]，吉田　稔[2,3]，伊藤昭博[1,2]　([1]東薬大・生命科学，[2]理研CSRS・ケミカルゲノミクス，[3]東大院農・応生工)

3E3p08　光遺伝学的手法を用いた社会行動と社会的認知記憶に対する海馬の役割の解析
15:17　○清田啓輔，谷水俊之，長葭大海，石川理絵，喜田　聡　(東京農大院・農・バイオ)

3E3p09　光遺伝学的手法を用いた海馬恐怖記憶エングラム操作による想起後の記憶制御機構の解析
15:28　○長葭大海，福島穂高，喜田　聡　(東農大院・農・バイオ)

3E3p10　光遺伝学的手法を用いた恐怖条件付け文脈記憶消去に対する前頭前野の役割の解析
15:39　○齋藤　翼，長葭大海，喜田　聡　(東京農大院・農・バイオ)

p11〜p13 発表者の接続時間 15:50〜16:00

3E3p11　HP1*α* クロモドメインを用いた新規蛍光プローブの開発とクロマチン動態観察
16:00　○佐々木和樹[1]，鈴木律裕[2]，中尾洋一[2]，吉田　稔[1,3]　([1]理研CSRS・ケミカルゲノミクス，[2]早稲田大・先端理工・化学・生命化学科，[3]東大院農・応生工)

3E3p12　二重環状ペプチドを用いた INO80 クロマチンリモデリング複合体機能の人為制御
16:11　○原田　海[1]，秋山祐亮[2]，高橋裕一朗[2]，町田奈々子[2]，HEINIS Christian[3]，原田昌彦[1,2]　([1]東北大農，[2]東北大院農，[3]EPFL LPPT)

3E3p13　脊椎動物ヒストンバリアント H2A.Z のアイソフォーム間での転写制御機構の差異の解析
16:22　○荻原　望[1]，高橋大輔[2]，日下部将之[3]，原田昌彦[2]　([1]東北大農，[2]東北大院農，[3]神戸大バイオシグナル総合研究センター)

E4 会場　午前の部(9:11〜12:05)

生物科学―糖鎖科学 - 構造，機能／糖鎖科学 - 糖鎖工学―

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

3E4a02　*Schizosaccharomyces* 属におけるピルビン酸含有糖鎖の構造解析
9:11　○福永嵩大[1]，樋口裕次郎[1]，前川裕美[1]，田中直孝[2]，竹川　薫[1]　([1]九大院生資環，[2]香川大農)

3E4a03　酵母細胞表層糖鎖の合成研究
9:22　○矢野佑介[1]，吉田英恵[1]，勝田　亮[2]，矢島　新[2]，石神　健[2]，額田恭郎[2]　([1]東農大院・農，[2]東農大・生命)

3E4a04　*Prevotella* 属菌群の産生する糖タンパク質糖鎖遊離酵素の特異性と宿主糖タンパク質糖鎖遊離・分解酵素系の存在
9:33　森　真司[2]，竹内朋史[1]，高谷尚弥[1]，○伊藤和央[1]　([1]阪市大・院理，[2]阪市大・理)

3E4a05　*β*-1,3-グルカナーゼの加水分解特異性を評価するための FRET 型 *β*-1,3-グルカンオリゴ糖誘導体の合成
9:44　宮川　淳，○金野克博，山村初雄　(名工大院工)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3E4a06　cytosolic PNGase/ENGase を欠損した A. thaliana の構築と内在する遊離 N-グリカン構造解析
10:05　○白井佐保子[1]，上村亮太[2]，前田　恵[1,2]，三崎　亮[3]，藤山和仁[3]，木村吉伸[1,2]　([1]岡山大農，[2]岡山大院・環境生命，[3]阪大・生物工学国際交流センター)

3E4a07　酸性ペプチド *N*-グリカナーゼ（aPNGase）過剰発現トマト（T2 世代）の表現型解析および aPNGase 活性解析
10:16　○山本千晴[1]，小椋美夏子[1]，前田　恵[1,2]，木村吉伸[1,2]　([1]岡山大農，[2]岡山大学大学院環境生命科学研究科)

3E4a08　Endo-CC N180H を用いたフラボノイドへの糖鎖転移反応
10:27　○藤澤　悠[1]，ハイエスマーク[2]，大橋貴生[1]，三崎　亮[1]，ペトルスカユルグ[2]，藤山和仁[1]　([1]阪大生国セ，[2]デュッセルドルフ大ユーリッヒ総合研究機構)

3E4a09　グルコース・グルコサミン交互共重合体を用いたセルロースのアミノ化
10:38　○上原大輝，菅　大介，藤原篤男，森帆乃未，宇佐美亮児，南雲玲香，鈴木市郎，武田　穣　(横国大工)

3E4a10　シロイヌナズナ *PGE3* 遺伝子欠損変異体の単糖組成解析
10:49　○橘　有咲，大橋貴生，松下宗義，三崎　亮，藤山和仁　(阪大生国セ)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3E4a11　酵素法により調製した糖ペプチドを基質とした ENGase の活性測定
11:10　○高島　晶，黒河内政樹，大隅賢二，菅原州一，森　昌子，水野真盛，天野純子，高田美生，松田昭生　（(公財)野口研究所）

3E4a12　新規合成戦略に基づくフコース含有糖鎖の構築
11:21　○松橋拓也[1]，今村彰宏[1]，石田秀治[1,2]　([1]岐阜大・応用生物，[2]岐阜大・G-CHAIN）

3E4a13　ブロック合成法によるケラタン硫酸糖鎖の化学合成
11:32　○尾崎隼人[1]，今村彰宏[1]，石田秀治[1,2]　([1]岐阜大・応用生物，[2]岐阜大・G-CHAIN）

3E4a14　細菌由来グリセロ糖脂質 SP-1, SPL-3 の化学合成
11:43　○髙登公一[1]，今村彰宏[1]，石田秀治[1,2]　([1]岐阜大・応用生物，[2]岐阜大・G-CHAIN）

3E4a15　昆虫と脊椎動物におけるシアル酸 9-リン酸合成酵素の基質特異性の解析
11:54　○北島　健[1,2]，石川寛茉[1,2]，濵口香代[1,2]，呉　　迪[1]，佐藤ちひろ[1,2]　([1]名大生物機能セ，[2]名大院生命農学）

E4 会場　午後の部（13:50〜16:55）

動物
―細胞 - 情報伝達，細胞応答，分化制御，メタボローム／細胞 - 細胞機能，細胞骨格，オルガネラ，輸送体，細胞接着，細胞内輸送／細胞工学 - 物質生産，タンパク質工学，細胞培養，細胞外マトリックス―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:40〜13:50

3E4p01　p27 機能制御の細胞種特異性の解析
13:50　○河崎優太郎，米谷達哉，千葉櫻拓　（東農大院バイオ）

3E4p02　がん抑圧因子 p27<Kip1>の細胞周期特異的な機能制御機構の解析
14:01　○美根崇志，南部なつき，米谷達哉，千葉櫻拓　（東農大院バイオ）

3E4p03　イロハモミジ発酵茶葉抽出物の成分分析とその抗骨粗鬆症効果について
14:12　○栗谷健志[1]，西尾昌洋[1]，和田匠平[1]，西瀬雅之[2]，岡本宏之[3]，勝崎裕隆[1]，梅川逸人[1]　([1]三重大院生資，[2]三重県大台町役場，[3]宮川森林組合）

3E4p04　マクロファージにおいて TLR4 シグナルは AKT/mTOR を介してオートファジーを調節することで炎症反応の減弱を制御する
14:23　○米野雅大，白木琢磨，芦田　久　（近畿大院・生物理工）

3E4p05　インスリン様分子の分泌制御を介して線虫の生育 / 休眠を制御する Rab family タンパクについて
14:34　長澤　守[1]，大西潤実[2]，松永洋平[3]，岩崎　崇[1,2]，○河野　強[1,2]　([1]鳥取大・農，[2]鳥取大院・農，[3](株)HIROTSU バイオサイエンス）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:55

3E4p06　Sf9 細胞を用いた昆虫嗅覚受容体のリガンド探索手法の開発
14:55　○布施寛人[1]，宮田佑吾[2]，コルネットリシャー[3]，黄川田隆洋[3]　([1]東京大学，[2]東京工業大学，[3]農研機構）

3E4p07　腸管上皮細胞に対する IL-4 の影響 －オルガノイド培養系を用いた検討－
15:06　○齋藤由季，佐藤美佳，岩槻　健，只石　幹，服部一夫，清水　誠　（東農大院農）

3E4p08　カルシウム応答性 NFAT レポーター測定による TRP チャネルの機能評価
15:17　阿知波卓也，張　　維，高原照直，柴田秀樹，○牧　正敏（名大院生命農）

3E4p09　アミノ酸による mTORC1 活性化の新規メカニズムの解析
15:28　○高原照直，池田奈央，石井千愛，杉山理紗，柴田秀樹，牧　正敏　（名大・生命農）

3E4p10　リソソーム傷害部位へのカルシウム結合タンパク質 ALG-2 の動員
15:39　林本敬大[1]，○柴田秀樹[1]，川野琢己[2]，高原照直[1]，牧　正敏[1]　([1]名大院・生命農，[2]名大農・応生科）

p11〜p15 発表者の接続時間 15:50〜16:00

3E4p11　メチオニンはがん抑制タンパク質 TSC2 のメチル化を介してインスリンシグナルに影響を及ぼす
16:00　○玄　成秀[1]，鈴木　司[1,2]，井上　順[1,2]，山本祐司[1,2]　([1]東農大院・農・農化，[2]東農大・応生・農化）

3E4p12　インスリンシグナルを制御する有機化合物 SF231 の作用メカニズムの解明
16:11　○山本佳明[1]，鈴木　司[1,2]，井上　順[1,2]，山本祐司[1,2]　([1]東農大院・農・農化，[2]東農大・応生・生化）

3E4p13　グルココルチコイドは脱ユビキチン化酵素 USP19 の発現上昇を誘導し筋融合を抑制する
16:22　○下唐湊一矢[1]，北野剛大[1]，原田直樹[1]，乾　　博[2]，山地亮一[1]　([1]大阪府大院・生命環境，[2]大阪府大・栄養）

3E4p14　β－カロテン代謝酵素 BCO1 ノックアウトマウスにおける褐色脂肪組織の特徴
16:33　○日野李保[1]，北風智也[2]，乾　　博[3]，原田直樹[1]，山地亮一[1]　([1]大阪府大院・生命環境，[2]神戸大院・科技イノベ，[3]大阪府大・栄養）

3E4p15　ストレプトゾトシンは REDD2 の発現増加を介して膵 β 細胞死を誘導する
16:44　○田宮央登[1]，原田直樹[1]，乾　　博[2]，山地亮一[1]　([1]大阪府大院・生命環境，[2]大阪府大・栄養）

E5 会場　午前の部（9:00〜12:05）

生物科学―生物工学 - 解析技術・方法論／その他―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3E5a01　マクロファージの炎症性物質に対するエミューオイルの効果
9:00　○足立卓哉，小倉エレン，相根義昌，南　和広，伊藤　実，丹羽光一　（東農大食品香粧）

3E5a02　オリーブ果実の乳酸発酵におけるオリーブ葉の添加効果
9:11　○岸本憲人　（小豆島ヘルシーランド株式会社　オリーヴ健康科学研究所）

3E5a03　全身麻酔薬はなぜ効くのか：ハエトリグサなど植物を用いた活動電位や細胞膜挙動の可視化
9:22　○陽川　憲[1]，蔭西知子[1]，Andrej Pavlovic[2]，Stefano Mancuso[3]，Frantisek Baluska[4]　([1]北見工大，[2]パラツキー大学オロモウツ，[3]フィレンツェ大学，[4]ボン大学）

3E5a04　表皮角化細胞単層培養系及び 3 次元皮膚モデルを用いた植物油の皮膚角層バリア形成促進機能の解析
9:33　○三嶋　隆，鷲見嘉奈子，児玉千鶴子，唐木田直矢，高橋有志，井出将博，吉田　泉，五十嵐友二　（日本食品分析セ）

3E5a05　東京湾岸江東地区での養蜂における蜜源解明の試み ―花粉 DNA のメタバーコーディング解析を用いて―
9:44　○野崎旭惣[1]，田中啓介[2]，志波　優[4]，中太葉月[3]，門多真理子[3,4]　([1]武蔵野大院環境，[2]東農大ゲノムセ，[3]武蔵野大環境，[4]東農大生命科学）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3E5a06　空間・構造・運動性相関スペクトルを用いた複雑系代謝物群の俯瞰的プロファイリング技術の開発
10:05 ○伊藤研悟[1,2]，坪井裕理[1]，伊達康博[1,2]，菊地　淳[1,2,3]（[1]理研CSRS，[2]横市院生命医，[3]名大院生命農）

3E5a07　山積される NMR 情報のデータクレンジング法検討およびツール開発
10:16 ○山田隼嗣[1,2]，黒谷　篤[2]，近山英輔[2,3]，菊地　淳[1,2,4]（[1]名大院・生命農，[2]理研・環境資源，[3]新潟国際大・情報文化，[4]横市院・生命医）

3E5a08　NMR を用いた魚肉の物理・化学プロファイルから見る魚類の多様性
10:27 ○魏　菲菲[1]，伊藤研悟[1]，坂田研二[1]，朝倉大河[1]，伊達康博[1,2]，菊地　淳[1,2,3]（[1]理研CSRS，[2]横市大院・生命医，[3]名大院・生命農）

3E5a09　細径化ロングモノリスカラムによる SRM プロテオミクスの高感度化
10:38 ○大谷優太[1]，油屋駿介[1,2]，水口博義[3]，三浦夏子[1]，青木　航[1,4,5]，植田充美[1,4,5]（[1]京大院・農，[2]日本学術振興会，[3]株式会社京都モノテック，[4]CREST，[5]KIST-BIC）

3E5a10　Agilent Hilic-Z カラムを用いた高極性化合物の一斉分析
10:49 ○軸丸裕介，Hsiao Jordy，Van de Bittner Genevieve，Chu Te-Wei，Yin Hongfeng（アジレント・テクノロジー）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3E5a11　高性能二段階孔構造精製担体を用いたペプチド・核酸の分離
11:10 ○泊　直宏[1]，山本佳宏[1]，宮本利一[2]，白　鴻志[2]（[1]地方独立行政法人　京都市産業技術研究所，[2]株式会社エスエヌジー）

3E5a12　改良された次世代シーケンスによる逆転写酵素の正確性の解析
11:21 岡野啓志[1]，馬場美聡[1]，秀瀬涼太[2]，飯田　慶[3]，李　瞳陽[1]，兒島憲二[1]，滝田禎亮[1]，柳原　格[4]，藤原伸介[2]，○保川　清[1]（[1]京大院農，[2]関西学院大，[3]京大院医，[4]大阪母子医療セ）

3E5a13　信号累積型イオン感応性電界効果トランジスタを用いたラッカーゼ活性の検出
11:32 ○西矢芳昭[1]，上田海夕[1]，泊　直宏[2]，山本佳宏[2]（[1]摂南大生命科学，[2]京都市産技研）

3E5a14　バイオメカニカルモーターの開発に向けた走査型プローブ顕微鏡によるボルボックスの推進力の解析
11:43 ○三留規誉[1]，堀永晃作[2]，新留愛理[2]，伊藤瑞希[2]，若林憲一[3]，植木紀子[3]，藤田和孝[2]，島袋勝弥[2]（[1]沼津高専，[2]宇部高専，[3]東工大化生研）

3E5a15　抗体修飾磁性粒子を用いたカイコ体液から組換えタンパク質の精製
11:54 ○鈴木慎一朗[1]，ミンクナーロバート[1]，徐　　剣[1]，林谷美貴子[1]，朴　龍洙[1,2]（[1]静大院・総科技・農，[2]静大グリーン科技研）

E5 会場　午後の部（13:50〜16:55）

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

p01〜p05 発表者の接続時間 13:40〜13:50

3E5p01　ピロリン酸型ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼの立体構造解析
13:50 ○千葉洋子[1]，宮川拓也[2]，嶋根康弘[1]，田之倉優[2]（[1]海洋研究開発機構，[2]東大院　農生化）

3E5p02　多糖モノオキシゲナーゼ，CBP21 の構造安定性　—金属イオンの効果—
14:01 ○杉本華幸[1,2]，中島優一[1]，中村禄朗[2]，渡邉剛志[1,2]，鈴木一史[1,2]（[1]新潟大・農・応生化，[2]新潟大院・自然科学）

3E5p03　Aspartate:Alanine 交換輸送体 AspT の構造解析に向けたモノクローナル抗体樹立と AspT-抗体複合体形成の評価
14:12 ○國井宏太[1]，小笠原諭[2]，村田武士[2]，七谷　圭[1]，阿部敬悦[1]（[1]東北大院農，[2]千葉大院理）

3E5p04　マガキにおけるカドミウム結合タンパク質の探索
14:23 ○川上和宏[1]，陳　嘉上[1]，根岸瑠美[2]，永田宏次[1]，吉村悦郎[1,3]，鈴木道生[1]（[1]東大院農，[2]東大定量研，[3]放送大教養）

3E5p05　アコヤガイ真珠層における有機ナノファイバー形成に関与する基質タンパク質の解析
14:34 ○西村　亮[1]，窪田一輝[1]，根岸瑠美[2]，鈴木道生[1]（[1]東大農，[2]東大定量研）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:55

3E5p06　アコヤガイ貝殻内の ACC 結合タンパク質の構造・機能解析
14:55 ○岩橋晴香[1]，荒城綾香[1]，永田宏次[1]，根岸瑠美[2]，降旗一夫[1]，鈴木道生[1]（[1]東大院農，[2]東大定量研）

3E5p07　マガキチョーク層における扁平状カルサイト結晶の形成に関与する因子の探索
15:06 ○岩本しほり[1]，近都浩之[1]，根岸瑠美[2]，鈴木道生[1]（[1]東大院農，[2]東大定量研）

3E5p08　細菌の金属輸送に関わる EfeUOB 系構成アルギン酸結合タンパク質のレアメタル結合性
15:17 ○奥村憲史[1]，三上文三[1]，村田幸作[2]，橋本　渉[1]（[1]京大院農，[2]摂南大理工）

3E5p09　Bacillus cereus 由来銅含有酸化酵素の異種発現系構築と特性評価
15:28 ○越智祐太，藤枝伸宇（阪府大院生還）

3E5p10　海洋生物に分布する水溶性カロテノイド結合タンパク質の探索と同定
15:39 ○金子隆之[1]，淺野朋美[1]，中野杏香[1]，三上　茜[1]，高市真一[1,2]，川崎信治[1,2]（[1]東農大バイオ，[2]東農大微生物）

p11〜p15 発表者の接続時間 15:50〜16:00

3E5p11　低級アルカンモノオキシゲナーゼの単離と特性評価
16:00 ○安部欣高，井上千裕，山之内渉，永山友紀，藤枝伸宇（阪府大院生命環境）

3E5p12　低級アルカンモノオキシゲナーゼに関わる補助タンパク質の単離と特性評価
16:11 ○山之内渉，永山友紀，安部欣高，井上千裕，藤枝伸宇（阪府大院生命環境）

3E5p13　ポリヒスチジン（His16）修飾リソソームを利用したリソソーム病に対する新規治療法の開発
16:22 ○林　大輝[1]，岡本　陸[2]，河野　強[1,2]，岩崎　崇[1,2]（[1]鳥取大院・持続，[2]鳥取大・農）

3E5p14　ポリオキソメタレートによるシステイン検出とそのメカニズム
16:33 ○今野博行，休石悠人，矢野成和（山形大院理工）

3E5p15　ファージディスプレイ法を用いた新規プロスタグランジン代謝産物測定系の確立
16:44 板倉正典[1]，○川口寧々[1]，佐々木栄太[1]，柴田貴広[2]，上田　宏[3]，内田浩二[1]（[1]東大院・農生科，[2]名大院・生命農，[3]東工大院・化生研）

E6 会場　午前の部（9:00〜11:54）

植物―生物間相互作用／その他―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3E6a01　アグロインフィルトレーションによる植物の乳液タンパク質の生産と抗昆虫活性の検討
9:00　○塩見祐生[1]，秋野順治[1]，三浦謙治[2]，Savadogo Eric[1]，北島佐紀人[1]　([1]京工繊大・応用生物，[2]筑波大学生命環境)

3E6a02　Identification and evaluation of toxic proteins accumulated in *Ficus carica* and *Euphorbia tirucalli* latexes.
9:11　○Hyrmeya Eric SAVADOGO[1]，Kazufumi Yazaki[2]，Ryosuke Munakata[2,3]，Masamitsu Yamaguchi[1]，Hideki Yoshida[1]，Takanari Umegawachi[1]，Ryo Tanaka[1]，Dan Ngoc Anh Suong[1]，Toki Taira[4]，Sakihito Kitajima[1]　([1]Kyoto Institute of Technology, [2]Kyoto University, [3]Universite de Lorraine /INRA, [4]University of the Ryukyus)

3E6a03　細菌エンドファイトによるプライミング機構の誘導に働くシグナル物質の探索
9:22　○藤田萌香[1]，草島美幸[1,2]，仲下英雄[1]　([1]福井県大院・生資，[2]東大院・農生科・応生化)

3E6a04　植物培養細胞の活性酸素種生成を指標とした植物免疫を亢進する植物内生菌の探索
9:33　○黒川摩利，中野正貴，北畑信隆，朽津和幸，古屋俊樹（東京理科大理工・応生）

3E6a05　タバコ根圏におけるサントパイン資化菌の探索
9:44　○島崎智久[1]，川崎　崇[1]，青木裕一[2]，矢崎一史[1]，杉山暁史[1]　([1]京大・生存研，[2]東北大学・東北メディカル・メガバンク機構)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3E6a06　An elite probiotic *Bacillus* sp. strain formulated with Asteraceae plant additive enhanced biocontrol activities against bacterial fruit blotch
10:05　Yen-Yu Liu[1]，Yi-Lin Chen[1]，Sook-Kuan Lee[1]，Wen-Chin Yang[2,3,4,5]，○Chi-Te Liu[1,2]　([1]Institute of Biotechnology, National Taiwan University, [2]Agricultural Biotechnology Research Center, Academia Sinica, [3]Department of Aquaculture, National Ocean University, Keelung, [4]Institute of Pharmacology, Yang-Ming University, [5]Department of Life Sciences, National Chung Hsing University)

3E6a07　植物病原細菌 *Acidovorax avenae* 由来のエフェクタータンパク質 IPPT を介した過敏感細胞死誘導の分子機構
10:16　○中村みなみ[1]，近藤真千子[2]，古川岳人[2]，川口雄正[1]，山田孝樹[1]，蔡　晃植[1,2]　([1]長浜バイオ大院・バイオ，[2]長浜バイオ大・バイオ)

3E6a08　イネ免疫反応を誘導する EFa50 ペプチドの受容機構
10:27　○古川岳人[1]，松田智裕[2]，千國孝明[1]，平井洋行[1]，蔡　晃植[1,2]　([1]長浜バイオ大バイオ，[2]長浜バイオ大院バイオ)

3E6a09　転写因子 DPF のイネ本来のいもち病抵抗性への関与
10:38　石川一輝[1,2]，山村千紘[1,2]，和田美樹[3]，冨山詩歩[3]，前田　哲[1]，岡田憲典[3]，鎌倉高志[2]，○森　昌樹[1,2]　([1]農研機構・生物機能利用研究部門，[2]東理大院・理工，[3]東大・生物生産工学研究センター)

3E6a10　転写調節因子 OsNTF1 による *OsPR7* 遺伝子の発現誘導機構
10:49　○平井洋行[1]，西村成史[2]，中塚達人[1]，古川岳人[1]，近藤真千子[1]，桂木雄也[1]，神村麻友[1]，仲下英雄[3]，蔡　晃植[1,2]　([1]長浜バイオ大・バイオ，[2]長浜バイオ大院・バイオ，[3]福井県大・生資)

a11〜a14 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3E6a11　イネの過敏感細胞死誘導における OsHSP90 の役割
11:10　○三田将大[1]，神村麻友[2]，平井洋行[2]，古川岳人[2]，蔡　晃植[1,2]　([1]長浜バイオ大学大学院　バイオサイエンス研究科，[2]長浜バイオ大学　バイオサイエンス学部)

3E6a12　イネ由来 GH18 キチナーゼ様タンパク質 riceXIP のキシラナーゼ阻害活性
11:21　○三井圭吾，大沼貴之　(近大院農)

3E6a13　馬鈴薯病害抵抗性関連タンパク質のプロテオーム解析
11:32　○荻原　淳，大工　創，寺尾実紗，渡邉泰祐　(日大生物資源)

3E6a14　植物のサリチル酸蓄積がタバココナジラミの産卵や生育に及ぼす影響
11:43　○植田浩一，釘宮聡一，田端　純，北本宏子，光原一朗（農研機構）

E7 会場　午前の部（9:00〜12:05）

植物―遺伝子 - 構造解析，ゲノム，遺伝，変異／遺伝子 - 機能，発現制御／一次代謝，二次代謝―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

3E7a01　造精器特異的電位依存型イオンチャネルは苔類ゼニゴケの精子走化性および生殖に関与する
9:00　○十川太輔[1]，末次憲之[2]，河内孝之[2]，大和勝幸[1]　([1]近大・院・生物工学，[2]京大・院・生命)

3E7a02　Comparative analysis of metabolite profiling of F1 hybrid and its parents in response of exogenous sucrose and photoperiods
9:11　○Thi Ngoc Quynh Le[1]，Naoya Sugi[1]，Miyako Kusano[1,2]，Kazuki Saito[3]，Hiroshi Shiba[1]　([1]Grad. sch. of Life and Environmental Sciences, Tsukuba Univ., [2]RIKEN, CSRS, [3]Chiba Univ.)

3E7a03　シロイヌナズナ種内雑種における雑種強勢に特徴的な代謝物変化及びその制御機構の解析
9:22　○杉　直也[1]，レティノクィン[1]，草野　都[1,2]，斎藤和季[2,3]，柴　博史[1]　([1]筑波大院・生命環境，[2]理研・CSRS，[3]千葉大・薬)

3E7a04　葯タペート組織のエピジェネティックな発生制御メカニズムの解明
9:33　○川又　奨[1]，杉　直也[1]，レティノクィン[1]，木本剛彰[2]，清永郁香[1]，岩野　恵[3]，岩井宏暁[1]，佐藤　忍[1]，高山誠司[4]，柴　博史[1]　([1]筑波大院・生命環境，[2]奈良先端大，[3]京大院・生命科学，[4]東大院・農学生命科学)

3E7a05　カラスビシャクの有用多糖アラバン合成関連遺伝子の探索
9:44　○下川　響[1]，田中宏幸[2]，江口壽彦[3]，松岡　健[1,3,4]　([1]九大・院生資環，[2]九大・院薬，[3]九大・生環セ，[4]九大・院農)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3E7a06　野生イネにも保存されているファイトアレキシン生産制御因子 DPF の機能解析
10:05　○冨山詩歩[1]，川原玲香[2]，宮本皓司[3]，山根久和[3]，豊増知伸[4]，野尻秀昭[1]，岡田憲典[1]　([1]東大・生物工学セ，[2]東農大・ゲノムセ，[3]帝京大・バイオ，[4]山形大・農)

3E7a07　大腸菌を用いたレタス由来ガラクチノール合成酵素遺伝子の機能解析
10:16　○木村太喜[1]，黒川　将[1]，益田時光[2]，本城賢一[2]，宮本敬久[2]　([1]九大院生資環，[2]九大院農)

3E7a08　Plant AT-rich sequence and zinc-binding protein（PLATZ）転写因子 7 および 8 は植物の形態形成に関与する
10:27　○瀬古友梨恵[1]，田部記章[2]，田茂井政宏[1]，重岡　成[1]　([1]近畿大院農，[2]奈良先端大)

3E7a09　葉緑体型アスコルビン酸ペルオキシダーゼ遺伝子（*APXII*）の選択的スプライシング制御因子の解析
10:38 ○大原晨亜[1]，田部記章[2]，吉村和也[3]，田茂井政宏[1]，重岡　成[1]（[1]近畿大院農，[2]奈良先端大，[3]中部大応生）

3E7a10　チューリップ栽培品種におけるジアシル型チューリッポシド類の存在
10:49 ○野村泰治[1,2]，山口航平[2]，荻田信二郎[3]，加藤康夫[1,2]（[1]富山県立大・生工研セ，[2]富山県立大・生物工，[3]県立広島大・生命科学）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3E7a11　アシル側鎖末端 deoxy 型基質によるチューリッポシド変換酵素の阻害
11:10 ○二永　貴[1]，野村泰治[1,2]，北岡直樹[1,2]，加藤康夫[1,2]（[1]富山県大院・工，[2]富山県大・生工研セ）

3E7a12　シコニンのアシル化に関与するムラサキのアシル基転移酵素 LeOAT の機能解析
11:21 ○押切春佳[1]，渡辺文太[2]，山本浩文[3]，矢崎一史[4]，高梨功次郎[1,5]（[1]信州大・総合理工，[2]京大・化研，[3]東洋大・生命科学，[4]京大・生存研，[5]信州大・理）

3E7a13　トマト根からのトマチン分泌の解析
11:32 ○大野滉平，中安　大，矢崎一史，杉山暁史（京大・生存研）

3E7a14　Enhancer of Flavonoid Production（EFP）によるカルコン合成酵素の活性化メカニズムの解析
11:43 ○和氣駿之，中野拓也，宇野海地，高橋征司，中山　亨（東北大院・工）

3E7a15　III 型ポリケチド合成酵素の生成物特異性制御に関する研究
11:54 ○宇野海地，中野拓也，和氣駿之，高橋征司，中山　亨（東北大院・工）

E7 会場　午後の部（13:50〜16:55）

植物―一次代謝，二次代謝―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:40〜13:50

3E7p01　キンギョソウ由来アントシアニン生合成関連酵素の機能解析
13:50 ○古川　楓，石塚　匠，伊藤圭亮，和氣駿之，高橋征司，中山　亨（東北大院・工）

3E7p02　植物のアセチルコリン生合成
14:01 ○村田　純[1]，渡辺健宏[1]，高橋俊雄[1]，佐藤宏明[2]（[1]公益財団法人 サントリー生命科学財団，[2]奈良女子大学 理学部）

3E7p03　ダイズの発芽と生育にともなう，L-アスコルビン酸と L-デヒドロアスコルビン酸の変動
14:12 ○間崎　剛，大谷はるか，岸本　壮，岸本未緒，豊場夕菜，牧野夏奈子（名古屋学芸大学管理栄養）

3E7p04　オウトウの花芽および葉芽の成熟に伴う経時的な代謝物変動の解明
14:23 ○佐藤紗野[1]，佐々木亮介[2]，及川　彰[1,2]（[1]山形大院農，[2]理研CSRS）

3E7p05　*Jatropha curcas* 種子に含まれる二次代謝物質の網羅的解析
14:34 ○松久保康輔，松川哲也，梶山慎一郎（近畿大学　生物理工）

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:55

3E7p06　生物の代謝産物として植物で初めて見つかったリボフラビン（ビタミン B2）誘導体（第 3 報）
14:55 ○田中啓介[1]，金子元優[2]，橋口純也[2]，佐藤純一[2]，石井達也[2]，武田晃治[3]，吉村悦郎[4]，新町文絵[5]，志波　優[6]，川崎信治[2]，新村洋一[2]（[1]東農大ゲノムセ，[2]東農大バイオ，[3]東農大教職，[4]放送大教養，[5]日大短大生資源，[6]東農大生命科学）

3E7p07　ビワの（2-ニトロエチル）ベンゼン生合成経路の解明
15:06 ○山口拓也[1]，桑原保正[2]，浅野泰久[2]，春原由香里[1]，松本　宏[1]（[1]筑波大・生命環境系，[2]富山県大・生工研セ）

3E7p08　光条件に応じたグルコシノレート代謝調節機構
15:17 ○一瀬智美[1]，山崎雄三[2]，三浦大典[3]，金　善州[4]，丸山明子[1]（[1]九州大 院農，[2]島津製作所，[3]産総研，[4]忠南大学）

3E7p09　コーヒー原種 *Coffea stenophylla*，*C. millotii*，*C. pseudozanguebariae* からのカフェイン生合成系酵素遺伝子の単離と機能解析
15:28 ○國久葉月[1]，高木　駿[1]，倉田陸朗[1]，Valerie Poncet[2]，Alexandre de Kochko[2]，水野幸一[1]（[1]秋田県大生物資源，[2]IRD-Montpellier DIADE）

3E7p10　発芽後のゴマ種子におけるリグナン配糖体およびそれらの配糖体化酵素の同定
15:39 ○大場幸江[1]，東　鋭明[1]，小埜栄一郎[2]，豊永宏美[2]，白石　慧[1]，原田英里砂[1]，村田　純[1]，堀川　学[1]（[1](公財)サントリー生命科学財団，[2]サントリーグローバルイノベーションセンター(株)）

p11〜p15 発表者の接続時間 15:50〜16:00

3E7p11　タルウマゴヤシ由来のフラボノイド-*C*-配糖化酵素への点突然変異導入による配糖化活性変換の試み
16:00 ○齋藤友美[1]，山岸由起子[1]，水藤史明[2]，田口悟朗[1,3]（[1]信州大院・総合理工，[2]東大院・新領域，[3]信州大・繊維）

3E7p12　タバコのフェノール性異物代謝に関わる二糖付加酵素の探索
16:11 ○佐藤里佳[1]，下坂　誠[1,2]，田口悟朗[1,2]（[1]信州大院・総合理工，[2]信州大・繊維）

3E7p13　ハナビシソウドラフトゲノムデータを利用したイソキノリンアルカロイド生合成関連遺伝子のマイニング
16:22 ○山田泰之[1]，堀健太郎[2]，土反伸和[1]，佐藤文彦[2,3]（[1]神戸薬大，[2]京大院・生命科学，[3]大阪府大院・理）

3E7p14　カロテノイド・クロロフィル簡便迅速測定法によるトマト品種の大規模スクリーニング
16:33 ○青野佑亮[1]，アシキンヨナタン[1]，王　　寧[1]，クリーハリー[2]，草野　都[1,3]（[1]筑波大生物資源，[2]フロリダ大植物イノベーションセンター，[3]理研CSRS）

3E7p15　薬用植物ムラサキを用いた VIGS アッセイ系の確立
16:44 ○井坂夏海[1]，草野博彰[1]，増田　税[2]，下村講一郎[3]，矢崎一史[1]（[1]京大生存研，[2]北大院農，[3]東洋大院生命）

E8 会場　午前の部（9:11〜12:05）

動物―タンパク質 - 構造，機能，活性，修飾，分解，局在，プロテオーム―

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

3E8a02　Biochemical characteristics of ovalbumin-related protein X in the chicken embryo
9:11 ○Takashi AKAZAWA[1,2,3]，Hiroyuki KOIKE[1]，Katherine FU[3]，Joy M. RICHMAN[3]，Masahiro OGAWA[1]，Shigeru HAYAKAWA[1]（[1]Kagawa Univ.，[2]Ehime Univ.，[3]University of British Columbia）

3E8a03　卵白アルブミンのポリマー化と凝集体形成
9:22 ○米倉百音，西川勇樹，恩田真紀（大阪府立大・理・生物）

3E8a04　PAI-1 阻害剤の作用機構
9:33 ○田中真帆，小林　誠，廣畠早紀，恩田真紀（大阪府立大・理・生物）

3E8a05　天然化合物 Embelin のニューロセルピン阻害を介したアミロイドプラーク分解促進薬剤としての可能性
9:44 ○加藤美有，原田彰大，恩田真紀（大阪府立大・理・生物）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

3E8a06　デヒドロアスコルビン酸による血清アルブミンの自然免疫活性化機能の獲得
10:05　○板倉正典[1]，佐々木栄太[1]，安達貴弘[2]，内田浩二[1]　([1]東大院・農生科，[2]東京医科歯科大・難治疾患研)

3E8a07　ピロール化タンパク質形成における酸化ストレスの関与
10:16　○吉武　淳[1]，柴田貴広[2]，内田浩二[3]　([1]名大未来社会，[2]名大院生命農学，[3]東大院農学生命)

3E8a08　ハブクラゲ刺胞内液中 IgG 特異的結合性タンパク質の精製
10:27　○鈴木智也[1]，永井宏史[2]，山下光雄[1]　([1]芝浦工大院・応化，[2]東京海洋大・海洋環境)

3E8a09　二枚貝の貝殻稜柱層内に存在するキチン繊維の形成機構の比較
10:38　○近都浩之[1]，奥村大河[2]，根岸瑠美[3]，中西啓仁[1]，永田宏次[1]，鈴木道生[1]　([1]東大院農，[2]東大院理，[3]東大定量研)

3E8a10　モデル生物としてのメダカを用いた組織型タンパク質架橋化酵素の機能解析
10:49　渡邉優子，鈴木里沙，孟　　斎，辰川英樹，○人見清隆　(名大院創薬科学)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

3E8a11　ミトコンドリアマトリクスに局在するプロテアーゼ Lon によるタンパク質の可溶性制御
11:10　○松島雄一[1]，高橋和也[1]，瀬戸山大樹[2]，康　東天[1]　([1]九大医，[2]九大病院)

3E8a12　マウスキチナーゼの相互作用に関する研究
11:21　○木村将大，梅山隆敏，脇田悟誌，大川一明，坂口政吉，小山文隆　(工学院大・先進工)

3E8a13　エクソソームを基軸とした糖尿病性腎症の新規バイオマーカー探索
11:32　○神谷孝平[1]，桑田啓子[2]，吉武　淳[3]，内田浩二[4]，柴田貴広[1]　([1]名大院生命農，[2]名大ITbM，[3]名大未来社会，[4]東大院農生)

3E8a14　マラリア原虫ヒスチジンリッチタンパク質 (PfHRP2) の細胞膜透過と細胞毒性に関する研究
11:43　○下田麻由，河野　強，岩崎　崇　(鳥取大院・持続)

3E8a15　リン脂質輸送体 ABCB4 の第 4 膜貫通ヘリックスに存在するプロリンの機能解析
11:54　○小川　峻[1]，末永健人[1]，木岡紀幸[1]，植田和光[1,2]，木村泰久[1]　([1]京大院農，[2]京大・iCeMS)

E8 会場　午後の部(13:50〜16:55)

植物―遺伝子 - 構造解析，ゲノム，遺伝，変異／植物工学 - 育種，物質生産，形質転換／その他―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:40〜13:50

3E8p01　栽培イチゴにおけるポリガラクツロナーゼ遺伝子 (*FaPG*) の多様性
13:50　○小山浩由，平野泰志　(埼玉農技研)

3E8p02　モモ果肉色の多様化に向けた ' 天津水蜜桃 ' の紅肉形質の解析と育種マーカー開発
14:01　原美由紀[1]，鵜木悠治郎[2]，日原誠介[2]，○小田賢司[1]　([1]岡山県農総セ生科研，[2]岡山県農総セ農研)

3E8p03　有用な二次代謝産物を高蓄積するセージを作製するための再分化系および形質転換系の確立
14:12　○上ヶ平柚歩[1]，平井洋行[2]，古川岳人[2]，蔡　晃植[1,2]　([1]長浜バイオ大院・バイオ，[2]長浜バイオ大・バイオ)

3E8p04　国内産生薬植物カラスビシャクの形質転換の試み
14:23　○青木達大[1]，下川　響[2]，江口壽彦[3]，松岡　健[1,2,3,4]　([1]九大農，[2]九大院生資環，[3]九大生環セ，[4]九大院農)

3E8p05　植物色素フラボノイドに着目した変異誘発処理当代植物における突然変異検出
14:34　○平田翔也[1,2]，北村　智[2]，佐藤勝也[2]，鳴海一成[1]，大野　豊[2]　([1]東洋大院・生命科学，[2]量研・高崎研)

p06〜p10 発表者の接続時間 14:45〜14:55

3E8p06　翻訳エンハンサー dMac3 と薬剤誘導型プロモーターを利用した，高効率なゲノム編集をもたらす TALEN system の開発
14:55　○小野寺瞳[1]，新宮沙絵子[1]，大沼万里子[1]，堀江峻晃[1]，紀平望帆[1,2]，草野博彰[1,3]，寺村　浩[1]，島田浩章[1]　([1]東京理科大・生物工，[2]現:奈良先端大・バイオサイエンス，[3]現:京都大・生存圏研)

3E8p07　翻訳エンハンサー dMac3 を利用したゲノム編集による低アミロースジャガイモの作出
15:06　○寺村　浩[1]，草野博彰[1,2]，無津呂(青木)裕美[1]，大沼万里子[1]，堀江峻晃[1]，市野澤大[1]，朝日貴大[1]，浅野賢治[3]，野田高弘[3]，島田浩章[1]　([1]東京理科大・基礎工・生物工，[2]現:京大・生存研，[3]農研機構・北海道農業研究センター)

3E8p08　多様な作物のゲノム編集研究に活用できる人工気象機を用いた簡便高密度水耕栽培法
15:17　○黒田昌治　(農研機構中央農研)

3E8p09　ゲノム編集技術を用いた多重遺伝子破壊による単細胞性緑藻 (*Coccomyxa*) の油脂生産性改良
15:28　○井出曜子[1]，早川准平[2]，吉満勇也[1]，糠塚　明[1]，小松さと子[1]，今村壮輔[2,3]，原山重明[2]　([1](株)デンソー，[2]中央大，[3]東工大)

3E8p10　ポリフェノールを多く含む植物の培養細胞を用いた flavan-3-ol 誘導体合成
15:39　○小堀　亮[1]，西村拓哉[1]，多賀大輝[2]，橋本誠也[2]，輿水　駿[2]，川崎　崇[3]，齊藤安貴子[1,2]　([1]大阪電気通信大学大学院工学研究科先端理工学専攻，[2]大阪電気通信大学工学部環境科学科，[3]京都大学生存圏研究所)

p11〜p15 発表者の接続時間 15:50〜16:00

3E8p11　青色 LED 光を使用して栽培したラズベリー中のポリフェノール成分変化
16:00　○橋本誠也[1]，輿水　駿[1]，小堀　亮[2]，多賀大輝[1]，辻　一成[1]，川崎　崇[3]，齊藤安貴子[1,2]　([1]大阪電気通信大学工学部環境科学科，[2]大阪電気通信大学大学院工学研究科先端理工学専攻，[3]京都大学生存圏研究所)

3E8p12　カルビン回路およびワックスエステル発酵経路の律速酵素遺伝子を同時導入したユーグレナの分子育種
16:11　○田茂井政宏[1,2]，西川由依菜[1]，井上勝太[1]，岡村桃子[1]，作山治美[1]，石川孝博[3]，重岡　成[1]　([1]近畿大農，[2]近畿大アグリ技研，[3]島根大生物資源)

3E8p13　日本生まれのフレーバーホップ「ソラチエース」の交配株における高ゲラン酸ホップの探索
16:22　○久慈正義[1]，實方綾子[2]，谷川篤史[1]，蛸井　潔[1]，大串憲祐[1]，須田成志[1]　([1]サッポロビール(株)，[2]サッポロホールディングス(株))

3E8p14　*Pseudomonas putida* 由来 *enoyl-CoA hydratase/aldolase* を導入したタケ培養細胞の作出
16:33　○北岡直樹[1,2]，中畑未来[2]，野村泰治[1,2]，荻田信二郎[3]，加藤康夫[1,2]　([1]富山県立大・生工研セ，[2]富山県立大・生物工，[3]県立広島大・生命科学)

3E8p15　アブシジン酸はタバコ BY-2 細胞の増殖と細胞死を共に抑制するがタンパク質の分泌は妨げない
16:44　○井上智晴[1]，ガリスイヴァン[2]，小田大和人[3]，松岡　健[1,2,3,4]　([1]九大農，[2]理研植物センター，[3]九大院生資源，[4]九大院農)

講演番号
開始時間　　演　題　　発表者氏名(所属)

B1 会場　午前の部(9:00〜12:05)

食品―食品機能・栄養 - メタボリック・シンドローム，エネルギー代謝／食品機能・栄養 - 脂質代謝／食品機能・栄養 - タンパク質・アミノ酸代謝―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

4B1a01　加工により水溶性食物繊維比率を変化させた昆布が食餌性肥満に及ぼす影響
9:00　○紙谷年昭[1]，東条由花[1]，岡田　香[1]，鈴木利雄[1]，山中千恵美[2]，戸田登志也[3]，青江誠一郎[2]　([1]フジッコ株式会社，[2]大妻女子大学，[3]武庫川女子大学)

4B1a02　モリンガ葉抽出物を用いた抗肥満効果
9:11　○耿　紅敏，中村唱乃，山津敦史，坂下真耶，金　武祚(株式会社ファーマフーズ)

4B1a03　ツバキ *Camellia japonica* 種子抽出物による抗肥満作用
9:22　○落合　優[1]，野崎　勉[2]，加藤正樹[2]，石原健夫[2]　([1]北里大獣医，[2]ビーエイチエヌ株式会社)

4B1a04　メタボローム解析を用いたきのこの抗肥満効果の検証
9:33　○清水崇光[1]，森光一郎[1]，小林　仁[1]，都築　毅[2]　([1]ホクト株式会社，[2]東北大院・農)

4B1a05　ピセアタンノール摂取が閉経後モデルマウスの肥満に及ぼす影響
9:44　○塩越美春[1]，川和理恵[2]，石川朋子[3]，森　貞夫[5]，守田　稔[5]，市　育代[3,4]，藤原葉子[3,4]　([1]お茶大院・ライフサイエンス，[2]お茶大・食物，[3]お茶大・HLI研，[4]お茶大・基幹研究院，[5]森永製菓(株))

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4B1a06　大豆加水分解物は PKA 経路の活性化に寄与することで脂肪細胞でのイソプロテレノール刺激による脂肪分解を亢進する
10:05　○ンスーピン[1]，野村　亘[1,2]，高橋春弥[1]，毛利晋輔[1]，ジェンフェイフェン[1]，荒　　武[1]，永井宏幸[3]，伊藤哲朗[3]，河田照雄[1,2]，後藤　剛[1,2]　([1]京都大学　大学院農学研究科　食品生物科学専攻，[2]京都大学　学際融合教育研究推進センター　生理化学研究ユニット，[3]岐阜県保健環境研究所)

4B1a07　Evaluation on anti-obesity potential of Thai medical plants with *in vitro* methods
10:16　○Wijitrapha RUANGARAM，Eisuke KATO (Hokkaido Univ., Grad. school of Agric., Lab. of Food Biochem.)

4B1a08　低栄養状態がマウス由来前駆脂肪細胞の脂肪蓄積と MMPs 発現に及ぼす影響
10:27　○岩本和子[1]，吸原慧紀[1]，財満信宏[1,2]，森山達哉[1,2]　([1]近畿大農，[2]近畿大アグリ技研)

4B1a09　マウス骨髄由来間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化に及ぼす乳脂肪球皮膜摂取の影響
10:38　○菊池優貴[1]，佐野あかり[1]，山田　潔[1]，東　徳洋[1]，元島英雅[2]　([1]宇大農，[2]よつ葉乳業)

4B1a10　マウス骨髄由来造血幹細胞の破骨細胞への分化に及ぼす乳脂肪球皮膜摂取の影響
10:49　○佐野あかり[1]，菊池優貴[1]，北島元樹[1]，山田　潔[1]，元島英雅[2]，東　徳洋[1]　([1]宇都宮大農，[2]よつば乳業)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

4B1a11　ブラジル生薬アンディローバ（*Carapa guianensis*）由来リモノイド成分の脂肪代謝促進作用およびその作用機序の解明
11:10　○長友暁史[1]，二宮清文[1,2]，丸本真輔[3]，酒井千恵[1]，村岡　修[1,2]，菊池　崇[4]，山田剛司[4]，田中麗子[4]，森川敏生[1,2]　([1]近畿大・薬総研，[2]近畿大・アンチエイジングセ，[3]近畿大・共同利用セ，[4]大阪薬大)

4B1a12　茶カテキン（EGCG）による低密度リポタンパク質受容体活性化に 67 kDa ラミニン受容体は関与しない
11:21　○残華久美子，川口勇矢，岡田雄大，長岡　利　(岐阜大自然科学)

4B1a13　オートファジーを指標にした食品の機能性評価に関する研究
11:32　○山越正汰[1]，諸富勝成[2]，有賀　幸[2]，原　太一[1]　([1]早稲田大学 人間科学学術院健康福祉科学科　細胞制御学・食品生命科学研究室，[2]天真堂株式会社)

4B1a14　セリン欠乏による Phgdh KO マウス線維芽細胞でのミトコンドリア機能異常の誘発
11:43　○松尾優樹[1]，原口祐里奈[1]，濱野桃子[1]，尾上詩織[1]，片倉喜範[1]，古屋茂樹[1,2]　([1]九大農，[2]九大イノベイティブバイオアーキテクチャーセンター)

4B1a15　コラーゲン由来ペプチドの投与がマウスの皮膚創傷治癒に与える影響の解析
11:54　○佐藤侑紀，須永真実，水重貴文，蕪山由己人　(宇都宮大農)

B2 会場　午前の部(10:05〜12:05)

食品―食品化学 - 色素，香料／食品化学 - その他―

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4B2a06　新規な迅速スクリーニング法によるポリフェノール－金属イオン間相互作用の網羅的解析
10:05　藤本和史，守岩友紀子，森岡和大，東海林敦，○柳田顕郎(東薬大薬)

4B2a07　ツタンカーメンエンドウの抗酸化成分の同定および調理による抗酸化性の変化
10:16　○近藤(比江森)美樹，上原穂野香，新家大輔　(徳島文理大人間生活)

4B2a08　コーヒー飲料の品質劣化に対する乳化型抗酸化製剤の作用
10:27　清水育実，○門脇章夫，大久保泰宏　(太陽化学株式会社)

4B2a09　味センサーを用いた碁石茶の味の可視化と解明
10:38　○大塚祐季[1]，森山洋憲[2]，下藤　悟[2]，有田　光[1]，阪地満帆[1]，柏木丈拡[1]，島村智子[1]，受田浩之[3]　([1]高知大・農，[2]高知県工技セ，[3]高知大・地域創造セ)

4B2a10　徳島県伝統後発酵茶阿波番茶の年次傾向について
10:49　○内野昌孝[1]，越智晶子[2]，小山翔大[3]，辻井良政[2]，高野克己[2]　([1]東農大生命，[2]東農大応生，[3]東農大院農学)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

4B2a11　青山緑水に含まれるモノテルペン配糖体による白血球型 12-リポキシゲナーゼの不可逆的阻害
11:10　○川上祐生，大槻朱美，森　香子，神崎圭太，山本登志子，伊東秀之，高橋吉孝　(岡山県大)

4B2a12　Identification of novel S-conjugates generated between thiol compounds and oxidized betacyanins from Basella alba L. fruits
11:21　○Agnieszka KUMORKIEWICZ，Slawomir WYBRANIEC　(Cracow University of Technology)

4B2a13　Thermal degradation and antioxidant potential of major betacyanin pigments in extracts of red Gomphrena globosa L. flowers
11:32　○Natalia SZMYR，Slawomir WYBRANIEC　（Cracow University of Technology）

4B2a14　ポリ-γ-グルタミン酸の発酵生産においてカルシウムイオンが分子量に与える影響
11:43　○岩本七虹[1]，山口良弘[1,2]，荻田　亮[1,3]，田中俊雄[1]，藤田憲一[1]　（[1]阪市大院・理，[2]阪市大・複合先端，[3]阪市大・健康研セ）

4B2a15　高圧処理によるレスベラトロールの反応生成物とその生理活性
11:54　○本田沙理[1]，田口修己[1]，鹿島康浩[2]，松川泰治[2]，熊澤茂則[1]　（[1]静県大院薬食，[2]UHA味覚糖(株)）

B3 会場　午前の部（9:00〜12:05）

食品―食品工学 - 製造工学，加工学／食品工学 - 物性，分析―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

4B3a01　海藻アカモク粉末添加による製パン性への影響
9:00　○村上　香，平山祐貴，黒石唯人　（広島工大生命）

4B3a02　セルラーゼ製剤中に存在する新規凝乳酵素の同定およびアプリケーション
9:11　○小笠原準季，吉川　潤，堀口博文　（合同酒精(株)）

4B3a03　LC-MS/MS によるノコギリヤシエキスの分析と同等性評価
9:22　○関川貴寛[1]，木澤有希[1]，李　艶梅[2]　（[1]BGG Japan，[2]BGG）

4B3a04　保存期間および加熱温度が異なる豚肉の呈味および加熱香気成分のメタボローム解析
9:33　○田村祥雄[1,2]，岩藤伸治[1]，宮浦一騰[1]，Asikin Yonathan[2]，草野　都[2,3]　（[1]JA全農，[2]筑波大院・生命環境，[3]理研・CSRS）

4B3a05　魚肉加工品メタボローム解析のための前処理方法の検討
9:44　○小倉立己[1,2]，芦野祐尋[1,2]，門脇里恵[1]，佐藤美夢[1]，曽我朋義[1]，冨田　勝[1]，若山正隆[1]　（[1]慶應義塾大学 先端生命科学研究所，[2]公益財団法人 庄内地域産業振興センター）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4B3a06　キャピラリー粘度計と精密密度計を用いた糖アルコールの水和パラメータ h
10:05　○佐藤之紀[1]，宮脇長人[2]　（[1]弘前大農生科，[2]石川県大生資環）

4B3a07　自己駆動型クーロメトリーを用いたアスコルビン酸測定法の開発
10:16　○三木功次郎，多田佳奈枝，石丸裕士，北村　誠，直江一光　（奈良工業高等専門学校）

4B3a08　錠剤の嚥下性評価のためのヒトを介さない評価手法の検討
10:27　○根岸辰成[1]，竹井裕介[2]，森川琢海[1]，阪田哲郎[1]，山口和也[1]，下山　勲[3]　（[1]株式会社東洋新薬，[2]産業技術総合研究所，[3]東京大学）

4B3a09　ナスコリンエステル非破壊定量法の開発
10:38　○鈴木美穂[1]，猪野亜矢[2]，和具なおみ[1]，原田裕斗[1]，野澤周吾[1]，深谷茜音[1]，石井敬子[2]，高橋昭彦[2]，中村浩蔵[1]　（[1]信州大農，[2]高知県農業技術センター）

4B3a10　ナスコアコレクション中のコリン化合物含有量調査
10:49　○深谷茜音[1]，宮武宏治[2]，齊藤猛雄[2]，和具なおみ[1]，原田裕斗[1]，中村浩蔵[1]　（[1]信州大学，[2]農研機構　野菜花き研究部門）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

4B3a11　国産各種ブランド米の食味評価方法の開発
11:10　○大坪研一，朝妻　聖，中村澄子　（新潟薬大）

4B3a12　良食味米飯の咀嚼筋筋電図における品種と摂食条件の影響
11:21　○神山かおる　（農研機構食品研究部門）

4B3a13　米菓咀嚼中の食塊物性変化と口どけ感の経時的官能評価の関係
11:32　○細井友加里[1]，山谷健太[2]，竹井　亮[2]，鷲尾英明[2]，勝野那嘉子[3]，西津貴久[3]　（[1]岐阜大院，[2]亀田製菓株式会社，[3]岐阜大）

4B3a14　脱アセチル化と加熱操作がコンニャクの冷凍劣化に及ぼす影響
11:43　○宝門祐樹，勝野那嘉子，西津貴久　（岐阜大学大学院）

4B3a15　ゴボウの加熱による軟化し難さとペクチンの関係
11:54　○井上竜一　（(公財)東洋食品研究所）

B4 会場　午前の部（9:11〜12:05）

食品―食品機能・栄養 - ビタミン・ミネラル／食品機能・栄養 - 酸化，抗酸化，糖化，抗糖化，老化／食品機能･栄養 - 神経，内分泌 ，味覚・食欲―

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

4B4a02　破骨細胞および骨芽細胞の分化に及ぼす PQQ およびキノン化合物の影響
9:11　○小林未侑[1]，外山博英[2]，橘信二郎[2]　（[1]鹿大院・連合農，[2]琉球大・農）

4B4a03　ヒト小腸由来コンジュガーゼ組換え酵素の調製と葉酸定量への応用
9:22　○小関喬平[1]，小川雄司[2]，美藤友博[1,2]，薮田行哲[1,2]，渡邊文雄[1,2]　（[1]鳥取大院持続性社会創生科学研究科，[2]鳥取大農）

4B4a04　選択的沈殿法を用いた大豆全粒粉末からの DDMP 型大豆サポニンの単離ならびに亜鉛トランスポーター ZIP4 誘導活性の検証
9:33　○高橋正和[1]，金田啓太郎[1]，髙田佳尭[1]，神戸大朋[2]，片野　肇[1]　（[1]福井県大生物資源，[2]京大院生命）

4B4a05　鉄欠乏が肝臓中銅制御分子群の発現に及ぼす影響
9:44　○塙　信彰，井上博文，勝間田(坪井)理恵，高橋信之，上原万里子　（東農大院農）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4B4a06　乾燥粉末化によるコマツナのルテイン含量変化
10:05　○石本太郎[1]，馬場　隆[2]，野田誠司[1]　（[1]東京都立食技セ，[2]東京都農総研）

4B4a07　線虫 C.elegans を用いたタンパク質凝集を抑制するアーユルヴェーダハーブの探索
10:16　○夏井真衣子[1]，西本暢尭[2]，高氏裕貴[2,3]，山上義巳[2]，ホサインモハマド[2,3]，三木健輔[2,3]，鮎沢　大[2,3]，藤井道彦[1,2]　（[1]横浜市大国際総合，[2]横浜市大生命ナノシステム，[3]イチバンライフ(株)）

4B4a08　異物抱合酵素発現酵母菌体を用いたスチルベン化合物の抱合代謝物の酵素合成
10:27　○中山　舞[1]，西川美宇[2,3]，安田佳織[2]，鎌倉昌樹[1]，深谷圭介[1]，占部大介[1]，榊　利之[2]，生城真一[1]　（[1]富山県大・工・生工，[2]富山県大・工・医工，[3]TOPUバイオ研究所）

4B4a09　ラットにおけるフェノフィブラート投与による外因性酸化コレステロールの抱合化と排出の変動
10:38　○加藤慧士，中堀紘花，石川航也，長田恭一　（明治大農）

4B4a10　ヒト腸内細菌によるクルクミン代謝に関する化学的研究 (2)
10:49　○丹羽利夫[1]，横山慎一郎[2]，望月美佳[3]，大澤俊彦[3]　（[1]修文大健康栄養，[2]岐阜県産業技術セ，[3]愛知学院大心身科学）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

4B4a11　鉄欠乏マウスにおける酸味細胞の変化
11:10　○奥野葉月，藍原祥子　（神戸大農）

4B4a12　Tas2r125 はマウス口腔内においてカテキンの苦味を検出する主要な味覚受容体として機能する
11:21　○成川真隆，三坂　巧　（東大院農生科・応生化）

4B4a13　高脂肪食摂取マウスにおける社会記憶の低下と末梢オキシトシン投与による社会記憶改善効果
11:32　○林遼太郎[1,2]，日出間志寿[2]，福光　聡[1]，仲川清隆[2]，西森克彦[2]　([1]日本製粉(株)，[2]東北大院農)

4B4a14　マウスを用いた食品の嗜好形成過程における報酬効果を評価するオペラント試験の確立
11:43　○安田文香，米田武志　（畿央大院 健康科学研究科）

4B4a15　抹茶の継続摂取がマウスの社会心理的ストレス負荷後の情動応答に与える影響
11:54　○物部真奈美，野村幸子，江間かおり，堀江秀樹　（農研機構）

B5 会場　午前の部(9:11〜11:43)

食品―食品機能・栄養 - 免疫，炎症，アレルギー・アレルゲン―

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

4B5a02　種々の濃度の PMA および ionomycin 処理による T 細胞の活性化およびアナジー化の誘導
9:11　○平野裕子，服部　誠，好田　正　（東農工大）

4B5a03　レチノイン酸合成酵素 RALDH2 を介したフラボノールによる腸管免疫の恒常性維持
9:22　○八代拓也，綿貫優実，山口昌樹，西山千春　（東理大基礎工）

4B5a04　サントル（*Sandoricum koetjape*）から単離したセンチュール酸の抗炎症作用
9:33　○伊藤智広[1]，桂山航輔[2]，二ノ宮真之[3]，纐纈　守[3]　([1]三重大院生資，[2]三重大資，[3]岐阜大工)

4B5a05　大腸炎モデルマウスにおけるライチ由来低分子プロシアニジン化合物 Oligonol® の大腸炎予防効果
9:44　○依田浩樹[1]，林　洪太[1]，長田恭一[1]，高成　準[2]，北館健太郎[2]　([1]明治大院農，[2]株式会社アミノアップ化学)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4B5a06　食用菊「阿房宮」および「延命楽」花弁ヘキサン抽出物のミクログリアにおける TNF-α 産生に及ぼす影響の比較
10:05　○若生　豊[1]，佐川保乃香[1]，米内真里奈[1]，馬　東建[2]，仁科淳良[3]　([1]八工大工，[2]新疆大生命，[3]日大理工)

4B5a07　乾癬モデルマウスは腸管のバリア損傷と炎症を引き起こす
10:16　○中野智裕，山本祥也，鈴木卓弥　（広大院生物圏）

4B5a08　慢性腎臓病における腸管バリア損傷の作用機序の探索
10:27　赤谷俊亮，山本祥也，○鈴木卓弥　（広大院生物圏）

4B5a09　アントシアニジン類による GPR35 の活性化
10:38　○若林万由香[1]，ローウェイチー[1]，下村沙也子[1]，中島史恵[1]，井上飛鳥[2]，青木淳賢[2]，内田浩二[3]，柴田貴広[1]　([1]名大院生命農，[2]東北大院薬，[3]東大院農生科)

4B5a10　Identification of GPR35 agonist in common herbs and spices
10:49　○Wei Qi LOH[1], Mayuka WAKABAYASHI[1], Sayako SHIMOMURA[1], Fumie NAKASHIMA[1], Inoue ASUKA[2], Junken AOKI[2], Koji UCHIDA[3], Takahiro SHIBATA[1]　([1]Grad. Sch. of Bioagric. Sci. Nagoya Univ., [2]Grad. Sch. of Pharm. Sci. Tohoku Univ., [3]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., The Univ. of Tokyo)

a11〜a13 発表者の接続時間 11:00〜11:10

4B5a11　タモギタケ中 β1,6 グルカンの M2 マクロファージ分化誘導作用
11:10　○湊健一郎　（名城大院農）

4B5a12　*Lactobacillus plantarum* OLL2712 株が腸管免疫系樹状細胞および脂肪組織由来間質血管細胞群に与える影響
11:21　○王イバイ，高野智弘，遠藤龍之助，足立(中嶋)はるよ，八村敏志　（東大院農生科・食の安全研セ）

4B5a13　母親の高脂肪食摂取が子の Paneth 細胞 α-defensin による腸内環境制御に与える影響
11:32　○杉本理菜[1]，中村公則[1,2]，嶋　七海[1]，清水由宇[1]，横井友樹[1]，綾部時芳[1,2]　([1]北大・生命科学・自然免疫，[2]北大・先端生命・細胞生物科学・自然免疫)

C1 会場　午前の部(9:00〜12:05)

食品―食品機能・栄養 - その他―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

4C1a01　低用量のこんにゃくセラミド摂取による肌機能改善効果の検証
9:00　○高橋香織[1,2]，三上大輔[2]，向井克之[1]，五十嵐靖之[2]　([1](株)ダイセル，[2]北大)

4C1a02　モリンガエキス配合化粧品塗布による肌機能改善効果
9:11　○中村唱乃[1]，庄屋雄二[1]，山津敦史[1]，坂下真耶[1]，齋藤洋子[2]，玉城美根子[2]，金　武祚[1]　([1](株)ファーマフーズ，[2](株)シャルレ)

4C1a03　藻類含有人工飼料給餌によるカイコ生育への影響および絹糸の化粧品素材としての可能性
9:22　○杉本良太，阿閉耕平，三輪由布子，橋本祐佳，中島綾香，岩田　修，鈴木健吾　（株式会社ユーグレナ）

4C1a04　トマト種子抽出物および含有サポニンの皮膚細胞外マトリックスに及ぼす効果
9:33　○竹田翔伍[1]，山田和佳奈[1]，中村誠宏[2]，松田久司[2]，下田博司[1]　([1]オリザ油化(株) 研究開発本部 食品開発部，[2]京薬大 生薬)

4C1a05　肝臓遺伝子発現による自然薯ムカゴ粉末および抽出物摂取効果の検証
9:44　○篠崎文夏[1]，山下治之[1]，亀井飛鳥[1]，嶋田耕育[1]，野原正勝[1]，荒井綜一[1,2]，阿部啓子[1,3]　([1]KISTEC，[2]東農大，[3]東大院農生科)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4C1a06　高脂肪食マウスの血中コレステロールおよび中性脂肪に及ぼす微細藻類 *Nannochloropsis* 摂取の影響
10:05　○石田　財，滝口泰之　（千葉工大工）

4C1a07　GABA 摂取による持久運動能力増強効果
10:16　○山田裕晃[1]，ホッサインマッドサダム[1]，ウォンカールーン[1]，嵯峨根里穂[1]，山津敦史[1]，金　武祚[1]，青井　渉[2]　([1]株式会社ファーマフーズ，[2]京都府立大学大学院生命環境科学研究科)

4C1a08　モリンガ種子抽出物の抗疲労効果の検証
10:27　○清水一雄[1]，杉浦和彦[1]，中田理恵子[2]，井上裕康[2]　([1]太陽化学(株)，[2]奈良女子大学・食物栄養)

4C1a09　マルトビオン酸は卵巣摘出マウスの骨量減少を抑制する
10:38　○西尾彩花[1]，中村保奈美[2]，中川　大[2]，渡辺章夫[3]，米澤貴之[3]，禹　済泰[2]，末廣大樹[4]，阿部秀飛[4]，深見　健[4]，大西素子[1,2]　([1]中部大院応生，[2]中部大応生，[3]中部大生機研，[4]サンエイ糖化(株))

4C1a10　骨代謝細胞に対するクベバコショウ由来リグナン化合物の作用
10:49　○米澤貴之[1]，宇田初音[2]，戸井田佳子[2]，林　忍弥[2]，遠藤由貴[3]，渡辺章夫[1]，禹　済泰[2,3]　([1]中部大生機研，[2]中部大応生，[3]中部大院応生)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

4C1a11　エクオール産生におよぼす胆汁酸の影響
11:10　○吉岡寛子[1]，渡辺真通[2]，難波文男[2]，鈴木利雄[2]，吹谷　智[3]，横田　篤[3]，戸田登志也[1]　([1]武庫川女子大，[2]フジッコ株式会社，[3]北大院農)

4C1a12　G protein-coupled receptor を介した curcumin のシグナル伝達機構について
11:21　○奥山真衣[1]，寺岡佳晃[1]，原田直樹[1]，五島直樹[2]，乾　　隆[1]，乾　　博[3]，山地亮一[1]　([1]大阪府大院・生命環境，[2]産総研，[3]大阪府大・栄養)

4C1a13　ウィンターセイボリー摂取後のヒトの体温変化への口腔・咽頭内刺激の影響
11:32　○森　紀之[1,2]，増田秀樹[3]，深尾奈央[2]，小林里穂[2]，蜂須賀祥子[3]　([1]同女大・生活科学，[2]滋賀県大・人間文化，[3]小川香料株式会社・舞浜研究所)

4C1a14　サツマイモ焼酎及び焼酎油におけるアミロイド β 誘発記憶障害モデルマウスに対する改善作用
11:43　○章　　超，河野邦晃，岩井謙一　(霧島酒造)

4C1a15　糸状菌の菌体破砕処理が菌体内二次代謝産物の人工消化液による抽出性に及ぼす影響
11:54　○高橋勇太郎，李　宗霏，早川　徹，若松純一，玖村朗人(北大院農)

C2 会場　午前の部(9:00〜10:49)

微生物―細胞 - 栄養，生育，増殖―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

4C2a01　メチオニン代謝が関与する GTP 生合成の新規な制御機構の解析
9:00　○大坂夏木[1]，高田　啓[2]，兼崎　友[3]，門屋亨介[4]，田口精一[1]，吉川博文[1]，朝井　計[1]　([1]東農大院，[2]Umea Univ. MIMS，[3]静岡大 グリーン科学技研，[4]東大・農生科)

4C2a02　枯草菌 RNAP の iNTP に対する嗜好性の解析
9:11　○渡辺愛美[1]，円谷優佑[1]，大坂夏木[1]，吉川博文[1]，朝井　計[1]，兼崎　友[2]　([1]東農大農，[2]静岡大・グリーン科学技術)

4C2a03　大腸菌高保存性レスポンスレギュレーターファミリーの適応増殖能における役割
9:22　○三宅裕可里，菅原真悟，山本兼由　(法政大院理工, 生命)

4C2a04　深海好圧性細菌 *Shewanella violacea* ゲノムにコードされた 4 種のペプチド輸送体の大腸菌内発現と機能解析
9:33　○根來将吾[1]，吉村歩佳[1]，翠川雄斗[1]，加藤千明[2]，阿部文快[1]　([1]青山学院大理工，[2]海洋研究開発機構)

4C2a05　*Methylobacterium extorquens* AM1 の環境温度変化適応における時計遺伝子ホモログ KaiC の関与
9:44　○吉田裕介，由里本博也，阪井康能　(京大院農)

a06〜a09 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4C2a06　二重層マイクロカプセルを用いた細菌集団の細胞分布制御
10:05　○髙橋晃平[1]，豊福雅典[2,3]，小川和義[2]，野村暢彦[2,3]，Utada Andrew[2,3]　([1]筑波大学・生命環境学群，[2]筑波大学・生命環境系，[3]筑波大学・微生物サスティナブル研究センター)

4C2a07　マイクロ流体デバイスを用いたプロバイオティクス細菌のカプセル包括法の開発
10:16　○釣流香織[1]，尾花　望[2,3]，小川和義[4]，野村暢彦[3,4]，Andrew S. UTADA[3,4]　([1]筑波大学・生命環境，[2]筑波大学・医学医療系・トランスボーダー医学研究センター，[3]筑波大学・微生物サステイナビリティ研究センター，[4]筑波大学・生命環境系)

4C2a08　ミニセルからの大腸菌の再生
10:27　○小林英城　(海洋機構)

4C2a09　金属イオンがバクテリアスフェロプラストの巨大化に与える影響
10:38　○西田洋巳，西野弘起　(富山県大工)

C3 会場　午前の部(9:00〜12:05)

微生物―細胞 - 構造，オルガネラ，小胞，分泌，細胞構成分子―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

4C3a01　糸状菌胞子の新規な高生産プロセスの開発
9:00　○杉本恭子，小田　忍　(金沢工大ゲノム研)

4C3a02　Discovery of a novel gelsolin-like protein regulating septum formation in filamentous fungi
9:11　○Md. Abdulla Al MAMUN[1]，Takuya KATAYAMA[1,2]，Jun-ichi MARUYAMA[1,2]　([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, The Univ. of Tokyo)

4C3a03　麹菌 *Aspergillus oryzae* の持つ PQ-loop タンパク質の機能解析
9:22　○冨田直治[1]，吉田　稔[1,2,3]，有岡　学[1,2]　([1]東大院・農生科・応生工，[2]東大・微生物連携機構，[3]理研環境資源セ)

4C3a04　麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるヌクレオファジーの分子機構の解析
9:33　○湯浅　晶[1]，菊間隆志[2]，吉田　稔[1,3,4]，有岡　学[1,3]　([1]東大院・農生科，[2]立命館大・生命科，[3]東大・微生物連携機構，[4]理研環境資源セ)

4C3a05　*Corynebacterium glutamicum* NCgl1221 メカノセンシティブチャネルの細胞内局在
9:44　○飯塚有紀，小槌龍介，岩井伯隆，和地正明　(東工大生命)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4C3a06　低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 におけるエイコサペンタエン酸修飾タンパク質の探索
10:05　○米田雄紀，徳永智久，川本　純，小川拓哉，栗原達夫(京都大学　化学研究所)

4C3a07　有機塩素系殺虫剤の微生物分解に関わる MCE superfamily タンパク質 LinM はホモオリゴマー複合体を形成する
10:16　○尾形拓哉，中鉢千尋，佐藤優花里，大坪嘉行，津田雅孝，永田裕二　(東北大学)

4C3a08　クテドノバクテリア *Dictyobacter aurantiacus* S27 株の形態分化とゲノム及び二次代謝の特徴
10:27　○鄭　　宇[1]，王　瓊渼[1]，齋藤彩菜[2]，酒井康輝[1]，阿部敬悦[1]，横田　明[1]，矢部修平[1]　([1]東北大院農，[2]東北大学農学部)

4C3a09　発酵食品に関する微生物のメンブランベシクルの特性の解明
10:38　○倉田淳志[1]，清原昇悟[1]，宮崎綾乃[1]，三好柚紀[2]，山崎思乃[3]，今井友也[4]，栗原達夫[5]，上垣浩一[1]　([1]近大農，[2]関西大院理工，[3]関西大化生工，[4]京大生存研，[5]京大化研)

4C3a10　深海底泥由来単離株 51-CS のメンブランベシクルの特性解明
10:49　○福井瑞季[1]，倉田淳志[2]，三好柚紀[3]，山崎思乃[4]，今井友也[5]，栗原達夫[6]，上垣浩一[2]　([1]近大院農，[2]近大農，[3]関西大院理工，[4]関西大化生工，[5]京大生存研，[6]京大化研)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

4C3a11　枯草菌における membrane vesicle の生産制御機構
11:10　○安部公博[1]，尾花　望[2]，豊福雅典[1]，野村暢彦[1]　([1]筑波大生命環境，[2]筑波大 医学医療)

4C3a12　Corynebacterium glutamicum における membrane vesicles 産生メカニズムの解析
11:21　○永久保利紀[1]，野村暢彦[1,2]，豊福雅典[1,2]　([1]筑波大・生命環境系，[2]筑波大学・微生物サステイナビリティ研究センター)

4C3a13　細菌 *Clostridium thermocellum* のメンブランベシクル生産とセルロース分解能への寄与
11:32　○市川俊輔[1]，小川　覚[2]，西田郁美[3]，小林柚姫[1]，黒澤俊人[4]，苅田修一[5]　([1]三重大教，[2]三重大医，[3]三重大院教，[4]三重大先端，[5]三重大院生資)

4C3a14　細胞外環境に応答した推定センサータンパク質を介する細菌のベシクル生産制御
11:43　○横山文秋[1]，川本　純[1]，陳　　晨[1]，今井友也[2]，栗原達夫[1]　([1]京大・化研，[2]京大・生存研)

4C3a15　低温菌 *Pseudoalteromonas* sp. Sq02 株を宿主としたタンパク質低温分泌生産システムの構築と応用
11:54　○河合総一郎，Puti Wanguyu Aken，川本　純，小川拓哉，栗原達夫　(京大化研)

C4 会場　午前の部(9:00〜12:05)

微生物―遺伝子 - 発現制御，トランスクリプトーム―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

4C4a01　超低栄養性細菌におけるアルデヒド脱水素酵素遺伝子（*aldA*）の発現制御
9:00　○池ヶ谷凌士[1]，加藤弘将[2]，新谷政己[1,2]，吉田信行[1,2]　([1]静大院・総合科技，[2]静大・工)

4C4a02　*Comamonas testosteroni* TA441 における好気呼吸の末端酸化酵素の発現制御
9:11　○新井　凌，亀谷将史，石井正治，新井博之　(東大院・農生科)

4C4a03　*Shewanella oneidensis* のバイオフィルム形成と電流生成を制御する ECF シグマ因子の同定
9:22　○古賀亮太，高妻篤史，渡邉一哉　(東薬大生命)

4C4a04　pH sensitive transcriptional regulator in acetic acid bacteria
9:33　○Afi Candra TRINUGRAHA[1]，Yuri ISHII[1]，Yuki SHIGE[1]，Naoki AKASAKA[2]，Wakao FUKUDA[1]，Shinsuke FUJIWARA[1]　([1]Kwansei Gakuin Univ. of Grad. Sch. Sci. Technol.，[2]Marukan Vinegar Co., Ltd.)

4C4a05　高度好熱菌 *Thermus thermophilus* を用いた異種タンパク質発現システム
9:44　○末松佑梨，藤野泰寛，土居克実　(九大院農)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4C4a06　酵母 D-アスパラギン酸オキシダーゼ遺伝子発現における酸性アミノ酸パーミアーゼの機能解析
10:05　○今西大生，阿部勝正，解良芳夫，高橋祥司　(長岡技大院工)

4C4a07　酵母 *Komagataella phaffii* の一細胞解析によるメタノール誘導性遺伝子発現制御機構の解析
10:16　○竹谷友之，由里本博也，阪井康能　(京大院農)

4C4a08　糸状菌 *Trichoderma reesei* における分泌プロテアーゼの発現制御機構の解析
10:27　○鈴木義之[1]，ダラナガマナヤニ[1]，志田洋介[1]，森　一樹[2]，油谷幸代[3]，小笠原渉[1]　([1]長岡技科大，[2]鹿児島高専，[3]産総研)

4C4a09　二量体化タグを用いた糸状菌転写因子の結合部位のゲノムワイド解析
10:38　○石原悠平[1]，岡　大椰[1]，丸山潤一[2,3]，兒島孝明[1]，中野秀雄[1]　([1]名大院・生命農，[2]東大院・農生科・応生工，[3]東大・微生物連携機構)

4C4a10　麹菌のオリゴペプチドトランスポーターの同定と発現制御機構の解析
10:49　○田中瑞己[1]，伊藤圭祐[1]，河原崎泰昌[1]，五味勝也[2]　([1]静県大食栄，[2]東北大農)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

4C4a11　麹菌 Aspergillus oryzae と Aspergillus nidulans 間におけるエノラーゼ遺伝子の異なる選択的転写開始点使用法
11:10　○井上大志，新谷尚弘，五味勝也　(東北大農)

4C4a12　黄麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるペプチダーゼの機能分化とその転写調節に窒素源が与える影響
11:21　○白石敦士，前田　浩，山形洋平　(東農工大農)

4C4a13　共ゲノム編集法を利用した麹菌の有用二次代謝産物（コウジ酸）の生産制御
11:32　○弓場一輝[1,2]，織田　健[2]，和田悠作[3]，岩下和裕[1,2]　([1]広大院先端研，[2]酒総研，[3]株式会社ファスマック)

4C4a14　麹菌 *Aspergillus oryzae* の染色体重複株ライブラリーの作製と表現型の解析
11:43　○高橋　理，小山泰二　(野田産研)

4C4a15　マコモタケの共生・不稔に関わる遺伝子および化合物の探索
11:54　○青木大地[1]，謝　肖男[2]，崔　宰熏[3,4]，河岸洋和[3,4]，鈴木智大[2]　([1]宇都宮大学院・農，[2]宇都宮大・バイオ，[3]静岡大・農，[4]静岡大・グリーン研)

C5 会場　午前の部(9:11〜12:05)

微生物―遺伝子 - 構造，機能／遺伝子 - ゲノム解析，メタゲノム，プロテオーム，バイオインフォーマティクス―

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

4C5a02　アカパンカビにおける *ERCC1* ホモログ *mus-44* の機能解析 － DNA 鎖間架橋剤感受性と光回復能の異常の関連性－
9:11　○塚田耕太郎[1]，一石昭彦[2]，吉原亮平[1]，畠山　晋[1]，田中秀逸[1]　([1]埼玉大院・理工，[2]東洋大・生命科学)

4C5a03　*Sphingobium* 属細菌のリグニン・β-aryl ether 代謝に関与する glutathione *S*-transferase 遺伝子の同定と機能解析
9:22　○佐藤大輔，樋口雄大，上村直史，政井英司　(長岡技科大・生物)

4C5a04　*Sphingobium* sp. SYK-6 株におけるフェニルクマラン型化合物代謝に関与する lignostilbene α,β-dioxygenase 遺伝子の同定（第 2 報）
9:33　○増羽龍斗[1]，廣瀬優作[1]，高橋健司[1]，上村直史[1]，菱山正二郎[2]，政井英司[1]　([1]長岡技科大・生物，[2]森林総研)

4C5a05　*Sphingobium* 属細菌における β-1 型リグニン由来化合物の立体選択的代謝システム
9:44　○前川滉大[1]，小林将大[1]，樋口雄大[1]，上村直史[1]，菱山正二郎[2]，政井英司[1]　([1]長岡技科大・生物，[2]森林総研)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4C5a06　*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* に感染する溶菌ファージ Q1 の特性およびゲノム解析
10:05　○木室綾華，山迫彩華，藤野泰寛，廣政恭明，土居克実　(九大院農)

4C5a07　*Lactobacillus nodensis* における D-arabinose 代謝経路の解析
10:16　○堀江絢子，奥村友梨，ジョミン，荒添貴之，鎌倉高志　(東理大)

4C5a08　Identification of the electron transport components of the carbazole 1,9a-dioxygenase from the marine carbazole-degrading bacterium *Erythrobacter* sp. KY5
10:27　○Felipe VEJARANO[1]，Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1,2]，Yoshiyuki OHTSUBO[3]，Masataka TSUDA[3]，Kazunori OKADA[1]，Hideaki NOJIRI[1,2]　([1]BRC, UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Tohoku University)

4C5a09　紅麹3種の比較ゲノム解析から明らかになった Monascus pilosus NBRC4520 の食品応用有用性について
10:38　○比嘉悠貴[1]，金谷重彦[2]，金　英寿[1]，小野直亮[2]　([1]小林製薬中央研究所，[2]奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科)

4C5a10　熱ストレス下における *Zymomonas mobilis* の細胞伸長の解明
10:49　○遠藤　慧[1]，水木　徹[3]，三浦　健[1,2]　([1]東洋大院・生命科学，[2]東洋大学・生命科学，[3]東洋大学・バイオナノエレクトロニクス研究センター)

a11～a15 発表者の接続時間 11:00～11:10

4C5a11　陸棲藍藻の紫外線防御に関わる遺伝子と関連機能物質
11:10　○加藤　浩[1]，オン　碧[2]，木村駿太[2]，富田-横谷香織[2]　([1]三重大，[2]筑波大)

4C5a12　サンゴ共在細菌の環境因子予測に向けた *Endozoicomonas* 属の系統解析
11:21　○井手圭吾[1,3]，伊藤通浩[2]，藤村弘行[2]，中野義勝[2]，細川正人[4,5]，竹山春子[1,3]　([1]早大院・先進理工，[2]琉球大，[3]産総研・早大CBBD-OIL，[4]JST・さきがけ，[5]早大・理工総研)

4C5a13　ヒト毛根及び毛幹に付着する細菌の存在形態及び群集構造の解明
11:32　○渡辺康太[1]，西　英二[2]，田代幸寛[1]，酒井謙二[1]　([1]九大院・生資環，[2]大分科捜研)

4C5a14　メタゲノミクスによって機能的に差別化される南北太平洋低緯度域の微生物叢
11:43　○高見英人[1]，多田雄哉[1]，荒井　渉[1]，大久保卓[1]，小椋義俊[2]，林　哲也[2]，鈴木翔太郎[3]，浜崎恒二[3]　([1]海洋機構横浜研，[2]九大医，[3]東大大海研)

4C5a15　マルチオミクス解析によって明らかになった自然環境下での木材分解の多様性
11:54　○堀　千明[1,2]，ジルガスケル[2]，大井俊彦[1]，松本謙一郎[1]，ダンカレン[2]　([1]北海道大学，[2]USDA Forest Products Laboratory)

C7 会場　午前の部(9:00～12:05)

微生物―物質生産 - 醸造，発酵（一次代謝産物）―

a01～a05 発表者の接続時間 8:50～9:00

4C7a01　富有柿幼果の振とう発酵および発酵にともなう機能性の変化
9:00　○折居千賀　((公財)東洋食品研究所)

4C7a02　竹粉を利用した乳酸菌の増殖と筍発酵食品の開発
9:11　○前田　勇[1]，沢谷実里[1]，太田宏美[1]，根岸潤実[1]，若山太郎[2]　([1]宇都宮大農，[2]若山農場)

4C7a03　紀州なれずしの発酵工程における乳酸菌の役割
9:22　○久保実希，丹羽　諒，大野智生，水野智文，ヨラニシャプトリ，中川智行，岩橋　均　(岐大応生)

4C7a04　阿波晩茶の製造工程における乳酸菌の動態
9:33　○西岡浩貴[1]，水野智文[2]，岩橋　均[2,3]，堀江祐範[3,4]　([1]徳島県工技セ，[2]岐阜大院・自然科技，[3]岐阜大院・連合農学，[4]産総研・健康工学)

4C7a05　仕込み年度の異なる山廃酛における菌叢変遷および化学成分変化の比較
9:44　○辻　篤史[1]，児沢美幸[2]，徳田耕二[2]，小柳　喬[3]　([1]石川工試，[2](株)車多酒造，[3]石川県大食科)

a06～a10 発表者の接続時間 9:55～10:05

4C7a06　酵母 *Saccharomyces cerevisiae* におけるリジン高含有機構の解析
10:05　今西浩之，○豊川洋一，KOONTHONGKAEW Jirasin，杉本幸子，那須野亮，渡辺大輔，高木博史　(奈良先端大バイオ)

4C7a07　微生物発酵酒かすの成分解析
10:16　○鍋倉義仁，佐藤圭吾，金桶光起　(新潟県醸造試験)

4C7a08　嫌気処理による清酒粕葉酸減少抑制の培養酵母モデル構築と解析
10:27　○村上葉月[1,2]，原田春佳[1,2]，濱田涼子[1]，金井宗良[1]，藤井　力[1,2]　([1]酒総研，[2]広島大院生物圏)

4C7a09　清酒もろみで米麹酵素との共同作用によりフェルラ酸とフェルラ酸エチルの生成を促進する *Trichoderma* 属由来酵素の同定
10:38　伊藤俊彦[1]，佐藤杏奈[1]，高橋　樹[1]，伊藤貴人[1]，高野康人[1]，野下浩二[1]，奥田将生[2]，○橋爪克己[1]　([1]秋田県大生物資源，[2]酒総研)

4C7a10　長鎖アルコールは低溶解度のために生物作用を示さない
10:49　○松本惇志，寺島一郎，上園幸史　(東大院理)

a11～a15 発表者の接続時間 11:00～11:10

4C7a11　ビール発酵中におけるホップ添加が酵母へ及ぼす影響について
11:10　○土屋友理[1]，太田　拓[1]，小林　統[2]，善本裕之[1]，稲留弘乃[1]　([1]キリン・酒類研，[2]キリン・基盤研)

4C7a12　自然界より単離した酵母の醸造特性評価
11:21　○松家彩恵[1]，阪本鷹行[2]，岡久修己[3]，櫻谷英治[2]　([1]徳島大院・先端技術，[2]徳島大・生物資源，[3]徳島県工技セ)

4C7a13　醸造工程における醪中の清酒酵母の圧力不活性化挙動
11:32　○野村一樹[1]，片岡ちひろ[1]，池崎　南[2]，堀沙織里[1]，井口晃徳[1,2]，重松　亨[1,2]　([1]新潟薬大・応生科，[2]新潟薬大院・応生科)

4C7a14　清酒酵母から取得した圧力感受性清酒酵母株の圧力不活性化挙動の解析
11:43　○池崎　南[1]，野村一樹[2]，片岡ちひろ[2]，堀沙織里[2]，青木俊夫[3]，栗林　喬[3]，金桶光起[3]，井口晃徳[1,2]，重松　亨[1,2]　([1]新潟薬大院・応生科，[2]新潟薬大・応生科，[3]新潟県醸造試験場)

4C7a15　清酒酵母酢酸イソアミル高生産変異株の取得と解析
11:54　○小野塚悠[1]，池崎　南[1]，野村一樹[1]，青木俊夫[2]，栗林　喬[2]，金桶光起[2]，井口晃徳[1]，重松　亨[1]，山崎晴丈[1]，高久洋暁[1]　([1]新潟薬大・応生科，[2]新潟醸試)

D1 会場　午前の部(9:11～11:54)

微生物―代謝 - 代謝調節，発酵生理，メタボローム／物質生産 - 発酵(二次代謝産物，抗生物質，ペプチド，生理活性物質)―

a02～a05 発表者の接続時間 9:01～9:11

4D1a02　*Euglena gracilis* におけるワックスエステル代謝調節因子 WSRK の機能解析
9:11　○石井侑樹[1]，木村光宏[1]，小川貴央[1]，丸田隆典[1]，森　大[2,3]，石川孝博[1]　([1]島根大・生資科，[2]慶應大・先端生命研，[3]慶應大・政策・メディア)

4D1a03　*Euglena gracilis* におけるワックスエステル分解酵素 WEH パラログの機能評価
9:22　○駒井陽輔，小川貴央，丸田隆典，石川孝博　(島根大・生資科)

4D1a04　油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* 油脂低蓄積変異株の原因遺伝子の同定と解析
9:33　○酒井里佳子[1]，阿部紗也[1]，荒　学志[1]，山崎晴丈[1]，志田洋介[2]，小笠原渉[2]，矢追克郎[3]，森　一樹[4]，油谷幸代[4]，荒木秀雄[5]，田代康介[6]，高久洋暁[1]（[1]新潟薬大・応生科，[2]長岡技科大・工，[3]産総研生物プロセス，[4]産総研 CBBD-OIL，[5]不二製油グループ本社，[6]九州大 院生資環 遺伝子制御）

4D1a05　皮膚菌叢をコントロールするパルミトレイン酸を高濃度含有する油脂の *Saccharomyces cerevisiae* による生産
9:44　○永尾寿浩[1]，成廣和枝[2]，田中重光[1]，木村和義[3]，山下和彦[2]，神坂　泰[3]（[1]大阪技術研，[2]ヤエガキ発酵技研，[3]産総研）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4D1a06　糸状菌由来オレイン酸水和酵素遺伝子の機能解析
10:05　○村川直美[1]，上野このみ[2]，阪本鷹行[1]，安藤晃規[3]，岸野重信[3]，相馬悠希[4]，和泉自泰[4]，馬場健史[4]，小川　順[3]，櫻谷英治[1]（[1]徳島大院・先端技術，[2]徳島大・生物資源，[3]京大院農・応用生命，[4]九大・生医研）

4D1a07　ラビリンチュラ類を用いた外来遺伝子の導入による n-3 系高度不飽和脂肪酸代謝物の生産
10:16　○沖野　望[1]，花田理沙[2]，重常公彦[3]，堤圭一郎[3]，石橋洋平[1]，有田　誠[4]，伊東　信[1]（[1]九大院農，[2]九大院生資環，[3]九大農，[4]理研IMS）

4D1a08　光駆動 ATP 再生系を導入した Vmax 細胞の開発
10:27　弘埜陽子[1]，戸谷吉博[2]，石井　純[3]，柘植謙爾[3]，松田史生[2]，○原　清敬[1]（[1]静岡県大院・食品栄養環境・環境科学，[2]阪大院・情報・バイオ情報，[3]神戸大院・先端バイオ工学）

4D1a09　顕微ラマン分光法を用いたバイオフィルム中の PHA の非破壊解析
10:38　○重吉康平[1]，尾花　望[2]，重藤真介[1]（[1]関学大院理工，[2]筑波大院生命環境科学）

4D1a10　大腸菌による植物アルカロイド生産を題材とした人工代謝経路の実証
10:49　○金　達英[1]，土金恵子[1]，宮澤せいは[1]，細山　哲[1]，中川　明[2]，南　博道[2]，白井智量[3]，川崎浩子[1]（[1]製品評価技術基盤機構，[2]石川県立大学，[3]理化学研究所）

a11〜a14 発表者の接続時間 11:00〜11:10

4D1a11　アブラナ科の根で誘導される放線菌の二次代謝とその遺伝子クラスターの同定
11:10　○石垣祐二[1]，尾納隆大[2]，橋本　恵[1]，佐藤繭子[1]，山口勝司[2]，長谷部光泰[2]，豊岡公徳[1]，重信秀治[2]，白須　賢[1]（[1]理研 CSRS，[2]基生研）

4D1a12　シアノバクテリアを用いたストリゴラクトン生産系構築の試み
11:21　○坂巻　裕，伊藤晋作，渡辺　智（東京農大）

4D1a13　*Aspergillus terreus* のイタコン酸生産に及ぼす金属イオンの影響（第 2 報）
11:32　南　智之[1]，横井　諒[2]，○椰野準希[1]，金政　真[2]（[1]中部大院・応生，[2]中部大・環生科）

4D1a14　豆類および豆麹における適合溶質の分析に関する研究
11:43　○村田紋奈[1]，加治晴奈[1]，三浦章寛[2]，椰野準希[2]，堤内　要[3]，金政　真[1]（[1]中部大・環生科，[2]中部大院・応生，[3]中部大・応生化）

D2 会場　午前の部（9:11〜12:05）

有機化学，天然物化学―天然物 - 生合成，代謝―

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

4D2a02　ツルムラサキ葉より放出される揮発成分の解析
9:11　○戸田綾香，芦谷竜矢，村山哲也，網干貴子（山形大農）

4D2a03　花香分析と RAPD 解析によるササユリ（ *Lilium japonicum*）系統間の多様性解析
9:22　○藤澤瑞希[1]，荒井　滋[2]，松川哲也[1]，瀧川義浩[3]，秋野順治[4]，梶山慎一郎[1]（[1]近畿大院・生物理工，[2]大神神社，[3]近畿大学先端研，[4]京都工繊大・DBFS）

4D2a04　ミヤコグサの 5DS および lotuslactone 生合成における MAX1 下流経路の解析
9:33　○森　愛美[1]，謝　肖男[2]，米山香織[3]，野村崇人[2]，米山弘一[2]，秋山康紀[1]（[1]阪府大院・生命環境，[2]宇都宮大・バイオ，[3]愛媛大・農）

4D2a05　植物における内生ヒドロキシカーラクトン酸メチルの同定
9:44　○高島　岬[1]，米山香織[2]，謝　肖男[3]，野村崇人[3]，米山弘一[3]，秋山康紀[1]（[1]阪府大院・生命環境，[2]愛媛大・農，[3]宇都宮大・バイオ）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4D2a06　イネにおけるフラボノイド型ファイトアレキシン，サクラネチンの蓄積に関するナチュラルバリエーション
10:05　○村田晃一[1]，高田　諒[2]，宇部尚樹[3]，上野琴巳[4]，寺石政義[2]，奥本　裕[2]，森　直樹[2]，石原　亨[1]（[1]鳥大院持続性社会，[2]京大院農，[3]鳥大院連農，[4]鳥大農）

4D2a07　イネにおけるテルペノイド型ファイトアレキシン，オリザレキシン A の蓄積に関するナチュラルバリエーション
10:16　○仮谷佳祐[1]，村田晃一[2]，宇部尚樹[3]，上野琴巳[1]，寺石政義[4]，奥本　裕[4]，森　直樹[4]，石原　亨[1]（[1]鳥取大農，[2]鳥大院持続性社会，[3]鳥取大院連農，[4]京都大学院農）

4D2a08　イネ（*Oryza sativa*）における酢酸 / プロピオン酸処理による乾燥耐性獲得時の代謝変化
10:27　○手嶋萌映[1]，伊左治俊策[1]，中田　隆[1]，土生芳樹[2]，吉永直子[1]，寺石政義[1]，奥本　裕[1]，森　直樹[1]（[1]京大院農，[2]農研機構）

4D2a09　コナダニ類に警報フェロモン neryl formate 分子を形成するギ酸の生合成
10:38　○森山太介，吉田直樹，清水伸泰（京都学園大）

4D2a10　昆虫におけるインドール酢酸生合成酵素の同定
10:49　○武井麻美[1,2]，小暮奨太[1]，伊藤晋作[3]，鈴木義人[1]（[1]茨城大・農，[2]東京農工大・連合農学，[3]東農大・バイオ）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

4D2a11　昆虫由来エリシター FACs の生合成酵素の探索
11:10　○野村泰介，義本裕介，宮下正弘，吉永直子，森　直樹（京大院農・応生）

4D2a12　クチナシ毒 gardenoside に対するハスモンヨトウ幼虫の解毒応答メカニズム
11:21　○吉岡英晃[1]，岩井崇晃[2]，吉永直子[2]，森　直樹[2]（[1]京大農，[2]京大院農）

4D2a13　リンゴ果実における傷害応答性トリテルペン類の生理活性
11:32　○大畑勇統[1]，森田沙代[1]，吉永直子[1]，石栗陽一[2]，森　直樹[1]（[1]京大院・農，[2]青森産技セ　リンゴ研）

4D2a14　カイコ *Bombyx mori* における DHCR24 の酵素特性の解析
11:43　○藤盛春奈，永田晋治（東大院・新領域・先端生命科学）

4D2a15　カイコ幼虫におけるアラトトロピンと short neuropeptide F の拮抗的な摂食行動制御
11:54　○松本澄洋，藤永大輝，永田晋治（東大院・新領域）

D3 会場　午前の部（9:11〜11:54）

有機化学，天然物化学
―天然物 - ケミカルバイオロジー，作用機構―

a02〜a05 発表者の接続時間 9:01〜9:11

4D3a02　細胞外 ATP 濃度の上昇によるヒト皮膚菲薄化への関与及びペパーミント葉抽出物の菲薄化抑制効果
9:11　○藤田幸子，坂元孝太郎，ビスワスカザールボロン，高山　悟，桝谷晃明　（一丸ファルコス株式会社）

4D3a03　青枯病菌クオラムセンシングシグナル分子の合成と応答の特異性
9:22　○甲斐建次，氏田夢斗　（阪府大院・生命環境）

4D3a04　殺虫性ペプチド LaIT1 の光親和性プローブの合成と活性評価
9:33　○田中宏明，太田喜之，宮下正弘，中川好秋，宮川　恒（京大院農）

4D3a05　シアノバクテリオクロムを基盤にした 6 種類の光変換を示す分子の創出
9:44　○伏見圭司[1]，長谷川万純[2]，榎本　元[3]，ニーニーウィン[4]，池内昌彦[4]，成川　礼[1]　（[1]静大・理学，[2]東大・大気海洋研，[3]フライブルグ大，[4]東大院・総合）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4D3a06　ケミカルライブラリーを用いた human ENaC 活性化剤のスクリーニング
10:05　○笠原洋一[1]，松田龍星[1]，成川真隆[1]，安岡顕人[1]，森　直紀[1]，阿部啓子[1,2]，三坂　巧[1]，朝倉富子[1]　（[1]東大院農生科応生化，[2]神奈川県立産業技術総合研究所）

4D3a07　Searching for Microbial Metabolites Active Against Plasmodium falciparum Dihydroorotate Dehydrogenase as Antimalarial Lead Compounds
10:16　○Amila PRAMISANDI[1,2]，Evita Chrysnayanti[2]，Kesi Kurnia[2]，Jun-ichi Hasegawa[3]，Mari Hontoku[3]，Kazuyuki Dobashi[4]，Mihoko Mori[1,4]，Daniel Ken Inaoka[5]，Tomoyoshi Nozaki[6]，Satoshi Omura[4]，Kazuro Shiomi[1,4]
([1]Grad. School of Infection Control Sciences, Kitasato University, Japan, [2]Laboratory for Biotechnology, BPPT, Indonesia, [3]School of Science, Kitasato University, Japan, [4]Kitasato Institute for Life Sciences, Japan, [5]School of Tropical Medicine and Global Health, Nagasaki University, Japan, [6]Dept. of Biomedical Chemistry, Grad. School of Medicine, The University of Tokyo, Japan)

4D3a08　イネいもち病菌のネクトリアピロン類の生産誘導と生理機能解析
10:27　○本山高幸，野川俊彦，長田裕之　（理研CSRS・ケミカルバイオロジー）

4D3a09　*Pyricularia oryzae* における pyriculol 類生合成に関わる NADPH-dependent aldo/keto reductase（PYR7）の研究
10:38　○古山祐貴[1,2]，本山高幸[1]，野川俊彦[1]，清田洋正[3]，鎌倉高志[2]，長田裕之[1]　（[1]理研CSRS・ケミカルバイオロジー，[2]東理大院理工・応生，[3]岡山大院・環境生命）

4D3a10　環化反応を触媒する新規ケトシンターゼドメインの X 線結晶構造解析
10:49　○尹　忠鉄[1]，西本一希[2]，本山高幸[1]，日野智也[2]，永野真吾[2]，長田裕之[1]　（[1]理研CSRS・ケミカルバイオロジー，[2]鳥取大院・工・化学生物）

a11〜a14 発表者の接続時間 11:00〜11:10

4D3a11　*Tolypocladium album* において NPD938 によって生産誘導される pyridoxatin と F14329 の生合成と生産制御の解析
11:10　○石井友彬[1,2]，本山高幸[1]，野川俊彦[1]，鎌倉高志[2]，長田裕之[1]　（[1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー，[2]東理大院理工・応生）

4D3a12　タンパク質合成阻害剤による糸状菌への二次代謝産物生産の誘導
11:21　○加藤　翔[1,2]，本山高幸[1]，二村友史[1]，浦本昌和[1]，長田裕之[1,2]　（[1]理研CSRS・ケミカルバイオロジー，[2]埼玉大学）

4D3a13　リベロマイシン生合成に関わるサクシニル化酵素群の相互作用解析
11:32　○鬼頭奈央子[1]，佐藤裕美[1]，奥村英夫[2]，熊坂　崇[2]，長田裕之[3]，高橋俊二[1]　（[1]理研 CSRS・天然物生合成，[2]高輝度光科学研究センター，[3]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー）

4D3a14　リベロマイシン生合成に関わる RevK の結晶構造解析
11:43　○奥村英夫[1]，鬼頭奈央子[2]，佐藤裕美[2]，熊坂　崇[1]，長田裕之[3]，高橋俊二[2]　（[1]高輝度光科学研究センター，[2]理研 CSRS・天然物生合成，[3]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー）

D4 会場　午前の部（9:00〜12:05）

有機化学，天然物化学―合成，反応機構―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

4D4a01　Zealexin A1 の合成研究
9:00　○志村美夏帆[1]，矢島　新[2]，勝田　亮[2]，石神　健[2]，額田恭郎[2]　（[1]東農大院・農，[2]東農大・生命）

4D4a02　Fischerellin 類の合成研究
9:11　○白川和泉[1]，矢島　新[2]，勝田　亮[2]，石神　健[2]，額田恭郎[2]　（[1]東農大院農，[2]東農大生命）

4D4a03　*Cordyceps* 属菌が産生するフラン誘導体の合成
9:22　○勝田　亮[1]，神田拓磨[2]，矢島　新[1]，石神　健[1]，額田恭郎[1]　（[1]東農大・生命，[2]東農大・応生）

4D4a04　フラン類の Diels-Alder 反応を用いたウロリチン A 誘導体の合成研究
9:33　○高橋広光[1]，園田素啓[1]，本多有佳里[1]，池田安裕[1]，谷森紳治[1]，川口真一[2]　（[1]阪府大院生命環境，[2]佐賀大農）

4D4a05　放線菌の生産する抗酸化性ピロンの合成と立体配置の決定
9:44　○堂地剛司[1]，園田素啓[1]，杉山靖正[2]，谷森紳治[1]　（[1]阪府大院生命環境，[2]実践女子大生活科学）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4D4a06　2-ピロンの分子内 Diels-Alder 反応を鍵とする強心ステロイド骨格の新規構築法の開発
10:05　○渡邉正悟，西川俊夫，中崎敦夫　（名大院生命農）

4D4a07　19-ノルブファリンの合成研究
10:16　○松村泰志，西川俊夫，中崎敦夫　（名大院生命農）

4D4a08　Pd 触媒を用いた環化反応によるペルヒドロフェナントレン骨格の新規構築法の開発
10:27　○中神展馬，西川俊夫，中崎敦夫　（名大院生命農）

4D4a09　塩化アルミニウムによるメチオニン誘導体の分子内環化反応の検討
10:38　○所百合花[1]，黒川菜摘[2]，橋床泰之[2]，橋本　誠[2]　（[1]北大農，[2]北大院農）

4D4a10　phenylpropanoid の 8 位と 7' 位が結合した四置換テトラヒドロフラン型リグナンの立体異性体と γ-diisoeugenol の両鏡像異性体の合成
10:49　○田窪竜明，西脇　寿，山内　聡　（愛媛大院農）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

4D4a11　鈴木カップリングによる多置換ビヘテロ芳香族化合物の効率的合成
11:10　○藤本亮太[1]，濱田昌弘[1,2]，中島範行[1,2]　([1]富山県大工，[2]富山県大生工研セ)

4D4a12　転位反応を活用した天然物の合成
11:21　○市川善康，森本裕詞，山﨑季樹　(高知大理工)

4D4a13　殺虫性毒素 LaIT3 由来の N 末端部分ペプチドの合成および抗菌活性評価
11:32　○堺　祥一，宮川　恒，宮下正弘，中川好秋　(京大院農)

4D4a14　エラスチン架橋部位の生体模倣反応の開発
11:43　○田中　尚，臼杵豊展　(上智大学)

4D4a15　Diphenyl Phosphorazidate を活性化剤かつアジド源として用いたケトキシムから 1,5-二置換テトラゾールの合成
11:54　○石原稿太朗，塩入孝之，松儀真人　(名城大農)

D5 会場　午前の部(9:00〜12:05)

有機化学，天然物化学―天然物 - 単離構造決定 - 植物―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

4D5a01　疫病菌無性生殖阻害物質 lycoside 類に関する研究
9:00　○加藤史華，岩井里佳，小鹿　一　(名大農)

4D5a02　ダキバアレチハナガサ（*Verbena xincompta*）からのイネ根に対する生長阻害活性物質の同定
9:11　伊達友亮[1]，重野叶夢[1]，○手林慎一[1]，佐藤正資[2]　([1]高知大農，[2]香川大農)

4D5a03　Tyrosinase inhibition and kinetics of silydianin that is the most abundant phenolic metabolite in milk thistle
9:22　○Yeongjun BAN，Ji Yeong Kim，Jeong Ho Kim，Ki Hun Park　(Division of Applied Life Science (BK21 plus)，IALS, Gyeongsang National University)

4D5a04　DNA damage protective effect of phenolic metabolites from *Ikonnikovia kaufmanniana* (regel) lincz. based on antioxidant activity
9:33　○Aizhamal Baiseitova，Janar Jenis，Jeong Yoon Kim，Da Hyun Jang，Ki Hun Park　(Division of Applied Life Science (BK21 plus)，IALS, Gyeongsang National University)

4D5a05　Competitive bacterial neuraminidase inhibitor of philippin F from *Flemingia philippinensis*
9:44　○Jeong Yoon Kim，Yan Wang，Zuo Peng Li，Ki Hun Park　(Division of Applied Life Science (BK21 plus)，IALS, Gyeongsang National University)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4D5a06　新規なアルデヒドの光学分割と NMR による絶対配置決定法
10:05　○福士幸治[1]，ラクサナアヌグラアディ[1]，福田　怜[2]　([1]北大院農，[2]北大地環研)

4D5a07　和種ハッカほくとの消臭効果に関する研究
10:16　○澤田慎之介，戸枝一喜，堀　容嗣，妙田貴生　(東農大)

4D5a08　ピーナッツ種皮に含まれる機能性ポリフェノールの探索
10:27　○細川夏菜乃，岩岡裕二，伊東秀之　(岡山県大保福)

4D5a09　合成生物化学的アプローチによる新規ジテルペン創製
10:38　○小嶋　柚，夏目雅裕，川出　洋　(東京農工大院農)

4D5a10　ゼニゴケ（*Marchantia polymorpha*）の精子誘引物質の探索
10:49　○山崎由美子[1]，竹村美保[2]，松川哲也[1]，大和勝幸[1]，梶山慎一郎[1]　([1]近畿大院・生物理工，[2]石川県大生資研)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

4D5a11　赤アズキ種皮に含まれ餡に移行する紫色色素の絶対立体配置の決定
11:10　○吉田久美[1]，井内　哲[1]，橋本　勝[3]，清水俊順[1]，永井伸和[2]，近藤忠雄[1]　([1]名大院情報学，[2]名大院情報科学，[3]弘前大農生)

4D5a12　シーベリー（*Hippophae rhamnoides*）葉の機能性に関する研究
11:21　○軍司真究[1]，妙田貴生[1]，堀　容嗣[1]，戸枝一喜[1]，橋本朋子[2]　([1]東農大農，[2]士幌町)

4D5a13　高ケルセチン含有レッドオニオン抽出液における核内受容体 PPARγ 活性化物質の探索
11:32　○土居幹生[1]，森田直樹[2]，岡本大作[3]，橋床泰之[4]　([1]北海道大学農学院，[2]産業技術総合研究所，[3]株式会社植物育種研究所，[4]北海道大学院農学研究院)

4D5a14　LC-APCI-MS/MS による黄色花弁中の Neoxanthin ester と Violaxanthin ester の迅速識別
11:43　○渡辺健宏，東　鋭明，堀川　学，村田　純，山垣　亮　(サントリー生命科学財団)

4D5a15　オタネニンジンからの育毛活性物質の探索
11:54　○繁森英幸[1]，鈴木　葵[2]，松山　茂[1]，松浦大輔[3]，金谷裕敏[3]，谷野伸吾[3]，綱川光男[3]　([1]筑波大生命環境，[2]筑波大院生命環境，[3](株)バスクリン)

D7 会場　午前の部(10:05〜12:05)

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

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4D7a06　Pyruvate dehydrogenase 複合体過剰発現による遺伝子組換え Cyanobacteria の isopropanol 生産向上
10:05　○花井泰三，久保武史，広川安孝　(九大農)

4D7a07　C5C6 発酵酵母による廃菌床由来バイオエタノールの発酵生産
10:16　○小林洋介[1]，藤森一浩[2]，西島拓人[1]，杉本直久[1]，藤野尚人[1]，栗原大樹[3]，今井史規[3]，金松雅俊[3]，山田憲治[3]，荒井　進[3]，吉田浩爾[1]，佐賀清崇[1]，泉　可也[1]　([1](株)Biomaterial in Tokyo，[2]産総研・生物プロセス，[3]三友プラントサービス(株))

4D7a08　リグニン由来フェノール類からのプロトカテク酸の生産
10:27　○後藤杏香[1]，上村直史[2]，稲垣　翔[3]，宮本正紀[3]，政井英司[2]，園木和典[1]　([1]弘前大院・農学生命，[2]長岡技大院・工・生物，[3]DIC株式会社)

4D7a09　Isobutylene production via biological conversion by wood-rot fungus *Fomitopsis palustris*
10:38　○Jeong-Jun YOON[1]，Do-Hyung KIM[1]，Yong-Cheol PARK[2]　([1]Kor. Inst. of Industri. Technol. (KITECH)，[2]Kookmin Univ.)

4D7a10　分離菌群による光学活性 L-乳酸生産のためのメタ発酵プロセスの再構築
10:49　○田代幸寛[1]，溝口尊春[1]，古原俊哉[1]，宮本浩邦[2,3]，酒井謙二[1]　([1]九大院・農，[2]千葉大・園，[3]サーマス)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

4D7a11　イチジク由来天然ゴムの TEM 観察とタンパク質分析
11:10　○横田早希[1]，千田進介[2]，鈴木健裕[3]，堂前　直[3]，後藤　猛[1]　([1]秋田大院理工，[2]秋田大バイオセ 分子医学部門，[3]理研 CSRS)

4D7a12　CE-C4D を用いた土壌抽出液中のアニオン分析のための前処理法の検討
11:21　○栂俊太朗[1]，植山智紗[1]，長谷部誉人[1]，蜷木朋子[2]，藤井紳一郎[3]，竹迫　紘[2]，小沢　聖[2]，安保　充[1]　([1]明治大農・農化，[2]明治大・黒川農場，[3]産総研・物質計測標準)

4D7a13　森林の物質循環におけるリター分解と土壌環境の関係解析
11:32　○荒木希和子，連　綾香，久保　幹　(立命館大・生命)

4D7a14　循環水耕液中の銅イオンの濃度管理に関する考察
11:43　○酒井秀太[1]，柳川省吾[1]，松本浩平[2]，手塚理紗子[2]，伊藤善一[2]，岡部勝美[2]，安保　充[1]　([1]明大農，[2]明大　黒川農場)

4D7a15　高性能ネブライザーを用いた殺菌デバイスの有効性の検証
11:54　○野尻深優[1]，村上周一郎[1]，宮下振一[2]，藤井紳一郎[2]，稲垣和三[2]，安保　充[1]　([1]明大農，[2]産総研)

E1 会場　午前の部(10:16〜12:05)

酵素―アミノ酸代謝関連酵素／酸化還元酵素―

a07〜a10 発表者の接続時間 10:06〜10:16

4E1a07　人工タンパク質設計による *Streptomyces* sp. NT1 株由来 L-グルタミン酸オキシダーゼの耐熱化
10:16　○杉森大助[1,2]，林　優花[2]，齋藤貴広[1]，久保田瞳[1]，酒瀬川信一[3]，中野祥吾[4]，伊藤創平[4]，浅野泰久[5]　([1]福島大理工，[2]福島大院理工，[3]旭化成ファーマ，[4]静県大食栄，[5]富山県大生工研セ)

4E1a08　好熱性真菌 *Rasamsonia emersonii* YA 株由来 D-アミノ酸オキシダーゼの広基質特異性に重要な構造因子の解明
10:27　○七五三掛湧也[1]，古市剛大[1]，鈴木秀之[1]，阿部勝正[1]，後藤　勝[2]，解良芳夫[1]，高橋祥司[1]　([1]長岡技大院工，[2]東邦大理)

4E1a09　高基質特異性酵素 L-リシン α-オキシダーゼの基質認識機構の解析
10:38　○松本侑也[1]，天野万里[1]，北川雄輝[2]，今田勝巳[2]，根本理子[1]，日下部均[3]，田村　隆[1]，稲垣賢二[1]　([1]岡山大院・環境生命，[2]阪大院・理，[3](株)エンザイム・センサ)

4E1a10　大腸菌由来アミノアシル-tRNA 合成酵素のピロリン酸増幅反応を用いた新規な L-ヒスチジン及び L-チロシンの測定法
10:49　○中柄朋子[1]，青木秀之[1]，喜田幹子[1]，佐藤大祐[1]，山田健太[1]，釘宮章光[2]　([1]池田食研株式会社，[2]広島市立大学)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

4E1a11　超好熱性古細菌由来システイン合成酵素 *O*-phospho-L-serine sulfhydrylase の 1 次基質認識機構解析
11:10　○中村　卓[1]，中林　誠[2]，石川一彦[3]　([1]長浜バイオ大バイオサイエンス，[2]産総研　機能化学，[3]産総研　バイオメディカル)

4E1a12　好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 における硫酸同化及びシステイン合成についての解析
11:21　○中山宗一郎，小倉一将，亀谷将文，新井博之，石井正治(東大院・農生科)

4E1a13　好気性光合成細菌 *Roseobacter denitrificans* の alternative oxidase による酸化ストレス耐性に関する研究
11:32　○吉田昇平，山本麻衣子，亀谷将史，石井正治，新井博之(東大院・農生科・応生工)

4E1a14　Electron transfer mechanisms among the ferredoxin and α3β3-type oxygenase component of Rieske non-heme iron oxygenase
11:43　○Pi-Cheng TSAI[1]，Joydeep CHAKRABORTY[1]，Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1,2]，Kazunori OKADA[1]，Hideaki NOJIRI[1,2]　([1]BRC, UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

4E1a15　Substrate Binding and Product Formation in the Terminal Oxygenase Component during Angular Dioxygenation of Carbazole 1,9a-Dioxygenase
11:54　○Yixia WANG[1]，Jun MATSUZAWA[1]，Joydeep CHAKRABORTY[1]，Zui FUJIMOTO[2]，Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1,3]，Kazunori OKADA[1]，Hideaki NOJIRI[1,3]　([1]BRC, UTokyo, [2]AAC, NARO, [3]CRIIM, UTokyo)

E2 会場　午前の部(9:00〜12:05)

酵素―糖質代謝関連酵素―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

4E2a01　*Luteolibacter algae* H18 由来フコイダン低分子化酵素によって生成するフコイダン分解産物の解析
9:00　○荒井良仁[1]，長尾達彦[2,3]，八木寿梓[2]，鈴木宏和[2]，大城　隆[2]　([1]鳥取大院・持社創科，[2]鳥取大院・工，[3]日本ジッコウ(株))

4E2a02　緑藻ウルバン資化細菌の持つウルバン分解遺伝子群の進化解析
9:11　○大西浩平，籾山健太，小林慎太郎　(高知大農林海洋)

4E2a03　海藻分解好熱菌に特徴的な糖加水分解酵素の特性評価
9:22　○鈴木宏和[1]，李　原圭[2]，藤井健太[3]，八木寿梓[1]，大城　隆[1]　([1]鳥取大工，[2]鳥取大院・持社創生，[3]鳥取大院・工)

4E2a04　シロイヌナズナ由来 GH1β-グルコシダーゼ AtBGlu42 の酵素化学的諸性質と立体構造の解析
9:33　○堀越　秀[1]，佐分利亘[1]，于　　健[2]，姚　　閔[2]，森　春英[1]　([1]北大院農，[2]北大院生命)

4E2a05　大腸菌で高発現させた麹菌由来の GH1 に属する新規 β-グルコシダーゼ(BglU/Bgl5)の酵素学的諸性質
9:44　○渡部　昭，新谷尚弘，五味勝也　(東北大院農・生物産業創成)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4E2a06　好熱嫌気性細菌 *Clostridium thermocellum* 由来セルロソーム構成セルラーゼの結晶性セルロース分解に対する相乗効果
10:05　○齊藤　翼，髙橋美帆，富田渓介，篠田　優，平野勝紹，春木　満，平野展孝　(日大・工・生命応用化)

4E2a07　全アミノ酸スキャニング変異導入法による耐熱型 *Bacillus* sp. 41M-1 株由来キシラナーゼの取得とその性状解析
10:16　○滝田禎亮[1]，中谷滉太[1]，片野裕太[1]，鈴木愛美[1]，兒島憲二[1]，坂　直樹[1]，三上文三[1]，八波利恵[2]，中村　聡[2]，保川　清[1]　([1]京大農，[2]東工大生命理工)

4E2a08　*Bacteroides thetaiotaomicron* 由来 α-galactosidase (BtGal97a)の天然基質に関する研究
10:27　○中川雄登，松永夏奈，菊池麻子，奥山正幸，田上貴祥，木村淳夫　(北大院農)

4E2a09　GH87 型 α-1,3-グルカナーゼの担子菌類プロトプラスト形成への影響
10:38　○福田泰久，佐藤　魁，鍋谷　海，白坂憲章　(近大農)

4E2a10　植物トレハラーゼ間の機能比較と α11 → α12 ループ上に保存された Thr の Tre6*P* 分解活性への寄与
10:49　○田口陽大，佐分利亘，森　春英　(北大院農)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

4E2a11　Functional analysis of maltose phosphorylase MalE from *Bacillus* sp. AHU2001 and synthesis of oligosaccharides and sugar phosphates with the enzyme
11:10　○Yu GAO，Wataru SABURI，Haruhide MORI (Hokkaido Univ.)

4E2a12　ブタ血清由来マルターゼ-グルコアミラーゼを形成する酵素ユニットの機能
11:21　○渡邊　憲，田上貴祥，奥山正幸，木村淳夫　(北大院農)

4E2a13　Expression, purification, and some properties of a GH13 enzyme from *Rhodothermus marinus*
11:32　○PU QU, Mika Nagaya, Yoshiharu Fujii, Atsushi Nishikawa, Takashi Tonozuka （School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology）

4E2a14　*Rhodothermus marinus* 由来耐熱性エキソ-1,4-β-マンノビオヒドロラーゼの機能解析
11:43　○佐分利亘[1]，中澤篤志[1]，福井健介[2]，伊吹昌久[3]，津村和伸[2]，森　春英[1]（[1]北大院農，[2]不二製油グループ本社（株），[3]不二製油(株)）

4E2a15　糸状菌由来 6-*O*-α-L-ラムノシル-β-D-グルコシダーゼ（ルチノシダーゼ）の基質特異性
11:54　○廣田瑠花，川﨑真由，石川真衣，塩野義人，小関卓也（山形大農）

E3 会場　午前の部（9:00〜12:05）

動物―個体 - 生理・栄養・代謝，生体機能，生体制御―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

4E3a01　NSY マウスの 2 型糖尿病遺伝子座（*Nidd1nsy*）のコンジェニックマウスを用いた解析
9:00　○長田裕太郎[1]，小林美里[1]，田中沙良[1]，大野民生[2]，村井篤嗣[1]，堀尾文彦[1]（[1]名古屋大院・生命農，[2]名古屋大学・医学系）

4E3a02　糖・脂質代謝を制御する転写因子 ChREBP の活性を抑制する食品成分の探索
9:11　○吉満　和，清水　誠，山内祥生，佐藤隆一郎（東大院・農生科・応生化）

4E3a03　フルクトース誘導性脂肪肝におけるセリン合成酵素の発現制御
9:22　○不野歩美，清水　誠，佐藤隆一郎（東京大）

4E3a04　3 重結合を有する脂肪酸 6-ODA・9-ODA による FFA1 依存的インスリン分泌促進効果
9:33　○西野勝俊[1]，上杉晴香[1]，平澤　明[2]，Mohamed Neffati[3]，宮前友策[4]，増田誠司[1]，神戸大朋[1]，礒田博子[5]，入江一浩[6]，永尾雅哉[1]（[1]京大院・生命，[2]京大院・薬，[3]IRA・Tunisia，[4]筑波大・生命環境，[5]筑波大・地中海・北アフリカ研究センター，[6]京大院・農）

4E3a05　等カロリー摂取条件下での食餌脂肪の量と質の違いがエネルギー代謝，腹腔内脂肪蓄積，肝臓中性脂肪濃度に与える影響　-C57BL/6J マウス-
9:44　○池田郁男[1]，韮野美咲[2]，小川裕香里[2]，林　中佳[3]，井上奈穂[4]（[1]東北大未来科学技術共同研究センター，[2]東北大農，[3]東北大院農，[4]山形大農）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4E3a06　フタホシコオロギ *Gryllus bimaculatus* の脂質分解酵素が体液中の脂肪酸組成へ与える影響
10:05　○福村圭介，永田晋治（東大院・新領域・先端生命科学）

4E3a07　Endocrine network "Endocrinet" upon feeding behavior in insects by real hormone network and virtual bibliometric network
10:16　○Yijun ZHOU, Shinji NAGATA （Grad. Sch. of Fro. Sci., the Univ. of Tokyo）

4E3a08　高トリグリセリド・低 HDL コレステロール血症マウスの遺伝解析による原因遺伝子の探索
10:27　○坪内宏樹，石井玲佳，石川　明，村井篤嗣，堀尾文彦，小林美里（名大生命農）

4E3a09　発酵前後の味噌がマウスの運動能に与える影響
10:38　○大河内蘭，山本和史，都築　毅（東北大院農）

4E3a10　FGF21 が表皮角化細胞に及ぼす影響
10:49　○金野凌介，岩槻　健，大石祐一，山根拓実（東農大院農）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

4E3a11　カルパインの制御異常は乾癬発症に関与する
11:10　○秦　勝志[1]，西藤泰昌[2]，土井奈穂子[1]，北村ふじ子[1]，反町洋之[1]，小野弥子[1]（[1]都医学研・カルパインPJ，[2]都医学研・基盤技術研究センター）

4E3a12　ブタ酸性キチナーゼは，消化器系プロテアーゼに耐性で，キチン分解酵素として機能する
11:21　○小山文隆[1]，樫村昭徳[1]，脇田悟誌[1]，菅原康里[1]，田畑絵理[1,2]（[1]工学院大生命化学科，[2]日本学術振興会特別研究員（DC[1]））

4E3a13　オキシトシン受容体欠損マウスで観察される嗅覚行動異常に対する修飾因子について
11:32　○長田和実[1]，太田　亨[1]，高井理衣[1]，宮園貞治[2]，西森克彦[3]，柏柳　誠[2]（[1]北医療大歯，[2]旭川医大医，[3]東北大農）

4E3a14　SIRT1 による単純糖質嗜好性の制御を担うのは，PVN の OXT ニューロンである
11:43　○松居　翔，佐々木努，河野大輔，橋本博美，小林雅樹，北村忠弘（群大生調研）

4E3a15　社会的敗北ストレスはマウス小腸下部上皮細胞のフコシル化糖鎖を減少させる
11:54　小又尉広[1]，青木玲二[1]，青木綾子[2]，比江森恵子[3]，豊田　淳[4,5]，舘野浩章[3]，○鈴木チセ[1]，高山喜晴[1]（[1]農研機構・畜産部門，[2]日本女子大，[3]産総研，[4]茨城大農，[5]農工大院連農）

E4 会場　午前の部（9:00〜12:05）

動物―細胞 - 細胞機能，細胞骨格，オルガネラ，輸送体，細胞接着，細胞内輸送／細胞 - 情報伝達，細胞応答，分化制御，メタボローム／細胞工学 - 物質生産，タンパク質工学，細胞培養，細胞外マトリックス／その他―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

4E4a01　多機能性トランスポーター BCRP1 の活性制御タンパク質の探索
9:00　○田口善智，梶友里恵，岡迫知弘，藤垣(山﨑)静香，福島翔理，川邊智史，岡本沙樹，戸木夢香，浅井咲嬉，佐伯和弘，三谷　匡（近畿大 生物理工 遺伝子）

4E4a02　亜鉛を活性部位に持つタンパク質の活性化機構〜亜鉛トランスポーターの種間保存性〜
9:11　○鈴木英介，神戸大朋（京大院生命）

4E4a03　抱合型プロスタグランジン代謝体の調製と受容体を介する作用解析
9:22　○児玉直輝[1]，黒木勝久[1]，Liu Ming-Cheh[2]，水光正仁[1]，榊原陽一[1]（[1]宮崎大農，[2]トレド大薬）

4E4a04　ヒト血漿中セラミド及びセラミド 1-リン酸の分子種組成と動物細胞へ作用
9:33　○森戸克弥[1]，島田明奈[1]，宮﨑　徹[1]，清水良多[1]，髙橋尚子[1]，下澤伸行[2]，東　桃代[3]，小山壱也[3]，西岡安彦[3]，福田達也[1]，小暮健太朗[1]，田中　保[1]（[1]徳島大院・医歯薬・衛生薬学分野，[2]岐阜大・生命科学総合研セ・ゲノム研究分野，[3]徳島大院・医歯薬・呼吸器膠原病内科学分野）

4E4a05　マクロファージに発現するシアル酸認識レクチン・シグレックの解析
9:44　稲坂　唯，立山博之，樋口廣士，村瀬佑介，金岡英徳，飯島信司，○西島謙一（名大工）

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4E4a06　DHA による RACK1-PKC 相互作用抑制
10:05　○山田秀俊，植村亜衣子，箱崎真友佳（岩手生工研）

4E4a07　マウス神経細胞 HT22 における酸化ストレス依存的な細胞外分泌因子の制御～酸化ストレス依存的な細胞外マトリクスと細胞外小胞の制御～
10:16 ○田辺岳海，吉田純平，鵜飼智文，水木　徹，根建　拓（東洋大学）

4E4a08　連続的翻訳後修飾による DNA 修復タンパク質 DDB2 の制御
10:27 ○金岡英徳[1]，荒川和彦[1]，小川大輝[1]，西島謙一[1]，飯島信司[2]（[1]名大院・工・生命分子工，[2]愛工大・工・応化）

4E4a09　がん細胞の足場非依存的増殖にポリアミン代謝とコレステロール代謝がおよぼす影響
10:38 ○田中亜路，柿本未来，奥野世理奈，小西恵理香，立本青空（安田女子大薬）

4E4a10　上皮間葉転換（EMT）における RhoE の役割と機能の解析
10:49 ○西塚　誠[1]，駒田莉奈[2]，今川正良[2]（[1]弘大農生，[2]名市大薬）

a11～a15 発表者の接続時間 11:00～11:10

4E4a11　オルガノイド培養系を用いた抗菌ペプチドの産生に関する研究
11:10 ○佐藤美佳，稲葉明彦，岩槻　健，只石　幹，服部一夫，清水　誠（東農大院農）

4E4a12　バキュロウイルス-昆虫細胞発現系におけるイズロン酸-2-スルファターゼ（IDS）生産
11:21 ○中島慎太朗，小幡佑季，三﨑　亮，大橋貴生，藤山和仁（阪大生国セ）

4E4a13　ミニサークル DNA ベクターを用いた逐次遺伝子組込み法による CHO 細胞染色体への遺伝子導入
11:32 ○上平正道，汪　　雪，久野晶生，河邉佳典，井藤　彰（九大工）

4E4a14　筋肉特異的巨大タンパクキナーゼの酵素活性とミトコンドリア形態制御との関連性
11:43 ○松永洋平，ベニアンガイ（エモリー大学病理学部）

4E4a15　筋形成型オリゴ DNA はマウス多能性幹細胞の心筋分化を誘導する
11:54 ○石岡美奈[1]，二橋佑磨[2]，鏡味　裕[1,2]，下里剛士[3]，高谷智英[1,2]（[1]信州大農，[2]信州大院総合理工，[3]信州大菌類・微生物セ）

E5 会場　午前の部（9:00～12:05）

生物科学―生物工学 - 解析技術・方法論／生物工学 - 酵素工学・生物反応工学―

a01～a05 発表者の接続時間 8:50～9:00

4E5a01　マイクロ流路を利用したハイスループット機能的 GPCR アッセイの開発
9:00 ○青木　航[1,2,3]，柳沼謙志[1]，三浦夏子[1,2]，小川雅人[5]，西川洋平[5]，細川正人[4,6]，竹山春子[5]，植田充美[1,2,3]（[1]京大院・農・応用生命，[2]JST-CREST，[3]京都バイオ計測セ，[4]JST-さきがけ，[5]早大院先進理工，[6]早大理工総研）

4E5a02　微細藻類の実用培養を指向した原生動物による捕食リスクの評価と低減の試み
9:11 ○戸田成美[1]，神原亮大[2]，本村　圭[2,3]，石田丈典[2]，池田　丈[2]，舟橋久景[2]，黒田章夫[2,3]，廣田隆一[2,3]（[1]広島大学工学部第三類，[2]広島大学院先端物質，[3]JST-ALCA）

4E5a03　疑似的な dFBA を用いた微生物による有用物質生産の改善方策の探索とその有効性の検証
9:22 ○厨　祐喜[1]，大山　彰[2]，白井智量[3]，荒木通啓[1,4]（[1]京都大院・医，[2]インシリコバイオロジー，[3]理研・CSRS，[4]神戸大院・科技イノベ）

4E5a04　亜リン酸依存性による生物学的封じ込めを搭載した藍藻への水平伝播抵抗性付与
9:33 ○佐野公亮[1]，本村　圭[1,2]，神原亮大[1]，渡辺　智[2,3]，池田　丈[1]，石田丈典[1]，舟橋久景[1]，黒田章夫[1,2]，廣田隆一[1,2]（[1]広島大院先端物質，[2]JST-ALCA，[3]東京農大生命科学）

4E5a05　Enhanced colorimetric detection of Hepatitis E virus-like particles using a new immunoassay approach.
9:44 ○Indra Memdi Khoris[1]，Tetsuro Suzuki[2]，Tian-Cheng Li[3]，Enoch Y. Park[1,4]（[1]Dept. Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. Sci. Technol., Shizuoka Univ., [2]Dept. Infect. Dis, Hamamatsu Univ. Sch. Med., [3]Dept. Virol. II, Nat' l Inst. Infect. Dis., [4]Res. Inst. Green Sci. Technol. Shizuoka Univ.）

a06～a10 発表者の接続時間 9:55～10:05

4E5a06　定量的レポーター遺伝子を用いた酵母 two-hybrid 法による新規 FRB 相互作用蛋白質の単離と解析
10:05 ○渡部瑠名，薗田拓実，内田由乃，伊藤圭祐，田中瑞己，河原崎泰昌（静県大食栄）

4E5a07　β-カロテンオキシゲナーゼ変異体を用いた非天然レチノイドの大腸菌生産
10:16 ○斉藤遥平，河合（野間）繁子，斎藤恭一，梅野太輔（千葉大院・工・共生応化）

4E5a08　酵素を用いたヒスチジン測定法の構築～食品や生体試料中のアミノ酸測定に向けて～
10:27 ○山口浩輝，中田國夫，巽　萌美，髙橋一敏，杉木正之，水越利巳，宮野　博（味の素株式会社）

4E5a09　Encapsulin を用いた外来タンパク質を内包可能なナノ粒子の調製
10:38 石原沙季，立田祐琳亜，岡　拓二，○平　大輔（崇城大・生物生命）

4E5a10　The production and refolding of Fab antibody fused with NanoLuc expressed in *Escherichia coli*
10:49 ○Almasul Alfi[1]，Shunta Ogawa[1]，Takaaki Kojima[1]，Teruyo Ojima-Kato[1,2]，Jasmina Damnjanovic[1]，Hideo Nakano[1,2]（[1]Grad. Sch. Bioagric., Nagoya Univ., [2]iBody Inc.）

a11～a15 発表者の接続時間 11:00～11:10

4E5a11　進化分子工学による大腸菌フィターゼ AppA の低温高活性化
11:10 ○和田愛未，林　勇樹，新井宗仁（東大・総合文化・生命環境）

4E5a12　酵素による poly（ethylene terephthalate）分解反応を加速する手法の開発
11:21 ○古川　洵，川上了史，富沢　温，宮本憲二（慶大理工）

4E5a13　合理的変異導入法を用いる β-シート構造中の不溶性発現に関与するアミノ酸残基の探索―ランダム変異との比較―
11:32 ○篠田　優，浅野泰久（富山県大・生工研セ）

4E5a14　Engineering by Proxy: Monobody-mediated alteration of enzyme specificity
11:43 ○Shunichi TANAKA[1,2,3]，Tetsuya Takahashi[4]，Akiko Koide[1,5,6]，Riki Iwamoto[7]，Hiroyoshi Matsumura[7]，Takuya Yoshizawa[7]，Kazufumi Takano[3]，Satoshi Koikeda[4]，Shohei Koide[1,5,8]（[1]Department of Biochemistry and Molecular Biology, The University of Chicago, [2]Ritsumeikan Global Innovation Research Organization, Ritsumeikan University, [3]Department of Biomolecular Chemistry, Kyoto Prefectural University, [4]Frontier Research Department, Gifu R&D Center, Amano Enzyme, Inc., [5]Perlmutter Cancer Center, New York University Langone Medical Center, [6]Department of Medicine, New York University School of Medicine, [7]Department of Biotechnology, College of Life Sciences, Ritsumeikan University, [8]Department of Biochemistry and Molecular Pharmacology, New York University School of Medicine）

4E5a15　指向性進化による転写制御因子 XylS のリガンド認識能の改変
11:54　○小川友希[1]，勝山陽平[1,2]，大西康夫[1,2]　([1]東大院・農生科・応生工，[2]東大微生物イノベ連携機構)

E7 会場　午前の部(9:00〜12:05)

植物―タンパク質，酵素 - 機能，調節―

a01〜a05 発表者の接続時間 8:50〜9:00

4E7a01　プロヘキサジオンによるイネ除草剤抵抗性付与酵素 HIS1 の活性阻害
9:00　○高村夏生，戸澤　譲　(埼玉大院理工)
4E7a02　イネ除草剤抵抗性遺伝子 *HIS1* およびその相同遺伝子の系統解析
9:11　○佐久間望[1]，吉田　均[2]，戸澤　譲[1,3]　([1]埼玉大理分子生物，[2]農研機構・生物機能部門，[3]埼玉大院理工)
4E7a03　イネ種子発芽期における貯蔵タンパク質分解機構の解析
9:22　○栗田辰乃佑[1]，山口雅祥[1]，沼本　穂[1]，森田重人[1,2]，増村威宏[1,2]　([1]京都府立大学・生命環境，[2]京都府農技セ・生資セ)
4E7a04　小麦種子貯蔵タンパク質 α-グリアジンと高分子量グルテニンは異なる蓄積挙動を示す
9:33　○松岡祐樹[1]，前田紘夢[1]，奥田英子[1]，奥田　綾[1]，山田哲也[2]，丸山伸之[1]　([1]京大院 農学研究科，[2]北大院 農学研究院)
4E7a05　NADPH 依存的グルタチオン還元活性を持つダイズ PDI ファミリータンパク質の解析
9:44　○奥田　綾[1]，増田太郎[1]，裏出令子[2]　([1]京大院農・農学，[2]京大・複合研)

a06〜a10 発表者の接続時間 9:55〜10:05

4E7a06　塩ストレス条件下で発芽させた大豆のニコチアナミン合成酵素に関する研究
10:05　○佐々木瞳，金内　誠，松本菜月，レーティゴックラン　(宮城大 食産業)
4E7a07　タマネギ由来フルクトオリゴ糖分解酵素の組換タンパク質の性質
10:16　○上野敬司[1]，相田裕貴[1]，奥　聡史[2]，志村華子[2]，前田智雄[3]，実山　豊[2]，鈴木　卓[2]，小野寺秀一[1]　([1]酪農学園大 農食環境学群，[2]北大院 農，[3]弘前大 農学生命科学部)
4E7a08　ピタヤにおける β-ガラクトシダーゼアイソザイムの解析
10:27　○川村昂史，野村啓一　(神戸大農)
4E7a09　構造解析及び MD シミュレーションにより明らかとなった植物ホルモン代謝システム
10:38　○竹原清日[1]，三上文三[2]，桜庭　俊[3]，松岡　信[1]，上口(田中)美弥子[1]　([1]名大・生物機能セ，[2]京大院・農，[3]量研)
4E7a10　GA 合成・代謝酵素と阻害剤との共結晶化の試み
10:49　○尾原寛之[1]，竹原清日[1,2]，三上文三[2]，松岡　信[1]，上口(田中)美弥子[1]　([1]名大・生物機能セ，[2]京大院・農)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:00〜11:10

4E7a11　植物ホルモン関連因子の結晶構造解析に向けた試み
11:10　○杉原諒彦，竹原清日，松岡　信，上口(田中)美弥子　(名大・生物機能セ)
4E7a12　アブラナ科植物の自家不和合性を司る花粉因子と雌蕊因子のハプロタイプ特異的相互作用解析
11:21　○河辺　善[1]，村瀬浩司[1]，高田美信[2]，渡辺正夫[2]，片山幸江[1]，岡本　研[1]，盧　　翌[1]，陸　　鵬[1]，鈴木道生[1]，高山誠司[1]，永田宏次[1]　([1]東大院，[2]東北大院)
4E7a13　ギンネムのミモシン合成酵素の同定と酵素学的性質の解明
11:32　○大貝茂希[1]，福田雅一[2]，渡邊啓一[4]，屋　宏典[3]　([1]鹿児島大学，[2]琉球大農，[3]琉球大熱生研，[4]佐賀大学)
4E7a14　ブラシノステロイド生合成における鍵酵素 CYP90B1 の結晶構造及び基質の位置・立体特異的な水酸化メカニズム
11:43　○藤山敬介[1]，日野智也[1]，渡辺文太[3]，Lee Hyoung Jae[2]，水谷正治[2]，永野真吾[1]　([1]鳥取大院工，[2]神戸大院農，[3]京都大化研)
4E7a15　細胞膜透過ペプチドを利用した植物細胞へのタンパク質直接導入法の開発
11:54　○大村昂誠，木村さやか，河野　強，岩﨑　崇　(鳥取大院持続)

一般講演（ポスター発表）プログラム

1. °はコアタイム発表者を示す.
2. コアタイムは 17:10 ～ 18:10 となります.

第 1 日（3 月 24 日）

ポスター番号 講演番号　　演　　題　　発表者氏名（所属）

A1 会場　P001 ～ P050

P001 1D5a05　ヤマカガシ属ヘビ *Rhabdophis pentasupralabialis* が蓄積する毒性ステロイド bufadienolide の由来
○氏家里奈子[1]，竹内寛彦[2]，城野哲平[3]，チェンチン[4]，ディンリー[4]，タンイェチョン[4]，ツァイテインシュン[5]，ツァオチェンチャン[6]，アランサビツキー[7]，油屋駿介[1]，青木　航[1]，吉永直子[1]，森　　哲[8]，森　直樹[1]（[1]京都大農，[2]日本大生物資源，[3]琉球大熱生研，[4]成都生物研，[5]ピントン科技大，[6]楽山師範大，[7]ユタ大，[8]京大理）

P002 1D5a15　ウメ花粉の発達に関与する *p*-クマロイルスペルミジンの新規異性体の同定と *ZZZ* 体のユニークな熱力学的安定性
○平井伸博[1]，森信之介[1]，赤松美紀[1]，福井宏至[2]，月岡淳子[3]，後藤勝実[3]（[1]京大院農，[2]香川大農，[3]京都薬大薬用植物園）

P003 1D5p07　マクロリドを有するトリコテセンは 12 位エポキシドがなくても毒性を示す
○松本愛美[1]，西山真未[1]，前多隼人[1]，殿内暁夫[1]，紺野勝弘[2]，橋本　勝[1]（[1]弘前大，[2]富山大和漢研）

P004 1D2a06　高還元型 II 型 PKS 由来 KS-CLF ヘテロダイマー及び ACP-KS-CLF 三者複合体の X 線結晶構造解析
○杜丹ヤオ[1]，勝山陽平[1,2]，伏信進矢[1,2]，Chen Aochiu[3]，Davis Tony D.[3]，Burkart Michael. D[3]，大西康夫[1,2]（[1]東大院農生科・応生工，[2]東大・微生物イノベ連携機構，[3]University of California, San Diego, Department of Chemistry and Biochemistry）

P005 1D2p01　ペニシリン結合タンパク質が触媒する非リボソームペプチドの環化反応
○松田研一[1]，小林雅和[1]，佐野文映[1]，倉永健史[1]，高田健太郎[2]，松永茂樹[2]，脇本敏幸[1]（[1]北大院薬，[2]東大院農）

P006 1D2a01　大麻のカンナビノイド生合成に関与する新規プレニル転移酵素の同定
○棚谷綾介，黒崎文也，田浦太志（富山大院薬）

P007 1D2a04　細菌由来テルペン合成酵素の大規模探索と複雑環骨格形成機構の解析
○村井恵一[1]，三橋隆章[2]，菊池　貴[3]，新家一男[4]，藤田　誠[5,6]，阿部郁朗[2,7]，西山　真[1,7]，葛山智久[1,7]（[1]東大生物生産工学セ，[2]東大院薬，[3]リガク応技センター，[4]産総研，[5]東大院工，[6]分子研，[7]東大微生物イノベ連携機構）

P008 1D2a10　*in vitro* 解析による多価不飽和脂肪酸生合成酵素の炭素鎖長制御機構の解明
○林　祥平[1]，小笠原泰志[2]，佐藤康治[2]，丸山千登勢[3]，濱野吉十[3]，氏原哲朗[4]，大利　徹[2]（[1]北大院総合化学，[2]北大院工，[3]福井県大院・生物資源，[4]協和発酵バイオ）

P009 1D3p14　ケミカルジェネティクスによるワールブルグ効果制御機構の解析
○小林大貴[1]，長田裕之[3]，吉田　稔[1,2,4]（[1]理研CSRS・創薬シード，[2]理研CSRS・ケミカルゲノミクス，[3]理研CSRS・ケミカルバイオロジー，[4]東大院農・応生工）

P010 1D3p04　２次元電気泳動を用いた化合物に相互作用するたんぱく質の解析法（2DE-CETSA）の開発
○室井　誠，永澤生久子，池野あゆみ，小川直子，川谷　誠，長田裕之（理研CSRS）

P011 1D3a13　ソロモン諸島産の海洋生物中の Na_v 阻害活性物質の探索
○春日政人[1]，Clyde Gorapava Puilingi[2]，角替俊輔[1]，中崎敦夫[3]，長由扶子[1]，西川俊夫[3]，此木敬一[1]，山下まり[1]（[1]東北大院農，[2]Pacific Adventist University，[3]名大院生命農）

P012 1D3p01　TRPV4 agonist による可逆的タイトジャンクション開口機構解析
○向山海凪，山崎洋平，南雲陽子，臼井健郎（筑波大生命環境）

P013 1D4a13　フェナジノン天然物群の全合成研究
○古波津春希，加茂翔伍，友重秀介，倉持幸司（東理大理工）

P014 1D4p05　テトロドトキシンの推定生合成中間体の全合成と絶対立体配置の決定
○宮坂忠親[1]，安立昌篤[1]，工藤雄大[2]，杉本敬太[2]，山下まり[2]，西川俊夫[1]（[1]名大院生命農，[2]東北大院農）

P015 1D4a12　陽極酸化を用いたリボース型アザヌクレオシドの合成
岡本一央，小路貴生，○筒井瑞季，信田尚毅，千葉一裕（東農工大）

P016 1D4p09　Sinensilactam A の全合成
○小宅真理，佐藤俊太郎，小倉由資，桑原重文（東北大院農）

P017 1D4a08　抗植物病原菌活性を有する Pseudohygrophorone 類の合成研究
○山本優月，森　直紀，渡邉秀典，滝川浩郷（東大院農生科）

P018 1E1p01　ヒト腸内細菌 *Bacteroides thetaiotaomicron* のカルボキシスペルミジン脱炭酸酵素の遺伝学的・生化学的解析
○下川ひろみ[1]，阪中幹祥[1,2]，栗原　新[1]（[1]石川県大・生資環，[2]デンマーク工科大）

P019 1E2p08　カルパイン-1 の制御因子としてのカルパイン-2
○大内史子[1]，進藤真由美[2]，秦　勝志[1]，土井奈穂子[1]，小野弥子[1]（[1]都医学研 カルパインPJ，[2]都医学研 基盤技術研究センター）

P020 1E1a07　イトマキヒトデ膵臓由来の *α*-L-フコシダーゼの精製，諸性質決定および構造解析
○鈴木智大[1]，小野晶子[1]，後藤咲季[2]，河野はるか[2]，松井　萌[2]，青木大地[1]，松田　勝[1]，河岸洋和[3,4]，尾形　慎[2]（[1]宇大・バイオ，[2]福島高専・化学バイオ，[3]静岡大・農，[4]静岡大・グリーン研）

P021 1E1a08　*Microbacterium arabinogalactanolyticum* 由来の組み換え endo-D-arabinase の機能解析
○藤田清貴[1]，田中悠暉[1]，石渡明弘[2]，伊藤幸成[2]，隅田泰生[3]，北原兼文[1]（[1]鹿児島大農，[2]理研，[3]鹿児島大院理工）

P022 1E1a09　*Bacteroides thetaiotaomicron* 由来 GH97 酵素：5 つの機能未知パラログの解析
○菊池麻子，中川雄登，奥山正幸，田上貴祥，木村淳夫（北大院農）

P023 1E1a10　変異型 galacto-*N*-biose/lacto-*N*-biose I phosphorylase を利用した lacto-*N*-tetraose の酵素合成法の開発
○則岡　翼[1]，後藤愛那[1]，加藤紀彦[1]，諏訪英理子[2]，松尾道憲[2]，北岡本光[3]，片山高嶺[1]（[1]京大院生命，[2]京女大院家政，[3]農研機構　食品研）

P024 1D8a08　乳酸菌を模倣した金ナノ粒子合成手法の開発
○加藤由悟[1]，菊池郁也[1]，吉村悦郎[1,2]，鈴木道生[1]（[1]東大院農，[2]放送大教養）

P025 1D8p03　ペンタクロロフェノールの微生物分解を促進する固体腐植物質の特徴
○笠井拓哉[1,2]，ファムデュエンミン[1]，章　春芳[2]，片山新太[1,2]（[1]名大・未来研，[2]名大院・工）

P026 1C7p02　*Rhodobacter sphaeroides* における *nifA* 改変および炭酸固定経路遮断による酢酸からの水素収率の向上
○清水　哲[1]，寺本陽彦[1]，乾　将行[1,2]（[1]RITE，[2]奈良先端大・バイオ）

P027 1C7p06　小胞体局在型グリセロール３リン酸アシル基転移酵素の過剰発現による藻類オイル生産性の飛躍的向上
福田　智，平澤英里，竹村時空，高橋颯太，チョクシカウミール，パンチャイムラン，田中　寛，○今村壮輔（東工大・化生研）

P028 1E4a01　FRET 型プローブを用いた endo-*α*-mannosidase の活性評価
○佐野加苗[1]，栗原大輝[2]，黒岩歩美[1]，石井希実[1]，戸谷希一郎[2]，吉原利忠[1]，松尾一郎[1]（[1]群馬大院理工，[2]成蹊大理工）

P029 1E4p10　哺乳類 CMP-シアル酸合成酵素の細胞内動態および細胞外分泌の分子機構の解明
○荒川広夢[1,2]，呉　　迪[1,2]，藤田明子[1,2]，佐藤ちひろ[1,2]，北島　健[1,2]（[1]名大・生物機能セ，[2]名大院・生命農）

P030 1E5a02　ヒト脱アセチル化酵素 SIRT2 の脱アセチル化・脱アシル化制御機構
○工藤紀雄[1]，新真由美[1]，中田明子[1]，堀江由美[1]，大貫哲男[1]，伊藤昭博[2,3]，吉田　稔[1,2,4]（[1]理研CSRS・創薬シード，[2]理研CSRS・ケミカルゲノミクス，[3]東薬大・生命科学部，[4]東大院農・応生工）

P031 1E5a05　*Microbacterium hydrocarbonoxydans* 由来 ABC トランスポーター基質結合サブユニットの結晶構造解析による基質認識機構の解明
○島村香穂[1]，秋山友了[1]，竹野谷美穂子[2]，伊藤晋作[2]，佐々木康幸[2]，矢嶋俊介[2]（[1]東農大院バイオ，[2]東農大生命バイオ）

P032 1E5a12　L-glucose を基質としうる scyllo-inositol dehydrogenase の 結晶構造解析
○鈴木麻佑[1]，小澤国生[1]，深野和紘[1]，伊藤晋作[1]，佐々木康幸[2]，中村　顕[3]，矢嶋俊介[2]（[1]東農大院バイオ，[2]東農大生命バイオ，[3]筑波大生命環境）

P033 1E5a13　超好熱性アーキア由来クランプ PCNA 上で働く DNA 複製タンパク質の生化学および構造の解析
○石野園子[1]，真柳浩太[1]，白井　剛[2]，清成信一[1]，今井奈美子[1]，大山拓次[3]，山上　健[1]，石野良純[1]（[1]九州大，[2]長浜バイオ大，[3]山梨大）

P034 1E5p05　安定同位体標識ラマンイメージングを用いた糸状菌の代謝ダイナミクスの可視化
○安田　充[1]，竹下典男[2]，重藤真介[1]（[1]関西学院大理工，[2]筑波大生命環境）

P035 1B2a06　コシヒカリに由来する良食味遺伝子座が及ぼす精白米に含まれる低分子量化合物への影響について
○辻井良政[1]，木村圭一[1]，米澤加代[1]，齋藤彰宏[1]，堀　清純[2]，高野克己[1]（[1]東京農大応生・農化，[2]農研機構作物開発センター）

P036 1B2a07　窒素施肥がイネ種子のデンプン組成に与える影響
○酒井孝一朗[1]，黒田昌治[2]，緑川景子[1]，阿部啓子[1,3]，朝倉富子[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]農研機構・中央農研，[3]神奈川科学技術アカデミー）

P037 1B2p02　乳のアルカリ条件における加熱凝乳機序
○寺内広行[1]，岡　大貴[2]，野口智弘[3]，高野克己[2]（[1]東京農大院農・農化，[2]東京農大応生・農化，[3]東京農大応生・食加技セ）

P038 1B2p04　鶏卵卵白加熱ゲル形成におけるシステイン残基の加熱挙動
○小山翔大[1]，岡　大貴[2]，辻井良政[2]，野口智弘[3]，半田明弘[4]，高野克己[2]（[1]東農大院農・農化，[2]東農大応生・農化，[3]東農大応生・食加技セ，[4]キユーピー株式会社）

P039 1B3a10　筋芽細胞モジュールの積層による培養肉の構築
○古橋麻衣[1,2]，森本雄矢[2]，島　亜衣[2]，仲村太志[1]，石川　博[3]，竹内昌治[2]（[1]日清食品HD(株)グローバルイノベーション研究センター，[2]東京大学生産技術研究所，[3]筑波大学医学医療系）

P040 1B5p01　短鎖脂肪酸はマスト細胞のアレルギー性応答を抑制する
○三浦亮介，藤垣　泉，飯塚雄輝，蔭山あづさ，笠倉和巳，八代拓也，西山千春（東理大基礎工）

P041 1B5p02　腸内細菌によるマスト細胞の顆粒形成関連分子の発現抑制
○池谷彩花[1]，高野真衣[1]，笠倉和巳[1,2]，中西祐輔[1]，花澤重正[1]，高橋恭子[1]（[1]日大生資，[2]ラ・ホヤアレルギー免疫研究所）

P042 1B1a05　高脂肪食の時間制限給餌による SAM マウスの聴覚老化の遅延
○大池秀明，薊　佳代（農研機構／食品研）

P043 1B1a11　12α 胆汁酸負荷により誘導される症状のラットおよびマウスを用いた比較
○吉田　凌[1]，堀　将太[2]，原　博[2]，石塚　敏[2]（[1]北大農，[2]北大院農）

P044 1B1p08　AMPK の活性化を制御する新規化合物の探索
○樋口敬太[1]，鈴木　司[1,2]，井上　順[1,2]，山本祐司[1,2]（[1]東農大院・農・農化，[2]東農大院・応生・農化）

P045 1B1p12　“スクロース過剰毒性”は消化管を介して脂肪肝と高中性脂質血症を誘導する
○小田裕昭[1]，孫　淑敏[1]，梅木美樹[2]，西村直道[3]，望月　聡[4]（[1]名大院生命農，[2]別府大食栄，[3]静岡大農，[4]大分大教育）

P046 1B5a06　光センシングによる簡便な未病マーカーの開発
○數村公子[1]，波多野薫子[1]，玻名城隼[2]，川西寿美[2]，美和登志幸[1]，服部将貴[3]，竹内康造[1]，稲川裕之[2,4]，杣源一郎[2,4]，大澤俊彦[5]（[1]浜松ホトニクス・中研，[2]自然免疫技組，[3]浜松ホトニクス・GSCC，[4]新潟薬大・健康自立，[5]愛知学院大・心身）

P047 1B5p15　マイクロ RNA Let-7b を介したデルフィニジンの抗メラノーマ作用
○村田　希[1,2]，山田脩平[2]，立花宏文[2]（[1]愛媛大・ADRES，[2]九大院農院・生機科）

P048 1B4p14　糖質制限食の長期摂取が腸内細菌叢や寿命に与える影響
○山本和史，巫　啓明，都築　毅（東北大院・農）

P049 1B4a03　グルコース-6-リン酸脱水素酵素を用いた，化合物のプロオキシダント能および抗酸化能の簡便な評価
○黒川洋一，伊佐純一，三浦歩馬（福井県大生物資源）

P050 1B4a15　ファージディスプレイ法を用いた過酸化脂質修飾タンパク質抗体の作製
○阿南優佑，佐々木栄太，板倉正典，内田浩二（東大院農生科）

A2 会場　P051 ～ P100

P051 1B4p03　「EGCG による抗加齢タンパク質 SMP30 の発現制御機構」
○荒川航太，井上博文，勝間田(坪井)理恵，高橋信之，上原万里子（東農大農）

P052 1B4p08　黒米糠の経口投与による老齢マウス脳組織における tau リン酸化抑制
○原　崇[1]，石橋実学[2]，池内　健[3]，金古堅太郎[1]，中村澄子[4]，城斗志夫[1]，西澤正豊[3]，三ツ井敏明[1]，山崎　彬[5]，小林　篤[5]，大坪研一[4]（[1]新潟大農，[2]新潟大院自然科学，[3]新潟大脳研，[4]新潟薬大応用生命，[5]越後製菓）

P053 1B3p07　グア豆由来水溶性食物繊維は便秘自閉症スペクトラム障害（ASD）児の腸内環境を改善し，ASD 併存症状を緩和する
○井上　亮[1]，阪上由子[2]，河田祐樹[1]，玉置竜士[1]，安川然太[3]，小関　誠[3]，澤井ちひろ[2]，上羽智子[4]，野々村和男[4]，塚原隆充[5]，内藤裕二[6]（[1]京都府立大学，[2]滋賀医科大学，[3]太陽化学，[4]守山市民病院，[5]栄養病理学研究所，[6]京都府立医科大学）

P054 1B3p06　食餌脂肪の質の違いがフルクトオリゴ糖摂取ラットの大腸 ALP 活性誘導と腸内環境変動に及ぼす影響
○岡崎由佳子，粟津瑠姫，木村李華，小檜山聖佳（藤女子大・人間生活）

P055 1B3a03　トランスサイレチン安定化作用を持つカルノシン酸の機能解析
○海切弘子[1]，谷本　暁[1]，柴田紗知[2]，味八木茂[3]，松原主典[1]（[1]広島大院・教育，[2]福山大・生命工，[3]広島大病院・未来医療センター）

P056 1B3a04　オートファジー活性を制御する食品成分の探索
○藤元　萌，大西康太，坂井麻衣子，福田哲平，大西愛花，増田真志，奥村仙示，河合慶親，竹谷　豊（徳大医）

P057 1E2a04　AMPK による SRSF1 のリン酸化を介した選択的スプライシング制御機構の解明
○松本英里[1]，鈴木　司[1,2]，井上　順[1,2]，山本祐司[1,2]（[1]東農大院・農・農化，[2]東農大・応生・農化）

P058 1E2a07　コラーゲン架橋構造ピリジノリンは糖化タンパク質受容体 RAGE の内因性のリガンドである
○三宅春奈[1]，村上庸人[1]，岡田楓夏[1]，藤野峻行[1]，倉知遼太郎[1]，長谷川俊樹[1]，臼井照幸[2]，早瀬文孝[1]，渡辺寛人[1]（[1]明治大農，[2]女子栄養大栄養）

P059 1E2a12　NPM1 との相互作用を介した p27 機能抑圧メカニズムの解析
○松下凪沙，小林加奈，米谷達哉，千葉櫻拓（東農大院 バイオ）

P060 1E3a02　高脂肪食給餌マウスのエネルギー代謝に関する研究
○世良悠夏[1]，児山有希[2]，渡邊美優[2]，三浦　徳[1]，
増澤(尾﨑)依[2]，細野　崇[1,2]，関泰一郎[1,2]　([1]日大院・生資科・応生科，[2]日大・生資科・生命化)

P061 1E3a03　父親の肥満と母親の妊娠期栄養制限がマウス次世代の糖・脂質代謝に及ぼす影響
○石井彩香，平井　静，中村絵里，小澤彩花，江頭祐嘉合　(千葉大院・園芸・応生化)

P062 1E3p02　ドーパミン D1/5 受容体による cAMP 情報伝達経路活性化を介した海馬依存性記憶制御
○六川智博，長谷川俊介，喜田　聡　(東農大・応生科・バイオ)

P063 1E3p06　リジン長鎖アシル化タンパク質の網羅的な探索法の開発
○加藤　竜[1]，則次恒太[1,2,3]，鈴木健裕[4]，堂前　直[4]，吉田　稔[2,3]，
伊藤昭博[1,2]　([1]東薬大・生命科学，[2]理研CSRS・ケミカルゲノミクス，[3]東大院・農生科・応生工，[4]理研CSRS・生命分子解析)

P064 1E3p05　筋萎縮時に応答する新規繊維芽細胞増殖因子の同定
○野口　惇，清水　誠，小田耕司，山内祥生，佐藤隆一郎　(東大院・農生科・応生化)

P065 1C3p02　高脂肪食中に含まれる脂肪酸がラット盲腸内細菌叢構成に与える影響の解明：脂肪酸仮説の検証
○阿部隆行[1]，渡辺真通[1]，藤田祐己[1]，小椋義俊[2]，吹谷　智[1]，
石塚　敏[1]，林　哲也[2]，横田　篤[1]　([1]北大院農，[2]九大院医)

P066 1C3a05　ヒトの皮膚常在菌 *Cutibacterium acnes* の MALDI-MS プロテオタイピング
○寺本華奈江，児嶋浩一，山田賢志，大久保達樹，関谷禎規，
岩本慎一，田中耕一　((株)島津製作所)

P067 1C4a08　プロバイオティックビフィズス菌 *Bifidobacterium longum* JBL05 株の腸溶性シームレスカプセルによる経口投与がヒト腸内細菌叢に与える効果
ディサヤナカムディヤンセルジ[1]，河野麻実子[2]，児玉高幸[2]，
野村　泉[1]，○鈴木　徹[1]　([1]岐阜大学，[2]森下仁丹(株))

P068 1C4a13　細菌の細胞壁成分に対する光触媒反応の影響
○髙尾綾乃[1,2]，大嶋佑治[1]，岡本歩未[1]，落合　剛[2,3]，藤嶋　昭[2,3]，
鈴木智順[1,3]　([1]東理大　応生，[2]KISTEC，[3]東理大　総研)

P069 1C4p05　酵母 *Yarrowia lipolytica* における *n*-アルカンへの吸着と細胞形態に関する研究
○高橋直熙[1]，石丸千晶[2]，岩間　亮[2]，渡邉夏仁[2]，志波　優[3,4]，
兼崎　友[4]，堀内裕之[2,5]，福田良一[2,5]　([1]東大・農，[2]東大院・農生科，[3]東農大・生命科学，[4]東農大・生物資源ゲノム解析セ，[5]東大・微生物連携)

P070 1C4p09　部位特異的 *in vivo* 光架橋法を用いた大腸菌の LPS トランスロコンサブユニット LptD の生合成過程の解析
○渡邊哲朗，宮﨑亮次，森　博幸，秋山芳展　(京大ウイルス・再生研)

P071 1C4p10　*Buttiauxella* 属細菌の To-Pal 系欠損による多重膜小胞形成
髙木航太郎[1]，田原悠平[2]，新谷政己[1]，大熊盛也[3]，宮田真人[2]，
二又裕之[1,4]，○田代陽介[1]　([1]静大院総合科技，[2]大阪市大院理，[3]理研バイオリソースセ，[4]静大グリーン研)

P072 1C4p14　*Shewanella* sp. HM13 の細胞外膜小胞への積荷輸送における膜表層構造の役割
○釜阪紘平，チェンチェン，樽林俊樹，川本　純，小川拓哉，
栗原達夫　(京都大学化学研究所)

P073 1C2p14　A-factor 結合型自己調節因子受容体 ArpA の結晶構造
○夏目　亮，稲葉龍生，藤田雄太，廣沢雄也，和田英嗣，
加藤雄己　(東京電機大学)

P074 1C2a06　メタノール資化性酵母 *Candida boidinii* における P-body とメタノール誘導性 mRNA の細胞内動態解析
○幅田亜香莉，白石晃将，由里本博也，阪井康能　(京大農)

P075 1C1p04　米麹におけるコウジカビの破精込みの蛍光イメージング解析
○安井瑞稀[1]，高谷直樹[1]，丸山潤一[2]，竹下典夫[1]　([1]筑波大生命環境，[2]東京大応生工)

P076 1C5a03　好気・微好気・嫌気条件下におけるプラスミドの接合伝達性の比較
○越智健太郎[1]，柳谷洸輔[1]，徳田真穂[2]，大熊盛也[3]，金原和秀[1,2]，
新谷政己[1,2,3]　([1]静大院・総合科技，[2]静大・工，[3]理研・BRC-JCM)

P077 1C5a06　希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の胞子嚢膜構成タンパク質の同定と機能解析
○前田聡史[1]，手塚武揚[1,2]，大西康夫[1,2]　([1]東大院・農生科，[2]東大・微生物連携機構)

P078 1C5a12　冬虫夏草（*Cordyceps militaris*）由来レクチンの機能解析
○小野晶子[1]，柏　毅[2]，本山高幸[2]，崔　宰熏[3,4]，平井浩文[3]，
道羅英夫[3]，長田裕之[2]，河岸洋和[3,4]，鈴木智大[5]　([1]宇都宮大院・農，[2]理研CSRS・ケミカルバイオロジー，[3]静岡大・グリーン研，[4]静岡大・農，[5]宇都宮大・バイオ)

P079 1C5p09　大腸菌のトキシンーアンチトキシン遺伝子による細胞休眠と遺伝子の水平伝播
○中島信孝[1]，秋山健太郎[2]　([1]産総研生物プロセス，[2]東工大生命理工)

P080 1C5p11　出芽酵母における pre-tRNA capping の発見と機能解析
○大平高之，菊池一徳，中塚太一，鈴木　勉　(東京大学)

P081 1C5p12　麹菌の固体培養特異的発現を示す遺伝子の転写制御に関与する転写因子 FlbC の細胞内局在と翻訳後修飾
○荒井　啓[1]，田中瑞己[2]，吉村　緑[1]，新谷尚弘[1]，五味勝也[1]　([1]東北大農，[2]静岡県大)

P082 1C1a02　光照射による大腸菌の中心代謝経路のフラックス制御
○タンダルセバスティアントミ[1]，妹尾幸枝[2]，戸谷吉博[2]，
清水　浩[2]　([1]大阪大学，[2]大阪大学大学院情報科学研究科)

P083 1C1a10　ユーグレナ油脂生産における硫黄に関する副次的反応の解明
○山田康嗣[1,2]，新多智明[1]，阿閉耕平[1,2]，城山真恵加[3]，井上小槙[4]，
樋口千恵子[1]，新田伸子[1]，大城　聡[5]，持田恵一[2,4,6,7]，
岩田　修[1,2]，大津　巌[1,3]，鈴木健吾[1,2]　([1]ユーグレナ，[2]理研BTZ，[3]筑大，[4]理研CSRS，[5]沖縄工専，[6]横市大，[7]岡大)

P084 1C1a07　電極を電子受容体とした微生物アンモニア酸化反応の検討と機構解析
○齋藤淳貴[1]，橋本和仁[2]，岡本章玄[3]　([1]東大工，[2]物材研，[3]センサ・アクチュエータ研究開発センター，物材研)

P085 1C7a01　アミノ酸機能工学を活用した大腸菌へのロバスト性の付与
○磯貝章太，高木博史　(奈良先端大)

P086 1C7a14　実用的酢酸発酵を目指した *Acetobacter pasteurianus* の低栄養育種と高温適応育種
○松本奈実[1]，大澄直樹[2]，パタナタボーンティーリサラ[3]，
末吉里帆[4]，松谷峰之介[1]，片岡尚也[1,4,5]，薬師寿治[1,4,5]，
ティーラグールガンジャナ[3]，白石　靖[2]，松下一信[1,4,5]　([1]山口大院創成科学，[2]キユーピー醸造(株)，[3]カセサート大，[4]山口大農，[5]山口大中高温微セ)

P087 1D1a12　ゲノム編集を利用した麹菌 *Aspergillus oryzae* における異種二次代謝産物生産および生産性の向上
○齋藤直也[1]，片山琢也[1,2]，南　篤志[3]，及川英秋[3]，丸山潤一[1,2]
([1]東大院・農生科・応生工，[2]東大・微生物連携機構，[3]北大院・理)

P088 1D1a13　細胞性粘菌 *D.discoideum* が持つ SteelyB 酵素の産物多様性機構の解明
○今井　玲[1]，飯島知之[2]，山中彩夏[2]，品川知則[2]，荒木　剛[1]，
齊藤玉緒[1]　([1]上智大・理工，[2]上智大院・理工)

P089 1D1p07　子嚢菌 *Talaromyces trachyspermus* による Spiculisporic acid の効率的生産
○林　真人[1]，高野真希[1]，畑下昌範[2]，星野一宏[1]　([1]富山大院理工，[2]若狭湾エネ研)

P090 1D7a10　*Pseudomonas citronellolis* LA18T 株由来レブリニル CoA 合成酵素の解析
○羽部　浩[1]，佐藤由也[1]，小池英明[2]，飯村洋介[1]，堀　知行[1]，
菅野　学[2]，木村信忠[2]，桐村光太郎[3]　([1]産総研・環境管理，[2]産総研・生物プロセス，[3]早稲田・応化)

P091 1D7p03　鉄還元酵素を利用した香気を有するセスキテルペノイド(-)- ロタンドン合成法の開発
○梅澤　覚[1,2]，木野邦器[1]　([1]早大院・先進理工・応化，[2]長谷川香料(株))

P092 1D7p10　SDGs に重要なアンモニアを生産する酵母セルファクトリーの構築
○渡邉幸夫[1]，黒田浩一[1]，立道祐輝[2]，仲原丈晴[2]，植田充美[1]　([1]京大院・農・応用生命，[2]キッコーマン株式会社・研究開発本部)

P093 1D7p14　*Rhodococcus wratislaviensis* C31-06 株における新規 α-アミノイソ酪酸代謝経路の全容解明
○日比　慎[1,2]，間中千尋[2]，福田　大[2]，油谷駿介[2]，青木　航[2]，植田充美[2]，野尻増俊[3]，八十原良彦[3]，高橋里美[2]，小川　順[2]　([1]富山県立大工・生工研セ，[2]京大院農，[3]カネカバイオテクノロジー研究所)

P094 1E6a02　複機能性物質カリキンの受容体阻害剤探索とその応用に関する研究
○酒井寿彦，姜　　凱，喜久里貢，徐　玉群，高橋郁夫，太田　鋼，宮川拓也，田之倉優，中村英光，浅見忠男　(東大院・農生科・応生化)

P095 1E6p02　立体選択的なストリゴラクトン生産に関与するソルガム LGS1 酵素の機能解析
○依田彬義[1]，森　愛美[2]，齋藤睦美[1]，菊地麻祐[3]，神林瑛瑠[3]，謝　肖男[1,4]，米山香織[5]，秋山康紀[2]，米山弘一[4]，野村崇人[1,4]　([1]宇都宮大院・農，[2]大阪府立大院・生命環境，[3]宇都宮大・農，[4]宇都宮大・バイオ，[5]愛媛大・農)

P096 1E6p03　ソルガムのストリゴラクトン生合成経路におけるソルゴモール合成酵素の同定
○若林孝俊[1,2]，支田香澄[1]，石輪俊典[1]，水谷正治[1]，杉本幸裕[1,2]　([1]神戸大院・農・生命機能科学，[2]JST/JICA・SATREPS)

P097 1E7a10　珪藻由来光化学系 II アンテナタンパク質 FCP 超複合体のクライオ単粒子構造解析
○秋田総理[1,2]，長尾　遼[1]，加藤公児[1]，宮崎直幸[3]，沈　建仁[1]　([1]岡大異分野，[2]JSTさきがけ，[3]阪大蛋白研)

P098 1E7a12　イネケイ酸輸送体 Lsi1 の極性分布に関する解析
○小西範幸，馬　建鋒　(岡山大　植物研)

P099 1E7p04　植物における匂い受容体候補の発見
○永嶌鮎美[1,2,3]，檜垣　匠[4,5]，肥塚崇男[6]，石神　健[1,7]，細川聡子[1]，渡邉秀典[1]，松井健二[6]，馳澤盛一郎[4]，東原和成[1,2,8]　([1]東大院・農生科・応生化，[2]ERATO東原化学感覚シグナルプロジェクト，[3]東工大・バイオ研究基盤支援総合センター，[4]東大院・新領域・先端生命，[5]熊本大・国際先端科学技術研究機構，[6]山口大院・創成科学，[7]東農大・生命科学，[8]東大ニューロインテリジェンス国際研究機構)

P100 1E7p08　光ストレス順応における葉緑体型アスコルビン酸ペルオキシダーゼの生理学的重要性
岡安嵩也，三冨　弦，亀岡峰志，菊樂香奈，岩上拓己，小川貴央，石川孝博，○丸田隆典　(島根大・生資科)

ポスター番号 講演番号　　演　　題　　発表者氏名(所属)

A1 会場　P001 ～ P050

P001 3D5a11　ヤマブシタケ（*Hericium erinaceus*）の生活環各段階における生物活性物質の網羅的探索
○呉　　静[1]，石岡達朗[2]，崔　宰熏[1,2,3]，平井浩文[1,2,3]，河岸洋和[1,2,3,4]
([1]静大・農，[2]静大院・総合農，[3]静大・グリーン研，[4]静大院・創造)

P002 3D5a14　LC/Q-TOF MS によるパリトキシン類縁体オストレオシン類の構造研究－ Pseudo-MS^3 法の妥当性検証とオストレオシン -E1 構造解析への適用―
○寺島健仁[1]，内田秀明[2]，阿部尚樹[1,3]，安元　健[4]　([1]東農大院・食品栄養，[2]アジレント・テクノロジー，[3]東農大・応生，[4]日本食品分析センター)

P003 3D5a15　蓄積された青枯病菌ゲノム情報を活用した新規リポペプチドの探索と単離・構造決定
○小松頌子，甲斐建次　(阪府院・生命環境)

P004 3D2a13　植物ホルモン Abscisic Acid の生合成における新規環化酵素の機能解析-1-
○瀧野純矢，小崎拓登，佐藤芳郎，劉　成偉，尾崎太郎，南　篤志，及川英秋　(北大院理)

P005 3D2p09　糸状菌由来酵素 CghA による立体選択的な Diels-Alder 反応の機構解明
○岸本真治，横山　葵，佐藤道大，前田直哉，恒松雄太，原　幸大，橋本　博，渡辺賢二　(静岡県大薬)

P006 3D2p11　キノコ由来テルペン系天然物の汎用的な生産法の開発-1-
○劉　成偉[1]，佐藤芳郎[1]，尾崎太郎[1]，呉　　静[2]，丸山潤一[3]，南　篤志[1]，河岸洋和[2]，及川英秋[1]　([1]北大院理，[2]静岡大・農，[3]東大院・農生科・応生工)

P007 3D2a10　放線菌由来 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid 合成酵素の同定および酵素学的諸性質
○茅根千湖[1]，橋本絢子[2]，小曽根郁子[2]，新家一男[3]，濱野吉十[1]，丸山千登勢[1]　([1]福井県大院・生物資源，[2]JBIC，[3]産総研)

P008 3D3p13　アミロイド β42 の毒性オリゴマーに対する核酸アプタマーの開発研究と脳組織染色への応用
○村上一馬[1]，小畑弥生[1]，関川あさ[1]，上田　遥[1]，泉尾直孝[2]，粟野達也[1]，高部圭司[1]，清水孝彦[2]，入江一浩[1]　([1]京大農，[2]千葉大医)

P009 3D3a12　エポキシシクロヘキセンジオン類によるミトコンドリア ADP/ATP 輸送体の凝集メカニズムの 解明
○青山綾希，村井正俊，三芳秀人　(京大院・農・応用生命)

P010 3D3p03　ユビキチンリガーゼ Rsp5 遺伝子変異酵母株を用いた塩ストレスに対する生育回復活性物質のスクリーニング
○松浦秀太郎[1]，栗澤尚瑛[2]，西谷直之[3]，高木博史[4]，木村賢一[1,2]　([1]岩手大・農，[2]岩手大院・総合科学，[3]岩手医大薬・情報薬科学，[4]奈良先端大・バイオサイエンス)

P011 3D3a07　ネオニコチノイドの選択毒性発現における Loop C の役割
○嶋田翔太，疋田麻衣，重藤　渉，松本祥太郎，谷河　純，伊原　誠，松田一彦　(近大院・農・応生科)

P012 3D1a13　コムラサキシメジ（*Lepista sordida*）における 2-azahypoxanthine の生合成研究
○伊藤彰将[1,2]，古田島美颯[3]，崔　宰熏[3,4]，道羅英夫[4]，平井浩文[3,4]，浅川倫宏[5]，大内仁志[6]，稲井　誠[6]，菅　敏幸[6]，河岸洋和[1,4]　([1]静大院・創造，[2]JSPS，[3]静大院・総合農，[4]静大・グリーン研，[5]東海大・創造，[6]静県大・薬)

P013 3D1a15　糖結合性天然色素の二量体を用いた真菌の染色
○田浦寛太[1]，小鹿　一[1]，五十嵐康弘[2]，伊藤幸成[3]，中川　優[1,3]　([1]名古屋大，[2]富山県大，[3]理研)

P014 3D4p12　ネコブセンチュウの誘引機構の解明とその応用
○井田和輝[1]，吉田翔太郎[1]，西川博崇[1]，開出智美[1]，伊藤晋作[2]，石毛太一郎[3]，岩堀英晶[4]，近藤竜彦[1]，小鹿　一[1]　([1]名大院・生命農，[2]東農大・応用科・バイオ，[3]東農大・ゲノムセンター，[4]龍谷大学・農)

P015 3D4a03　(*Z*)-2β-Hydroxy-14-hydro-β-santalol の両鏡像体の合成と絶対立体配置の決定
○門脇和生[1]，山田慎也[1]，會場翔平[2]，川崎常臣[2]，勝田　亮[3]，矢島　新[3]，額田恭郎[3]，滝川浩郷[1]，渡邉秀典[1]，石神　健[3]　([1]東大院農，[2]東理大理，[3]東農大・生命)

P016 3D4a01　D-体と L-体の糖を構成成分とするシクロデキストリン類縁体の合成研究
○後藤楠太[1]，河原直子[2]，井上裕香[2]，勝田　亮[3]，矢島　新[3]，石神　健[3]，額田恭郎[3]　([1]東農大院・農，[2]東農大・応生，[3]東農大・生命)

P017 3D4a06　Oscillatoxin D の合成と生物活性評価
○花木祐輔[1]，新木悠介[1]，野倉吉彦[1]，中崎敦夫[1]，北　将樹[1]，早川皓太郎[2]，入江一浩[2]，西川俊夫[1]　([1]名大院生命農，[2]京大院農)

P018 3E2a11　環状イミン構造を有する β-カルボリンアルカロイド分解酵素の発見
永久保利紀[1]，○熊野匠人[1]，太田雄大[2]，橋本義輝[1]，小林達彦[1]　([1]筑波大院・生命環境，[2]山陽小野田市立山口東京理科大学・工学部)

P019 3E2a13　好熱性アーキアに存在する新規色素依存性 L-乳酸脱水素酵素複合体の解析
○里村武範[1,2]，宇野紘平[1]，角間真人[1]，黒沢則夫[5]，櫻庭春彦[3]，大島敏久[4]，末信一朗[1,2]　([1]福井大工，[2]福井大ライフ，[3]香川大農，[4]大阪工大工，[5]創価大)

P020 3E2a14　シアノバクテリアのビオチン生合成経路に見出された新規脱水素酵素の機能と構造に関する研究
○榊　　渓[1]，大石恵太[1]，清水　哲[1]，小林一幾[3]，富田武郎[1,2]，田中　寛[3]，葛山智久[1,2]，西山　真[1,2]　([1]東大・生物工学セ，[2]東大・微生物イノベ連携機構，[3]東工大・化生研)

P021 3E2p02　*Arthrobacter globiformis* 由来トランスケトラーゼを用いたヘプトース生産
○山根一倖[1]，久住優花[1]，加藤志郎[2]，望月　進[2]，吉原明秀[2]，秋光和也[2]，何森　健[2]　([1]香大農，[2]香大・希少糖)

P022 3E2p11　タマネギ由来催涙因子合成酵素の触媒機構
○佐藤優太[1]，荒川孝俊[1,2]，高辺潤平[1]，青柳守紘[3]，加藤雅博[3]，鴨井享宏[3]，正村典也[3]，柘植信昭[3]，今井真介[3]，伏信進矢[1,2]　([1]東大院・農生科・応生工，[2]東大微生物連携機構，[3]ハウス食品・中央研究所)

P023 3D8p03　疎水性プラスチックを強く吸着する *Cladosporium* sp. TPet-1 株の分離とその諸性質
○小池　優，橋床泰之　(北海道大学院農)

P024 3D8p11　*Pseudomonas stutzeri* NT-I による水相のテルルの効率的揮発化
○黒田真史，畠中玄彦，末神悠人，井上大介，池　道彦　(阪大院工)

P025 3C7a05　二次細胞壁形成に関わる WRKY 転写因子欠損変異イネの作出とそのリグノセルロース性状解析
○宮本託志[1]，高田理江[1]，飛松裕基[1]，鈴木史朗[1]，山村正臣[1]，刑部敬史[2]，刑部祐里子[2]，坂本正弘[3]，梅澤俊明[1,4]　([1]京大生存研，[2]徳大生物資源，[3]京大農，[4]京大グローバル生存基盤)

P026 3C7a13　ルビスコ経路を利用した組換え大腸菌におけるグリコール酸ポリマー生合成系の構築
永田暁洋[1]，齋藤樹理[1]，横尾俊憲[1]，工藤悠希[1]，堀　千明[1]，大井俊彦[1]，田口精一[2]，○松本謙一郎[1,3]　([1]北大院工，[2]東農大生命科学，[3]ALCA-JST)

P027 3D8a08　光合成をモチーフとした高出力バイオ太陽電池の構築
○足立大宜[1]，北隅優希[1]，白井　理[1]，片岡邦重[2]，加納健司[1]　([1]京大院農，[2]金沢大理工)

P028 3E4a02　*Schizosaccharomyces* 属におけるピルビン酸含有糖鎖の構造解析
○福永嵩大[1]，樋口裕次郎[1]，前川裕美[1]，田中直孝[2]，竹川　薫[1]　([1]九大院生資環，[2]香川大農)

P029 3E5a03　全身麻酔薬はなぜ効くのか：ハエトリグサなど植物を用いた活動電位や細胞膜挙動の可視化
○陽川　憲[1]，蔭西知子[1]，Andrej Pavlovic[2]，Stefano Mancuso[3]，Frantisek Baluska[4]　([1]北見工大，[2]パラツキー大学オロモウツ，[3]フィレンツェ大学，[4]ボン大学)

P030 3E5a06　空間・構造・運動性相関スペクトルを用いた複雑系代謝物群の俯瞰的プロファイリング技術の開発
○伊藤研悟[1,2]，坪井裕理[1]，伊達康博[1,2]，菊地　淳[1,2,3]　([1]理研CSRS，[2]横市院生命医，[3]名大院生命農)

P031 3E5p06　アコヤガイ貝殻内の ACC 結合タンパク質の構造・機能解析
○岩橋晴香[1]，荒城綾香[1]，永田宏次[1]，根岸瑠美[2]，降旗一夫[1]，鈴木道生[1]　([1]東大院農，[2]東大定量研)

P032 3E5p08　細菌の金属輸送に関わる EfeUOB 系構成アルギン酸結合タンパク質のレアメタル結合性
○奥村憲史[1]，三上文三[1]，村田幸作[2]，橋本　渉[1]　([1]京大院農，[2]摂南大理工)

P033 3E5p13　ポリヒスチジン（His16）修飾リソソームを利用したリソソーム病に対する新規治療法の開発
○林　大輝[1]，岡本　陸[2]，河野　強[1,2]，岩崎　崇[1,2]　([1]鳥取大院・持続，[2]鳥取大・農)

P034 3B2a11　増粘剤が鼻腔内到達香気成分量に及ぼす影響
○中田勇二，北田　亮，林　和寛　(味の素株式会社)

P035 3B2p05　発酵種由来の乳酸菌がパンの官能特性に与える影響
○山田彬史，伊藤惠介，成島典子，森田亜紀，藤本章人　(MC フードスペシャリティーズ(株)製品開発研究所)

P036 3B2p07　ビール保存時に生成する新規苦味成分群の HPLC 分離と結晶スポンジ法の組合せによる網羅的な迅速構造解析
○谷口慈将[1]，菊池　貴[2]，藤田　誠[3,4]　([1]キリン基盤研，[2]リガク応技センター，[3]東大院工，[4]分子研)

P037 3B3p09　有機酸を中心とした食品添加物の併用効果によるバイオフィルムの制御
○塚谷忠之，坂田文彦　(福岡県工技セ)

P038 3B3p01　変性 β-グルカンによる難水溶性物質の可溶化（1）―包接複合体の粉末化―
○甲元一也，児玉歩夢　(甲南大FIRST)

P039 3B1a01　メタボローム解析を用いた活性ベース代謝物プロファイリング法の構築及びトマトに含まれるアディポネクチン様活性化合物の探索
○毛利晋輔[1]，高橋春弥[1]，坂井麻衣子[1]，高橋慎吾[2]，脇　尚子[2]，相澤宏一[2]，菅沼大行[2]，荒　　武[1]，松村康生[1]，柴田大輔[1]，後藤　剛[1]，河田照雄[1]　([1]京大院農，[2]カゴメ・イノベーション本部)

P040 3B1a02　*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* GCL2505 株は短鎖脂肪酸受容体 GPR43 を介して宿主のエネルギー代謝を調節する
○堀内寛子[1]，上門弘平[1]，青木　亮[1]，菅沼名津季[1]，西嶋智彦[1]，中谷明穂[2]，木村郁夫[2]　([1]江崎グリコ(株)健康科学研究所，[2]東京農工大学農学研究院)

P041 3B1a06　肝細胞の脂肪蓄積抑制作用を有する脂肪酸アミド化合物のスクリーニングとその作用機構の解明
○上久保綾祐[1]，板倉正典[1]，佐々木栄太[1]，柴田貴広[2]，赤川　貢[3]，内田浩二[1]　([1]東大院・農生科，[2]名大院・生命農，[3]阪府大院・生環科)

P042 3B1a12　食後血糖値の予測を目的とした食品の試験管内糖化速度測定法（GR 法）の開発
○陶山達矢[1]，橋本和彦[1]，村上隆之[1]，西川佳子[2]，阿部　準[2]，中西由季子[3]，佐々木一[4]，木村修一[5]　([1]山崎製パン(株)中央研究所，[2]一般財団法人日本食品分析センター栄養科学部生化学分析課，[3]人間総合科学大学人間科学部，[4]神奈川工科大学栄養生命科学科，[5]NPO法人国際生命科学研究機構(ILSI Japan))

P043 3B1p04　食品成分の消化管における認識機構の解明
○福田陽大[1]，越阪部奈緒美[1]，安達貴弘[2]　([1]芝浦工業大学，[2]東京医科歯科大学)

P044 3B1p05　腸管を作用場とする機能性ポリフェノールの吸収・代謝挙動の可視化
○田中　充，グエンフナイ，李　宝瑞，松井利郎　(九大院農)

P045 3B3p05　DIUTHAME へのブロッティングを用いたイメージング質量分析法によるイチゴ果実中の糖，有機酸，およびアントシアニンの可視化
○榎元廣文[1,2]，山根久和[1]，八田　一[3]，瀧本未羽[4]，小谷政弘[4]，大村孝幸[4]　([1]帝京大理工，[2]帝京大先端機器分析センター，[3]京女大家政，[4]浜松ホトニクス(株))

P046 3B3a12　木材を直接発酵して造る，香り豊かなアルコール
○大塚祐一郎，野尻昌信，ナバロロナルド，楠本倫久，橋田　光　(森林総研)

P047 3B5a02　アクロレイン修飾タンパク質による IgM 抗体産生機構の解析
○遠藤龍之助[1]，板倉正典[1]，佐々木栄太[1]，安達貴弘[2]，内田浩二[1]　([1]東大院・農生科，[2]東京医科歯科大学・難治疾患研)

P048 3B5a03　腸管上皮細胞が分泌するエクソソームによる炎症制御
○長谷川加奈[1]，桑田啓子[2]，吉武　淳[3]，内田浩二[4]，柴田貴広[1]　([1]名大院・生命農，[2]名大・ITbM，[3]名大・未来社会，[4]東大院・農生科)

P049 3B5a04　緑茶カテキン EGCG の血管内皮細胞由来エキソソームマイクロ RNA 発現調節とその機能
○冨岡玲乃，両角麻衣，熊添基文，藤村由紀，立花宏文　(九大院農院・生機科)

P050 3B5a07　Mechanism for the intrinsic allergenicity of Ara h 1, a major peanut allergen, excerting activation of human primary macrophages
○Masako Toda[1,2]，Maren Krause[2]，Peter Crauwels[2]，Martin Globisch[3]，Thomas Henle[3]，Ger van Zandbergen[2]，Stefan Vieths[2]，Stephan Scheurer[2]　([1]Tohoku University，[2]Paul-Ehrlich-Institut，[3]Technical University Dresden)

A2 会場　P051 ～ P100

P051 3B5p06　米ぬか由来繊維は腸内細菌叢の調節を介して大腸炎を抑制する
○田中一己[1,2,3]，アウワンピン[1,2]，鈴木健大[4]，尾花　望[8]，楊　佳約[1,2]，木村彰宏[7]，冨田　勝[1,2]，福田真嗣[1,2,3,5,6,8]　([1]慶大・先端生命研，[2]慶大・院・政策・メディア，[3]神奈川産技総研，[4]環境研・生態環境セ，[5]JST・さきがけ，[6]メタジェン，[7]国立国際医療研究センター，[8]筑波大学)

P052 3B4a10　ジペプチドライブラリーを用いたグレリン分泌調節ペプチドの包括的探索とその生理作用
○中戸絢也[1]，青木隼人[1]，徳山雄基[1]，山本雄大[1]，岩倉　浩[2]，松村成暢[1]，井上和生[1]，大日向耕作[1]　([1]京大院・農・食品生物，[2]和歌山県立医科大学・内科学第一講座)

P053 3B4a11　ラットの幼若期における咀嚼刺激が海馬の遺伝子発現と記憶能力に与える影響
○宮口一勢[1]，永井俊匡[2]，斉藤芳和[1]，安岡顕人[1,3]，阿部啓子[1,3]，朝倉富子[1]　([1]東大院農生科，[2]高崎健大・栄養，[3]神奈川県立産業技術総合研究所)

P054 3B4a13　脳幹で甘味を伝達する神経の特定
○中島健一朗[1]，傅　　欧[2]，岩井　優[2]，近藤邦生[1]，箕越靖彦[1]，三坂　巧[2]　([1]生理学研究所，[2]東大院農生科・応生化)

P055 3B4p06　加齢依存的な味感受性変化における味修飾因子の関与の検討
○上吉原絢，成川真隆，三坂　巧　(東大院農生科・応生化)

P056 3B4p09　希少糖 D-Allulose の GLP-1 分泌促進作用と求心性迷走神経を介した摂食・糖代謝調節作用
○岩崎有作[1,2]，仙度光麻[2]，出崎克也[2]，比良　徹[3]，中田正範[2,4]，原　　博[3]，Daniel J. Drucker[5]，山田祐一郎[6]，徳田雅明[7]，矢田俊彦[2,8]　([1]京都府大生命環境，[2]自治医大，[3]北大農，[4]和歌山県医大，[5]ルーネンフェルト・タネンバウム研究所，[6]秋田大医，[7]香川大医，[8]関電病院医学研究所)

P057 3E3a09　神経性疼痛物質オピオイドの腸管免疫における炎症抑制作用
○長田和樹[1]，三浦亮介[1]，長瀬　博[2]，八代拓也[1]，西山千春[1]　([1]東理大基礎工，[2]筑波大IIIS)

P058 3E3a10　葉酸欠乏によるうつ症状のメカニズム解析 －神経成熟異常およびエピゲノム変動の関与－
○西田将治，竹村　凌，橘　　新，浅利颯太，荒木良太，矢部武士　（摂南大薬・複合薬物解析学）

P059 3E8a08　ハブクラゲ刺胞内液中 IgG 特異的結合性タンパク質の精製
○鈴木智也[1]，永井宏史[2]，山下光雄[1]　([1]芝浦工大院・応化，[2]東京海洋大・海洋環境）

P060 3E8a14　マラリア原虫ヒスチジンリッチタンパク質（PfHRP2）の細胞膜透過と細胞毒性に関する研究
○下田麻由，河野　強，岩崎　崇　（鳥取大院・持続）

P061 3E4p04　マクロファージにおいて TLR4 シグナルは AKT/mTOR を介してオートファジーを調節することで炎症反応の減弱を制御する
○米野雅大，白木琢磨，芦田　久　（近畿大院・生物理工）

P062 3E4p06　Sf9 細胞を用いた昆虫嗅覚受容体のリガンド探索手法の開発
○布施寛人[1]，宮田佑吾[2]，コルネットリシャー[3]，黄川田隆洋[3]　([1]東京大学，[2]東京工業大学，[3]農研機構）

P063 3E4p07　腸管上皮細胞に対する IL-4 の影響 －オルガノイド培養系を用いた検討－
○齋藤由季，佐藤美佳，岩槻　健，只石　幹，服部一夫，清水　誠　（東農大院農）

P064 3C3a12　空間的・代謝的な相互作用を介した細菌と真菌の新たな相利共生戦略
○久知良桃花[1]，Gayan Abeysinghe[1]，桝尾俊介[2,3]，萩原大祐[2,3]，高谷直樹[2,3]，野村暢彦[2,3]，尾花　望[3,4]，竹下典男[2,3]　([1]筑波大学大学院・生命環境科学研究科，[2]筑波大学・生命環境系，[3]筑波大学・微生物サステイナビリティ研究センター，[4]筑波大学・医学医療系・トランスボーダー医学研究センター）

P065 3C3a13　プラスミド NAH7 上の接合伝達における受容菌選択性決定因子の探索
○作田郁子[1]，水口千穂[1,2]，岸田康平[3]，津田雅孝[3]，岡田憲典[1]，野尻秀昭[1,2]　([1]東大・生物工学セ，[2]東大・微生物連携機構，[3]東北大院生命）

P066 3C3p14　細胞性粘菌と様々な植物寄生性線虫の相互作用の比較
梅山拓也[1]，○鄭　明燮[2]，田川拓哉[2]，齊藤佑美子[2]，宮崎早紀[2]，永松ゆきこ[3]，齊藤玉緒[1]　([1]上智大院・理工，[2]上智大・理工，[3]パネフリ工業株式会社）

P067 3C4a03　MutS 非依存型新規ミスマッチ修復機構の解析
○竹本訓彦[1]，沼田　格[2]，末次正幸[2]，秋山　徹[1]　([1]国立国際医療研究センター，[2]立教大）

P068 3C2a10　出芽酵母の圧力適応に重要な細胞内シグナル伝達経路の探索
○望月貴博，波多野絵梨，藤山未奈，阿部文快　（青山学院大理工）

P069 3C2a14　海洋細菌 FT01 が生産する EPS が金属腐食性バイオフィルムに与える影響
○伊藤菜々子[1]，渡辺宏紀[2]，稲葉知大[3]，尾花　望[4,5]，宮野泰征[6]，野村暢彦[5,7]　([1]筑波大・生命環境，[2]筑波大院・生命環境，[3]産総研・環境管理，[4]筑波大・医学医療系・TMRC，[5]筑波大・MiCS，[6]秋田大院・理工，[7]筑波大・生命環境系）

P070 3C2p02　病原細菌における tail-to-tail 遺伝子プロファイリング解析
北田泰平[1]，谷川敦也[1]，兼崎　友[2]，吉川博文[2]，GROISMAN Eduardo[3]，○加藤明宣[1]　([1]近大農，[2]東農大農，[3]Yale Univ.）

P071 3C2p10　遺伝子組み換えにより従属栄養増殖を可能にした単細胞紅藻シゾンの解析
○向井瑞梨[1]，兼崎　友[2]，宮澤和己[1]，島田尚弥[4]，池内昌彦[4]，藤原崇之[3]，宮城島進也[3]，渡辺　智[1]　([1]東京農大，[2]静岡大・グリーン研，[3]遺伝研，[4]東京大学）

P072 3C1a02　出芽酵母 Dhog1 株の浸透圧感受性抑圧変異株を用いた新規寿命制御機構の解析
○舟木知穂，松上紗千，米北久美子，久米一規，水沼正樹　（広島大院先端研）

P073 3C2p14　次世代プロバイオティクス *Bacteroides* 属細菌による動物宿主由来粘液物質の資化と腸内優占性
○佐藤賢宏[1]，久門知也[1]，梶川幹太[2]，村田幸作[3]，橋本　渉[1,2]　([1]京大院農，[2]京大農，[3]摂南大理工）

P074 3C1a06　*Phytophthora infestans* 遊走子放出阻害物質の同定及びその作用解析
○今村　翼，甲斐建次，谷　修治，炭谷順一，川口剛司　（阪府大院・生環科）

P075 3C5a06　大腸菌リジン脱アセチル化酵素 CobB の N 末端配列の機能解析
○楳原琢哉[1]，西山　真[1,2]，古園さおり[1,2,3]　([1]東大・生物工学セ，[2]東大・微生物連携機構，[3]理研CSRS）

P076 3C5p09　大規模ゲノム再編誘発酵素の直接導入による実用酵母の育種
中村隆宏[2]，○安川泰史[1]，井村　誠[1]，増尾直久[1]，小田有沙[2]，太田邦史[2]　([1]興人ライフサイエンス株式会社，[2]東大院総合文化）

P077 3C4p09　コリネ型細菌での pHM1519 由来シャトルベクターの高コピー数変異体の取得とその解析
○羽城周平，安枝　寿　（味の素・イノベ研）

P078 3C4a06　*De novo* メタトランスクリプトーム解析とメタボローム解析の併用による捕食性細菌群の代謝戦略の解明
○佐藤由也，稲葉知大，堀　知行，羽部　浩　（産総研環境管理）

P079 3C4a11　qTnSeq 法の開発と PCB 分解細菌への適用
○大坪嘉行，永田裕二，津田雅孝　（東北大院生命）

P080 3C4a15　*Rhodococcus erythropolis* を用いた遺伝子配列改変によるタンパク質発現調節法の開発
○田島直幸[1]，北川　航[2]，齋藤　裕[1]，西宮佳志[2]，玉野孝一[2]，安武義晃[2]，田村具博[2]，亀田倫史[1]　([1]産総研AIRC，[2]産総研生物プロセス）

P081 3C1p12　超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* におけるアーキア特異的な新規 dephospho-CoA kinase の同定および解析
○下坂天洋[1,2]，MAKAROVA Kira S[3]，KOONIN Eugene V[3]，跡見晴幸[1]　([1]京大院・工，[2]日本学術振興会，[3]NCBI, NLM, NIH）

P082 3C7p03　酵母の染色体異数性が清酒醸造に与える影響
○堀田夏紀[1]，小高敦史[1]，松村憲吾[1]，杉山峰崇[2]，笹野　佑[3]，原島　俊[3]，秦　洋二[1]　([1]月桂冠・総研，[2]阪大院・工，[3]崇城大・生物生命）

P083 3C7p05　清酒酵母の減数分裂染色体組換え不全を相補する遺伝子のクローニング
○下飯　仁，川村夏希，山田美和　（岩手大農）

P084 3C7p12　麹菌群の比較ゲノム解析
○齊藤亮太[1]，織田　健[1]，岩下和裕[1,2]　([1]酒総研，[2]広先端研）

P085 3C7p14　麹菌のクエン酸生産に関与する推定細胞質膜局在輸送体 CitT の機能解析
○中村恵理[1]，門岡千尋[2]，奥津果優[1,2]，吉﨑由美子[1,2]，髙峯和則[1,2]，後藤正利[1,3]，玉置尚徳[1,2]，二神泰基[1,2]　([1]鹿児島大・農，[2]鹿児島大・連農，[3]佐賀大・農）

P086 3D1p04　複合培養における赤色色素生産非応答性変異株の解析
○石塚　匠[1]，浅水俊平[1]，柳澤昌臣[1]，佐藤勝也[2]，尾仲宏康[1]　([1]東大院農生科，[2]量研機構）

P087 3D1p08　複合微生物系によるウロリチンの生産に関する研究（4）～腸内細菌共培養によるウロリチン A 発酵生産～
○石輪俊典，中島賢則，林　素子，工藤眞丈，山本浩明　（ダイセル・コーポレート研）

P088 3D1p09　自家蛍光シグネチャー評価による新規スクリーニング法：酵母の油脂代謝性をモデルとして
○平山智弘[1]，八幡志央美[2]，高部響介[2]，川村優樹[3]，岡野千草[2]，野村暢彦[2]，八幡　穣[2]　([1]筑波大学・生命環境学群，[2]筑波大学・生命環境系，[3]筑波大学大学院・生命環境）

P089 3D7a06　Screening and functional analysis of a medium-chain fatty alcohol oxidative enzyme for microbial production of alkanes
Shigenobu Kishino[1], Satoshi Maruyama[1], ○Daniel Makoto Takeuchi[1], Masakazu Ito[2], Masayoshi Muramatsu[2], Shusei Obata[2], Jun Ogawa[1]（[1]Kyoto University Graduate School of Agriculture, [2]Toyota Motor Corporation）

P090 3D7p11　非天然ボトリオコッセン合成経路の進化デザイン
○多田和樹，坂本康二，河合繁子，斎藤恭一，梅野太輔（千葉大院工）

P091 3D7a11　多様なリグニン組成に対応できる *Pseudomonas* sp. NGC7 株を利用したムコン酸生産（I）：新規単離微生物株を用いたムコン酸生産株の作出
○阿部七瀬[1]，篠田英里[1]，高橋健司[1]，杉田晴佳[2]，上村直史[1]，園木和典[2]，政井英司[1]（[1]長岡技科大・生物，[2]弘前大・農生）

P092 3D7a15　Cyclic GMP-AMP 量産化技術の確立
○吉田　晃，石毛和也（ヤマサ醤油・医薬化成品）

P093 3E6a08　イネ免疫反応を誘導する EFa50 ペプチドの受容機構
○古川岳人[1]，松田智裕[2]，千國孝明[1]，平井洋行[1]，蔡　晃植[1,2]（[1]長浜バイオ大バイオ，[2]長浜バイオ大院バイオ）

P094 3E7a04　葯タペート組織のエピジェネティックな発生制御メカニズムの解明
○川又　奨[1]，杉　直也[1]，レティノクィン[1]，木本剛彰[2]，清永郁香[1]，岩野　恵[3]，岩井宏暁[1]，佐藤　忍[1]，高山誠司[4]，柴　博史[1]（[1]筑波大院・生命環境，[2]奈良先端大，[3]京大院・生命科学，[4]東大院・農学生命科学）

P095 3E7a06　野生イネにも保存されているファイトアレキシン生産制御因子 DPF の機能解析
○冨山詩歩[1]，川原玲香[2]，宮本皓司[3]，山根久和[3]，豊増知伸[4]，野尻秀昭[1]，岡田憲典[1]（[1]東大・生物工学セ，[2]東農大・ゲノムセ，[3]帝京大・バイオ，[4]山形大・農）

P096 3E7a13　トマト根からのトマチン分泌の解析
○大野滉平，中安　大，矢崎一史，杉山暁史（京大・生存研）

P097 3E8p02　モモ果肉色の多様化に向けた ' 天津水蜜桃 ' の紅肉形質の解析と育種マーカー開発
原美由紀[1]，鵜木悠治郎[2]，日原誠介[2]，○小田賢司[1]（[1]岡山県農総セ生科研，[2]岡山県農総セ農研）

P098 3E8p09　ゲノム編集技術を用いた多重遺伝子破壊による単細胞性緑藻（*Coccomyxa*）の油脂生産性改良
○井出曜子[1]，早川准平[2]，吉満勇也[1]，糠塚　明[1]，小松さと子[1]，今村壮輔[2,3]，原山重明[2]（[1]（株）デンソー，[2]中央大，[3]東工大）

P099 3E7p09　コーヒー原種 *Coffea stenophylla*，*C. millotii*，*C. pseudozanguebariae* からのカフェイン生合成系酵素遺伝子の単離と機能解析
○國久葉月[1]，高木　駿[1]，倉田陸朗[1]，Valerie Poncet[2]，Alexandre de Kochko[2]，水野幸一[1]（[1]秋田県大生物資源，[2]IRD-Montpellier DIADE）

P100 3E7p14　カロテノイド・クロロフィル簡便迅速測定法によるトマト品種の大規模スクリーニング
○青野佑亮[1]，アシキンヨナタン[1]，王　　寧[1]，クリーハリー[2]，草野　都[1,3]（[1]筑波大生物資源，[2]フロリダ大植物イノベーションセンター，[3]理研CSRS）

講演番号：1B1a01
講演日時：3 月 24 日 09:00～ 1 号館 B1 会場

糖質・脂質バランスの違いが閉経後モデルマウスの肥満に及ぼす影響

Influence of differences in carbohydrate and fat balance on obesity in postmenopausal model mice

○川和 理恵[1]、井上 怜子[1]、塩越 美春[2]、石川 朋子[3]、市 育代[3,4]、藤原 葉子[3,4] ([1]お茶大・食物、[2]お茶大院・ライフサイエンス、[3]お茶大・HLI 研、[4]お茶大・基幹研究院)
○Rie KAWAWA[1], Satoko INOUE[1], Miharu SHIOKOSHI[2], Tomoko ISHIKAWA[3], Ikuyo ICHI[3,4], Yoko FUJIWARA[3,4] ([1]Food and Nutr., Ochanomizu Univ., [2]Grad. Life Sci., Ochanomizu Univ., [3]Inst. HLI, Ochanomizu Univ., [4]Fac. Core Res., Ochanomizu Univ.)

【背景】 閉経後の女性において、女性ホルモンの減少は内臓脂肪蓄積型肥満の増加につながり、糖尿病や高血圧、脂質異常症を発症するリスクが急激に高まる。日本人は軽度肥満者でも内臓脂肪蓄積型肥満では、僅かな体重増加が健康障害につながることから、肥満の抑制だけでなく、内臓脂肪の蓄積を抑制することが重要である。また、現在の日本においては低糖質・高脂肪の食事が推奨されているが、その根拠となる研究結果は十分に得られていない。本研究では、閉経後モデルマウスを用いて、糖質と脂質バランスの違いが肥満に及ぼす影響を検討した。
【方法】16 週齢の雌性 C57BL/6N マウスに卵巣摘出手術（OVX）を施し、各群 6 匹ずつ、低脂肪（LF）群、通常脂肪（NF）群、高脂肪(HF)群の 3 群に分けて 12 週間飼育した。食餌組成は、LF 群（タンパク質：脂質：糖質=P:F:C=15:10:75%, エネルギー比)、NF 群（P:F:C=15:25:65)、HF 群（P:F:C=15:40:45）とした。実験は 3 回行い、実験Ⅰ）全群 OVX、自由摂取、実験Ⅱ)全群 OVX、 pair-feeding、実験Ⅲ）全群手術無し、pair-feeding とした。体重測定は毎週行い、腹部μCT 撮影は 4 週間に 1 回行った。μCT 撮影結果を用いて、内臓脂肪と皮下脂肪の蓄積量を解析し、解剖時には血中脂質濃度を測定した。
【結果】実験Ⅰ）摂取エネルギーは試験期間全体を通して、HF 群＞LF 群＞NF 群の順に多かったが、体重は HF 群＞NF 群＞LF 群の順に重かった。実験食開始 4 週後から、内臓脂肪、皮下脂肪共に HF 群＞NF 群＞LF 群の順に有意に蓄積量が多く、特に内臓脂肪蓄積量は差が顕著であった。血清中性脂肪濃度も、HF 群＞NF 群＞LF 群の順に高く、HF 群が LF 群と比較して、有意に高値であった。 実験Ⅱ）体重は LF 群が他 2 群と比較して軽かった。実験食開始 4 週後の内臓脂肪および皮下脂肪蓄積量は、共に HF 群＞NF 群＞LF 群の順に多かった。 実験Ⅲ）体重は NF 群が他 2 群と比較して重い傾向にあり、実験食開始 4 週後の体脂肪量に 3 群間で有意な差は観察されなかった。
【結論】通常マウスでは、食餌組成による影響は閉経後モデルマウスと比較して少ないが、閉経後モデルマウスにおいては、食餌中の脂質濃度が高いほど、体重は増加し、内臓脂肪蓄積量が多くなった。以上のことから、閉経後女性が低糖質・高脂肪の食事を摂取することは、健康維持に適切ではない可能性が高く、注意が必要であることが示唆された。

ovx, obesity

発表責任者：藤原　葉子（fujiwara.yoko@ocha.ac.jp）

講演番号：1B1a02
講演日時：3 月 24 日 09:11～ 1 号館 B1 会場

軽度肥満者を対象とした乳酸菌 S-PT84 の継続摂取による体脂肪低減効果と炎症制御

Reduction of abdominal fat mass and inflammatory response by long-term intake of *Lactobacillus pentosus* strain S-PT84 in adults with obese tendencies.

○前川 敏宏、井田 正幸、出雲 貴幸、北川 義徳、柴田 浩志（サントリーウエルネス株式会社　健康科学研究所）
○ Toshihiro MAEKAWA, Masayuki IDA, Takayuki IZUMO, Yoshinori KITAGAWA, Hiroshi SHIBATA (Institute for Health Care Science, SUNTORY WELLNESS LIMITED.)

【背景・目的】*Lactobacillus pentosus* strain S-PT84（乳酸菌 S-PT84）は、京都の伝統的漬物である“しば漬け”から単離された菌株で、免疫調節作用に優れた乳酸菌である。近年、脂肪の蓄積と持続的で軽微な炎症状態との関連が報告されており、生体内の炎症状態を制御することが健康の維持に繋がると考えられている。また、乳酸菌 S-PT84 には、抗炎症作用に加え、膵リパーゼ活性を阻害すること、食後血中中性脂肪の上昇を抑えることが確認されている。そこで我々は、軽度肥満者を対象とし、乳酸菌 S-PT84 を摂取することで体脂肪が低減するか検証するため、2 つの臨床試験を実施した。
【方法】（臨床試験 1）内臓脂肪面積が 100 cm^2 以上で、年齢が 30～65 歳の成人男女 40 名を対象とした。被験食品にはデキストリンに乳酸菌 S-PT84　400 億個を配合した粉末を、対照食品にはデキストリンのみの粉末を試験に用いた。試験食品は、1 日 1 回、1 包を水あるいは食事とともに摂取させた。試験期間は 8 週間とした。（臨床試験 2）BMI が 25 kg/m^2 以上、30 kg/m^2 未満で、年齢が 20 歳以上の成人男女 130 名を対象とした。被験食品はハードカプセル 2 カプセルに乳酸菌 S-PT84　100 億個を配合し、対照食品は乳酸菌 S-PT84 を含まない点を除き原材料は全て同一にした。試験食品は、1 日 1 回、2 カプセルを水とともに摂取させた。試験期間は 12 週間とした。いずれの試験も事前検査にて医師により被験者の健康状態に問題ないことを確認し、ランダム化二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験にて実施した。体脂肪の評価は、臍部の腹部脂肪面積を CT 撮影にて行った。
【結果】（臨床試験 1）乳酸菌 S-PT84　400 億個の摂取により、対照群と比較して腹部全脂肪面積及び皮下脂肪面積の変化量に有意差が認められた。次に、試験食品摂取開始前の BMI が 23 kg/m^2 以上、30 kg/m^2 未満の被験者で層別解析を行ったところ、全例解析と同様の結果が認められた。（臨床試験 2）乳酸菌 S-PT84　100 億個の摂取により、対照群と比較して腹部全脂肪面積及び皮下脂肪面積の変化量に有意差が認められた。次に、内臓脂肪面積が 100 cm^2 未満の被験者で層別解析を行ったところ、対照群と比較して腹部全脂肪面積及び皮下脂肪面積の変化量に有意差が認められた。また、血液検査の結果、乳酸菌 S-PT84 の摂取により高感度 CRP が対照群と比較して有意に低下した。いずれの試験においても乳酸菌 S-PT84 の長期摂取による安全性に問題ないことが確認された。
【結論】乳酸菌 S-PT84 の継続摂取により軽度肥満者における腹部脂肪面積を低下させることが明らかとなった。また、乳酸菌 S-PT84 の摂取が生体内の炎症を抑える可能性が示唆された。今後、炎症制御と健康の関係についても研究を進めていきたい。

Lactobacillus, obese, inflammation

講演番号：1B1a03
講演日時：3 月 24 日 09:22～ 1 号館 B1 会場

スルフォラファンは転写因子 SREBP 前駆体の分解促進を介して食事誘導性肥満や脂肪肝を改善する
Sulforaphane improves diet-induced obesity and fatty liver by stimulating degradation of precursor forms of SREBPs

○井上 順[1]、宮田 慎吾[2]、正路 健太[1]、鈴木 司[1]、山本 祐司[1]、清水 誠[2]、佐藤 隆一郎[2]([1]東農大・応生・農化、[2]東大院・農生科・応生化)
○Jun INOUE[1], Shingo MIYATA[2], Kenta SHOJI[1], Tsukasa SUZUKI[1], Yuji YAMAMOTO[1], Makoto SHIMIZU[2], Ryuichiro SATO[2] ([1]Tokyo Univ. of Agric., [2]The Univ. of Tokyo)

【目的】メタボリックシンドロームを代表とする生活習慣病は、脂質代謝制御の破綻を発症基盤とする疾患である。その調節機構の中心に転写因子 SREBP が存在する。SREBP の過剰活性化は、過度の脂質合成やインスリンシグナルの低下を引き起こし、脂肪肝やインスリン抵抗性を惹起することが知られている。したがって、生活習慣病予防のためには SREBP 活性を適度に抑制することが望まれる。本研究では、SREBP の活性を低下させる食品成分の探索、およびその作用機構の解析を目的とした。
【方法】SREBP-1 の標的遺伝子 FAS のプロモーター領域(-987~+121)を含むレポーター遺伝子を安定発現するヒト肝がん由来 Huh-7 細胞株を樹立した。本細胞株を用いて FAS 遺伝子プロモーター活性を低下させる化合物を食品由来成分ライブラリーから探索を行い、スルフォラファン(SFaN)を見出した。SFaN を Huh-7 細胞に処理し、SREBP 標的遺伝子の mRNA 量、SREBP タンパク質量への影響を解析した。続いて、SREBP 前駆体の分解へおよぼす影響について、翻訳抑制剤であるシクロヘキシミドを用いて検討した。また、SFaN による SREBP 前駆体分解促進作用への、プロテアソームを介した分解の関与について検討した。食餌性肥満マウスにおいて摂食実験を行い、肝臓における SREBP の挙動を解析するとともに、抗生活習慣病効果を検証した
【結果】FAS 遺伝子のプロモーター活性を抑制する化合物として、ブロッコリーに含まれる成分 SFaN を見出した。その効果を検証したところ、SFaN は SREBP 標的遺伝子の mRNA 量および前駆体 SREBP タンパク質量を低下させた。また、SFaN は前駆体 SREBP のユビキチン化を促進し、プロテアソームによる分解を亢進させることにより SREBP 活性を抑制することが示された。SFaN を摂食したマウスの肝臓では前駆体および成熟体 SREBP 量の減少を伴う SREBP 標的遺伝子発現の低下が観察されるとともに、肥満や脂肪肝が改善されることが明らかになった。

Sulforaphane, SREBP, obesity

発表責任者：井上順（ji206785@nodai.ac.jp）

講演番号：1B1a04
講演日時：3 月 24 日 09:33～ 1 号館 B1 会場

食品成分の組み合わせによる作用増強に関する研究

Study on enhancement of effect by combination of food ingredients

○正路 健太[1]、鈴木 司[1,2]、山本 祐司[1,2]、井上 順[1,2]（[1]東農大院・農・農化、[2]東農大・応生・農化）
○Kenta SHOJI[1], Tsukasa Suzuki[1,2], Yuji Yamamoto[1,2], Jun Inoue[1,2] ([1]Tokyo Univ. Agric. Grad. Sch., [2]Tokyo Univ. Agric.)

【背景・目的】

Sterol regulatory element-binding protein(SREBP)は生体内の脂質代謝を包括的に制御する転写因子で、SREBP 活性の上昇は脂肪酸合成やコレステロール合成促進につながることが知られている。SREBP は小胞体膜上に前駆体として合成され、プロセシングを受けることで成熟型となり、核内の移行して転写因子として機能する。SREBP 活性の抑制は食餌性肥満マウスや 2 型糖尿病マウスの体重増加や脂肪肝を抑制することが報告されており、生活習慣病改善のターゲットとして期待される。我々はこれまでに SREBP の標的遺伝子として脂肪酸合成酵素(FAS)遺伝子を用い、SREBP 活性を抑制する食品成分の探索を行った。その結果、FAS 遺伝子発現を抑制する多くの成分の同定に成功し、さらにそれらが実際に SREBP 活性を抑制していることを明らかにした。本研究では、見出した複数の食品成分を組み合わせて処理することで、SREBP 活性抑制能が上昇するかどうか検討を行った。

【方法】

SREBP-1 の標的遺伝子 FAS のプロモーター領域(-987~+121)を含むレポーター遺伝子を安定発現するヒト肝がん由来 Huh-7 細胞株を用いた。Huh-7 細胞にステロール枯渇処理を 16 時間行い、すでに見出している SREBP 活性を抑制する食品成分を組み合わせて 24 時間投与し、FAS 遺伝子プロモーター活性におよぼす影響についてルシフェラーゼアッセイにより評価した。食品成分の濃度や組み合わせを変化させ、効率的に FAS プロモーター活性を抑制する条件を検討した。次に内因性の SREBP 標的遺伝子発現におよぼす効果をリアルタイム PCR 法により検討した。食品成分にはキサントフモール、イソキサントフモール、アリルイソチオシアネート、4’－ヒドロキシフラバノン等を用いた。

【結果】

用いた食品成分 7 種類を全て組み合わせて処理することで FAS プロモーター活性の低下が確認できた。今後は各食品成分において、様々な組み合わせにおける最適な濃度の検討を行っていく。今回用いた食品成分は既に SREBP 活性の抑制メカニズムも明らかにしていることから、その抑制メカニズムの違いに着目し、それら食品成分の組み合わせを選択する予定である。

SREBP, food factor, lipid metabolism

発表責任者：井上　順（ji206785@nodai.ac.jp）

講演番号：1B1a05
講演日時：3 月 24 日 09:44～ 1 号館 B1 会場

高脂肪食の時間制限給餌による SAM マウスの聴覚老化の遅延
Time-restricted feeding of a high-fat diet delayed age related hearing loss in senescence-accelerated mouse
○大池 秀明、薊 佳代（農研機構／食品研）
○Hideaki OIKE, Kayo AZAMI (NARO/FRI)

高脂肪食の長期摂取は、ヒトやマウスにおいて肥満を引き起こし、さらに継続すると、メタボリックシンドロームに行きついてしまう。しかしながら、これまでの時間栄養学研究から、マウスの活動期のみに食餌を制限する時間制限給餌は、高脂肪食において、肥満の誘導を小さくすることが知られている。一方で、これを長期間続けた場合にどうなるかは報告がなく、健康状態が維持できるのか、それとも、不健康な状態に陥ってしまうのかは不明である。

ここでは、高脂肪食のエネルギー効率の良さに着目し、暗期の時間制限給餌を長期間に渡って実施した場合、マウスの老化がどのように影響されるのかを検討することを目的とした。

試験動物として、メスの老化促進マウス（SAMP8 系統）を利用し、高脂肪食および普通食について、それぞれ自由摂食群と暗期 12 時間の時間制限給餌群を設定し、2 ヶ月齢から 1 年齢まで飼育を行っている。

高脂肪食群は、普通食群と比較して体重が有意に増加し、既存の報告とは異なり、最初の 2 ヶ月程度は自由摂食群においても時間制限給餌群においても、同等の肥満（体重増加）度であった。しかし、3 ヶ月目あたりから徐々に体重差が出始め、時間制限給餌群の方が体重増加の伸びが抑制されている。

また、老化の指標として、3, 6, 9（もしくは 10）ヶ月齢の時点で、尾懸垂試験、ロータロッド試験、聴力等について評価を行った。聴力に関しては、加齢依存的に閾値が低下し、加齢性難聴の進行が認められ、高脂肪食、および、時間制限給餌の影響で若干ではあるが、有意に老化が遅延された。尾懸垂、ロータロッドについては、加齢によるスコアの低下が起きていないことから、今後、さらに飼育を続けて解析する。

（本研究はロッテ財団による研究助成を受けて実施されたものです）

aging, circadian, clock

発表責任者：大池秀明（oike@affrc.go.jp）

講演番号：1B1a06
講演日時：3 月 24 日 10:05～ 1 号館 B1 会場

食後血糖値の上昇を低減させる玄米の加工法とそのメカニズム

A new brown rice processing rendered depression effect of post prandial blood glucose value and its mechanism.

○大木 梓織[1]、佐藤 千樺[2]、石川 匡子[1,2]、秋山 美展[1,2]（[1]秋田県大院生物資源、[2]秋田県大生物資源）
○Shiori OKI[1], Chika SATO[2], Kyoko ISHIKAWA[1,2], Yoshinobu AKIYAMA[1,2] ([1]Grad. Sch. Akita Prefectural Univ., [2]Akita Prefectural Univ.)

【目的】新規難消化性澱粉の創製を目的として研究を行っている．これまでの実験結果から，馬鈴薯澱粉に脂肪酸を添加し一定温度で加熱することにより澱粉に難消化性を付与できることを確認しており，米糠中にもともと多くの脂質を含む玄米でも一定温度で加熱するだけで米澱粉に難消化性を付与できることを確認している．これは，玄米粉砕および加熱により内部酵素によって内在脂質から脂肪酸が遊離し，澱粉分子構造内で澱粉と脂肪酸とが複合体を形成するためと考えられているが，詳細なメカニズムは解明されていない．澱粉と複合体を形成し得る脂肪酸（澱粉内部脂肪酸）が消化性低下に相関があることを報告してきた．本研究では脂質を含む穀類における加熱処理による難消化性発現のメカニズムを明らかにするため，玄米粉砕後に遊離してくる脂肪酸量やその脂肪酸種を調べるとともに，玄米の加熱による分子構造変化を X 線回折装置によって解析した．

【方法】H29 年度産あきたこまち玄米を使用した．試料米を嫌気下で小型ミルを用いて粉砕後，75 ~ 250 μm に粉砕・篩別し，玄米試料とした．その後，窒素を充填した嫌気条件下で 0, 7, 14, 21 日保管し，ソックスレー抽出法により外部油分を抽出し，粉砕により遊離した脂肪酸量をガスクロマトグラフィにより定量した．また，玄米試料の加熱処理による分子構造変化の測定では，玄米試料をステンレス製密封容器に封入しオイルバスで 140℃まで加熱し，ただちに氷冷した加熱試料と，未加熱試料を X 線回折法(XRD)にて X 線回折図を得た．X 線回折装置は UltraX18（株式会社リガク）を用い，X 線源 Cu-Kα，管電圧 50 kV，管電流 27 mA，走査速度 1.20°/ 分，測定間隔 0.020°，走査角度 2θ = 5.0 ~ 40.0°の条件で測定した. 得られた X 線回折データにより, 加熱による X 線回折図の変化を比較・分析した.

【結果】ソックスレー抽出法により抽出された外部油分はパルミチン酸・オレイン酸・リノール酸の 3 種が大半を占めた．Fig. 1 には保管日数の違いによる 3 種の脂肪酸の外部遊離型脂肪酸(EFFA)量の変化を示す．EFFA 量は保管日数に比例して増加したが，その増加率は脂肪酸種による明瞭な差は見られなかった．一方，XRD における分析では，加熱により澱粉-脂質複合体由来の構造を反映するピークを生じることが確認された.

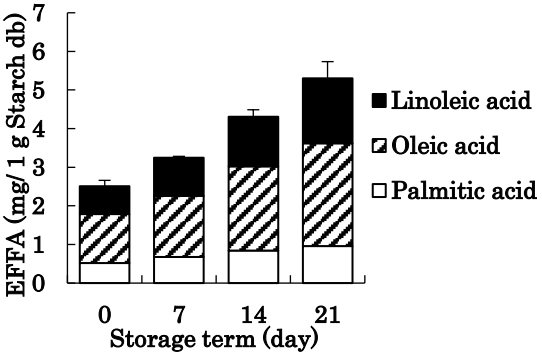


Fig. 1 保管日数による EFFA の変化

brown rice, fatty acid, digestion resistant

講演番号：1B1a07
講演日時：3 月 24 日 10:16～ 1 号館 B1 会場

ゲニステインはプロヒビチンを介して NAMPT の発現量と NAD^+合成量を増加する
Genistein induces the expression of NAMPT and NAD^+ synthesis through prohibitin
○渡邉 駿[1]、三谷 塁一[2]、片山 茂[1,2]、中村 宗一郎[1]([1]信州大院・総合理工（農学専攻）、[2]信州大・先鋭領域融合)
○ Shun WATANABE[1], Takakazu MITANI[2], Shigeru KATAYAMA[1,2], Soichiro NAKAMURA[1] ([1]Shinshu Univ., [2]Shinshu Univ. ICCER)

【目的】過度の脂質蓄積による肥満は、インスリン抵抗性や心血管系疾患の発症につながる。近年、高脂肪食負荷によって脂肪組織中の NAD^+合成酵素である NAMPT（Nicotinamide phosphoribosyltransferase）の発現および NAD^+合成量が著しく低下し、これが 2 型糖尿病発症の一因であることが報告されている。つまり、脂肪組織中の NAMPT の発現および NAD^+合成量を増加することは、肥満による 2 型糖尿病発症の予防・改善に繋がるといえる。本研究では、脂肪細胞における NAMPT の発現に注目して、大豆イソフラボンの一種であるゲニステインによる NAMPT の発現増加のメカニズムと NAMPT を介したゲニステインの効果について解析した。
【方法】マウス線維芽細胞（3T3-L1）を insulin、dexamethasone、IBMX で処理することで脂肪細胞へと分化誘導を行い、ゲニステイン（1-25μM）の効果を検討した。NAMPT 遺伝子の転写活性を解析するために、NAMPT 遺伝子のプロモーター領域を組み込んだレポータープラスミドを作製した。ゲニステインに磁気ビーズを結合したゲニステイン結合担体を作製し、脂肪細胞からゲニステイン結合タンパク質を探索した。
【結果と考察】ゲニステインを 3T3-L1 脂肪細胞に添加したところ、ゲニステインは NAD^+合成量、NAMPT の遺伝子・タンパク質発現を増加した。ルシフェラーゼレポーターアッセイの結果から、ゲニステイン単独では NAMPT 遺伝子の転写活性に影響はないものの、脂肪細胞の転写因子 C/EBP β と協調的に NAMPT 遺伝子の転写活性を亢進することが示された。また、ゲニステインは C/EBP β のタンパク質発現量を増加した。つまり、ゲニステインは C/EBP β のタンパク質の安定性を向上し、NAMPT 遺伝子の発現を亢進することが明らかとなった。ゲニステイン結合担体を用いたプルダウンアッセイの結果、ゲニステインは細胞膜タンパク質の一つである Prohibitin と相互作用することが示された。Prohibitin を siRNA でノックダウンしたところ、ゲニステインによる C/EBP β と NAMPT のタンパク質レベルの増加は抑制された。最後に、ゲニステインが NAD^+合成量を増加した際の細胞への影響を解析した。ゲニステインは、インスリン感受性を向上する分泌成分であるアディポネクチンの発現を増加し、アディポネクチンの増加は、NAMPT をノックダウンすることで抑制された。以上の結果から、ゲニステインは、NAMPT による NAD^+合成を誘導することで、アディポネクチンの発現を増加することが示され、ゲニステインは脂肪細胞を標的としてインスリン感受性を向上する食品因子であることが示唆された。

adipocytes, adiponectin, NAD

発表責任者：三谷塁一（mitani@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：1B1a08
講演日時：3 月 24 日 10:27～ 1 号館 B1 会場

北海道自生キノコのインスリン分泌促進能の解析
Analysis of insulin secretion promoting ability of wild mushrooms from Hokkaido
○高橋 有志[1]、吉田 泉[1]、井出 将博[1]、三嶋 隆[1]、山口 昭弘[2]、五十嵐 友二[1]([1]日本食品分析セ、[2]酪農大農食環群)
○ Yushi TAKAHASHI[1], Izumi YOSHIDA[1], Masahiro IDE[1], Takashi MISHIMA[1], Akihiro YAMAGUCHI[2], Tomoji IGARASHI[1] ([1]Japan Food Research Laboratories, [2]Rakuno Gakuen University, Food Sci.)

【目的】
北海道にはカバノアナタケ,タモギダケやナラタケなど，その雄大な自然から有用キノコが数多く自生している。キノコの機能性についてはβ-グルカンのような食物繊維に関する報告が多い。食物繊維は糖の吸収を緩和し血糖値の上昇を抑えるほか，インクレチンを刺激しインスリンの分泌を促進すると考えられているため，キノコは抗糖尿病効果の高い食品とされている。一方，キノコには抗酸化性の高いエルゴチオネインなどの低分子化合物による機能性も知られている。そのためキノコには，食物繊維以外にも抗糖尿病効果を示す低分子の機能性物質が存在する可能性がある。そこで，我々は北海道に自生するキノコについて，インスリン分泌促進能を指標に抗糖尿病作用のスクリーニングを行い，キノコの新たな低分子機能性成分の探索を目指した。
【方法】
道央圏に自生するキノコ 23 種類の温風乾燥品を粉末とした後，50% エタノールを用いて抽出した。ラット由来膵β細胞株 RIN-m5F にクレブス-リンガー重炭酸緩衝液で希釈したキノコ抽出液を添加し，37℃，5% CO_2下 2 時間インキュベート後に得られた上清のインスリン濃度を ELISA により測定した。また，RIN-m5F に RPMI1640 で希釈したキノコ抽出液を添加し，同様にインキュベート後，得られた細胞溶解液のサイクリック AMP 濃度を ELISA により測定した。表面プラズモン共鳴測定装置を使用し，Recombinant Mouse GLP1R protein を固相化して GLP-1 受容体結合能を調べた。あわせてインスリン分泌能と抗酸化力の相関を調べるため,ORACおよびESR法によるスーパーオキシド消去能を測定した。
【結果】
スクリーニングの結果，インスリン分泌促進能はキシメジ，ミネシメジおよびアイシメジのキシメジ属キノコが 1μmol/L グルカゴンより約 2～3 倍高い結果を示した。しかし,抗酸化力はクロカワが 860 μmolTE/g と突出した高い結果であり,上述のキノコは 100μmolTE/g 前後とクロカワよりは低くインスリン分泌促進能との相関性は認められなかった。これらのことからポリフェノールのような抗酸化物質だけではなく，他の化合物でもインスリン分泌を促進することが示唆された。GLP-1 受容体結合能とサイクリック AMP 産生量については現在測定継続中であり，検証結果については発表時に報告する。

insulin, mashroom, Hokkaido

発表責任者：高橋有志（takahashiyu@jfrl.or.jp）

講演番号：1B1a09
講演日時：3 月 24 日 10:38～ 1 号館 B1 会場

わかめの摂取が食後血糖値およびインスリン分泌に及ぼす影響

Effects of *Undaria pinnatifida* (Wakame) on postprandial glycemia and insulin levels in humans

○吉永 恵子[1]、仲野 隆久[1]、三田村 理恵子[2] ([1]理研ビタミン(株)、[2]藤女子大・食物栄養)
○Keiko YOSHINAGA[1], Takahisa NAKANO[1], Rieko MITAMURA[2] ([1]Riken Vitamin Co., Ltd., [2]Fuji Women's Univ.)

【目的】

海藻は低カロリーでミネラル、ビタミンに富み、古来より食べられてきた日本食を代表する食材である。中でもわかめは味噌汁や酢の物の具として、広く食されている。これまでにわかめの機能性として我々のグループは、血圧降下作用やコレステロール低下作用、腸内環境改善作用などについて報告してきた。本試験では、わかめの摂取が食後血糖値およびインスリン値に及ぼす影響を検証することを目的とした。

【方法】

空腹時血糖値が 95mg/dL 以上、126mg/dL 未満の健常男女 26 名を対象とした非盲検クロスオーバー比較試験を実施した。試験食品として乾燥カットわかめ（ふえるわかめちゃん® 三陸）を用いた。負荷食には包装米飯サトウのごはん 200g を用いた。対照群は負荷食のみを摂取させ、わかめ摂取群には、包装米飯サトウのごはん 200g に加え、乾燥カットわかめ 4.0g を水戻ししたものを摂取させた。被験者を無作為的に 2 群に分け、クロスオーバー法により朝食として摂取させた。対照群、わかめ摂取群共に空腹時のグルコースを測定後、試験食品に関しては米飯負荷開始 5 分前より摂食を開始させ、十分な咀嚼をさせ 5 分間で摂取させた。負荷食は 10 分以内に摂取させ、負荷開始後 30 分、60 分、90 分、120 分に採血を行い、血糖値およびインスリンの推移・増減量ならびに AUC（曲線下全面積）、incremental AUC（以下 iAUC、上昇曲線下面積）を評価した。

【結果】

被験者の年齢は 51.5±8.4 歳（男性 15 名：50.8±7.0 歳、女性 11 名：52.5±6.1 歳）であった。
血糖値は摂取 30 分後において有意な群間差、摂取 60 分後には群差傾向が認められ、わかめ摂取群において血糖値の上昇抑制効果が認められた。増減量においても同様に、摂取 30 分後には群間差、摂取 60 分後には群間傾向が認められた。AUC、iAUC に関しては共に群間差が認められ、試験食品摂取による血糖値上昇抑制効果が認められた。

インスリンは摂取 30 分後において有意な群間差が確認された。増減量においても同様に、摂取 30 分後において有意な群間差が確認された。iAUC に関しては群間差が認められた。

以上の結果から、本試験食品の摂取が米飯摂取後の血糖値上昇ならびにインスリンの分泌を有意に抑制することが認められた。

seaweed, postprandial glycemia, insulin

講演番号：1B1a10
講演日時：3 月 24 日 10:49～ 1 号館 B1 会場

食品由来成分による尿中へのグルコース排泄促進作用

Enhanced urinary excretion of glucose by food ingredient

○大川 咲希、白川 仁、駒井 三千夫（東北大院農）
○Saki Okawa, Hitoshi Shirakawa, Michio Komai (Tohoku Univ. of Agric.)

【目的】血液中のグルコースは、腎臓の近位尿細管において、SGLT（sodium glucose cotransporter）により再吸収されるため、尿中にグルコースはほとんど排泄されない。一方、高血糖状態では SGLT の再吸収能を超えた分のグルコースが尿中へ排泄される。従来の糖尿病治療においては、グルコースの供給抑制と利用促進に焦点が当てられ、食事・運動・薬物療法が行われてきた。近年、腎臓におけるグルコースの再吸収のほとんどを担う、SGLT2 の阻害薬が開発され、尿中へのグルコース排泄を増加させることにより、高血糖を改善するという薬物療法が注目されている。

我々は、正常ラットに高ガラクトース食を慢性的に摂取させると、尿中へのグルコースの排泄量が顕著に増加することを見出した。本研究は、ガラクトース摂取による尿中へのグルコース排泄促進の機構解明を目的として行った。

【方法】（実験 1）SD 系ラット（8 週齢、雄）を用い、1 週間馴化した後、ストレプトゾトシン（40 mg/kg 体重）を投与した。投与 3 日後の血糖値により 2 群に分け、AIN-93G 食（con 群）と 10%ガラクトース添加食（gal 群）を 4 週間与えた。1 日おきに体重と摂餌量を測定した。また、毎週尾静脈から採血を行い、得られた血漿を用いてグルコース濃度を測定した。また、3 週目に 24 時間蓄尿を行い、グルコース排泄量を測定した。飼育終了後、腎臓を採取し、SGLT などの mRNA 量を測定した。（実験 2）KK-Ay マウス（4 週齢、雄）に AIN-93G 食（con 群）、または 10%ガラクトース添加食（gal 群）を 4 週間与えた。飼育期間における測定、解剖後の解析は実験 1 と同様に行った。

【結果・考察】（実験 1）飼育開始後、3 および 4 週目の血糖値が con 群と比較して gal 群で有意に低下した。3 週目に測定した尿糖値は、gal 群で有意に高値を示した。また、腎臓の SGLT1 mRNA 量は、群間で差は見られなかったが、SLLT2 mRNA 量が、gal 群で有意に増加していた。以上のことから、ガラクトース摂取はストレプトゾトシン誘発糖尿病モデル動物において、尿中へのグルコース排泄増加と血糖値低下作用を示し、病態を改善することが示唆された。また、実験 2 の KK-Ay マウスにおいても、gal 群で腎臓 SGLT2 mRNA の有意な増加が観察されたことから、ガラクトース摂取により、SGLT2 活性が阻害され、尿中へのグルコース排泄量が増加すると推定された。

Glucose excretion, Glucose transporters, Kidney

講演番号：1B1a11
講演日時：3 月 24 日 11:10～ 1 号館 B1 会場

12α胆汁酸負荷により誘導される症状のラットおよびマウスを用いた比較
Comparison of symptoms induced by 12α-hydroxylated bile acids between rats and mice
○吉田 凌[1]、堀 将太[2]、原 博[2]、石塚 敏[2] ([1]北大農、[2]北大院農)
○Ryo YOSHIDA[1], Shota HORI[2], Hiroshi HARA[2], Satoshi ISHIZUKA[2] ([1]Hokkaido University School of Agriclture, [2]Hokkaido University Graduate School of Agriclture)

【背景】脂質吸収を促進する胆汁酸の分泌は、高脂肪食摂取時に増加することが知られている。これまでに我々は、ラットを用いて、高脂肪食摂取時に増加する一次胆汁酸が 12α胆汁酸であるコール酸（CA）であることを明らかにし、飼料への CA 添加が肝脂質の蓄積、腸内細菌叢の変化、消化管バリア機能の低下など、多様な症状を引き起こすことを見出してきた。しかし、これらの病態発症に種差があるかを検証していない。そこで実験動物として広く用いられているマウスに同様の処理を施した場合に、ラットで見られた病態発症が起こるか検証した。

【方法】WKAH/HkmSlc 雄性ラット（3 週齢）、C57BL/6JJmsSlc 雄性マウス（4 週齢）を予備飼育後、AIN-93G 準拠の飼料を与えたコントロール群または CA 食（0.5 g/kg 飼料）を与えた群に分けてそれぞれ飼育した。WKAH ラットでは 13 週間、C57BL/6J マウスでは 6 週間の飼育を実施した。解剖後、各臓器重量、肝臓中のトリグリセリド、コレステロールの測定、および非吸収性マーカーを用いた in vivo での消化管透過性評価を行った。また UHPLC-MS を用いて胆汁酸代謝の解析を行った。

【結果と考察】ラットでは、CA 負荷により肝脂質の蓄積、消化管バリア機能の低下が観察された。一方、マウスでは、消化管バリア機能低下の傾向は観察されたものの、肝脂質蓄積は観察されなかった。胆汁酸代謝を比べると、ラットで観察された CA 負荷による肝臓タウロコール酸濃度の増加がマウスでは観察されなかった。ラットでは当該 CA 負荷が肝臓での 12α水酸化胆汁酸濃度の顕著な増加が見られた一方、マウスでは当該 CA 負荷が肝臓胆汁酸濃度に及ぼす影響が弱かったことが、同一の CA 負荷条件にも関わらず種差が現れた原因と考えられる。また、ラット・マウスともに消化管では当該 CA 負荷で 12α水酸化胆汁酸濃度の著明な増加が観察された。このことは、消化管バリア機能の脆弱化に対する CA 負荷の作用が同様な結果となった理由であると推察した。ラットでは当該 CA 負荷で消化管内での脱抱合や 7α脱水酸化の停滞は見られなかった一方で、マウスでは CA 負荷による糞中 CA の増加、すなわち消化管での 7α脱水酸化が抑制された。マウスでは相対的に当該 CA 負荷の影響が出にくいことが胆汁酸代謝解析の結果示唆された。また、消化管は肝臓に比べて、経口摂取させた胆汁酸の影響をより受けやすいこと、また、肝臓における 12α水酸化胆汁酸はその脂質代謝と密接に関連することが示唆された。

bile acid, lipid metabolism, gastrointestinal barrier function

発表責任者：石塚　敏（zuka@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：1B1a12
講演日時：3 月 24 日 11:21～ 1 号館 B1 会場

タウリン摂取によるマウス FXR シグナルと胆汁酸動態の変動
Taurine intake alters FXR signaling and bile acid metabolism in mice
○宮田 昌明、舩木 萌浩、江口 昌志、住屋 佑希乃、杉浦 義正（水産機構水大校）
○ Masaaki MIYATA, Akihiro FUNAKI, Masashi EGUCHI, Yukino SUMIYA, Yoshimasa SUGIURA (National Fisheries Univ.)

【目的】タウリンは生体内に最も豊富に存在する遊離アミノ酸で、一部体内で合成されるがタコ、イカ、カキなどの魚介類に多く含まれ、多くは食事あるいは栄養ドリンクやサプリメントにより摂取される。タウリンは多くの生理作用を有し、コレステロールの低下作用等が知られているがその作用機序は不明な点が多い。またヒトや齧歯類では胆汁酸の抱合に利用され、胆汁酸代謝にも関与すると考えられる。本研究ではタウリンが胆汁酸受容体の farnesoid X receptor (FXR)シグナルを調節することで、胆汁酸代謝に影響を与える可能性を考え、*Fxr* 欠損マウスとその野生型マウスを用いタウリン摂取による FXR シグナルと胆汁酸動態の変動について解析した。
【方法】8～10 週齢の雄性 *Fxr* 欠損マウスとその野生型マウスに 10 日間にわたり 0.5% あるいは 2%タウリン含有水を自由摂取させた後、肝臓、小腸、小腸管腔内容物、門脈血および糞を採取した。胆汁酸の組成は 3α-hydroxysteroid dehydrogenase (3α-HSD)カラムを用いた HPLC で測定した。肝臓、小腸の mRNA レベルは、定量 PCR で測定した。
【結果と考察】タウリン 0.5% 及び 2%含有水の摂取により野生型マウスの肝蔵と門脈血中の胆汁酸レベルが有意に増加し、*Fxr* 欠損マウスの胆汁酸レベルと同程度となった。一方 *Fxr* 欠損マウスではそのような増加は認められなかった。胆汁酸組成についてはタウリン摂取群の野生型マウスの肝蔵と門脈血中で FXR アゴニスト、アンタゴニストのコール酸、βムリコール酸の両方の増加が認められ、有意な質的変動は認められなかった。肝内コレステロールレベルの変動は両マウスのタウリン摂取群で認められなかった。FXR シグナルの標的遺伝子の fibroblast growth factor (FGF)15 と small heterodimer partner (SHP) mRNA レベルの減少がタウリン摂取の野生型マウスの回腸で認められたが、*Fxr* 欠損マウス回腸では認められなかった。これらの結果よりマウスにおいてタウリンの摂取は回腸の FXR シグナルを減弱させ、胆汁酸プールを増加させる可能性が示された。

taurine, bile acid, FXR

発表責任者：宮田昌明（mmiyata@fish-u.ac.jp）

講演番号：1B1a13
講演日時：3 月 24 日 11:32～ 1 号館 B1 会場

cis-バクセン酸摂取により影響を受ける組織の探索
Investigation of mice tissues affected by intake of *cis*-vaccenic acid
○甲木 孝弘、井土 良一（（公財）東洋食品研究所）
○Takahiro Katsuki, Ryouichi Iduchi (Toyo Institute of Food Technology)

【背景・目的】
収穫されたカキの一部は過熟、規格外等により出荷されず、未利用であると考えられる。また、幼果は果実を大きくするために一部は摘果され、未利用のまま廃棄されている。カキには、炭素数 18 の n-7 系一価不飽和脂肪酸である *cis*-バクセン酸（*cis*-VA）が総脂肪酸の約 30%、炭素数 18 の一価不飽和脂肪酸に限れば 95%を占めるという、他の果実には無い特徴がある。未利用果実を使った高付加価値加工品を開発するために、カキに特徴的な *cis*-VA に着目したが、*cis*-VA の摂取効果については報告がない。そこで初めに、*cis*-VA 摂取により影響を受ける組織を探索するため、*cis*-VA を摂取したマウスの各種組織における脂肪酸組成を調査した。
【実験方法】
10 週齢雄性の健常マウス（C57BL/6J）と糖尿病マウス（KK-Ay）に *cis*-VA（300 mg/kg/day）を 7 日間毎日強制経口投与した。対照群には溶媒（1.5%ポリグリセリンエステル水溶液）のみ投与した。7 日目の投与 3 時間後にイソフルラン麻酔下で解剖し、各種組織を摘出した。各組織から Brigh-Dyer 法により脂質を抽出し、GC-MS により脂肪酸組成を分析した。
【結果・考察】
cis-VA 投与により、健常・糖尿病マウス共に体重、摂食量に影響は無かったが、肝臓重量が有意に低下した。健常マウスでは *cis*-VA 投与により、膵臓の総脂肪酸に対するパルミトレイン酸比とオレイン酸（OA）比が低くなり、ステアリン酸（SA）比とアラキドン酸比、ドコサヘキサエン酸比が高くなった。また、心臓でも同様の傾向が見られた。OA と SA の変化から Δ9 不飽和化酵素（SCD1）活性への影響が推定されたため、SCD1 活性の指標となる OA/SA 比を算出したところ、*cis*-VA 投与により膵臓で有意に低かった。
糖尿病では通常よりも血中や肝臓等で SCD1 活性が上昇することが知られている。本実験でも糖尿病マウスの OA/SA 比は、通常マウスに比べて肝臓と心臓で高い値となっていた。さらに、*cis*-VA 投与した糖尿病マウスの心臓では、OA/SA 比は健常マウスと同程度まで低くなり、他の脂肪酸組成比は *cis*-VA 投与した健常マウスと同様の変化を示した。
これらの結果から、*cis*-VA の摂取は膵臓、心臓に対して影響を及ぼす可能性が考えられた。糖尿病状態での脂肪酸組成を健常状態に戻したことから、糖尿病に対して有効性が期待される。

cis-vaccenic acid, persimmon, fatty acids composition

発表責任者：甲木　孝弘（takahiro_katsuki@shokuken.or.jp）

講演番号：1B1a14
講演日時：3 月 24 日 11:43～ 1 号館 B1 会場

バレレン酸が脂肪細胞に与える影響

Effect of valerenic acid on adipocytes

○高橋 遵[1]、加藤 悠理海[1]、原田 洸輔[1]、只今 幹[1]、仁科 淳良[2]、清水 誠[1]、服部 一夫[1]([1]東農大院農、[2]日大理工)
○Jun TAKAHASHI[1], Yuria KATO[1], Kousuke HARADA[1], Miki TADAISHI[1], Atsuyoshi NISHINA[2], Makoto SHIMIZU[1], Kazuo HATTORI[1] ([1]Grad. Sch. of Tokyo Univ. of Agric., [2]Nihon Univ.)

【背景・目的】　平成 28 年度国民健康・栄養調査によると、糖尿病が強く疑われる者（糖尿病有病者)、糖尿病の可能性が否定できない者（糖尿病予備軍）は、いずれも約 1,000 万人と推定されている。Ⅱ型糖尿病においては、過食による肥満や運動不足などの生活習慣の乱れからインスリン抵抗性が引き起こされ、耐糖能の低下をもたらす。さらに、糖尿病の増悪は神経障害、網膜症、腎症、動脈硬化などの合併症に繋がる。我々はこれまでにⅡ型糖尿病の改善作用を有する食品を検討し、in vitro においてセイヨウカノコソウ鱗茎メタノール抽出物がアディポネクチン産生を高め、抗糖尿病作用を有する可能性を報告した[1)]。しかし、その有効成分は明らかになっていない。そこで本研究では、当該抽出物に含まれることが報告されているバレレン酸の作用を in vitro で検討した。
【方法】　3T3-L1 細胞に分化誘導を開始した日を Day 0 とした。 Day 2 までは IBMX、インスリン、DEX を添加した 10% FBS 含有高グルコース DMEM 培地、 Day 4 まではインスリンを添加した 10% FBS 含有高グルコース DMEM 培地、 Day 8 までは 10% FBS 含有高グルコース DMEM 培地で培養を行った。ロシグリタゾン（ポジティブコントロール)、バレレン酸（終濃度 1, 10, 100 μM ）は Day 0 ～ Day 8 まで添加した。脂肪細胞の分化と機能に関連した遺伝子の発現量はリアルタイム RT-PCR で測定した。また、培養上清中のアディポネクチンは ELISA 法にて定量した。3T3-L1 細胞に対するバレレン酸の細胞毒性は、播種 6 日後に MTT アッセイを行うことにより評価した。
【結果・考察】　バレレン酸添加による細胞毒性を検討したところ、100 μM の濃度まで細胞生存率に変化はなく、本実験での濃度範囲において細胞毒性は認められなかった。次に、バレレン酸添加による脂肪細胞分化への影響を調べた。 Oil red O 染色の結果、100 μM のバレレン酸添加において、ロシグリタゾン（100 nM ）と同等の分化促進作用が観察された。また、100 μM 添加において、有意な脂肪蓄積量の増加が認められた。さらに、脂肪細胞分化に関連する PPARγ や C/EBPα の mRNA 発現量は、 100 μM 添加において有意に増加していた。加えて、アディポネクチンの mRNA 発現量と培養上清中のアディポネクチン量は、コントロールと比して、100 μM 添加で有意な増加が認められた。以上より、バレレン酸は脂肪細胞の分化を促進する作用を有し、アディポネクチン産生を誘導することが示された。これらのことから、バレレン酸は抗糖尿病作用を有する可能性が示唆された。
1）原田ら、日本農芸化学会 2017 年度大会

Adipocytes, Valerenic acid, Diabetes

講演番号：1B1a15
講演日時：3 月 24 日 11:54～ 1 号館 B1 会場

炎症による消化管脂質代謝異常の発症メカニズムの解明

Study of pathogenic mechanism of inflammation-dependent dyslipidemia in the intestine

○津山 博之[1]、勝間田（坪井） 理恵[1]、室田 佳恵子[2]、井上 博文[1]、上原 万里子[1]、高橋 信之[1]（[1]東農大農、[2]島根大農生命）
○Hiroyuki TSUYAMA[1], Rie KATSUMATA(TSUBOI)[1], Kaeko MUROTA[2], Hirofumi INOUE[1], Mariko IEHARA[1], Nobuyuki TAKAHASHI[1] ([1]Tokyo Univ. of Agric, [2]Shimane Univ.)

［背景・目的］

現在、心疾患や脳血管疾患などの動脈硬化性疾患が日本人の死因の２割以上を占めている。動脈硬化性疾患の発症リスクとの相関が注目されてきたのが血中中性脂肪(TG)である。しかし、同じ血中 TG であっても空腹時と非空腹時で異なる。近年、食後に血中 TG 濃度が上昇した状態、つまり食後高脂血症の方が動脈硬化性疾患の発症リスクとの相関性が空腹時よりも高い事が明らかとなっている。このことから、食後高脂血症の改善は動脈硬化性疾患の予防・改善における重要な治療ターゲットとなりうる。先行研究において「高脂肪食の摂取が炎症やアテローム性動脈硬化を誘導する」ことならびに「炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子(TNF)αの投与が食後高脂血症の悪化を誘導する」ことが報告されている。これらの報告から「高脂肪食の摂取により誘導される炎症が食後高脂血症を悪化させる」ことが予想された。そこで本研究では、「①食事中の脂肪と食後高脂血症の関連性の検討」「②高脂肪食による食後高脂血症悪化のメカニズムの解明」を目的とし、以下のような実験を行った。

［方法］

食事中の脂肪含量と食後高脂血症及び腸管炎症との関連性を検討するため、脂肪含量が異なる餌をマウスに与え、経口投与負荷試験(Oral Lipid Tolerance Test：OLTT)による食後高脂血症の評価と real-time PCR による炎症関連遺伝子の定量を行った。「飽和脂肪酸が自然免疫系に関与する Toll Like Receptor-4(TLR-4)のリガンドとなり炎症を促進させる」ことが脂肪組織において明らかとなっていることから我々は脂肪酸組成と腸管炎症ならびに食後高脂血症とに関連があるのではないかと考えた。そこで脂肪酸組成の異なる食用油で作成した高脂肪餌をマウスに与え OLTT と Real-Time PCR を行った。

［結果・考察］

脂肪含量に比例して食後高脂血症が有意に悪化した。また、飽和脂肪酸の割合が多い高脂肪食は不飽和脂肪酸の割合が多い高脂肪食に対して食後高脂血症が有意に悪化した。以上の結果から高脂肪食は食後高脂血症を悪化させると考えられる。そして食後高脂血症の悪化の要因が飽和脂肪酸であることが考えられる。しかし、脂肪含量及び脂肪酸組成と炎症関連遺伝子との関連性は明確ではなかったために、組織学的解析など他の手法により炎症反応の詳細を検討中である。

Postprandial Hyperlipidemia, High-Fat Diet, Inflammation

発表責任者：高橋　信之（nt204885@nodai.ac.jp）

講演番号：1B1p01
講演日時：3 月 24 日 13:50～ 1 号館 B1 会場

質量分析イメージングを用いた魚肉タンパク質摂餌ラットの骨格筋脂質解析

Investigation of the lipid changes that occur in hypertrophic muscle due to fish protein-feeding using mass spectrometry imaging

○森笹 瑞季[1]、井上 菜穂子[1]、佐藤 友彦[1]、藤谷 美菜[3]、岸田 太郎[3]、内田 健志[2]、森 司[1]([1]日大・生資、[2]日本水産(株)食品機能研、[3]愛媛大院・農・生命機能)
○ Mizuki MORISASA[1], Naoko GOTO-INOUE[1], Tomohiko SATO[1], Mina FUJITANI[3], Taro KISHIDA[3], Kenji UCHIDA[2], Tsukasa MORI[1] ([1]Nihon Univ., [2]Nippon Suisan Kaisha, [3]Ehime Univ. of Agric.)

【目的】

近年、加齢性筋力減退症(以下、サルコペニア)が大きな社会問題となっている。サルコペニアとは進行性の骨格筋量及び骨格筋力の低下を特徴とする症候群である。予防や改善には良質な栄養源を摂取し、適切な運動を行うことが必要であると考えられている。しかし、高齢者は適切な運動療法の処方が困難であるため、サルコペニアの予防・治療法の確立を目指した栄養学的アプローチの研究が盛んに行われている。我々は、ラットを実験対象として摂餌タンパク質組成を改変し、骨格筋量の変動を観察した。その結果、カゼイン食(カゼインが主要タンパク質源)摂餌群と比較して、魚肉食（スケトウダラ由来タンパク質が主要タンパク質源）摂餌群の腓腹筋重量が顕著に増加することを明らかにした。そこで、この重量変化が骨格筋肥大に起因するものなのか、またその際どういった代謝物変化が起こっているのかを明らかにするため、質量分析イメージング及び組織学的手法を用いて解析を行った。

【方法・結果】

5 週齢 SD ラット雄に、カゼイン食と魚肉食をそれぞれ 7 日間与え飼育した。その後腓腹筋を摘出し、速筋と遅筋の組成が異なる三つの部位（表層部、深層部、内側頭深層部）を含むよう 10μｍ厚の凍結切片を作成し、質量分析イメージング及び免疫組織学染色に供した。組織学的染色により筋線維直径を計測したところ、魚肉食投与によって筋線維が有意に肥大している表現型を得ることができた。免疫組織学的染色によって速筋線維と遅筋線維を染めわけ、それぞれの筋線維タイプごとに筋線維直径を計測したところ、いずれの線維においても有意な肥大が認められた。この時、肥大に伴う筋線維組成（遅筋線維率）の変化は見られなかった。

次に魚肉食の摂取によって起こる筋線維肥大特異的な分子マーカーを探索するため、質量分析イメージングに供した。その結果、特に遅筋部位に特徴的に局在し、魚肉食により増減している脂質分子を同定した。

本研究により､魚肉食摂取による筋肥大は速筋･遅筋両方に対して有効であることが示唆された。また、肥大時に骨格筋の脂質組成が変化していることが明らかになった。今後はどういった肥大メカニズムによって制御されているのかを明らかにするため、脂質代謝物に加えて筋タンパク質の発現解析を進めていく予定である。

Muscle, Lipid, Mass spectrometry imaging

発表責任者：井上菜穂子（inoue.naoko@nihon-u.ac.jp）

講演番号：1B1p02
講演日時：3 月 24 日 14:01～ 1 号館 B1 会場

ミャンマー生薬 Vitex trifolia 中の抗糖尿病成分の探索

Elucidation of anti-diabetic components in Myanmar herbal medicine, Vitex trifolia

○仁科 淳良[1]、纐纈 守[2]、二ノ宮 真之[2]、平井 康昭[3]、若生 豊[4] ([1]日本大学、[2]岐阜大学、[3]昭和大学、[4]八戸工業大学)
○Atsuyoshi NISHINA[1], MAMORU KOKETSU[2], MASAYUKI NINOMIYA[2], YASUAKI HIRAI[3], YOTAKA WAKOU[4] ([1]Nihon Univ., [2]Gifu Univ., [3]Showa Univ., [4]Hachinohe Ins. Tech.)

【目的】*Vitex trifolia* は、ミャンマー生薬の 1 アイテムであり、健忘症、抗がん性、抗炎症性、駆虫作用、創傷治癒、抗菌作用を示すことが報告されている。一方、含有成分としてはラブダン型ジテルペン、トリテルペン、リグナン類、フラボノイドなどが知られている。
我々が予備的に、*V. trifolia* の茎抽出物の脂肪細胞分化 3T3-L1 細胞に対する効果を測定した結果、比較対象に用いたチアゾリジン系抗糖尿病薬と類似の作用（TZD 様作用）が認められた。同植物の非極性画分中の生理活性成分を探索した結果、活性成分が Vitexilactone であることが判明した(1)。本研究では *V. trifolia* の極性画分に含まれる Vitexilactone 以外の TZD 様効果を有する成分の探索を試みた。
【方法】ミャンマー国立パセイン大学から提供された *V. trifolia* 茎部を粉砕し、5 倍量のメタノールに浸漬後、濾過、乾燥することにより粗メタノール抽出物を調製した。粗メタノール抽出物から溶媒分画によりヘキサン画分、酢酸エチル画分、メタノール画分を調製した。予備的に、各画分の脂肪細胞分化 3T3-L1 細胞に対する効果を測定した結果ヘキサン画分とメタノール画分に TZD 様作用が認められた。本研究では各種クロマトグラフィーを使用してメタノール画分に含まれる活性成分の単離を試みた。単離化合物の化学構造は NMR スペクトル、MS スペクトル等を測定して同定した。抽出物と単離化合物の生理活性はインスリン等で脂肪細胞分化した 3T3-L1 前駆細胞の脂肪蓄積量、細胞のサイズを陽性対照のチアゾリジン系抗糖尿病剤（ロシグリタゾン）と比較することにより判断した。さらに、活性成分で刺激した 3T3-L1 細胞中の脂肪細胞分化関連タンパク質の増減やリン酸化のレベルをウエスタンブロットで測定して作用メカニズムの推定を試みた。
【結果】*V. trifolia* メタノール画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィー、逆相 HPLC 等を用いて精製し、4 種のリグナン類を単離・同定した。各単離化合物は脂肪細胞分化した 3T3-L1 前駆細胞に対してロシグリタゾンと同等の脂肪蓄積量増加作用を示した。ウエスタンブロットで単離化合物の脂肪細胞分化関連タンパクに対する作用を測定した結果、脂肪細胞分化を促進するとともにアディポネクチンの発現を高めることが分かった。一方、PPARγ アンタゴニスト（BAGDE）により TZD 様作用が抑制されたことから、単離化合物が PPARγ のアゴニストとして作用すると考えられた。今後、*V. trifolia* メタノール画分から単離・同定したリグナン類の作用メカニズムと構造活性相関の詳細を明らかにする予定である。

(1) A. Nishina *et al., Molecules*. 2017 Nov 22;22(11). pii: E2030.

Vitex trifolia, anti-diabetes, 3T3-L1 cells

発表責任者：仁科淳良（nishina.atsuyoshi@nihon-u.ac.jp）

講演番号：1B1p03
講演日時：3 月 24 日 14:12～ 1 号館 B1 会場

徳島県育成香酸カンキツ「阿波すず香」のフラボノイドおよび芳香成分プロファイル解析

The flavonoid and aromatic profile of Awa-suzuka (*Citrus sudachi* X *C. junos*)

○新居 美香[1,2]、堤 理恵[2]、阪上 浩[2] ([1]徳農技セ、[2]徳島大院　代謝栄養学分野)
○MIKA NII[1,2], RIE TSUTSUMI[2], HIROSHI SAKAUE[2] ([1]Tokushima Pref. of Agric, [2]Tokushima Univ. dept. nutrition)

【背景および目的】徳島県が育成した「阿波すず香」は 2017 年に品種登録された香酸カンキツで、種子親を 4 倍体スダチ、花粉親を 2 倍体ユズとする 3 倍体品種である。阿波すず香の特徴は、果皮に苦味が少なく、「皮ごと食べられる」ことであり、果皮・果汁ともにユズやスダチとは異なる味質を有する。本研究では、本品種の生育過程におけるフラボノイド含有量および芳香成分の変動を分析し、そのプロファイルを明らかにすること、さらにその特徴を生かして生食することが糖代謝に与える影響を明らかにすることとした。
【方法】徳島県立農林水産総合技術支援センター勝浦試験地に植栽の 13 年生樹より果実を定期的に採取し、供試した。サンプリングは、8 月～12 月の間、月 1 回とし、果皮および果肉を分離、凍結乾燥後ミルサーで粉砕し、抽出等の処理を行い、分析に供試した。フラボノイドは、抽出溶媒(DMSO:メタノール＝1:1)に粉末試料を加え、16 時間室温で攪拌した後、遠心分離、上清を C18 ミニカラムで固層抽出した。定容・ろ過し、HPLC 分析用試料とした。芳香成分分析は、果実を採取して 1 日以内の果皮を-80℃で凍結保存した。抽出溶媒はジエチルエーテルとし、GC/MS 分析用試料とした。また、11 月収穫後の果汁または対照群として生理食塩水を C57Bl/6 マウス(雄性、8 週齢)に 200μL を投与し、30 分後に糖負荷試験を行った。
【結果】フラボノイド分析結果では、8-12 月の各果皮および果肉からはナリンジンはほとんど検出されず、ネオヘスペリジン、ナリルチンが検出された。その他、果皮および果汁にはスダチやユズとも異なる特異的なピークが検出され、複数のフラボノイドを有することが示唆された。また、芳香成分分析では、カンキツ類の芳香の主成分であるリモネン、リナロール、α-ピネン、β-ピネン等が検出された。さらに、こうした成分を有する果汁をマウスに投与すると、その後に行った糖負荷試験では、対照群と比較して 15、30 分後の血糖の上昇が有意に緩やかであり、血糖上昇抑制作用を有することが示された。
【考察および結論】カンキツ類の果皮の苦みの主成分はナリンジン、ネオヘスペリジンとされるが、阿波すず香の果皮、果汁、果肉にはナリンジンが少なく、苦味が少なく「皮ごと食べられる」理由のひとつであると考えられた。また、スダチ、ユズにないフラボノイドが検出され、味質のみならずフラボノイド成分も異なっていた。さらに果汁投与により血糖上昇抑制作用が示唆された。阿波すず香は独自のフラボノイド、芳香成分を有し、血糖上昇抑制等の機能性を有することが期待される。

Awa-suzuka, flavonoid, glucose-metabolism

発表責任者：新居美香（nii_mika_1@pref.tokushima.jp）

講演番号：1B1p04
講演日時：3 月 24 日 14:23～ 1 号館 B1 会場

健康的日本食を摂取したヒトにおける mRNA と miRNA の関係と統合解析

Relationship between mRNA and miRNA in human who ingested healthy Japanese diet and integrated analysis

○浅野 将希、山本 和史、都築 毅 (東北大院農)
○Masaki Asano, Kazushi Yamamoto, Tsuyoshi Tsuduki (Grad. Sch. Agri. Sci., Tohoku Univ.)

【目的】日本食は日本人の長寿の要因の一つとして考えられている。以前我々は、様々な年代の日本食の健康有益性を比較したところ、1975 年の日本食が最も高い効果をもつことを明らかとした [1,2]。これらの研究を基に 1975 年日本食の特徴を探索し、それを組み込んだ食事（1975 年型日本食）を試験食とし、軽度肥満者を対象とした介入試験を実施した結果、1975 年型日本食群において肥満改善や糖尿病予防、動脈硬化予防及び慢性炎症予防効果が示唆された。一方、生体機能を調節する遺伝子発現制御に micro RNA（miRNA）が関与していることが知られている。miRNA による種々の代謝調節機構が解明されていく中で、脂質異常症や肥満の発症と miRNA の関係性が明らかとなっている [3,4]。本研究では、血中単球の DNA マイクロアレイ分析と miRNA マイクロアレイ分析の統合解析を行い、ヒト介入試験で見られた様々な効果に対する詳細なメカニズム解明を試みた。
【方法】1975 年型日本食が軽度肥満者に与える影響を、現代の日本食 （日本人の食事摂取基準に準じた食事） と比較した。被験者（25<BMI<30、20～70 歳） を現代食群（30 名）と 1975 年型日本食群（30 名） に割り当て、試験食を 1 日 3 食、28 日間摂取させた。試験期間前後に採取した血液から単球を単離し、Total RNA を調製したのち、DNA マイクロアレイ分析と miRNA マイクロアレイ分析に供した。1975 年型日本食群で特異的に発現が変化した遺伝子を抽出し、データベース（TargetScan）を基にそれらの遺伝子の発現制御に関わる miRNA を検索し、miRNA マイクロアレイの結果と統合した。
【結果】DNA マイクロアレイの結果、動脈硬化症に関わる *Rap2a* や自然免疫応答に関わる *Usp25* の発現量が減少しており、その要因として miRNA である *has-miR-10a-5p* の発現上昇が認められた。また、Wnt シグナル伝達の活性化に関わる *Tnks* や抗ウィルス因子である *Rsad2* の発現量が増加しており、その要因として miRNA である *has-miR-590-5p* の発現減少が認められた。
【考察】1975 年型日本食群において、Wnt シグナル伝達活性化や動脈硬化発症リスク低下、免疫賦活化に関わる遺伝子とそれらを制御する miRNA との関連が示唆された。1975 年型日本食の摂取により miRNA の発現量が変化し、それによって生体機能調節に関わる遺伝子の発現を制御したと考えられた。

[1] Y. Kitano, T. Tsuduki, et al., J Jpn Soc Nutr Food Sci, 2014.
[2] K. Yamamoto, T. Tsuduki, et al., Nutrition, 2016.
[3] Rayner KJ, et al: Science, 328: 1570-1573, 2010.
[4] Horie T, et al: Proc Natl Acad Sci USA, 107: 17321-17326, 2010.

Japanese diet, Human, micro RNA

講演番号：1B1p05
講演日時：3 月 24 日 14:34～ 1 号館 B1 会場

miRNA に着目したガーリック由来香気成分の抗肥満作用に関する研究
Studies on anti-obesity effect of garlic focusing on miRNA

○池田 彩菜[1]、三浦 徳[2]、瀬尾 希来[1]、渡辺 高大[2]、増澤（尾崎） 依[2]、細野 崇[1,2]、関 泰一郎[1,2]
([1]日大院・生資科・応生科、[2]日大・生資科・生命化)
○Ayana Ikeda[1], Atushi Miura[2], Kiki Seo[1], Takahiro Watanabe[2], Yori Ozaki-Masuzawa[2], Takashi Hosono[1,2], Taiichiro Seki[1,2] ([1]Nihon Univ. Grad.School of Bioresouce Sci., [2]Nihon Univ. Coll.Bioresouce Sci.)

【目的】
肥満をはじめとした生活習慣病の発症や進展には食習慣が密接に関与しており、近年の生活習慣病の増加に伴い食品の機能性が注目されている。これまでに演者らはガーリック由来香気成分 diallyl trisulfide (DATS)が抗肥満作用を有することを明らかにした。一方、食品由来成分がタンパク質に翻訳されない non-cording RNA の一種である miRNA を介して様々な機能性を発揮する可能性が報告されている。本研究では、抗肥満作用を有する DATS の機能発現における miRNA の役割を検討し、DATS の新しい作用メカニズムを明らかにする。

【方法】
Sprague-Dawley ラット（5 週齢、オス）を通常食を与えて 1 週間予備飼育後、高脂肪食を 1 週間給餌した。その後、DATS を投与する群（DATS 群） と DATS の溶媒のみを投与する群（Vehicle 群に）分け、2 日に一度経口投与した。本試験開始 10 週目に血液と各臓器を採取し、血漿及び肝臓中トリグリセリド(TG)・コレステロール(Cho)量の測定と精巣上体白色脂肪組織（epiWAT）における miRNA 及び mRNA 発現の網羅的解析を行った。

【結果・考察】
Vehicle 群と比較して DATS 群の体重増加は有意に抑制された。また、体重増加の抑制に伴い白色脂肪組織重量も有意に減少した。DATS は血漿 TG 濃度及び肝臓中 TG・Cho 量を有意に減少させた。epiWAT における miRNA 発現の網羅的解析を行った結果、DATS 投与により miRNA7 種類が有意に増加し、3 種類が有意に減少した。また、mRNA 発現の網羅的解析の結果、DATS 投与によりアラキドン酸代謝に関連する mRNA の発現が変化した。DATS 投与により発現が減少した miRNA-335 は脂質代謝関連遺伝子の発現を制御することが報告されている。DATS は白色脂肪組織における miRNA-335 発現を減少させることで脂質代謝を改善すること、アラキドン酸代謝に関する mRNA 発現を変化させることで脂肪組織の減少や機能を変化させる可能性が明らかになった。

garlic, obesity, miRNA

発表責任者：関　泰一郎（tseki@brs.nihon-u.ac.jp）

講演番号：1B1p06
講演日時：3 月 24 日 14:55～ 1 号館 B1 会場

骨格筋細胞におけるフェネチルイソチオシアネートの筋タンパク質分解抑制効果の評価
Effect of phenethyl isothiocyanate on muscle protein degradation in C2C12 myotubes.
○千葉 麻衣子[1]、伊藤 芳明[2]、長澤 孝志[2] ([1]岩手大院総合科学、[2]岩手大農)
○Maiko CHIBA[1], Yoshiaki ITO[2], Takashi NAGASAWA[2] ([1]Grad. Sch. of Arts and Sciences, Iwate Univ., [2]Iwate Univ.)

【背景・目的】我々は、クレソンなどに含まれるイソチオシアネート化合物の一つであるフェネチルイソチオシアネート(Phenethyl isothiocyanate, 以下 PEITC)が糖尿病モデルマウス KKAy において空腹時の血糖値上昇抑制効果を有することを明らかにしてきた。また、マウス骨格筋由来 C2C12 細胞を用いた作用機序検討において、PEITC は Akt のリン酸化を増加させ、これを介して骨格筋細胞内へのグルコース取り込みを促進させる可能性が示唆された。

加齢や疾病、栄養不足等により骨格筋タンパク質の合成が抑制され分解が亢進すると骨格筋は萎縮する。生体内最大の組織である骨格筋は運動機能や代謝機能において重要な役割を担っており、その量を維持・増加させることが健康の増進に不可欠である。骨格筋タンパク質の合成促進・分解抑制において Akt の活性化が関与していることをこれまで我々はリジンとその代謝物を用いた筋萎縮抑制作用の検討で示してきた。骨格筋細胞において Akt を活性化する PEITC は、同様に筋萎縮の抑制に寄与する可能性がある。そこで本研究では、PEITC が筋タンパク質の合成・分解に及ぼす影響について検討した。

【方法・結果および考察】C2C12 細胞に PEITC を 0~20μM で処理してアミノ酸飢餓培養を行い、培地中に放出された 3-メチルヒスチジン(3-MeHis)を測定することで骨格筋タンパク質の分解速度を測定した。PEITC は濃度依存的に 3-MeHis の放出を抑制し、タンパク質分解を抑制している可能性が示唆された。またこのとき、PEITC は FoxO1 のリン酸化を促進し、ユビキチンリガーゼの MuRF1、Atrogin1 の発現を抑制していたことから、PEITC はユビキチンプロテアソーム系を抑制している可能性が示唆された。さらに Akt 阻害剤の併用処理を行うと、PEITC のこれらの効果が打ち消されたことから、PEITC は Akt の活性化を介してユビキチンリガーゼの発現を抑制し、骨格筋タンパク質の分解を抑制する可能性が示唆された。一方で、PEITC は Akt 下流でタンパク質合成の促進に寄与する mTOR、S6K1、4E-BP1 のリン酸化を増加させたが、SUnSET 法により新規合成タンパク質量の評価を行ったところ、有意な合成量の増加は見られなかった。このとき PEITC は、タンパク質の合成阻害に働く eIF2α のリン酸化も同時に増加させていることが明らかとなり、こうした抑制シグナルも同時に活性化してしまうことが、合成量の増加に寄与しない一因となっている可能性が考えられた。

これらの結果から、PEITC は骨格筋細胞において Akt の活性化を介して筋タンパク質分解の抑制に有効に働く可能性が示唆された。

isothiocyanate, skeletal muscle, protein degradation

発表責任者：伊藤 芳明（yito@iwate-u.ac.jp）

講演番号：1B1p07
講演日時：3 月 24 日 15:06～ 1 号館 B1 会場

骨格筋ファイバに対する大麦若葉エキス末の糖取り込み作用

Young Barley Leaf Extract Promotes Glucose Uptake in Skeletal Muscle Cellfiber

○正路 佳代子[1]、安達 亜希[1]、森川 琢海[2]、尾上 貴俊[2]、鍔田 仁人[2]、島 亜衣[3]、竹内 昌治[3]([1]株式会社セルファイバ、[2]株式会社東洋新薬、[3]東大)
○Kayoko SHOJI[1], Aki ADACHI[1], Takumi MORIKAWA[2], Takatoshi OGAMI[2], Masahito TUBATA[2], Ai SHIMA[3], Shoji TAKEUCHI[3] ([1]CellFiber Co., Ltd., [2]TOYO SHINYAKU Co.,Ltd., [3]The Univ. of Tokyo)

【概要】本研究では、平面培養した骨格筋細胞および骨格筋ファイバ（三次元培養；図 1）を用いて、大麦若葉エキス末が糖取り込みを促進することを明らかにした。また、その糖取り込み促進作用はインスリン経路を介していることが示唆された。

【背景・目的】糖尿病の症状緩和や重症化予防の方法として健康食品等の日常的摂取が注目されている [1]。例えば、大麦若葉エキス末（Young Barley Leaf Extract; BLE）の血糖値降下作用が報告されているが [2]、作用機序には不明な点も多い。本研究では生体最大の器官である骨格筋による糖取り込みに注目し、BLE が骨格筋細胞(平面培養)及び骨格筋ファイバ（三次元培養）に対して糖取り込みを促進するかを調査した。（文献 1 ：Minaiyan *et al.*, *Res Pharm Sci,* 2014, 9, pp.173–178. 文献 2 : 久保田ら、日本薬学会第 109 年会講演要旨集 1989, 4, pp.25.）

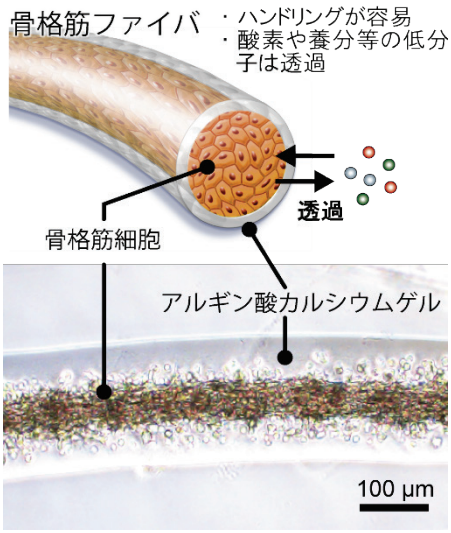


図 1 骨格筋ファイバの概要図（上）及び写真（下）

【方法・結果】骨格筋ファイバは、マウス筋芽細胞株 C2C12 をファイバ内部で筋分化誘導して作製し、グルコースアナログ 2-NBDG を用いて糖取り込みを計測した。その結果、骨格筋ファイバにおいて、BLE 刺激による糖取り込み促進作用が計測された。BLE による糖取り込み促進作用は Wortmannin により抑制されたことから、BLE はインスリン経路で糖取り込みを促進していることが示唆された(図 2)。また、C2C12 を筋分化誘導した平面培養での評価においても同様の傾向が見られた。

以上から、大麦若葉エキス末は骨格筋組織に対してインスリン経路を介して糖取り込みを促進し、血糖値制御に有効である可能性が示唆された。

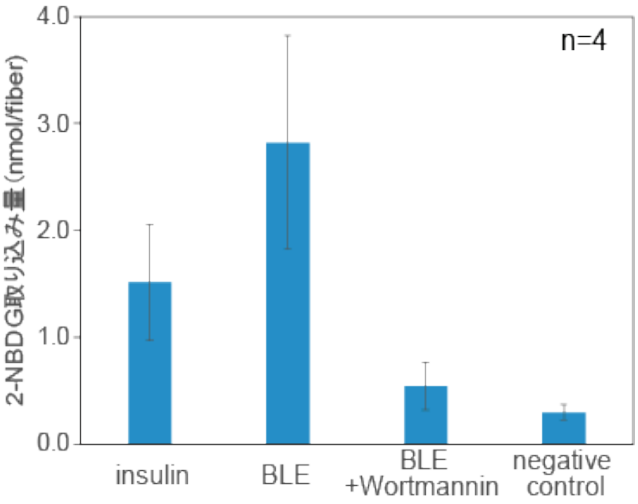


図 2 骨格筋ファイバの糖取り込み量
試薬濃度はそれぞれ insulin(500 ng/ml)、BLE(100 μg/ml)、 Wortmannin(10 μM).

Young Barley Leaf Extract, diabetes, skeletal muscle

発表責任者：正路 佳代子（kayoko.shoji@cellfiber.jp）

講演番号：1B1p08
講演日時：3 月 24 日 15:17～ 1 号館 B1 会場

AMPK の活性化を制御する新規化合物の探索
Screening of the novel compounds that regulate AMPK activity
○樋口 敬太[1]、鈴木 司[1,2]、井上 順[1,2]、山本 祐司[1,2] ([1]東農大院・農・農化、[2]東農大院・応生・農化)
○ Keita Higuchi[1], Tsukasa Suzuki[1,2], Jun Inoue[1,2], Yuji Yamamoto[1,2] ([1]Tokyo Univ.Agric.,Grad.Sch.of Agric, [2]Tokyo Univ.Agric)

【背景・目的】

AMP-activated protein kinase (AMPK) は真核生物に高度に保存されているセリン/スレオニンキナーゼであり、生体内のエネルギー恒常性維持を担う重要な酵素として知られる。AMPK は細胞内での ATP 濃度の低下を感知すると活性化状態になる。活性化した AMPK はその基質をリン酸化することで、異化作用の亢進、同化作用の抑制を行う。また、AMPK の活性化剤であるメトホルミンは 2 型糖尿病の第一選択薬として広く利用されており、AMPK の新しい活性化剤の同定は医療分野において有用である。そこで、我々は AMPK を活性化させる化合物の探索およびその作用機構の解析を本研究の目的とした。

【方法】

AMPK 活性化の評価は、その活性化に必須となるαサブユニットの Thr172 のリン酸化と AMPK の基質のひとつであるアセチル CoA カルボキシラーゼ(ACC) Ser79 のリン酸化を指標とした。理化学研究所天然化合物バンクから３７６種類の化合物を用い、In Cell Western 法にて評価を行った。さらに、Western Blotting 法でも評価を行い、AMPK を活性化させる化合物の選抜を行った。また、高い AMPK 活性化能がみられた化合物については、その類縁体２０種類を用いて、Western Blotting 法にて、より AMPK 活性化能の化合物のスクリーニングを行った。また、これらの化合物による AMPK 活性化機構を調べるため、細胞に添加した際の ADP/ATP 濃度比を測定した。

【結果】

In Cell Western 法および Western Blotting 法によって AMPK 活性化剤のスクリーニングを行った。結果、１種類の化合物において高い AMPK 活性化能がみられた。さらに、この化合物の類縁体２０種類を Western Blotting 法を用いて解析したところ、元の化合物より２つの類縁体でより高い AMPK 活性化能が認められた。また、これらの化合物の作用機構について明らかにするため、細胞内の ADP/ATP 濃度比を測定した結果 、化合物を添加した細胞で ADP/ATP 濃度比が大きく上昇していた。

本研究で我々は、新しい AMPK の活性化剤として 2 種類の化合物を同定し、これらの化合物は細胞内の ATP/ADP (AMP) 濃度比を低下させることで AMPK を活性化させることを明らかにした。

AMPK, type 2 diabetes, chemical biology

講演番号：1B1p09
講演日時：3 月 24 日 15:28～ 1 号館 B1 会場

バナナ摂取による運動パフォーマンス向上効果と疲労軽減効果に関する解析

Analysis on exercise performance and fatigue improvement effect by banana ingestion

○増田 隆昌[1]、渡邊 恵梨子[1]、石川 大仁[1]、瀧本 陽介[1]、積 志保子[2]、堀田 拓哉[3]、大滝 尋美[3]、荒木 雄介[3]、渡辺 陽介[3]、長﨑 大[4]（[1]株式会社ヘルスケアシステムズ、[2]ソロス株式会社、[3]株式会社ドール、[4]愛知学院大学 心身科学部 健康科学科）

○ Takamasa MASUDA[1], Eriko WATANABE[1], Hirohito ISHIKAWA[1], Yosuke TAKIMOTO[1], Shihoko SEKI[2], Takuya HOTTA[3], Hiromi OTAKI[3], Yusuke ARAKI[3], Yosuke WATANABE[3], Masaru NAGASAKI[4] ([1]Healthcare Systems Co., Ltd., [2]SOLROS Co., Ltd., [3]Dole Japan, Inc., [4]Department of Health Science, Faculty of Psychological and Physical Science, Aichi Gakuin University)

バナナは、エネルギーやミネラルの効率よい補給源として、よく運動前や運動中に慣習的に食べられる。しかし、バナナ摂取の運動への影響に関する知見には限りがある。我々は、運動前のバナナ摂取による運動パフォーマンス向上効果と疲労軽減効果について明らかにするために、運動負荷試験をバナナ摂取群・非摂取群の並行群間比較試験のデザインで行った。

被験者は 20 代の健常な日本人 20 名（各群 10 名ずつ）で、バナナ 234 g（約 2 本分相当）の摂取 3 時間後に、各被験者の最大酸素摂取量の 60%に相当する強度の運動負荷を、エルゴメーター（エアロバイク）にて 1 時間行った。その結果、バナナ摂取群は非摂取群に比べて運動量の指標となる Watt 数が増加しており、また運動中の主観的疲労度（RPE；全体、下肢、呼吸）が低下していた。また、客観的疲労度として疲労マーカーである血中 LDH 濃度の増加がバナナ摂取群では抑えられていた。また、筋痙攣に関連のあることが知られている血中カリウム濃度の低下がバナナ摂取群では抑えられていた。

さらに、運動時によく食べられる米、パン、マルトデキストリン（炭水化物サプリメント）などの他の食品摂取との比較検討をクロスオーバー試験で行った結果、同様に血中カリウム濃度の低下が他の試験食品摂取群に比べてバナナ摂取群で抑えられていた。

これらのことから、バナナ摂取には、運動量の増加や疲労軽減効果があることが示唆された。したがって運動時のバナナの摂取は、運動パフォーマンスの向上効果や怪我や故障の予防効果があることが期待される。

Sports nutrition, Exercise fatigue, Banana ingestion

講演番号：1B1p10
講演日時：3 月 24 日 15:39～ 1 号館 B1 会場

オオバギ（*Macaranga tanariusu*)実由来抽出物及びその成分の生理活性
Bioactivity of extract and its components derived from *Macaranga tanarius* fruit.
○夏目 矩行[1]、渡辺 章夫[4]、小塚 隆造[3]、米澤 貴之[4]、禹 済泰[2,5]、照屋 俊明[1]([1]琉球大院・理工、[2]中部大・応生、[3]中部大院・応生、[4]中部大・生機研、[5](株) 沖縄リサーチセンター)
○Noriyuki NATSUME[1], Akio WATANABE[4], Ryuzo KOZUKA[3], Takayuki YONEZAWA[4], Je-Tae WOO[2,5], Toshiaki TERUYA[1] ([1]Graduate school of Engineering and Science, University of the Ryukyus., [2]Department of Biological Chemistry, Chubu University., [3]Graduate school of Bioscience and Biotech., Chubu University., [4]Research Institute for Biological Function, Chubu University., [5]Okinawa Research Center Co.,Ltd.)

【背景・目的】
オオバギは、トウダイグサ科の常緑樹木であり、日本の沖縄などの熱帯地域に自生する植物である。オオバギ（*Macaranga tanarius*)の実には、フラボノイド骨格にプレニル基が付加したプレニルフラボノイドが非常に多く含有していることが報告されているが、その生理作用についての報告は少ない。そこで、本研究では、オオバギ実メタノール抽出物及びその成分について、糖・脂質代謝に対する影響を細胞レベルおよび動物レベルで検討した。

【方法・結果】
ラット骨格筋 L6 筋管細胞を用いて糖取込み作用に対する確認したところ、オオバギ実メタノール抽出物は糖取込みを有意に促進させた。そこで、活性成分を特定するため、オオバギ（実)に含有する主要成分（nymphaeol-A, nymphaeol-B, nymphaeol-C, isonymphaeol-B と 3’-geranyl-naringenin）を単離・精製し、L6 筋管細胞の糖取込みに対する影響を確認したところ、isonymphaeol-B と 3’-geranyl-naringenin に強い糖取込み促進作用が認められた。

Isonymphaeol-B と 3’-geranyl-naringenin がどのような作用メカニズムで L6 筋管細胞の糖取込みを促進しているのかを明らかにするため、糖代謝に関わるシグナル経路についてウエスタン・ブロット解析によって確認した。その結果、インスリンによって誘導される Akt 経路には影響はみられず、エネルギー代謝に重要な AMPK のリン酸化の亢進が認められたことから、AMPK 経路の活性化が関わっていることが示唆された。

さらに、高脂肪・高ショ糖飼料を摂取させた肥満誘導モデルマウスを用いて、糖・脂質代謝に対するオオバギ実抽出物（100 or 500 mg/kg body weight. p.o.)の影響について検討したところ、オオバギ実抽出物 500 mg/kg BW 投与群で体重増加の抑制、脂肪組織重量の減少作用が認められた。加えて、血漿中パラメータ解析では総コレステロールの減少作用が認められた。さらに、オオバギ実抽出物 500 mg/kg BW 投与群で絶食時・非絶食時の血糖値上昇の抑制作用が認められた。

本研究で、オオバギ実抽出物及びその含有成分は、細胞レベルで AMPK 経路活性化を介して糖取込み促進作用を示し、動物レベルで抗肥満・抗糖尿病作用を有することが示唆された。

このことから、オオバギ実及びその含有成分は、糖代謝及び脂質代謝異常の予防・治療のためのサプリメント及び薬の開発素材として有用・有望であると考えられる。

Macaranga tanarius, Prenylflavonoid, Anti-diabetes

講演番号：1B1p11
講演日時：3 月 24 日 16:00～ 1 号館 B1 会場

香酸柑橘柚香の腸内細菌叢を介した糖代謝改善作用

Functional effects of citrus yuko via microflola

○堤 理恵[1]、新居 美香[1,2]、瀬山 瑞穂[1]、阪上 浩[1] ([1]徳島大、[2]徳島県立農林水産総合技術支援センター)
○RIE TSUTSUMI[1], Mika Nii[1,2], Mizuho Seyama[1], Hiroshi Sakaue[1] ([1]Tokushima Univ. of Nutrition, [2]Tokushima Agric. Fores. Fishes. Tec Support. Cent.)

【背景】徳島県産香酸柑橘の一種である柚香（*Citrus Yuko*）は、果汁中にノビレチン等フラボノイドを多く含む稀な果実であり、収穫後から 6 ヶ月以上にわたって腐敗しにくい、その間に糖度を増す等の民間伝承を有する。我々はこれまでに柚香の抗菌活性を見出し、その有用性について特許取得等を行ってきた。本研究では抗菌活性を有する柚香果汁の摂取がマウスにおいて腸内細菌叢を変化させるか、その効果として高脂肪食誘導性糖代謝異常を改善するかを検討した。
【方法】C57Bl/6J マウス（5 週齢、雄、日本 SLC）40 匹を通常食（NC）、高脂肪食（HFD）にわけ、さらにそれぞれ柚香果汁投与群、生理食塩水投与群にわけ、４群（n=10 ,each）とした。６週齢より各餌および柚香果汁または生理食塩水の投与を開始し、１週間後より週に一度、便の回収を行った。10 週齢時に経口糖負荷試験、11 週齢時にインスリン負荷試験を行い、12 週齢時に解剖、各臓器摘出、盲腸内容物の採取等を行った。柚香果汁または生理食塩水の投与は毎日一回 200μL 経口ゾンデにて行った。
【結果】柚香果汁を経口投与開始し、1 週間後の採便にて、Akkermansia 属の発現が認められた。また、NC 食と HFD 食群を比較すると、HFD 群において Firmicutes および Proteobacteria の増加、Bacteroidetes の減少が認められたが、HFD 摂取の柚香果汁投与群では Firmicutes、Proteobacteria、Bacteroidetes の組成が NC 食摂取群に近い割合となった。さらに、糖負荷試験では高脂肪食摂取による耐糖能異常が柚香果汁投与群において有意に改善した（$p<0.05$）。またインスリン抵抗性改善も認めた。
【考察】抗菌性を有する柚香果汁の投与は腸内細菌叢の改善、抗肥満作用を有するとされる Akkermansia の発現誘導をもたらすと示唆された。果汁中の有効成分としてはノビレチン、ヘスペリジン等が検出されているが、その他にも同定されていない未知の成分を有すると考えられる。果汁中にフラボノイドを多く有効することで、より機能性を発揮しやすい果実であり、有効成分の同定とさらなる機序の解明が必要である。
【結論】柚香果汁の摂取は腸内細菌叢の改善を介して高脂肪食誘導性糖代謝異常を改善することが示唆された。

citrus, microflora, glucose metabolism

発表責任者：堤理恵（rtsutsumi@tokushima-u.ac.jp）

講演番号：1B1p12
講演日時：3 月 24 日 16:11～ 1 号館 B1 会場

“スクロース過剰毒性”は消化管を介して脂肪肝と高中性脂質血症を誘導する
Excess sucrose targets a digestive tract to induce fatty liver and hyperlipidemia in rats
○小田 裕昭[1]、孫 淑敏[1]、梅木 美樹[2]、西村 直道[3]、望月 聡[4] ([1]名大院生命農、[2]別府大食栄、[3]静岡大農、[4]大分大教育)
○Hiroaki ODA[1], Shumin Sun[1], Miki UMIKI[2], Naomichi NISHIMURA[3], Satoshi MOCHIZUKI[4] ([1]Nagoya Univ., [2]Beppu Univ., [3]Shizuoka Univ., [4]Oita Univ.)

【目的】スクロース過剰摂取は脂肪肝や高脂血症を引き起こし，さらには高尿酸血症を引き起こすなど，“スクロース過剰毒性”として知られている。そして現在スクロース過剰毒性がメタボリックシンドロームの主な原因として考えられるようになってきた。これまでエネルギーの過剰摂取や飽和脂肪酸の摂取が考えられてきたが，最も重要な因子としてスクロース過剰毒性が新たにクローズアップされるようになった。一方，スクロース過剰毒性のメカニズムは半世紀以上も前に発表された報告が，今でもスタンダードな教科書に載っている。その説明は，脂質合成の基質が急速に流れるためであるというものであり，十分な説明になっていない。つまり，スクロースの構成糖であるフルクトースの代謝物が肝臓で解糖系の途中に流入するため，素早く脂質合成に利用されるというものであり，肝臓が主要な臓器できてあるとされてきた。しかし，血清にフルクトースがほとんど表れないことなどから，小腸がフルクトースの主要な代謝臓器であるとことが，2018 年にはじめて明らかになった。そこで演者らは，スクロース過剰摂取は小腸粘膜の概日時計に変化を与え，消化吸収機能に影響を及ぼすことを検討した。さらに，盲腸粘膜の概日時計についても検討し，盲腸内容物の腸内細菌叢の変化についても解析を行った。抗生物質を与えることでスクロース過剰毒性による脂質代謝異常に与える影響を検討した。
【方法】5 週齢 Wistar 系雄性ラットを用いて，食餌中の炭水化物源をすべてスターチまたはスクロースとして摂取させた 2 群を設けた。28 日間飼育後、ラットを屠殺し血清，肝臓，小腸粘膜，盲腸粘膜，盲腸内容物を得た。血清脂質と肝臓脂質を分析し，小腸粘膜と盲腸粘膜の時計遺伝子を検討した。さらに，盲腸内容物の腸内細菌叢を検討した。
【結果】スクロース食群では，血中中性脂肪がスターチ食群に比べ上昇し，肝臓総脂質も増加した。スクロース過剰摂取により小腸粘膜の Per，Cry 遺伝子などの時計遺伝子に変動が見られた。また，GLUT5 などの遺伝子発現も増加した。一方，盲腸粘膜の概日時計には影響を及ぼさなかった。盲腸内容物の細菌叢は，スクロース食群で　多様性が減少し、ファーミキューテス門／バクテロイデス門比はスクロース食群で低下していた。抗生物質の飲水への添加は，脂肪肝と高脂血症を抑えた。これらの結果から、スクロース過剰摂取は消化管に作用して，小腸概日時計に影響を与え，腸内細菌叢に変化を与えることで，脂肪肝と高脂血症を引き起こすことがわかった。したがって，スクロース過剰毒性が肝臓をターゲットとしているわけではなく，主要な臓器が消化管であることが明らかになった。

sucurose excess, metabolic syndrome, fatty liver

発表責任者：小田裕昭（hirooda@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：1B1p13
講演日時：3 月 24 日 16:22～ 1 号館 B1 会場

肥満モデルマウスにおける *Lactobacillus paracasei* K71 加熱死菌体摂取が腸内細菌叢へ及ぼす影響
Effects of *Lactobacillus paracasei* K71 on gut microbiota composition in ob/ob mice.

○志波 優[1,2]、伊藤 さとみ[3]、松本 雄宇[3,4]、鈴木 司[3]、井上 順[3]、石毛 太一郎[2]、熊谷 武久[5]、藤田 信之[1]、山本 祐司[3]、田中 尚人[1] ([1]東農大生命科学、[2]東農大生物資源ゲノム解析セ、[3]東農大応生化、[4]関東学大機能食研、[5]亀田製菓株式会社)
○Yuh SHIWA[1,2], Satomi Ito[3], Yu Matsumoto[3,4], Tsukasa Suzuki[3], Jun Inoue[3], Taichiro Ishige[2], Takehisa Kumagai[5], Nobuyuki Fujita[1], Yuji Yamamoto[3], Naoto Tanaka[1] ([1]Fac. Life Sci., Tokyo Univ. of Agric., [2]NGRC, Tokyo Univ. of Agric., [3]Fac. Appl. Bio Sci., Tokyo Univ. of Agric., [4]Funct Foods Sci Res Inst, KGU, [5]Kameda Seika Co., Ltd.)

【背景・目的】
酒粕から分離した *Lactobacillus paracasei* K71(以下 K71 株)は、これまでに加熱死菌体摂取によるアトピー性皮膚炎の緩和作用、および唾液中の分泌型イムノグロブリン A(SIgA)の増加作用が報告されており、脂質代謝への影響についても解析が進められている。本研究では、遺伝性肥満マウス(*ob/ob* マウス)を用いて、K71 株摂取による腸内細菌叢への影響を明らかにすることを目的とした。
【材料・方法】
実験には 5 週齢の雄性 C57BL6/J マウスと *ob/ob* マウスを用いた。AIN-93G 飼料で飼育した C57BL6/J マウス（野生型群）と *ob/ob* マウス（ob-AIN 群）、AIN-93G 飼料に K71 株を添加した飼料で飼育した *ob/ob* マウス（ob-K71 群）の 3 群（各群 8 匹）を 90 日飼育した。飼育 90 日目の自然排便された糞便試料を採取し、採取し-80℃で保存した。糞便試料から DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子（V3-V4 領域）をバーコードタグ付きプライマーで増幅し、MiSeq システムを用いて 2×300 塩基対のペアエンドシークエンス解析に供した。配列データから OTU 構築、菌種帰属等の一連の解析は、QIIME2 解析パイプラインを用い、16S rRNA データベースには SILVA Release 128 を用いた。
【結果・考察】
各個体の試験終了日体重を精査した結果、ob-AIN 群において低体重を示す個体が確認されたため、当該 1 個体を解析から除外した。種の豊富さを示す Chao1、種の均等度を示す Shannon 指数は、いずれも群間で有意な差は見られなかった。一方、試料間での菌叢構造は群間で有意に異なっていた。続いて、ob-AIN 群と ob-K71 群の比較において組成比が有意に変化している細菌を科レベルで探索したところ、ob-K71 群で有意な増加が見られたのは *Bacteroidetes* 門 (B 門) *Rikenellaceae* 科であった。一方、ob-K71 群で有意な減少が見られた科は、B 門 *Prevotellaceae* 科、*Firmicutes* 門 *Peptostreptococcaceae* 科、*Proteobacteria* 門 *Alcaligenaceae* 科、*Verrucomicrobia* 門 *Verrucomicrobiaceae* 科であった。これら ob-K71 群で有意な増加および減少した科の多くは、2 型糖尿(T2D)や非アルコール性脂肪肝炎(NASH)との関連が報告されている。本研究により、K71 株摂取は腸内細菌叢に影響を与え、T2D や NASH で報告のある腸内細菌群に影響を与えることが明らかとなった。

Lactobacillus paracasei, metagenome, gut microbiota

講演番号：1B1p14
講演日時：3 月 24 日 16:33～ 1 号館 B1 会場

肥満モデル動物における *Lactobacillus paracasei* K71 加熱死菌体摂取による新規機能性の探索
Search for novel functionalities by ingesting heating dead cells of Lactobacillus paracasei K71 in obese model animals

○伊藤 さとみ[1]、志波 優[2]、松本 雄宇[5]、鈴木 司[1,4]、井上 順[1,4]、石毛 太一郎[3]、熊谷 武久[6]、藤田 信之[2]、田中 尚人[2]、山本 祐司[1,4]([1]東農大院・農化、[2]東農大・生命科学、[3]東農大・生物資源ゲノム解析セ、[4]東農大・応生化、[5]関東学大・機能食研、[6]亀田製菓株式会社)
○Satomi ITOU[1], Yuh Shiwa[2], Yu Matsumoto[5], Tsukasa Suzuki[1,4], Jun Inoue[1,4], Taichiro Ishige[3], Takehisa Kumagai[6], Nobuyuki Fujita[2], Naoto Tanaka[2], Yuji Yamamoto[1,4] ([1]Agric Chem., Tokyo Univ. of Agric., [2]Fac. Life Sci., Tokyo Univ. of Agric., [3]NGRC, Tokyo Univ. of Agric., [4]Fac. Appl. Bio Sci., Tokyo Univ. of Agric., [5]Funct Foods Sci Res Inst, KGU, [6]Kameda Seika Co., Ltd.)

【背景・目的】現代の日本においてメタボリックシンドロームは重大な健康問題である。これを解消する新たな手法として乳酸菌死菌体や乳酸菌産生物質を直接食品として摂取し、腸管を介して生体調節機能を発揮するバイオジェニックスが挙げられる。我々は玄米から分離した *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 327(以下 c327)、酒粕から分離した *Lactobacillus paracasei* K71(以下 K71)をバイオジェニックスとして摂取した際に脂質代謝に影響を及ぼすかどうかについて検討を行った。
【方法①】5 週齢の雄性 C57BL/6J マウスと *ob/ob* マウス(遺伝子変異による肥満モデル)を用いた。AIN-93G を与えた C57BL/6J マウス(WT-AIN 群)と *ob/ob* マウス(*ob*-AIN 群)、AIN-93G に c327 または K71 の加熱死菌体を添加した飼料を与えた *ob/ob* マウス(c327 群および K71 群)の 4 群(n=8)を設置、90 日間飼育を行った。実験終了日に採取した臓器の重量比較、および肝臓中セラミド代謝関連因子の mRNA 発現量解析を行った。
【方法②】5 週齢の雄性 SD ラットを用いた。AIN-93G を与えた AIN 群、 High Fat Diet(以下 HFD、肥満誘導餌)を与えた HFD 群、HFD の一部を K71 死菌体に置換した餌を与えた K71 群の 3 群(n=9～10)を設置し、現在 60 日間の飼育を行っている。実験終了日に血清及び臓器の採取を行う。血清はキットを用い血中脂質を解析する。臓器は重量の比較を行う。肝臓中の脂質代謝関連因子とセラミド代謝関連因子の mRNA およびタンパク質の発現量について解析を行う。また LC/MS で血清と肝臓中のセラミドの定性・定量を行う。
【結果①】*ob/ob* 群間において総摂食量と体重増加量に有意差は見られなかったが、精巣周囲脂肪重量(g/体重 1g)が *ob*-AIN 群に対し K71 群において減少していた。また肝臓中でのセラミド合成を司る serine palmitoyl transferase-1、セラミド合成酵素 Ceramide synthase 2 及びセラミド分解酵素 Acid ceramidase の mRNA 発現量は *ob*-AIN 群に対し K71 群において有意に減少していた。今後 Ceramide synthase 1,4～6 についても解析を進める。また肝臓中脂質代謝関連因子の mRNA 発現量解析を行う。
【結果②】飼育 45 日目時点で HFD 群に対し K71 群で総摂食量に有意差は見られなかったが、体重増加量の減少傾向が見られた。飼育終了後は結果①で変動が確認された因子を中心に解析を進める。
遺伝的要因肥満モデルマウス ob/ob マウスと食事誘導性肥満モデルの SD ラットを用いることにより、乳酸菌死菌体摂取が遺伝性肥満と食事誘導性肥満にどのように影響を及ぼすのか明らかにしていく。

Lipid metabolism, Ceramide, Lactobacillus

講演番号：1B1p15
講演日時：3 月 24 日 16:44～ 1 号館 B1 会場

Lactobacillus plantarum PIC-NBN22 とフラクトオリゴ糖含有食品における体脂肪および腸内フローラに及ぼす影響

Effect on the Changing of Body Fat and Intestinal Flora by Intaking Foods Containing *Lactobacillus plantarum* PIC-NBN22 and Fructo-oligosaccharide

○矢島 冬紗子、中西 愛美、信田 友理子 ((株)ピックルスコーポレーション)
○Fusako YAJIMA, Narumi NAKANISHI, Yuriko NOBUTA (PICKLES corporation)

【背景と目的】近年、腸内細菌が生産する代謝物が宿主の健康や疾病に関連があることが明らかとなり、腸内細菌叢の改善が生活習慣病の予防・改善に有効であることが示唆されている。中でも、健康の維持・増進をもたらす生きた微生物はプロバイオティクスと呼ばれ、注目されている。そこで本研究では、高い胃酸耐性能をもつとして漬物から単離された *Lactobacillus plantarum* PIC-NBN22 (Pne-12) とフラクトオリゴ糖(1.5 g/日)の混合粉末摂取による体脂肪低減作用効果と整腸作用効果をヒト試験にて検証した。

【実験方法】

[A.体脂肪低減作用] BMI が 23 以上 30 未満に該当する 35 歳以上 65 歳未満の男女計 60 例を対象として、Pne-12 粉末(生菌)とフラクトオリゴ糖を配合した粉末 3 g の被験食あるいはプラセボ食を摂取する 2 群に割り付ける無作為化二重盲検二群並行群間比較試験を実施した。12 週間摂取前後に、体脂肪面積(CT スキャン:全体脂肪、皮下脂肪、内臓脂肪)、体組成(体重、BMI、体脂肪率)、腹囲を測定した。

[B.整腸作用] 排便回数が 3～5 回/週程度の 20 歳以上 65 歳未満の男女計 30 例を対象として、Pne-12 粉末(生菌)とフラクトオリゴ糖を配合した粉末 3 g の被験食あるいはプラセボ食を 2 週間摂取させる無作為化二重盲検クロスオーバー試験を実施した。各試験食摂取前後に、腸内フローラ、排便回数・排便量・便性状を測定した。

なお、両試験において、被験者には同意を得たうえで、倫理的配慮の下試験を実施した。

【結果と考察】

[A] 肥満症の被験者を除き、被験食の 12 週摂取で、プラセボ食摂取と比較し、皮下脂肪量、体重、BMI の有意な減少が確認された($p<0.05$)。また、総コレステロール値が高めの被験者においては、被験食摂取において、プラセボ食摂取と比較し、4 週、8 週、12 週で有意な減少が確認された ($p<0.05$)。

[B]被験食摂取により、Bifidobacterium 属の増加傾向、プラセボ食摂取と比較して F/B 比の減少傾向が確認された。また、排便回数が週 5 回以下の便秘傾向者において、非摂取期と比較して、排便回数の有意な増加が確認された($p<0.05$)。

[A],[B] 2 つの臨床試験結果を総括すると、Pne-12+フラクトオリゴ糖の摂取により、腸内細菌叢が改善されることで体脂肪量が減少する可能性が示唆された。現在、作用機序に関して検討を行っている。

lactic acid bacteria, intestinal flora, total body fat

講演番号：1B2a01
講演日時：3 月 24 日 09:00～ 1 号館 B2 会場

キクイモオリゴ糖のプレバイオティクスとしての効果

Effect of oligosaccharide from Jerusalem artichoke as prebiotics

○森田 朗[1]、原 崇[2]、城 斗志夫[2] ([1]新潟大院自然科学、[2]新潟大農)
○ Akira Morita[1], Takashi Hara[2], Toshio Joh[2] ([1]Grad.Sch.Sci.Technol.,Niigata Univ., [2]Fac.Agric.,Niigata Univ.)

【目的】

キク科ヒマワリ属の多年草であるキクイモ（*Helianthus tuberosus*）は、塊茎中に水溶性食物繊維であるイヌリンを 13-20%と豊富に含む。イヌリンは、スクロースのフルクトース残基にフルクトースがβ-2,1 結合で 1～50 個直鎖状につながった構造をしており、収穫直後のキクイモに豊富な高分子イヌリンが貯蔵中次第に低分子化することから、分解を防ぐ貯蔵法の研究が行われてきた。イヌリンには水溶性食物繊維としての整腸作用の他に、プレバイオティクスとしての働きが期待されている。プレバイオティクスとしては低分子のオリゴ糖の方が好ましいと推測されるが、イヌリンの分子量とプレバイオティクスの効果の関係は明らかにされていない。そこで本研究では、貯蔵温度がキクイモのイヌリンの分子量に及ぼす影響を明らかにするとともに、その高分子イヌリンと低分子イヌリンが乳酸菌やビフィズス菌の生育に及ぼす影響を調べた。

【方法】

11 月に収穫したキクイモを 5℃、20℃、70℃で貯蔵した。凍結乾燥したキクイモに脱塩水を加え、60℃で振とうすることによりイヌリンを抽出し、得られたイヌリンは Bio-Gel P-2（分画分子量 100-1,800)によるゲルろ過クロマトグラフィーで分離後、各溶出画分の糖をフェノール硫酸法で測定し、その分子量分布を調べた。また、ゲルろ過クロマトグラフィーによりイヌリンを高分子量画分と低分子量画分に分け、乳酸菌８株とビフィズス菌３株に対するプレバイオティクス効果を調べた。プレバイオティクス試験では、各菌をグルコースの代わりに高分子または低分子イヌリンを添加したＭＲＳ液体培地等に接種後、菌の増殖を 600nm の吸光度を測定し比較した。

【結果】

貯蔵温度がキクイモのイヌリンの分解に及ぼす影響を調べた。20℃では 5℃に比べ 3 ヶ月の貯蔵で低分子領域が大きく増加した。しかし、いずれの温度でも 3 カ月間の貯蔵でイヌリンは単糖まで分解されることはなく二糖もしくは三糖までしか分解されなかった。しかし、60℃以上で単糖まで分解された。また、プレバイオティクス効果を調べた結果、乳酸菌やビフィズス菌は高分子より低分子イヌリンを効率よく資化し、乳酸菌の中には低分子イヌリンしか資化しないものもあった。このようにプレバイオティクスとしての機能は低分子イヌリンで高かった。現在キクイモイヌリンを効率よく低分子化する方法を検討している。

inulin, Jerusalem artichoke, prebiotics

講演番号：1B2a02
講演日時：3 月 24 日 09:11～ 1 号館 B2 会場

Mycobacterium obuense によるキクイモ由来イヌリンからのイヌロビオースの選択的生産
Selective production of inulobiose from *Helianthus tuberosus* inulin by *Mycobacterium obuense*
○曽根 涼平、川島 恭幸、滝口 泰之（千葉工大工）
○Ryohei SONE, Yasuyuki KAWASHIMA, Yasuyuki TAKIGUCHI (Chiba Institute of Technology)

[背景及び目的]
スクロースの過剰摂取による生活習慣病として糖尿病が注目されており、高甘味度で低カロリーの甘味料が求められている。キクイモ(*Helianthus tuberosus*)はキク科に属す多年草であり、貯蔵栄養としてデンプンの代わりに、フルクトースがβ-(2→1)結合した多糖であるイヌリンを高濃度に含有している。また、イヌロオリゴ糖は低エネルギー甘味料として注目されており、イヌロビオースはスクロースより甘味度が強いとされている。本研究の目的は、微生物が持つ酵素を利用してキクイモに含まれるイヌリンを部分加水分解する事でイヌロビオースの効率的な製造方法を検討する。
[方法]
土壌サンプルを回収し希薄な水溶液とする事で選択培地(1 %イヌリン培地,0.1 %イヌリン培地)に塗布し室温・暗所で培養した。培養後のコロニーを観察し、色や大きさの異なるコロニーを単離するために画線培養を複数回繰り返した。イヌリン分析は、フェノール硫酸法(全糖量)及び Somogyi-Nelson 法(還元糖量)に基づき平均重合度を計算により確認した。今回、単離した 2 種の細菌と一昨年に単離した真菌類を振盪培養による糖濃度の変化を TLC と HPLC で検討した。イヌリン塩酸加水分解物を TLC において、2-プロパノール:1-ブタノール:純水=12:3:4 で展開し、ナフトレゾルシノール硫酸を噴霧し加熱する事で呈色させた。また、HPLC は Shodex Asahipak NH2P-50 4E(4.6 mmI.D.×250 mm), 60 %or75 %アセトニトリル, 1000 μL/min, RI-930(示差屈折率検出器), 30℃の測定条件で解析した。
[結論及び考察]
千葉県習志野市藤崎で回収した土壌サンプルより 0.1 %イヌリン培地を使用する事で、クリーム色のコロニーを形成する 1A1 株,赤橙色のコロニーを形成する 1A2 株も単離した。24 時間の平均重合度変化において、1A2 株のイヌリン分解能は 1A1 株より高かった。1A2 株はイヌリン分解菌 *Nectria mauritiicola* と比較して、より低分子の糖と思われるピークが得られ、培養温度 30℃で 48 時間, 35℃で 24 時間の時点でイヌロビオースと思われるピークが大きく見られた。HPLC の溶離液に用いたアセトニトリルの比率は 60 %よりも 75 %の方が高分離能であった。低分子の糖を生産すると考えられる 1A2 株は 16SrRNA 遺伝子の解析により、*Mycobacterium obuense* と高い相同性を示した。1A2 株より産生する酵素の精製及び活性測定と最適条件については現在検討中である。

inulin, inulobiose, oligosaccharide

講演番号：1B2a03
講演日時：3 月 24 日 09:22～ 1 号館 B2 会場

能登栗の低温貯蔵による遊離糖組成の変化
Change in free sugar composition of “Noto” chestnuts by cold storage
○齋藤 泰宏、本多 裕司（石川県大・生資環）
○Yasuhiro Saito, Yuji Honda (ISPU)

【緒論】石川県で栽培される栗の収穫量は 121 t（平成 29 年度）であり、そのほとんどが能登地方で栽培されている。能登地方で栽培される栗は「能登栗」と呼ばれており、「丹沢」、「筑波」、および「石鎚」という品種が主に栽培されている。その他、「利平」や「国見」といった品種も栽培されている。

一般的に栗は菓子や料理の材料として使われるが、その調理法は茹でたり蒸したりすることが多い。一方、栗は焼き芋のように焼き栗として調理することも可能であり、「ホクホク」とした食感が味わえるとともに、素材そのものの甘みを感じることができると言われている。

しかし、焼き栗は見た目が大切であり、外皮が傷ついたものや形の悪いものは焼き栗として販売することができない。規格外品は焼き栗として販売することができないため、規格外品の新しい利用法が生産者の間で求められていた。規格外品の風味（甘みや食感）が焼き栗の正規品と同等であるならば、規格外品の利用法を新たに提案することが可能となる。

我々は、石川県輪島市で収穫された能登栗の風味に関係する成分として、遊離糖の組成と澱粉の性質に注目した。本研究では、能登栗の主要品種（丹沢、筑波、石鎚）に含まれる上記の成分を分析することで、能登栗の風味を比較検討することを目的とした。

【方法及び結果】2018 年 9 月に輪島市で収穫された丹沢、筑波および 10 月に収穫された石鎚を実験試料として使用した。栗に含まれている遊離糖成分を分析するために、栗を剥皮して破砕した試料を 80%エタノールで 20 時間振とうし、遊離糖を抽出した。得られた糖抽出液を高速液体クロマトグラフィー（カラム：Shodex AsahiPak NH2P-50 4E）を用いて分析した。また、栗に含まれる澱粉の糊化温度の差異を検討するために、スライスした栗を凍結乾燥した後に、ミルサーで細かく破砕した試料を調製した。得られた栗粉中の澱粉の糊化に関する情報を得るために、示差走査型熱量計（Seturum MicroDSC Ⅲ）を用いて栗粉を分析した。

収穫直後の試料に含まれる遊離糖の組成（フルクトース、グルコース、スクロース、およびマルトース）を比較してみると、すべての品種においてスクロースが 90%以上を占めていた。丹沢と石鎚はフルクトース、グルコース、およびマルトースが 1%程度であったが、筑波は 2～5%の含量であった。また、正規品および規格外品の上記の遊離糖含量は比較してみると、ほぼ同様の傾向であった。

現在、低温貯蔵した後の遊離糖含量、および示差走査熱量計による栗粉の分析をすることで、能登栗の風味に関する評価を検討しているところである。

chestnuts, sugar, cold storage

発表責任者：本多裕司（honda@ishikawa-pu.ac.jp）

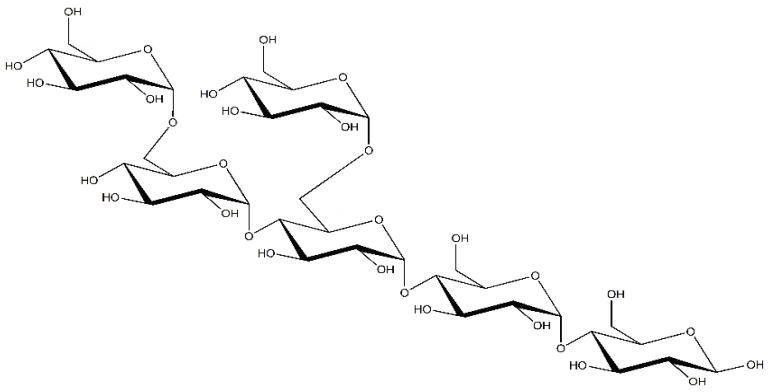
講演番号：1B2a04
講演日時：3 月 24 日 09:33～ 1 号館 B2 会場

清酒に含まれるオリゴ糖の構造に関する研究
Structural analysis of oligosaccharides in sake

○本田 千尋[1]、勝田 亮[1]、岡田 奈菜子[2]、馬宮 綾音[2]、河村 卓也[2]、山田 真理子[1]、小林 泉美[1]、戸塚 昭[3]、進藤 斉[1]、穂坂 賢[1]、徳岡 昌文[1] ([1]東農大院農、[2]東農大応生、[3]感性科学研究所)
○Chihiro HONDA[1], Ryo KATSUTA[1], Nanako OKADA[2], Ayane MAMIYA[2], Takuya KAWAMURA[2], Mariko YAMADA[1], Izumi KOBAYASHI[1], Akira TOTSUKA[3], Hitoshi SHINDO[1], Masaru HOSAKA[1], Masafumi TOKUOKA[1] ([1]Grad. Sch. Agric., Tokyo Univ. of Agric., [2]Fac. Appl. Biosci. Tokyo Univ. of Agric., [3]Research institute of KANSEI science)

【目的】
清酒中には、糖類としてグルコースの他に 2 糖以上のオリゴ糖が約 1~2%含まれることが知られており、味の調和に寄与すると考えられている。これまでに我々は清酒には少なくとも重合度 18 までのオリゴ糖が含まれ、それらはβ-アミラーゼにより消化されない構造であることを明らかにしており、これらを清酒オリゴ糖として研究を進めている [1)]。本研究では清酒オリゴ糖の構造的な特徴を明らかにすることを目的に研究を行った。

【結果及び考察】
構造異性体分離が可能なカラムを用いて清酒オリゴ糖を分析したところ、DP4,6 では 2 本、DP5,7,8,では 3 本、DP9~12 では 4 本以上のピークが検出された。また、精製した重合度 6~8 の清酒オリゴ糖について、それぞれグルコアミラーゼ消化前後でのクロマトグラムの変化を調べたところ、ピークによりグルコアミラーゼ消化の影響が異なることが分かった。これら結果から、清酒オリゴ糖には、同じ重合度でも、グルコース単位の結合様式が異なる、構造異性体が含まれることが示唆された。市販酒について調べたところ、製品により、含まれるオリゴ糖構造異性体の種類は同じだが、含有量が異なることが示された。そこで、市販清酒に共通して含まれ、グルコアミラーゼで消化されにくいことを特徴とする重合度 6 のオリゴ糖構造異性体について、活性炭処理及び液体クロマトグラフィーによる分取を行った結果、25mg を精製することができた。NMR 解析の結果、還元末端側から 3 番目と 4 番目のグルコース単位それぞれにα-1,6 結合でグルコースが結合した構造であることが明らかとなった。



【参考文献】
1) Tokuoka, M., Honda, C., Totsuka, A., Shindo, H., Hosaka, M. : *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **124**, 171-177, (2017)

sake, oligosaccharide, structural isomer

講演番号：1B2a05
講演日時：3 月 24 日 09:44～ 1 号館 B2 会場

糖転移により生成する清酒中新規化合物の構造解析
Structural analysis of novel transglycosylation products in sake
○小島 悠輔[1]、松村 聡美[2]、勝田 亮[1]、小林 泉美[1]、本田 千尋[1]、我妻 いずみ[1]、徳岡 昌文[1]、進藤 斉[1]、穂坂 賢[1] ([1]東農大院農、[2]東農大応生)
○Yusuke KOJIMA[1], Satomi MATSUMURA[2], Ryo KATSUTA[1], Izumi KOBAYASHI[1], Chihiro HONDA[1], Izumi WAGATSUMA[1], Masafumi TOKUOKA[1], Hitoshi SHINDO[1], Masaru HOSAKA[1] ([1]Grad. Sch. Agric., Tokyo Univ. of Agric., [2]Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. of Agric.)

【背景・目的】α-エチルグルコシド（α-EG）は清酒中に 0.24～0.71%含まれており、麹由来のα-グルコシダーゼによる糖転移で生成する配糖体である。α-EG は即効性の甘味、遅効性の温和な苦味を呈する呈味物質で、保湿作用など様々な生理活性を持つことから化粧品に用いられている。当研究室において、α-グルコシダーゼ遺伝子の 1 つである *agdA* の破壊株で製麹及び小仕込試験を行い、製成酒を HPLC により分析したところ、α-EG に加え、複数の化合物のピーク強度が減少することを見出した。本研究では、これら化合物の中の、精密質量がα-EG とグルコース 1 分子の脱水縮合物と一致する化合物について、糖転移により生成する清酒中の新規化合物と予想し、同定を行った。
【方法・結果】清酒からの精製は夾雑物が多く困難であったことから、*in vitro* でのα-グルコシダーゼの糖転移作用による目的化合物の酵素合成を試みた。AgdA 高生産麹菌株を YPM 培地で 30℃、6 日間振とう培養し、その培養液を限外濾過することで粗精製 AgdA を得た。次に、酢酸緩衝液 10mM（pH5.0）に基質としてエタノールとマルトースをそれぞれ終濃度 40%（v/v）、5%（w/v）となるように添加し、粗精製 AgdA を 0.18 unit/ml 加え、37℃で 2 日間インキュベートしたところ、グルコース、α-EG 及びイソマルトース等に加えて、目的とする化合物と HPLC における溶出時間が一致する化合物を得た。副生成物のグルコースは清酒酵母によって除去し、エバポレーターで濃縮後、HPLC により本化合物を分取することで精製物 139mg を得た。NMR により構造解析を行ったところ、α-EG のグルコシル残基における C4 または C6 にα-D-glucose が脱水縮合した Ethyl α-maltoside 及び Ethyl α-isomaltoside であることが分かった。これらの化合物はα-グルコシダーゼにより生成することから、本化合物は清酒醪中において AgdA によるα-EG への糖転移で生成すると考えられる。市販清酒 124 点を分析したところ、Ethyl α-maltoside、Ethyl α-isomaltoside はそれぞれ 114 点、119 点で検出され、平均値は 143ppm、431ppm、最大値は 269ppm、1497ppm であり、これら化合物は一般的な清酒成分であることが示された。

sake, α-EG, α-glucosidase

講演番号：1B2a06
講演日時：3 月 24 日 10:05～ 1 号館 B2 会場

コシヒカリに由来する良食味遺伝子座が及ぼす精白米に含まれる低分子量化合物への影響について
Effect of Good Eating Quality Gene Loci of Koshihikari on the Composition of Low Molecular Weight Compounds of Polished Rice

○辻井 良政[1]、木村 圭一[1]、米澤 加代[1]、齋藤 彰宏[1]、堀 清純[2]、高野 克己[1]([1]東京農大応生・農化、[2]農研機構作物開発センター)
○Yoshimasa TSUJII[1], Keiichi KIMURA[1], Kayo YONEZAWA[1], Akihiro SAITO[1], Kiyosumi HORI[2], Katsumi TAKANO[1] ([1]Dept. Agr. Chem, Tokyo Univ. of Agric., [2]1Institute of Crop Science, NARO)

【目的】日本のイネの育種において、米飯の食味は重要な選抜対象形質であり、QTL（量的形質遺伝子座）解析が進められ、コシヒカリの良食味に関する QTL が第 3 染色体短腕上に検出されている。しかし、コシヒカリの良食味遺伝子座による理化学的な米飯特性については、いまだ解明されていない点が多い。そこで本研究では、コシヒカリと日本晴の交雑体を用いて米飯食味に関わる低分子量化合物について解析することにより、コシヒカリの良食味遺伝子座が米飯食味に与える影響について検討した。
【方法】コシヒカリの良食味に関する QTL 領域をコシヒカリ型に固定した日本晴の遺伝的背景の置換系統（NSL）および日本晴型に固定したコシヒカリの遺伝的背景の置換系統（KSL）の精白米を試料とした。コントロールとして同一圃場で栽培、収穫されたコシヒカリおよび日本晴を用いた。米飯食味に関わる物質を網羅的に解析するため、GC-MS を用いた多成分分析を行った。33%メタノールにて低分子量化合物を抽出し、濃縮乾固後の残渣にメトキシアミン塩酸塩を 10mg/ml の濃度で脱水ピリジンに溶解させた溶液を加え反応後、MSTFA を加えて誘導体化させた。GC-MS（アジレント・テクノロジー社製 GC 7890B、MS 5977A）に供した。データの解析は、Metalign(Lommen, 2009)にてクロマトグラムと MS スペクトルのアライメント処理を行い、AIoutput2(Hiroshi Tsugawa, RIKEN)を用いて 561 化合物ライブラリー（GL サイエンス社）と照合した。定性された化合物を変数とし、ヒートマップ図は MetaboAnalyst を使用してユークリッド距離とウォード法を用いてクラスタリングしヒートマップ表示した。主成分分析は、Pirouette(GL サイエンス社)を用いた。データスケールはオートスケールを使用した。
【結果】精白米の比較では、ヒートマップ解析の階層クラスタリングにより、コシヒカリと KSL、日本晴と NSL が異なるクラスターとなった。コシヒカリは日本晴に比べて含有化合物量が全体的に多かった。アラントイン、トリプトファン、ラフィノース、アスパラギンおよびスクロースで、コシヒカリに比べて KSL では含有化合物量は減少する傾向であった。また、日本晴に比べて NSL ではこれらの含有化合物量が増加傾向であり、交雑体で変化がみられた。主成分分析の結果、第一主成分（Factor1）の寄与率は 61.5%、第二主成分（Factor2）の寄与率は 14.7%であった。スコアプロットを確認すると Factor1,2 ともにコシヒカリと日本晴とで分離していた。KSL は、Factor1 ではコシヒカリと同域に分布していたが、Factor2 ではコシヒカリと日本晴の間に分布した。交雑体は Foctor1 上ではベースの品種と同様な分布となったが、Factor２上では置換した品種の分布に近づいていた。

RICE, KOSHIHIKARI, low molecular weight compounds

発表責任者：辻井良政（96tsujii@nodai.ac.jp）

講演番号：1B2a07
講演日時：3 月 24 日 10:16～ 1 号館 B2 会場

窒素施肥がイネ種子のデンプン組成に与える影響

Effects of Nitrogen Fertilizer on Starch Composition of Rice Seed

○酒井 孝一朗[1]、黒田 昌治[2]、緑川 景子[1]、阿部 啓子[1,3]、朝倉 富子[1] ([1]東大院農生科・応生化、[2]農研機構・中央農研、[3]神奈川科学技術アカデミー)
○ Koichiro SAKAI[1], Masaharu KURODA[2], Keiko MIDORIKAWA[1], Keiko ABE[1,3], Tomiko ASAKURA[1] ([1]the Univ. of Tokyo, [2]NARO Central Region Agricultural Research Center, [3]KISTEC)

コメの収量増加の方法の一つに出穂時期以降の窒素追肥があるが、これは収量を増加させる一方で、コメが硬くパサパサとした食感になることが知られている。その原因の一つとして米粒中の貯蔵タンパク質の増加がこれまでに指摘されてきたが、我々の先行研究において、追肥の影響として細胞壁などの多糖類合成に関わる遺伝子群の発現が低下することを新たに見出した。実際、完熟種子胚乳のβ－グルカン量は、追肥群で対照群と比べて有意に減少しており、炭素骨格が多糖類よりもタンパク質の方に割り振られることが示唆された。ここで、細胞壁以外の多糖類、特にデンプンはコメの食感に関与することが予測されることから、デンプンの変化に着目した。

[方法] 日本晴をインキュベーター内で栽培して実験材料とした。出穂開花した時点で追肥群のみに塩化アンモニウムを土面散布し、開花後 15 日目の登熟途上の種子と、完熟種子を採取した。開花後 15 日目の種子から RNA を抽出し、DNA マイクロアレイに供した。また、完熟種子を用いて、EnzyChrom Starch Assay Kit (BioAssay Systems)による可溶性/不溶性デンプン量の測定と、Amylose/Amylopectin Kit(Megazyme)、中村澄子らの論文(Sumiko Nakamura et al., 2014)の手法によるアミロース/アミロペクチンの割合、アミロペクチンの鎖長の測定を行った。

[結果] デンプンに関係する遺伝子群では、β-amylase 3 および 5、α-amylase 3E の発現が追肥群で上昇しており、デンプンの分解が起きている可能性が示された。

そこで更にデンプンの組成を細かく調べた結果、追肥群の完熟種子は対照群に対して不溶性デンプン量が減少したのに対して可溶性デンプン量が増加することがわかった。また、完熟種子内のアミロース/アミロペクチンの割合は対照群と追肥群で有意差が見られなかったが、アミロペクチンの鎖長に関しては、追肥群の方が有意に長鎖長の割合が減少し、短鎖長の割合が増加するという結果が得られた。以上より、追肥で誘導された β-amylase 3 および 5、α-amylase 3E によってアミロペクチンが分解されて、コメの粘りの減少に影響を与える可能性が示された。

rice, starch, degradation

講演番号：1B2a08
講演日時：3 月 24 日 10:27～ 1 号館 B2 会場

アルギン酸含有量、ウロン酸組成、タンパク質含有量のコンブ部位の比較
Kelp site comparison of alginate content, uronic acid composition, and protein content

○平賀 捷悟[1]、石島 大義[1]、垣田 浩孝[1]、関 憧平[2]、四ツ倉 典滋[3] ([1]日大文理、[2]北大院環境科学院、[3]北方生物圏フィールド科学センター)
○ Shogo HIRAGA[1], Haruyoshi ISHIJIMA[1], Hirotaka KAKITA[1], Shohei SEKI[2], Norisige YOTSUKURA[3] ([1]College of Humanities and Science,Nihon Univ., [2]Graduate School of Environmental Science,Hokkaido Univ., [3]Field Science Center for Northern Biosphere)

【諸言】アルギン酸はコンブ属やワカメ属等の褐藻類の細胞壁間酸性多糖で食品添加剤や歯科印象剤として広く工業的に利用されている。アルギン酸はβ－Ｄ－マンヌロン酸（以下Ｍと略）とα－Ｌ－グルロン酸（以下Ｇと略）の２種類のウロン酸が１，４結合で重合した直鎖状ポリマーで、２価金属イオンと接してゲルを生成する。これはグルロン酸が金属イオンと架橋を作るためであり、Ｍ／Ｇ比の低いアルギン酸（Ｇが多いアルギン酸）ほどゲルを形成しやすい。アルギン酸ゲルの物性はＭとＧの組成比（Ｍ／Ｇ比）に影響される。Ｍ／Ｇ比の低い（Ｍ／Ｇ＜１）アルギン酸は硬く比較的もろいアルギン酸ゲルをつくるため医薬用包埋剤等に使用され、一方、Ｍ／Ｇ比の高い（Ｍ／Ｇ＞１）アルギン酸は柔らかくしなやかなアルギン酸ゲルをつくるため歯科印象剤等に使用されている。つまり用途に適したＭ／Ｇ比のアルギン酸を得る技術は産業的に非常に有用であるが、いまだその技術は達成されていない。アルギン酸の生合成経路や関連する酵素に関しては微生物では詳細まで解明されているが、海藻では不明な点が多い。そこで本研究ではコンブの付着器から先端部分までの断片中のアルギン酸含有量、Ｍ／Ｇ比、タンパク質含有量を明らかにすることを目的とした。【材料・方法】北海道厚岸で採取した褐藻類大型海藻ナガコンブを用いた。ナガコンブを先端から付着器にかけて１ｍ間隔で切断し断片を得た。コンブ断片を洗浄後、アルカリ溶液中で振とうし、アルギン酸ナトリウムとして粗アルギン酸を回収した。粗アルギン酸をエタノールで再沈殿して精製アルギン酸を得た。精製アルギン酸を濃硫酸で加水分解後、中和してアルギン酸加水分解物を得た。加水分解物中のウロン酸組成はＷｈａｔｍａｎ　Ｐａｒｔｉｓｉｌ　１０ＳＡＸを用いたＨＰＬＣによって測定した。ウロン酸はトリエチルアミン添加によりラクトン環を開環させた状態でＨＰＬＣを行った。【結果・考察】生育２年目のナガコンブにおいてアルギン酸含有率は付着器近傍から先端部分までに２度減少する箇所が検出された。生育２年目のナガコンブにおいてＭ／Ｇ比は付着器近傍と先端部位を比較すると、先端部分の方がＭ／Ｇが低かった。ただし付着器近傍から先端部分にかけて切片中のＭ／Ｇ比は単調減少ではなかった。このことからさらに詳細を調べるべく、生育１年目、１，５年目、２年目のナガコンブについて切片中のアルギン酸含有量、Ｍ／Ｇ比、タンパク質含有量等を現在調査している。

Seaweed, Alginic acid, Uronic acid

発表責任者：垣田浩孝（Kakita.hirotaka@nihon-u.ac.jp）

講演番号：1B2a09
講演日時：3 月 24 日 10:38～ 1 号館 B2 会場

魚の加熱調理が機能性成分量に与える変化とマウスの健康へ与える影響

Influence of fish heat cooking on functional ingredient content and on health of mice.

○坂之井 悠人、都築 毅（東北大院・農）
○YUTO SAKANOI, TSUYOSHI TSUDUKI (Grad. Sch. of. Agri. Sci., Tohoku Univ.)

【目的】日本食には多種多様な食材が用いられ、多くの機能性成分が含まれている［1]。しかし、これらの機能性成分は調理により損失することが知られており、そのため調理による機能性成分量の変化に関して、多くの研究がなされている。しかし、これらの研究のほとんどは調理による機能性成分の変化を分析するのみであり、実際に摂食した際の機能性成分の体内濃度や生理機能の変化を検討している研究はほとんどない。我々は、魚に含まれる機能性成分として知られるエイコサペンタエン酸（EPA）やドコサヘキサエン酸（DHA）に着目して、研究を行うこととした。EPA や DHA は日本食でよく用いられるイワシに豊富に含まれる。イワシは、刺身として生で食べられたり、焼く、茹でる、揚げるなどの加熱調理後に食べられたりする。そこで本研究では、イワシの加熱調理による EPA や DHA 含量および摂取時の生体内濃度の変化を中心に検討し、魚を摂取する際にはどのような調理法が有効成分の生体内濃度の損失を朝得ることができるのかを明らかにすることを目的とした。
【方法】イワシを①焼く、②茹でる、③揚げる調理を行った後、生のものと共に凍結乾燥・粉砕し、均一化した。調理条件は①片面を中火で 4 分間焼き裏返して 3 分間焼く、②試料重量の 10 倍量の水を沸騰させ 8 分間茹でる、③900ml の油を 180℃に熱し 2 分間揚げるとした。5 週齢雄性の C57BL/6J マウスを 5 群に分け、通常飼育食、生イワシ食、焼きイワシ食、茹でイワシ食および揚げイワシ食で 1 週間もしくは 4 週間飼育した。生イワシ食では通常飼育食に生のイワシの凍結乾燥物を 15%添加したものとし、各調理イワシ食は生イワシ食と同量のイワシを調理および凍結乾燥したものを添加した。飼育期間終了後、血清や各種臓器を採取し各種分析に供した。
【結果】生のイワシ 100g を調理した後の EPA 含量（mg）は生、焼く、茹でるおよび揚げる処理でそれぞれ 1854±60、1303±58、1243±61、231±29 となり、DHA 含量（mg）はそれぞれ 1066±54、727±34、687±32、164±14 となった。一方で各調理イワシ食を 4 週間与えたマウスの肝臓 1g あたりの EPA 含量（mg）は通常飼育食群、生イワシ食群、焼きイワシ食群、茹でイワシ食群および揚げイワシ食群でそれぞれ 0.40±0.06、0.97±0.05、1.02±0.05、1.11±0.08、0.64±0.03 となり、DHA 含量（mg）は 2.23±0.08、2.96±0.01、2.79±0.06、2.81±0.10、2.16±0.08 となった。以上のことより、焼くおよび茹でるは、魚を摂取する際において有効成分の生体内濃度減少を防ぐことができる調理法であることが明らかとなった。

[1] Y. Iwagaki, T. Tsuduki, et al., Mol. Nutr. Food Res. 2017

EPA, DHA, Cooking

講演番号：1B2a10
講演日時：3 月 24 日 10:49～ 1 号館 B2 会場

質量分析を用いた油脂初期酸化の新規評価法

Determination of oil oxidation mechanisms using LC-MS/MS

○加藤 俊治[1,2]、伊藤 隼哉[1]、境野 眞善[3]、佐野 貴士[3]、永塚 貴弘[1]、宮澤 陽夫[4,5]、仲川 清隆[1] ([1]東北大院農・機能分子解析、[2]東海大医・基礎医学・生体防御、[3]（株）J-オイルミルズ・ 技術戦略センター、[4]東北大院農・食の健康科学ユニット、[5]東北大・未来科学技術共同研究センター)

○Shunji KATO[1,2], Junya ITO[1], Masayoshi SAKAINO[3], Takashi SANO[3], Takahiro EITSUKA[1], Teruo MIYAZAWA[4,5], Kiyotaka NAKAGAWA[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Tokai Univ., [3]Innovation Development Section, J-OIL MILLS, INC., [4]Tohoku Univ. Food Health Sci. Res. Unit, [5]Tohoku Univ. NICHe)

【背景】油脂の酸化は、様々な原因（熱や光など）により進行し、酸化臭の発生や味の劣化をもたらす。そのため、食品の製造・保存過程における油脂の初期酸化の抑制とその酸化原因を知ることは、その後の品質維持に極めて重要である。現在、油脂酸化の評価法には様々な方法があるが、とくに初期酸化の指標として過酸化物価（POV）が広く用いられている。しかし、POV は感度が低く、さらに油脂の酸化原因を特定できないという問題点がある。ところで、脂質過酸化物（LOOH）には様々な異性体が存在し（-OOH 位置異性、cis-trans 異性）、その異性体構造は酸化原因に依存する。すなわち、油脂に含まれている LOOH の異性体構造を解析できれば、油脂の酸化原因を特定できると考えた。これまで我々は質量分析を用いた LOOH 異性体解析法を開発し、様々な脂質クラス（リン脂質、脂肪酸、コレステロールエステル）の異性体解析を可能にしてきた。そこで本研究では、本手法をトリアシルグリセロール（TG）の酸化物（トリアシルグリセロールヒドロペルオキシド（TGOOH））解析へと応用し、油脂の酸化原因を明らかにすることを目的とした[1)]。

【方法・結果】菜種油をサンプルとし、Q1MS スキャンとプロダクトイオン MS スキャンを用いて油脂に含まれる TG 分子種を特定した。その中でも主要な TG（ジオレオイル-リノレオイルグリセロール（OOL））を測定対象とした。OOL-OOH 異性体標品はリノール酸ヒドロペルオキシドとジオレオイルグリセロールをエステル化させ調製した。LC-MS/MS 法では OOL-OOH のプレカーサーイオンに Na^+付加体を用いることで、OOL-OOH 異性体の特異的な定量が可能になった。最後に、開封直後の菜種油を分析したところ、開封直後にもかかわらず OOL-OOH が検出され、また、異性体解析の結果から光によって酸化している可能性が示唆された。

これらの手法は菜種油のみならず、様々な油脂の酸化解析に応用できることを確認しており、特に「Na^+を用いた質量分析法」はオレイン酸～ドコサヘキサエン酸（DHA）などの様々な脂肪酸を有する TG の酸化物を解析できる。本法は油脂がどのような過程で酸化されたのかをおおよそ推定できる方法であり、油脂の酸化抑制の検討（抗酸化剤や容器の検討など）に役立つと期待される。

1) S. Kato et al., *npj Science of Food*, **2** (2018)

Mass spectrometry, Lipid oxidation, Triacylglycerol

発表責任者：仲川清隆（nkgw@m.tohoku.ac.jp）

講演番号：1B2a11
講演日時：3 月 24 日 11:10～ 1 号館 B2 会場

LC-MS/MS を用いたオリーブ油の酸化メカニズム推定
LC-MS/MS evaluation of olive oil oxidation mechanisms
○高橋 隼登[1]、加藤 俊治[1,2]、伊藤 隼哉[1]、境野 眞喜[3]、佐野 貴士[3]、永塚 貴弘[1]、宮澤 陽夫[4,5]、仲川 清隆[1] ([1]東北大院農・機能分子解析、[2]東海大医・基礎医学・生体防御、[3]（株）J-オイル ミルズ・ 技術戦略センター、[4]東北大院農・食の健康科学ユニット、[5]東北大・ 未来科学技術共同研究センター)
○Hayato TAKAHASHI[1], Shunji KATO[1,2], Junya ITO[1], Masayoshi SAKAINO[3], Takashi SANO[3], Takahiro EITSUKA[1], Teruo MIYAZAWA[4,5], Kiyotaka NAKAGAWA[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Tokai Univ., [3]Innovation Development Section, J-OIL MILLS, INC., [4]Tohoku Univ. Food Health Sci. Res. Unit, [5]Tohoku Univ. NICHe)

【背景】オリーブ油は独特な風味や香りを持つ食用油脂である。しかし、製造および保存・調理過程において、色素成分（クロロフィル）による光（一重項酸素）酸化や、熱によるラジカル酸化を受けることで、風味を損なう可能性が懸念されている。従来技術では、いずれの酸化が進行しているかの見極めは難しかったが、近年我々は油脂の主成分（トリアシルグリセロール（TG)）の酸化一次生成物（トリアシルグリセロールヒドロペルオキシド（TGOOH)）を解析できる方法を開発し、油脂中での酸化の種類の見極めを試みてきた[1)]。本法は TGOOH の異性体構造の解析により、油脂の酸化の種類を推察できる方法である。そこで本研究では、本法をオリーブ油へ応用し、製造直後のオリーブ油（あるいは各種条件下で強制酸化させたもの）の TGOOH 異性体の解析を行い、オリーブ油が製造過程でどのような酸化を受けているのかを明らかにしようとした。

【方法・結果】オリーブ油の分析に先駆けて、オリーブ油の主要 TG 分子種（トリオレオイルグリセロール（OOO）とジオレオイル-リノレオイルグリセロール（OOL)）について、これらのヒドロペルオキシド異性体（OOO-OOH（OO-8-hydroperoxy octadecamonoenoyl（HpOME)、OO-9-HpOME、OO-10-HpOME、OO-11-HpOME）と OOL-OOH（OO-9-hydroperoxy octadecadienoyl（HpODE)、OO-10-HpODE、OO-12-HpODE、OO-13-HpODE）の位置および幾何異性体）を合成した。これら標品を我々の方法で分析し、それぞれを明瞭なピークとして検出でき、異性体レベルで解析できることを確認した。次いで、製造直後のオリーブ油を分析した結果、OOO-OOH の異性体組成比から、主に光（一重項酸素）酸化していると推定した。しかしながら、OOL-OOH の異性体組成比からは主に、熱（ラジカル）によって酸化されていると推定された。このことから脂肪酸ごとに受けやすい酸化の種類が異なっている可能性が示唆された。そこで、オリーブ油を光照射および加熱条件下で強制酸化させた実験を行った結果、脂肪酸ごとに受けやすい酸化の種類が異なることを裏付ける知見が得られつつある。こうした酸化メカニズムを明らかにすることで、オリーブ油のさらなる品質維持の向上につながると期待される。

1) S. Kato et al., *npj Science of Food*, **2** (2018)

Olive oil, Triacylglycerol, Lipid oxidation

発表責任者：仲川清隆（nkgw@m.tohoku.ac.jp）

講演番号：1B2a12
講演日時：3 月 24 日 11:21～ 1 号館 B2 会場

様々な分子種からなるランダムエステル交換油の酸化機構の評価
Evaluation of oxidation mechanisms in random transesterified oil composed of various molecular species

○飯田 彩未[1]、加藤 俊治[1,2]、泉井 亮太[3]、久保内 宏晶[3]、仲川 清隆[1]（[1]東北大院農・機能分子解析、[2]東海大医・基礎医学・生体防御、[3]雪印メグミルク）
○Ayami IIDA[1], Shunji KATO[1,2], Ryota WAKUI[3], Hiroaki KUBOUCHI[3], Kiyotaka NAKAGAWA[1]
([1]Tohoku Univ., [2]Tokai Univ., [3]MEGMILK SNOW BRAND Co.,Ltd.)

【背景】油脂の酸化は熱や光など様々な原因によって進行する。油脂の主成分であるトリアシルグリセロール（TG）は、酸化するとトリアシルグリセロールヒドロペルオキシド（TGOOH）となり、さらに酸化が進行すると、アルデヒド類やカルボニル化合物などの種々の有害物質が生成する。これらの酸化生成物は食品の褐変及び酸化臭の原因となり、食味の低下につながる。したがって食品の品質維持のためには、食品製造・保存過程における油脂の酸化原因を知り、初期酸化を抑制することが重要である。TGOOH には様々な異性体（-OOH 位置異性体、cis-trans 異性体）が存在し、その異性体構造は酸化原因に依存する。したがって、TGOOH の異性体構造を解析することにより、油脂の酸化原因を特定できると考えた。これまでに我々は、Na イオンを用いた質量分析法が脂質ヒドロペルオキシドの-OOH の位置情報を与えることを明らかにしてきた。さらに、近年ニュートラルロス（NL）スキャン・プロダクトイオン（PI）スキャンを用いた新たな TGOOH 異性体分析法を構築し、菜種油の酸化原因の解析に成功した[1)]。本研究では、本手法を応用して、菜種油よりもさらに複雑な TG 組成を持つランダムエステル交換油脂の TGOOH 異性体解析を行い、酸化原因の解析を試みた。

【方法・結果】ランダムエステル交換油は、菜種極度硬化油と菜種油をブレンドした後、ナトリウムメトキシドを触媒とし、ランダムエステル交換して調製した。この試料（2 g）を 60℃・遮光で 0、3、6、12、24 時間加熱し（24 時間時で POV = 2.2）、サンプルとした。まず始めに、NL・PI スキャン（4000QTRAP、SCIEX）によりランダムエステル交換油に多く含まれている主要な TG 分子種を特定した。次に特定した TG 分子種を分析対象として、TGOOH（TG isotopic mass + 32 + Na^+）の PI スキャンを行った。TGOOH の PI 解析には我々の構築した PI データベースを用いた。その結果、TG の構成脂肪酸（リノール酸、オレイン酸など）の-OOH 位置異性体を解析することができ、本実験条件下（60℃・遮光で 0、3、6、12、24 時間加熱）では確かに熱酸化が進行しているという TGOOH 異性体プロファイルを観察できた。したがって、天然の植物油よりも TG 組成が複雑なランダムエステル交換油脂においても、本法を用いることで酸化の原因となる分子種の推察が可能であった。複雑な油脂組成をもつ食品において、保存中の酸化の原因となる分子種の推察が可能であると考え、現在さらなる検討を進めている。

1) S. Kato et al., *npj Science of Food*, **2** (2018)

Oil oxidation, Mass spectrometory, Triacylglycerol

発表責任者：仲川清隆（nkgw@m.tohoku.ac.jp）

講演番号：1B2a13
講演日時：3 月 24 日 11:32～ 1 号館 B2 会場

ヨメガカサガイの生殖細胞から見いだされた多様な新規 *n*-1 系列のジエン酸構造

Novel *n*-1 dienoic acid isomers in germ cells of the Japanese limpet *Cellana toreuma*

○川島 英城（岩手県立大宮古短大部）
○Hideki Kawashima (Miyako Coll., Iwate Pref. Univ.)

【目的】ベッコウカサガイ（*Cellana grata*）や ヨメガカサガイ（*Cellana toreuma*）の生殖細胞中に、希少で多様な構造を持つ非メチレン中断型脂肪酸（non-methylene-interrupted fatty acid, NMI FA）群を見いだした[1-3]。 これらは二重結合間にメチレン基を 2 個以上挟んだ構造を持つ。しかし、生物活性やその機能はほとんど明らかにされていない。最近、*C. grata* から見いだされた NMI FA の中で、23:2*n*-3,14 がヒト急性前骨髄性白血病細胞 HL60 に対する細胞毒性や GSK-3 β に対する阻害活性を有すること, さらにその構造アナログの一つ 18:2*n*-3,14 がラット肝癌由来 H4IIE 細胞における糖新生の抑制を示すことが初めて明らかになった[4]。そこで、本研究では NMI FA による生物活性探索の展開に向け、*C. toreuma* の生殖細胞からユニークな *n*-1 系列のジエン酸を新たに見いだしたので、その構造並びに推定される生合成経路について考察した[3, 5]。

【方法】前報に従い[1]、採取した三陸沿岸産 *C. toreuma* の生殖細胞から全脂質を抽出後、分取用 TLC を用いてトリアシルグリセロール（TAG）と極性脂質（主にホスファチジルコリン及びホスファジルエタノールアミンを含む）にそれぞれ分画した。これらの画分を methyl ester 誘導体に調製後、不飽和度に応じて 5%硝酸銀 TLC で不飽和脂肪酸 methyl ester の分取を行い、標的とするジエン酸画分を得た。さらに、二重結合の位置を決定するために、得られた画分を 3-pyridylcarbinol ester 誘導体に直接変換し、EI-MS（70 eV）によりこれらの構造解析を行った。

【結果】本研究では、*C. toreuma* の生殖細胞から、既知の 17:2*n*-1,8 に加え、2 種類の新規 17:2*n*-1,12 及び 17:2*n*-1,10 が同定された。同定された 3 種類の位置異性体すべてが、雌生殖細胞由来の極性脂質のみに認められた。一方、17:2*n*-1,8 及び 17:2*n*-1,10 は雌生殖細胞由来の TAG、雄生殖細胞由来の TAG 及び極性脂質における分布が確認された。また、前回の研究報告を含め、これら *n*-1 系列の構造アナログは 4 種類のグループを形成していた。すなわち、第一のグループは 17:2*n*-1,12 及び 19:2*n*-1,12、第二のグループは 17:2*n*-1,10、19:2*n*-1,10 及び 21:2*n*-1,10、第三のグループは 17:2*n*-1,8 及び 19:2*n*-1,8、第四のグループは 19:2*n*-1,14 及び 21:2*n*-1,14 である。さらに、興味深いことに、これらアナログの前駆体に相当するモノエン酸（15:1*n*-1、17:1*n*-1 及び 19:1*n*-1）の存在が同時に認められた。したがって、これらモノエン酸を出発基質として、一連の不飽和化（Δ5 あるいはΔ9）及び C2 ユニット伸長化プロセスを経ることによって、多様な *n*-1 系列のジエン酸（C17、C19 及び C21）の生合成に至ったと推定した[5]。

参考文献

[1] *Lipids* **2012**, 47, 827. [2] *Lipids* **2016**, 51, 257. [3] *Lipids* **2017**, 52, 375. [4] *Lipids* **2017**, 52, 295. [5] *Lipids* **2018**, 53, 841.

Cellana toreuma, non-methylene-interrupted fatty acid, 3-pyridylcarbinol

発表責任者：川島英城（ajoe@iwate-pu.ac.jp）

講演番号：1B2a14
講演日時：3 月 24 日 11:43～ 1 号館 B2 会場

カメリア油の脂質特性
Lipid characteristics of Camellia seed oil

○ソ イ、遠藤 泰志（東京工科大学）
○Wei ZENG, Yasushi ENDO (Tokyo Univ. of Tech.)

[目的]　ツバキ、ユチャ（油茶）および茶は、カメリア属の代表的な 3 つの作物である。ツバキの種子から採れる油は、日本において整髪油として古くから使用されている。しかし、ツバキ油は生産量が少ないこともあり、価格が高騰している。そのため多くの油脂メーカーは現在、ツバキ油に代わって中国からユチャ種子油を輸入して使用している。ユチャは、別名アブラツバキと呼ばれ、主に中国で生産されおり、現地では食用油の原料として使わている。茶は、茶葉を生産するため大規模に栽培されているが、その種子はほとんど使われていない。そこで本研究では、これらの 3 種類のカメリア属種子の有効利用を目的として、カメリア油の脂質特性を比較した。
[方法]　試料として 17 種類の精製されたカメリア油（3 種類のツバキ油、9 種類のユチャ油、5 種類の茶油）を使用した。17 種類の油脂について、酸価、過酸化物価、比重、屈折率、ヨウ素価、ケン化価、脂肪酸組成、トリアシルグリセロール組成、トコフェロール含量、ステロール組成をそれぞれ分析して比較した。
[結果]　3 種類のカメリア油の比重は同じであったが、酸価、過酸化物価、ヨウ素価、ケン化価および屈折率は異なった。また、カメリア油の主要脂肪酸はパルミチン酸（16 : 0）、オレイン酸（18 : 1）、リノール酸（18 : 2）であった。ツバキ油、ユチャ油のオレイン酸含有率が全脂肪酸の 80%以上含まれていて、茶油より高かった。一方、茶油のリノール酸含有率が他の 2 種類カメリア油より高かった。トコフェロールとステロール組成を分析したところ、品種に関わらず、8 種類の不ケン化物（Squalene, Ergosterol, Lupeol, β-Amyrin, Lanosterol, Tirucallol, 7-Stigmastenol, Cycolartenol）およびα-トコフェロールが検出された。しかし、含有量は品種によって異なり、茶油のトコフェロール含有量とステロール含有量が最も高く、それぞれ 26.2 mg/100g と 674.8 mg/100g 脂質であった。これらの結果から、カメリアの品種は種子油の脂質特性に影響を与えることが明らかとなった。

camellia seed oil, physicochemical properties, systematic comparison

発表責任者：ソイ（leow.zeng@foxmail.com）

講演番号：1B2a15
講演日時：3 月 24 日 11:54～ 1 号館 B2 会場

Development of methods for purification of plant sphingolipids, glycosylinositol phosphoceramide and phytoceramide 1-phosphate

○ Rumana YESMIN HASI, Mokoto MIYAGI, Takashi KIDA, Tatsuya FUKUTA, Kentaro KOGURE, Tamotsu TANAKA (Tokushima Univ. Grad. Sch. of Biomed. Sci.)

Objective: Previously, we found an unknown sphingolipid in cabbage, and identified it as phytoceramide 1-phosphate (PC1P). We also found that PC1P is produced from glycosylinositol phosphoceramide (GIPC) by the action of phospholipase D (PLD) activity. Although GIPC and PC1P are potential agents for cosmetics, convenient methods for isolation of GIPC and PC1P have not established yet. Here, we developed methods for extraction and purification of them.

Method: Lipids were extracted from plant tissues using a lower layer of mixed solvents consist of isopropanol: water: hexane (55:25:20, v/v) and treated with 40% methylamine: ethanol (5:7, v/v). GIPC was isolated from the lipid extracts through Sephadex column chromatography followed by TLC. Lipids were extracted by Bligh & Dyer method and subjected to silicic acid chromatography. PC1P was isolated by TLC.

Results and Discussion: We had extracted GIPC-containing lipids from plant tissues using lower layer of isopropanol: water: hexane (55:25:20, v/v/v). However, the extract contained sticky impurities that hamper the development of TLC. We tried to remove those impurities from the extract by phase separation. Results showed that the yield of GIPC by two-phase separation consists of chloroform: methanol: water (1:1:0.9, v/v) was 45%. We also examined the two-phase separation of butanol: water (1:1, v/v), and found that the yield of GIPC was 65%. Next, we tried to remove the sticky impurities from the extract by Sephadex chromatography using different solvent systems. Among tested, isopropanol: water (55:25, v/v) separated sticky impurities from GIPC in Sephadex chromatography. Using this method, we examined amounts of GIPC in 13 kinds of vegetables, and found that all vegetables contain GIPC at levels 3-20 mg/100g (wet weight). We also examined the amount of PC1P, and found that PC1P in lower root is higher (3.8 mg/100g) than those of other parts of radish including leaves, petiole, stem, stem-root, middle-root and upper-root.

purification, glycosylinositol phosphoceramide, phytoceramide 1-phosphate

発表責任者：Yesmin Hasi Rumana（c401841003@tokushima-u.ac.jp）

講演番号：1B2p01
講演日時：3 月 24 日 13:50～ 1 号館 B2 会場

ミオシン重鎖における transglutaminase 反応領域の網羅的探索

Comprehensive exploration of transglutaminase-reactive regions on myosin heavy chain

○三根 健太郎、小南 友里、渡邊 壮一、潮 秀樹（東大院農）
○Kentaro MINE, Yuri KOMINAMI, Soichi WATANABE, Hideki USHIO (The Univ. of Tokyo)

かまぼこなどの水産練り製品において，その食感はおいしさを形作る上で重要な要素となっている．その特有の弾力ある食感は主に，原料すり身に含まれるミオシン重鎖(myosin heavy chain, MHC)同士が架橋結合して生じるネットワーク構造に由来する．MHC 同士の架橋結合を触媒する酵素としてトランスグルタミナーゼ(transglutaminase, TGase)が知られている．TGase はタンパク質のグルタミン(Gln)残基とリシン(Lys)残基の間にイソペプチド結合を形成するが, 実際に架橋反応を受ける残基の位置の詳細はまだ十分に明らかになっていない．さらに，MHC の分子内には複数の TGase 反応領域が存在することが予想され，従来の蛍光小分子を用いるような方法ではそれらを網羅的に探索することはできない．そこで本研究は，NanoLC-MS/MS を用いることで，MHC における TGase 反応領域を網羅的に解析し，水産練り製品のネットワーク構造の詳細を明らかにすることを目的とした．

まず，Gln および Lys 残基を含むウマ心筋ミオグロビンアミノ酸配列由来の合成ペプチド(11 残基)を TGase で反応させ，得られた架橋ペプチドを NanoLC-MS/MS で分析し，その MSMS スペクトルから架橋ペプチドを検出する手法を構築した．次いで，TGase の基質となりやすいアポミオグロビン同士を TGase によって架橋したアポミオグロビン二量体について, NanoLC-MS/MS を用いて構造解析を行い，架橋部位を特定した．その結果，Gln41 とループ領域に存在する Lys47, Lys98 が TGase によって架橋されることが判明した．ウマ心筋アポミオグロビン Gln41 が TGase によって架橋されるという既報と一致したことから, 開発した手法が他のタンパク質にも適用可能であると判断した. また, ループ領域などの構造的に自由度の高い部分が TGase 架橋部位となる可能性が示唆された．さらに，かまぼこ原料として有用なシログチから精製した MHC を TGase で架橋し，得られた MHC 二量体について同様に解析した．その結果，シログチ MHC における TGase 反応領域を特定することに成功し，Gln においては subfragment-1 上のループ領域もしくは加熱によってほどけたミオシンロッド部に主要な反応部位が含まれることが分かった．また，架橋された Gln の周辺には塩基性アミノ酸残基が多く存在し，架橋された Lys の周辺には疎水性アミノ酸残基の出現頻度が多かったことから，このような微小環境が TGase の架橋反応を促進するものと考えられた．

transglutaminase, myosin heavy chain, mass spectrometry

発表責任者：潮　秀樹（aushio@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：1B2p02
講演日時：3 月 24 日 14:01～ 1 号館 B2 会場

乳のアルカリ条件における加熱凝乳機序
Mechanism of heating curds in the alkaline condition of the milk
○寺内 広行[1]、岡 大貴[2]、野口 智弘[3]、高野 克己[2] ([1]東京農大院農・農化、[2]東京農大応生・農化、[3]東京農大応生・食加技セ)
○ HIROYUKI TERAUCHI[1], DAIKI OKA[2], TOMOHIRO NOGUCHI[3], KATSUMI TAKANO[2] ([1]Agrichem.,Agr.,Grad.Sch.,TokyoUniv.Agric., [2]Dept.Appl.Biol.chem.,Fac.Biosci.TokyoUniv.Agric., [3]FPC,Fac.Biosci.,TokyoUniv.Agric.)

【目的】 カゼインミセルの表面には負電荷の糖鎖を持つκ-カゼイン（κ-CN）が多く存在しているが、加熱によりκ-CN はホエータンパク質のα-La やβ-Lg と SS 結合を形成し、加熱複合体となってミセルから脱離することが知られている。我々は、加熱温度や pH およびホエータンパク質量を変え、加熱時のκ-CN の脱離量と酸乳ゲルの強度との関係性について明らかにし [1), 2)]、κ-CN の脱離量が増えるにつれて酸乳ゲル強度が高まること、ホエータンパク質を添加し pH をアルカリ性側に変化させて加熱する事で凝乳が生じる（加熱凝乳）ことを見出した。そこで本研究では、アルカリ条件下での加熱において、どのような機構により凝乳が生じるのか要因を特定し、ミセルの特徴を活かした新規加工食品の開発のための基礎的知見を得ることを目的とした。
【方法】 本学富士農場(静岡県富士宮市)で搾乳された生乳を脱脂処理したものを非加熱脱脂乳として用いた。この非加熱脱脂乳（pH6.6）に対して、ホエータンパク質を乳中に含まれる量と等倍量の 0.56%(w/v)添加し、3N 水酸化ナトリウムにて pH を 6.6～9.0 の間で調整した。その後 80℃で 30 分間加熱処理を行い、加熱後のゲル化状態を観察した。同試料を超遠心分離（33,000×G、65 分間）にてホエー画分とカゼイン画分に分画後、SDS-PAGE に供しタンパク質の挙動を解析した。また、両画分を DTT にて還元処理後、遊離したチオール基をヨードアセトアミドにて修飾し、RP-HPLC にてκ-CN を定量した。
【結果】 アルカリ条件下で加熱を行ったところ、pH8.6 付近から凝乳が生じ、それ以降 pH をアルカリ性に傾けるにつれて強い凝乳作用を示した。各 pH のホエー画分とカゼイン画分を SDS-PAGE に供した結果、ホエー画分では、pH をアルカリ性に傾けるにつれてκ-CN の他、α-CN およびβ-CN、加熱複合体のバンドが濃く検出された。一方、カゼイン画分では、pH をアルカリ性に傾けるにつれてκ-CN のバンドが薄く検出された。また、κ-CN 量を HPLC にて定量した結果、ホエー画分では pH をアルカリ性に傾けるにつれてκ-CN の脱離量が増加し、カゼイン画分ではκ-CN 量が減少し、加熱凝乳が生じた pH8.6 のκ-CN 脱離量は 70%であった。

(1) 日本食品科学工学会第 62 回大会 3Ep10
(2) 日本農芸化学会 2018 年度大会

milk, Casein micelle, κ-Casein

発表責任者：寺内 広行（44418012@nodai.ac.jp）

講演番号：1B2p03
講演日時：3 月 24 日 14:12～ 1 号館 B2 会場

ペクチンとの複合体化による β-ラクトグロブリンの高機能化

Functional Improvements of ß-Lactoglobulin by Conjugation with Pectin

○影山 廉、加藤 七菜子、好田 正、服部 誠 (東農工大農)
○Ren KAGEYAMA, Nanako KATO, Tadashi YOSHIDA, Makoto HATTORI (Tokyo University of Agriculture and Technology)

【目的】主要な乳清タンパク質である β-ラクトグロブリン（BLG）は、乳化性、気泡性、ゲル化性といった機能特性を有し、必須アミノ酸をバランスよく含むことから栄養学的にも優れており、食品素材として潜在的に有用なタンパク質である。しかし、多くの食品の pH である酸性条件下や塩存在下で乳化性が低下することや、牛乳中の主要なアレルゲンであることから、その利用は制限されている。本研究では,エステル化度の異なる 2 種類のペクチン（LMP、HMP）と BLG を、架橋剤である 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド（EDC）を用いて複合体化することにより、BLG の乳化性の改善と低アレルゲン化を達成することを目的とした。
【方法】BLG としては B 変異体を用いた。BLG のアミノ基と LMP あるいは HMP のカルボキシル基のモル比が 1:5 となるように、0.9 % NaCl 溶液に溶解し、ペクチンのカルボキシル基の 2 倍量の EDC を加え、室温で 3 時間反応させた。透析により過剰の EDC を取り除き、塩析により未反応のペクチンの大部分を除去した後、Sephacryl S-100 HR（2.0 ID×60 cm、GE Healthcare、Massachusetts、USA）を用いたゲル濾過クロマトグラフィーにより未反応の BLG を除くことで複合体を精製した。複合体化の確認は SDS-PAGE により行い、OPA 法による遊離アミノ基の測定、CD スペクトルの測定による二次構造の解析、モノクローナル抗体を用いた局所的構造解析により、複合体の構造解析を行った。複合体の乳化性は濁度法を用いて、乳化活性と乳化安定性を評価した。アレルゲン性の指標である免疫原性の評価は、BLG、BLG 及び各ペクチンの混合物、複合体を近交系マウス（BALB/c、C57BL/6）に免疫し、血清中の抗体価を測定することで行った。血清中の IgG1 及び IgG2a 量を測定することで Th1/Th2 バランスを評価した。
【結果・考察】高分子量の複合体の生成を SDS-PAGE により確認した。構造解析の結果、僅かな変化は認められたものの、複合体化後も BLG はネイティブ構造をほぼ維持していた。ペクチンとの複合体化により、弱酸性・中性条件下での BLG の乳化活性及び乳化安定性が向上した。BALB/c マウス及び C57BL/6 マウスともに血清中の抗 BLG 抗体量の低下が認められ、その効果は BLG-LMP 複合体で顕著であった。血清中の IgG1 及び IgG2a 量の測定の結果、HMP 混合物群と両複合体群で Th1 型への偏向を示し、BLG の免疫原性の質的な改善が示された。このことから、Th バランスの変化は複合体化そのものの効果と HMP 単体での免疫系への調整能力の双方に起因すると考えられた。
本研究の結果、ペクチンとの複合体化は BLG の高機能化にきわめて有効であると考えられた。

β-lactoglobulin, protein conjugation, pectin

発表責任者：服部誠（makoto@cc.tuat.ac.jp）

講演番号：1B2p04
講演日時：3 月 24 日 14:23～ 1 号館 B2 会場

鶏卵卵白加熱ゲル形成におけるシステイン残基の加熱挙動

Heating behavior of cysteine residues on heat-induced gel formation of hen egg white

○小山 翔大[1]、岡 大貴[2]、辻井 良政[2]、野口 智弘[3]、半田 明弘[4]、高野 克己[2]([1]東農大院農・農化、[2]東農大応生・農化、[3]東農大応生・食加技セ、[4]キユーピー株式会社)
○Shota KOYAMA[1], Daiki OKA[2], Yoshimasa TSUJII[2], Tomohiro NOGUCHI[3], Akihiro HANDA[4], Katsumi TAKANO[2] ([1]Agrichem., Agr., Grad. Sch., Tokyo Univ. Agric., [2]Dept. Agrichem., Fac. Biosci., Tokyo Univ. Agric., [3]FPC, Fac. Biosci., Tokyo Univ. Agric., [4]R&D Div., Kewpie Corp.)

【目的】 卵白の加熱ゲル化性は加工食品の製造にて広く利用されている。従来の研究で、還元剤を添加し加熱した卵白は脆いゲルを形成することから、タンパク質分子間のジスルフィド (S-S) 結合は卵白の加熱ゲル形成に重要であるとされている。S-S 結合は加熱により遊離のシステイン残基(SH 基)の酸化や S-S 結合の架け換えにより形成される。一方、卵白加熱ゲルにおいて SH 基や S-S 結合を前駆体として形成されるランチオニン (LAN) 結合の存在も見いだされている。このように、卵白の加熱ゲル形成には SH 基を介した S-S 結合および LAN 結合が寄与すると考えられるが、その加熱挙動は希薄溶液などを用いて解析されており、加熱ゲルそのものを対象に解析した例はない。そこで、加熱ゲルが形成される高濃度溶液での解析を試み、卵白加熱ゲル形成に伴う SH 基、S-S 結合および LAN 結合の加熱挙動における新たな知見が得られたので報告する。

【方法】 試験には採卵 3 日後の鶏卵を使用した。割卵後卵黄を除去し均質化したのち、pH を 9.0、タンパク質濃度を 140 mg/mL (ゲル形成濃度) または 10.0 mg/mL (希薄溶液) に調整して、50 ～100 ℃まで 5 ℃間隔で 30 分間加熱した。加熱した卵白タンパク質を 3 M SDS (50 mM DTT 含有) 溶液にて溶解し、SDS-PAGE にてその組成を解析した。Ellman 法により遊離 SH 基量を測定した。加熱卵白の SH 基および S-S 結合は、過ギ酸にてシステイン酸へ酸化後、酸加水分解し LC/Q-TOF (Agilent Technologies 社製)にてシステイン酸および LAN を定量した。カラムはシステイン酸分析では Intrada Amino acid、LAN の分析には Scherzo SM-C18 (ともに Imtakt 社製)を使用した。

【結果】 SDS-PAGE (非還元) においてオボトランスフェリンのバンドは希薄溶液では 60℃で完全に消失したのに対し、ゲル形成濃度では 60℃でも大半が残存し 75℃で完全に消失したことから、タンパク質の濃度によって S-S 結合の形成温度に差異が生じることが推察された。SDS-PAGE (還元) では、バンドパターンはよく似た傾向を示し、希薄溶液では 70℃で、ゲル形成濃度では 65℃で高分子量域にバンドが生じた。遊離 SH 基量は、希薄溶液では 55℃から 60℃にかけて 21.7%増加した後、加熱温度依存的に減少した。一方、ゲル形成濃度では 55℃から 60℃における増加はみられず、65℃から 75℃の加熱で 44.7%減少した。LAN 結合量において、ゲル形成濃度では 65℃から加熱温度依存的に増加した。以上の結果よりタンパク質の濃度の差異により SH 基の加熱挙動が異なることが明らかになった。

protein gel, lanthionine, heat denaturation

発表責任者：小山翔大（44518002@nodai.ac.jp）

講演番号：1B2p05
講演日時：3 月 24 日 14:34～ 1 号館 B2 会場

乾燥卵白可溶性凝集体の加熱挙動

Thermal behavior of soluble aggregate of dried egg white

○根本 裕子[1]、小山 翔大[1]、岡 大貴[2]、辻井 良政[2]、半田 明弘[3]、野口 智弘[4]、高野 克己[2]([1]東京農大院農・農化、[2]東京農大応生・農化、[3]キユーピー（株）・研究開発本部、[4]東京農大応生・食加技セ)

○ Yuko NEMOTO[1], Shota KOYAMA[1], Daiki OKA[2], Yoshimasa TSUJII[2], Akihiro HANDA[3], Tomohiro NOGUCHI[4], Katsumi TAKANO[2] ([1]Agrichem., Agr., Grad.Sch., Tokyo Univ. of Agric., [2]Dept. Agrichem., Fac.Biosci., Tokyo Univ. of Agric., [3]R&D Div., Kewpie Corp., [4]FPC, Fac.Biosci., Tokyo Univ. of Agric.)

【目的】

乾燥卵白は液卵白を噴霧乾燥させ加熱殺菌(60～80℃、3～30 日)し製造される。加熱殺菌を経た乾燥卵白は液卵白と比較して硬く弾力性に富む加熱ゲルを形成し、畜肉・魚肉練り製品や麺類など多くの加工食品に物性改良材として使用される。また、乾燥卵白は加熱殺菌によりオボアルブミン(OA)やオボトランスフェリン(OT)などの主要タンパク質が可溶性凝集体を形成すること、タンパク質の平均分子量とゲル強度に正の相関があることが報告されている[1)]。よって、この可溶性凝集体が乾燥卵白特有の高硬度ゲル形成に寄与すると考えられるが、その機序は不明である。そこで、本研究では可溶性凝集体の加熱挙動について解析し、乾燥卵白のゲル形成機序について新たな知見を得ることを目的とした。

【方法】

乾燥卵白試料はキユーピータマゴ(株)社製の pH が中性の乾燥卵白(殺菌有・無)を用いた。乾燥卵白を純水にて溶解し pH を 7.0 に、タンパク質濃度を 1%および 5%に調整後、25℃および 40～100℃(5℃間隔)でそれぞれ 30 分間加熱した。冷却後、濁度測定(600 nm)および電気泳動(Blue Native-PAGE) に供しタンパク質の加熱挙動を解析した。

【結果】

殺菌無においてタンパク質濃度 1%と 5%いずれにおいても 55℃から 60℃にて濁度が上昇した。一方、殺菌有において 1%ではいずれの加熱温度でも濁度の変化はみられなかったのに対し、5%では 45℃から温度依存的に濁度が上昇した。なお、タンパク質濃度 5%では殺菌無では 60℃以上、殺菌有では 65℃以上で流動性が低下した。Blue Native-PAGE では、殺菌無では両濃度とも 60℃より低い温度でタンパク質の状態変化はみられなかった。一方、殺菌有において 1%では高分子量の可溶性凝集体の挙動は変化がなかったが、5%では 45℃から温度依存的に可溶性凝集体のバンドがより高分子量域へとシフトした。よって、タンパク質濃度、すなわちタンパク質分子間距離によって可溶性凝集体の反応性が左右されると考えられた。また、殺菌有が殺菌無よりも加熱に伴う反応性が低いのは、表面電荷の反発が殺菌無よりも大きいためと考えられた。

1) Handa, A., et al., *J. Agric. Food Chem.*, **49**(8), 3957-3964 (2001).

dried egg white, gel properties, aggregate

発表責任者：岡大貴（d3oka@nodai.ac.jp）

講演番号：1B2p06
講演日時：3 月 24 日 14:55～ 1 号館 B2 会場

ハチミツは豆乳タンパク質を凝集させる

Honey can aggregate soymilk proteins

○西澤 果穂、久保 茜、佐藤 瞳、城山 彩奈、有井 康博（武庫川女子大学）
○Kaho Nishizawa, Akane Kubo, Hitomi Sato, Ayana Shiroyama, Yasuhiro Arii (Mukogawa Women's Univ.)

【目的】豆腐の加工には凝固剤としてグルコノデルタラクトン（GDL）が用いられる。本加工において、GDL は豆乳中で加水分解され、グルコン酸（GA）となり、豆乳タンパク質の等電点沈殿が引き起こされる。一方、ハチミツにはハチミツ酸と呼ばれる GA が豊富に含まれる。これらのことから、ハチミツを豆乳に加えることで豆腐様沈殿が形成されると考えた。本研究では、ハチミツを用いた新規食品の開発を目指し、ハチミツ添加による豆腐様沈殿の形成の有無、形成条件の検討、および豆腐様沈殿形成におけるハチミツ主要成分の役割について検討した。
【方法】株式会社山田養蜂場ご提供の 4 種類（アカシア、ヒルガオ、ソバ、コーヒー）のハチミツと市販の混合ハチミツ 1 種類（株式会社加藤美蜂園本舗）を蒸留水で希釈し、様々な濃度のハチミツ希釈液を調製した。また、様々な濃度の GDL とグルコースの混合液（GDL/グルコース混液）を調製した。85℃で 5 分間加熱した豆乳に様々な濃度のハチミツ希釈液あるいは GDL/グルコース混液を添加し、さらに 85℃で 60 分間加熱した。氷冷後に遠心し、豆腐様沈殿の有無を確認した。また上清について、SDS-PAGE によるタンパク質バンドの観察および pH の測定を行った。さらに、各ハチミツ中の全糖量をフェノール硫酸法により定量し、GA 濃度を市販測定キットにより定量した。
【結果と考察】アカシアおよび混合ハチミツの希釈液を様々なハチミツ濃度で豆乳に添加すると、いずれの濃度においても下層に沈殿がほとんど観られず、高濃度では上層に凝集体が観られた。ヒルガオ、ソバおよびコーヒーの希釈液を添加すると、ハチミツ濃度の上昇に伴い沈殿が観られたが、より高濃度では消失し、上層に凝集体が観られた。これらの結果から、ハチミツ濃度の上昇により沈殿が凝集体として上層に移行したと考えた。ハチミツと豆乳の混合液を遠心後、液部を SDS-PAGE に供したところ、いずれのハチミツにおいてもタンパク質のバンドはほとんど観られなかったことから、ハチミツの添加が豆乳タンパク質を凝集させることが示唆された。また、ハチミツ濃度の上昇により液部の pH はいずれのハチミツにおいても低下した。タンパク質が凝集するハチミツ濃度と pH には関係性が見られ、pH の低下がタンパク質の凝集に関与していることがわかった。一方で、凝集体の上層への移行と pH の変化に関係性は見出せず、ハチミツ中の糖濃度が関与していると考えた。そこで、各ハチミツの GA 濃度と全糖量を測定し、その濃度をもとに GDL/グルコース混液を調製し、GDL/グルコース混液を豆乳に添加することで、各現象を再現することができた。以上のことから、凝集体の形成には GA 濃度が、上層への移行には糖濃度が関与していることがわかった。

honey, soymilk, tofu

発表責任者：西澤果穂（nishi38@mukogawa-u.ac.jp）

講演番号：1B2p07
講演日時：3 月 24 日 15:06～ 1 号館 B2 会場

尿素可溶性が異なる豆腐様沈殿の形成に重要な因子の決定
Determination of critical factor for the formation of tofu-like precipitates with different urea-solubility
○有井 康博、香川 千尋、番匠 志帆、陶器 宏美、長島 裕子、西 あゆみ、西尾 朋子、西澤 果穂（武庫川女子大学）
○Yasuhiro ARII, Chihiro KAGAWA, Shiho BANSYO, Hiromi TOUKI, Yuko NAGASHIMA, Ayumi NISHI, Tomoko NISHIO, KAHO NISHIZAWA (Mukogawa Women's University)

【目的】所属研究室では、豆乳に $MgCl_2$ を異なる濃度で添加すると、尿素に対する溶解性が異なる沈殿が生じることを明らかにしている（Arii & Takenaka, 2013）。また、豆腐形成において金属イオンが沈殿形成の開始因子であることも明らかにしている（Arii & Takenaka, 2014）。本研究では、尿素に可溶性が高い沈殿（USP）と可溶性が低い沈殿（UIP）の作り分けに関連する重要な因子について明らかにすることを目的とした。
【方法】$MgCl_2$ 濃度を最終濃度 0–20 mM の範囲で豆乳に添加し、沈殿と上清に分けた。上清のタンパク質濃度を決定する一方で、2 M 尿素に対する沈殿の可溶性を調べた。また、Cl^-濃度を一定（Cl^-濃度が 40、60、80、100、120、140 mM）に調整した NaCl と $MgCl_2$ の混液（$MgCl_2$/NaCl）を、Mg^{2+}濃度が様々な濃度になるように豆乳に添加し、同様に上清のタンパク質濃度と沈殿の尿素可溶性を調べた。
【結果と考察】$MgCl_2$ 濃度の変化によって、上清タンパク質の濃度は 5 mM から減少し、10 mM でプラトーに達した。一方、USP は 7 mM まで増加した後に減少した。次に、$MgCl_2$/NaCl を添加したところ、Mg^{2+}濃度が低濃度においても Na^+濃度が増加することで、USP が増加することが明らかとなった。加えて、Mg^{2+}の非存在下で Na^+のみが添加される条件において、NaCl 濃度が 100 mM のときに USP が生じる割合と $MgCl_2$ が 7 mM のときに、USP が生じる割合が一致することが明らかとなった。この結果は USP が一価の金属イオンの添加によっても生じることを示し、USP 形成において二価金属イオンは必須でないことを意味している。すなわち、USP の形成は豆乳タンパク質に金属イオンが結合することで表面電荷が失われることで起こる塩析であると考えた。一方、以前の研究において UIP の形成には金属イオンによるタンパク質間の架橋（塩橋）が重要であることを明らかにしていることから（Arii & Takenaka, 2014）、USP および UIP の作り分けに関する重要な因子は、異なる金属イオン濃度が引き起こす、金属イオンータンパク質間の相互作用様式の違いによるものだと考えた。なお、過去の研究において凝固剤に含まれる陰イオンの濃度も作り分けに影響を与えているが、主要な因子ではないと報告している（Arii & Nishizawa, 2018）。本研究は公益財団法人飯島藤十郎記念食品科学振興財団平成 28 年度学術研究として助成いただき、学術誌に報告している（Arii & Nishizawa, 2018）。
Arii Y & Takenaka Y (2013). Biosci. Biotechnl. Biochem., 77, 928.; Arii Y & Takenaka Y (2014). Biosci. Biotechnl. Biochem., 78, 86.; Arii Y & Nishizawa K (2018). Heliyon, 4, e00817.

tofu, magnesium chloride, sodium chloride

発表責任者：有井康博（arii@mukogawa-u.ac.jp）

講演番号：1B2p08
講演日時：3 月 24 日 15:17～ 1 号館 B2 会場

カルボキシメチルセルロースとの複合体化による β-コングリシニンの機能改変

Functional changes in β-conglycinin by conjugation with carboxymethyl cellulose

○石塚 美咲、田中 綾、好田 正、服部 誠（東農工大）
○Misaki ISHIZUKA, Aya TANAKA, Tadashi YOSHIDA, Makoto HATTORI (Tokyo Univ. of Agriculture and Tech)

【目的】大豆タンパク質の主成分である β-コングリシニンは必須アミノ酸を豊富に含む良質なタンパク質であり、乳化性、気泡性、ゲル化性などの機能特性や、血中コレステロール低下作用、血圧上昇抑制、抗酸化作用、抗肥満効果などの生理機能を持つ有用な食品タンパク質である。しかしながら、β-コングリシニンは酸性条件下で機能特性が低下することから、食品の調理、加工、保存における利用が制限されている。大豆アレルギーの主要な原因物質であるという問題点もある。以上のことから、β-コングリシニンの機能を改変することには大きな意義があると考えた。

本研究では架橋剤である 1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（EDC）を用い、β-コングリシニンとカルボキシメチルセルロース（CMC）を複合体化することで、β-コングリシニンの機能特性の向上を達成することを目的とした。

【方法】β-コングリシニンは、脱脂大豆粉末から水抽出の後に等電沈殿と Q-Sepharose Fast Frow (2.5 ID × 50 cm, GE Healthcare Bio-Science AB) を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。β-コングリシニンのアミノ基と CMC のカルボキシメチル基のモル比が 1：2.0 になるようにそれぞれ蒸留水に溶解した。この混合物を 0.1 M NaOH を用いて pH 7.0 に調整後、モル比で CMC のカルボキシメチル基の 2 倍量の EDC を 30 分かけて加えた。24 時間攪拌後、2 M 酢酸緩衝液を 2 mL 加えて反応を停止した。透析後、沈殿物を遠心分離により除去し、上清を凍結乾燥に供することで β-コングリシニン-CMC 複合体を調製した。複合体生成の確認は SDS-PAGE により行い、フェノール硫酸法により複合体の糖含量を測定し、BCA 法によりタンパク質含量を測定した。機能特性の評価としては、複合体の pH 依存的溶解性と乳化性の測定を行った。複合体の乳化性は濁度法により評価した。

【結果・考察】SDS-PAGE の結果、β-コングリシニン-CMC 複合体の生成を確認した。糖含量及びタンパク質含量の測定により、β-コングリシニンと CMC が複数回の実験で、重量比で 1：0.38～1.04 の割合で複合体化したことが明らかとなった。溶解性測定の結果、β-コングリシニンの等電点付近である pH 5.0 での溶解性の改善を認めた。また、乳化性の評価を行ったところ、複合体化により pH 3.0、pH 5.0 の塩存在下において、β-コングリシニンの乳化性の改善を認めた。

以上のように、本研究の手法は β-コングリシニンの機能改変に有効であると考えられた。

【謝辞】脱脂大豆粉末をご恵与頂きました日清オイリオグループ株式会社様に、深謝申し上げます。

β-conglycinin, functional imprivements, protein conjugation

発表責任者：服部　誠（makoto@cc.tuat.ac.jp）

講演番号：1B2p09
講演日時：3 月 24 日 15:28～ 1 号館 B2 会場

メイラード反応を利用した低メトキシペクチンとの複合体化による β－コングリシニンの機能改変
Functional Changes in β-Conglycinin with Low Methoxyl Pectin by the Maillard Reaction
○図師 奈緒子、根上 拓、好田 正、服部 誠（東農工大）
○ Naoko ZUSHI, Taku NEAGARI, Tadashi YOSHIDA, Makoto HATTORI (Tokyo Univ. of Agriculture and Tech.)

【目的】大豆の主要なタンパク質である β-コングリシニンは、必須アミノ酸をバランスよく含み、乳化性やゲル化性といった機能特性を有している。さらに、血中中性脂肪を低下させるなどの生理機能が報告されている。しかし、β-コングリシニンが酸性条件下で機能特性が低下することや、アレルゲン性を有するといった問題点がある。以上のことから、β-コングリシニンの機能改変を達成することには大きな意義がある。メイラード反応は、糖質をタンパク質に付加させる反応で、食品加工へ応用可能な方法である。本研究では、糖質として、低メトキシペクチン（LMP）を用いた。LMP は、柑橘類に含まれる糖で、血糖値の低下、便秘解消などの効能が知られている。

本研究では、特に、β-コングリシニンの溶解性および乳化性の改善、免疫原性の低減化を達成することを目的としている。

【方法】β-コングリシニンは等電点沈殿と Q-Sepharose Fast Frow (2.5 ID×50 cm, GE Healthcare Bio-Science AB, Sweden)を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーにより、脱脂大豆粉末から抽出・精製した。β-コングリシニン：LMP＝1：4.9（重量比）となるように精製 β-コングリシニンおよび LMP を混合し、凍結乾燥した。温度 65 ℃、相対湿度 79%の条件下で 5 日間メイラード反応させ、β-コングリシニン-LMP 複合体を調製した。複合体化の確認は SDS-PAGE 後の 0.2%クーマシーブリリアントブルー R250（CBB）染色および 0.5%過ヨウ素酸フクシン（PAS）染色によって行った。自然蛍光の測定により、複合体の構造を調べた。機能特性の評価として、溶解性測定と乳化性測定を行った。溶解性は、複合体を Milli-Q 水に分散させ、遠心分離した後に、上清に含まれるタンパク質を BCA 法によって定量することで評価した。乳化性は濁度法により評価した。

【結果】メイラード反応を用いた複合体化により、 β-コングリシニン-LMP 複合体を得た。自然蛍光測定の結果、β-コングリシニンのアミノ基が糖により遮蔽されたことを確認した。複合体の溶解性は等電点付近である pH 5.0 で有意に改善できた。このことについては、メイラード反応により、β-コングリシニンに LMP の親水基が付与されたことに起因すると考えられた。また、乳化性は β-コングリシニンと比較してすべての pH および塩存在下で向上した。これは、加熱や複合体化に伴って β-コングリシニンの疎水性残基が露出し、親水性疎水性のバランスが改善したとともに、油滴間の相互作用が強くなり、細かく安定的なエマルションが調製されたからだと考えられた。

以上のことから、本研究の手法は β-コングリシニンの機能改変に有用であると考えられた。

β-Conglycinin, functional improvements, protein conjugation

発表責任者：服部誠（makoto@cc.tuat.ac.jp）

講演番号：1B2p10
講演日時：3 月 24 日 15:39～ 1 号館 B2 会場

大豆 7S グロブリンのα’サブユニットのエクステンション領域におけるエピトープ構造の解析
Structural and epitope analysis of extension region of soybean 7S globulin α’subunit

○前田 紘夢[1]、佐藤 さくら[2]、海老澤 元宏[2]、丸山 伸之[1]([1]京大院農、[2]相模原病院)
○Hiromu MAEDA[1], Sakura SATO[2], Motohiro EBISAWA[2], Nobuyuki MARUYAMA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Sagamihara Hospital)

【目的】大豆は主要なアレルギー食品であり、大豆そのものや豆腐などの加工食品などを摂取したときに症状が誘発される。大豆アレルギー患者を対象にした原因抗原の解析から、7S グロブリン(Gly m 5)および 11S グロブリン(Gly m 6)が主要なアレルゲンであることが報告されている[1)]。これまで、Gly m 5 のサブユニットに対する特異的 IgE 抗体の定量解析を行い、βサブユニットと比較して、αおよびα′サブユニットに対する感作率が高く、多くの患者血清中に N 末端部のエクステンション領域と結合する IgE 抗体が存在することを明らかにしている[2)]。本研究では、エクステンション領域のアレルゲン性と構造との関係に関する知見を得ることを目的として、Gly m 5 の N 末端部のエクステンション領域のタンパク質構造を解析するとともに、その領域に存在するエピトープ領域を解析した。
【方法】1) Gly m 5 α′サブユニットの N 末端部のエクステンション領域をコードする遺伝子を pET ベクターに組み込み、大腸菌に形質転換して発現させた。抽出液に対して硫安分画を行い、得られた沈殿をバッファー(20mM Tris-HCl, pH7.5)で再溶解した後、陰イオンクロマトグラフィー(HiPrep Q XL, GE ヘルスケア) およびゲルろ過クロマトグラフィー(HiLoad Superdex 200 pg, GE ヘルスケア) により精製した。2) 190-250 nm の CD スペクトルを測定し、二次構造を推定した (J720 型円二色性分散計、日本分光)。また、示差走査熱量測定 (DSC) を行った。3) Gly m 5 の N 末端部のエクステンション領域に対するオーバーラッピングペプチド(15 残基,3 残基 offset)ライブラリーを結合させたスライドガラスを作製し、患者血清を反応させ、IgE 抗体に対する標識した 2 次抗体で処理後、蛍光スキャナーで測定した。
【結果】ゲルろ過クロマトグラフィーにおいて単一ピークとして、Native-PAGE によりほぼ単一バンドとして、エクステンション領域を精製した。CD スペクトルはランダムコイルに特有のパターンを示し、DSC では明瞭なピークが検出されなかった。これらの結果から、エクステンション領域は主に不規則構造であることが示唆された。ペプチドライブラリーを用いた解析において、N 末端部のエクステンション領域中のいくつかの配列に複数の患者血清が反応した。以上の結果から、不規則構造をとるドメインにおいてエピトープとなりやすい部分構造が存在する可能性が示唆された。

Reference
1) Ito, k. et al., J. Allergy Clin Immunol., 2011, 128(3):673-675.
2) Maruyama, N. et al., Clin. Exp. Allergy, 2018, 48(12):1726-1734.

food allergy, soybean, epitope

講演番号：1B2p11
講演日時：3 月 24 日 16:00～ 1 号館 B2 会場

冷凍パンの生地物性に及ぼす凍結と酵母の影響

Influence of freezing and yeast on the physical dough properties of frozen bread

○三井 悠河[1]、岡 大貴[2]、野口 智弘[3]、髙野 克己[2] ([1]東京農大院農・農化、[2]東京農大応生・農化、[3]東京農大応生・食加技セ)

○ Yuga MITSUI[1], Daiki OKA[2], Tomohiro NOGUCHI[3], Katsuimi TAKANO[2] ([1]Agrichem.,Agr.,Grad.Sch.,TokyoUniv.Agric., [2]Dept.Agrichem.,Fac.Biosci.TokyoUniv.Agric, [3]FPC,Fac.Biosci.,TokyoUniv.Agric.)

【目的】

冷凍パンは、耐冷凍性酵母の普及により、その品質が向上し近年急速に製造量が拡大している。しかし、冷凍による生地膨張力の低下や内相の粗雑化、ナシ肌の発生などその品質には未だ課題が指摘されている。これらの現象は、冷凍による酵母の死滅によって漏出したグルタチオンによって引き起こされるジスルフィド結合の還元や、氷結晶によるグルテン組織の脆弱化などが原因とされているが、冷凍障害の正確な理解にはさらに検討が必要である。今回、パン生地の冷凍障害に対する冷凍中の酵母ならびにグルテンの状態の変化の影響を解析し、いくつかの知見を得たので報告する。

【方法】

パン生地は強力粉（カメリヤ、日清製粉社製)、グラニュー糖、全卵、脱脂粉乳、耐冷凍性酵母および食塩に水を加え、縦型ミキサーにて混捏後、ショートニングを加えさらに混捏し調製した。一次発酵した生地を 60 g に分割後、モルダーにて成型し、ブラスト冷凍庫（約-30 ℃：急速冷凍）にて冷凍した。冷凍生地は、-18 ℃にて 1 日から 2 週間冷凍保存後、20 ℃にて解凍し、35 ℃、湿度 75 %、70 分間ホイロ後、焼成した。焼成パンの比容積は 3D Laser volume measurement(ASTEX 社製)にて計測した。パン生地の伸長度測定試験は各生地を調製後、モルダーで生地を薄く延ばし麺状に切り取り（厚さ 3 ㎜×幅 5 ㎜)、万能物性測定器(インストロンジャパン社製)にて測定した。

【結果】

一次発酵を行ったパンでは、1 日、1 週間、2 週間と冷凍期間が長くなるにつれ大幅に比容積が低下し、2 週間冷凍で未冷凍パンの約 63 %に低下した。一方、一次発酵を行っていないパンでは、冷凍による低下幅は小さく、同様に 2 週間冷凍で約 90 %の比容積を維持した。次に、生地の伸長度測定を行ったところ、一次発酵を行った生地では、混捏後生地に比べ、発酵後の引張強度の値が大幅に増加し伸びが低下した。さらに、この生地を冷凍すると冷凍期間に従い、生地の引張強度が低下し伸長度が増した。一方、一次発酵を行わない生地では、生地混捏後の強度の増加及び伸長度の低下は観察されたが、その後の冷凍による変化は少なかった。さらに、酵母無添加生地では、冷凍期間の延長による生地物性に大きな差異がみられなかった。

frozen bread, physical dough properties

講演番号：1B2p12
講演日時：3 月 24 日 16:11～ 1 号館 B2 会場

小麦登熟過程中の内在プロテインジスルフィドイソメラーゼによるジスルフィド結合形成の挙動解析

Analysis of forming disulfide bonds with endogenous Protein Disulfide Isomerase in wheat ripening process

○小澤 佳祐[1]、西堀 史也[2]、岡 大貴[3]、野口 智弘[2]、高野 克己[3]([1]東京農大院農、[2]食加技セ、[3]東京農大応生)
○ Keisuke Ozawa[1], Humiya Nishibori[2], Daiki Oka[3], Tomohiro Noguchi[2], katsumi Takano[3] ([1]Agrichem.,Agr.,Grad.Sch.,Tokyo Univ.Agric., [2]FPC,Fac.Biosci.,Tokyo Univ.Agric., [3]Dept.Agrichem.Fac.Biosci.,Tokyo Univ.Agric.)

【目的】小麦粉に水を加え混捏することで粘弾性に富んだ生地が形成される。この生地特性の発現には、生地タンパク質であるグルテンにおけるジスルフィド結合（SS 結合）の形成が重要である。我々は同結合を触媒するプロテインジスルフィドイソメラーゼ（PDI）のリコンビナント体を小麦粉生地添加に添加することによって SS 結合形成が促進され、製パン性が向上することを報告している。また、小麦粉中にも PDI 活性が存在することから、小麦粉内在 PDI の製パン性への関与が考えられる。PDI は本来小麦種子登熟中にタンパク質への SS 結合導入のため存在することから、登熟過程中での PDI の作用がグルテン質の質に影響を及ぼすことが推測される。そこで、本研究では施肥条件を変化させ特性の異なる小麦粉を調製し、小麦粒登熟過程におけるタンパク質量や PDI 活性の挙動と小麦タンパク質合成時のジスルフィド(SS)結合形成挙動の関係性を解析し、小麦粉の生地形成性と内在 PDI との関係性について検討した。
【方法】試料の小麦粉には強力品種の「ゆめかおり」を用い、慣行および多肥条件で畑地にて栽培した。出穂開花日を 0 日目として 5 日おきに採取したものをサンプルとして使用した。小麦粉タンパク質の抽出は、小麦粒に 3% SDS, 5N Urea, 0.1M NaCl を含む溶液を加え破砕し、SS 結合非還元にて行った。タンパク質量は、DC protein assay 法にて測定するとともに SDS-PAGE に供し、解析ソフト Quantity One(Bio-Rad 社)を用いてバンド強度を測定した。PDI 活性は、小麦粒に 50mM Tris-HCl Buffer (pH 7.4)にて抽出し、インスリンを基質に用いて還元活性法により PDI 活性を測定した。
【結果】登熟が進むにつれて小麦粒中のタンパク質量は増加する傾向を示し、慣行区に対して多肥区では全体的に高い値を示す傾向がみられた。非還元 SDS-PAGE に供した結果、慣行区では 20 日目、多肥区では 15 日目で、250kDa 付近にて SS 結合により高分子化したと思われるバンドを確認し、同バンド強度は慣行区に対して多肥区で高い値を示した。また、還元処理 SDS-PAGE では、登熟が進むにつれ各タンパク質が増加し、慣行区では登熟 20 日目、多肥区では 15 日目にて 80～100kDa 付近にて高分子グルテニンと思われるバンドが確認された。PDI 活性量は、慣行区で 25 日目、多肥区では熟 20 日目頃にピークを迎えた後、登熟が進むにつれて活性は低下したが、最大活性量は多肥区で慣行区の約 1.5 倍の値を示した。

wheat, Protein Disulfide Isomerase, cultivation condition

発表責任者：小澤佳祐（44418004@nodai.ac.jp）

講演番号：1B2p13
講演日時：3 月 24 日 16:22～ 1 号館 B2 会場

LOX 添加によるグルテニンサブユニット構成変化メカニズムの解明

Studies on constitutional changes of glutenin subunits by lipoxygenase (LOX)

○久保田 淳平[1]、菅原 紘貴[2]、白石 玲[2]、夏目 亮[3]、椎葉 究[1,2]([1]東京電機大学理工学部、[2]東京電機大学理工学研究科、[3]東京電機大学工学研究科)
○Jyunpei KUBOTA[1], Kouki SUGAWARA[2], Akira SIRAISI[2], Ryou NATUME[3], Kiwamu SIIBA[1,2]([1]Toukyo denki University Faculty of Science and Technology, [2]Tokyo denki University School of Science and Technology, [3]Tokyo denki University Graduate School of Engineering)

【目的】
リポキシゲナーゼ(LOX と以下略)は、小麦中に含まれる酸化酵素で少なくとも 3 種のアイソザイムがあり(1)、ドウを作製時に添加し酸化を促進することで製パン性を改良することが報告されている(2)。LOX は、二次加工中、グルテンの構造の変化を引き起こすことが報告されている。一方、グルテニンは、高分子量・低分子量グルテニンサブユニット（HMW-GS・LMW-GS）に分かれ、それぞれ構成するタンパク質の機能や構造が異なっている。当研究室では小麦 LOX Ⅰ（アイソザイム 1）の大腸菌組換え DNA による大量発現に成功したため、これらを用いてグルテニンサブユニットを構成するタンパク質の構成変化に対する特性を分析し、製パン性への影響について研究を行った。

【方法】
大腸菌内での発現に適化した LOX Ⅰ遺伝子配列をコードする DNA を合成した。その遺伝子を PCR で増幅し、リコンビナーゼ反応を利用して pET-16b に組込んだ。配列を確認後、大腸菌 BL21(DE3)を形質変換し組換え LOX Ⅰを発現させた（rLOX と以下略)。小麦粉に rLOX と水を加えミキシングし、小麦粉と LOX を反応させた。一方、対照区として rLOX 無添加区も同様にして調製した。オズボーン分画法で、可溶性・不溶性グルテニンの沈殿物を抽出後、グルテニンサブユニットに分画し、構成タンパク質成分の違いを SDS-PAGE と RP-HPLC（Column：Inertsil WP300 C18 5μm、3.0×250 ㎜）によって比較した。

【結果】
① 組換え大腸菌の 1 回の培養により、タンパク質 0.21mg/ml、LOX 活性 55.1munits のサンプルが得られた
②SDS=PAGE および RP-HPLC 分析により、LOX 添加有無により可溶性および不溶性グルテニン画分中、特定のポリペプチドに違いが認められた。

(1) K.SHIIBA *et. al*, 1991. Purification and characterization of lipoxygenase isozymes from wheat germ, Cereal Chem. 68(2):115-122
(2) K.SHIIBA et. al, 1993.Changes in solubility of wheat glutenin during Fermentation, Food Science and Technology Research.40(10):727-731

lipoxygense, glutenin, bread-making

発表責任者：久保田淳平（15rb035@ms.dendai.ac.jp）

講演番号：1B2p14
講演日時：3 月 24 日 16:33～ 1 号館 B2 会場

X 線・中性子小角散乱によるグリアジン／グルテニン複合体の集合構造解析
Assembled structure of gliadin/glutenin complex investigated by small-angle X-ray and neutron scattering
○佐藤 信浩、裏出 令子、守島 健、井上 倫太郎、杉山 正明（京大複合研）
○Nobuhiro Sato, Reiko Urade, Ken Morishima, Rintaro Inoue, Masaaki Sugiyama (KURNS, Kyoto Univ.)

【目的】グルテンはコムギの主要な種子貯蔵タンパク質グリアジンとグルテニンの複合体からなり、小麦粉生地の物性に大きな影響を及ぼす。我々はこれまでにグリアジンが小麦粉生地から純水中に抽出可能であることを見出し、X 線小角散乱(SAXS)法により水和凝集体中のグリアジンの集合構造を明らかにしてきた。一方、グリアジンとグルテニンがグルテン中においてどのような構造を形成しているかについては未だ明確になっていない。そこで、本研究ではグルテニンとグリアジンの混和により作製したグルテンのモデル系の水和凝集体に対して SAXS ならびに中性子小角散乱(SANS)法を用いた構造解析を行い、グリアジン単独との構造の相違やNaCl添加時の構造変化の相違について調べた。また、グリアジン/グルテニン複合体中におけるグリアジンの集合構造を明らかにするため、コントラスト変調 SANS(CV-SANS)の適用を検討した。CV-SANS は中性子散乱における同位体効果を利用し、重水素ラベル化によって多成分系中における各構成成分の構造解析を可能とする手法である。本研究では重水素化グリアジンの調製、および重水素化グリアジン/軽水素化グルテニン混合物に対する軽水/重水混合溶媒中における CV-SANS 測定に関する予備検討を行ったので、その結果について報告する。
【方法】グリアジンおよびグルテニンは既報に従って調製した。SAXS 測定は実験室 X 線小角散乱装置（NANOPIX, リガク）および高エネルギー加速器研究機構 Photon Factory の SAXS 装置(BL-10C)を用いて、SANS 測定は仏 Laue-Langevin 研究所の SANS 装置(D22)を用いて、いずれも室温で実施した。
【結果】40wt%の水和凝集体の SAXS 散乱曲線において、グリアジンは不均一凝集構造に由来するピークを示す一方、グルテニンは大きな凝集構造を示す単調な立ち上がりのみが観測された。一方、両者の1:1混合物はほぼグルテニンに類似した散乱曲線を示し、分子量の大きいグルテニンの散乱への寄与の大きさによって、複合体中で各タンパク質が形成する特徴的な構造を明確に識別することは困難であった。また、グリアジンの散乱曲線は NaCl の添加によって大きく変化する一方、グルテニンについてはわずかな変化しか見られないことも明らかとなった。一方、CV-SANS における散乱強度の計算を行ったところ、重水組成43%混合溶媒中で軽水素化グルテニンの見かけの散乱が消失して不可視化し、重水素化グリアジンの構造のみが可視化されることが予測された。そこで、種々の組成の軽水/重水混合溶媒中において軽水素化グルテニン単独の SANS 測定を行ったところ、実際には、計算上の散乱消失点よりも低い重水組成26%程度で散乱強度が最小となり、この組成においてグリアジン/グルテニン複合体中における重水素化グリアジン由来の構造を選択的に解析出来る可能性が見いだされた。

wheat protein, SAXS, SANS

発表責任者：佐藤信浩（sato-n@rri.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：1B2p15
講演日時：3 月 24 日 16:44～ 1 号館 B2 会場

純水抽出小麦グリアジンとエタノール抽出小麦グリアジンの機能特性の比較
Comparison of functional properties between water-extracted and ethanol-extracted wheat gliadins
○小林 隼斗[1]、中村 華恵[1]、殿島 利奈[1]、阿部 竜典[1]、山口 勇将[1]、赤尾 真[1]、二宮 和美[2]、熊谷 仁[2]、裏出 令子[3]、熊谷 日登美[1] ([1]日大・生資科、[2]共立女子・家政、[3]京大・複合研)
○Hayato Kobayashi[1], Hanae Nakamura[1], Rina Tonoshima[1], Ryosuke Abe[1], Yusuke Yamaguchi[1], Makoto Akao[1], Kazumi Ninomiya[2], Hitoshi Kumagai[2], Reiko Urade[3], Hitomi Kumagai[1] ([1]Nihon Univ., [2]Kyoritsu Women's Univ., [3]Kyoto Univ.)

【目的】小麦グルテンの構成成分の一つであり，小麦粉生地に伸長性をもたらす小麦グリアジンは，60～70%のエタノール溶液に可溶で，水には溶けにくいとされている。このため，食品加工において扱いづらく，その利用が限られている。近年，裏出らより，食塩を含有する小麦粉ドウから，純水によって高濃度でグリアジンを抽出できることが報告された。また、純水で抽出された小麦グリアジンは，エタノールで抽出された小麦グリアジンと異なる高次構造を有することが報告されている。このため，エタノールおよび純水で抽出された小麦グリアジンは表面特性など食品加工における特性が異なると予想されるが、その違いは未だ明らかになっていない。本研究では、エタノールおよび純水で抽出された小麦グリアジンの機能特性を明らかにするため、水溶性および起泡性について比較検討した。また，我々は小麦グリアジンを陽イオン交換樹脂により脱アミド化することで，低アレルゲン化することを報告しているが、エタノール抽出した小麦グリアジンよりも純水抽出した小麦グリアジンの方が効率的に脱アミド化できるかについても併せて検討した。
【方法】純水抽出小麦グリアジンは，裏出らが報告した方法を一部改変して調製した。一方，エタノール抽出小麦グリアジンは，60%エタノールを用いて抽出した。水溶性は，サンプルを純水に加えて撹拌後，遠心分離し，上清中のタンパク質濃度を測定することにより求めた。起泡性は，サンプルを水に加えた後ミルクフォーマーを用いて撹拌し，得られた泡の体積から評価した。さらに，サンプルをカルボキシレートタイプ陽イオン交換樹脂と混合・攪拌することで，脱アミド化純水抽出小麦グリアジンを得た。脱アミド化率は，未処理グリアジン，陽イオン交換樹脂で脱アミド化したグリアジン，塩酸で完全に脱アミド化したグリアジン中の窒素量を全窒素全炭素測定装置により測定し，樹脂で除去された窒素量の未処理グリアジン中のアスパラギンとグルタミンに含有される窒素量に対する割合から算出した。
【結果】エタノール抽出小麦グリアジンは純水への溶解性が非常に低く，純水中ではグリアジンの殆どが沈殿を形成した。一方，純水抽出小麦グリアジンは高濃度で水に溶解した。加えて，純水抽出小麦グリアジンは，エタノール抽出小麦グリアジンよりも高い起泡性を示した。脱アミド化率は，エタノール抽出小麦グリアジンが 28%だったのに対し，純水抽出小麦グリアジンは 43%だった。これらの結果より，水抽出した小麦グリアジンの優れた食品加工特性が示された。

Ethanol-extracted wheat gliadin, Water-extracted wheat gliadin, Deamidation

発表責任者：熊谷日登美（kumagai@brs.nihon-u.ac.jp）

講演番号：1B3a01
講演日時：3 月 24 日 09:00～ 1 号館 B3 会場

酒粕甘酒の機能性成分の探索　～アミノ酸とレジスタントスターチの機能性～

Search for functional component in sake cake type amazake ~ Functionality of amino acids and resistant starch ~

○冨田 麻理絵、根来 宏明、堤 浩子、秦 洋二（月桂冠（株））
○Marie TOMITA, Hiroaki NEGORO, Hiroko TSUTSUMI, Yoji HATA (Gekkeikan Sake Co.,Ltd.)

【背景・目的】甘酒は日本書紀や万葉集にも記され飲用されていた歴史は古く、近年では“飲む点滴”と言われ愛飲され、機能性が注目されている。甘酒には主原料として酒粕を用いるか米こうじを用いるかで 2 つの種類に分けられる。清酒醸造の副産物として得られる酒粕は、麹菌と酵母の発酵によって生成される多様な成分からなり、食物繊維やタンパク質、アミノ酸などが豊富に含まれる。我々はこれまでに酒粕や酒粕タンパク質に血中アルコール濃度低減効果[1)]、コレステロール低減、血中中性脂肪低下、血流改善効果[2)]など数多くの効用を報告してきた。しかし、甘酒の持つ有用機能における酒粕由来成分の寄与について報告は少ない。そこで、甘酒の主原料である酒粕と米こうじに着目して成分比較を行い、酒粕の機能性寄与物質の探索を行った。

【方法・結果】試料として当社で得られる酒粕を使用した。酒粕と米こうじをそれぞれ水抽出した水溶性画分のアミノ酸、有機酸、糖類の分析は高速液体クロマトグラフィーを用いた。分析の結果、アルコール代謝促進効果が認められているアラニンやアスパラギン酸、血管拡張作用のある一酸化窒素を産生するアルギニンも多く含まれており既報のアルコール吸収抑制効果や血流改善効果に寄与している可能性が考えられた。その他、リン酸、リンゴ酸を含む有機酸 3 種、エチル-α-グルコシドなどが有意に酒粕に多く、GABA、メチオニンを含むアミノ酸 5 種、クエン酸、グルコース、グリセロール、α-グルコシルグリセロール、マルトースなどが有意に米こうじに多く含まれていることが分かった。加えて、酒粕には清酒に溶出せずに残存する不溶性成分が多く含まれ、酒粕タンパク質の他、レジスタントスターチ（RS）も含まれていると考えられた。そこで、酒粕の RS を測定した結果、2.81 g/100 g 乾燥重量と、他の試料（白米、α 化米、米こうじ）に比べ約 10 倍多く含まれていた。RS は、難消化性で食後の急激な血糖値上昇を抑える効果や大腸内発酵を促進する働きが知られている。そこで、酒粕と米こうじを培地に添加し、*Bifidobacterium bifidum* の増殖試験を実施した。*B. bifidum* の増殖指標として培地中の有機酸生産を測定した結果、酒粕を添加することで有機酸が多く産生し、酒粕による *B. bifidum* 増殖促進効果が確認できた。また、酒粕における *B. bifidum* の増殖促進に寄与する成分については現在検討中である。

1）入江元子「酒粕による飲酒後のアルコール濃度低減効果」日本醸造協会誌 105, 440-446（2010）
2）村上直之ら「酒粕の体を温める効果」日本農芸化学会 2015 年度大会要旨 4F37a07（2015）

sake cake, amazake, resistant starch

講演番号：1B3a02
講演日時：3 月 24 日 09:11～ 1 号館 B3 会場

塩ストレス下で生育したトマト果実中のトランスクリプトーム解析

Transcriptome analysis in the fruits of tomato grown under salt stress.

○朝倉 浩子、山川 隆、阿部 啓子、朝倉 富子（東大院農生科）
○Hiroko ASAKURA, Takashi YAMAKAWA, Keiko ABE, Tomiko ASAKURA (Univ. of Tokyo)

＜背景＞

トマトはカロテン、リコペン、ポリフェノール、ビタミンCなどの有用成分を含み、生食だけではなく、さまざまな加工に供される世界中で最も消費量の多い野菜の１つである。トマトは、甘味、酸味、旨味のバランスが特に重要とされ、その特有の香りや味は品種を特徴付ける因子として解析されている。このように、品種改良による品質の向上や目的に合った品種の作出が試みられている一方で、栽培方法を工夫することで栄養性・嗜好性・機能性を向上させる試みも行われている。トマトをストレス条件下（乾燥、低栄養など）で栽培すると糖やアミノ酸、有機酸の生産量が増加することが知られている。果実の登熟期に植物体がストレスを受けると、そのストレスを解除するための代謝系が動く。ストレス応答ホルモンの増加やアミノ酸および硫黄代謝産物などの機能性成分も含まれていることが報告されている。そこで、本研究では、塩ストレス下で生育したトマト果実中の mRNA を解析し、トマトの生理機能に及ぼす影響を探ることとした。

＜方法・結果＞

実験用矮性品種であるマイクロトムを、通常条件下および高塩濃度条件下で養液栽培した。塩ストレス条件区は、NaCl が 0.4%になるように開花後から完熟期まで NaCl を養液に添加した。本実験では、成熟過程における遺伝子発現が完熟期の果実成分にどのような影響を及ぼすかを研究するため、登熟期の実をトランスクリプトーム解析に、完熟期の実をメタボローム解析に供した。前者では、非着色の果実を破砕し、多糖類等を除去した後、得られた RNA を定量・品質評価をし、ビオチンラベルおよびハイブリダイゼーションを行った。メタボローム解析は、完熟期の凍結乾燥果実からメタノール抽出後、上清をクロロホルムで抽出し、MSTFA を用いて誘導体化した後、GC-MS に供した。検出結果の解析は、既知化合物および未知化合物を対象に行った。結果、塩ストレス下に晒されたトマトの果実内において、複数の mRNA に顕著な発現量の有意な変動が見られ、中でも、イノシトールおよびガラクツロン酸等の生合成に変化が見られたことから、細胞壁および細胞膜の成分に関与する糖代謝が変化することが示唆された。

tomato, salt stress

講演番号：1B3a03
講演日時：3 月 24 日 09:22～ 1 号館 B3 会場

トランスサイレチン安定化作用を持つカルノシン酸の機能解析
Study on functions of transthyretin stabilizing compound, carnosic acid
○海切 弘子[1]、谷本 暁[1]、柴田 紗知[2]、味八木 茂[3]、松原 主典[1] ([1]広島大院・教育、[2]福山大・生命工、[3]広島大病院・未来医療センター)
○ Hiroko KAIKIRI[1], Aki TANIMOTO[1], Sachi SHIBATA[2], Shigeru MIYAKI[3], Kiminori MATSUBARA[1] ([1]Hiroshima Univ., [2]Fukuyama Univ., [3]Hiroshima Univ. Hospital)

【目的】アルツハイマー病（AD）のような加齢性疾患では、変性タンパク質が蓄積（アミロイド形成）することにより炎症を引き起こし、臓器の機能低下をもたらすプロテオーシスが知られている。従って、タンパク質変性を抑制し、アミロイド形成を遅らせることができれば、加齢性疾患の発症が遅れ健康寿命の延伸が期待できる。我々はアミロイド形成タンパク質の一つであるトランスサイレチン（transthyretin: TTR）に注目し検討を行っている。TTR はチロキシンやレチノールの輸送機能を持っているが、AD に関与しているアミロイドβ（Aβ）を脳から排出すること、さらには抗うつ効果の可能性があることからも注目を集めている。昨年度の本大会では、この TTR を安定化させる食品機能成分の探索結果とそれらの作用機構の一部について報告した。本発表では、引き続き検討を進めた結果について報告する。

【方法】脳の神経細胞では、加齢に伴い TTR の発現量が増加することが知られている。これは、Aβの排出を促すことにより、Aβ蓄積による毒性を避けるためだと考えられている。そこで、TTR 安定化作用を示した食品機能成分について、神経細胞モデル細胞である SH-SY5Y 細胞での TTR 遺伝子発現への影響について定量 RT-PCR 法で検討した。また、タンパク質発現については、蛍光免疫染色法で検討した。経口摂取による効果については、老化促進マウスを用い、行動試験と脳の免疫組織染色法により検討した。

【結果】SH-SY5Y 細胞を各種食品機能成分で 24 時間処理し、TTR 遺伝子発現への影響を検討したところ、ローズマリーに含まれるカルノシン酸（carnosic acd: CA）が最も強く誘導した。一方、TTR 遺伝子発現を抑制する成分もあった。CA について濃度や処理時間を変えて検討をしたところ、濃度依存的（～25 μM）に発現量が増加した。また、24 時間処理が最も強く誘導することが分かった。SH-SY5Y 細胞を 10 μM CA で 24 時間処理し、TTR に対する抗体を用いて蛍光免疫染色したところ、対照よりも強く染まり TTR の誘導がタンパク質レベルでも確認できた。
老化促進マウス（SAMP8）に 50 μM CA を長期投与し、脳機能への影響を行動試験で検討した結果、新規物体認識試験で CA 投与群の方が脳機能を維持できていることが確認できた。脳での TTR 沈着については現在解析を進めている。

Carnosic acid, Transthyretin, Aging

発表責任者：松原主典（kmatsuba@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：1B3a04
講演日時：3 月 24 日 09:33～ 1 号館 B3 会場

オートファジー活性を制御する食品成分の探索

Exploration of bioactive food factors for the control of autophagy flux

○藤元 萌、大西 康太、坂井 麻衣子、福田 哲平、大西 愛花、増田 真志、奥村 仙示、河合 慶親、竹谷 豊（徳大医）
○Moe FUJIMOTO, Kohta OHNISHI, Maiko SAKAI, Teppei FUKUDA, Aika OHNISHI, Masashi MASUDA, Hisami YAMANAKA-OKUMURA, Yoshichika KAWAI, Yutaka TAKETANI (Tokushima Univ. of Med.)

【目的】オートファジーは、細胞内に生じた異常分子に対する分解機構の一つであり、生体恒常性の維持に重要な働きを担う。近年、加齢や肥満に伴い、生体のオートファジー活性が減弱すること、また、本活性異常が幅広い疾病の発症と深く関与することが明らかとなっており、オートファジーを作用標的とした予防医学の発展に期待が寄せられている。一方、食品に含まれる多種多様なポリフェノール化合物群が、抗酸化活性や抗炎症活性に代表される幅広い生理機能性を有することも知られている。本研究では、日常的な食事から摂取可能なポリフェノール化合物群から、オートファジー活性を亢進する食品成分のスクリーニング試験を行った。
【方法と結果】オートファジー活性の評価には、水島昇らが開発した GFP-LC3-RFP-LC3 delta G プローブを用いた。本プローブは発現した後、細胞質内において Atg4 活性により直ちに切断され、等分子量の GFP-LC3 と RFP-LC3 delta G を産生する。GFP-LC3 はオートファゴソームに局在し、その後、オートファジー分解を受けるが、変異体である RFP-LC3 delta G は分解を免れるため、プローブ発現量に対する内部標準となる。つまり、GFP/RFP 蛍光強度比を評価指標としてオートファジー活性を定量することが可能である(Kaizuka *et al.*, *Mol. Cell*, 64 (4): 835-849, 2016)。まず、理研バイオリソース研究センター・遺伝子材料開発室より購入した pMRX-IP-GFP-LC3-RFP-LC3 delta G を、リポフェクション法により HeLa 細胞に導入した。Puromycin 存在下で 2 週間生存した細胞をプローブ安定発現株として回収した後、GFP・RFP 蛍光強度が共に高いシングルクローンを FACS により分取した。また、ハイコンテンツイメージングシステム Operetta を用いることで、作出した細胞の蛍光強度を正確、且つ、簡便に測定できるハイスループットスクリーニング系を構築した。
作出したプローブ発現細胞を 96 穴プレートに播種し、計 60 種類の食品成分をそれぞれ処理した（10μM、12 時間）。Operetta を用いて細胞内の蛍光強度を定量検出し、GFP/RFP 蛍光強度比を算出した結果、2,2’,4’-トリヒドロキシカルコン、3’-メチルルテオリン、イソラムネチンなどのポリフェノール化合物を処理した細胞において、オートファジー活性の亢進が認められた。現在、作用機序についての検討を進めている。
【謝辞】東京大学大学院医学系研究科 水島昇教授
徳島大学大学院医歯薬学研究部 総合研究支援センター先端医療研究部門
徳島大学先端酵素学研究所 藤井節郎記念医科学センター

Autophagy, Polyphenol, Functional food

発表責任者：大西 康太（ohnishi.kohta@tokushima-u.ac.jp）

講演番号：1B3a05
講演日時：3 月 24 日 09:44～ 1 号館 B3 会場

ローズマリーの加熱処理によって生成された新規化合物の構造解析と生理活性について
The Structures and Biological Activities of New Conpounds Generated by Heat Treatment of Rosemary

○酒見 裕香[1]、Bu-chin Yu[2]、濱島 留梨子[1]、森岡 優子[1]、山中 大介[3]、伯野 史彦[2]、高橋 伸一郎[2]、新藤 一敏[1] ([1]日女大・家政・食物、[2]東大・院農生・応物、[3]東大・院農生・獣医)
○ Yuka SAKEMI[1], Yu BU-CHIN[2], Ruriko HAMASHIMA[1], Yuko MORIOKA[1], Daisuke YAMANAKA[3], Fumihiko HAKUNO[2], Shin-ichiro TAKAHASHI[2], Kazutoshi SHINDO[1] ([1]Dep. of food and nutrition, Japan Women's Univ., [2]Dep. of Animal Resource Sciences, Gra. Sch. Univ. of Tokyo, [3]Dep. of Veterinary Medical Sciences, Gra. Sch. Univ. of Tokyo)

【目的】スパイスやハーブとして用いられているローズマリー（*Rosmarinus officinalis L.*）には carnosic acid (CA) や carnosol (CS)といったセスキテルペンが含まれ、これらには抗酸化作用や PPARγ agonist 活性（PPARγ agonist は繊維芽細胞の脂肪細胞の分化を促進させ、それによりインシュリンへの感受性が増すことで抗糖尿病作用が期待される）作用を有することが報告されている。ローズマリーは主に加熱調理して用いられるため、乾燥ローズマリー粉末を加熱処理して CA, CS 関連化合物が生じるか、生じていればそれらに抗酸化作用や PPARγ agonist 活性があるか否かを検討することとした。

【方法・結果】まず乾燥ローズマリー（4 g）をミキサーで粉末化し、フライパン上にて 4 分間中火で乾煎りした。加熱粉末を CH_2Cl_2-MeOH (1:1)で抽出した。未加熱の乾燥ローズマリー粉末（4 g）も CH_2Cl_2-MeOH(1:1)で抽出し、加熱処理抽出エキスと未加熱抽出エキスに存在する化合物の違いを HPLC で比較検討した（HPLC 条件 カラム: CAPCELLPAK MG-II 150 mm x 4.6 mm、溶媒 A 液：5% CH_3CN(v/v)+20 mM リン酸、溶媒 B 液：95% CH_3CN (v/v)+ 20 mM リン酸、 0 → 3 min A 100%, 3 → 23 min A 100% → B 100% linear gradient, 23 → 30 min B 100%, 検出:200-500 nm)。その結果、加熱処理抽出物にのみに検出される化合物（**1**～**5**）を発見した。

1～**5** の化合物を単離・構造解析するため、乾燥ローズマリー粉末（35 g）を加熱処理した。これを CH_2Cl_2-MeOH (1:1) 500 mL で抽出した（4.22 g)。次に抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒 : hexane-EtOAc (20:1), シリカゲル : silica gel 60)、さらに分取 HPLC（HPLC 条件 カラム: DEVELOPSIL C30 250 mm x 20 mm、溶媒: 90% CH_3CN、検出: 200-500 nm）で精製し、**1**～**5** をそれぞれ純品として得ることができた。得られた各化合物の重量は、**1**：30.0 mg, **2**：2.2 mg, **3**：5.4 mg, **4**：5.3 mg, **5**：3.2 mg であった。各化合物について ESI-MS, 各種 NMR 解析（^{1}H, ^{13}C, ^{1}H-^{1}H COSY, HMQC, HMBC, NOESY）を行った結果、**1** を dehydromiltirone, **2** を miltiodiol, **4** を miltirone と同定した。**3** 及び **5** は CAS database に登録の無い新規化合物であった。

抗酸化活性評価としては、ラット脳脂質過酸化抑制活性試験を実施した。その結果 **3** が CA と比較して、より優れた抗酸化活性を有することが明らかになった。

PPARγ agonist 活性としては、マウス 3T3-L1 前駆脂肪細胞への分化誘導促進活性を測定した。その結果、**3** 及び **5** が CA より強い脂肪細胞への分化誘導活性を有することが明らかとなった。

Rosemary, Antioxidant, PPARγ agonist activity

発表責任者：新藤一敏（kshindo@fc.jwu.ac.jp）

講演番号：1B3a06
講演日時：3 月 24 日 10:05～ 1 号館 B3 会場

瀬戸内海沿岸で養殖されたマガキ含有成分の解析および機能性の検討
Analyses of major components of oysters from Seto Inland Sea and biological function
礒野 千晶[1]、丸田 ひとみ[1]、三宅 剛史[2]、我如古 菜月[1]、花田 恭孝[3]、○山下 広美[1]([1]岡山県大、[2]岡山県工業技術センター、[3](株）マルト水産)
Chiaki Isono[1], Hitomi Maruta[1], Tsuyoshi Miyake[2], Natsuki Ganeko[1], Yoshitaka Hanada[3], ○ Hiromi Yamashita[1] ([1]Okayama Pref. Univ., [2]Industrial Technology Center of Okayama Prefecture, [3]Marutosuisan)

【目的】マガキ(Oyster, *Crassostrea gigas*) は、日本など多くの地域で養殖が行われ、食用とされている二枚貝である。マガキはタンパク質、グリコーゲン、タウリン、亜鉛、EPA や DHA などが豊富に含まれており栄養価が高いことが知られている。本研究では、瀬戸内海沿岸の複数地域で養殖されたマガキに含まれる主要成分の分析を行い、季節変動および養殖地域による違いについて解析し、瀬戸内海産マガキの特徴を明らかにすること目的とした。さらに、マガキに豊富に含まれているタウリンに注目し、その生理機能性について若干の検討を行った。
【方法】試料は、2013 年 11 月から 2014 年 4 月までの各月に岡山県、広島県、兵庫県で養殖、水揚げされたマガキを用いた。水分、灰分、およびタンパク質の含有量は常法により測定した。グリコーゲン含有量はアンスロン法により測定した。脂質含有量は Bligh and Dyer 法により測定した。脂肪酸組成は抽出した脂質をメチル化し、ガスクロマトグラフィーにより測定した。ミネラルは原子吸光光度計により測定した。遊離アミノ酸は乾燥試料から過塩素酸による抽出を行い、アミノ酸自動分析計により測定した。タウリンの機能性は、SD ラットおよび L6 筋管細胞を用いて行った。血中、培養液中、および組織内のタウリン濃度は逆相 HPLC により測定した。タンパク質発現はウエスタンブロット法により、遺伝子発現はリアルタイム PCR 法により解析を行った。
【結果・考察】すべての産地において 11 月から 4 月にかけて水分含量の減少とグリコーゲン含量の増加がみられた。マガキには脂肪酸として EPA や DHA が豊富に含まれており、遊離アミノ酸としてタウリンが豊富に含まれていた。岡山県産および兵庫県産マガキは広島県産と比較して、水分含量が低く、グリコーゲン含量が高かった。広島県産マガキは亜鉛含量が高かった。瀬戸内海沿岸地域で養殖されたマガキは、日本国内の他地域で養殖されたマガキと比較して亜鉛、鉄およびタウリン含量が高かった。タウリンを摂取した動物では摂取 1 時間後に血中タウリン濃度が有意に増加した。L6 筋管細胞にタウリンを添加するとリン酸化 AMPK のレベルが有意に増加し、MEF2A や PGC-1α の発現が増加したことから、AMPK を介した代謝調節が示唆された。また、デキサメタゾンによる筋萎縮モデルにおいて、萎縮関連遺伝子である Atrogin-1 及び MuRF1 の発現が抑制されたことから、タウリンが筋萎縮を抑制する可能性が示唆された。タウリンの作用の詳細なメカニズムに関しては今後の検討課題である。

Oyster, Components, Taurine

発表責任者：山下広美（yamashit@fhw.oka-pu.ac.jp）

講演番号：1B3a07
講演日時：3 月 24 日 10:16～ 1 号館 B3 会場

ビールのドリンカビリティ新規評価技術の構築
Temporal Dominance of Sensations (TDS) paired with dynamic wanting: a new method of sensory evaluation with consumers for a better understanding of beer drinkability
○脇平 崇浩[1]、宮下 聖子[1]、小林 稔[1]、上村 和彦[1]、Schlich Pascal[2] ([1]アサヒビール株式会社、[2]INRA, France)
○Takahiro Wakihira[1], Seiko Miyashita[1], Minoru Kobayashi[1], Kazuhiko Uemura[1], Pascal Schlich[2] ([1]Asahi Breweries, Ltd., [2]INRA, France)

ドリンカビリティはビールを評価する上で最も重要な観点の 1 つである。にもかかわらず、ビールのドリンカビリティを評価できる手法は確立されていない。本プロジェクトでは、消費者の飲用行動にできる限り近い方法でビールのドリンカビリティを評価することを目的とし、新規評価技術の構築を行った。

評価者はビールを飲み進めるにつれて変化する Wanting「飲み続けたい気持ち」を継続的に記録し、同様に「飲みやすさ」や香味感覚の変化についても飲み終わるまで記録を続けた。香味感覚の変化は時間軸官能評価の Temporal Dominance of Sensations（TDS 法）を用いて評価した。本発表では、２つの試験について評価設計と結果を報告する。1 つは訓練されたビール専門の官能評価パネルが行った試験、もう 1 つは訓練されていない一般のビール飲用者パネルが行った試験であり、評価には日本市場の市販品（４品、３品）を用いた。

結果は、Wanting「飲み続けたい気持ち」の移り変わりを捉えることの重要性を明らかにした。上述２試験の結果は共に、Wanting「飲み続けたい気持ち」は飲み始めには大差がなくても飲み進めるにつれて製品間差が広がってくる傾向を示した。一方、「飲みやすさ」の評価は飲み始めから飲み終わりまで製品間差に一貫性が見られた。さらに、「飲みやすさ」評価が低い製品は、飲み進めるにつれて Wanting「飲み続けたい気持ち」の減少度合いが大きいこともわかり、「飲みやすさ」がドリンカビリティに繋がっていることが示唆された。

これらの試験により、ドリンカビリティの高いビールの特徴も明らかになった。いずれの試験においても Wanting「飲み続けたい気持ち」のスコアが最も高かったビールは、他のビールと比べて突出した香味が少なく、感覚への蓄積効果が少なかったと考えられた。我々は、飲み進める間に受ける感覚負荷が多いほど、飲み続けたい気持ちが下がってくると推察している。この新規評価手法を用いて、今後も様々なビールや消費者のタイプに関して、ドリンカビリティに寄与する官能特性や消費者の満足度について理解を深めていきたい。

Temporal Dominance of Sensations (TDS), wanting, drinkability

講演番号：1B3a08
講演日時：3 月 24 日 10:27～ 1 号館 B3 会場

ビールの「飲みやすさ」に及ぼすキレ寄与成分の影響

A new methodology for dynamic "easiness to drink" with Temporal Dominance of Sensations (TDS) - good *kire* (crispness) of beer leading to easiness of drinking

○宮下 聖子、脇平 崇浩、小林 稔、上村 和彦（アサヒビール株式会社）
○Seiko MIYASHITA, Takahiro WAKIHIRA, Minoru KOBAYASHI, Kazuhiko UEMURA (Asahi Breweries, Ltd.)

日本市場でビールの美味しさを表現する言葉のひとつに「キレ」がある。キレについては国際的に認められた用語、定義は存在しないため、日本国内では、一般的に、キレを「風味（味、香り）に落差があって、かつ突出した風味が残らないこと」と定義している。我々はこれまでに、日本で市販されている主要な 14 種のビール類を官能評価と機器分析により網羅的に分析し、その関連性を解析することにより、キレには呈味と香気成分の両方が重要であり、キレに直接寄与する成分（中鎖脂肪酸、エステル、ホップ香等）についても明らかにしてきた。そこで本研究では、ビールのキレに寄与する成分が「継続飲用における飲みやすさ」にも影響を及ぼすかどうかを明らかにすることを目的とした。官能評価においては、Liking の決め手となる製品特徴を導き出すために開発された Temporal Drivers of Liking（TDL 法）を参考に、ビールの「飲みやすさ」を継続的に評価する新規評価技術を構築した。「飲みやすさ」の継続飲用評価では、事前の官能評価で最もキレの評価が高かったビール、及び顕著にキレの評価が低かったビールを実験試料とした。訓練された評価者が試料を繰り返し 5 口飲み進める毎に、Temporal Dominance of Sensations（TDS 法）で「最も気になる感覚」の経時的な変化を記録し、TDS 後にラインスケール上で「飲みやすさ」の評価を行った。その結果、キレの評価が高いビールは、キレの評価が低いビールよりも有意に「継続飲用における飲みやすさ」の評価が高く、「飲みやすさ」に寄与する官能特性についても試料間で差異が認められた。さらには、ビールのキレを抑制する効果が確認されているキレ寄与成分群を、キレと「飲みやすさ」両方の評価が高かったビールへ添加し、これらの成分群が「飲みやすさ」に及ぼす影響について調査した。本発表の最後に、添加官能評価の結果と、「飲みやすさ」がドリンカビリティに繋がっていることを示唆する結果についても併せて報告する。

beer, easiness to drink, Temporal Dominance of Sensations (TDS)

講演番号：1B3a09
講演日時：3 月 24 日 10:38～ 1 号館 B3 会場

様々な魚肉を用いたさつま砂糖漬け製法の有用性評価
Utility evaluation of method for producing miso- and sugar- preserved fish meat
○福田 翼、小林 聡子、辰野 竜平、古下 学（水産機構・水大校）
○Tsubasa FUKUDA, Satoko KOBAYASHI, Ryohei TATSUNO, Manabu FURUSHITA (National Fisheries Univ.)

【目的】さつま砂糖漬け製法とは、三年味噌への漬け込み処理と砂糖への漬け込み処理を利用した薩摩地方（鹿児島県）の保存法である。さつま砂糖漬けは、江戸時代における鯛に着目した料理集「鯛百珍料理秘密箱」（1785 年）に「さつま砂糖漬け鯛」として記載されている。同料理集には「風を通さなければ長期保存が可能である」と記され、保存食であった推測される。これまでの研究成果より、タイ魚肉を使用したさつま砂糖漬けは、味噌漬け処理を行わない（以下、未処理）魚肉よりも保存中の細菌数が低くなった。また、味噌漬けを行ったタイ魚肉における砂糖漬け処理は砂糖漬けを行わない魚肉よりもタイ魚肉を硬くし、暗色化した。さらに、味噌漬け処理および砂糖漬け処理は嗜好性を高める結果となった。したがって、さつま砂糖漬け製法はタイ魚肉の保存に有効であることが示唆された。そこで、さつま砂糖漬け製法の有用性を評価するため、江戸時代の薩摩地方で漁獲されていたカツオ、スズキおよびブリを用いて製造を試みた。保存期間中の各魚肉における微生物数挙動を調査したので報告する。また、化学分析および物理分析結果についても報告する。
【方法】さつま砂糖漬け鯛は、「鯛百珍料理秘密箱」を参考にして製造した。すなわち、まず、三枚におろしたマダイ、カツオ、スズキおよびブリの魚肉重量に対して 5%の食塩を添加し、滅菌した紙タオルに包み 4°C で一昼夜保存した。保存した魚肉を 1 cm 程度に切断した後、滅菌ガーゼに包み、三年味噌に漬け込んだ（4°C、48 時間）。三年味噌漬け処理を行った（以下、味噌漬け）魚肉または味噌漬け処理を行わない（以下、未処理）魚肉をガラス容器に入れ、魚肉重量に対して 20%の砂糖を添加し、容器を密封後、20°C で 3 ヶ月目まで発酵させた。
【結果】保存期間中におけるマダイ、カツオ、スズキおよびブリの細菌数は、味噌漬け魚肉よりも未処理魚肉の方が低かった。同様に、保存期間中におけるマダイ、カツオ、スズキおよびブリの乳酸菌数は、味噌漬け魚肉よりも未処理魚肉の方が低かった。一方、保存期間中におけるマダイ、カツオ、スズキおよびブリの酵母数は、味噌漬け魚肉の方が未処理魚肉よりも高かった。マダイ、カツオ、スズキおよびブリの水分は、味噌漬け魚肉の方が未処理よりも低かった。また、これらの水分は保存期間中における変化は見られなかった。したがって、さつま砂糖漬け製法は、カツオ、スズキおよびブリ魚肉においてもマダイ魚肉と同様の効果が得られる事が示唆された。現在、化学分析および物理分析を行っている。

traditional food, food preservation, seafood process

講演番号：1B3a10
講演日時：3 月 24 日 10:49～ 1 号館 B3 会場

筋芽細胞モジュールの積層による培養肉の構築

Tissue culture technique using myoblast modules for construction of “cultured-meat”

○古橋 麻衣[1,2]、森本 雄矢[2]、島 亜衣[2]、仲村 太志[1]、石川 博[3]、竹内 昌治[2]([1]日清食品 HD（株）グローバルイノベーション研究センター、[2]東京大学生産技術研究所、[3]筑波大学医学医療系)
○ Mai FURUHASHI[1,2], Yuya MORIMOTO[2], Ai SHIMA[2], Futoshi NAKAMURA[1], Hiroshi ISHIKAWA[3], Shoji TAKEUCHI[2] ([1]Nissin Foods Holdings Co., Ltd Global Innovation Center, [2]Institute of Industrial Science, The University of Tokyo, [3]Faculty of Medicine, The University of Tsukuba)

【背景・目的】
人口増加や新興国の所得増加に伴い、食肉需要は増大している。一方で、家畜の飼料となる穀物価格の高騰や飼育場所確保の問題から、食肉供給量を増やすことは難しく、代替肉の開発が期待されている。培養肉は、培養により増やした骨格筋細胞を用いて組織を形成することで作られる。実験室内で生産可能なことから気候変動に左右されない生産が可能であり、また従来の畜産と比較し温室効果ガス排出量が少なく環境負荷も小さい。しかし、ステーキ肉のような食感を持つ食肉を細胞から作り出すためには、成熟した三次元筋組織を構築する必要がある。再生医療分野ではヒトやマウスの骨格筋細胞を用いて三次元筋組織の構築が試行されているが、培養肉を見据えた家畜細胞での検討はほとんどなされていない。そこで我々は、培養肉の実用化を目指し、ウシ骨格筋細胞を用いて三次元組織の構築を試みた。

【方法・結果】
筋芽細胞は分化に伴い、細胞同士が融合して、多核の筋管を形成する。まず、ウシ細胞の筋分化条件について調べるため、牛肉から採取したウシ筋芽細胞をシャーレ上で培養した。その結果、培養 7 日目で多核の筋管が観察された。また、培養液にビタミン C を添加することにより、ビタミン C 濃度依存的な筋管数の増大が認められた。上記培養条件を基に、牛肉から採取したウシ筋芽細胞をハイドロゲルに包埋し、両端を固定して三次元的に培養した。その結果、三次元組織内で筋管が観察された。加えて、α-actinin の免疫染色の結果、筋管において特徴的なα-actinin の縞状の分布が観察された。さらに、大型三次元組織構築のため、筋芽細胞含有ハイドロゲルにスリットを設けた筋芽細胞モジュールを作製し、これを積層し三次元培養を試みた。その結果、本積層法で形成した三次元組織中でも筋管の観察に成功した。今後は、より大きな組織形成を目指した栄養供給方法の確立および三次元組織の成熟条件の解明を進めていく。

cultured-meat, three dimensional culture, vitamin C

講演番号：1B3a11
講演日時：3 月 24 日 11:10～ 1 号館 B3 会場

界面活性剤を利用して作製したポリ乳酸製濾過膜の濾過特性

Filtration characteristics of PLLA membrane prepared with the aid of a surfactant

○田中 孝明、民部 裕洋、水野 陽樹、渋谷 裕紀、落合 秋人、谷口 正之（新潟大）
○ Takaaki Tanaka, Hiromi MINBU, Haruki MIZUNO, Yuki SHIBUYA, Akihito OCHIAI, Masayuki TANIGUCHI (Niigata Univ.)

【目的】濾過分離は飲料や液状食品素材の清澄化など，多くの食品製造プロセスで用いられているが，目詰まりした濾材の再生や廃棄が問題となる。当研究室では各種相分離法を用いて，使用後にコンポスト化（堆肥化）処理可能なポリ（L-乳酸）（PLLA）製濾過膜を開発している[1-3]。ポリ乳酸は循環型社会を支える生分解性バイオマスプラスチックとしても注目されている。本研究では，界面活性剤を含む溶媒を用いて作製したポリ乳酸製濾過膜[3]について，膜の構造や濾過圧力が濾過特性に与える影響について検討した。

【実験方法】ポリ乳酸製濾過膜はポリマー濃度 10%とし，溶媒中の界面活性剤 Tween 80 濃度 15%を含む 1,4-ジオキサン溶媒にポリ乳酸を溶解させたポリマー溶液を，厚さ 0.5 mm の枠を有するガラス板上にキャストした。これを非溶媒である精製水に浸漬し，非溶媒誘起相分離法により作製した[3]。作製したポリ乳酸製濾過膜について，精製水の濾過実験（10 kPa）から求めた濾過速度より濾過抵抗を，乳酸菌（*Lactobacillus plantarum*, ϕ0.7 μm×2.5 μm）懸濁液を用いた濾過により，粒子の濾過特性を評価した。

【結果と考察】作製したポリ乳酸製濾過膜を走査型電子顕微鏡で観察すると緻密な構造を持つ平滑面と粗面があり，粗面側に開放孔を有する指状孔構造を有することが確認できた。このため，粗面側から濾過を行うと，膜内部で分散して菌体を阻止するデプスフィルターとして作用し，濾過抵抗の増加を低減できると考えられた。そこで，乳酸菌懸濁液の濾過実験を行ったところ，粗面側から濾過した場合の方が平滑面側から濾過した場合と比較して濾過速度が高かった。濾過後の膜をグルタルアルデヒドで固定化後，走査型電子顕微鏡で観察したところ，平滑面側から濾過した場合は，膜面上に菌体層が形成されていたのに対して，粗面から濾過した場合は膜内に分散して菌体が保持されている様子が見られた。濾過圧力を 10 kPa から 50 kPa へ高めると平滑面側，粗面側とも濾過速度が増加した。一方，50 kPa から 100 kPa と高めたときは，いずれの面から濾過した場合でも濾過速度の増加はわずかであった。本研究で作製したポリ乳酸製濾過膜では粗面側から 50 kPa で濾過を行うと効率良く濾過できることが示された。

1) T. Tanaka *et al*., J. Membr. Sci. 238 (2004) 65-73.
2) T. Tanaka *et al*., J. Membr. Sci. 396 (2012) 101-109.
3) H. Minbu *et al*., J. Membr. Sci. 479 (2015) 85-94.

poly(L-lactic acid), membrane, filtration

発表責任者：田中孝明（tctanaka@eng.niigata-u.ac.jp）

講演番号：1B3a12
講演日時：3 月 24 日 11:21～ 1 号館 B3 会場

ゲル状食品の力学的特性とテクスチャー評価
Mechanical properties and texture evaluation of gel-like foods
○鬼島 直子[1]、砂押 諒[2]、真坂 知克[2]、石川 大太郎[2]、藤井 智幸[2] ([1]東北大未来研、[2]東北大院農)
○Naoko KIJIMA[1], Rou SUNAOSHI[2], Masyaktu MASHAKA[2], Daitaro Ishikawa[2], Tomoyuki FUJII[2] ([1]Tohoku Univ. NICHe, [2]Tohoku Univ. of Agric)

【目的】食べ物のおいしさには、テクスチャーが大きく関わっている。ゲル状食品のテクスチャーにおいては様々な因子が複合的に関与しているにもかかわらず、硬さについては破断強度のみで捉えることが多い。一方で、ヒトの感覚を模したテクスチャー測定から得られる硬さ、付着性、凝集性などの指標にはレオロジーに基づいた理論的裏付けが無い。そこで本研究ではテクスチャーの指標としてレオロジー特性である弾性と破断に着目し、ゲル状食品をゴム弾性体として捉える評価法について検討を行った上で、力学物性値とその官能特性との相関について実験的に検討した。
【方法】市販のゲル状食品を 6 種選び、10 ㎜角の立方体に成形した試料をクリープメーター（株式会社山電 RE2-3305S）を用いた力学物性試験に供した。①接触面が 10×10 ㎜（100 ㎡）のプランジャーを用いた弾性測定、②楔形プランジャーを用いた破断測定、③直径 1 ㎜のプランジャーを用いた貫入測定を行った。圧縮速度 0.1 ㎜/s、測定温度 25℃とした。弾性測定によって得られた応力-ひずみ曲線を、理想ゴムモデルを大変形領域まで拡張した BST 式[1)] を用いて解析した。破断測定からは破断応力と破断深さを、貫入測定からは貫入破断応力と貫入破断深さを求めた。官能評価は日本食品分析センターに依頼し、「日本語テクスチャー用語[2)]」の中からゲル状食品において多く使われる用語を選抜し、評点法で行った。そして官能評価値と力学物性パラメーターについて多変量解析を行った。
【結果】6 種のゲル状食品の弾性測定における応力-ひずみ曲線について、試料によって適用できる範囲に差があったが、ひずみ 0.15 から 0.35 までの範囲で良好に記述することができ、BST 式の弾性パラメーターE と非線形指数 n を求めることができた。官能評価に用いる用語は、「日本語テクスチャー用語」（全 445 語）から、まず小分類中に提示された食物名のうちゲル状食品の食物名の数の割合が 8 割以上であるものとして選抜された 4 つの小分類のそれぞれに分類される「ぷりぷり」、「しなやか」、「ぷるぷる」、「くにゃくにゃ」の 4 語とした。これらは全て弾性的表現であったため、破断を表す用語として 2 語（「切れやすい」、「くずれやすい」）選出し、計 6 語で官能評価を行った。6 個のから 4 個ずつ選んだ力学物性パラメーターの組み合わせと 6 語のテクスチャー用語との相関を検討したところ、「ぷりぷり」の官能評価値について、危険率 5 %で予測に役立つと推定される回帰関数が得られた。1) P. J. Blatz et al., Transactions of the Society of Rheology 18, 145-161 (1974). 2) 早川文代ら, 日本食品科学工学会誌, 52(8)337-346 (2005).
本研究は、農林水産省「『知』の集積と活用の場による革新的技術創造促進事業」により行われた。

gelike food, texture, mechanical properties

発表責任者：鬼島直子（naoko.kijima.d4@tohoku.ac.jp）

講演番号：1B3a13
講演日時：3 月 24 日 11:32～ 1 号館 B3 会場

凍結・解凍に伴う魚肉タンパク質ゲルの状態変化の解析
State Transformation of Fish-Protein Gel with Freeze-Thawing
○門田 佳奈、石川 大太郎、藤井 智幸（東北大院農）
○Kana MONTA, Daitaro ISHIKAWA, Tomoyuki HUJII (Tohoku Univ.)

【目的】凍結は食品の貯蔵法の一つである。食品を凍結すると、化学的変化、酵素的変化、微生物的変化が抑制されるため、食品の貯蔵の際に広く利用されている。しかし、水産練り製品については製造業者によって、あるいは製品によって凍結保存が可能であったり不可能であったりと一定していない。これは凍結条件が充分に制御されていないためと思われる。そこで、品質劣化の無い凍結・解凍技術の確立を目的とし、魚肉タンパク質ゲルを対象として凍結・解凍による状態変化について実験的に検討した。
【方法】試料として水分含量 77%、食塩濃度 2.05%のスケトウダラすり身を選んだ。これを真空シールし、スチーマーを用いて中心温度 95℃以上で 20 分間加熱してゲル化させた後、室温で 25℃まで徐冷したものを―25℃フリーザー、または液体窒素を用いて中心温度を―25℃まで冷却して凍結し、―25℃で一晩保存した。解凍は室温で行った。このような凍結・解凍操作を 1～4 回繰り返した。各試料について固形質量当たりの水分保持率を算出した。さらに、赤外分光測定に供し、試料内のタンパク質の二次構造、また水の状態の変化について解析を行った。赤外分光測定は FT/IR-350（JASCO）にて透過法、ATR 法で行い、積算回数は 256 回とした。
【結果】水分保持率の測定の結果、魚肉タンパク質ゲル中の水は、凍結・解凍によって自然と遊離する自由水、遠心操作を加えることで遊離する束縛水、遠心分離後もゲル中に保持される結合水の 3 種類に分けられることが明らかとなった。そして、凍結・解凍の繰り返しにより自由水、束縛水は共に増加し、結合水は減少した。液体窒素を用いて冷却した試料は－25℃フリーザーを用いて冷却した試料と比較して自由水、束縛水の増加率は小さく、結合水減少傾向についてもその変化は小さかった。このことから凍結・解凍操作によりゲルの保水能が低下し、この傾向は凍結速度が小さいほど顕著であることが示された。ゲルの保水能低下の原因として、タンパク質の構造変化が考えられたが、FTIR 測定の結果、タンパク質の二次構造にほとんど変化は認められなかった。一方、300～4000cm^{-1}の二次微分スペクトルを比較したところ、3250cm^{-1}付近のシグナルが保水能の低下に伴い高波数側にピークシフトすることが明らかとなった。このように、魚肉タンパク質ゲルを凍結・解凍することで変化するゲル内部の水の状態を評価する分子分光マーカーを見出すことができた。このシグナルは水の伸縮振動の偏光成分であり、凍結・解凍操作によって水素結合が弱まったことでピークシフトが生じたと考えられた。

frozen storage, syneresis, IR spectoroscopy

講演番号：1B3a14
講演日時：3 月 24 日 11:43～ 1 号館 B3 会場

分光学的手法を用いた物理的変換操作による米粉の構造変化解明に関する研究

Study on the change in powder structure of rice flour due to mechanical shock using spectroscopy

○石川 大太郎、澤 いくみ、楊 嘉敏、藤井 智幸（東北大院農）
○Daitaro ISHIKAWA, Ikumi SAWA, Jiamin YANG, Tomoyuki FUJII (Tohoku Univ.)

[緒言]
食品の品質・物性は、構造に依存する。故に、食品加工とは、物理的変換操作によって構造を変化させ高品質な製品を作ることに他ならない。米粉を含めたコメ食品は結晶性の生体高分子であるデンプンが主成分である。従って、米粉の物性と構造との相関関係を理解し高品質化を実現するためには、高分子の結晶構造、分子間・分子内相互作用を解明することが必須である。しかし米粉の場合、粉砕等の物理的変換操作による結晶多形の変化やその不均一性などのマクロ構造は、いまだ体系化されるには至っておらず、品質制御や利用拡大の妨げとなっている。分光分析的手法は、非破壊的な構造評価や相互作用の明確化に有効である。そこで、本研究では、XRD による構造解析、収着特性解析と分光学的手法を相補的に用いることで、物理的変換操作による米粉構造の変化解明に関する研究を実施した。

[実験方法]
ひとめぼれ（平成 26 年，宮城県産）を原料とし，異なる粉砕方法によりα化米粉を含む 5 種類の米粉を得た。そしてピンミルにてスクリーン径を変えて 2 回粉砕したものを米粉 a，小型微粉砕機により粉砕したものを米粉 b，ピンミル粉砕した後，小型微粉砕機により粉砕したものを米粉 c，湿式粉砕したものを米粉 d，α化米を粉砕したものを米粉 e とした。各米粉に対して、XRD 測定および近赤外分光測定に加え、水分活性、含水率測定を実施した。

[結果および考察]
XRD 測定は、結晶性米粉とα化米粉を明確に分離しそれぞれの結晶化度が異なることを示した。DI とデンプン損傷度は、高い正の相関を示した(R2=0.923)。水分収着特性は、GAB 式によりよく説明され、GAB パラメータ Qm は、DI と負の相関を示した。この結果は、米粉の収着サイトが減少したことを示唆した。さらに、パラメータ K と DI には、正の相関が観察された。つまり米粉と水分子間の相互作用物理的変換操作によって弱まった可能性が示唆された。SEM 画像は、多湿状態にさらされた米粉の状態変化を明確に示しており、パラメータ K の変化が、固体の構造変化を反映するという可能性を支持した。
各米粉の近赤外分光スペクトル(1000-2350 nm)は，1440-1470 と 1920-1980nm に，水の OH 由来のピークが存在し，2100-2400nm 付近にデンプンの OH 基に帰属されるバンドが認められた。各米粉の二次微分スペクトルは、非晶部分からなる米粉 e では，2240nm 付近のデンプン由来の OH 基のピークが他の米粉に比べて短波長側にシフトしていた。また，ピーク強度は他のサンプルに比べて低くなった。このことから米粉のデンプン結晶由来のピーク抽出の可能性が示唆された。スペクトルの主成分分析結果から、第一主成分得点は，米粉 e では負の値を，その他では正の値をとり結晶化度と相関を示した。

disorder index, GAB parameters, spectroscopy

講演番号：1B3a15
講演日時：3 月 24 日 11:54～ 1 号館 B3 会場

5 つの基本味溶液嚥下時における表面筋電図と嗜好性の関連解析

Analysis of correlation between surface electromyogram and taste palatability at the time of swallowing with five basic taste solutions

○梅谷 華奈[1]、上田 玲子[1]、小西 史子[2]、安岡 顕人[1]、阿部 啓子[1,3]、朝倉 富子[1]（[1]東大院・農生科、[2]女子栄養大・栄、[3]KISTEC）
○Kana UMETANI[1], Reiko UEDA[1], Fumiko KONISHI[2], Akihito YASUOKA[1], Keiko ABE[1,3], Tomiko ASAKURA[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Kagawa Nutrition Univ., [3]KISTEC)

（背景・目的）近年、高齢者の誤嚥による肺炎が増加傾向にあり、高齢化が進んでいる日本において嚥下しやすい食品開発への社会的ニーズが高まっている。現在、嚥下調整食の物性基準や感覚的な指標による区分がいくつか設けられているが、その区分は摂食者の味覚に対する嗜好を反映していない現状にある。しかし、嚥下は摂取した食品に対する嗜好性にも影響を受けている。
本研究では、官能評価による嗜好の評価と生体側の応答を表面筋電位計で測定し、嗜好性と生体応答の対応関係を明らかにすることを目的とした。
（方法）食品には味、匂い、物性といった様々なファクターが存在するが、本研究では味に着目することとした。基本呈味質である甘味・苦味・塩味・酸味・旨味の 5 味について、嗜好・忌避濃度が含まれるように、濃度設定を検討した。濃度設定した各溶液の強度及び嗜好について 9 段階尺度を用いた官能評価を実施した。次に、パネルが各溶液 7.5ml を嚥下する際のオトガイ舌骨筋の筋電図を表面筋電位計 P-EMG plus を用いて測定した。官能評価による嗜好の評価と筋電位測定パラメーターについてピアソンの積率相関係数を求めることで相関性を検討した。なお、今回は口腔内に障害のない 20 代、女性健常者をパネルとして用いた。
（結果・考察）基本呈味質の 5 味について、嗜好・忌避濃度が含まれる 5 段階の濃度水準を設定した。設定した濃度水準を用いて 41 名のパネルで官能評価を行い、クラスター分析を実施した結果、嗜好の説明力が高い（$R^2 > 0.89$）13 のクラスターに分けることができた。各クラスターから抽出した約半数の代表者に筋電位測定を行い、ピアソンの積率相関係数を算出した結果、いくつかの呈味質において、嗜好の官能値と筋電位値に相関がみられた。
このことより、味覚に対する嗜好性はオトガイ舌骨筋の応答に関与している可能性が示された。

本研究は、総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」によって実施された。

electromyogram, sensory evaluation, swallowing

発表責任者：朝倉富子（asakura@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：1B3p01
講演日時：3 月 24 日 13:50～ 1 号館 B3 会場

クロロゲン酸摂取による非アルコール性脂肪性肝疾患抑制機序に関する研究

Study on suppressive mechanism of non-alcoholic fatty liver disease by chlorogenic acid

○渡邉 衛央、橋本 堂史（神戸大院・農）
○Morio WATANABE, Takashi HASHIMOTO (Kobe Univ.)

【背景・目的】当研究室では肥満を伴わない非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）の動物モデルである SHRSP5/Dmcr ラットを用いた研究により、クロロゲン酸（CGA）の経口投与が NAFLD 初期の脂肪肝形成を抑制することを示した（第 19 回日本フードファクター学会学術集会）。一方、消化管から一部の CGA はそのまま吸収されるが、多くは腸内細菌によりカフェ酸（CA）、ジヒドロカフェ酸（dCA）、フェルラ酸（FA）、ジヒドロフェルラ酸（dFA）などへ代謝されることが知られている。このことから、これらの腸内細菌代謝物が脂肪肝を抑制していると考えた。本研究では SHRSP5/Dmcr ラット肝臓中の CGA および CGA 腸内細菌代謝物の濃度を明らかにするとともに、CGA の腸内細菌代謝物が肝細胞への脂肪蓄積に及ぼす影響を調べた。
【方法】SHRSP5/Dmcr ラット（9 週齢、雄）に通常飼料または NAFLD 誘導のための高脂肪・高コレステロール（HFC）飼料を自由摂取させた。肝臓へ CGA 及び CGA 腸内細菌代謝物の肝臓蓄積量を測定するため、この間、毎日 2 ml の 7.5 mg/ml CGA 水溶液を胃内強制投与し、二週間後に肝臓を摘出した。CGA 及び CGA 腸内細菌代謝物の体内動態を調べるため、二週間通常飼料または HFC 試料を自由摂取させた SHRSP5/Dmcr ラットに 2 ml の 7.5 mg/ml CGA 水溶液を単回胃内強制投与し、0、0.5、1、2、8 時間後に肝臓を摘出した。摘出した肝臓は重量を測定した後、HPLC による CGA 及び CGA の腸内細菌代謝物量の分析に用いた。また、ヒト肝がん由来 HepG2 細胞を CGA 腸内細菌代謝物で処理した後、0.5 mM 脂肪酸（オレイン酸：パルミチン酸＝2：1）を添加することで細胞内に脂肪蓄積を誘導させた。24 時間後に細胞を回収し、Nile Red 染色液によって細胞内脂肪滴を染色し、フローサイトメーターを用いてその蛍光強度を測定した。
【結果および考察】通常飼料を摂取したラット肝臓中への CGA 腸内細菌代謝物の蓄積は見られなかったが、HFC 試料により NAFLD を誘導したラットの肝臓中には CA、FA、dFA が蓄積していた。CGA 単回投与後の肝臓における腸内細菌代謝物の動態は、投与 0、0.5、1、2、時間後では通常飼料及び HFC 試料を摂取していた群間に差はなかったが、8 時間後において HFC 試料を摂取していた群で CA、dCA、FA、dFA が増加していた。HepG2 細胞は脂肪酸存在下で培養することにより細胞内脂肪蓄積量が有意に増加した。一方、CA 処理はこの増加を有意に抑制した。これらの結果から、HFC 試料を与えたラットでは肝臓に CGA 腸内細菌代謝物が蓄積し、特に CA が肝臓への脂肪蓄積を抑制すると考えた。現在、CA の脂肪蓄積抑制の機序について検討中である。

Chlorogenic acid, Non-alcoholic fatty liver disease, Caffeic acid

発表責任者：渡邉衛央（dfutu3010@gmail.com）

講演番号：1B3p02
講演日時：3 月 24 日 14:01～ 1 号館 B3 会場

熟成ニンニク抽出液（AGE）によるアルコール代謝促進効果の検証

Effects of aged garlic extract (AGE) on alcohol metabolism

○井上 雅子[1]、袁 思豪[1]、北風 智也[2]、吉岡 泰淳[3]、芦田 均[1] ([1]神戸大院農、[2]神戸大院イノベ、[3]甲南女子大)
○ Masako INOUE[1], Sihao YUAN[1], Tomoya KITAKAZE[2], Yasukiyo YOSHIOKA[3], Hitoshi ASHIDA[1] ([1]Grad. Sch. Agri. Sci., Kobe Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [3]Faculty Clin. Nutr. Diet., Konan Women Univ.)

【背景・目的】
体内に吸収されたエタノールは、アルコール脱水素酵素（ADH）によって有害なアセトアルデヒドに代謝された後、アルデヒド脱水素酵素（ALDH）により、無毒な酢酸へ分解される。熟成ニンニク抽出液（AGE）は、生ニンニクをエタノール溶液中に約 20 ヶ月浸漬することで得られる食品素材である。先行研究において、AGE は抗酸化作用、心血管保護作用、ならびに肝臓保護作用などの機能性を有することが報告されているが、アルコール代謝に関する機能性は明らかにされていない。本研究では、AGE がアルコール代謝に与える効果を検証するとともに、その作用機序の解明を目的とした。
【方法】
ヒト肝癌由来 HepG2 細胞に AGE を 48 時間処理した後、ミトコンドリア画分を得た。ミトコンドリアおよびポストミトコンドリア画分にプロピオンアルデヒドを作用させ、NADH 産生量を指標として、各画分における ALDH 活性を測定した。また、ミトコンドリアに局在する ALDH2 および細胞質に局在する ALDH1A1 のタンパク質発現量をウェスタンブロッティングにより検討した。次に、HepG2 細胞に 4 mg/ml の AGE を１、３、または 6 時間処理し、核内における Nrf2 の発現量を検討した。
【結果・考察】
AGE の 48 時間処理により、HepG2 細胞のミトコンドリア内の ALDH 活性および ALDH2 発現量が、濃度依存的に増加した。一方、細胞質中の ALDH 活性および ALDH1A1 の発現量は、AGE の処理で変化しなかった。ALDH2 の転写因子である Nrf2 の核内移行量を検討した結果、１、３、ならびに 6 時間の AGE 処理によって、増加した。したがって、AGE は Nrf2 の核内移行を促進することで、Nrf2/ARE 経路を介して ALDH2 の発現量を増加させ、ミトコンドリアにおけるアセトアルデヒドの代謝を促進することが示唆された。以上のことから、AGE は、肝臓におけるアルコール代謝促進効果を有する食品素材として、有用性が期待される。現在、AGE に含まれている *S*-アリルシステインおよび *S*-アリルメルカプトシステインが、HepG2 細胞の ALDH 活性と ALDH 発現量に与える影響を検討している。

Aged garlic extract, Aldehyde dehydrogenase, Nrf2

講演番号：1B3p03
講演日時：3 月 24 日 14:12～ 1 号館 B3 会場

鮒ずし由来乳酸菌 FS-1 投与による高スクロース食摂取ラットの脂質代謝および便通への影響
Effect of administration of *Lactobacillus Plantraum FS-1* from Funazushi to rats fed a high sucrose diet on lipid metabolism and the functions of the intestines

○内田 健志[1]、冠野 由衣[2]、藤谷 美菜[2]、岸田 太郎[2]([1]日本水産株式会社　食品機能研、[2]愛媛大院農)
○Kenji UCHIDA[1], YUI KANNO[2], MINA FUJITANI[2], TARO KISHIDA[2] ([1]Nippon Suisan Kaisha, Ltd., [2]Ehime Univ.)

【目的】鮒ずしは、古来より滋賀県を中心に食されている伝統発酵食材である。鮒すし由来の乳酸菌のうち、すり身の発酵能力が高いことを特徴とする乳酸菌（*Lactobacillus plantarum subsp. FS-1* 株）を発見した。乳酸菌には、免疫賦活作用、整腸作用、抗ストレス作用、脂質代謝促進作用など、様々な作用が報告されている。本研究では、高スクロース食摂取ラットを用いて、FS-1 株の死菌粉末（以下、乳酸菌 FS-1）投与による脂質代謝および便通への影響について検討を行った。
【方法】４週齢、SD 系雄性ラットを 2 群に分け、高スクロース食と 2%乳酸菌 FS-1 株配合高スクロース食を 2 週間摂取させ、体重、摂餌量、脂肪（副睾丸周囲、腸管膜、腎周囲）、糞（重量、コレステロール量、胆汁酸量）、肝臓（重量、コレステロール量、中性脂肪量、脂質代謝関連因子遺伝子発現）および血清（コレステロール濃度、中性脂肪濃度）について評価を行った。高スクロース食は、AIN-93G 基本食のα-コーンスターチとスクロースが同量となるように、配合を変更し調製した。
【結果】体重、飼料摂取量は、両群において変化がなかった。脂肪重量は有意ではないが減少する傾向が見られた。糞重量、糞中総脂質量、糞中胆汁酸量は、乳酸菌 FS-1 の投与により有意に増加した。肝臓重量には変化はなかったが、乳酸菌 FS-1 の投与により肝臓中のコレステロール量が有意に減少し、中性脂肪量に減少傾向が見られた。また、肝臓中の CYP7a1 遺伝子発現に増加傾向が見られた。血清総コレステロール濃度には変化がなかったが、乳酸菌 FS-1 の投与により血清中性脂肪濃度が有意に減少した。
【考察】中性脂肪が肝臓、および血清で、コレステロールが肝臓で減少したことより、乳酸菌 FS-1 が脂質代謝改善作用を有すことが示唆された。糞中胆汁酸排泄および肝臓 CYP7a1 遺伝子発現の増加により、コレステロールから胆汁酸への異化が促進され、肝臓のコレステロール含量が低下したことが示唆された。肝臓遺伝子発現プロファイルには中性脂肪低下機構の端緒は見当たらず、今後検討が必要である。また、糞量が増加したことより、便通改善作用を有することが示唆された。

triglyceride, cholesterol, feces

発表責任者：内田　健志（kenji_uchida@nissui.co.jp）

講演番号：1B3p04
講演日時：3 月 24 日 14:23～ 1 号館 B3 会場

鮒ずし由来乳酸菌 FS-1 株の免疫賦活による感染症予防効果

Lactobacillus plantarum from Funazushi activates natural killer cell and prevents virus infection

○篠原 日菜子[1]、阿久津 歩夢[1]、吉田 恵里子[2]、内田 健志[2]、韓 力[2]、水重 貴文[3]、蕪山 由己人[3]
([1]宇都宮大農、[2]日本水産株式会社、[3]宇都宮大学学術院)
○ Hinako Shinohara[1], Ayumu Akutsu[1], Eriko Yoshida[2], Kenji Uchida[2], Li Han[2], Takafumi Mizushige[3], Yukihito Kabuyama[3] ([1]Utsunomiya Univ. of Agric., [2]Nippon Suisan Kaisha, Ltd., [3]Utsunomiya Univ.)

【目的】
鮒ずしは、古来より滋賀県を中心に食されている伝統発酵食材である。鮒ずし由来の乳酸菌のうち、すり身の発酵能力が高いことを特徴とする乳酸菌（L. plantarum subsp. FS-1 株）を発見した。乳酸菌には、免疫賦活作用、整腸作用、抗ストレス作用、脂質代謝促進作用など、様々な作用が報告されていることから、FS-1 株の死菌粉末（以下、乳酸菌 FS-1）の機能性について探索を行っている。本研究では、乳酸菌 FS-1 の免疫賦活作用や感染症予防効果について、マウスを用いて検討を行った。
【方法】
実験１：5 週齢雄性の BALB/c 系マウスを 2 群に分け、乳酸菌 FS-1（200 mg/kg 体重）を 28 日間、経口投与した。脾臓、パイエル板、肺を摘出し、リンパ球を採取した。その後、採取したリンパ球と NK 細胞の標的となる Yac-1 細胞を共培養（リンパ球:Yac-1 細胞＝1:5）し、2 時間後に Propidium Iodide 染色し、Yac-1 細胞の傷害率をフローサイトメトリーで測定した。これにより、NK 細胞の活性を評価した。
実験２：5 週齢雌性の BALB/c 系マウスを 4 群に分け、それぞれに乳酸菌 FS-1（20, 200 mg/kg 体重）またはポジティブコントロールとして補中益気湯顆粒（株式会社ツムラ）を 14 日間経口投与し、鼻腔内に 50%組織培養感染率（$TCID_{50}$）が 1.0×10^4 のインフルエンザウイルス A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)（PR8 株）を感染させた。3 日後に、屠殺後、肺を摘出し PR8 株の遺伝子発現量の測定および肺の病理観察を行った。
【結果・考察】
実験１：乳酸菌 FS-1 を経口投与した群は、対照群と比較して、脾臓、パイエル板、肺のリンパ球による Yac-1 細胞の傷害率が有意に増加し、乳酸菌 FS-1 による NK 細胞の活性化が示唆された。
実験２：乳酸菌 FS-1（200 mg/kg 体重）を経口投与した群は、対照群と比較して、PR8 株の発現量の有意な減少、肺の出血状態の改善、炎症細胞浸潤状態の改善が確認され、乳酸菌 FS-1 は、ウィルス感染予防効果を示すことが示唆された。
以上より、乳酸菌 FS-1 が、NK 活性を向上させ、ウィルス感染細胞の傷害率を増加させることより、ウィルス感染症予防効果を示すことが示唆された。

influenza, immune system, NK cell activation

講演番号：1B3p05
講演日時：3 月 24 日 14:34～ 1 号館 B3 会場

機能性大麦 BARLEYmax (*Tantangara*)の抗肥満効果と腸内細菌叢との関係
Anti-obesity effect of functional barley BARLEYmax (*Tantangara*) and its relationship with gut microbiota

○野村 直生[1]、西村 文[1]、三好 孝則[1]、北薗 英一[1]、森田 英利[2]、松井 輝明[3] ([1]帝人株式会社 ヘルスケア新事業部門、[2]岡山大学大学院 環境生命科学研究科、[3]帝京平成大学 健康メディカル学部 健康栄養学科)
○Naoki NOMURA[1], Aya NISHIMURA[1], Takanori MIYOSHI[1], Eiichi KITAZONO[1], Hidetoshi MORITA[2], Teruaki MATSUI[3] ([1]TEIJIN Limited, Healthcare New Business Division, [2]Graduate School of Environmental and Life Science, Okayama University, [3]Teikyo Heisei University, Faculty of Medical Health, Department of Health and Nutrition)

【目的】
内臓脂肪型肥満はインスリン抵抗性を増大させ、耐糖能障害、脂質異常症などの生活習慣病のリスクを高める。内臓脂肪型肥満を誘発する要因の 1 つとして、食物繊維摂取量の不足が指摘されており、これには、大腸内の腸内細菌が水溶性食物繊維を代謝して産生する、短鎖脂肪酸が関係していることが示唆されている。短鎖脂肪酸は、糖代謝の改善や満腹感を促すことが報告されている。
大麦品種 BARLEYmax は、水溶性食物繊維である β－グルカン、フルクタンと、同じく大腸内で短鎖脂肪酸に代謝されるレジスタントスターチを豊富に含み、短鎖脂肪酸の産生量が増加することが報告されている。本試験では、BARLEYmax の摂取による腹部内臓脂肪の減少効果について検討した。

【方法】
本試験は、ランダム化二重盲検並行群間比較法にて実施した。被験者は、BMI23 以上 30 未満の、30 歳以上 60 歳未満の男性 24 名、女性 26 名とした。被験食品は、 BARLEYmax フレークを 12ｇ含有するグラノーラ 40ｇとし、対照食品は、コーンフレークを含有するものを使用した。これら試験食品を、朝食として 1 日 1 回ずつ、12 週間摂取した。被験者は、試験前、試験 12 週目に腹部内臓脂肪面積（VFA）を測定した。また、副次評価項目として、多量体アディポネクチン、血清脂質などを測定し、糞便を採取した。腸内細菌叢解析については、BARLEYmax 摂取群のうち、21 名について行った。

【結果・考察】
BARLEYmax 摂取群では、試験前と比較し、VFA が有意に減少した。一方、プラセボ群では、VFA の有意な減少は認められなかった。また、インスリン抵抗性との負の相関が示唆される、総アディポネクチンに占める高分子量アディポネクチンについて、試験 12 週目の BARLEYmax 摂取群の値が、プラセボ群よりも有意に高かった。腸内細菌叢に関しては、短鎖脂肪酸の 1 つである酪酸を産生する、*Blautia*, *Prevotella*, *Faecalibacterium* 属細菌の増加の傾向が示唆された。
以上の結果より、BARLEYmax の摂取によって、内臓脂肪が減少する可能性が示唆された。また、それによって、インスリン抵抗性が改善される可能性がある。これらの機能に関わると予測される要因の 1 つとして、腸内細菌によって産生される酪酸があげられる。

BARLEYmax, visceral fat obesity, microbiota

発表責任者：野村 直生（na.nomura@teijin.co.jp）

講演番号：1B3p06
講演日時：3 月 24 日 14:55～ 1 号館 B3 会場

食餌脂肪の質の違いがフルクトオリゴ糖摂取ラットの大腸 ALP 活性誘導と腸内環境変動に及ぼす影響

Effects of different types of dietary fats on the induction of colonic ALP activity and the modulation of gut luminal environment in rats fed fructo-oligosaccharides

○岡崎 由佳子、粟津 瑠姫、木村 李華、小檜山 聖佳（藤女子大・人間生活）
○Yukako OKAZAKI, Rubyi AWAZU, Rika KIMURA, Seika KOHIYAMA (Fuji Women's Univ.)

【目的】Alkaline phosphatase(ALP)は，アルカリ性条件下でリン酸化合物を分解する糖タンパク質酵素で，細菌から高等動物まで幅広く分布している。近年，生体内の ALP の中でも小腸型の ALP は，腸管内での抗炎症作用が指摘され, 栄養条件による変動も報告されている。最近我々は, 脂質として 30%ラードを用いた高脂肪食摂取ラットにおいて，水溶性食物繊維や難消化性オリゴ糖といった発酵性難消化性糖質が共通して，小腸 ALP には影響を与えずに大腸 ALP 活性を特異的に増加させ，そのメカニズムに ALP 遺伝子（*IAP-I*）の発現誘導が関与していることを明らかにした [1),2)]。また，このとき大腸 ALP 活性は，腸管バリア機能の指標である Mucin 含量と正の相関関係にあることや，腸内細菌叢の変動と関連性があることを示した。本研究では，食餌脂肪の種類を変えた条件下で，難消化性オリゴ糖摂取の大腸 ALP 活性と遺伝子発現に及ぼす影響を検討した。

【方法】実験動物として, 4 週齢の SD 系雄ラットを用いた。実験食として 30%ラード食または 30%大豆油食を用い, それぞれの飼料に 4%フルクトオリゴ糖（FOS）をセルロースに置き換えて添加した 4 群を設け, 14 日間飼育した。飼育終了後, 糞および大腸 ALP 活性の測定と, 大腸 ALP 遺伝子（*IAP-I, Akp3, Alpl*）の発現解析（RT-PCR 法）を行った。さらに, 糞中 Mucin（蛍光光度法）, 盲腸有機酸（HPLC 法）, 糞中の腸内細菌叢（qPCR 法）を解析した。

【結果】体重増加量および食餌摂取量は，本実験による影響は認められなかった。FOS 無添加群においては, 食餌脂肪の質の違いによる大腸 ALP 活性をはじめとする各種因子への影響は認められなかった。一方，ラード食では FOS 添加により大腸 ALP 活性と ALP 遺伝子（*IAP-I*）発現および糞中 Mucin 含量が有意に増加したが，大豆油食では FOS 摂取による影響は認められなかった。さらに，FOS 摂取による糞中 *Bifidobacterium* spp.や *Clostridium coccoides* の割合の変動も大豆油食と比較してラード食の条件下で顕著であった。FOS 摂取による盲腸内容物の有機酸増加作用は，食餌脂肪の質の違いによる影響を受けなかった。以上より，FOS 摂取による大腸 ALP 活性と遺伝子発現の増加作用は，大豆油食よりもラード食の条件下で顕著であり，Mucin や腸内細菌叢についても同様な影響が示された。

1) Nutrition Research, 2017, 43, 43-50
2) British Journal of Nutrition, (印刷中)

Alkaline phosphatase, Oligosaccharides, Dietary fats

講演番号：1B3p07
講演日時：3 月 24 日 15:06～ 1 号館 B3 会場

グア豆由来水溶性食物繊維は便秘自閉症スペクトラム障害（ASD）児の腸内環境を改善し、ASD 併存症状を緩和する

Dietary supplementation with partially hydrolyzed guar gum helps improve constipation and gut dysbiosis symptoms and behavioral irritability in children with autism spectrum disorder.

○井上 亮[1]、阪上 由子[2]、河田 祐樹[1]、玉置 竜士[1]、安川 然太[3]、小関 誠[3]、澤井 ちひろ[2]、上羽 智子[4]、野々村 和男[4]、塚原 隆充[5]、内藤 裕二[6] ([1]京都府立大学、[2]滋賀医科大学、[3]太陽化学、[4]守山市民病院、[5]栄養病理学研究所、[6]京都府立医科大学)

○Ryo INOUE[1], Yuko SAKAUE[2], Yuki KAWADA[1], Ryuji TAMAKI[1], Zenta YASUKAWA[3], Makoto OZEKI[3], Chihiro SAWAI[2], Satoko UEBA[4], Kazuo NONOMURA[4], Takamitsu TSUKAHARA[5], Yuji NAITO[6] ([1]Kyoto Prefectural University, [2]Shiga University of Medical Science, [3]Taiyo Kagaku, [4]Moriyama Municipal Hospital, [5]Kyoto Institute of Nutrition & Pathology, [6]Kyoto Prefectural University of Medicine)

自閉症スペクトラム障害(ASD)は、社会性の障害、強いこだわりといった特徴を持つ発達障害である。近年、罹患者は増加し続けており、その急激な増加から、ASD の発症・悪化における後天的要因が重要視されるようになった。腸内細菌叢は、ASD の発症や悪化に関与することが示唆されており、ASD の後天的要因のひとつとして注目されている。我々はこれまでに、日本人の ASD 児でも腸内細菌叢の構成が定型発達児とは異なっていること、また、ASD 児で定型発達児よりも有意に多い *Faecalibacterium* 属及び、少ない *Blautia* 属の占有率が白血球の炎症性に関わる遺伝子群の発現量と強い相関を示すことを見出している(Inoue et al. 2016, BBB)。本研究では、便秘症の ASD 児を対象とし、水溶性食物繊維の摂取により腸内環境を改善することで、ASD の併存症状を緩和することができるかを検証した。なお、本研究は滋賀医科大学の倫理委員会の承認を得て実施した(承認番号 27-161)。

13 名の便秘症の ASD 児に、水溶性食物繊維（Partially Hydrolyzed Guar Gum; PHGG, Sunfiber® 太陽化学）を 1 日 6g 摂取させた。なお、摂取期間は摂取前のサンプリングを行った定期検診から、次の定期検診までの間とした（>2 ヶ月)。PHGG の摂取前後で排便回数、異常行動チェックリスト日本語版（ABC-J）による症状の評価、及び採血、採便を行った。血液からは血清を分離し、炎症性サイトカインの測定に供した。糞便からは細菌 DNA を抽出し、Inoue et al. 2016 に従い、16S rRNA メタゲノム法による糞便細菌叢の解析を行った。

PHGG の摂取により、排便回数は有意に増加し、ABC-J のうち興奮性サブスケールの値が有意に低下した($P<0.01$)。さらに、血清中の IL-1β 濃度が有意に低下し($P<0.05$)、IL-6 及び TNF-α 濃度が低下する傾向がみられた($P<0.1$)。糞便細菌叢では、PHGG 摂取により *Blautia* 属の増加を含め、9 菌属の占有率が有意に変化し、α 多様性が有意に減少した。OTU(Operational taxonomic unit)レベルでは 19 の OTU の占有率に PHGG による影響が認められ、そのうち 3 つの OTU の占有率には排便回数と、別の 4 つの OTU の占有率には ABC-J 興奮性サブスケールと有意な相関関係が認められた。

以上から、PHGG を摂取することで、便秘症の ASD 児の腸内環境を改善することができ、その結果全身性の炎症反応の抑制、興奮性サブスケールの低下、つまり ASD の併存症状も緩和できうることが示唆された。ASD 児はその強いこだわりから偏食であることが多いが、PHGG は飲食物の見た目や香りを変化させることがないため、容易に飲食物内へ添加することができる。このため、PHGG の使用により ASD 児の併存症状改善だけでなく、その保護者の生活の質も改善できることが期待できる。

Gut microbiota, Autism spectrum disorder, Dietary fiber

講演番号：1B3p08
講演日時：3 月 24 日 15:17～ 1 号館 B3 会場

小麦ファイバーサプリメント摂取による腸内環境への効果
A pilot study of supplementation with wheat bran for health benefit through the alteration of intestinal environment

○松崎 光ノ介[1]、岩井 克機[1]、三好 規之[1]、平本 茂[2]、前川 智宏[2]、大橋 典男[1] ([1]静岡県立大・食品栄養、[2]日清ファルマ)
○ Konosuke MATSUZAKI[1], Katsuki IWAI[1], Noriyuki MIYOSHI[1], Shigeru HIRAMOTO[2], Tomohiro MAEKAWA[2], Norio OHASHI[1] ([1]Univ. of Shizuoka, [2]Nisshin Pharma Inc.)

【目的】小麦ふすまは、小麦の製粉工程において世界で年間約 9,000 万トン発生するが、その多くは廃棄処分されている。しかし、小麦ふすまは食物繊維を豊富に含むことから、その有効利用が期待される。そこで、小麦ふすまの機能性を検討するため、サプリメント化された「小麦ファイバー（日清ファルマ社製)」を用いて介入試験を行った。
【方法】20 代成人女性（BMI20-24）の被験者を 13 名募り、無作為に A 群（6 名）と B 群（7 名）に分けた。両群共に 2 週間の間、発酵食品の摂取を控えていただき（前観察期間)、その後の 4 週間を試験期間とした。試験期間においては A 群では 18 g/day（食物繊維換算 6 g/day)、B 群では 36 g/day（食物繊維換算 12 g/day）の小麦ファイバーを摂取していただき、試験の前後および期間中に糞便を提供していただいた。糞便中の短鎖脂肪酸は GC/MS により、糞便中の分泌型 IgA は ELISA 法により解析した。さらに糞便中の細菌叢は次世代シーケンサーを用いたメタ 16S 解析により調べた。試験期間における食事の食物繊維粗摂取量は、試験期間の前後で簡易型自記式食事歴質問票による食習慣調査を行い、A 群と B 群の粗摂取量に有意な差異がないことを確認した。
【結果および考察】小麦ファイバーサプリメントの介入試験において、摂取量の少ない被験者（A 群）と多い被験者（B 群）共に、小麦ふすま摂取により糞便中の短鎖脂肪酸量が増加することが判った。また、糞便中の分泌型 IgA 量においても、小麦ふすま摂取により増加することが明らかとなった。さらに、メタ 16S 解析により、サプリメント摂取前後の糞便中の細菌叢を解析した結果、α 多様性（各個人の菌種・均等度の多様性）では、A 群が摂取後に減少（6/6 名）し、B 群は摂取後に増加（6/7 名）していることが判った。この結果より、摂取量の少ない A 群では小麦ふすまの資化能の高い細菌が優占的に増加したため多様性が減少し、一方で、摂取量の多い B 群では資化能の高い細菌のみならず、他の腸内細菌も小麦ふすまを利用できたため多様性が増加したものと推察された。β 多様性（個人の間の菌種・菌組成の多様性）では、糞便中の菌種において、サプリメント摂取後の A 群と B 群の間で異なるクラスターが形成された。つまり、小麦ファイバーサプリメントの摂取量の違いは、腸内の菌種の変動に影響を与えるものと考えられる。
以上の結果より、小麦ふすま摂取は、ヒトの腸内において、細菌叢の変動を介して、短鎖脂肪酸産生量や IgA 分泌量を増加させるなどのプレバイオティクス効果が期待できるものと考える。

wheat bran, gut microbiota, short-chain fatty acid

講演番号：1B3p09
講演日時：3 月 24 日 15:28～ 1 号館 B3 会場

Bifidobacterium animalis subsp. *lactis* GCL2505 とイヌリンによる腸内ビフィズス菌数増加効果の検証
Effects of synbiotics containing *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* GCL2505 and inulin on intestinal bifidobacteria.

○安澤 大輔、馬渡 隆志、田中 祥之、山本 実央、源田 知美、高橋 将太、西嶋 智彦、釜阪 寛、栗木 隆（江崎グリコ株式会社）
○Daisuke ANZAWA, Takashi MAWATARI, Yoshiyuki TANAKA, Mio YAMAMOTO, Tomomi GENDA, Shota TAKAHASHI, Tomohiko NISHIJIMA, Hiroshi KAMASAKA, Takashi KURIKI (Ezaki Glico Co., Ltd.)

【背景・目的】ヒト腸内菌叢の中でも最優性菌の一つである *Bifidobacterium*（ビフィズス菌）は、整腸作用、免疫系調節作用、感染防御作用などの重要な働きをすることが知られている。健康の維持増進には、腸内環境の改善、すなわち腸内のビフィズス菌数を多い状態に保つことが重要であると考えられるため、これまでに様々なプロバイオティクスやプレバイオティクス、およびそれらを組み合わせたシンバイオティクスを摂取することによる腸内ビフィズス菌増殖効果に関する研究が報告されている。本研究は、腸内で増殖する特徴を有するプロバイオティクス菌株 *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (*B. lactis*) GCL2505 を使用し、本菌株とプレバイオティクスとして知られるイヌリンとを組み合わせたシンバイオティクスを摂取した際の腸内ビフィズス菌数への影響を、プラセボ摂取時および *B. lactis* GCL2505 単独摂取時と比較して評価することを目的とした。
【方法】試験デザインは、ランダム化二重盲検プラセボ対照クロスオーバー試験とし、便秘傾向のある 60 名の被験者に、*B. lactis* GCL2505 を 1×10^{10} cfu とイヌリン 2.0 g を含む飲料（シンバイオティクス）、*B. lactis* GCL2505 を 1×10^{10} cfu 含む飲料（プロバイオティクス）、またはいずれも含まない飲料（プラセボ）のいずれかを各 2 週間摂取させた。各摂取期間の末期に糞便を採取し、定量的リアルタイム PCR 法でビフィズス菌数を測定した。
【結果・考察】プラセボと比較し、プロバイオティクスおよびシンバイオティクスを摂取した期間において、糞便中の総ビフィズス菌数および *B. lactis* 菌数の有意な増加が見られた。またシンバイオティクス摂取期では、プロバイオティクス摂取期と比較し、総ビフィズス菌数及び常在ビフィズス菌数が有意に増加した。さらにプロバイオティクス摂取後に *B. lactis* の菌数が低かった被験者 20 名を抽出し層別解析したところ、総ビフィズス菌数において、プロバイオティクス摂取期ではプラセボ摂取期との有意差が認められなかった一方、シンバイオティクス摂取期には、プラセボおよびプロバイオティクス摂取期と比較して有意な増加が確認された。以上の結果から *B. lactis* GCL2505 とイヌリンを組み合わせたシンバイオティクスは、*B. lactis* GCL2505 を単独で摂取する時よりも、強い腸内ビフィズス菌数増加効果を有し、腸内環境改善に有効であることが示された。本シンバイオティクスはより多くの人の腸内ビフィズス菌数を増やす手段になり得る可能性があると考えられる。

Bifidobacterium animalis subsp. *lactis* GCL2505, Inulin, Synbiotics

発表責任者：安澤大輔（daisuke.anzawa@glico.com）

講演番号：1B3p10
講演日時：3 月 24 日 15:39～ 1 号館 B3 会場

冠動脈疾患患者大腸フローラモデルによる候補投与物の調査

Investigation of candidate dosage using human colonic microbiota model of coronary artery disease

○佐々木 建吾[1]、吉田 尚史[2]、佐々木 大介[1]、大澤 朗[3]、山下 智也[2]、近藤 昭彦[1] ([1]神戸大・科学技術イノベ、[2]神戸大・医、[3]神戸大・農)
○Kengo SASAKI[1], Naofumi YOSHIDA[2], Daisuke SASAKI[1], Ro OSAWA[3], Tomoya YAMASHITA[2], Akihiko KONDO[1] ([1]Grad. Sch. Sci. Tech. Innov., Kobe Univ., [2]Grad. Sch. Med., Kobe Univ., [3]Grad. Sch. Agri., Kobe Univ.)

【背景と目的】冠動脈疾患とは、心筋に血液を運ぶ冠動脈の内壁にコレステロールなどが沈着して内腔が狭められる事により血液供給が減少する病気であり、世界においても 35 歳以上のヒトの死因の 3 分の 1 以上を占めているとされている。一方、近年になってヒト腸内細菌叢が宿主の健康と疾病に関係している事が知られてきている。冠動脈疾患患者の腸内細菌叢においても、*Bacteroides* 属が減少しており特に *Bacteroides vulgatus* と *B. dorei* が減少しており、これらの菌を回復させる事が炎症反応を抑制するのに効果的である事が明らかとなっている。我々は健常人や潰瘍性大腸炎のヒト大腸フローラモデル、いわゆる Kobe University Human Intestinal Microbiota Model(KUHIMM)を培養器の中に構築し、機能性食品成分等の投与により細菌叢の変動や代謝プロファイルをモニターできる事を既に報告している [1)]。KUHIMM は動物給餌試験やヒト介入試験による *in vivo* 系に先立つ試験系として有用であると考えられる。そこで本研究においては、冠動脈疾患患者の治療戦略を立てるためにも本疾患の KUHIMM を構築して、候補投与物質を投入して *B. vulgatus* や *B. dorei* の応答を評価する事を目的とした。
【方法と結果】培養器に GAM 培地を投入して、窒素・二酸化炭素混合ガスを曝気した。初期 pH を 6.5 に調整して、冠動脈疾患患者ないしは健常人（コントロール）の糞便を投入して 37℃で培養した。定期的に培養液を採取して、DNA を抽出して 16S rRNA 遺伝子を対象として次世代シーケンサーにて菌叢解析を行った。また、*B. vulgatus* や *B. dorei* を標的とした定量 PCR 解析を行った。その結果、冠動脈疾患患者の KUHIMM モデルにおいては、健常人のモデルと比較して *Bacteroides* 属および *B. vulgatus* や *B. dorei* の割合が有意に減少して既報の結果と一致しており、本疾患の特徴を再現していた。さらに冠動脈疾患患者のモデルにおいては、レジスタントスターチを 0.5%投与する事により *B. vulgatus* や *B. dorei* の量が有意に増加していた。患者の一部には効果の認められないものも存在しており、KUHIMM モデルは患者個人毎の特性を評価できると考えられる。本研究は、文部科学省先端融合領域イノベーション創出拠点形成プログラム・バイオプロダクション次世代農工連携拠点の形成の支援を受けて実施した。

1)日本農芸化学会 2018 年度大会

Coronary artery disease, Gut micorbiota, Resistant starch

発表責任者：佐々木建吾（sikengo@people.kobe-u.ac.jp）

講演番号：1B3p11
講演日時：3 月 24 日 16:00～ 1 号館 B3 会場

バジルシードガム摂取による DSS 誘導性大腸炎の抑制効果について

Study on suppressing effect on DSS-induced colitis by administration of basil seed gum

○島田 龍太郎、橋本 堂史（神戸大学大学院農学研究科）
○Ryutaro SHIMADA, Takashi HASHIMOTO (Graduate School of Agricultural Science, Kobe University)

【目的】バジル種子は水に触れるとムシレージと呼ばれる粘液を出す。バジル種子由来ムシレージはバジルシードガム（BSG）とも呼ばれ難消化性水溶性食物繊維を豊富に含んでいる。一般的に水溶性食物繊維は腸内細菌によって発酵され短鎖脂肪酸が産生されることが知られている。自然免疫に関わるマクロファージは大腸炎発症の初期に関与しており、その予防や治療のターゲットとして注目されている。またマクロファージは炎症性の M1 型と抗炎症性の M2 型に大別されている。本研究では BSG 摂取が大腸炎に及ぼす影響を調べると共に、BSG あるいはその腸内細菌代謝物である短鎖脂肪酸がマクロファージに及ぼす影響を調べた。
【方法】水酸化ナトリウムで pH8.0 に調整した 70℃の温水にバジルシードを浸漬し、20 分間振とうさせた。その後エタノール沈降法により BSG を調製した。デキストラン硫酸ナトリウム（DSS）を 2.5%となるように飲水に混ぜ、C57BL/6 マウス（8 週齢、雌）に 7 日間自由摂水させることで大腸炎モデルマウスを作製した。BSG は 1%または 10%となるように混餌し、DSS 投与開始 7 日前から開始後 10 日まで 17 日間自由摂取させた。BSG の大腸炎に及ぼす影響は体重減少および BSG 投与最終日に摘出した結腸の縮短を指標として評価した。最終日に回収した糞中の短鎖脂肪酸濃度は HPLC を用いて測定した。1μg/ml リポポリサッカライド（LPS）処理により炎症を誘導したマクロファージ様細胞 RAW264.7 細胞に 1 mM 短鎖脂肪酸（酢酸、酪酸、プロピオン酸）または 1 mg/ml BSG を添加し、24 時間後にマクロファージの活性について TNF-α産生量および誘導型一酸化窒素合成酵素（iNOS）活性を指標に評価した。一方、M2 様マクロファージへの分極化の指標としてアルギナーゼ-1 活性を調べた。
【結果と考察】BSG は抽出率 17.3%で得られ、全糖含量は 72.4%であった。1%および 10%BSG 混餌食は、いずれも DSS 誘導性大腸炎による結腸の縮小および体重の減少を有意に抑制した。また、10% BSG 混餌投与群では糞中の短鎖脂肪酸量が BSG 非投与群に比べて有意に増加したが、1%BSG 混餌投与群では有意な増加は見られなかった。RAW264.7 細胞は LPS 処理により有意に iNOS 活性および TNF-α産生量が増加したが、短鎖脂肪酸はこれらの増加を有意に抑制した。一方、BSG 処理は iNOS 活性および TNF-α産生を抑制するだけでなくアルギナーゼ-1 活性を上昇させた。BSG 摂取は消化管内での短鎖脂肪酸産生を介してマクロファージの炎症を抑制するだけでなく、BSG が消化管内で M2 様マクロファージへの分極化を促進することで大腸炎を抑制する可能性が示唆された。今後、*in vivo* において、BSG 摂取が M2 様マクロファージへの分極化に及ぼす影響について検討する必要があると考えた。

basil seed gum, DSS-induced colitis, RAW264.7 cell

講演番号：1B3p12
講演日時：3 月 24 日 16:11～ 1 号館 B3 会場

ヒト介入試験における黒大豆の血管機能に及ぼす効果
The effect of black soybean on promote of vascular function in human study
○山下 陽子[1]、仲村 明日賀[1]、王 柳青[1]、堂前 千晶[1]、難波 文男[2]、齋藤 静[2]、鈴木 利雄[2]、三樹 文男[3]、芦田 均[1] ([1]神大院農、[2]フジッコ(株)、[3](有)ベーカリーミキ)
○ Yoko YAMASHITA[1], Asuka NAKAMURA[1], Liuqing WANG[1], Chiaki DOUMAE[1], Fumio NANBA[2], Shizuka SAITO[2], Toshio SUZUKI[2], Fumio MIKI[3], Hitoshi ASHIDA[1] ([1]Kobe Univ. of Agric., [2]FUJICCO Co., Ltd., [3]Bakery Miki.)

【目的】黒大豆は、種皮中に flavan-3-ol 類など、子葉中にイソフラボン類などのポリフェノールを豊富に含み、様々な生理機能が報告されている。黒大豆をはじめとする大豆類にはプロテインインヒビターなどの消化酵素阻害物質が含まれているため、ヒトが食する場合には加熱加工が必要である。この過程の中で、ポリフェノール成分が損失あるいは構造の変化を起こすことが推測される。これまでの研究で、煎り黒大豆種皮中には、他の加工黒大豆よりも比較的多くのポリフェノールが残存し、高い抗酸化能をもつことが認められた。そこで本研究では、煎り黒大豆あるいはそのきな粉を使用したクッキーを作製し、ヒト介入試験により血管機能に及ぼす影響を検討した。
【方法】煎り黒大豆のヒト介入試験デザインは、健常な女性 47 名を対象にオープン前後比較試験を行った。試験食は煎り黒大豆 30 g/日を 8 週間摂取させた。摂取するタイミングは自由摂取とした。摂取開始前、摂取 4 週間目および 8 週間目に検査を行ない、体組成、加速度脈波、血圧（HEM-1010、オムロンヘルスケア㈱製）を測定した。また、検査日の第一尿を採取し、血管拡張に関わる尿中 NO 濃度の測定に供した。絶食下での採血も行い、一般生化学検査に供した。次に、煎り黒大豆クッキーでの試験デザインは、健常な男女 22 名に 4 週間の単盲検クロスオーバー試験とした。試験食には、煎り黒大豆のきな粉が 20 g 当量を含有する黒豆クッキーを作製した。プラセボ食には、黒大豆きな粉分を小麦粉に置き換えた小麦粉クッキーとした。これらの試験食あるいはプラセボ食を 4 週間、自由な時間に摂取してもらった。試験開始摂取時と 4 週目に、煎り黒大豆試験と同様のマーカーを測定した。
【結果】加速度脈波の測定結果から、煎り黒大豆の摂取により、拍出強度、動脈血管弾性度、血管波形、波形点数、血管年齢、動脈年齢、血管健康度、残血量が摂取前と比較して有意に改善した。血圧については、煎り黒大豆の摂取により低下傾向を示した。また、尿中の NO は、煎り黒大豆の摂取により有意に増加した。さらに、酸化ストレスマーカーが有意に改善した。黒豆クッキーを摂取すると、動脈年齢や収縮期血圧の改善効果が認められた。血中の 8-OHdG 量は黒豆クッキー摂取により有意に減少した。また、いずれの試験でも、血中あるいは尿中からは flavan-3-ol 類、イソフラボン類のポリフェノールが検出された。【考察】これらのことから、煎り黒大豆製品の摂取により体内のポリフェノール濃度が上昇し、ポリフェノールの抗酸化能が血管機能向上効果に寄与したと考えられた。

vascular function, Black soybean polyphenol, human study

講演番号：1B3p13
講演日時：3 月 24 日 16:22～ 1 号館 B3 会場

黒大豆ポリフェノールは一酸化窒素産生を促進して、血管機能を向上させる

Black soybean polyphenol contributes to improvement of vascular function by promoting nitric oxide production

○堂前 千晶[1]、難波 文男[2]、鈴木 利雄[2]、芦田 均[1]、山下 陽子[1]([1]神戸大院農、[2]フジッコ株式会社)
○Chiaki DOUMAE[1], Fumio NANBA[2], Toshio SUZUKI[2], Hitoshi ASHIDA[1], Yoko YAMASHITA[1]
([1]Kobe Univ., [2]Fujicco Co.Ltd.)

【目的】血管機能の低下は、生活習慣の乱れや酸化ストレスなどの様々な要因により引き起こされ、循環器疾患の発症リスクを高める。従って、血管機能の向上が健康の維持・増進に重要であると考えられる。これまでに当研究室では、ヒト介入試験において、煎り黒大豆の血管機能改善効果を報告している。そこで本研究では、黒大豆に特徴的な種皮中のポリフェノールに着目し、黒大豆種皮抽出物（BE）が血管機能に及ぼす効果とその作用機構を解明することを目的とした。
【方法】雄性 6 週齢 Wistar ラットに BE を 50 mg/kg B.W.の濃度で強制経口投与し、0、7.5、15、30、60、並びに 120 分後の血管組織中 NO 濃度と eNOS のリン酸化について検討した。また、eNOS の上流因子の一つであるグルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）の血中濃度を測定した。次に、ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）に BE を 0.001-100 μg/ml の濃度で 0.5-1 時間作用させ、培地中の NO 濃度と eNOS のリン酸化について検討した。ヒト結腸由来細胞（Caco-2）と HUVEC を transwell system を用いて共培養し、BE を管腔側に 0.1-10 mg/ml の濃度で 24 時間作用させた後に、基底膜側の NO 濃度とポリフェノール量を測定した。また、HUVEC に GLP-1 を 1-50 pM の濃度で 5-30 分間作用させ、培地中の NO 濃度と eNOS のリン酸化について検討した。
【結果・考察】動物実験において、BE 投与の 60-120 分後に血管組織中 NO 濃度が有意に増加した。その上流因子である eNOS のリン酸化は、BE 投与の 7.5 分後に有意に増加し、60 分後に再び増加する傾向が見られた。また、BE の投与により血中の GLP-1 濃度が増加した。細胞実験では、BE を 1-100 μg/ml の濃度で作用させると、30 分後に eNOS およびその上流因子である Akt のリン酸化が有意に増加し、1 時間後には NO 濃度が有意に増加した。Caco-2 細胞との共培養系では、BE を 10 mg/ml の濃度で 24 時間作用させると NO 濃度が増加した。このとき、基底膜側において BE 中のポリフェノールが検出された。また、HUVEC に GLP-1 を 25-50 pM の濃度で作用させると、5 分後に eNOS のリン酸化が有意に増加し、30 分後に NO 濃度が有意に増加した。以上の結果から、BE は NO 産生量を増加させることで血管機能の向上に寄与すると考えられる。その作用機構としては２つの経路を見出だし、一つは腸管から吸収された BE 中のポリフェノールが血管内皮細胞に直接作用し、Akt/eNOS を活性化する経路であり、もう一つは BE 中のポリフェノールが小腸の L 細胞を刺激することによって分泌された GLP-1 が血管内皮細胞に作用し、eNOS を活性化する経路であると示唆された。

vascular function, NO, GLP-1

講演番号：1B3p14
講演日時：3 月 24 日 16:33～ 1 号館 B3 会場

梨幼果抽出成分が出芽酵母の寿命延長およびその関連遺伝子の発現に及ぼす影響

Influence of unripe pear fruit extract on budding yeast's lifespan elongation and expression of related genes.

○長谷川 真梨菜[1]、藤井 雄三[1]、藤田 憲一[2]、田中 俊雄[2]、荻田 亮[2,3]、村田 和加惠[1]([1]米子高専物質、[2]阪市大院 理、[3]阪市大健康研セ)
○Marina HASEGAWA[1], Yuzou FUJII[1], Ken-ichi FUJITA[2], Toshio TANAKA[2], Akira OGITA[2,3], Wakae MURATA[1] ([1]Yonago Natl. Coll. Technol., [2]Grad. Sch. Sci., Osaka City Univ., [3]Res. Center. Urban Health Sports, Osaka City Univ.)

近年，日本社会の高齢化や健康ブームなどと相まって，健康寿命の延伸に向けた関心が高まっている．人の健康を阻害する一つの要因として，細胞老化による免疫機能の低下や，活性酸素種の影響による DNA の損傷など，細胞機能の低下に起因する加齢関連疾患が挙げられる．細胞寿命の延伸や，細胞機能の維持についての研究は多岐にわたり進められており，その一つとして，寿命延長効果を付与する成分の探索と，その応用が期待されている．本研究では，ヒト寿命の決定機構と共通性を有することから寿命・老化研究に適したモデル細胞であるとされている出芽酵母を用いて，梨の抽出成分による細胞寿命の延長効果を検討した．

梨の成熟果および幼果をそれぞれ破砕し，蒸留水あるいは 70% エタノールに懸濁した後，それぞれのサンプルを抽出した．細胞寿命の評価は，出芽による細胞増殖を停止した細胞が生存し得る期間，すなわち経時寿命を測定することにより行った．定常期に至った後，継続して液体培地中にて培養した酵母から，コロニー形成が可能な生存細胞の割合をコロニーカウント法により求め，経時寿命における細胞生存率とした．また，Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 試験によって出芽酵母の mRNA の発現量を分析し，梨抽出成分による遺伝子レベルでの影響を評価した．

実験の結果，梨の成熟果の水抽出成分を与えた酵母の経時寿命は，コントロールとの間に差異は無く，梨の成熟果成分における寿命延長の効果はみられなかった．一方，梨の幼果においては，水抽出成分およびエタノール抽出成分のいずれを付与した場合においても，コントロールと比べて著しく経時寿命を延長させる効果が認められた．さらに，梨幼果の水抽出成分の付与によって寿命延長がみられた細胞を対象として，RT-PCR によって mRNA の転写量について調べたところ，ヒト長寿遺伝子 (*SIRT1*) の相同遺伝子とされている *SIR2*, および *SIR4*, さらには，ビタミン生成に関与しているとされる *VHR1*, および *VHR2* の発現量の増加が認められた．

以上の結果から，梨の幼果成分は，関連する数種の mRNA の転写活性を亢進することによって，出芽酵母の経時寿命を延長させる活性を有することが判った．また，梨幼果に含まれる有効成分の活性は，梨果実が成熟果に成長する段階で失活している可能性が示唆された．

Saccharomyces cerevisiae, Chronological lifespan, pear

講演番号：1B3p15
講演日時：3 月 24 日 16:44～ 1 号館 B3 会場

スルフォラファンによるパラベン類の抗菌作用の増幅効果

Parabens' enhancement of antimicrobial activity by addition of sulforaphane.

○村田 和加惠[1]、岩敷 里奈[1]、藤田 憲一[2]、田中 俊雄[2]、荻田 亮[2,3]([1]米子高専物質、[2]阪市大院理、[3]阪市大健康研セ)
○Wakae MURATA[1], Rina IWASHIKI[1], Ken-ichi FUJITA[2], Toshio TANAKA[2], Akira OGITA[2,3] ([1]Yonago Natl. Coll. Technol., [2]Grad. Sch. Sci., Osaka City Univ., [3]Res.Center. Urban Health Sports, Osaka City Univ.)

化粧品や食品、医薬品などの防腐剤として使用されるパラオキシ安息香酸エステル（パラベン）類は広い菌種に対して抗菌作用を示すことが知られており、食品や化粧品の防腐剤として広く使用されている。しかしながら、パラベン類にはアレルギーや接触性皮膚炎、発がん等の可能性が報告されており、添加量の低減が求められている。これまでに、パラベン類の添加量を低減することを目的として、パラベン類の作用を増幅させる介助因子を探索するなかで、ブロッコリーに微量に含まれ、がん抑制作用、抗酸化作用、肝機能向上、高血圧および心臓病の予防効果などを示すといわれているスルフォラファンが、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に対するメチルパラベン、エチルパラベンの抗菌作用を増幅する介助因子としての活性を有することを見出している。さらに、スルフォラファンによるパラベン類の抗菌作用の増幅効果は、カビや細菌など、幅広い菌種に対して効果を示すことが認められている。本研究では、*S. cerevisiae* W303 株および BY4741 株を試験菌とし、これまでに示されているメチルパラベン、エチルパラベンに加えて、ブチルパラベン、プロピルパラベンの抗菌作用に対するスルフォラファンの増幅効果について検討を行った。

実験の結果、*S. cerevisiae* W303 株では、メチルパラベン、エチルパラベン、ブチルパラベン、プロピルパラベンの全てのパラベン類の抗菌作用は、スルフォラファンと組み合わせることによって増幅することが観察された。また、分子実験に広く使用されており W303 株と感受性が異なるという特徴を有する *S. cerevisiae* BY4741 株に対しては、*S. cerevisiae* W303 株より感受性は低いものの、メチルパラベンおよびエチルパラベンにおいて、スルフォラファンとの組み合わせによる抗菌作用の増幅効果が観察された。

Saccharomyces cerevisiae , paraben, sulforaphane

講演番号：1B4a01
講演日時：3 月 24 日 09:00～ 1 号館 B4 会場

ヒドロキシルラジカルによるリポソーム系の酸化反応に対するα - トコフェロールと各種抗酸化物の併用効果

Interactions between α - Tocopherol and some selected antioxidants during liposome peroxidation with hydroxyl radical

○南 育子、梅田 あゆみ、小林 弘司、石川 洋哉（福岡女子大学　国際文理）
○ Ikuko Minami, Ayumi Umeda, Hiroshi Kobayashi, Hiroya Ishikawa (Fukuoka Women's University)

【目的】老化予防や生活習慣病予防を目的とした生体の酸化抑制における抗酸化物の役割を考える上で、細胞膜内に局在する抗酸化物と膜外の抗酸化物の相互作用が注目されている。当研究室では生体膜モデルとして利用されるリポソーム系において、AAPH 由来ペルオキシラジカルによる酸化に対する各抗酸化物の抗酸化能を評価し、薬剤の併用効果解析に汎用される Median effect analysis を用いて、抗酸化物 2 成分の相互作用（相乗・相加・相殺効果）を解析してきた。本研究では、新たにリポソーム溶液にフェントン試薬を添加し、発生するヒドロキシルラジカルによる酸化に対する各抗酸化物の抗酸化能を解析した。リポソーム膜内にα-トコフェロールを、膜外に各抗酸化物を局在させた場合の両者の相互作用を Median effect analysis により解析した。
【方法】リポソームの作製には卵黄由来ホスファチジルコリン（PC）を用い、リポソーム溶液を調製した。なお、抗酸化物を膜内に局在化させる際は、リポソーム形成前に抗酸化物を事前に添加し、膜外に局在化させる際はリポソーム溶液作成時に添加した。抗酸化能測定は、リポソーム溶液にラジカル発生剤を添加し、3 時間後の過酸化物量を TBA 法で測定した。結果から IC_{50} 値を算出し、Median effect analysis による併用効果解析を行い、CI 値（CI＞1：相殺、CI＝1：相加、CI＜1：相乗）で判断した。
【結果】リポソーム系におけるフェントン試薬由来ヒドロキシルラジカルによる酸化に対する各抗酸化物の抗酸化能の活性値は、AAPH 由来ペルオキシラジカルによる酸化に対する抗酸化能の活性値より比較的低く、各抗酸化物間で差が大きかった。ヒドロキシルラジカルによる酸化に対する抗酸化活性はフラボノール類のケルセチンで IC_{50}=27.6μg/mL、ミリセチンで IC_{50}=49.3μg/mL だった。一方フラボノール配糖体のルチンは他の抗酸化物より活性が低く IC_{50}=359.0μg/mL であった。続いて、リポソーム膜内にα-トコフェロールを、膜外溶液中に各抗酸化物を局在させ相互作用を解析した結果、カテキン類では多くの場合相殺効果を示し、ECg および EGCg は fa=0.8 において相乗効果を示した。フラボノール類では、特に高濃度において相加・相乗効果を示した。フェノール酸類のカフェ酸は各濃度条件においていずれも低い CI 値を示し、リポソーム膜内のα-トコフェロールと高い相乗効果を示した。一方ロスマリン酸は各濃度条件において高い CI 値を示し強い相殺効果を示した。本実験における各抗酸化物の抗酸化作用が、脂質の酸化抑制、ヒドロキシルラジカル消去、鉄イオンの酸化抑制のいずれに影響しているのか詳細な解析が必要である。

Antioxidant, Lipid Peroxidation, Combination Effects

発表責任者：石川洋哉（ishikawa@fwu.ac.jp）

講演番号：1B4a02
講演日時：3 月 24 日 09:11～ 1 号館 B4 会場

高麗人参摂取ヒト血清の ESR スピントラップ法（MULTIS 法）による抗酸化能評価と人参サポニン代謝解析

Multiple free-radical scavenging (MULTIS) study and ginseng saponin metabolite analysis on serum derived from healthy subjects administered Panax Ginseng.

○三原 憲一[1]、巽 裕希[2]、小林 慧子[3]、南山 幸子[3]、市川 寛[2]（[1]金氏高麗人参（株）品質保証・研究開発室、[2]同志社大学大学院生命医科学研究科、[3]京都府立大学大学院生命環境科学研究科）
○Kenichi MIHARA[1], Yuuki TATSUMI[2], Keiko KOBAYASHI[3], Yukiko MINAMIYAMA[3], Hiroshi ICHIKAWA[2] ([1]KIM's Korean Ginseng Co., Ltd., [2]Doshisha Univ. Grad. Sch. of Life and Medical Sciences, [3]Kyoto Prefectural Univ. Grad. Sch. of Life and Environmental Sciences)

【背景・目的】高麗人参（ウコギ科オタネニンジン *Panax ginseng* C.A.Meyer）は、古来より生薬として珍重され、食品としても様々な形で利用されている。高麗人参の主要有効成分は、トリテルペンに糖鎖が結合した人参サポニン「ジンセノサイド」であり、糖鎖の異なる多種類のジンセノサイドが存在する。生の高麗人参に多く含まれ、糖鎖の大きいメジャージンセノサイドは、消化管で腸内細菌によって糖鎖の小さい、体内への吸収性が高いマイナージンセノサイドへ変換される[1)]。また、ジンセノサイドには抗酸化能があり、ヒドロキシラジカル消去活性を示すジンセノサイドも存在する[2)]。一方、近年 ESR スピントラップ法（MULTIS 法）により生体試料の正確な抗酸化能評価が可能になり[3)]、食品成分自体の抗酸化能よりも、食品成分摂取が惹起する生体の抗酸化能を評価することが重要と考えられつつある。しかし、高麗人参摂取後の生体試料の抗酸化能を評価した研究は今までに報告がない。そこで本研究は、高麗人参加工食品の紅参エキス末錠剤をヒトが摂取した際の血清ジンセノサイド代謝プロファイルを調べると共に、MULTIS 法を用いてヒト血清の抗酸化能を評価した。
【方法】30～50 歳の男性被験者 5 名に紅参エキス末錠剤を 1 週間摂取させ、摂取前、初日摂取 4 時間後、摂取期間終了後の計 3 回、血清を採取し、37 種類の血清ジンセノサイド濃度を LC-TOF/MS で分析、定量した。また、MULTIS 法で測定して 6 種類のラジカル消去活性を評価した。
【結果】摂取 4 時間後の血清ジンセノサイド濃度は、摂取期間終了後よりも高かった。また、マイナージンセノサイドが多く検出された。MULTIS 法の結果では、摂取 4 時間後の血清は摂取前に比べて有意な変化は無かったが、摂取期間終了後の血清は、摂取前と比較してスーパーオキシドラジカル消去活性及びヒドロキシラジカル消去活性が大幅に増加した。このことから、血清ジンセノサイド濃度との相関は見られないものの、継続的な高麗人参摂取によりヒトの身体自身の抗酸化力が高まり、身体への様々な効果が期待できることが示唆された。

1)長谷川秀夫, *医学のあゆみ* **207**(10): 857-861 (2003)
2)Kang KS, *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.***30**(5): 917-921 (2007)
3)Oowada S, *et al.*, *J. Clin. Biochem. Nutr.***51**(2): 117-121 (2012)

antioxidative effect, multiple free-radical scavenging capacity, Panax Ginseng

発表責任者：三原　憲一（k-mihara@k-kn.jp）

講演番号：1B4a03
講演日時：3 月 24 日 09:22～ 1 号館 B4 会場

グルコース-6-リン酸脱水素酵素を用いた、化合物のプロオキシダント能および抗酸化能の簡便な評価
Simple assessment of pro- and anti-oxidant activities of a compound using glucose-6-phosphate dehydrogenase

○黒川 洋一、伊佐 純一、三浦 歩馬（福井県大生物資源）
○Yoichi Kurokawa, Jun'ichi Isa, Ayuma Miura (Fukui Pref. Univ.)

【目的】抗酸化物質の中には金属イオン存在下などで活性酸素種(ROS)の発生を促進する「プロオキシダント能（Pox)」をもつ物が存在し、生体高分子の酸化を促進してしまうことがある。Pox が低く、抗酸化能（Aox）に優れた抗酸化物質を選別できれば、このような問題を回避できると考えられ、私どもはこれまでに「低プロオキシダント性抗酸化物質(LPAO)」ライブラリーの作成を行ってきた。本研究では、迅速かつ簡便な選別のために、ペントースリン酸経路における鍵酵素であり、細胞内の酸化還元状態の維持に重要なグルコース 6 リン酸脱水素酵素(G6PDH)を用いて、抗酸化物質の Pox および Aox の評価を検討し、ルミノールの化学発光を指標とした方法との比較において、これまで選別したライブラリー化合物の効果を評価することとした。
【方法・結果】G6PDH を、過酸化水素および遷移金属イオン塩存在下で一定時間インキュベートした後、グルコース-6-リン酸、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型($NADP^+$)存在下でインキュベートし、NADPH の生成に伴う 340 nm の吸光度の増加を指標として、本酵素の残存活性を測定した。また、ヒドロキシルラジカルの発生を Coumarin-3-carboxylic acid(3CCA)を用いて評価した。その結果、過酸化水素および鉄(III)イオン存在下ではヒドロキシルラジカルの発生に伴う G6PDH の活性低下は見られなかったが、過酸化水素および銅(II)イオン存在下では、G6PDH の活性はインキュベート前の約 10%にまで顕著に低下した。この活性低下は、EDTA などのキレート剤存在下では抑制された。また、本酵素活性は、ヒドロキシルラジカル発生能を持つ芳香族アミンまたはアスコルビン酸、および銅(II)イオン存在下でも低下した。従って、本酵素は、銅イオンが触媒するヒドロキシルラジカル発生条件下で失活すると示唆された。本酵素の酸化的活性低下を指標として、化合物の Aox、Pox 評価が可能と考えられた。フラボノイド類やクマリン類、アミノ酸代謝物等を含む LPAO ライブラリー化合物 100 種類について評価を行ったところ、過酸化水素および銅イオン存在下での G6PDH 活性低下を、100μM で 50%以上抑制する化合物、70%以上抑制する化合物がそれぞれ約 10 種類見出され、その多くはフェノール性水酸基が修飾を受けたフラボノイドであった。当日は、本法およびルミノールを用いた化合物の抗酸化能の比較など、詳細なデータに基づいて報告を行う予定である。以上より、G6PDH を用いた本評価系は、低プロオキシダント性抗酸化物質を選別する上で有用と期待される。

anti-oxidant, pro-oxidant, glucose-6-phosphate dehydrogenase

発表責任者：黒川洋一（kurokawa@fpu.ac.jp）

講演番号：1B4a04
講演日時：3 月 24 日 09:33～ 1 号館 B4 会場

ベビーリーフの酸素ラジカル消去能（ORAC）および総ポリフェノール 量の年次変動の解明
Evaluation of seasonal changes on oxygen radical absorbance capacity and total polyphenol contents of young leaves.

○武波 洋志[1,2]、恩田 浩幸[3]、石川(高野) 祐子[2] ([1]茨城大院農、[2]農研機構食研、[3]エスビー食品)
○Hiroshi TAKENAMI[1,2], Hiroyuki ONDA[3], Yuko TAKANO-ISIKAWA[2] ([1]Ibaraki Univ., [2]Food research institute, NARO, [3]S&B FOODS INC.)

【背景および目的】我が国では 1 日 350g 以上の野菜摂取が推奨されているが、ほとんどの世代で充足できておらず、かつ野菜の摂取量自体も減ってきている。その中で、野菜の幼葉を数種類混合して販売されるベビーリーフは、手軽に多種類の野菜を食べられることから消費が増えている。しかし、販売価格は低下傾向にあり、価格維持のために付加価値をつけることが求められている。そこで、ベビーリーフの差別化・高付加価値化のために、抗酸化能の年次変動を評価するとともに、寄与成分の解明を目的として研究を行った。
【試料および方法】9 種類のベビーリーフ （ヒユ科：ベビースピナッチ・レッドビート、キク科：エンダイブ・コスレタス、アブラナ科：レッドマスタード・ルッコラ・ターサイ・ピノグリーン・ミズナ)を対象に、土耕栽培された試料を毎月入手し、調査した。試料は入手後直ちに液体窒素で凍結、凍結乾燥・粉砕し、凍結乾燥粉末を高速溶媒抽出機 (ASE-350) を用いてヘキサン：ジクロロメタン(1:1)により親油性物質を、引き続き酢酸酸性メタノールにより親水性物質を抽出し、それぞれ、親油性酸素ラジカル消去能 (L-ORAC)、親水性ラジカル消去能 (H-ORAC) および総ポリフェノール量 (TPP) を測定した。
【結果および考察】全ての試料において、抗酸化能への寄与は L-ORAC よりも H-ORAC の方が高く、総 ORAC の約 80％を H-ORAC が占めており、いずれの時期においても同じ傾向を示した。また、H-ORAC と TPP は高い相関(r= 0.82～0.98)を示したことから、ベビーリーフの抗酸化能には親水性のポリフェノール類の寄与が高いことが示唆された。各品目の総 ORAC はベビースピナッチ:1065.04～3437.78(μmol TE/ 100 g FW)、レッドビート：1543.06～3275.23、エンダイブ：1300.06～8230.69、コスレタス：1496.80～3874.69、レッドマスタード：1942.04～4102.95、ルッコラ：1225.51～3978.46、ターサイ：1520.41～3119.73、ピノグリーン：1748.18～3728.96、ミズナ：2102.27～3188.86 の範囲で推移した。
季節変動としては、冬季において抗酸化能が高くなる品目が複数存在したが、これらは低温ストレスに対応するためにフラボノイド類の生合成量が増加したことに起因すると考えられた。現在、特に冬季と夏季の抗酸化能の差が 6 倍程度と供試品目の中で最も大きかったエンダイブを対象とし、その抗酸化寄与成分とその変化についての検討を行っている。

oxygen radical absorbance capacity, total polyphenol, young leaves

講演番号：1B4a05
講演日時：3 月 24 日 09:44～ 1 号館 B4 会場

酒粕加水分解物の細胞内グルタチオン上昇作用

Sake lees hydrolysate increased intracellular glutathione levels

○川上 賀代子[1]、新崎 由樹[1]、守谷 智恵[1]、花房 満[2]、畑中 唯史[3]、坪井 誠二[1]([1]就実大薬、[2]（株）室町酒造、[3]岡山生物研)

○Kayoko KAWAKAMI[1], Yuki SHINZAKI[1], Chie MORITANI[1], Mitsuru HANABUSA[2], Tadashi HATANAKA[3], Seiji TSUBOI[1] ([1]Shujitsu Univ. Sch. of Pharm., [2]Muromachi Shuzo Co., Ltd., [3]RIBS Okayama)

【目的】グルタチオンは生体内で産生される抗酸化物質であり、酸化ストレスに対する防御をはじめ、細胞内の酸化還元状態の制御、毒物や薬物の解毒など様々な生理作用を有している。よって、グルタチオンの細胞内濃度を上昇させることにより、酸化ストレスを軽減し、酸化ストレスに起因するさまざまな疾病を予防することができると考えられる。我々は、これまでに細胞内グルタチオン量上昇作用をもつ食品成分のスクリーニングを行っており、酒粕加水分解物に細胞内グルタチオン上昇作用があることを明らかにした。酒粕は日本酒を醸造する際の副産物であり、精米した米を用いる。精米歩合 60%以下の米を原料とした場合は吟醸酒、精米歩合 50%以下の場合は大吟醸酒と呼ばれる。しかし、精米歩合の異なる酒粕の細胞内グルタチオン上昇作用に対する影響や活性成分については明らかになっていない。今回、精米歩合の違いによる細胞内グルタチオン上昇作用および酸化ストレスによる細胞傷害に対する抑制効果について報告する。

【方法】雄町米酒粕（40%、50%、55%、60%精米酒粕、室町酒造）をデナチーム AP（ナガセケムテックス）で処理し、遠心分離後に上清を凍結乾燥して酒粕加水分解物を調製した。ヒト肝がん細胞 HepG2 を 1.5×10^5 cells / 2ml / 6 well plate で播種し、48 時間培養した。その後、酒粕加水分解物を添加し 24 時間後に細胞を回収して、細胞内グルタチオン量を測定した。活性成分を同定するため、酒粕加水分解物を Sep-PakC18（Waters）、さらに逆相 HPLC を用いて分画した。酒粕加水分解物の酸化ストレスによる細胞傷害抑制効果については、HepG2 を 1.5×10^4 cells/ 100 µl / 96 well plate で播種し、24 時間培養した。酒粕加水分解物を添加した培地で細胞を 24 時間培養後、過酸化水素で 24 時間処理し、細胞膜傷害の指標である乳酸脱水素酵素の細胞外漏出を測定することにより評価した。

【結果】細胞内グルタチオン量を測定した結果、60%精米酒粕加水分解物が最も細胞内グルタチオン量を上昇させることが明らかとなった。60%精米酒粕加水分解物を Sep-Pak C18 により分画すると 40%アセトニトリルで溶出した画分に細胞内グルタチオン上昇作用がみられた。過酸化水素による酸化ストレスによる細胞障害抑制効果については、酒粕加水分解物をあらかじめ細胞に添加することで、濃度依存的に細胞障害が抑制された。以上の結果から、酒粕加水分解物の細胞内グルタチオン上昇作用は精米歩合の低いものの方が高く、細胞内グルタチオンが上昇することにより、酸化ストレスによる細胞傷害の抑制効果があることが示唆された。現在、活性成分の同定を試みている。

glutathione, sake lees hydrolysate

講演番号：1B4a06
講演日時：3 月 24 日 10:05～ 1 号館 B4 会場

妊娠・授乳期のコーヒー摂取が子供に与える影響
Influence of coffee intake during pregnancy and lactation on offspring
○石川 春奈、山本 和史、都築 毅（東北大院農）
○Haruna Ishikawa, Kazushi Yamamoto, Tsuyoshi Tsuduki (Grad. Sch. of Agri. Sci., Tohoku Univ.)

【目的】エネルギーの過剰摂取や喫煙などが原因で起こる過度な酸化ストレスにより過酸化物質が体内に蓄積すると、糖尿病や動脈硬化などをはじめとした様々な生活習慣病の発症と進展を促すことが知られている。そのため、酸化ストレスを減弱し生体内の過酸化脂質量を減らすことは重要である。また、出生時のエピジェネティックスな変化が生活習慣病発症の要因の 1 つになっているという成人病胎児期発症起源説（DOHaD）が示されている。つまり、母親の妊娠授乳期の食事は子供の健康状態に密接に関わっている。従って、子供の将来の疾病発症には、出生後の生活習慣の負荷と、母親の妊娠授乳期での栄養状況という二段階で、発症リスクに大きな影響を与えている。我々も以前より妊娠授乳期の母親に様々な食品成分を与えることにより、その子供の健康状態が大きく変化することを明らかにしている[1]。一方、妊娠・授乳期に摂取すると影響を与えるとされている食品の一つにコーヒーがある。コーヒーの主要成分の一つにカフェインがあるが、妊娠授乳期間中の高レベルのカフェイン摂取は胎児に悪影響を与え、乳幼児期の子供の肥満率を増加させる。しかし、コーヒーは抗酸化作用や抗肥満作用があることが報告されており、カフェインの他にも、ポリフェノールの一種であるクロロゲン酸などをはじめとし様々な機能性成分を含んでいる。よって、低レベルのコーヒー摂取であれば、子孫にそれほど悪い影響を与えないのではないかと考えられた。そこで本研究では、妊娠授乳期の母親に食後 1 杯程度（1 日 3 杯）の低レベルのコーヒーを摂取させ、その子供にどのような影響を与えるか検討することとした。
【方法】妊娠 3 日目の C57BL/6J マウスを 2 群に分け、それぞれ普通食とコーヒー食（普通食にコーヒー粉末を 0.1%添加した試料）で飼育した。仔は 3 週齢で離乳させた後、それぞれの群を普通食と高脂肪食摂取の計 4 群に群分けし飼育した。その後、各群の仔を 11 週齢まで飼育し、12 時間の絶食後、血清や臓器を採取し、各種分析に供した。
【結果】普通食を摂取した仔マウスにおいて、母マウスのコーヒー摂取により終体重が有意に減少し、血清過酸化脂質量や肝臓過酸化脂質量、肝臓中性脂肪量が有意に増加した。一方で、高脂肪食を摂取した仔マウスにおいて、母マウスのコーヒー摂取により血清や肝臓中の過酸化脂質量の有意な低下が見られた。以上より、妊娠授乳期の低レベルコーヒー摂取はその仔マウスの酸化ストレス感受性に影響し、仔マウスの食餌により違った効果を示すことが明らかになった。
[1] T. Tsuduki, et al., Mol Nutr Food Res. 2016

coffee, DOHaD, offspring

講演番号：1B4a07
講演日時：3 月 24 日 10:16～ 1 号館 B4 会場

テロメラーゼをターゲットとした新規発毛成分の探索

Search for novel hair-growth promoting factors by targeting telomerase

○片倉 喜範、松尾 花佳（九大院シス生）
○Yoshinori KATAKURA, Haruka Matsuo (Kyushu Univ. Grad Sch Sys Life Sci)

【背景・目的】最近、テロメラーゼ触媒サブユニット（TERT）の上皮細胞における発現誘導が、発毛を促進することが報告されたことを受け、当研究室では、ヒト表皮ケラチノサイト由来 HaCaT 細胞を用いて、ヒト TERT 遺伝子プロモーターを活性化する食品成分を探索し、２種のポリフェノールを発毛効果を有する食品成分として同定している。この結果に基づき、本研究ではこの同定された２種のポリフェノールの構造類似化合物の表皮における hTERT 活性化を介した発毛促進効果を検証した。

【材料および方法】まず、hTERT プロモーターに制御される EGFP 発現ベクターを導入した HaCaT 細胞（HaCaT（hTERTp-EGFP））に、各種食品成分を添加して培養した後、イメージングサイトメーター（IN Cell Analyzer 1000）を用いて EGFP 蛍光強度の変化を追跡し、各種成分の hTERT プロモーター増強活性を評価した。また選定した食品成分については、HaCaT 細胞の内在性 hTERT 発現に対する効果を検証した。著しく発毛効果の見られたポリフェノール X においては、マイクロアレイ解析により、遺伝子発現変化の解析を行った。

【結果･考察】イメージングサイトメーターによる解析及びリアルタイム定量 PCR による内在性 hTERT 発現の検証により、Resverateol 類似化合物、X 類似化合物のいくつかにおいて hTERT 増強活性がみられた。これらの結果から、発毛促進効果につながりうる共通構造の存在が明らかとなった。今後は、hTERT 増強活性がみられた化合物においては育毛関連成長因子の発現解析をおこなうとともに、各種化合物による hTERT 増強の分子基盤に関し解析を進める予定である。さらに最終的には、マウスへの塗布試験により発毛促進効果を検証する予定である。また、発毛促進作用を示すポリフェノール X のマイクロアレイ解析から、ポリフェノール X が表皮細胞に及ぼす効果、誘導する表現型変化について考察を行う予定である。

Telomerase, hair-growth, polyphenol

発表責任者：片倉喜範 p（katakura@grt.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：1B4a08
講演日時：3 月 24 日 10:27～ 1 号館 B4 会場

植物発酵液 SW の美白効果に関する機能性の解析
Analysis of functionality on making skin whitening with Liquid of Fermented Plant Extract SW
○田中 瑞穂[1]、本藤 和彦[2]、及川 哲志[3]、松井 彩[3]、大野 あぐり[3]、山下 慎一郎[1]、原 太一[3]([1]株式会社オルトメディコ、[2]八雲香産株式会社、[3]早稲田大学 人間科学学術院健康福祉科学科 細胞制御学・食品生命科学研究室)
○Mizuho TANAKA[1], Kazuhiko HONDOU[2], Satoshi OIKAWA[3], Aya MATSUI[3], Aguri ONO[3], Shin-ichiro YAMASHITA[1], Taichi HARA[3] ([1]ORTHOMEDICO Inc., [2]Yagumo Kousan Co., Ltd., [3]Laboratory of Cellular Regulation/Food and Life Science, Faculty of Human Sciences, Waseda University)

【目的・背景】
植物発酵液ＳＷは、１００種類以上の野菜・果物・海藻類と、喜界島産の粗糖を原料とし、「酵母・乳酸菌」などの力により発酵・熟成させた植物発酵食品（植物発酵液）である。本研究は、今回新たに開発した植物発酵液ＳＷについて、美白効果に着目し、機能性を検証することを目的とした。
【方法・結果】
シミが増加する原因として活性酸素が大きく関わっていることが知られている。そこで、植物発酵液ＳＷの活性酸素消去能について、ＤＰＰＨラジカル消去能を指標に解析を行ったところ、植物発酵液ＳＷに強いラジカル消去能が存在することを見出した。また、植物発酵液ＳＷの活性酸素消去能の詳細について検討を行い、植物発酵液ＳＷが抗酸化酵素ＳＯＤやカタラーゼ様の活性を有していることが明らかとなった。次に、皮膚における色素沈着の原因となるメラニン色素の合成に関する植物発酵液ＳＷの影響を調査した。メラニン産生に働くチロシナーゼの活性におよぼす効果を検討したところ、植物発酵液ＳＷは濃度依存的にチロシナーゼの活性を阻害した。また、植物発酵液ＳＷのメラニン産生細胞（Ｂ１６細胞）の細胞毒性についてＣｅｌｌ Ｃｏｕｎｔｉｎｇ Ｋｉｔ-８（ＷＳＴ-８法、同人化学）を用いて検討したところ、高濃度の植物発酵液ＳＷでは、細胞増殖が顕著に抑制された。現在、細胞毒性を示さない濃度でのＢ１６細胞のメラニン産生におよぼす影響を検討中である。
以上の結果から、植物発酵液ＳＷは、活性酸素の産生やメラニン生成を抑制し、色素沈着を防ぐ機能性が期待できる素材であると考えられる。本学会発表では、われわれの研究成果を紹介し、植物発酵液ＳＷの美容への応用の可能性について議論したい。

antioxidation, aging, fermented plant extract

講演番号：1B4a09
講演日時：3 月 24 日 10:38～ 1 号館 B4 会場

タチバナ抽出物の皮膚炎症に対する抑制効果
The inhibitory effects of *Citrus Tachibana* extract on skin-inflammation.
○渡辺 章夫[1]、小林 桃佳[2]、佐藤 美穂[3]、米澤 貴之[1]、禹 済泰[3] ([1]中部大生機研、[2]中部大応生院、[3]中部大応生)
○Akio WATANABE[1], Momoka KOBAYASHI[2], Miho SATO[3], Takayuki YONEZAWA[1], Je-Tae WOO[3] ([1]Research Institute for Biological Functions, Chubu Univ., [2]Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Chubu Univ., [3]Department of Biological Chemistry, Chubu Univ.)

【目的】
紫外線暴露による皮膚老化の中でも、シワやシミは重要なアンチエイジングの研究対象である。UVB 暴露によりケラチノサイトから分泌される炎症性サイトカイン（IL-1α など）が真皮繊維芽細胞に作用することでエラスターゼ酵素活性が誘導される。その結果、肌のハリに重要なエラスチンが分解されて真皮の三次元構造が変性することで、皮膚の弾力性が低下しシワが形成される。一方、皮膚の色素沈着はメラノサイト内のメラノソームで合成されるメラニンによって引き起こされる。したがって、メラニン形成過程において律速酵素として働いているチロシナーゼ活性を抑制する天然物は美白化粧料への利用が可能である。また、日本に自生している柑橘類であるタチバナ（*Citrus Tachibana*）は、主に祭事や観賞用として限定的に使用されるのみで、生理作用に関する研究例は少ない。そこで本研究では、タチバナ抽出物について、炎症誘導性皮膚老化関連因子に対する作用を検討した。
【方法】
タチバナ未熟果をエタノールで抽出後、濃縮乾固したものを、タチバナ抽出物とした。また、タチバナ抽出物を HPLC によって測定した。炎症の指標としてマクロファージ系細胞株である RAW264 細胞を用いて、LPS 刺激時の一酸化窒素（NO）産生を測定した。シワ形成の指標としては、ヒト皮膚線維芽細胞を用いて、IL-1α 刺激時のエラスターゼ活性及びコラーゲン分解酵素である MMP-1 発現を測定した。さらに、色素沈着の指標として、ヒトメラノーマ細胞株の HMV-Ⅱを用いて、フォルスコリン刺激で誘導されるチロシナーゼ活性を測定した。
【結果】
RAW264 細胞を用いた NO 産生試験において、タチバナ抽出物は濃度依存的な NO 産生抑制効果を示した。タチバナ抽出物の HPLC 分析の結果、ポリメトキシフラボノイドであるノビレチン、タンゲレチン、シネンセチンが主成分であると推定され、ノビレチン、タンゲレチン、シネンセチンのいずれにおいても NO 産生が有意に抑制された。ヒト皮膚線維芽細胞を用いたエラスターゼ活性 及び MMP-1 発現に対しては、タチバナ抽出物 及び ノビレチン、タンゲレチン、シネンセチンのいずれにおいても抑制された。さらに、フォルスコリン刺激によるチロシナーゼ活性の上昇はタチバナエキスで抑制され、ポリメトキシフラボノイドではノビレチンによる抑制効果が最も強かった。本研究で、タチバナ抽出物の抗皮膚老化作用が示され、作用物質としてポリメトキシフラボノイドの関与が示唆された。

Skin-inflammation, Citrus Tachibana, Polymethoxyflavonoid

発表責任者：禹 済泰（jwoo@isc.chubu.ac.jp）

講演番号：1B4a10
講演日時：3 月 24 日 10:49～ 1 号館 B4 会場

青森県津軽地域伝統野菜「そばもやし」の生理機能性に関する研究

Physiological function of Aomori traditional vegetable “Buckwheat sprout”

○岩間 直子[1]、小堀 真珠子[2]([1]青森産技セ弘前工研、[2]農研機構食品研究部門)
○Naoko IWAMA[1], Makiko KOBORI[2] ([1]Hirosaki Laboratory, AITC, [2]Food Research Institute, NARO)

【目的】青森県の津軽地方では、そばの実から発芽させた「そばもやし」が伝統的に栽培されており、全国的に栽培されているそばスプラウトとは異なり、光を遮って栽培するのが特徴である。このそばもやしにはルチンが豊富に含まれ、腸内環境改善に有用なパントエア菌も存在していることが明らかとなっている。本研究では、そばもやしが健康及び美容に及ぼす機能性を評価して明らかにし、新たな青森県産機能性素材としての可能性を検討した。

【方法】暗所で生育したそばもやしを凍結乾燥し、ORAC 法を用いて抗酸化能の測定を行った。さらに、そばもやしの凍結乾燥物から 80%メタノールで抽出を行い、得られた抽出液を減圧濃縮後 DMSO に溶解して、そばもやし抽出物を調製した。リポ多糖(LPS)で刺激したマウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 に、そばもやし抽出物を 150～300μg/ml 濃度（凍結乾燥物量換算）で添加して、誘導される NO（一酸化窒素）産生量の変化を測定し、炎症関連物質産生抑制作用を評価した。また、そばもやし抽出物をマウス B16 メラノーマ細胞に 300 及び 600μg/ml 濃度で添加してメラニン生成量の変化を測定し、メラニン生成抑制作用を評価した。
【結果】そばもやしの乾燥重量あたりの ORAC 値総量は、867.6μmol TE /g（H-ORAC 値：796.9、L-ORAC 値：70.7）と非常に高く、強い抗酸化作用を示した。
一方、マウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 へのそばもやし抽出物添加によって、LPS 刺激で誘導される NO 産生量が濃度依存的に減少し、600μg/ml 濃度添加で約 1/4 にまで抑制された。よって、そばもやし抽出物は明らかに抗炎症作用を有するものと考えられた。また、効果が認められた 150～600μg/ml 濃度範囲の添加では特に細胞毒性はみられず、安全であることも確認された。
さらに、マウス B16 メラノーマ細胞へのそばもやし抽出物の添加において、600μg/ml 濃度添加でメラニン生成量が約 1/2 に減少し、顕著なメラニン生成抑制効果が認められた。
以上のことから、そばもやしは抗酸化、抗炎症及び美白作用を持つ機能性素材として、健康食品や化粧品に利用できる可能性が示唆された。

Buckwheat sprout, antioxidant capacity, anti-inflammatory effect

発表責任者：岩間直子（naoko_iwama@aomori-itc.or.jp）

講演番号：1B4a11
講演日時：3 月 24 日 11:10～ 1 号館 B4 会場

血圧がゲニポシド酸の心房性ナトリウム利尿ペプチド分泌に与える影響

The Influence of Blood Pressure on Atrial Natriuretic Peptide Secretion of Geniposide Acid

○高橋 伶仁[1]、杉万 直[2]、細尾 信悟[2]、平田 哲也[2]、山口 康代[2]、山崎 寛生[2]、山口 翔平[1]、南野 直人[3]、中村 浩蔵[1]([1]信州大農、[2]小林製薬株式会社、[3]国立循環器病研究センター)
○ Ryuto TAKAHASHI[1], Nao SUGIMAN[2], Shingo HOSOO[2], Tetsuya HIRATA[2], Yasuyo YAMAGUCHI[2], Hiroo YAMASAKI[2], Shohei YAMAGUCHI[1], Naoto MINAMINO[3], Kozo NAKAMURA[1] ([1]Shinshu Univ., [2]Kobayashi Pharmaceutical CO., Ltd., [3]National Cerebral and Cardiovascular Center)

【目的】心房性ナトリウム利尿ペプチド（ANP）は、ナトリウム（Na）利尿作用や血管拡張により血圧を低下させ、身体の恒常性維持に重要な役割を果たすホルモンである。血圧上昇に伴う心負荷増大を心房圧受容体が感知し、心房細胞内にカルシウムイオン（Ca^{2+}）が流入することで分泌され、血圧を低下させる。近年、グルカゴン様ペプチド-1 受容体（GLP-1R）を介した ANP 分泌経路が発見された[1]。また、所属研究室では、ゲニポシド酸（GEA）の高血圧自然発症ラット（SHR）への単回経口投与による ANP 分泌促進作用を明らかにし[2]、その分泌作用が GLP-1R を介したものであることを示した。しかし、GEA による GLP-1R 作動性 ANP 分泌と血圧の関係は不明である。そこで本研究では、SHR に GEA と降圧剤を投与し、血圧低下が GEA の ANP 分泌と Na 利尿作用に与える影響を検討した。
【方法】雄性 16～19 週齢の SHR/NcrlCrlj を代謝ケージで飼育し、試験に使用した。尾静脈から生理食塩水（コントロール群; n=6)、GEA 60 mg/kg（GEA 群; n=6)、降圧剤であるロサルタンカリウム（LT) 30 mg/kg（LT 群; n=6）の各単独投与および LT 30 mg/kg と GEA 60 mg/kg の共投与（共投与群; n=6）の計 4 群で試験を行った。共投与では GEA の投与 30 分前に予め LT を投与し、血圧が低下した状態で GEA を投与した。投与前、投与 3、8、16、24 時間後にテイルカフ法により血圧測定を行った。また、投与 3 時間後、尾静脈から採血、血漿を作成し CLEIA 法により ANP を定量した。Na 利尿への影響は、同様の尾静脈投与を行い、投与 8、16、24 時間後に採尿し、尿中 Na 排泄量で評価した。
【結果】GEA 群ではコントロールと比較して有意に収縮期血圧が低下、血中 ANP 量が増加したことから、GEA は ANP 分泌により降圧作用を引き起こすことが再確認された。一方、LT で血圧を低下させ GEA を投与した共投与群では、GEA 群と比較して有意に血中 ANP 量が減少した。また、GEA 群では投与 16 時間後にコントロールと比較して尿中 Na 排泄量が有意に増加したが、共投与群では GEA 群と比較して Na 利尿作用が有意に減弱した。これらの結果から、GEA は ANP 分泌により降圧作用および Na 利尿作用を引き起こすが、血圧低下時には ANP 分泌が抑制され、それに伴い Na 利尿作用が減弱することが示された。血圧低下時には心房圧受容体を介した ANP 分泌が心房細胞内への Ca^{2+}流入量の減少によって抑制されるが、GEA による ANP 分泌も同様に、血圧低下に伴う心房細胞内への Ca^{2+}流入減少により分泌が抑制されたのではないかと推測された。

[1] Kim M., et al. (2013), *Nature Medicine*, 19, 567-575.
[2] Nakamura K., et al. (2018), *Journal of Functional Foods*, 40, 634-638.

Atrial natriuretic peptide, Geniposidic acid, Blood pressure lowering

発表責任者：中村浩蔵（knakamu@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：1B4a12
講演日時：3 月 24 日 11:21～ 1 号館 B4 会場

テレメトリー法を用いた抗ストレス成分の自律神経、血圧調節作用評価
Evaluation of orally ingested anti-stress food ingredients in autonomic nervous regulatory and antihypertensive by the telemetry system.
○早坂 柚実、高橋 佑介、山口 翔平、中村 浩蔵（信州大農）
○Yuzumi HAYASAKA, Yusuke TAKAHASHI, Shohei YAMAGUCHI, Kozo NAKAMURA (Shinshu Univ. of Agric.)

【目的】テレメトリー法は現在、最も客観的に生体データを測定でき、動脈圧および腎交感神経活動を無拘束・無麻酔下で連続記録することができる。我々は、ソバスプラウト乳酸発酵物の抗高血圧成分としてコリンエステル類（アセチルコリン（ACh）、プロピオニルコリン、ラクトイルコリン（LCh））を同定し[1]、テレメトリー法により ACh や LCh が高血圧自然発症ラット（SHR）の 30 日間の反復経口投与において、コントロール群（純水）と比較して血圧上昇抑制作用および腎交感神経活動低下を確認した。コリンエステル類は神経活動を制御し抗高血圧作用をもたらすことから、有用な抗ストレス食品成分として期待される。本研究では ACh、LCh および代表的な抗ストレス成分として知られる GABA を単回経口投与し、24 時間の神経活動および動脈圧を測定し、自律神経調節作用および血圧上昇抑制作用を評価した。
【方法】KAHA SCIENCES 社製のテレメトリーセンサ、システムを用いてラットに埋め込み手術を行った。SHR または SD ラット（雄性 11 週齢）をイソフルラン麻酔下で開腹し、血圧センサを腹部大動脈に挿入後、生体用接着剤で固定・止血を行った。続けて、腎交感神経を剥離し神経電位センサを取り付け、シリコン接着剤で固定し腹腔内にセンサを留置した。術後 1 週間を回復期間とした後、1 日ごとに純水、ACh、LCh、GABA を単回経口投与した。動脈圧および腎交感神経活動をサンプリングレート 1000 Hz（1k/s）で記録し、得られた動脈圧波形のトップを収縮期血圧、ボトムを拡張期血圧として 1 時間ごとの平均値を算出し、腎交感神経活動は 20 Hz のハイパスフィルターをかけた後、20 ms の時定数積分を行い、1 時間ごとの曲線化面積値を算出した。
【結果】SD では ACh、LCh、GABA の投与は純水投与と比較して血圧値に影響はほとんどなかった。一方で腎交感神経活動は純水投与と比較して低下が確認された。SHR では投与により血圧低下および腎交感神経活動の低下が確認された。本研究の結果から、ACh、LCh、GABA の投与によって血圧上昇抑制および腎交感神経活動の低下が連動していることが確認され、神経活動を介して血圧上昇を抑制していることが示唆された。なお、本研究は農研機構生研支援センター「革新的技術開発・緊急展開事業（うち経営体強化プロジェクト）」の支援を受け「新規機能性成分によるナス高付加価値化のための機能性表示食品開発」事業で実施した。

[1] K Nakamura et al. (2016) *Food Chem*, 15;201:185-9.

anti-stress food ingredients, telemetry system, autonomic nervous regulatory

発表責任者：中村浩蔵（knakamu@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：1B4a13
講演日時：3 月 24 日 11:32～ 1 号館 B4 会場

正常血圧ラットにおける経口摂取アセチルコリンによる降圧作用

Blood pressure lowering effect after oral administration of acetylcholine in normotensive rat

○坂本 希加子、松本 健督、早坂 柚実、高橋 佑介、中村 浩蔵（信州大農）
○Kikako SAKAMOTO, Kento MATSUMOTO, Yuzumi HAYASAKA, Yusuke TAKAHASHI, Kozo NAKAMURA (Shinshu Univ. of Agric.)

【背景・目的】我々は、アセチルコリン（ACh）を含む食品の経口摂取が高血圧自然発症ラット（SHR）において降圧作用を引き起こす可能性を明らかにし、ACh が新たな食品機能性成分として期待できることを示した[1、2]。ACh 含有食品を、高血圧予防を目的とした機能性食品として実用化するためには、利用者を想定し、高血圧状態だけでなく正常血圧状態での血圧への影響を調べる必要がある。そこで本研究では経口摂取 ACh の降圧作用について、本態性高血圧のモデルである SHR と、遺伝的にその対照として用いられている正常血圧の Wistar 京都ラット（WKY）を用いた単回経口投与試験を行い、系統間における血圧、心拍数変化を評価した。
【方法】雄性 10～14 週齢 SHR/Izm、WKY/Izm 各 4 匹を用い、ACh（10^{-9} mol/kg、10^{-7} mol/kg、10^{-5} mol/kg、10^{-3} mol/kg）の単回経口投与試験を行った。コントロールとしては純水を用いて試験を行った。飼育は代謝ゲージ内で行い、自由摂餌・自由摂水とした。単回経口投与試験では、絶食後、各投与試料を経口ゾンデを用いて投与し、投与直前と投与 3、6、9、24 時間後にテイルカフ法を用いて血圧測定を行った。
【結果】SHR と WKY において、コントロール（純水投与）では、収縮期血圧変化、拡張期血圧変化、心拍数変化のいずれにも差はみられなかった。ACh 投与では、SHR において WKY と比較して収縮期血圧変化、拡張期血圧変化ともに低値を示し、心拍数変化も ACh 10^{-9} mol/kg、10^{-5} mol/kg、10^{-3} mol/kg 投与で有意な低値を示した。しかし、WKY では降圧作用は限定的であった。これまでに我々は、SHR への ACh 経口投与試験において交感神経活動の上昇抑制を示唆するデータを得ている。SHR は WKY よりも交感神経活動が異常に亢進しているという報告[3]があることから、今回の試験でみられた経口摂取 ACh による降圧作用の系統間差は、交感神経活動レベルの差が起因している可能性がある。現在、ACh 摂取が SHR と WKY の交感神経活動に与える影響を調べるために、ACh 経口投与後の尿中カテコールアミン量の変動について調査を進めている。

(1) Nakamura, K. et al. (2013) Functional Foods, 5, 406-415.
(2) Nakamura, K. et al. (2016) Food Chem, 201, 185-189.
(3) Tsunoda, M. et al. (2008) Yakugaku Zasshi, 128, 1589-1594

acetylcholine, blood pressure lowering effect, normotensive rat

発表責任者：中村浩蔵（knakamu@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：1B4a14
講演日時：3 月 24 日 11:43～ 1 号館 B4 会場

酸化食用油によるインスリンシグナル伝達抑制と細胞死誘導

Suppression of insulin signaling and induction of cell death by oxidized edible oil

○上野 有紀[1]、川本 善之[2]、大澤 俊彦[1] ([1]愛知学院大心身科学、[2]中部大生命健康科学)
○Yuki UENO[1], Yoshiyuki KAWAMOTO[2], Toshihiko OSAWA[1] ([1]Aichi Gakuin Univ., [2]Chubu Univ.)

【背景】

昨年度の本大会において、我々の研究グループは、α-リノレン酸高含有の酸化食用油による神経細胞におけるアポトーシス誘導機構を報告した。我々はα-リノレン酸高含有の酸化食用油が、神経細胞以外の種々の細胞においても機能低下をもたらすのではないかと予想した。そこで、今大会では肝臓細胞におけるインスリンシグナル伝達に着目し、酸化食用油による細胞生存率・アポトーシス誘導に与える影響とともに検討することとした。

【方法】

市販の食用油 11 種類を 60℃、3 日間インキュベートした。これらをヒト肝臓由来細胞株 HepG2 に添加し一晩培養した。これらの細胞生存率は、Cell Counting Kit-8（同仁化学研究所）を用いて測定した。断片化 DNA の検出は、PI 染色後にフローサイトメーター（FACS）で Sub-G1 領域を解析した。インスリンシグナル伝達は、インスリン刺激後のリン酸化 Akt のタンパク質量をウェスタンブロッティング法により検討した。細胞内の脂質蓄積量の評価は、Oil Red O 染色法により行った。

【結果・考察】

市販の食用油 11 種類を酸化処理し、これらを HepG2 細胞へ投与したところ、酸化エゴマ油・アマニ油に高い細胞内油滴形成が見られた。また、酸化エゴマ油・アマニ油はインスリン刺激による Akt のリン酸化を強く抑制した。また、FACS 解析により Sub-G1 領域の割合が顕著に増加し、DNA の断片化が確認された。以上の結果から、エゴマ油およびアマニ油に含まれるα - リノレン酸由来酸化物はインスリンシグナル伝達の抑制と細胞生存率の低下、およびアポトーシス誘導を引き起こすことが示唆された。本研究により、α-リノレン酸高含有の酸化食用油は、肝臓におけるインスリンによる糖新生制御を障害する可能性が考えられた。

oxidation, edible oil, insulin signaling

発表責任者：上野有紀（ueno@dpc.agu.ac.jp）

講演番号：1B4a15
講演日時：3 月 24 日 11:54～ 1 号館 B4 会場

ファージディスプレイ法を用いた過酸化脂質修飾タンパク質抗体の作製
Phage display-based preparation of antibody against lipid peroxidation-modified proteins
○阿南 優佑、佐々木 栄太、板倉 正典、内田 浩二（東大院農生科）
○Yusuke ANAN, Eita SASAKI, Masanori ITAKURA, Koji UCHIDA (Grad. Sch. Agric. and Life Sci., Univ. of Tokyo)

【背景・目的】生体内の脂質が酸化されると様々な炭素鎖長を持つ過酸化脂質が生じる。これらの過酸化脂質には、化学的反応性の高いアルデヒド基を有するものが多く、タンパク質や核酸などの生体分子と反応し、構造変化や機能不全を引き起こす。我々はこれまでに、自己免疫疾患の全身性エリテマトーデス (SLE) モデルマウス血清中の過酸化脂質 4-oxo-2-nonenal (ONE) 修飾タンパク質に対する抗体価の上昇を確認し、そのモノクローナル抗体を作製している (Otaki *et al.*, JBC, 2010)。さらに、その抗体は DNA に対しても交差性を示すことが分かっている。しかしながら、ONE 修飾タンパク質抗体産生のメカニズムや、修飾タンパク質自体の自己免疫疾患との関係性は分かっていない。そこで本研究では、ファージディスプレイ法と用いて抗 ONE 修飾タンパク質抗体を作製し、その生理的・病態生理学的意義を解明することを目的とする。

【方法・結果】抗 ONE 修飾タンパク質モノクローナル抗体 (DSO) を用いて、ファージディスプレイ法により、抗体提示ファージの作製を行った。DSO 産生ハイブリドーマ細胞から抗体遺伝子の可変領域を PCR で増幅し、ファージミドベクターpSEX81 に挿入した。得られたファージミドを用いて大腸菌を形質転換し、ヘルパーファージ KM13 を感染させることで、DSO を提示したファージを作製した。その結果、DSO では抗体の発現に抑制をかけなければ大腸菌が増殖せず、十分な量のファージ抗体が得られなかった。発現した抗体が大腸菌に対する毒性を持っていたためと考えられる。

一方、新たな抗 ONE 修飾タンパク質抗体を得るために、抗体ライブラリーのスクリーニングを行うこととした。SLE モデル MRL/lpr マウスの脾臓細胞の抗体遺伝子を使用し、同様の方法で抗体提示ファージライブラリーを調製したところ、1×10^8 サイズの抗体ライブラリーの調製に成功した。イムノプレートに固相化した ONE 修飾タンパク質にファージライブラリーを加え、結合したファージからファージミドを回収した。回収したファージミドを用いて、再び大腸菌を形質転換し、上記の操作を繰り返すことで抗原親和性の高い抗体の割合を増幅した（バイオパニング）。バイオパニング前後のライブラリーを用いて、目的抗原に対する親和性を間接 ELISA 法により確認したところ、1 回のパニングごとに親和性が上昇した。また、ライブラリーから ONE 修飾タンパク質と DNA に交差性をもつ抗体を単離した。現在、さらなる抗体の解析と、得られた抗体への変異導入による親和性解析を行っている。

lipid peroxidation, post-translational modification, antibody

講演番号：1B4p01
講演日時：3 月 24 日 13:50～ 1 号館 B4 会場

細胞老化におけるタンパク質恒常性異常の解析

Analysis of Imbalance of Proteostasis in Cellular Senescence

○藤井 紗恵莉[1]、高氏 裕貴[2,3]、藤井 道彦[1,2] ([1]横浜市大国際総合、[2]横浜市大生命ナノシステム、[3]イチバンライフ(株))
○Saeri FUJII[1], Yuki TAKAUJI[2,3], Michihiko FUJII[1,2] ([1]Yokohama City Univ. Int'l Col. of Arts and Sci., [2]Yokohama City Univ. Grad. Sch. of Nanobiosci., [3]Ichibanlife Corp.)

正常体細胞は一定回数の分裂後に分裂を不可逆的に停止する。これは細胞老化とよばれる現象である。近年の研究で、細胞老化は様々なストレスによって引き起こされ、正常体細胞のみならず、がん細胞や不死化細胞においても細胞老化が誘導されることが明らかになった。特に、前者を継代老化、後者を誘導老化あるいは未成熟老化とよぶ。老化を誘導するストレスとして、酸化ストレス、DNA 障害、活性化がん遺伝子の発現などが有名である。

近年、細胞老化が in vitro の培養においてのみ観察される現象ではなく、生体内においても観察され、さらに、個体の老化や加齢性疾患の発症にも深く関与していることがわかってきた。したがって、細胞老化の誘導機構を解明し、それを調節することが可能になれば、加齢性疾患の予防や、人々の健康長寿に貢献できると期待される。我々はこれまでに、老化細胞に共通する特徴である DNA 複製の遅滞と細胞肥大化に着目し、老化細胞では増殖細胞と比較して DNA 含量に変化はないが、タンパク質含量は数倍に増加していることを見出した。そして、過剰なタンパク質の合成や蓄積を抑えることで細胞老化を抑制できることを示してきた。これらの特徴から、細胞老化は、ストレスによって DNA 複製が遅滞し細胞周期が延長していく一方で、細胞内でタンパク質の合成が進み蓄積することで、細胞が肥大化・扁平化していく過程で引き起こされると考えた。しかし、過剰なタンパク質の合成や蓄積が細胞老化を誘導する機構については明らかになっていない。本研究では、タンパク質凝集の細胞老化への関与について検討したので、その結果について報告する。

Cellular Senescence, Proteostasis

講演番号：1B4p02
講演日時：3 月 24 日 14:01～ 1 号館 B4 会場

包括的ペプチド利用による動脈弛緩反応の加齢による変容の解明

Comprehensive studies on aging-induced modification using vasorelaxing dipeptides

○小山 大貴、孫 星恵、松村 成暢、井上 和生、大日向 耕作 (京都大学)
○Daiki Koyama, Xinghui Sun, Shigenobu Matsumura, Kazuo Inoue, Kousaku Ohinata (Kyoto Univ. of Agric)

【目的】人は血管とともに老いると言われ、加齢により血管機能が低下することが知られているが、詳細は不明な点が多い。これまで我々は、高血圧自然発症ラット（SHR）の摘出血管を用いて、ジペプチドの中に動脈弛緩活性を示すものが存在し[1]、その構造－活性相関情報に基づき食品ペプチドの機能性予測が可能であることを示してきた[2]。本研究では、加齢による血管機能の変容に焦点を当て、高血圧発症前期および後期における SHR の摘出血管に対する反応性を、ジペプチドライブラリーを用いて包括的・体系的に検討した。さらに、高血圧発症前期と後期において、動脈弛緩活性を示すジペプチドの作用機構を解明するとともに、それらの血圧降下作用を検討した。
【方法】高血圧発症前期（15-18 週齢）および後期（25 週齢以上）の SHR から腸間膜動脈を摘出し、336 種類のジペプチドを用いて動脈弛緩活性を検討した。高血圧発症前期および後期において、強力な動脈弛緩活性を示したジペプチドに関しては、各種アンタゴニストを用いて動脈弛緩機構を検討した。また、ジペプチドを SHR に経口投与し、tail-cuff 法により血圧を測定した。
【結果と考察】ジペプチドライブラリーを用いた包括的検討により、高血圧発症前期においては Ser-Tyr（SY）が最も強い動脈弛緩作用を示すことを見出した。SY の動脈弛緩作用は、一酸化窒素（NO）合成酵素阻害剤の L-NAME によってブロックされ、NO 系を介していることが示唆された。また、SHR に SY を経口投与したところ血圧降下作用が認められ、この作用は L-NAME 投与により阻害された。したがって、SY は NO 系を介して動脈弛緩・血圧降下作用を示すことが判明した。一方、高血圧発症後期では、動脈弛緩作用を示すペプチドのパターンが異なり、Asn-Ala（NA）が最も強い動脈弛緩作用を示すことを見出した。NA の動脈弛緩作用は L-NAME や indomethacin では阻害されず、CCK アンタゴニストの lorglumide によってブロックされ、CCK 系を介していることが示唆された。また、高血圧発症後期（32～34 週齢）の SHR に NA を経口投与したところ血圧降下作用が認められた。以上、ジペプチドの包括的・体系的な検討は、血管機能の加齢による変容の実体解明につながるものと考えられる。
【結論】ジペプチドライブラリーを用いて血管機能の加齢による影響を検討した。その結果、高血圧発症前期と後期で動脈弛緩作用を示すジペプチドのパターンが異なり、前期では SY が NO を介して、後期では NA が CCK を介して動脈弛緩活性を示した。いずれのジペプチドも血圧降下作用を示した。

[1] Kagebayashi et al. Mol. Nutr. Food Res. (2012) 56,1456-1463.
[2] Kontani et al. Mol Nutr Food Res. (2014) 58,359-364.

Aging, Vasorelaxation, Dipeptide library

講演番号：1B4p03
講演日時：3 月 24 日 14:12～ 1 号館 B4 会場

「EGCG による抗加齢タンパク質 SMP30 の発現制御機構」
Regulatory mechanism on SMP30 expression by EGCG
○荒川 航太、井上 博文、勝間田(坪井) 理恵、高橋 信之、上原 万里子（東農大農）
○Kota ARAKAWA, Hirofumi INOUE, Rie KATUMATA(TUBOI), Nobuyuki TAKAHASHI, Mariko UEHARA (Tokyo Univ. of Agric)

【目的】我が国では老若男女を問わず、生活習慣病や加齢性疾患に対する予防・改善効果について社会的関心が高く、超高齢社会という背景からも健康寿命の延伸に対する食品成分の有効性が求められている。そこで我々は加齢とともに発現が減少する senescence marker protein 30(SMP30)に着目した。SMP30 はラット肝臓において加齢と共に著しく減少するタンパク質として見出された加齢指標タンパク質であり、近年では Nrf-2 の活性化の誘導を介した抗酸化能や、カルシウムシグナルを制御することで抗アポトーシス能を発揮することが報告されている。しかしながら、これまでに SMP30 の発現を制御する食品成分についての探索は検討が行われていない。我々の研究グループでは SMP30 の発現を上昇させる食品成分を複数見出しているが、本発表では特に SMP30 の発現を顕著に上昇させた食品成分である Epigalloatechin-*3*-gallate(EGCg)に着目し、SMP30 発現調節機構の解明を行った。
【方法/結果】まず、ラット肝臓由来細胞株である FAO 細胞に対し、EGCg を終濃度 1－300μM で 24 時間処理し、WST-8 法による細胞毒性評価を行った。その結果、EGCg では無処理群に比し、いずれの濃度においても細胞毒性が認められなかった。続いて、EGCg を 10-100μM で 24 時間処理し、western blot 法による SMP30 の発現変動を解析した。その結果、無処理に比し、30 μM EGCg 処理から SMP30 の発現が上昇することを明らかにした。先行研究により、tert-butyl hydroperoxide(t-BHP)誘導性の酸化ストレス下において ERK1/2 経路を介して SMP30 の発現が減少することが報告されていることから、我々は EGCg の併用処理によって、t-BHP による SMP30 の発現減少が抑制されるか否かについて検討を行った。その結果、t-BHP 処理による SMP30 発現の減少並びに ERK1/2 のリン酸化は、EGCg 併用処理により抑制された。次に、本条件においても、t-BHP による SMP30 の発現減少が ERK1/2 活性により制御されているのかについて明らかにするために、我々は MEK-ERK1/2 活性阻害剤 PD98059 を用いた検討を行った。その結果、t-BHP による SMP30 の発現減少は PD98059 処理により抑制された。
【結論】本研究により SMP30 の発現調節を上昇させる食品成分として EGCg を同定した。また、EGCg 処理は t-BHP 誘導性による ERK1/2 活性を抑制することで、SMP30 の発現減少を抑制することが示唆された。今後、他の茶カテキン類(EGC, EC, ECg)についても検討していく必要があると考える。

EGCg, SMP30, t-BHP

発表責任者：荒川 航太（10218001@nodai.ac.jp）

講演番号：1B4p04
講演日時：3 月 24 日 14:23～ 1 号館 B4 会場

高麗人蔘のアンチエイジング効果について

Anti-aging effects in *Panax ginseng*

○沢辺 昭義[1,2]、山下 敦之[2]、山中 咲樂[1]、藤平 峻弘[1]、大西 夏実[2]、竹田 竜嗣[3]、藤田 佳孝[4]（[1]近畿大農、[2]近畿大院農、[3]関西福祉科学大・健康福祉、[4]王子食品(株)）
○Akiyoshi SAWABE[1,2], Atsuyuki YAMASHITA[2], Sakura YAMANAKA[1], Toshihiro FUJIHIRA[1], Natsumi OHNISHI[2], Ryuji TAKEDA[3], Yoshitaka FUJITA[4] ([1]Faculty of Agriculture, Kindai University, [2]Graduate School of Agriculture, Kindai University, [3]Faculty of Health and Welfare, Kansai University of Welfare Sciences, [4]Oji Foods Inc., Ltd.)

【目的】

高麗人蔘は学名由来から「万能の神薬」と言われており，滋養強壮を主体として様々な食品に利用されている．含有される成分は，根のサポニン類が特徴的である．我々はアンチエイジングを目的とした天然由来成分の探索研究を行っている．本研究では高麗人蔘のアンチエイジング効果について検討した．肌にしなやかな弾力を与えるコラーゲンやエラスチン，みずみずしい潤いを保つヒアルロン酸など，美肌に関わる成分が真皮では多くつくられている．こうした美肌成分の生成に深く関わっているのが「線維芽細胞」である．若々しい肌には，真皮の中にコラーゲンやエラスチン，ヒアルロン酸などが多く含まれている．肌内部にある線維芽細胞が活性化して，それらを活発に生産しているからである．線維芽細胞に活発性がなくなる原因は様々であるが，コラーゲンに糖化反応が起こると機能が低下し，肌のハリや弾力性が低下する．そこで今回は，抗糖化に着目し，肌の老化の進行を防ぐことを目的とした．今回は，抽出方法の異なる 2 種のエキスについてヒト由来の線維芽細胞を用いたコラーゲン産生，抗糖化活性試験などを検討し，それらの抽出分離を行い，単離した成分について高麗人蔘の肌の老化の進行を防ぐ美肌効果（アンチエイジング効果）について検討したので報告する．

【方法および結果】

抽出方法の異なる 2 種のエキスは，6 年根 高麗人蔘粉末（Ginsenoside Rb1：2.6g/100g，Rg1：0.94g/100g）：A および 6 年根 高麗人蔘エキス（Ginsenoside Rb1：3.6g/100g，Rg1：1.1g/100g）：B を用いた．線維芽細胞に対する試料の影響について検討した結果，いずれの濃度でも細胞毒性は認められず，0.01 および 0.1 μg/ml の濃度で細胞増殖が認められた．抗糖化活性試験を行った結果，2 μg/ml から高麗人蔘エキス (B) に，10 μg/ml から高麗人蔘粉末 (A) に阻害が有意に認められた．また，高麗人蔘根の粉末から分画，単離した成分の AGEs 生成阻害活性を行った結果，顕著な活性が得られた．

以上のことから，高麗人蔘は肌の真皮層にある線維芽細胞に作用し，コラーゲン，ヒアルロン酸を産生し，さらに抗糖化作用が認められたことから，美肌効果を有するサプリメントへの応用が期待できる．

Panax ginseng, AGEs inhibitory activity, Anti-aging effects

講演番号：1B4p05
講演日時：3 月 24 日 14:34～ 1 号館 B4 会場

摘果柿に含まれる機能性成分の有効利用

Utilization of the functional ingredient included in immature persimmon

○大西 夏実[1]、和田 瑞彩[2]、井上 美穂[2]、飯田 彰[1,2]、澤邊 昭義[1,2] ([1]近畿大院農、[2]近畿大農)
○Natsumi OONISHI[1], Mizusa WADA[2], Miho INOUE[2], Akira IIDA[1,2], Akiyoshi SAWABE[1,2] ([1]Graduate School of Agriculture, Kindai University, [2]Faculty of Agriculture, Kindai University,)

【目的】

食品には，生命維持のための栄養素の供給という面の 1 次機能と，おいしく食べようという嗜好特性の面の 2 次機能そして，生理活性などの 3 次機能がある．日本では高齢者人口が多く，2020 年には 3 人に 1 人が高齢者と言われており，これから高齢者向け食品の開発が必要とされる．本研究では 3 次機能において，生理活性の付与として抗老化の観点から AGEs 生成阻害活性成分の探索を行う．続いて 2 次機能において，高齢者は摂取・嚥下障害を起こしやすく，そうなると美味しさも損なわれてしまうのでそれを解消するために，香りの劣化抑制とゲル化を活用したいと考えている．

今回は柿（*Diospyros kaki*）の栽培工程の 1 つである摘果によって切り落とされる果実（ここでは摘果柿とする）を使用した．摘果柿は切り落とされたらそのまま地面に放置されてしまう．本来は廃棄される未利用資源である摘果柿を有効利用することを本研究の目的としている．使用した摘果柿の品種は刀根早生（*Diospyros kaki Tone*）と富有（*Diospyros kaki Fuyu*）である．本発表は，抗糖化に着目し，疾病および老化の進行を防ぐことを目的とし摘果柿に含まれる成分の AGEs 生成阻害活性について検討し，柑橘系フレーバーの劣化抑制効果について検討したので報告する．

【方法および結果】

渋柿は刀根早生(6.33kg)，甘柿は富有(6.50kg)の摘果柿を使用した．2 種の摘果柿をそれぞれ果皮と果肉に分け，MeOH で浸漬し，MeOH 抽出物を得た．次いでヘキサン，1-ブタノールで抽出し，それぞれヘキサン抽出物，1-ブタノール抽出物，水抽出物とした．その内，刀根早生の果皮の 1 ブタノール抽出物をシリカゲルクロマトグラフィーおよびゲル濾過法を反復して分離を進め，3 種の成分を単離した．NMR, MS の各スペクトルの結果から，4-(2-*O*-glucopyranosyl ethyl)phenol [**1**], Gallic acid [**2**], Betulinic acid [**3**]の 3 つの化合物が同定された．ついで，単離した化合物において AGEs 生成阻害活性試験を測定した結果，ポジティブコントロールの aminoguanidine と比較して，化合物 **3** は非常に高い阻害活性を示した。有効利用として，柑橘系香料 citral の劣化抑制効果について検討し，興味ある知見を得た．

今後，毎日服用するサプリメントや食品添加物としての利用が期待される．

immature persimmon, AGEs inhibitor, citrus fruit flavor

講演番号：1B4p06
講演日時：3 月 24 日 14:55～ 1 号館 B4 会場

フェルラ酸は Nrf2 活性化を介して Aβ誘導性細胞死および tau リン酸化亢進を抑制する
Ferulic acid prevents Aß-induced cell death and tau phosphorylation in SK-N-SH cells via Nrf2 activation

○梅田 将実[1]、石橋 実学[2]、原 崇[1]、池内 健[3]、城 斗志夫[1]、中村 澄子[4]、西澤 正豊[3]、山崎 彬[5]、小林 篤[5]、大坪 研一[4] ([1]新潟大農、[2]新潟大院自然科学、[3]新潟大脳研、[4]新潟薬大応用生命、[5]越後製菓)
○Masami UMEDA[1], Mitsuhisa ISHIBASHI[2], Takashi HARA[1], Takeshi IKEUCHI[3], Toshio JOH[1], Sumiko NAKAMURA[4], Masatoyo NISHIZAWA[3], Akira YAMAZAKI[5], Atsushi KOBAYASHI[5], Ken'ichi OHTSUBO[4] ([1]Fac. Agric., Niigata Univ., [2]Gad. Sch. Sci. & Technol., Niigata Univ., [3]Brain Res. Inst., Niigata Univ., [4]Appl. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., [5]Echigo Seika Co., Ltd.)

【目的】
フェルラ酸は植物細胞壁に豊富に存在する抗酸化物質であり、アルツハイマー病の予防効果が期待されている。マウスへの経口投与試験により、フェルラ酸はアミロイドβ（Aβ）誘導性記憶障害を改善することが報告されている。アルツハイマー病の病理的特徴は、Aβ が凝集した老人斑とリン酸化 tau が凝集した神経原繊維変化である。Aβ は神経細胞毒性を示すペプチドであり、酸化ストレスや tau の過剰リン酸化を誘導するとした報告がある。本研究では、株化神経細胞の Aβ 誘導性細胞死および tau リン酸化に対するフェルラ酸の抑制効果について検討し、さらに、生体の酸化ストレス防御機構において重要な役割を担う Nrf2 の活性化がフェルラ酸の効果に関与するか検討した。

【方法】
Aβ 誘導性細胞死は、10 nM Aβ42 を添加してヒト神経芽細胞腫細胞株 SK-N-SH を 3 日間培養することにより誘導した。細胞死／アポトーシス、細胞内 ROS はフローサイトメーター解析により、アポトーシス関連タンパク質（Bax、Bcl-2 など）およびリン酸化 tau、Nrf2 はイムノブロット法により評価した。さらに、siRNA を用いた RNA 干渉により Nrf2 をノックダウンし、フェルラ酸による効果がみられるか検討した。

【結果】
Aβ42 処理により SK-N-SH 細胞の細胞死／アポトーシス、Bax および活性化型 caspase-3 の増加、Bcl-2 の減少が確認された。同時に、細胞内 ROS レベルの上昇と tau リン酸化の亢進が確認された。これらの現象は、フェルラ酸（100～1000 nM）の前処理（24 h）により抑制された。また、フェルラ酸は Nrf2 を活性化し、抗酸化酵素 HO-1 の発現を増大させた。siRNA により Nrf2 発現を減弱させると、Aβ 誘導性細胞死ならびに tau リン酸化に対するフェルラ酸の抑制効果が顕著に減弱した。以上の結果より、フェルラ酸は Nrf2 を活性化することにより酸化ストレスを抑制し、Aβ 誘導性神経細胞死および tau リン酸化亢進の抑制につながると推察される。

本研究は、内閣府 SIP「次世代機能性農林水産物・食品の開発」の一部として実施した。

ferulic acid, amyloid beta-induced neuronal cell death, Nrf2

講演番号：1B4p07
講演日時：3 月 24 日 15:06～ 1 号館 B4 会場

シアニジン分解物のアミロイドβ誘導性神経細胞死抑制効果

Protective effect of cyanidin degradation products against amyloid beta-induced neuronal cell death

○石橋 実学[1]、梅田 将実[2]、原 崇[2]、池内 健[3]、中村 澄子[4]、城 斗志夫[2]、西澤 正豊[3]、山崎 彬[5]、小林 篤[5]、大坪 研一[4] ([1]新潟大院自然科学、[2]新潟大農、[3]新潟大脳研、[4]新潟薬大応用生命、[5]越後製菓)

○Mitsuhisa ISHIBASHI[1], Masami UMEDA[2], Takashi HARA[2], Takeshi IKEUCHI[3], Sumiko NAKAMURA[4], Toshio JOH[2], Masatoyo NISHIZAWA[3], Akira YAMAZAKI[5], Atsushi KOBAYASHI[5], Ken'ichi OHTSUBO[4] ([1]Gad. Sch. Sci. & Technol., Niigata Univ., [2]Fac. Agric., Niigata Univ., [3]Brain Res. Inst., Niigata Univ., [4]Appl. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., [5]Echigo Seika Co., Ltd.)

【目的】黒米糠は，アルツハイマー病予防効果が期待される[1)]。アルツハイマー病の病理学的特徴は老人斑と神経原線維変化であり，それぞれアミロイドβ（Aβ）とリン酸化 Tau を構成成分とする。演者らは，黒米糠の主要色素成分である cyanidin-3-O-glucoside（Cy3G）およびそのアグリコンである cyanidin（Cy）が Aβ42 誘導性神経細胞死、Tau リン酸化および活性酸素種（ROS）の細胞内レベル亢進を抑制することを報告してきた。本研究では，生体内で検出されている主な Cy 分解物を対象とし，Aβ誘発性神経細胞毒性に対する抑制効果を示すか検討した。

【方法】神経細胞モデルとして，ヒトおよびマウスの神経芽細胞腫細胞株（SK-N-SH、Neuro 2a）を用いた。Aβ誘導性神経細胞死は、10 nM Aβ42 存在下で 3 日間培養することにより誘導した。Aβ42 処理に先立ち、protocatechuic acid、gallic acid、syringic acid、vanillic acid などの Cy 分解物により 24 時間前処理した。細胞死／アポトーシスおよび細胞内 ROS レベルは FACS 解析により評価した。リン酸化 Tau および Nrf2 は，イムノブロット法により検出した。

【結果及び考察】

生理的濃度（1～10 nM）の Aβ42存在下で3日間以上培養すると，SK-N-SH 細胞および Neuro 2a 細胞の細胞死／アポトーシスが誘導され，細胞内 ROS レベル亢進が確認された。この Aβ42誘導性細胞死／アポトーシスとそれに伴う ROS レベル亢進に対し, 数百 nM の protocatechuic acid、gallic acid、vanillic acid は抑制的に作用した。また、Aβ42によるリン酸化 Tau レベルの亢進が確認され，この亢進を protocatechuic acid、gallic acid、vanillic acid は有意に抑制した。一方，protocatechuic acid、gallic acid、vanillic acid は酸化ストレスから細胞を保護する転写因子 Nrf2を活性化することが確認された。以上の結果より，生体内で生じ得る幾つかのアントシアニン分解物が Aβ神経細胞毒性から神経細胞を保護し、その作用機序として Nrf2活性化が関与する可能性が伺えた。

本研究は，内閣府 SIP「次世代機能性農林水産物・食品の開発」の一部として実施した。

1) S. Nakamura et al.:*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, (2016) .

cyanidin degradation products, amyloid beta-induced neuronal cell death, tau phosphorylation

講演番号：1B4p08
講演日時：3 月 24 日 15:17～ 1 号館 B4 会場

黒米糠の経口投与による老齢マウス脳組織における tau リン酸化抑制

Oral administration of black rice bran attenuates tau phosphorylation in the brains of aged mice

○原 崇[1]、石橋 実学[2]、池内 健[3]、金古 堅太郎[1]、中村 澄子[4]、城 斗志夫[1]、西澤 正豊[3]、三ツ井 敏明[1]、山崎 彬[5]、小林 篤[5]、大坪 研一[4] ([1]新潟大農、[2]新潟大院自然科学、[3]新潟大脳研、[4]新潟薬大応用生命、[5]越後製菓)

○Takashi HARA[1], Mitsuhisa ISHIBASHI[2], Takeshi IKEUCHI[3], Kentarou KANEKO[1], Sumiko NAKAMURA[4], Toshio JOH[1], Masatoyo NISHIZAWA[3], Toshiaki MITSUI[1], Akira YAMAZAKI[5], Atsushi KOBAYASHI[5], Ken'ichi OHTSUBO[4] ([1]Fac. Agric., Niigata Univ., [2]Gad. Sch. Sci. & Technol., Niigata Univ., [3]Brain Res. Inst., Niigata Univ., [4]Appl. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., [5]Echigo Seika Co., Ltd.)

【目的】 黒米はアルツハイマー病予防効果が期待されており [1)]，演者らは黒米糠に含まれるアントシアニンの抗アルツハイマー活性について研究を進めてきた。アルツハイマー病の病理的特徴は，アミロイドβ（Aβ）が凝集した老人斑とリン酸化 Tau（p-Tau）が凝集した神経原繊維変化である。近年，神経原繊維変化こそがアルツハイマー病の病態形成に重要とする説が浮上している。本研究では，ヒト Tau 安定発現細胞を活用し，Aβ 誘導性細胞死に及ぼす p-Tau の影響について検討した。また，老齢マウスに黒米糠を長期間投与し，Tau リン酸化を抑制するか検討した。

【方法】 Neuro 2a 細胞とこの細胞にヒト Tau（1N4R）を安定発現させた Neuro 2a MAPT 細胞を用い，10 nM Aβ42 を添加して数週間培養することにより Aβ 誘導性細胞死を誘発した。細胞死は MTT 法，アポトーシスは Annexin V を指標とした FACS 解析により評価した。Tau および p-Tau はイムノブロット法により検出した。また，30 週齢以上の C57BL/6 マウス(♂)に黒米糠を 15%含む餌を自由摂食させて 11～12 ヵ月間飼育後，脳組織の Tau および p-Tau を検出し，さらに，MS/MS 解析により脳組織にアントシアニンが存在するか調べた。

【結果】 Neuro 2a MAPT 細胞には多量のヒト Tau が細胞内に存在し，10 nM Aβ42 を添加して 4 週間培養すると，顕著な細胞生存率の低下が確認された。一方，Neuro 2a 細胞は 10 nM Aβ42 を添加して 4 週間培養しても細胞生存率の低下が極わずかであった。p-Tau は，Neuro 2a MAPT 細胞において，Neuro 2a よりも明らかに多量に存在していた。これらの結果より，p-Tau レベル亢進が神経細胞死へ導くことが伺える。黒米糠の長期経口投与試験の結果，対照群と比較し，黒米糠投与群マウスの脳組織における p-Tau/Tau 比は有意に低いレベルを示した。また，MS/MS 解析の結果，黒米糠投与群マウスの脳組織からシアニジン六炭糖が検出された。黒米糠は神経原繊維変化の形成を抑制し，アルツハイマー病予防に役立つ可能性がある。

本研究は，内閣府 SIP「次世代機能性農林水産物・食品の開発」の一部として実施した。

1) S. Nakamura et al.:*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, (2016) .

black rice bran, cyanidin-3-glucoside, tau phosphorylation

発表責任者：原　　崇（harata@agr.niigata-u.ac.jp）

講演番号：1B4p09
講演日時：3 月 24 日 15:28～ 1 号館 B4 会場

カルノシンによる筋脳相関活性化とその分子基盤
Molecular basis of muscle brain correlation activation by carnosine

○尾上 詩織[1]、佐藤 三佳子[2]、片倉 喜範[3] ([1]九大院・シス生、[2]日本ハム・中研、[3]九大院・農院)
○Shiori ONOUE[1], Mikako SATO[2], Yoshinori KATAKURA[3] ([1]Grad. Sch. Life Sci.,Kyushu Univ, [2]R&D center NH Foods Ltd, [3]Fac. Agric. Kyushu Univ)

【背景・目的】

鶏胸肉に豊富に含まれる、イミダゾールジペプチドの一種であるカルノシン・アンセリンが中・高齢者の記憶機能を改善することが明らかとなった。しかし、その分子基盤については明らかになっていない。これまでに、運動による筋活性化が認知症を抑制すること、カルノシンが筋肉細胞に作用しうること、またカルノシンが腸管細胞に対して運動模倣効果を示すことが明らかとなっている。そこで本研究では、カルノシンが筋肉細胞に対して運動模倣効果を示し、その結果として脳機能が改善するものと想定し、研究を行う。そこでまず、カルノシンの筋肉細胞に対する運動模倣効果について、検証することを目的とした。

【方法】

本研究では、骨格筋細胞モデルとしてマウス横紋筋細胞(C2C12)を用いた。まず、先行研究により腸管細胞において効果が確認されている、SIRT1 および PGC-1 α 発現増強効果について、定量 RT-PCR 法を用いて検証した。次に、ミトコンドリア機能を評価するため、細胞を Mito Tracker Red および Green にて染色し、フローサイトメトリーにて蛍光強度を測定することで、ミトコンドリア数およびミトコンドリア膜電位の変化を追跡した。また、共焦点レーザー顕微鏡にて、ミトコンドリアの様子を観察した。また、ミトコンドリアにおける β 酸化関連遺伝子について、定量 RT-PCR 法を用いて検証した。

【結果・考察】

まず、定量 RT-PCR を行った結果、カルノシンは C2C12 細胞において、SIRT1 および PGC-1 α の mRNA 発現レベルを有意に増強することが明らかとなった。また、Mito Tracker Red および Green を用いた染色で、カルノシンはミトコンドリア数の増加および、ミトコンドリアを活性化することが明らかとなった。加えて、β 酸化関連遺伝子の発現を増強した。以上の結果より、カルノシンが筋肉細胞において、運動模倣効果を発揮しうるものと考えられた。今後は、筋肉細胞が活性化されることによって生じる筋脳相関活性化にカルノシンが与える影響について、in vitro/in vivo の両方で更なる検証を行っていく。

carnosine, skeletal muscle, muscle brain correlation

講演番号：1B4p10
講演日時：3 月 24 日 15:39～ 1 号館 B4 会場

投与タイミングの違いが生理的濃度のルテオリンによる Nrf2 の活性化に与える影響

The difference of the timing of a physiological concentration of luteolin affects the activation of Nrf2

○北風 智也[1]、牧山 敦志[2]、山下 陽子[2]、芦田 均[2] ([1]神戸大院・科技イノベ、[2]神戸大院・農)
○Tomoya KITAKAZE[1], Atsushi MAKIYAMA[2], Yoko YAMASHITA[2], Hitoshi ASHIDA[2] ([1]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [2]Grad. Sch. Agri. Sci., Kobe Univ.)

【背景】ルテオリンはシソやピーマンなど多くの植物に含まれるフラボノイドであり、日常的に摂取する食事で血中濃度が 100 nM 程度に達する。これまでにルテオリンは肝臓における薬物代謝第I相酵素の発現誘導を抑制し、一方で、薬物代謝第II相酵素の発現量を増加させることが報告されている。しかし、これらの作用は 100 nM を超える濃度で検討されており、日常的な食事で達する生理的な濃度である 100 nM 以下のルテオリンが生体に及ぼす影響は不明である。
【目的】Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)は、薬物代謝第II相酵素の発現を介して酸化ストレスなどに対する防御機構を担う転写因子である。Nrf2 は Keap1 と複合体を形成しており、活性が制御されている。また、Nrf2 の発現量は日内変動することが報告されている。そこで本研究では、生理的濃度のルテオリンが肝臓の薬物代謝第II相酵素の発現と Nrf2 の活性化に与える影響を検討するとともに、投与タイミングについても検討を行った。
【方法・結果】ヒト肝ガン由来 HepG2 細胞を 10 pM から 1 μM のルテオリン存在下で培養し、薬物代謝第II相酵素の発現量を検討した結果、全ての濃度のルテオリンで薬物代謝第II相酵素の発現量が増加した。Nrf2 の活性を評価した結果、ルテオリンは Nrf2 のリン酸化、核内移行、ならびに抗酸化剤応答配列への結合を増加させた。一方で、Nrf2 の mRNA 発現には影響を与えなかった。ルテオリンによる Nrf2 のリン酸化と Nrf2 の転写活性の増加は ERK1/2 経路の阻害剤 U0126 により抑制された。ルテオリンが Nrf2 の分解に与える影響をタンパク質の翻訳阻害剤であるシクロヘキシミド存在下で検討した結果、ルテオリンは Nrf2 の分解を遅延することが明らかとなった。Keap1 の構造変化によって、Keap1-Nrf2 の複合体が解離することから、Keap1 の構造変化を評価した結果、ルテオリンは構造変化した Keap1 を増加させた。以上の結果から、生理的濃度のルテオリンは ERK1/2 経路を介して Nrf2 のリン酸化を促進し、また、Keap1 の構造を変化させることで Nrf2 を分解から保護し、下流の薬物代謝第II相酵素の発現量を増加させることが示唆された。さらに、投与タイミングを変えて ICR マウスにルテオリンを 0.01-10 mg/body weight の濃度で 1 週間経口投与した結果、マウスの活動期開始時にあたる Zeitgeber time (ZT) 10 に投与した群では薬物代謝第II相酵素の発現量が増加したのに対して、マウスの休眠期開始時である ZT22 に投与した群では変化がみられなかった。このことから、生理的濃度のルテオリンによる Nrf2 の活性化には投与タイミングが重要であることが判った。
本研究は科学研究費補助金 17H00818 の助成を受けたものです。

Luteolin, Nrf2, ERK1/2

講演番号：1B4p11
講演日時：3 月 24 日 16:00～ 1 号館 B4 会場

スピラントールによる塩味増強効果の作用機構の解明に関する研究
Study on elucidation of the mechanism of salty taste enhancement effect by Spilanthol
○早坂 健史[1]、白川 仁[1]、庄司 靖隆[2]、宮澤 利男[2]、駒井 三千夫[1]([1]東北大院農、[2]小川香料株式会社)
○Kenshi HAYASAKA[1], Hitoshi SHIRAKAWA[1], Yasutaka SHOJI[2], Toshio MIYAZAWA[2], Michio KOMAI[1] ([1]Tohoku Univ. of Agric, [2]Ogawa & Co., Ltd)

塩化ナトリウム(NaCl)は、生物にとって生命維持に欠かせないナトリウムの摂取源として重要な物質である。また、飲食物に塩味を付与して美味しく調味する目的や、食物の保存性の向上や物性改善などを目的として広く一般に用いられている。しかし、その過剰摂取は、高血圧や心疾患、脳血管疾患、腎臓疾患など様々な疾病を引き起こす原因となる。そのため、現代社会において、食塩の摂取を減らす動きが強まっている。そこで、塩味を増強させて結果的に食塩の摂取量を減らすことのできる「塩味増強剤」の開発が望まれている。スピラントール(Spilanthol)は、キク科キバナオランダセンニチ(Spilanthes acmella L. var. oleracea Clarke：別名　ハトウガラシ)に含まれる辛味成分である。これまでに、ヒトの味官能評価試験では塩味増強効果が確認され、ラットを用いた電気生理学的な検討においても、塩味増強効果が確認された。本研究では、スピラントールによる塩味増強効果の作用機構を神経生理学的に解明することを目的とした。

実験動物は SD 系雌ラット(8-14 週齢)を用いた。ラットにソムノペンチルで麻酔した後、左側鼓索神経束を結合組織から遊離させ、白金電極に接触させた。不関電極は手術野付近に接触させた。舌に刺激溶液を流した時に生じるインパルス放電を増幅し、積分してペンレコーダーで記録した。用いた味刺激溶液は、0.03M グルタミン酸ナトリウム(MSG)、0.5M スクロース、5mM 塩酸(HCl)、3mM 安息香酸デナトニウム(Den)、3μM 塩酸キニーネ(Q-HCl)、0.03M NaCl、これらの基本五味の各溶液に 5.6μM または 11.2μM となるようにスピラントール(Spi)を加えたものを用いた。

結果として、各刺激溶液における一過性の応答(phasic response)、持続的な応答(tonic response)、全体の応答(total response)の AUC を比較したところ、Q-HCl 以外の味刺激溶液で、5.6μM または 11.2μM spi 添加で phasic response、tonic response、total response のいずれか、もしくは全てが有意に上昇した。苦味の中でも Q-HCl の場合には増強が全く認められないことが分かり、spi による味応答増強効果のメカニズム解明のヒントとなった。さらに、本研究では、ヒトにおいても spi による味増強効果があるのかどうか検討するために、ヒト官能評価試験を行い、味増強作用の重要な要因であると考えている TRP チャネルを阻害した条件下で検討した結果についても報告する予定である。

taste, salt, spilanthol

講演番号：1B4p12
講演日時：3 月 24 日 16:11～ 1 号館 B4 会場

カルシウム単回経口投与による消化管ホルモン分泌を介した食欲抑制作用機構の検討

Mechanism of appetite suppression via intestinal hormone secretion by single oral administration of calcium

○小笠原 奨之、比良 徹、原 博（北海道大院・農）
○Shono OGASAWARA, Tohru HIRA, Hiroshi HARA (Hokkaido Univ.)

【背景】カルシウムを補足した食事が、短期的あるいは長期的に食欲を抑制することが報告されている。一方で腸管の内分泌細胞に発現しているカルシウム感知受容体の活性化が、食欲抑制作用を有する消化管ホルモン（コレシストキニン、Glucagon-like peptide-1 など）の分泌や、胃排出抑制を誘導することが明らかとなっている。しかしながら、カルシウムそのものの食欲への影響については知られていない。本研究では、カルシウムの単回経口投与がラットの食欲に与える影響を検討し、またこのときの、消化管ホルモン、血中のカルシウム濃度、胃排出速度への影響も調べた。

【方法】AIN-93G 食で飼育した 8～12 週齢の Sprague-Dawley 系雄性ラットを一晩絶食させ、試験当日にカルシウム溶液を経口投与し、直後に AIN-93G 食を自由摂取させた。＜実験 1＞塩化カルシウム、炭酸カルシウムおよび乳酸カルシウム（カルシウムとして 150 mg/kg BW）または溶媒のみ（10 ml/kg BW）を経口投与し、0.5、1、2、4、8、24 時間後の摂食量を測定した。＜実験 2＞塩化カルシウムの経口投与直後に、消化管ホルモン受容体の阻害剤を腹腔内投与し、0.5、1、2、4、8、24 時間後の摂食量を測定した。＜実験 3＞胃排出速度評価のためにアセトアミノフェンを含むカルシウム溶液を経口投与し、再給餌 30 分後に麻酔下にて門脈および腹部大静脈より採血し、アセトアミノフェン濃度を測定するとともに、血中のカルシウム濃度を測定した。

【結果と考察】実験 1 において、塩化カルシウムの経口投与により、4 時間後までコントロール群に比べて摂食量が有意に減少した。一方、24 時間後には群間差は確認されなかった。炭酸カルシウム、乳酸カルシウムでは明確な作用は見られなかった。実験 2 において、消化管ホルモン Peptide-YY (PYY)の受容体阻害処理により、実験 1 で見られた塩化カルシウム誘導性の摂食量減少は消失した。実験 3 において、血中のアセトアミノフェン濃度およびカルシウム濃度に群間差は確認されなかった。

以上より、ラットにおいて塩化カルシウム（カルシウムとして 150 mg/kg BW）の単回経口投与は短期的に摂食量減少をもたらすことが明らかとなった。この作用への血中カルシウム濃度の変動および胃排出抑制の寄与は低く、消化管ホルモンの PYY が関与している可能性が示唆された。

Appetite, Calcium, PYY

発表責任者：小笠原 奨之（ogasho@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：1B4p13
講演日時：3 月 24 日 16:22～ 1 号館 B4 会場

腸管オルガノイドと生体腸組織における内分泌細胞の比較

Comparative analysis of enteroendocrine cells and their hormones between mouse intestinal organoids and native tissues

○大木 淳子[1,2]、坂下 陽彦[3]、稲葉 明彦[2]、粟飯原 永太郎[4]、内山 博允[5]、松本 征仁[6]、二ノ宮 裕三[7,8]、山根 拓実[2]、大石 祐一[2]、岩槻 健[2] ([1]つく国大医、[2]東農大応生、[3]シンシナティ小児病院、[4]シンシナティ大、[5]東農大ゲノムセンター、[6]順天堂大医、[7]九大五感、[8]モネルセンター)
○ Junko OHKI[1,2], Akihiko SAKASHITA[3], Akihiko INABA[2], Eitaro AIHARA[4], Hironobu UCHIYAMA[5], Masahito MATSUMOTO[6], Yuzo NINOMIYA[7,8], Takumi YAMANE[2], Yuichi OISHI[2], Ken IWATSUKI[2] ([1]Tsukuba Int'l. Univ., [2]Tokyo Univ. of Agric., [3]Cincinnati Children Hosp., [4]Univ. of Cincinnati, [5]Tokyo Univ. of Agric. Genome Res. Ctr., [6]Juntendo Univ., [7]Kyushu Univ., [8]Monell Chem. Senses Ctr.)

【目的】
消化管に存在する内分泌細胞は、生体恒常性の維持のため種々のホルモンを分泌するが、その存在割合は 1%前後であるため、解析が遅れている。今回、消化管の *in vitro* 培養系であるオルガノイド培養法を用いて、消化管内分泌細胞の存在比率や主要なホルモンの遺伝子発現パターンから、生体内との類似性や相違点を解析することを目的とした。
【方法】
内分泌前駆細胞のマーカーである Neurogenin3 (Ngn3)のプロモーター制御下に EGFP を発現する Ngn3-EGFP マウスを導入し、同マウスより小腸、十二指腸、空腸、回腸のオルガノイドを作製した。その後、免疫組織化学染色、トランスクリプトーム解析等により、消化管オルガノイドと生体組織における内分泌細胞マーカー分子の発現を比較した。
【結果・考察】
免疫組織化学染色では、マウス消化管組織とオルガノイドともに、十二指腸から回腸にかけて全ての部位で Ngn3 及び Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP)、Glucagon-like peptide-1 (GLP-1)が検出された。GIP は上部小腸に高発現し、GLP-1 は下部小腸に高発現することが知られているが、今回の結果では組織、オルガノイドとも十二指腸、回腸は同様の割合で発現していることが確認された。また、内分泌細胞関連遺伝子の発現を比較したところ、オルガノイドの遺伝子発現パターンは、部位により異なる動向を示した。Ghrelin は組織、オルガノイドともに十二指腸、空腸で高発現した。Cholecystokinin においては、組織は十二指腸で高発現し、オルガノイドでは有意差はないものの、十二指腸でもっとも高発現した。Gip は組織において有意差は見られなかったが十二指腸でもっとも高発現し、オルガノイドでは十二指腸、空腸で高発現した。Secretin は組織、オルガノイドともに回腸で高発現し、Glp-1 の前駆体である Glucagon は組織、オルガノイドともに回腸で高発現した。以上の結果より、小腸オルガノイドは摘出した部位の性質を保ち続けていることが分かり、*in vitro* において正常腸管上皮細胞の性質を解析できるツールであることが改めて確認された。今後、本オルガノイド培養系を用いて、食品成分の刺激によるホルモンの分泌機構や、内分泌細胞の分化機構などについて詳細に解析する予定である。

enteroendocrine cell, organoid, Neurogenin 3

講演番号：1B4p14
講演日時：3 月 24 日 16:33～ 1 号館 B4 会場

糖質制限食の長期摂取が腸内細菌叢や寿命に与える影響

Influence of the long-term intake of carbohydrate-restricted diet on gut microbiota and lifespan

○山本 和史、巫 啓明、都築 毅（東北大院・農）
○Kazushi Yamamoto, Qiming Wu, Tsuyoshi Tsuduki (Grad. Sch. of Agri. Sci., Tohoku Univ)

【目的】老化とは加齢依存的に様々な組織で機能が低下する現象であり、この老化を遅延し、高齢者の QOL を維持する方法が切望されている。そのため、老化遅延を目指した食事や食品の研究が広く行われている。一方、低炭水化物・高タンパク質食は糖質制限食として知られており、食事の量を減らすことなく炭水化物の量を制限し、その分をタンパク質などで補う食事である。糖質制限食は内臓脂肪を減らす効果が報告されたことで注目され、各所で実践されている。しかし、長期の糖質制限を行ったマウスにおいて心血管に悪影響を及ぼすなど、糖質制限食の長期摂取における安全性に疑問が持たれている。そこで我々は最近、長期間の糖質制限が老化にどのような影響を及ぼすかを明らかにするため、老化促進モデルマウスである SAMP8 を用いて糖質制限食がマウスの老化にどのような影響を与えるかを検討し、特に、皮膚の老化を促進することを見出した [1]。この結果を受け本研究では、糖質制限食の長期摂取により実際の寿命や脳機能、腸内細菌叢はどのように変化するかを明らかにするために SAMP8 を用いた試験を行った。

【方法】SAMP8（3 週齢、雄性）を 1 週間の予備飼育後に 3 群に分け、Control 食（AIN-93G）、高脂肪食（AIN-93G のコーンスターチの一部をラードとコレステロールに置換した食餌）、糖質制限食（高脂肪食のコーンスターチをミルクカゼインに置換した低炭水化物・高タンパク質食）のそれぞれを寿命を迎えるまで自由摂食させた。また、マウスが十分に老化した 50 週齢時に、脳の学習記憶能をパッシブアボイダンステストによって評価し、また糞便を採取して腸内細菌叢の変化をメタ 16S 解析によって評価した。

【結果】パッシブアボイダンステストの結果より、糖質制限食群は Control 食群と比べて脳の学習記憶能の有意な低下が見られ、また寿命の短縮が認められた。また、糖質制限食により腸内細菌叢は大きく変化しており、特に腸内で乳酸や短鎖脂肪酸を産生する *Bifidobacterium* 属の減少、病原性の菌を多く含む *Clostridium* 属の増加が見られた。また、実際に血中や盲腸内容物の短鎖脂肪酸量を測定したところ、糖質制限食により酢酸や酪酸は大きく減少していた。さらに、血中炎症性マーカーである IL-6 や IL-1β の濃度は糖質制限食により増加した。以上より、糖質制限食は老化促進モデルマウスの脳機能や寿命を低下させ、そのメカニズムの 1 つに腸内細菌叢の変化が示唆された。

[1] Wu Q, E S, Yamamoto K, Tsuduki T. Carbohydrate-restricted diet promotes skin senescence in senescence-accelerated prone mice. Biogerontology 2018. doi: 10.1007/s10522-018-9777-1.

carbohydrate restriction, gut microbiota, lifespan

講演番号：1B4p15
講演日時：3 月 24 日 16:44～ 1 号館 B4 会場

空腹による味覚の嗜好・忌避性を制御する外側視床下部神経回路の解析

Lateral hypothalamic neuron circuits modulate hunger-induced change in taste palatability and aversion

○傅 欧[1,2]、岩井 優[1]、三坂 巧[1]、箕越 靖彦[2]、中島 健一朗[2]([1]東大農・応生化、[2]生理学研究所)
○ Ou FU[1,2], YUU IWAI[1], TAKUMI MISAKA[1], YASUHIKO MINOKOSHI[2], KENICHIRO NAKAJIMA[2] ([1]The Univ.Tokyo, [2]NIPS)

味覚は、食物の価値の判断基準として機能している。味の感じ方は、空腹や満腹など生理状態によって変化することが知られているものの、どのような機構でその感受性が変化するかについては、依然として不明である。我々はこれまでに、光遺伝学を用いて視床下部の摂食亢進神経であるアグーチ関連ペプチド産生神経（AgRP 神経）の複数ある投射先のうち外側視床下部(LH)の経路によって、空腹時と同様に、甘味や苦味に対する感受性が調節されることを見出した。また、このような変化は LH 内の AgRP 神経に近接するグルタミン酸作動性神経（Vglut2 発現神経）の活動に応じて制御されることを見出した。本研究では LH の Vglut2 神経が複数の脳部位に投射していることに注目し、どの部位が味覚嗜好性に影響を及ぼすかを検証した。

抑制性 DREADD である hM4Di-mCherry をコードするアデノ随伴ウィルスを Vglut2-ires-Cre マウスに導入し、LH の Vglut2 発現神経を特異的に可視化したところ、外側中隔核(LS)、外側手綱核(LHb)、背側前核(AD)の 3 ヶ所で強い投射が観察された。次に、このマウスの各投射先に DREADD のリガンドである CNO を局所投与することで、各経路の選択的な抑制が味覚に及ぼす影響を検証した。その結果、興味深いことに、甘味に対する嗜好性の上昇は LS を抑制した場合のみに生じたのに対し、苦味に対する忌避性の低下は LHb を抑制した場合のみ観察された。また、逆行性トレーサーである Retrobeads を用いて LH→LS 経路と LH→LHb 経路の神経を標識した結果、LH 内で LS に投射する細胞と LHb に投射する細胞は異なることが明らかになった。

以上の結果から、空腹時、AgRP 神経の下流にある外側視床下部 Vglut2 神経は異なる経路を介して甘味嗜好性と苦味忌避性を調節していることが示唆された

本研究は、総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」の助成により実施された。

taste, hunger, lateral hypothalamus

講演番号：1B5a02
講演日時：3 月 24 日 09:11～ 1 号館 B5 会場

マクロファージの自然免疫機能に対するハマナス果実の増強効果

Potentiating effect of *Rosa rugosa* Thunb. on innate immune function of macrophages.

○小倉 エレン、足立 卓哉、南 和広、相根 義昌、伊藤 実、丹羽 光一（東農大食品香粧）
○Eren OGURA, Takuya ADACHI, Kazuhiro MINAMI, Yoshimasa SAGANE, Minoru ITO, Koichi NIWA (Tokyo Univ. of Agric.)

【背景と目的】 北海道の花に指定されているハマナス（*Rosa rugosa* Thunb.）はバラ科バラ属の落葉低木で、高さ 1.5 m、株張りも 1.5 m に成長する東アジア原産の植物である。日本では北海道から日本海側の砂地に多く自生しており、4 月～7 月に開花して秋には 2 cm ほどの果実が赤く熟す。ハマナス果実には、ビタミン C やポリフェノールが豊富に含有し、ジャムや果実酒として利用されている。最近、ハマナスの根に抗炎症作用があることが報告されたが、炎症を含む免疫機能に対するハマナス果実の効果は不明である。本実験では、培養マクロファージを用いて、ハマナス果実の免疫機能に対する効果について検討した。

【材料と方法】 凍結乾燥したハマナス果実を粉砕して 100% エタノールに一晩浸漬した。遠心分離した上清を真空乾燥し、DMSO に溶解して試料とした。細胞はマウスマクロファージ株化細胞である RAW264 を用いた。ハマナス抽出物を 0.01～10 μg/mL の濃度で添加した培養液（DMEM)で細胞を 24 時間培養し、LPS (100 ng/mL）を添加してさらに培養した。培養上清中の一酸化窒素（NO）とインターロイキン-6（IL-6）産生量をそれぞれ Griees 法と ELISA で測定した。細胞内の誘導型 NO 合成酵素（iNOS）発現量はウエスタンブロットで検出した。貪食能は、ハマナス抽出物を添加した培養液で 24 時間培養した細胞の蛍光ビーズの取り込み量によって評価した。

【結果と考察】RAW264 を LPS で刺激すると NO の産生量は増加した。ハマナス果実抽出物を添加すると、LPS 刺激したときの NO 産生量は 0.01、0.1 μg/mL において有意に上昇した。LPS の添加により細胞中の iNOS 発現量は増加し、ハマナス果実抽出物（0.01、0.1 μg/mL）はこの iNOS 発現量を有意に増強したことから、ハマナス果実抽出物による NO の産生の増強は iNOS の発現量の増加によるものであることが示唆された。ハマナス果実抽出物は 0.01、0.1、1、10 μg/mL において LPS 刺激による RAW264 の IL-6 産生量も有意に増強した。さらに、RAW264 による蛍光ビーズの取り込み量は、ハマナス果実抽出物を添加することで増加した。

これらの結果から、ハマナス果実抽出物はマクロファージの機能を活性化することで免疫機能を増強する可能性が示唆された。今後、ハマナスがマクロファージのどのような細胞内シグナルに作用して機能を増強しているかを明らかにし、さらに他の免疫担当細胞への効果を調べることで、健康増進のためのハマナスの有用性が認知されるものと考えられる。

Rosa rugosa, macrophage, innate immunity

発表責任者：丹羽光一（k3niwa@nodai.ac.jp）

講演番号：1B5a03
講演日時：3 月 24 日 09:22～ 1 号館 B5 会場

Toll-like receptor を介した野沢菜によるマクロファージの活性化
Brassica rapa L. activates macrophages through Toll-like receptors
○田中 沙智、髙橋 楓香（信大農）
○Sachi TANAKA, Fuka Takahashi (Shinshu Univ.)

【背景・目的】マクロファージは、体内に侵入してきた病原体を認識し、一酸化窒素（NO）やサイトカインを産生し、貪食活性を示すことで異物を排除する細胞である。また、Toll-like receptor（TLR）は、病原体に特異的な分子パターンを認識する受容体であり、TLR のシグナルによってサイトカインが産生され、自然免疫の活性化が促進される。当研究室では、これまでに長野県の伝統野菜である野沢菜（*Brassica rapa* L.）の熱水抽出物不溶性画分が樹状細胞からのサイトカイン産生を誘導することを明らかにしている。しかし、野沢菜によるマクロファージの NO およびサイトカイン産生誘導に関与するレセプターについては明らかになっていない。そこで本研究では、野沢菜によるマクロファージの免疫賦活効果に対する TLR の関与を明らかにすることを目的とした。
【方法】腹腔マクロファージを調製するために、WT、TLR2$^{-/-}$および TLR4$^{-/-}$マウスにチオグリコレートを腹腔内投与し、4 日後に腹腔内より細胞を回収した。回収した細胞を抗 F4/80 抗体、抗 TLR2 抗体、抗 TLR4 抗体で染色し、フローサイトメーターでマクロファージの割合と、TLR2 および TLR4 の発現を解析した。また、野沢菜の不溶性画分を腹腔マクロファージに添加して 24 時間の培養を行った後、細胞から Total RNA を抽出し、RT-qPCR により誘導型 NO 合成酵素（iNOS）の mRNA 発現を解析した。さらに、腹腔マクロファージに野沢菜不溶性画分を添加して 24 時間の培養を行い、培養上清中の NO、TNF-α および IL-6 産生レベルを ELISA で測定した。
【結果】WT、TLR2$^{-/-}$および TLR4$^{-/-}$マウスより回収した細胞のマクロファージ（F4/80 陽性細胞）の割合は 80～90%であり、TLR2$^{-/-}$および TLR4$^{-/-}$マウスではそれぞれ TLR2 と TLR4 の発現が WT マウスに比べて減少していることを確認した。野沢菜不溶性画分の添加により、腹腔マクロファージの iNOS mRNA 発現は有意に増加し、TLR2$^{-/-}$および TLR4$^{-/-}$マウス由来腹腔マクロファージでの iNOS mRNA 発現は WT マウスに比べて低下した。また、腹腔マクロファージに野沢菜不溶性画分を添加して 24 時間の培養を行った時の NO 産生レベルは、WT マウスに比べて、TLR2$^{-/-}$および TLR4$^{-/-}$マウス由来腹腔マクロファージでの産生レベルは有意に低下した。さらに、腹腔マクロファージからの TNF-α および IL-6 産生レベルについても、TLR2 および TLR4 の欠損により有意に低下した。以上より、野沢菜は TLR2 および TLR4 を介してマクロファージを活性化させ、NO やサイトカイン産生を誘導することが示された。

Brassica rapa L., macrophages, Toll-like receptor

発表責任者：田中 沙智（tanakasa@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：1B5a04
講演日時：3 月 24 日 09:33～ 1 号館 B5 会場

Pediococcus acidilactici K15 株のヒトプラズマサイトイド樹状細胞に対する効果
Pediococcus acidilactici K15 activates Human Plasmacytoid Dendritic Cells.

○碇 菜穂[1]、川島 忠臣[1]、久保田 芳郎[2]、下条 直樹[3]、辻 典子[4] ([1]キッコーマン（株）研究開発本部、[2]キッコーマン（株）キッコーマン総合病院、[3]千葉大院　医学研究院　小児病態学、[4]産総研　バイオメディカル研究部門)
○Naho IKARI[1], Tadaomi KAWASHIMA[1], Yoshiro KUBOTA[2], Naoki SHIMOJO[3], Noriko M TSUJI[4] ([1]Kikkoman Corp., [2]Kikkoman General Hospital, [3]Chiba Univ., [4]AIST)

【背景】

発酵食品や腸内細菌由来の乳酸菌はヒトの健康に対し様々な良い効果をもたらすことが知られている。我々はこれまでに、乳酸菌の菌体内 2 本鎖 RNA がエンドソームのトル様受容体を刺激することでミエロイド樹状細胞（mDC）からの IFN-β産生を亢進することを示してきた（Kawashima et al. *Immunity.* 2013, Kawashima et al. *Front Immunol.* 2018）。その中で、IFN-β産生誘導活性が強い乳酸菌として *Pediococcus acidilactici* K15 株（以下、K15）を選抜した。さらに研究を進める中で、K15 の mDC を介した IgA 産生増強作用と、K15 摂取による成人の唾液中分泌型 IgA 濃度の上昇を確認した（Kawashima et al. *Sci Rep.* 2018）。このように K15 の mDC を介した様々な効果が感染抵抗性の増強に寄与することを示してきた。

一方で、喘息患者がウイルスに感染すると重症化しやすいことが知られており、それにはプラズマサイトイド樹状細胞（pDC）表面における FcεRI という受容体が関与することが報告されている（Gill et al. *J Immunol.* 2010）。FcεRI 上の IgE 抗体同士がアレルゲンなどを介して架橋されると、ウイルス感染時の pDC の IFN-α産生が著しく低下する。今回、K15 がヒト末梢血由来 pDC の IFN-α産生誘導や FcεRI の発現に与える影響を評価することとした。

【方法】

被験者より採取した血液より末梢血単核球細胞を分離後、pDC を単離した。その後、乳酸菌の加熱菌体と共培養し、培養後の pDC の細胞表面に発現している FcεRI の発現をフローサイトメトリーで評価した。また、培養上清中の IFN-α濃度を ELISA 法により測定した。

【結果と考察】

複数の乳酸菌株について pDC からの IFN-α産生を評価した結果、K15 が強い IFN-α産生誘導活性を有することを確認した。一方、pDC の FcεRI の発現抑制については乳酸菌株によって異なっており、その中でも K15 は FcεRI の発現を強く抑制した。

pDC の IFN-α産生を促進することは感染抵抗性の増強に繋がることから、K15 摂取が pDC を介した感染抵抗性の増強に寄与する可能性が示された。また、pDC の IFN-α産生を阻害する FceRI の発現が K15 刺激により低下したことから、喘息患者のウイルス感染時の症状悪化を防ぐ可能性が見出された。

pDC, IFN-α, asthma

講演番号：1B5a05
講演日時：3 月 24 日 09:44～ 1 号館 B5 会場

特異に分岐したニシヨモギ由来ペクチンの 2,3 の活性
Some activities of unusually branched pectin isolated from *Artemisia indica*
○田幸 正邦[1,2]、田場 日和[2]、北島 聖子[2]、与儀 琢也[2]、小西 照子[2] ([1]健康長寿科研、[2]琉球大農生資科)
○Masakuni Tako[1,2], Hiyori Taba[2], Seiko's Kitajima[2], Takuya Yogi[2], Teruko Konishi[2] ([1]Health Longevity Res. Lab., [2]Dept. Biosci. Biotechnol. Univ. Ryukyu)

目的：演者らは先に、沖縄県の伝統食品の 1 つであるニシヨモギから NMR およびメチル化分析等により、長鎖の D-ガラクツロン酸が分岐したペクチンの化学構造を推定した[1]。NMR スペクトルにより長鎖の D-ガラクツロン酸を検出したのは演者らが最初である。本ペクチンは前述の酸性糖(50 モル)に加えて L-ラムノース(3), L-アラビノース(6)、D-ガラクトース(4)、D-キシロース(1)、D-グルクロン酸(1)および酢酸基等で構成されている。ここでは、免疫賦活および抗腫瘍活性について報告する。
方法：ニシヨモギは那覇市牧志公設市場で購入し、常法によりペクチンを調製した。細胞実験にはマウス由来マクロファージ RAW264.7 とヒトリンパ腫 U937 を使用して行った。また、イムノブロット分析により iNOS とカスパーゼ 3 の検出を行った。
結果：本ペクチンを RAW264.7 細胞液に添加すると、濃度に比例して（＞6.25 μg/mL）NO の産生量が増えた。また、TNF α および IL-6 が誘導産生された。iNOS をイムノブロット分析により確認した。さらに、本ペクチンはシグナル伝達系の諸酵素の活性を阻害した。ペクチンを U937 細胞に添加すると、濃度に比例して増殖が抑制された。また、カスパーセ 3 をイムノブロット分析により確認した。

1. 田幸正邦, 田場日和, 上地敬子, 玉城善之, 玉城志博, 小西照子. 第 37 回日本糖質学会年会講演要旨集 p. 71, 2018 年 8 月 28-30 日, 仙台.

unusually branched pectin, bioactivities, *Artemisia indica*

発表責任者：田幸正邦（tako@agr.u-ryukyu.ac.jp）

講演番号：1B5a06
講演日時：3 月 24 日 10:05～ 1 号館 B5 会場

光センシングによる簡便な未病マーカーの開発
Development of an easy-to-use presymptomatic disease marker by optical sensing
○數村 公子[1]、波多野 薫子[1]、玻名城 隼[2]、川西 寿美[2]、美和 登志幸[1]、服部 将貴[3]、竹内 康造[1]、稲川 裕之[2,4]、杣 源一郎[2,4]、大澤 俊彦[5] ([1]浜松ホトニクス・中研、[2]自然免疫技組、[3]浜松ホトニクス・GSCC、[4]新潟薬大・健康自立、[5]愛知学院大・心身)
○ Kimiko KAZUMURA[1], Yukiko HATANO[1], Jun HANASHIRO[2], Hisami KAWANISHI[2], Toshiyuki MIWA[1], Masaki HATTORI[3], Kozo TAKEUCHI[1], Hiroyuki INAGAWA[2,4], Gen-Ichiro SOMA[2,4], Toshihiko OSAWA[5] ([1]Hamamatsu Photonics CRL, [2]Control of Innate Immunity TRA, [3]Hamamatsu Photonics GSCC, [4]Niigata Univ. of Pharmacy and Applied Life Sci., [5]Fac. of Psychological and Physical Sci., Aichi Gakuin Univ.)

【目的】酸化ストレスは生活習慣病や老化等の主な原因の一つと考えられており、食事由来の抗酸化成分による改善が期待されている。「食」を摂取した後の生体内での酸化ストレスに対する効果が判別できる簡便法として、我々は酸化ストレスの原因となる好中球の過剰活性化を光センシング技術により評価できる手法を開発している。これまでに、複数のパイロットスタディによる本手法の有効性の検証について報告してきた。今回は、約 1000 名の横断研究により算出された暫定基準範囲や一般生化学マーカーとの関連性の検討等から判明した好中球活性評価の未病マーカーとしての有用性について報告する。
【方法】好中球の活性化指標となるスーパーオキシド（$O_2^{\cdot-}$）産生とミエロペルオキシダーゼ（MPO）活性を、$O_2^{\cdot-}$検出用化学発光試薬 MCLA による化学発光と、次亜塩素酸イオン（OCl^-）検出用蛍光試薬 APF による蛍光の、二つの光情報に変換して検出する技術を開発した。指先からランセットを用いて自己採取した極微量の血液中の好中球活性を、細胞分離することなく希釈のみで測定可能とするために、赤血球や血液中の夾雑物による影響を最小限にした光学系として新たにディスポーザブルの樹脂製角型計測セルと計測装置を開発した。本システムを用いて、三宅医学研究所セントラルパーククリニック（高松市）にて健康診断・人間ドック受診者の研究参加への同意が得られた 996 名の好中球活性を評価した。一次除外後の 734 名の測定値について、潜在基準値抽出法に従って二次除外、正規分布化を実施して、基準範囲（平均値±1.96SD）を設定した。また一般生化学マーカーやメタボ指標との相関についても解析を行った。
【結果】各被験者について、算出された基準範囲を基に健診結果との比較検証を行ったところ、健診結果では異常無しであっても、本評価では基準範囲から外れて酸化ストレスあるいは免疫力低下状態、いわゆる未病状態と考えられる事例が複数確認された。生化学マーカーとメタボ指標との関連性においては、CRP 等の炎症マーカーはもちろん、空腹時血糖や BMI、肝機能マーカー等との相関性が確認された。また、喫煙習慣とも高い関連性があった。以上の結果より、本手法は生活習慣病等の未病マーカーとして有用である可能性が示唆された。
本研究は、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構、SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」（管理法人：農研機構 生研支援センター）によって実施された。

in vivo, presymptomatic disease, innate immune response

発表責任者：數村公子（kimiko-k@crl.hpk.co.jp）

講演番号：1B5a07
講演日時：3 月 24 日 10:16～ 1 号館 B5 会場

ユーグレナおよびパラミロンの特異的抗体産生への影響

The effect of *Euglena* and Paramylon on specific antibody production

○中島 綾香[1]、石塚 幹菜[2]、安田 光佑[1]、帖佐 圭佑[1]、鈴木 健吾[1]、後藤 康之[2]([1]株式会社ユーグレナ、[2]東京大学大学院農学生命科学研究科)
○ Ayaka NAKASHIMA[1], Kanna ISHIZUKA[2], Kosuke YASUDA[1], Keisuke CHOSA[1], Kengo SUZUKI[1], Yasuyuki GOTO[2] ([1]euglena Co.,Ltd., [2]Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo)

【背景】
発育鶏卵を用いたインフルエンザワクチン抗原の製造は安定供給に課題がある。1 回あたりの接種量を減らすことで供給数を増やせるが、その場合ワクチン効果は減弱する。アジュバントはワクチン抗原と混合することでワクチンの効果を上げるものであり。インフルエンザワクチンにおいても低用量抗原にアジュバントを混合することにより、高用量の抗原単独投与と同程度の抗体を誘導できる。ユーグレナは、微細藻類に分類される単細胞の微生物である。植物と動物両方の性質を兼ね備えていることから、ビタミン、ミネラル、アミノ酸、脂肪酸等多様な栄養素を含んでいる。実際、ユーグレナの貯蔵多糖であるパラミロンはβ-1,3-グルカンの一種で、経口摂取によってインフルエンザウイルス感染時の症状の緩和が見られるなど、免疫応答への効果が期待されている。
【目的・方法】
本研究ではユーグレナならびにパラミロンについてアジュバント活性を試験した。方法として、これら物質について in vitro におけるマクロファージ活性化能と in vivo における OVA ならびにインフルエンザワクチンに対する抗体産生増強能を評価した。マウスマクロファージ細胞株 Raw264.7 を用いて、ユーグレナおよびパラミロンのマクロファージ活性化能について、サイトカインの一種である TNF-α の産生 を指標として評価を行った。また、in vivo でのアジュバント能を評価するために、マウスにおいて OVA 単独投与あるいはユーグレナまたはパラミロンとの混合投与時における抗体産生を ELISA にて評価した。さらに、インフルエンザ HA ワクチン高用量（1 μg）を単独で、もしくは低用量（100 ng）を単独もしくはユーグレナ及びパラミロンとともに投与し、ワクチン抗原に対する抗体産生を ELISA にて評価した。
【結果・考察】
in vitro において、ユーグレナおよびパラミロンはマクロファージ活性化能を有することが明らかとなった。また、OVA 単独投与マウスと比較して、ユーグレナまたはパラミロンとの混合投与群で高い抗体産生が確認された。インフルエンザ HA ワクチンを用いた実験では、低用量ワクチン＋ユーグレナ、ならびに低用量ワクチン＋パラミロンの両群において、低用量ワクチン単独群と比較して高い抗体産生能が見られた。以上のことから、ユーグレナ及びパラミロンはインフルエンザワクチンにおけるアジュバント能をもつ可能性が示された。

Euglena, Paramylon, immune system

講演番号：1B5a08
講演日時：3 月 24 日 10:27～ 1 号館 B5 会場

食品コウジカビの経口投与による NOD マウスの Th1 応答増強効果
Enhancement effects on Th1 responses of NOD mice by oral administration of koji fungi
○宇田 佳功[1]、北爪 里欧[1]、内田 妃音[1]、関口 昭博[2]、榎本 淳[1,3]([1]群大院理工、[2]群馬産技セ、[3]群大食健康セ)
○ Yoshinaru UDA[1], Rio KITAZUME[1], Hinari UCHIDA[1], Akihiro SEKIGUCHI[2], Atsushi ENOMOTO[1,3] ([1]Graduate School of Science and Engineering, Gunma University, [2]Gunma Industrial Technology Center, [3]Gunma University Center for Food Science and Wellness)

【目的】演者らはこれまでに清酒や味噌や醤油などの製造に利用されている食品コウジカビ、特に黄コウジカビ（*Aspergillus oryzae*）がマウス T 細胞の増殖応答には影響を与えないものの、一般にその Th1 応答を高め、逆に Th2 応答を弱める効果がある可能性を *in vitro* 細胞培養系を用いて見出してきた。本研究では、このような黄コウジカビの Th1 応答増強効果が *in vivo* においても、すなわちその死菌体をマウスに経口投与した場合でも発揮されるかどうか検討することを目的とした。
【方法】あらかじめ加熱滅菌処理を施した黄コウジカビ（樋口松之助商店製）を 10 %スキムミルク溶液に懸濁し、実験開始時に 8 週齢のメスの NOD マウスに 1 回あたり 20～1,000 μg/匹の投与量で 2 週間に合計 6 回経口投与した。一群 2～3 匹とし、対照群としてスキムミルク溶液のみを投与した群も用意した。最終投与 3 日後、これらのマウスの脾臓細胞を抗 CD3 抗体あるいはリポ多糖（LPS）を添加して培養し、その際に産生される各種サイトカイン量を ELISA により測定した。
【結果および考察】黄コウジカビ投与群と未投与群の普段の様子や体重の変化を比較したところ、両群間で有意差はなく、黄コウジカビの経口投与は NOD マウスに健康上の悪影響を与えないものと考えられた。さらに脾臓細胞数は黄コウジカビ投与群で若干多くなる傾向があったものの、両群間で有意差は認められなかった。このような傾向は黄コウジカビの経口投与量に依存することなく、すべての実験で観察された。
Th1 系の代表的なサイトカインである IFN-γは黄コウジカビの経口投与の有無に関わらず、LPS 添加時には全く検出されなかったものの、抗 CD3 抗体刺激時には有意に産生された。あらかじめ 1 回あたり 200 μg/匹の投与量で黄コウジカビを NOD マウスに経口投与したところ、この抗 CD3 抗体刺激に対する IFN-γ応答が未投与群と比較して、黄コウジカビ投与群で有意に高くなることが見出された。このような現象は黄コウジカビの投与量を 500 μg/匹/回とした場合にも観察され、黄コウジカビは *in vivo* においても Th1 応答増強効果を発揮できることが示された。しかしこのような黄コウジカビの Th1 応答増強効果は、その投与量を 20～70 μg/匹/回にした場合には弱くなり、1,000 μg/匹/回の投与量で 4 週間に 12 回投与した場合には全く観察されなくなることが明らかになった。演者らは興味深いことに、黄コウジカビの *in vitro* における Th1 応答増強効果には最適添加濃度が存在し、それが 5～40 μg/ml であることを既に報告しており、本研究の結果は、*in vivo* においても 200～500 μg/匹/回の黄コウジカビの経口投与量が最適であることを示すものである。

koji fungi, Th1 response, oral administration

発表責任者：榎本　淳（enomoto@gunma-u.ac.jp）

講演番号：1B5a09
講演日時：3 月 24 日 10:38～ 1 号館 B5 会場

ハニーブッシュ抽出物が脾臓細胞における sIgA 産生に及ぼす影響の解析

The effects of Honeybush extracts on sIgA production by splenocytes

○増田 美咲、村松 真由子、三浦 豊（東農工大農）
○Misaki MASUDA, Mayuko MURAMATSU, Yutaka MIURA (Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

[背景・目的] ハニーブッシュは南アフリカ産のハーブであり、我が国でも消費量が増加しつつある。ハニーブッシュ抽出物中の主要なポリフェノールであるマンギフェリンは、抗炎症作用や抗酸化作用、抗糖尿病作用などを持つことが報告されている。このことからハニーブッシュは機能性食品として注目されており、実際に抗酸化作用や抗肥満作用、皮膚保護作用などが示唆されている。本研究では生体防御能に焦点を当て、ハニーブッシュ抽出物の摂取が腸管免疫応答を担う sIgA 産生能に及ぼす影響について検討することを目的とした。

[実験方法] 雄性 Balb/c マウスの脾臓を摘出し、脾臓細胞を調整した。sIgA 産生細胞への分化を促す LPS、TGF-β、IL-2 をそれぞれの濃度が 1μg/ml、2ng/ml、10ng/ml になるように添加した群(Inducer(1x)群)、その 5 分の 1 の濃度になるように添加した群(Inducer(1/5)群)、添加しない群(Inducer(-)群)、5 分の 1 濃度の誘導剤とハニーブッシュ抽出物を添加した群を作製し、7 日間培養した後に上清を回収し、ELISA 法により各群における sIgA 産生量の測定を行った。なお、ハニーブッシュ抽出物は現在知られている 23 品目から商業生産に適している *Cyclopia.genistoides*、*C.subternata*、*C.maculata* の 3 品種を選び、それぞれの熱水および 40%エタノール抽出物、計 6 種類を用いた。

[結果] 12 週齢の雄性 Balb/c マウスを用いて Inducer(1x)、Inducer(1/5)、Inducer(-)、ハニーブッシュ抽出物を 200μg/ml になるように添加した群の sIgA 濃度の測定を行い、各群間で比較を行った。その結果、Inducer(1/5)群と比較して全てのハニーブッシュ抽出物添加群で sIgA 濃度の有意な減少が見られた。この際、*C.genistoides* 由来の抽出物添加群において比較的大きな sIgA 濃度の差が見られたためこの 2 つに着目し、抽出物の添加濃度を変えて sIgA 産生能に与える影響について検討することとした。

そこで 6 週齢の Balb/c マウスを用いて Inducer(1x)、Inducer(1/5)、Inducer(-)、C.genistoides 由来の 2 種類の抽出物をそれぞれ 0.01、0.1、1、20、100、200μg/ml になるように添加した群の sIgA 濃度の測定を行い、各群間で比較を行った。その結果、どちらの抽出物添加群においても低濃度の時に sIgA 濃度が有意に増加し、高濃度の時に濃度上昇が抑制されるという二相性が見られた。sIgA 産生誘導が上昇する濃度は通常我々がハーブティーとして摂取する条件下に近いと考えられるため、sIgA 産生誘導を介して腸管免疫能を向上させる可能性が示唆された。現在 *in vivo* でのハニーブッシュ抽出物の作用を検討しており、その結果も合わせて報告する。

IgA, immunity, Honeybush

発表責任者：増田美咲（msdmsk0224@gmail.com）

講演番号：1B5a10
講演日時：3 月 24 日 10:49～ 1 号館 B5 会場

フラクトオリゴ糖摂取による血中および腸管の部位ごとの IgA 産生の特徴

Effect of dietary fructooligosaccharides on IgA production in the serum and intestinal mucosa

○宇野 直哉、津田 真人、細野 朗、小島 菜月、渡辺 裕文（日本大学生物資源科学部）
○Naoya Uno, Masato Tsuda, Akira Hosono, Natsuki Kojima, Hirofumi Watanabe (Nihon Univ. College of Bioresource Sciences)

【目的】

フラクトオリゴ糖（FOS）は、難消化性糖類として胃や小腸で消化・吸収されにくく、大腸で特定の腸内細菌の増殖を活性化して腸内環境を変化させることで、宿主の感染防御やアレルギーの制御に有益に作用することが期待されている。これまでの研究では FOS の摂取により腸管の IgA 産生応答が亢進されることが明らかにされているが、FOS が腸管のどの部位で免疫系に作用しているのかは不明な点が多い。本研究では、FOS の摂取が小腸および大腸の各部位の IgA 産生に与える影響を明らかにするために、腸管免疫系の誘導組織である腸管関連リンパ組織に着目して解析を行った。

【方法】

BALB/c マウス（雌性 6 週齢）を FOS 群と対照群の 2 群に分け、7.5%または 0%FOS 含有精製飼料を 2 週間自由摂取させた。各マウスから血清および腸管を 5 つの部位（小腸：上部、中部、下部、大腸：盲腸、結腸）に分けて採取した。各腸管組織は 0.1 mg/ml トリプシンインヒビター・50 mM EDTA 含有 PBS 中にホモジナイズし、腸管粘膜抽出液を調製した。各サンプル中の抗体（IgA、IgG1、IgG2a、IgM）量を ELISA 法により定量した。また、腸管各部位の腸管関連リンパ組織（パイエル板：PP、盲腸リンパ節：Cep、結腸リンパ節：Cop）を採取、細胞調製し、抗体産生を調節するはたらきを持つ濾胞性ヘルパー T（Tfh）細胞の割合をフローサイトメトリーにより解析した。

【結果および考察】

FOS の摂取により盲腸部位の粘膜抽出液中における IgA 量が増加し、IgM 量が減少する傾向が認められた。しかし、IgG1 および IgG2a 量は腸管のどの部位においても FOS 摂取の影響がみられなかった。さらに、FOS 摂取により血清中の IgA 量の増加も認められた。また、FOS を摂取すると Cep および Cop の Tfh 細胞の割合が増加する傾向が見られたが、小腸部位の PP の Tfh 細胞の割合には大きな変化は見られなかった。

これらのことから FOS の摂取は大腸部位の腸管関連リンパ組織の免疫応答を活性化することで、腸管および血清の IgA 産生を亢進することが示唆された。

Fructooligosaccarides, IgA production, Follicular helper T

講演番号：1B5a11
講演日時：3 月 24 日 11:10～ 1 号館 B5 会場

ロイコ菌 M048 株摂取における唾液中 s-IgA 分泌促進効果に関するプラセボ対照二重盲検比較試験
Effect of *Leuconostoc mesenteroides* NTM048 on promoting secretion IgA in saliva: a randomised, double blind, placebo controlled study

○山本 悠太、杉田 玄、川嶋 秀治、山岸 直子、平岡 政信、武田 早織、保富 宗城（和医大医）
○Yuta YAMAMOTO, Gen Sugita, Shuji Kawashima, Naoko Yamagishi, Masanobu Hiraoka, Saori Takeda, Muneki Hotomi (Wakayama Medical Univ. Med.)

Leuconostoc mesenteroides NTM048（ロイコ菌M048株)は､エンドウ豆より単離された乳酸菌であり、マウスに 14 日間の経口投与を行うことで、プラセボ群だけでなく、*Leuconostoc mesenteroides* JCM6124（基準株）と比較しても、糞中の分泌型 IgA（s-IgA）量が有意に増加することを認めている。パイエル板などのリンパ組織で抗原刺激を受けることで、s-IgA の粘膜における分泌が亢進することが知られており、腸管粘膜だけでなく唾液腺での分泌も亢進するといわれている。s-IgA は中和抗体として働き、病原体や花粉といった抗原が体内へ侵入するのを阻止するといわれているため、ロイコ菌 M048 株をヒトに投与することで、粘膜における s-IgA の分泌が促進され、インフルエンザや、嘔吐下痢症などの感染回数の低下や、花粉症の症状の緩和が期待できる。そこで本研究では、20 歳から 60 歳までの健常者 40 名およびスギ花粉症者 40 名の計 80 名に対し、二重盲検法でプラセボ群またはロイコ菌 M048 株（10^{10} CFU/Day）群の 2 群に割付け、ロイコ菌 M048 株の 16 週間継続摂取による影響を検討した。唾液中の s-IgA 量は 16 週間摂取で有意な増加を認めなかったが、13 週目から 16 週目における食品の飲み忘れが 1 週間に 1 回未満の被験者で、解析を行うと唾液中の s-IgA 量が有意に増加した。そこで、インフルエンザの診断を受けた回数と嘔吐下痢症の発生回数に有意な抑制効果を期待したが、試験開始前よりインフルエンザの流行が始まっており、また食事を原因とした下痢も発生したため、効果を確認できなかった。しかし、鼻アレルギー診療ガイドラインに基づき、アレルギー性鼻炎の症状をスコアー化したところ、花粉症者で抗アレルギー薬を服用しなかった集団において、くしゃみ発作は 13 週目から 16 週目において有意に軽減し、鼻閉は 9 週目から 16 週目において有意に軽減した。日常生活の支障度は､花粉量がピークであった 5 週目から 8 週目において有意に軽減した。また、研究期間全体を通じて、ロイコ菌 M048 株摂取による副作用は認めなかった。本研究では、ロイコ菌 M048 株のほぼ毎日の摂取により、唾液中の s-IgA 分泌促進効果を認めた。しかし、鼻症状の軽減については、試験食品の飲み忘れに関わらず有効性を認めたため、s-IgA 分泌促進効果とは独立したメカニズムで鼻症状が改善している可能性が考えられる。

clinical study, s-IgA, allergic rhinitis

発表責任者：山本悠太（yuta-y@wakayama-med.ac.jp）

講演番号：1B5a12
講演日時：3 月 24 日 11:21～ 1 号館 B5 会場

免疫調整機能を有する味噌由来 *Tetragenococcus halophilus*

Isolation of immune-regulatory *Tetragenococcus halophilus* from miso

○熊澤 利彦[1,2]、西村 篤寿[1]、浅井 紀之[1]、安達 貴弘[2]([1]イチビキ（株)、[2]東京医科歯科大・難研)
○ Toshihiko KUMAZAWA[1,2], Atsuhisa NISHIMURA[1], Noriyuki ASAI[1], Takahiro ADACHI[2]
([1]Ichibiki Inc., [2]Tokyo Medical and Dental Univ.)

【背景・目的】 古くから日本人の健康維持に役立ってきた味噌には耐塩性乳酸菌（*Tetragenococcus halophilus*）が含まれている。味噌より耐塩性乳酸菌を分離し、その菌体（殺菌体）をマウス脾臓 B 細胞と共培養することで、B 細胞の細胞生存能と細胞活性化能を共に高める能力を有する複数の菌株を見出した。これらの乳酸菌は、マウス脾臓細胞と共培養すると B 細胞の他、T 細胞の細胞生存能と細胞活性化能を高めることが確認され、更に B 細胞中の IFN-γ、IL-10、IL-22 産生細胞が増加した。B 細胞の細胞生存能と細胞活性化能を共に高める最良株（蔵華乳酸菌 LTK-1 と称する）を正常マウスに２週間給餌すると血清中の IgA が有意に上昇した。本研究では、蔵華乳酸菌 LTK-1 の免疫調整機能を明らかにするために、更なる検証を実施した。

【方法】 蔵華乳酸菌 LTK-1 の培養液をオートクレーブで殺菌後、遠心分離で菌体を回収し、水洗浄したものを凍結乾燥して乳酸菌菌体(殺菌体)を得た。この LTK-1 菌体をマウス脾臓細胞と共培養し、2 日後の細胞培養上清の IgA 及び IgG 含量を ELISA 法で測定した。次に、LTK-1 菌体を正常マウスに給餌し、２週間後に糞便を回収した。糞便は PBS で懸濁し、その抽出液の IgA 含量を測定した。また、LTK-1 菌体を正常マウスに給餌開始してから２週間後に OVA/alum を腹腔内投与し、免疫前後の血清の OVA 特異的 IgG 含量を ELISA 法で測定した。更に４週間後に追加免疫を行い、免疫後の血清の OVA 特異的 IgG 含量も同様に測定した。

【結果・考察】 蔵華乳酸菌 LTK-1 の菌体との細胞共培養により、IgA 及び IgG の産生量が有意に上昇し、LTK-1 の菌体刺激により *in vitro* で IgA 及び IgG の産生が誘導されることが示された。また、マウスに LTK-1 菌体を給餌すると、コントロールと比べ糞便中の IgA が有意に上昇した。血清中の IgA も有意に上昇することから、*in vivo* において LTK-1 摂取により全身の IgA 産生が増強することが示唆された。更に、LTK-1 摂取した状態で抗原(OVA)を腹腔内投与すると、OVA 特異的 IgG がコントロールに比べ有意に上昇し、LTK-1 摂取により抗原に対する免疫応答が高まると考えらえた。更に追加免疫後の OVA 特異的 IgG もコントロールに比べ有意に上昇することから LTK-1 摂取による免疫記憶能の向上も示唆された。これらの結果より蔵華乳酸菌 LTK-1 が免疫調整機能を有し、健康に有益な作用をもたらす乳酸菌であることが期待された。

Lactic acid bacteria, Miso, Immunomodulation

講演番号：1B5a13
講演日時：3 月 24 日 11:32～ 1 号館 B5 会場

大腸 GALT の胚中心形成と制御性 T 細胞誘導における恒常的な腸内細菌叢と MyD88 シグナルの役割
Roles of constitutive intestinal microbiota and MyD88 signaling in germinal center formation and the induction of induced regulatory T cells in gut-associated lymphoid tissue of large intestine.

○小島 菜月[1]、津田 真人[1]、渡邉 裕文[1]、宇野 直哉[1]、石濱 文也[1]、八村 敏志[2]、高橋 宜聖[3]、高橋 恭子[1]、上野川 修一[1]、細野 朗[1]([1]日大生資科、[2]東大院農生科・食の安全研セ、[3]感染研・免疫)
○Natsuki KOJIMA[1], Msato Tsuda[1], Hrohumi Watanabe[1], Nouya Uno[1], Humiya Ishihama[1], satoshi Hachimura[2], Yoshimasa Takahashi[3], Kyoko Takahashi[1], Shuichi Kaminogawa[1], Akira Hosono[1] ([1]Nuhon Univ. of Bioresource Science, [2]Tokyo Univ, Research Center for Food Safety, [3]National Institute of Infectious Diseases, Dep.Immunology)

【目的】

腸管関連リンパ組織（GALT）は、食品成分、腸内細菌、病原体などの外来抗原に対する免疫応答の誘導組織である。GALT 内の濾胞性ヘルパーT 細胞（Tfh）と胚中心 B 細胞（GCB）は相互作用して高親和性の抗体を産生し、誘導性制御性 T 細胞（iTreg）は過剰な免疫応答の抑制にはたらくことで、それぞれが腸内の恒常性維持に重要な役割を果たしている。しかし、小腸部位のパイエル板（PP）と比較して、大腸部位の盲腸リンパ節（CeP）、結腸リンパ節（CoP）の免疫系細胞の特徴には不明な点が多い。これまでに、腸内細菌が存在しない無菌マウスの大腸 GALT では、Tfh 細胞、GCB 細胞、iTreg 細胞が顕著に減少することを明らかにしている。本研究では、大腸 GALT において、これらの免疫系細胞の発達における①腸内細菌叢の恒常的な存在の影響②Toll-like receptor の主要なアダプター分子である MyD88 シグナル経路の役割を検討した。

【方法】

コンベンショナル環境下で飼育した BALB/c マウス（雌性 6-7 週齢）に、滅菌水または抗生物質（アンピシリン（1 g/L）、ネオマイシン（1 g/L）、バンコマイシン（0.5 g/L）、メトロニダゾール（0.25 g/L））を含む飲水を 4 週間自由摂取させた。また、SPF 環境下で飼育した野生型（WT）および MyD88 欠損 BALB/c マウス（10-11 週齢）を使用した。各マウスからパイエル板（PP）、盲腸リンパ節（CeP）、結腸リンパ節（CoP）、を採取し、コラゲーナーゼ処理によって細胞懸濁液を調製した。各リンパ組織内の iTreg 細胞（$Foxp3^{+}NRP^{-}CD4^{+}$ T 細胞）、Tfh 細胞（$CXCR5^{+}PD\text{-}1^{+}CD4^{+}$ T 細胞）、GCB 細胞（$CD95^{+}GL\text{-}7^{+}$ B 細胞）の割合をフローサイトメトリーにより解析した。

【結果】

成熟マウスへの抗生物質投与によって、CeP の iTreg 細胞、Tfh 細胞、GCB 細胞の割合が顕著に減少したが PP では Tfh 細胞のみがわずかに減少した。また、MyD88 欠損マウスの CeP において、Tfh 細胞と GCB 細胞の割合が WT マウスと比較して減少していた一方で iTreg 細胞の割合は増加していた。さらに、MyD88 欠損マウスの PP における Tfh 細胞と iTreg 細胞の割合は WT マウスと同程度であった。以上のことから、PP と CeP では胚中心形成と iTreg 細胞の誘導における MyD88 シグナル経路の影響が異なることが示された。特に、恒常的な腸内細菌叢は CeP において、MyD88 シグナル経路依存的に胚中心形成の誘導・維持に作用していることが示唆された。

Gut associated lymphoid tissue, Intestinal bacteria, T follicular helper cell

講演番号：1B5a14
講演日時：3 月 24 日 11:43～ 1 号館 B5 会場

腸内細菌由来菌体成分が結腸を介して腸管免疫系細胞応答に与える影響

Intestinal immune responses induced by colonic sensitization of intestinal bacterial components

○渡邊 裕文[1]、津田 真人[1]、小島 菜月[1]、宇野 直哉[1]、高橋 恭子[1]、高橋 宜聖[2]、細野 朗[1]([1]日大・生資科、[2]感染研・免疫)
○ Hirofumi WATANABE[1], Masato TSUDA[1], Natsuki KOJIMA[1], Nadya UNO[1], Kyouko TAKAHASHI[1], Yoshimasa TAKAHASHI[2], Akira HOSONO[1] ([1]Nihon Univ. Graduate School of Bioresource Sciences, [2]NIID Department of Immunology)

【目的】腸内細菌と宿主免疫系は相互に影響し合っており、腸内細菌が腸管免疫組織の発達や腸管免疫の主要な免疫応答である免疫グロブリン A(IgA)産生の誘導に強く作用している。特に、*Bacteroides* は腸内細菌叢を構成する優勢菌の一つであり、マウス腸内細菌由来の *Bacteroides acidifacience* type A43(BA)は無菌マウスにその生菌体を定着させた際に、腸管免疫系の特に大腸部位において胚中心の形成や IgA 産生を誘導するのに強く関与することが明らかになっている。しかし BA 菌体がどのような作用機序で免疫系を感作して免疫調節しているのかは不明な点が多い。そこで本研究では、腸内細菌由来菌体成分が腸管のどの部位で免疫感作をしているのかを明らかにするために、投与ルートの異なる条件で腸管部位ごとに免疫応答に与える影響を解析した。
【方法】通常環境下で飼育した BALB/c マウス(8-12)週齢を対照群、経口投与群、結腸内投与群の 3 群に分けた。対照群にはリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を経口投与および結腸内投与し、経口投与群と結腸内投与群には加熱処理した BA 菌体をそれぞれ経口投与または結腸内投与を 7 日間連続で行った。そして、小腸及び大腸部位の腸管関連リンパ組織である小腸パイエル板(PP)、盲腸リンパ節(CeP)、結腸リンパ節(CoP)の単一細胞を調製した。フローサイトメトリーにより分化したエフェクター及び制御性の $CD4^+$T 細胞サブセットに関連する細胞表面分子、細胞内転写因子の発現を解析した。また、上記マウスから採取した各腸管関連リンパ組織の細胞を 1 週間 BA 加熱死菌体と共培養し、培養上清中の総 IgA 量を定量した。
【結果】結腸内投与群では、CoP において胸腺由来の免疫応答の抑制に働く内在性制御性 T($Foxp3^+Neuropilin1^+CD4^+$)細胞の割合が対照群と比較して有意に高く、経口投与群と比較しても高い傾向が見られた。また、活性化 T($CD44^+CD62L^-CD4^+$)細胞の割合は結腸内投与群が対照群と比較して高い傾向が見られた。培養上清中の総 IgA 量を測定したところ、結腸内投与群が対照群と比較して盲腸リンパ節で高い傾向が見られた。
【考察】結腸部位の腸管腔内に投与した BA 菌体によって結腸リンパ節において直接免疫系細胞応答が感作される可能性が考えられ、その際に CoP において T 細胞分化が誘導されていると考えられた。また、結腸内投与した BA 菌体によって盲腸部位においても免疫系細胞応答が影響を受ける可能性が考えられた。

Intestinal immunity, Intestinal bacteria, Colon

講演番号：1B5p01
講演日時：3 月 24 日 13:50～ 1 号館 B5 会場

短鎖脂肪酸はマスト細胞のアレルギー性応答を抑制する

Short chain fatty acids suppress allergic response of mast cells

○三浦 亮介、藤垣 泉、飯塚 雄輝、蔭山 あづさ、笠倉 和巳、八代 拓也、西山 千春（東理大基礎工）
○Ryosuke Miura, Izumi Fujigaki, Yuki Iizuka, Azusa Kageyama, Kazumi Kasakura, Takuya Yashiro, Chiharu Nishiyama (Dept. of Biol Sci and Tech., Tokyo Univ. of Sci)

[目的]食餌により摂取された難消化性の食物繊維は腸内細菌によって分解され、短鎖脂肪酸が産生される。近年短鎖脂肪酸が腸上皮細胞や免疫系細胞の遺伝子発現を調節することで腸内恒常性に寄与することが明らかにされているが、腸管を含む粘膜組織や結合組織に広く分布するマスト細胞に対して短鎖脂肪酸がどのような働きをするのかは不明である。我々は現在までに短鎖脂肪酸の一種である吉草酸がマスト細胞のアレルギー応答を抑制することを見出している。本研究では短鎖脂肪酸によるマスト細胞のアレルギー応答の抑制の詳細なメカニズムを解明することを目的とする。

[方法と結果]サイトカイン IL-3 により誘導したマウス骨髄由来マスト細胞(BMMC)の培養液に吉草酸や酪酸を添加することにより、FcεR1-IgE-抗原架橋により誘導される BMMC の抗原誘導性脱顆粒が顕著に抑制された。一方でカルシウムイオノフォア A23187 によって誘導される脱顆粒反応は酪酸により抑制された一方で吉草酸は抑制作用を示さなかった。さらに、酪酸と吉草酸の抗原誘導性脱顆粒の抑制は Cyclooxygenase(COX)-1/2 阻害剤アスピリンとインドメタシンにより阻害されたが、酪酸によるカルシウムイオノフォア誘導性脱顆粒の抑制は阻害されなかった。また COX-1 選択的阻害剤と COX-2 選択的阻害剤を用いた実験により酪酸と吉草酸による抗原刺激誘導性脱顆粒の抑制は COX-1 に依存することが示され、FACS によりこれらの短鎖脂肪酸は BMMC の FcεR1 膜表面発現を抑制するもののその作用は COX 非依存的であることが示された。さらに COX により最終的に生産されるプロスタグランジン（PG）E_2 が BMMC の抗原誘導性脱顆粒を抑制し、PGE_2 の受容体 EP3 をノックダウンすることで酪酸と吉草酸による抗原誘導性脱顆粒の抑制が阻害される結果を得た。以上の結果から、酪酸と吉草酸は COX-1 依存性に PGE_2 産生を促し、受容体 EP3 を介して FcεR1 シグナル経路を抑制することに加え、COX 非依存性にマスト細胞膜表面の FcεR1 の発現を抑制すること、さらに酪酸の場合は COX 非依存性にカルシウム流入以降の脱顆粒誘導経路にも阻害効果を発揮することが明らかとなった。最後に、酪酸が生体でのマスト細胞を介したアレルギー反応を抑制するか確認するため、雌性 C57BL/6 マウスに IgE と抗原の投与によりアナフィラキシーを誘導する実験を行ったところ、酪酸の経口投与によりアナフィラキシーによる体温低下が顕著に抑制され、またその作用はインドメタシン自由飲水投与により部分的に阻害されることが示された。

以上、本研究により酪酸と吉草酸のマスト細胞のアレルギー応答抑制の分子メカニズムが明らかにされ、さらに酪酸の経口投与がマウスのアレルギー疾患モデルに奏効することがはじめて示された。

Allergy, Short chain fatty acids, Mast cell

発表責任者：三浦亮介（8316703@ed.tus.ac.jp）

講演番号：1B5p02
講演日時：3 月 24 日 14:01～ 1 号館 B5 会場

腸内細菌によるマスト細胞の顆粒形成関連分子の発現抑制
Suppression of the gene expression involved in granule formation of mast cells by intestinal bacteria

○池谷 彩花[1]、高野 真衣[1]、笠倉 和巳[1,2]、中西 祐輔[1]、花澤 重正[1]、高橋 恭子[1]([1]日大生資、[2]ラ・ホヤアレルギー免疫研究所)
○Ayaka IKETANI[1], Mai TAKANO[1], Kazumi KASAKURA[1,2], Yusuke NAKANISHI[1], Shigemasa HANAZAWA[1], Kyoko TAKAHASHI[1] ([1]Nihon Univ., [2]La Jolla Institute for Immunology)

【背景・目的】
近年、腸内細菌の様々な生理作用が明らかにされ、その 1 つとして抗アレルギー作用が注目されている。I 型アレルギーにおいては、マスト細胞が IgE とアレルゲンにより活性化されることにより、細胞内の顆粒に含まれるヒスタミンが放出されアレルギー炎症が誘導される。これまでに、*Lactobacillus casei* JCM[1134] 菌体が、マスト細胞における転写因子 C/EBPα の発現を上昇させることにより顆粒形成を抑制することを報告している。本研究では、腸内細菌の抗アレルギー作用の新規なメカニズムとして、C/EBPα を介したマスト細胞の顆粒形成の抑制機構を明らかにすることを目的とした。

【方法】
C57BL/6 マウスの骨髄細胞を IL-3 存在下で 4-8 週間培養して骨髄由来マスト細胞（BMMC）を得た。BMMC を 1μg/ml の *L. casei* JCM[1134] 株の超音波破砕菌体にて 2 週間刺激し、7 日ごとに細胞を回収した。また、BMMC にエレクトロポレーションにより C/EBPα 発現プラスミドを導入して 24 時間培養を行った。これらの細胞から総 RNA を調製後、顆粒形成に関わるわる各分子（HDC，Serglycin，Mcpt4,5,6，C4ST-1，NDST2，Cpa3，Ctr2，GalNAc4S6ST）と C/EBPα の mRNA 発現量を定量 RT-PCR で解析した。さらに、BMMC に Serglycin および Mcpt4 の siRNA を導入して 48 時間培養し、顆粒形成をトルイジンブルー染色により評価した。

【結果】
BMMC への *L.casei* 菌体の刺激により HDC，Serglycin，Ctr2，Mcpt4 の発現が減少することが確認された。一方、C/EBPα 発現プラスミドの導入による過剰発現の結果、HDC，Ctr2 を除く分子の発現が抑制された。このうち、Serglycin, Mcpt4 は *L.casei* 菌体刺激によっても発現抑制がみられたことから、これらの分子の発現の変化は C/EBPα 依存的な変化であると考えられた。さらに、Serglycin, Mcpt4 の siRNA の導入により、顆粒形成の抑制が観察された。したがって、腸内細菌による顆粒形成の抑制は、C/EBPα 依存的に Serglycin および Mcpt4 の発現が抑制されることによることが示された。

mast cell, C/EBPα, granule

発表責任者：高橋恭子（ktaka@brs.nihon-u.ac.jp）

講演番号：1B5p03
講演日時：3 月 24 日 14:12～ 1 号館 B5 会場

酪酸は腸管上皮細胞におけるα-ディフェンシン 5 の発現を増強させる

Butyrate increases expression of the α-defensin 5 gene expression in intestinal epithelial cells

○宮下 采佳[1]、杉 由高[1,2]、中田 一彰[1]、中西 祐輔[1]、花澤 重正[1]、高橋 恭子[1] ([1]日本大学生物資源科学部、[2]協同乳業株式会社)
○Saika MIYASHITA[1], Yutaka SUGI[1,2], Kazuaki NAKATA[1], Yusuke NAKANISHI[1], Shigemasa HANAZAWA[1], Kyoko TAKAHASHI[1] ([1]Nihon Univ., [2]KYODO MILK INDUSTRY CO.,Ltd)

【目的】

α-ディフェンシン 5 は、腸管上皮で産生される主要な抗菌ペプチドの 1 つである。特に、小腸クリプトのパネート細胞から多量に産生され、侵入してくる病原菌に対する感染防御に加え腸内細菌叢のバランスの維持に重要な役割を果たしている。

これまでの研究により、マウス腸内容物の低分子量画分にα-ディフェンシン 5 遺伝子の転写調節作用があることを明らかにしている。本研究では、α-ディフェンシン 5 の産生を増強する腸内細菌代謝産物を特定することを目的とした。

【方法】

異なるブリーダー由来の BALB/c マウスから盲腸を摘出し、盲腸内容物抽出液を限外濾過して 3 kDa 以下の低分子画分を調製した。ルシフェラーゼ遺伝子上流にα-ディフェンシン 5 遺伝子 5′領域を挿入したレポータープラスミドを腸管上皮細胞株 Caco-2 に導入し、盲腸内容物<3 kDa 画分あるいは有機酸を添加してα-ディフェンシン 5 遺伝子の転写プロモーター活性に及ぼす影響を測定した。また、盲腸内容物より DNA を抽出し、次世代シーケンスにより 16S rRNA 遺伝子 V3-V4 領域の配列を用いた菌叢解析を行った。さらに、盲腸内容物<3 kDa 画分の ^{1}H-NMR および GC-MS 解析により、異なるブリーダー間での含有成分の比較を行った。

【結果】

Caco-2 細胞を用いたレポーターアッセイの結果、マウス盲腸内容物<3 kDa 画分にα-ディフェンシン 5 遺伝子の発現調節作用が認められ、また調節作用にはブリーダー間で違いが観察された。一方、菌叢解析の結果より、ブリーダー間で腸内細菌叢の構成の違いが確認された。よって、腸内細菌叢の違いにより、これらのマウスの盲腸内容物<3 kDa 画分に含まれる様々な腸内細菌由来代謝産物の量に差異がある可能性が考えられた。実際に、NMR および GC-MS で盲腸内容物<3 kDa 画分を解析した結果、代表的な腸内細菌代謝産物である有機酸の含有量に差異があることが示唆された。そこで、有機酸がα-ディフェンシン 5 遺伝子の転写プロモーター活性に及ぼす影響を解析した結果、酪酸を添加した Caco-2 細胞ではプロモーター活性が増加したのに対し、吉草酸およびイソ吉草酸の添加は影響を及ぼさなかった。

以上の結果から、腸内細菌代謝産物である酪酸にα-ディフェンシン 5 遺伝子の発現を増強させる作用があることが示された。

α-defensin 5, butyrate, intestinal epithelial cell

発表責任者：高橋恭子（ktaka@brs.nihon-u.ac.jp）

講演番号：1B5p04
講演日時：3 月 24 日 14:23～ 1 号館 B5 会場

腸内細菌によるマスト細胞の IgE 受容体発現抑制とその機構
Reglation of IgE receptor expression on mast cells by intestinal bacteria
○深津 咲乃、池谷 彩花、田中 大智、亀井 理佐、永田 志帆、中西 祐輔、高橋 恭子（日大生物資源）
○SAKINO FUKATSU, AYAKA IKETANI, DAICHI TANAKA, RISA KAMEI, SHIHO NAGATA, YUSUKE NAKANISHI, KYOKO TAKAHASHI (Nihon Univ.)

【背景・目的】近年、腸内細菌の抗アレルギー作用が注目されているが、その機構は十分明らかにされていない。アレルギー炎症の責任細胞として知られるマスト細胞は、高親和性 IgE 受容体(FcεRI)を細胞表面に発現し、FcεRI が IgE 抗体とアレルゲンにより架橋されるとヒスタミンなどの炎症性物質が放出される。したがって、マスト細胞表面の FcεRI の発現レベルはアレルゲンに対する感受性を決定する重要な要因となる。マスト細胞は主に皮膚や粘膜に存在するが、生体最大の粘膜組織である腸管には莫大な数の腸内細菌が生息し、これらの腸内細菌がマスト細胞の表現型に影響を及ぼす可能性が考えられる。本研究では、腸内細菌がマスト細胞の FcεRI の発現に及ぼす影響とその機構を明らかにすることを目的とした。
【方法】C57BL/6 マウス大腿骨より調製した骨髄細胞を IL-3 存在下で 5-10 週間培養して得た骨髄由来マスト細胞(BMMC)を使用した。BMMC に腸内細菌の加熱死菌体を添加して培養し、細胞表面の FcεRI の発現におよぼす影響をフローサイトメトリーにより解析した。FcεRI 各サブユニットの mRNA・タンパク発現、Erk の活性化を定量 RT-PCR、ウェスタンブロッティングにより解析した。また、MEK1/2 阻害剤 U0126、タンパク合成阻害剤シクロヘキシミドを添加して細胞表面の FcεRI 発現をフローサイトメトリーにより測定した。
【結果・考察】BMMC を *Bacteroides acidifaciens* type A43(BA) 菌体で 72 時間以上刺激することにより FcεRI の細胞表面発現が抑制されることが明らかになった。用いた様々な腸内細菌の加熱死菌体のうち、本株にのみ抑制作用が認められた。FcεRIα鎖およびβ鎖の mRNA および細胞内も含めた全タンパクの発現量に FcεRI の細胞表面発現と相関する有意な変化は観察されず、抑制作用は主に翻訳後段階の制御によると考えられた。一方、Erk のリン酸化が BA 菌体刺激開始 72 時間以降で抑制されることが明らかになった。さらに、U0126 を添加して Erk のリン酸化を阻害すると細胞表面の FcεRI の発現抑制が観察された。さらに、シクロヘキシミド存在下での細胞表面の FcεRI の発現低下が U0126 の添加により促進された。以上の結果から、長時間の BA 菌体刺激は、Erk の抑制を介して FcεRI のエンドサイトーシスを促進することにより、マスト細胞表面の FcεRI の発現を抑制すると考えられた。これらの結果は、腸内細菌による抗アレルギー作用機序の新たな一端を示すものである。

IgE receptor, mast cell, intestinal bacteria

発表責任者：高橋恭子（ktaka@brs.nihon-u.ac.jp）

講演番号：1B5p05
講演日時：3 月 24 日 14:34～ 1 号館 B5 会場

腸管上皮における低分子量 GTP アーゼ ARF4 の役割

The role of ARF4 in intestinal epithelial cells

○中田 一彰、中西 祐輔、津田 真人、細野 朗、高橋 恭子（日本大学生物資源科学部）
○ Kazuaki NAKATA, Yusuke NAKANISHI, Masato TSUDA, Akira HOSONO, Kyoko TAKAHASHI (Nihon Univ.)

【目的】

腸管上皮細胞（IEC）は、隣り合う細胞の細胞膜タンパク質同士の結合を介して、細胞同士が密着しあいタイトジャンクションを形成することにより、管腔と体内を隔てる物理的バリアを構築している。この機構は、管腔の食物抗原、病原体、腸内細菌等が直接体内に侵入し、過剰な炎症反応が誘導されるのを防ぐために重要である。これまでに、低分子量 GTP アーゼである ARF4 はタイトジャンクション関連タンパク質の発現を抑制し腸管上皮透過性を亢進させることを明らかにした。そこで、本研究では、IEC における ARF4 の役割について明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】

ARF4 と相互作用するタンパク質を同定するため、ヒト IEC 株である Caco-2 細胞よりライセートを調製し、抗 ARF4 抗体あるいはコントロール抗体を用いた免疫沈降を行った。回収物を SDS-PAGE・銀染色に供し、抗 ARF4 抗体を用いた際にのみ特異的に検出されたバンドについて、ゲル内トリプシン消化後に質量分析を行った。さらに、同定された候補タンパク質に対する抗体を用いて、抗 ARF4 抗体による免疫沈降物のウェスタンブロッティングを行い、候補タンパク質と ARF4 との結合を解析した。

【結果と総括】

抗 ARF4 抗体を用いた免疫沈降の結果、コントロール抗体を用いた時には検出されず、抗 ARF4 抗体を用いた場合にのみ検出されたバンドが存在した。これらのバンドの質量分析を行った結果、ARF4 と結合する候補タンパク質が複数同定された。次に、抗 ARF4 抗体による免疫沈降物について、候補タンパク質の抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った。その結果、nuclear migration protein nudC と tropomodulin 3 を ARF4 と相互作用するタンパク質として同定した。両タンパク質は細胞骨格の維持に関与することが報告されている。したがって、ARF4 はタイトジャンクションタンパク質の発現抑制に加え、IEC の形態や極性を調節することにより上皮透過性を制御する可能性が示唆された。

intestinal epithelial cell, small GTPase, ARF4

講演番号：1B5p06
講演日時：3 月 24 日 14:55～ 1 号館 B5 会場

ザクロポリフェノールと大豆イソフラボンによる接触過敏症抑制効果

Diets containing pomegranate polyphenol and soy isoflavone attenuate contact hypersensitivity in mice

○長野 隆男[1]、伊東 秀之[2]([1]石川県大食品、[2]岡山県大栄養)
○Takao NAGANO[1], Hideyuki ITO[2] ([1]Ishikawa Pref. Univ., [2]Okayama Pref. Univ.)

【目的】マウスを用いた接触過敏症（CHS）動物実験系は、アレルギー性接触皮膚炎（ACD）のよいモデル動物実験系と考えられている。これまでに、私たちは CHS 動物実験系を用いてザクロポリフェノール（PP）と大豆イソフラボン（SI）の CHS 抑制効果を検討し、両方に、ヒトが食生活で摂取可能な量に相当する摂取量で CHS 抑制効果があることを明らかにした。そこで本研究では、マウスに PP と SI を同時に与えて行った実験結果について報告する。
【方法】PP はザクロジュースから調製し、SI としてソヤフラボン HG（不二製油）を使用した。PP と SI は、飲料水として実験開始 3 週間前からマウスに自由摂取させた。実験は，非 CHS マウス/水摂取（非 CHS 群，n = 3)、CHS マウス/水摂取（対照群，n = 6)、CHS マウス/PP 溶液摂取（PP 群，n = 6)、CHS マウス/SI 溶液摂取（SI 群，n = 6)、CHS マウス/PP と SI 溶液摂取（PS 群，n = 6）の 5 群で行った。CHS マウスは、実験 0 日目と 1 日目に 0.5% ジニトロフルオロベンゼン（DNFB）を腹部に感作した後、実験 5 日目と 12 日目に 0.2% DNFB を耳介部にチャレンジした。以下の評価は、2 回目の DNFB チャレンジをした 24 時間後の耳介に対して行った。耳介の腫れはマイクロメータで測定し、耳介組織への炎症細胞の浸潤は抗 Gr-1 抗体を用いた免疫組織化学染色により行った。サイトカインの産生は、抗体アレイと ELISA を用いて測定した。
【結果】耳介の腫れを測定したところ、対照群と比較して PP，SI，PS 群で、SI 群と比較して PS 群で有意な腫れの抑制が観察された。一方、耳介組織への炎症細胞の浸潤を調べたところ、対照群と比較して PP， SI， PS 群で有意な炎症細胞の浸潤抑制が見られた。次に、抗体アレイを用いて、患部の耳介におけるサイトカインの産生について調べたところ、対照群と比較して PS 群で好中球を誘導する CXCL2 とマクロファージを誘導する MCP-5 の産生抑制が示された。そこで ELISA を用いて CXCL2 と MCP-5 の定量を行った。CXCL2 を測定した結果、対照群と比較して PP，SI，PS 群で、SI 群と比較して PS 群で有意な産生抑制が観察された。一方、有意な MCP-5 の産生抑制が、対照群と比較して SI 群と PS 群で見られが、PP 群では観察されなかった。また、PP 群と比較して PS 群で MCP-5 の有意な産生抑制が観察された。以上のことから、ヒトが食生活で摂取可能な量に相当する量をマウスに与えた結果、PP と SI の同時摂取はそれぞれを単独で摂取する場合よりも CHS の抑制効果は高いことが示された。そのため、ACD の予防と緩和に、ザクロと大豆を食生活に取り入れることが有用であることが示唆された。

pomegranate polyphenol, soy isoflavone, contact hypersensitivity

発表責任者：長野隆男（naganot@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：1B5p07
講演日時：3 月 24 日 15:06～ 1 号館 B5 会場

低分子化ホエイプロテインを用いたウシ乳房炎に対する治療剤の開発

Development of therapeutic agents for bovine mastitis using low molecular weight-whey protein

○田坂 徹[1,3]、前橋 克彦[2]、井土 侑香[1]、山田 久嗣[1]、鵜沼 英樹[3]、徳永 彦[3]、早川 明夫[3]、呉 明輝[3]、呉 貴卿[4]、宇都 義浩[1]（[1]徳島大学大学院社会産業理工学研究部、[2]NOSAI 徳島、[3]株式会社皇漢薬品研究所、[4]呉クリニック）
○Toru TASAKA[1,3], Katsuhiko MAEHASHI[2], Yuka IZUCHI[1], Hisatsugu YAMADA[1], Hideki UNUMA[3], Ken TOKUNAGA[3], Akio HAYAKAWA[3], Akiteru GO[3], Kikyo GO[4], Yoshihiro UTO[1]
([1]Graduate School of Technology, Industrial and Social Sciences, Tokushima University, [2]Nosai Tokushima, [3]Kohkan Pharmaceutical Institute Co., Ltd., [4]Dermatology Go clinic)

【目的】ホエイタンパク質は、チーズ製造の副産物であるホエイから単離されたグロブリンの混合物である。主にβ-ラクトグロブリン、α-ラクトアルブミン、ラクトフェリンで構成され、豊富な免疫活性タンパク質を含んでいる。また、ホエイタンパク質の部分加水分解物は免疫疾患の改善効果を有することが報告されている。これらの知見から、我々は、様々な食品用プロテアーゼを用いて加水分解ホエイタンパク質（低分子化ホエイプロテイン）を調製し、マクロファージの貪食活性化能および炎症性サイトカインの１種である腫瘍壊死因子（TNF-α）産生能の増強効果を有することを明らかにした。そこで、酪農経営上重要な疾病で、ウシの乳房内や乳腺組織内に細菌などの病原微生物が侵入し増殖することによって起る乳房の炎症の総称である乳房炎に対する低分子化ホエイプロテインの治療効果について検証した。
【方法・結果】ウシの腹腔内に生理食塩水に溶かした低分子化ホエイプロテイン（300 mg または 1000 mg）、もしくは、膣内にカプセル充填した低分子化ホエイプロテイン（1000mg）を５日間連投し、各乳房４箇所から採取した乳に含まれる体細胞数と細菌の種類を同定し、IgA を定量した。その結果、300mg 投与群の３頭は体細胞数が出荷基準値の 40 万未満に減少しなかった。一方、1000 mg 投与群の４頭のうち２頭は、体細胞数が 40 万未満に低下した。また、乳汁中の IgA 含有量は、投与後に体細胞数が 40 万未満に減少した乳汁で有意に減少した。
【考察】基礎研究の結果を元に考察すると、低分子化ホエイプロテイン（1000mg）投与後における体細胞数の減少は、低分子化ホエイプロテインがウシの腹腔内のマクロファージに作用して、貪食活性および TNF-α産生を増強することにより抗菌作用を発揮したことや、ホエイ自体に含まれる IgA が小腸のパイエル板に作用して IgA 産生細胞の動員を増加し、炎症箇所に IgA が誘導されたことで病原微生物の増殖を抑制したと考えられる。本研究より、低分子化ホエイプロテインはウシ乳房炎に対して有効な治療剤となり得ることが示された。現在、ウシ乳房炎に対する低分子化ホエイプロテインの症例数の積み上げやウシ由来マクロファージ細胞を用いた *in vitro* 試験を検討しており、併せて報告する予定である。

low molecular weight-whey protein, Bovine mastitis, macrophage-activation

講演番号：1B5p08
講演日時：3 月 24 日 15:17～ 1 号館 B5 会場

1-Deoxynojirimycin による抗炎症作用の解析

Analysis of anti-inflammatory property of 1-Deoxynojirimycin

○本田 瑞希[1]、亀井 飛鳥[2]、相田 美緒[3]、薩 秀夫[3]([1]前工大院・工、[2]KISTEC、[3]前工大・工)
○Mizuki HONDA[1], Asuka KAMEI[2], Mio AIDA[3], Hideo SATSU[3] ([1]Dept. of biotech., Maebashi institute of technology, [2]KISTEC, [3]Maebashi institute of technology)

【目的】クワは日本をはじめ東アジアなどで盛んに栽培され、日本では古くから蚕の餌として利用されるとともに健康茶としても飲み継がれてきた。近年クワ葉の持つ機能性がさらに注目され、血糖値上昇抑制作用や脂質代謝改善作用などが報告されている。一方、演者らはクワ葉の抗炎症作用についてこれまで解析を進め、炎症のマスターレギュレーターである NFκB 転写活性の安定評価系を動物培養細胞を用いて構築し、クワ葉に含まれる 1-Deoxynojirimycin（1-DNJ）が TNF-αによる NFκB 活性化を抑制することを見出した。本研究では、ヒト肝モデル細胞を用いて 1-DNJ による NFκB 阻害の特性・機構を解析するとともに、ヒト腸管上皮モデル細胞との共培養系を用いて 1-DNJ が腸管上皮を透過し肝細胞における炎症関連分子の発現に及ぼす影響を検討することとした。
【方法】NFκB の標的遺伝子として炎症性ケモカインであるインターロイキン 8（IL-8）に注目した。ヒト肝がん由来 HepG2 細胞を用いて TNF-α と同時に 1-DNJ およびその構造類似体である 1,5-Anhydroglucitol（1,5-AG）または Fagomine を添加し、IL-8 の mRNA 発現量に及ぼす影響を real-time PCR 法を用いて解析した。さらに 1-DNJ の腸管吸収を考慮するためヒト腸管上皮モデル Caco-2 細胞を透過性膜上で 2 週間培養し腸管上皮様に分化させた後、HepG2 細胞との共培養をおこなった。Caco-2 細胞の管腔側より 1-DNJ を添加して 21 時間インキュベートした後、基底膜側に TNF-αを添加してさらに 3 時間インキュベート後、HepG2 細胞における IL-8 の mRNA 発現量を測定した。
【結果】HepG2 細胞に TNF-α と 1-DNJ 、1,5-AG または Fagomine を添加し IL-8 mRNA 発現に及ぼす影響を検討した結果、1-DNJ が TNF-αによる IL-8 mRNA 発現亢進を抑制した一方で、1,5-AG および Fagomine は TNF-α誘導 IL-8 の mRNA 発現亢進を有意に抑制しないことが明らかとなった。また、Caco-2 細胞と HepG2 細胞の共培養系を用いて、Caco-2 管腔側より 1-DNJ を、基底膜側より TNF-αを添加し、HepG2 細胞における IL-8 mRNA 発現量に及ぼす影響を検討した結果、1-DNJ は TNF-αによって誘導された IL-8 mRNA 発現を有意に抑制した。以上より、クワ葉成分の一種である 1-DNJ による IL-8 mRNA 発現抑制作用は 1-DNJ の構造に極めて特異的であることが示唆された。また、1-DNJ は腸管で吸収された後、肝臓においても抗炎症作用を発揮する可能性が示唆された。現在、動物モデルを用いてクワ葉の抗炎症作用についても検討を進めている。
なお本研究の一部は，総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」によって実施されました。

NFκB, anti-inflammation, 1-deoxynojirimycin

発表責任者：薩　秀夫（satsu@maebashi-it.ac.jp）

講演番号：1B5p09
講演日時：3 月 24 日 15:28～ 1 号館 B5 会場

マクロファージに対するシネフリンの抗炎症効果

Anti-inflammatory effect of synephrine on macrophages

○石田 萌子、竹國 千尋、西 甲介、菅原 卓也（愛媛大学院農）
○Momoko ISHIDA, Chihiro TAKEKUNI, Kosuke NISHI, Takuya SUGAHARA (Ehime Univ. of Agric.)

【目的】 炎症は、生体の恒常性維持のために必要不可欠な生体防御反応であるが、過剰な、あるいは慢性的な炎症状態は、自己免疫疾患や慢性炎症性疾患を誘引する。シネフリンは、主に柑橘類の果皮に含まれるアルカロイドの一種であり、サプリメント素材としても用いられている。これまでに、脂肪蓄積抑制効果などが報告されているものの、炎症を誘導するマクロファージに対する効果やその詳細な作用機構の解明には至ってはいない。そこで本研究では、過剰炎症状態のマクロファージに対するシネフリンの抗炎症効果とその作用機構の解明、および炎症性疾患モデルマウスに対する症状緩和効果を明らかにすることを目的とした。

【方法】 シネフリンを蒸留水に溶解後、pH7.4 に調製したものをサンプルとして使用した。マウス由来マクロファージ様細胞株である RAW264.7 細胞およびマウス腹腔から回収した腹腔マクロファージを、シネフリン存在下でグラム陰性菌細胞壁外膜成分であるリポ多糖（LPS）で刺激することで過剰炎症状態を誘導し、シネフリンの抗炎症効果を検討した。炎症性サイトカイン（IL-6 および TNF-α）の定量には酵素抗体法、細胞毒性の評価には WST-8 法、シグナル伝達因子への影響にはウエスタンブロッティング法を用いて検討した。また、BALB/c マウスに対してシネフリンを 7 日間経口投与した後、腹腔内に LPS を投与することで全身性炎症反応症候群（SIRS）を誘導した。LPS 投与から 2 時間後に採血し、血中炎症性サイトカイン量を測定するとともに、40 時間に渡ってマウスの生存状況を観察し、SIRS モデルマウスに対するシネフリン投与の効果を評価した。

【結果】 シネフリンは細胞毒性を示すことなく、RAW264.7 細胞の LPS 誘導性炎症性サイトカイン産生を有意に抑制した。また、マウス腹腔マクロファージに対しても同様の効果を示した。シグナル伝達因子に与える影響を検討したところ、MAPK ファミリーである p38 のリン酸化、および NF-κB の核内移行を下方制御することで炎症性サイトカイン産生を抑制することが示唆された。生体内でのシネフリンの抗炎症効果について SIRS モデルマウスを用いて検討した結果、コントロール群では LPS 投与後 40 時間ですでにマウスの生存率が 0%であるのに対して、シネフリン投与群では 50%であった。また、血中 IL-6 量の有意な減少が認められたことから、シネフリンの経口投与は、全身性炎症によって誘導される炎症性サイトカインの過剰産生を抑制し、SIRS モデルマウスの生存率を向上させることが示唆された。これらのことから、シネフリンは過剰炎症状態のマクロファージを標的とした抗炎症効果を有することが明らかになり、生体内においてもその効果を発揮すると期待できる。

Synephrine, Anti-inflammatory effect, Macrophages

講演番号：1B5p10
講演日時：3 月 24 日 15:39～ 1 号館 B5 会場

SEA による JAK/STAT 系活性化機構およびカテキン類によるその抑制メカニズムの解析

Activation of JAK/STAT signaling pathways by staphylococcal enterotoxin A (SEA) and inhibition of its signaling by catechins

○黒川 亜美[1]、島村 裕子[1]、伊藤 創平[1]、菅 敏幸[2]、大橋 典男[1]、増田 修一[1] ([1]静岡県大院・薬食生命、[2]静岡県大・薬)

○Ami KUROKAWA[1], Yuko SHIMAMURA[1], Sohei ITO[1], Toshiyuki KAN[2], Norio OHASHI[1], Shuichi MASUDA[1] ([1]Pharm. Nutr. Sci., Univ. Shizuoka, [2]Sch. Pharm. Sci., Univ. Shizuoka)

【目的】我々は、これまでに、黄色ブドウ球菌が産生する staphylococcal enterotoxin A (SEA) が IFN-γ 等の Th1 サイトカインを誘導すること、また、カテキン類が SEA と相互作用することを明らかにしている。しかし、IFN の細胞内シグナル伝達系である JAK/STAT 系を SEA がどのように作用することで IFN システムを発現しているのか不明である。そこで、本研究では、SEA による JAK/STAT 系の活性化メカニズムを明らかにすることを目的に、マウス脾臓細胞に SEA を暴露させた際の JAK/STAT 系関連遺伝子および Th1/Th2 バランスの変化について検討した。さらに、SEA 誘導性 STAT のリン酸化に対するカテキン類の影響について解析した。

【方法】C57BL/6J マウスから脾臓細胞を採取し、各種濃度で SEA を暴露させた。継時的に細胞を回収し、SEA 誘導性の JAK/STAT 系を介するサイトカインおよび JAK/STAT 系の遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR を用いて解析した。また、マウス脾臓細胞に、SEA と(−)-epigallocatechin gallate (EGCg) および合成したメチル化カテキン (3′′-Me-EGCG および 4′′-Me-EGCG) をそれぞれ暴露させ、カテキン類による SEA 誘導性 STAT3 のリン酸化の変化を Western blot を用いて解析した。

【結果・考察】マウス脾臓細胞に SEA を暴露することにより、Th2 サイトカインである IL-6 の発現量は減少傾向を示し、Th1 サイトカインである IFN-γおよび IL-27 の発現量が増加した。また、SEA を暴露することにより、JAK1 の発現量は減少したが、JAK2、SOCS1、STAT1、STAT3 および STAT3 の下流シグナル遺伝子である BNIP3 の発現量は増加した。さらに、培養時間の延長に伴い、JAK/STAT を負に調節する SOCS1 の発現量が増加し、STAT3 の発現量が減少した。そこで、SEA 誘導性 STAT3 のリン酸化に対するカテキン類の影響を検討したところ、EGCg は、SEA によって誘導された STAT3 (Tyr705) のリン酸化を有意に抑制した。マウス脾臓細胞に SEA とメチル化カテキンを暴露させた場合、3′′-Me-EGCG は、STAT3 のリン酸化を抑制しなかったが、4′′-Me-EGCG は、EGCg と同様に STAT3 のリン酸化を有意に抑制した。これらの結果より、EGCg のガロイル基 3′′位の水酸基と SEA が相互作用することにより、SEA が誘導する STAT3 のリン酸化を抑制していると推察された。

本研究により、SEA は、Th1 サイトカインを誘導し、サイトカイン受容体 gp130 を介して STAT3 を活性化することを明らかにした。さらに、EGCg は、SEA 誘導性の JAK/STAT 系を介するサイトカインの発現および STAT3 のリン酸化に対して負のフィードバック機構を増強することを示した。今後、免疫・炎症性疾患の治療に対するカテキン類の応用が期待される。

Staphylococcal enterotoxin A (SEA), JAK/STAT, EGCg

講演番号：1B5p11
講演日時：3 月 24 日 16:00～ 1 号館 B5 会場

香料シトラールの突然変異抑制機構に関する構造解析

Analyze the structure of anti-mutagenic mechanism of perfume citral

○柴田 陶子、加賀谷 洋太、石垣 美晴、佐藤 綺海、藤島 直太、髙橋 優太、遠藤 金吾（秋田高校）
○Touko SHIBATA, Youta KAGAYA, Miharu ISHIGAKI, Ayami SATO, Naota Fujishima, Yuta TAKAHASHI, Kingo ENDO (Akita High School)

秋田県は、がん(特に消化器系)による死亡率が高いことが問題となっている(秋田県健康環境センター保健衛生部，2014)。そこで、食品に用いられている香料の中から、細胞のがん化の一因である遺伝子突然変異を抑制する物質を探索することで、食を通じて人々の健康の維持・増進に貢献できると考え、本研究を着想した。これまでの我々の研究で、レモンの香料物質「シトラール」が出芽酵母において過酸化水素による遺伝子突然変異を抑制し、その効果にはアルデヒド基とそれに隣接する C－C 間二重結合の隣接構造が起因することが示唆されている。そこで我々はシトラールの遺伝子突然変異抑制効果をもたらす構造を明確にすることを目的として本研究を行った。

2．方法

① 一倍体出芽酵母 YAS106[2)] を YPD 液体培地 30℃で 3 日間振とう培養した。これに変異原である過酸化水素と、シトラールと構造が類似した物質を試料としてそれぞれ加え、30℃で 3 時間培養し、完全培地(YPD 培地)とカナバニン含有最少培地に撒いた。

② 30℃で 3 日間培養後、寒天培地に生えてきたコロニー数を数え、完全培地より全菌数を、カナバニン含有最少培地よりカンバニン耐性へと突然変異が生じた菌数を算出し、

遺伝子突然変異頻度＝カナバニン耐性菌数/全菌数

を求めた。

3．結果・考察

アルデヒド基とそれに隣接する C－C 間二重結合にさらにメチル基が隣接する *trans*-クロトンアルデヒドのみでシトラールと同様に過酸化水素による遺伝子突然変異を抑制する効果が見られ、これらの構造のいずれかが欠けた化合物では、いずれも遺伝子突然変異を抑制する効果は見られなかった。このことから、シトラールの持つ遺伝子突然変異抑制効果は、①アルデヒド基、②C－C 間二重結合、③メチル基の 3 つが全て隣接している構造によるものであることが示された。

4．謝辞

本研究は、一般財団法人東和食品研究振興会、JST　グローバルサイエンスキャンパス東北大学探求型科学者の卵養成講座、公益財団法人齋藤憲三・山﨑貞一顕彰会の支援を受けて行ったものです。この場をお借りしてお礼申し上げます。

mutation, citral, antioxidation

発表責任者：遠藤金吾（kinnoji@af.wakwak.com）

講演番号：1B5p12
講演日時：3 月 24 日 16:11～ 1 号館 B5 会場

赤シソ由来メトキシフラバノン PDMF の細胞老化誘導作用とその分子機構
Cellular senescence-inducing potency of a *Perilla frutescens*-derived methoxyflavanone (PDMF) and its molecular mechanisms

○前田 陽[1]、平川 規子[2]、馬場 堅治[2]、河本 正次[1]([1]広島大院・先端・生命機能、[2]三島食品株式会社・研究所)
○Akira MAEDA[1], Noriko HIRAKAWA[2], Kenji BABA[2], Seiji KAWAMOTO[1] ([1]Grad. Sch. ADSM, Hiroshima Univ., [2]Mishima Foods Co., Ltd.)

[背景および目的]

我々はこれまでの本大会において、赤シソ(*Perilla frutescens*)由来の新規メトキシフラバノン（PDMF; 8-hydroxy-5,7-dimethylflavanone）が p53 がん抑制遺伝子を分子標的とした制がん作用（細胞周期停止、アポトーシス誘導）を示すことを報告してきた。p53 は細胞老化誘導の主要な regulator でもあることから、本研究では PDMF のがん細胞に対する細胞老化誘導活性の有無を検証すると共に、その分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

[方法]

ヒト肺腺がん細胞株 A549 を 6 well プレートに 5.0×10^3 cells/well で播種して 10% FBS 添加 DMEM 培地で一晩培養した後、PDMF 添加培地にて 10 日間刺激培養した。その後、細胞を通常培地に戻して 6 日間培養し、老化細胞で発現が増加する老化関連β-ガラクトシダーゼ（SA-β-gal）染色に供して PDMF が細胞老化を誘導しうるか否かを調べた。

[結果および考察]

PDMF 刺激により、SA-β-gal 陽性細胞の有意かつ著明な増加が確認され、本分子が A549 細胞に対して細胞老化誘導活性を示しうることが示唆された。我々はこれまでに PDMF が p53 の活性化ならびにそのタンパク質量レベルをいずれも正に調節することを見出している。そこで、PDMF の細胞老化誘導作用における p53 の必要性を RNAi により検証すると共に、本分子の上流で細胞老化のマスターレギュレーターとして機能する ATM/ATR 活性化への PDMF の影響について調べている。さらに、ATM/ATR の下流標的として p53 経路とは独立に細胞老化誘導に関わる $p16^{INK4}$ 経路および GATA4-細胞老化随伴分泌現象（SASP）経路への PDMF の影響についても解析を進めており、結果を合わせて報告したい。

cellular senescence, flavanone, *Perilla frutescens*

発表責任者：前田　陽（maeda.akira.1121@gmail.com）

講演番号：1B5p13
講演日時：3 月 24 日 16:22～ 1 号館 B5 会場

がん細胞多剤耐性に及ぼす酵素消化低分子化フコイダン抽出物の効果

Effects of low molecular weight fucoidan extract on multidrug resistance of cancer cells

○大河内 公一[1]、江藤 博[2]、照屋 輝一郎[1,3] ([1]九大院生資環、[2]第一産業(株)、[3]九大院農院)
○Koichi OKAWACHI[1], Hiroshi ETO[2], Kiichiro TERUYA[1,3] ([1]Grad. Sch. Biores. Bioenv. Sci. Kyushu Univ., [2]Daiichi Sangyo Co. Ltd., [3]Fac. Agr. Kyushu Univ.)

［目的］
褐藻由来の硫酸化多糖類であるフコイダンを低分子化した酵素消化低分子化フコイダン抽出物（LMF）には、免疫賦活作用、血管新生抑制作用、アポトーシス誘導作用の 3 つの作用が報告されており、これらの作用により抗がん作用があると考えられている。がんの標準的な治療法の一つに化学療法があるが、抗がん剤を長期的に継続するとがん細胞が薬剤耐性を獲得し、抗がん剤の効果が低下することが問題となっている。本研究ではがん細胞における多剤耐性（MDR）に対して LMF がどのような効果を及ぼすかを検証した。

［方法］
ヒト線維肉腫由来細胞株 HT1080、ヒト正常線維芽細胞 TIG-1 及びヒト慢性骨髄性白血病由来細胞株 K562 を使用した。酵素消化低分子化フコイダン抽出物（LMF）は第一産業株式会社より提供されたものを使用した。各細胞は 10% FBS を添加した MEM または RPMI1640 培地中で 37℃、5% CO_2／95% Air 下で培養を行った。HT1080 細胞、TIG-1 細胞そして K562 細胞を播種し、24 時間前培養後、LMF、ドキソルビシン（以下 DXR）等の抗がん剤の単独処理、またはそれらを併用処理し、処理終了後に WST-1 Assay による細胞の代謝活性の測定、ならびに定量 PCR により多剤耐性関連遺伝子の発現レベルを測定した。

［結果と考察］
LMF は DXR による正常細胞への影響を減弱させるだけでなく、LMF 単独処理ではがん細胞特異的な細胞増殖抑制効果を示した。LMF と DXR との併用処理ではその効果を増強させたが、薬剤耐性を獲得したがん細胞に対しては LMF の顕著な効果は見られなかった。しかしながら LMF 処理濃度依存的な MDR1 遺伝子発現レベルの減少が見られたため、LMF 処理を加えることで DXR 単独処理に比べてがん細胞への抗がん効果が期待された。

fucoidan, anticancer, multidrug resistance

発表責任者：照屋輝一郎（kteruya@grt.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：1B5p14
講演日時：3 月 24 日 16:33～ 1 号館 B5 会場

肺癌マウスモデルにおけるヒメマツタケ抽出物の免疫チェックポイント阻害作用

Agaricus blazei Murrill extract inhibits the expression of immune checkpoints in lung cancer mouse model.

○原田 栄津子[1,2]、コリナ ダレッサンドロ・ガバザ[2]、森園 智浩[1]、安間 太郎[2]、戸田 雅昭[2]、ガバザ エステバン[2]（[1]岩出菌学研究所、[2]三重大医）

○ Etsuko HARADA[1,2], Corina D'ALESSANDRO-GABAZZA[2], Toshihiro Morizono[1], Taro YASUMA[2], Masaaki TODA[2], Esteban GABAZZA[2] ([1]Iwade Research Institute of Mycology, Ltd., [2]Mie University School of Medicine)

【緒言】日本の原因疾患別死亡者数で最も多いのが悪性腫瘍である。最近の研究により、それぞれのがんに特有な遺伝子変異が存在することがわかってきており、肺がんでは「ALK 融合遺伝子」「EGFR 遺伝子変異」といった特有の遺伝子変異がみられ、これら以外にもさまざまな遺伝子変異のタイプが存在することが判明している。このことから、我々は、ヒト EGFR 変異型（EGFRL858R）肺癌モデルマウスを独自に開発して実験に供している。一方、最近、がん細胞が免疫の働きにブレーキをかけて、免疫細胞の活性化を阻害していることが判明している。その免疫細胞の攻撃を阻止するようにブレーキの解除を行い、免疫細胞の働きを再び活性化して、がん細胞を攻撃するようにする新たな治療法が注目されている。

キノコ類は、古来より東洋医学にも使用されており、悪性腫瘍の予防や治療に対しても、免疫強化やアポトーシスの誘導などにより有益であるとされている。その中でも、特にヒメマツタケ（*Agaricus blazei* murrill）は、抗腫瘍活性が高く、ヒメマツタケ中の多糖体 β-(1→6)-D-グルカンたんぱく質複合体（FⅢ2ｂ画分）がマクロファージや NK 細胞を活性化して、がんに対して増殖抑制作用をもつ。さらに、樹状細胞の活性化作用というあらたな免疫機構のメカニズムも解明されている。しかしながら、これまで、キノコ抽出液で、上述の免疫チェックポイント阻害効果に関しては、報告されていない。

【方法および結果】我々は、ヒメマツタケアルカリ抽出液を 2%（w/w）餌に添加して、肺癌モデルマウス（$EGFR^{L858R}$ トランスジェニックマウス）に投与した結果、ヒメマツタケアルカリ抽出物を経口投与した肺癌モデルマウスにおいて免疫チェックポイント分子（PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA4）や AXL のいずれに関しても発現が低下することが判明した。また、肺細胞組織の所見によっても、実際にヒメマツタケアルカリ抽出物を投与することによって、癌細胞が減少していることが判明した。従いまして、ヒメマツタケは新しい治療として注目されているがん免疫療法として大いに効果がある可能性が示された。さらには、国民の大きな負担になると指摘されているがん治療における医療費問題も解決できる可能性も認められた。

Agaricus blazei, immunity checkpoint molecules, antitumor effect

発表責任者：原田栄津子（harada2@iwade101.com）

講演番号：1B5p15
講演日時：3 月 24 日 16:44～ 1 号館 B5 会場

マイクロ RNA Let-7b を介したデルフィニジンの抗メラノーマ作用
Anti-melanoma effect of Delphinidin via up-regulation of microRNA Let-7b

○村田 希[1,2]、山田 脩平[2]、立花 宏文[2]([1]愛媛大・ADRES、[2]九大院農院・生機科)
○Motoki MURATA[1,2], Shuhei YAMADA[2], Hirofumi TACHIBANA[2] ([1]Ehime Univ., [2]Kyushu Univ.)

【目的】デルフィニジンはアントシアニジンの一種であり、糖や糖鎖と結びついた配糖体（アントシアニン）の形で花や果実中に存在しているが、抗がん作用や抗炎症作用を示す機能性食品成分としても期待されている。一方、ノンコーディング RNA の一種であるマイクロ RNA は標的遺伝子の発現を負に制御し様々な生命現象に関与することから、食品の機能性を担う新たな分子種として注目を集めている。食品の機能性とマイクロ RNA に関する研究は始まったばかりであり、機能性食品成分がどのようなマイクロ RNA の発現に影響を与えるかは不明な点が多い。これまでに、デルフィニジンの廃用性筋萎縮抑制作用にマイクロ RNA が関与していることを明らかにしており（*J Agric Food Chem.*, 65.1: 45-50 (2016)）、本研究ではデルフィニジンの抗がん作用に対するマイクロ RNA の関与について検討した。

【方法】デルフィニジンで処理したマウスメラノーマ細胞株 B16 の細胞数を測定し、細胞周期の制御に関与する Cyclin D1 タンパク質の発現をウエスタンブロットにより解析した。がん抑制性のマイクロ RNA である Let-7b の発現量をリアルタイム PCR により測定した。Let-7b 阻害剤を導入した B16 細胞をデルフィニジンで処理し、Let-7b の機能阻害がデルフィニジンの抗メラノーマ作用に及ぼす影響を細胞数計測ならびにウエスタンブロットにより検討した。さらに、C57BL/6J マウスに B16 細胞を移植し腫瘍の成長を確認後、デルフィニジンを経口投与し、腫瘍における Let-7b の発現量を測定した。

【結果】デルフィニジン処理により B16 の細胞数が減少するとともに、Cyclin D1 タンパク質の発現が抑制され、Let-7b の発現が上昇した。一方、Let-7b のインヒビター導入により、デルフィニジンの B16 細胞増殖抑制作用および Cyclin D1 タンパク質発現抑制作用が見られなくなった。また、デルフィニジンの摂取により、腫瘍組織における Let-7b の発現が有意に上昇した。

【結論】以上の結果より、デルフィニジンの抗メラノーマ作用は Let-7b の発現上昇に依存的であることが示された。

Delphinidin, microRNA, melanoma

発表責任者：立花 宏文（tatibana@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：1C1a01
講演日時：3 月 24 日 09:00～ 1 号館 C1 会場

解糖系とペントースリン酸経路のフラックス比がメバロン酸の生産に及ぼす影響

Effect of flux ratio between glycolytic pathways on mevalonate production

鎌田 健太郎、○戸谷 吉博、清水 浩 (阪大院・情報)
Kentaro KAMATA, ○Yoshihiro TOYA, Hiroshi SHIMIZU (Osaka Univ. IST)

還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH) は、様々な有用物質の生合成において還元力として必要な補酵素であり、NADPH 供給の最適化は代謝工学の課題の 1 つである。本研究で対象とするメバロン酸は、3 分子のアセチル CoA から 2 分子の NADPH を消費して合成され、大腸菌などの微生物による高生産が期待されている化合物である。大腸菌は取り込んだグルコースを解糖系やペントースリン酸経路を経由して異化する。解糖系では 1 分子のグルコースから 2 分子のアセチル CoA が作られる。一方、ペントースリン酸経路は 1 分子のグルコースから 5/3 分子のアセチル CoA と 2 分子の NADPH が作られる。つまり、ペントースリン酸経路は炭素を犠牲にして NADPH を生産する経路である。本研究では、メバロン酸の生産において最適な解糖系とペントースリン酸経路のフラックス比を探るため、このフラックス比を人為的に変えた際に、メバロン酸の収率に及ぼす影響を調べた。

Enterococcus faecalis 由来のメバロン酸経路遺伝子 *mvaE*, *mvaS* を恒常発現した大腸菌メバロン酸生産株を使用した。また、解糖系のホスホグルコースイソメラーゼの発現量をイソプロピル-β-チオガラクトピラノシド (IPTG) 誘導プロモーターで制御するように改変した。培地に添加する IPTG 濃度により、解糖系とペントースリン酸経路のフラックス比を操作し、フラックス比とメバロン酸収率の関係を評価した。

培養の結果、増殖停止期においては、解糖系フラックスが 39.7%においてメバロン酸の収率が最大であり、フラックス比を制御しなかった場合（解糖系フラックスが 70.4%）と比べて、メバロン酸の収率は約 25%増加した。また、解糖系のフラックスが 50%以上になると、副産物である酢酸の収率が増加することを明らかにした。メバロン酸と酢酸はどちらもアセチル CoA を炭素源として合成されるが、メバロン酸の生合成が NADPH を必要とするのに対して、酢酸は NADPH を必要としない。すなわち、ペントースリン酸経路での NADPH の供給量が、アセチル CoA からメバロン酸を作るか酢酸を作るかの運命に影響を与えた。最大のメバロン酸収率を実現したフラックス比は、NADPH の物質収支から計算できる理論値とおよそ一致しており、メバロン酸の生産ではアセチル CoA と NADPH の供給バランスが重要であり、フラックス比のファインチューニングの重要性を示すことができた。

metabolic flux, NADPH, mevalonate

発表責任者：清水浩（shimizu@ist.osaka-u.ac.jp）

講演番号：1C1a02
講演日時：3 月 24 日 09:11～ 1 号館 C1 会場

光照射による大腸菌の中心代謝経路のフラックス制御
Optogenetic Switch for Controlling the Central Metabolic Flux of *Escherichia coli*
○タンダル セバスティアン　トミ[1]、妹尾 幸枝[2]、戸谷 吉博[2]、清水 浩[2]([1]大阪大学、[2]大阪大学大学院情報科学研究科)
○Sebastian Tommi TANDAR[1], Sachie SENOO[2], Yoshihiro TOYA[2], Hiroshi SHIMIZU[2] ([1]Osaka University, [2]Osaka University Graduate School of Information Science and Technology)

光誘導スイッチ（オプトジェネティクスイッチ）は、特定波長の光照射によって誘導可能な遺伝子発現制御系である。化学物質による誘導と異なり、光照射は迅速に ON-OFF の切り替えが可能であることから、オプトジェネティクスイッチは目的遺伝子の発現量の微調整への応用が期待される。本研究では、光照射によって主要な解糖系であるエムデン-マイヤーホフ-パルナス（EMP）経路と酸化的ペントースリン酸経路（oxPP）のフラックス比をコントロールするためのスイッチの構築を目的とした。oxPP 経路は炭素を CO_2 として犠牲にする代わりに還元力 NADPH を獲得する経路であり、生合成に NADPH を必要とする有用化合物の生産性向上には、EMP と oxPP 経路のフラックス比の最適化が有効である。そこで、 EMP と oxPP 経路の分岐の反応を触媒するホスホグルコースイソメラーゼ（Pgi）の発現をオプトジェネティクスイッチにより制御した。

オプトジェネティクスイッチには、シアノバクテリア由来の二成分制御系 CcaS/CcaR を用いた。センサーである CcaS は緑色光照射下でリン酸化、赤色光照射下で脱リン酸化し、リン酸化した CcaS はさらに CcaR をリン酸化する。CcaR は転写因子であり、リン酸化された CcaR は *cpcG2* 遺伝子のプロモーターの発現を促進する。この CcaS/CcaR システムは大腸菌細胞内で機能することが報告されており、蛍光タンパク質を用いた発現制御が実証されている。そこで、まず先行研究に基づいて大腸菌に CcaS/CcaR を導入し、高コピープラスミドにおいて *cpcG2* プロモーター下に *pgi* を挿入した。しかし、OFF 状態（赤色光照射下）においても Pgi の発現量が高かったため、プラスミッドのコピー数を減らしたが、発現の漏れを十分に抑制することができなかった。OFF 状態の Pgi 量を減衰するために ssRA タンパク分解タッグを Pgi の C 末端に付加した。

緑色および赤色光の照射により、EMP と oxPP 経路のフラックス比をコントロールできていることを確認するため、それぞれの条件における代謝フラックス分布を 13C 標識実験により解析した。ON 状態における EMP と oxPP 経路のフラックス比は 69：26 であり、これは野生株に近い値であった。一方、OFF 状態のフラックス比は 38：45 であり、赤色光の照射により EMP 経路のフラックスを抑制し、oxPP 経路のフラックスを増加させることに成功した。

本研究はオプトジェネティクスイッチの中心代謝経路のフラックス制御への応用を示した。さらに、翻訳後レベルで代謝遺伝子の活性を低下させる ssRA 分解タグの有効性も示した。

metabolic flux, *optogenetics* , NADPH

発表責任者：TANDAR Sebastian Tommi（sebastian.tandar@gmail.com）

講演番号：1C1a03
講演日時：3 月 24 日 09:22～ 1 号館 C1 会場

大腸菌の炭素源シフトにおけるオーバーフロー代謝の役割

Roles of acetate overflow metabolism during the carbon source transition in Escherichia coli

○田中 寛[1]、太刀川 智之[2]、丹羽 達也[1]、田口 英樹[1]、斎藤 菜摘[3]、島田 友裕[4] ([1]東工大研究院、[2]東工大生命理工学院、[3]鶴岡高専、[4]明大農)
○ Kan Tanaka[1], Tomoyuki Tachikawa[2], Tatsuya Niwa[1], Hideki Taguchi[1], Natsumi Saito[3], Tomohiro Shimada[4] ([1]Tokyo Tech., IIR, [2]Tokyo Tech., Life Sci. Technol., [3]Tsuruoka Inst. of Technol., [4]Meiji Univ., Agr.)

大腸菌を少量のグルコースとカザミノ酸を含む最小培地でバッチ培養すると、グルコース枯渇以降、アミノ酸や有機酸へと炭素源が順次切り替わっていく。これまでの解析結果は、バクテリアがこの間に幾つかの安定な代謝状態の間を移行しながら増殖を維持していることを示しており、我々はその遷移機構に関して分子遺伝学的な解析を進めている（Shimada & Tanaka, AEM 2016)。従来、この一連の代謝状態の遷移は cAMP/CRP 系を中心とした遺伝子発現調節により説明されてきた。しかし最近私達は、アセチル CoA から酢酸へのオーバーフロー代謝経路（Pta 及び AckA）がグルコース枯渇後の増殖維持に必須であり、それら酵素の欠損株が cAMP 非依存的に強いジオキシー増殖を示すことを見出した。本大会ではその分子機構についての解析結果を発表する。プロテオーム解析の結果、これら欠損株でも cAMP/CRP に依存したタンパク質の発現誘導が正常に起きていること。細胞内のピルビン酸濃度の上昇により、PdhR を介してピルビン酸デヒドロゲナーゼ（PDH）の発現が脱抑制を受け、間接的に 2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ（OGDH）の活性が抑制されていると考えられること。さらに、グルコース枯渇後の OGDH の迅速な活性化がスムースな増殖維持に必須であること等が明らかになった。PDH と OGDH はどちらも巨大な複合体を形成しており、互いによく似た E1、E2 サブユニットと、さらに同一の E3 サブユニットを共有する兄弟酵素である。これら酵素が触媒するのはどちらも 2-ケト酸と CoA からアシル CoA を合成する不可逆反応であり、細胞内の代謝の方向性を決める鍵ステップと言える。今回の発表ではこれら酵素活性の相互作用による代謝制御の可能性について議論したい。グルコース利用時のオーバーフロー代謝の意義はプロテオーム維持に関わるコスト最適化からの説明がなされているが、本研究の結果はオーバーフロー代謝の新しい役割を提案するものと考えられる。

Escherichia coli, overflow metabolism, metabolic state transition

発表責任者：田中　寛（kntanaka@res.titech.ac.jp）

講演番号：1C1a04
講演日時：3 月 24 日 09:33～ 1 号館 C1 会場

新規 L-グルコース資化細菌の単離とその代謝機構の解析

Isolation of novel L-glucose-utilizing bacteria and analysis of its L-glucose catabolic pathway

○谷内田 優史、中村 顕（筑波大 生命環境）
○Masashi YACHIDA, Akira NAKAMURA (University of Tsukuba)

D-グルコースの鏡像異性体である L-グルコースは自然界での存在が報告されておらず、生物によって利用されないと考えられてきた。しかしながら、当研究室では L-グルコース資化細菌として *Paracoccus laeviglucosivorans* を自然界から分離し、その L-グルコース代謝経路を明らかにした。またその際に *Alphaproteobacteria* 綱の異なる属に属する細菌の分離にも成功した。しかしながら、*Alphaproteobacteria* 綱以外の分類に属する L-グルコース資化細菌が存在するかは不明であった。そこで、本研究では *P. laeviglucosivorans* と系統的に離れた L-グルコース資化細菌を環境中より取得し、その代謝経路を明らかにすることを目的とした。

L-グルコースを単一炭素源とした最少培地を用いた集積培養により、各種土壌から 10 株の L-グルコース資化細菌を取得した。そのほとんどは既知の L-グルコース資化細菌が含まれる *Alphaproteobacteria* 綱細菌であったが、1 株のみ門レベルで系統の異なる、*Verrucomicrobia* 門の *Luteolibacter* 属に属すると考えられる LG18 株を取得した。*Verrucomicrobia* 門細菌は土壌等の環境から DNA レベルでは検出されるが、単離の例は少なく、比較的難培養であることが知られている。

LG18 株の無細胞抽出液から、L-グルコースに対する酵素活性として $NADP^+$依存性の L-グルコースデヒドロゲナーゼ(L-GDH)活性のみが検出されたため、同酵素を精製した。L-GDH の反応産物は L-グルコン酸であることを LC-MS により明らかにした。次に、同株の無細胞抽出液から L-グルコン酸に対する酵素活性として NAD^+依存性の L-グルコン酸デヒドロゲナーゼ(L-GnDH)活性を検出したため、同酵素を精製した。L-GnDH の反応産物は 5-ケト-L-グルコン酸であることが TLC により示唆された。これら 2 種の精製酵素の N 末端アミノ酸配列を決定し、同株のドラフトゲノム配列と照合したところ、両酵素をコードする遺伝子は、4 つの糖代謝関連遺伝子とともにクラスターを形成していることが明らかになった。このクラスターに含まれる遺伝子がコードするタンパク質は、*P. laeviglucosivorans* の L-グルコース代謝経路を担う酵素と同一の機能を有することが推測された。このことは、系統的に大きく離れた LG18 株と *P. laeviglucosivorans* が同一の代謝経路で L-グルコースを代謝することを示唆しており、L-グルコース代謝経路は細菌間で広く保存されている可能性が考えられる。また、L-GDH と L-GnDH はそれぞれ L-ガラクトース、L-ガラクトン酸に対して高い活性を示したことから、LG18 株の L-グルコース代謝経路は本来 L-ガラクトースを代謝するためのものであることが考えられる。

L-glucose, rare sugar, *Luteolibacter*

講演番号：1C1a05
講演日時：3 月 24 日 09:44～ 1 号館 C1 会場

放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2) M145 株における低分子化合物の生理学的意義
A role of low molecular mass thiol in *Streptomyces coelicolor* A3(2) M145
○澁井 佑生子、佐藤 眸、小川 翔太、伊藤 晋作、矢嶋 俊介、佐々木 康幸（東農大バイオ）
○Yukiko SHIBUI, Hitomi SATO, Shota OGAWA, Shinsaku ITO, Syunsuke YAJIMA, Yasuyuki SASAKI (Tokyo Univ. of Agric.)

［目的］放線菌は、土壌中に生息するグラム陽性菌であり、複雑な形態分化と多種多様な二次代謝産物生産が特徴である。我々の研究チームは、放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2) M145 株において硝酸、亜硝酸、NO と順次生産し、再び硝酸に戻す窒素酸化物循環経路を見出した。本経路によって生産される NO は胞子形成と抗生物質 Actinorhodin (ACT), Undecylprodigiosin (RED)の生産シグナル分子として働く。しかし、NO は反応性が高く、細胞内で過剰量蓄積されると DNA 障害や細胞障害などを引き起こす。従って、細胞内 NO 量は厳重に制御されなければならない。

放線菌が生産する低分子チオール化合物であるミコチオール (MSH)とエルゴチオネイン (EGT)は NO を始めとする活性酸素種と高い反応性を有し、抗酸化作用を持つことが報告されている。一般的に NO はチオール基とニトロソ体を形成する。本研究は、窒素酸化物循環経路で生産される NO と低分子チオール化合物の関係性を明らかにすることを目的とした。

［方法・結果］qPCR により、M145、MSH 生合成系欠損株（Δ*mshC*）、EGT 生合成系欠損株（Δ*egtA*）の細胞内 NO 量に依存的に発現する遺伝子発現量の定量を行った。Δ*mshC* 株は M145 と異なる発現挙動だったため、NO シグナリングへの影響の有無を検証した。その結果、Δ*mshC* 株では胞子形成能、抗生物質生産能に異常が見られた。また、生体内のニトロソチオールを定量した結果、Δ*mshC* 株で検出されたニトロソ化合物量は、M145 に比べ少なかった。よって、MSH は NO と MSNO を形成することで細胞内 NO の恒常性維持を行うことが示唆された。加えて、正常な胞子形成と抗生物質生産を行うのに重要な化合物であることが明らかになった。

M145 株のニトロソ化合物量は、NO と MSH の細胞内挙動に伴って増加し、培養後期で顕著に減少した。この結果から、MSNO を代謝する機構の存在が考えられる。我々は、一次構造の検証により MSNO 還元酵素であることが示唆された機能未知タンパク質の欠損株を作製し、表現型の検証などを行った。MSNO 還元酵素の研究は MSH による NO 恒常性維持機構の更なる解明に繋がると考える。

Streptomyces, nitric oxide, homeostasis

講演番号：1C1a07
講演日時：3 月 24 日 10:16～ 1 号館 C1 会場

電極を電子受容体とした微生物アンモニア酸化反応の検討と機構解析

Novel microbial ammonium oxidation coupled to electron transport to the electrode

○齋藤 淳貴[1]、橋本 和仁[2]、岡本 章玄[3] ([1]東大工、[2]物材研、[3]センサ・アクチュエータ研究開発センター、物材研)
○Junki SAITO[1], Kazuhito HASHIMOTO[2], Akihiro OKAMOTO[3] ([1]Univ. of Tokyo, [2]NIMS, [3]Center for Functional Sensor & Actuator, NIMS)

【背景】微生物によるアンモニア酸化は、廃水処理や地球上の窒素循環において重要な役割を担っており、その反応経路として、それぞれ酸素、亜硝酸を電子受容体とする硝化、アナモックス反応が知られている。一方、自然界の土壌では Fe(III)の還元と共役したアンモニア酸化が進行しており、微生物活動の関与が報告されているが [1]、その機構は未知である。細胞内に取り込めない固体の Fe(III)が利用されていることから、外膜酸化還元蛋白質を介して細胞外物質に直接電子を受け渡す細胞外電子移動(Extracellular Electron Transport, EET)を行う微生物が反応に関与している可能性が考えられる。そこで本研究では、細胞外電子移動と共役した微生物アンモニア酸化の可能性の検討、及び反応生成物の特定と関与する遺伝子の探索を行った。

【方法】*Shewanella oneidensis* MR-1 を LB 培地で培養した後、電子供与体を含まない培地で 4 時間好気振とう培養して有機物由来の細胞内還元力を消費させた。電子供与体を NH_4Cl に限定した嫌気 3 電極系を反応器とし、作用極(ガラス基板 ITO 薄膜電極)に 0.4 V(vs. 標準水素電極)を印加した状態で *S.oneidensis* MR-1 を導入して、電極への電子移動を電流値として測定した。

【結果・考察】*S.oneidensis* MR-1 を反応器へ導入すると、NH_4Cl を含む系で電流値の上昇が観測されたのに対し、NH_4Cl を含まない系では観測されなかった(図 1)。これは、*S.oneidensis* MR-1 がアンモニウムイオン(NH_4^+)を酸化し、得た電子を細胞外の電極へ受け渡している事を示唆している。さらに、高分解能二次イオン質量分析(NanoSIMS)を用いてこの菌体を測定した結果、電極が存在する場合のみ顕著なアンモニア態窒素の同化反応が見られた。また、NO と反応して蛍光物質を作る細胞膜透過性試薬 DAF-2 DA を加えると [2]、菌体からの蛍光が確認された。以上の結果は、*S.oneidensis* MR-1 によるアンモニア酸化によって NO が生成することを強く示唆している。*S.oneidensis* MR-1 は既知のアンモニア酸化代謝経路を持たないため、この反応は未知の反応経路によって媒介されていると考えられる。当日は、亜硝酸還元酵素(*NrfA*)の欠損株を用いた実験結果についても詳細に議論する。

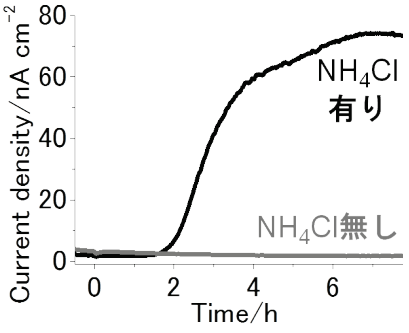


図 1. *S.oneidensis* MR-1 による NH_4^+ を電子供与体とした電流生成の時間変化

1. S. Huang *et al.*, *PLoS ONE* **13(4)**, e0194007 (2018)
2. T. Nagano, *Luminescence* **14**, 283-290 (1999)

Shewanella oneidensis MR-1, extracellular electron transport, bioelectrochemical system

発表責任者：岡本章玄（okamoto.akihiro@nims.go.jp）

講演番号：1C1a08
講演日時：3 月 24 日 10:27～ 1 号館 C1 会場

Electrochemical Techniques for Investigating the Isolation and Characterization of Human Gut Bacteria Capable of Extracellular Electron Transport

○ Waheed MIRAN[1], Divya NARADASU[1,2], Akihiro OKAMOTO[1,3] ([1]International Center for Materials Nanoarchitectonics (WPI-MANA), National Institute for Materials Science (NIMS), 1-1 Namiki, Tsukuba, Ibaraki 305-0044, Japan, [2]Department of Advanced Interdisciplinary Studies, Rcast, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 4-6-1 Komaba, Meguro-ku, Tokyo 153-8904 Japan, [3]Center for Functional Sensor & Actuator, National Institute for Materials Science (NIMS), Tsukuba, Ibaraki, Japan)

Extracellular electron transfer (EET) is a ubiquitous strategy for microbial anaerobic respiration, and is mainly responsible for global biogeochemical cycling of metals. The mechanisms of outward EET are well understood for two model systems, Shewanella and Geobacter, both of which employ multiheme cytochromes to provide an electron pathway to the cell exterior in anoxic natural environments. However, as for the human microbiome which significantly impacts our h ealth, the role and importance of EET has not been widely investigated. In this study, we enriched and isolated the EET-capable bacteria from human gut microbes using an electrochemical enrichment method and characterized the metabolism that couples with EET. Upon the use of energy-rich or minimum media (with acetate or lactate) for electrochemical enrichment with the human gut sample at an electrode potential of +0.4 V vs SHE, both culture conditions showed significant current production (Fig. 1). However, EET-capable pure strains were enriched specifically with minimum media, and subsequent incubation using a δ-MnO2-agar plate with lactate or acetate led to the isolation of two EET-capable microbial strains, Gut-S1 and Gut-S2, having 99.9% of 16S rRNA gene sequence identity with *Enterococcus avium* (*E. avium*) and *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), respectively. While the enrichment involved anaerobic respiration with acetate and lactate, further electrochemistry with *E. avium* and *K. pneumoniae* revealed that the glucose fermentation was also coupled with EET. These results indicate that EET couples not only with anaerobic respiration as found in environmental bacteria, but also with fermentation in the human gut.

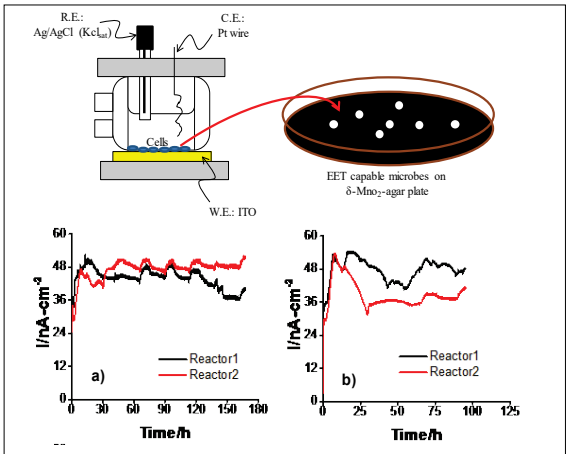


Figure 1. Schematic of enrichment of gut microbes by electrochemical enrichment followed by δ-MnO$_2$-agar plate isolation and electrochemical activity of gut microbes during enrichment phase a) first cycle and b) second cycle (exchange of medium) with minimum medium. Reactor 1 and Reactor 2 were operated with acetate and lactate as electron donor, respectively.

Electromicrobiology, Extracellular electron transfer, Gut microbes

発表責任者：Akihiro OKAMOTO（OKAMOTO.Akihiro@nims.go.jp）

講演番号：1C1a09
講演日時：3 月 24 日 10:38～ 1 号館 C1 会場

Enhancement of synergetic current generation with conductive iron sulphide nanoclusters biomineralized by the Sulphate reducing bacteria (SRB)

○Muralidharan MURUGAN[1,2], Akihiro OKAMOTO[1,2,3] ([1]International Center for Materials Nanoarchitectonics (WPI-MANA), National Institute for Materials Science (NIMS), 1-1 Namiki, Tsukuba, Ibaraki 305-0044, Japan, [2]Graduate School of Chemical Sciences and Engineering, Hokkaido University, Sapporo 060-8628, Japan, [3]Center for Functional Sensor & Actuator, National Institute for Materials Science (NIMS), Tsukuba, Ibaraki, Japan)

Iron sulphide minerals, an important mineral involved in the global biogeochemical sulphur cycle, is a ubiquitously occurring mineral existing in various metastable phases (FeS_x). The tetragonal forms of iron monosulphides show metallic like conductivity that enable them to function as long-range electron conductors adjoining various redox environments. Iron sulphide nanoclusters biosynthesized by the action of dissimilatory sulphate reducing bacteria (SRB) has already been shown to improve the electron transfer rate to the electrodes. Recent studies with the electrogenic iron reducing bacterium (IRB) *Shewanella oneidensis MR-1* also reported that the presence of FeS facilitated anaerobic bacterial respiration which are coupled with electron transport process to external solids, the so-called extracellular electron transport (EET) and its presence drastically improved the anodic current production. However, it has been unclear how these metallic nanoparticles influence the current generation by these electrogenic microbes. In this work, we investigated the influence of FeS nanoclusters for the synergetic anodic current generation by SRB and IRB cocultures which function as FeS nanoclusters and current producers respectively. We performed electrochemical measurements to study the current generation with *Desulfovibrio vulgaris,* as SRB and *S. oneidensis MR-1* as IRB in a three-electrode electrochemical reactor with indium tin-doped oxide electrode as working electrode poised at 200 mV vs Ag/AgCl KCl sat. Our observation showed that the biomineralization of FeS nanoclusters promoted the synergetic enhancement of current generation. Electrochemical gating measurements with the interdigitated array electrodes showed a redox gradient driven long-range electron conduction in the system in the presence of FeS nanoclusters, suggesting the synergetic effect is related with the long-range electron conduction. In order to understand the interaction between SRB and IRB, we examined the impact of the electron donor, lactate, concentration on synergetic current production and also the impact of IRB on FeS production by characterizing the biomineralized FeS particles. We will discuss about the potential mechanism for synergetic current production in the coculture system.

Microbial fuel cell, Synergetic current generation, In-vivo electrochemistry

発表責任者：Akihiro OKAMOTO（OKAMOTO.Akihiro@nims.go.jp）

講演番号：1C1a10
講演日時：3 月 24 日 10:49～ 1 号館 C1 会場

ユーグレナ油脂生産における硫黄に関する副次的反応の解明
Characterization of sulfur-compound metabolism underlying wax-ester fermentation in *Euglena gracilis*

○山田 康嗣[1,2]、新多 智明[1]、阿閉 耕平[1,2]、城山 真恵加[3]、井上 小槙[4]、樋口 千恵子[1]、新田 伸子[1]、大城 聡[5]、持田 恵一[2,4,6,7]、岩田 修[1,2]、大津 巌[1,3]、鈴木 健吾[1,2] ([1]ユーグレナ、[2]理研 BTZ、[3]筑大、[4]理研 CSRS、[5]沖縄工専、[6]横市大、[7]岡大)
○Koji YAMADA[1,2], Tomoaki NITTA[1], Kohei ATSUJI[1,2], Maeka SHIROYAMA[3], Komaki INOUE[4], Chieko HIGUCHI[1], Nobuko NITTA[1], Satoshi OSHIRO[5], Keiichi MOCHIDA[2,4,6,7], Osamu IWATA[1,2], Iwao OHTSU[1,3], Kengo SUZUKI[1,2] ([1]euglena, [2]Riken BTZ, [3]Tsukuba Univ., [4]Riken CSRS, [5]Okinawa Coll., [6]Yokohama City Univ., [7]Okayama Univ.)

ユーグレナは、淡水の湖沼、田んぼなどに生息するミドリムシという和名でもお馴染みの単細胞生物である。50 種類以上が知られるユーグレナのうち、ユーグレナグラシリス（*Euglena gracilis*）は 50 年以上も前からモデル生物として使われており、その豊富な栄養素、及び細胞内に蓄積するβグルカンであるパラミロンの機能性から食品素材としての利用も検討されてきた。ユーグレナは独特な代謝経路を持っており、周囲に酸素がない条件において細胞内にワックスエステルを合成し油脂として蓄積することが知られ、この現象はワックスエステル発酵と呼ばれている。ワックスエステル発酵では、細胞内に蓄積したパラミロンを分解してエネルギーを獲得し、その反応において生成したピルビン酸をもとにして、最終的にワックスエステルが生成することが明らかになっている。このワックスエステルは、構成する脂肪酸の鎖長からバイオ燃料の原料として適しているとされ、ユーグレナはバイオ燃料生産にも利用が検討されている。

ユーグレナがワックスエステル発酵する条件下においては、同時に硫黄化合物の臭いがミドリムシから発生することが経験的に知られている。この臭いの発生は既知のワックスエステル発酵の反応系からは説明がされない現象であり、これまで深く追及されたことはなかった。本研究では、サルファーインデックス解析（硫黄のメタボロミクス）を行うことにより、この臭い発生の原因について明らかにすることを試みた。その結果、ワックスエステル発酵時の培養液上清において、硫化水素が含まれていることが確認され、これがワックスエステル発酵における臭い発生の原因であることがわかった。さらに、細胞内に含まれる硫黄化合物量の変化を調べることで、ワックスエステルの生産に対応して、細胞内のシステインやメチオニンなどの含硫アミノ酸が増えていることが明らかとなり、同時にグルタチオンやタンパク質などの硫黄を含む化合物が減少していることがわかった。これらのことから、グルタチオンやタンパク質が分解されて、システインやメチオニンなどの含硫アミノ酸が増えるという変化が細胞内で起こり、この含硫アミノ酸をエネルギー獲得のために分解した際に硫化水素が発生するという仕組みが新たに示唆された。

本研究では、ユーグレナのワックスエステル発酵にともなって起こる硫黄化合物に関係する副次的反応を明らかにした。これを知ることにより、ユーグレナを用いたワックスエステル生産における臭いの発生を抑制する技術の開発が可能となり、大規模にバイオ燃料生産する際の環境への臭い放出を予防するとともに、残渣の利用価値を高めることに役立つと期待される。

Euglena graciclis, wax ester, sulfur metabolomics

発表責任者：山田康嗣（yamada@euglena.jp）

講演番号：1C1a11
講演日時：3 月 24 日 11:10～ 1 号館 C1 会場

Aspergillus niger 菌糸を利用したシアン非感受性呼吸系阻害剤の探索
Search for inhibitors toward cyanide-insensitive respiration by use of *Aspergillus niger* mycelia
○松浦 貴大、吉岡 育哲、桐村 光太郎（早大・先進理工・応化）
○Takahiro MATSUURA, Isato YOSHIOKA, Kohtaro KIRIMURA (Dept. Appl. Chem., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

【目的】
真核生物の中には、チトクロム鎖とは別の呼吸系を有するものが存在する。alternative oxidase (EC 1.10.3.11；以下 AOX)は、ミトコンドリア内膜に存在する電子伝達系末端酵素で、ユビキノールから電子を直接酸素に伝達し呼吸鎖複合体 III、IV のバイパス経路であるシアン非感受性呼吸系を構成している。AOX は、シアン化合物やアンチマイシン A ではなく salicylhydroxamic acid (SHAM) によって阻害される。アフリカ睡眠病の病原体 (原生生物)である *Tryapanosoma brucei* では宿主の血液中で AOX を用いたエネルギー代謝を行うことが知られている。一方、ヒトをはじめとする哺乳類には AOX が存在しないため、AOX は *T. brucei* など病原体の化学療法の標的となりうる可能性が示唆されている。本研究では、演者らは安全性の高い真菌を利用した AOX 阻害剤の簡便な評価系を構築した。
【方法および結果】
クエン酸生産糸状菌 *Aspergillus niger* WU-2223L では AOX をコードする遺伝子 *aoxA* が同定されており[1]、クエン酸生産条件下の菌糸で *aoxA* が顕著に発現している[2]。しかし、*A. niger* の AOX を阻害する化合物としては SHAM 以外に報告例がなかった。そこで、既にヒトに有害である寄生虫などの AOX を阻害すると報告されている 8-hydroxyquinoline (8-HQ)と n-propyl gallate (n-PG)の *A. niger* 菌糸における AOX への影響を検証した。AOX の活性は、クラーク型酸素電極を用いてシアン非感受性呼吸系による 1 分間の酸素消費速度として測定した。1 mM 8-HQ と 1 mM n-PG は *A. niger* のシアン非感受性呼吸系をそれぞれ 56.8%、50.8% 阻害したが、1 mM SHAM の阻害率 (100%)より低かった。一方、各阻害剤の細胞膜透過性の増大を目的として、界面活性剤である Tween 80 のアッセイ系への添加を検討し、4% (v/v) を最適濃度と決定した。4% (v/v) Tween 80 添加条件では 1 mM 8-HQ と 1 mM n-PG の AOX の阻害率はそれぞれ 85.0%、90.7%に増大した。また、8-HQ と n-PG が AOX を特異的に阻害していることを示すためにこれらの化合物の *aoxA* 破壊株 *A. niger* DAOX-1 への影響を検証し、DAOX-1 株の呼吸系への影響は数%であることを確認した。以上より、SHAM とともに 8-HQ と n-PG は *A. niger* AOX の特異的な阻害剤であることを明らかにした。
[1] K. Kirimura, *et al*., Curr. Genet., **34**, 472-477 (1999).
[2] K. Kirimura, *et al*., J. Biosci. Bioeng., **102**, 210-214 (2006).

alternative oxidase, *Aspergillus niger*, cyanide-insensitive respiration

発表責任者：桐村光太郎（kkohtaro@waseda.jp）

講演番号：1C1a12
講演日時：3 月 24 日 11:21～ 1 号館 C1 会場

コリネ型細菌における RNase III の発現制御解析

Regulation of RNase III expression in Corynebacterium glutamicum

○澤 誠人[1,2]、田中 裕也[2]、乾 将行[1,2] ([1]奈良先端大・バイオ、[2]RITE)
○Masato SAWA[1,2], Yuya TANAKA[2], Masayuki INUI[1,2] ([1]NAIST, [2]RITE)

【目的】我々は、有用工業微生物 *Corynebacterium glutamicum* における遺伝子発現制御の研究を行っており、特に転写後制御に注目して解析を進めている。転写後制御を行う酵素の一つが Ribonuclease（RNase）である。RNase は mRNA の分解、オリゴヌクレオチドのリサイクル、ノンコーディング RNA の成熟等に関与している。RNase の一種である RNase III は原核生物だけでなく真核生物にも広く保存されており、二本鎖 RNA を特異的に分解する。多くの細菌で RNase III は rRNA、tRNA、ノンコーディング RNA の成熟に関与し、遺伝子発現制御にも関与することが知られている。*C. glutamicum* では RNase III をコードする遺伝子 *rnc* の周辺には *rnc* の上流に核酸結合タンパク質をコードする *cgR_1960* が存在し、下流には formamidopyrimidine-DNA glycosylase をコードする *cgR_1958* が存在する。これらの遺伝子のコード領域は一部重複しており、オペロン構造を構成しているのではないかと推察された。*rnc* 周辺の遺伝子クラスターには細胞分裂開始タンパク質をコードする *cgR_1961*、Co/ Zn/ Cd 輸送体と推定される *cgR_1957*、プロテアーゼをコードする *cgR_1956* が存在する。本研究では *rnc* 遺伝子、および周辺遺伝子がどのように発現制御されているか解析を行った。
【方法と結果】*rnc* 周辺の遺伝子クラスターがオペロンを構成しているかを解析するため、*C. glutamicum* の培養液から RNA を回収し、RT-PCR 解析を行った。その結果、*rnc* 周辺の遺伝子 *cgR_1958* と *cgR_1960* を含む cDNA の増幅が観測された。このことから、*rnc* 周辺の遺伝子クラスターはオペロンを構成していることが判明した。*C. glutamicum* の RNase III は RNase E/G や RNase J により *rnc* mRNA が切断され発現量を制御されている。RNase E/G や RNase J が *rnc* 周辺の遺伝子クラスターについても制御しているのか mRNA 量について qRT-PCR により解析した。その結果、野生株と比較し RNase J 破壊株で *cgR_1956* の発現量が約 6.8 倍増加したが、*cgR_1956* 以外の遺伝子はあまり変化が見られなかった。以上の結果から、RNase J は *rnc* オペロンの制御に関わるが、オペロン内の遺伝子ごとに影響の程度が異なることが示唆された。

C. glutamicum, RNase III, operon

発表責任者：乾　将行（inui@rite.or.jp）

講演番号：1C1a13
講演日時：3 月 24 日 11:32～ 1 号館 C1 会場

コリネ型細菌における転写因子 AnsR によるアスパラギン代謝オペロンの発現制御機構の解析

Analysis of transcriptional regulation mechanism of asparagine catabolic operon in *Corynebacterium glutamicum*

○菅谷 理貴[1,2]、豊田 晃一[2]、須田 雅子[2]、平賀 和三[2]、乾 将行[1,2]([1]奈良先端大・バイオ、[2]RITE)
○Riki SUGAYA[1,2], Koichi TOYODA[2], Masako SUDA[2], Kazumi HIRAGA[2], Masayuki INUI[1,2]
([1]NAIST, [2]RITE)

【目的】コリネ型細菌 *Corynebacterium glutamicum* はグルタミン酸生産菌として単離され、各種アミノ酸生産の宿主として広く用いられている。当研究室ではコリネ型細菌のアミノ酸高生産株の創製を目指した基盤情報を得ることを目的として代謝経路の解析を行っている。アスパラギン酸より派生する L-リジン、L-メチオニンなどは産業的に有用なアミノ酸であり、高生産を目指した研究が行われている。*C. glutamicum* のゲノム上にはアスパラギン酸生合成に関与する遺伝子として、オキサロ酢酸にグルタミン酸のアミノ基を転移してアスパラギン酸を生成するアスパラギン酸トランスアミナーゼ遺伝子（*aspB*、cgR_0312）、フマル酸とアンモニウムイオンからアスパラギン酸を生成するアスパルターゼ遺伝子（*aspA*、cgR_1563）が存在する。当研究室が取得した R 株のゲノム上にはさらにアスパラギンの脱アミノ化によりアスパラギン酸を生成するアスパラギナーゼ（*ansA2*、cgR_2808）がコードされている。本遺伝子はアスパルターゼをコードする *aspA2*（cgR_2809）、パーミアーゼをコードする *ansP*（cgR_2810）と共にオペロンを形成しており、アスパラギンの添加によって発現が誘導される。本研究ではこのオペロンの発現制御機構の解明を目的としてオペロン先頭にコードされている GntR ファミリーに属する転写因子 AnsR の機能解析を行った。

【方法と結果】*ansR*（cgR_2807）破壊株におけるオペロン構成遺伝子の発現を定量 RT-PCR を用いて解析した。破壊株においてオペロン構成遺伝子は、L-アスパラギンの添加なしで野生株における L-アスパラギン添加時（発現誘導条件）と同程度の発現量を示したことから、AnsR はオペロンの転写抑制因子であることが示された。AnsR による制御が直接的なものかを調べるためにゲルシフトアッセイを行った。プロモーター領域を含む DNA 断片への結合が見られたことから AnsR は RNA ポリメラーゼホロ酵素の結合を阻害し、オペロンの転写を抑制していることが示唆された。加えて、L-アスパラギンをエフェクターとして添加する実験ではバンドシフトが生じないことから、L-アスパラギン存在下において AnsR がプロモーター領域から解離することで、オペロンが脱抑制されることが示唆された。更に詳細な制御機構及び結合配列を明らかにするために、DNase I footprinting を用いた解析を進めている。

Corynebacterium glutamicum, transcriptional regulation, asparagine metabolism

講演番号：1C1a14
講演日時：3 月 24 日 11:43～ 1 号館 C1 会場

コリネ型細菌における CRISPR - Cas9 システムを使った物質生産株構築のためのゲノム編集法の開発

Development of a CRISPR-Cas9-based genome engineering tool to construct strains of *Corynebacterium glutamicum* for producing valuable compounds

○小澤 輝[1]、久保田 健[2]、須田 雅子[2]、乾 将行[1,2]([1]奈良先端科学技術大学院大学、[2]RITE)
○Hikaru OZAWA[1], Takeshi KUBOTA[2], Masoka SUDA[2], Masayuki INUI[1,2] ([1]NAIST, [2]RITE)

【目的】*Corynebacterium glutamicum* は飼料添加物、栄養補助食品、化粧品、調味料、医薬品の工業生産に用いられる重要な微生物であり、クリーンな物質生産が求められる今 *C. glutamicum* を使った製品の市場規模は年々拡大している。*C. glutamicum* による物質生産効率を上げるためのゲノム編集手段としては主に二回相同組換え法が用いられる。しかしこの方法では複数の組換え操作を必要とするため、手間と時間がかかる。様々な物質の生産株を速やかに構築するためにもさらに効率の良いゲノム編集技術を開発することが重要である。そこで本研究では *C. glutamicum* に適用可能な CRISPR-Cas9 システムを開発し、従来法より編集にかかる期間を短縮することを目指した。
【方法と結果】*Escherichia coli* では 2 種のプラスミドを利用した CRISPR-Cas9 システムが確立済みである。この方法では *cas9* 遺伝子を組み込んだプラスミド(pCas)と、sgRNA と donor DNA を組み込んだプラスミド(pTargetF)を用い、両プラスミドで *E. coli* を形質転換することでゲノム編集を行う。ゲノム編集後、pTargetF のみを脱落させ別の遺伝子の編集用 pTargetF で再度形質転換することにより、短いスパンで連続してゲノム編集が可能となる。この手法を *C. glutamicum* へ応用する検討を行った。まず、pCas に *C. glutamicum* の温度感受性複製起点を追加したプラスミド(pCasC)を構築した。この温度感受性プラスミドは 28℃で維持、37℃で脱落可能である。また、pTargetF に *C. glutamicum* の複製起点を追加したプラスミド(pTargetFC)を構築しゲノム編集実験を行った。今回はモデルケースとして乳酸脱水素酵素をコードする *ldhA*（*cgR_2812*)を標的とした遺伝子破壊を試みた。その結果 16 コロニー中 1 コロニーおいてゲノム編集に成功した。しかし、2 つのプラスミドでの形質転換後の生育が悪く、コロニーが得られるまで 4 日を要した。温度感受性プラスミドを維持するため培養温度を通常よりも低くしたこと、もしくは 2 つのプラスミドの共存が *C. glutamicum* にとってストレスとなったことが原因だと考えられる。これを解消する為、*cas9* 遺伝子をゲノムに挿入する方法を検討した。これにより至適温度で培養可能となりかつ形質転換するプラスミドを pTargetFC の 1 つに減らすことができた。この方法では現在のところゲノム編集は成功していない。ゲノムへの *cas9* 遺伝子の挿入により、プラスミド上で発現させた場合よりも発現量が下がったことが原因だと考えられる。今後 real time PCR やウエスタンブロッティングにより Cas9 の発現量を確認し、同時にプロモーターの変更等により発現量を増加させることを検討する。

Corynebacterium glutamicum, CRISPR-Cas9, genome engineering

発表責任者：乾　将行（inui@rite.or.jp）

講演番号：1C1a15
講演日時：3 月 24 日 11:54～ 1 号館 C1 会場

スピルリナ（*Arthrospira platensis*)での 15N 部分置換状態におけるタンパク質ターンオーバーの数理モデリング
Mathematical modelling of protein turnover in Spirulina by monitoring partially 15N-labeled phycobiliproteins
川端 優裕、○上林 将大、小南 友里、渡邊 壮一、潮 秀樹（東大院農）
Masahiro KAWAHATA, ○Shota KAMIBAYASHI, Yuri KOMINAMI, Soichi WATANABE, Hideki USHIO (The Univ. of Tokyo)

一般に、タンパク質のターンオーバー解析を行う場合、15N アミノ酸による全置換を行うが、魚類や肉食動物のようにタンパク質を生命維持のエネルギーに用いる種では 15N への完全な置換は著しく困難である。そこで本研究では、数理モデルを用いて 15N 部分置換タンパク質ターンオーバー解析手法の確立を目指した。

スピルリナ *A. platensis* は単細胞生物で非窒素固定型のシアノバクテリアである。また、全ゲノム解析が行われており、豊富なタンパク質データベースをもつことから、タンパク質ターンオーバー解析のモデル生物として適している。スピルリナ内で構成タンパク質の大部分を占めるフィコシアニンに注目し、その吸収波長に基づいて OD620nm による成長評価を行った。$Na^{15}NO_3$/SOT 培地を用いた標識培地および $Na^{14}NO_3$/SOT 非標識培地を用い、非標識培地から標識培地に移した標識導入区と、標識培地から非標識培地に移した標識流出区とした。その結果、非標識培地から標識培地に移したスピルリナは 1 週間で約 3.4 倍に増殖し、LC-MS/MS による解析から得られたフィコシアニンの実測の 15N 置換率はα鎖で 89%、β鎖で 85%であった。それに対して OD620nm の結果からタンパク質新生だけが行われていたと仮定した場合のタンパク質新規合成理論値は 70%であった。次に、標識培地から非標識培地に移した試験区ではスピルリナは 1 週間で約 4.1 倍に増加し、15N 置換率はフィコシアニンβ鎖で 27%、その他のタンパク質で 47%～39%であり、タンパク質分解理論値は 24%であった。2 つの試験区では理論値と実測値に差が生じていることから、シアノバクテリアは 15N を選択的に取り込み、さらに蓄積しやすい傾向があると考えられた。また、アミノ酸ターンオーバー解析ではバリンやアラニンなどアミノ酸は置換されにくいことやアスパラギンが他のアミノ酸と比較して体タンパク質として再利用される可能性が示唆された。15N 部分置換状態でも、LC-MS/MS によるタンパク質/アミノ酸質量解析の結果をもとに、アミノ酸置換率およびそれに基づいたタンパク質合成および分解を数理モデル的に表現することができた。

本研究によって、タンパク質レベルおよびアミノ酸レベルで 15N 部分置換タンパク質ターンオーバー解析手法を確立することができた。

Spirulina *Arthrospira platensis*, protein turnover, mathematical model

発表責任者：潮 秀樹（aushio@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：1C1p01
講演日時：3 月 24 日 13:50～ 1 号館 C1 会場

Aspergillus niger E-1 株のペレット形態に与えるクオラムセンシング分子の影響解析
Effects of quorum sensing molecules on pellets of *Aspergillus niger* E-1
○小原 賢[1]、村上 周一郎[2] ([1]明治大院農、[2]明治大農)
○Ken OBARA[1], Shuichiro MURAKAMI[2] ([1]Gaduate School of Agric., Meiji Univ., [2]School of Agric., Meiji Univ.)

【背景・目的】
Aspergillus niger は、glucoamylase のように産業的に利用されている糖質分解酵素の生産に用いられている糸状菌である。酵素生産のために糸状菌を液体培地で培養した場合、液体培地中で形成されるペレット（菌糸体の塊）の形態が多様に変化し、酵素の生産性に影響を与えることが知られているが、形態変化のメカニズムについては未だ明らかにされていない。また、ペレットサイズが培養開始時の分生子接種量に対して逆相関的に小さくなることが知られている。そこで本研究では、本菌の形態変化に真菌のクオラムセンシング分子（QSM）が関与しているのかを検討した。
【方法・結果】
まず、xylan を唯一炭素源とした液体培地に当研究室で分離した *A. niger* E-1 株の分生子を、2×10^5 spores/mL および 2×10^3 spores/mL となるように調整して接種・培養（1 段階培養）した後、増殖した菌体を除いて得られた培養上清に 2×10^3 spores/mL となるように分生子懸濁液を再度接種して培養（2 段階培養）し、菌糸体の形態を観察した。その結果、1 段階培養で分生子を 2×10^5 spores/mL 接種して得た培養上清を 2 段階培養に用いた場合、fresh な培地で培養した場合と比較して、そのペレットサイズは極端に減少した。一方、1 段階培養で分生子を 2×10^3 spores/mL 接種した場合には、fresh な培地で培養した場合とペレットサイズに差異は認められなかった。また、1 段階培養で分生子を 2×10^5 spores/mL 接種して得られた培養上清を C18 疎水カラムに供して得られた素通りした画分を 2 段階培養に用いた場合、fresh な培地で培養した場合と比較して、ペレットサイズは増加した。以上の結果から、分生子の接種量に依存して培養液中に何らかの物質が生産・蓄積され、その物質が E-1 株の形態に影響を与えていることが明らかとなった。
次に、真菌の QSM として知られている物質の本菌の形態に与える影響を調べた。その結果、tyrosol、tryptophol、および isoamyl alcohol を添加して培養した場合、無添加の場合と比較してペレットサイズについて差異は認められなかったが、farnesol を 100 μM で添加した場合、ペレットサイズが有意に減少することを見出した。以上の結果は、E-1 株のペレットサイズは、QSM によって影響を受けることを示している。しかし、farnesol の影響を受けたペレットの性状は、高濃度で分生子を接種した場合に形成された小さな不定形のペレットとは異なりきれいな球状を形成したことから、本菌株が生産している QSM は、farnesol とは異なることが示唆された。

Aspergillus niger, Quorum sensing, Farnesol

発表責任者：村上周一郎（smura@meiji.ac.jp）

講演番号：1C1p02
講演日時：3 月 24 日 14:01～ 1 号館 C1 会場

モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* の GPI アンカー型α-アミラーゼ AgtA による細胞壁多糖α-1,3-グルカンの分子量制御

Regulation of molecular mass of cell wall α-1,3-glucan by GPI-anchored α-amylase AgtA in the model filamentous fungus *Aspergillus nidulans*.

山下 雄章[2]、宮澤 拳[2]、○吉見 啓[1]、小泉 亜未[2]、矢野 成和[3]、佐野 元昭[4]、阿部 敬悦[1,2] ([1]東北大・未来研、[2]東北大院・農、[3]山形大院・工、[4]金沢工大・ゲノム研)
Takaaki Yamashita[2], Ken Miyazawa[2], ○Akira Yoshimi[1], Ami Koizumi[2], Shigekazu Yano[3], Motoaki Sano[4], Keietsu Abe[1,2] ([1]NICHe, Tohoku Univ., [2]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., [3]Grad. Sch. Eng., Yamagata Univ., [4]Genome Biotechnol. Lab., Kanazawa Inst. Tech.)

[研究背景] α-1,3-グルカン(AG)は糸状菌における主要な細胞壁構成多糖の一つである。モデル糸状菌 *A. nidulans* には 2 種の AG 合成酵素(AGS)遺伝子(*agsA, agsB*)が存在する。我々は以前、通常の生育状態では主に AgsB が AG の生合成に寄与することを明らかにした[1)]。また、AG を欠損した株の菌糸が液体培地中に均一分散したことから、AG は菌糸の接着因子として機能することも明らかになっている[1)]。次に、AGS 遺伝子高発現株(*agsA*^{OE}株および *agsB*^{OE}株)を作製し、液体振盪培養における培養性状を観察したところ、*agsB*^{OE}株では野生株と類似した緊密な菌糸の塊(菌糸塊)を形成したのに対し、*agsA*^{OE}株では密度の低い菌糸塊を形成した。この表現型の違いをもたらす要因を検証したところ、AgsA が合成する AG の分子量(1,480 kDa)は AgsB の合成する分子量(372 kDa)の約 4 倍であることが明らかになった[2)]。さらに、両高発現株の顕微鏡観察の結果から、*agsB*^{OE}株の AG は細胞壁外層に存在するのに対し、*agsA*^{OE}株では細胞壁の比較的内層に分布することが明らかになった[2)]。すなわち、細胞壁 AG の分子量は AG の細胞壁中における局在を決定し、これが液体振盪培養における菌糸の表現型に影響することが示唆された。ところで、*agsB* 遺伝子座の近傍には GPI アンカー型アミラーゼ遺伝子 *agtA* が存在する。AgtA は AG 生合成に関わる酵素の一つと推定されており、細胞壁 AG 量を負に制御することが明らかとなっている[3)]。しかし細胞壁 AG の生合成における AgtA の詳細な役割は未だ不明である。そこで本研究では、AG 分子量の観点から AG 生合成機構における AgtA の機能を解析することを目的とした。

[材料・方法] まず、*agsA*^{OE}株, *agsB*^{OE}株を親株として、*agtA* 高発現株(*agsA*^{OE}*agtA*^{OE}, *agsB*^{OE}*agtA*^{OE})および *agtA* 破壊株(*agsA*^{OE}Δ*agtA*, *agsB*^{OE}Δ*agtA*)を作製し、液体振盪培養における菌糸の培養性状を観察した。熱水アルカリ抽出法により AG を主成分とするアルカリ可溶画分を取得し、本画分中の多糖の分子量をゲルろ過法により分析した。また両株の細胞壁成分を蛍光染色し(AG：AG binding domain-fused GFP [AGBD-GFP]; β-1,3-グルカン：抗 β-1,3-glucan 抗体及び anti-mouse IgG-Alexa Fluor 594; chitin：wheat germ agglutinin-Alexa Fluor 350)、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

[結果・考察] まず各株の液体振盪培養における培養性状を観察したところ、*agsA*^{OE}*agtA*^{OE}, *agsB*^{OE}*agtA*^{OE} 株では親株に比べて密度の低い菌糸塊を形成した。次に、ゲルろ過法によりアルカリ可溶画分中の多糖の分子量を測定したところ、*agsA*^{OE}*agtA*^{OE}, *agsB*^{OE}*agtA*^{OE} 株では親株に比べて AG 分子量の顕著な減少が観察された。これに対し、*agsA*^{OE}Δ*agtA*, *agsB*^{OE}Δ*agtA* 株では AG 分子量の顕著な増加が確認された。さらに蛍光顕微鏡観察の結果、両 AGS 遺伝子高発現株を親株とした *agtA* の高発現および破壊は、AG の細胞壁中における局在にはほとんど影響しないことが明らかになった。また、これらの株の細胞壁 AG 量には親株との顕著な差異は認められなかった。以上のことから、AgtA は細胞壁 AG の分子量を減少させる活性を有することが初めて明らかになった。一方で、AGS 遺伝子高発現条件下においては、AgtA が細胞壁 AG 量を減少させる効果は比較的弱いことが示唆された。

1) Yoshimi et al. *PLOS ONE* 2013, 8:e54893; 2) Miyazawa et al. *Front. Microbiol.* 2018, 9:2623; 3) He et al. *Mol. Microbiol.* 2014, 91:579–595

Cell wall, α-1, 3-glucan, amylase

発表責任者：吉見啓（a-yoshimi@niche.tohoku.ac.jp）

講演番号：1C1p03
講演日時：3 月 24 日 14:12～ 1 号館 C1 会場

麹菌 *Aspergillus oryzae* の液体振盪培養における菌糸塊形成メカニズムの解析
Analyses of the mechanism of hyphal aggregation under liquid culture conditions in *Aspergillus oryzae*

○宮澤 拳[1]、吉見 啓[2]、矢野 成和[3]、佐野 元昭[4]、阿部 敬悦[1,2]([1]東北大院・農、[2]東北大・未来研、[3]山形大院・工、[4]金沢工大・ゲノム研)
○Ken Miyazawa[1], Akira Yoshimi[2], Shigekazu Yano[3], Motoaki Sano[4], Keietsu Abe[1,2] ([1]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., [2]NICHe, Tohoku Univ., [3]Grad. Sch. Eng., Yamagata Univ., [4]Genome Biotechnol. Lab., Kanazawa Inst. Tech.)

【背景・目的】糸状菌は一般的に液体振盪培養において菌糸が塊を形成しながら生育する。この性質は糸状菌を用いた物質生産の足かせとなってきたが、根本的な菌糸塊形成メカニズムについてはこれまで明らかになっていなかった。我々は以前、モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* の細胞壁多糖 α-1,3-グルカン(AG)の欠損株は、菌糸が液体培地中に均一に分散することを見出した[1)]。これは、AG が菌糸接着因子として機能することを意味している。一方、麹菌 *Aspergillus oryzae* においては AG の欠損のみでは完全分散には至らず、小さな菌糸塊を形成するにとどまった[2)]。すなわち、麹菌には AG 以外の因子も菌糸塊形成に関与することが示唆された。我々は、細胞外分泌多糖ガラクトサミノガラクタン（GAG）が麹菌に残存する凝集因子ではないかと考えた。そこで、麹菌の野生株と AG 欠損株を親株として、麹菌の GAG 生合成遺伝子を破壊した株を作製した(GAG 欠損株および AG-GAG 二重欠損株)[3)]。その結果、AG-GAG 二重欠損株の菌糸は培地中に均一分散する形質を示したことから、麹菌の菌糸塊形成には AG と GAG が協調的に機能すると考えられるが、その過程において両多糖がどのように機能するかは不明であった。また、GAG による凝集性の本質についても解析されてこなかった。そこで本研究では、麹菌の菌糸塊形成における AG, GAG の時空的役割を明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】まず、麹菌の野生株、AG 欠損株、GAG 欠損株および AG-GAG 二重欠損株の分生子を、最少培地を入れた 48 穴プレートに接種し、プレートミキサーで攪拌しながら 30℃ で培養した。接種後 0, 3, 6, 9 時間後に実体顕微鏡を用いて菌糸塊の形成過程を観察した。また、各時間の菌糸細胞の AG, GAG を蛍光染色し、共焦点顕微鏡を用いて観察した。その結果、野生株や GAG 欠損株では接種後 3 時間以内に凝集形成が見られた一方、AG 欠損株では 6 時間目になって初めて菌糸塊形成が見られた。AG-GAG 欠損株ではいずれの時間においても菌糸塊形成は見られなかった。また、野生株における AG 由来の蛍光はいずれの時間においても分生子や発芽した菌糸の表面で観察されたのに対し、GAG 由来の蛍光は接種後 6 時間以降にのみ菌糸表面に見られた。このことから、菌糸塊の形成は接種後初期には AG が、分生子の発芽後には AG に加えて GAG も寄与していることが明らかになった。さらに、菌体培養後の培養上清から取得した GAG 粗精製物を、AG-GAG 欠損株の分生子と混合したところ、凝集性が回復した。これは GAG の凝集性が *in vitro* で再現されることを意味しており、本発表ではその結果についても詳しく紹介したい。1) Yoshimi et al. *PLoS ONE* (2013) 8:e54893; 2) Miyazawa et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (2016) 80:1853–1863; 3) 阿部ら 特願 2017-91734

cell wall, hyphal aggregation, polysaccharide

発表責任者：阿部敬悦（kabe@niche.tohoku.ac.jp）

講演番号：1C1p04
講演日時：3 月 24 日 14:23～ 1 号館 C1 会場

米麹におけるコウジカビの破精込みの蛍光イメージング解析

Fluorescence imaging analysis of fungal mycelial growth in steamed rice

○安井 瑞稀[1]、高谷 直樹[1]、丸山 潤一[2]、竹下 典夫[1] ([1]筑波大生命環境、[2]東京大応生工)
○Mizuki YASUI[1], Naoki TAKAYA[1], Zyunnichi MARUYAMA[2], Norio TAKESHITA[1] ([1]Faculty of Life and Environmental Sciences, Univ. of Tsukuba, [2]Dept. of Biotechnol, The Univ. of Tokyo)

古くから酒、味噌、醤油の製造に利用され、国菌に指定されている *Aspergillus oryzae*、別名コウジカビと呼ばれる菌がいる。麹とは穀類にカビを繁殖させたものをいう。特に米にコウジカビをはやしたものを米麹と呼び、清酒造りに必須である。米麹では米の表面に付着したコウジカビの胞子が菌糸を伸ばし、酵素による働きででんぷんを分解しながら米内部へ入っていく。このように蒸米に種付けされたコウジカビの胞子が発芽繁殖し、米の内部や表面で菌糸が白く見えるようにまで成長したこの現象は「破精」と呼ばれる。そして、米粒の中心部にコウジカビの菌糸が生育していく程度を「破精込み」という言葉で表す。破精込みには種類があり、米粒に対し深く破精込んだものを「総破精」、破精の廻っていない部分も残るものを「突き破精」、破精込みが浅い状態のものを「塗り破精」と呼ぶ。清酒醸造の現場において、杜氏は造りたい清酒の味に応じた麹造りを行っているほど、米麹へのコウジカビ菌糸の破精込みは清酒造りにおいて重要である。しかし、破精込みはコウジカビ（種)、米（品種・精米歩合)、水分、湿度、温度などによって変化するため制御が難しい。そこで本研究では *A. oryzae* の破精込みを検出し制御することを目的とし、蛍光イメージングを中心に解析を行っている。精米歩合 50%または 90%の酒米（山田錦）または食用米（千代錦）に、GFP で核を標識した *A. oryzae* を生育させて作製した米麹を用いて観察した。その結果、精米歩合 90%より 50%の米でより多く菌糸が米粒中心に破精込んでいる様子が観察された。さらに、米の細胞と細胞の間を菌糸が伸長していく様子も観察された。現在、SEM や X 線 CT による検証と、RNA-seq による遺伝子発現解析を行っている。また、*A. oryzae* の性質を特徴付ける機構を明らかにするため、まず固体培地での核の動態を解析した。培養時間などにより菌糸内の核の数に大きなばらつきが見られた。一方、このようなばらつきは *A. oryzae* と同じ属のモデル生物 *A. nidulans* では見られなかった。現在、その原因を探索している。本研究において日本の伝統文化を最新のテクノロジーで解析することでその奥深さを明らかにし、更なる技術改良に貢献したいと考えている。

fluorescence imaging analysis, fungal mycelial growth, steamed rice

講演番号：1C1p05
講演日時：3 月 24 日 14:34～ 1 号館 C1 会場

マイクロ流体デバイスを用いた糸状菌の菌糸の屈性と可塑性の解析

Chemotropism and plasticity in filamentous fungi analysed by microfluidic devices

○福田 紗弓[1]、島宗 悠太郎[2]、横川 雅俊[2]、ウタダ アンドリュー[1]、柳沢 直樹[3]、高谷 直樹[1]、佐藤 良勝[3]、竹下 典男[1]([1]筑波大・生命環境、[2]数理物質系、[3]名古屋大・ITbM)
○Sayumi FUKUDA[1], Yutaro SHIMAMUNE[2], Masatoshi YOKOKAWA[2], Andrew UTADA[1], Naoki YANAGISAWA[3], Naoki TAKADA[1], Yoshikatsu SATO[3], Norio TAKESHITA[1] ([1]Tsukuba Univ. of Life Enviro Sci, [2]Pure Appl Aci, [3]Nagoya Univ. of ITbM)

糸状菌は、管状の細胞である菌糸先端の伸長で生長する。その際に、分泌する多種多様な分解酵素は、醸造や醗酵、食品生産などに利用される。一方で、菌糸生長によって動植物の細胞に侵入し病原性を示す。これら糸状菌の酵素分泌能や病原性は、菌糸の生長様式に密接に関連している。糸状菌は外部シグナルに応答し、生長速度や方向を制御していることが明らかとなってきた。この制御により糸状菌がより良い環境を選択し、生長の過程で有利に働くことが考えられる。固体培地上で炭素源や窒素源などの栄養の濃度勾配を作り出し、糸状菌のコロニーの生育を観察したところ、濃度勾配に依存してコロニーの拡大が早いことが示された。しかし、栄養のある箇所で生長速度が速いのか、栄養のある方向に向かって生長しているのかを判別することは難しかった。そこで我々は、1 細胞レベルでの外部シグナルへの応答による生長方向の制御（屈性）を解析するため、ある栄養源の有無の違いによる 2 種の溶液が隣り合うが、混ざらないようなマイクロ流体デバイスを設計し、そこに *Aspergillus nidulans* の菌糸を生育させ、蛍光ライブセルイメージングを行った。窒素源の有無の条件では、菌糸が窒素源のある側の流路に向かって生長した。一方、炭素源の有無では、そのような顕著な応答は見られなかった。これにより、糸状菌は窒素源に応答し生長方向を制御していることが示唆された。

また、菌糸細胞には、細胞壁の圧力である壁圧と、細胞膜が細胞壁を逆向きに押す膨圧が存在する。菌糸先端部は柔軟性が高いことが知られ、膨圧と細胞壁の柔軟性や再構成（分解と合成）のバランスが、菌糸生長に関わると考えられる。細胞の可塑性は、菌糸が土壌等の隙間や、動植物の細胞間に侵入し伸長する際に重要であると予想される。このような細胞の可塑性について解析するため、我々は、菌糸の直径より狭い幅（1 μm）の溝（長さ 50, 100 μm）のマイクロ流体デバイスを作製した。現在までに *A. nidulans*（菌糸直径 2~3 μm）、*Aspergillus oryzae*（菌糸直径 2~10 μm）、*Neurospora crassa*（菌糸直径 10 μm）を培養し、菌糸生長を経時的観察により解析している。*N. crassa* では、細い流路に入らないものや、通り抜けた後に脱極性を示し菌糸生長できないものが見られた。今後、これらの頻度や菌糸の伸長速度などのを定量化する。

Aspergillus nidulans, microfluidic device, chemotropism

講演番号：1C1p06
講演日時：3 月 24 日 14:55～ 1 号館 C1 会場

微生物の自家蛍光シグネチャーを用いた一細胞の生理状態変化の可視化

Single-cell autofluorescence signature revealed temporal dynamics of cell physiology

○川村 優樹[1]、平山 智弘[2]、渡辺 宏紀[1]、清川 達則[1]、高部 響介[3]、野村 暢彦[3]、八幡 穣[3]([1]筑波大学大学院・生命環境科学研究科、[2]筑波大学・生物資源学類、[3]筑波大学・生命環境系)
○Yuhki KAWAMURA[1], Tomohiro HIRAYAMA[2], Hiroki WATANABE[1], Tatsunori KIYOKAWA[1], Kyousuke TAKABE[3], Nobuhiko NOMURA[3], Yutaka YAWATA[3] ([1]Grad. Sch. of Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Sch. Life Environ. Sci., Univ. of Tsukuba, [3]Fac. Life Environ. Sci., Univ. of Tsukuba)

細菌の生理状態はその生育段階や環境によって大きく変化する。食品衛生や医療現場では生理状態の変化に伴う芽胞形成や有害物質生産による食品腐敗や病原性の発現などが問題となっている。更に生理状態の変化は細菌集団内で細胞ごとに不均一性があるために、その対処を困難としている。現在の細菌分析法では染色や細胞破砕、DNA 抽出などの侵襲的な処理を必要とするため、生理状態の変化をリアルタイムで可視化することは困難である。更に現在の分析法ではコロニーや培養液といった細胞集団の平均値として分析を行うため、一細胞ごとの不均一性までを知ることはできなかった。そこで本研究では、細胞低侵襲的に増殖に伴う一細胞ごとの自家蛍光の経時変化を可視化した。自家蛍光は細胞内分子が発する蛍光であるため、細胞低侵襲的に取得することが可能である。

我々は、共焦点顕微鏡の視野下で細菌細胞を培養しながら、一細胞の自家蛍光パターンが増殖フェイズと共に大きく変化していく様子をリアルタイムで取得した。今回、一細胞レベルのトラッキングにより、細胞集団内の一細胞ごとの不均一な自家蛍光パターンの変化を捉えた。更に、分裂酵母である *Saccharomyces pombe* JY1 においては一細胞ごとの変化だけでなく、細胞内での自家蛍光の局在変化まで明らかとなった。自家蛍光は酵素や脂質といった細胞内分子によって発せられるため、網羅的に取得した自家蛍光パターンは増殖に伴う細胞内の生理状態の変化を反映していると考えられる。

これらのことから、自家蛍光パターンを分析することにより、増殖に伴う一細胞ごとの細胞内の経時変化を細胞低侵襲的に可視化できることが明らかとなった。そして、今回見られた細胞内の変化は生理状態の変化を反映している可能性がある。これまで一細胞やその内部変化の可視化には蛍光タンパクなどの遺伝子導入や染色を必須としていたが、この自家蛍光パターンの解析によって intact な細胞が実環境中でどのような挙動を示しているのかをリアルタイムで分析することが可能になると考えられる。

Single-cell, physiology, temporal dynamics

発表責任者：八幡　穣（yawata@icloud.com）

講演番号：1C1p07
講演日時：3 月 24 日 15:06～ 1 号館 C1 会場

奈良八重桜から分離されたストレス耐性酵母で観察された凝集性
Flocculation observed in stress tolerance yeast, Torulaspora delbrueckii (strain B61) isolated from Nara double cherry blossoms
○上原 澪來、岩口 伸一 (奈良女子大学)
○Reira UEHARA, Shin-ichi IWAGUCHI (Nara Women's Univ.)

酵母の凝集性は古くから醸造産業においてビールから酵母を効率的に分離できるという点で欠かせない形質として知られている。また近年では醸造のみならず、凝集性酵母を用いたバイオエタノール生産や重金属を含む廃水のバイオレメディエーションなど工業的応用も期待されている。

本研究では奈良八重桜（ナラノヤエザクラ）の花から単離された *Torulaspora delbrueckii* B61 株の凝集性に注目した。*T. delbrueckii* は欧米では冷凍パンや小麦ビール、ワインに使用されていて、種々のストレスに対して耐性があることが知られている。B61 株には様々なストレスに対する高い耐性度に加え、凝集性を示す特徴がみられた。この凝集性について調べた結果、原因の一つとして細胞表層のタンパク質の関与が示唆された。

醸造に用いられている *Saccharomyces.cerevisiae* の凝集性では、Flo1 や New-Flo1 という凝集型がよく知られており、それらには表層タンパク質 Flo1p、New-Flo1p が関与している。しかし B61 株の凝集性ではそれらの凝集型にみられるような糖による凝集阻害やカルシウムイオンによる凝集促進、EDTA による凝集の解離といった特徴が確認できなかった。また、B61 株の凝集性には pH の影響が見られ、pH2.0 や pH9.0 といった条件下では凝集細胞は解離した。そのため、新規の表層タンパク質がこの菌株に凝集性を与えているのではないかと考えた。

表層特異性の関与を調べるため、メルカプトエタノールと炭酸アンモニウムで細胞を処理したところ、B61 株の凝集体は解離した。また、処理後の細胞と未処理の細胞を洗浄後それぞれ滅菌水に懸濁すると、未処理の細胞は凝集性を示したが、処理した細胞は凝集性を示さなかった。それに加え、この細胞壁抽出物を凝集性を示さなかった処理後の細胞に加えたところ細胞が再び凝集した。SDS-PAGE では約 160kDa の特異的なバンドがみとめられ、このタンパク質が凝集性に関与している可能性が示唆された。

yeast, Torulaspora delbrueckii, flocculation

発表責任者：上原澪來（sar_uehara@cc.nara-wu.ac.jp）

講演番号：1C1p08
講演日時：3 月 24 日 15:17～ 1 号館 C1 会場

分裂酵母における窒素カタボライト抑制解除機構に関連する因子の探索

Investigation of factors for the cancelation of nitrogen catabolite repression in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe

○大澤 晋、八代田 陽子、吉田 稔 (理研 CSRS・ケミカルゲノミクス)
○Shin OHSAWA, Yoko YASHIRODA, Minoru YOSHIDA (Riken, CSRS, Chemical genomics)

カタボライト抑制とは資化しやすい栄養源を効率よく利用するために、資化しにくい栄養源の利用を抑制する機構であり、様々な生物種における重要な代謝制御機構である。カタボライト抑制によって多くの微生物は、産業や実験室内での培養において、その利用しやすい栄養源に対して旺盛な生育を示す。一方、様々な栄養が混在している培地においてはカタボライト抑制が生育に不利に働く例が報告されている。そのため、自然界などカタボライト抑制が不利に働く環境下ではその抑制解除機構が重要な生存戦略となると考えられる。しかし、カタボライト抑制解除機構の詳細なメカニズムは不明であった。

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* は、資化しやすい窒素源であるアンモニアの存在下では、培地中のアミノ酸の取り込みを厳しく制限する。これを窒素カタボライト抑制という。この窒素カタボライト抑制により *S. pombe* のロイシン要求性株である *leu1* 変異株（*leu1*）は培地中にロイシンが存在していても、高濃度のアンモニアが存在するとロイシンの取り込みが抑制される。しかし、*leu1* 株はこの条件下でも培養時間の経過とともに生育を開始する。我々は、この生育を窒素カタボライト抑制解除モデルとして、その機構に関わる遺伝子のスクリーニングを行った。*S. pombe* 非必須遺伝子破壊株（3400 株）ライブラリーを用いたスクリーニングの結果、窒素カタボライト抑制解除機構に関連する遺伝子として、ヒストン修飾に関わるタンパク質をコードする *prf1*$^{+}$遺伝子を同定した。

Prf1 タンパク質は、RNA polymerase II-associated factor (PAF) 複合体の構成因子であり、転写伸長や mRNA プロセシングの制御に関わることが報告されている。また、PAF 複合体は、Histone H2B ubiquitin ligase complex (HULC) と相互作用し、H2B のユビキチン化を制御する。これら PAF 複合体や HULC の構成タンパク質をコードする遺伝子の破壊株は *prf1* 遺伝子破壊株と同様に窒素カタボライト抑制条件での著しい生育遅延が確認された。一方、H2B ユビキチン化不能株（*htb1-K119R*）においては部分的な生育遅延しか観察されなかった。これらのことから、窒素カタボライト抑制解除には、PAF 複合体、HULC が重要な機能を持つが、HULC は H2B 以外の因子をユビキチン化することでその抑制解除に関わることが示唆された。

catabolite repression, PAF1C, fission yeast

講演番号：1C1p09
講演日時：3 月 24 日 15:28～ 1 号館 C1 会場

出芽酵母トリプトファン輸送体 Tat2 の機能と安定性に及ぼす遺伝的要因
Genetic traits affecting the functionality and stability of the yeast tryptophan permease Tat2
○石井 凌賀、望月 貴博、阿部 文快（青山学院大理工）
○Ryoga ISHII, Takahiro MOCHIZUKI, Fumiyoshi ABE (Aoyama Gakuin Univ.)

【目的】出芽酵母の高親和性トリプトファン輸送体 Tat2 は高水圧や低温、あるいは数種の化学物質など様々なストレスに強い感受性を示す。また、輸送基質であるトリプトファンを細胞に過剰投与した場合、Tat2 は Rsp5-Bul1 ユビキチンリガーゼ複合体により速やかに分解される。私たちはこれまで、Tat2 のトリプトファン輸送活性に関わる多数のアミノ酸残基を同定してきた。これらの部位に変異が生じると Tat2 のトリプトファン輸送活性が著しく低下し、低濃度のトリプトファン培地では増殖できなくなる。一方、トリプトファン輸送能が欠失した変異体には、高濃度トリプトファンを投与しても分解が見られない安定なものと、トリプトファンを投与していないにも関わらず、常時分解される不安定なものが存在する。しかし、これらの変異が Tat2 の機能にどのような影響を及ぼすのかはわかっていない。そこで本研究では、Tat2 の輸送能に関わるアミノ酸残基に着目し、分解との関係について解析した。

【方法】ガラクトース誘導性プロモーターにより *TAT2* を発現させ、グルコース抑制と同時に高濃度トリプトファンを投与し、ウエスタンブロッティングにより Tat2 タンパク質、およびその変異型の分解様式を調べた。また、Tat2 の輸送活性に失陥があるとトリプトファン要求性株は低トリプトファン（4 μg/mL）培地で増殖できない。このことを利用し、各種変異型 Tat2 の高親和性トリプトファン輸送能を検証した。

【結果】Tat2 の N 末端細胞質ドメインの D74 をアルギニンに置換（D74R）すると、細胞を高濃度トリプトファンや高圧にさらしても Tat2 が分解されず、変異株は 25 MPa での高圧増殖能を獲得した。このことは、D74R 変異が Bul1 による Tat2 認識を阻害し安定化を導くことを示唆する。機能失陥変異である I96T や V326L は Tat2 の恒常的分解を誘起したが、I96T-D74R や V326L-D74R 二重変異型 Tat2 は分解されずに安定化した。従って、$Tat2^{I96T}$ や $Tat2^{V326L}$ は恒常的にユビキチン依存分解されているものと考えられる。一方、低トリプトファン培地で $Tat2^{V326L-D74R}$ 発現株は増殖したが、$Tat2^{I96T-D74R}$ 株は増殖しなかった。このことは、$Tat2^{V326L}$ はトリプトファン輸送能を有するものの何らかの理由で分解が促進していることを示唆する。そこで現在、変異による Tat2 の不安定化の要因や構造安定化に関わる因子の探索を行っている。

Saccharomyces cerevisiae, ubiquitin, tryptophan permease Tat2

講演番号：1C1p10
講演日時：3 月 24 日 15:39～ 1 号館 C1 会場

出芽酵母の新規小胞体タンパク質 Ehg1 は高水圧下でアミノ酸輸送体を制御する
A novel ER membrane protein Ehg1 plays a role in regulating nutrient permeases in *Saccharomyces cereivisiae* under high pressure
○加藤 祐介[1]、黒坂 豪祐[1]、望月 貴博[1]、伊村 咲希[1]、石田 夏穂[1]、石井 凌賀[1]、上村 聡志[2]、阿部 文快[1] ([1]青山学院大理工、[2]東北医科薬科大医)
○Yusuke KATO[1], Goyu KUROSAKA[1], Takahiro MOCHIZUKI[1], Saki IMURA[1], NATSUHO ISHIDA[1], Ryouga ISHII[1], SATOSHI UEMURA[2], FUMIYOSHI ABE[1] ([1]Aoyama Gakuin Univ., [2]Tohoku Medical and Pharmaceutical Univ.)

【目的】 我々は出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* をモデルとし、25 MPa（約 250 kg/cm2; 2,500 m の深海に相当）程度の非致死的圧力に対する適応メカニズムを明らかにする目的で研究を行ってきた。特にトリプトファン輸送体は高圧に超感受性を示し、要求株の増殖は著しく制限される。一方、トリプトファン非要求株を親株とした遺伝子破壊ライブラリーからも、高圧や低温に感受性を示すものが 84 株見いだされている。本研究では、トリプトファン輸送以外にも栄養源取り込み失陥が高圧感受性の要因となるものがあるのではないかと考えスクリーニングを行った。こうして得られた機能未知遺伝子 *YPR153W* について今回報告する。

【方法】 高圧や低温に感受性を示した 84 株（*leu2 his3 lys2 ura3*）全てに 4 つのプラスミド（*LEU2, HIS3, LYS2, URA3*）を同時に導入し、25 MPa での増殖が回復する遺伝子欠損株を得た。それらのうち機能未知である *YPR153W* に着目し、Ypr153w タンパク質の細胞内局在、変異導入による機能部位の同定、および Split Ubiquitin システムを用いた栄養源輸送体との相互作用について解析を行った。

【結果】 84 個の感受性株について栄養要求性を相補し、25 MPa での増殖を調べた。その結果、高圧増殖能が回復する 24 株が見いだされた。興味深いことに、機能未知である 7 個の遺伝子欠損株について高圧増殖能の大きな回復効果が見られた。中でも特に顕著だったのが *YPR153W* の欠損株であり、Ypr153w-GFP タンパク質は小胞体膜上に局在することがわかった。そこで、この遺伝子を *EHG1* (ER-associated high pressure growth gene 1) と名付けた。Ehg1 ホモログは深海酵母にも見られ、N 末端領域は種を越えて高度に保存されていた。この領域のアラニン置換体 $Ehg1^{P17,20A}$ や $Ehg1^{F19A}$ 発現株は高圧増殖能を失ったことから、Ehg1 における N 末端の重要性が示唆された。

Split Ubiquitin システムは膜タンパク質どうしの相互作用を解析するための有用なツールである。分割したユビキチン分子とレポーター（*HIS3*）の転写因子を Ehg1 と各種栄養源輸送体に融合して 1 つの細胞に共発現させ、ヒスチジンを含まない選択培地で培養し、その増殖能から両者の相互作用について評価する。現在その定量的な解析を実施している。

Saccharomyces cereivisiae, high-pressure adaputation, ER mambrane protein

講演番号：1C1p11
講演日時：3 月 24 日 16:00～ 1 号館 C1 会場

大腸菌のビスフェノール A 耐性に及ぼす薬剤排出ポンプの影響

Characterization of *E. coli* drug efflux pump involved in bisphenol A resistance

○加賀 経元、荷方 稔之、酒井 保藏（宇都宮大院・工）
○Tsunemoto KAGA, Toshiyuki NIKATA, Yasuzo SAKAI (Grad. Sch. Eng., Utsunomiya Univ.)

【背景】*Stenotrophomonas maltophilia* は多剤耐性を有し院内感染の起因菌として知られるグラム陰性細菌であり、大腸菌や緑膿菌がビスフェノール A（BPA）に耐性を示すのに対し *S. maltophilia* は BPA 感受性を示す。この機構を解明するため大腸菌の BPA 耐性に着目し、大腸菌 BW25113 株の *tolC* 欠損株を用いて BPA 感受性試験を行ったところ、*tolC* 欠損株が BPA 感受性となることが明らかになった。TolC は薬剤排出ポンプを構成するタンパク質であるため、薬剤排出ポンプが BPA を菌体外へ排出し耐性を得ていることが予想される。これを検証するため、TolC を有する薬剤排出ポンプで排出される蛍光物質ローダミン 6 G を使用して BPA との競合試験を行った。また TolC と複合体を形成して機能する薬剤排出ポンプは複数存在するため、これらをコードする 16 の遺伝子破壊株について BPA 耐性試験を行い、BPA 排出に関与する薬剤排出ポンプの特定を行った。
【方法・結果】BPA とローダミン 6 G の競合試験は、大腸菌野生株と *tolC* 欠損株を使用した。0.5 mg/L のローダミン 6 G を含む LB 液体培地を調製し、さらに BPA 濃度を 0 mM、0.8 mM、1.2 mM に調製した。これに前培養液 10 μL を接種し、37 ℃で 3 時間培養して集菌、リン酸バッファーで洗浄し濁度を調整した。この懸濁液とその上清の蛍光強度（蛍光波長 550 nm、励起波長 525 nm）を測定した。その結果、*tolC* 欠損株において 0.8 mM BPA 共存下では BPA 無添加時と比べて 1.1 倍、1.2 mM BPA 共存下では 3.2 倍に蛍光強度が増加した。このことからローダミン 6 G と BPA の排出が競合していることが予想された。BPA 耐性試験では、1.0 mM まで段階的に BPA 濃度を調整した LB 液体培地 200 μL を 96 ウェルプレートに分注し、前培養液を接種して 37 ℃で 16 時間振とう培養した後、濁度を測定した。その結果、*acrA*、*acrB* 欠損株において BPA 感受性となることを見出した。AcrAB-TolC 複合体は大腸菌において多種類の化合物を基質とする強力な薬剤排出ポンプであり、これらの実験結果から大腸菌が AcrAB-TolC を介して BPA を排出して耐性を得ていることが示唆された。

bisphenol A, efflux pump, *tolC*

講演番号：1C1p12
講演日時：3 月 24 日 16:11～ 1 号館 C1 会場

大腸菌増殖における培地成分の寄与度の学習分析

Prediction of the decision making chemicals to bacterial growth by machine learning

○イン ベイウェン、芦野 一葉、菅野 健太、天笠 俊之（筑波大）
○Bei-Wen YING, Kazuha ASHINO, Kenta SUGANO, Toshiyuki AMAGASA (Univ. Tsukuba)

環境要素がどのように微生物の集団増殖に寄与するのかは生態環境や生命現象に関する普遍的な問いである。本発表では多様な化学環境が単細胞集団の増殖にもたらす影響を実験室内において網羅的かつ高精度に探索する試みを報告する。具体的には、10 種類の市販化合物を混ぜ合わせた多様な化学環境条件下で、大腸菌の集団増殖を経時的に計測し、様々な化学環境に対応した集団増殖のデータを網羅的かつ高精度に取得した。以上の計測実験から、13 種類の化学因子 （イオン）から構成される 225 種類の培地種類に対応する 1336 種類の増殖データが得られた。このデータセットに対し、機械学習のアプローチである決定木学習を適用し、集団増殖の速さと集団密度の高さを優位に決定する化学因子とそれらの濃度範囲を同定した。専門知識と実験の経験則に依存しない学習分析により、最大増殖速度と最大集団密度を決める化学因子が明らかとなった。また、グルコースを代表とする炭素源が増殖の最優先決め手でないことや、化学因子のトレードオフ方式の作用機構など、従来の微生物学の知見に反する結果や想定外の発見も得ることができた。今後、さらなる計測と学習分析により、培地中の各化学組成のどれらがどのように集団増殖に寄与するのかを明らかにする。本研究は、情報科学のアプローチである機械学習を集団増殖の予測に導入する初めてのチャレンジであり、データサイエンスとしての微生物学研究の一つの実施例として紹介する。機械学習を微生物実験科学に導入することにより、抜本的な知的リバイスと技術的革新が期待できる。

Bacterial growth, Cell culture, Machine learning

発表責任者：イン　ベイウェン（ying.beiwen.gf@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：1C1p13
講演日時：3 月 24 日 16:22～ 1 号館 C1 会場

Pseudomonas sp. LAB-08 株培養上清による大腸菌の一時的増殖抑制機構の解析
Growth repressing mechanism of *Escherichia coli* by *Pseudomonas* sp. strain LAB-08

○本荘 雅宏[1]、鈴木 研志[2]、田代 陽介[1]、二又 裕之[1,3] ([1]静大院総合科技、[2]静大院創造、[3]静大グリーン研)
○Masahiro HONJO[1], Kenshi SUZUKI[2], Yosuke TASHIRO[1], Hiroyuki FUTAMATA[1,3] ([1]Grad. Sch. of Integr. Sci. and Technol. Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. of Sci. and Technol. Shizuoka Univ., [3]Res. Inst. of Green Sci. and Technol. Shizuoka Univ.)

微生物生態系の好適制御技術構築に際して、微生物間の相互作用を理解することは極めて重要である。本研究室では、一般環境細菌 *Pseudomonas* sp. LAB-08 株が、複数の異属微生物の増殖を一時的に抑制する物質を生産することを見出している。これまでに、本物質は分子量 1033 の水溶性物質であること、KEIO ライブラリー（*Escherichia coli* BW25113 株一遺伝子欠損コレクション合計 3285 株）を用いた解析で、野生株は一時的な増殖抑制を受けるのに対して、増殖抑制効果が低い 11 株を見出した。これらの株は膜輸送系タンパク質およびペントースリン酸経路に連なる酵素を欠損していた。以上の知見を踏まえ、本研究では BW25113 株を用いて一時的な増殖抑制機構の解明を目的とする。

LAB-08 株由来の粗精製した増殖抑制物質を添加したグルコースを唯一の炭素源とする培地で BW25113 株を培養すると、誘導期の長期化と増殖速度定数の低下を誘発するものの、最終的な増殖量は増殖抑制物質無添加系と同等になる。一方、炭素源を酢酸アンモニウムとした同様の実験では、最終的な増殖量は無添加系の約 1/20 に留まった。なお、無添加系における両炭素源での増殖量は同等であった。この結果は、解糖系からペントースリン酸経路および TCA 回路へと代謝が進行する場合と、糖新生を経て代謝が進行する場合で、増殖抑制物質の効果が大きく異なることを意味している。細胞の増殖には還元力および核酸の原料供給であるペントースリン酸経路が必須である。酢酸アンモニウムを炭素源とした場合に無添加系と比較して増殖量が著しく低い要因として、糖新生からペントースリン酸経路に向かう代謝の抑制、即ち、ホスホエノールピルビン酸（PEP）からグリセルアルデヒド 3 リン酸（G3P）の間で増殖抑制物質が作用していると予想された。そこで、G3P から PEP 間の 4 ステップを担う各酵素遺伝子の転写量を Reverse transcription-qPCR により測定した。グルコースを炭素源とした場合、1,3-ジホスホグリセリン酸（1,3-DPG）と 3-ホスホグリセリン酸（3-PG）間および 3-PG と 2-ホスホグリセリン酸（2-PG）間の代謝を担う *pgk* および *gpmA* は増殖抑制物質無添加系と同等もしくは活性化されていた。一方、G3P と 1,3-DPG 間および 2-PG と PEP 間の代謝を担う *gapA* および *eno* の転写抑制が示唆された。

以上の結果から、グルコースを炭素源とする場合には、G3P よりも上流のフルクトース-6-リン酸からペントースリン酸経路に入ることが可能であるため、増殖抑制物質添加系と添加系では最終的な増殖量に差が生じなかったと考えられた。また現時点において、LAB-08 株由来の増殖抑制作用箇所の特定には未だ至っていないものの、G3P から PEP 間の代謝を抑制している可能性が示唆された。

Growth-repressing, Metabolic pathway, Pentose phosphate pathway

講演番号：1C1p14
講演日時：3 月 24 日 16:33～ 1 号館 C1 会場

どのような遺伝因子がプラスミド非感受性の発揮に関与しているのか？
What genetic factors can make a host cell plasmid-insensitive?
○河野 響[1]、上田 朋美[1]、水口 千穂[1,2]、岡田 憲典[1]、野尻 秀昭[1,2]（[1]東大・生物工学セ、[2]東大・微生物連携機構）
○ Hibiki KAWANO[1], Tomomi UEDA[1], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1,2], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1,2] ([1]BRC, UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

【背景】可動性遺伝因子の一種であるプラスミドの保持は、宿主に薬剤耐性能などの新規形質を付与するとともに、生育負荷を及ぼすことが多く報告されている。特に非選択条件下では、生育負荷が引き金となってプラスミド保持株の生き残りやすさ (fitness) が低下し、集団中から保持株が消失する場合が多い。当グループではこれまで、プラスミド保持株／非保持株の競合培養下における保持株の存在比率の経時的な変化を指標として、プラスミド保持に伴う生育負荷の評価を行ってきた。その結果、環境中でカルバゾール分解プラスミド pCAR1 を保持していた *Pseudomonas resinovorans* CA10dm4 株に、pCAR1 をはじめとする特徴の異なる 10 種のプラスミドをそれぞれ保持させた場合にも生育負荷が認められない、いわばプラスミド“非感受性”を示すことを昨年度までに報告した。さらに非感受性メカニズム解明の一環として、トランスポゾン (Tn) を用いたスクリーニングにより、 pCAR1 保持に対して感受的になった (pCAR1 保持に伴う生育負荷が認められる) CA10dm4(pCAR1) 変異株を二株 (#2, #4 株) 取得した (図)。本年度は各変異株の Tn 挿入位置を中心に報告する。

【結果】#2 株では、染色体上の 7 kb の配列が三度連続して繰り返されるリピート配列内部の機能未知の ORF に Tn が挿入されていた。なお、この ORF 自身も染色体上に 3 コピー存在しており、Tn 挿入位置を一箇所に決定することは出来なかった。さらに興味深いことに、7 kb の配列内部の 12 個の各 ORF の遺伝子産物をドメイン構造検索に供したところ、ファージ関連のものが 3 つ (複製に関与、外皮タンパク質、機能未知) 予測され、併せて当該領域の GC 含量 (56%) がゲノムの GC 含量 (64%) に比べて十分低かったことから、この 21 kb の領域はプロファージ領域の一部であると推定される。一方#4 株では、sensor protein をコードする ORF 内部に Tn が挿入されていた。さらに隣接する ORF が two-component response regulator をコードしていたことから、この二つの ORF で協働して二成分制御系として機能すると考えられる。現在、#2 株に関しては SOS 応答の誘導が生じているか否かの評価を、また両変異株を RNA-Seq に供することで Tn 挿入に伴うトランスクリプトームの変化の評価を行っている。本発表ではその結果と併せて、プラスミド非感受性発揮における当該因子の機能／役割について議論したい。

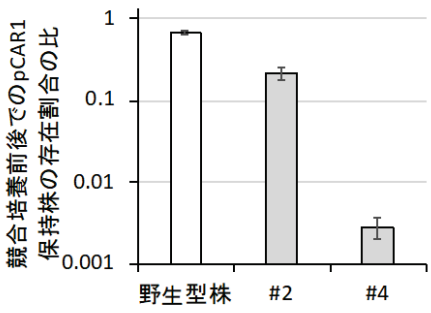


図. 取得した変異株の pCAR1 保持時の fitness
縦軸の値が 1 に等しいことは pCAR1 保持時の fitness が低下しない、つまり生育負荷が認められないことを、値が 1 より小さいほど生育負荷の度合いが増加することを意味する。

plasmid, fitness cost, *Pseudomonas*

発表責任者：野尻秀昭（anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：1C1p15
講演日時：3 月 24 日 16:44～ 1 号館 C1 会場

細菌が示すプラスミド”非感受性”を利用した新規宿主ベクター系開発の可能性

The possibility of construction of a novel host-vector system using bacteria showing “insensitivity” to plasmids

○上田 朋美[1]、河野 響[1]、水口 千穂[1,2]、岡田 憲典[1]、野尻 秀昭[1,2]（[1]東大・生物工学セ、[2]東大・微生物連携機構）
○Tomomi UEDA[1], Hibiki KAWANO[1], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1,2], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1,2] ([1]BRC, UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

【背景】プラスミドを用いる場合、宿主が受けるプラスミド保持に伴う生育負荷により非選択的条件下で集団中からプラスミド保持株が消失する場合が一般的である。ゆえに、ベクター上の有用遺伝子を宿主に導入する様々な局面では抗生物質の添加等の選択圧が必須とされてきた。しかし、薬剤の使用は薬剤耐性菌出現／蔓延の原因となるため、世界的に抗生物質の使用を可能な限り控える動きが強まっており、選択圧を必要としない宿主ベクター系の需要は高いと言える。その一方我々はこれまでに、*Pseudomonas resinovorans* CA10dm4 株に自然界から単離された異なる 8 種のプラスミドおよび 2 種の人工ベクターをそれぞれ保持させた際に、この株がプラスミド保持に伴う負荷を負わない（感じない）、いわばプラスミド保持に「非感受的」である特殊な株であることを明らかにしてきた。例えば汎用ベクターpBBR1MCS-5 を保持させた場合、非保持株との競合培養の過程で *P. putida* KT2440 株では培養を経るごとに保持株の存在比率が低下した一方、CA10dm4 株ではこの低下は確認されなかった (図 A)。今年度は、非感受性株の新規宿主ベクター系を物質生産に利用する場を想定し、ベクター上からタンパク質を発現させた場合の宿主とベクターの挙動について報告する。

【方法・結果】pBBR1MCS-5 上の *lac* プロモーター下から蛍光タンパク質 GFP、mCherry およびテトラサイクリン耐性 (Tc^r) 遺伝子をそれぞれ発現させるベクターを作製し、CA10dm4 株に保持させた際のベクターの安定性および生育負荷を評価した。まず安定性の評価に際して、抗生物質を一切含まない非選択条件下でベクター保持株を単独培養し経時的にベクター保持株の比率を算出したところ、いずれのベクターも細胞内で安定に保持された。次に負荷の評価に際して、ベクター保持株と非保持株を等量混合し非選択条件下で継代培養しながら経時的に両者の比率を測定したところ、いずれのタンパクを発現させた場合にもこの比率が一定に保たれた (図 B)。以上より、いずれのベクターに対しても非感受性を示すことが明らかになった。これに併せて競合培養の培養液の蛍光強度を経時的に測定した結果、培養を経ても強度の低下は見られず、また Tc^r 遺伝子を発現させた場合にはベクター保持株の Tc 耐性は十分に維持され、目的のタンパク質を十分に発現していることを確認できた。これらの結果は、CA10dm4 株を抗生物質の使用を回避できる新たなベクター宿主として応用できる可能性を示唆している。

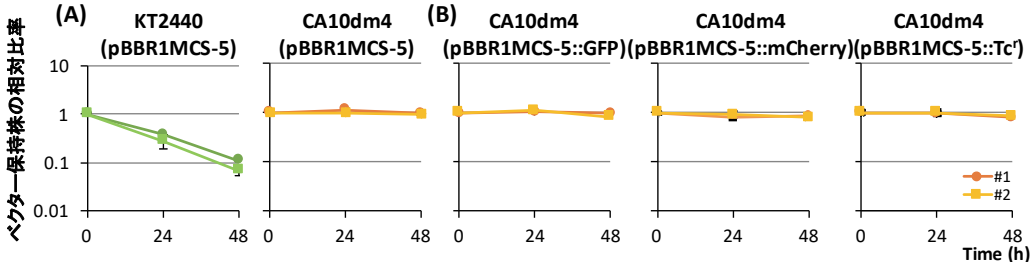


図. ベクター保持に伴う負荷の定量の結果

plasmid, fitness cost, *Pseudomonas*

発表責任者：野尻 秀昭（anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：1C2a01
講演日時：3 月 24 日 09:00～ 1 号館 C2 会場

出芽酵母のリン酸飢餓誘導性オートファジーにおける Atg11 の役割の解析と特異的因子の発見

Analyses of the role of Atg11 and the discovery of specific factors in phosphate starvation-induced autophagy of *Saccharomyces cerevisiae*

○奥村 俊、横田 浩人、五味 勝也、新谷 尚弘（東北大院農・生物産業創成）
○Shun OKUMURA, Hiroto YOKOTA, Katsuya GOMI, Takahiro SHINTANI (Tohoku Univ. of Agric.)

マクロオートファジー（以下オートファジー）は、栄養飢餓条件下において、自己の細胞質成分を二重膜構造体オートファゴソームに内包し、液胞（動物細胞ではリソソーム）へ輸送、分解する機構である。出芽酵母のオートファジーは様々な栄養素の枯渇によって誘導されるが、分子機構の解析においては短時間で著しくオートファジーが活性化される窒素源飢餓が誘導条件として汎用され、誘導条件の違いによる分子機構の違いはほとんど調べられていなかった。近年、液胞酵素アミノペプチダーゼ I の液胞への輸送やマイトファジーなどの選択的オートファジーのみに必須な（非選択的オートファジーには不要であるとされた）Atg11 が、リン酸飢餓で誘導されるオートファジー（Phosphate Starvation-induced Autophagy、以下 PSiA）には必須であることが示された。Atg11 は、選択的オートファジーにおいて、積荷とオートファジー・マシナリー（Atg1 や Atg9）との相互作用を仲介するアダプターである。そこで、Atg11−Atg9 間の相互作用が失われる $Atg9^{H192L}$ 株、および Atg11−Atg1 間の相互作用が著しく低下する $Atg1^{L825H,\ W826S}$ 株を作製し PSiA の解析を行った。その結果、前者のオートファジー活性は親株と同程度であったのに対し、後者のオートファジー活性は親株と比較して著しく低下することが明らかとなった。オートファジーの誘導は、Atg13 の脱リン酸化に伴う Atg1、Atg13、Atg17−Atg31−Atg29 からなる Atg1 複合体の形成を介して Atg1 のキナーゼ活性が自己活性化することにより開始される。しかし、リン酸飢餓下では Atg13 の脱リン酸化が不十分で、この超分子構造体の形成が非効率になることが示唆されていた。さらに、Atg11 は Atg29 と相互作用することが知られており、Atg11 が Atg1 の超分子構造体へのリクルートを補填することが示唆された。

また、飢餓誘導時の細胞形態を電子顕微鏡により観察したところ、リン酸飢餓誘導時では窒素飢餓誘導時と比較し、液胞が断片化していること（高浸透圧条件下でよく観察される）、細胞壁が分厚くなっていることが数多くの細胞において確認されていた。これらの現象に High Osmolarity Glycerol（HOG）経路と Cell Wall Integrity（CWI）経路が関わることが知られている。そこで、各経路において中心的な役割を担う MAP キナーゼである Hog1 と Slt2 に着目し、それぞれの遺伝子破壊株を作製して PSiA の解析を行った。その結果、*hog1*Δ株、*slt2*Δ株ともに、オートファジーの進行が親株と比較して著しく遅延した。このことから、Hog1 と Slt2 が PSiA には必要であることが示唆された。今後は、PSiA における両因子の役割について解析する予定である。

Saccharomyces cerevisiae, autophagy, phosphate metabolism

発表責任者：奥村　俊（shun.okumura.q3@dc.tohoku.ac.jp）

講演番号：1C2a02
講演日時：3 月 24 日 09:11～ 1 号館 C2 会場

麹菌における小胞体ストレス条件下での分泌タンパク質遺伝子の転写抑制機構の解析
Analysis of how transcription of secretory protein gene is repressed under endoplasmic reticulm stress in *Aspergillus oryzae*

○佐藤 駿[1]、杉山 優子[1]、田中 瑞己[2]、五味 勝也[1]、新谷 尚弘[1] ([1]東北大農、[2]静県大食栄)
○Shun SATO[1], Yuko SUGIYAMA[1], Mizuki TANAKA[2], Katsuya GOMI[1], Takahiro SHINTANI[1] ([1]Tohoku Univ. of Agric., [2]Shizuoka Univ. of Food Nutr.)

麹菌 *Aspergillus oryzae* は、高いタンパク質分泌生産能を持つという特性から、異種タンパク質生産の宿主として期待されているが、その生産量はカビ由来タンパク質の生産に比べ低い。その一因として、宿主の品質管理機構による異種遺伝子の転写および翻訳産物の分解が挙げられる。分泌タンパク質の合成は、N 末端のシグナルペプチド（SP）がシグナル認識粒子によって認識されることで、小胞体膜の透過と共役して進行する。一方で 小胞体内に異常タンパク質が蓄積すると、小胞体ストレス応答によりタンパク質のフォールディング、異常タンパク質の分解などに関する遺伝子の転写活性化を引き起こす unfolded protein response（UPR）が誘導される。加えて、糸状菌では小胞体ストレス条件下で、主要分泌タンパク質遺伝子の mRNA が特異的に減少することが知られている。この現象は repression under secretion stress（RESS）と呼ばれ、分泌タンパク質遺伝子プロモーターに依存した転写抑制が原因の一つだとされているが、その機構の全容は不明である。そこで、私たちは麹菌をモデルとして、RESS 機構の解明を目指した。まず、麹菌でも RESS が起こるか確認した。即ち、麹菌株を yeast extract-peptone-maltose（YPM）培地（アミラーゼ発現条件）で 24 時間培養した後、UPR を誘発する薬剤であるジチオトレイトール（DTT）を培養液に添加し、アミラーゼ遺伝子（amyA/B/C）mRNA 量の経時的変化を観察した。その結果、アミラーゼ遺伝子 mRNA の急激な減少が観察された。そこで、この減少がアミラーゼ新生鎖–mRNA–リボソーム複合体の小胞体へのターゲティングに依存しているか解析した。即ち、*amyB* 遺伝子の SP コード領域のみにフレームシフトが生じる変異を導入し RESS の解析を行った。その結果、DTT 処理による変異型 *amyB* mRNA の急激な減少は回避されることが明らかとなった。同様の結果は、*Aspergillus tubingensis* 由来のα-1,2-D-マンノシダーゼを分泌発現した時にも観察された。これらの結果より、RESS にはプロモーター依存的な転写抑制の他にも、小胞体へのターゲティングに依存した分泌タンパク質 mRNA の品質管理機構が関与していることが示唆された。今後は、分泌タンパク質 mRNA の減少機構および小胞体ストレス応答と RESS との関連を明らかにしたい。

Aspergillus oryzae, ER stress, RESS

講演番号：1C2a03
講演日時：3 月 24 日 09:22～ 1 号館 C2 会場

Comparative functional analysis of Fus3-type MAPK cascade and scaffold HAM-5 ortholog in development and cell fusion of *Aspergillus oryzae*

○Yue Chen[1], Takuya Katayama[1,2], Ozgur Bayram[3], Gerhard H. Braus[4], Katsuhiko Kitamoto[5], Jun-ichi Maruyama[1,2] ([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Dept. of Biol., Maynooth Univ., [4]Dept. of Mol. Microbiol. Genet., Georg-August-University Goettingen, [5]Nihon Pharmaceutical Univ.)

[Background]
Fus3-type mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway regulates a series of cellular programs for development and cell fusion in fungi. In yeast, the MAPK cascade consisting of Ste11, Ste7, and Fus3 together with the scaffold protein Ste5 is responsible for the pheromone-responsive cell fusion during mating. In filamentous fungi, three orthologous components of the Fus3-type MAPK cascade function in sexual development and cell fusion. Although an ortholog of Ste5 is not conserved in filamentous fungi, HAM-5 is recognized as the scaffold protein sharing the function in sexual development and cell fusion with the Fus3-type MAPK cascade[1)]. The formation of sclerotia, which are the compact hardened mass of hyphae, occurs in the asexual development state of some species of filamentous fungi. However, a functional relationship between Fus3-type MAPK cascade components and scaffold protein HAM-5 remains undetermined in sclerotia formation. In this study, we aim to clarify the functions of the MAPK cascade components and HAM-5 ortholog in development and cell fusion of *Aspergillus oryzae*.
[Results]
We phenotypically compared the deletion strains of *Aoham5* and Fus3-type MAPK cascade components encoding genes (*Aoste11*, *Aoste7* and *Aofus3*). All the deletion strains show severe defects in conidia formation. The *Aoste11*, *Aoste7* and *Aofus3* deletion strains completely abolished sclerotia formation, however, the *Aoham5* deletion retained the ability of sclerotia formation, which is in contrast to the defects in conidia formation of all the deletion strains. This inconsistence suggests an independency of the MAPK cascade from the HAM-5 ortholog despite its proposed scaffold function.
We have established an experiment to quantitatively evaluate cell fusion efficiency in *A. oryzae* by utilizing auxotrophic complementation[2)]. Two different auxotrophic strains were constructed to determine the cell fusion efficiency in all the deletion strains. We will report cell fusion efficiency and perform further comparative analysis with FipA recently identified to interact with AoFus3[3)].

1) Jonkers *et al.*, *PLoS Genet.* 2014, 10, e1004783
2) Tsukasaki *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2014, 78, 1254-1262
3) Katayama *et al.*, Annual meeting of JSBBA 2016, 2F049

Aspergillus oryzae, development, MAPK cascade

発表責任者：Jun-ichi MARUYAMA（amarujun@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：1C2a04
講演日時：3 月 24 日 09:33～ 1 号館 C2 会場

A. oryzae のシグナル伝達系 sskA と sskB の浸透圧応答に関する解析

Analysis on osmotic response of signaling system *sskA* and *sskB* in *Aspergillu oryzae*

○森本 ちよの、水野 克紀、佐野 元昭（金沢工大バイオ・化学）
○Chiyono MORIMOTO, Katsunori MIZUNO, Motoaki SANO (Kanazawa Inst. Technol)

【背景・目的】生物では、外界の環境変化の情報を細胞内へ伝達する仕組みが知られている。*Aspergillus nidulans* では浸透圧応答についての研究が行われており、浸透圧応答は HOG (High Osmolarity Glycerol response) 経路が中心的な機能をもち、二成分制御系、HOG MAPK カスケードによって構成されている。浸透圧応答の流れとして、浸透圧応答に関係する各遺伝子は、外部から浸透圧ストレスを感じると、*nikA*、*ypdA*、*sskA*、*sskB*、*pbsA*、*hogA* と順番にシグナルを核まで伝達する [1)]。*A. nidulans* の *sskA* と *sskB* は浸透圧応答に関係していることが分かっている。しかし、*A. oryzae* の浸透圧応答に関しては未だ明らかにされていない。

そこで本研究では、*A. oryzae* の *sskA* と *sskB* が浸透圧応答に関係しているのか、明らかにすることを研究目的とした。

【方法】*A. nidulans* の *sskA* と *A. oryzae* で同定された *sskA* の相同性、*A. nidulans* の *sskB* と *A. oryzae* で同定された *sskB* の相同性を解析した。使用菌株は、control 株として *A. oryzae* (Δ*ligD, pyrG*$^{+}$)、遺伝子破壊株としてΔ*sskA* (Δ*ligD, pyrG*$^{+}$, Δ*sskA*)、Δ*sskB* (Δ*ligD, pyrG*$^{+}$, Δ*sskB*)を使用した。プレートアッセイの条件は、YPD 寒天培地に NaCl、Sorbitol、Sucrose を添加し、各条件の最終濃度を 0.8 M、1.0 M、1.2 M、1.5 M になるように調製した。コロニーの大きさを培養 3、4 日目に測定し、control 株及びΔ*sskA*、Δ*sskB* のコロニーの大きさを比較した。

【結果】解析結果より、*A. nidulans* の *sskA* と *A. oryzae* で同定された *sskA* の相同性は 61.7 %、*A. nidulans* の *sskB* と *A. oryzae* で同定された *sskB* の相同性は 80.8 %であった。

control 株と比較してΔ*sskB* のコロニーは NaCl 濃度が高くなるにつれてコロニーの大きさが小さくなった。*p* 値を 0.01 として *t* 検定を行ったところ、NaCl 濃度が 0.8 M から 1.5 M では有意差が確認された。これらの結果より、*A. oryzae* のΔ*sskB* も *A. nidulans* と同じように浸透圧応答に関係しており、*A. oryzae* にも *A. nidulans* と同じような浸透圧応答経路が存在すると考えられる。Δ*sskA* については、現在詳細な解析を行っている。

1) Kentaro Furukawa *et al*., *Mol. Microbiol.*, 56 (5), 1246-1261 (2005)

Aspergillus oryzae, *sskA*, *sskB*

発表責任者：佐野元昭（msano@neptune.kanazawa-it.ac.jp）

講演番号：1C2a05
講演日時：3 月 24 日 09:44～ 1 号館 C2 会場

糸状菌 *Aspergillus nidulans* のエルゴステール合成制御におけるプロテインキナーゼ C の果たす役割

The role of protein kinase C in the regulation of ergosterol biosynthesis in *Aspergillus nidulans*

○高城 景子[1]、福嶋 真輝恵[1]、福田 良一[1,2]、堀内 裕之[1,2] ([1]東大院・農生科、[2]東大・微生物連携)
○Keiko TAKAGI[1], Makie FUKUSHIMA[1], Ryouichi FUKUDA[1,2], Hiroyuki HORIUCHI[1,2] ([1]Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, Univ. of Tokyo)

生体膜の構成成分であるステロールは、真核細胞に広く存在する生育に必須の脂質であり、動物細胞ではコレステロールが、真菌の細胞ではエルゴステロールが主要なステロールとして存在する。ステロールは、膜の流動性や透過性に関わるほか、膜上にマイクロドメインを形成して情報伝達などに関わると考えられている。真菌のエルゴステロール合成経路に関しては酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を中心に解明が進んでおり、また、エルゴステロール合成に関与する遺伝子の転写制御に関わる因子についても、酵母、糸状菌で報告があるが、その転写制御機構の詳細については未解明である。

糸状菌 *Aspergillus nidulans* のプロテインキナーゼ C（PKC）は生育に必須であり、細胞壁の完全性維持、菌糸生長、形態形成、二次代謝産物の生産制御など様々な現象に関与することが示唆されているが、その機構の詳細は未解明な部分が多い。これまでに我々は *A. nidulans* の PKC である PkcA の活性化型変異体である PkcA (R429A) を高発現する株（R429A 株）を作製し、解析を行った結果、PkcA の活性化条件においてエルゴステロール合成に関わる複数の遺伝子の mRNA 量が減少する傾向がみられていた。そこで今回、糸状菌 *A. nidulans* における PKC とエルゴステロール合成制御の関連について解析を行った。

R429A 株を用いて PkcA 活性化条件における菌体内エルゴステロール量の定量を行ったところ、R429A 株は野生型株に比べエルゴステロール量の低下を示し、PKC がエルゴステロール代謝に関わることが示唆された。また、ステロール結合性色素である Filipin を用いて菌糸の染色を行ったところ、R429A 株では野生型株と比較して PkcA 活性化条件において蛍光の減少を示したものの、細胞膜や菌糸先端への局在については特に異常を示さなかった。

更に、R429A 株の PkcA 活性化条件におけるステロール関連分子種について解析を行ったところ、エステル化されたエルゴステロール（エルゴステロールエステル）の増加がみられた。ステロールエステルは細胞中の脂肪滴に貯蔵される貯蔵脂質であると考えられていることから、脂肪滴を特異的に染色する色素 Nile Red による染色を行ったところ、R429A 株では PkcA 活性化条件で脂肪滴の著しい減少がみられた。

また、*Aspergillus* 属糸状菌においてエルゴステロール合成酵素の転写制御に SrbA、AtrR が転写因子として関わることが報告されており、現在 SrbA、AtrR によるエルゴステロール合成の転写制御と PKC との関連について解析を行っている。

Aspergillus, ergosterol, PKC

発表責任者：堀内　裕之（ahhoriu@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：1C2a06
講演日時：3 月 24 日 10:05～ 1 号館 C2 会場

メタノール資化性酵母 *Candida boidinii* における P-body とメタノール誘導性 mRNA の細胞内動態解析

Intracellular dynamics of P-bodies and mRNAs during methanol-inducible gene expression in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*

○幅田 亜香莉、白石 晃將、由里本 博也、阪井 康能（京大農）
○Akari HABATA, Kosuke SHIRAISHI, Hiroya YURIMOTO, Yasuyoshi SAKAI (Kyoto Univ. of Agric.)

メタノール資化性酵母 *Candida boidinii* はメタノールを唯一の炭素源・エネルギー源として生育できる。*C. boidinii* をメタノール培地で培養するとアルコールオキシダーゼ（AOD）やジヒドロキシアセトンシンターゼ（DAS）などメタノール代謝に関わる酵素群が顕著に誘導され、ペルオキシソームが発達することが知られているが、これらメタノール誘導性遺伝子の mRNA 動態制御に関する知見はない。Processing body（P-body）は、未翻訳 mRNA 及び様々な RNA 結合タンパク質によって構成される膜のない顆粒構造体であり、細胞質 mRNA の分解、貯蔵などの品質管理を担うことが知られている。本研究では、*C. boidinii* における P-body とメタノール誘導性 mRNA の細胞内動態から P-body のメタノール誘導性遺伝子発現に対する制御機構を明らかにすることを目的とした。

C. boidinii ドラフトゲノムより P-body 局在タンパク質 Dcp2、Edc3、Pat1 のホモログ遺伝子を同定した。Dcp2-Venus 発現株をグルコース培地からメタノール培地へシフトすると、3 時間後に P-body 数の減少が認められ、その後再び増加した。同様の実験を P-body 構成因子である Edc3 と Pat1 の遺伝子破壊株を用いて行ったところ、*edc3Δ* 株、*edc3Δpat1Δ* 株においては P-body の初期形成は完全に阻害され、*pat1Δ* 株においては、メタノールシフト 3 時間後の P-body 数が野生株よりも著しく減少していた。また *edc3Δ* 株及び *edc3Δpat1Δ* 株においてはメタノール適応時における *AOD1* 及び *DAS1* の mRNA 量の増加が見られたが、*pat1Δ* 株ではこれらの mRNA 量が低下し、タンパク質レベルにおいても AOD 及び DAS の誘導遅延が確認された。これらの結果より、*C. boidinii* において Edc3 はメタノール適応時の P-body 形成に重要であり、Pat1 は P-body 動態制御に関与し、メタノール誘導性遺伝子の発現を正に制御していることが示唆された。さらに、*AOD1* 及び *DAS1* mRNA 可視化株を作成し、本株をグルコース培地からメタノール培地へシフトすると、3 時間後に mRNA 顆粒数が減少し、その後再び増加するという P-body と同様の挙動を示した。以上の結果より、P-body はメタノール誘導性遺伝子の mRNA の細胞内動態制御に関与していると考えられ、現在メタノール培養時の mRNA、P-body、ペルオキシソームそれぞれの局在、相互作用について解析を進めている。

methylotrophic yeast, *Candida boidinii*, P-body

講演番号：1C2a07
講演日時：3 月 24 日 10:16～ 1 号館 C2 会場

転写因子 Mxr1 による *Komagataella phaffii* のメタノール濃度に応じた遺伝子発現制御機構
Regulation of a transcription factor Mxr1 involved in methanol-dependent gene expression in *Komagataella phaffii*

○井上 紘一、大澤 晋、由里本 博也、阪井 康能（京大農）
○Koichi Inoue, Shin Osawa, Hiroya Yurimoto, Yasuyoshi Sakai (Kyoto Univ. of Agric.)

【背景・目的】

メタノール資化性酵母 *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) はメタノールによって特異的かつ強力に誘導されるプロモーターを有しており、このメタノール誘導性遺伝子プロモーターは、異種タンパク質生産のために広く利用されている。メタノール誘導性遺伝子の発現には、転写因子 Mxr1 によって制御されメタノールに依存しない脱抑制と、転写因子 Mit1, Trm1, Hap 複合体により制御されメタノール濃度に依存するメタノール誘導の 2 段階の活性化段階があると考えられている。これまでに、細胞表層においてメタノール濃度の感知に寄与する Wsc1, Wsc3 からのメタノールシグナルは、cell wall integrity 経路における Pkc1 から分岐して Mxr1 に伝達されることが明らかになりつつあるが、Mxr1 によるメタノール濃度に応じた遺伝子発現制御やメタノール濃度情報のシグナル伝達の分子機構については不明であった。本研究では、メタノール濃度に応じた遺伝子発現制御における Mxr1 の役割を明らかにするために、Mxr1 のタンパク質量とリン酸化について解析した。

【方法・結果】

K. phaffii をグルコース培地からメタノール培地に移した際、Mxr1 のタンパク質量が減少するとともにメタノール濃度依存的に変動し、メタノール濃度 0.1%で最もタンパク質量が多く、これよりも低濃度および高濃度ではタンパク質量が減少することをウエスタンブロットにより明らかにした。このメタノール濃度依存的な Mxr1 の量制御が、メタノール誘導性遺伝子の転写量に反映されていると考えられる。一方、qRT-PCR の結果より、*MXR1* の転写量はメタノール濃度によらず一定であったことから、Mxr1 の量制御は翻訳もしくは翻訳後に行われることが明らかになった。また、菌体をグルコース培地からメタノール培地に移すと、Mxr1 のリン酸化レベルが顕著に減少した。Mxr1 がメタノール濃度依存的に脱リン酸化される可能性が考えられたため、メタノール濃度と Mxr1 のリン酸化レベルの関係について Phos-tag SDS-PAGE や anti-phosphoserine 抗体などを用いたウエスタンブロット解析を行っている。

Transcriptional factor, Methylotrophic yeast, Gene expression regulation

発表責任者：阪井康能（ysakai@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：1C2a08
講演日時：3 月 24 日 10:27～ 1 号館 C2 会場

高濃度エタノールストレスによる酵母タンパク質の変性とプロテオスタシスにおける Btn2 の関与
Btn2 is involved in yeast proteostasis during the recovery process from severe ethanol stress

加藤 沙枝、○井澤 真吾（京都工繊大院・応生）
Sae KATO, ○Shingo IZAWA (Kyoto Inst. Technol. Appl. Biol.)

【目的】出芽酵母の Btn2 は熱ショックなどによる変性タンパク質の核内封入体である INQ の形成に関与することが近年報告されており、細胞内タンパク質の品質管理において何らかの役割を担うと考えられている(Miller *et al.*, 2015)。*BTN2* は非ストレス条件下でほとんど発現していないが、熱ショックによってその発現が誘導されるほか、高濃度エタノール(10% v/v)による翻訳抑制下でも選択的・優先的に翻訳され発現レベルが上昇する(Yamauchi and Izawa, 2016)。ストレスによる翻訳抑制下でも優先的に発現する遺伝子の産物は、ストレスへの対処において緊急性を要する重要な役割を担っていると考えられているが、高濃度エタノールストレス下での Btn2 の生理的機能などはよくわかっていない。本研究では、*BTN2* の発現が誘導される高濃度エタノール条件下でも、熱ショックと同様に変性タンパク質の増加・蓄積が引き起こされるのか検証するとともに、欠損株などを用いて Btn2 の関与を検討した。
【結果・考察】10% エタノールストレス下でも熱ショックと同様に、aggregase である Hsp104 や Hsp70/Sis1 などの凝集体が形成された。また、不溶性タンパク質やユビキチン化されたタンパク質のレベルも顕著に増加したことから、高濃度エタノールストレス下でも変性タンパク質の蓄積が引き起こされることが明らかとなった。一方、野生株やオートファジー欠損変異株ではエタノールの除去によって変性タンパク質が速やかに減少したのに対し、プロテアソーム阻害剤 MG132 存在下や Btn2 欠損株、Hsp104 欠損株では変性タンパク質の蓄積が継続することが観察された。これらの結果から、高濃度エタノールにより酵母細胞内で変性タンパク質が蓄積し、その効率的な処理には Btn2 や Hsp104 を介したユビキチン-プロテアソーム系が必要であることが強く示唆された。ストレス下でのユビキチン-プロテアソーム系の活性化については、ROQ1 を介したストレス応答性の変性タンパク質分解系(SHRED pathway)が提唱されている (Szoradi *et al*., 2018)。現在、高濃度エタノールストレス下でも SHRED pathway の活性化が誘導されるのか検証を行っている。
【参考文献】Miller *et al*. (2015) *EMBO. J*., **34**, 778-797; Yamauchi and Izawa (2016) *Front. Microbiol*., **7**, 1319; Szoradi *et al.* (2018) *Mol. Cell*, **70**, 1025-1037.

Btn2, proteostasis, ethanol stress

発表責任者：井澤真吾（thioredoxin@kit.ac.jp）

講演番号：1C2a09
講演日時：3 月 24 日 10:38～ 1 号館 C2 会場

大気圧低温プラズマによる効率的殺菌法の開発：高いストレス耐性を持つメラニン産生真菌に対する効果

Fungicidal activity of cold atmospheric pressure plasma against melanized fungi *Aureobasidium pullulans*

○福田 志津[1]、川﨑 祐子[1]、井澤 真吾[2]（[1]同志社女子大院生科、[2]京都工繊大院応生）
○Shizu FUKUDA[1], Yuko KAWASAKI[1], Shingo IZAWA[2]（[1]Doshisha Women's College of Liberal Arts, [2]Kyoto Inst. Technol. Appl. Biol.）

大気圧低温プラズマ(cold atmospheric pressure plasma, CAP)は常温常圧で電離したガスであり、反応性が高く殺菌およびウィルスの不活化効果を持つ。CAP は熱変性を引き起こさず残留物質の問題もないため、生鮮食品や医療分野の新しい殺菌方法として注目を集めている。これまでに我々は、CAP 照射に伴い *Saccharomyces cerevisiae* の細胞内で酸化的ストレスや翻訳抑制、タンパク質の変性・凝集などが惹起され、効率的に殺菌されることを報告している(Itooka *et al*., 2016; 2018)。様々な微生物種に対する CAP の殺菌効果が数多く報告される中で、メラニンを産生する真菌に対する殺菌効果は未だ報告されていない。メラニン産生真菌は高いストレス耐性を示すことが知られており、チェルノブイルの原発廃炉内ですらその生育が確認されている。メラニン産生真菌の一つである *Aureobasidium pullulans* は黒酵母とも呼ばれ、広範囲に分布する日和見病原性真菌である。本研究では、*A. pullulans* NBRC 6353 に対する CAP の殺菌効果を検証した。

メラニンを蓄積した *A. pullulans* は H_2O_2 (80 or 100 mM)や熱ストレス(46˚C)に対し高い耐性を示したが、培地への硫安添加によってメラニン合成を抑制すると、そのストレス耐性は失われた。また、メラニンを蓄積した *A. pullulans* 細胞は CAP に対しても高い耐性を示したが、メラニン合成が抑制された細胞は *S. cerevisiae* と同様に CAP 照射によって速やかに死滅し、メラニンが CAP 照射に対して強い防御効果を持つことが確認された。

メラニン蓄積細胞に対する CAP の殺菌効果が不十分であったため、その改善を検討した。CAP は大気中の水分と反応して H_2O_2 を生じることから、二価鉄存在下では Fenton 反応を誘導することが期待された（Fenton 反応は二価鉄を触媒として H_2O_2 から hydroxyl radical が生じる反応である）。そこで、メラニンを蓄積した *A. pullulans* を $FeCl_2$ や $FeSO_4$ を含む緩衝液に懸濁して CAP を照射したところ、顕著な殺菌効果の改善が認められた。CAP-Fenton 反応のシナジー効果によって殺菌効果が改善されたと考えられ、メラニン産生真菌などのストレス耐性菌を殺菌する上で二価鉄溶液の塗布が簡便で有効な手段だと考えられた。

【参考文献】

Itooka *et al*. (2016) *Appl. Microbiol. Biotechnol*., **100**, 9295-9304
Itooka *et al*. (2018) *Appl. Microbiol. Biotechnol*., **102**, 2279-2288

cold atmospheric pressure plasma, melanin, Fenton reaction

講演番号：1C2a10
講演日時：3 月 24 日 10:49～ 1 号館 C2 会場

メチルグリオキサールの生成を介したジヒドロキシアセトンによる出芽酵母の細胞増殖阻害
Inhibitory effect of dihydroxyacetone on cell growth of the budding yeast through the formation of methylglyoxal

○野村 亘[1,2]、青木 美穂[3]、後藤 剛[1,2]、河田 照雄[1,2]、井上 善晴[3]（[1]京大院・農・食品生物、[2]京大・生理化学研究ユニット、[3]京大院・農・応生科）
○Wataru NOMURA[1,2], Miho AOKI[3], Tsuyoshi GOTO[1,2], Teruo KAWADA[1,2], Yoshiharu INOUE[3] ([1]Div. of Food Sci. & Biotechnol., Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ., [2]Research Unit for Physiological Chemistry, [3]Div. of Appl. Life Sci., Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ.)

最小のケトースであるジヒドロキシアセトン（DHA）は、出芽酵母 *S. cerevisiae* においてはジヒドロキシアセトンキナーゼ（Dak1/2）によりリン酸化されてジヒドロキシアセトンリン酸となり、解糖系へ流入する。しかしその一方で、これまでにいくつかの微生物種において、高濃度の DHA が細胞毒性を発揮することが報告されている。出芽酵母は出芽を伴う極性成長によって細胞増殖するが、高濃度 DHA は出芽酵母の極性成長を阻害する。そのメカニズムとして、DHA 代謝で生じるホルムアルデヒドの関与が指摘されているが、高濃度 DHA による細胞増殖阻害の具体的なメカニズムについては良くわかっていない。一方、DHA は非酵素的にメチルグリオキサール（MG）に変換されることが知られている。MG は解糖系から派生する 2-オキソアルデヒドであるが、その反応性の高さから、代謝性ストレス因子として様々な疾患と関連する。また、我々は以前、MG が細胞極性に重要なアクチン極性を脱極性化することを見出している（*Mol. Cell. Biol.* 35:1269-1280, 2015）。そこで今回、DHA が引き起こす細胞増殖阻害における MG の関与について検討を行った。

細胞増殖阻害における DHA と MG の相関性を検証したところ、MG 代謝酵素（Glo1、Gre2、Gre3）の欠損株が DHA に対して高い感受性を示すこと、ならびに DHA 処理により細胞内 MG レベルが上昇することを見出した（*Biochem. J.* 475:2637-2652, 2018）。また、アクチン細胞骨格について、DHA は MG と同様にアクチン極性の脱極性化を引き起こした。DHA によるこれらの表現系は *DAK1* の過剰発現により抑圧された。さらに、DHA ならびに MG が核分裂を阻害することを新たに見出した。これらのことから、DHA による出芽酵母の極性成長阻害に MG が関与すること、ならびにその阻害機構にアクチンの脱極性化および核分裂の阻害が関わることが示唆された。

dihydroxyacetone, methylglyoxal, yeast

講演番号：1C2a11
講演日時：3 月 24 日 11:10～ 1 号館 C2 会場

メタボロミクスアプローチによる非常用酵母の凍結耐性関連代謝物の推定

Metabolomics approach revealed freeze-tolerant associate metabolites in non-conventional yeasts

○菊池 成真、森本 一輝、浅野 祐史、小西 正朗（北見工大）
○Narumi KIKUCHI, Kazuki MORIMOTO, Masashi ASANO, Masaaki KONISHI (Kitami Inst. Tech.)

冷帯及び亜寒帯の環境酵母(非常用酵母 non-conventional yeast, NCY)は冬季の凍結ストレスに適応するための耐性を持っている可能性があるが、その研究は十分行われていない。我々はオホーツク圏の自然環境中から分離した NCY の一部が既存の凍結耐性酵母より強い凍結耐性を持つことを明らかにしているが、それらの酵母の凍結耐性機構はわかっていない。先行研究では、*Saccharomyces cerevisiae* が細胞内に糖アルコールや L-プロリンなどの低分子代謝物を蓄積することで凍結ストレスを緩和することが知られている。本研究では、凍結耐性に関与する代謝物に着目し、代謝産物組成と凍結耐性の関連性について解析し、凍結耐性に関与する成分について調査した。

独自に分離した NCY(*Zygosaccharomyces rouxii* SRT88 株, *Metschnikowia kunwiensis* KRF61 株)、それらと同種の対照株(*Z. rouxii* NBRC0740, NBRC1733, *M. kunwiensis* CBS9067, CBS9679)を用いた。凍結耐性試験は、YM 培地で培養後、濁度(OD_{600})が 1 になるように希釈し、-30°C で一晩凍結した後で 30°C, 10 min 融解する操作を繰り返して凍結融解操作前後で生菌数変化から半致死凍結回数(LF_{50})を算出することにより評価した。メタボローム解析では代謝物の変化を防ぐため、菌体を回収後に素早く凍結乾燥した。凍結乾燥菌体を 5 mg に調整し、抽出溶媒(メタノール/クロロホルム/水 =5/2/2)、内部標準物質（リビトール 60 µL, 0.2 mg/mL）を加えてガラスビーズでホモジナイズした。上清を新しいチューブに移し、超純水を加えて遠心後、上層(極性層)を凍結乾燥した。メトキシアミン塩酸塩を添加し、30°C, 90 min 保温した後、MSTFA を加えて 37°C, 30 min 保温し、水溶性代謝物をトリメチルシリル化した。これらのサンプルを GC/MS で分析した。分析データは PCA，PLS-R 法で解析した。

Z.rouxii SRT88 株とコントロール株(NBRC0740, NBRC1733)の半致死凍結回数 LF_{50} はそれぞれ 3.75 回、0.90 回、2.39 回であり、凍結耐性に明らかな違いが認められた。メタボローム解析の結果、SRT88 株は対照株 2 種に比べ、糖アルコール(グリセロール、マンニトール、*myo*-イノシトールなど)を多く蓄積していた。SRT88 株は糖アルコールを多量に蓄積することで凍結耐性が高くなることが示唆された。また、*M. kunwiensis* KRF61 株とコントロール株(CBS9067, CBS9679)の LF_{50} はそれぞれ 7.73 回、13.33 回、10.55 回となり対照株のほうが高い凍結耐性を示した。メタボローム解析では、コントロール株 2 種にのみ L-プロリンが蓄積されていた。よって、L-プロリンを多く蓄積しているほど凍結耐性が高くなることが考えられた。いずれの株も凍結前後で胞子形成は確認できなかった。この結果より、同種の NCY 内でも株間で凍結耐性能が異なり、多様な代謝産物が関係している可能性が示唆された。

freeze tolerant, taxonomy, metabolomics

発表責任者：小西正朗（konishim@mail.kitami-it.ac.jp）

講演番号：1C2a12
講演日時：3 月 24 日 11:21～ 1 号館 C2 会場

酵母での一酸化窒素合成における NADPH の必要性の解析
Analysis of NADPH requirement for nitric oxide synthesis in yeast

○吉川 雄樹、那須野 亮、多和田 健人、高木 博史（奈良先端大、バイオ）
○Yuki YOSHIKAWA, Ryo Nasuno, Kento Tawada, Hiroshi Takagi (NAIST, Biological Science)

一酸化窒素（NO）は、微生物から哺乳類に至るまでの生物において、様々な生命現象に関与するシグナル伝達物質である。哺乳類では NO 合成酵素（NOS）によって、アルギニンを基質として２段階の酸化反応で NO とシトルリンを合成する。また、哺乳類の NOS は NADPH からの電子の受け渡しを行うレダクターゼドメインと、基質の結合と酸化を行うオキシゲナーゼドメインから構成される。

一方、高等生物のモデルとして、また種々の発酵・醸造食品の製造に重要な微生物である酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においては、過酸化水素処理条件下で NO が産生されるが、哺乳類型 NOS の阻害剤であるアルギニンアナログを処理することで NO 生成量が顕著に低下することから、哺乳類の NOS に類似した NO 合成機構が存在すると考えられている。しかし、酵母のゲノム上には哺乳類型 NOS のオルソログは存在しないため、酵母における NO 合成機構には未だ不明な点が多い。

これまで当研究室において、過酸化水素処理に伴う NO 合成にフラボタンパク質 Tah18 が関与すること、さらに Tah18 と相互作用することが知られている鉄硫黄クラスタータンパク質 Dre2 は、Tah18 の機能とは異なり、NO 合成を抑制することを見出した。さらに、過酸化水素処理条件下において、Tah18 と Dre2 の複合体が迅速に解離することを明らかにした。Tah18 は一次構造上、哺乳類型 NOS のレダクターゼと類似した配列を有しているが、オキシゲナーゼに相当する配列は存在せず、Tah18 単独では NOS 様活性を示さない。一方で、Tah18 は NADPH を基質として電子を Dre2 へと伝達することで、鉄硫黄クラスタータンパク質の合成に寄与する。これらの知見から我々は、「通常、Tah18 と Dre2 が複合体を形成し、Dre2 へと電子が伝達される。しかし、過酸化水素処理に伴って Dre2 が解離することで Tah18 は NOS のオキシゲナーゼに相当するタンパク質へと電子を伝達することで NO 合成に寄与する」といったモデルを提唱している。このモデルに示すように、Tah18 は哺乳類型 NOS のレダクターゼドメインと同様に、NADPH から電子を伝達することで NO 合成に寄与することが推測された。しかし、実際に酵母における NO 合成に NADPH が必要であるかは不明であった。そこで本研究では、NADPH 代謝との関連が推定されるタンパク質について、各遺伝子の破壊株を作製し、NO の蛍光プローブとフローサイトメーターを用いて NO 合成能の評価を行った。その結果、NADPH 代謝関連酵素が NO 合成に重要であることが示された。現在、NO 合成にその NADPH 代謝関連酵素がどのように関与するか詳細な解析を進めている。

Nitric Oxide, Yeast, NADPH

発表責任者：吉川　雄樹（y-yoshikawa@bs.naist.jp）

講演番号：1C2a13
講演日時：3 月 24 日 11:32～ 1 号館 C2 会場

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における *S*-ニトロソ化修飾を介した一酸化窒素の生理的役割
S-nitrosylation-mediated physiological role of nitric oxide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*
○示野 誠也、吉岡 奈津子、吉川 雄樹、那須野 亮、高木 博史（奈良先端大・バイオサイエンス）
○Seiya SHINO, Natsuko YOSHIOKA, Yuki YOSHIKAWA, Ryo NASUNO, Hiroshi TAKAGI (NAIST Biological science)

【目的】一酸化窒素（NO）は様々な生物において多くの生命現象に関わるシグナル伝達物質である。哺乳類において、NO は可溶性グアニル酸シクラーゼ（sGC）の活性化を介して様々な生理機能に関与していることが知られている。また、NO はタンパク質システイン残基のチオール基を直接的に *S*-ニトロソ（SNO）化修飾することで、タンパク質の機能を調節する。近年、当研究室では、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、高温や過酸化水素処理に応答して NO が合成され、細胞保護や細胞死を誘導することを見出した。しかし、NO の生理的役割や作用機序には依然として不明な点が多い。酵母ゲノム上には sGC のオルソログが保存されていないことから、タンパク質の SNO 化が主な生理機能の発現機序と考えられる。そこで、本研究では、SNO 化タンパク質の網羅的解析法を確立し、生理的条件下において酵母細胞内で SNO 化されるタンパク質を同定・解析することで、NO の生理的役割とその作用機序を明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】動植物において SNO 化修飾の解析には、SNO 化タンパク質を特異的にビオチン化するビオチンスイッチ（BS）法が広く用いられており、ビオチン化タンパク質はアビジン結合樹脂を用いたプルダウンによって精製が可能である。まず、BS 法を応用して SNO 化タンパク質のスクリーニング法の構築を試みた。酵母細胞から抽出したタンパク質溶液を、生体内において NO ドナーとして作用する *S*-ニトロソグルタチオン（GSNO）で処理し、BS 法に供した後、抗ビオチン化抗体によるウェスタンブロットを行った。その結果、GSNO 処理依存的なビオチン化、即ち SNO 化タンパク質レベルの顕著な増加を確認した。また、アビジン結合樹脂を用いて精製したビオチン化タンパク質を液体クロマトグラフ質量分析（LC-MS/MS）に供し、SNO 化されると考えられるタンパク質を多数同定した。また、従来の BS 法は、アビジン結合樹脂からの溶出時にビオチン修飾基が除去されるため、MS 解析によりビオチン化残基（SNO 化部位）を直接同定することは不可能であった。そこで我々は、この欠点の改良を試み、ビオチン化シグナルを保持したタンパク質の精製方法を確立した。さらに、実験手技や BS 法の工程に由来する誤差をなくすために、安定同位体標識した窒素源を用いた方法を採用することで、定量性を向上した解析手法の確立にも成功した。現在、過酸化水素処理により NO 合成を誘導した酵母細胞を用いて、SNO 化タンパク質の網羅的解析を行っている。
本発表では、これらの解析手法の紹介とともに、現在までに得られている解析結果から、考えられる NO の生理的役割やその作用機序について議論する。

S-nitrosylation, Nitric oxide, *Saccharomyces cerevisiae*

講演番号：1C2a14
講演日時：3 月 24 日 11:43～ 1 号館 C2 会場

酵母の鉄硫黄クラスタータンパク質合成に関わるジフラビンレダクターゼ Tah18 と相互作用するタンパク質の解析

Novel interaction proteins of the diflavin reductase Tah18 involved in Fe-S cluster protein biogenesis in yeast

○多和田 健人、山口 悠太、吉川 雄樹、那須野 亮、高木 博史 (奈良先端大 バイオ)
○Kento TAWADA, Yuta YAMAGUCHI, Yuki YOSHIKAWA, Ryo NASUNO, Hiroshi TAKAGI (NAIST)

【目的】

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、様々な発酵生産に用いられる産業微生物であるとともに、高等真核生物のモデル生物としても有用であるため、酵母の環境ストレス応答を理解することは基礎・応用の両面で重要である。近年、当研究室では、ジフラビンレダクターゼ Tah18 依存的に合成される一酸化窒素（NO）が、高温からの細胞保護や過酸化水素依存的な細胞死誘導に寄与することを報告した。Tah18 は鉄硫黄クラスタータンパク質 Dre2 と複合体を形成し、NADPH から Dre2 に電子を伝達することで、細胞質の鉄硫黄クラスタータンパク質の合成に関与する。当研究室では最近、Tah18 が Dre2 から解離することで NO 合成に寄与することを見出したが、Tah18 は単独では NO 合成活性を示さないため、現在のところ、Tah18 が Dre2 以外のタンパク質と相互作用することで NO 合成に寄与すると考えている。これらのことは、Tah18 には Dre2 以外のタンパク質と相互作用することで、鉄硫黄クラスタータンパク質合成以外の機能があることを示唆している。そこで本研究では、Tah18 の新規相互作用タンパク質を探索・同定し、その機能を解析することを目的とした。

【方法・結果】

まず、N 末端に 6×His タグを融合した Tah18 を過剰発現する酵母株（His-Tah18 株）を構築した。対数期まで増殖させた細胞を過酸化水素処理したサンプルと未処理のサンプルを調製し、抽出液を Ni 樹脂によるプルダウンアッセイに供した。イミダゾールによる溶出画分を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、含まれるタンパク質を LC-MS/MS により同定した。タグを融合していない Tah18 を過剰発現する株で同様の操作を行い、His-Tah18 株でのみ検出されたタンパク質を Tah18 の相互作用タンパク質候補とした。続いて、各候補タンパク質の C 末端に HA タグを、Tah18 の N 末端に EGFP をそれぞれ融合したタンパク質を共過剰発現する株を構築し、抗 EGFP 抗体結合樹脂を用いた共免疫沈降とウェスタンブロットにより上記スクリーニング結果の再現性を確認した。その結果、*S*-アデノシルメチオニン（SAM）シンテターゼ Sam2 が、過酸化水素処理条件下において Tah18 と相互作用することが明らかとなった。現在、*SAM2* およびそのパラログである *SAM1* の両遺伝子欠損株における Tah18 依存的 NO 合成活性や鉄硫黄クラスタータンパク質合成活性、細胞死誘導能を評価するとともに、*TAH18* の発現抑制が SAM 含量や Sam2 活性に及ぼす影響を解析している。

Saccharomyces cerevisiae, diflavin reductase Tah18, *S*-adenosylmethionine synthetase Sam2

発表責任者：多和田　健人（tawada.kento.tz6@bs.naist.jp）

講演番号：1C2a15
講演日時：3 月 24 日 11:54～ 1 号館 C2 会場

酵母を用いた神経変性疾患に関わる凝集タンパク質の分解機構の解析

Analysis of degradation mechanism of aggregated proteins involved in human neurodegenerative disease using yeast

○棚橋 亮弥、渡辺 大輔、高木 博史（奈良先端大学 先端科学技術）
○Ryoya TANAHASHI, Daisuke WATANABE, Hiroshi TAKAGI (NAIST)

タンパク質分解系の破綻により生じる凝集タンパク質は、パーキンソン病や筋萎縮性側索硬化症（ALS）などの神経変性疾患に深く関与している。凝集タンパク質の分解機構を解明するため、我々はこれまでに、パーキンソン病に関与するヒト α-シヌクレインを酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において過剰発現することにより、生育阻害が誘発されるパーキンソン病モデル実験系を構築した。本実験系を用いた解析により、真核生物に広く保存された酵母の Nedd4 ファミリーユビキチンリガーゼ Rsp5 が α-シヌクレインの分解調節に関与することを明らかにした。しかしながら、Rsp5 による α-シヌクレインの分解調節機構が様々な凝集タンパク質に共通するかどうかは不明である。そこで今回、ALS の原因の一つとして知られるヒト TDP-43 タンパク質を用いて、酵母の ALS モデル実験系を構築するとともに、Rsp5 による凝集タンパク質の分解調節機構を解明することを目的とした。

まず、パーキンソン病モデル実験系と同じく TDP-43 を酵母細胞内で過剰発現させる ALS モデル実験系を構築した。当実験系における TDP-43 の動態と酵母の生育について解析したところ、TDP-43 が細胞内で凝集し、酵母の生育が阻害されることが明らかになった。また、本実験系を用いて Rsp5 内のアミノ酸置換が TDP-43 の分解に及ぼす影響について解析した。これまでに当研究室では、Rsp5 による基質認識に必須な WW ドメインの機能欠損変異（$rsp5^{A401E}$）が、α-シヌクレインの蓄積により酵母の生育を顕著に阻害すること、一方、WW ドメイン上のアミノ酸置換（$RSP5^{P343S}$）が α-シヌクレインのユビキチン化と分解を促進し、機能獲得変異として機能することを見出している。これらの変異が TDP-43 の過剰発現により引き起こされる毒性に及ぼす影響を調べたところ、$rsp5^{A401E}$ 変異により TDP-43 の凝集が促進し、酵母の生育が著しく阻害されること、一方で $RSP5^{P343S}$ 変異により TDP-43 の凝集は減少し、酵母の生育が回復することが明らかになった。さらに、これらの変異による TDP-43 の分解への影響について検討したところ、$rsp5^{A401E}$ 変異により TDP-43 の分解は抑制されたのに対し、$RSP5^{P343S}$ 変異により TDP-43 の分解は促進されることを見出した。以上の結果から、Rsp5 の基質認識能が TDP-43 の分解に重要な役割を果たしていることが示唆された。パーキンソン病モデル実験系での知見と併せて考えると、Nedd4 ファミリーユビキチンリガーゼの WW ドメインを介した凝集タンパク質の認識に、共通のメカニズムが存在する可能性が示された。現在、Rsp5 と凝集タンパク質間の相互作用および Rsp5 による凝集タンパク質のユビキチン化について、さらなる解析を進めている。

Rsp5, Tdp-43, ubiquitin

発表責任者：棚橋　亮弥（tanahashi.ryoya.ti3@bs.naist.jp）

講演番号：1C2p01
講演日時：3 月 24 日 13:50～ 1 号館 C2 会場

絶対嫌気性菌 *Clostridium acetobutylicum* の O_2 存在下における生育停止機構に関する研究
Mechanisms of growth cessation of *Clostridium acetobutylicm* in the presence of O_2.
○鈴木 裕之[1]、田島 怜[1]、永塚 健司[1]、宇津 智晴[1]、赤間 拓海[1]、岡田 拓也[1]、佐藤 拓海[1,2]、新村 洋一[1,2]、川崎 信治[1,2] ([1]東農大バイオ、[2]東農大微生物)
○Hiroyuki SUZUKI[1], Ryo TAZIMA[1], Kenzi NAGATUKA[1], Tomoharu UTU[1], Takumi AKAMA[1], Takuya OKADA[1], Takumi SATO[1,2], Yoichi NIMURA[1,2], Shinzi KAWASAKI[1,2] ([1]TUA bio., [2]TUA microbiol.)

【 目的 】

絶対嫌気性菌は大気 O_2 濃度が 1 %下ではコロニーを形成できないという特徴を持つ。O_2 存在下で生育が阻害される原因として、呼吸鎖や活性酸素種を分解する酵素系の欠如などが推察されてきたが、未だその原因は不明である。当研究チームでは絶対嫌気性菌が O_2 存在下で生育が阻害される原因の解明を目的として研究を行っている。代表的な絶対嫌気性菌である *Clostridium* 属細菌は、低濃度の気相 O_2 濃度下では全ての O_2 を消費した後に嫌気条件下とほぼ同様の生育を開始した。O_2 消費機構についてはアセトンブタノール発酵菌の *C. acetobutylicum* において O_2 存在下で発現誘導される複合酵素系が同定され、O_2 や活性酸素種を水へと還元無毒化する。以上のことから同菌は ①O_2 存在下において生存性を有し、②O_2 や活性酸素種による直接の毒性とは異なる要因によって生育停止することが示唆された。昨年度の農芸化学大会では、O_2 存在下において生育を停止中の菌体に生存性が示唆されることを報告した。本学会では O_2 や活性酸素種による生育停止機構の解明を目的として、生育停止中の *C. acetobutylicum* 菌体において特異的に発現変化するタンパク質について解析したので報告する。

【 方法・結果 】

C. acetobutylicum を嫌気条件下および O_2 存在下で液体振とう培養を行ったところ、O_2 濃度に応じて異なる生育挙動が観察された。また、O_2 の代謝産物である H_2O_2 を添加し培養を行ったところ、O_2 存在下で観察された生育挙動に類似する挙動が観察された。O_2 と H_2O_2 処理時の生理状態に着目してプロテオーム解析を行ったところ、酸化ストレス下で特異的な挙動を示す二つのタンパク質が検出され、*C. acetobutylicum* の酸化ストレス下での生育停止要因の一つであることが示唆された。現在、この二つのタンパク質の酸化ストレス応答に関して詳細な解析を行っている。

1）赤間ら　2018 年度　農芸化学大会

Clostridium, oxidative stress, anaerobe

講演番号：1C2p02
講演日時：3 月 24 日 14:01～ 1 号館 C2 会場

Clostridium 属細菌の O_2 存在下における生育停止機構について
Mechanisms of Clostridial growth cessation by oxygen.
○田島 怜[1]、鈴木 裕之[1]、宇津 智晴[1]、西尾 匠人[1]、藤近 友三郎[1]、赤間 拓海[1]、佐藤 拓海[2]、新村 洋一[1]、川崎 信治[1] ([1]東農大バイオ、[2]東農大微生物)
○ RYO TAJIMA[1], HIROYUKI SUZUKI[1], TOMOHARU UTSU[1], TAKUTO NISHIO[1], TOMOSABUROU FUJICHIKA[1], TAKUMI AKAMA[1], TAKUMI SATOH[2], YOICHI NIIMURA[1], SHINJI KAWASAKI[1] ([1]TUA bio., [2]TUA microbiol.)

【 目的 】

嫌気性菌の研究は北里柴三郎が破傷風菌(*Clostridium tetani*)の純粋培養を成功させたことから始まる。近年各種醗酵産業やプロバイオティクス等の健康分野で注目され盛んに研究が行われているが、100 年以上たった現在も難培養という性質上培養できない嫌気性細菌は多々存在している。これまで絶対嫌気性菌は活性酸素消去酵素を欠如する O_2 に弱い生物と考えられていたが、当研究グループにおいて代表的な絶対嫌気性菌である *Clostridium* 属細菌を用いた研究から、自身が消費可能な O_2 量であれば O_2 を消費し、消費後は嫌気条件下とほぼ同等の生育を示すことが観察された。またアセトンブタノール発酵菌の *C. acetobutylicum* から O_2 や活性酸素種を高速に水へと還元的に無毒化する複合酵素系が同定された [1)]。その後の研究で、絶対嫌気環境で生育中の *C. acetobutylicum* に O_2 や H_2O_2 を付与して培養を行ったところ、生育を停止するが生育停止中の菌体は生存性を有する可能性が示唆された [2)]。そこで本学会では *Clostridium* 属細菌から供試菌を数種類選択し、生育停止機構の共通性と、その分子機構の解明を目的として研究を行った。

【 方法・結果 】

C. acetobutylicum の近縁種である *Clostridium beijerinckii* や *Clostridium butyricum* など数菌種を供試菌として選択し、絶対嫌気条件下と低 O_2 濃度下で液体振盪培養を行い生育を観察した。その結果、*C. acetobutylicum* に類似して O_2 濃度に応じて異なる生育挙動が観察された。また O_2 や H_2O_2 存在下で培養を行った際にも類似する挙動が観察されたことから、*C. acetobutylicum* で観察された生育停止機構が他の *Clostridium* 属細菌にも共通して分布する可能性が示唆された。供試菌を用いて生育停止時のプロテオーム解析を行ったところ、タンパク質の発現に差異が観察され、かつ菌種に固有の発現挙動の特徴も観察された。現在それらタンパク質の同定と機能推定を行っている。

1）Kawasaki *et al.* AEM 75:1021-1029 (2009)
2）赤間ら　2018 年　農芸化学大会

Clostridium, oxidative stress, obligate anaerobe

講演番号：1C2p03
講演日時：3 月 24 日 14:12～ 1 号館 C2 会場

クロストリジウム属に保存されるヘテロタンパク質複合体による芽胞形成制御機構の解析
Sporulation regulation by a heteromeric protein complex conserved in Clostridium

○武藤 真輝[1]、尾花 望[2]、野村 暢彦[3]（[1]筑波大生命環境、[2]筑波大医学系、[3]筑波大生命環境系）
○Naoki MUTO[1], Nozomu OBANA[2], Nobuhiko NOMURA[3] ([1]Tsukuba Univ. of Grad. Sch. Life Environ. Sci., [2]Tsukuba Univ. of TMRC, Fac. Medicine. Sci., [3]Tsukuba Univ. of Fac. Life Environ. Sci.)

病原性クロストリジウム属細菌は芽胞を形成して熱や酸素、抗生物質に対する高い耐性を獲得し、食中毒などの感染症を引き起こす。本属細菌の一種であるウェルシュ菌（*Clostridium perfringens*）は、食中毒の原因菌であり、本菌の病原性の発揮には芽胞形成が必須であると考えられる。しかしながら、本菌の芽胞形成の詳細な制御機構については未だ不明な点が多い。そこで本研究では、新規の芽胞形成・毒素産生制御因子の同定および機能解析を行った。

これまでに我々はウェルシュ菌における様々な毒素の制御遺伝子として *ctrAB* オペロンを同定した（Obana and Nakamura, 2011, J. Bacteriol.）。CtrA および CtrB タンパク質は、生体内でタンパク質複合体を形成して機能する。さらに *ctrAB* オペロンは様々なクロストリジウム属に保存されていることから、本属細菌において共通の機能を有していることが予想された。そこで本タンパク質と芽胞形成の関連を解析するため、ウェルシュ菌 SM101 株を用いて *ctrB* 破壊株を作成した。その結果、*ctrB* は芽胞形成に必須な遺伝子であることが明らかとなった。さらに *ctrB* 破壊株における芽胞形成を経時的に観察したところ、細胞の形態変化は初期段階で停止していた。また *ctrB* 破壊株では、毒素タンパク質であるエンテロトキシン（CPE）の産生量が著しく低下した。*cpe* 遺伝子の転写には芽胞形成に特異的なσ因子であるσ^{E}およびσ^{K}が必須であり、ウェルシュ菌においてσ^{E}およびσ^{K}は芽胞形成の初期段階の進行に必要であることから、経時観察の結果と合わせて、CtrAB は芽胞形成の初期過程の制御に関与することが示唆された。次に、*ctrAB* が制御する遺伝子群を調べるために DNA マイクロアレイ解析を行ったところ、*ctrAB* の約 200 のレギュロンのうち 100 以上の遺伝子が、芽胞形成のマスターレギュレーターである *spo0A* のレギュロンと重複していることが明らかとなった。そこで、両遺伝子同士の発現制御の関係性について調べたところ、CtrAB は Spo0A 発現には大きく影響を与えないことが明らかとなった。また、芽胞形成の開始には Spo0A のリン酸化および活性化が必要であるが、*ctrB* 破壊株ではリン酸化 Spo0A 量が減少していた。以上の結果より、CtrAB は Spo0A のリン酸化を制御していることが示唆された。

以上の結果より、CtrAB タンパク質複合体はクロストリジウム属細菌における新規の芽胞形成・毒素産生制御因子であることが示された。現在は CtrAB による Spo0A のリン酸化制御機構の解析を行っている。

sporulation, regulation, Spo0A

発表責任者：武藤真輝（s1821156@s.tsukuba.ac.jp）

講演番号：1C2p04
講演日時：3 月 24 日 14:23～ 1 号館 C2 会場

c-di-GMP 関連遺伝子が *Paracoccus denitrificans* のバイオフィルム形成に与える影響
The effect of c-di-GMP related gene on biofilm formation in *Paracoccus denitrificans*

○宮崎 俊[1]、森永 花菜[1]、永久保 利紀[3]、尾花 望[2,4]、豊福 雅典[3,4]、野村 暢彦[3,4] ([1]筑波大院・生命環境、[2]筑波大学・医学医療系トランスボーダー医学研究センター、[3]筑波大・生命環境系、[4]筑波大・微生物サステナビリティ研究センター)
○SHUN MIYAZAKI[1], KANA MORINAGA[1], TOSHIKI NAGAKUBO[3], NOZOMU OBANA[2,4], MASANORI TOYOFUKU[3,4], NOBUHIKO NOMURA[3,4] ([1]Grad. Sch. Life Environ., Univ. of Tsukuba, [2]Transborder Medical Research Center, Facalty of Medicine., University of Tsukuba, [3]Fac. Life Environ. Sci., Univ. of Tsukuba, [4]MiCS, Univ. of Tsukuba)

【背景】
微生物はバイオフィルム（BF）と呼ばれる構造体を形成することで自然環境に適応していることが知られている。BF とはある物質表面上に形成する微生物の集合体と、それら微生物が生産する細胞外マトリクス成分（EPS: Extracellular Polymeric Substances）によって構成される。運動性細菌において BF 形成にはいくつかの段階が存在する。まず浮遊状態の細菌はべん毛や繊毛などを用いて物質表面に付着することで、BF 形成を始める。次に増殖と EPS の生産を伴って成熟した BF へと成長し、最後に一部の菌が脱離し浮遊状態に戻ることで一つの形成サイクルが成り立つ。一方、非運動性細菌における BF 形成の分子機構は未解明な点が多い。我々は先行研究において、非運動性グラム陰性細菌で脱窒能力をもつ *Paracoccus denitrificans* の BF 形成に必須な付着性因子を同定している。また、多くのグラム陰性細菌の BF 形成にはセカンドメッセンジャーである c-di-GMP の関与が報告されているが、本菌におけるその役割は未解明な部分が多い。加えて、本菌は c-di-GMP の合成および分解に関わると予想される遺伝子をそれぞれ二つずつ有するが、それらの役割はほとんど知られていない。

【目的】
P. denitrificans の BF 形成における c-di-GMP の役割を解明することを目的とした。

【手法・結果】
c-di-GMP の合成および分解の推定関連遺伝子機能を明らかにするため、それらの各遺伝子を欠損した株および誘導系を導入した株を作製し、高速液体クロマトグラフィー/質量分析（LC/MS）を用いた c-di-GMP 定量を行った。その結果、一つの合成酵素をコードする遺伝子の過剰発現によって細胞内における c-di-GMP の蓄積が確認され、その遺伝子が実際に細胞内において c-di-GMP の合成に寄与することが明らかとなった。また c-di-GMP の推定合成および分解遺伝子が BF 形成に与える影響を解析するため、各株を用いて BF 形成試験を行った。BF の形成量はクリスタルバイオレットによる染色で定量を行い、BF 立体構造形成に与える影響を走査型共焦点レーザー顕微鏡によって観察した。その結果、野生株と欠損株間において BF 立体構造に違いがみられた。したがって、本菌においても c-di-GMP の推定合成および分解遺伝子が BF 構造に関与していることが示唆された。現在、詳細なメカニズムを解析中である。

Biofilm, c-di-GMP, *Paracoccus denitrificans*

講演番号：1C2p05
講演日時：3 月 24 日 14:34～ 1 号館 C2 会場

細胞内封入体がクォラムセンシングに与える影響の解析

The influence of PHA on quorum sensing

○中島 梨花[1]、森永 花菜[2]、安田 まり奈[2]、野村 暢彦[3,4]、豊福 雅典[3,4] ([1]筑波大・生命環境、[2]筑波大院・生命環境科学研究科、[3]筑波大・生命環境系、[4]筑波大・微生物サステイナビリティ研究センター)

○ Rinka NAKASHIMA[1], Kana MORINAGA[2], Marina YASUDA[2], Nobuhiko NOMURA[3,4], Masanori TOYOFUKU[3,4] ([1]School of Life and Environmental Sciences, Tsukuba Univ., [2]Graduate School of Life and Environmental Sciences, Tsukuba Univ., [3]Faculty of Life and Environmental Sciences, Tsukuba Univ., [4]Microbiology Research Center for Sustainability, Tsukuba Univ.)

環境中に存在する多くの細菌は、シグナル物質を介して、菌体密度依存的に遺伝子発現を調節し細胞間コミュニケーションを行っている。この機構をクォラムセンシング(QS)と呼ぶ。QS はシグナル物質が周囲の細菌へ伝達することで成立する。グラム陰性細菌はシグナル物質として、アシル側鎖を持つ *N*-acyl-homoserine lactone (AHL)を産生し、その側鎖の長さは多様性に富んでいる。短鎖 AHL は拡散に優れているが、長鎖の AHL は疎水性が高く、細胞膜に留まりやすいために伝達されにくいと考えられている。

グラム陰性細菌である *Paracoccus denitrificans* は、QS シグナルとして長鎖 AHL である C_{16}-HSL を産生している。当研究室では、本菌が膜小胞に内包された状態で C_{16}-HSL を細胞外に放出することを明らかにした（Toyofuku, *et al.*, 2017, ISME J)。本菌では産生された C_{16}-HSL の約 30%が細胞に蓄積していることも明らかとなった。

一方で、*P. denitrificans* は窒素などの栄養の欠乏下において細胞質内に Polyhydroxyalkanoate (PHA)を合成し、封入体を形成する。PHA とは疎水性の高い高分子ポリマーであり、生分解性プラスチックにも応用されている。蓄積された PHA は細胞質内の 80～90%を占め、栄養飢餓時に細菌自身のエネルギー源となる。こうした PHA の蓄積が細胞の生理状態、とりわけシグナル伝達を撹乱する可能性があるにも関わらず研究されてこなかった。そこで本研究では、PHA と QS のシグナル伝達の関係性を明らかとすることを目的とした。

窒素制限下と非制限下における *P. denitrificans* の QS 活性と PHA 合成量を調べたところ、PHA 合成量が少ない窒素非制限下では QS 活性が観察された。その一方で、PHA が多く合成される窒素制限下では QS 活性が観察されなかった。また、野生株と C_{16}-HSL 非生産株（Δ*pdnI*）の PHA 合成量を比較すると Δ*pdnI* は野生株に比べて約 2 倍以上の PHA を合成した。さらに、QS 活性を持たない Δ*pdnI* に C_{16}-HSL を外部添加すると窒素非制限下では QS 活性の回復が見られたが、窒素制限下では QS 活性の回復は見られなかった。これらの結果から、PHA を多く合成する窒素制限下では QS 活性が低下し、QS も PHA 合成に関わっていることが示された。

本菌は環境に応じて QS をコントロールしていることが考えられ、今後は PHA の蓄積がシグナル伝達に与える影響を明らかにしていく。

cell-to-cell communication, PHA, signals

発表責任者：中島梨花（shima.rinka7@gmail.com）

講演番号：1C2p06
講演日時：3 月 24 日 14:55～ 1 号館 C2 会場

緑膿菌ムコイドバイオフィルムにおける非ムコイド株の出現及び局在の解析
Appearence and localization of WT phenotype in *Pseudomonas aeruginosa* mucoid biofilms
○板垣 香菜子[1]、尾花 望[2,4]、豊福 雅典[3,4]、野村 暢彦[3,4]、Andrew S. Utada[3,4] ([1]筑波大・院・生命環境科学研究科、[2]筑波大・医学医療系・トランスボーダー医学研究センター、[3]筑波大・生命環境系、[4]筑波大・微生物サスティナビリティ研究センター)
○ Kanako ITAGAKI[1], Nozomu OBANA[2,4], Masanori TOYOFUKU[3,4], Nobuhiko NOMURA[3,4], Andrew S. UTADA[3,4] ([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]TMRC, Fac. Med., Univ. Tsukuba, [3]Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [4]MiCS., Univ. Tsukuba)

緑膿菌は環境中に遍在し、免疫力の低下したヒトに感染する日和見細菌として知られている。また、本菌は細胞外マトリクスを産生し、バイオフィルム (BF)を形成する。この BF 形成は感染症の慢性化に関連するため、BF を理解し、制御することが求められている。緑膿菌ムコイド株は、細胞外マトリクスの一種であるアルギン酸産生量が向上した変異株であり、主に嚢胞性繊維症の患者の肺から単離される。本株は、細胞外に産生するアルギン酸で自身を覆うことにより、外部環境ストレス耐性が向上し、疾患の悪化や治療の難治化に寄与することが問題とされている。さらに本株の実際の感染部位においては、ムコイド株と非ムコイド株の混在が明らかにされており、複合 BF が形成される。形質が異なる細胞が集団内に局在することで、BF はより複雑化し、強固となると考えられている。しかしながら、BF 中におけるムコイド株のアルギン酸産生や非ムコイド株への変異についての詳細な知見は少ない。そこで、我々は BF 中におけるムコイド株の生態について、3 次元的かつ 1 細胞レベルでの理解を目的として解析を試みた。

まず、BF 中におけるアルギン酸の局在を共焦点レーザー顕微鏡によって解析した。すると、BF 形成初期では、アルギン酸は繊維状構造を示し、細胞間を架橋していた。一方、成熟した BF 中ではアルギン酸が BF 全体を覆っており、BF 中の全ての細胞がアルギン酸によって保護されていることが示唆された。

次に、BF 中におけるムコイド株からの非ムコイド株の出現とその局在性を解析するため、形質の違いを 1 細胞レベルで可視化できるレポーター株を作成した。本蛍光レポーター株は、アルギン酸産生遺伝子の過剰発現 (ムコイド株)では、細胞は赤色蛍光を発し、一方でアルギン酸産生の遺伝子発現が低下した細胞 (非ムコイド株)は、緑色蛍光を発する。本蛍光レポーター株をセルソーターで 1 細胞ずつ分取したところ、蛍光を反映した形質の細胞が得られることが確認された。この株を用いて、ムコイド株が形成する BF 中における非ムコイド株の出現を空間的に解析した。その結果、コロニーBF 中では、底面部から非ムコイド株が出現することが明らかとなった。また、連続的に培地が供給される流路中の BF 形成を経時的に解析したところ、成熟した BF 中でムコイド株と非ムコイド株の共局在が観察された。BF 内部は様々な選択圧によって変異が生じやすい環境であることが知られており、バイオフィルムの形成条件によってもムコイド株から非ムコイド株の出現とその局在が大きく変化することが示唆された。今後は、非ムコイド株の出現環境要因を探索する予定である。

Biofilm, localization, phenotype

発表責任者：Andrew S. Utada（utada.andrew.gm@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：1C2p07
講演日時：3 月 24 日 15:06～ 1 号館 C2 会場

緑膿菌バイオフィルム形成に伴う自然突然変異株出現の時空間的解析
Spatiotemporal analysis of RecA dependent mutation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms

○伊澤 徹[1]、豊福 雅典[2,3]、清川 達則[1]、楊 佳約[1]、尾花 望[3,4]、野村 暢彦[2] ([1]筑波大学大学院・生命環境科学研究科、[2] 筑波大学・生命環境系、[3] 筑波大学・微生物サステナビリティ研究センター、[4] 筑波大学・医学医療系・トランスボーダー医学研究センター)
○ Toru ISAWA[1], Masanori TOYOFUKU[2,3], Tatsunori KIYOKAWA[1], Jiayue Yang[1], Nozomu OBANA[3,4], Nobuhiko NOMURA[2] ([1]Grad. Sch. of Life Environ., Univ. Tsukuba, [2]Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [3]MiCS, Univ. Tsukuba, [4]Transborder Medical Research Center, Fac. of Medicine, Univ. Tsukuba)

実環境において細菌は集団で生活することが多い。特に多糖をはじめとする細胞外マトリクスに覆われた細菌集団の構造体はバイオフィルムと呼ばれる。細菌がバイオフィルムを形成すると浮遊状態と比較して、細胞の不均一性や種々のストレス耐性が増加するため、その制御が困難になることが知られている。例えば、多様な自然突然変異株が高頻度に出現することが報告されており、その出現は細菌集団の環境適応において大きな役割を果たす一方で、細菌集団制御を困難にする一因であると考えられる。バイオフィルム形成に伴って基質・酸素分圧の勾配や代謝産物の蓄積等、不均一な微小環境が形成されるが、自然突然変異株出現との関係性は未だ完全に解明されていない。本解明には、バイオフィルム形成過程における自然突然変異株出現の時間的・空間的分布の解析が必須である。そこで、本研究ではバイオフィルム形成過程における自然突然変異株出現を時空間的に解析することで、二者の関係性を明らかとすることを目的とした。本研究にはバイオフィルムのモデル細菌であり、多剤耐性菌の出現が問題視されている緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）PA01 株を使用した。

バイオフィルムにおける自然突然変異株の出現には RecA が関与する。そこで、まず初めに *recA* プロモーターレポーター株を作製し、バイオフィルム内部における *recA* 発現を可視化した。次に本レポーター株によるバイオフィルム形成実験を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いてバイオフィルムを構成する細胞及び *recA* プロモーター発現を一細胞レベルで可視化した。その結果、*recA* プロモーターはバイオフィルム集団全体で一様に発現するのではなく、その一部でのみ高発現していた。さらに興味深いことに *recA* プロモーター高発現細胞はバイオフィルム底面部に集中する傾向にあり、時間経過に伴いバイオフィルムが成熟しても底面部に集中していた。これはバイオフィルム内部の不均一な環境に関係すると予想される。*recA* 発現を誘導する環境、つまり変異株出現への関係性が予想される環境はバイオフィルム形成初期段階から底面部局所的に形成されることが示唆された。現在は外部環境変化に伴う *recA* 発現環境の時空間的局在性の変化について研究を進めている。

Stress response, Mutation, *Pseudomonas aeruginosa*

講演番号：1C2p08
講演日時：3 月 24 日 15:17～ 1 号館 C2 会場

細菌集団中に出現するペプチドグリカン層が分解された細胞の解析

Characterization of peptidoglycan degraded cells in *Pseudomonas aeruginosa*

○兼松 周作[1]、野村 暢彦[2,3]、豊福 雅典[2,3] ([1]筑波大学・生命環境学群、[2]筑波大学・生命環境系、[3]筑波大学・微生物サスティナビリティー研究センター)
○Shusaku KANEMATSU[1], Nobuhiko NOMURA[2,3], MASANORI TOYOHUKU[2,3] ([1]Sch. of Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [3]MiCS, Univ. Tsukuba)

{目的}緑膿菌はグラム陰性細菌の桿菌である。しかし、近年の当研究室の先行研究から、集団内の一部において桿状ではなく球状の細胞(Round cell 以下、Rcell)が存在していることがわかってきた。Rcell は、DNA ストレスや嫌気条件において、誘導されるエンドリシンというペプチドグリカン(PG)分解酵素の働きによって形成される。エンドリシンによって PG 層が分解されることで細胞の形状を保てなくなり、球状の Rcell となる。Rcell は PG 層が分解されているため、通常の細胞と性質が大きく異なると考えられる。例えば、PG 特異的な抗生物質に対する耐性、周囲の菌体との融合、メンブレンベシクル(MV)の取り込み、といった性質を獲得していることが予想されるが、これまで研究されてこなかった。Rcell 形成に必要なエンドリシンはプロファージによってコードされており、細菌間で最も保存されている遺伝子の一つである。従って、Rcell は緑膿菌特異的な細胞形態ではなく、多くの細菌において普遍的に見られる細胞形態であることが考えられる。本研究では、Rcell の性質や機能を明らかにし、その生物学的役割の解明を目指す。
{実験材料および方法}Rcell は通常の培養条件したでは 1%程度の割合で出現するので、その解析は困難である。そこで、緑膿菌 MPAO１株において、マイトマイシン C(MMC)の添加による DNA ストレスの誘発、あるいはエンドリシンの発現誘導株を用いることによって Rcell の培養条件を検討した。さらに、Rcell の増殖をライブセルイメージングによって観察した。
{結果および考察}
Rcell の培養条件の検討により、集団中の大多数が Rcell になる条件が得られた。ライブセルイメージングの結果から、Rcell を培養すると、破裂して溶菌するものと、桿菌に戻り、分裂を再開するものが存在した。また、細胞同士が融合する様子も観察された。先行研究により、Rcell の溶菌はメンブレンベシクルや細胞外 DNA の放出に関わることを報告したが、今回新たに Rcell が細胞分裂を開始すること、互いに融合することが示された。これらの結果より、Rcell にも何種類かが存在し、その表現系は一過的に発揮されることが示された。細菌は抗生物質耐性など遺伝子の変異によらない一過的な表現系を示すことが明らかになっているが、Rcell もそうした現象の一端を担っていることが考えられる。今後は、Rcell の特徴と不均一性について詳細に研究していくことで、通常の細胞が発揮し得ない Rcell の生物学的な役割を明らかにする。

Pseudomonas aeruginosa, Round cell, endolysin

講演番号：1C2p09
講演日時：3 月 24 日 15:28～ 1 号館 C2 会場

大腸菌の D-アラニン飢餓ストレス応答に及ぼす菌密度の影響
Effects of the cell density on the stress response to D-alanine starvation in *Escherichia coli*
○山川 雄大、梅宮 真知、佐藤 一樹、大内 寿一、堀 初弘、安藤 太助、米山 裕（東北大農）
○Takehiro YAMAKAWA, Machi UMEMIYA, Kazuki SATO, Toshikatu OUCHI, Hatsuhiro HORI, Tasuke ANDO, Hiroshi YONEYAMA (Tohoku Univ. of Agric)

【目的】大腸菌がもつ２つのアラニンラセマーゼ（Alr、DadX）を欠損させた二重変異株 MB2795（Δalr Δ dadX）は D-アラニン(D-Ala)要求性を示す。当研究室では、アラニンの代謝研究をする過程で、この D-Ala 要求株を D-Ala を含まない L 液体培地で培養すると急激な細胞死を起こすことを先行研究によって見出した。そして、この D-Ala 飢餓による細胞死はクロラムフェニコール存在下で抑制されることから、D-Ala 飢餓ストレスを感知した後に誘導される遺伝情報の発現が細胞死に関与していることが示唆された。そこで、本研究ではこの D-Ala 飢餓ストレスによる細胞死の原因を探る一環として、D-Ala 飢餓ストレスをかける際の菌密度の影響を評価した。
【方法】D-Ala(50 μg/ml)添加 L 培地で前培養した MB2795 を生理食塩水で洗浄後、D-Ala を含まない L 培地にさまざまな菌密度(4.2 x 10^8～6.8 x 10^9)で接種し 37℃にて振盪培養を開始した。その後、経時的に残存生菌数を D-Ala(50 μg/ml)添加 L 平板にて計測した。また、D-Ala 欠乏による細胞壁合成阻害がこの細胞死に何らかの影響を及ぼしている可能性を調べるために、D-Ala 飢餓ストレスをかけた MB2795 を顕微鏡下で観察した。
【結果と考察】D-Ala を含まない L 液体培地に MB2795 を異なる菌密度で接種後振盪培養し、経時的に残存生菌数を測定した結果、培養開始時の菌密度が 4.2 x 10^8 cells/ml の条件において 6 時間後と 24 時間後の生残菌数は、2.6 x 10^5 cells/ml と 1.4 x 10^8 cells/ml であり、6 時間後に著しい生残菌数の低下(残存率 6.4 x 10^{-4})を示した後、24 時間後は再増殖した。この 24 時間後に生育したクローンの D-Ala 要求性を評価したところ、D-Ala を含まない最少培地で生育したことから、サプレッサー変異株の増殖であることが明らかになった。一方、培養開始時の菌密度が 6.8 x 10^9 cells/ml の条件では 6 時間後と 24 時間後の生菌数が 8.2 x 10^9 cells/ml と 1.6 x 10^9 cells/ml であり、細胞数の低下はそれほど認められなかった。このことから、D-Ala 飢餓による細胞死は菌密度の影響を受けることが明らかとなった。次に、約 10^{-3} まで生残率が低下する条件下で D-Ala 飢餓ストレスをかけた大腸菌を光学顕微鏡で観察したところ、一視野あたり対照と比べて同レベルの菌体が観察され溶菌による細胞死ではないことが示唆された。

E.coli , stress response, cell death

発表責任者：米山裕（hiroshi.yoneyama.a4@tohoku.ac.jp）

講演番号：1C2p10
講演日時：3 月 24 日 15:39～ 1 号館 C2 会場

大腸菌のアミノ酸飢餓および薬剤ストレス応答間の情報伝達クロストーク
Crosstalk of stress response between amino acid starvation and antibiotic stress in *Escherichia coli*

○橋本 美優[1]、金 世怜[2]、間世田 英明[2]、安藤 太助[1]、米山 裕[1] ([1]東北大農、[2]産総研)
○ Miyu HASHIMOTO[1], Seryoung KIM[2], Hideaki MASEDA[2], Tasuke ANDO[1], Hiroshi YONEYAMA[1] ([1]Tohoku Univ. of Agric., [2]AIST)

【目的】我々は大腸菌の L-アラニン (Ala) 要求性変異株を遺伝学的な手法で取得することに成功し、Ala を含有しない最少寒天培地でこの変異株を培養すると、自然突然変異より高頻度で Ala 非要求性サプレッサー変異株が出現することを発見した。この現象は、大腸菌が Ala 飢餓ストレスを感知し何らかの細胞内カスケードを経て突然変異が惹起された結果、起こったと解釈できる。一方、抗生物質であるクロラムフェニコール(CP)に暴露された緑膿菌は多剤排出ポンプ MexEF-OprN (Mex ポンプ) の高発現によって耐性化し、この耐性化頻度が自然突然変異より高いことが知られている。これら異なった環境ストレスに対応する細胞内カスケードのクロストークがあるのか否か検証するため、CP 暴露による耐性菌出現頻度の上昇をモニターすることができるレポータープラスミド (pT8) を Ala 要求性変異株へ形質転換した。取得した形質転換体を Ala 飢餓条件で培養した結果、耐性菌出現頻度が上昇したことから、これらの異なったストレス応答カスケードにクロストークがあることが示唆された。そこで、本研究では、Ala 以外のアミノ酸についても同様の評価を行った。
【方法】大腸菌の一遺伝子欠損変異株ライブラリーである KEIO コレクションの中から 4 種類のアミノ酸要求株を選び (JW3841 Δ*glnA*, JW2975 Δ*metC*, JW1252 Δ*trpA*, JW4351 Δ*serB*)、これらの変異株にレポータープラスミド pT8 を導入した形質転換体を取得した。最少液体培地で各形質転換体を 52 時間培養後 CP (12.5 μg/ml) を含む L 寒天培地に塗布し、37℃にて 2 日培養後に出現した CP 耐性クローンの数を計測し、トータルコロニー数に対する耐性菌出現頻度を算出した。
【結果と考察】最少液体培地で JW3841 Δ*glnA* と JW2975 Δ*metC* は明らかな生育 (OD_{660} > 1.0) が 52 時間後には認められ、JW1252 Δ*trpA* と JW4351 Δ*serB* については生育が見られなかった。JW3841 と JW2975 の生育は、Gln および Met 非要求性サプレッサー株が出現したものと考えられた。CP 耐性菌出現頻度は、生育が観察された Δ*glnA* と Δ*metC* がそれぞれ 1.16×10^{-4}、1.22×10^{-4} であり、Δ*trpA* と Δ*serB* は 1.40×10^{-5}、6.14×10^{-6} であった。以上のことから、Ala 以外のアミノ酸飢餓ストレスでも、サプレッサー変異株が出現する条件下において CP 耐性菌出現頻度の上昇が認められ、サプレッサーの出現と CP 耐性菌出現に至るまでのカスケードに何らかのクロストークが存在すると考えられる。

E. coli, auxotroph, drug resistance

発表責任者：米山裕（hiroshi.yoneyama.a4@tohoku.ac.jp）

講演番号：1C2p11
講演日時：3 月 24 日 16:00～ 1 号館 C2 会場

好熱好酸性アーキアのマルチプル分子シャペロニンの機能解析

The functional analysis of multiple chaperonins from thermoachidophilic archaeon

○魚住 奎太、山田 芽生、プトリ アザレア、福田 青郎、藤原 伸介（関西学院大理工）
○ Keita UOZUMI, Mei YAMADA, Azalea PUTRI, Wakao FUKUDA, Shinsuke FUJIWARA (Kwansei Gakuin Univ. of Sci. Technol.)

【背景と目的】分子シャペロニンはタンパク質の凝集を防ぎ、可溶化を促進する。好熱好酸性アーキア *Sulfolobus* 属は複数の分子シャペロニンサブユニットを有しており、これらは生育温度依存的に組成変化を起こすことが明らかにされている[(1)]。*S. acidocaldarius* は、3 種類の分子シャペロニンサブユニット α（Saci_1401）、β（Saci_0666）、γ（Saci_1203）を有しているが、本菌は生育温度幅が広く（55 ℃-85 ℃）、さらに生育可能 pH 幅も広い（pH 1-5）ことから、生育条件に応じたこれら 3 つの分子シャペロニンの使い分けがなされていると予想される。本研究では、各シャペロニンサブユニットの生理的意義の解明を目指し、生育温度・pH が異なる場合における各シャペロニンサブユニットの発現動態解析を行い、また分子シャペロニン遺伝子欠失株の環境に対する応答の変化を解析した。
【結果と考察】*S. acidocaldarius* を生育至適 pH 下（pH 3.0）で 60 ℃、75 ℃、82 ℃にて栄養培地を用いて培養した。対数期中期に到達した菌体から総タンパク質を抽出し、定量ウエスタンブロッティング法により本菌の分子シャペロニンサブユニット α､β 及び γ サブユニットタンパク発現量解析を行った。高温環境下（82 ℃）では、α サブユニットの発現量が増加していた。また、低温環境下（60 ℃）では γ サブユニットの発現量が増加していた。一方、β サブユニットに関しては有意な発現量の変動は示さなかった。これらの結果から、高温環境下では α サブユニットが、低温環境下では、γ サブユニットが生育に重要であると予想された。このような発現量変化については、類縁菌である *S. shibatae* でも高温・低温ショックを与えた際に似たような挙動を示すことが報告されている[(2)]。一方、生育至適温度下（75 ℃）で、培養 pH を pH 2、 pH 3、 pH 4 に変動させて同様の実験を行ったところ、全てのサブユニットにおいて有意な発現量の変動は確認されなかった。この結果より、分子シャペロニンの発現量は pH ストレスよりも温度ストレスに応答していることが示唆された。次に、シャペロニンの遺伝子破壊株の作成を試みたところ、γ 遺伝子破壊株のみ得られた。この株の生育を野生株と比較したところ、すべての温度、pH 条件でわずかな比増殖速度の減少が見られた。以上の結果は、γ サブユニットは温度･pH 条件にかかわらず生育に関与はしているものの必須ではないことを示している。

【参考文献】 (1) Chaston, J. J. *et al*., *Structure*. 24, 364–374（2016）(2)Kagawa, H. K. *et al*., *Mol*. *Microbiol*., 48(1), 143-56(2003)

chaperonin, thermoachidophiles, *Sulfolobus acidocaldarius*

発表責任者：藤原伸介（fujiwara-s@kwansei.ac.jp）

講演番号：1C2p12
講演日時：3 月 24 日 16:11～ 1 号館 C2 会場

Functional analysis of multiple chaperonin in thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*

○Azalea PUTRI, Mei YAMADA, Keita UOZUMI, Wakao FUKUDA, Shinsuke FUJIWARA (Kwansei Gakuin Univ. of Grad. Sch. Sci. Technol.)

[Introduction] Molecular chaperonins prevent protein aggregation and promote solubilization. Thermophilic acidophilic archaea *Sulfolobus* species have multiple chaperonin subunits, which cause compositional changes dependent on growth temperature (1). *Sulfolobus acidocaldarius* has three types of chaperonin, α, β, and γ subunit, and the archaeon shows a wide growth temperature (55° C – 85° C) and pH range (pH 1 – 5). Therefore, it is expected that these three molecular chaperonins are appropriately utilized depending on the growth conditions. This study aimed to clarify the chaperonin functions in *S. acidocaldarius* cells, and thermostabilities, pH stabilities, and (re)folding activities of chaperonins were analyzed.

[Results and Discussion] In order to evaluate the properties of chaperonins in *S. acidocaldarius*, thermostabilities and pH stabilities of each subunit was analyzed by CD spectrum. The CD values of α and β subunit exhibited a slight increase until 90°C, indicating that α and β subunits were thermostable. However, the structure of γ subunit was slightly changed from 60°C to 90°C, suggesting that γ subunit was thermolabile. On the other hand, all chaperonin subunits were stable at low pH. In order to examine the chaperonin function, refolding activities of chaperonins to histidine-tagged *Sa*-TrpC, treated with urea at various concentration, were analyzed. The results showed that β and γ subunits improved the refolding of *Sa*-TrpC treated with 6 M and 7 M urea. On the other hand, α subunit slightly enhanced the refolding of *Sa*-TrpC treated with 7 M urea. In addition, chaperonin function was evaluated for alcohol dehydrogenase (ADH) at various temperature. All chaperonins prevented ADH from thermal inactivation. Moreover, γ subunit showed the highest prevention activity at 50℃ compared to α and β subunits. These results suggested that γ subunit functions effectively in *S. acidocaldarius* cell at cold-stressed temperature, and that α and β subunits functions at heat-stressed temperature.

[References] (1)Kagawa, H. K. et al., Mol. Microbiol., 48(1), 143-56(2003)

chaperonins, thermoacidophilic archaeon, *Sulfolobus acidocaldarius*

発表責任者：Shinsuke FUJIWARA（fujiwara-s@kwansei.ac.jp）

講演番号：1C2p13
講演日時：3 月 24 日 16:22～ 1 号館 C2 会場

大腸菌 PhoQ センサードメインの SD ポケットの構造と機能

Identification of an internal cavity in the PhoQ sensor domain for PhoQ activity and SafA-mediated control

○吉谷 亘平[1,3]、石井 英治[1,3]、谷口 勝英[3]、杉本 宏[4,5]、城 宜嗣[5]、秋山 芳展[1]、加藤 明宣[3]、内海 龍太郎[6]、江口 陽子[2,3]([1]京大 ウイルス・再生 医科学研究所、[2]近大 生物理、[3]近大 農、[4]理研・放射線センター、[5]兵庫県大 生命理学、[6]阪大・産研)
○Kouhei YOSHITANI[1,3], EIJI ISHII[1,3], KATSUHIDE TANIGUCHI[3], HIROSHI SUGIMOTO[4,5], YOSHITSUGU SHIRO[5], YOSHINORI AKIYAMA[1], AKINORI KATO[3], RYUTARO UTSUMI[6], YOKO EGUCHI[2,3] ([1]Kyoto Univ., [2]Kinki Univ. of Biology-Oriented Science and Technology, [3]Kinki Univ. of Agriculture, [4]RIKEN SPring-8, [5]Hyogo Univ., [6]Osaka Univ.)

【背景・目的】

大腸菌二成分制御系 PhoQ/PhoP 系において、センサー膜タンパク質 PhoQ は Mg^{2+}の枯渇等を感知し自己リン酸化し、続いてレギュレータータンパク質 PhoP にリン酸基を転移させ、リン酸化型 PhoP が標的遺伝子の発現を活性化させる。一方、膜貫通型小タンパク質 SafA(65aa)は PhoQ の Sensor domain(SD)と相互作用することにより PhoQ の自己リン酸化を活性化することが明らかにされている(1、2、3)。SafA は PhoQ-SD との結合により、構造変化を引き起こすことで PhoQ を活性化するものと推定されるが、その結合領域や活性化に重要な領域は未解明である。本研究では SafA と PhoQ の活性化に関わる PhoQ-SD の結晶構造解析と変異解析を行った。

【結果】

PhoQ-SD の 179 番目のアスパラギン酸をアルギニンに置換した変異体(D179R)は SafA との結合能と PhoQ 活性化能を同時に消失していた(2)。本研究では、野生型と D179R 変異型 PhoQ-SD を精製し、結晶構造解析を行った。野生型と D179R 変異体の立体構造が解像度 1.9Å、2.7Å で決定された。それらの構造を比較した結果、野生型では D179 周辺に窪み(SD pocket)が形成されていたが、D179R 変異型ではそのような窪みは見られなかった。他の部位には構造上の変化は見出されなかった。次に SD pocket を構成するアミノ酸残基のアラニン置換変異体を 19 種作製した。これらの変異型 PhoQ の活性及び SafA 存在条件における活性を、PhoP により活性化されるプロモーターの制御下にある *lacZ* 遺伝子の発現量を測定することにより評価した。その結果、D179 以外に新たに５種の変異体において、SafA 発現条件での PhoQ 活性が野生型と比べて低下した。これらの結果は SafA による PhoQ 活性化に SD pocket が重要な役割を担っていることを示唆した。

SD pocket は PhoQ-SD の抗菌性ペプチドや二価カチオン結合部位とは異なる位置に存在し、SafA によるアロステリック効果による PhoQ の活性制御部位と考えられた。SafA の直接的な結合部位の詳細については、今後の更なる進展を待たねばならないものの、PhoQ-SD pocket への結合を介する SafA による PhoQ の活性化機構は新規であると考えられる。

1) Eguchi et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 104、18712-18717 (2007).
2) Eguchi et al. Mol. Microbiol. 85、299-313 (2012).
3) Ishii et al. Biosci.Biotechnol. Biochem. 77、814-819 (2013).

Two-component signal transduction, SMP, Histidine kinase

講演番号：1C2p14
講演日時：3 月 24 日 16:33～ 1 号館 C2 会場

A-factor 結合型自己調節因子受容体 ArpA の結晶構造

Crystal structure of the auto-regulator receptor protein ArpA in A-factor bound form

○夏目 亮、稲葉 龍生、藤田 雄太、廣沢 雄也、和田 英嗣、加藤 雄己（東京電機大学)
○Ryo NATSUME, Ryusei INABA, Yuta FUJITA, Yuya HIROSAWA, Eiji WADA, Yuki KATO (Tokyo Denki Univ.)

【目的：A-factor 受容体 ArpA の構造機能相関解析】

放線菌 *Streptomyces griseus* の二次代謝および形態分化は、A-factor カスケード系によって制御されている。このカスケード系の頂点を司るのが、微生物ホルモンとも呼ばれる自己調節因子 A-factor とその受容体 ArpA からなる転写制御システムである。同様の転写制御システムは *Streptomyces* 属放線菌類に広く分布するが、リガンドの構造が一部異なるだけで種間のクロストークは起きない厳密な制御システムとなっている。特異性が極めて高いこのシステムの詳細を明らかにする目的で、自己調節因子受容体ファミリーの構造生物学的研究が行われてきた。しかしこれまでに報告がある構造解析例のいずれもリガンド結合型ではないため、受容体による自己調節因子の認識の詳細については不明のままであった。この課題を解く目的で、発表者らは A-factor 結合型 ArpA の結晶化に長年取り組んできた。昨年度大会では、取り扱いの難しい ArpA についてどの様にして精製、濃縮、結晶化を実現したかについて紹介した。今年度は、A-factor 結合型 ArpA の結晶構造について紹介する。

【方法および結果：A-factor 結合型 ArpA の結晶構造解析】

ArpA の構造は、他の自己調節因子受容体ファミリータンパク質同様に、N 末端側が HTH motif からなる DNA 結合ドメイン、C 末端側がリガンド結合ポケットを含む調節ドメインであり、αヘリックスリッチな典型的な TetR 型リプレッサー構造のホモ二量体を形成していた。すでに決定されている *Streptomyces coelicolor* A3(2)由来 CprB の DNA 結合型構造との比較から、A-factor 結合に伴って ArpA が DNA 結合性を失うというこれまでの知見が構造生物学的に裏付けられた。また、肝心の A-factor の電子密度についても、ArpA 内部のリガンド結合ポケットに完全に内包された状態ではっきりと観察できた。今回決定した構造から、ArpA に結合した A-factor のコンフォメーション、A-factor–ArpA 間の相互作用、A-factor 認識に直接関与する残基などの姿形が初めて明らかとなった。これまでに得られていた ArpA に関する生化学的／生理学的知見との整合性や、構造から見えてきた少し予想外であった A-factor と ArpA の相互作用および ArpA のコンフォメーション変換機構について、解説する。

Streptomyces griseus, autoregulatory factor, crystal structure

発表責任者：夏目　亮（natsume@mail.dendai.ac.jp）

講演番号：1C2p15
講演日時：3 月 24 日 16:44～ 1 号館 C2 会場

接合菌 *Mucor circinelloides* の二形成メカニズムを利用した表現型スクリーニングへの応用

Application of dimorphic mechanism for phenotypic screening by zygomycota *Mucor ciecinelloides*

○高野 真希[1]、岩倉 遼[1]、石井 結菜[2]、星野 一宏[1]([1]富山大院理工、[2]富山大工)
○Maki TAKANO[1], Ryo IWAKURA[1], Yuina ISHII[2], Kazuhiro HOSHINO[1] ([1]Grad. Sch. Aci. Eng. Univ. Toyama, [2]Fac. Eng. Univ. Toyama)

【目的】様々な環境因子(温度、pH、CO_2 など) に応答し分化形態が変化する真菌を二形成真菌と呼び、*Candida* など病原性真菌にこの現象がみられることが多い。当研究室で開発した Ethanol 生産接合菌の *Mucor circinelloides* も顕著に二形成応答性を有していることを見出した。本菌株は好気条件下で菌糸状態をとる一方、CO_2 含有嫌気条件下では、酵母体へ形態が変化する。これの特性を活用することで、化合物と形態を関連付けた表現型スクリーニング技術の開発につながると期待できる。しかし真菌の表現型が変化する現象は病原性真菌の偽菌糸伸長に関する研究が多く、酵母体への形態変化は未知であり、詳細なメカニズムは明らかになっていない。そこで本研究では *M. circinelloides* の糸状体および酵母体について二形成に関わる遺伝子の発現を解析するとともに、菌糸伸長に影響する Actin および Tubulin 阻害剤等の添加による形態変化について検討した。【方法・結果】*M. circinelloides* 4572J を好気条件で培養した菌体を糸状体、70%N_2+30%CO_2 の完全嫌気条件下で培養した菌体を酵母体として用いた。本菌株は、CO_2 の有無により形態が変化することから、細胞内 CO_2 変換に関わる Carbonic anhydrase (CA)遺伝子 *Nce103* の発現量を比較したところ、糸状体と酵母体の間で発現量の違いは認められなかった。しかしその下流の GTPase 遺伝子 *Ras1* の発現量は培養 6 ～24 h において糸状体では 2.8 倍増加し、酵母体では 0.03 倍にまで減少した。また、真菌の二形成には細胞内 cAMP レベルが影響するとされていることから、Adenylyl cyclase (*CYR1*)および Phosphodiesterase (*PDE*)の遺伝子発現量を解析した。酵母体におけるそれぞれの発現量は、培養 6～24 h においてどちらも糸状体の 2 倍であり、実際、細胞内 cAMP 含量は糸状体において培養に伴い減少したが、酵母体では維持されていた。その下流の菌糸伸長因子 *Efg1* 発現量は酵母体において糸状体の 1/8 であった。さらに、菌糸伸長に直接に関わる細胞骨格成分である Actin および Tubulin 遺伝子の発現量を解析したところ、いずれも糸状体の方が発現量が高いことが判明した。そこで、酵母状態の菌体に対して好気条件下で各種薬剤を添加し、形態変化を観察した。Actin 重合阻害剤 Cytochalasin D 添加では菌糸先端の分岐が増加し、膨張していた。また、Tubulin 重合阻害剤 Griseofulvin 添加では、菌糸先端の隔壁形成や酵母体での増殖が確認できた。このとき、*Efg1* および *Actin* 発現量は大きく変化しなかったが、*Tubulin* 発現量は糸状体細胞より減少していた。これらの結果から、本菌株の酵母体から糸状体への表現型変化を活用することで、薬剤の一次スクリーニングに活用できる可能性があることが示唆された。

dimorphism, phenotypic screening, *Mucor circinelloides*

発表責任者：星野一宏（khoshino@sus.u-toyama.ac.jp）

講演番号：1C3a02
講演日時：3 月 24 日 09:11～ 1 号館 C3 会場

鰹節（枯節）製造のかび付け発酵工程における好乾性糸状菌の菌叢解析
Analysis of fungal community dynamics during fermentation and ripening of katsuobushi bonito
○竹中 慎治[1]、中林 麗奈[1]、小川 千晶[2]、横田 仁子[3]、土居 幹治[3]（[1]神戸大院農、[2]神戸大農、[3]マルトモ（株））
○shinji Takenaka[1], Reina Nakabayashi[1], Chiaki Ogawa[2], Satoko Yokota[3], Mikiharu Doi[3] ([1]Kobe Univ. Grad. Sch. of Agric., [2]Kobe Univ. Fac. of Agric., [3]Marutomo co.)

【目的】日本の伝統食品である鰹節には、大きく分けて荒節と枯節の 2 種類が存在する。原料のカツオをおろし、煮熟・焙乾ものが荒節であり、さらに *Aspergillus* 属糸状菌（鰹節カビ）を使ってかび付け発酵・熟成させたものが枯節である。かび付け工程は、約 6 か月間かけて「かび付け⇒天日干し⇒かびの払落し」を 4 回ほど繰り返す手間のかかる作業であるが、脂肪の分解、香味の付与、色相の変化などをもたらし、荒節のもつ刺激臭を消し去ってまろやかな風味や上品な色合いを有する節に変えてくれる。鰹節カビは、*A. glaucus* およびその類縁種と言われてきたが、節の水分含量が約 20%から 15%まで減少していく過程で、どのような *Aspergillus* 属糸状菌が発酵・熟成を担っているかその詳細は明らかではない。本研究では、菌叢解析法を検討するとともに、かび付け工程やサンプルの違いによる好乾性糸状菌の優占種やそれらの加水分解酵素の生産特性を明らかにしたので報告する。
【方法】培養とゲノム DNA の調製：「同じ製造元から入手した 1 番から 4 番枯節」と「問屋から入手した製造元の異なる 4 番枯節」を鰹節カビ分離源とし、MY20 平板培地で培養して得られた菌糸体から混合ゲノム DNA を得た。PCR-DGGE 法：β-チューブリン遺伝子（*benA* 部分断片、約 400 bp）を増幅し、変性剤濃度 5%から 35%、60℃の条件で行った。鰹節カビライブラリー作成：2 番および 4 番枯節からサンプリングしたカビを集めた（96 サンプル/枯節）。酵素活性：既報の方法に従い[1)]、鰹節（荒節）粉にて固体培養を行って、リパーゼ活性（基質: pNP-butyrate および pNP-palmitate）およびプロテアーゼ活性（ヘモグロビンおよびカゼイン）を調べた。
【結果】サンプルの調製や菌叢解析の条件を検討しながら、*A. amstelodami*、*A. chevalieri*、*A. pseudoglaucus*、*A. ruber*、*A. sydowii* の 5 種について PCR-DGGE 法にて検出できる条件を確立できた。「同じ製造元から入手した 1 番から 4 番枯節」について優占種の推移を調べた結果、*A. pseudoglaucus* および *A. chevalieri* が優占種であり、かび付け発酵が進むとともにこれらの構成比が徐々に変わることがわかった。また、「製造元が異なる 4 番枯節」については、上述の 2 種の他に *A. amstelodami*、*A. ruber*、*A. sydowii* も優占種となっていた。枯節 2 番および 4 番から調製した鰹節カビライブラリーついて加水分解酵素の生産特性を調べた結果、リパーゼは pNP-butyrate に対して高活性を示す株が多く、プロテアーゼは酸性条件でヘモグロビンに対して活性を示す株が見られた。
１） S. Takenaka, L. Lim, T. Fukami, S. Yokota, M. Doi. J. Sci. Food Agric. (2018) doi: 10.1002/jsfa.9339. [Epub 2018 Sep 7.]

fungal community, katsuobushi bonito, PCR-DGGE

発表責任者：竹中慎治（stakenaka@people.kobe-u.ac.jp）

講演番号：1C3a03
講演日時：3 月 24 日 09:22～ 1 号館 C3 会場

日光東照宮彩色文化財に発生した真菌叢の網羅的解析および光触媒殺菌による真菌防除に向けた事前試験
Comprehensive analyses of the fungal flora occurring in painted cultural assets of Nikko Toshogu, and preliminary examination for the fungus control by photocatalytic sterilization

○小笠原 麻衣[1,3]、三浦 菜摘[1]、寺島 千晶[2]、藤嶋 昭[2,3]、落合 剛[2,3]、鈴木 智順[1,2]（[1]東理大応生、[2]東理大総研、[3]KISTEC）
○Mai OGASAWARA[1,3], Natsumi MIURA[1], Chiaki TERASHIMA[2], Akira FUJISHIMA[2,3], Tsuyoshi OCHIAI[2,3], Tomonori SUZUKI[1,2] ([1]Department of Applied Biological Science, Tokyo University of Science, [2]Research Institute for Science & Technology, Tokyo University of Science, [3]Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology)

〔目的〕 日光社寺文化財の多くは，漆塗装や漆上に様々な彩色が施されている。これら彩色部分に使用されている顔料には，膠や桐油などが溶剤や接着剤として使用されている。特に，膠で溶いた顔料を使用して彩色した部分では，塗装後約半年で黒く変色することが問題となっており，その原因は真菌の発生によるものだと考えられている。しかし，原因となる真菌の正確な同定はされておらず，真菌発生の予防法についての研究も進んでいないため，大規模な修復作業以外に解決策がない。この問題を解決するために，比較的安価で安全性の高い光触媒を彩色部分の真菌防除に適用する検討を行うことにした。これまでの当研究室による光触媒殺菌の研究結果より，真菌の種類（糸状菌や酵母などの形態の違い，色素の有無）によって光触媒殺菌の効果に違いがあることがわかっている。そこで本研究では，文化財保護に貢献することを目指して，様々な彩色文化財に発生する真菌叢の網羅的解析と，真菌防除のための事前試験を行うことを目的とした。
〔方法〕 彩色文化財および日光自然環境由来真菌は現時点で 34 株分離されている。これら分離株に対して 18S rRNA 遺伝子および ITS 領域を用いた系統解析を行った。また，第三世代シークエンサーである MinION を用いた非培養法的真菌叢解析を行い，文化財に発生する真菌の網羅的解析も試みた。さらに，真菌防除の事前試験として，膠彩色漆木片に分離株を接種し，発生する真菌の様子を経時的に観察した。また，膠彩色漆木片に光触媒 TiO_2 をコーティングし，殺菌効果が得られるかどうかの検討も行った。
〔結果〕 分離株の系統解析は一部の真菌株において完了し，その結果，文化財由来株は *Penicillium* 属と *Cladosporium* 属に近縁な真菌が主であり，日光自然環境由来株は *Monochaetia* 属等に含まれる真菌であった。*Penicillium* 属と *Cladosporium* 属はともに空気中に広く存在する真菌であり，*Monochaetia* 属の多くの種は植物病原菌である。従って，文化財由来真菌は一般的な建築物に発生する真菌であり，自然環境下で見られた真菌とは異なることが示唆された。非培養法による真菌叢の解析では，文化財には *Baudoinia* 属と *Penicillium* 属に近縁な真菌が主で，日光自然環境には *Aspergillus* 属と *Penicillium* 属に近縁な真菌が主に存在していた。これらの結果は培養法によっては得られず，真菌叢の網羅的解析を補完するものであった。真菌防除のための事前試験では，彩色に用いた顔料の種類によって真菌の生育速度が異なることが確認された。また，塗装面に有機物が存在するとより速い生育が見られ，今後の真菌防除試験を行うにあたって評価時間の短縮が図られると思われる。
本発表に際しては，系統解析の完了していない分離株の結果および新たに採取したサンプルの非培養法的真菌叢解析の結果も報告するとともに，TiO_2 を用いた防除事前試験結果についても報告する予定である。

Nikko Toshogu, fungal flora, photocatalyst

発表責任者：小笠原麻衣（mm.boc.47.0531@gmail.com）

講演番号：1C3a04
講演日時：3 月 24 日 09:33～ 1 号館 C3 会場

洗濯工程で検出される微生物の単離とその特徴
Characterization of microbial strains isolated in home laundry
○奥田 裕暁[1]、野田 浩史[1]、冨岡 敏一[3]、脇田 克也[2]、松村 吉信[3]([1]関西大・生命生物工、[2]パナソニック（株）、[3]関西大・ORDIST)
○ Hiroaki Okuda[1], Hirofumi Noda[1], Toshikazu Tomioka[3], Katsuya Wakita[2], Yoshinobu Matsumura[3] ([1]Dept. Life Science & Biotechnol., Kansai Univ., [2]Panasonic co. Ltd, [3]ORDIST, Kansai Univ.)

【目的】衣類や綿布で微生物汚染が原因と推測される異臭が多くの家庭で確認され、洗濯工程での除菌や抗菌処理への要望が高まっている。また、最近の一般家庭では抗菌剤配合の洗剤を使用しても洗濯後の衣類からの異臭発生が軽減されないとの意見もある。当研究室では、この異臭の原因が菌体外に排出される微生物細胞の代謝物だけではなく、抗菌剤によって破壊された細胞からの漏出物にもあると予想している。これまでの我々の研究で、洗濯工程のバクテリア叢解析の結果から、綿布に付着しやすい菌（脱離しにくい菌、吸着菌）と、綿布からは検出されず洗濯水から検出される綿布に付着しにくい菌（脱離しやすい菌、通過菌）が存在していると予想された。そこで、本研究では、吸着菌及び脱離菌を単離し、それらの細胞構造上の特徴を確認すると共に、それらを用いた綿布付着および脱離評価系の構築を試み、吸着菌の脱離しやすい条件の探索を目的とした。
【方法】吸着菌株および通過菌株は一般家庭で使用されていた綿布および洗濯工程中の水（洗濯水）からそれぞれ単離した。吸着菌株は洗濯後の綿布をリン酸緩衝生理食塩水で懸濁してストマッカー法で、通過菌株は洗濯中の洗濯水から回収した。回収した吸着菌株および通過菌株は TSA 培地または AGS 寒天培地、無機塩培地、R2A 培地で、25℃、4 日間、好気下で培養し、単離した。単離菌の同定は、16S rRNA 遺伝子配列の相同性から行った。単離菌の構造上の特徴を確認するために栄養細胞の走査型電子顕微鏡（SEM）画像観察を行った。
【結果】綿布および洗濯水から単離された菌株の 16S rRNA 遺伝子による簡易同定を行なった結果、吸着菌として *Paracoccus yeei* LR01、*Sphingomonas.* sp. LR02、*Stenotrophomonas rhizophila* LR03、*Brevundimonas vesicularis* LR04、*Roseomonas terpenica* LR05 が単離され、通過菌として *Acinetobacter ursingii* LT01、*Pseudomonas koreensis* LT02 が単離された。これまでの次世代シーケンサーによるバクテリア叢解析の結果から、綿布付着バクテリアの主要属として *Paracoccus* 属や *Sphingomonas* 属、*Roseomonas* 属が、洗濯水で主要となっていた属として *Pseudomonas* 属が確認されており、この結果からも今回単離された吸着菌株および通過菌株が妥当なものだと判断された。単離菌株の SEM 観察を行ったところ、吸着菌と通過菌の細胞表面構造に明確な違いは認められなかったが、細胞サイズは吸着菌株で 0.5 ~ 1.0 μm、通過菌株で 1.5 ~ 2.5 μm と吸着菌株の方が少し小さい傾向があった。今後、これらの単離菌株を用いて細胞の付着および脱離評価系の構築を試み、細胞が綿布から脱離しやすい条件および綿布に吸着しやすい条件の特定を行っていく予定である。

biofilm, malodor, home laundry

発表責任者：松村　吉信（ymatsu@kansai-u.ac.jp）

講演番号：1C3a05
講演日時：3 月 24 日 09:44～ 1 号館 C3 会場

ヒトの皮膚常在菌 *Cutibacterium acnes* の MALDI-MS プロテオタイピング
MALDI-MS Proteotyping of Human Skin Bacteria *Cutibacterium acnes*

○寺本 華奈江、児嶋 浩一、山田 賢志、大久保 達樹、関谷 禎規、岩本 慎一、田中 耕一（（株）島津製作所）
○Kanae TERAMOTO, Koichi KOJIMA, Yoshihiro YAMADA, Tatsuki OKUBO, Sadanori SEKIYA, Shinichi IWAMOTO, Koichi TANAKA (Shimadzu Co.)

【緒言】 *Cutibacterium acnes* は，通性嫌気性のグラム陽性細菌で，資化性や形態学的特徴などに基づき Type I，II，および III の 3 つのタイプに分けられている．近年では MLST など DNA の塩基配列解析に基づく分類法が検討されており，phylotype の分類法が短期間にいくつも提案されている．さらに，MALDI-MS など質量分析による分類方法も検討され，数本の特徴的なピークを用いた指紋判定法によりタイプを分けられることが報告されている[1, 2]．しかし，この数本のピークを用いた指紋判定法では，phylotype を完全に識別できないことが指摘されている．そこで本研究では，バクテリアの亜種あるいは株レベルの系統分類に利用できることが報告されているリボソームタンパク質を解析対象とした Proteotyping[3]による *C. acnes* の分類を試みた．

【実験】 試験菌株として，MLST により 5 つの phylotype（IA_1，IA_2，IB，II，および III）に分類された 24 株の *C. acnes* を用いた．ビーズ破砕と簡易な遠心分離により得たタンパク質画分とマトリックス試薬を用いて試料マトリックス混合結晶を調製した．*m/z* 2000-30000 の範囲を MALDI-MS （AXIMA Performance™，島津製作所製)により測定した．UniProtKB や GenBank などのタンパク質データベースに登録されている約 90 株の全ゲノム解読株のアミノ酸配列から計算した観測質量の理論値を用いて，Strain Solution™（島津製作所製）によりマススペクトルを解析した．バイオマーカーピークの選択には統計解析ソフト eMSTAT Solution™（島津製作所製）を用いた．全試料菌株について，Strain Solution™を用いて各試料菌株のマススペクトルをクラスター解析し，デンドログラムを作成した．

【結果】 ビーズ破砕した *C. acnes* の全ゲノム解読株では，約 35 種類のリボソームタンパク質に関連するピークが観測された．本研究で用いた 24 菌株では，13 種類のリボソームタンパク質が共通して観測され,それらのうち 5 種類が同種内でアミノ酸配列の変異を反映したピークシフトが認められた．クラスター解析により，本研究で用いた 24 株は 5 つに分類され，それらは MLST による phylotype と一致した．また、本研究では phylotype IC の菌株を入手できなかったが、タンパク質 DB のアミノ酸配列から、本研究で用いたバイオマーカーで分類できることを確認した。遺伝子の翻訳産物を分析する本分析法は，遺伝子の塩基配列とは異なる特徴をもつ優れた手法であると考えられた．

【参考文献】 1) Dekio I. *et al., J. Med. Microbiol.*, **61**, 622-630 (2012). 2) Nagy E. *et al., Anaerobe,* **20**, 20-26 (2013). 3) Teramoto K. *et al., Anal. Chem.*, **79**, 8712-8719 (2007).

MALDI-MS Proteotyping, Phylotype, *Cutuibacterium acnes*

発表責任者：寺本華奈江（t_kanae@shimadzu.co.jp）

講演番号：1C3a06
講演日時：3 月 24 日 10:05～ 1 号館 C3 会場

メタ 16S 解析による渡良瀬遊水地の環境細菌
16S amplicon analysis of environmental bacteria in Watarase retarding basin

○荒川 理彩[1]、田口 尚幸[1]、木川田 喜一[2]、齊藤 玉緒[2] ([1]上智大院・理工、[2]上智大学・理工)
○ RISA ARAKAWA[1], NAOYUKI TAGUCHI[1], YOSIKAZU KIKAWADA[2], TAMAO SAITO[2] ([1]Graduate School of Science and Technology, Sophia Univ., [2]Faculty of Science and Technology, Sophia Univ.)

【背景・目的】高度経済成長期、日本では当時全国一の銅生産量を占めていた足尾銅山による鉱害が深刻な問題となっていた。こうした背景から鉱毒防止対策などを目的としてつくられたのが渡良瀬遊水地である。現在、動植物や重金属など渡良瀬遊水地に対する様々な診断・調査が行われている中、我々はメタ 16S 解析による土壌、水質サンプル中の微生物解析を行い地質・水質の性質や状態を診断し今後の環境保全対策を行う際の一つの評価基準になることを目的とした。

【方法】2017 年 6 月（夏）と 11 月（冬）の異なる時期に 渡良瀬遊水地周辺のサンプリングを行った。サンプリングで土壌は 5 か所（各表層、地下 30 cm）計 10 サンプル、水は夏では 6 ヵ所 6 サンプル、冬では 5 ヵ所 5 サンプル（各々300ml）それぞれ採取した。サンプルは土壌、水ともに pH と温度をそれぞれ測定し、採取したサンプルは 16S Amplicon 解析を行った。次世代シーケンサーにより決定した塩基配列の解析は微生物群集解析専用ソフト QIIME を用いて行い、地点による細菌叢の違いを比較した。また土壌に関しては実際、各サンプルにどれだけの重金属が含まれていたか特定するために重金属（Zn、Cu、Fe、As）抽出量の解析も合わせて行った。

【結果】QIIME により解析した細菌叢構造(phylum)を夏と冬のサンプル間で比較すると、土壌サンプルに関しては夏では 28、冬は 29 とほぼ同じ門レベルの細菌種が検出された。また UniFrac 距離に基づく主座標分析では夏と冬どちらも、重金属の抽出量に差が見られた 2 地点(ヨシ原浄化施設付近と旧役場跡地)の間で細菌叢に違いが見られたことから季節間による細菌叢の大きな差異はみられなかった。なかでも様々な環境変化に耐性のある Acidobacteria 門が Proteobacteria 門に次いで多くの存在比を占めていた。これにより、土壌環境がいまだ重金属などの負荷によって荒れている状態であることが示唆された。また水中の細菌叢構造では富栄養化を引き起こす要因として知られる Cyanobacteria 門の存在比が遊水地内において夏ではおよそ 10%であったのに対し、冬ではおよそ 50%以上と大幅に増加していた。ヨシの浄化作用による影響が一つの要因として示唆された。
今回、渡良瀬遊水地の土壌中の細菌叢は季節による影響を受けなかった一方、水では季節やヨシの生育状態といった外的要因による細菌叢の変化が見られた。今後、特に遊水地内の水質状況を詳細にみていく必要があると考える。

16S amplicon analysis

講演番号：1C3a07
講演日時：3 月 24 日 10:16～ 1 号館 C3 会場

Isolation of actinomycetes from deep-sea sediments of the Pacific Ocean

○Dana Ulanova[1,2] ([1]Fac. Agric. Mar. Sci. Kochi Univ., [2]Cent. Adv. Mar. Core Res. Kochi Univ.)

[Introduction]

Marine-derived actinomycetes are producers of many bioactive compounds, incl. a potential anticancer agent salinosporamide.[1] This study presents the new isolation of actinomycetes from the seafloor surface sediment samples collected from the deep-sea sediments of the Pacific Ocean.

[Methods]

Seafloor sediment samples from 1712 to 4944 m water depth were collected by the shipboard scientists during the KH-16-6 cruise and kept at 4°C until processed. Sediment samples were inoculated on acinomycetes isolation agar, AMM, M1 (10x diluted AMM) and Bennet's agar plates and cultivated at 28°C. The 16S rRNA gene, 16S-23S rRNA intergenic region and *gyrB* fragments were amplified from individual actinomycete-like colonies by colony PCR and sequenced.

[Results & Discussion]

Nine actinomycete-like colonies were obtained after 4 months of cultivation. The most isolates belonged to genus *Streptomyces* (6 colonies). Remaining colonies had an orange color and colony surface typical to the family *Micromonosporaceae*. 16S rRNA gene sequence analysis revealed that two of these isolates belonged to the genus *Micromonospora*, while the remaining one shared 99% sequence identity with *Salinispora pacifica*. The subsequent analysis of ITS and *gyrB* sequences confirmed the high level of identity (both 98%) to *S. pacifica*.

Salinipora spp. has been mostly isolated from the tropical and subtropical marine sediments, seaweed and marine invertebrates.[1] Recently, we have reported the most northern point of *Salinispora arenicola* distribution - nearshore sediments of Tosa Bay.[2] This study adds the new location of the genus *Salinispora* distribution and extends the knowledge on biogeography of these marine actinomycetes.

[References]

[1] Jensen PR. *et al*. *Nat Prod Rep* 32: 738-751 (2015).
[2] Goo KS. *et al. Antonie van Leeuwenhoek* 105: 207–219 (2014).

actinomycetes, deep-sea, Salinispora

発表責任者：Dana Ulanova（ulanova@kochi-u.ac.jp）

講演番号：1C3a08
講演日時：3 月 24 日 10:27～ 1 号館 C3 会場

循環型汚水浄化槽内における代謝産物要求細菌の分子系統解析および表現形の解析

Analyses of molecular phylogeny and phenotype on the bacterial strains requiring metabolites derived from the other bacteria in Lab-scale wastewater treatment system

○鈴木 遥菜、島田 紘帆、鈴木 智順（東理大応生）
○ Haruna SUZUKI, Hiroho SHIMADA, Tomonori SUZUKI (Tokyo University of Science, Department of Applied Biological Science)

【目的】現在、自然界に存在する細菌はわずか 1%しか記載されていないと言われており、大多数の細菌は分離が出来ておらず、培養法も確立されていない。細菌の系統解析を行うことは、新たな細菌の進化上の位置づけを行い、同時に細菌の種多様性の解明に繋がると期待されている。当研究室では、微生物代謝を利用して生物学的に有機物除去を行う浄化システムを、ラボスケールで運用した循環型汚水浄化槽を構築し、人工汚水を 1 週間循環させて処理している。先行研究において、人工汚水培地では生育せず、処理水を用いた培地でのみ生育する代謝産物要求細菌 3 株が分離され，これらは 16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列解析で相同値が 99%以下であり，新種ではないかと考えられた。本研究では、循環型汚水浄化槽由来の代謝産物要求株 3 株（*Thiopseudomonas denitrificans* X2^{T} と相同値 97.8%である 3Cr 株 、*Alcanivorax pacificus* W11-5^{T} と相同値 96.6%である 5Fr 株、HS3r 株）を用いて表現型を網羅的に解析する共に、ほぼ全ての 16S rRNA 遺伝子塩基配列を用いた分子系統解析を行うことで、3 株の新属および新種の提唱を行うことを目的とした。
【実験方法】代謝産物要求株の培養には処理水培地を用いた。この処理水培地は、循環型汚水浄化槽に投入した人工汚水を 1 週間循環させ、回収した微生物の代謝産物が含まれた処理水を遠心分離後、上清を濾過滅菌することで調製した。分子系統学的解析において、分離株の 16S rRNA 遺伝子の全塩基配列を決定し、さらに先行研究で解析途中であった HS3r 株の分子系統解析を行った。表現型の網羅的な解析において、形態学的解析では、コロニー観察、グラム染色、走査型電子顕微鏡を用いた細胞形態の観察により行った。生理生化学的性状では、API ZYM（bioMérieux）を用いた各種酵素の有無の判定、API 20NE（bioMérieux）を用いた生理生化学的特性を調べた。さらには、濁度を用いた生育可能温度の測定も行った。また、化学分類学的解析においては、HPLC を用いた逆相カラムによる GC 含量の測定を行った。
【結果】分子系統解析において、HS3r 株の 16S rRNA 遺伝子塩基配列は *Pseudomonas caeni* HY-14^{T} と相同値が 97.3%となり、新属の可能性が示唆された。表現型の網羅的な解析では、分離株 3 株は共にグラム陰性の桿菌であり、コロニーはクリーム色で 1～3 mm の大きさであった。また、生育可能温度は 3 株共に 10℃～37℃であり、生育至適温度は 3Cr 株と 5Fr 株では 20℃、HS3r 株は 25℃であった。
なお、API ZYM および API 20NE を用いた 3 株の具体的な生理生化学的性状、および化学分類学的解析における 3 株の GC 含量についても併せて報告する予定である。

wastewater treatment system, uncultured microorganism, phylogeny

講演番号：1C3a09
講演日時：3 月 24 日 10:38～ 1 号館 C3 会場

循環型汚水浄化システムにおける難培養微生物が要求する代謝産物の特定

Identification of metabolites required by uncultured microbes in Lab-scale wastewater treatment system

○山本 晃裕、島田 紘帆、鈴木 智順（東理大応生）
○Akihiro YAMAMOTO, Hiroho SHIMADA, Tomonori SUZUKI (Tokyo University of Science, Department of Applied Biological Science)

【目的】当研究室で運転している循環型汚水浄化槽から、別種の細菌（ヘルパー細菌）が産生する物質を生育に必要とする代謝産物要求細菌が分離されている。しかし、その代謝産物がどのような物質であるのかは、まだ解明されていない。また、生物にとって鉄は必要不可欠な元素であるが、環境中に生物が利用できる遊離鉄は限られている。そこで、ある微生物は鉄獲得因子であるシデロフォアを放出し、それを別種の微生物が生育に用いている。本研究では、生育因子である代謝産物の性質・構造を明らかにし、さらには代謝産物要求細菌の生育と鉄との関連性を見出すことを目的とした。
【方法】本研究では、ヘルパー細菌 JS5h 株と代謝産物要求細菌 3Cr 株を供試した。3Cr 株は人工汚水培地では生育できないが、JS5h 株の培養濾液を添加した人工汚水培地では生育する。JS5h 株を人工汚水培地で培養後、遠心・濾過により菌体を除去し、JS5h 株培養濾液を得た。そして、分液操作・濃縮を行い、逆相シリカゲルクロマトグラフィーで分画後、得られたフラクションを乾固し、人工汚水培地に再溶解した。これらの培地に 3Cr 株を植菌し、生育を確認することで、生育因子である代謝産物が含まれているフラクションを特定した。そして、TLC での純度確認、NMR 測定を行った。TLC では、ヨウ素およびニンヒドリンで呈色反応を行った。また、JS5h 株を人工汚水培地、および塩化鉄（Ⅲ）を加えた人工汚水培地で培養し、無添加培養濾液および塩化鉄（Ⅲ）添加培養濾液を作製し、それぞれに 3Cr 株を植菌、培養し、その生育の評価を行った。
【結果】TLC でニンヒドリン呈色したことから、3Cr 株の生育因子である JS5h 株の代謝産物はペプチドである可能性が示唆された。また、3Cr 株が生育したフラクションは複数確認でき、生育因子である代謝産物は複数あることも示唆された。JS5h 株の塩化鉄（Ⅲ）添加培養濾液は無添加培養濾液と比べ、3Cr 株の生育を促進した。しかし、JS5h 株の無添加培養濾液に塩化鉄（Ⅲ）を添加しても 3Cr 株の生育には影響を及ぼさなかった。このことから鉄は 3Cr 株の生育に直接影響を及ぼすことはせず、JS5h 株の代謝に作用して、新たな 3Cr 株生育促進物質の生産に関与していると考えられる。また、JS5h 株培養時、振盪培養することでさらに鉄添加培養濾液が 3Cr 株の生育を促進することが確認された。このことから代謝産物要求細菌 3Cr 株を最も生育促進する条件は、塩化鉄（Ⅲ）を添加した人工汚水培地でヘルパー細菌 JS5h 株を振盪培養した培養濾液を使用することであることが示された。
なお、塩化鉄（Ⅲ）だけでなく塩化鉄（Ⅱ）を加えた培養濾液での 3Cr 株に対する生育への影響についても併せて報告し、鉄イオンの価数の違いが 3Cr 株に与える影響について考察する予定である。

uncultured microbe, metabolite, ferric ion

講演番号：1C3a10
講演日時：3 月 24 日 10:49～ 1 号館 C3 会場

嫌気性廃水処理プロセスに生息する未知微生物の分離培養と生理学的性質
Isolation and physiological trait of the microbial dark matter reside in anaerobic wastewater treatment processes

○倉島 優仁[1]、千葉 有紀[1]、堀 沙織里[2]、林 真由美[2]、野村 一樹[2]、幡本 将史[3]、山口 隆司[3]、関口 勇地[4]、重松 亨[1,2]、井口 晃徳[1,2] ([1]新潟薬大院・応生科、[2]新潟薬大・応生科、[3]長岡技術科学大学、[4]産業技術総合研究所)
○Yuto KURASHIMA[1], Yuki CHIBA[1], Saori HORI[2], Mayumi HAYASHI[2], Kazuki NOMURA[2], Masashi HATAMOTO[3], Takashi YAMAGUCHI[3], Yuji SEKIGUCHI[4], Toru SHIGEMATSU[1,2], Akinori IGUCHI[1,2] ([1]Grad. Sch. Appl. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., [2]Fac. Appl. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., [3]Nagaoka Univ. Technol., [4]AIST)

嫌気性廃水処理 (メタン発酵) プロセスは、無酸素条件下で種々の嫌気性微生物により有機物をメタンまで分解する生物学的反応プロセスである。昨今のエネルギー事情の観点から、活性汚泥法のような好気性微生物を利用した処理方法と比較して省・創エネルギー型プロセスとして注目されている。次世代シーケンサーを活用した環境ゲノム解析技術の適用により、嫌気性廃水処理プロセス中には多数の未知・未培養微生物が生息していることが明らかにされている。これらの未知・未培養微生物の機能や性質が解明されれば、プロセスの最適化・安定化に貢献できると考えられる。我々は、上向流嫌気性汚泥床 (UASB) リアクターから採取した嫌気性グラニュール汚泥から、これまで分離培養例の無かった Cloacimonetes 候補門 (WWE1 門) に属する細菌 (NY-MAS 株) および *Caldiserica* 門の未培養系統に属する細菌 (NY-SETRAS 株) の分離培養に成功した。これらの細菌は世界中の様々な嫌気性廃水処理プロセスから遺伝子としては高頻度に検出されているが、その生態や機能は不明である。そこで本研究は、これらの細菌の嫌気性廃水処理プロセス中における機能・生態解明を目的に、この 2 株の生理学的性質の調査を行なった。

NY-MAS 株の増殖温度は 25-45℃ (至適温度:35-40℃), 増殖可能 pH は 6.0-8.0 (至適 pH:6.5-7.0), Yeast Extract (Y. E.) または Polypeptone を唯一の炭素源およびエネルギー源として増殖することが明らかとなった。また、Y. E.単独よりも Y. E.と糖質 (スクロース) を添加した培地において増殖が活発になる傾向が見られたが、糖質を唯一の炭素源とした場合での増殖は認められなかった。

一方、NY-SETRAS 株の増殖温度は 25-45℃ (至適温度:35-40℃), 増殖可能 pH は 6.0-8.0 (至適 pH:6.5), ピルビン酸塩または Polypeptone を唯一の炭素源として増殖することが明らかとなった。分離前の集積培養液を用いた実験において、Y. E.と酢酸を添加した培地で NY-SETRAS 株の増殖が活発になる傾向が見られた。しかし、嫌気条件下における酢酸の酸化分解は、吸エルゴン反応であるため、単独の細菌がこの反応によりエネルギーを獲得し増殖することは不可能である。けれども、水素資化性メタン生成古細菌と共生関係を構築することで全体反応が発エルゴン反応となる。したがって、本株が水素資化性メタン生成古細菌と共生関係を組みながら酢酸または Y. E.に含まれる成分をエネルギー源として増殖できる可能性が考えられる。

現在、NY-MAS 株および NY-SETRAS 株と水素資化性メタン生成古細菌である *Methanospirillum hungatei* の共培養を試みている。

Isolation, *Candidatus* Cloacimonetes, Phylum *Caldiserica*

発表責任者：井口晃徳（a_iguchi@nupals.ac.jp）

講演番号：1C3a11
講演日時：3 月 24 日 11:10～ 1 号館 C3 会場

D-アスパラギン酸高生産乳酸菌の酵素スクリーニング法の開発と同定
Development of an enzymatic screening method and identification of highly D-aspartic acid-producing lactic acid bacteria
○梶谷 賢吾[1]、石川 拓実[1]、柴田 公彦[2]、高屋 朋彰[3]、阿部 勝正[1]、解良 芳夫[1]、高橋 祥司[1]([1]長岡技大院工、[2]福島高専化学・バイオ、[3]小山高専物質)
○Kengo KAJITANI[1], Takumi ISHIKAWA[1], Kimihiko SHIBATA[2], Tomoaki KOUYA[3], Katsumasa ABE[1], Yoshio KERA[1], Shouji TAKAHASHI[1] ([1]Nagaoka Univ. of Tech, [2]N.I.T. Fukushima Col., [3]N.I.T. Oyama Col.)

【背景・目的】近年，分析技術の発展により，D-Asp がほ乳動物体内に存在することが明らかとなってきており，神経性疾患やホルモンの生産・分泌に関与することが報告されている．さらに，D-Asp が真皮コラーゲン繊維束形成に関与し美容効果をもたらすことや，D-Asp の経口投与による精子運動性能の向上も報告されている．そのため，D-Asp の医薬品や機能性食品への応用が期待されている．細菌は細胞壁ペプチドグリカンの構成成分として D-Ala や D-Glu を生産するが，ある種の乳酸菌はラセマーゼにより生産された D-Asp も構成成分として利用することが知られている．したがって，D-Asp を多量に生産する乳酸菌は，新規な機能性食品の開発や D-Asp の工業的な発酵生産に有用と考えられる．演者らは，これまでに酵母 *Cryptococcus humicola* UJ1 株由来の D-アスパラギン酸オキシダーゼ（ChDDO）と西洋ワサビペルオキダーゼ（HRP）を用いたカップリング反応による D-Asp の発色検出定量法を開発している．そこで本研究では，乳酸菌が生産する D-Asp の本酵素法を用いた定量を検討するとともに，本酵素法を用いて新潟県内の発酵食品などから D-Asp 高生産乳酸菌のスクリーニングを検討したので報告する．
【方法・結果】ChDDO と HRP および発色基質である TOOS と 4-アミノアンチピリンを用いて，D-Asp 生産乳酸菌（*Lactobacillus brevis* JCM 1170 株, *Lb. gasseri* JCM 1131 株）と D-Asp 非生産菌（*Staphylococcus epidermidis* JCM 2412 株，*E. coli* K-12 株）の培養液上清の D-Asp 濃度を定量したところ，D-Asp 生産乳酸菌における D-Asp 濃度は非生産菌における値よりも高かったが，全ての培養液上清において，HPLC で測定して得られた濃度よりも高い値であった．しかし，酵素法と HPLC 測定で得られた濃度は強い相関関係を示したことから，本酵素法を用いて D-Asp 高生産乳酸菌を簡便にスクリーニングできると考えた．新潟県内の発酵食品を含む 51 試料の懸濁液を真菌とグラム陰性細菌に対する抗生物質を含む MRS 培地に塗布し，生育したコロニーの形態的特徴から乳酸菌と推測された菌株を 1,000 株単離した．さらに，炭酸カルシウム含有 MRS 培地におけるハロー形成試験とカタラーゼ試験により，乳酸菌候補株を 800 株選抜した．得られた乳酸菌候補株と *Lb. brevis* JCM1170 株の培養液上清の D-Asp 濃度を本酵素法を用いて定量し，その D-Asp 生産能（D-Asp 濃度/OD_{600}）を評価したところ，*Lb. brevis* よりも約 3 倍高い D-Asp 生産能を有する乳酸菌株を 1 株単離することができた．現在，この D-Asp 高生産株の同定を進めている．

lactic acid bacteria, D-aspartic acid, screening

発表責任者：高橋祥司（shoutaka@vos.nagaokaut.ac.jp）

講演番号：1C3a12
講演日時：3 月 24 日 11:21～ 1 号館 C3 会場

Pleurotus salmoneostramineus NBRC31859 株由来単胞子分離株のスクリーニング
Screening of single spore isolation strains with fruit body formation from *Pleurotus salmoneostramineus* NBRC31859
○平山 朋美、佐藤 魁、吉岡 詩織、田中 亨宗、福田 泰久、白坂 憲章（近大農）
○Tomomi HIRAYAMA, Kaito SATO, Siori YOSHIOKA, Naotaka TANAKA, Yasuhisa FUKUTA, Norifumi SHIRASAKA (Kindai Univ. of Agric.)

【背景と目的】
担子菌の担子胞子形成では、核融合後の減数分裂において染色体の組換えが起こる。交配型を支配する不合和性因子の構成は胞子において２種類あるいは４種類に過ぎないが、それ以外の遺伝子構成は胞子ごとに無数に異なるものが生じる。その結果、単胞子分離によって得られた単核体は担子菌として生育する重要な領域を保持しつつ、菌糸体及び子実体の表現型がそれぞれ異なっている。
一方、近年の遺伝子工学研究では対象生物の全ゲノム解析データは必要不可欠であるが、二核菌糸体 (n+n) から抽出した DNA を次世代シーケンサーで解析した際、異なる核由来の配列をアセンブルするため、うまく繋がらないという問題が発生する。それに対し、単核体ではシーケンス解析後のアセンブルにより得られるコンティグ数は、二核体に比べて大幅に減少し、データベース構築が容易になる。
以上のことから、単胞子分離株は子実体形成に関わる因子探索の実験材料として非常に優れていることが考えられる。本研究では、遺伝型がバラエティに富んでいる単胞子分離株に着目し、子実体形態を形成する単核菌糸体（非子実体形成株を含む）の取得を目的とした。
【材料と方法】
供試菌株は *P. salmoneostramineus* NBRC31859 株を用いた。人工栽培した本菌の子実体から胞子を回収し、PDA 培地上で発芽させ単胞子分離株を多数得た。得られた単胞子分離株の同定はトキイロヒラタケ特有の色素タンパク遺伝子、PsPCP の増幅により確認した。その内、N4, N13, N21, N60 株を選抜し、NextSeq500 で DNA シーケンス解析をし、ドラフトゲノムシーケンスを上記の 4 菌株間で比較した。さらに、30 菌株を選抜し、PDA・固体培養を行い、菌糸期の生長速度、隔壁距離を測定した。子実体形成の有無は、固体培養したもので確認した。
【結果と考察】
選抜した 4 菌株のドラフトゲノムシーケンスを比較したところ 26/28rDNA や PsPCP といった種特有のコード領域は高度に保存されていたが、大幅に欠損、挿入されている領域も存在していた。PDA・固体培地において 30 菌株の単核菌糸体は様々な生育速度、隔壁距離を示した。それぞれの単核菌糸体を固体培地上で 30 日以上培養したところ、子実体形成能を示す株が多数得られ、その形態は株毎に異なっており、実験材料として優れている菌株のスクリーニングに成功した。

Pleurotus salmoneostramineus, single spore isolation, monokaryon

講演番号：1C3a13
講演日時：3 月 24 日 11:32～ 1 号館 C3 会場

陸域深部地下珪藻質泥岩層に生息する未培養 *Bacteroidetes* 門発酵性細菌の分離培養化と生理機能の解析

Isolation and characterization of a novel fermentative bacterium in the phylum *Bacteroidetes* from a deep subsurface diatomaceous mudstone formation

○玉澤 聡[1]、上野 晃生[1]、玉木 秀幸[2]、玉村 修司[1]、村上 拓馬[1]、木山 保[1]、猪股 英紀[1]、宮川 和也[3]、長沼 毅[4]、金子 勝比古[1] ([1]幌延地圏環境研究所、[2]産総研、[3]原子力機構、[4]広島大院・生物圏科学)

○ Satoshi TAMAZAWA[1], Akio UENO[1], Hideyuki TAMAKI[2], Shuji TAMAMURA[1], Takuma MURAKAMI[1], Tamotsu KIYAMA[1], Hidenori INOMATA[1], Kazuya MIYAKAWA[3], Takeshi NAGANUMA[4], Katsuhiko KANEKO[1] ([1]H-RISE, [2]AIST, [3]JAEA, [4]Hiroshima Univ.)

地球上に 10^{30} 個のオーダーで存在すると概算される微生物は、その 90%以上が酸素のない嫌気的環境下に生息すると推定されており、嫌気性微生物の代謝活動が及ぼす炭素循環及びエネルギーフラックスへの影響は極めて大きいと考えられている。嫌気的環境の一つである陸域地下珪藻質泥岩層は地球上に広く分布しており、北海道北部地域の天塩平野の地下には、新生代新第三紀中新世から鮮新世に掛けて形成された海成堆積物から成る珪藻質泥岩層が広がっている。同層から採取された地層水中からは微生物起源のメタンが検出されていることから、堆積有機物の発酵による分解反応とメタン生成反応の進行が推測され、その中でも発酵性細菌は中核的な役割を担っているものと考えられた。これまで珪藻質泥岩層のボーリングコア試料または地層水の微生物群集構造解析やメタゲノム解析によって、発酵性細菌と推測される微生物群の存在は示唆されていたものの、現在まで分離培養されておらずその生理生態学的機能はほとんど明らかにされていなかった。そこで本研究では、陸域深部地下珪藻質泥岩層に生息する発酵性細菌の分離培養化と機能解析を目的とした。

JAEA 幌延深地層研究センターの深度 250 m の珪藻質泥岩層から採水した地層水を微生物接種源に、珪藻質泥岩中有機物の発酵分解産物として想定されるトリメチルアミン及び酢酸を基質として添加し、地層水の各種イオン組成を模擬した無機塩培地を用いて、気相 N2/CO2 の嫌気的環境下、25℃で集積培養を行った。少なくとも 4 回の継代培養を実施した後に、酵母エキスを単独基質とした限界希釈培養を重ね、最終的にアガーシェイク法により新規 *Bacteroidetes* 門細菌 HJ250 株の純粋分離に成功した。HJ250 株は、15-37℃、pH 6.0-9.0 で生育可能な絶対嫌気性の発酵性細菌であり、原位置地下環境（20℃, pH 7）に適応した生理学的特徴を有していた。16S rRNA 遺伝子を対象とした分子系統学的解析の結果、HJ250 株は *Bacteroidetes* 門の *Marinilabiliales* 目に属するものの、既に記載されている最近縁種の *Draconibacterium orientale* FH5 株とは 88.6%の相同性しか示さない極めて新規な系統に属することがわかった。また、深度 250 m の地層水から抽出した DNA 及び RNA（cDNA)を用いた原位置微生物群集構造解析の結果、HJ250 株と 100%の相同性（251/251 bp）を示す配列が少数ながら DNA だけでなく cDNA からも検出された。さらに、深度 140 m と 350 m 地層水から抽出した DNA 及び cDNA からも検出され、特に深度 140 m の cDNA では全 322 OTUs の中で第三番目の相対存在量を示した。以上のことから、HJ250 株は原位置にただ存在するだけでなく、珪藻質泥岩層の特に比較的浅部域における発酵すなわち嫌気的有機物分解反応に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

deep subsurface environment, isolation/characterization, uncultured *Bacteroidetes*

発表責任者：玉澤聡（satoshi.tamazawa@h-rise.jp）

講演番号：1C3a14
講演日時：3 月 24 日 11:43～ 1 号館 C3 会場

Effect of hydrogen peroxide on microbes colonize on agar plate

○Motoyuki WATANABE[1,2], Wataru KITAGAWA[1,2], Yoichi KAMAGATA[1,2] ([1]Hokkaido Univ. of Agric., [2]AIST)

Hydrogen peroxide (H_2O_2) causes oxidative stress on microbes. Previous study showed that when phosphate and agar are being autoclaved together, high amount of H_2O_2 (up to 15 μM) would be generated in the agar medium. This byproduct is considered to impede the colonization of microbes on agar plate. Here, we investigated the effect of H_2O_2 on the amount and diversity of microbes forming colonies on agar plate by adding a variety of concentration of H_2O_2.

We prepared four groups of plates which are differ in their H_2O_2 concentrations, 1.8 μM, 3.2 μM, 8.3 μM and 17.3 μM. Water sample from Ono pond in Hokkaido University was spread on to these plates, incubated at 20°C for 10 days, determined the colony forming units (CFUs), and investigated the diversity of microbes that emerged among different concentrations of H_2O_2. Results showed that the decrease of CFU inversely to the concentration of H_2O_2 was observed. 16S rRNA gene sequencing analysis of each colony demonstrated that the diversity of microorganisms decreased with the increased amount of amended H_2O_2. Decrease in the count of the class *betaproteobacteria* was evident with increased H_2O_2. The organisms within the genera *Rhodoferax, Limnohabitans* and *Pelomonas* within the class *Betaproteobacteria* showed the most obvious decrease. An unclassified genus being found in the *Betaproteobacteria* had also decreased in the same manner. By contrast, the count of colonies within the class *Gammaproteobacteria* (i.e. *Pseudomonas* and *Pantoea*) increased in direct proportion to the amount of H_2O_2.

Taken together, we showed that H_2O_2 biases the diversity of cultivable microbes, which should be considered during the plate preparation.

hydrogen peroxide, H_2O_2, 16S rRNA gene

発表責任者：Motoyuki WATANABE（motoyuki@eis.hokudai.ac.jp）

講演番号：1C3a15
講演日時：3 月 24 日 11:54～ 1 号館 C3 会場

ナノファイバーセルロースを用いた微生物固体培地の新規作製法の検討

New method for preparing solidified nanofibrous cellulose-containing media for growth of extremophiles

○津留 美紀子、磯部 紀之、出口 茂 (海洋機構)
○Mikiko TSUDOME, Noriyuki ISOBE, Shigeru DEGUCHI (JAMSTEC)

【研究目的】微生物の分離培養技術で汎用されている寒天培地は、寒天のゲル化能を超える温度や pH では溶解や軟化がおきるため、高温、強酸、強アルカリ環境下など過酷な培養条件で生育する極限環境微生物の固体培養には使用できない。我々は、寒天に変わる微生物固体培地基材として,高温や酸・アルカリ性溶媒などに非常に強い耐性を示すセルロースを用いた新しい微生物固体培養方法を確立した。この新しい固体培地はオートクレーブ滅菌が可能であり、大腸菌など中温菌の培養はもちろん、寒天培地では不可能であった様々な極限環境微生物のコロニー形成にも成功している。
しかしながら従来のチオシアン酸カルシウム(Ca(SCN)$_2$)飽和溶液を用いたセルロース培地の作製方法（以下 Ca(SCN)$_2$セルロース培地）は、手順が煩雑、加熱温度や時間によっては Ca(SCN)$_2$が分解するなど、作製には熟練を要し、かつコストが高いなどの問題があった。そこで我々は、チオシアン酸カルシウム(Ca(SCN)$_2$)飽和溶液に代わって高濃度臭化リチウム（LiBr）水溶液を用いるセルロース培地の新しい作製方法（以下 LiBr セルロース培地）を確立した。
【実験方法】60 wt%LiBr 水溶液と結晶性セルロース粉末(Avicel)を混和し、140 ℃に加熱してセルロースを溶解させた。溶液をシャーレに分注し、室温で一晩静置することで放冷・固化させた。その後、メタノールと水で LiBr を取り除くことで、LiBr セルロース培地を得た。培養実験は、オートクレーブ滅菌した LiBr セルロース培地に液体培地を含浸させたものを使用した。
【実験結果および考察】得られた LiBr セルロース培地は、直径数十 nm のナノファイバーが絡み合った多孔質体で、Ca(SCN)$_2$セルロース培地と非常に似た構造であり、オートクレーブ滅菌(120°C,20min)も可能であった。大腸菌など中温菌を用いた培養実験で、それぞれ（寒天培地、セルロース培地 2 種）の固体培地のコロニー形成能を比較したところ、コロニー形成能に差がなかったことから、LiBr セルロース培地は微生物固体培地として利用可能なことがわかった。*Thermus thermophileus* HB8（pH7, 80°C）など、寒天培地での固体培養が困難な条件において、LiBr セルロース培地ではコロニー形成を確認した。また他の極限環境微生物の培養についても、コロニー形成が可能であった。LiBr セルロース培地と Ca(SCN)$_2$セルロース培地についての物理化学的特性については、現在解析中であり、これについても報告する。

cellulose, extremophiles, thermophiles

発表責任者：津留　美紀子（tsudomem@jamstec.go.jp）

講演番号：1C3p01
講演日時：3 月 24 日 13:50～ 1 号館 C3 会場

高脂肪食またはコール酸摂取マウス腸内における胆汁酸組成および細菌叢構成の動態解析による胆汁酸仮説の検証

Verification of the 'Bile acid hypothesis' by dynamic analysis of bile acid profile and microbiota composition in the gut of mice fed high-fat diet or cholic acid

○坂本 佳奈子[1]、相磯 知里[1]、松浦 史佳[1]、吹谷 智[1]、園山 慶[1]、小椋 義俊[2]、林 哲也[2]、横田 篤[1]([1]北大農、[2]九大医)

○ Kanako SAKAMOTO[1], Chisato AISO[1], Fumika MATSURA[1], Satoru FUKIYA[1], Kei SONOYAMA[1], Yoshitoshi OGURA[2], Tetsuya HAYASHI[2], Atsushi YOKOTA[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Kyushu Univ.)

【背景と目的】近年，高脂肪食の摂取による肥満やメタボリックシンドロームの発症に腸内細菌叢構成の変化を伴うことが示されているが，高脂肪食の摂取によって腸内細菌叢構成が変化するメカニズムについては不明な点が多い．このメカニズムに関わる因子として，当研究室では脂質の消化・吸収を補助し，かつ強い抗菌活性を示す胆汁酸に着目した．これまでに，ラットでは高脂肪食およびヒトの主要な胆汁酸であるコール酸 (CA) を摂取させた試験により，胆汁酸が腸内細菌叢構成の制御因子であることを明らかにしている．しかし，ラットはヒトやマウスと異なり，胆汁の貯蔵および濃縮を担う胆嚢を持たないため，胆汁酸分泌の挙動が異なる可能性がある．そこで本研究では，マウスを用いて同様の飼育試験を行い，胆汁酸が高脂肪食摂取時の腸内細菌叢の変化に及ぼす影響を評価した．
【方法】＜実験 1＞8 週齢の C57BL/6J 雄性マウスを 2 週間予備飼育後，通常食（脂質 10 kcal%）と純水を与える対照群，高脂肪食（脂質 60 kcal%）と純水を与える HF 群，通常食と 0.06% CA 添加水を与える 0.06% CA 群の計 3 群に分け，8 週間飼育した．解剖時に盲腸内容物を採取し，LC-MS による胆汁酸分析，および 16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を標的とした Illumina MiSeq による菌叢解析に供した．＜実験 2＞8 週齢の C57BL/6J 雄性マウスを 2 週間予備飼育後，通常食と純水を与える対照群，通常食と 0.1% CA 添加水を与える 0.1% CA 群，通常食と 0.2% CA を与える 0.2% CA 群の計 3 群に分け，8 週間飼育した．実験 1 と同様に，胆汁酸分析および菌叢解析を行った．
【結果および今後の予定】HF 群では，Control 群と比較して盲腸内の総胆汁酸濃度および DCA をはじめとする抗菌活性の高い胆汁酸分子種の濃度が有意に増加した．また，Firmicutes 門の有意な増加，Bacteroidetes 門の有意な減少といった腸内細菌叢構成の変化が観察された．一方 0.06% CA 群では，総胆汁酸濃度・細菌叢構成ともに，HF 群と同程度の変化が観察されなかった．以上の結果から，胆汁酸が高脂肪食摂取時の腸内細菌叢の変化に及ぼす影響を評価するためには，0.06% CA では濃度が十分ではないことが示唆された．そこで，2 週間の短期飼育試験により CA 濃度を検討した上で，0.1% および 0.2% CA 添加水を与える 8 週間の飼育試験を行った．その結果，0.1% および 0.2% CA 群において，総胆汁酸濃度に有意な変化はなかったものの，DCA をはじめとする抗菌活性の高い胆汁酸分子種の濃度が有意に増加した．今後は，メタ 16S 菌叢解析および各胆汁酸分子種の濃度と各 OTU の存在比との相関解析を行い，胆汁酸が高脂肪食摂取時の腸内細菌叢の変化に及ぼす影響について，詳細に検証を進めていく予定である．

bile acids, gut microbiota, high-fat diet

発表責任者：横田篤（yokota@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：1C3p02
講演日時：3 月 24 日 14:01～ 1 号館 C3 会場

高脂肪食中に含まれる脂肪酸がラット盲腸内細菌叢構成に与える影響の解明：脂肪酸仮説の検証

Elucidation of the effect of fatty acids in a high-fat diet on the microbiota composition in rat cecum: validation of a fatty-acid hypothesis

○阿部 隆行[1]、渡辺 真通[1]、藤田 祐己[1]、小椋 義俊[2]、吹谷 智[1]、石塚 敏[1]、林 哲也[2]、横田 篤[1]
([1] 北大院農、[2] 九大院医)

○ Takayuki ABE[1], Masamichi WATANABE[1], Yuki FUJITA[1], Yoshitoshi OGURA[2], Satoru FUKIYA[1], Satoshi ISHIZUKA[1], Tetsuya HAYASHI[2], Atsushi YOKOTA[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Kyusyu Univ.)

【研究背景】脂肪を過剰に含む高脂肪食の摂取は、肥満や代謝関連疾患の発症のみならず、腸内細菌叢の特異的な変化を引き起こすことが知られている。我々はこれまでに、高脂肪食の摂取に伴う盲腸内総胆汁酸量の増加が菌叢変化に与える影響を明らかにしてきた。しかし通常食および高脂肪食を摂取したラットにおいて、盲腸内総胆汁酸濃度と有意な相関を示した腸内細菌種が、通常食を摂取したラットの菌叢中に占める相対的な割合は 35%に留まる。このことから、高脂肪食摂取時の特徴的な菌叢変化に影響を与える因子は胆汁酸だけではない可能性が考えられた。胆汁酸以外の因子として、複数の脂肪酸に抗菌活性が報告されている。しかし、脂肪酸が腸内細菌叢の変化に与える影響については十分に理解されていない。そこで本研究では、消化管下部に達した脂肪酸が腸内細菌叢構成に与える影響を解明することを目的とした。
【方法】WKAH/HkmSlc 雄性ラットを 2 週間予備飼育後、AIN-93G 準拠飼料を与える Control 群（大豆油 7%）、大豆油高含有食群（大豆油 30%）、ラード高含有食群（大豆油 7%, ラード 23%）に分けて 8 週間飼育した。解剖時に採取した盲腸内容物を用いて、Illumina MiSeq によるメタ 16S 菌叢解析、GC による脂肪酸分析および UPLC-ESI/MS を用いた胆汁酸分析に供した。
【結果と考察】糞便中総脂肪酸、飽和脂肪酸の排泄量はラード高含有食群が Control 群と比較してそれぞれ有意に増加した。メタ 16S 菌叢解析により得られた盲腸内細菌叢構成のデータと比較したところ、糞便中の総脂肪酸と飽和脂肪酸量は高脂肪食摂取時に特異的に増減する Firmicutes 門の割合と正の相関、Bacteroidetes 門の割合と負の相関を示した。加えて、飽和脂肪酸と有意な相関を示した腸内細菌種が Control 群の菌叢に占める相対的な割合は 57.1%に達した。糞便中飽和脂肪酸と有意に相関する腸内細菌種のうち、盲腸内総胆汁酸濃度とも有意に相関する種は Control 群の菌叢の 20%に留まる。このことから、飽和脂肪酸と胆汁酸は、互いに異なるメカニズムにより宿主の菌叢を変化させていることが示唆された。現在、盲腸内の脂肪酸と菌叢の変化の関連性を明らかにするための高脂肪食の反復飼育試験、並びに菌叢変化に寄与すると示唆された飽和脂肪酸種を摂取させたラット飼育試験について、メタ 16S 菌叢解析、脂肪酸分析および胆汁酸分析を行い、脂肪酸と菌叢の関係のさらなる検証を進めている。

fatty acids, bile acids, gut microbiota

発表責任者：横田篤（yokota@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：1C3p03
講演日時：3 月 24 日 14:12～ 1 号館 C3 会場

胆汁酸変換菌の共培養によるウルソコール酸からデオキシコール酸への変換機構の検証

Verification of the conversion mechanism of ursocholic acid to deoxycholic acid by the co-culture of bile acid-transforming bacteria

○北川 更[1]、Tawthep Sarinya[1]、吹谷 智[1]、小椋 義俊[2]、林 哲也[2]、横田 篤[1] ([1]北大院農、[2]九大院医)

○Sara KITAKAWA[1], Saryinya TAWTHEP[1], Satoru FUKIYA[1], Yoshitoshi OGURA[2], Tetsuya HAYASHI[2], at sushi YOKOTA[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Kyushu Univ.)

【研究背景】肝臓で合成された一次胆汁酸は小腸における脂質の消化吸収に寄与し，腸肝循環により腸管と肝臓を行き来する．しかし，一部は腸肝循環を逃れて大腸へ流入し，腸内細菌による変換を受けて二次胆汁酸となる．ヒトにおいて主要な一次胆汁酸であるコール酸 (CA) は腸内細菌によりデオキシコール酸 (DCA) または 7-oxo-DCA へと変換され，7-oxo-DCA はさらにウルソコール酸 (UCA) へと変換される（図）．DCA は大腸において高濃度に存在し，強い界面活性作用を示し．大腸がんや肝臓がん，肥満等の疾患との関りも示唆されていることから，腸内における DCA 生成のメカニズムを明らかにすることは重要である．これまでに当研究室では，7-oxo-DCA 生成菌が生成した 7-oxo-DCA を DCA 生成菌が基質として利用することで高濃度に DCA が生成されることを示し，腸内での DCA の有意な生成のメカニズムの一端が明らかになりつつある．また，ラットへの CA 添加食投与試験において，腸内で UCA が一度増加した後に減少し，DCA が徐々に増加する現象が観察されている．この結果から，UCA が DCA 生成の基質となることが推測された．そこで本研究では，DCA 生成菌による UCA から DCA への新たな変換反応の同定を目的とした．

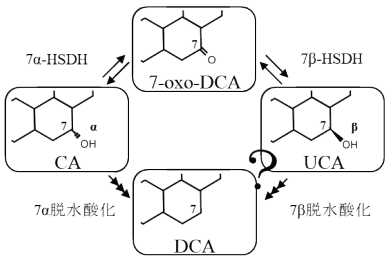


図 大腸における腸内細菌による胆汁酸変換反応

【方法・結果および考察】UCA 生成菌により CA から 7-oxo-DCA を経て UCA を生成させた培養液を用いて様々な胆汁酸変換菌を培養することで，UCA から DCA への変換を検証した．経時的に菌の生育 (OD_{660}) および培地の pH を測定し，培養液から抽出した胆汁酸は UPLC/ESI-MS を用いて分析を行った．DCA 生成菌の単培養では UCA から DCA の生成は認められなかったが，UCA 生成菌との共培養では UCA の減少および DCA の増加が観察された．CA と 7-oxo-DCA，7-oxo-DCA と UCA の相互変換はそれぞれ異なる酵素，7α-hydroxysteroid dehydrogenase (7α-HSDH) および 7β-HSDH が担っており，UCA 生成菌は両酵素を有する．しかし，7α-HSDH と 7β-HSDH の両方，あるいは片方を持たない菌と DCA 生成菌との共培養では，DCA は生成しなかった．以上の結果から，UCA が DCA 生成の基質となることが示された．また，共培養によって UCA 生成菌の単培養では進まない逆反応が起こり，UCA は 7-oxo-DCA，CA を介して DCA へと変換されることが示唆された．この変換機構を解明するために，現在 7α-HSDH および 7β-HSDH をそれぞれ単独または両方発現させた大腸菌株を構築して検証を行っている．

bile acids, gut microbiota, bacterial interaction

発表責任者：横田 篤（yokota@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：1C3p04
講演日時：3 月 24 日 14:23～ 1 号館 C3 会場

高糖野菜発酵液－Kôso 液からの難培養性新規乳酸菌の単離と同定

Isolation and identification of a difficult-to-culture and novel lactic-acid bacterium from a concentrated sugar-vegetable fermented beverage called kôso

○邱 泰瑛[1]、須田 亙[2,3]、大島 健志朗[3]、服部 正平[2,3]、松﨑 千秋[4]、山本 憲二[4]、高橋 知也[5]([1]北見工大、[2]理研生医、[3]東京大院新領域、[4]石川県立大、[5]アルソア R&D)
○Tai-Ying Chiou[1], Wataru Suda[2,3], Kenshiro Oshima[3], Masahira Hattori[2,3], Chiaki Matsuzaki[4], Kenji Yamamoto[4], Tomoya Takahashi[5] ([1]Kitami Tech., [2]RIKEN IMS, [3]Tokyo Univ., [4]Ishikawa Prefectural Univ., [5]ARSOA・R&D)

【目的】「酵素液（Kôso）」と呼ばれる砂糖と野菜を発酵させて作った飲料は日本の伝統発酵食品の一種であり、自然発酵により作られるため、様々な食材に由来する多様な細菌叢を有している。これまでに次世代シーケンサーを利用して細菌叢を分析した結果では、ある未知の菌種が優勢的に存在することが示唆され、*Lactobacillus* 属に属する乳酸菌であることを明らかにしたが、通常の MRS 寒天培地を用いることによる単離ができなかった。本研究では、この未知の菌種を単離・同定し、さらにその特性を検討することを目的とした。
【方法】酵素液は 12 種類の葉菜類、7 種類の根菜類、3 種類のキノコ類、3 種類の糖類を使用して発酵し（50%(w/w)を糖類が占める）、その発酵液を菌の分離源として MRS 寒天培地をはじめ、様々な固体培地に播種してコロニーの形成を試みた。また、96 well マイクロプレートを使用した極限希釈法による菌株の単離を試みた。単離・純粋培養した菌株の DNA を抽出し、PCR で 16S rDNA を増幅した後、シーケンサーで配列を解析した。API 50CHL と API ZYM を利用して、糖資化性と酵素反応を検討し、さらにグラム染色、生育因子、増殖最適 pH と温度、NaCl 耐性などの特性を検討した。
【結果】MRS寒天培地をはじめ、様々な固体培地を用いて発酵液より菌株の単離を試みたが、優勢菌である未知の菌種を単離することができなかった。このため通常の固体培地でコロニーが形成できない難培養菌だと判断し、96 wellマイクロプレートを使用した極限希釈法により単離を試みた結果、優勢菌である未知の菌種の単離に成功した。このとき、液体培地中にシングルコロニーの形成が観察された。16S rDNAを解析した結果、*L. kunkeei*、*L. ozensis*、*L. apinorum*との一致率はそれぞれ95.5%、95.4%、95.3%であった。そこで、これらの乳酸菌がフルクトースを糖源として良好に生育する知見に基づいて、MRSブロス培地にフルクトースを添加して培養した結果、5-20%の存在下で良好に増殖した。一方、フルクトース無添加の培地では増殖が見られなかった。この結果、未知の優勢菌はフルクトフィリック（好フルクトース）乳酸菌であることが示唆された。API 50CHで糖資化性を検討した結果、他の糖による資化性はみられず、API ZYMで検討した結果、Acid phosphataseとNaphthol AS-BI-phosphohydrolaseのみの反応が見られた。本菌はグラム陽性を示し、最適増殖条件はpH 6.5、27℃であり、2%以上のNaCl添加で増殖が見られない。この優勢菌は新規な乳酸菌と判断し、酵素液（Kôso）から単離したため、*Lactobacillus kosoi*と名付けてIJSEMに登録した。また、本菌株が、マウスパイエル板IgA産生を強力に誘導することを明らかにしている。

koso, Lactobacillus kosoi, fructophilic

発表責任者：邱　泰瑛（tkyuu@mail.kitami-it.ac.jp）

講演番号：1C3p05
講演日時：3 月 24 日 14:34～ 1 号館 C3 会場

高 LPS 含有の水耕ホウレン草に共生するグラム陰性細菌の解析

Analysis of gram-negative bacteria symbiotic to hydroponic spinach containing high LPS

○山下 賀容子[1]、重藤 和明[1]、稲川 裕之[2]、杣 源一郎[2]（[1]一般財団法人 雑賀技術研究所、[2]自然免疫制御技術研究組合）
○Kayoko YAMASHITA[1], Kazuaki Shigefuji[1], Hiroyuki Inagawa[2], Gen-Ichiro Soma[2] ([1]Saika Technological Institute Foundation, [2]Control of Innate Immunity Technology Research Association)

【背景・目的】我々はこれまで多くの農産物中にリポ多糖(LPS)が含まれることを見出しており、特に、ヒトに対して長く食経験のある小麦粉より単離された共生細菌の中で、パントエア・アグロメランス（グラム陰性菌）の細胞壁成分である LPS の経口投与が、腹腔食細胞や脳マイクログリアの貪食能を増強するなどの緩和なマクロファージ細胞活性化能を示すこと、また感染症やメタボリックシンドローム、アレルギーなど生活習慣病を予防する効果を示すことを報告してきた。LPS を含む農産物としては、小麦のほかに蕎麦や米、蓮根、漢方（生薬）等があり、それら農産物の共生細菌に由来する LPS によっても自然免疫活性化能が示されることが明らかにされてきたが、一般的な野菜においては未だほとんど解析されていない。そこで、各種野菜を中心とした農産物の LPS 含量についてスクリーニングを実施したところ、ホウレン草に特に高い LPS 含量が示されることを見出した。

【方法・結果】今回の報告では、ホウレン草において高 LPS 含量である理由を調べるため、年間安定して供給される水耕栽培ホウレン草を調べることにより、栽培時の気温による LPS 含量の変化や、ホウレン草共生細菌の 16S リボソーム RNA による菌叢解析、栽培中の細菌の共生時期などについて調べた。その結果、水耕栽培ホウレン草の根から選択的に取り込まれるグラム陰性菌が存在すること、その菌はホウレン草内でも存在することが明らかとなった。また、グラム陰性菌の由来については、栽培環境因子としての土壌や大気、水などからの共生が考えられたが、主にホウレン草の種子由来であることも明らかとなった。

【考察】農産物からの LPS の経口摂取は、農薬などの使用から減少していると考えられ、そのことがアレルギー性疾患の増加と関連することが推定されている。そのため、グラム陰性菌が共生しやすいホウレン草種子や栽培条件を明らかにすることは、安定して高い LPS 量を含むホウレン草の栽培が可能となり、さらには、高 LPS 含有のために高い自然免疫活性を有し、アレルギーなどの生活習慣病に罹りにくい機能性農産物を生産できる技術を確立できる可能性につながる。

LPS, Innate immunity, Spinacia oleracea

発表責任者：山下賀容子（k.yamashita@saika.or.jp）

講演番号：1C3p06
講演日時：3 月 24 日 14:55～ 1 号館 C3 会場

Artificial creation of disease suppressive soil by using media immobilized with the microbial ecosystem

○JAMJAN MEEBOON[1], Makoto Shinohara[1], Kazuki Fujiwara[1], Kenji Miyamoto[2], Yasuo Kato[3], Akinori Ando[4,5], Jun Ogawa[4,5] ([1]NARO, [2]Dept. Biosci. Inform., Keio Univ., [3]Biotech. Res. Cent., Toyama Pref. Univ., [4]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [5]Res. Unit Physiol. Chem. Kyoto Univ.)

Introduction

The existence of disease suppressive soils has been recognized worldwide for almost 60 years. Disease suppressive soils are defined as soils in which the pathogen does not establish or persist, the pathogen establishes but causes no damage to plants or the pathogen causes some disease damage, but the disease becomes progressively less severe even though the pathogen persists in soil. Numerous analyses of the disease suppression mechanisms have been carried out by investigations into the soil minerals, antagonistic microorganisms, and microbial ecosystem, but the exact disease preventing factors are still unknown. Synthetically generated suppressive soils have not been created to date even after the inclusion of antagonistic bacteria to the soil as they cannot establish within the soil. We have developed a novel method for an organic hydroponics system utilizing organic fertilizer by a construction of a microbial ecosystem in the hydroponic culture solution. It has been documented that organic hydroponics can inhibit pathogen *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum* in the same way that suppressive soils function. In this study, we attempted to create an artificial suppressive soil through the addition of microorganisms into the culture solution of organic hydroponics to the artificial media.

Methods / Results

The bacteria were cultured by the addition of 1 g/L of fish-based soluble fertilizer, 10 g/L of soil as microbial inoculum with aeration. The culture solution was inoculated onto rockwool cubes. The addition of the fish-based soluble fertilizer to the cubes resulted in the generation of inorganic nutrients such as nitrate. This result indicates the successful artificial creation of soil by inoculation of microbial culture solution to artificial media. When the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* was inoculated to the rockwool cube, the growth of the pathogen was suppressed. Microscopic examination showed no hyphal elongation of *Fusarium oxysporum*, these results indicate that inoculation of the organic hydroponic solutions to artificial media can create suppressive soil.

disease control, organic hydroponics, suppressive soil

発表責任者：Meeboon Jamjan（mibunj714@affrc.go.jp）

講演番号：1C3p07
講演日時：3 月 24 日 15:06～ 1 号館 C3 会場

有機養液栽培に於ける根の成長促進物質の探索

Isolation and identification of root growth promoter from biofilm of organic hydroponics

○黄 穎[1]、篠原 信[2]、メツナー リチャード[3]、加藤 康夫[3]、安藤 晃規[4]、小川 順[4]、宮本 憲二[1]([1]慶應義塾大学、[2]野菜茶業研究所、[3]富山県立大学、[4]京都大学　農学研究科)
○YING HUANG[1], MAKOTO SHINOHARA[2], Richard Metzner[3], YASUO KATO[3], AKINORI ANDO[4], JUN OGAWA[4], KENJI MIYAMOTO[1] ([1]Dept. Biosci. Inform., Keio Univ., [2]NARO, [3]Biotech. Res. Cent., Toyama Pref. Univ., [4]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ)

1. 背景・目的

有機質肥料活用型養液栽培（以下、有機養液栽培）は、無機養液栽培と比較して環境負荷を低減でき、有機物を肥料として使用できる水耕栽培の新手法である。本栽培法は、これまで実現が困難とされてきた水中における土壌環境の再現に成功したことから水耕栽培の新しい方法として注目を集めている。有機養液栽培では植物の根圏にバイオフィルムと呼ばれる微生物の群集構造が形成され、有機物を植物が吸収可能な状態にまで変換（硝化）する。これまでに、バイオフィルム中では有機物の硝化から植物への栄養供給までの流れが効率的に行われることや、バイオフィルムが存在することで植物の根の成長促進や病害抑制など興味深い現象が確認されている。

そこで本研究では、根圏と微生物の相互作用を化学物質の観点から解析するために、バイオフィルムから植物の根の成長促進を行う生理活性物質の取得を目的とした。

2. 方法と結果

<u>活性物質の単離・同定</u>

カツオ煮汁を有機質肥料としてマイクロトムの栽培を行った。そして、得られた根圏のバイオフィルムを EtOH 抽出し、水層画分と有機層画分を分配し、シロイヌナズナを用いた活性試験を行った。そして、試験結果を基に、順相・逆相カラムクロマトグラフィーや HPLC などで精製を進め、ESI-MS と NMR により構造解析を行った。その結果、水層画分からトリプトファン(L-Trp)、有機層からコレステロール(CHO)を活性物質として同定した。

<u>活性評価系の構築</u>

モデル植物のシロイヌナズナとトマトと同じナス科のタバコを対象植物として、最適なアッセイ環境と栽培培地組成を検討し、根（主根、側根）と葉の成長に対する評価方法を確立した。

<u>活性物質の活性評価</u>

シロイヌナズナとタバコに対して、市販の L-Trp、D-Trp と CHO はいずれも根の成長促進効果(主根伸長、側根促進、根毛促進）が確認できた。加えて CHO と Trp による相乗効果が確認できた。

また、活性物質による発芽への影響および植物への吸収・蓄積・代謝についてもあわせて報告する。

tryptophan, biofilm, organic hydroponics

発表責任者：宮本　憲二（kmiyamoto@bio.keio.ac.jp）

講演番号：1C3p08
講演日時：3 月 24 日 15:17～ 1 号館 C3 会場

Cobalt-dependent inhibition of nitrite oxidation in *Nitrobacter winogradskyi*

○Richard Metzner[1], Taiji Nomura[1], Naoki Kitaoka[1], Kenji Miyamoto[2], Makoto Shinohara[3], Akinori Ando[4,5], Jun Ogawa[4,5], Yasuo Kato[1] ([1]Biotech. Res. Cent., Toyama Pref. Univ., [2]Dept. Biosci. Inform., Keio Univ., [3]NARO, [4]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [5]Res. Unit Physiol. Chem., Kyoto Univ.)

【Introduction】

Nitrifying bacteria play an important role in the global nitrogen cycle, oxidizing ammonia (NH_3) to nitrate (NO_3^-) via nitrite (NO_2^-). Despite their importance, little is known about how to improve their cell density in soil or nitrification bioreactors. Thus, the use of axenic cultures of nitrifying bacteria could provide more information about the factors regulating their cell growth. In the course of our study to design a microbial consortium capable of generating inorganic fertilizer from food-processing waste,[1)] we observed a hitherto unknown heavy metal inhibition of the NO_2^- oxidation (Nox) of *Nitrobacter winogradskyi* in a mineral medium with IC_{50} values as low as 0.2 μM.[2)] Since this inhibition led to high concentrations of phytotoxic NO_2^- in the medium, in this study, we examined in detail how *N. winogradskyi* is affected by these metals.

【Methods / Results】

Nox activity of axenic cultures of *N. winogradskyi* NBRC 14297 in liquid medium was analyzed via colorimetric determination (Griess assay) of NO_2^- consumption and compared with the cell growth based on colony-forming units (CFU) on solid medium.

We found that (i) Co^{2+}, Cu^{2+} and Zn^{2+} are medium-derived heavy metal inhibitors with IC_{50} values in the lower μM range. Co^{2+} was the strongest inhibitor of both Nox activity and cell growth. (ii) Combinations of Co^{2+} with each other component of the medium gave logistic dose-responses for divalent cations, i.e. Ca^{2+} and Mg^{2+}, indicating a competitive Co^{2+} uptake via their corresponding ion transporters. Albeit saturation by these alkaline earth metals significantly increased the Co^{2+} resistance in *N. winogradskyi*, a residual IC_{50} of 14.7 μM was determined. (iii) Several natural chelators were screened in an effort to develop a complete detoxification from Co^{2+} which might be applied ad hoc to organic hydroponic solutions with phytotoxic NO_2^- levels. L-Histidine was identified as a potential lead compound when applied with Co^{2+} to axenic cultures of *N. winogradskyi* with a Nox recovery of >90% at a molar ratio of 2:1 (ligand/metal).

1) 2017 JSBBA Ann. Meeting, 3C19a03. 2) 2018 JSBBA Ann. Meeting, 3A02a13.

Nitrification, cobalt toxicity, calcium antagonism

発表責任者：加藤　康夫（ykato@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：1C3p09
講演日時：3 月 24 日 15:28～ 1 号館 C3 会場

Lanthanide-dependent formaldehyde oxidation pathways in *Methylobacterium aquaticum* strain 22A

○Patcha YANPIRAT, Akio TANI (IPSR, Okayama Univ.)

Methylobacterium species are one of the most predominant methylotrophic bacteria in the phyllosphere. It utilizes methanol emitted from plants as a sole carbon and energy source. Methanol is oxidized into formaldehyde by methanol dehydrogenases (MDHs), encoded by *mxaF* and *xoxF,* which are calcium- and lanthanide-dependent. Since formaldehyde is toxic, it is necessary to detoxify the compound. Formaldehyde is then oxidized by tetrahydromethanopterin (H_4MPT) and glutathione (GSH) pathways. Our transcriptomic analysis revealed that in the presence of lanthanide (Ln), *xoxF* is highly induced while *mxaF* is repressed. Additionally, H_4MPT and GSH pathways were downregulated but there was high formaldehyde dehydrogenase activity. These results suggested that formaldehyde oxidation other than these two pathways takes place. It was reported that XoxF can oxidize formaldehyde and methanol. The objective of this research is to genetically and biochemically reveal the exact methylotrophic roles of XoxF in the presence of Ln, focusing on formaldehyde oxidation. Additionally, the roles of other formaldehyde oxidation pathways would be investigated. We have generated single/multiple deletion mutants for formaldehyde oxidizing enzyme genes, namely *fae1* and *fae2* (formaldehyde activating enzyme), *mch* (methenyl-H_4MPT cyclohydrolase), and *hgd* (S-hydroxymethyl glutathione dehydrogenase), as well as *mxaF* and suppressed *xoxF1* mutants. The mutants were grown on methanol in the absence and presence of Ln. We found that 1. Δ*hgd* did not show any phenotype in any genetic backgrounds and growth conditions, suggesting that GSH pathway is less important compared to H_4MPT. 2. In wild type (WT) and Δ*xoxF1*sup backgrounds, *fae1* was crucial for the growth but *fae2* was not*,* contrary to Δ*maxF* background where Δ*fae1* showed better growth and Δ*fae2* did not show clear phenotype, suggesting that the roles of *fae1* and *fae2* differ based on the presence of Ln. 3. In WT and Δ*xoxF1*sup backgrounds, Δ*mch* showed no growth suggesting formaldehyde accumulation, but Δ*mch* in Δ*mxaF* exhibited growth, suggesting that *mxaF* may play a role in repressing *xoxF1* and XoxF1 can oxidize formaldehyde. 4. The Δ*mxaF* Δ*fae1*Δ*fae2*Δ*hgd*Δ*mch* mutant lacks all formaldehyde oxidation genes but exhibited growth in the presence of Ln. This suggests that when only *xoxF* is working, formaldehyde oxidation pathways are not needed. These results genetically supported that XoxF can oxidize methanol directly to formate. Furthermore, our results suggested that H_4MPT and GSH pathways are necessary only when *mxaF* is active. Also, XoxF was extracted, purified, and characterized to further analyze its formaldehyde oxidation abilities.

Methylobacterium, lanthanide, methanol dehydrogenase

発表責任者：谷　明生（atani@okayama-u.ac.jp）

講演番号：1C3p10
講演日時：3 月 24 日 15:39～ 1 号館 C3 会場

*Methylobacterium aquaticum*22A 株におけるメチロタキシスの機能解析
Molecular mechanism of methylotaxis in *Methylobacterium aquaticum* strain 22A
○春名 優希[1]、加藤 純一[2]、谷 明生[1] ([1]岡山大植物研、[2]広島大先端物質)
○Yuuki Haruna[1], Junichi Kato[2], akio Tani[1] ([1]Okayama Univ. Institute of plant., [2]Hiroshima Univ. of Advanced Material.)

【目的】
Methylobacterium 属細菌は植物表面上の細菌の 10-20%を占める優占種で、植物由来のメタノールを利用して生育し、また植物の生育を促進する。共生が成立する前の段階で、本属細菌は何らかの植物由来の物質を感知してその存在を探し当てていると考えられる。私たちはエゾスナゴケから分離した *M. aquaticum* 22A 株がメタノールに対して走化性を示すことを見いだした。22A 株ゲノム中には走化性センサーである methyl-accepting chemotaxis protein (MCP)と考えられる遺伝子が 52 個存在し、多様な化合物を認識すると考えられる。RNA-seq による発現解析データからメタノールセンサーMCP 候補を絞り込み、遺伝子欠失株の作製と走化性のアッセイにより、最終的に 3 つの遺伝子(MCP1,MCP2,MCP3)欠失株において走化性が完全に失われた。これら 3 遺伝子の、単独遺伝子欠損株や二重遺伝子欠失株において走化性が完全に失わないことから、3 つの MCP がそれぞれ独立して機能していると考えられた。また三重欠失株はアミノ酸等には野生株と同等の走化性を示し、植物の根に対する走化性が弱まったことから、メタノールとそれに対する走化性が本属細菌と植物との共生ステップに重要であることが示された。これらはメタノール脱水素酵素が要求するランタノイドの存在により発現量が変化した。また本株はホルムアルデヒドにも走化性を示すことから、ホルムアルデヒドセンサーの同定も試みた。
【方法と結果】
MCP1 は MCP signal ドメインのみから構成されており GFP タグタンパク質は細胞質に局在した。MCP2 は Energy taxis を司るとされる PAS ドメインを保持しており、細胞の極に局在するが、ランタノイドの存在により発現が高まり細胞周辺に局在した。MCP3 はペリプラズムドメインと HAMP ドメインを保持し極に局在した。3 つの MCP においてランタン及びメタノール濃度への依存性を検討したところ、MCP1 はランタン非存在下高親和性、MCP2 はランタン存在下低親和性、MCP3 はランタン非存在下低親和性メタノールセンサーであった。
　また野生株はランタノイド存在下でのみホルムアルデヒドに走化性を示したことから、ランタノイドで高発現する MCP を二つ(MCP4 と 5)見いだし、それぞれの遺伝子欠失株でホルムアルデヒドに対する走化性が弱まることを見いだした。現在 MCP4,5 の両遺伝子欠失株の作製と、MCP1 が相互作用すると考えられるタンパク質の探索を行っている。

Methylobacterium, Chemotaxis, Methanol

発表責任者：谷　明生（atani@okayama-u.ac.jp）

講演番号：1C3p11
講演日時：3 月 24 日 16:00～ 1 号館 C3 会場

Methylobacterium aquaticum 22A 株における La 誘導性タンパクの機能解析

Functional analysis of lanthanide inducible protein of *Methylobacterium aquaticum* strain 22A

○藤谷 良子、谷 明生（岡山大植物研）
○Yoshiko FUJITANI, Akio TANI (IPSR,Okayama Univ.)

[目的]

Methylobacterium 属菌は、植物が放出するメタノールを利用して植物葉上で優占化する細菌の一種である。本属細菌はメタノールを酸化するための PQQ 依存 methanol dehydrogenase(MDH)を持っており、本酵素は植物の葉上で最も高発現するペリプラズム酵素である。本属細菌ゲノムの多くにおいて MDH は *mxaF* と *xoxF* の 2 つの遺伝子にコードされており、MxaF はカルシウムを活性中心に持つ酵素であることが分かっていた。一方の XoxF の機能は長らく分かっていなかったが、近年、希土類元素であるランタノイドのいくつかを補因子として利用することが明らかとなった。本酵素は生物学的にランタノイドに依存することが初めて知られた酵素である。

エゾスナゴケから分離された植物生育促進菌である *M. aquaticum* 22A 株において、RNA Seq 解析を行ったところ、La の存在下では XoxF が優先的に発現し、La の非存在下では MxaF のみが発現することが分かった。またそれ以外に、La 存在下で高発現する機能未知のタンパク質をコードするいくつかの遺伝子がゲノム中に見られた。本研究では、これらのうち Ca-binding protein(CaBP)をコードする遺伝子(*cbp*)について機能解析を行い、ランタノイドが生物学的プロセスにどのように関わるのかを解明する手がかりを得ることを目的とした。

[方法・結果]

CaBP は、EF-hand と呼ばれる Ca 結合ドメインを持ち、*Methylobacterium* 属細菌の多くや *Bradyrhizobium* 属細菌のゲノムにも保存されていた。推定タンパク質アミノ酸配列の N 末端にはシグナルペプチドの存在が示唆され、12 kDa のタンパク質をコードすると考えられた。qPCR により *cbp* は La 存在下で発現量が上がることを確認した。22A 株細胞内で GFP タグ付 CaBP タンパク質を発現させ、共焦点顕微鏡観察により、ペリプラズム周辺に局在することが分かった。また *cbp* 遺伝子欠失株は、La の存在の有無に関わらずメタノールでの生育能を失わなかったことから、メタノール代謝には関連しないと考えられた。MDH の発現量を qPCR で解析したところ、*mxaF* の発現量が野生株よりも高くなっていたことから、MDH の発現抑制にも関与していると考えられた。また *cbp* 遺伝子欠失株は野生株に比べてランタノイドを取り込む量が少なくなることが分かった。

大腸菌において His タグ付リコンビナントタンパク質を発現、精製した。La 存在下で UV 吸収スペクトルや Native PAGE での泳動度、ゲル濾過での溶出に変化が見られたことから、CaBP タンパクは La を結合し、構造変化を起こしていることが示唆された。また GST タグ CaBP を用い、Pulldown 法により 22A 株の細胞抽出液から相互作用すると推定されるタンパク質の探索を行った。

Methylobacterium, lanthanide, methanol dehydrogenase

講演番号：1C3p12
講演日時：3 月 24 日 16:11～ 1 号館 C3 会場

Methylobacterium aquaticum strain 22A におけるランタノイドスイッチのメカニズム
The mechanism of lanthanide switch in *Methylobacterium aquaticum* strain 22A
○宮本 稚子、谷 明生（岡山大植物研）
○Wakako MIYAMOTO, Akio TANI (IPSR,Okayama Univ.)

[目的]
植物生育促進菌として分離された *Methylobacterium aquaticum* 22A 株は Ca2+または La3+の存在下でメタノールを炭素源として生育する。メタノール脱水素酵素（MDH）には 2 種類あり、一つは Ca2+に依存しヘテロテトラマー構造を取る MxaF/I である。もう一つは La3+や Ce3+などのランタノイドに依存しモノマーである XoxF である。この XoxF はランタノイド依存酵素として始めて発見された酵素である。本属細菌はランタノイドの存在下では XoxF を優先的に利用し、ランタノイドの非存在下では MxaFI を利用する。これはランタノイド・スイッチと呼ばれている。mxaF を欠失させた株は xoxF が存在しているために La3+存在下でメタノールに生育する。xoxF を欠失させた株は mxaF が存在するにも関わらず、Ca2+存在下で生育しない。すなわち mxaF の発現は xoxF に依存する。xoxF 欠失株からメタノール生育が回復した突然変異株ΔxoxF1Sup 株のゲノムシーケンスにより、変異が膜局在型ヒスチジンキナーゼをコードする mxbD に見つかった。mxbD 欠失株は La3+非存在下では生育しない。ΔMxbD 株では、mxaF の発現が低く、xoxF が La3+非存在下でも高い発現を示していることから、mxbD は mxaF 発現および xoxF 抑制に関わっていることが予測された。また変異を導入した mxbD を導入すると La 非存在下での生育が回復したことから、ランタノイド・スイッチを司るのは MxbD であることが示唆された。モデル菌株 M. extorquens AM1 株では MxbD は転写調節因子 MxbM と共に二成分系シグナル伝達経路を構成すると考えられている。22A 株でも両遺伝子はタンデムにゲノムにコードされている。
MxbD が認識するリガンドはまだ不明であり、La3+存在下で MxbM がリン酸化されるのかどうか、またリン酸化 MxbM が mxaF, xoxF のプロモーターに結合してそれぞれを正、負に調節するのかどうかは不明である。そこで、本研究では *M. aquaticum* 22A のランタノイド・スイッチにおける MxbDM の役割を明らかにすることを目的とした。
[方法]
mxbD を 22A 株において His-tag タンパク質として発現させ、Pulldown 法により 22A 株の細胞抽出液から相互作用するタンパク質の同定を試みた。また MxbM 抗体を作製し、22A 株の野生株と mxbD, xoxF など様々な遺伝子欠失株を用い MxbM のリン酸化状態をウェスタンブロッティングによって検討した。また mxbM 欠失株の表現型についても検討を行っている。

Methylobacterium, Lanthanide, Methanol dehydrogenase

講演番号：1C3p13
講演日時：3 月 24 日 16:22～ 1 号館 C3 会場

嫌気的アンモニア酸化能を有する酸素非発生型光合成細菌の探索

Searching for anaerobic ammonia-oxidizing photosynthetic bacteria

○中小路 菫[1]、成廣 隆[2]、延 優[2]、嶋田 敬三[1]、春田 伸[1]、花田 智[1] ([1]首都大理、[2]産総研)
○Sumire Nakakoji[1], Takashi Narihiro[2], Masaru K. Nobu[2], Keizo Shimada[1], Shin Haruta[1], Satoshi Hnada[1] ([1]Tokyo Metropolitan Univ. of Science, [2]AIST)

【目的】嫌気的アンモニア酸化能を有する酸素非発生型光合成細菌の探索
【背景】地球の大気の約 78%は窒素であり、この窒素循環は地球上に生息する生き物にとって欠かせない。特に窒素循環の硝化（アンモニア酸化、亜硝酸酸化）や脱窒は微生物の働きが必要不可欠であり、自然環境中のみならず、廃水処理施設にも利用されている。脱窒が無酸素条件で行われるのに対し、硝化過程には酸素が必須であり、またその反応に時間がかかることが問題となっている。硫化水素や二価鉄などの無機物を電子供与体とした光合成は嫌気性酸素非発生型光合成細菌にとっては一般的であり、光合成細菌による嫌気条件下での硝化反応の可能性も無視できない。実際、亜硝酸を用いる（つまり、嫌気条件下で亜硝酸を硝酸に酸化する）光合成細菌の存在もすでに報告されている（Griffin et al., 2007；Schott et al.,2010）。しかし、アンモニア酸化光合成細菌の存在も示唆されているにも関わらず（Broda. 1976）、アンモニアを電子供与体として光合成を行う細菌は未だ発見されていない。もしアンモニア酸化光合成細菌を見つけ出すことができれば、光合成細菌を利用した新たなる嫌気条件下での硝化行程の開発を行う事が可能となる。
【方法】サンプリングは宮城県の松島の海で行なった。アンモニア酸化は青色光に阻害されることが知られている。バクテリオクロロフィルの吸収波長が赤外光であることを考慮して培養に 700㎚ 以上の波長のみ使用した。嫌気条件下の元、電子供与体はアンモニアのみの無機培地でアンモニア酸化細菌の最適温度である 28℃での培養を試みた。
【結果・考察】光合成細菌を含む培養物の取得に成功し、安定的に植え継ぎを繰り返すこともできた。アンモニアの減少も確認することができ、この条件で生える細菌群は酸素を使わずに光を利用してアンモニア酸化し、エネルギーを得ていると考えられる。得られたサンプルを形態観察・16S アンプリコン解析を行なった結果、酸素非発生型光合成細菌である *Marichromatium* sp. を含む、4 種の細菌を主要とする複合系であることが判明した。通常の好気的アンモニア酸化ではアンモニアから亜硝酸・硝酸が生成されるが、本研究では検出されなかったことから、複合系内で窒素循環による亜硝酸・硝酸の消費（酸化または還元）が複雑に行われていると考えた。本研究は光合成細菌を含む複合系による嫌気的アンモニア酸化現象を世界に先駆けて示すものであり、廃水処理における硝化技術の革新に繋がる研究シーズと言えよう。

ammonia-oxidation, photosynthesis, wastewater treatment

発表責任者：中小路菫（nakakoji-sumire@ed.tmu.ac.jp）

講演番号：1C4a02
講演日時：3 月 24 日 09:11～ 1 号館 C4 会場

スギヒラタケの産生する毒性物質に関する生化学的研究
Biochemical studies on toxic substances produced by *Pleurocybella porrigens*
○中村 瑠奈[1]、稲吉 里美[2]、崔 宰熏[2,3]、道羅 英夫[3]、笹浪 知宏[2]、平井 浩文[2,3]、河岸 洋和[2,3]、鈴木 智大[4] ([1]宇大・農、[2]静大・農、[3]静大・グリーン研、[4]宇大・バイオ)
○ Luna NAKAMURA[1], Satomi INAYOSHI[2], Jae-Hoon CHOI[2,3], Hideo DOHRA[3], Tomohiro SASANAMI[2], Hirofumi HIRAI[2,3], Hirokazu KAWAGISHI[2,3], Tomohiro SUZUKI[4] ([1]Fac. of Agric., Utsunomiya Univ., [2]Dept. of Agric., Grad. School of Integr. Sci. and Technol., Shizuoka Univ., [3]Res. Inst. of Green Sci. and Technol. Shizuoka Univ., [4]C-Bio, Utsunomiya Univ.)

【目的】
2004 年、東北・北陸地方を中心に原因不明の急性脳症が発生し、患者数は 59 名に達し、17 名の患者が亡くなった。うち 55 名はスギヒラタケ（*Pleurocybella porrigens*）を摂取していたことから、スギヒラタケが急性脳症の原因であることが予想されたが、未だその発症機構は不明である。我々は現在までに、スギヒラタケからレクチン（PPL）の単離・精製・遺伝子クローニングに成功しており [1)]、PPL とスギヒラタケ致死性高分子（B3）を混合するとプロテアーゼ活性を示し、血液脳関門を破壊することを報告している [2)]。しかしながら、B3 は難溶性であるため未だ 1 次構造が不明である。また PPL 単独でもプロテアーゼ活性が表れる場合があり、その時の MS スペクトルには PPL のピークのほかに *m/z* 13000 付近にピークが確認された。そのため、この物質が B3 と同様にプロテアーゼ活性に関与していると推定し、本タンパク質（PP13000 と命名）の構造決定を行った結果、PPL の部分配列であるということを明らかにした。そこで本研究では PPL と PP13000 の異種発現系の構築を試み、その諸性質を明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】
大腸菌のコールドショック発現系用ベクター（pCold I）に目的遺伝子（*ppl* および *pp13000* 遺伝子）をそれぞれ導入し発現プラスミドを構築した。本プラスミドを大腸菌に形質転換し発現誘導を行った後、菌体を回収・破砕し可溶性画分を精製した。得られた可溶性画分を His GraviTrap アフィニティークロマトグラフィーにより精製後、SDS-PAGE および LC-MS/MS をもちいたタンパク質同定を行い、それぞれの組換えタンパク質の発現および精製を確認した。得られた組換えタンパク質の諸性質を決定するため、赤血球凝集活性試験を行いレクチン活性の有無を試験した結果、recombinant PPL（rPPL）ではレクチン活性が確認されたが、recombinant PP13000（rPP13000）ではその活性は確認されなかった。さらにインスリンを基質としたプロテアーゼ活性試験を行い、MALDI-TOF/MS によりプロテアーゼ活性の有無および基質開裂パターンの確認を試みた。その結果 native B3 と rPPL を混合したサンプルでは、天然と同様の基質の開裂パターンを示したのに対し、rPPL と rPP13000 を混合したサンプルでは基質の消失のみが観察された。現在詳細に解析中である。
1) Suzuki, T., et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73, 702-709 (2009)
2) 鈴木ら、第 52 回天然有機化合物討論会講演要旨集、p. 655(2010)

toxic mushroom, *Pleurocybella porrigens*, protease

発表責任者：鈴木智大（suzukit@cc.utsunomiya-u.ac.jp）

講演番号：1C4a03
講演日時：3 月 24 日 09:22～ 1 号館 C4 会場

スギヒラタケが産生する毒性物質に関する組織学的研究
The histological studies on effect of toxic substances produced by *Pleurocybella porrigens.*
○手塚 裕紀[1]、浅川 倫宏[2]、前川 文彦[3]、木村 栄輝[3]、菅 敏幸[4]、河岸 洋和[5,6]、鈴木 智大[1,7]([1]宇都宮大・農、[2]東海大・創造技研、[3]国立環境研究所・環境リスク・健康研究センター、[4]静県大・薬、[5]静岡大・農、[6]静岡大・グリーン研、[7]宇都宮大・バイオ)
○Yuki TEZUKA[1], Tomohiro ASAKAWA[2], Fumihiko MAEKAWA[3], Eiki KIMURA[3], Toshiyuki KAN[4], Hirokazu KAWAGISHI[5,6], Tomohiro SUZUKI[1,7] ([1]Faculty of Agriculture, Utsunomiya University, [2]Tokai University Institute of Innovative Science and Technology, [3]National Institute for Environmental Studies, [4]School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, [5]Department of Agriculture, Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka University, [6]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, [7]Center for Bioscience Research and Education, Utsunomiya University)

【目的】
2004 年、東北・北陸地方を中心に原因不明の急性脳症が発生し、その原因としてスギヒラタケ（*Pleurocybella porrigens*）が特定されたが、その発症機構は未解明である。我々は現在までに、スギヒラタケからレクチン(PPL)の単離・精製に成功し、そのアミノ酸配列および cDNA 塩基配列情報の取得に成功しており [1]、PPL とマウスに致死活性を示す糖タンパク質であるスギヒラタケ致死性高分子(B3)を混合するとプロテアーゼ活性を示し、血液脳関門を破壊することを報告している [2]。さらに、スギヒラタケエタノール可溶部より単離された化合物の構造から推定された不安定な予想前駆体であるアジリジン化合物（pleurocybellaziridine:PA）の合成に成功し、スギヒラタケ中での存在及びミエリン鞘を構成するオリゴデンドロサイトに特異的な毒性を明らかにした [3]。それら総合的な知見から、B3-PPL 複合体が血液脳関門を破壊し、その後神経細胞毒性を持った低分子化合物（PA）がスギヒラタケ脳症に特異な脱髄病変を引き起こすという仮説急性脳症メカニズムを提唱した。そこで本研究では本急性脳症の作用機序の解明を目的とし、上述のスギヒラタケ由来成分がマウスの脳組織に与える影響を検討した。

【方法・結果】
スギヒラタケ由来成分の毒性はマウス（ddY、5 週齢）に腹腔内投与することで試験した。スギヒラタケ由来成分（B3、PPL および PA）単独投与群、プロテアーゼ活性を示す 2 成分（B3 および PPL）同時投与群および 3 成分同時投与群を作成し、投与 72 時間後に潅流固定した後、脳組織を採取した。得られた脳組織を 30%スクロース溶液に浸漬し脱水後、ドライアイスで凍結し切片作成機で 50 μm の脳切片を作成した。得られた脳切片を各種抗体で免疫染色後、3,3'-diaminobenzidine で発色させ、投与成分による影響を顕微鏡にて観察した。その結果、一次抗体にアポトーシス細胞を標識する anti-ssDNA 抗体を用いた染色を行った組織の海馬（歯状回）において、3 成分同時投与群は対照群と比較してアポトーシス細胞数を有意に増加することが明らかとなった。

1) Suzuki, T., et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73, 702-709 (2009)
2) 鈴木ら、第 52 回天然有機化合物討論会講演要旨集、p. 655(2010)
3) Wakimoto, T., et al., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 50, 1168-1170 (2011)

Toxic substance(s), mushroom, *Pleurocybella porrigens*

発表責任者：鈴木智大（suzukit@cc.utsunomiya-u.ac.jp）

講演番号：1C4a04
講演日時：3 月 24 日 09:33～ 1 号館 C4 会場

Bacillus 分離株 W-O-1A が産生する抗カビ物質の同定
Identification of antifungal substances produced by *Bacillus* isolate W-O-1A
○加藤 蒼[1]、佐藤 有里華[2]、尾形 友朔[2]、松浦 成美[2]、稲元 民夫[2]、福島 淳[2]、上松 仁[3]、志村 洋一郎[2] ([1]秋田県立大生資科院、[2]秋田県立大生資科、[3]秋田高専物質工)
○So KATO[1], Yurika SATO[2], Yusaku OGATA[2], Narumi MATSUURA[2], Tamio INAMOTO[2], Jun FUKUSHIMA[2], Hitoshi AGEMATSU[3], Yoichiro SHIMURA[2] ([1]Graduate school of Akita Prefectural Univ., [2]Akita Prefectural Univ., [3]NIT, Akita College.)

【背景・目的】
本研究室では、樹皮片から糸状菌 2B とそれに拮抗する細菌 1A を見出した。バイオアッセイの結果、細菌 1A 株の抗カビ活性だけでなく、生育阻止円周辺に糸状菌 2B 株の菌糸・胞子の塊が形成されることを観察した。そこで、これらをモデル系とすることで、糸状菌–細菌間の相互作用の分子メカニズムの一端が明らかにできるものと考え、まずは細菌分離株の示す抗カビ活性の主体の解明を目的とした。

【方法】
樹皮片を滅菌生理食塩水に懸濁後、Wickerham 寒天培地に塗布し菌株を分離した。糸状菌は ITS 領域の、細菌は 16S rRNA 遺伝子の配列解析を行った。
バイオアッセイは、細菌 1A 株を 37℃で 2 日間振とう培養し、その遠心上清 50 µl を紙ディスクに滴下・乾燥し、糸状菌 2B 株の胞子液を塗布した平板に置き、室温で 5 日間培養することで行った。
抗カビ物質の分離は、二晩培養液を塩酸酸性（pH 2.0）とし一晩放置した。これを遠心し得た沈殿を水に溶解後中性（pH 7.0）にしてから凍結乾燥し、その後メタノールに懸濁し 0.1 µm ポアサイズのフィルターろ過の後、バイオアッセイに供した。

【結果・考察】
分離株の配列解析の結果、糸状菌 2B 株は *Trichoderma ressei* と細菌 1A 株は *Bacillus amyloliquefaciens* と同定された。
培養液の酸沈殿物から抗カビ活性が確認されたため、現在、精製を進めているところである。Li ら（2016）は *B. amyloliuefaciens* SYBC H47 からの環状ペプチドやリポペプチドの産生を報告しており、今回の抽出液中にも類似の物質が含まれる可能性がある。

Bacillus, anti fungal substance

発表責任者：志村洋一郎（yshimura@akita-pu.ac.jp）

講演番号：1C4a05
講演日時：3 月 24 日 09:44～ 1 号館 C4 会場

ミドリムシの植物成長促進効果の発見と検討

The plants growth promotion by Euglena sp.

○田村 ニナ、佐藤 美結、辻 敏之（三田国際学園）
○Nina TAMURA, Miyu SATO, Toshiyuki TSUJI (MITA international school)

【目的】

ミドリムシは鞭毛運動を行う動物的性質を持ちながら、体内に葉緑体を持ち、植物と同じく光合成を行う興味深い生物である。我々はこのミドリムシと水耕栽培の関係について研究を行なっている。本校における先行研究では、ミドリムシを添加した栽培液が植物の成長を促進させることを明らかにしている[1]。また酸素供給のみを行った場合よりも、酸素供給とともにミドリムシを添加した場合の方が、植物の生育をより促進させる傾向が示された。これは植物の成長促進に対するミドリムシの寄与が酸素供給だけではないことを示唆する結果である。そこで本研究では、先行研究の追試を行うとともに、ミドリムシが植物の成長に与える要因について詳細な知見を得るため、種々の検討を行った。

【実験・結果】

ミドリムシの生死と光合成の有無が植物の生育に関与するかどうかを確かめるために、以下の実験を行った。

100 mL のビーカーにパーライト、ろ紙、ブロッコリーの種子を順に入れた。5 つの条件の栽培液（ミドリムシ、葉緑体の少ないミドリムシ、破砕したミドリムシ、煮沸したミドリムシ、培地のみ）を種子に浸透させ、4 日間人工気象器内で栽培した。4 日後、種子の重さを 1 つずつ秤量した。

この結果、生存し光合成が可能なミドリムシを含んだ栽培液を使用した場合に、最も植物の成長を促進させた(図)。よってミドリムシは、光合成を行うことで植物に対する成長促進の効果を示すことが示唆された。

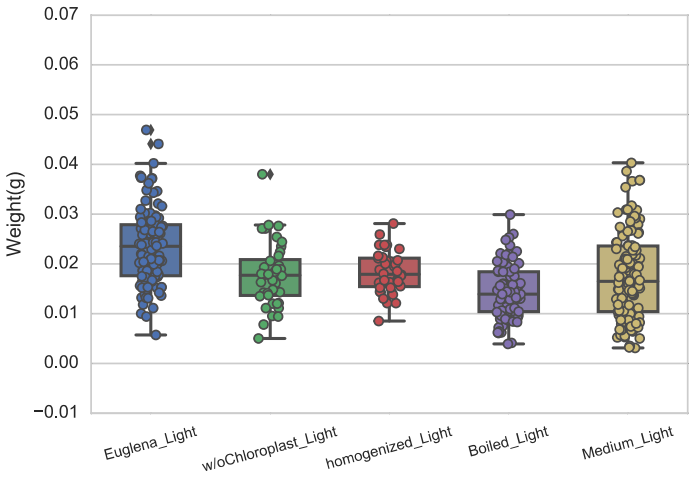


図. 水耕栽培栽培液の条件と生育の関係
5 つの条件での 4 日間栽培したあとの植物体の重さの分布

【参考文献】

1. 高林陵, 環境微生物系合同年会 2017 要旨集 p. 17（2017）

Euglena, hydroponics, growth promotion

発表責任者：辻敏之（t.tsuji@mita-is.ed.jp）

講演番号：1C4a06
講演日時：3 月 24 日 10:05～ 1 号館 C4 会場

Mechanism of cholesterol-lowering effects of lactic acid bacteria isolated from fermented seafood
○Bao LE, Seung-Hwan YANG (Department of Biotechnology, Chonnam National University, Yeosu, Chonnam, 59626, Republic of Korea)

Cardiovascular diseases are increasing numbers of death worldwide, causing disorders of the heart and blood vessels. Fermented seafood is traditional Asia foods provide a diversity of beneficial microbes. In this study, we investigated the cholesterol-lowering effect of lactic acid bacteria (LAB) in the Caco-2 cells model and their potential as probiotics for human consumption. Among of over hundreds LAB, two strains identified as *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides* showed effectively reduced cholesterol concentration in aqueous. These two strains were characterized by Biosafety assessment, resistant to gastrointestinal digestion and bile salt for evaluating probiotic properties. The cholesterol induced Caco-2 cells adhered to these isolated strains showed significantly cholesterol uptake reduction. The molecular mechanism of the cholesterol-lowering effects of LAB were investigated by the level expression of cholesterol transport related genes including NPC1L1, PPARα, sterolin, and transcription factor genes. Lb. plantarum demonstrated 0.7-fold higher down-regulation of NPC1L1 than L. *mesenteroides*. Both strains upregulate PPARα expression in Caco-2 cells. Taken together, our results showed different lactic acid bacteria potentially reducing cholesterol and contribute to probiotic formula development.

cholesterol, Lactobacillus, Leuconostoc

発表責任者：Seung-Hwan YANG（ymichigan@jnu.ac.kr）

講演番号：1C4a07
講演日時：3 月 24 日 10:16～ 1 号館 C4 会場

Bifidobacterium longum 105-A cpsD 欠損変異株を用いた菌体外多糖の解析
Analysis of extracellular polysaccharide using *Bifidobacterium longum 105-A cpsD* deficient mutant strain

○足立 貴康[1]、タホン アミン[1,2]、桝谷 尚慶[1]、エル シャルカウィ ハネム[1,2]、矢部 富雄[1]、野村 泉[1]、鈴木 徹[1] ([1]岐阜大学、[2]カフル エル シェイク大学)
○Takayasu ADACHI[1], Amin TAHON[1,2], Hisayoshi MASUTANI[1], Hanem El Sharkawy[1,2], Tomio YABE[1], Izumi NOMURA[1], Tohru SUZUKI[1] ([1]Gifu Univ., [2]Kafr El Sheikh Univ.)

【目的】 *Bifidobacterium longum* 105-A 株は、菌体外に菌体外多糖（CPS/EPS）を生産し、プロバイオティクス効果を有するビフィズス菌である。今回我々は *B. longum* 105-A が CPS/EPS の形成を制御する遺伝子領域の特定と欠損株の製作を通して CPS/EPS の機能と構造分析、そして CPS/EPS の形成に関して如何なる環境因子が関与するかを検討した。
【方法】*B. longum* 105-A 株において CPS/EPS 形成を制御する領域について調査し、糖転移酵素クラスター中で *BL105A_0405* （*cpsD*）領域の欠損変異株を作成した。これらの培養液の濁度変化を位相差顕微鏡により観察し、菌体の凝集塊を計測した。また *cpsD* 欠損株と *B. longum* 105-A 株をグルコース濃度 0 ～ 2% MRS 液体培地及びビフィズス菌最小栄養培地（BMM 培地）で培養した。菌体を india ink 染色して光学顕微鏡を用いて比較し、CPS/EPS 形成と糖類添加条件の関係性について調査した。さらに、EPS 組成の分析は *B. longum* 105-A 株及び *cpsD* 欠損変異株を MRS 液体培地で培養し、遠心後、培養液から EPS を透析チューブで単離して、酸加水分解処理を施して HPLC により分析した。
【結果】*B. longum* 105-A の CPS/EPS 形成には *BL105A_0405* （*cpsD*）が制御していることが明らかとなった。またこの領域を欠損させた *cpsD* 欠損株は *B. longum* 105-A 株と比較して細胞凝集性がみられ、透過型電子顕微鏡を用いて菌体を確認したところ *cpsD* 欠損株は菌体周囲に繊毛様構造体が確認された。この結果から CPS/EPS の消失と繊毛を介した細胞間接着があると考えられ、生育環境における糖類の存在と CPS/EPS 形成の関係について調査した。糖類添加或いは非添加の MRS 液体培地及び BMM 培地を用いて *B. longum* 105-A 株を培養したところ、各濃度において MRS 液体培地及び BMM 培地で培養した菌体と比較して形態にその違いは確認されなかった。この結果から CPS/EPS の形成と *B. longum* 105-A の生育環境上における単糖類などの炭素源との関係性は低い可能性が示された。
HPLC による EPS の分析では、*B. longum* 105-A の CPS/EPS はグルコース及びガラクトースを主な構成成分としていることが示された。また、*cpsD* 欠損変異株において *B. longum* 105-A 株で検出されなかったピークが確認され、CPS/EPS 消失に伴い特異的な高分子構造を有する可能性が示唆された。
これらの結果から *B. longum* 105-A は CPS/EPS 欠損に伴い、繊毛の出現とさらに特異的な高分子構造を有することが示され、以前報告した *B. longum* 105-A と Caco-2 細胞との接着性及びマクロファージの貪食は CPS の消失と繊毛の発現によって起こると考察された。

Bifidobacterium longum 105-A, Capsular polysaccharides, Cell adhesion

講演番号：1C4a08
講演日時：3 月 24 日 10:27～ 1 号館 C4 会場

プロバイオティックビフィズス菌 *Bifidobacterium longum* JBL05 株の腸溶性シームレスカプセルによる経口投与がヒト腸内細菌叢に与える効果
Effect of oral administration of *Bifidobacterium longum* JBL05 on human gut microflora using enteric seamless capsule
ディサヤナカ ムディヤンセルジ[1]、河野 麻実子[2]、児玉 高幸[2]、野村 泉[1]、○鈴木 徹[1]([1]岐阜大学、[2]森下仁丹(株))
MUDIYANSELAGE DISSANAYAKA[1], Mamiko Kohno[2], Takayuki Kodama[2], Izumi Nomura[1], ○Tohru Suzuki[1] ([1]Gifu Univ., [2]Morishita Jintan Co.,Ltd.)

【目的】*Bifidobacterium longum* JBL05 株は、七糖構造の繰り返しからなる本株に特徴的な細胞外多糖（CPS/EPS）を生産するプロバイオティック効果を有するビフィズス菌である。
今回我々は、腸溶性シームレスカプセルを用いてヒトに経口投与した場合、本菌が腸内細菌叢に与える影響を検討した。

【方法】*B. longum* JBL05 株の生菌末を封入した腸溶性シームレスカプセルを作製した。８人の成人ボランティア（男性 4 人、女性 4 人）に対し、2×10^7 または 5×10^8 CFU の本株を含むシームレスカプセルを単回経口投与し、投与前 1 回、投与後 5 日間排便毎、および投与 15 日以降に 1 回採便した。
各サンプルの DNA を抽出し、①全細菌、②全ビフィズス菌、③*B. longum* JBL05 株 に対する特異的プライマーを用い、SYBR Green 法による定量 PCR を StepOnePlus (ABI)を用いて行なった。
また、16S rRNA V3-V4 領域を対象として、次世代シーケンサ MiSeq (Illumina)を用い菌叢解析を行い、QIIME を用いて結果を解析した。

【結果】*B. longum* JBL05 株のドラフトゲノム解析の結果、本株は、*B. longum* 105-A 株と相同の EPS クラスタを有していることが明らかになった。この領域を対象に株特異的な定量 PCR のためのプライマーを設計した。両株に特徴的な EPS 遺伝子クラスタ中から、遺伝子内、遺伝子間の非コード領域を対象に数箇所の領域について定量 PCR のためのプライマーを設計した結果、BL105A_415 (Pyruvyl transferase)、BL105A_416 (Flippase)間 120 bp の領域が、基準株、糞便サンプルともにバックグラウンドが低かったため、これを JBL05 株特異的プライマーとして定量 PCR を行うこととした。
腸溶性シームレスカプセルに包含された *B. longum* JBL05 株の単回経口投与の結果、7 例(摂取前菌量が取得できなかった 1 例を除く)中 6 例のサンプルにおいて、JBL05 株の菌量が、検出限界(10^3 cells/g)程度から、一過的に増加し、中には 1000 倍に増加した例もあった。その後、数日後には投与前のレベルに戻った。1 例では、10^7 cells/g が検出され、JBL05 株が経口投与前から存在している可能性が示唆された。本例については、投与による増加は見られなかった。一方、次世代シーケンサを用いた菌叢のヒートマップ解析の結果、優先度上位 30 種について、JBL05 株の投与後、劇的に変化しその効果は、本株が消失した後も数日間維持された。これらの結果から、腸溶性シームレスカプセル包含 *B. longum* JBL05 株の単回経口投与では、本株の大腸内での定着、増殖は見られないが、菌叢構造に数日間に渡って影響を与え、プロバイオティック効果をもたらすものと示唆された。

Bifidobacterium, probiotics, gut microflora

発表責任者：鈴木　徹（suzuki@gifu-u.ac.jp）

講演番号：1C4a09
講演日時：3 月 24 日 10:38～ 1 号館 C4 会場

乳酸菌遺伝子組換え体取得効率の改善へ向けた CRISPR/Cas9 ベクターの構築

Development of a CRISPR/Cas9 vector for an efficient genetic modification system applicable for lactic acid bacteria.

○知久 勤[1]、鈴木 駿也[1]、横田 健治[2]、五十君 靜信[2]、梶川 揚申[2]([1]東農大院・農化、[2]東農大・農化科)
○ Tsutomu CHIKU[1], Shunya SUZUKI[1], Kenji YOKOTA[2], Shizunobu IGIMI[2], Akinobu KAJIKAWA[2] ([1]Grad. Sch. Agr. Chem., Tokyo Univ. Agr., [2]Sch. Agr. Chem., Tokyo Univ. Agr.)

＜目的＞

乳酸菌の遺伝子組換えにおいては既存の技術を使用することで染色体上の遺伝子改変が可能であるものの、目的の変異体を取得できる効率が低い、あるいは取得自体が困難であることも少なくない。実際、筆者らの研究においても複数の組換え体構築が難航しており、技術的な改善が求められている。近年、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集・遺伝子改変手法が確立され、汎用性の高い技術として主に真核生物・哺乳類細胞で普及している。原核生物においてはゲノムの 2 本鎖切断を修復する機構が脆弱であるため、直接的な遺伝子改変ではなく、塩基配列特異的な染色体切断と、それに続く細胞死誘導による選択圧としての利用が報告されている。そこで本研究では、乳酸菌における組換え体の取得効率改善に向けた CRISPR/Cas9 ベクターの構築および評価を目的とした。

＜方法＞

温度感受性、広宿主域のプラスミド pG$^+$host5 を基本骨格とし、人工合成した sgRNA 配列、*Streptococcus pyogenes* JCM 5674 由来 Cas9 遺伝子を大腸菌でクローニングした。構築された CRISPR および Cas9 が機能することを確認するため、*Lactobacillus paracasei* IGM394(IGM394)および既存のサーチュイン遺伝子(*sirA*)欠損変異株の形質転換を行った。実際の遺伝子組換え過程における選択圧として使用するため、Double-crossover による IGM394 *sirA* 欠損を試みた。*sirA* 近傍領域を含み、乳酸菌 ori を持たないプラスミドを構築し、宿主染色体相同領域へ導入した。継代培養を行った細胞からコンピテントセルを調製し、CRISPR/Cas9 ベクターによる形質転換を行った。出現したコロニーに対する *sirA* 特異的 PCR により、遺伝子欠損株をスクリーニングした。

＜結果と考察＞

sgRNA と Cas9 のどちらか一方、あるいは双方を含むプラスミドを作製した。sgRNA および Cas9 タンパク質の発現を確認後、それぞれのプラスミドを用いて IGM394 及び *ΔsirA* 株の形質転換を行った。その結果、sgRNA と Cas9 両方を含むプラスミドと野生株の組み合わせにおいてのみ顕著な形質転換効率の低下がみられたことから、本研究において構築された CRISPR/Cas9 システムが機能していると考えられた。Double-crossover を用いた組換え体作製における選択圧として使用したところ、CRISPR/Cas9 を使用しない場合に比べて効率よく変異株が取得された。以上より、本研究で構築されたベクターが形質転換効率の改善に有用であることが示された。

CRISPR-Cas9, Lactic acid bacteria, screening

講演番号：1C4a10
講演日時：3 月 24 日 10:49～ 1 号館 C4 会場

黒麹菌Δ*agsE*における形質転換用マーカー遺伝子の検討
Consideration of marker gene for *A. luchuensis*
○渡嘉敷 直杏[1]、水谷 治[1,3]、山田 修[2]、外山 博英[1,3] ([1]鹿児島連大・農、[2]酒総研、[3]琉球大・農)
○ Jikian TOKASHIKI[1], Osamu MIZUTANI[1,3], Osamu YAMADA[2], Hirohide TOYAMA[1,3]
([1]Kagoshima Univ., [2]NRIB, [3]Univ. Ryukyus)

【背景・目的】
麹菌は糸状菌の一種で古くから我が国において清酒、味噌、醤油などの発酵食品に用いられており、医薬品や酵素等の有用物質生産にも利用されている微生物である。*Aspergillus* 属糸状菌における遺伝子操作は一般的に細胞壁溶解酵素 Yatalase を用いたプロトプラスト-PEG 法によって行われるが、黒麹菌においては Yatalase と α-1,3-glucanase を併用する必要があった。一方、黒麹菌 α-1,3-glucan 合成酵素をコードしている *agsE* の破壊株 (Δ*agsE*) は、野生型では難しいプロトプラスト調製を黄麹菌と同様に Yatalase 単独で簡便に行う事ができ、糸状菌で一般的に用いられるプロトプラスト-PEG 法による形質転換を可能にした（(1, 2)。
麹菌の形質転換体のセレクションには、強い薬剤耐性から使用できる抗生物質が限定されており、一般的には栄養要求性を指標に目的形質転換体を得ている。黒麹菌における形質転換体のセレクションも同様であり、これまでに、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ピリチアミン耐性遺伝子といったマーカー遺伝子を用いて、Δ*agsE* 株 (Δ*ligD*::*ptrA*, Δ*agsE*::*hph*) が造成された。
Δ*agsE* 株はピリチアミン耐性遺伝子やハイグロマイシン耐性遺伝子といったマーカーを既に使用しているため、他の遺伝子操作用途でこれらのマーカーを利用する事が出来なかった。そこで本研究では、新たな薬剤耐性遺伝子マーカーとして Bleomycin 耐性遺伝子 (*ble*) の検討を行った。
【結果】
Streptoalloteichus hindustanus 由来の *ble* 遺伝子は二本鎖切断を引き起こす薬物（Zeocin や Phleomycin）に対しての抵抗性を獲得できるタンパク質をコードしている。この遺伝子をマーカー遺伝子として使用し、Δ*agsE* 株のゲノム上に対して *agsE* の相補を目的とする形質転換を行った。
Phleomycin を添加した培地上でセレクションを行い、生育する黒麹菌の株を単離すると目的部位で相同組換えが行われていることが確認でき、黒麹菌でのセレクションに用いる事ができた。また、この形質転換で *agsE* が相補された株は、プロトプラストが Yatalase 単独で得られない野生株タイプに戻り、改めて *agsE* がプロトプラスト調製を困難にする要因である事が確認された。

(1). 日本農芸化学会 2016 年度 大会
(2). 生物工学会九州支部会 2017 年度 大会

α-1,3-glucan, *Aspergillus luchuensis*, Phleomycin

発表責任者：水谷治（mizutani@agr.u-ryukyu.ac.jp）

講演番号：1C4a11
講演日時：3 月 24 日 11:10～ 1 号館 C4 会場

ハイスループット培養を目指した散乱光および蛍光に基づく微生物増殖 W/O ドロップレットの検出
Detection of W/O droplets containing growing bacteria on the basis of light scatter and fluorescence aiming for high-throughput cultivation

○大田 悠里[1,2]、斉藤 加奈子[1,2]、髙木 妙子[2]、松倉 智子[2]、森田 雅宗[2]、常田 聡[1,2]、野田 尚宏[1,2]
([1]早大先進理工、[2]産総研バイオメディカル)
○Yuri OTA[1,2], Kanako SAITO[1,2], Taeko TAKAGI[2], Satoko MATSUKURA[2], Masamune MORITA[2], Satoshi TSUNEDA[1,2], Naohiro NODA[1,2] ([1]Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]BMRI, AIST)

[背景]
環境中には様々な微生物が生息しているが，これまでに単離・培養されてきたものは 1%未満であり，残り 99%以上は未培養であると言われている。現行の微生物培養手法ではスループットが低いことが問題であると考え，本研究ではハイスループットに培養場を提供できる water-in-oil (W/O) ドロップレットに着目した。油中に分散した水滴は W/O ドロップレットと呼ばれ，内部にて酵素反応や細胞培養等を行えることから近年バイオ分野でも利用されてきている。マイクロ流体デバイスを使用することで均一の W/O ドロップレットを数十万個単位で作製することができる。また，サイズは pL～nL 程度であり，W/O ドロップレット 100 万個が 1.5 mL チューブに収まることから，大量の培養場で並行して培養を行うことができる。未培養の環境微生物を獲得するためには，W/O ドロップレット内部で微生物を増殖させること，および内部で微生物が増殖した W/O ドロップレットを検出し，ソーティングするという過程が必要となる。そこで本研究では内部で微生物が増殖した W/O ドロップレットを検出し，ソーティングする手法の確立のために，モデル微生物を W/O ドロップレット内で培養し，散乱光および蛍光に基づく選択的な W/O ドロップレットソーティングを行った。
[方法・結果]
油相にフッ素系オイルおよびフッ素系界面活性剤を，水相に培地を使用し，体積 1 nL 程度の均一サイズの W/O ドロップレットを作製した。モデル微生物として *Escherichia coli* を選択し，W/O ドロップレット内へ封入した。作製した W/O ドロップレットを 1.5 mL チューブに入れ，静置培養した。顕微鏡観察の結果，培養後に W/O ドロップレット内で微生物が高密度に増殖した様子が観察された。また，マイクロ流路チップ式セルソーターを用いて個々の W/O ドロップレットの散乱光強度および蛍光強度を測定したところ，微生物が増殖した W/O ドロップレットと空の W/O ドロップレットにおいて蛍光強度や散乱光強度に違いが生じた。散乱光強度や蛍光強度の差に基づいて W/O ドロップレットをソーティングしたところ，内部で微生物が増殖した W/O ドロップレットが濃縮された。ソーティングした W/O ドロップレットに含まれる微生物をアガープレートに播種したところ，培養後にコロニー形成が確認された。以上の結果から W/O ドロップレット内で微生物を培養し，散乱光および蛍光強度に基づいて内部で微生物が増殖した W/O ドロップレットを検出し，内部の微生物が生きた状態のまま回収することに成功した。

water-in-oil droplet, bacterial cultivation, droplet sorting

発表責任者：野田尚宏（noda-naohiro@aist.go.jp）

講演番号：1C4a12
講演日時：3 月 24 日 11:21～ 1 号館 C4 会場

重イオンビーム照射によるシオミズツボワムシ大型変異系統の育種
Mutation breeding on rotifer (*Brachionus plicatilis* s. s.) by heavy-ion beam irradiation
○常泉 和秀[1]、山田 美恵子[1]、一瀬 勝紀[1]、市田 裕之[1]、金 禧珍[2]、萩原 篤志[2]、川田 実季[3]、片山 貴士[3]、﨑山 一孝[3]、手塚 信弘[3]、小磯 雅彦[3]、阿部 知子[1]([1]理化学研究所仁科センター、[2]長崎大学、[3]水産研究・教育機構)
○ Kazuhide TSUNEIZUMI[1], Mieko YAMADA[1], Katsunori ICHINOSE[1], Hiroyuki ICHIDA[1], Hee-Jin KIM[2], Atsushi HAGIWARA[2], Miki KAWADA[3], Takashi KATAYAMA[3], Kazutaka SAKIYAMA[3], Nobuhiro TEZUKA[3], Masahiko KOISO[3], Tomoko ABE[1] ([1]RIKEN Nishina Center, [2]Nagasaki Univ., [3]FRA)

養殖漁業で重要な初期餌料生物として知られるシオミズツボワムシ(以下ワムシ)は、近年海洋動物プランクトン研究のモデル生物として注目されている。漁業において産まれたばかりの仔魚は成長に伴い体サイズに合わせて餌の嗜好が変化することが知られており、最初に与える餌としてワムシが用いられ、次にアルテミアが利用される。一般的なワムシのサイズは 300μm 程度でアルテミアの幼生では 400μm～1cm となっている。しかしワムシからアルテミアへと餌を切り替える際に、適した生き餌がいまのところ見付かっていない。この餌のギャップ時期に仔魚が餓死もしくは共食いしてしまい個体数が激減してしまうことが大きな問題となっている。全世界的に食糧事情が逼迫してきていることもあり、養殖での生産量を増加させるために餓死・共食いによる個体数減少を抑制する試みが注目されている。本研究では体サイズが大きくなるワムシ変異系統を選抜育種することにより上記問題へ貢献することを目的としている。

これまでの研究でワムシに強い放射線耐性があることが報告されているが、重イオンビームやγ線の照射による致死量や孵化率などのパラメーターに着目される場合がほとんどであり、変異系統の作出や変異系統作出に適した放射線照射条件に関する議論は行われていない。当研究室では様々な植物の品種改良に重イオンビームを用いて生産量増加、付加価値向上、環境耐性獲得など有用変異系統を選抜育種し実用化させてきている。本研究ではワムシにカーボン(C)イオンビームやアルゴン(Ar)イオンビームを照射し、特に生存率や、照射後の増殖能、変異系統出現頻度に関する重イオンビーム照射による影響を観察し、変異系統作出に適した照射条件の検討を行った。大規模スクリーニング手法を開発・改良し変異系統の選抜育種を行った。ワムシの体である被甲の大きさの尺度である背甲長・背甲幅を指標として、体サイズが大きくなる変異系統を選抜育種し、数十系統の大型変異系統を作出した。非照射ワムシの平均背甲長は 300μm、平均背甲幅は 220μm ほどであるのに対し、変異系統では背甲長が最大の個体で背甲長が 425μm、背甲幅は 330μm となっていた。この個体は平均的な非照射ワムシの体積と比較して３倍となっており、個体数減少問題解決へ向けた餌料として期待できる。

動物培養細胞に対して使用される重イオンビームの照射線量と比較すると、ワムシは圧倒的に放射線耐性を有していると本研究において示されたが、変異系統出現頻度は数%あり、ワムシゲノムプロジェクトで明らかになったワムシ特有遺伝子の機能解析に重イオンビームを用いた変異体解析によるフォワードジェネティクスが十分実用的であることが示された。

rotifer, heavy-ion beam, mutation breeding

発表責任者：常泉　和秀（hyde_tsune@riken.jp）

講演番号：1C4a13
講演日時：3 月 24 日 11:32～ 1 号館 C4 会場

細菌の細胞壁成分に対する光触媒反応の影響
The effect of the photocatalytic reaction to bacterial cell wall components
○髙尾 綾乃[1,2]、大嶋 佑治[1]、岡本 歩未[1]、落合 剛[2,3]、藤嶋 昭[2,3]、鈴木 智順[1,3]（[1]東理大 応生、[2]KISTEC、[3]東理大 総研）
○AYANO TAKAO[1,2], YUJI OHSHIMA[1], AYUMI OKAMOTO[1], TSUYOSHI OCHIAI[2,3], AKIRA FUJISHIMA[2,3], TOMONORI SUZUKI[1,3] ([1]Department of Applied Biological Science, Tokyo University of Science, [2]Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology, [3]Research Institute for Science & Technology, Tokyo University of Science)

【目的】 消毒剤や抗生物質などを用いた一般的な殺菌は、高コストかつ人体への影響が懸念されるといった問題点がある。そこで、これらの問題点を解決する殺菌技術として、光触媒反応が期待されている。光触媒による殺菌効果は、二酸化チタン（TiO_2）に紫外線を照射することで産生する活性酸素種（ROS）の強い酸化力によるものである。しかし、この殺菌メカニズムについては未だ明確な知見が得られていない。グラム陽性細菌はペプチドグリカン層が厚いためにグラム陰性細菌よりも殺菌効果が低いという報告がある一方で、グラム陽性細菌の方が殺菌されやすいという報告もある。このように、ペプチドグリカン層に対する光触媒反応には、相反する報告が存在しているのが現状である。そこで、芽胞を形成せず、ペプチドグリカン層が厚いグラム陽性細菌である *Lactobacillus plantarum* JCM1149^T と、そのプロトプラスト細胞、そして細胞壁を持たない *Mesoplasma florum* NBRC100688^T に対して光触媒反応を行った後、BacLight 蛍光試薬による生存率評価を行った。その結果、ペプチドグリカン層のある *L. plantarum* 細胞で最も生存率が低下し、プロトプラスト細胞と *M. florum* の生存率に有意差は確認されなかった。以上から、ペプチドグリカン層は TiO_2 光触媒反応効果を促進することが示唆された。そこで本研究では、プロトプラスト細胞にペプチドグリカン標品を添加して光触媒反応を行い、同様に生存率評価を行うことで、ペプチドグリカンがもたらす影響をより詳細に解明することを目的とした。
【方法】 *L. plantarum* JCM1149^T 細胞懸濁液に細胞壁融解酵素を加えることで、プロトプラスト細胞を作製した。光触媒反応に対する影響はプロトプラスト細胞とペプチドグリカン標品（Wako）を添加したプロトプラスト細胞で行った。各懸濁液に対して BacLight 蛍光試薬を添加し、TiO_2 コーティングガラス上で UVA を照射して、光触媒反応を行った。その後、共焦点レーザー顕微鏡 LSM5EXCITER-ZEN2008 (ZEISS) を用いて観察を行い、細胞膜損傷率すなわち生存率を算出した。
【結果】 UVA 照射 2 時間後の生存率を比較したところ、プロトプラスト細胞では約 98%であったのに対し、ペプチドグリカン標品添加プロトプラスト細胞では約 50%まで低下し、これらに有意差が確認された。また、この値はペプチドグリカン層のある *L. plantarum* JCM1149^T 細胞の生存率と有意差は確認されなかった。以上の結果から、ペプチドグリカンは TiO_2 光触媒反応による生存率低下を促進することが示唆された。なお、細胞壁成分の一つであるテイコ酸標品をプロトプラスト細胞に添加して光触媒殺菌に及ぼす影響を解析した結果も併せて報告する予定である。

photocatalysis, killing mechanism, protoplast

講演番号：1C4a14
講演日時：3 月 24 日 11:43～ 1 号館 C4 会場

青枯病菌 *Ralstonia pseudosolanacearum* の D-リンゴ酸による twitching 運動抑機構の解明

Studies on the suppression mechanism of twitching motility by D-malate in *Ralstonia pseudosolanacearum*

○小代 安莉、緋田 安希子、田島 誉久、加藤 純一（広島大院先端物質）
○Anri Ojiro, Akiko Hida, Takahisa Tajima, Junichi Kato (Hiroshima Univ.)

【背景・目的】
青枯病菌とは、トマトやナスなどを宿主とする土壌感染性病原菌である。本菌は水中では鞭毛による遊泳運動を、固体表面では線毛による twitching 運動を駆使することで土壌中を移動し宿主植物の根へと到達することで感染する。これまで当研究室では青枯病菌が植物感染時に利用する運動について様々な方面から研究を行ってきた。その中で、D-リンゴ酸により twitching 運動が抑制されることが明らかとなった。twitching 運動の抑制剤として D-リンゴ酸を添加した栽培系では植物感染率が有意に低下することも見出しており、土壌への D-リンゴ酸散布という新たな青枯病菌の感染防除法を提案できるかもしれない。しかし、この防除法の根幹となる twitching 運動抑制機構については未だ解明されていない。そこで本研究では、この D-リンゴ酸による twitching 運動の抑制機構を明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】
供試株には *Ralstonia pseudosolanacearum* MAFF106611 を用いた。最小培地から炭素源のみを取り除いた寒天培地の上に菌懸濁液を滴下して、24 時間静置培養した後、コロニー周辺の広がりを顕微鏡で観察することで twitching 運動を評価した。twitching 運動は PilA タンパク質の重合・脱重合により線毛を伸長・収縮することにより行われる。そこでまずは、D-リンゴ酸存在下で線毛形成が抑制される可能性について PilA 発現量という観点から検証を試みた。D-リンゴ酸を添加した培地と添加していない培地でそれぞれ培養した菌体から RNA を抽出し、線毛構成因子 *pilA* 遺伝子の転写解析を行った。その結果、*pilA* の転写量は D-リンゴ酸の有無により変化しないことが明らかとなり、D-リンゴ酸存在下でも線毛は形成されると考えられた。この結果から、D-リンゴ酸は線毛の形成ではなく、機能を阻害する可能性が示唆された。そこで次に、D-リンゴ酸による線毛機能抑制の可能性について検証を試みた。PilA タンパク質の重合・脱重合は ATP の消費を伴う。炭素源を含まない寒天培地上で野生株および *pilA* 欠損株の twitching 運動前後の細胞内 ATP 量を測定し比較することで、線毛運動に利用した ATP 量を評価できると考えられる。これにより、ATP という観点から D-リンゴ酸の線毛運動機能抑制への寄与について解析する。また、線毛の動き（伸長・収縮）を直接的に観察することができれば、D-リンゴ酸が線毛運動に与える影響をより明確に評価できると考えられる。そこで、当該青枯病菌株の線毛に特異的に付着する RSM3 ファージの p3 タンパク質を利用する。GFP と p3 の融合タンパク質を構築し青枯病菌細胞表面へ作用させることで、線毛運動の可視化を試みる。これら二つの方法により、D-リンゴ酸の線毛機能に与える影響について現在解析中である。

pili, twitching motility, D-malate

発表責任者：加藤純一（jun@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：1C4p01
講演日時：3 月 24 日 13:50～ 1 号館 C4 会場

生育温度が *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 の細胞膜に与える影響について

Effect of incubation temperature on cell membrane of *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6

○王 静雨、亀谷 将史、新井 博之、石井 正治（東大院・農生科）
○Jingyu WANG, Masafumi KAMEYA, Hiroyuki ARAI, Masaharu ISHII (The Univ. of Tokyo)

【背景】

Hydrogenobacter thermophilus TK-6 は、伊豆の峰温泉近傍の土壌より単離された好熱独立栄養性細菌である。生育至適温度は、バクテリアとしては極めて高い 70 ℃であり、水素をエネルギー源、二酸化炭素を主炭素源とし、炭酸固定経路として reductive TCA 回路を持つ。また *Aquificales* 目に属する本菌は、16S rRNA に基づく系統解析によってバクテリアの中でも、進化的に最も古い起源をもつバクテリアの一つであると考えられている。

【目的】

生物の膜は体内と外界を隔てる役割がある事から、環境変化を直接受け、進化の過程でそれらに対応していると考えられる。その為、生物を形成する膜について理解を深めることは、進化に伴う環境変化への適応について知る重要な研究であるといえる。そこで、外部温度が本菌の膜構造に与える影響について、従属栄養的な中温菌である大腸菌と、好熱菌である *Thermus thermophilus* と比較しながらその実態を明らかにする。

【手法・結果】

①様々な培養温度下で、上記 3 菌の脂肪酸組成を GC-MS により分析した。大腸菌では、低温条件下で 16:1 と 18:1 が増加し、高温条件下で 16:0 が増加した。*T. thermophilus* では不飽和脂肪酸が検出されず、低温条件下で 17:0 が減少するとともに 13:0 が増加した。*H. thermophilus* では、低温条件下で 20:1 が増加し、高温条件下で 18:0 の増加した。

②50℃と 75℃で対数初期まで培養した *H. thermophilus* に ^{13}C 酢酸を添加し、それぞれ温度を変えて培養を継続した時の、各種脂肪酸の同位体比率を GC-MS により分析した。その結果、低温へのシフト時に 20:1 脂肪酸のラベル化が促進されるなど、温度条件による脂肪酸生合成活性の変化を示唆するデータが得られた。

Hydrogenobacter thermophilus TK-6, membrane, fatty acid

講演番号：1C4p02
講演日時：3 月 24 日 14:01～ 1 号館 C4 会場

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の Opi1 タンパク質による膜陥入が生じる核膜領域の形態的解析
Morphological analysis of a nuclear membrane domain necessary for the Opi1p-induced membrane invagination in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

○中村 珠子、鍵和田 聡（奈良女子大理）
○Shuko NAKAMURA, Satoshi KAGIWADA (Nara Women's Univ. of Sci.)

【背景・目的】

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、リン脂質合成酵素遺伝子の発現は、転写促進因子である Ino2p/Ino4p による正の調節と転写抑制因子である Opi1p による負の調節を受ける。発現抑制条件下では、Opi1p はリン脂質合成酵素遺伝子の発現を抑制するために、核膜から核質へと移行する一方、促進条件下では、Opi1p はそのレセプターである核膜/小胞体膜タンパク質 Scs2p やホスファチジン酸（PA）によって核膜/小胞体膜に繋ぎ止められている。

我々は Opi1p と Scs2p を出芽酵母に過剰発現させると、正常な核膜では見られない“核内膜構造”が生じることを電子顕微鏡観察により発見した。この現象は、Opi1 が核膜に過剰に局在したためにリン脂質合成遺伝子の発現を抑制できず、リン脂質が異常に合成される結果として生じる核膜の拡張を防ぐために、核膜が陥入して生じたのではないかと予想している。このとき、“核内膜構造”は多くの場合は核膜内の１ヶ所でのみ生じるため、陥入は核膜のどの領域からでも無作為に起こるのではなく、特定の領域から起こる可能性が示唆されたが、その領域を決める因子については不明である。

【方法・結果】

本研究では Opi1p による核膜の陥入が起こる領域について明らかにするために、まず“フレア”と呼ばれる異常な核膜構造と“核内膜構造”との関係について調べた。PA ホスファターゼを活性化する役割を担うホスファターゼである Spo7p をコードする *SPO7* の破壊株（*spo7Δ* 株）では、PA が消費されず蓄積することで核膜が過剰に産生された結果、核膜が細胞質側へ伸長して“フレア”構造が生じる。この *spo7Δ* 株に Opi1p と Scs2p を過剰発現し、蛍光顕微鏡および電子顕微鏡で観察した結果、“核内膜構造”と“フレア”両方の特徴を持つ核膜が観察されたことから、これらの異常な核膜構造は互いに排反ではなく、単一の細胞内で同時に生じうることが示唆された。

次に“核内膜構造”にどのようなタンパク質が含まれるかを明らかにするために、核質タンパク質 Pus1p および核小体タンパク質 Nsr1p に蛍光タンパク質 mCherry を付加したものを作製し、Opi1-GFP を過剰発現させた株に発現させ、これらのタンパク質の局在部位と“核内膜構造”との関係を蛍光顕微鏡および免疫電子顕微鏡法で解析している。

本発表では、これらの結果から、Opi1 の核膜への過剰な局在によって生じる核膜の陥入が特定の核膜の領域で起こる可能性について議論したい。

nuclear membrane, phospholipid, electron microscopy

発表責任者：鍵和田聡（kagiwada@cc.nara-wu.ac.jp）

講演番号：1C4p03
講演日時：3 月 24 日 14:12～ 1 号館 C4 会場

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 内で大量生産させたトリテルペンの細胞壁分画への溶出
Excretion of triterpenes overproduced in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* into the cell wall fraction.

○水谷 泉美[1]、岡田 茂[2]、鍵和田 聡[1]([1]奈良女子大理、[2]東京大農)
○Izumi MIZUTANI[1], Shigeru OKADA[2], Satoshi KAGIWADA[1] ([1]Nara Women's Univ. of Sci., [2]Tokyo Univ. of Agric.)

【背景・目的】 スクアレンをはじめとする炭素数 30 の炭化水素トリテルペンは工業的に有用であり、微生物を利用した生産が試みられている。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* はスクアレンの生合成経路をもち、増殖速度が速いことや遺伝子組換え技術が適用しやすいことを活かして、スクアレンやその誘導体の合成に用いられてきた。しかし、これらの脂質を回収するために細胞を破壊しなくてはならないことは、大量生産に向けての障壁のひとつとなっている。

我々はこれまでに緑藻 *Botryococcus braunii* が作るトリテルペンであるボツリオコッセンを出芽酵母に生産させてきたが、回収の過程で、合成されたボツリオコッセンが細胞壁に溶出されていることを発見した。この現象を制御できれば非破壊的に回収できるようになると考え、本研究では、ボツリオコッセンおよびスクアレンの細胞壁への溶出を定量的に調べ、より多くのトリテルペンが細胞壁に溶出されるような条件を検討した。

【方法・結果】 酵母株として、HMG CoA 還元酵素遺伝子(HMG1)のプロモーターを構成的に発現する TEF プロモーターに、スクアレン合成酵素遺伝子(ERG9)のプロモーターをメチオニンで抑制可能な MET3 プロモーターに、それぞれ置換した株にボツリオコッセン酵素遺伝子 *SSL-3* を導入した株を用いた。この株の、細胞外・Zymolyase 感受性成分（細胞壁成分）・細胞内それぞれの分画から脂溶性分子を抽出・濃縮後、スクアレンおよびボツリオコッセン量をガスクロマトグラフィーを用いて定量した。その結果、通常の好気培養においてスクアレン・ボツリオコッセンはほとんどが細胞内に蓄積していたが、細胞壁分画にも全量の 5-10%が存在していた。興味深いことに、この細胞壁分画のスクアレン溶出量は嫌気培養により 3 倍以上に増加した。一方、細胞外へはほとんど溶出していなかった。

【考察】 蓄積したトリテルペンの細胞壁への溶出が、嫌気条件に伴う膜構成の変化によりさらに促進された可能性がある。嫌気条件ではステロール合成のためのスクアレンのエポキシ化が進行せず、スクアレンが蓄積すると考えられる。テルペン類は両親媒性ではないため、それらの蓄積は脂質二重層を揺動するため細胞には有害である。近年、真核生物においても形質膜から小胞が放出される事象が報告されているように、蓄積したトリテルペンが積極的に排除されているのかもしれない。今後、細胞内の蓄積場所と考えられる脂肪滴の影響や細胞壁の微細構造観察を行い、どのように溶出が起こるのかを調べる予定である。

squalene, cell wall, anaerobic

発表責任者：鍵和田聡（kagiwada@cc.nara-wu.ac.jp）

講演番号：1C4p04
講演日時：3 月 24 日 14:23～ 1 号館 C4 会場

分裂酵母の胞子表面を覆うデコボコ構造の形成に関与する遺伝子の取得と解析
Identification and characterization of genes involved in constructing spike structure on the fission yeast spore surface.

○増田 大輝[1]、田原 悠平[1,2]、宮田 真人[1,2]、中村 太郎[1]([1]大阪市大・院理、[2]大阪市大複合先端研究機構)
○Daiki MASUDA[1], Yuhei TAHARA[1,2], Makoto MIYATA[1,2], Taro NAKAMURA[1] ([1]Osaka City Univ., [2]OCARINA)

[背景と目的]

分裂酵母の胞子表面には、ちょうど金平糖のような特徴的なデコボコ構造が見られる。では、どのようにしてこのデコボコは形成されるのだろうか？これまで、このデコボコ形成に関与する遺伝子 *mde10*$^{+}$が唯一取得されている[1)]。Mde10 は ADAM ファミリータンパク質をコードする。ADAM はヒトを含む高等生物でも広く保存され、精子と卵の膜融合やシグナル伝達など細胞表層での様々な生命現象に関与することが知られている。したがって、胞子表面のデコボコは *mde10*$^{+}$およびその周辺遺伝子によって形成されると考えられる。そこで本研究の目的は、デコボコ形成に関与する新たな遺伝子を取得・解析し、その分子メカニズムを明らかにすることである。

[結果]

目的の遺伝子を取得するため、減数分裂時に転写量が上昇する遺伝子（*mug*$^{+}$および *meu*$^{+}$）の破壊株[2)3)]（191 株）の胞子を観察した。はじめに、胞子の輪郭が観察しやすい位相差顕微鏡を用いた。40 の破壊株で、胞子表面が野生型の胞子とは異なっていた。次に、電子顕微鏡を用いてより詳細な観察を行った。これまで 7 株の胞子を観察し、そのうち 2 株（*mug57Δ* および *meu30Δ*）の胞子でデコボコの形成に欠損が見られた。しかし予想とは異なり、これらの変異株の胞子表面は多数の比較的小さなデコボコによって覆われていた。したがって、デコボコの数を抑制する系の存在が示唆された。

Mug57 は細胞接着に関与するファシクリン I ドメインを持つタンパク質、Meu30 はα-アミラーゼホモログをコードしていた。蛍光顕微鏡観察により、Meu30 は胞子表面に局在することが明らかになった。Meu30 は GPI アンカーの修飾を受ける配列を持っているので、GPI アンカーを介して胞子の表層に局在し、デコボコ形成に関与することが示唆された。これらのタンパク質は Mde10 と協調的に働き、デコボコ形成に関与する可能性が考えられる。

1) Nakamura *et al.* (2004) Eukaryotic Cell 3, 27-39
2) Martin-Castellanos *et al.* (1997) Curr Biol 15, 2056-2062
3) Watanabe *et al.* (2001) Nucleic Acids Res 29, 2327-2337

yeast, spore, ADAM

講演番号：1C4p05
講演日時：3 月 24 日 14:34～ 1 号館 C4 会場

酵母 *Yarrowia lipolytica* における *n*-アルカンへの吸着と細胞形態に関する研究
Adsorption to *n*-alkane and cell morphology of *Yarrowia lipolytica*

○高橋 直熙[1]、石丸 千晶[2]、岩間 亮[2]、渡邉 夏仁[2]、志波 優[3,4]、兼崎 友[4]、堀内 裕之[2,5]、福田 良一[2,5]([1]東大・農、[2]東大院・農生科、[3]東農大・生命科学、[4]東農大・生物資源ゲノム解析セ、[5]東大・微生物連携)
○ Naoki TAKAHASHI[1], Chiaki ISHIMARU[2], Ryo IWAMA[2], Natsuhito WATANABE[2], Yuh SHIWA[3,4], Yu KANESAKI[4], Hiroyuki HORIUCHI[2,5], Ryouichi FUKUDA[2,5] ([1]Fac. of Agric., Univ. of Tokyo, [2]Univ. of Tokyo, [3]Fac. Life Sci., Tokyo Univ. of Agric., [4]NGRC, Tokyo Univ. of Agric., [5]CRIIM, Univ. of Tokyo)

n-アルカン資化性酵母 *Yarrowia lipolytica* は *n*-アルカンなどの疎水性化合物を単一の炭素源として生育できる酵母である。*Y. lipolytica* において、取り込まれた *n*-アルカンは小胞体上で CYP52 ファミリーに属するシトクロム P450 によって末端が水酸化された後、小胞体またはペルオキシソームで脂肪酸に酸化され、β 酸化経路で資化されるか脂質合成に利用される。一方で、*Y. lipolytica* が疎水性の *n*-アルカンを細胞内に取り込む機構としては、*n*-アルカンの油滴に吸着し、エネルギー依存的に取り込む可能性が考えられているが、詳細は全く不明である。

本研究では、*Y. lipolytica* による *n*-アルカンの取り込み機構を明らかにすることを目的として、*n*-アルカンへの吸着能が低下した変異株を単離し、解析を行った。*Y. lipolytica* は二形性酵母であり、*n*-アルカンの存在下で菌糸型生長が誘導されるが、*n*-アルカンへの吸着能が低下した変異株には、*n*-アルカンにより誘導される菌糸型の生育に欠損を示す株が高度に濃縮されていた。そこで、得られた変異株のうちの一株についてゲノムシーケンスにより変異点の特定を行ったところ、*YALI0E30283g* に変異を持つことが明らかになった。*YALI0E30283g* は、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においてグリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)の脂質リモデリングに関わる膜結合型 *O*-アシルトランスフェラーゼをコードする *GUP1* のオルソログである。そこで、*YALI0E30283g* を *GUP1* と命名し、その破壊株を作製して生育を観察したところ、野生型株と比較して *n*-ドデカン、*n*-ヘキサデカンを炭素源とした培地での生育が悪化した。また、この破壊株の細胞形態を観察したところ、グルコース、グリセロール、*n*-ドデカンを炭素源とした培地では菌糸生長が見られず、*n*-ヘキサデカンを炭素源とした培地では野生型株と比較して菌糸生長が悪化した。これらの結果から、*Y. lipolytica* において *GUP1* オルソログが *n*-アルカンの利用とそれに応答した菌糸生長に関わることが示唆された。

Yarrowia lipolytica, *n*-alkane, glycosylphosphatidylinositol

発表責任者：福田良一（afukuda@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：1C4p06
講演日時：3 月 24 日 14:55～ 1 号館 C4 会場

Saccharomyces cerevisiae において、Kre5 は Kre6 と相互作用し、Kre6 の安定性に寄与する
Kre5 interacts with Kre6 and contributes to stability of Kre6 in *Saccharomyces cerevisiae*
○難波 聖人、依田 幸司、足立 博之、野田 陽一（東大院・農生科・応生工）
○Masato NAMBA, Koji YODA, Hiroyuki ADACHI, Youichi NODA (Tokyo Univ)

[目的]
出芽酵母は、広く利用される有用な真核微生物である。その細胞壁はマンナンタンパク質、キチン、β-1,3-グルカン、β-1,6-グルカンから構成されている。このうち、β-1,6-グルカンはマンナンタンパク質層、グルカン層、キチンをつなぎとめる重要な役割を持っているが、その合成機構には不明な点が多数残されている。本研究は、その合成機構の一端を解明することを目的として、β-1,6-グルカンの合成に関わるとされる *KRE* 遺伝子にコードされるタンパク質のうち、特に重要な役割を持つことが予想される Kre5, Kre6, Kre9 に着目した。Kre5 は、小胞体に局在する UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase(UGGT)の酵母ホモログである。Kre6 は糖加水分解酵素ファミリー16 と相同な配列を持つⅡ型膜貫通タンパク質であり、小胞体と芽に局在する。Kre9 は N 末端にシグナル配列を持ち、O-糖鎖修飾を受け、高発現によって細胞外へ分泌されるタンパク質である。これらの欠損株は、どれもβ-1,6-グルカン量の減少を示し、さらに Kre5 と Kre9 は欠損すると著しい生育阻害を引き起こし、Kre6 と Kre9 はそのホモログとともに欠損すると致死になる。本発表ではこれらタンパク質の相互作用について調べた結果について報告する。
[方法と結果]
2018 年の本大会の難波らの発表で、Kre6 と Kre9 は少なくとも輸送経路上のゴルジ体以降で相互作用すること、Kre5 と Kre6 はゴルジ体プロテアーゼ Kex2 の欠損株において強く結合することを報告した。Kre5 と Kre6 の相互作用についてさらに詳しく調べるため、引き続き Kre5-3HA を染色体に組み込んだ種々の変異株を用いて、Triton X-100 で膜を可溶化し、anti-HA と anti-Kre6 を用いた共免疫沈降実験を行った。その結果、上述の Kex2 によって切断を受けると考えられる Kre9 の欠損株においても、Kre5 と Kre6 の強い相互作用が検出された。ここで、Kre5 が Kre6 と相互作用する意義について、Kre5 はシャペロン様の機能をするのではないかとの議論が既になされていることから、Kre5 温度感受性株を用いて Kre6 をウェスタンブロットで検出、定量したところ、非制限温度でも Kre6 のリン酸化型バンドが消失し、高温条件ではさらに Kre6 の量の減少を示唆する結果を得た。以上の結果と、Kre5 が小胞体局在タンパク質であることから、Kre6 は小胞体で Kre5 と相互作用してシャペロン様の作用を受けたのち、Kre9 と相互作用して細胞膜まで運ばれることが推測される。

ER, Golgi, cell wall

発表責任者：野田陽一（anoday@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：1C4p07
講演日時：3 月 24 日 15:06～ 1 号館 C4 会場

出芽酵母β-1,6-glucan 合成関連蛋白質 Kre6 のリン酸化の解析
Phosphorylation of Kre6 is dependent on the cell cycle progression
○岡部 凱、依田 幸司、足立 博之、野田 陽一（東大院農生科）
○Kai OKABE, Koji YODA, Hiroyuki ADACHI, Yoichi NODA (Univ. of Tokyo)

[目的]
出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の細胞壁構成成分の一つであるβ-1,6-glucan はその合成経路が未解明であり、K1 killer toxin によるアッセイから得られた一連の *KRE* 遺伝子群の中にその合成酵素が存在すると予想されている。Kre6 蛋白質は 720 アミノ酸からなる II 型膜貫蛋白質で、lumen 側 C 末端領域には活性中心と考えられる配列を含んだ glycosyl hydrorase と相同性の高い領域を持ち、その近傍には複数の糖鎖修飾部位が存在する。細胞内の動態に関する研究としては、我々がショ糖密度勾配遠心分画法で主に ER に局在し、間接蛍光抗体法による顕微鏡観察で特に初期の芽に局在することを報告している。ここはβ-1,6-glucan 抗体を用いた免疫電子顕微鏡観察によって報告されているβ-1,6-glucan が新たに合成される場所と一致する。また、Kre6 の欠損株ではβ-1,6-glucan 量が減少し、ホモログである Skn1 との二重欠損によって致死となる。これらのことから Kre6 はβ-1,6-glucan 合成の非常に重要な反応に関与していることが予想されている。Kre6 はリン酸化修飾を受けることが分かっているが、その機能についてはわかっていない。本研究では、Kre6 のリン酸化の意義について調べることを目的とした。
[結果]
まず、細胞から抽出した Kre6 をホスファターゼ処理することで、Kre6 には少なくとも 2 つのリン酸化状態が存在することを見出した。さらに、それぞれのリン酸化状態における Kre6 の機能を解明するために、酵母蛋白質のリン酸化断片を網羅したデータベースから Kre6 の断片を選択し、その断片中のセリン 17 残基・スレオニン 1 残基・チロシン 2 残基をリン酸化部位の候補とした。これらのうちいくつかのセリン・スレオニン残基をそれぞれアラニンに置換したところ、Kre6 のリン酸化状態が変化する株が複数取得された。また、α-factor を用いて細胞を G1 期に同調させると、同調させない場合と比べてリン酸化状態に顕著な差異がみられることから、Kre6 蛋白質の動態は細胞周期によって調節されていることが予想された。現在、これらのアミノ酸置換体を用いて、リン酸化状態の違いによる Kre6 蛋白質の局在、β-1,6-glucan 生合成、および生育速度の変化を調べている。

cell wall, phosphorylation, cell cycle

発表責任者：岡部　凱（kahlua-panda@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：1C4p08
講演日時：3 月 24 日 15:17～ 1 号館 C4 会場

Svp26 により ER からの搬出が促進される膜蛋白質の解析
Svp26 facilitates ER exit of a set of mannosyltransferases
○野田 陽一[1]、田辺 勇気[1,2]、鎌倉 高志[2]、足立 博之[1]、荒井 斉祐[3]、和田 郁夫[3]、依田 幸司[1]([1]東大院・農生工、[2]東理大・理、[3]福島県立医大)
○Yoichi NODA[1], Yuuki TANABE[1,2], Takashi KAMAKURA[2], Hiroyuki ADACHI[1], Seisuke ARAI[3], Ikuo WADA[3], Koji YODA[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Tokyo Univ. of Sci., [3]Fukushima Med. Univ.)

目的
COPII 小胞による ER からの積荷膜蛋白質の搬出は，積荷とコート蛋白質の直接の結合，あるいは積荷とコートの結合を仲介するアダプター蛋白質の働きにより促進される．Svp26 は，出芽酵母の ER とゴルジ体に局在する四回膜貫通型の 228 アミノ酸からなる蛋白質であり，精製したゴルジ体のプロテオミクス解析より見出された．Svp26 は Kre2 family に属するマンノース転移酵素である Ktr3, Kre2, Ktr1 などの ER からの搬出を促進するアダプター蛋白質であることが報告されている．今回は，さらに Svp26 により ER からの搬出が促進される積荷蛋白質の探索を行った．

方法と結果
網羅的な解析をさらに進めることにより， Mnt2, Mnt3 の局在が *SVP26* 遺伝子の欠損により，ゴルジ体から ER にシフトすることを見出した．Mnt2, Mnt3 は O 糖鎖の付加経路において最後のマンノースをα-1,3-結合で転移する酵素である．インビトロの COPII 小胞形成アッセイを含む生化学的な解析により，Svp26 が Mnt2, Mnt3 の ER からの搬出を促進するアダプター蛋白質であることが示された．また以前に N 糖鎖のマンノースリン酸の付加に関わる Mnn4 の局在が，*SVP26* 遺伝子，もしくは *MNN6* 遺伝子の欠損により，ゴルジ体から ER へシフトすることを報告していた．インビトロの COPII 小胞形成アッセイにより，Mnn6 が COPII 小胞へ積み込まれる効率は非常に低いこと，Svp26 と Mnn6 が，Mnn4 の COPII 小胞への効率のより積み込みに必要であることが示された．Mnn4 と Mnn6 は共に N 糖鎖へのマンノースリン酸の付加に必要であり，また糖ヌクレオチドを基質として，糖転移を触媒する酵素に共通してよく見られる DXD モチーフを持っている．Mnn4 の DXD モチーフへのアミノ酸置換の導入は，マンノースリン酸の付加を消失させたが，Mnn6 の DXD モチーフへのアミノ酸置換の導入はマンノースリン酸の付加に影響を与えなかった．これらの結果から, Mnn4 がマンノースリン酸を付加する酵素の本体であり，Mnn4 はまず Mnn6 と結合した後に，Svp26 に引き渡されることにより COPII 小胞への積み込みが促進され，効率良くゴルジ体に運ばれることが示唆された．

YEAST, traffic, Golgi

発表責任者：野田陽一（anoday@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：1C4p09
講演日時：3 月 24 日 15:28～ 1 号館 C4 会場

部位特異的 *in vivo* 光架橋法を用いた大腸菌の LPS トランスロコンサブユニット LptD の生合成過程の解析

Analysis of biogenesis of LptD, a subunit of the LPS translocon, by a site-directed *in vivo* photo-cross-linking approach

○渡邊 哲朗、宮﨑 亮次、森 博幸、秋山 芳展（京大ウイルス・再生研）
○Tetsuro WATANABE, Ryoji MIYAZAKI, Hiroyuki MORI, Yoshinori AKIYAMA (Kyoto Univ.)

大腸菌などのグラム陰性細菌の外膜は、抗生物質など細胞にとって有害な物質の透過障壁として働く。外膜外葉の主要な構成要素である LPS（リポ多糖）は外膜の透過障壁機能に必須の役割を持ち、外膜の LptD/LptE 複合体（LPS トランスロコン）によって外膜へ組み込まれる。LptD は大腸菌の生育に必須のβバレル型膜タンパク質であり、グラム陰性細菌に広く保存されている。

LptD は細胞質で合成された後、ペリプラズムへと輸送され、様々なシャペロンと相互作用しつつ外膜へと運ばれ、外膜の BAM 複合体により外膜に組み込まれる。我々はこれまでにペリプラズムの亜鉛メタロプロテアーゼである BepA が、LptD の外膜へのアセンブリーを促進すると共に、正常なアセンブリに失敗した LptD の分解にも関わることで、外膜の機能維持に重要な役割を果たしていることを見出した [1]。また、BepA の C 末端側に存在する TPR ドメインが LptD や BAM 複合体構成タンパク質と直接的に相互作用すること、TPR ドメインはリング状の BAM 複合体ペリプラズムドメイン内部に挿入した形で BAM 複合体と会合することを示唆している [2, 3]。しかしながら、LptD の外膜へのアセンブリにおける BepA や BAM 複合体構成タンパク質の役割については未だ不明な点が多い。

我々は、LptD の生合成過程における、BepA や BAM 複合体との相互作用の詳細を明らかにするために、LptD の全長を対象として系統的に光反応性アミノ酸アナログ *p*BPA (*p*-benzoyl-L-phenylalanine) を導入し、部位特異的 *in vivo* 光架橋実験を行った。部位特異的 *in vivo* 光架橋法は、生細胞内でタンパク質間相互作用を高い空間分解能で検出しうる優れた手法である。その結果、LptD と BepA や BAM 複合体構成タンパク質、ペリプラズムシャペロンとの架橋を多数同定した。架橋を検出した *p*BPA 導入部位を既に報告されている LptD の立体構造にマッピングしたところ、BAM 複合体上で LptD が、最終的なβバレル構造と類似した高次構造を取り、特定の向きを持って BAM 複合体構成タンパク質や BepA と相互作用しうることが示唆された。これらの結果を踏まえ、LptD の生合成における BepA および BAM 複合体等の役割や、新たに当研究室で開発した、迅速なタンパク質間相互作用変化を解析できる光架橋解析法（PiXie 法）[4]を用いた、LptD の生合成過程の解析について議論する。

[1] Narita S., *et al.* 2013, *PNAS* 110, E3612-E3621.
[2] Daimon Y., *et al.* 2017, *Mol. Microbiol.* 106, 760-776.
[3] Shahrizal M., *et al.* 2018, *J. Mol. Biol.* in press
[4] Miyazaki R., *et al.* 2018, *J. Biol. Chem.* 293, 677-686.

outer membrane, protein biogenesis, *in vivo* photo-cross-linking

講演番号：1C4p10
講演日時：3 月 24 日 15:39～ 1 号館 C4 会場

Buttiauxella 属細菌の To-Pal 系欠損による多重膜小胞形成
Multilamellar membrane vesicle formation by Tol-Pal defect in *Buttiauxella* sp.
髙木 航太郎[1]、田原 悠平[2]、新谷 政己[1]、大熊 盛也[3]、宮田 真人[2]、二又 裕之[1,4]、○田代 陽介[1]([1]静大院総合科技、[2]大阪市大院理、[3]理研バイオリソースセ、[4]静大グリーン研)
KOTARO TAKAKI[1], YUHEI TAHARA[2], MASAKI SHINTANI[1], MORIYA OHKUMA[3], MAKOTO MIYATA[2], HIROYUKI FUTAMATA[1,4], ○YOSUKE TASHIRO[1] ([1]Grad. Sch. Integr. Sci. Technol., Shizuoka. Univ., [2]Grad. Sch. Sci., Osaka City Univ., [3]RIKEN Biores. Cent., [4]Res. Inst. Green. Sci. Technol., Shizuoka. Univ.)

【緒言】
多くの細菌は細胞外に自身の細胞膜を摘み取るようにして膜小胞（membrane vesicles）を分泌している。膜小胞は膜タンパク質とリン脂質で構成される直径数百 nm 以下の球状構造体であり、内部に様々な微生物由来の物質を高濃度に内包し、遺伝子水平伝播や細胞間情報伝達の媒体として機能している。そのような特徴から、遺伝子導入やドラッグデリバリーシステム、ワクチンとしての利用開発が進んでいる。近年我々は腸内細菌科の *Buttiauxella* 属細菌が膜小胞を過剰に分泌することを見いだし、その膜小胞分泌機構解明と応用開発に向けて研究を進めてきた。本研究では、*B. agrestis* 外膜-内膜の膜架橋因子である Tol-Pal 系を欠損させた変異株の膜小胞分泌量増大に着目し、*tolB* 欠損株が分泌する膜小胞の特性ならびに分泌機構の解明を目的とした。
【方法・結果】
培養上清中に存在する膜小胞の定量により、*tolB* 欠損株では野生株に比べて 10 倍以上の膜小胞を形成することが示された。膜小胞の透過電子顕微鏡観察を行ったところ、多重のリン脂質二重層で構成された膜小胞が欠損株培養上清から確認された。膜小胞構成成分の比較解析の結果、野生株と欠損株で顕著な違いが見られなかったことから、多重の膜は外膜で構成されている可能性が示唆された。さらに凍結急速レプリカ電子顕微鏡法により細菌内部構造観察を行ったところ、ペリプラズム領域に多重膜小胞が蓄積されている様子が観察された。以上の結果から、従来とは異なる型の膜小胞分泌現象が明らかとなり、新たな膜小胞形成プロセスが示唆された。

membrane vesicles, multilamellar, outer membrane

発表責任者：田代陽介（tashiro.yosuke@shizuoka.ac.jp）

講演番号：1C4p11
講演日時：3 月 24 日 16:00～ 1 号館 C4 会場

メンブレンベシクルを介したシグナル伝達の制御
Bacterial cell-cell signaling via membrane vesicles
○森永 花菜[1]、Andrew S. Utada[2,3]、尾花 望[3,4]、野村 暢彦[2,3]、豊福 雅典[2,3] ([1]筑波大学大学院・生命環境科学研究科、[2] 筑波大学・生命環境系、[3] 筑波大学・微生物サステイナビリティ研究センター、[4]筑波大学・医学医療系・トランスボーダー医学研究センター)
○ Kana MORINAGA[1], Andrew S. UTADA[2,3], Nozomu OBANA[3,4], Nobuhiko NOMURA[2,3], Masanori TOYOFUKU[2,3] ([1]Grad. Sch. of Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [3]MiCS, Univ. Tsukuba, [4]Transborder Medical Research Center, Fac. of Medicine, Univ. Tsukuba)

細菌の多くはシグナル分子を用いて情報伝達を行い、お互いの遺伝子発現を制御している。このうち菌体密度依存的な遺伝子発現制御機構はクォーラムセンシング（QS）と呼ばれている。最も多くの細菌で報告されている QS のシグナル分子としてアシル化ホモセリンラクトン（AHL）が挙げられる。AHL はラクトン環とアシル基から成り、側鎖の長さが C4 から C20 までが報告されている。QS は細胞間でのシグナル分子の授受によって成立するため、シグナル分子の拡散性が重要となる。しかしながら、長鎖 AHL は水環境中での拡散性が低いため、細菌間で伝達されづらいことが予想されていた。このため、長鎖 AHL がどのように細菌間で伝達されるかは長い間未解明であった。我々は、土壌脱窒細菌である *Paracoccus denitrificans* が、メンブレンベシクル（MV）に長鎖 AHL・C16-HSL を内包することによってシグナル伝達を行なっていることを明らかにした。MV は、細胞膜から構成される直径 20 から 400 nm の膜小胞であり、近年、細菌が自身の構成分子や代謝産物を内包して伝達するために用いていることが明らかとなっている。細菌は環境中で同種のみならず、異種細菌とも相互作用することが予想されるため、本研究では、*P. denitrificans* の MV が異種細菌との相互作用にも寄与するのかについて検証した。

まず、*P. denitrificans* が C16-HSL 以外の AHL に応答するのかを確かめた。*P. denitrificans* は QS によって凝集体形成を抑制する。そのため、凝集体形成を指標にアッセイしたところ、短鎖 AHL には応答しない一方で、長鎖 AHL によって凝集体形成が抑制されることが明らかとなった。*P. denitrificans* は、C16-HSL 以外の長鎖 AHL も QS シグナルとして用いることが示唆された。さらに、MV がそれらの長鎖 AHL を *P. denitrificans* に伝達できるのかを調べた。*P. denitrificans* の AHL レポーター株を用い、長鎖 AHL と混合させた MV への応答を調べたところ、レポーター株の応答が確認された。このことより、MV は長鎖 AHL を吸着し、*P. denitrificans* に伝達しうることが示された。*P. denitrificans* が生産した MV は、異種細菌よりも *P. denitrificans* に付着しやすいことも明らかとなっている。このことより、MV には宿主特異性が存在することが示唆される。これらのことより、*P. denitrificans* は MV を用いることによって、異種細菌のシグナルを吸着し、自身の QS に利用することが可能になると考えられる。現在 *P. denitrificans* と異種細菌との MV を介した相互作用を解析中である。これらの成果は、複合微生物系内での特異的な細菌の制御に繋がることが期待される。

membrane vesicles, cell-cell communication, *N*-acyl homoserine lactone

講演番号：1C4p12
講演日時：3 月 24 日 16:11～ 1 号館 C4 会場

溶原ファージは MV 形成を介して微生物間相互作用を制御しうる
Cryptic phage manipulatescell-to-cell communication throught MV production
○安田 まり奈[1]、森永 花菜[1]、尾花 望[2,3]、野村 暢彦[2,4]、豊福 雅典[2,4]([1]筑波大学大学院・生命環境科学研究科、[2]筑波大学・微生物サステイナビリティ研究センター、[3]筑波大学・医学医療系・トランスボーダー医学研究センター、[4]筑波大学・生命環境系)
○Marina YASUDA[1], Kana MORINAGA[1], Nozomu OBANA[2,3], Nobuhiko NOMURA[2,4], Masanori TOYOFUKU[2,4] ([1]Grad. Sch. of Life Environ., Univ. Tsukuba, [2]MiCS, Univ. Tsukuba, [3]Transborder Medical Research Center, Fac. of Medicine, Univ. Tsukuba, [4]Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

細菌は細胞外にシグナル物質を分泌し、周囲のシグナル物質を認識することで微生物間相互作用を介して集団的な遺伝子制御を行っている。近年我々は、*Paracoccus denitrificans* が生産する疎水性の高いシグナル物質が、膜小胞（MV）に内包されて放出されていることを報告した（Toyofuku *et al.* 2017. *ISME Journal*)。水中で拡散しづらい疎水性の高いシグナル物質は、MV に内包されることでその拡散性が向上されると考えられる。さらに、本菌の MV は本菌に優先的に付着するという興味深い特徴を有する（Toyofuku *et al.* 2017. *ISME Journal*)。つまり、このシグナル物質の拡散・伝達の鍵となるのは MV 産生であり、この MV 産生機構の理解が微生物間相互作用の理解につながると考えられる。そこで、*P. denitrificans* の MV 産生機構を解明することを本研究の目的とした。

我々は先行研究について、グラム陽性細菌である *Bacillus subtilis* やグラム陰性細菌である *Pseudomonas aeruginosa* において集団中の一部で誘導される新奇 MV 生産機構を発見した（Toyofuku *et al.* 2017. *Nat Commun.*, Turnbull *et al.* 2016. *Nat Commun.*）。本機構は、DNA ストレスによって誘導されるプロファージ領域に存在する溶菌遺伝子が関わる。多くの細菌はゲノム上にプロファージを有することから、溶菌遺伝子を介した MV 生産機構は *P. denitrificans* を含む多くの細菌に共通したものであることが考えられた。

そこで、DNA ストレスを誘導する薬剤 MMC を用いて、*P. denitrificans* におけるストレス条件下での MV 産生を解析したところ、MMC 添加量に応じた MV 産生誘導が見られた。また、ライブセルイメージングにおいて、集団中の一部の細菌から MV が形成される様子が観察できた。ストレス条件下で産生された MV に含有される DNA の全ゲノムシークエンスを行ったところ、MV にはプロファージ領域に由来する遺伝子が豊富に含まれており、その中には推定溶菌遺伝子が存在していた。この溶菌遺伝子の欠損株を用いて MV 産生能を検証したところ、野生株で見られたような MMC に応じた MV 生産誘導が見られなくなった。以上より、本菌において溶菌遺伝子を介した MV 生産機構が存在することが明らかとなった。

P. denitrificans では MV を介してシグナル伝達が行われることから、本研究により、溶原ファージが MV 産生を介してシグナル伝達を制御している、新たな微生物間相互作用の様式が示唆された。

Membrane vesicle, Cell-to-cell communication, Cryptic phage

発表責任者：豊福 雅典（toyofuku.masanori.gf@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：1C4p13
講演日時：3 月 24 日 16:22～ 1 号館 C4 会場

Involvement of a putative LPS-biosynthesis enzyme in the vesicle-mediated protein secretion of Shewanella sp. HM13

○Yuying LIU, Chen CHEN, Jun KAWAMOTO, Takuya OGAWA, Tatsuo KURIHARA (Kyoto University)

[Introduction] *Shewanella* sp. HM13, a cold-adapted bacterium isolated from the intestine of horse mackerel, secretes a large amount of extracellular membrane vesicles (EMVs), which contain a protein of unknown function, P49, as a single major cargo. The P49-coding gene is included in a gene cluster coding for homologs of surface lipoglycan synthesis proteins, components of type II secretion system, and hypothetical proteins. In this study, to analyze the molecular mechanism of vesicle-mediated secretion of P49, we constructed a targeted gene deletion system by using the *pyrF* gene of this strain as a selection marker and found that a homolog of LPS-biosynthesis enzyme, WecA, plays an important role in the cargo loading to EMVs.

[Methods] To construct a targeted gene deletion system for *Shewanella* sp. HM13, a *pyrF*-deletion mutant was obtained by two-step single crossover homologous recombination and used as the parent strain. HM3362 and HM3309, which code for two different WecA homologs, were deleted individually by two-step homologous recombination with the *pyrF* complementation suicide plasmid pKKP. The effect of the gene deletion on the vesiculation was analyzed with a lipophilic dye, FM4-64, which stains the EMVs. Localization of P49 was analyzed by SDS-PAGE of the EMVs, the post-vesicle fraction (PVF), and the cells.

[Results and Discussion] HM3362 and HM3361, which code for the N- and C-terminal halves of a WecA homolog, respectively, were found in tandem in the P49 gene cluster. The HM3362-deleted mutant (ΔHM3362) produced EMVs, showing that HM3362 is not essential for the EMV synthesis. However, in this mutant, P49 was mislocalized to PVF and not found in EMVs, indicating that a putative WecA encoded by HM3362 and HM3361 is required for the loading of P49 to EMVs. In the genome of *Shewanella* sp. HM13, we found two more WecA-coding genes, HM3308 and HM3309. These gene products showed 42.7% and 44.9% sequence identities to *E. coli* WecA, respectively. The HM3309-deleted mutant (ΔHM3309) showed growth retardation, but P49 was transported normally to EMVs in this mutant. These results suggest that a WecA homolog encoded by HM3309 contributes to the synthesis of cell surface lipoglycan, and another WecA homolog encoded by HM3362 and HM3361 contributes to the synthesis of the EMV surface structure recognized by P49.

Extracellular membrane vesicles, Shewanella, lipopolysaccharide

発表責任者：LIUYuying（yuyingliu@mbc.kuicr.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：1C4p14
講演日時：3 月 24 日 16:33～ 1 号館 C4 会場

Shewanella sp. HM13 の細胞外膜小胞への積荷輸送における膜表層構造の役割
Roles of membrane surface structure in cargo transport to extracellular membrane vesicles of *Shewanella* sp. HM13
○釜阪 紘平、チェン チェン、榑林 俊樹、川本 純、小川 拓哉、栗原 達夫（京都大学化学研究所）
○ Kouhei KAMASAKA, Chen CHEN, Toshiki KUREBAYASHI, Jun KAWAMOTO, Takuya OGAWA, Tatsuo KURIHARA (Institute for Chemical Research, Kyoto Univ)

Shewanella sp. HM13 は、機能未知タンパク質 P49 をほぼ単一の積荷タンパク質とする菌体外膜小胞（Extracellular membrane vesicle, EMV）を生産する。本研究では、本菌の膜小胞を介した選択的タンパク質分泌機構の解明を試みた。P49 の遺伝子は、II 型タンパク質分泌装置（T2SS）のサブユニットのホモログ、リポ多糖（Lipopolysaccharide, LPS）の合成および輸送に関与するタンパク質のホモログとその他機能未知タンパク質をコードする遺伝子群から成る遺伝子クラスター内に存在した。これらの遺伝子破壊株を作製した結果、P49 の周辺遺伝子は EMV 合成には必須でないことが示された。一方、全ての破壊株で EMV への P49 輸送が消失したため、P49 周辺遺伝子は P49 の EMV への輸送に必須の因子であると考えられた。各遺伝子破壊株について P49 の局在性解析を行ったところ、T2SS サブユニットのホモログを欠損した株では細胞画分中に P49 が蓄積していた。これは、T2SS 様タンパク質輸送装置が欠損することで P49 の細胞外への輸送が抑制されたためと考えられた。一方、LPS の合成および輸送への関与が示唆されるタンパク質の欠損株では培養上清から EMV を除去した画分（Post-vesicle fraction, PVF）中に P49 が蓄積していた。これらの株では P49 は細胞外へ輸送されるものの EMV に組み込まれなかったために PVF 中に局在化したと考えられた。つまり、P49 の EMV への組み込みには P49 周辺遺伝子産物によって作られる LPS が重要であることが示唆された。そこで、周辺遺伝子の内、LPS 前駆体を内膜外葉に輸送する機能が推定される Wzx-フリッパーゼホモログ（HM3343）に注目した。本遺伝子欠損株では、P49 が EMV に組み込まれないだけでなく、野生株に比べて顕著な細胞凝集体（フロック）が形成された。このフロック形成と P49 の PVF への蓄積は HM3343 相補用プラスミドの導入により抑制されたことから、HM3343 は本菌の細胞表層において P49 の EMV への組み込みに関与する LPS の輸送を制御しており、ΔHM3343 では正常な細胞表層構造が形成されず、異常なフロックを生じたと考えられた。P49 が EMV の表層構造を認識している可能性が考えられたため、P49 欠損株より単離した EMV に対して精製 P49 を添加する実験を行なったところ、精製 P49 が EMV に結合することが見いだされた。P49 は EMV の表層構造を認識しているものと考えられ、その形成が HM3343 の生理的機能であると推定された。

Psychrotroph, outer membrane vesicle, lipopolysaccharide

発表責任者：釜阪　紘平（kama.kinoko144@mbc.kuicr.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：1C4p15
講演日時：3 月 24 日 16:44～ 1 号館 C4 会場

Secretory production of heterologous proteins as cargoes of membrane vesicles by using a cold-adapted bacterium, Shewanella sp. HM13

○ Chen CHEN[1], Soichiro KAWAI[1], Jun KAWAMOTO[1], Tomoya IMAI[2], Tatsuo KURIHARA[1]
([1]Institute for Chemical Research, Kyoto University, [2]Research Institute for Sustainable Humanosphere, Kyoto University)

[Purpose] Recombinant protein expression at low temperatures is suitable for the production of thermolabile proteins, and secretory production of proteins facilitates their isolation. To develop an efficient secretory protein production system operating at low temperatures, we isolated a cold-adapted bacterium, *Shewanella* sp. HM13, which produces a single major secretory protein of unknown function, P49, at low temperatures. We found that P49 is associated with the extracellular membrane vesicles (EMVs) in the culture supernatant. In this study, we explored a protein motif in P49 that directs this protein to EMVs.

[Method] *Shewanella* sp. HM13 was grown at 4 ˚C and 18 ˚C. EMVs were recovered from the culture supernatant by ultracentrifugation and purified by sucrose density gradient centrifugation. Purified EMVs were visualized by transmission electron microscopy. Genetically modified strains that produce the full-length and C-terminal truncated P49-green fluorescent protein (GFP) fusion proteins were generated by homologous recombination with pKNOCK plasmid. EMV production of the mutants and the wild-type strain was analyzed by using a lipophilic fluorescent dye, FM4-64. Localization of P49 and the fusion proteins was analyzed by western blotting using anti-P49 or anti-GFP antibodies.

[Results and Discussion] *Shewanella* sp. HM13 abundantly produced a secreted protein (≈49kDa, named P49) in the culture supernatant as a single major cargo of EMVs. EMVs produced by this strain were spherical membranous structures with an average diameter of about 30-50 nm. The strain produced a large number of blebs on the surface of the outer membrane, which are supposed to be precursors of EMVs, and released larger amounts of EMVs than related *Shewanella* strains. More than 90% of P49 was recovered in the EMV-containing fraction by sucrose density gradient centrifugation. To examine whether secretory production of heterologous proteins as cargoes of EMVs is possible, GFP fused to the C-terminus of P49 was expressed in *Shewanella* sp. HM13. As the result, we found that P49-fused GFP was transported to EMVs. Then a series of C-terminal truncated P49-GFP fusion proteins were constructed to determine the sequence of P49 required for its transport to EMVs. According to the secondary structure prediction, P49 has two transmembrane helices, and we found that the second helix segment of P49 is important for its transport to EMVs.

membrane vesicle, protein secretion, protein expression

発表責任者：CHEN chen（chenchen88728@gmail.com）

講演番号：1C5a01
講演日時：3 月 24 日 09:00～ 1 号館 C5 会場

環境試料からの新規自己伝達性プラスミドの取得と解析

Exogenous plasmid capturing from natural environmental samples

○早川 雅也[1]、前島 由明[2]、金原 和秀[2]、新谷 政己[2] ([1]静大・工、[2]静大院・総合科技)
○Masaya HAYAKAWA[1], Yoshiaki MAEJIMA[2], Kazuhide KIMBARA[2], Masaki SHINTANI[2] ([1]Fac. Eng. Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. Shizuoka Univ.)

【目的】 プラスミドは異なる微生物間を伝播し，様々な遺伝子群を運ぶことで，宿主の生理的機能を劇的に変化させることができるため，微生物の様々な環境への進化や適応を促す要因となる一方で，多剤耐性菌の出現や蔓延の原因にもなっている．これまでに多くのプラスミドが取得されているが，実環境中で実際に遺伝子の水平伝播を担っているプラスミドがどれなのか，また，それらがどこにどれだけ分布しているのかについては不明な点が多い．我々の先行研究で，下水処理場の嫌気処理槽や牛糞試料をモデル環境として，それらから自己伝達能を指標としたプラスミドの取得を行ったところ，実環境中で実際に水平伝播を担うプラスミドとして，最近新たに提唱されたプラスミド群，PromA 群プラスミドを複数得ることに成功し，新たなサブグループ(PromAγ, PromAδ)に属することを示した[1)]．PromA 群プラスミドは，これまでに我々が発見した 4 本を含め，12 本しか全塩基配列が決定されておらず，どのようなプラスミドであるのか不明であったが，この成果は，PromA 群プラスミドが，様々な環境で伝播している主要なプラスミド群であることを示唆していた．そこで本研究では PromA 群プラスミドが，我々の身近な環境にどの程度存在するのかを明らかにすることを目的として，浜松市の佐鳴湖とその周辺の河川の底泥から，同様の方法で PromA 群プラスミドが得られるのか検証すると共に，その分布の調査を行った．

【方法・結果】プラスミドの自己接合伝達能を指標とした三親接合を用い，佐鳴湖とその周辺の河川の底泥試料から自己伝達性プラスミドを収集した．得られたプラスミドについて既知のプラスミドの遺伝子配列を基に作製したプライマーセットを用いた PCR 解析を行うことで，不和合性群の判別を行った．既に環境に広く分布することが知られる IncP-1 群プラスミドと，PromA 群プラスミドを判別の対象とした．その結果，得られた 172 株の接合完了体のうち，33 株が IncP-1 群プラスミドを，86 株が PromAα または PromAβ 群プラスミドを，2 株が PromAγ または PromAδ 群プラスミドを保持すると推定され，調べた環境に PromA 群プラスミドが広く分布していることが示唆された．これらのうち，それぞれ PromAβ, PromAγ 群プラスミドと推定された 2 つのプラスミド (pMH0613-68 と pMH0621-74)については，全塩基配列の解読を行っている．また，佐鳴湖とその周辺の環境試料，さらにそれ以外の環境試料についても，全 DNA を抽出後，各 PromA 群プラスミドを特異的に検出する PCR と，その後のサザンブロット解析によって，その分布を調査している．

1． Yanagiya et al., 2018, Front. Microbiol. 9:2602.

plasmid, PromA group, exogenous plasmid capturing

講演番号：1C5a02
講演日時：3 月 24 日 09:11～ 1 号館 C5 会場

新規プラスミドグループ PromA 群に属する GC 含量の異なるプラスミドの宿主域比較
Comparison of host range of plasmids with different GC contents belonging to novel plasmid group PromA

○徳田 真穂[1]、柳谷 洸輔[2]、井上 謙吾[3]、雪 真弘[4]、大熊 盛也[4]、水口 千穂[5]、野尻 秀昭[5]、金原 和秀[1,2]、新谷 政己[1,2,4] ([1]静大・工、[2]静大院・総合科技、[3]宮崎大・農、[4]理研・BRC-JCM、[5]東大・生物工学セ)
○Maho Tokuda[1], Kosuke Yanagiya[2], Kengo Inoue[3], Masahiro Yuki[4], Moriya Ohkuma[4], Chiho Minakuchi[5], Hideaki Nojiri[5], Kazuhide Kimbara[1,2], Masaki Shintani[1,2,4] ([1]Fac.Eng, Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch, Shizuoka Univ., [3]Fac.Agr, Mitazaki Univ., [4]RIKEN BRC-JCM, [5]Univ. Tokyo BRC)

【背景・目的】我々は近年新たに提唱されたプラスミドグループ，PromA 群に属する新規プラスミド pSN1104-11，pSN0729-62 をそれぞれ廃水の嫌気処理槽内のグラニュールおよび牛糞から取得した [1)]．これらは共に PromA 群の既存のサブグループに分類されない新規性の高いプラスミドである．また，pSN0729-62 は pSN1104-11 を含む他の PromA 群のプラスミドと比較して，プラスミド上の遺伝子群がコードするアミノ酸配列の保存性は高いにもかかわらず，GC 含量が約 10%低いという特徴を持つ [1)]．多くの場合，プラスミドの GC 含量は宿主染色体の GC 含量より 10%程度低い [2)] ことから，pSN1104-11 と pSN0729-62 の宿主域が異なる可能性が示された．そこで本研究では，GC 含量の異なる上記の 2 つのプラスミドの宿主域を比較し，GC 含量の違いによって宿主域が異なるかどうか検証した．
【方法・結果・考察】供与菌には絶対好気性の *Pseudomonas putida* SMDBS 株，受容菌には *Proteobacteria* 門の異なる綱に属する *Ochrobactrum anthropi* JCM 21032^T，*Ensifer terangae* JCM 20965 (以上 *Alphaproteobacteria* 綱)，*Delftia acidovorans* JCM 5833^T，*Hydrogenophaga pseudoflava* JCM 21410^T (以上 *Betaproteobacteria* 綱)，および *Pseudomonas stutzeri* JCM 5965^T (*Gammaproteobacteria* 綱) を用いて接合実験を行った．プラスミドは pSN1104-11，pSN0729-62 を用い，供与菌と受容菌を混合して LB 培地上の孔径 0.45 μm フィルター上で 24 時間接合した．接合完了体は絶対好気性の供与菌が生育できない，酸素濃度 100 ppm 以下の嫌気チャンバー内で選択培地に塗布することで検出した．その結果，pSN1104-11 は *O. anthropi* および *P. stutzeri* に，pSN0729-62 は *E. terangae* および *P. stutzeri* への伝達が認められた．また，本研究で用いた *Betaproteobacteria* 綱の細菌への接合伝達は検出できなかったが，いずれのプラスミドも異なる綱の細菌に接合伝達可能で，広宿主域プラスミドであると示唆された．さらに，同じ *Alphaproteobacteria* 綱の細菌に対する接合伝達の可否が異なったことから，GC 含量の異なる pSN1104-11 と pSN0729-62 の宿主域が異なることも示された．現在は，pSN1104-11，pSN0729-62 に接合完了体内のみで発現する GFP 遺伝子を挿入し，牛糞等に含まれる微生物群集を受容菌群として接合後，接合完了体の蛍光を指標にしたセルソーターによって宿主域の詳細な解析と比較を行っている．

1.Yanagiya *et al*., 2018, Front. Microbiol. 9:2602.
2. Nishida, 2012, Int. J. Evol. Biol. 2012;2012:342482.

PromA plasmids, host range, GC contents

発表責任者：新谷政己（shintani.masaki@shizuoka.ac.jp）

講演番号：1C5a03
講演日時：3 月 24 日 09:22～ 1 号館 C5 会場

好気・微好気・嫌気条件下におけるプラスミドの接合伝達性の比較

Comparisons of conjugation frequency of plasmid under aerobic, microaerobic and anaerobic conditions

○越智 健太郎[1]、柳谷 洸輔[1]、徳田 真穂[2]、大熊 盛也[3]、金原 和秀[1,2]、新谷 政己[1,2,3]（[1]静大院・総合科技、[2]静大・工、[3]理研・BRC-JCM）
○Kentaro Ochi[1], Kosuke Yanagiya[1], Maho Tokuda[2], Moriya Ohkuma[3], Kazuhide Kimbara[1,2], Masaki Shintani[1,2,3] ([1]Grad. Sch, Shizuoka Univ., [2]Fac. Eng, shizuoka Univ., [3]RIKEN BRC-JCM)

【背景と目的】プラスミドは，微生物内の染色体とは物理的に別個に存在する可動性遺伝因子で，供与菌から受容菌へと接合伝達により伝播することが知られている．これまで，好気条件下の接合伝達性については研究が進められてきたが，地球上に広く分布する，微好気・嫌気条件下の接合伝達性についてはほとんど調べられていない．こうした条件下では，プラスミドの動態が変化する可能性がある．そこで本研究では，異なる種類のプラスミドや供与菌・受容菌を用い，酸素濃度の違いによってそれらの接合伝達性に変化が生じるか検証した．
【方法】供与菌には絶対好気性細菌である *Pseudomonas putida* KT2440 派生株，SMDBS 株と，通性嫌気性細菌の *P. stutzeri* JCM 5965 株を用い，プラスミドには pBP136(IncP-1 群)と pCAR1(IncP-7 群)を使用した．受容菌には 3 種の通性嫌気性の *Pseudomonas*, *Buttiauxella*, *Pantoea* 属細菌を用いた．好気条件で培養した供与菌・受容菌を好気条件で接合させた場合を好気条件下，嫌気チャンバー内(100 ppm 以下)で接合させた場合を微好気条件下とし，嫌気条件で培養した菌株を嫌気チャンバー内で接合させた場合を嫌気条件下の接合実験とした．いずれの条件についても接合後の懸濁液を選択培地に塗布し，嫌気チャンバー内でコロニーの出現を認めた後，酸素に曝露し，GFP に由来する蛍光を示すかどうかを指標にして接合完了体の検出を行った．接合時間を 3 および 24 時間とし，得られた完了体数を接合後の供与菌数で割ったものを伝達頻度として算出し，各条件下で比較した．
【結果と考察】供与菌・受容菌をどの組み合わせで用いた際も，接合時間を 3 時間とした際の伝達頻度は，好気条件と比べて微好気・嫌気条件下では 1/10～1/100 に低下した．また，3 時間後と 24 時間後の伝達頻度を比較すると，いずれも好気条件下の伝達頻度は 10～100 倍に上昇していることが明らかとなった．さらに好気・微好気・嫌気条件下における伝達頻度の違いはプラスミドや，供与菌と受容菌の組み合わせによって異なることが示された．これらの結果から，酸素濃度の違いが接合伝達効率に影響していること，酸素濃度によって伝達しやすい菌株の種類が変化することが示唆された．この伝達頻度の違いは，供与菌・受容菌の生育の違いに起因するのかを検証するために，栄養源のない条件で接合実験を行った．その結果，接合時の栄養源の有無によらず同様の傾向を示したことから，各菌株の生育の違いが接合伝達頻度には影響しないことが示唆された．現在は pBP136 を用いて複合微生物系を受容菌群とした際の好気・微好気条件下における宿主域の違いについて調査を進めている．

conjugation, plasmid, anaerobic condition

発表責任者：新谷政己（shintani.masaki@shizuoka.ac.jp）

講演番号：1C5a04
講演日時：3 月 24 日 09:33～ 1 号館 C5 会場

Bacillus thuringiensis subsp. *israelensis* の巨大プラスミドの構造変化を可能にする遊離環状 DNA 分子

Free circular DNA molecules that enable structural change of large plasmids in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*

○前田 直樹、野澤 貴洋、千 菊夫 (信州大・農)
○Naoki MAEDA, Takahiro NOZAWA, Kikuo SEN (Fac. of Agr., Shinshu Univ,)

[背景・目的]

Bacillus thuringiensis（*Bt*）は，胞子形成期に殺虫性タンパク質顆粒(クリスタル)を生産する． *Bt* の一亜種 *israelensis*（*Bti*）のクリスタル生産を担っている巨大プラスミドとして，*Bti* HD522 株が保有する pBTI-6（116.5 kb）と *Bti* 4Q5 株が保有する pBtoxis（127.9 kb）の全塩基配列が報告されている．二つの巨大プラスミドの基本構造は同じであるが，1）一部の領域が反転していること，2) pBtoxis は同プラスミドに特異的な領域を保有している点が異なる．また，HD522 株には，pBTI-6 の構造変化領域に，pBtoxis 特異的領域の一部と IS*240*A が付加された pBTI-6Ex という別のプラスミドの存在が明らかになっている．pBTI-6 と pBTI-6Ex は，HD522 細胞内において,「同一の複製機構・起点をもつ異なるプラスミド間の不和合性の原理」に反して共存可能であることから, pBtoxis 特異的領域が遊離した環状 DNA 分子が構造変化を仲介しているという仮説を立てた．本研究は，*Bti* 巨大プラスミドの構造変化について知見を得ることを目的としており，今回は上記仮説を検証した．

[方法]

実験材料である *Bti* HD522 株のプラスミド DNA をアルカリ法によって調製し, これを鋳型として PCR を行い，プラスミドの構造変化を解析した．具体的には，pBtoxis 特異的領域内にのみアニールし, pBtoxis 特異的領域内を増幅可能なプライマーセットと, それに相補的なプライマーセットを用いて増幅された DNA をアガロースゲル電気泳動によって解析した．また，PCR 増幅産物に対して制限解析を行うことによって，同産物の由来を確認した．

[結果・考察]

PCR 解析の結果は，pBtoxis 特異的領域が遊離環状 DNA 分子として HD522 細胞内に存在しており，同分子が pBTI-6 の構造変化を可能にしているという仮説を裏付けるものであった．PCR 解析で検出された遊離環状 DNA の推定分子サイズは，11.3 kb と 10.0 kb の 2 種類で，PCR 増幅産物の制限解析によって，これらの DNA 分子が複製起点と IS*240*A を有することが示された． *Bti* HD522 株の巨大プラスミドの構造変化は, pBtoxis 特異的領域由来の遊離環状 DNA 分子の IS*240*A と pBTI-6 の IS*240*A 間の相同組換えによって起こっており，この組換え現象の結果，HD522 細胞内において pBTI-6 と pBTI-6Ex の共存が可能となっていると推測した．

Bacillus thuringiensis, insertion sequence, plasmid

発表責任者：千　菊夫（kik1000@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：1C5a05
講演日時：3 月 24 日 09:44～ 1 号館 C5 会場

枯草菌プラスミドの安定維持に 関わる新規遺伝子の同定

Identification of novel genes involved in plasmid maintenance in *Bacillus subtilis*

○沖田 貴弘[1]、渡辺 智[2]、吉川 博文[2]、久留主 泰朗[1]([1]茨大農、[2]東農大生命)
○Takahiro OKITA[1], Satoru WATANABE[2], Hirohumi YOSHIKAWA[2], Yasuro KURUSU[1] ([1]Ibaraki Univ., Col. Agric., [2]Tokyo Univ. of Agric., Faculty of Life Sciences)

微生物を用いた遺伝学・生化学的解明は古くから研究され、大腸菌はグラム陰性菌の代表菌株として、枯草菌はグラム陽性菌の代表菌株として研究が進められてきた。グラム陰性菌で高度に保存されている DksA は、DnaK のサプレッサーとして同定された。その後の研究で DksA は RNA ポリメラーゼ(RNAP)の二次チャネルに結合し、転写制御を行う転写因子であることが解明された。枯草菌では DnaK の存在は確認されているが、DnaK のサプレッサーは確認されていない。一方枯草菌内における DksA ファミリーに属するタンパク質として YlyA, YteA, YocK がある。

枯草菌 *ylyA, yteA, yocK* はそれぞれ胞子形成に関わる遺伝子として同定された。YlyA は胞子形成後期で作用するσG の制御下において遺伝子発現に関与する RNAP 結合タンパク質であるが、YteA と YocK の詳しい機能は不明である。

我々はこれまでに、大腸菌 *dksA* 変異株において複製様式の異なるプラスミドに対してコピー数に影響を与える結果を得ている。このことから、大腸菌 *dksA* 遺伝子はプラスミドの維持へ関与することが示唆された。本研究では、グラム陽性菌の中で幅広く研究が行われている枯草菌において、同様に DksA ファミリーがプラスミドの維持に関与するかを明らかにすることを目的とする。

本研究では、枯草菌 *ylyA, yteA, yocK* 単独もしくは複合変異株を宿主に用いてプラスミドの安定維持に関する解析を行った。単独変異株・二重変異株では枯草菌プラスミド pC194 および pHY300PLK は野生株と同程度の安定性を維持し各世代へ分配されることを確認したが、三重変異株では宿主内安定性が低下した。また、プラスミドコピー数への関与を確認するためプラスミドコピー数を測定した結果、プラスミドのコピー数には影響をしないことが判明した。

本大会では枯草菌内でプラスミドの安定維持に関与する新規な遺伝子として *ylyA, yteA, yocK* について報告する。

Plasmid, *Bacillus subtilis*

発表責任者：久留主泰朗（yasurou.kurusu.krsy@vc.ibaraki.ac.jp）

講演番号：1C5a06
講演日時：3 月 24 日 10:05～ 1 号館 C5 会場

希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の胞子嚢膜構成タンパク質の同定と機能解析
Identification and functional analysis of sporangium membrane proteins of the rare actinomycete *Actinoplanes missouriensis*

○前田 聡史[1]、手塚 武揚[1,2]、大西 康夫[1,2] ([1]東大院・農生科、[2]東大・微生物連携機構)
○Satoshi Maeda[1], Takeaki Tezuka[1,2], Yasuo Ohnishi[1,2] ([1]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, Univ. of Tokyo)

【背景・目的】

希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* は栄養豊富な環境では基底菌糸を伸ばして増殖するが、栄養飢餓状態になると多数の胞子を内包する胞子嚢を形成して休眠する。胞子嚢は水分などのシグナルを感知すると最外層が透明化した後に開裂し、胞子を放出する。外界に放出された胞子はべん毛運動を行う遊走子となり水中を泳ぎ回る。このような複雑な形態分化の中でも、特に胞子嚢は多数の細胞を内包する“多細胞状態”とも言える構造体であり、原核生物において極めて特異な存在である。以前の研究で我々は、それまで胞子嚢壁と呼んでいた胞子嚢を取り巻く構造体を精製し成分分析を行うことで、これがペプチドグリカンからなる細胞壁様の構造体ではなく、脂質二重層とタンパク質からなる細胞膜様の構造体であることを明らかにした。今後、この構造体を胞子嚢膜と呼ぶことにしたが、本研究では、胞子嚢膜を構成するタンパク質の同定と機能解析を行った。

【方法・結果】

精製胞子嚢膜を SDS-PAGE に供し、CBB 染色によりバンドとして検出されたタンパク質の同定を peptide mass fingerprinting とアミノ酸シーケンサーを用いて行ったところ、SmpA (AMIS_66900)、SmpB (AMIS_76590)、SmpC (AMIS_48270)、SmpD (AMIS_53900)の 4 つのタンパク質が見出された。これらのタンパク質はアミノ酸配列からの機能予測は困難であったが、いずれも分泌シグナル配列を有しており、胞子嚢に内包されている胞子細胞（あるいは胞子に分化する前の胞子嚢内の菌糸）から分泌されて胞子嚢膜に局在したものと考えられた。そこで、大腸菌で発現させた SmpA、SmpB、SmpC を抗原とするポリクローナル抗体を作製し、菌糸、胞子嚢、遊走子、胞子嚢膜から抽出したタンパク質を用いてウエスタンブロッティングを行った結果、SmpA と SmpC は胞子嚢膜で特異的に検出され、さらに遊走子にはシグナル配列が切断されていない前駆体 SmpA が存在していることがわかった。遺伝子破壊株の解析により、*smpA* 破壊株では正常な胞子嚢がほとんど形成されず、胞子嚢膜を持たないむき出しの胞子の塊の様なものが観察された。また、*smpB* 破壊株では胞子嚢は形成されるものの胞子嚢膜に異常が見られ、胞子嚢の開裂もほとんど起こらなかった。*smpC* 破壊株は過去に作製されていたが、表現型に野生株との違いは見られなかった。なお、SmpD に関しては現在、遺伝子破壊株を作製して機能解析を行っている。以上の結果より、SmpA、SmpB は正常な胞子嚢形成に必須なタンパク質であることが示された。

rare actinomycete, sporangium, membrane protein

講演番号：1C5a07
講演日時：3 月 24 日 10:16～ 1 号館 C5 会場

希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の胞子鎖成熟に関与するグルコサミニダーゼの同定と機能解析

Identification and functional analysis of a glucosaminidase required for spore maturation in *Actinoplanes missouriensis*

○光山 京太[1]、手塚 武揚[1,2]、大西 康夫[1,2] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]東大・微生物連携機構)
○Kyota MITSUYAMA[1], Takeaki TEZUKA[1,2], Yasuo OHNISHI[1,2] ([1]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci. Univ. of Tokyo, [2]CRIIM Univ. of Tokyo)

【背景・目的】希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* は栄養豊富な環境では基底菌糸を伸張して増殖するが、栄養飢餓環境では多数の胞子を内包する胞子嚢を形成して休眠する。胞子嚢は水分を含むシグナルを感知すると開裂して胞子を放出する。放出された胞子は spore sheath と呼ばれる薄膜を脱離し、べん毛運動により水中を運動する遊走子となり、走化性により栄養豊富な環境に至ると運動を停止して発芽する。*A. missouriensis* はこのように複雑な生活環を持つが、その制御機構に関しては未解明な部分も多い。本研究では、微生物が休眠細胞へ分化する分子機構の解明を目的として、*A. missouriensis* の胞子嚢形成に関わる遺伝子の同定とその機能解析を行った。
【方法・結果】過去の研究から *A. missouriensis* の形態分化に関与する遺伝子は、転写制御因子 TcrA によってグローバルに制御されることがわかっている。そこで、TcrA レギュロンと同定された遺伝子の中で、翻訳産物の機能予測から胞子嚢形成に関与すると予想された遺伝子の破壊株を順次作製した。その結果、Glucosaminidase をコードすると予想される遺伝子 *gsmA* の破壊株では、胞子嚢の開裂は野生株と同様に進行したものの、放出された遊走子の多くが単独では存在せず 2～20 個程度の一列に繋がった集合体をなしていた。電子顕微鏡による観察から、*gsmA* 破壊株の胞子は形成段階で個々の胞子が十分に成熟せず連結されたままであることが示唆された。単独で遊走する遊走子も観察されることから、*gsmA* 破壊株のべん毛の形成および spore sheath の脱離は正常に行われていることが示唆された。また、qRT-PCR による転写解析を行った結果、*gsmA* の転写量は野生株で胞子嚢の成熟に伴い増大していたが、*tcrA* 破壊株では胞子嚢形成後期での転写量が野生株の 10 分の 1 程度に減少していた。一方、GsmA は N 末端側に TAT 経路による分泌シグナルとタンパク質間相互作用に関わると予想される 2 つの SH3-like domain を、C 末端側に Glucosaminidase domain を持つ。大腸菌を用いて発現・精製した GsmA の Glucosaminidase domain と *A. missouriensis* の栄養菌糸から精製した細胞壁成分を用いて zymography を行ったところ、細胞壁成分の分解が認められた。以上の結果から、GsmA は胞子嚢形成過程で胞子間の細胞壁を分解し、個々の胞子を分離させる機能を持つことが示された。*Streptomyces* 属放線菌ではペプチドグリカンの糖鎖は GlcNAc と MurNAc から成るが、*Actinoplanes* 属を含む一部の放線菌では GlcNAc と MurNGly から成ることが知られている。現在、*Streptomyces* 属放線菌から精製した細胞壁成分および既知の細胞壁分解活性を持つ市販の酵素等も用いて zymography を行い、GsmA が認識する細胞壁構造の特異性を調べている。

Actinomycetes, sporangium, spore

講演番号：1C5a08
講演日時：3 月 24 日 10:27～ 1 号館 C5 会場

希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* において Clp プロテアーゼの ATPase サブユニットは胞子嚢の形成と開裂に関与する

The ATPase subunit of Clp protease is required for sporangium formation and dehiscence in *Actinoplanes missouriensis*

○鈴木 遼太[1]、手塚 武揚[1,2]、大西 康夫[1,2] ([1]東大院・農生科、[2]東大・微生物連携機構)
○Ryota Suzuki[1], Takeaki Tezuka[1,2], Yasuo Ohnishi[1,2] ([1]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci. Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, Univ. of Tokyo)

【背景・目的】希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* は栄養飢餓状態になると数百個の胞子を内包した胞子嚢を形成し休眠する。胞子嚢は水を含む何らかのシグナルを感知すると開裂し、放出された胞子は遊走子となって泳ぎ始める。遊走子は栄養豊富な環境下に到達すると遊走を停止し発芽する。転写阻害剤やセリンプロテアーゼ阻害剤の存在下では胞子嚢の開裂が進行しないことから、胞子嚢の開裂には何らかの遺伝子の転写とセリンプロテアーゼ活性が必要であることが示唆されていたが、その詳細は不明であった。本研究では、胞子嚢の開裂に必須なセリンプロテアーゼ遺伝子の同定を目指した。
【方法・結果】Clp プロテアーゼはセリンプロテアーゼサブユニットと ATPase サブユニット（Clp-ATPase）からなる複合体であり、Clp-ATPase が ATP を利用して基質となるタンパク質のフォールディングをほどくことで、プロテアーゼ活性が発揮される。これまでに行った RNA-seq 解析より、Clp-ATPase をコードする *AMIS_11250*（*clpX* と命名）の転写が胞子嚢形成過程および開裂過程において増大することがわかっていたため、*clpX* に着目した。*clpX* 破壊株を作製したところ、*clpX* 破壊株は未成熟で小さな胞子嚢しか形成できないことが明らかになった。また、S1 nuclease mapping により、*clpX* は 2 つの転写開始点を持ち、いずれの転写開始点からの転写も胞子嚢形成過程と開裂過程で増大していることがわかった。これらの転写開始点の上流にはそれぞれ主要シグマ因子（ここではσ^{HrdB} と呼ぶ）及び胞子嚢形成や開裂を制御することが明らかになっている置換型シグマ因子σ^{FliA} の認識プロモーターが存在していた。そこで、相補実験に用いる *clpX* 発現プラスミド（染色体組み込み型）上で、これら 2 つのプロモーターのいずれか 1 つ、または両方の-10 領域を欠損させ、*clpX* 破壊株に導入した。その結果、野生型プロモーターをもつ *clpX* は胞子嚢形成や開裂を正常に回復させたのに対して、両プロモーターのうち、どちらか 1 つの-10 領域を欠損させたプロモーターを有する *clpX* 導入株では、胞子嚢は正常に形成するが、胞子嚢はほとんど開裂しないという表現型を示した。また、両プロモーターの-10 領域を欠損させた *clpX* の導入株では、予想通り *clpX* 破壊株の表現型に変化はなかった。以上の結果から、*clpX* は正常な胞子嚢形成と開裂に必須な遺伝子であることが示され、さらに、(i)σ^{HrdB} 認識プロモーターとσ^{FliA} 認識プロモーターのどちらか一方からの転写があれば胞子嚢形成は正常に行われること、(ii)σ^{HrdB} 認識プロモーターとσ^{FliA} 認識プロモーターの両方からの転写が活性化されることが正常な胞子嚢の開裂に必要であること、が強く示唆された。

rare actinomycete, sporangium, Clp protease

発表責任者：鈴木遼太（ryota-suzuki@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：1C5a09
講演日時：3 月 24 日 10:38～ 1 号館 C5 会場

Lactobacillus agilis BKN88 が持つ 2 種のフラジェリンの特性解析
Characteristic analysis on two homologous flagellins of *Lactobacillus agilis* BKN88
○江口 直人[1]、鈴木 駿也[1]、辻井 良政[2]、須恵 雅之[2]、横田 健治[2]、五十君 靜信[2]、梶川 揚申[2]([1]東農大院・農化、[2]東農大・農化)
○Naoto EGUHCI[1], Shunya SUZUKI[1], Yoshimasa TSUJII[2], Masayuki SUE[2], Kenji YOKOTA[2], Shizunobu IGIMI[2], Akinobu KAJIKAWA[2] ([1]Grad. Sch. Agr. Chem.,Tokyo Univ. of Agric., [2]Sch. Agr. Chem.,Tokyo Univ. of Agric.)

【背景・目的】
Lactobacillus 属細菌は一般的にべん毛を持たないが、一部べん毛を持ち運動性を示す菌種・菌株が存在する。有べん毛乳酸菌に関する知見は乏しく、そのべん毛構造や機能、生態については大部分が未解明である。過去の研究において、筆者らは *Lactobacillus agilis* BKN88 株のべん毛を構成するフラジェリン遺伝子(*fliC1* および *fliC2*)の発現解析を行い、同菌株のべん毛が相同性の高いこれら 2 つのフラジェリンにより構成されていることを示した。しかし、これら 2 種のフラジェリンが *L. agilis* のべん毛形成や運動性にどのように関わっているかは不明であった。そこで本研究では、*L. agilis* BKN88 においてそれら 2 種のフラジェリンが果たす役割を調べることを目的とした。
【実験方法】
L. agilis BKN88 のフラジェリン遺伝子を標的とし、近傍の相同領域を挿入した温度感受性プラスミドを構築した。これを *L. agilis* BKN88 へ導入し、二重相同組換えによりフラジェリン欠損株を作出した。次に、*fliC1* および *fliC2* をノックインするための 2 種のプラスミドを構築し、それらをフラジェリン欠損株へ導入することで *fliC1* 単独発現株(Δ*fliC2* 株)を作出した。Δ*fliC2* 株からべん毛を単離し、CBB 染色を行った。また、*L. agilis* のフラジェリンは糖鎖修飾を受けることが明らかになっているため、PAS 染色も行った。*fliC2* 欠損による運動性への影響を調べるため、Δ*fliC2* 株の移動速度を顕微鏡観察下の動画解析により算出した。また、べん毛の安定性を評価するため、べん毛を加熱(37℃, 47℃, 57℃, 67℃)または酸性(0.1N HCl, 0.01N, 0.001N, 0.0001N)条件で処理し、Native-PAGE によりべん毛繊維から脱離したフラジェリンモノマーを検出した。
【結果・考察】
単離したべん毛の CBB 染色・PAS 染色の結果、FliC1 と推定される単一バンドが確認され、野生株由来のフラジェリン同様に糖鎖修飾を受けていることが示された。軟寒天培地への接種・顕微鏡観察による運動性試験では、Δ*fliC2* 株の運動性が確認され、移動速度についても BKN88 野生株との間に明確な差異はみられなかった。また、加熱または酸性条件下における安定性においても野生株との差は認められなかった。以上の結果より、*L. agilis* においては FliC1 のみで正常なべん毛形成や運動性の発揮が十分に可能であることが示された。現在、*fliC2* 単独発現株の作製を行っており、同様の評価を行うことでそれぞれのフラジェリンタンパク質の役割を明確にする。

Lactic acid bacteria, flagella, motility

講演番号：1C5a10
講演日時：3 月 24 日 10:49～ 1 号館 C5 会場

Aphanomyces cochlioides 被嚢胞子発芽時に発現上昇する遺伝子の同定
Identification of notably induced genes during cyst spore germination in an oomycete, *Aphanomyces cochlioides*

○佐藤 優樹、橋床 泰之、橋本 誠、崎浜 靖子（北大院農）
○Yuki SATO, Yasuyuki HASHIDOKO, Makoto HASHIMOTO, Yasuko SAKIHAMA (Hokkaido Univ. of Agric.)

【背景・目的】*Aphanomyces cochlioides* はケイトウやホウレンソウに感染する植物病原性卵菌であり、菌糸状の栄養体は冠水などの刺激により遊泳能を持つ遊走子を形成する。遊走子は宿主特異的シグナル物質に誘引され、宿主根表面で被嚢化後発芽し感染が成立する。また、遊走子は振動などの非宿主特異的刺激によっても被嚢化するが、その場合発芽には至らず遊走子が再生される。遊走子の被嚢化および発芽は感染において必須の過程であるが、*Aphanomyces* 属卵菌の形態変化分子機構に関する知見は限られており、不明な点が多い。そこで本研究では、遊走子の細胞分化機構を明らかにすることを目的とし、被嚢胞子発芽または遊走子再生時に特異的に発現量が変動する遺伝子の同定を行った。
【材料・方法】*A. cochlioides* Cel1 MAFF 305845 株（AC Cel1）を yeast extract 含有コーンミール寒天培地で 4～7 日間培養した。その後、30 分毎に滅菌水を交換し菌糸を 3 時間洗浄、20℃で 16 時間静置し、遊走子懸濁液を調製した。AC Cel1 遊走子懸濁液に、発芽処理として clarified V8 野菜ジュース（終濃度 2～12%）、遊走子再生処理としてニコチンアミド（NA）溶液（終濃度 1～10 μM）を添加した。発芽または遊走子再生処理を施した菌体から RNA を抽出し、アダプター配列を付加したオリゴ dT プライマーを用いて cDNA を合成した。ディファレンシャルディスプレイ法により発現変動遺伝子を検出し、これらの塩基配列決定およびリアルタイム PCR による定量解析を行った。さらに、一部の遺伝子について 5'-RACE 法による、完全長 cDNA 配列決定を試みた。
【結果】10% V8 処理によって全ての遊走子が被嚢化し、80 分後の発芽率は約 9 割に達した。また、6 μM NA 処理では処理直後全ての遊走子が一旦被嚢化し、180 分後から遊走子再生が確認され、300 分後の再生率は約 7 割に達した。ディファレンシャルディスプレイ解析の結果、V8 処理 80 分後に発現量が上昇するバンド、*V8-AC1100* および *V8-AC750* が検出され、発現定量 PCR 解析の結果、*V8-AC1100* および *V8-AC750* の発現量は、V8 処理直後のそれぞれおよそ 60 倍と 3 倍に上昇していた。特に変動の大きかった *V8-AC1100* について 5'-RACE 法を用いた 5'末端配列解析を行い、開始および停止コドンを含む 1096 bp の cDNA 配列を決定した。得られた塩基配列からタンパク質 V8-AC1100 の細胞内局在、機能を予測したところ、フォールディングシャペロン機能を有する核局在型 FKBP タンパク質と推察された。核に局在する FKBP タンパク質はヒストンシャペロン活性を有し、遺伝子発現に関与することが報告されていることから、*V8-AC1100* も被嚢胞子発芽時の遺伝子発現制御に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

Oomycete, Cellular differentiation, Chaperone

講演番号：1C5a11
講演日時：3 月 24 日 11:10～ 1 号館 C5 会場

Mucor circinelloides が有する低温依存性リパーゼ遺伝子の発現解析
Expression analysis of genes encoding low temperature-dependent lipases from *Mucor circinelloides*.

○田中 瑛子[1]、村上 周一郎[2] ([1]明治大院農、[2]明治大農)
○Akiko TANAKA[1], Shuichiro MURAKAMI[2] ([1]Graduate School of Agriculture, Meiji Univ., [2]School of Agriculture, Meiji Univ.)

【背景・目的】

リパーゼは産業的にも幅広く利用されている三大消化酵素の一つであり、その中でも洗剤や食品加工、水の浄化処理等に利用する目的で、低温活性リパーゼが注目を集めている。

Mucor circinelloides は接合菌門ケカビ目に分類される低温性糸状菌である。子嚢菌や担子菌と比較して接合菌の研究報告例は少ないが、*Mucor* 属はその中で比較的多く研究が行われている。*M. circinelloides* ATCC 1216B は *Mucor* 属で最初にゲノムが公開された株であり、ケカビのモデル生物として用いられている。また *M. circinelloides* は脂質を蓄積することができる油性微生物でもあり、それに関わるリパーゼはバイオディーゼル生産の生物触媒としての利用も期待されている。そこで、本研究は、低温菌である *M. circinelloides* が低温環境下で主として発現しているリパーゼ遺伝子を同定し、産業利用できる有用な低温活性リパーゼを得ることを目的とした。

【方法・結果】

まず *M. circinelloides* が有する推定トリアシルグリセロールリパーゼ遺伝子を Mycocosm データベースを用いて検索し、23 個の遺伝子を候補とした。次に本菌を生育至適温度（25℃）および低温（10℃）で Tween80 を主要な炭素源とした完全合成培地にて振とう培養し、菌体量とリパーゼ活性の指標として 4-nitrophenyl decanoate（*p*NPD）分解活性を経時的に測定した。その結果、25℃では培養 24 h から 36 h にかけて、10℃では培養 72 h から 120 h にかけて菌体量、*p*NPD 分解活性ともに上昇した。よって、本菌の増殖に伴ってリパーゼ遺伝子の発現が活発に行われていることが示唆された。そこで、25℃では 24 h、10℃では 144 h 培養した菌体を回収し、total RNA を精製後、cDNA を合成し、RT-qPCR に供した。その結果、25℃および 10℃でほとんどの推定リパーゼ遺伝子の発現が確認された。また、25℃と 10℃における推定リパーゼ遺伝子の発現レベルを、28S rRNA 量をリファレンスとした発現比で比較した。その結果、ほとんどの遺伝子が 10℃よりも 25℃で多く発現していたが、10℃において、1 つの遺伝子の発現量が著しく増加していることを見出した。以上の結果は、本菌が低温依存的に発現する推定リパーゼ遺伝子を有していることを示している。現在そのリパーゼ遺伝子のクローニングを進めている。

low temperature-dependent lipase, *Mucor circinelloides*, zygomycetes

講演番号：1C5a12
講演日時：3 月 24 日 11:21～ 1 号館 C5 会場

冬虫夏草（*Cordyceps militaris*）由来レクチンの機能解析
Functional analysis of a lectin from the mushroom *Cordyceps militaris*.
○小野 晶子[1]、柏 毅[2]、本山 高幸[2]、崔 宰熏[3,4]、平井 浩文[3]、道羅 英夫[3]、長田 裕之[2]、河岸 洋和[3,4]、鈴木 智大[5]([1]宇都宮大院・農、[2]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー、[3]静岡大・グリーン研、[4]静岡大・農、[5]宇都宮大・バイオ)
○Akiko ONO[1], Takeshi KASHIWA[2], Takayuki MOTOYAMA[2], Jae-hoon CHOI[3,4], Hirofumi HIRAI[3], Hideo DOHRA[3], Hiroyuki OSADA[2], Hirokazu KAWAGISHI[3,4], Tomohiro SUZUKI[5] ([1]Graduate School of Agriculture, Utsunomiya University, [2]Chem. Biol., RIKEN CSRS, [3]Research Institute of Green Science and Technology Shizuoka University, [4]Department of Agriculture, Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka University, [5]Center for Bioscience Research and Education, Utsunomiya University)

【目的】
冬虫夏草は昆虫などから生じるキノコの総称であり、世界的に約 500 種が確認されている。その 1 種である *Cordyceps militaris* はサナギタケと呼ばれ、癌患者の治療薬などとして古くから用いられてきた[1)]。しかし、この菌の感染から寄生そして子実体形成における詳細なメカニズムは未だ不明である。これまでサナギタケ由来のレクチン(*C. militaris* lectin)については、報告が 3 報あるが、その生体内機能に関する報告はなされていない。本研究では、サナギタケ子実体より精製した新規レクチン(CmLec4)が、感染・寄生・子実体形成における菌と昆虫との相互作用に関与しているのではないかという仮説のもと、現在までに CmLec4 の精製・諸性質決定、カイコ中の CmLec4 に結合する物質の探索を行った。その結果、CmLec4 の一次アミノ酸配列・諸性質を決定し、CmLec4 がカイコ中の Sex-specific storage-protein 2 (SP2) に結合することを見出した。そこで本研究では、(1) 酵母 (*Kluyveromyces lactis*) を用いた CmLec4 の異種発現系を構築し、その諸性質をより詳細に検討することと、(2) 異種発現させた rCmLec4 をカイコの蛹に接種しその影響を調べることで、サナギタケの感染から子実体形成に至る過程での CmLec4 の役割を明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】
サナギタケ子実体より *cmlec4* 遺伝子のクローニングを行った後、*K. lactis* Protein Expression Kit を用いて *K. lactis* GG799 株のゲノムに導入し、形質転換体を取得した。得られた酵母形質転換体を YPGal 培地で培養後、培養上清を His Tag 精製し，rCmLec4 を得た。取得した rCmLec4 を SDS-PAGE に供したところ、目的の 15 kDa 付近にシングルバンドが確認された。更に赤血球凝集活性試験および赤血球凝集反応阻害試験の結果から rCmLec4 は糖認識能を有していること、その糖認識特異性は native CmLec4 と同等であることが明らかになった。また、rCmLec4 をカイコ蛹に接種し、羽化率の算出によりカイコ蛹への感染に及ぼす影響を検討した。その結果、rCMLec4 を接種したカイコ蛹では対照区と比較して羽化の速度に影響を与えることを明らかにした。さらに *cmlec4* 遺伝子破壊株の作出に成功し、破壊株はカイコ蛹への感染速度が低下すること、子実体形成能が野生株よりも顕著に低下することを明らかにした。
1) Yue.K., *et al,*. *J Pharm Pharmacol*, 65:474-493 (2013)

lectin, fungus, *Cordyceps militaris*

発表責任者：鈴木　智大（suzukit@cc.utsunomiya-u.ac.jp）

講演番号：1C5a13
講演日時：3 月 24 日 11:32～ 1 号館 C5 会場

イネいもち病菌における核数制御因子の探索

Exploration of factors regulating the number of nuclei and its relationship to infection specific cell differention in the rice blast fungus.

○齋藤 翔太、菊沢 佑斗、黒木 美沙、荒添 貴之、鎌倉 高志（東理大）
○Shota Saito, Yuto Kikusawa, Misa Kuroki, Takayuki Arazoe, Takashi Kamakura (Tokyo Univ. of Sci)

イネに重要病害を引き起こすイネいもち病菌（*Pyricularia oryzae*）は分生子形成から感染特異的器官である付着器の形成および成熟までの細胞分化時を除き，1 つの核が隔壁に仕切られた単核細胞で構成される。近縁であるアカパンカビ（*Neurospore crassa*）などの多核細胞で構成される糸状菌も複数存在するが，核数制御機構に着目した研究は少なく未解明な点が多い。本研究は単核細胞で構成されるイネいもち病菌の核数制御因子の探索とその機能解析を行うことで，核数制御機構とその生物学的意義の一端を明らかにすることを目的としている。

我々はイネいもち病菌のヒストン H3 を GFP で可視化した H3::GFP 株を作出し，アグロバクテリウム法を用いたランダム遺伝子破壊による核数制御因子の探索を行った。得られた 994 の推定形質転換株の蛍光観察により，栄養菌糸において核数異常を示す 8 株を単離した。得られた核数異常株 8 株において分生子形成率を調査したところ野生株と比較して著しい低下がみられる株が存在した。また付着器形成率においても一部の核数異常株において低下が確認された。異常株のうち 7 株では分生子において隔壁の消失や過剰形成，核数の増減を示したことから，隔壁形成や核の局在，それらを制御する細胞周期機構が核数制御に関与すること，分生子形成および付着器形成の両形成率が著しく低下した株が存在することから，細胞分化と核数制御機構の関連性が推測された。また，残りの 1 株では，分生子形成過程を経ることで栄養菌糸時に観察されたヒストン H3 の GFP 蛍光の消失が確認された。DAPI 染色においては正常な核の染色が認められたことから，細胞分化時特異的な染色体構成の異常によるものと考えられた。ヒストン H3 の GFP 蛍光が消失した株において分生子から栄養菌糸を再形成させた際も GFP 蛍光は消失したままで，DAPI による染色は認められた。本株の栄養菌糸を液体培養して経時的に蛍光観察を行ったところ 7 日頃から一部の菌糸で H3 の GFP 蛍光が観察され，14 日にはほぼすべての栄養菌糸細胞で蛍光の回復が観察された。この H3 の GFP 蛍光が回復するといった現象は嫌気条件下での静置培養によって促進された。今後これらの核数異常を示す株の原因遺伝子を同定することで，核数制御と隔壁形成，細胞周期および細胞分化機構との関連性や相互作用機構について研究を進めていく。

Pyricularia oryzae, number of nuclei, cell cycle and cell differentiation

講演番号：1C5a14
講演日時：3 月 24 日 11:43～ 1 号館 C5 会場

A study on the enzymatic properties and physiological functions of mannan-degrading enzymes in *Neurospora crassa*

○Yunhan HSU[1], Minoru YOSHIDA[1,2,3], Manabu ARIOKA[1,2] ([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]RIKEN CSRS)

In nature, mannan is widely distributed as the third most abundant component of hemicellulose in the plant cell wall and contributes to the high structural complexity. Endo-1,4-β-mannanase (EC 3.2.1.78) is one of the major plant mannan-degrading enzymes and is capable of cleaving internal β-1,4-linkage of two mannose moieties. Another key group of enzymes in mannan hydrolysis is β-mannosidase (EC 3.2.1.25), an exo-acting enzyme that catalyzes the hydrolysis of β-1,4-linked mannosides, releasing mannose from the non-reducing end of mannans and manno-oligosaccharides produced by β-mannanase. The filamentous fungus *Neurospora crassa* is an ideal model for the elucidation of plant cell wall deconstruction mechanism due to its well-annotated genome sequence and robust growth on lignocellulose. In this study, five cDNA fragments encoding the putative mannan-degrading enzymes in *N. crassa*, including three GH2 β-mannosidases (gh2-1, gh2-4, and gh2-5), one GH5 β-mannanase (gh5-7), and one GH26 hemicellulase (gh26-1), were cloned, heterologously expressed, and characterized, and their physiological function(s) were analyzed. Among these, only the activities of gh5-7 and gh2-1 were confirmed, displaying endo-β-mannanase and exo-β-mannosidase activities, respectively. Subcellular localization analysis indicated that the β-mannosidase gh2-1 is an intracellular protein and localizes to the cytoplasm. This enzyme showed the catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) toward *p*-nitrophenyl-β-D-mannopyranoside (233.83 mM^{-1} s^{-1}) comparable to other fungal β-mannosidases. Compared with the wild type strain, the growth of Δ*gh5-7* and Δ*gh5-7*Δ*gh2-4* mutants was poor in the cultures containing galactomannan, β-mannan, or glucomannan as the sole carbon source, suggesting that β-mannanase gh5-7 plays a critical role in mannan degradation *in vivo*. On the other hand, Δ*gh2-1*, Δ*gh2-4,* and Δ*gh2-1*Δ*gh2-4* mutants grew normally when cultured in the media containing either galactomannan or glucomannan, while they showed significantly slow growth when grown in the medium containing β-mannan as the sole carbon source, indicating that these two enzymes may play a certain role in the degradation of unsubstituted β-mannan. We propose a following scheme of sequential actions by the enzymes involved in the mannan utilization in *N. crassa*: β-mannanase gh5-7 is the most powerful mannan degrader, releasing manno-oligosaccharides from the branched mannan. Subsequently, the short manno-oligosaccharides including mannobiose incorporated into the cells can be further converted to mannose by the intracellular β-mannosidase gh2-1. Our results would help reveal the novel insights into the mannan degradation in *N. crassa*.

Neurospora crassa, ß-mannanases, ß-mannosidases

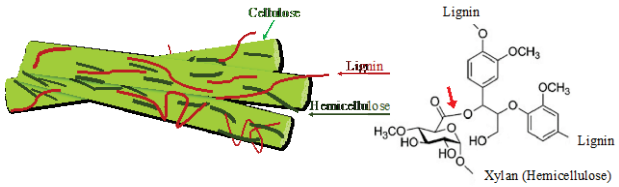
発表責任者：Manabu Arioka（arioka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：1C5a15
講演日時：3 月 24 日 11:54～ 1 号館 C5 会場

Analysis on the physiological function of glucuronoyl esterase (GE) in the model filamentous fungus *Neurospora crassa*

○Ruijie WANG[1], Hiep Hung HUYNH[1], Minoru YOSHIDA[1,2,3], Manabu ARIOKA[1,2] ([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]RIKEN CSRS)

Plant biomass is the most abundant renewable resource in the world, although its efficient conversion into fermentable sugars remains a significant challenge. A new type of carbohydrate esterase belonging to Carbohydrate Esterases family 15, glucuronoyl esterase (GE), is considered to play an important role in the degradation of biomass by disconnecting the linkage between hemicellulose and lignin through the hydrolysis of the ester bond between 4-*O*-methyl-D-glucuronic acid residues of glucuronoxylans and aromatic alcohols of lignin (arrow). However, studies of GEs primarily focus on their functions *in vitro*, limiting our understanding of their potential exploration.



Glucuronoyl esterases (GEs) target site is indicated by the red arrow.

The model filamentous fungus *Neurospora crassa* metabolizes plant biomass and upregulates expression of a variety of genes encoding enzymes involved in the degradation of lignocellulose. We have been studying the physiological functions of GE in *N. crassa*, NcGE, in the deconstruction of wood polymers *in vivo*. To achieve this goal, *N. crassa* wild-type, *NcGE*-knockout, *NcGE*-overexpression, and catalytically inactive-*NcGE*-overexpression strains were generated and used to evaluate the effects of NcGE in utilizing different kinds of wood-extract during growth. Additionally, the expression levels of major genes encoding cellulolytic/hemicellulolytic enzymes were quantified by qRT-PCR to investigate the overall function of NcGE in these strains.

First, *in vitro* experiments showed that recombinant NcGE produced in *Pichia pastoris* could facilitate the deconstruction of Lignin Rich Precipitate (LRP) by mixed cellulases, resulting in the release of larger amount of reducing sugars. Second, when the cells were grown in the synthetic medium containing different kinds of wood extract as the sole carbon source, the relative xylanase activity secreted into culture supernatant of *NcGE*-overexpression strain was significantly higher than those of other strains. Results of qRT-PCR further confirmed the higher expression of genes encoding hemicellulolytic enzymes in this strain. These data indicate that NcGE can boost not only the degradation of plant biomass *in vitro*, but also the expression of genes encoding hemicellulolytic enzymes *in vivo*, presumably by releasing more hypothetical inducer(s) from plant biomass.

glucuronoyl esterase, biomass degradation, *Neurospora crassa*

発表責任者：Manabu ARIOKA（arioka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：1C5p06
講演日時：3 月 24 日 14:55～ 1 号館 C5 会場

ポリヒドロキシアルカン酸生産菌で機能する転写制御スイッチの確立
Establishment of Transcriptional Switches for Polyhydroxyalkanoate-producing Microorganisms

○平山 歩夢[1]、折田 和泉[1]、中村 聡[1]、梅野 太輔[2]、福居 俊昭[1]([1]東京工業大学生命理工学院、[2]千葉大学工学部)
○ Ayumu HIRAYAMA[1], Izumi ORITA[1], Satoshi NAKAMURA[1], Daisuke UMENO[2], Toshiaki FUKUI[1] ([1]Sch. Life Sci. & Technol., Tokyo Tech., [2]Grad. Sch. Eng., Chiba Univ.)

【目的】

ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は様々な微生物が生合成するポリエステルであり、生分解性を示すことから環境調和型高分子材料として注目されている。PHA の生産性向上のためには PHA 生合成方向と細胞増殖方向の代謝フラックス制御が重要である。一方、近年の合成生物学研究では野生型 (WT) リプレッサーを用いて誘導剤添加により遺伝子発現を誘導する ON スイッチに加え、変異を導入した逆表現型 (RP) リプレッサーを用いて遺伝子発現を抑制する OFF スイッチが開発されている。この発現制御技術を応用した代謝フラックス制御による PHA 生産の高効率化が考えられるが、現在 PHA 生合成菌で使用できる転写制御スイッチは開発途上である。本研究では PHA を多量に蓄積する *Ralstonia eutropha*、メタノールから PHA を生合成する *Methylorubrum extorquens* で機能する転写制御スイッチの確立を目指した。

【方法および結果】

R. eutropha と *M. extorquens* のそれぞれにおける GFP 発現ベクターの *gfp* 上流にオペレーター配列を挿入し、リプレッサー遺伝子 (WT または RP) を導入した。リプレッサーは *E. coli* 由来のコリン誘導性 BetI とアンヒドロテトラサイクリン (aTc) 誘導性 TetR を使用し、Bet ON/Bet OFF スイッチおよび Tet ON/Tet OFF スイッチを構築した。作製ベクターを導入した形質転換体を誘導剤非添加条件と添加条件で培養し、GFP 蛍光を測定することでスイッチによる発現制御を評価した。

R. eutropha に Bet ON または Bet OFF スイッチベクターを導入した株では予想に反し、コリン添加の有無による GFP 蛍光強度の変化が見られなかった。この結果から *R. eutropha* は添加したコリンを細胞内に取り込めていない可能性が考えられた。そこで *E. coli* 由来のコリン特異的トランスポーターを Bet ON スイッチ導入株で異種発現させたところ、コリン添加による GFP の発現誘導が観察された。*M. extorquens* に Tet ON スイッチおよび Bet OFF スイッチを導入した株では誘導剤添加に伴う GFP の発現誘導と発現抑制がそれぞれ観察された。誘導剤濃度と GFP 蛍光強度に相関が見られたため、標的タンパク質の特性に合わせた発現制御が可能と期待される。

現在、より厳密かつ応答性の高い発現制御に向け、リプレッサーの発現量やオペレーター配列とその挿入位置の最適化を検討している。

genetic switch, Polyhydroxyalkanoate, *Methylorubrum extorquens*

発表責任者：福居俊昭（tfukui@bio.titech.ac.jp）

講演番号：1C5p07
講演日時：3 月 24 日 15:06～ 1 号館 C5 会場

Identification and characterization of b-glycosidase as a factor related to expression regulation of chitin-assimilation genes in Thermococcus kodakarensis

○YAMIN CHEN[1], Junqi YAN[1], Izumi ORITA[1], Tatsuya NIWA[2], Hideki TAGUCHI[2], Satoshi NAKAMURA[1], Tadayuki IMANAKA[3], Toshiaki FUKUI[1] ([1]Sch. Life Sci. & Technol., Tokyo Tech., [2]Inst. of Innov. Res., Tokyo Tech., [3]Coll. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

[Background]

The hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis* KOD1 possesses an ability to assimilate chitin, which is rarely seen in hyperthermophiles. The genes related to the chitin metabolism are clustered within a 13-kbp region including genes of proteins with unknown function, TK1762 (hypothetical protein) and TK1763 (PIN-domain protein), and the expression was induced by $GlcNAc_2$. We have pervious clarified that TK1762 and TK1763 have roles in expression regulation of the chitin-assimilation genes because transcription levels of the genes increased when *tk1762* and/or *tk1763* was deleted. Further investigations clarified that TK1762 had binding ability toward a specific promoter-containing region within the gene cluster whereas TK1763 did not. Interestingly, TK1762 and TK1763 interacted with each other, and the TK1762-TK1763 complex showed higher binding affinity to the DNA region than TK1762 alone. This study aimed to elucidate the expression regulation mediated by TK1762 and TK1763 in *T. kodakarensis*.

[Results and Discussion]

Immunoprecipitation with anti-TK1762 or anti-TK1763 antiserum and subsequent shotgun proteomic analysis using LC/MS identified Gly, which is β-glycosidase (Ezaki et al. JBB 1998) encoded by *tk1761* neighbor to *tk1762*, as an interacting partner for both TK1762 and TK1763. However, native PAGE analysis using recombinant proteins showed that Gly neither interacted with TK1762 nor TK1763 regardless of the presence or absence of the inducer $GlcNAc_2$, and did not affect formation of the TK1762-TK1763 complex. We then examined DNA binding ability of Gly by EMSA. The results demonstrated that Gly had a binding ability to the promoter-containing region in addition to the actual β-glycosidase activity. The DNA binding affinity of Gly was comparable with that of TK1762 alone. The competition of binding to the promoter region between Gly and TK1762 may relate to the expression regulation, or another factor may be required for interaction of Gly with TK1762/TK1763. Further investigation to elucidate the expression regulation in *T. kodakarensis* is now under progress.

hyperthermophile, *Thermococcus kodakarensis*, chitin

発表責任者：Toshiaki FUKUI（tfukui@bio.titech.ac.jp）

講演番号：1C5p08
講演日時：3 月 24 日 15:17～ 1 号館 C5 会場

７セグメントデコーダとして振る舞う単層遺伝子回路の進化デザイン

Directed evolution of single-layered genetic circuits that behave as 7-segment decoders

○山上 和馬、小林 一幾、湯本 達弥、佐伯 和哉、冨永 将大、河合 繁子、斎藤 恭一、梅野 太輔（千葉大院・工）
○ Kazuma YAMAGAMI, Ikki KOBAYASHI, Tatsuya YUMOTO, Kazuya SAEKI, Masahiro TOMINAGA, Shigeko KAWAI, Kyoichi SAITO, Daisuke UMENO (Chiba Univ. Grad. Sch. of Eng.)

【背景・目的】

人工的な転写制御ネットワークを構築するために，多入力型の転写制御回路のデザイン研究が盛んにおこなわれている。多数の転写因子どうしの相互制御カスケードデザインによって，複雑な遺伝子回路が制作できるようになりつつあるが，多層型（カスケード型）の遺伝子回路では，素過程ひとつひとつにおける細胞間分布が掛け合わされるために，ある程度以上の複雑度をもった集積回路設計は困難である。最近我々は，様々な演算様式をひとつの転写イベントの中に埋め込む，「単層型」集積方法を提案した。ここでは，T7RNA ポリメラーゼが有する“Protein displacement 活性”および”転写因子の結合競合”の進化デザインという建設方式をとる。この方式では，回路デザインから実装までの作業効率が飛躍的に高まるのみならず，リガンド応答速度の向上や，振る舞いの細胞間分布の抑制にも効果があると期待される。本報告では，上記の複雑な転写制御回路の「単層デザイン」の設計法と実装の具体的レシピについて報告する。

【方法・結果】

10 の独立した入力状態を化合物の有無（1/0）の組み合わせで作るためには，最低 4 つ（2^4＝16＞10）の誘導型転写因子の協働が必要となる。5 つの誘導剤（コリン，無水テトラサイクリン（aTc），isopropyl β-D-thiogalactopyranoside （IPTG） ， 2,4-diacetylphloroglucinol （DAPG） ，dequalinium） に応答する転写因子（BetI，TetR，LacI，PhlF，QacR）を発現するレギュレータプラスミドを導入した大腸菌に，P_{T7} の上流あるいは下流に 5 つの転写因子のオペレータを互いに部分重複させる形で配置し，その重複部分をランダム化した。こうして作製したオペレータ複合プロモータは，隣り合う転写因子同士で結合排斥する。この結合競合を利用することにより，一つの転写プロモータの活性を，上・下流から最大 5 つの転写因子が同時に作用できることを確認した。こうして制作した複合プロモータを複数タンデム連結すると，ポリメラーゼの Protein displacement 効果により，全体としてそれらの論理和を出力することがわかった。本報告では，その応用例として，10 つの入力状態に対してプログラム通りの振る舞いをする「7 セグメントデコーダ回路」の製作の試みを報告する。

protein displacement, binding competition, genetic circuits

講演番号：1C5p09
講演日時：3 月 24 日 15:28～ 1 号館 C5 会場

大腸菌のトキシンーアンチトキシン遺伝子による細胞休眠と遺伝子の水平伝播

Cell dormancy and horizontal gene transfer triggered by toxin-antitoxin genes in Eshcherihica coli

○中島 信孝[1]、秋山 健太郎[2] ([1]産総研生物プロセス、[2]東工大生命理工)
○ Nobutaka NAKASHIMA[1], Kentaro Akiyama[2] ([1]AIST, Bioproduction, [2]Tokyo Institute of Technology, School of Life Science)

トキシンーアンチトキシン（TA）遺伝子とは、細菌が天然にゲノム上に持つもので、ほとんどの場合で T 遺伝子と A 遺伝子が近接して存在している。T 遺伝子はその名の通り、細胞に毒性のあるタンパク質（以下、pT とする）をコードしている。一方、A 遺伝子は機能が多彩であるが、一例として pT を中和する抗毒素タンパク質（以下、pA とする）をコードしている。細菌が盛んに増殖している状況下では、pT は pA と複合体を形成しており、pT の毒性は発揮されない。しかし、細胞が抗生物質にさらされた場合や、アミノ酸飢餓に陥った場合など特定の状況下では、pA がプロテアーゼによる分解を受け、pT が毒性を発揮し、細胞は増殖を停止するか細胞死を起こす。

TA 遺伝子の存在は細胞にとって、ある種の「時限爆弾」を抱えているようにも見える。しかし驚くべきことに、大腸菌 K12 株はゲノム上に少なくとも 37 対もの TA 遺伝子を持つ。TA 遺伝子は、細胞が増殖に適さない状況にある時、pT を機能させて一時的に休眠状態にし、外部環境に耐えるバイオフィルムなどの細胞状態を作り出すために存在すると考えられる。あるいは、細胞群集の一部を死や溶菌に追いやり、群集全体の利益を確保しているとも考えられる。他にも TA 遺伝子の考えられる機能として、「利己的な遺伝子」「ゲノムの安定化機構」「ファージへの感染防御機構」などが挙げられている。

そこで我々は、より詳細に TA 遺伝子の機能を探るため、大腸菌において最も代表的なトキシン遺伝子である *mazF* を過剰発現し、その後の細胞内 mRNA の挙動を RNA-seq によって解析した。一般に MazF は、ACA 配列が RNA 中に存在するとそこで切断する RNA interferase 活性をもつことで、トキシンタンパク質として機能すると考えられて来た。しかし、我々の RNA-seq の結果では、*mazF* の過剰発現によって存在量が変化した mRNA 種（DER＝Differentially expressed mRNA）と、DER 中の ACA 配列の有無あるいは多寡とは全く関連性が見られなかった。一方で DER は、呼吸鎖関連遺伝子など、ある特定の細胞機能を持つものに偏って分類された。以上のことから、MazF は無差別に mRNA を切断するのみでなく、特定の mRNA 種の量を特異的に調節して休眠状態を作っていると考えられた。さらに、DER のうち upregulate されたものが、株特異的な染色体領域（＝進化上、ごく最近になって水平伝播で獲得したと思われる領域）にクラスターを成していた。よって、MazF が遺伝子の水平伝播に大きな影響を及ぼしていることが示唆された。

toxin-antitoxin, horizontal gene transfer, RNA-seq

発表責任者：中島信孝（n-nakashima@aist.go.jp）

講演番号：1C5p10
講演日時：3 月 24 日 15:39～ 1 号館 C5 会場

大腸菌における SulA 依存性溶菌経路の解明

Elucidation of SulA-dependent cell lysis pathway in Escherichia coli

○大田 菜都子[1]、大澤 歩[2]、高坂 智之[2]、山田 守[2] ([1]山口大農、[2]山口大学院・創成科学研究科)
○ Natsuko OTA[1], Ayumi OSAWA[2], Tomoyuki KOSAKA[2], Mamoru YAMADA[2] ([1]Yamaguchi University of Agriculture, [2]Graduate School of Sciences and Technology for Innovation, Yamaguchi University)

【目的】大腸菌の SOS 応答遺伝子の一つである *sulA* は、通常 LexA により転写が制御されているが、DNA が損傷を受け RecA が活性化されると LexA の自己分解が誘発され、それによって *sulA* が転写誘導される。発現した SulA は FtsZ の集合を阻害することで細胞分裂を阻害し、DNA 損傷の修復時間を確保していると考えられている。我々は、過去の研究においてこの SulA を高発現させると細胞が溶菌する現象(SulA 依存性溶菌)を見出したことから、DNA 損傷が修復できないほど強い場合、SulA が細胞を溶菌させる機構を担っているのではないかと推察している。しかし、SulA 発現から溶菌までの分子機構は明らかとなっていない。大腸菌では既にいくつかの細胞死経路が報告されていることから、本研究では SulA 依存性溶菌と既報の細胞死機構を比較するとともに、SulA 依存性溶菌に関わる遺伝子の特定による溶菌経路の推察を試みた。
【方法・結果】細胞溶菌は培養時に培地中に放出されるタンパク質を SDS-PAGE により検出することで観察した。まず SulA 依存性溶菌と、細胞死経路として報告されている ALD(apoptosis-like death)経路や MazEF 媒介細胞死経路との関連を明らかとするため、ALD 経路に関与するとされる遺伝子群に含まれ、かつ SigmaE 依存性細胞溶菌に関与する sRNA *rybB* の破壊株や *mazEF* 破壊株における SulA 発現時の溶菌を比較した。その結果、*rybB* および *mazEF* 破壊株において溶菌の抑制はほとんど観察されなかったことから、SulA 高発現時に起こる溶菌を誘導する経路がこれまでに報告されている細胞死経路とは異なることが示唆された。次に SulA 依存性溶菌の主要な経路を探索するため、SulA 過剰発現時に転写誘導が見られた *soxS* に着目した。SoxS は酸化ストレスに応答する SoxR によって活性化される転写制御因子であり、酸化ストレス応答遺伝子を含む多種の遺伝子を制御することが知られている。そこで *soxS* 破壊株における SulA 依存性溶菌を観察したところ、溶菌が明確に抑制されたことから、SoxS が SulA 依存性溶菌において重要な役割を担っていることが示唆された。さらに、SoxS の下流で SulA 依存性溶菌に関与する遺伝子の探索を試みたところ、SoxS regulon のうち必須遺伝子で LPS の合成に関与する *lpxC* を過剰発現させた株で顕著な溶菌が観察された。加えて、*sulA*, *soxS* および *lpxC* それぞれの過剰発現株において溶菌の程度が *SulA*, *SoxS*, *LpxC* の順で増加したことから、SulA 依存性溶菌の主要経路が SulA→SoxS→LpxC であると推察した。

SOS response gene, cell lysis, Escherichia coli

発表責任者：大田菜都子（v007ge@yamaguchi-u.ac.jp）

講演番号：1C5p11
講演日時：3 月 24 日 16:00～ 1 号館 C5 会場

出芽酵母における pre-tRNA capping の発見と機能解析
Discovery and functional analysis of pre-tRNA capping in budding yeast
○大平 高之、菊池 一徳、中塚 太一、鈴木 勉（東京大学）
○Takayuki OHIRA, Ittoku Kikuchi, Taichi Nakatsuka, Tsutomu Suzuki (Univ. of Tokyo)

出芽酵母において RNA ポリメラーゼ III によって転写された tRNA の一次転写産物は、核内で 5’リーダー配列および 3’トレーラー配列が除去され、3’末端に CCA 配列が付加された後に、細胞質へ輸送される。この過程で多種多様な転写後修飾が導入される。さらに、tRNA 前駆体中にイントロンがある場合は、ミトコンドリア外膜上に局在するスプライシング装置によってイントロンが切除され、そのまま細胞質で成熟が完了すると考えられてきた。しかし、我々はスプライシング後の tRNA 前駆体が核へと戻り、核内で修飾を受けて、再び細胞質へと輸送される機構を見出しており(Ohira and Suzuki, 2011)、tRNA の成熟化機構は従来の考えよりも複雑であることが明らかになってきた。

最近、成熟過程の様々な tRNA 前駆体を単離し、LC/MS 解析による構造解析を行ったところ、一部の 5’リーダー配列を持つ tRNA 前駆体の 5’末端にメチル化グアノシンキャップ構造が結合していることを発見した。この現象を pre-tRNA capping と命名した（Ohira and Suzuki, 2016）。一般に、RNA ポリメレースⅢの転写産物である tRNA は 5’ キャップ修飾されない、と信じられてきたことから、この発見は従来の概念を覆すものであった。キャップ化の割合は RNase P の活性を抑制し、成熟化を阻害すると増加した。また、キャップ付加酵素 Ceg1p の温度感受性株を非許容温度で培養すると tRNA 前駆体におけるキャップ形成の阻害と、この tRNA 前駆体の著しい減少を観測した。さらに、この tRNA 前駆体は *MET22* 遺伝子欠損株で蓄積したことから、5’エキソヌクレアーゼによって分解されていることが判明した。以上の結果から、tRNA 前駆体に見出されたキャップ構造は、tRNA 前駆体を 5’エキソヌクレアーゼによる分解から保護する役割があることが示唆された。さらに、5’ キャップ修飾を持つ pre-tRNA を網羅的に解析するために、RNase P の抑制により pre-tRNA を蓄積させた細胞株から、低分子 RNA 画分（70 ~ 180 nt）を調製し、抗メチル化グアノシンキャップ抗体を用いた免疫沈降を行い、得られた RNA を鋳型とした cDNA ライブラリを調製した。ハイスループットシークエンシング解析の結果、多くの pre-tRNA が 5’ キャップ修飾されていることが判明したが、その修飾率は tRNA 種や成熟度の違いによって偏りがあった。また、これらの pre-tRNA が細胞内においてキャップ結合タンパク質と相互作用するか、RNase P 抑制条件下の細胞を用い検証したところ、eIF-4E との結合が観察された。この結果は、pre-tRNA が細胞質において eIF-4E と結合し、mRNA の翻訳開始反応を抑制する役割を持つことを示唆している。今後は様々な生育環境における pre-tRNA capping の分布や変動を調べ、その生理学的意義に迫りたい。

tRNA, maturation, 5' cap

発表責任者：大平高之（ohira_t@chembio.t.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：1C5p12
講演日時：3 月 24 日 16:11～ 1 号館 C5 会場

麹菌の固体培養特異的発現を示す遺伝子の転写制御に関与する転写因子 FlbC の細胞内局在と翻訳後修飾

Subcellular localization and post-transcriptional modification of transcription factor FlbC involved in the transcriptional regulation of *Aspergillus oryzae* genes specifically expressed in solid-state culture

○荒井 啓[1]、田中 瑞己[2]、吉村 緑[1]、新谷 尚弘[1]、五味 勝也[1] ([1]東北大農、[2]静岡県大)
○ Hiraku Arai[1], Mizuki Tanaka[2], Midori Yoshimura[1], Takahiro Shintani[1], Katsuya Gomi[1] ([1]Tohoku Univ. of Agric, [2]Shizuoka Univ. of Food Nutr)

【背景と目的】

麹菌 *Aspergillus oryzae* は清酒・味噌・醤油など日本の伝統的な醸造産業に必須の微生物である。その特徴としてデンプン分解酵素をはじめとする様々な加水分解酵素を生産する。また、その酵素生産は液体培養に比べ米や小麦ふすまを基質とする固体培養において高いことが知られている。我々は *Aspergillus nidulans* において分生子形成因子として見出された転写因子 FlbC が, 麹菌において *glaB* や *pepA* をはじめとする多くの固体培養特異的に生産される酵素遺伝子の発現に関与することを明らかにしてきた。また GlaB の生産に浸透圧応答性 MAPK である MpkC が関与することも明らかにした。一方で FlbC 自身の機能解析は進められていない。そこで今回は、FlbC の細胞内局在や翻訳後修飾を解析することとした。

【方法】

寒天培地および小麦ふすま培地における分生子形成を観察した。また、マルトースの有無により発現の調節が可能な *malP* プロモーターを用いて GFP を融合した FlbC を発現させ蛍光顕微鏡による観察と、リン酸化について調べるためにアルカリホスファターゼ（AP）を用いて western blot および Phos-tag PAGE により FlbC のリン酸化レベルを解析した。

【結果】

寒天培地においては浸透圧ストレス・菌糸成長阻害ストレスを加えた場合でもΔ*flbC* 株では分生子形成に異常は観察されなかった。一方で固体培養においては野生株では 72 時間以降から分生子が形成し始めるのに対し、Δ*flbC* 株では分生子は形成されず菌糸が伸長し続けた。FlbC が固体培養特異的な酵素生産に関与することと合わせ、FlbC が固体培養におけるシグナル伝達に重要な因子であることが強く示唆された。次に細胞内局在を観察したところ FlbC は構成的に核に存在していた。また C 末端側に存在する 2 つの推定核移行シグナル(NLS)を欠損させると核移行が大幅に減少したことから、FlbC の核への局在に NLS が重要であることが示された。western blot 及び Phos-tag PAGE に供した結果、SDS-PAGE では FlbC-GFP は単一のバンドとして検出されたが、Phos-tag PAGE では複数のバンドに分離し、AP 処理区においてバンドが一本へと収束したことから FlbC はリン酸化されていることが示唆された。また、液体培養においては脱リン酸化された FlbC の量は少なく構成的にリン酸化されていることが示唆された。一方でΔ*flbC*Δ*mpkC* 株において発現させた FlbC-GFP は脱リン酸化された FlbC が認められた。次に FlbC-GFP を誘導したあとに NaCl による浸透圧ストレスを加えたところ、Δ*flbC* 株ではリン酸化された FlbC-GFP が分解され全体の FlbC-GFP 量が減少したのに対し、Δ*flbC*Δ*mpkC* 株では脱リン酸化された FlbC-GFP が安定して存在し続けた。この結果から FlbC のリン酸化に MpkC が関与していることが示唆された。次にリン酸化部位を推定するために N 末端側の 49・99・200・281 アミノ酸を欠損させた FlbC-GFP を発現させ western blot に供した結果 200 番目から 280 番目のアミノ酸領域において少なくとも 1 つのリン酸化部位を有することが示唆された。

Aspergillus oryzae, gene expression, solid-state culture

発表責任者：五味勝也（katsuya.gomi.a6@tohoku.ac.jp）

講演番号：1C5p13
講演日時：3 月 24 日 16:22～ 1 号館 C5 会場

麹菌 *Aspergillus oryzae* 新規制御因子 KpeR の機能領域の解析
Analysis of functional region of a novel regulatory protein, KpeR, in *Aspergillus oryzae*
○工藤 駿斗[1]、荒川 弦矢[1]、梁瀬 惇史[2]、進藤 斉[1]、穂坂 賢[1]、徳岡 昌文[1] ([1]東農大院農、[2]東農大応生)
○Hayato KUDO[1], Genya ARAKAWA[1], Atsushi YANASE[2], Hitoshi SHINDO[1], Masaru HOSAKA[1], Masafumi TOKUOKA[1] ([1]Grad. Sch. Agric., Tokyo Univ. of Agric., [2]Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. of Agric.)

【背景及び目的】
麹菌 *Aspergillus oryzae* は多数の二次代謝関連遺伝子を持つが、その機能や制御機構は不明な点が多く、醸造食品の安全性や品質の観点から、その解明が強く望まれている。我々は *A. oryzae* の転写制御因子遺伝子破壊株ライブラリーに対するスクリーニング実験から、二次代謝産物生産と形態形成に関与する新規遺伝子を見出した。遺伝子破壊によりコウジ酸生産量が増加したことから、本遺伝子を *kpeR*(kojic acid production enhancement Regulater)と命名した。KpeR は $Zn(II)_2$-Cys_6 型転写因子と予想されたが、典型的な同タイプの転写因子では $Zn(II)_2$-Cys_6 モチーフが N 末端領域に存在するのに対して、KpeR では配列中央にモチーフが存在する点でユニークな構造のタンパク質と予想された。そこで、本研究では、KpeR の $Zn(II)_2$-Cys_6 モチーフの機能及びアミノ酸配列中の機能領域の推定に取り組んだ。
【方法及び結果】
$Zn(II)_2$-Cys_6 モチーフ内の 6 つの Cys 残基すべてを Ala 残基に置換した変異株を作製したところ、Ala 置換株は *kpeR* 破壊株と同様の表現型を示したことから、$Zn(II)_2$-Cys_6 モチーフは KpeR の機能に必須であり、KpeR は DNA 結合性のタンパク質であると予想された。また転写開始点を調べたところ、$Zn(II)_2$-Cys_6 モチーフの N 末端側は 364 アミノ酸残基と推定されたが、配列相同性解析からは、この領域に既知の機能性ドメインは予想されなかった。そこで、KpeR の機能領域を調べるため、アミノ酸欠失解析を行ったところ、KpeR の N 末端側は末端の 177 アミノ酸を欠失しても機能したのに対し、C 末端側は 55 アミノ酸を欠失すると機能が失われた。続けて N 末端側に対し機能領域を絞り込んだところ、アミノ酸残基 173~191 番目の領域が KpeR の機能に必須であることが分かった。この領域には、タンパク質のグリコシル化及びリン酸化に関与することが知られている Ser/Thr リッチな配列が複数存在することから、KpeR の制御に関わる領域であることが予想された。現在、KpeR の活性制御に関わるアミノ酸残基の特定を進めている。

Aspergillus oryzae, secondary metabolism regulation, transcription factor

発表責任者：徳岡昌文（m3tokuok@nodai.ac.jp）

講演番号：1C5p14
講演日時：3 月 24 日 16:33～ 1 号館 C5 会場

糸状菌 *Aspergillus nidulans* におけるマンナナーゼ遺伝子の発現制御機構
The transcription regulatory mechanism of mannanase genes in *Aspergillus nidulans*
○玉城 彰悟[1]、李 諾[1]、國武 絵美[2]、金丸 京子[1]、木村 真[1]、小林 哲夫[1]（[1]名大院生命農学、[2]三重大院生物資源）
○Shogo TAMAKI[1], Nuo LI[1], Emi KUNITAKE[2], Kyoko KANAMARU[1], Makoto KIMURA[1], Tetsuo KOBAYASHI[1] ([1]Grad. sch. Applied Biosciences. Nagoya Univ., [2]Grad. sch. Bioresources. Mie Univ.)

【目的】
我々は、*Aspergillus nidulans* においてマンナナーゼ遺伝子発現には 2 つの類似転写因子 ClrB と ManS が関与すること、特に ManS が主要な役割を持つが、遺伝子によって ClrB が協調的あるいは競合的に相互作用すること、ManS と ClrB はともに *manE*、*manF* プロモーター中に存在する $CGGN_9CCG$（以下 N9 と記載する）に結合することなどを報告してきた。しかし、N9 は ManS の制御下の *manB*、*manC*、*man134A* のプロモーターに存在しないし、*in vivo* で機能するという確証も得られていない。そこで、本研究では ManS の新規 DNA 結合配列を見出すとともに、既に報告した結合配列もあわせて活性評価を行い、真に生体内で機能する結合配列を同定することを目的とした。
【方法と結果】
manE 遺伝子プロモーター上の ManS 結合配列を EMSA（electrophoretic mobility shift assay)により再検証し、新たな結合配列として $CGGN_{16}CCG$（以下 N16 と記載）が見出された。そこで、N16 と N9 の活性をタカアミラーゼ遺伝子（*taaG2*）をレポーターとして評価した。ClrB が干渉する可能性があったため、このレポーターアッセイは *clrB* 破壊株で行った。その結果、N16 が ManS 依存的遺伝子発現を担う結合配列であり、N9 は機能しないことが明らかとなった。N16 は *manB*、*manF* プロモーターも有しており、また、*man134A* にはスペースが 1 塩基短い $CGGN_{15}CCG$（N15）が存在していた。これら配列について上記と同様に EMSA ならびにレポーターアッセイを行ったところ、全てに ManS が結合し、かつ *in vivo* で機能することが示された。以上から ManS 単独による転写制御に関わる配列は $CGGN_{15/16}CCG$（N15/16）であると考えられる。
A. nidulans マンナナーゼ遺伝子の発現誘導についてはまだ未解明の点が残されている。例えば、転写解析では *man134A* と *manC* は *manE* や *manF* よりはるかに高い発現量を示すが、*man134A* の N15 では *manE*、*manF* の N16 と同等以下の活性しか認められないし、*manC* のプロモーターには N15/16 がそもそも存在しない。さらに、*manB* は ManS と ClrB により協調的に制御されており、本遺伝子プロモーターの $CGGN_9CGGN_6CGG$ への ManS/ClrB ヘテロダイマーの結合が観察されている。これらの未解明の点について EMSA とレポーターアッセイのアプローチで現在解析を進めており、その結果についても発表を行う予定である。

Aspergillus nidulans, mannanase genes, ManS

発表責任者：玉城彰悟（tamaki.shougo@b.mbox.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：1C5p15
講演日時：3 月 24 日 16:44～ 1 号館 C5 会場

AreA 転写因子と pH が *Fusarium graminearum* のトリコテセン生合成に及ぼす影響の詳細な解析

Detail functional analysis of AreA transcription factor and pH in regulation of trichothecene biosynthesis by *Fusarium graminearum*

○塩原 拓也[1]、中嶋 佑一[1]、赤坂 まな美[1]、前田 一行[2]、鬼頭 良幸[1]、金丸 京子[1]、小林 哲夫[1]、木村 真[1] ([1]名大院生命農、[2]明大院農)

○ Takuya SHIOBARA[1], Yuichi NAKAJIMA[1], Manami AKASAKA[1], Kazuyuki MAEDA[2], Yoshiyuki Kitou[1], Kyoko KANAMARU[1], Tetsuo KOBAYASHI[1], Makoto KIMURA[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Meiji Univ.)

【背景と目的】

AreA は窒素代謝に必要な遺伝子群の転写を制御しており、フェニルアラニン等の窒素源を代謝する際やグルタミン等の窒素源が枯渇した際に転写因子として機能化する。*Fusarium graminearum* のトリコテセン生合成遺伝子（*Tri* 遺伝子）のプロモーターには AreA のコンセンサス結合配列 HGATAR が豊富に存在するため、機能化した AreA は *Tri* 遺伝子の転写活性化に関与していると予想される。そこで本研究では、*Tri6* 遺伝子プロモーター内の AreA 結合配列を全て変異させた株（Absm 株）を用い、培地窒素源がトリコテセン生合成に与える影響の解明を目的とした。

【方法】

F. graminearum JCM9873（15-ADON 型）野生型（WT 株）と本菌株から作成した Absm 株と AreA 遺伝子を破壊したΔAreA 株を使用した。これらの株を Garidiner ら(*Fungal Genet Biol* 46: 604-613, 2009)の最小培地に準じスクロースを炭素源、グルタミンもしくはフェニルアラニンを唯一窒素源とした培地に植菌した。グルタミン培地でこれらの株を経時的に pH をモニタリングしながら 6 日間培養した。また、グルタミン培地およびフェニルアラニン培地で WT 株と Absm 株を pH2.5、pH3、pH4 一定条件下で培養した。一定期間培養後、その毒素産生量を HPLC で定量した。

【結果および考察】

グルタミン培地で WT 株、Absm 株およびΔAreA 株を培養したところ、WT 株と Absm 株の pH 経時変化は一致したが、ΔAreA 株は WT 株と比較して pH の低下が遅く、最終 pH も高かった。またΔAreA 株では毒素産生をしなかった。その原因は AreA 欠損のためであるか、pH の不十分な低下によるものであると考えられる。WT 株と同様の pH 経時変化を示した Absm 株の毒素産生量は WT 株と比較して有意に減少した。このことから AreA が *Tri6* プロモーター内の AreA 結合配列に結合することがトリコテセン産生誘導に必要であると示唆される。pH3、pH4 一定条件で AreA が機能化するフェニルアラニンを代謝したところ、WT 株と比較して Absm 株で毒素産生量が有意に減少したが、pH2.5 一定条件では有意差はなかった。このことから、pH2.5 という低 pH 条件では AreA は毒素産生に必須でないと考えられる。

Fusarium graminearum, trichothecene mycotoxin, nitrogen regulatory AreA

講演番号：1C7a01
講演日時：3 月 24 日 09:00～ 1 号館 C7 会場

アミノ酸機能工学を活用した大腸菌へのロバスト性の付与

Improvement in robustness of *Escherichia coli* by "functional amino acid engineering"

○磯貝 章太、高木 博史（奈良先端大）
○SHOTA ISOGAI, HIROSHI TAKAGI (NAIST)

【背景・目的】

大腸菌は最も研究が進んでいるモデル生物であり、高温や酸をはじめ種々のストレスに対する応答・適応・耐性機構が研究されている。しかしながら、実際に有用物質を高生産する菌株について、ストレス耐性を強化することで生産性の向上に結びついた成果は、ほとんど発表されていない。酵母を用いた研究において、発酵生産環境は細胞内の活性酸素種（ROS）レベルが上昇する「酸化ストレス状態」であることが示されており、プロリンや荷電アミノ酸（アルギニン、リジン、グルタミン酸）が酵母の冷凍ストレス耐性に寄与すること､特にプロリンについてはストレスで上昇する細胞内 ROS レベルを低下させることが報告されている。これらのアミノ酸のうち、プロリン、アルギニンにはタンパク質のフォールディング促進効果、凝集抑制効果が知られている。また、リジンやグルタミン酸もタンパク質表面の荷電アミノ酸との相互作用によりタンパク質の変性を防ぐ効果が期待できる。従って、これらのアミノ酸は大腸菌においても同様の機能を発揮し、細胞のストレス耐性向上に寄与すると考えられる。我々は細胞にストレス耐性（ロバスト性）を付与する機能性アミノ酸（プロリン、アルギニン、リジン、グルタミン酸）を高生産させることで、有用物質の生産性向上を図る育種手法を「アミノ酸機能工学」と命名した。本研究では､「アミノ酸機能工学」を大腸菌に適用し、優れたロバスト性を備えた菌株を育種することを目的とした。

【方法・結果】

まず、大腸菌のモデル株を生育が抑制されるような高温条件下で液体培養を行ったところ、プロリン、アルギニン、リジン、グルタミン酸を添加することで細胞の生育が改善されることを見出した。この結果から、これらの機能性アミノ酸が大腸菌に高温ストレス耐性を付与する可能性が示された。そこで、細胞の生育阻害を引き起こすアミノ酸アナログに対して耐性を示す変異株の中から、対応するアミノ酸の生産量が顕著に増加した株が取得できることを利用して、機能性アミノ酸の高生産株の取得を試みた。常法に従いエチルメタンスルホン酸を用いて細胞に突然変異を導入した後、各機能性アミノ酸に対応するアナログを含有する最少培地でスクリーニングを行い、多数のアナログ耐性株を取得した。本発表では、これらのアナログ耐性株について、アミノ酸の生産量および高温などのストレスに対する表現型を解析した結果を発表する予定である（本研究は、国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（ＮＥＤＯ）の委託業務で行われた)。

Stress tolerance, Amino acid, *Escherichia coli*

講演番号：1C7a02
講演日時：3 月 24 日 09:11～ 1 号館 C7 会場

メタボロミクス技術を応用した培地の評価と培養予測
Evaluating culture media for microorganisms and estimating the growth of *Escherichia coli* using metabolomics techniques
○小西 正朗、立花 成我、渡辺 一樹（北見工大工）
○Masaaki KONISHI, Seiga TACHIBANA, Kazuki WATANABE (Kitami Inst. Tech.)

微生物培養において，肉エキス，酵母エキス，麦芽エキスなど植物や動物の抽出物などの天然成分が多用される。特に工業用の天然基材は，ブランド間やロット間で成分のばらつきが大きく，実用プロセスにおいては，ブランドの選定やロットチェックのための培養法による試行錯誤が恒常的に行われている。また，実験室で多用される高品質な酵母エキスとの成分差やスケール問題により，生産性を最大化することが困難である。我々は，天然基材のブランド間，ロット間の培養に対する影響をあらかじめデータベース化し，統計モデルを構築することで，培養法による試行錯誤に頼らない，培養管理システムについて，検討している。メタボロミクス技術で多用されるノンターゲッティング分析を利用し，網羅的な成分組成データを取得し，組成と培養結果の相関を主成分分析は機械学習など知識工学的手法により，相関付ける技術を検討している。本発表では，酵母エキスのブランド・ロット間の組成差が大腸菌の増殖に与える影響について，モデル化した例について紹介する。

5 社の異なるブランドの酵母エキス 6 種類（YE-a～YE-f）（0.1～0.5 g/L）を M9 最少培地に添加した培地を作成した。*Escherichia coli* K12 を指標菌として用いた。培養は 200 ml バッフル付フラスコに 20ml の培地スケールで振とう培養した（30°C，200 rpm）。酵母エキスの組成は添加した濃度のサンプルを別途用意し，オートクレーブ後に，トリメチルシリル化処理をした後，GC-MS により分析した。内部標準として 0.06 g/L のリビトールを用い，得られたピークの標準化に用いた。ピークエリアを標準化した後，統計ソフトウエア R を用いて，主成分分析（PCA）ならびに部分最小二乗法（PLS-R）解析をした。

培養試験の結果, いずれの酵母エキスでも添加量の増加に伴い, 増殖速度や濁度上昇が認められた。YE-a, YE-b, YE-c は 18 時間後の濁度が $OD_{600}=10$ に達したが，YE-d は 6.5，YE-e，YE-f は 9.5 程度であった。酵母エキスの種類によって，大腸菌増殖への影響が異なることが確認された。PCA 解析の結果，酵母エキスの組成から 3 つのクラスターに分類できることが示唆された。酵母エキスの組成と増殖の相関関係を解析するため, PLS-R によるクロスバリデーション解析をしたところ, いずれのパターンにおいてもモデルの精度を表す R^2 が 0.95 以上を示し，酵母エキス組成が増殖と高い相関があることが示された。バリデーションの精度を示す Q^2 は YE-d をテストデータにした場合，低い値を示したものの，その他のパターンでは 0.85 以上を示し，高い精度で予測できた。因子解析により，アミノ酸の多くが増殖促進効果を示したが，L-Met は阻害効果を示すことがわかった。

metabolomics, yeast extract, *Escherichia coli*

発表責任者：小西　正朗（konishim@mail.kitami-it.ac.jp）

講演番号：1C7a03
講演日時：3 月 24 日 09:22～ 1 号館 C7 会場

4-アミノフェニルアラニン発酵における組換え大腸菌の代謝改変

Metabolic engineering of *Escherichia coli* for improved 4-aminophenylalanine production

○川口 秀夫[1]、若井 桂子[1]、蓮沼 誠久[1]、桝尾 俊介[2]、高谷 直樹[2]、近藤 昭彦[1]([1]神戸大院科技イノベ、[2]筑波大生命環境科)
○Hideo KAWAGUCHI[1], Keiko WAKAI[1], Tomohisa HASUNUMA[1], Shunsuke MASUO[2], Naoki TAKAYA[2], Akihiko KONDO[1] ([1]Kobe Univ., Sci. Tech. Innov., [2]Univ. Tsukuba, Life Environ. Sci.)

【背景と目的】芳香族ポリアミド（アラミド）は非常に優れた耐熱性と機械的強度を持つスーパーエンジニアリングプラスチックのひとつであり、ガラス代替を含めた多様な用途展開が期待されている。これまでに我々は、4-アミノ桂皮（4ACA）を単一前駆体とするとするバイオ芳香族ポリアミドを開発し、その優れた物理化学的特性、すなわち高い力学強度（>400 MPa；ポリカーボネートの 6 倍に相当）と高い透明性を確認している[(1)]。このバイオ 4ACA はグルコースからの 4 アミノフェニルアラニン（4APhe）発酵と、4APhe のバイオコンバージョン（脱アミノ化）で構成する、組換え大腸菌を用いた２段階反応により生産される[(1)]。本研究では 4APhe 発酵の効率化に必要な基礎的知見を得るために、組換え 4APhe 生産大腸菌の代謝改変を行なった。

【結果と考察】4APhe 発酵への影響を評価するため、フェニルアラニン高生産大腸菌 NST37 の副生物生合成経路を破壊し、各種破壊株を宿主に *Pseudomonas fluorescens* 由来 4-amino-4-deoxychorismate synthase（*papABC*）を高発現させた 4APhe 生産代謝改変株を作製した。作製した組換え菌を用いてグルコースを単一炭素源とする 4APhe 発酵を Jar で行なった結果、副産物として有機酸（酢酸と乳酸）、フェニルアラニン(Phe)、*p*-アミノ安息香酸（PABA）が蓄積していた。*ldh* の破壊により乳酸の生合成が完全に抑えられたが、4APhe の増加は 6%だった（4.1 g/L)。酢酸の生合成破壊（Δ*ackA*Δ*poxB*）は酢酸生成を 80%低下させたが、4APhe 生産は 13%減少して Phe は 45%増加した（1.3 g/L)。シキミ酸経路への前駆体供給促進を目的とする *ppsA*（phosphoenolpyruvate synthase をコード）の共発現は、親株の 4APhe 生産を 6%増加させたが、破壊株の生産を顕著に低下させた。これらの発酵におけるメタボローム解析の結果についても、併せて報告を予定している。

【謝辞】本研究は科学技術振興機構(JST)による先端的低炭素化技術開発(ALCA)の助成を受けて実施した。

【参考文献】
(1) Tateyama, et al. (2016) Ultrastrong, transparent polytruxillamides derived from microbial photodimers. *Macromolecules*, 49(9):3336-3342.

Metabolic engineering, *Escherichia coli*, metabolome analysis

発表責任者：川口　秀夫（kawaguchi_h@port.kobe-u.ac.jp）

講演番号：1C7a04
講演日時：3 月 24 日 09:33～ 1 号館 C7 会場

乳酸菌 *Enterococcus faecalis* の好気性乳酸発酵を利用したグリセロールからの D-乳酸生産

D-Lactate production from glycerol by aerobic lactic acid fermentation found in *Enterococcus faecalis*

○土肥 裕希（岡山理大）
○Yuki Doi (Okayama University of Science)

Enterococcus faecalis はグリセロール資化性に優れた乳酸菌である。その主要な代謝経路は 1 分子のピルビン酸の生成に対して 2 分子の NADH の発生を伴い、それはグルコース代謝の 2 倍である。それゆえ、多量のグリセロールを代謝している *E. faecalis* では細胞内 NADH/NAD^+比が極めて高いレベルに達し、結果としてそのピルビン酸の好気代謝経路は発酵性の L-乳酸脱水素酵素（LdhL1）による乳酸発酵に限定される。この *E. faecalis* の好気性乳酸発酵を利用することで、回分培養系においてグリセロールから最大で約 1.5 M（135 g/L）の L-乳酸の生産に成功した。そこで本課題では、同様の系を用いてグリセロールからより高価な D-乳酸を生産させ、その生産キャパシティを評価した。

E. faecalis は、そのゲノム DNA に D-乳酸生産性の乳酸脱水素酵素（LdhD）をコードする遺伝子を有していない。そこで、*E. faecalis* の *ldhL1* 遺伝子を破壊して L-乳酸生産能を失わせたΔ*ldhL1* 株にプラスミドを用いて *ldhD* 遺伝子を導入した。この *ldhD* 遺伝子発現プラスミドは、プロモーターとして *E. faecalis* の *ldhL1* 遺伝子のそれを有し、その下流に *Escherichia coli*、*Lactobacillus pentosus*、*Lactobacillus delbrueckii* のいずれかの *ldhD* 遺伝子が挿入されている。その結果、用いた *ldhD* 遺伝子の種類にかかわらず、これらのプラスミドが導入されたΔ*ldhL1* 株は総じて好気性乳酸発酵によって D-乳酸を活発に生産し、72 時間で 1.0 M（92 g/L）のグリセロールから約 0.95 M（86 g/L）の D-乳酸を生産した。それと同時に生産された L-乳酸は 10 mM 以下であったことから、本菌株は 98%以上の光学純度で D-乳酸を生産することが示された。

続いて、使用する培地の組成を検討した結果、多様な成分を含む M-MRS 培地に代わって、LB 培地に準じた YPN 培地においてほぼ同等の生産量と生産効率を得られることを見出した。YPN 培地では、*ldhD* 遺伝子発現プラスミドを有するΔ*ldhL1* 株は 120 時間以内に 1.5 M（138 g/L）のグリセロールから 1.35 M（122 g/ L）の D-乳酸を生産し、それはグリセロール添加量と培養時間をさらに増加することで 1.5 M（135 g/L）を超えるに至った。興味深いことに、1.5 M を超える L-乳酸の存在は *E. faecalis* のグリセロール代謝を完全に阻害したが、D-乳酸はそれを阻害せず、このことが回分培養系で 1.5 M 以上の D-乳酸の生産を可能にしていた。このように、本研究の成果は、グリセロールを基質とした D-乳酸の生物生産において、乳酸菌 *E. faecalis* が極めて高いキャパシティを有していることを示した。

lactic acid fermentation, Enterococcus, glycerol metabolism

講演番号：1C7a05
講演日時：3 月 24 日 09:44～ 1 号館 C7 会場

Lipid production of cold-adapted oleaginous yeast *Metschnikowia* sp. NBRC 111458 from Mongolia

○Dolgormaa BATAA[1], Takao OHASHI[1], Ryo MISAKI[1], Enkh-Amgalan JIGJIDDORJ[2], Kazuhito FUJIYAMA[1] ([1]Osaka Univ., [2]Mongolian Academy of Science)

In biofuel production, monounsaturated fatty acids are more preferable according to their better flow property. Therefore, cold adapted microorganisms in which unsaturated fatty acid content is comparatively high can satisfy that property. Mongolia is one of the habitats of psychrophilic microorganisms because of its cold climate. Ascomycetous yeast, *Metschnikowia* sp. NBRC 111458 was isolated from flowers of the plant*, Dracocephalum foetidum* in Mongolia. In our preliminary study, lipid droplets were observed in *Metschnikowia* sp. NBRC 111458 by Sudan IV staining. Furthermore, culture conditions, including a carbon and nitrogen ratio (C/N), a temperature, a carbon source, a nitrogen source, pH and shaking speed, were optimized to improve the lipid production. In order to evaluate the growth and lipid production, specific growth rate and lipid content were examined. In nitrogen limited medium, one of the important factors is the carbon and nitrogen ratio. Different carbon and nitrogen ratios which varied between C/N (10:1) to C/N (160:1) have been tested. C/N (100:1) that showed the highest lipid content in dry cell weight (DCW) was used for further experiments. Among 5 different temperatures varied between 10°C to 30°C, *Metschnikowia* sp. NBRC 111458 cultured at 10°C showed the highest lipid production. This result indicates that *Metschnikowia* sp. NBRC 111458 is cold-adapted yeast. Low temperature cultivation affects not only lipid production but also a fatty acid composition. While, in lower temperature cultivations, oleic acid (C18:1) amount increased, stearic acid (C18:0) amount decreased. These results suggest that oleic acid is needed to maintain membrane fluidity at lower temperatures. However, increment of other unsaturated fatty acids was not observed. Overall lipid productivity (g/L) of *Metschnikowia* sp. NBRC 111458 was increased due to high growth rate when the carbon source is fructose and the nitrogen source is monosodium glutamate. After all improvements of culture conditions, lipid production has been increased by 3 fold. In conclusion, *Metschnikowia* sp. NBRC 111458 can be a potential model to study a biofuel production at low temperature.

oleaginous yeast, *Metschnikowia* sp., psychrophilic

発表責任者：Kazuhito Fujiyama（fujiyama@icb.osaka-u.ac.jp）

講演番号：1C7a06
講演日時：3 月 24 日 10:05～ 1 号館 C7 会場

油糧糸状菌 *Mortierella alpina* の漏出脂質プロテオーム解析と漏出株の創製
Molecular breeding of *Mortierella alpina* leaky strains with proteome analysis of lipid fractions from the culture broth

○島田 良美[1]、岸野 重信[1]、油屋 駿介[1]、青木 航[1]、植田 充美[1]、安藤 晃規[1,2]、馬場 健史[3]、小川 順[1,2]、櫻谷 英治[4]([1]京大院・農・応用生命、[2]京大・生理化学研究ユニット、[3]九州大学・生体防御医学研究所、[4]徳島大・生物資源)
○Yoshimi Shimada[1], Shigenobu Kishino[1], Shunsuke Aburaya[1], Wataru Aoki[1], Mitsuyoshi Ueda[1], Akinori Ando[1,2], Takeshi Bamba[3], Jun Ogawa[1,2], Eiji Sakuradani[4] ([1]Appl. Life Sci., Kyoto Univ., [2]Res. Unit for Physiol. Chem., Kyoto Univ., [3]Med. Inst. Bioreg., Kyushu Univ., [4]Biosci. Bioindust., Tokushima Univ.)

【緒言】

油糧糸状菌である *Mortierella alpina* 1S-4 株はアラキドン酸の工業生産株であり、菌体内脂質の貯蔵形態は主にトリグリセリド（TAG）である。菌体内脂質は最大で乾燥菌体重量の 60%に及ぶが、脂質を菌体外生産することにより、さらなる脂質生産性の向上が可能であると考えられる。そこで、当研究室でこれまでに取得した脂質漏出性株について、これらの漏出脂質に共存するタンパク質のプロテオーム解析を行うことで漏出性に関わるタンパク質を特定し、さらなる脂質生産性の向上につなげることを目的として、以下の研究を行った。

【方法および結果】

M. alpina 脂質漏出性株として化学変異操作により得られた V6 株とΔ5 desaturase 遺伝子過剰発現株であるΔ5DS-11 株を選択した。大豆粉培地にて 28℃、8 日間振盪培養を行った後、培養液から超遠心分離により脂質画分を回収した。得られた脂質画分から Bligh & Dyer 法およびヘキサン抽出により脂質を除き、得られたタンパク質画分についてプロテオーム解析を行った。その結果、V6 株では 57 個、Δ5DS-11 株では 14 個の候補タンパク質が検出された。

このうち両者に共通する 6 個の候補タンパク質を選抜し、それぞれの遺伝子を、本菌株由来の強力なプロモータ PP3p の下流に挿入した過剰発現用プラスミドを構築した。アグロバクテリウム法によりウラシル要求性宿主株に導入し、それぞれ 30～70 株程度の形質転換株を得た。漏出性を評価するために、GY 培地にて 28℃、120 rpm にて 7 日間振盪培養した後、培養液上清から Bligh & Dyer 法により脂質を抽出し、GLC にて脂肪酸を定量した。その結果、宿主株では上清中に脂肪酸を検出できなかったが、形質転換株では 0.17 mg/ml 程度の脂肪酸が検出され、新たな漏出性株の創製に成功した。

Mortierella alpina, proteome analysis, extracellular lipid production

発表責任者：小川順（ogawa@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：1C7a07
講演日時：3 月 24 日 10:16～ 1 号館 C7 会場

ピルビン酸代謝フロー改変を用いた 2,3-ブタンジオール高生産麹菌の構築
Development of 2,3-butanediol-high producing *Aspergillus oryzae* by pyruvate metabolism engineering
○張 斯来[1]、若井 暁[1]、荻野 千秋[2]、堤 浩子[3]、秦 洋二[3]、近藤 昭彦[1]([1]神戸大院・イノベ、[2]神戸大院・工、[3]月桂冠・総研)
○Silai ZHANG[1], Satosi WAKAI[1], Chiaki OGINO[2], Hiroko TSUTSUMI[3], Yoji HATA[3], Akihiko KONDO[1] ([1]Grad. Sch. Sci. Tech. Innov., Kobe Univ, [2]Grad. Sch. Eng., Kobe Univ, [3]Res. Inst., Gekkeikan)

環境や化石資源の枯渇問題で植物資源などの再生可能資源から作られるバイオリファイナリーが注目されている。麹菌（*Aspergillus oryzae*）は細胞外に様々な糖化酵素を大量に分泌することが可能であり、植物バイオマスから有用物質を直接生産する宿主微生物として期待されている。本研究では、植物バイオマスであるデンプンやセルロースからの 2,3-ブタンジオール (2,3-BDO) 高生産に着目した。2,3-BDO は合成ゴムや溶剤、医薬品原料となる C4 アルコールであり、麹菌には、2,3-BDO 生合成に必要な一部の遺伝子しか持っていない。そのため、麹菌に 2,3-BDO の生合成遺伝子である *Lactobacillus pantarun* 由来のアセト乳酸シンターゼ (ALS)、アセト乳酸デカルボキシラーゼ (ALDC) と *Saccharomyces cerevisiae* 由来のブタンジオールデヒドロゲナーゼ (BDH) をコードする遺伝子を導入したところ (WT-BDO)、100 g/L グルコースから 1 g/L 2,3-BDO の生産が確認された。その際、リンゴ酸、コハク酸などの有機酸とエタノールを大量に生産していることも確認された。2,3-BDO は、ピルビン酸から 3 ステップの合成反応で生合されるので、ピルビン酸からの変換効率を向上させることが高生産に必要と考えられた。我々の先行研究で、ピルビン酸代謝を改変することによって、乳酸生産を理論収率の約 90% まで向上させることに成功しており(1)、本戦略を 2,3-BDO 生産に転換することで生産量の向上を目指した。

本研究では、先行研究で構築した細胞質内でのピルビン酸代謝が再方向付けされた ΔPDCΔMPC 株に *Lpals*、*Lpaldc* と *Scbdh* を導入した。その結果、ΔPDCΔMPC-BDO 株では 35 g/L の生産に成功し、WT-BDO 株と比べると約 30 倍以上生産した。これは理論収率の約 70% に達していた。本研究結果からも、ピルビン酸代謝フラックス改変はピルビン酸を出発する化合物の生産効率の向上に対して非常に強力な戦略であることが示された。また、この株では副産物であるエタノールや有機酸の生産が大幅に抑制された一方で、大量のピルビン酸が培地中に分泌されていた。このことから、ピルビン酸からの 2,3-BDO 生合成経路をさらに強化する必要があると考えている。我々はこれまでに麹菌のセルラーゼ高発現株の構築やマルチコピー遺伝子導入法の開発を進めており(2)、現在、セルラーゼ高発現、ピルビン酸代謝フラック改変、2,3-BDO 生合成経路を強化するための 2,3-BDO 生合成遺伝子のマルチコピー導入により、セルロースからの高効率 2,3-BDO 生産株の構築を試みている。

(1) 張ら、第 70 回日本生物工学会大会要旨集 1Kp10
(2) 若井ら、日本農芸化学会 2014 年大会要旨集 3A10a03

Aspergillus oryzae, pyruvate metabolism, 2,3-butanediol

発表責任者：張 斯来（zhangsilai@people.kobe-u.ac.jp）

講演番号：1C7a08
講演日時：3 月 24 日 10:27～ 1 号館 C7 会場

コリネ型細菌内での枯草菌 BioI 酵素の基質解析
Substrate analysis of *Bacillus subtilis* BioI in *Corynebacterium glutamicum*
○竹野 誠記[1]、中村 絵梨[1]、大竹 辰徳[1]、梅澤 公二[1]、林 幹朗[2]、池田 正人[1]（[1]信州大農、[2]協和発酵バイオ）
○Seiki TAKENO[1], Eri NAKAMURA[1], Tatsunori OTAKE[1], Koji UMEZAWA[1], Mikiro HAYASHI[2], Masato IKEDA[1] ([1]Shinshu Univ., [2]Kyowa Hakko Bio)

【背景と目的】　近年まで、ビオチン前駆体のピメリン酸チオエステルがどうやって生合成されるかの詳細はわかっていなかったが、最近、脂肪酸合成経路に依存していることが明らかになってきた。その脂肪酸経路からのピメリン酸チオエステル供給には、BioCH ルート（大腸菌型）と BioI ルート（枯草菌型）が知られている。我々のこれまでの研究で、ビオチン要求性細菌であるコリネ菌では、その供給ルートが欠損しており、枯草菌由来の BioI 酵素がその欠損を相補できることがわかっている。つまり、枯草菌の BioI 酵素は、コリネ菌がつくるアシル CoA（主にオレオイル CoA、次いでパルミトイル CoA）を基質として利用できることを示唆している。しかし、両菌種間で膜構成脂肪酸の種類は全く異なるうえ、ACP 体（枯草菌）と CoA 体（コリネ菌）の違いもあって、BioI 酵素がコリネ菌のつくるアシル CoA をどの程度基質として利用できているのかは定かではない。本研究では、コリネ菌の膜構成脂肪酸であるオレイン酸（C18:1）とパルミチン酸（C16:0）に焦点を当て、BioI 酵素との相性をインビボとインシリコの両面から解析した。

【方法と結果】　我々が育種したコリネ菌のビオチン非要求株は、糖からビオチンバイタマーを微量生成する。その培養系に、枯草菌の膜構成脂肪酸（C12~15 の分枝鎖脂肪酸）を添加すると、総じてバイタマー力価は向上した。本結果は、添加した脂肪酸がコリネ菌内でアシル CoA に変換されて BioI の基質として利用されていることを示す。コリネ菌の膜構成脂肪酸を添加した場合は、パルミチン酸（C16:0）に同様な効果が認められたが、オレイン酸（C18:1）には有意な増産効果は認められなかった。すなわち、オレオイル CoA とパルミトイル CoA 間で BioI との相性が異なると考えられた。BioI 反応は長鎖アシル CoA の開裂なので、同反応でピメロイル CoA（C7）が生成すれば、副産物として、等モルの中鎖脂肪酸が生成するはずである。仮に C18 が基質であれば C11 が副生し、C16 が基質であれば C9 が副生すると考えられる。その C9 と C11 を定量することができれば、コリネ菌のつくる 2 種のアシル CoA がどういう割合で利用されているのかがわかる。目的に叶う GC-MS 分析法を構築し、発酵液中の中鎖脂肪酸を分析した結果、C9 がピメロイル CoA の生成に見合う量、検出された。意外にも C11 は検出されなかった。以上は、コリネ菌内での BioI の基質がパルミトイル CoA であり、オレオイル CoA は基質として利用されていないことを示している。本結果を、インシリコによるドッキングシミュレーションの面からも考察する。

Corynebacterium glutamicum, BioI, fatty acid

発表責任者：池田正人（m_ikeda@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：1C7a09
講演日時：3 月 24 日 10:38～ 1 号館 C7 会場

コリネ型細菌によるパルミチン酸単独発酵
Metabolic shift from oleic acid to palmitic acid production in *Corynebacterium glutamicum*
○青木 邦祥[1]、村田 紀子[1]、林 幹朗[2]、竹野 誠記[1]、池田 正人[1] ([1]信州大農、[2]協和発酵バイオ)
○Kuniyoshi AOKI[1], Noriko MURATA[1], Mikiro HAYASHI[2], Seiki TAKENO[1], Masato IKEDA[1] ([1]Shinshu Univ., [2]Kyowa Hakko Bio)

【背景と目的】　コリネ菌は、細菌としては例外的に、真核型の I 型 FAS（脂肪酸合成酵素）を 2 種有する（FasA と FasB）。FasA はオレオイル CoA とパルミトイル CoA の合成に関わり、FasB はパルミトイル CoA の合成に関わるサブと考えられている。我々は、そのようなユニークな脂肪酸代謝系をもつコリネ菌を用い、脂肪酸の生産検討を進めている。これまでに、コリネ菌野生株が *fasR* の欠損のみで脂肪酸を分泌するようになること、そして、FasA の強化が脂肪酸の増産をもたらすことを報告してきた。コリネ菌が生産する脂肪酸は、細胞膜の構成比に応じて、オレイン酸が主体であり、次いでパルミチン酸である。もし、このオレイン酸主体の発酵をパルミチン酸発酵に転換できれば、前演者の知見に添う宿主になる可能性がある。今回、FasA と FasB の機能の違いに着目して、その転換育種を試みた。

【方法と結果】　脂肪酸生産菌 PCC-6 株で、2 種の脂肪酸合成酵素遺伝子（*fasA* と *fasB*）のうち、主体の *fasA* を破壊した。予想通り、同破壊株はオレイン酸の要求性を示した。同株を、オレイン酸要求株を培養するときの常法（Brij35＋オレイン酸）で培養すると、パルミチン酸と同時に、オレイン酸を含む種々の脂肪酸が出現して、狙いとするパルミチン酸単独発酵にはならなかった。オレイン酸源として Tween80 を必要最少量添加した培養でも結果は同様であった。オレイン酸の添加条件を種々検討した結果、Brij35 や Tween80 に依存しないオレイン酸の添加法を見いだした。この条件で *fasA* 破壊株を培養すると、発酵後の培養液中の脂肪酸がほぼパルミチン酸のみなから成るパルミチン酸単独発酵が成立した。この菌株でさらに *fasB* も破壊すると、パルミチン酸生成は消失し、行き場を失ったマロニル CoA が遊離のマロン酸として副生することがわかった。従って、パルミチン酸発酵は FasB に依存して成立していることが裏付けられた。以上は、FasB がパルミチン酸の合成のみに関わり、脂肪酸合成のサブと考えられていながらパルミチン酸を高生産できる十分な活性を有していることを示している。

Corynebacterium glutamicum, type I fatty acid synthase, palmitic acid production

発表責任者：池田正人（m_ikeda@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：1C7a10
講演日時：3 月 24 日 10:49～ 1 号館 C7 会場

コリネ型細菌における脂肪酸の新たな生成機構
Fatty acid production via a different mechanism in *Corynebacterium glutamicum*
○高橋 敬祐[1]、大竹 辰徳[1]、井元 瞭介[1]、林 幹朗[2]、竹野 誠記[1]、池田 正人[1]（[1]信州大農、[2]協和発酵バイオ）
○ Keisuke TAKAHASHI[1], Tatsunori OTAKE[1], Ryosuke IMOTO[1], Mikiro HAYASHI[2], Seiki TAKENO[1], Masato IKEDA[1] ([1]Shinshu Univ., [2]Kyowa Hakko Bio)

【背景と目的】　コリネ菌はゲノム上に、遊離脂肪酸の CoA 化を担う脂肪酸アシル CoA シンセターゼ（FadD）様遺伝子を 5 種持つ。我々は、前大会で、そのうち、*fadD5* または *fadD15* を野生株で破壊すると、脂肪酸生合成系が野生型であるにもかかわらず、遊離脂肪酸の分泌が起こることを報告した。大腸菌等、一部の微生物では、定常期に細胞膜脂質がリパーゼを介した分解（リポリシス）を受け、その結果として、遊離脂肪酸の生成が起こることが知られている。このことを念頭に、今回、*fadD* 破壊で遊離脂肪酸が生成する仕組みを解析した。

【方法と結果】　コリネ菌の *fadD5* および *fadD15* 同時破壊株をグルコース培養すると、オレイン酸とパルミチン酸からなる脂肪酸を分泌生産する。その生成過程を、代表的な脂肪酸生産菌（*fasR* 破壊株）と比較した。その結果、両菌株とも脂肪酸生成は主に対数増殖期の後期に認められ、定常期では停止していることがわかった。この挙動は、脂肪酸がリポリシスとは違う仕組みで生じていることを示唆する。仮説として、生合成されたアシル CoA はその一部が、常時、チオエステラーゼ（Tes）の作用で遊離脂肪酸に分解されているのでは、と考えた。実際、グルコース培養細胞に、オレオイル CoA に対する高い Tes 活性が認められた。その遺伝子として特定した *tesA* を、*fadD5* および *fadD15* 同時破壊株で破壊すると、脂肪酸生産はキャンセルされ、*tesA* を増幅すると、逆に脂肪酸の増産が起こった。すなわち、*fadD* 破壊株の脂肪酸生成は Tes 依存であり、Tes 非依存のリポリシスとは異なることを示している。以上の結果に基づき、*fadD* 破壊株が脂肪酸を分泌生成する仕組みを次のように考察した。コリネ菌は、ミコール酸層形成のため遊離脂肪酸を常時合成する必要がある。そのため、アシル CoA は一定量、常に Tes の作用で遊離脂肪酸に分解されなければならない。その際、余剰の遊離脂肪酸は FadD によりアシル CoA に戻され、細胞膜合成にリユースされると考えられる。つまり、コリネ菌には、Tes と FadD からなる、いわゆる「基質回路」が存在するとの仮説である。この仮説に基づけば、FadD が欠損すると、同回路が回らなくなるため、遊離脂肪酸が生成すると説明できる。

Corynebacterium glutamicum, substrate cycle, fatty acid production

発表責任者：池田正人（m_ikeda@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：1C7a11
講演日時：3 月 24 日 11:10～ 1 号館 C7 会場

抗菌物質生産能および LPS（Lipopolysaccharide）分解能を持つ食用枯草菌の分離

Isolation of *Bacillus* sp. producing antibacterial substance and eliminating LPS (Lipopolysaccharide)

○金内 誠、山本 希、根本 有子、佐々木 瞳、松本 菜月、レーティゴック ラン（宮城大 食産業）
○ Makoto KANAUCHI, Nozomi YAMAMOTO, Yuko NEMOTO, Hitomi SASAKI, Natsuki MATSUMOTO, Lan LE THI NGOC (Miyagi Univ.)

【緒論】食品のプロバイオティクス分野において、乳酸菌だけでなく枯草菌などの細菌は、腸内フローラ形成や *Bifidobacterium* 属の増殖に関与することが報告されている。また、腸の炎症性疾患（過敏性腸症候群）の予防には、納豆やみそなど発酵食品の摂取による腸内環境改善が有効であることが示唆されている。これは、食品微生物群によって炎症性物質である LPS（リポポリサッカライド）を持つ大腸菌が生育抑制されるためであると考えられる。しかし、発酵食品中の枯草菌類のプロバイオティクス効果についての詳細な検討は少ない。本研究では、発酵食品から分離した食用枯草菌を用いてプロバイオティクスへ応用することを目的とした。はじめに、食用枯草菌類を分離し、抗菌性物質の生産能および LPS 分解能を持つ株をスクリーニングした。

【方法】納豆や熟れずし、ウォッシュチーズなど 30 種類の発酵食品を試料とし、食用枯草菌を分離した。試料 0.1 g をブイヨン液体培地 10 mL に接種し、集積培養した。これを 90 ℃、30 分の加熱処理を行い、耐熱性芽胞を有する株をブイヨン平板培地に塗抹接種後、分離した。分離した株を、再びブイヨン液体培地にて培養し、培養後に遠心分離した。この培養上清をペーパーディスク法にて、*Escherichia coli* に対する抗菌性物質生産能（阻止円）を確認した。さらに抗菌性物質生産能を持つ株の中から LPS 消去能を有する株をスクリーニングした。LPS の測定は、ライセート試薬を用いた。スクリーニング株（N6 株）は定法に従い、形態学的あるいは分子生物学的特徴によって同定した。この N6 株の生産する LPS 消去物質も検討した。

【結果及び考察】30 種類の食品試料から、多くの耐熱性株を分離した。この中から平板培地上のコロニーの色や形状など、タイプの異なる株を合計 60 株選抜した。これらの株を培養し、抗菌性物質生産株をスクリーニングした。その結果、納豆や味噌、チーズから分離した 3 株（N6 株、N12 株、N14 株）が選抜された。これらの株を LPS に曝露後、LPS 消去能を検討した。N6 株の LPS 消去率は 90%以上であった。一方、N12 株と N14 株の 2 株は LPS 消去率が 50%以下であった。この N6 株は芽胞を形成し、運動性を有していた。さらに、16S rRNA の塩基配列より、*Bacillus subtilis* と同定した。この株の LPS 消去の至適温度を検討した結果、30 ℃であった。この株の LPS 消去物質は、タンパク質であることも明らかとなった。これにより N6 株は、耐熱性芽胞を有し、グラム陰性菌の生育阻害と LPS 消去による抗炎症効果が期待でき、プロバイオティクスに利用できることが明らかとなった。

lipopolysaccharide, *Bacillus* sp., antibacterial substance

発表責任者：金内誠（kanauchi@myu.ac.jp）

講演番号：1C7a12
講演日時：3 月 24 日 11:21～ 1 号館 C7 会場

酪酸生産菌のフルクトオリゴ糖代謝

Fructooligosaccharide metabolism in butyrate producing gut microbes

○丹野 広貴[1]、藤井 匡[2]、平野 勝紹[2]、栃尾 巧[2]、遠藤 明仁[1] ([1]東農大生物産業、[2]物産フードサイエンス株式会社)
○HIROKI TANNO[1], TADASHI FUJII[2], KATSUAKI HIRANO[2], TAKUMI TOCHIO[2], AKIHITO ENDO[1] ([1]Tokyo Univ. of Agric., [2]B Food Science Co., Ltd.)

【背景と目的】

ヒト腸内に常在する善玉菌はプレバイオティクスであるオリゴ糖により増殖が促進され、宿主の健康に寄与することが知られている。フルクトオリゴ糖 (FOS) は世界で最も研究・利用されているオリゴ糖の 1 つであり、我々はこれまでに腸管系乳酸菌やビフィズス菌の多くは 3 糖の FOS であるケストースでは良好に生育するが、4 糖の FOS であるニストースでは生育せず、一般的な FOS 混合物中に含まれるこれら善玉菌の増殖因子はケストースであることを明らかにしている。一方で、酪酸生産菌は近年の研究でその重要性が示されており、それらが生産する酪酸はヒト結腸上皮細胞で他の短鎖脂肪酸よりも優先的に利用され、大腸炎やアレルギーの抑制に関与する等の報告があるが、酪酸生産菌の FOS 代謝の詳細は明らかにされていない。そこで本研究では、酪酸生産菌の FOS 代謝能を調べ、プレバイオティクス摂取によるこれらの生育促進メカニズムを明らかにすることを目的とした。

【実験方法、結果及び考察】

まず酪酸生産菌 5 菌株の FOS 系を中心とした生育能を観察した。*Faecalibacterium prausnitzii* JCM 31915 はケストースを含む FOS 系オリゴ糖でのみ良好に生育した。*Agathobacter rectalis* JCM 17463^T はキシロオリゴ糖 (XOS) でのみ生育した。*Anaerostipes caccae* JCM 13470^T はケストースで生育したがニストースでは生育しなかった。*Anaerostipes butyraticus* JCM 17466^T は FOS のみで良好に生育した。*Butyricicoccus faecihominis* JCM 31056^T は今回用いたいずれのオリゴ糖でも生育しなかった。

また上記 5 菌株のうち、データベースにゲノム情報が公開されている 3 菌株のデータを取得し、糖の加水分解に関わると考えられるタンパク質を推定したところ、*F. prausnitzii* で 32 個、*A. rectalis* で 50 個、*A. caccae* で 12 個推定され、酪酸生産菌の糖代謝能は菌種ごとに大きく異なることがゲノム面からも示された。

次に *A. caccae* におけるケストースとニストースの生育能の違いに着目した。ゲノムデータより FOS 代謝に関わると考えられる遺伝子クラスターを推定し、これらの FOS 培養時の発現解析を Real-time PCR を用いて行った。スクロース培養時の発現量を 100 %とした時、ケストース培養時ではどの遺伝子もスクロース培養時以上の発現量を示したが、ニストース培養時ではどの遺伝子も 10%～30% 程度の発現量となった。これより *A. caccae* のケストースとニストースの生育能の違いは遺伝子発現レベルで制御されていることが強く示唆された。

butyrate producers, fructooligosaccharides, gene expression

発表責任者：遠藤明仁（a3endou@nodai.ac.jp）

講演番号：1C7a13
講演日時：3 月 24 日 11:32～ 1 号館 C7 会場

Gluconobacter japonicus NBRC 3271 が持つ膜結合型グルコン酸脱水素酵素に関する研究
Study on membrane-bound gluconate dehydrogenases of *Gluconobacter japonicus* NBRC 3271

○片岡 尚也[1,2]、大田 諒子[3]、SAICHANA Natsaran[4]、松谷 峰之介[1]、外山 博英[5]、藥師 寿治[1,2]、松下 一信[1,2] ([1]山口大院・創成科学、[2]山口大・中高温微セ、[3]山口大・農、[4]Mae Fah Luang Univ.、[5]琉球大・農)
○ Naoya KATAOKA[1,2], Ryoko OTA[3], Natsaran SAICHANA[4], Minenosuke MATSUTANI[1], Hirohide TOYAMA[5], Toshiharu YAKUSHI[1,2], Kazunobu MATSUSHITA[1,2] ([1]Yamaguchi Univ., [2]Yamaguchi Univ. RCTMR, [3]Yamaguchi Univ. Agr., [4]Mae Fah Luang Univ., [5]Univ. of the Ryukyus)

【背景・目的】酢酸菌は, 細胞質膜のペリプラズム側に数多くの膜結合型酵素を保有しており, その働きにより多種多様な糖類やアルコール類を不完全に酸化する酸化発酵と呼ばれる代謝を営む。酢酸菌 *Gluconobacter* 属の行う酸化発酵にグルコースを初発基質として複数の膜結合型酵素が連続的に機能して成立するケトグルコン酸発酵がある。本発酵系は, *Gluconobacter* 属が普遍的に保有する能力であるが, 株間で代謝産物が異なり, 特に, *Gluconobacter japonicus* NBRC 3271 は, グルコースからグルコン酸を経て生成される 2-ケトグルコン酸を発酵液中に著量蓄積する。これまでに, NBRC 3271 株を材料に, 2-ケトグルコン酸の生成に関わるグルコン酸脱水素酵素 (GADH) が精製されるとともに, その遺伝学的な解析が行われ, GADH はフラビンアデニンジヌクレオチド及びヘム C を補欠分子族に持つフラボプロテイン・シトクロム *c* 複合体であること, NBRC 3271 株は GADH を少なくとも 2 つ以上保有していること, が明らかにされた (1, 2)。本研究では, NBRC 3271 株におけるグルコン酸の 2-ケトグルコン酸への酸化を更に詳細に明らかにすることを目的として研究を行った。
【方法・結果】まず, NBRC 3271 株を含む複数種の *Gluconobacter* 属のゲノム情報を用いて, フラボプロテイン・シトクロム *c* 複合体のフラボプロテインサブユニットを標的にした分子系統解析を行った。その結果, NBRC 3271 株には, 分子系統学的に異なる 2 つの GADH (GndSLC, GndFGH) が存在することが明らかになった。そこで, 各 GADH のケトグルコン酸発酵への寄与を検証するため, 各欠損株 (Δ*gndSLC*, Δ*gndFGH*), 二重欠損株 (Δ*gndSLC*Δ*gndFGH*) を二重相同組換え法により作製し, 野生株とともにグルコース及びグルコン酸を含む発酵培地で培養した。その結果, 野生株と Δ*gndFGH* は同一の表現型を示した一方で, Δ*gndSLC* では顕著な 2-ケトグルコン酸の生成遅延が観察され, Δ*gndSLC*Δ*gndFGH* は 2-ケトグルコン酸を生成しなかった。またこの時の各株の膜画分におけるグルコン酸に対するフェリシアニド還元活性は野生株, Δ*gndFGH*, Δ*gndSLC*, Δ*gndSLC*Δ*gndFGH* の順に低く, Δ*gndSLC*Δ*gndFGH* に活性は確認されなかった。これらの結果は, GndSLC の 2-ケトグルコン酸生成への寄与が大きいこと, 2 つの GADH が 2-ケトグルコン酸の蓄積に関与していること, を示していた。現在, 各 GADH の生化学的な特徴づけを行うべく, 遺伝子工学的手法による各 GADH の過剰発現株の作製を行っている。

1. Shinagawa, E., *et al.*, 1984. *Agric. Biol. Chem.*, **48**: 1517-1522.
2. Toyama, H., *et al.*, 2007. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**: 6551-6556.

Gluconobacter japonicus, acetic acid bacteria, membrane-bound gluconate dehydrogenase

発表責任者：片岡 尚也（nkataoka@yamaguchi-u.ac.jp）

講演番号：1C7a14
講演日時：3 月 24 日 11:43～ 1 号館 C7 会場

実用的酢酸発酵を目指した *Acetobacter pasteurianus* の低栄養育種と高温適応育種
Low-nutrition and thermal adaptation of *Acetobacter pasteurianus* for practical acetic acid fermentation

○松本 奈実[1]、大澄 直樹[2]、パタナタボーン ティーリサラ[3]、末吉 里帆[4]、松谷 峰之介[1]、片岡 尚也[1,4,5]、藥師 寿治[1,4,5]、ティーラグール ガンジャナ[3]、白石 靖[2]、松下 一信[1,4,5] ([1]山口大院創成科学、[2]キユーピー醸造(株)、[3]カセサート大、[4]山口大農、[5]山口大中高温微セ)
○Nami MATSUMOTO[1], Naoki OSUMI[2], Theerisara PHATHANATHAVORN[3], Riho SUEYOSHI[4], Minenosuke MATSUTANI[1], Naoya KATAOKA[1,4,5], Toshiharu YAKUSHI[1,4,5], Gunjana THEERAGOOL[3], Yasushi SHIRAISHI[2], Kazunobu MATSUSHITA[1,4,5] ([1]Grad. Sch. Yamaguchi Univ., [2]Kewpie Jyozo Co.,Ltd., [3]Kasetsart Univ., [4]Fac. Agr. Yamaguchi Univ., [5]RCTMR Yamaguchi Univ.)

【背景・目的】耐熱性微生物を用いた高温発酵技術は、省エネ型で安定な発酵技術として期待でき、耐熱化微生物の取得及び耐熱化機構の解明が望まれている。私たちは、酢酸菌を用いた実験室進化により耐熱化株を取得するとともに、耐熱化機構の解明に取り組んでいる[1]。これまでに、*Acetobacter pasteurianus* SKU1108 を酢酸発酵下で高温適応育種して耐熱化株 TH-3 を取得し[2]、さらに高エタノール培地で育種して高酸度生産株 7E-13 を取得した。この株は食酢醸造用の「もろみ」培地では高温発酵能を十分に発揮できず、原因として、育種に用いられた YPGD 培地は、「もろみ」に比べて窒素源濃度が高いことが考えられた。そこで、「もろみ」で高温発酵可能な株を取得するために、7E-13 株の低栄養培地への適応育種を行った。一方、耐熱性の低い実用モデル株 *A. pasteurianus* K-1034 については、低栄養培地で高温適応育種を行い、耐熱化株の取得を試みた。
【方法・結果】①育種：擬似もろみ培地（0.5%酵母エキス、0.5%グルコース、5%エタノール、0.6%酢酸）と Jasmine rice wine の 2.78 倍希釈液もろみ培地（6%エタノール、0.2%酢酸を含む）の 2 種類の培地で耐熱化株 7E-13 による低栄養適応育種を行った。前者の培地で 38, 38.5, 39˚C と段階的に温度を上昇させながら 33 回の継代培養により LN 株を、後者の培地で 37˚C、40 回の継代培養にて G-40 株を取得した。また、実用モデル株 K-1034 の耐熱化は、擬似もろみ培地で 37 から 39˚C まで段階的に温度を上昇させながら、41 回の継代培養で得た培養液より RH 株と SY 株を取得した。これらの適応株はすべて、擬似もろみ培地におけるフラスコ培養で 40˚C での酢酸発酵が可能であった。
②変異：適応株の変異箇所は、比較ゲノム解析により同定した。低栄養育種の LN と G-40 株は、変異箇所の重複なく、それぞれ 5 及び 6 ヶ所の変異を、高温適応育種株の SY と RH 株は、5 ヶ所の重複を含む、それぞれ 7 及び 6 ヶ所の変異を有していた。低栄養育種株 G-40 の変異遺伝子のひとつの *fabG* 遺伝子は、本菌のプラスミド上に存在するホモログとの部分的組換え変異であることが示唆された。この変異型 *fabG* 遺伝子の親株への導入変異株は、低栄養育種株と同等の生育を示し、この変異が低栄養条件での発酵能力の向上に寄与することが示された。
③発酵能：これら育種株の発酵能を「もろみ」培地で 37˚C と 39˚C においてファーメンターとバッフルフラスコで比較した。ファーメンターでは、フラスコ培養に比べ発酵速度は変わらないが、最終酸度が低下した。一方、バッフルフラスコでは両因子とも増加した。ファーメンターによる酸度の低下は通気によるエタノール濃度の低下が原因と考えられたため、エタノールの追加実験を行った結果、G-40 と RH 株においては 39˚C で 4.5%以上の酸度が得られた。
本研究は JST-ALCA 事業（JPMJAL1106）の一環として行われた。
[1] Matsushita K et al., *Biosci Biotechnol Biochem*, 80, 655 (2016), [2] Matsutani M et al., *J Biotechnol*, 165, 109 (2013)

acetic acid bacteria, adaptation, acetic acid fermentation

講演番号：1C7a15
講演日時：3 月 24 日 11:54～ 1 号館 C7 会場

低栄養育種と高温適応育種を行った *Acetobacter pasteurianus* による実用的酢酸発酵性能評価

Evaluation of practical acetic acid fermentation performance by low-nutrition and thermal adapted *Acetobacter pasteurianus*

○大澄 直樹[1]、松本 奈実[2]、パタナタボーン ティーリサラ[3]、末吉 里帆[4]、藥師 寿治[2,4,5]、ティーラグール ガンジャナ[3]、松下 一信[2,4,5]、白石 靖[1]([1]キユーピー醸造(株)、[2]山口大院創成科学、[3]カセサート大、[4]山口大農、[5]山口大中高温微セ)
○Naoki OSUMI[1], Nami MATSUMOTO[2], Theerisara PHATHANATHAVORN[3], Riho SUEYOSHI[4], Toshiharu YAKUSHI[2,4,5], Gunjana THEERAGOOL[3], Kazunobu MATSUSHITA[2,4,5], Yasushi SHIRAISHI[1] ([1]Kewpie Jyozo Co.,Ltd., [2]Grad. Sch. Yamaguchi Univ., [3]Kasetsart Univ., [4]Fac. Agr. Yamaguchi Univ., [5]RCTMR Yamaguchi Univ.)

【背景・目的】我々のグループでは、耐熱性微生物を用いた省エネ型発酵技術の検討を行っている。食酢メーカーでの大量生産には、深部酢酸発酵装置(アセトファーメンター)が多く使用されている。既に分離されている耐熱性酢酸菌株は、実験室培地を用いてジャーファーメンターにより発酵性能を評価してきた。実験室培地と食酢製造の仕込み液は組成が大きく異なり、ジャーファーメンターとアセトファーメンターの装置の特性も大きく異なる。そこで、実際の食酢製造へ耐熱性菌株を使用した場合の評価を行うこととした。実製造装置に近い特性を持つ小型のアセトファーメンターを用い、米もろみを原料とした米酢の発酵を行うことで、より実用的な酢酸発酵性能を評価した。
【方法】供試酢酸菌株として、タイの果実・花から分離した耐熱性酢酸菌株である *Acetobacter pasteurianus* SKU1108、SKU1108 の耐熱化育種株(TH-3)、TH-3 株の高酸度生産育種株(7E-13)、7E-13 株の低栄養育種株(LN)、7E-13 株の Jasmine rice wine もろみ適応育種株(G-40)、実用モデル株 *A. pasteurianus* K-1034、その耐熱化育種株(SY, RH)を用いた。これらの菌株について、小型のアセトファーメンターを用いて、米酢の発酵試験を行った。*A. pasteurianus* を用いた通常の発酵は 30℃で行われているが、何℃まで発酵を行うことが可能か確認した。発酵の可否は、酢酸発酵が開始できるか、一般的に市販されている米酢の酸度まで発酵できるかという点から評価した。
【結果】耐熱性酢酸菌株(7E-13)： 37℃で発酵が可能であったが、発酵が可能な液量・通気量の条件は限られた。培養温度 39℃では、目的の酸度まで発酵することが出来なかった。
耐熱性酢酸菌の低栄養育種株(LN) ：37℃では、発酵終盤で発酵速度の落ち込みがみられた。
耐熱性酢酸菌の Jasmine rice wine もろみ適応育種株(G-40) ：37℃で発酵能の一時的な低下と再上昇が見られたが発酵が可能であった。
実用モデル株(K-1034) ：35℃で発酵が可能であった。37℃では発酵できなかった。
実用モデル株の耐熱化育種株(SY,RH) ：両株とも、37℃で良好な発酵が可能であった。しかし、38℃では、安定して目的の酸度まで発酵することが出来なかった。
以上のように、耐熱性酢酸菌株およびその低栄養育種株では発酵が安定しない場合が多かった。特殊な環境であるアセトファーメンターでの実製造では、実用モデル株およびその耐熱化育種株がより適した菌株であると推察された。
本研究は JST-ALCA 事業（JPMJAL1106）の一環として行われた。

acetic acid bacteria, adaptation, acetic acid fermentation

講演番号：1C7p01
講演日時：3 月 24 日 13:50～ 1 号館 C7 会場

生物学的ハーバーボッシュ法の基盤確立

Development of fundamentals for biological Haber-Bosch process

○宮内 友子、高妻 篤史、渡邉 一哉（東薬大生命）
○Tomoko MIYAUCHI, Atsushi KOUZUMA, Kazuya WATANABE (Tokyo Univ. of Pharm. Life sci.)

近年の世界的な人口増加に伴い、食糧生産に必要な化学肥料（アンモニア）の需要が増加している。現在アンモニアは主にハーバー・ボッシュ法により製造されているが、本手法は高温高圧の反応条件を必要とするため、多大なエネルギーを消費する。そこで現在、エネルギー消費の少ないアンモニア合成法の開発が望まれており、窒素固定細菌を用いた生物学的方法が注目を集めている。窒素固定細菌としては従属栄養細菌や光合成細菌がよく知られているが、これらの細菌を用いた窒素固定プロセスは生産物よりも高価なエネルギー源（グルコース等の有機物）や広大な土地を必要とするため、工業化が難しいと考えられる。

そこで本研究では、窒素固定能を持つ化学合成独立栄養細菌である *Acidithiobacillus* 属細菌に着目した。本属細菌は好酸性の鉄酸化細菌として知られるが、鉄以外にも水素を電子供与体として生育することができる。水素は、エネルギー密度が高く安価に生産できることから、工業規模のハーバー・ボッシュ法によるアンモニア生産にも用いられている。そこで本研究では、水素をエネルギー源とした生物学的ハーバー・ボッシュ法の開発に向け、*Acidithiobacillus* 属細菌の水素利用能と窒素固定能の検証、およびこれらのプロセスに関連する分子機構の解析を行った。

本研究では、*Acidithiobacillus* 細菌の中でも特に高い水素利用能を示すことが報告されている *A. ferridurans* JCM 18981 株を選定し、まず本株の水素利用能と窒素固定能の検証を行った。その結果、エネルギー源として水素を用いた場合、鉄を用いた場合よりも高い菌体密度が得られること、また水素培養時にアンモニア同化反応の阻害剤を添加することで、培養液中にアンモニウムイオンが蓄積することが示された。これらの結果は、本菌株を用いれば水素と窒素からアンモニアを生産できることを示している。次に、水素利用や窒素固定に関する分子機構の基盤情報を得る目的で、本株のゲノム解読及び遺伝子発現変動解析を行った。まず PacBio シーケンサーによるゲノム配列解析を行い、完全長のゲノム配列（約 2.9 Mb）を得た（Miyauchi et al. 2018. Microbiol Resour Announc 7:e01028-18）。この配列を元に DNA マイクロアレイを設計し、水素培養時と鉄培養時のトランスクリプトームを比較した。その結果、水素培養時に、鉄培養時よりも顕著にニトロゲナーゼ遺伝子（*nifHDK*）の発現が上昇することが示された。これらの遺伝子の発現上昇は水素による十分なエネルギー供給に起因すると考えられ、本株において窒素固定系とエネルギー代謝系が協調的に制御されている可能性が示唆された。以上の成果は、水素の利用が本株の窒素固定を促進することを示しており、生物学的ハーバー・ボッシュ法の開発に大きく寄与すると期待される。

Acidithiobacillus, hydrogen, nitrogen fixation

講演番号：1C7p02
講演日時：3 月 24 日 14:01～ 1 号館 C7 会場

Rhodobacter sphaeroides における *nifA* 改変および炭酸固定経路遮断による酢酸からの水素収率の向上
Improvement of H_2 yield from acetate by engineering of *nifA* and disruption of the Calvin cycle in *Rhodobacter sphaeroides*
○清水 哲[1]、寺本 陽彦[1]、乾 将行[1,2] ([1]RITE、[2]奈良先端大・バイオ)
○tetsu SHIMIZU[1], haruhiko TERAMOTO[1], masayuki INUI[1,2] ([1]RITE, [2]NAIST)

【目的】我々は、大腸菌による暗発酵と紅色非硫黄細菌による光発酵を組み合わせたセルロース系バイオマスからの高効率バイオ水素生産プロセスの開発に取り組んでいる。暗発酵では熱力学的な制約によりグルコースは酢酸までしか酸化されないのに対し、光発酵では光エネルギーの利用により酢酸の完全酸化による水素生産が可能なため、両発酵プロセスの統合により原料バイオマスあたりの水素収率の大幅な向上が期待される。そこで本研究では、代表的な紅色非硫黄細菌である *Rhodobacter sphaeroides* を対象とし、水素生産反応を触媒するニトロゲナーゼの発現強化および水素生成競合経路の一つである炭酸固定経路遮断が酢酸からの水素生産に与える影響について解析した。
【方法と結果】水素取り込み型ヒドロゲナーゼ遺伝子を破壊した *R. sphaeroides* (RsHyd1)を親株として、ニトロゲナーゼの転写活性化因子である *nifA* を改変した RsHyd2 株、二回交差法により染色体上の 2 コピーのルビスコ遺伝子を破壊した RsHyd3 株、2 つの遺伝子改変を組み合わせた RsHyd4 株、RsHyd4 株にさらに改変型 *nifA* をプラスミド導入した RsHyd5 株を作製した。作製した各株を炭素源として酢酸、ニトロゲナーゼ発現のため単一窒素源としてグルタミン酸を添加した無機塩培地にてアルゴン雰囲気下、光照射条件下で培養し、生成水素をガスクロマトグラフィーにより定量した。
アンモニアによるニトロゲナーゼの発現抑制を緩和する変異を染色体上の *nifA* に加えた RsHyd2 株は、RsHyd1 株と比較して 1.6 倍の水素を生産した。従って、グルタミン酸を単一窒素源とした条件においてもニトロゲナーゼの発現はある程度抑制されており、水素生産の律速となっていることが示唆された。一方、水素生産に必要な還元力を消費する炭酸固定経路を遮断した RsHyd3 株では、RsHyd1 株と比較して水素生産量の有意な上昇は観察されなかった。しかしながら、炭酸固定経路遮断と *nifA* 改変を組み合わせた RsHyd4 株は RsHyd1 と比較して 2.2 倍の水素を生産した。以上の結果から、*nifA* 改変によるニトロゲナーゼ発現レベルの増強により、炭酸固定経路遮断に伴って生じる余剰還元力が効率的に水素生産に用いられることが示唆された。また、窒素源を塩化アンモニウムとした条件において RsHyd1 株、RsHyd3 株の水素生産が検出限界以下であったのに対して、改変型 *nifA* を染色体に導入した RsHyd2、RsHyd4 株は微量な水素を生産した。さらに RsHyd4 株に改変型 *nifA* をプラスミド導入した RsHyd5 株は、同条件において RsHyd4 株と比較して 88 倍の水素を生産した。以上の結果から、改変型 *nifA* を高発現することにより、アンモニアを窒素源とした条件での効率的な水素生産が可能であることが示された。本研究は METI の委託研究の一環として行われたものである。

Rhodobacter, hydrogen, nitrogenase

発表責任者：乾将行（inui@rite.or.jp）

講演番号：1C7p03
講演日時：3 月 24 日 14:12～ 1 号館 C7 会場

生分解性プラスチックの高温メタン発酵過程における酢酸消費微生物群の解析

Acetate Consuming Microflora Analysis on Thermophilic Methane Fermentation Process of Biodegradable Plastic

○曽 厚嘉、田島 大貴、蒋 紅与、大西 章博、藤本 尚志（東農大農）
○Hou Chia TSENG, Daiki TAJIMA, Hongyu JIANG, Akihiro OHNISHI, Naoshi FUJIMOTO (Tokyo Univ. of Agric.)

【背景と目的】事業系の食品ロスは年間 300～400 万トン発生しており、大部分が焼却・埋立処分されている。飼料化・肥料化などにより食品廃棄物を再利用する場合は、破砕して、容器包装類や収集用のごみ袋を分別除去する必要があり、分別過程で除けなかった容器包装類やごみ袋は処理過程の配管や機械の閉塞、故障の原因となっている。現在、これらの容器包装類やごみ袋をポリ乳酸が原料の BDP（生分解性プラスチック）に置き換えようとする社会的な動きがある。しかしながら、BDP の生分解過程における生物学的な知見は少なく、実用性の見込みについては不透明である。本研究では、BDP である PLA（ポリ乳酸）の高温メタン発酵過程における分解メカニズムの解析を試みる。これまでの研究結果では、PLA がメタン生産の良質な基質になり得ることが強く示唆された。また、PLA の乳酸への低分子化過程は全体の約 30%程度が物理化学的な要因で進行するものの、乳酸からメタンガスへの変換は全て生物作用によるものであることが示唆された。また、培養法により *Tepidimicrobium* 属の細菌が乳酸の分解に寄与することを明らかにした。本研究では、乳酸分解後の代謝産物の一つである酢酸の分解に寄与する微生物の特定を試みた。

【実験材料と方法】酢酸の終濃度が 0.1M（pH7.4）となるように調製した人工培地を用い、PLA 分解後の高温メタン発酵汚泥を植種として回分実験（55℃）に供した。培養過程のガス生成量とガス組成を測定した。菌相解析は、植種と回分実験後の培養物から DNA を抽出して、PCR-DGGE 法により行った。

【結果及び考察】PLA 分解後の汚泥を回分実験に供した結果、30 日間で消費された供試培地中の酢酸は約 0.35g であった。これに対して、約 76ml のメタンガスが生成した。消費酢酸あたりのメタンガス収率は 0.58 mol/mol acetate-consumed であった。細菌相を評価した結果、植種に比べて回分実験過程で優占性が上昇したと考えられる特異的な 3 つの DNA バンドが検出された。これらの DNA 配列を決定し、系統学的な位置を推定した結果、*Parageobacillus* 属、*Tumebacillus* 属、*Oceanobacillus* 属の細菌群であった。これらの微生物は PLA の分解過程では酢酸分解と、水素や二酸化炭素の生成に寄与するものと考えられた。ここで生成する水素と二酸化炭素は、*Methanothermobacter* 属などの古細菌によるメタンガス生成に利用されるものと考えられた。

Biodegradable Plastic, PLA, Thermophilic Methane Fermentation

講演番号：1C7p04
講演日時：3 月 24 日 14:23～ 1 号館 C7 会場

嫌気条件下での微生物による腐植物質からメタン生成への試み
Can microbial consortia convert humic substances to methane under anaerobic conditions?
○上野 晃生[1]、玉澤 聡[1]、玉村 修司[1]、村上 拓馬[1]、木山 保[1]、猪股 英紀[1]、山口 眞司[2]、青山 秀夫[2]、中島 一紀[3]、五十嵐 敏文[3]、長沼 毅[4]、金子 勝比古[1] ([1]幌延地圏環境研究所、[2]三菱マテリアル株式会社、[3]北大院・工学研究院、[4]広島大院・生物圏科学)
○Akio UENO[1], Satoshi TAMAZAWA[1], Shuji TAMAMURA[1], Takuma MURAKAMI[1], Tamotsu KIYAMA[1], Hidenori INOMATA[1], Shinji YAMAGUCHI[2], Hideo AOYAMA[2], Kazunori NAKASHIMA[3], Toshifumi IGARASHI[3], Takeshi NAGANUMA[4], Katsuhiko KANEKO[1] ([1]H-RISE, [2]Mitsubishi Material Co. Ltd., [3]Hokkaido University, [4]Hiroshima University)

【研究背景】
地下環境をはじめとする嫌気的な環境では、メタン生成アーキアがメタン生成に関わることが分かっているが、その基質はどのように供給されるのであろうか？石炭等に含まれる難分解性高分子有機物を分解し低分子有機物生成に関わる微生物群や、それら低分子有機物をさらに分解し、メタン生成アーキアの成長に必要な基質を作り出す微生物群などが複合的に働き、炭素循環の最終産物としてメタン生成アーキアによりメタンが生成される過程が提案されている [1,2]。しかしながら、メタン生成過程に至る初期段階である難分解性高分子有機物を分解し低分子有機物生成に関する機構については未解明な部分が多く、地下環境でのメタン生成機構解明の長年の問いとなっている。演者らは、難分解性有機物として地下環境に豊富に存在する「腐植物質」が生物学的な分解を受け、メタン生成アーキアの成長に必要な基質の供給源になっているのではないかと考え、微生物による腐植物質の嫌気分解に着目し研究を行ってきた [3]。過去の大会において、腐植物質分解能を有する地下環境褐炭由来の集積培養物「Sal-4」について報告した [4]。本研究では、腐植物質の一画分であるフミン酸(humic acids; HA)を用い、Sal-4 とメタン生成微生物群(H-RISE 微生物群)の共培養により腐植物質からメタンが生じるどうかを調べた。
【実験方法】
市販のフミン酸 Aldrich HA と、日本原子力研究開発機構・幌延深地層研究施設より採取した珪藻泥岩(声問層)より調製した声問層 HA を使用した [4]。嫌気培養用ハンゲートチューブを用い、炭素源となり得る有機物を含まない培養液(HRM001 培地)を調製後、Aldrich HA もしくは声問層 HA を培養液に添加した。メタン生成能のある H-RISE 微生物群と、腐植物質分解能のある Sal-4 を上記培養液に接種し、嫌気条件での共培養実験を 30℃で行った。ヘッドスペースガスを経時的に採取し、既報に従いガスクロマトグラフィーによりメタンの測定を行った [5]。
【結果および考察】
Aldrich HA を用いた場合は培養 99 日目より、声問層 HA を用いた場合は培養 71 日目より、Sal-4 および H-RISE 微生物群の共培養実験でメタン生成が確認され、培養期間を経るに従いメタン生成の上昇が確認された。一方、Sal-4 もしくは H-RISE 微生物群のいずれかのみの培養実験からはメタンは検出されなかった。以上の結果から、Sal-4 による腐植物質の分解によりメタン生成アーキアの成長に必要な基質が供給され、H-RISE 微生物群によるメタン生成が生じたと考えられる。
【参考文献】
[1)]Strąpoć *et al.* (2008) Appl Environ Microbiol 74:2424-2432.; [2)]Jones *et al.* (2010) Appl Environ Microbiol 76:7013-7022.; [3)]Ueno *et al.* (2016) Sci Rep 6:18990; [4)]2017 年度日本農芸化学会大会講演要旨集(発表番号:2J28a05); [5)]Ueno *et al.* (2018) Geomicrobiol J in press.

humic substances, methanogenesis, anaerobic conditions

発表責任者：上野　晃生（akio.ueno@h-rise.jp）

講演番号：1C7p05
講演日時：3 月 24 日 14:34～ 1 号館 C7 会場

廃棄雑草のみを原料としたメタン発酵における雑草溶出成分のメタン生産への影響

Involvement of water-soluble fraction of weed in methane production from weed waste

○松田 修平、大槻 隆司（山梨大院医工農）
○Shuhei MATSUDA, Takashi OHTSUKI (Univ. Yamanashi)

【背景・目的】

我々は、豊富なバイオマスであるにもかかわらず全く有効活用されていない雑草に着目し、雑草のみを基質として 200 mL/g $_{dry\ weed}$ 以上のメタンを生産可能な微生物群を取得した。本研究はギョウギシバという雑草を基質とし、リン酸緩衝液のみを添加した培地でメタン発酵を行っており、培地作成時のオートクレーブにより約 50%(w/w)の雑草成分が溶出することが明らかになっている。草本系バイオマスを用いたメタン発酵において基質成分の溶出について言及された例は少なく、溶出した成分を微生物群が資化するのかは明らかになっていない。本研究では雑草から溶出した成分とオートクレーブ後の残渣を単独で基質としてメタン発酵を行い、メタン生産量の比較、並びにそれぞれを資化する微生物群が異なるのかを明らかにすることを目的とした。

【方法】

粉末化し目抜き 100 μm の篩を通過したギョウギシバを 1%(w/v)含むイオン交換水をオートクレーブし、ガラス濾紙を用いて吸引濾過を行った。そして、得られた濾液を熱水抽出物、ガラス濾紙上に回収された雑草を残渣とした。0.1 M リン酸ナトリウムカリウム緩衝液(pH7.2)に、基質としてギョウギシバ 0.2 g、ギョウギシバ 0.1 g 分に相当する熱水抽出物、残渣 0.1 g のいずれかを添加し培地に用いた。ギョウギシバを基質としてメタン生産可能な微生物群の懸濁液 1 mL を加え全量 20 mL とし、気相を窒素置換後 35℃で静置することでメタン発酵を行った。培養中はメタン生産量を測定し比較するとともに、PCR-DGGE による菌相解析を行なった。

【結果・考察】

80 日間メタン発酵を行なった結果、基質 1 g あたりのメタン生産量はギョウギシバ：184.5 mL、熱水抽出物：96.8 mL、残渣：26.5 mL であった。また、PCR-DGGE を行なった結果、基質によってバンドパターンが異なっており、異なる菌相が形成されたことが示された。従って熱水抽出物および残渣をそれぞれ異なる微生物群が資化し、生成された代謝産物を微生物群間で利用することでメタン生産量の増加に至ると推察された。今後は、ナノポアシーケンサーMinION を用いた 16S rRNA 遺伝子解析により微生物群を構成する微生物を推定し、熱水抽出物および残渣をそれぞれ資化する微生物群の相互作用について解析する。

methane fermentation, weed waste, microbial community

発表責任者：松田　修平（g17dhl03@yamanashi.ac.jp）

講演番号：1C7p06
講演日時：3 月 24 日 14:55～ 1 号館 C7 会場

小胞体局在型グリセロール 3 リン酸アシル基転移酵素の過剰発現による藻類オイル生産性の飛躍的向上

Accelerated triacylglycerol production without growth inhibition by overexpression of a glycerol-3-phosphate acyltransferase in the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*

福田 智、平澤 英里、竹村 時空、高橋 颯太、チョクシ カウミール、パンチャ イムラン、田中 寛、○今村 壮輔（東工大・化生研）
Satoshi FUKUDA, Eri HIRASAWA, Tokiaki TAKEMURA, Sota TAKAHASHI, Kaumeel CHOKSHI, Imran PANCHA, Kan TANAKA, ○Sousuke IMAMURA (CLS, Tokyo Tech)

微細藻類を用いた油脂生産は再生可能エネルギー生産系の一つであり、空気中の CO_2 を炭素源とするため、CO_2 排出削減に貢献すると期待されている。藻類が生産する油脂の中でも、トリアシルグリセロール(TAG)は、メチルエステル化した後に液体燃料として利用できるため、TAG 生産性の向上はバイオ燃料生産にも直結する技術といえる。しかし、TAG の生合成や蓄積を制御する基本的な機構は不明な点が多く残されている。したがって、TAG 生産性を向上させるためには、TAG 生合成の制御機構をまず解明し、その知見を基に分子遺伝学的手法を用いて細胞の形質を改変していくことが肝要である。

我々はこれまで、窒素を含む種々の栄養量の感知とその応答で機能するタンパク質リン酸化酵素 TOR (target of rapamycin) と TAG 蓄積との関係に着目し、単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae*（シゾン）を用いて研究を行っている。その大きな理由は、TOR の活性をその特異的な阻害剤ラパマイシンにより阻害すると、栄養充足条件であるにもかかわらず、TAG の細胞内蓄積の誘導が観察されるからである。本研究では、遺伝子発現レベルの変化から、TAG 生合成における TOR の作用点を見出し、その知見を基にした TAG 生産性向上を目的にした。

TOR 阻害時における、脂肪酸合成と TAG 生合成遺伝子群の遺伝子発現レベルを解析したところ、小胞体局在型グリセロール 3 リン酸アシル基転移酵素（GPAT）をコードする *GPAT1* と *GPAT2* 遺伝子のみが顕著に誘導されることを見出した。そこで、両遺伝子をそれぞれ細胞内で過剰発現させ、TAG 蓄積量への影響を確認した。その結果、GPAT1 過剰発現株では、コントロール株に比べて 56 倍もの TAG 生産性の向上が観察された。一方、GPAT2 過剰発現による TAG 量の変化は観察されなかった。これらの結果は、GPAT1 が触媒する反応が紅藻シゾン TAG 生合成の律速段階であることを示すとともに、藻類における TAG 生産性向上の優れた標的になりうることを示している。

microalga, triacylglycerol, glycerol-3-phosphate acyltransferase

発表責任者：今村　壮輔（simamura@res.titech.ac.jp）

講演番号：1C7p07
講演日時：3 月 24 日 15:06～ 1 号館 C7 会場

単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* における 葉緑体局在脂肪酸輸送体 CmFAX1 の同定とその応用

Identification of a chloroplast fatty acid exporter protein, CmFAX1, and triacylglycerol accumulation by its overexpression in the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*

○竹村 時空、今村 壮輔、田中 寛（東工大・化生研）
○Tokiaki TAKEMURA, Sousuke IMAMURA, Kan TANAKA (CLS, Tokyo Tech)

微細藻類が産生することのできる中性脂質、トリアシルグリセロール（TAG）は、有望なバイオ燃料の原料の一つであるが、生産性が低いことが現実的な生産にとって大きな問題となっている。そして、細胞内における TAG 合成の根底にある分子メカニズムを理解することは、生産性を向上させるために必要不可欠である。藻類細胞において、TAG は小胞体で合成される一方で、脂肪酸は主に葉緑体で合成される。したがって、TAG 合成のためには、脂肪酸が葉緑体から小胞体へと輸送される必要がある。シロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* では、葉緑体の脂肪酸の輸送を担う葉緑体内膜タンパク質 AtFAX1 をコードする核遺伝子が同定されている（Li et al., 2015）。今回我々は、単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* における AtFAX1 の相同なタンパク質 CmFAX1 を同定し、解析を行ったので本学会にて報告する。まず、細胞内局在解析の結果、CmFAX1 は葉緑体に局在することが明らかになった。さらに CmFAX1 は、出芽酵母を宿主とした異種発現実験によって脂肪酸の輸送活性を示した。*C. merolae* で CmFAX1 を過剰発現すると、対照株と比較して細胞内の遊離脂肪酸量が約 0.4 倍に減少し、一方で TAG 量は約 2.4 倍に増加した。この結果は、葉緑体で合成された脂肪酸の輸出が促進され、小胞体における TAG 合成にそれらが消費されたことを示唆する。さらに、CmFAX1 過剰発現株において蓄積された TAG には、対照株では観察されない、融点が比較的低い C14：0 などの脂肪酸種が含まれていた。また、対数増殖期以降において、CmFAX1 過剰発現株の増殖速度は、対照株と比較して増加した。これは、CmFAX1 過剰発現株観察される光合成色素、クロロフィル *a* の減少に起因して、生長に必要な光が、高密度な細胞培養液においても比較的透過しやすくなったからであると考えられる。これらの結果は、CmFAX1 が藻類バイオ燃料の生産性向上のための有用な標的遺伝子であり得ることを示している。

Triacylglycerol, Biofuel, Cyanidioschyzon merolae

講演番号：1C7p08
講演日時：3 月 24 日 15:17～ 1 号館 C7 会場

アルギン酸ゲル封入培養法による微細藻類 Chlamydomonas debaryana NIES-2212 の細胞凝集体形成と増殖・トリアシルグリセロール蓄積の促進

Acceleration of Cell Growth and Lipid Accumulation in Spherical Colonies of Chlamydomonas debaryana NIES-2212 Encapsulated in Alginate Gel

○吉冨 徹[1]、神永 紗英子[1]、佐藤 直樹[1]、豊島 正和[1]、森山 崇[1]、吉本 敬太郎[1,2]（[1]東大総文・生命、[2]JST・さきがけ）
○ Toru YOSHITOMI[1], Saeko Kaminaga[1], Naoki Sato[1], Masakazu Toyoshima[1], Takashi Moriyama[1], Keitaro Yoshimoto[1,2] ([1]Univ. of Tokyo, [2]JST, PRESTO)

【背景と目的】近年、微細藻類を用いた物質生産技術は、バイオ燃料、医薬品、食料、プラスチック等の幅広い応用が期待されている。これらの応用技術を実用化するうえで、微細藻類の大規模培養や物質の産生効率を高めることが必要不可欠である。近年、微細藻類の野外大規模培養が検討されているものの、細胞の回収に手間とコストがかかるだけでなく、異種微生物の繁殖や微細藻類の周辺環境への飛散などの問題が指摘されている。そこで、本研究では、高分子ゲルに微細藻類細胞を封入する培養法に着目した。微細藻類を高分子ゲルに封入することで、回収が容易になるだけでなく、外部からの微生物の侵入や周辺環境への飛散を防ぐことができる。本発表では、アルギン酸ゲル内に封入した微細藻類 *Chlamydomonas debaryana* (*C. debaryana*)の増殖能およびトリアシルグリセロール(TAG)蓄積能について報告する。

【方法】褐藻由来のアルギン酸ナトリウムと *C. debaryana* の混合溶液を塩化カルシウム溶液に滴下し、アルギン酸ゲルビーズ内に *C. debaryana* を封入した。光独立条件下で培養し、エチレンジアミン四酢酸を用いてゲルを溶解することにより細胞を回収し、細胞数、乾燥重量、クロロフィル量、タンパク質量を測定した。細胞内に蓄積した脂質を中性脂質染色試薬である二フッ化ホウ素ジピロメテン(BODIPY)を用いて染色し、蛍光顕微鏡観察を行った。さらに細胞内脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィーによる脂質の分離後、細胞内に蓄積した TAG の定量を行った。

【結果と考察】アルギン酸ゲルビーズ内に *C. debaryana* を封入した後、光独立条件下で培養した。ゲルに封入することにより球状の細胞凝集体を形成し、通常培養と比較して増殖速度及び TAG の蓄積量が増大することが分かった。細胞増殖と TAG 蓄積を考慮すると、ゲル封入培養法は、通常培養法に比べて約 5 倍バイオ燃料生産効率を高められる。以上の結果から、アルギン酸ゲル封入培養法は、*C. debaryana* の増殖および脂質蓄積を向上させ、物質の産生効率を高める培養法であることが示された。

Microalgae, Biofuels, Gel encapsulation

発表責任者：吉冨徹（t_yoshitomi@bio.c.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：1C7p09
講演日時：3 月 24 日 15:28～ 1 号館 C7 会場

微細藻類由来不飽和脂肪酸を原料としたメタセシス反応の検証

Olefin metathesis of unsaturated fatty acids from Aurantiochytrium

○富澤 哲、大島 賢治 (熊本高専)
○Satoshi TOMIZAWA, Kenji Oshima (NIT, Kumamoto College)

【背景と目的】

循環型社会の構築を目指す現代、バイオマス資源を原料とした脂肪族化合物と芳香族化合物の生産が求められている。バイオエタノールやバイオポリエステルなどの脂肪族化合物の生産は産業化を目指した段階にある。一方で、ベンゼンなどの芳香族化合物は細胞毒性を示すため、大量発酵生産には課題がある。そこで、グルコースの発酵生産で得られる不飽和脂肪酸を原料としたベンゼンの合成を発想した。オーランチオキトリウム（*Aurantiochytrium*）属など一部の微細藻類は、グルコースを原料として細胞内にドコサヘキサエン酸（DHA）を蓄積する。DHA は６つの不飽和結合を有する脂肪酸である。触媒を用いたオレフィンメタセシス反応により、DHA を 1,4-シクロヘキサジエン（1,4-CHD）へと変換し、続く触媒反応によりベンゼンと水素を取得する。本研究では、２つの不飽和結合を有し、DHA より容易に入手可能なリノール酸メチルを原料とした 1,4-CHD の合成を検証した。

【方法と結果】

生物油脂のモデルとしてリノール酸メチルについて、オレフィンメタセシス反応を行った。反応物をガスクロマトグラフィーで分析したところ、1,4-CHD が含まれていた。1,4-CHD は白金触媒により容易に芳香族化するため、ベンゼンと水素の供給源として期待できる。また、*Aurantiochytrium* sp. から抽出した不飽和脂肪酸を原料とした 1,4-CHD への変換も検討した。

unsaturated fatty acid, olefin metathesis, Aurantiochytrium

講演番号：1C7p10
講演日時：3 月 24 日 15:39～ 1 号館 C7 会場

緑色 LED を用いた微細藻類バイオマス増産技術の開発
Green LED light is suitable for high-biomass cultivation and growth acceleration of *Chlamydomonas reinhardtii*

○加藤 悠一[1]、藤川 康夫[2]、三島 俊介[3]、泉田 智史[4]、蓮沼 誠久[1,5]、近藤 昭彦[1,5,6] ([1]神戸大先端バイオ工、[2]日亜化学工業、[3]大塚電子、[4]ヒューマン・チップス、[5]神戸大院科技イノベ、[6]神戸大院工)
○ Yuichi KATO[1], Yasuo FUJIKAWA[2], Shunsuke MISHIMA[3], Satoshi IZUTA[4], Tomohisa HASUNUMA[1,5], Akihiko KONDO[1,5,6] ([1]Kobe Univ. Eng. Biol. Res. C, [2]Nichia Corp., [3]Otsuka Electronics Co., Ltd., [4]HumanChips Inc., [5]Kobe Univ. Sci., Technol. and Innov., [6]Kobe Univ. Chem., Sci. and Eng.)

【背景・目的】
微細藻類は、光合成により二酸化炭素からバイオマス生産を行うことが可能であり、陸上植物と比較して成長が速いことから、バイオ燃料など様々な有用物質の生産に期待されている。微細藻類の光独立栄養条件におけるバイオマス生産は光条件に絶対的な制限を受ける。バイオマス生産量を増やすために培養槽を大きくする場合、光合成に十分な光が届くのは受光面付近のみであり、水深を深くするほど培養液あたりの光量が減少し、細胞密度が低下してしまう。その一方で、バイオマス生産量を増やすために強光を照射することは光酸化ストレスを誘発し、微細藻類の生育に悪影響を及ぼす要因となりうる。高いバイオマス生産性を達成するためには、細胞密度と細胞増殖を両立しうる、微細藻類の培養に適した光条件の解明が必要である。微細藻類の培養は、太陽光を利用して屋外で行うことが望ましいが、より高付加価値な物質の生産では LED などの人工照明を利用した屋内培養も視野に入る。本研究では、クロロフィルに吸収されにくいことから微細藻培養液の深い深度まで届く緑色光に着目し、緑色光の利用によるバイオマス生産の検討し、緑色光が微細藻類に及ぼす影響を解明することを目的とした。
【方法】
光独立栄養条件にて緑色 LED（ピーク波長 530 nm）および赤色 LED（ピーク波長 660 nm）を用いて微細緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* を培養した。
【結果・考察】
光強度 100、200、600 μmol/m^2/s の赤色光および緑色光を用いて培養したところ、全ての光強度で緑色光条件における最大バイオマス生産量が赤色光条件のそれを上回った。微細藻類の培養においてバイオマス生産量を高めるのに緑色光を用いた培養が有効であることが示唆される。また、100、200 μmol/m^2/s では赤色光条件の方が高い増殖速度を示したが、600 μmol/m^2/s の強光条件では緑色光条件の方が高い増殖速度を示した。100、200、600 μmol/m^2/s の緑色光条件では光強度を上げるほど増殖速度が高くなる傾向が見られた。このことから、強光照射によって微細藻類のバイオマス生産速度を上げる用途にも緑色光が適している可能性が示される。強光条件において緑色光の増殖速度が赤色光のそれを上回った原因として、光酸化ストレスの低減が考えられる。現在、各光条件における光酸化ストレスを一重項酸素量により評価しており、その結果についても報告する予定である。

biomass, LED, microalgae

発表責任者：加藤悠一（yuichi@shark.kobe-u.ac.jp）

講演番号：1C7p11
講演日時：3 月 24 日 16:00～ 1 号館 C7 会場

脂肪族アルコールを蓄積する細菌から取得した脂肪族アルコール合成遺伝子群について
A gene cluster for fatty alcohol synthesis from a *Reinekea*-related bacterium that accumulates fatty alcohols
○寺本 真紀（高知大農林海洋）
○Maki TERAMOTO (Kochi Univ.)

目的

脂肪族アルコールは、化粧品添加物、薬、燃料など多様な用途がある。近年、脂肪族アルコールを合成する遺伝子が発見され、再生可能な原料から安価に大量生産できる可能性が開かれた。しかし、これまでに発見された脂肪族アルコール合成遺伝子では、この遺伝子を発現させた細胞内での脂肪族アルコールの蓄積（生産）量が低いため、大量生産が難しかった。そこで、本研究では、細胞あたりで脂肪族アルコールを高蓄積させる新たな遺伝子を探索した。

結果

発表者は、脂肪族アルコール（$C_{14,16,18}$）を乾重量の 1%（w/w）以上も蓄積する海洋細菌を発見した。この菌は系統的に *Reinekea* 属と近縁だった。そして、この菌から脂肪族アルコールを合成する新規遺伝子群 *phsAB* を発見した。アミノ酸配列の比較で、PhsA は脂肪酸アシル CoA レダクターゼと 51%の相同性を示し、PhsB は既知のタンパク質と顕著な相同性を示さなかったがリパーゼと低い相同性を示した。興味深いことに、*phsA* のみの発現で、大腸菌は乾重量の 19%（w/w）も脂肪族アルコールを蓄積するようになった。さらに、*phsB* も同時に発現させると、大腸菌は乾重量の 24%も脂肪族アルコールを蓄積するようになり、増殖速度も速くなった。このことから、*phsAB* が、脂肪族アルコールの環境にやさしい安価な大量生産に大いに役立つ可能性が示された。

本成果は、「A gene cluster for fatty alcohol synthesis from a *Reinekea*-related bacterium that accumulates fatty alcohols. Maki Teramoto. FEBS Lett. 2018. 592: 3421–3428.」に掲載されています。
また、特許出願「寺本真紀 小松あゆみ　脂肪族アルコール合成細菌及び脂肪族アルコールの製造方法　特願 2018-83292」もされています。

Fatty alcohol synthesis, *Reinekea*, Fatty acyl-CoA reductase

発表責任者：寺本真紀（maki.teramoto@kochi-u.ac.jp）

講演番号：1C7p12
講演日時：3 月 24 日 16:11～ 1 号館 C7 会場

反転を伴う回転振盪による油脂資化性酵母の培養

Cultivation of Lipid Assimilating Yeast Using Rotary Shaking Culture with Inversion

○小林 由衣乃[1]、川村 奈々[2]、竹園 恵[1]、中島 敏明[3]、茂野 俊也[4]、小野寺 正幸[1] ([1]新潟工大院生産開発工、[2](株)プリス、[3]筑波大院生命環境、[4]つくば環微研)
○ Yukino KOBAYASHI[1], Nana KAWAMURA[2], Satoshi TAKESONO[1], Toshiaki NAKAJIMA[3], Toshiya SHIGENO[4], Masayuki ONODERA[1] ([1]Niigata Inst. of Tech., [2]PRECi co., Ltd, [3]Tsukuba Univ., [4]Lab. Tsukuba Env. Microb)

【目的】廃食用油の有効活用として、安価な窒素源（N 源）と無機塩の添加により微生物菌体を培養し、その菌体を家畜並びに養魚用飼料とすることを目指している。油脂資化性酵母 *Meyerozyma guilliermondii* TY-89（TY-89）を用いて市販の植物油を炭素源（C 源）とした場合、回転振盪培養において、通常の三角フラスコよりもバッフル付き三角フラスコの方が、生育が良好であること、界面活性剤の添加により通常の三角フラスコでもバッフル付き三角フラスコを用いた場合と同等の生育を認めたことを 2015 年度の本大会で報告した。[1)] また、市販のラードを C 源とした場合でもバッフル付き三角フラスコが有効であることを一昨年報告した。[2)]すなわち、C 源として非水溶性の食用油は、その微細化が菌体の生育に効果的であることを明らかにした。一方、バッフル付き三角フラスコは培養終了後、通常の三角フラスコよりも洗浄が困難であること、さらに価格も高価であるため、通常の三角フラスコでの培養が望ましいと考えられる。そこで、回転振盪に反転を伴わせることにより、反転時の急激な流れの変化による液体培地表面の乱れが増大し、非水溶性 C 源を微細化させることが可能ではないかと考え、通常の三角フラスコでもバッフル付きの三角フラスコと同程度、またはそれ以上の生育が得られるものと期待した。今回は、植物油を C 源とした場合での反転を伴う回転振盪培養での TY-89 の生育について検討を行った。
【方法と結果】グルコース、ペプトン、酵母エキスからなる GPY 培地 [1)]で、30℃24 時間回転振盪培養したものを前培養とした。本培養に用いる培地は、C 源として市販の植物油 10g/L、N 源として硫酸アンモニウム 2g/L、その他無機塩からなる無機塩培地とした。500ml 容三角フラスコ（培地量 100ml、シード接種量 4ml）で、30℃、120rpm の回転振盪培養を行った。菌体量は Whatman 製 glass microfiber filters, Grade GF/B を用いた乾燥菌体重量法によって測定した。時計方向から反時計方向、反時計方向から時計方向に回転している時間を反転時間と定めた。反転時間を 2 秒間とした場合、安定して 120rpm には到達せず、3 秒間とした場合に安定して 120rpm に到達したため、まずは、反転時間を 3 秒間とした。通常の三角フラスコで培養してもバッフル付き三角フラスコでの通常の回転振盪培養と同程度の生育挙動を認めた。次いで、反転時間を 6 秒間として培養を行ったが、この条件でも通常の三角フラスコでもバッフル付き三角フラスコと同程度の生育であった。現在、さらに反転時間を変化させ生育への影響について検討している。
謝辞：本研究は、新潟工科大学 風・流体工学研究センターの研究課題として行われた。
1) 佐藤、竹園、中島、茂野、小野寺、日本農芸化学会 2015 年度講演要旨集、2C25p12.
2) 小林、日下部、竹園、中島、茂野、小野寺、日本農芸化学会 2017 年度講演要旨集、3J27a10.

lipid assimilating yeast, rotary shaking culture, inversion

発表責任者：小野寺 正幸（onodera@acb.niit.ac.jp）

講演番号：1C7p13
講演日時：3 月 24 日 16:22～ 1 号館 C7 会場

ラビリンチュラ類オーランチオキトリウム属の酢酸資化時のメタボローム解析と脂肪酸生産性向上に向けた育種標的探索

Exploring of targets to improve the fatty acid productivity of *Aurantiochytrium limacinum* SR21 grown in acetate medium by metabolome analysis.

ペレズ チャローズ、○渡邉 研志、廣谷 蘭、岡村 好子、中島田 豊、秋 庸裕（広島大院・先端）
Charose M. T. PEREZ, ○Kenshi WATANABE, Ran HIROTANI, Yoshiko OKAMURA, Yutaka NAKASHIMADA, Tsunehiro AKI (1) Grad. Sch. Adv. Sci. Matter, Hiroshima Univ.)

【背景】海洋性真核微生物ラビリンチュラ類オーランチオキトリウム属は有機物を資化して高度に増殖し、長鎖飽和脂肪酸、高度不飽和脂肪酸、キサントフィルなどの有用脂質を細胞内に蓄積する。オーランチオキトリウムはグルコースやキシロースなどの単糖類を主に炭素源として資化するが、本微生物を多様な産業分野において利用するためには、より安価で豊富に存在する培養基質を利用できることが望ましい。演者らは海洋及び陸上の余剰・非可食バイオマスや産業廃棄物系バイオマスのオーランチオキトリウムの培養基質としての利用を試みており、近年、本微生物の酢酸資化性に着目して、多様なバイオマスを酢酸に変換する酢酸生成菌とオーランチオキトリウムからなる 2 段階油脂発酵系を確立した。本研究ではオーランチオキトリウムの酢酸資化時の増殖及び脂肪酸収量とともに細胞内代謝物を網羅的に解析し、酢酸からの脂肪酸生産性向上に向けた育種ターゲットの探索を試みた。
【結果・考察】パルミチン酸やドコサヘキサエン酸を主とする脂肪酸を高生産する *Aurantiochytrium limacinum* SR21 株を、種々の濃度の酢酸を唯一炭素源とする培地で培養したところ、40 g/L の酢酸を含む培地で細胞収量及び脂肪酸収量は最大（それぞれ 13.43 g/L、3.22 g/L）となった。30 g/L のグルコースまたは酢酸を含む培地で同株を培養して細胞収量と脂肪酸収量の経時変化を調べたところ、酢酸資化時はグルコース資化時と比べて増殖及び脂肪酸生産速度の低下が認められた。酢酸からの脂肪酸生産性向上に向けた育種標的の探索のため、対数増殖期の初期と後期及び定常期で回収した細胞から細胞内代謝物を抽出し、GC-MS 及び LC-MS で分析した。GC-MS で得た解析データを主成分分析に供して酢酸資化時に細胞内存在量が顕著に増加する物質を調べたところ、対数増殖期初期において各種ステロイド化合物の増加が認められた。従って、ステロイドの生合成経路であるメバロン酸経路が活性化されており、脂肪酸生合成の基質であるアセチル CoA を大量に消費していることが推測された。LC-MS で得た結果をクラスター分析に供したところ、酢酸資化によるクエン酸回路の活性化、解糖系及びペントース-リン酸経路の抑制が示唆され、細胞増殖に必要な ATP や脂肪酸生合成の補酵素である NADPH が酢酸資化時には不足していることが示唆された。また、酢酸資化時はクエン酸回路の変形回路であるグリオキシル酸回路が稼働しており、それに伴う NADH の不足が細胞増殖を鈍化させていることが示唆された。現在はメタボローム解析で得られた情報をもとに脂肪酸生産性向上に向けた代謝改変を検討しており、その詳細について報告する。

Lipid production, Metabolomics, Microalgal oil

発表責任者：秋庸裕（aki@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：1D1a06
講演日時：3 月 24 日 10:05～ 1 号館 D1 会場

外部から加えたスーパーオキシド消去酵素によるアフラトキシン生産の制御機構
Inhibitory mechanism of aflatoxin production by externally added superoxide dismutase
○古川 智宏、作田 庄平（帝京大理工）
○Tomohiro FURUKAWA, Shohei SAKUDA (Teikyo Univ)

【目的】

Aspergillus flavus や *Aspergillus parasiticus* の生産するアフラトキシン (AF) 類による穀類の汚染は世界中で見られ、毎年多額の経済被害をもたらすとともに約 50 億人が慢性的な健康リスクに曝されている。現在展開・開発が進められている汚染防除法の最適化や、新規の防除策の開発のためにも AF 生産調節機構の解明が求められる。最近、活性酸素種 (ROS) と AF 生産の関わりが注目され、過酸化水素が AF 生産を亢進する一方、低分子抗酸化物質は AF 生産を抑制すると考えられている。本研究では、ROS の中でもスーパーオキシドに着目し、外部から加えたスーパーオキシド発生剤とスーパーオキシド消去酵素 (SOD) が AF 生産に与える影響を調べた。

【方法】

A. flavus IFM 47798 株の胞子をポテトデキストロース培地に植え 28℃で 2 日間培養し、培養液中のアフラトキシン B_1 をクロロホルム抽出後 HPLC により定量した。液体窒素下で破砕した菌体について、タンパク質を抽出し SOD 活性を測定、また RNA を精製しリアルタイム PCR を行った。SOD 活性は WST-1 のキサンチンオキシダーゼによる還元の阻害率から算出した。ミトコンドリアおよび細胞質基質に局在する蛍光試薬 mitoSOX と DHE を用いて菌体中のスーパーオキシドを定量した。

【結果及び考察】

スーパーオキシド発生剤パラコートは、菌体の生育に影響を与えず AF 生産を IC_{50} 54.9 μM で阻害した。培養液に加えたウシ SOD はパラコートによる AF 生産阻害を回復させた一方、単独では IC_{50} 18 μg/mL で AF 生産を阻害した。SOD 活性測定の結果、添加した SOD の約 1/100 の活性が菌体抽出物に検出されたが、これは培養途中に菌を洗浄し再度培養した場合も同様であり、細胞内に SOD が取り込まれていると考えられた。パラコートにより引き起こされたミトコンドリアおよび細胞質基質のスーパーオキシドの増加は SOD により抑制されたが、SOD 単独ではスーパーオキシド量に有意な変化を与えなかった。更に、パラコートは *aflR* を含む AF 生合成遺伝子の転写量を減少させた一方、SOD は AF 生合成遺伝子には影響を与えず SOD 遺伝子及びエタノール発酵酵素遺伝子の転写量を変化させた。以上から、細胞内スーパーオキシドの増加は AF 生合成遺伝子の発現減少による AF 生産の減少を引き起こす一方で、外部から加えた SOD はスーパーオキシドの消去とは異なるメカニズム、即ち転写に影響を与えメタボロームを変化させることにより、AF 生産を変化させると考えられた。

aflatoxin, *Aspergillus flavus*, superoxide dismutase

発表責任者：古川智宏（furukawa@nasu.bio.teikyo-u.ac.jp）

講演番号：1D1a07
講演日時：3 月 24 日 10:16～ 1 号館 D1 会場

糸状菌における RNA 結合タンパク質 NrdA の機能解析
Functional analysis of RNA binding protein NrdA in *Aspergillus*.
○門岡 千尋[1]、泉津 弘佑[2]、浅井 禎吾[3]、奥津 果優[1]、吉﨑 由美子[1]、髙峯 和則[1]、後藤 正利[1,4]、玉置 尚徳[1]、二神 泰基[1] ([1]鹿児島大・連農、[2]滋賀県立大・環境科学、[3]東京大院・総合文化、[4]佐賀大・農)
○ Chihiro KADOOKA[1], Kosuke IZUMITSU[2], Teigo ASAI[3], Kayu OKUTSU[1], Yumiko YOSHIZAKI[1], Kazunori TAKAMINE[1], Masatoshi GOTO[1,4], Hisanori TAMAKI[1], Taiki FUTAGAMI[1] ([1]Unit. Grad. Sch. Agri. Sci. Kagoshima Univ., [2]Grad. Sch. of Env. Sci., Univ. of Shiga Pref., [3]Grad. Sch. Arts & Sci., Univ. of Tokyo., [4]Fac. Agric., Saga Univ.)

糸状菌のゲノム上には様々な二次代謝生合成遺伝子クラスターが存在する。これらの二次代謝生合成遺伝子クラスターの多くは転写が起きづらいヘテロクロマチン領域に存在するため、通常の培養条件では発現しておらず、クロマチンリモデリングによりエピジェネティックに制御されることが報告されている。近年、出芽酵母においてヘテロクロマチン領域の転写は活発に起きているものの、速やかに分解されていることが報告された。そこで、糸状菌において、ヘテロクロマチン領域の RNA 分解と二次代謝生産との関連性に興味がもたれた。本研究は、出芽酵母の RNA 分解制御機構において標的 RNA の認識を行う Nrd1 のホモログを解析対象として、糸状菌における RNA 分解制御と二次代謝生産との関連を明らかにすることを目的とした。
まず、モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* において出芽酵母 *nrd1* のホモログである *nrdA* の破壊株の構築を試みたが、破壊株を取得できなかったため、Tet-On システムの制御による *nrdA* コンディショナル発現株を構築した。この Tet-*nrdA* 株は *nrdA* の発現非誘導条件においてはコロニーを形成できず、*A. nidulans* において *nrdA* は必須遺伝子であることが示唆された。また、Tet-*nrdA* 株は過剰発現条件においても野生株と比較して、生育が遅延し、分生子形成能が低下した。また、菌体外に茶色い色素を分泌したため、二次代謝生産に変化があることが示唆された。次に抗生物質生産性について解析したところ、Tet-*nrdA* 株は野生株と比較して大腸菌に対する生育阻止円が大きくなったことから、NrdA の過剰発現により、ペニシリン等の抗生物質を高生産する可能性が示唆された。また、有性世代への影響について解析したところ、Tet-*nrdA* 株は野生株と比較して子嚢殻の数が増加し、その赤紫色の色素が薄くなったため、NrdA は有性世代への移行と色素生産に関与することが示唆された。さらに、他の *Aspergillus* 属糸状菌における NrdA の過剰発現の影響を調べるため、白麹菌 *Aspergillus kawachii* において Tet-*nrdA* 株を構築した。AkTet-*nrdA* 株も *nrdA* の発現非誘導条件ではコロニーを形成できず、過剰発現により生育が遅延し、菌糸に茶色い色素が沈着した。このことから、白麹菌においても NrdA の過剰発現は二次代謝生産を促進する可能性が示唆された。以上の結果より、NrdA は糸状菌において生育に必須な遺伝子であり、菌糸伸長、分生子形成、有性世代への移行、二次代謝などの様々な生命現象に関わることが示唆された。

RNA binding protein, secondary metabolism, *Aspergillus*

発表責任者：二神泰基（futagami@chem.agri.kagoshima-u.ac.jp）

講演番号：1D1a08
講演日時：3 月 24 日 10:27～ 1 号館 D1 会場

麹菌二次代謝系の転写制御の分泌性ルシフェラーゼによる迅速な解析
Rapid analysis of transcription regulation of secondary metabolism genes in Aspergillus oryzae
○町田 雅之、石井 智子、佐野 元昭（金沢工大ゲノム研）
○Masayuki Machida, Tomoko Ishii, Motoaki Sano (Kanazawa Inst. of Technol.)

麹菌の二次代謝系遺伝子は、その多くが発現を抑制されたサイレントな状態になっていることが知られているが、例えばコウジ酸の生合成に関わる遺伝子は、高い糖濃度、窒素源の抑制、長時間培養という特殊な培養条件で旺盛に発現することが知られている。二次代謝系遺伝子は、他の糸状菌種でもその多くが通常の条件では抑制されており、培養条件を変更して試したとしても、一般的にゲノム上に存在する二次代謝系遺伝子の 1 割程度しか発現させることできない。二次代謝系遺伝子の発現には様々な条件とその組合せが関与しており、発現する条件を探し出すことは非常に難しい。このことは、二次代謝の研究や生理活性物質のスクリーニングの観点から大きな課題であり、「眠る宝庫」と考えられるこれらの遺伝子を発現させるために、転写制御因子をひとつひとつ組み換えて高発現化するなどの膨大な努力が払われている。そこで本研究では、(1)様々な培養条件とその組合せを迅速に探索することによって、迅速・効率的に発現条件を見つけ出すこと、(2)様々な二次代謝系遺伝子の発現条件を比較解析することで、二次代謝系遺伝子の発現する可能性が高い培養条件とその組合せを推定することを目的として、簡便・迅速な測定が可能な新規なレポーター遺伝子系の構築と評価、及び、学術・産業的に重要な二次代謝系遺伝子の発現制御の解析を行った。

麹菌ゲノム上の遺伝子より、メバロン酸、コウジ酸、ペニシリンなどの生合成遺伝子クラスタ、*laeA* などを候補として選択した。これらの遺伝子のプロモーター領域の下流に、*glaA* 遺伝子を融合化して分泌性としたルシフェラーゼを接続した DNA 断片を作製した。この断片を上記遺伝子のプロモーター下流に組込むことによって、これらの制御下に培地中にルシフェラーゼを分泌する形質転換体を得た。*amyB* プロモーターをコントロールとした実験により、マルトースによる誘導性が簡便かつ明瞭に判別された。メバロン酸生合成系の遺伝子である *mel1B* のプロモーターの解析では、小麦ふすまでの高い誘導が観察されると共に、培養温度を下げることによる厳密な誘導が観察された。また、二次代謝のグローバルな転写制御因子として知られる *laeA* のプロモーターでは、ふすまなどの固形物や長時間の培養はその発現に抑制的であった。分泌されたルシフェラーゼは、低 pH で安定性の低下が認められたため、培地に緩衝能を持たせた。現在、レポーターの種類を増やすとともに、構築されたレポーター株を用いて、様々な培養条件とその組合せについて検討を行っている。また、シグナル伝達系の破壊株へのレポーターの導入を進めている。これらにより、様々な二次代謝制御遺伝子系について、シグナル伝達系の関与の有無を含めて、転写制御メカニズムの解析を進めているところである。

secondary metabolism gene, secretory reporter, Aspergillus oryzae

発表責任者：町田雅之（m.machida@neptune.kanazawa-it.ac.jp）

講演番号：1D1a09
講演日時：3 月 24 日 10:38～ 1 号館 D1 会場

トリコテセン系かび毒脱アセチル化酵素遺伝子 *Tri104* の発現様式の解析
Analysis of expression pattern of trichothecene deacetyl esterase, *Tri104*

○前田 一行[1,3]、富永 直樹[2]、兵藤 壮一郎[2]、中嶋 佑一[3]、杉浦 涼介[3]、服部 明日希[3]、松山 桃子[3]、大里 修一[1]、鎌倉 高志[2]、木村 真[3] ([1]明大農、[2]東理大・理工、[3]名大院・生命農)
○Kazuyuki MAEDA[1,3], Naoki TOMINAGA[2], Soichirou HYODO[2], Yuichi NAKAJIMA[3], Ryosuke SUGIURA[3], Asuki HATTORI[3], Momoko MATSUYAMA[3], Shuichi OHSATO[1], Takashi KAMAKURA[2], Makoto KIMURA[3] ([1]Meiji Univ., [2]Tokyo Univ. of Sci., [3]Nagoya Univ.)

【背景と目的】

赤かび病菌 *Fusarium graminearum* は有毒なトリコテセン系かび毒を生産する。この二次代謝物は多様な側鎖修飾様式を示すことが知られており、その大きな要因としてトリコテセン後期生合成経路で作用する脱アセチル化エステラーゼの存在が挙げられる。先行研究において、同酵素をコードする *Tri8* 遺伝子のパラログと考えられる *Tri104* 遺伝子の存在が明らかとなった。*Tri104* 遺伝子は、トリコテセン類の一種であるニバレノール（NIV）生合成経路において、固体培地条件でのみ C-4 脱アセチル化活性を示して NIV の生産に寄与する興味深い性質を備えていた。そこで本研究では、C-4 脱アセチル化活性をコードする *Tri104* 遺伝子を対象に、液体・個体培養条件下における同酵素遺伝子の発現様式の比較や制御様式について調査を試みた。

【方法】

Tri104 遺伝子の発現様式の解析には、*F. asiaticum* MAFF 111233（NIV 生産菌）を供した。液体培地には、かび毒非生産性の YG（0.5% yeast extract, 2% グルコース）液体培地、及びかび毒生産性の rice flour（RF）液体培地（3% 米粉, 5% スクロース, 1% yeast extract）および RF 固体培地を用いた。まず、MAFF 111233 株をカルボキシメチルセルロース（CMC）液体培地で前培養した後、培養液の一部を YG 液体培地、RF 液体培地、RF 固体培地にそれぞれ植菌し、培養した。培養開始から 2, 3, 5, 7, 10 日後に各培地の培養菌糸から total RNA を抽出し、トリコテセン生合成経路遺伝子（*Tri5*, *Tri104*）の発現量をノーザンブロット法により経時的に解析した。また、*Tri104* 遺伝子の発現制御について調査するため、トリコテセンを正に制御する *Tri6*, および *Tri10* 遺伝子の破壊株を用いて、RF 液体培地における *Tri104* 遺伝子の発現量をノーザンブロット解析により評価した。

【結果および考察】

ノーザンブロット解析の結果、*Tri104* 遺伝子は、培地の種類を問わず 2-3 日目以降に発現が確認でき、さらに長時間にわたって発現し続けていることが明らかとなった。*Tri104* 遺伝子は毒素非生産培地である YG 液体培地でも発現が認められたことに加え、*Tri6*, *Tri10* 遺伝子破壊株においても発現が確認できたため、TRI6 や TRI10 の制御下には無いことも明らかとなった。以上の結果から、TRI104 本来の機能はトリコテセン生合成経路酵素とは別のものであり、進化の過程でトリコテセン類の脱アセチル化に寄与するようになったものと考えられる。

trichothecene biosynthesis, deacetyl esterase, expression analysis

発表責任者：前田 一行（kmaeda@meiji.ac.jp）

講演番号：1D1a10
講演日時：3 月 24 日 10:49～ 1 号館 D1 会場

Fusarium graminearum のトリコテセン生産制御におけるグリシン開裂系の役割

Role of glycine cleavage system in regulation of trichothecene biosynthesis in *Fusarium graminearum*.

○中嶋 佑一[1]、前田 一行[2]、塩原 拓也[1]、赤坂 まな美[1]、金丸 京子[1]、小林 哲夫[1]、西内 巧[3]、木村 真[1] ([1]名大院生命農、[2]明治大院農、[3]金沢大学際科学)

○Yuichi NAKAJIMA[1], Kazuyuki MAEDA[2], Takuya SHIOBARA[1], Manami AKASAKA[1], Kyoko KANAMARU[1], Tetsuo KOBAYASHI[1], Takumi NISHIUCHI[3], Makoto KIMURA[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Meiji Univ., [3]Kanazawa Univ.)

【研究の背景】

植物病原菌 *Fusarium graminearum* はトリコテセン系かび毒（毒素）を生産して穀粒を汚染し、食の安全を脅かす。穀類の毒素低減化に向けた我々のこれまでの研究から、玄米粉固体培養時にトレオニン （Thr）を添加することで本菌の毒素生産が抑制されること、Thr 添加によって毒素生合成（*Tri*）遺伝子群が転写レベルで抑制されることを見出している。本研究では特定のアミノ酸の処理によるトリコテセン生合成の抑制機構を明らかにすることを目的に、関与する候補遺伝子の探索、発現解析、破壊株作製・解析を行った。

【結果と考察】

玄米粉固体培養時の Thr 添加区において培養初期過程特異的に発現が変化する遺伝子群を定量的 RT-PCR によって調査したところ、Thr 代謝系に関わる遺伝子群では threonine aldolases (TAs: *FGSG_05335* および *FGSG_12344*) や glycine decarboxylase P subunit (GCV2) をコードする遺伝子の顕著な発現上昇が認められた。TAs の破壊株では Thr の資化能が大幅に低下したことから本菌は Thr 代謝において TAs が主要な働きをすることが明らかとなった。一般的に Thr 代謝の過程で TA は Thr をグリシン（Gly）へと変換し、代謝を進行させる。そこで続いて起こる Gly 代謝の影響を調べるため、Thr 添加で発現上昇が認められた GCV2 の遺伝子破壊株を作出した。得られた遺伝子破壊株は玄米固体培地で生育は可能であったものの、Thr や Gly を添加した際に生育の阻害が認められた。このような生育阻害の原因として、本遺伝子破壊株はグリシン開裂系の機能が欠損することから、Gly をセリン（Ser）へと変換してゆく過程で 5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸 (5, 10-CH_2-THF)が枯渇することが生育阻害の原因となることが想定された。毒素生産を誘導する液体培養における解析では GCV2 破壊株は Gly 添加で毒素生産の顕著な上昇を示し、Gly 及び Ser を同時添加すると毒素生産の上昇効果が消失した。上記結果は Gly 添加による細胞内 5, 10-CH_2-THF の枯渇が毒素生産を誘導したと予想され、また Ser 同時添加系では 5, 10-CH_2-THF が Ser から供給されうる状況であったことから、細胞内における 5, 10-CH_2-THF 量が毒素生産制御に大きく影響することが示唆された。

【謝辞】

本研究は、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業の支援を受け行われたものである。

Fusarium graminearum, Trichothecene, Glycine cleavege system

講演番号：1D1a11
講演日時：3 月 24 日 11:10～ 1 号館 D1 会場

麹菌におけるステロール合成関連遺伝子の破壊によるポリケタイド化合物の増産効果
Improvement of polyketide yields by the deletion of sterol biosynthesis-related genes in *Aspergillus oryzae*

○菅 英一郎[1,2]、勝山 陽平[1,3]、丸山 潤一[1,3]、玉野 孝一[4]、小山 泰二[2]、大西 康夫[1,3]([1]東大院・農生科・応生工、[2]野田産研、[3]東大・微生物イノベ連携機構、[4]産総研)
○Eiichiro KAN[1,2], Yohei KATSUYAMA[1,3], Jun-ichi MARUYAMA[1,3], Koichi TAMANO[4], Yasuji KOYAMA[2], Yasuo OHNISHI[1,3] ([1]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., Univ. of Tokyo, [2]Noda Inst. Sci. Res., [3]CRIIM, [4]AIST)

【背景・目的】一般に糸状菌は高い二次代謝産物生産能を有している。しかしながら、麹菌 *Aspergillus oryzae* では多くの二次代謝産物生合成遺伝子を保有しているにもかかわらず、その多くは発現していないことが知られている。このため、異種の二次代謝産物生合成遺伝子を導入した際に合成される化合物の解析が容易であるため、麹菌の異種二次代謝産物生産宿主としての利用が期待されている。しかし、麹菌を宿主として利用するにはいくつかの障壁があり、その一つが細胞内における基質の供給である。これまでに、我々は麹菌にクルクミノイド合成酵素（CUS）をコードする遺伝子を導入し、CUS の開始基質アナログである feruloyl-NAC から植物由来ポリケタイド化合物であるクルクミンを生産する系を構築してきた。この系において、伸長基質として利用される malonyl-CoA を生成する acetyl-CoA carboxylase をリン酸化しその酵素活性を阻害すると考えられる AoSnf1 に着目し、その遺伝子を破壊したところ、クルクミン生産量を 2 倍に増加させることができた。今回、さらに acetyl-CoA または malonyl-CoA の供給量を増やすことでクルクミンの増産を目指すとともに、作製したポリケタイド高生産用宿主が他のポリケタイド化合物の増産にも有効であるかを検証した。
【結果・考察】糸状菌の細胞膜構成成分であるエルゴステロールは acetyl-CoA を出発基質とするため、エルゴステロール合成経路を抑制することで細胞内の acetyl-CoA 量を増やすことを目指した。哺乳類においてステロール合成の転写因子として知られる Sterol regulatory element-binding protein（SREBP：AO090038000467）または SREBP-cleavage activating protein（SCAP：AO090701000401)のホモログ遺伝子を探索し、CUS 遺伝子発現株において各遺伝子を破壊した。クルクミン生産量を比較したところ、Δ*SREBP* 株では 3 倍、Δ*SCAP* 株では 2.5 倍に増加していた。さらに、AoSnf1 との二重破壊株を作製したところ、Δ*AoSnf1*Δ*SCAP* 株では親株の 6 倍にクルクミン生産量が増加していた。また、クルクミン高生産株の細胞内 malonyl-CoA を定量したところ、細胞内 malonyl-CoA 濃度が親株の 2.3 倍に増加していることが明らかになった。Δ*AoSnf1*Δ*SCAP* 株が他のポリケタイド化合物の増産にも有効であるかを検証するため、*A. terreus* 由来化合物である atrochrysone の生合成酵素遺伝子を CUS 遺伝子と置き換える形で異種発現した。その結果、最終生成物の一種である emodin の生産量は、親株に atrochrysone 生合成酵素遺伝子を発現させた株の 3.7 倍（843 μg/l）に増加しており、Δ*AoSnf1*Δ*SCAP* 株がポリケタイド化合物の増産に汎用性のある麹菌宿主として利用可能であることが示された。

A. oryzae, polyketide, SREBP system

発表責任者：大西 康夫（ayasuo@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：1D1a12
講演日時：3 月 24 日 11:21～ 1 号館 D1 会場

ゲノム編集を利用した麹菌 *Aspergillus oryzae* における異種二次代謝産物生産および生産性の向上
Heterologous production and productivity enhancement of a secondary metabolite in *Aspergillus oryzae* by genome editing

○齋藤 直也[1]、片山 琢也[1,2]、南 篤志[3]、及川 英秋[3]、丸山 潤一[1,2]([1]東大院・農生科・応生工、[2]東大・微生物連携機構、[3]北大院・理)
○ Naoya SAITOH[1], Takuya KATAYAMA[1,2], Atsushi MINAMI[3], Hideaki OIKAWA[3], Jun-ichi MARUYAMA[1,2] ([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Grad. Sch. Sci., Hokkaido Univ.)

【目的】
麹菌 *Aspergillus oryzae* は近年、異種二次代謝産物生産の宿主として利用する研究が進められている[1)]。二次代謝産物の生合成には多くの場合 4～6 個以上の生合成遺伝子が関与しており、異種生産のためにはそのすべてを 1 つの株に導入する必要がある。*A. oryzae* ではこれまでに、4 つの選択マーカーを利用した形質転換が可能である四重栄養要求性株 NSAR1 を用いて異種二次代謝産物の全合成が行われている。しかし、異種生産を行ったうえで生産性を向上させる遺伝子改変を行う場合、従来の系では選択マーカーの数による制約を受けるという課題がある。一方で我々は、*A. oryzae* における CRISPR/Cas9 システムを利用したゲノム編集技術を確立し、ゲノム編集プラスミドのリサイクリングにより標的遺伝子の破壊および標的染色体部位への遺伝子導入を無制限に繰り返すことに成功した[2)]。本研究では、ゲノム編集を利用した *A. oryzae* における異種二次代謝産物の生産、および代謝経路の遺伝子改変による生産性の向上を目的とした。

【結果】
異種二次代謝産物生産のモデルとして、7 つの生合成遺伝子によって合成される担子菌由来の抗細菌活性を持つジテルペン pleuromutilin の生産を行った。遺伝子導入の標的部位として、分生子の色素合成に関与する *wA*、硝酸資化に必要な *niaD*、ウリジン/ウラシル生合成に必要な *pyrG* の各遺伝子を選択した。*A. oryzae* 野生株 RIB40 を宿主として段階的に形質転換を行い、各標的部位の欠失に由来する表現型を指標として株を選択することで、7 つの pleuromutilin 生合成遺伝子すべてが導入された株を効率的に取得した。得られた株の代謝物において、GC/MS 解析により pleuromutilin の生産が確認され，さらに抗菌活性も検出された。以上の結果から，ゲノム編集を利用した *A. oryzae* における異種二次代謝産物生産が可能となった。さらに，取得された生産株を用いて，生産性向上のための代謝経路の遺伝子改変を行った。pleuromutilin 合成につながるエルゴステロール生合成経路の遺伝子 *Aoerg20* について、イソプレン鎖の伸長に関与する領域のアミノ酸置換を行った結果、pleuromutilin 生産量が増加する傾向が見られた。現在、生合成経路における前駆体であるアセチル CoA の供給を増加させる代謝経路遺伝子の改変を行い、生産性のさらなる向上を試みている。

1) 南ら (2017) 日本醸造協会誌 112:592-597
2) Katayama *et al.* (2018) *Appl. Environ. Microbiol.* in press

Aspergillus oryzae, genome editing, secondary metabolite

発表責任者：丸山潤一（amarujun@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：1D1a13
講演日時：3 月 24 日 11:32～ 1 号館 D1 会場

細胞性粘菌 *D.discoideum* が持つ SteelyB 酵素の産物多様性機構の解明
Steely regulates "promiscuity"of type III PKS
○今井 玲[1]、飯島 知之[2]、山中 彩夏[2]、品川 知則[2]、荒木 剛[1]、齊藤 玉緒[1]([1]上智大・理工、[2]上智大院・理工)
○ Lei IMAI[1], Tomoyuki IIJIMA[2], Ayaka YAMANAKA[2], Tomonori SHINAGAWA[2], Tsuyoshi ARAKI[1], Tamao SAITO[1] ([1]Sophia Univ. Faculty of Sci. & Tech., [2]Sophia Univ. Grad. Sch. of Sci. & Tech.)

【背景・目的】
細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* は、通常単細胞体で細菌を捕食し分裂を繰り返しながら増殖するが、飢餓状態では細胞が集合しおよそ 24 時間後に子実体と呼ばれる柄と胞子からなる多細胞体を形成する。細胞性粘菌 *D. discoideum* が持つ 45 個のポリケタイド合成酵素 (PKS)のうち、SteelyA, SteelyB と呼ばれるⅠ型とⅢ型が結合したハイブリッド型の PKS が存在することが知られている。*stlB knock out* 株での放射性同位体 ^{36}Cl ラベル TLC の結果によると、SteelyB は発生中期には柄細胞分化誘導因子である DIF-1 が合成されるが、発生後期では異なる産物である LCCs (Late Chlorinated Compounds)が合成される。本研究ではこの SteelyB の産物多様性がどのようにもたらされているか解明することを目的とした。
【結果・考察】
Western blotting による SteelyB の発生時間ごとのタンパク質検出により、発生初期では SteelyB の存在が見られず、発生 6 時間後以降では SteelyB の全長サイズのバンドが検出された。また、子実体形成期の 24 時間後では全長サイズのバンドの他にⅢ型 PKS のバンドサイズに等しい短いバンドが検出されたことから、発生後期にはⅢ型 PKS が切断されることが推定された。さらにⅢ型 PKS が切断される子実体形成期において胞子細胞と柄細胞に分けタンパク質の検出を行ったところ、胞子細胞ではバンドが全く見られず、柄細胞のみに特異的に存在していた。このことから当研究室では、発生後期にⅢ型 PKS が切り離されることで単独で働き、柄細胞で LCCs が産出するのではないかという仮説(Product Switch 仮説)を立てこの検証にあたった。まず、Ⅲ型 PKS の切断は子実体形成期の柄細胞分化あるいは細胞を飢餓状態におくことにより起こるのではないかと考えた。そこで緩衝液中において細胞を飢餓状態におき、29 時間振盪をした。発生時間ごとにタンパク質の検出を行った結果、緩衝液中では 24 時間後においてもⅢ型 PKS の切り離しは見られなかったことから、Ⅲ型 PKS の切り離しは細胞を飢餓状態においてからの経過時間ではなく子実体形成が不可欠であることが示唆された。また、Ⅲ型 PKS が発生後期に切り離される際に切断が起こる部位を特定するため、*stlB* 遺伝子に tag を挿入した形質転換体を発生させた。この変異体の柄細胞を回収することによりⅢ型 PKS の精製に成功した。これに関しても併せて報告する予定である。

Dictyostelium discoideum, polyketide, promiscuity

発表責任者：齊藤　玉緒（tasaito@sophia.ac.jp）

講演番号：1D1a14
講演日時：3 月 24 日 11:43～ 1 号館 D1 会場

細胞性粘菌が生成するハロゲン化有機化合物 LCC-1 の生合成機構の解析
The biosynthesis mechanism of halogenated organic compounds in *Dictyostelium discoideum*
○小山 航平[1]、飯島 知之[2]、品川 知則[2]、齊藤 玉緒[1]([1]上智大・理工、[2]上智大院・理工)
○Kohei KOYAMA[1], Tomoyuki IIJIMA[2], Tomonori SHINAGAWA[2], Tamao SAITO[1] ([1]Sophia Univ. Faculty of Sci. & Tech., [2]Sophia Univ. Grad. Sch. of Sci. & Tech.)

【背景・目的】
細胞性粘菌 *Dictyosterium discoidium* は土壌中に棲息し、バクテリアや酵母等の微生物を捕食して分裂・増殖する単細胞アメーバである。飢餓状態になると、細胞が集合して胞子と柄からなる子実体と呼ばれる構造をつくる。柄細胞ではⅠ型とⅢ型が融合したハイブリッド型ポリケタイド合成酵素の発現が見られ、二次代謝産物の生合成を触媒していると考えられている。本研究では柄細胞で合成される塩素化化合物に着目し、その生合成機構の解明を目的としている。
【結果・考察】
柄細胞で生産されている塩素化化合物のうち当研究室では LCC-1 (Late Chlorinated Compound-1)とよばれるジベンゾフラン骨格をもつ塩素化化合物の単離に成功した。HRFABMS、NMR、X 線結晶解析からその構造が 1-(4,6,8-trichloro-1,3,9-trihydroxy-7-methoxy-2-dibenzofranyl)-hexane-1-one であることが分かった。
生合成経路の解析では、LCC-1 の骨格がハイブリッドポリケタイド合成酵素である SteelyB(StlB)の産物 1-(2,4,6-TriHydroxyRhenyl)Hexane-1-one(THPH)と共通していること、*stlB* knock out 株では LCC-1 が生合成されないことから、THPH が LCC-1 の前駆物質だと示唆されていた。実際に外部から *stlB* knock out 株に THPH を加えると LCC-1 の生合成が回復したことから、THPH が LCC-1 の前駆物質であることが確認できた。THPH は柄細胞誘導因子として知られている DIF-1 の前駆体でもあるため、LCC-1 は DIF-1 の生合成経路から派生していることが分かった。さらに、DIF-1 生合成に関与している塩素化酵素(ChlA)の knock out 株からは LCC-1 が生合成されないことから、LCC-1 の生合成にも ChlA が関与していることが示唆された。*stlB* knock out 株に塩素化された THPH である Cl-THPH、Cl^2-THPH を外部から加えてみると LCC-1 の生合成が回復したことから、THPH は ChlA によって、Cl^2-THPH まで塩素化されてからジベンゾフラン骨格を形成すると考えられる。

Dicyostelium discoideum, polyketide, halogenated compound

発表責任者：齊藤　玉緒（tasaito@sophia.ac.jp）

講演番号：1D1a15
講演日時：3 月 24 日 11:54～ 1 号館 D1 会場

Pertusaria laeviganda から誘導した地衣内生菌が産生する抗酸化活性成分
Antioxidant compounds produced by cultured endolichenic fungus induced from *Pertusaria laeviganda*

○川上 寛子、鈴木 千尋、山口 遼、原 光二郎、小峰 正史、山本 好和（秋田県大・生物資源）
○Hiroko KAWAKAMI, Chihiro Suzuki, Haruka Yamaguchi, Kojiro Hara, Masashi Komine, Yoshikazu Yamamoto (Akita Pref. Univ.)

【背景と目的】

地衣類は地衣菌（真菌類）と藻類の共生生物であり、地衣菌は独特な化学構造を有する二次代謝産物を生産することが広く知られている。しかし、地衣菌の他に地衣体内に内生する地衣内生菌が有用物質生産の新しい資源として近年注目されている [1)]。我々はこれまで、抗酸化活性成分を産生する地衣菌及び地衣内生菌を対象にスクリーニングを行い、*Pertusaria laeviganda* 天然地衣体から誘導した地衣内生菌（PtsLa）由来メタノール抽出物が高い抗酸化活性を示すことを見出した。本研究は、地衣内生菌 PtsLa が産生する抗酸化活性成分を明らかにし、活性成分の効率的生産方法を確立することを目的としている。

【材料と方法】

地衣内生菌 PtsLa を麦芽酵母エキス培地で 3 週間液体培養した後、菌体を回収し、メタノール粗抽出物を得た。粗抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分画し、HP20 及び薄層クロマトグラフィーを用いて、活性を示した画分から活性成分を単離した。抗酸化活性は ORAC 法で評価した。また、HPLC-PDA, LC-MS/MS, NMR の分析データに基づいて、活性成分の化学構造を決定した。さらに、活性成分の効率的生産方法を確立するために、培養容器や培地組成が異なる培養条件下において PtsLa を液体培養した後、菌体を回収し、乾物重と単位乾燥重あたりの活性成分含有量を測定した。

【結果と考察】

抗酸化活性を示した画分から単離した黄色結晶を HPLC-PDA, LC-MS/MS, NMR で解析した結果、活性成分はノルリヘキサントン（NL）であることが明らかになった。ORAC 測定法で用いたフルオレセインの減少に伴う曲線から EC_{50} を算出したところ、NL は既知の抗酸化活性成分であるアスコルビン酸、没食子酸や Trolox よりも高い活性を示した。また、バッフル付き三角フラスコを培養容器に用いた場合、乾燥重は増加した一方、単位乾燥重あたりの NL 含有量は減少した。

これまで、DPPH 法を用いた抗酸化活性試験において NL の活性は低いことが報告されていたが [2)]、反して ORAC 法を用いた場合には非常に高い活性を示すことを新たに明らかにした。

今後、地衣内生菌 PtsLa における NL の効率的生産条件について詳細に検討する。

1) Singh BN, Upreti DK, GuptaVK et al. Trends in Biotech. 2017;35;808–813.
2) Wang QX, Bao L, Yang XL et al. Fitoterapia. 2012;83;209–214.

endolichenic fungi, antioxidant activity, xanthone

発表責任者：川上寛子（khiroko@akita-pu.ac.jp）

講演番号：1D1p01
講演日時：3 月 24 日 13:50～ 1 号館 D1 会場

赤色海洋酵母由来希少カロテノイドの多様な生理機能解析

Various physiological analyses of the carotenoid from the red marine yeast.

○大塚 哲雄[1]、秋田 真也[2]、鈴木 隆広[2]、浜本 牧子[1,2] ([1]明治大院農、[2]明治大農)
○Tetsuo OTSUKA[1], Masaya AKITA[2], Takahiro SUZUKI[2], Makiko HAMAMOTO[1,2] ([1]Meiji Univ. Grad. Sch., [2]Meiji Univ.)

【目的】我々は、赤色海洋酵母由来希少カロテノイド 2-Hydroxyplectaniaxanthin （2-HXP）が、強い脂質過酸化抑制活性を有すること、及び HeLa 細胞の増殖阻害作用をもつことを明らかにしている 1)。本研究では、このカロテノイドの多様な生理機能を明らかにすることを目的として、一重項酸素消去活性、HeLa 細胞増殖阻害メカニズム、および皮膚に対する作用を調べた。
【方法と結果】カロテノイドの抽出・精製は、赤色海洋酵母湿菌体を機械的に破砕後、アセトン抽出、ケン化、TLC による分画により行った。多様な生理機能の比較対象カロテノイドとして、アスタキサンチン及びβ-カロテンを用いた。
①一重項酸素消去作用：リノール酸のメチレンブルー光増感酸化を測定する簡易法により調べた結果、2-HXP は、抗酸化活性が極めて高いことが知られているアスタキサンチンとほぼ同等の一重項酸素消去活性を示した。
②HeLa 細胞の増殖阻害メカニズム解析：培養 24 時間後の HeLa 細胞に 2-HXP を最終濃度 10 μM になるように加え、さらに 48 時間培養した後の HeLa 細胞を Annexin V 及び PI で染色後、フローサイトメーターで解析した結果、2-HXP は HeLa 細胞のアポトーシスを誘導していると考えられた。さらに、カスパーゼアッセイを行った結果、カスパーゼ 8、9、3/7 が活性化していることが明らかになった。
③ヒト表皮角化細胞（HaCaT 細胞）に対する作用：2-HXP が、HaCaT 細胞のヒアルロン酸生産におよぼす影響とコラーゲン分解酵素の発現量におよぼす影響についても報告する。

１）佐藤ら，第 66 回日本生物工学会大会（2014）要旨集

red marine yeast, carotenoid, 2-Hydroxyplectaniaxanthin

発表責任者：大塚哲雄（cf170406@meiji.ac.jp）

講演番号：1D1p02
講演日時：3 月 24 日 14:01～ 1 号館 D1 会場

ヒト腸内細菌のカロテノイド生合成遺伝子の機能解析
Functional analysis of carotenoid biosynthesis genes from human gut bacteria
○松本 航[1]、七浦 春風[1]、竹村 美保[1]、眞岡 考至[1,2]、栗原 新[1]、三沢 典彦[1]([1]石川県大・生資研、[2]生産開発研)
○Wataru MATSUMOTO[1], Haruka NANAURA[1], Miho TAKEMURA[1], Takashi MAOKA[1,2], Shin KURIHARA[1], Norihiko MISAWA[1] ([1]Ishikawa Pref. Univ., [2]Res. Ins. Prod. Dev.)

【背景・目的】
ヒトの体には数 100 兆個の細菌が常在しており、特に小腸下部から大腸に存在する細菌は、数や種類が最も豊富である。これらの腸内細菌には乳酸菌（プロバイオティクス細菌）も含まれている。
カロテノイドは植物、藻類、一部の細菌などが生産する天然色素で、現在までに 750 種類以上が単離・同定されているが、ほとんどが炭素数 40 の基本骨格からなる。乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* が 4,4’-diaponeurosporene という炭素数 30 のカロテノイドを生産するという報告があるが、乳酸菌や腸内細菌におけるカロテノイドの生理機能や生合成に関する研究はあまり進んでいない。これまでに我々は大腸菌を用いたカロテノイド生合成遺伝子の機能解析を行ってきた。そこで、本研究では大腸菌を用いたヒト腸内細菌のカロテノイド生合成遺伝子の機能解析を目的とした。
【方法】
計 60 種の培養可能なヒト腸内細菌（一部プロバイオティクス細菌などを含む）から、主にゲノム配列を指標にカロテノイド生産菌候補を探索した。次にカロテノイド生合成遺伝子の候補を持つ細菌からゲノム DNA を抽出し、PCR クローニングにより候補遺伝子配列の単離を行った。その遺伝子配列を機能発現解析用大腸菌に導入して培養し、菌体からの脂溶性抽出物を HPLC - PDA で分析した。

【結果・考察】
ゲノム配列の解析の結果、ヒト腸内細菌である *Bacteroides dorei*、*Bacteroides ovatus*、*Bacteroides vulgatus*、*Clostridium perfringens*、*Eubacterium limosum*、*Parabacteroides distasonis*、プロバイオティクス細菌である *Lactobacillus plantarum*、*Leuconostoc mesenteroides* にカロテノイド生合成候補遺伝子配列が見つかった。これらの候補遺伝子配列の機能発現解析の結果、*E. limosum*、*L. plantarum*、*L. mesenteroides* 由来の遺伝子産物では CrtM (4,4’-diapophytoene synthase)及び CrtN (4,4’-diapophytoene desaturase)の活性が検出された。一方 *B. dorei*、*B. ovatus*、*B. vulgatus*、*C. perfringens* 及び *P. distasonis* 由来の *crtN* 相同遺伝子は機能発現しなかった。
これらの結果から *B. dorei*、*B. ovatus*、*B. vulgatus*、*C. perfringens*、*P. distasonis* には *crtM* 相同遺伝子が無く、*crtN* 相同遺伝子産物の活性が検出されなかったことから、カロテノイドは生産せず、*E. limosum*、*L. mesenteroides* が C30 カロテノイドを生産している可能性があると考えられた。

carotenoid, functional analysis, gut bacteria

発表責任者：三沢典彦（n-misawa@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：1D1p03
講演日時：3 月 24 日 14:12～ 1 号館 D1 会場

大腸菌による violaxanthin の生産

Bioproduction of violaxanthin in *E. coli*

○竹村 美保[1]、久保 亜希子[2]、大段 光司[2]、眞岡 孝至[3]、佐原 健彦[4]、矢追 克郎[4]、三沢 典彦[1] ([1]石川県大、[2]江崎グリコ、[3]生産開発研、[4]産総研)
○Miho TAKEMURA[1], Akiko KUBO[2], Kouji ODAN[2], Takashi MAOKA[3], Takehiko SAHARA[4], Katsuro YAOI[4], Norihiko MISAWA[1] ([1]Ishikawa Pref. Univ., [2]EZAKI GLICO, [3]Res. Inst. Prod. Dev., [4]AIST)

カロテノイドは、主に植物や微生物が生産する天然の色素化合物である。カロテノイドはヒトの生理機能にとって重要な役割を果たすため、近年サプリメントなどとして需要が高まっている。現在市場に供給されているカロテノイドは主に植物や藻類から抽出したものであるが、より高機能なカロテノイドは天然に微量にしか存在しないため、供給がほとんどされていない。

これまで我々は、高機能で希少なカロテノイドを安定的かつ安価に生産するために、大腸菌での生合成を試みてきた。それによって、β-carotene や astaxanthin など様々なカロテノイドを生産できるようになったが、大腸菌による生産が難しいカロテノイドも多数存在する。

キサントフィルの一種 violaxanthin は zeaxanthin epoxidase(ZEP) によって zeaxanthin から生産されるが、zeaxanthin epoxidase の活性が大腸菌では低いため、大腸菌では violaxanthin が微量にしかできなかった。本研究では、大腸菌で効率的に violaxanthin を生産することを目的とし、いくつかのアプローチを試みた。まず初めに、様々な生物由来の *ZEP* 遺伝子を用い、大腸菌に適したコドンに改変した後、zeaxanthin 生産大腸菌に導入した。その結果、*Arabidopsis thaliana* や *Capsicum annuum* 由来の *ZEP* 遺伝子は大腸菌で活性を示したが、*Zea mays* 由来の *ZEP* 遺伝子は活性を示さなかった。また、*Capsicum annuum* 由来の *ZEP* 遺伝子が最も大腸菌で活性が高かったことから、以降の実験には主に *Capsicum annuum* 由来の *ZEP* 遺伝子を用いた。次に、ホストの大腸菌株を検討し、大腸菌株によって生産性等に違いがあることがわかった。また、ベクターの検討、培養条件の検討、RBS (Ribosome binding site)配列の改良などを行うことにより、生産性を向上することができたので、本学会で報告する。

violaxanthin, *E. coli*, zeaxanthin epoxidase

発表責任者：竹村美保（mtake@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：1D1p04
講演日時：3 月 24 日 14:23～ 1 号館 D1 会場

海洋性油糧微生物ラビリンチュラ類を用いたステロールの選択的生産

Selective production of sterols by using gene-modified thraustochytrids

○石橋 洋平[1]、西田 裕貴[2]、渡辺 昂[1]、林 雅弘[3]、沖野 望[1]、伊東 信[1,4] ([1]九大院・農・生命機能、[2]九大院・生資環・生命機能、[3]宮大・農・海洋生物、[4]九大院・農・i-BAC)
○Yohei ISHIBASHI[1], Yuki Nishida[2], Takashi Watanabe[1], Masahiro Hayashi[3], Nozomu Okino[1], Makoto Ito[1,4] ([1]Dept. Biosci. Biotech., Grad. Sch. Biore. Bioenvtl. Sci., Kyushu Univ, [2]Dept. Biosci. Biotech., Grad. Sch. Biore. Bioenvtl. Sci., Kyushu Univ., [3]Miyazaki Univ., [4]i-BAC, Grad. Sch. Biore. Bioenvtl. Sci., Kyushu Univ.)

ステロールは様々な用途で産業利用されている。例えば、コレステロールは化粧品や養殖飼料の原料として、エルゴステロールはビタミン D2 の原料として、植物ステロールはコレステロールの吸収阻害効果を活用した食品機能性素材や、前立腺肥大症の症状緩和を目的とした医薬品として活用されている。近年、ステロール合成の中間産物と考えられていたラノステロールが白内障の症状を改善すること、8,9 位不飽和ステロールがミエリン再形成を促進することが明らかとなり、白内障や多発性硬化症などの脱髄疾患の新規治療薬としての期待が高まっている。しかしながら、ステロールの発酵生産技術は確立しておらず、有用なステロールを安定的に高生産する技術開発が求められる。

生物によって生合成するステロール分子種は異なり、哺乳類はコレステロールを、植物はカンペステロールやスティグマステロール（植物ステロール）を、酵母などの真菌類はエルゴステロールを合成する。近年のメタボロミクス研究の発展に伴い、従来の常識を覆すような生物が存在することが分かってきた。海洋真核性微生物ラビリンチュラ類は、DHA などの高度不飽和脂肪酸を合成し、高レベルで蓄積する能力を持つ一方、哺乳類、真菌、植物から見いだされる全てのステロール分子種を有している（Dellero Y, et al. 2018）。しかし、その生合成経路の詳細に関してはよく分かっていない。本研究では、ラビリンチユラ類の 1 種 *Aurantiochytrium limacinum* のステロール合成経路のほぼ全貌を解明し、合成経路の改変によって選択的なステロールの発酵生産が可能になったことを報告する。

まず、安定同位体標識グルコースを用いた追跡実験により、*A. limacinum* がコレステロールを生合成することを確認した。続いて、ドラフトゲノム解析によりコレステロール合成および植物ステロール合成の鍵酵素である DHCR24 と SMT1 を同定し、それぞれの欠損株および復帰株を作製した。その結果、DHCR24 欠損株ではコレステロールが消失し植物ステロールが増加したが、SMT1 欠損株では植物ステロールが消失しコレステロールが増加することが分かった。それぞれの復帰株は、野生株とほぼ同じステロール組成を示した。

真菌類である酵母を用いてコレステロールや植物ステロールを生産するためには、その合成に関与する外来遺伝子を導入する必要がある。一方、ラビリンチュラ類は多様なステロールを合成する遺伝子群をゲノムに備えているため、合成経路を任意に遮断するだけで効率良く目的とするステロールを生産することが可能である。今回の研究によって、ラビリンチュラ類を用いることで目的・用途に合わせた各種ステロールの選択的発酵生産が可能であることが示された。

Sterol, Thraustochytrid, Aurantiochytrium

講演番号：1D1p05
講演日時：3 月 24 日 14:34～ 1 号館 D1 会場

エルゴチオネイン発酵法開発におけるヒスチジン合成制御系の解除と代謝モデルの活用
Release of feedback regulation in histidine biosynthesis and utilization of metabolic model in the development of ergothioneine producer

○仲谷 豪[1]、嘉悦 佳子[1]、仲島 菜々実[1]、野口 祐司[1]、石井 信佳[1]、厨 祐喜[2]、白井 智量[3]、荒木 通啓[4]、曽田 匡洋[1]([1]長瀬産業株式会社、[2]神戸大院・科技イノベ、[3]理化学研究所、[4]京大院・医)
○Takeshi Nakatani[1], Keiko Kaetsu[1], Nanami Nakashima[1], Yuji Noguchi[1], Nobuyoshi Ishii[1], Yuki Kuriya[2], Tomokazu Shirai[3], Michihiro Araki[4], Masahiro Sota[1] ([1]NAGASE & CO., LTD., [2]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [3]RIKEN, [4]Grad. Sch. Med., Kyoto Univ.)

【背景・目的】

エルゴチオネイン（EGT）は、一部の微生物のみが生合成可能な含硫アミノ酸である。近年、ヒトにおける EGT 特異的な取り込み輸送体や、脳における神経新生の誘導効果等が発見され、その生理活性が注目されている。当社では放線菌の一種である *Streptomyces* 属細菌を用いた物質生産プラットフォームを開発しており、ホストが元来保有する EGT 生合成系を強化することで、従来の製法より安価に製造可能な微生物発酵法の開発に取り組んできた。これまでに、主要前駆体となるヒスチジン（His）を培地添加し EGT へと変換するバイオコンバージョン法開発に関する報告は複数存在する。本研究では、His 合成経路におけるフィードバック制御（FBR）を解除し、安価な糖から His を生産させ EGT へと変換することで、より製造コストを抑えた発酵生産プロセスの開発を目指した。また、代謝モデルとフラックスバランス解析を活用した代謝改変点の予測を行う場合、FBR 等の制御系は考慮されない。このため合成経路内に FBR が存在する EGT 生産菌の場合、改変を行っても予測された効果が表れにくいという課題があった。本研究では、FBR 解除株の構築により、フラックスバランス解析時の上記課題の解決についても検討を行った。

【方法・結果】

まず、アミノ酸の FBR 解除株の取得に広く用いられるアミノ酸アナログ法を用いたスクリーニングにより、*Streptomyces lividans* TK64 の His アナログ耐性株の取得を試みた。あえて NTG などの変異剤を使用せず、アナログ添加と実験室進化手法を組み合わせ、自然変異に依存したアナログ耐性変異株、約 80 株を取得した。アナログ耐性株の中から、生産性が有意に向上した 23 株を選抜し、次世代シークエンサーによる変異解析を実施した。自然変異を利用したことで、ゲノムに導入される変異が格段に抑えられ、FBR の解除に関連すると思われる複数の変異点の同定に成功した。そこで、得られた有効変異をゲノムに組み込んだ FBR 解除株を構築し His の生産性を評価した。野生株は培地中に His を分泌することはないが、FBR 解除株では培地中に著量の His を蓄積することが確認された。次に、当グループで開発中の TK64 のゲノムスケールモデルを用いて、His 及び EGT の生産をフラックスバランス解析によりシミュレーションした。上記の FBR 解除株に、解析より予測された代謝改変の一部を適用することで、EGT 生産菌開発における代謝モデル活用の有効性を検証した。(本研究の一部は NEDO「植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発」の支援を受けて行われました。)

Streptomyces, ergothioneine, flux balance analysis

発表責任者：仲谷 豪（takeshi.nakatani@nagase.co.jp）

講演番号：1D1p06
講演日時：3 月 24 日 14:55～ 1 号館 D1 会場

放線菌物質生産条件における RNA-Seq 解析とエルゴチオネイン生産株をモデルとした有効性の検証
Development and verification of an RNA-Sequencing (RNA-Seq) analysis under the producing conditions for ergothioneine high-producing strain actinomycetes.

○野口 祐司[1]、嘉悦 佳子[1]、仲島 菜々実[1]、仲谷 豪[1]、菅野 学[2]、三谷 恭雄[2]、木村 信忠[2]、曽田 匡洋[1] ([1]長瀬産業株式会社、[2]産総研・生物プロセス)
○Yuji NOGUCHI[1], Keiko KAETSU[1], Nanami NAKASHIMA[1], Takeshi NAKATANI[1], Manabu KANNO[2], Yasuo MITANI[2], Nobutada KIMURA[2], Masahiro SOTA[1] ([1]NAGASE & CO., LTD., [2]AIST-BPRI)

【背景・目的】

当社では *Streptomyces* 属放線菌をホストとした物質生産プラットフォームを開発してきた。物質生産における遺伝子発現プロファイルは、生産機構の解明及び、生産性向上の為に極めて重要である。一方で、放線菌における物質生産は増殖期を経た後に活発となることが一般的であるが、このような時期の菌体から RNA を抽出した場合、分解が激しく、RNA-Seq を行うことが困難とされている。

これまでに、放線菌においてエルゴチオネイン（EGT）生合成系を強化することで EGT 生産菌を構築した。本菌株の育種過程において、EGT の主要前駆体であるヒスチジン(His)の供給量を上げる目的で、His のアナログ耐性変異株を取得し、His 及び EGT 生産性が向上した株を選抜した。本菌株は、EGT 生産性向上に寄与する変異を有しており、次世代シークエンサーを用いた変異解析及び、遺伝子発現プロファイルの取得により高生産菌の育種に有用な知見が得られる。本研究では、生産条件下の *Streptomyces lividans* 菌体を対象とした RNA 抽出法、および RNA-Seq 解析法の開発を試みた。さらに、EGT 生産菌をモデルとし、開発した手法を用いて放線菌の EGT 高生産変異株における RNA-Seq 解析の有効性を検証した。

【方法・結果】

遺伝子発現プロファイルを取得するにあたり、ホスト、EGT 生産ベクター導入株、His アナログ耐性株の 3 菌株を選択した。一般的に RNA-Seq では分解度の低い total RNA を調製する必要がある。RNA 抽出工程を検討し、弊社放線菌用の RNA 抽出法を確立した。本培養を 48 時間、96 時間経た菌体から RNA を調製し、RNA-Seq 解析に供した。なお、各菌株それぞれ独立した 3 回の培養試験を実施し、データを取得し、解析を行った。

RNA-Seq 解析で得られた結果に対して主成分分析、発現差解析などを実施し、有意に発現量の変動が確認できた遺伝子群を抽出した。現在、抽出された遺伝子群の中から EGT 生産性を向上させる遺伝子の検証を進めている。(本研究の一部は、NEDO「植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発」の支援を受けて行われた。)

Streptomyces, RNA-Seq, ergothioneine

発表責任者：野口祐司（yuji.noguchi@nagase.co.jp）

講演番号：1D1p07
講演日時：3 月 24 日 15:06～ 1 号館 D1 会場

子嚢菌 *Talaromyces trachyspermus* による Spiculisporic acid の効率的生産
Effective Production of Spiculisporic Acid by Ascomysota *Talaromyces trachyspermus*
○林 真人[1]、高野 真希[1]、畑下 昌範[2]、星野 一宏[1] ([1]富山大院理工、[2]若狭湾エネ研)
○ Makoto HAYASHI[1], Maki Takano[1], Masanori Hatashita[2], Kazuhiro Hoshino[1] ([1]Grad.Sch.Sci.Eng.Univ.Toyama, [2]WERC)

【背景・目的】近年、微生物が生産するバイオサーファクタントが、固有の化学構造や高い生分解性、独自の生理活性作用を有することから新規バイオマテリアルとして注目されている。*Penicillium spiculisporum* が生産する Spiculisporic acid (SA)は 1 個のラクトン環と 2 個のカルボキシル基を有する特異な他官能性サーファクタントである。また、皮膚への低刺激性や抗菌性、高い界面活性作用を有するため、化粧品等への利用が期待されている。しかし、SA は現在工業的には少量しか生産されていない。前回我々は、*P.spiculisporum* の ITS 遺伝子領域を解析し、相同性の高い子嚢菌 *Talaromyces trachyspermus* が SA を生産することを報告した。そこで、本研究ではこの子嚢菌の培養条件を実験計画法 (DOE)等を用いて最適化し、SA を効率的に生産させることを検討した。
【方法】本研究では、*P.spiculisporum* のテレオモルフである *Talaromyces trachyspermus* NBRC 32238 を用いた。基本培地成分は 0.8 g/L $(NH_4)_2SO_4$、0.5 g/L KH_2PO_4、0.5 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$、0.05 g/L $FeSO_4$、1 g/L CSL、また炭素源として 100 g/L Glucose を使用し、初期 pH 2.0-3.0 に調整した。培養は 28°C、7 日間好気振盪することにより行った。培養液中に固体として存在する SA は、Ethanol に溶解させ、再結晶化することで回収した。この精製物は 1D-, 2D-NMR (^{13}C・^{1}H)を用いて同定した。さらに、SA の生産において重要と推測される窒素成分および微量金属塩の影響について検討した。これらの結果をもとに SA 生産に関わる因子について DOE を実施し、最適化を行った。
【結果】SA の工業生産に用いられる *P.spiculisporum* (I 株) は Glucose を 23.1 g/L 消費した培養 7 日で 4.2 g/L の SA を生産してた。一方、*T.trachyspermus* NBRC 32238 は Glucose が 50.9 g/L 消費した培養 7 日で 11.3 g/L も生産できた。この菌株による SA 生産の向上を目指し、培地成分特に窒素成分の影響を検討した。各種天然窒素成分や無機塩で培養した結果、Meat extract を 4.5 g/L となるように添加したとき、SA の生産を 22.2 g/L と向上させることができた。さらに、培地中への微量金属塩の添加効果を調べた結果、$FeCl_3$ 添加時に Glucose 消費が 90.9 g/L となり、SA 生産が 22.3 g/L と向上することが判明した。そこで、Meat extract、$FeCl_3$、および KH_2PO_4 に関して DOE を行い SA 生産に対する培地成分の最適化を行った。その結果、Meat extract 6.1 g/L、$FeCl_3$ 56.5 mg/L および KH_2PO_4 が 4.3 g /L のとき SA を 24.01 g/L 生産できると予測できた。この最適培地で実際に培養を行った結果、27.2 g/L 生産できた。今後はイオンビーム変異による SA 高生産株の構築や、SA およびその誘導体の生理活性作用や機能活性を検討する。

biosurfactunt, Spiculisporic acid, *Talaromyces* sp.

発表責任者：星野一宏（khoshino@sus.u-toyama.ac.jp）

講演番号：1D1p08
講演日時：3 月 24 日 15:17～ 1 号館 D1 会場

多種の乳酸菌バクテリオシンを分泌する新奇 ABC トランスポーターEnkT の分子機構の解析

Characterization of the molecular mechanism of a novel multiple bacteriocin ABC transporter, EnkT

○和田 夏美[1]、須志田 浩稔[1]、Perez R.H.[1,2]、善藤 威史[1]、園元 謙二[1]([1]九大院・農、[2]フィリピン大・ロスバニョス校)
○ Natsumi WADA[1], Hirotoshi SUSHIDA[1], Rodney H. PEREZ[1,2], Takeshi ZENDO[1], Kenji SONOMOTO[1] ([1]Fac. Agric., Kyushu Univ., [2]BIOTECH, Univ. the Philippines Los Banos)

【背景・目的】乳酸菌が生産するバクテリオシンはリボソーム上で生産される抗菌性ペプチドである。低濃度で抗菌活性を示し、酸や熱に安定といった優れた特性を有することから食品保存をはじめとする様々な分野への応用が期待されている。発酵魚より分離された乳酸菌 *Enterococcus faecium* NKR-5-3 は 5 種類ものバクテリオシン、enterocin NKR-5-3A, B, C, D, Z (Ent53A, B, C, D, Z)を生産する非常に稀な乳酸菌である。一般に、バクテリオシンは菌体内で前駆体として合成され、各バクテリオシンはそれぞれに専用の ABC トランスポーターによる菌体外への分泌時にα-helix 構造を含むリーダーペプチドが切断されて抗菌活性をもつ成熟型となる。しかし、本株の有する ABC トランスポーターEnkT は Ent53B を除く 4 種についてリーダーペプチドの切断と菌体外への分泌を担うことが明らかとなった。さらに、EnkT は異種バクテリオシン enterocin A と lactococcin A および Q、pediocin PA-1 の分泌も可能であることが確認され、4 種もの異種バクテリオシンの分泌が確認されたトランスポーターの初めての例となった。このように広い基質寛容性を持つトランスポーターを応用することで、様々なペプチドの分泌生産系の構築が期待される。そこで、本研究は ABC トランスポーターEnkT の分子機構の解明を目的とした。
【方法】EnkT のアミノ酸配列を用いた相同性検索の結果をもとに、*Clostridium thermocellum* が有する ABC トランスポーターPCAT1 の立体構造に基づくホモロジーモデリングを行い、前駆体の認識およびリーダーペプチドの切断における重要部位を推定した。それらの重要性を確かめるために、*Lactococcus lactis* NZ9000 株を宿主とし、EnkT 遺伝子、Ent53C 構造遺伝子、および Ent53C 自己耐性遺伝子を導入した Ent53C 異種発現株と、これを鋳型として EnkT の推定重要部位に変異を導入した株を構築し、EnkT 変異による Ent53C 分泌能への影響を定量的に評価した。
【結果および考察】構造予測の結果、EnkT のペプチダーゼドメイン(PD)において、バクテリオシンの認識に重要と思われる 5 つのα-helix 構造の存在が確認された。また、立体構造上で近傍に位置することが推測され、かつ ABC トランスポーター間で保存性の高い 4 つのアミノ酸残基、Gln9、Cys15、His94、Asp110 が確認され、これらの構造を重要部位と推定した。推定重要部位に変異を導入した EnkT を有する全変異株において分泌能の大幅な低下が確認され、これらの重要性が示された。この結果から、リーダーペプチドと EnkT PD 間での helix 間相互作用によって前駆体が認識され、EnkT PD 中の保存性の高い 4 つのアミノ酸残基が協調してリーダーペプチドを切断するという機構が推定された。

transporter, protease, bacteriocin

発表責任者：善藤威史（zendo@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：1D1p09
講演日時：3 月 24 日 15:28～ 1 号館 D1 会場

環状バクテリオシン、エンテロシン NKR-5-3B の環状化を担うタンパク質の解析

Characterization of a protein involved in circularization of a circular bacteriocin, enterocin NKR-5-3

佐戸 翔太[1]、PEREZ Rodney H.[1,2]、○善藤 威史[1]、園元 謙二[1] ([1]九大院農、[2]フィリピン大学・ロスバニョス校)

Shota SADO[1], Rodney H. PEREZ[1,2], ○Takeshi ZENDO[1], Kenji SONOMOTO[1] ([1]Fac. Agric., Kyushu Univ., [2]BIOTECH, Univ. the Philippines Los Banos)

【背景・目的】乳酸菌が生産する安全な抗菌性ペプチドであるバクテリオシンは食品保存などへの利用が期待されている。その中でも N 末端と C 末端がペプチド結合した構造をもつ環状バクテリオシンは、耐熱性・耐酸性に優れ、安全な抗菌物質としての利用のみならず、新奇ペプチドの創出に向けたその環状化機構の利用も期待されている。環状バクテリオシンの生合成には、リーダーペプチドの切断、環状化、分泌のプロセスが必要である。そこで本研究では、乳酸菌 *Enterococcus faecium* NKR-5-3 が生産する環状バクテリオシン、エンテロシン NKR-5-3B (Ent53B) の環状化機構の解明を目的とし、生合成タンパク質の機能解析を行った。

【方法】特定された Ent53B の最小生合成遺伝子群（*enkB*、*B1*～*B4*）のうち、*enkB2* は DUF95 スーパーファミリータンパク質 (DUF95) をコードする遺伝子に相同性を示す。DUF95 の機能は未知であるが、環状バクテリオシンの生合成遺伝子群に共通してみられるため、環状化への関与が予想される。EnkB2 の機能解析を行うため、EnkB2 のアミノ酸のうち、DUF95 で特に保存性の高いアミノ酸残基をアラニンや構造が類似したアミノ酸に置換した変異株を構築し、以下のようにリーダーペプチドの切断や環状化への影響を評価した。構築した変異株の菌体内外の画分について、抗菌活性試験により、成熟型（活性型）の環状 Ent53B の生産能を評価した。また、変異株の生育挙動をモニターし、宿主の生育に与える影響を評価した。さらに、抗菌活性や生育に顕著な変化が見られた変異株について、LC/MS により、菌体内外に存在する Ent53B あるいはその派生物等の検出を試みた。

【結果および考察】バクテリオシン分泌生産能の評価の結果、DUF95 で保存されている各アミノ酸残基を置換した全ての変異株で、抗菌活性の消失や著しい減少が確認された。その一方で、保存されていない各アミノ酸残基を置換した変異株では抗菌活性の低下が認められなかった。この結果から、DUF95 で保存されているアミノ酸の重要性が示された。さらに、特定のアミノ酸を置換した変異株では対数増殖期後期に生育が阻害され、菌体内からはリーダーペプチドや直鎖状 Ent53B のほか、その残骸と予想される物質が多数検出された。この結果から、アミノ酸置換により機能不全となった EnkB2 は、Ent53B の切断や環状化を適切に行うことができず、直鎖状 Ent53B やその残骸を蓄積し、これらが宿主の生育を阻害したと考えられた。以上より、DUF95 スーパーファミリータンパク質である EnkB2 は、Ent53B の環状化に関与し、保存されたアミノ酸残基が特にその機能に重要と考えられた。

bacteriocin, circular peptide, lactic acid bacteria

発表責任者：善藤威史（zendo@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：1D1p10
講演日時：3 月 24 日 15:39～ 1 号館 D1 会場

プロピオン酸菌が生産する抗菌タンパク質の精製と特性評価
Purification and characterization of antimicrobial protein produced by propionic acid bacteria

○高屋 朋彰、木下 葵子（小山高専・物質）
○Tomoaki KOUYA, Noriko KINOSHITA (NIT. Oyama Col.)

【背景・目的】

乳製品由来プロピオン酸菌（*Acidipropionibacterium* 属など）が生産する抗菌タンパク質は，近縁の微生物をはじめとして，多くの微生物に対して抗菌作用を示すことが知られている．

本研究では、尋常性ざ瘡や日和見感染症，難病（サルコイドーシス）の一因であるニキビ菌（*Cutibacterium acnes*）や尿路感染症起炎菌（*Propionimicrobium lymphophilum*）に対して抗菌作用を示す，乳製品由来プロピオン酸菌が生産する抗菌タンパク質の分離・精製・特性評価を目的とした．

【方法】

検定菌として乳製品由来プロピオン酸菌（*Acidipropionibacterium thoenii* JCM 6435，理化学研究所バイオリソースセンターより分譲），被検菌として皮膚疾患菌（*C. acnes* JCM 6473，*C. acnes* JCM 6425^{T}）や尿路感染症起炎菌（*P. lymphophilum* JCM 5829^{T}）を用いた．抗菌物質生産菌のスクリーニングは，抗菌活性試験（Cup 法）を用いて評価した．

液体培地を用いて嫌気培養した *A. thoenii* JCM 6435 の培養液を遠心分離し，培養上清を回収した．硫酸アンモニウムを 80%飽和となるように硫安沈殿を行った後，遠心分離によって回収したタンパク質を再溶解してから透析膜（MWCO 1,000）を用いて脱塩し，凍結乾燥を行った．得られた凍結乾燥粉末を再溶解させ，陰イオン交換クロマトグラフィー（HiTrap Q FF、1ml（GE ヘルスケア社））および逆相クロマトグラフィーによる分画を行った．得られた各画分を脱塩，凍結乾燥した後，電気泳動（SDS-PAGE）による分子量分布の評価や抗菌活性試験による抗菌性評価を行った．

【結果】

A. thoenii JCM 6435 の培養上清に含まれるタンパク質成分を濃縮・脱塩し，抗菌活性評価を行った．得られた抗菌タンパク質を陰イオン交換クロマトグラフィーおよび逆相クロマトグラフィーを用いて分画したところ，特定の吸着画分が *P. lymphophilum* や *C. acnes* に対して抗菌活性を示した．現在，電気泳動（SDS-PAGE）や質量分析による抗菌タンパク質の特定，およびその特性評価を進めている．

propionic acid bacteria, *Acidipropionibacterium*, antimicrobial protein

発表責任者：高屋　朋彰（tkouya@oyama-ct.ac.jp）

講演番号：1D1p11
講演日時：3 月 24 日 16:00～ 1 号館 D1 会場

ヴィオラセインの抗菌性とその作用機序
Anti-bacterial activities and action mechanism of violacein
○吉野 凌太、滝口 泰之（千葉工業大学工）
○Ryouta YOSINO, Yasuyuki TAKIGUCHI (Chiba institute of technology)

［背景・目的］
ヴィオラセインはグラム陰性細菌 *Chromobacterium violaceum* の生産する青色の天然色素でグラム陽性細菌に対して高い抗菌性を示すことが知られている。また、抗トリパノソーマ活性、抗真菌活性および抗腫瘍活性も報告されている。近年、化学的に合成された合成色素の環境中での残留の問題や安全性の面から、天然色素が注目されている。本研究は *Cutibacterium acnes* と *Bacillus megaterium* に対するヴィオラセインの抗菌性を調べるとともにその作用機序をペニシリンと比較しながら調べることを目的とした。
［方法］
ヴィオラセインは当研究室で検索・分離した *Chromobacterium violaceum* VP-2 株をキング B 培地で培養し、メタノールで抽出し、Toyopearl HW-40F で精製した。*C. acnes* NBRC 107605 株は GAM 培地(日本水産(株)製)を用いて 37℃で静置培養した。また、*B. megaterium* NBRC 15308 株はペプトン-酵母エキス培地を用いて、30℃で振とう培養した。前培養した菌をエタノールに溶解したヴィオラセイン、または滅菌水に溶解したペニシリンを所定量加えた培地に接種して培養し、菌体の増殖を 660nm の吸光度で経時的に測定した。また、Bcteria Live/Dead Stainning Kit を用いて、生菌と死菌の分別染色を行った。
［結果・考察］
C. acnes および *B. megaterium* のヴィオラセインを添加した培養液では検討した濃度の範囲において 24 時間では増殖がみられなかった。ペニシリンを添加した *C. acnes* は検討した濃度の範囲では増殖がみられなかった。しかし *B. megaterium* ではペニシリンを 5、10 μg/ml 添加した培養液については増殖がみられた。これらのことから *C. acnes* に対してはヴィオラセインとペニシリンは同程度の抗菌性を示し *B. megaterium* に対してはヴィオラセインがペニシリンよりも高い増殖抑制作用をもつと考えられる。また、Bacteria Live/Dead Stainning Kit で菌体を染色した結果、ヴィオラセインを添加した菌体では生菌および死菌どちらも確認されなかった。これはヴィオラセインが菌の増殖を抑制したため生菌および死菌がみられなかったと考えられる。また、ヴィオラセインの抗菌性の作用機序については現在、検討中である。

violacein, antibacterial activity, penicillin

発表責任者：吉野凌太（bleach0418@docomo.ne.jp）

講演番号：1D1p12
講演日時：3 月 24 日 16:11～ 1 号館 D1 会場

Haloduracin 生合成遺伝子クラスターに隣接する機能未知遺伝子の解析

Analysis of unknown genes adjacent to Haloduracin biosynthetic gene cluster

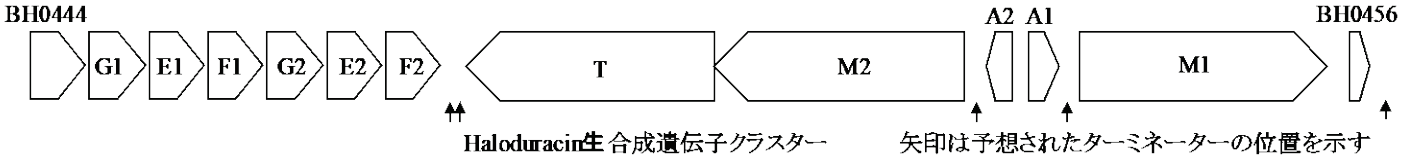
○片山 欣哉、松本 英恵、佐藤 稲子、田崎 弘之（日獣大獣）
○Kinya KATAYAMA, Hanae MATSUMOTO, Touko SATO, Hiroyuki TAZAKI (NVLU)

【目的】Haloduracin は好アルカリ性細菌 *Bacillus halodurans* C-125 が産生する two-peptide ランチビオティックで，広範囲の抗菌活性を示すことが知られている．ランチビオティックの生合成は，ランチビオティック構造遺伝子（halA1, halA2）から転写，翻訳されたプレプロペプチドのセリンまたはトレオニン残基の水酸基が脱水・環化酵素（halM1, halM2）により翻訳後修飾を受けることで特徴的なランチオニン構造が導入され，プロペプチドとなる．その後，ペプチダーゼドメインを有する輸送タンパク（halT）により，リーダーペプチドの切断，菌体外への分泌が行われる．このほか，haloduracin 生合成遺伝子クラスターには自己耐性に関与すると考えられる ABC トランスポーターをコードする遺伝子が 2 組（halG1, halE1, halF1 および halG2, halE2, halF2）存在している．

これらランチビオティックの産生および耐性に必要な遺伝子群の上流および下流に，それぞれ機能未知のタンパクをコードする遺伝子（BH0444, BH0456）がある．今回，これら 2 つの未知遺伝子と haloduracin 生合成遺伝子群との発現量の関連を検討した．

【方法】Haloduracin 生合成遺伝子を含む全長約 16.5 kb の DNA 配列について，Virtual Footprint の Promoter Analysis によるプロモーター予測，WebGesTer Database によるターミネーター予測，SOSUI を用いたシグナルペプチドおよび膜貫通ドメインの予測を行った．また，BH0444，BH0456 遺伝子の発現を確認するため，Horikoshi II 培地（pH 9.0）で 37˚C，9 h の培養を行った *B. halodurans* C-125 から全 RNA を抽出し，qPCR（Applied Biosystems 7500）を用いて定量を行った．

【結果および考察】BH0444 を含むオペロンに関連したターミネーターは 2 セットの ABC トランスポーター遺伝子の下流に予測された. また, BH0456 の下流にターミネーターが予測されたことから，BH0455，BH0456 でオペロンを構成していると予測された．SOSUI による解析では BH0444 は 3 回膜貫通型, BH0456 は 1 回膜貫通型の膜タンパクであると予測された. qPCR では BH0444 と halG1, halM1 と BH0456 の発現量がそれぞれ同等であることが明らかとなった．以上の結果から，機能未知遺伝子 BH0444 および BH0456 はいずれも haloduracin 生合成遺伝子とともに発現していると考えられる．



haloduracin, Bacillus halodurans, lantibiotic

講演番号：1D1p13
講演日時：3 月 24 日 16:22～ 1 号館 D1 会場

Lactobacillus plantarum PUK6 の多成分バクテリオシン遺伝子クラスターの同定および分子解析
Identification and molecular analysis of the gene cluster encoding multiple bacteriocins of *Lactobacillus plantarum* PUK6

○河原 あい[1]、善藤 威史[2]、松崎 弘美[1,3] ([1]熊本県大院環境共生、[2]九大院農、[3]熊本県大環境共生)
○Ai KAWAHARA[1], Takeshi ZENDO[2], Hiromi MATSUSAKI[1,3] ([1]Grad. Sch. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [2]Grad. Sch. Agric., Kyushu Univ, [3]Fac. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto)

【目的】乳酸菌が生産するタンパク質性増殖阻害物質のバクテリオシンは、その安全性の高さから天然の食品保存料として期待されている。本研究では、熊本県球磨地方の伝統的発酵食品「味噌漬け豆腐」から分離した *Lactobacillus plantarum* PUK6 が生産する多成分バクテリオシンの精製・同定と塩基配列決定および遺伝子解析を行うことを目的とした。
【方法および結果】*L. plantarum* PUK6 の培養液上清について、70%飽和硫安分画、透析（MWCO 1,000）、逆相 HPLC を用いてバクテリオシンを精製した。HPLC で得られた Fraction 1~7 について *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM1157^T を用いたバイオアッセイの結果、Fraction 1 および 4 で抗菌活性がみられた。Fraction 4 のアミノ酸配列分析の結果、既知のバクテリオシンと相同性を示さず、新規バクテリオシンあるいは機能不明タンパク質の分解物である可能性が示唆された。Fraction 1 については、HPLC による精製をさらに進めたところ、新たに 8 つのピークが得られ、全てに抗菌活性が検出された。抗菌活性が高かった 3 つのピークのアミノ酸配列を調べた結果、plantaricin A, NC8β および F と相同性を示した。これらバクテリオシン遺伝子に特異的なプライマーを用いて PCR を行い、増幅産物の塩基配列を決定した。その結果、plantaricin A, NC8 および EF の構造遺伝子を見出した。さらに、PCR を行い、PUK6 株の各バクテリオシン構造遺伝子は、*plnNC8*、*plnA* および *plnFE*（逆向き）の並びで位置していることが明らかとなった。これらの遺伝子の位置や BLAST 検索の結果から、PUK6 株の多成分バクテリオシンの構造遺伝子および生合成関連遺伝子は、これまでに報告されている *L. plantarum* 8P-A3 株および J51 株の *pln* locus と同様の遺伝子クラスターを有していると考えられた[1)]。そこで、それらのゲノム情報を参考にプライマーを設計し、ゲノム walking を行い、PUK6 株の plantaricin 遺伝子群 *pln* locus（約 20 kb）の塩基配列を決定した。また、この *pln* locus の中にバクテリオシンの可能性が高い遺伝子をさらに見出した。現在、それら遺伝子の機能解析を進めている。

1) Tsapieva, A. *et al*., *Benef. Microbes*, **2**, 255-261 (2011)

lactic acid bacteria, bacteriocin, *Lactobacillus plantarum*

発表責任者：松崎弘美（matusaki@pu-kumamoto.ac.jp）

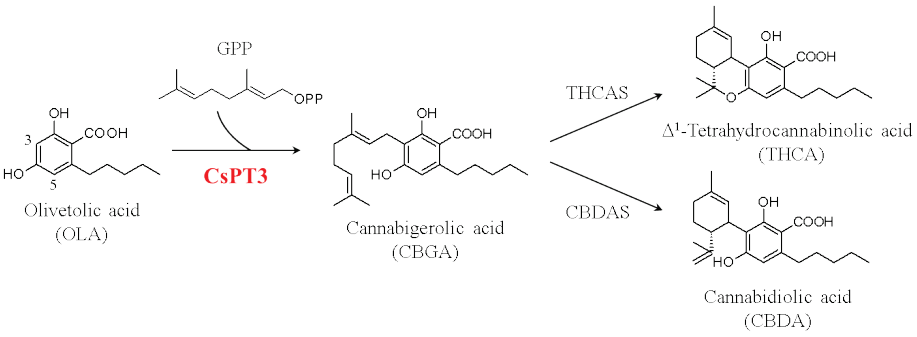
講演番号：1D2a01
講演日時：3 月 24 日 09:00～ 1 号館 D2 会場

大麻のカンナビノイド生合成に関与する新規プレニル転移酵素の同定
Identification of aromatic prenyltransferase involved in cannabinoid biosynthesis

○棚谷 綾介、黒崎 文也、田浦 太志（富山大院薬）
○Ryosuke TANAYA, Fumiya KUROSAKI, Futoshi TAURA (Toyama Univ. of Phar.)

【目的】大麻（*Cannabis sativa*）のカンナビノイドはポリケチドとモノテルペンから構成されるメロテルペノイドであり、その強力な薬理活性から古くより研究が盛んに行われてきた。主成分である THCA 及び CBDA は、前駆体のカンナビゲロール酸（CBGA）から FAD 依存型オキシダーゼにより生産される [1]。近年、オリベトール酸（OLA）及び GPP から CBGA を生成するプレニル転移酵素として CsPT1 が報告されたが [2]、副生成物を少なからず生産するなどその酵素機能に疑問が持たれた。本研究では、公開データベース（The Cannabis Genome Browser）のトランスクリプトームをスクリーニングすることにより、CBGA の生合成に関わる新たなプレニル転移酵素 CsPT3 を同定した。

【結果・考察】トランスクリプトームデータのスクリーニングを行った結果、既報の CsPT1 以外に 3 種の PT（CsPT2~4）の発現を確認した。これらはいずれもホップの苦味酸生合成酵素 [3]と高いホモロジーを示し、二次代謝に関与すると推察した。次いで、これら 4 つの候補遺伝子を酵母発現ベクターpPICZA にクローニングし、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* に形質転換した。発現誘導後のミクロソーム画分を粗酵素とし、OLA 及び GPP を基質としてアッセイを行ったところ、いずれの酵素を用いた場合も CBGA の生成が確認された。その中でも特に CsPT3 は高い活性を示し、定量分析の結果、本酵素の比活性は CsPT1、2 及び 4 と比較して 100 倍程度高いことを確認した。このことから、既知の CsPT1 ではなく CsPT3 がカンナビノイド経路で主に機能する PT であると考えられる。



1) Sirikantaramas S, Taura F (2017) Cannabinoids: biosynthesis and biotechnological applications. *Cannabis sativa* L.: Botany and Biotechnology. Springer, Cham, Switzerland, pp 183-206
2) Page J, Boubakir Z (2010) Aromatic prenyltransferase from Cannabis. Patent No. WO 2011017798 A1
3) Tsurumaru Y, Sasaki K, Miyawaki T, Uto Y, Momma T, Umemoto N, Momose M, Yazaki K (2012) HlPT-1, a membrane-bound prenyltransferase responsible for the biosynthesis of bitter acids in hops. Biochem Biophys Res Commun 417: 393-398

cannabinoid, prenyltransferase, biosynthesis

発表責任者：田浦　太志（taura@pha.u-toyama.ac.jp）

講演番号：1D2a02
講演日時：3 月 24 日 09:11～ 1 号館 D2 会場

クラス IB テルペン合成酵素の触媒反応の解析
Analysis of the catalytic reaction of class IB terpene synthase
○西 智之[1]、ステパノワ ラファエラ[1]、菅原 啓[1]、上田 大次郎[1]、藤橋 雅宏[2]、三木 邦夫[2]、保野 陽子[3]、品田 哲郎[3]、佐藤 努[1]（[1]新潟大院自然、[2]京大院理、[3]阪市大院理）
○ Tomoyuki NISHI[1], Rafaella STEPANOVA[1], Kei SUGAWARA[1], Daijiro UEDA[1], Masahiro FUJIHASHI[2], Kunio MIKI[2], Yoko YASUNO[3], Tetsuro SHINADA[3], Tsutomu SATO[1] ([1]Niigata Univ., [2]Kyoto Univ., [3]Osaka city Univ.)

私達は *Bacillus* 属細菌から、既知テルペン合成酵素と一次構造の類似性がなく既知モチーフ配列を持たない新型テルペン合成酵素ファミリー（クラス IB）を発見した[1-3]。クラス IB テルペン合成酵素は、C_{25}～C_{35} のプレニル二リン酸から二リン酸を脱離させ、対応する炭素数のテルペンに変換する[1-3]。これまでに炭素数 C_{25} を超えるプレニル二リン酸の構造変換を触媒できる酵素はほとんど見つかっておらず、我々の見いだしたクラス IB ファミリーに属する酵素群は、テルペンの構造多様性を大幅に拡張し、有用な化合物を見いだす手がかりになると考えられる。そのような背景の中、私たちは *Bacillus alcalophilus* 由来のクラス IB テルペン合成酵素（BalTS）について、クラス IB として初めて X 線結晶構造解析に成功した[4,5]。昨年度の本会では主に酵素化学的諸性質について報告した[6]。

【結果】
精製 BalTS を調製し、C_{20}-C_{35} の基質特異性を解析したところ、基質が短いほど反応性が良いことが分かった。*B. clausii* において、C_{25} と C_{30} がテルペン合成に主に使われ、C_{35} が主にメナキノン生合成に使われているが[3]、BalTS ホモログの基質特異性が関与しているのかもしれない。
私たちはごく最近、基質アナログと結合した BalTS の結晶構造を明らかにした[7]。今回、基質アナログ周辺の数種の塩基性アミノ酸残基をターゲットにした変異型 BalTS を解析した。全てにおいて酵素活性が著しく減少したことから、ターゲット残基は酵素活性に重要であることが判明した。
現在、生成物特異性に関与すると考えられる残基の変異型 BalTS の解析を行っており、合わせて発表する予定である。

【文献】
1) T. Sato *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, 133, 9734. 2) T. Sato *et al.*, *ChemBioChem*, 2013, 14, 822.
3) D. Ueda *et al.*, *ChemBioChem*, 2015, 16, 1371. 4) M. Fujihashi *et al.*, *Chem. Sci.*, 2018, 9, 3754.
5) 農化 2018, 3A17p01. 6) 農化 2018, 3A17p02. 7) 稲木ら，日本結晶学会 2018, PC-I-03

terpene synthase, isoprenoid, terpenoid

発表責任者：佐藤努（satot@agr.niigata-u.ac.jp）

講演番号：1D2a03
講演日時：3 月 24 日 09:22～ 1 号館 D2 会場

Mycobacterium 属細菌由来新型セスクアテルペン環化酵素の高感度活性測定法の構築とそれを利用した探索

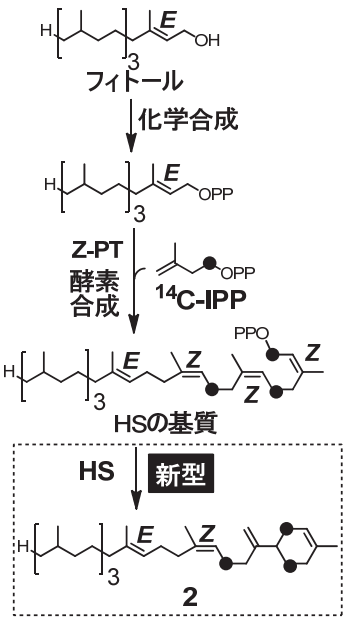
Construction of highly sensitive assay method of novel sesquarterpene cyclase from Mycobacterium species.

○阿部 透[1]、尾崎 真夢[1]、吉田 優里[2]、三浦 彩奈[2]、相良 昌寛[2]、上田 大次郎[1,2]、金古 堅太郎[1]、三ツ井 敏明[1,2]、佐藤 努[1,2] ([1]新潟大院自然、[2]新潟大農)

○Toru ABE[1], Sadamu OZAKI[1], Yuri YOSHIDA[2], Ayana MIURA[2], Masahiro SAGARA[2], Daijiro UEDA[1,2], Kentaro KANEKO[1], Toshiaki MITSUI[1,2], Tsutomu SATO[1,2] ([1]Niigata Univ., [2]Niigata Univ. of Agric.)

私たちは非病原性マイコバクテリアから環状セスクア（C_{35}）テルペン（Heptaprenylcycline **1** およびその類縁体）を単離し、その生合成研究を進めてきている[1-4]。アリル基質によって C_{35} と C_{50} の生成物を作り分ける二機能性 *Z* 型プレニル鎖伸長酵素（*Z*-PT）を同定した他[2]、*E*・*Z* 両プレニル鎖を還元する新しい酵素（PR）の存在を見出した[2,4]。また、**1** の環状骨格形成を触媒する Heptaprenylcycline 合成酵素（HS）は新型テルペン環化酵素（既知テルペン環化酵素と一次構造類似性なし）である可能性を見出し、探索を行っている[1]。新型酵素の同定は新たな触媒機構の解明や新規天然物発掘の糸口となることが期待される。特に、*Z* 型イソプレノイドを環化する点は非常に珍しく、新しい酵素ファミリーの発見につながることを期待している。

まず、アイソトープを利用した HS の高感度アッセイ系を構築した。主天然物の **1** の基質調製は難しいため、微量生産する dehydroheptaprenylcycline（**2**: **1** の一か所の *E* 型二重結合が非還元型）の基質調製を計画した。市販のフィトールを二リン酸化した PhytylPP と[^{14}C]-IPP を基質に、同定済みの *Z*-PT を用いて HS の基質[^{14}C]-C_{35}PP を酵素合成することに成功した。これを *Mycobacterium chlorophenolicum* 無細胞抽出液とインキュベートし、TLC と GC-MS 解析を行い、**2** の生成を確認した。多検体の解析に耐えうる高感度な酵素活性アッセイ系を構築できたため、この系を用いて HS の探索を行った。



変異誘発剤である NTG を用いて *M. chlorophenolicum* 変異株を約 1,500 株作製した。全ての株を 5 mL 培養して無細胞抽出液を調製し、**2** の生成活性を解析したが、HS 欠損株は得られず、遺伝子の同定には至らなかった。HS 遺伝子は必須である可能性が考えられた。続いて、酵素活性を指標に HS の精製を試みた。*M. chlorophenolicum* 無細胞抽出液の可溶性画分を DEAE クロマトグラフィーに供し、NaCl のリニアグラジエントにより分画したところ、部分精製できた。現在、ゲル濾過クロマトグラフィーによる精製及び LC-MS/MS を用いたタンパク質同定を進めている。また、本基質を利用して PR の探索も行っており、合わせて報告する予定である。1) *Org. Biomol. Chem.*, 2008, 6, 3788. 2) *ChemBioChem*, 2010, 11, 1874. 3) *BBB*, 2010, 74, 147. 4) *Tetrahedron Lett*., 2012, 53, 2522.

terpene synthase, prenyl reductase, isoprenoid

発表責任者：佐藤努（satot@agr.niigata-u.ac.jp）

講演番号：1D2a04
講演日時：3 月 24 日 09:33～ 1 号館 D2 会場

細菌由来テルペン合成酵素の大規模探索と複雑環骨格形成機構の解析
Identification and characterization of novel terpene synthases from bacteria
○村井 恵一[1]、三橋 隆章[2]、菊池 貴[3]、新家 一男[4]、藤田 誠[5,6]、阿部 郁朗[2,7]、西山 真[1,7]、葛山 智久[1,7] ([1]東大生物生産工学セ、[2]東大院薬、[3]リガク応技センター、[4]産総研、[5]東大院工、[6]分子研、[7]東大微生物イノベ連携機構)
○keiichi MURAI[1], Takaaki MITSUHASHI[2], Takashi KIKUCHI[3], Kazuo SHIN-YA[4], Makoto FUJITA[5,6], Ikuro ABE[2,7], Makoto NISHIYAMA[1,7], Tomohisa KUZUYAMA[1,7] ([1]BRC, UTokyo, [2]Grad. of Pharm., UTokyo, [3]Rigaku, [4]AIST, [5]Grad. of Tech., UTokyo, [6]Inst. for Mol. Sci., [7]CRIIM, UTokyo)

【背景】テルペンとは天然に約 8 万種の多様な構造の報告例がある天然物群最大のグループである。テルペン類はその合成過程で複雑な多環骨格を形成し、その絶対立体化学は環化酵素により厳密に制御されている。この骨格多様性と立体制御機構により、テルペン類は二次代謝産物として多様な生物活性が報告されている。しかし、細菌の培養液から検出されるテルペン類が少数であったこと、細菌型テルペン合成酵素は配列相同性がきわめて低く分子系統樹においてはほとんど分散してしまうことから、細菌はテルペン類をほとんど生産しないと考えられていた。そのため、これまでに機能解析された細菌型テルペン合成酵素はわずか 60 種ほどにとどまっている。
【目的・手法】本研究では、1) いまだ報告例の少ない細菌型テルペン合成酵素の大規模な探索を行うこと 2) それにより新奇なテルペン化合物を得ること 3) その詳細な環化機構の解析を行うことを目的とした。多検体の探索において、各段階のボトルネックとなる手法を以下のように改善することで解析効率の高速化を図った。1) *in silico* 解析における検出感度の高い隠れマルコフモデル法の採用。2) 遺伝子クローニングにおける低コスト・多検体化が可能な産業技術総合研究所ライブラリー化ゲノムサンプルの利用。3) 酵素アッセイにおいて高速かつ検出と精製の容易な *in vitro* 再構成系の利用。4) 構造決定においてはマイクログラムスケールで絶対立体構造の決定が可能な結晶スポンジ法と、NMR・MS スペクトルライブラリーを組み合せての利用。5) 環化機構解析においては、^{13}C・^{2}H 基質による全位置の炭素と水素の移動解析を取り入れた。
【結果】インハウス細菌ゲノムデータベースの全 140 株、1,242,605 個の ORF に対して、隠れマルコフモデルで作成された酵素活性ドメインモデルによる検索を行なった。これによりテルペン合成酵素候補群として 341 個の ORF を得た。さらにこの中から新奇性の高い酵素を抽出するため、BLAST を利用し既知の酵素群と比較して相同性の低い 53 個の ORF を抽出した。この 53 個の ORF の組換え酵素を調製し、炭素鎖長の異なる 3 種の基質を用いて in vitro テルペン合成アッセイを行なった。その結果、33 種の新奇酵素から 34 種の主反応産物を得た。ガスクロマトグラフィーのマスパターンライブラリーより 18 種は反応産物が同定でき、16 種は推定新奇化合物と考えられた。これらを NMR と結晶スポンジ法で解析したところ、Spata-11(18),14-diene、Pristinol と(9*R*)-3-Dehydroxy-trefolane A、新奇骨格セスキテルペンであることが現在までに明らかとなっている。発表では、その環化反応機構も含めて報告する。

isoprenoid, cyclase, genome mining

発表責任者：村井恵一（kei.murai.n.s@gmail.com）

講演番号：1D2a05
講演日時：3 月 24 日 09:44～ 1 号館 D2 会場

出芽酵母における薬剤排出ポンプ遺伝子の発現に関わる新規因子の探索
Exploration of novel factors related to gene expression of drug exhaust pumps in *S. cerevisiae*
○尾山 昌弘[1]、山口 良弘[1,2]、荻田 亮[1,3]、田中 俊雄[1]、藤田 憲一[1] ([1]阪市大院・理、[2]阪市大・複合先端、[3]阪市大・健康研セ)
○Masahiro OYAMA[1], Yoshihiro YAMAGUCHI[1,2], Akira OGITA[1,3], Toshio TANAKA[1], Kenichi FUJITA[1] ([1]Osaka City Univ. of Science, [2]Osaka City Univ. of Advanced Research Institute for Natural Science and Technology, [3]Osaka City Univ. of Research Center for Urban Health and Sports)

【背景】近年、抗菌剤の乱用により薬剤耐性菌が頻発してきている。真菌においてもアゾール系薬剤に対する耐性菌が臨床の現場で問題となってきている。薬剤耐性機構を抑制する薬剤を既承認の薬剤と組み合わせることは薬剤耐性真菌による感染症を克服する方法の一つであると言える。我々はアニスオイルの主成分トランス・アネトール（アネトール）が薬剤排出を抑制する活性を示すことを報告してきた。例えば、モデル薬剤であるドデカノール単独で出芽酵母を処理した場合、一時的に生菌数が下がるが、時間の経過に伴って薬剤排出ポンプ遺伝子 *PDR5* が高発現し、ドデカノールの細胞外への排出が促進され、逆に生菌数が増加する。しかし、アネトールを共存させた場合、アネトールは *PDR5* の発現を抑制し、ドデカノールの細胞外への排出を抑制し、抗真菌作用は持続する。少なくともドデカノールによる *PDR5* の高発現は、その転写因子の一つである *PDR3* が関連していることがわかっているが、詳細な誘導メカニズムは明らかになっていない。ヒト肝臓癌由来の培養細胞においては薬剤によって誘導される薬剤排出ポンプには細胞内 Ca^{2+}が関連するとの報告から、ドデカノールによる *PDR5* の誘導にも細胞内 Ca^{2+}が関係している可能性を想定した。
【方法及び結果】まず、細胞内 Ca^{2+}レベルの調節に関与する遺伝子欠損株群を用いてドデカノールの感受性を調べた。その結果、ゴルジ体への Ca^{2+}排出に関わる Ca^{2+}-ATPase *PMR1* の欠損株のみで感受性が高くなった。また、本欠損株を用いて生菌数の変化を調べたところ、ドデカノール単独処理において生菌数の回復が親株よりも遅れた。このことからドデカノールによる薬剤排出ポンプの高発現には *PMR1* が関係していると推定した。次いで細胞内 Ca^{2+}レベルを Fluo-4 AM 体を用いて調べた。その結果、ドデカノール単独処理および組み合わせ処理において細胞内の Ca^{2+}レベルが有意に上昇し、加えて *pmr1* 欠損株では親株よりも細胞内 Ca^{2+}レベルの上昇が持続していることがわかった。これらを踏まえて、親株における *PMR1* の発現量を調べた。その結果、ドデカノール単独処理と組み合わせ処理において、*PMR1* の発現量が減少していた。さらに、 *pmr1* 欠損株ではドデカノールによって *PDR5* は誘導されなかった。以上より、ドデカノールによって *PMR1* の発現量が低下した結果、細胞内 Ca^{2+}レベルが上昇した可能性が示唆された。また、*pmr1* 欠損あるいはそれに起因する Ca^{2+}レベルの上昇は *PDR5* の高発現を抑制する可能性も指摘された。

Ca^{2+}, *S. cerevisiae*, drug resistance

発表責任者：藤田憲一（kfujita@sci.osaka-cu.ac.jp）

講演番号：1D2a06
講演日時：3 月 24 日 10:05～ 1 号館 D2 会場

高還元型 II 型 PKS 由来 KS-CLF ヘテロダイマー及び ACP-KS-CLF 三者複合体の X 線結晶構造解析
X-ray structural analysis of the KS-CLF heterodimer and the ACP-KS-CLF ternary complex of a highly reducing type II PKS

○杜 丹ヤオ[1]、勝山 陽平[1,2]、伏信 進矢[1,2]、Chen Aochiu[3]、Davis Tony D.[3]、Burkart Michael. D[3]、大西 康夫[1,2]（[1]東大院農生科・応生工、[2]東大・微生物イノベ連携機構、[3]University of California, San Diego, Department of Chemistry and Biochemistry）
○Daoyao Du[1], Yohei Katsuyama[1,2], Shina Fushinobu[1,2], Aochiu Chen[3], Tony D. Davis[3], Michael. D Burkart[3], Yasuo Ohnishi[1,2] ([1]Grad. Sch. Argi. and Life Sci. Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, [3]University of California, San Diego, Department of Chemistry and Biochemistry)

【背景と目的】Ishigamide は *Streptomyces* sp. MSC090213JE08 において見出されたポリエン骨格を有するポリケタイドである。[1] 組換えタンパク質を用いた *in vitro* 解析により、ishigamide のポリエン骨格は II 型 polyketide synthase (PKS)である IgaPKS が触媒する縮合、還元、脱水の反応サイクルにより合成されることが明らかになった。[2] II 型 PKS は還元度の低い芳香族ポリケタイドの合成に特化したものと長年考えられてきたが、IgaPKS の解析により、II 型 PKS も高還元度のポリエン骨格の合成能を有していることが示された。IgaPKS において、Iga11-Iga12 (ketosynthase-chain length factor, KS-CLF) が触媒する脱炭酸を伴うクライゼン縮合により C-C 結合が形成され、Iga10 (acyl carrier protein, ACP) 上で鎖伸長が起こるが、芳香族ポリケタイド合成とは異なり、伸長した炭素鎖は KS-CLF の反応ポケットから外に運ばれ、Iga13, Iga16 による還元、脱水を受けたあと次のサイクルに入る。IgaPKS が触媒するポリエン合成の分子機構を理解するため、Iga11-Iga12 及び Iga11-Iga12 と Iga10 が形成する複合体の X 線結晶構造解析を行った。
【方法と結果】Iga11-Iga12 ヘテロダイマーの構造を 1.75 Å の分解能で決定した。次に、4-ホスホパンテテインアナログの先端に alkene chloride 構造を付加した crosslink probe を用いて、Iga10 と Iga11 が架橋された Iga10-Iga11-Iga12 三者複合体を調製し、その構造を分解能 1.98 Å で決定した。構造解析された KS-CLF は actinorhodin 生合成経路由来の KS-CLF ヘテロダイマー（KS-CLF_{Act}）に次いで本研究が二例目である。また、ACP-KS-CLF 三者複合体の構造は前例がない。Iga11-Iga12 は脂肪酸生合成由来の KS ホモダイマーや KS-CLF_{Act} と類似した全体構造を示した。Iga11-Iga12 の反応ポケットの入り口は Iga11 の表面にあり、その真下に KS の触媒三残基（Cys-His-His）が位置していた。この Cys から Iga12 の方向に向けてポケットが伸展しており、その深さは約 20 Å であった。KS-CLF_{Act} とは異なり、ポケットを構成するアミノ酸には極性のものが多いが、それらの側鎖はポケットの内側を向いておらず、ポケットは適度な疎水的環境を保持していた。また、Iga10 の helix II, III には酸性アミノ酸残基が多くあり、これらが Iga11-Iga12 の塩基性アミノ酸残基と水素結合を形成していた。水素結合を形成する塩基性アミノ酸残基のうち 4 つをそれぞれ Ala に置換すると、いずれの場合も Iga10 と Iga11-Iga12 間の crosslink 形成効率が低減したため、これらの水素結合が Iga10 と Iga11-Iga12 間の相互作用に重要であることが示唆された。
[1] Du *et al.*, **2016**, *Chembiochem, 17*, 15.; [2] Du et al., **2018**, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl, 57*, 7.

polyketide synthase, X-ray structural analysis, protein-protein interaction

発表責任者：大西康夫（ayasuo@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：1D2a07
講演日時：3 月 24 日 10:16～ 1 号館 D2 会場

Streptomyces griseus におけるイミニマイシン類の生合成遺伝子群の機能解析
Functional analysis of the genes for the biosynthesis of iminimycin in *Streptomyces griseus*
○堤 隼馬[1]、勝山 陽平[1,2]、手塚 武揚[1,2]、宮野 怜[3]、稲橋 佑起[4]、高橋 洋子[4]、中島 琢自[4]、大西 康夫[1,2] ([1]東大院・農生科、[2]東大・微生物イノベ連携機構、[3]北里大院・感染制御、[4]北里大・生命研)
○Hayama Tsutsumi[1], Yohei Katsuyama[1,2], Takeaki Tezuka[1,2], Rei Miyano[3], Yuki Inahashi[4], Yoko Takahashi[4], Takuji Nakashima[4], Yasuo Ohnishi[1,2] ([1]Grad. Sch. Agri. and Life Sci., Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, Univ. of Tokyo, [3]Grad. Sch. Inf. Cont. Sci. Kitasato Univ., [4]Kitasato Inst. Life Sci. Kitasato Univ.)

【背景・目的】イミニマイシン類は化合物の物理化学的性質に着目した physicochemical screening を用いて *Streptomyces griseus* より見出された化合物である。[1,2] これら化合物群はイミニウム基や octahydroindolizine 骨格、octahydroindolizine 骨格に融合したシクロプロパン環といった、天然物において非常に珍しい構造を有しており、その生合成機構には新規な酵素反応が関与していることが期待される。本研究ではイミニマイシン類生合成経路を解析することにより、これら特徴的な構造の形成に関与する酵素を同定し、その反応機構を解明することを目的とした。前回大会において、*S. griseus* IFO13350 株における生合成遺伝子クラスターの同定、遺伝子クラスター中の生合成遺伝子破壊 (8 種) とそれぞれの株の代謝解析の結果を発表した。[3] 本大会では、各生合成酵素遺伝子破壊株の代謝産物を詳細に解析した結果について発表する。
【方法・結果】イミニマイシン類生合成遺伝子クラスターにコードされる I 型ポリケチド合成酵素（PKS）はテトラエンと末端アルデヒドを有する直鎖状のオクタケタイドを合成すると予想された。生合成遺伝子クラスター中のアミノ基転移酵素をコードする *sgr6375* を in-frame にて破壊した結果、イミニマイシン類の生産が消失し、この直鎖状のオクタケタイドと$[M+H]^+$が一致する化合物 **1** の蓄積が見られた。**1** は培養液中にて末端のアルデヒドがカルボン酸へ酸化された **1'**へと変換されていることが LC-MS 解析から明らかとなったため、**1'** を単離し、NMR により構造解析した。その結果、**1'**は予想通りのポリケタイド骨格を有していた。次に機能未知タンパク質をコードする *sgr6377* と acyl-CoA dehydrogenase をコードする *sgr6379* の遺伝子破壊株にて蓄積した化合物 (それぞれ **2** と **3**) の構造解析を行った。これらの化合物は極めて不安定であると予想されたため、水素化ホウ素ナトリウムを用いて **2**, **3** を還元し、その結果生じた **2'**, **3'**をそれぞれ単離、構造解析した。その結果、**2'**はエポキシ環、octahydroindolizine 骨格とトリエンからなる化合物で、**3'**は **2'**からエポキシ環が取り除かれた化合物であった。これらの構造から中間体である **2**, **3** の構造を予測した。これらの化合物は octahydroindolizine 骨格をもつものの、シクロプロパン環を構造中に有しておらず、トリエン部位も α, β から β, γ 二重結合へとシフトしていた。このため、シクロプロパン環は octahydroindolizine 骨格形成後に二重結合のシフトとそれに伴う C-N 結合の切断、その後の C-C 結合と C-N 結合の形成という例を見ない大規模な骨格のリアレンジメントを伴って作られると予想された。現在、他の遺伝子破壊株において蓄積していた化合物の構造解析を進めている。
【引用文献】1) Nakashima, T. *et al*. *J. Antibiot*. 2016, 69, 611-615. 2) Nakashima, T. *et al. Tetrahedron Lett.* 2016, 57, 3284-3286. 3) 堤ら, 2018 年度日本農芸化学会 (名古屋), 3A17a04, 2018 年 3 月

biosynthesis, polyketide, iminium ion

発表責任者：大西 康夫（ayasuo@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：1D2a08
講演日時：3 月 24 日 10:27～ 1 号館 D2 会場

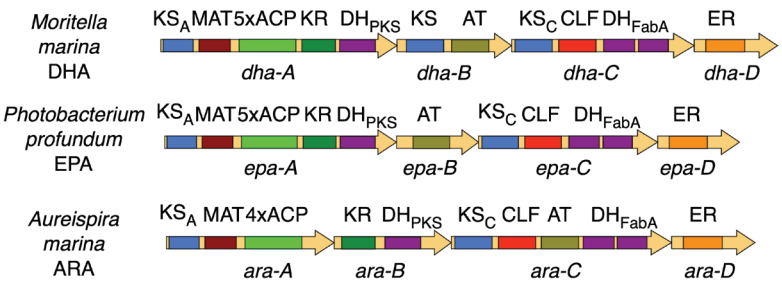
in vivo 解析による多価不飽和脂肪酸生合成酵素の生成物制御ドメインの同定
Essential domain for controlling the product profiles in polyunsaturated fatty acid synthases
林 祥平[1]、中 真以[1]、○佐藤 康治[2]、氏原 哲朗[3]、大利 徹[2] ([1]北大院総合化学、[2]北大院工、[3]協和発酵バイオ)
Shohei HAYASHI[1], Mai NAKA[1], ○Yasuharu SATOH[2], Tetsuro UJIHARA[3], Tohru DAIRI[2] ([1]Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., [2]Grd. Sch. Eng., Hokkaido Univ., [3]Kyowa Hakko Bio Co., LTD)

【研究背景】

ドコサヘキサエン酸（DHA; C22:6 ω3)、エイコサペンタエン酸（EPA; C20:5 ω3）、アラキドン酸（ARA; C20:4 ω6）に代表される多価不飽和脂肪酸（PUFA）は必須脂肪酸であり、魚油等が主な供給源である。しかし近年の需要増加や海洋資源の保護の観点から海洋資源に依存しない供給源が求められており、微生物発酵が注目されている。ある種の海洋性微細藻類や細菌は PUFA を脂肪酸合成酵素ではなく、ポリケチド合成酵素（PKS）様のマルチドメインから構成される巨大酵素複合体（PUFA 合成酵素）により生合成する。しかし、巨大酵素であるが故に詳細な機能解析例は少ない。そこで本研究では、*Moritella marina* 由来 DHA 合成酵素、*Photobacterium profundum* 由来 EPA 合成酵素、*Aureispira marina* 由来 ARA 合成酵素を用い、*cis* 二重結合形成および炭素鎖長制御ドメインの解明を目的とした。

【方法・結果】

上記PUFA合成酵素は巨大酵素であり、酵素全長を用いた*in vitro*解析は困難である。そこで大腸菌を用いた異種宿主発現系で評価した。最初に4つのサブユニットからなる各々の酵素遺伝子を共存可能なベクターで発現させた結果、形質転換株は予想されるPUFAを生産した。次に*cis*二重結合形成機構の手掛かりを得るため、EPA（ω3）の各サブユニット遺伝子を対応するARA（ω6）遺伝子と置換する方法、サブユニットの途中で相互に入れ替えて構築したキメラ酵素遺伝子を用いる方法で解析した。その結果、ARA合成酵素のCサブユニットに存在するβ-ketoacyl synthase（KS_C）/chain length factor（CLF）ドメインおよびdehydratase (DH_{FabA}）ドメインとBサブユニットに存在するDH_{PKS}ドメインがARA（ω6）生産に必須であることが分かった。また、炭素鎖長制御機構を解明するため、DHA（C22）とEPA（C20）の合成酵素遺伝子を用いて同様の実験を行った結果、DHA/EPA合成酵素のCサブユニットに存在するKS_C/CLFドメインが関与することが分かった。



原核生物由来 PUFA 合成酵素遺伝子とそのドメイン構造

polyunsaturated fatty acid synthase, polyketide synthase, biosynthesis

発表責任者：大利徹（dairi@eng.hokudai.ac.jp）

講演番号：1D2a09
講演日時：3 月 24 日 10:38～ 1 号館 D2 会場

in vitro 解析による多価不飽和脂肪酸生合成酵素の *cis* 二重結合形成機構の解明
Control mechanism for *cis* double bond formation by polyunsaturated fatty acid synthases.

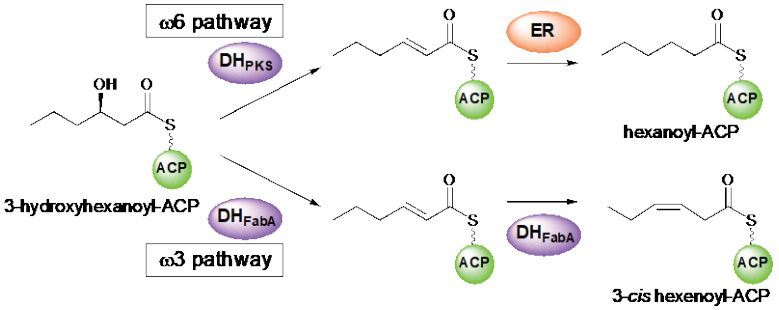
林 祥平[1]、○小笠原 泰志[2]、佐藤 康治[2]、丸山 千登勢[3]、濱野 吉十[3]、氏原 哲朗[4]、大利 徹[2]([1]北大院総合化学、[2]北大院工、[3]福井県大院・生物資源、[4]協和発酵バイオ)
SHOHEI HAYASHI[1], ○Yasushi OGASAWARA[2], Yasuharu SATO[2], Chitose MARUYAMA[3], Yoshimitsu HAMANO[3], Testuro UJIHARA[4], Tohru DAIRI[2] ([1]Grad. Sch. Chem. Sci Eng., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., [3]Fukui pref. Univ., [4]Kyowa Hakko Bio)

【研究背景】

ある種の海洋性微細藻類や細菌はポリケチド合成酵素（PKS）様のマルチドメインから構成される巨大酵素複合体（PUFA 合成酵素）によりドコサヘキサエン酸（DHA; C22:6 ω3)、エイコサペンタエン酸（EPA; C20:5 ω3）、アラキドン酸（ARA; C20:4 ω6）を特異的に生合成する。前演者が報告したように、当研究室では大腸菌を用いた異種宿主生産系を基盤とした遺伝子やドメインの置換実験により、生成物を制御するドメインの解析を行った。その結果、*cis* 二重結合導入位置（ω3 とω6）の制御にはβ-ketoacyl synthase (KS)/chain length factor (CLF) ドメインおよび 2 つの dehydratase（DH）ドメインが重要であることを明らかにした。2 つの DH ドメインはそれぞれ、モジュラー型 PKS 中の DH (DH_{PKS})、*cis* 型不飽和脂肪酸の生合成に関わる FabA 型 DH (DH_{FabA}）と相同性を示すことから、これらが *cis* 二重結合導入の位置を制御すると予想された。そこで本研究では、*in vitro* 解析による DH ドメインの詳細な機能解明を試みた。

【方法・結果】

Photobacterium profundum 由来 EPA 合成酵素、*Aureispira marina* 由来 ARA 合成酵素に存在する 2 つの DH ドメインを大腸菌で発現し組換え酵素を調製した。また、炭素鎖長の異なるアシル-ACP 基質も有機合成と酵素により調製した。種々の組み合わせで酵素反応を行った結果、3-hydroxyhexanoyl-ACP 基質に対して、ARA 合成酵素では DH_{PKS} が DH_{FabA} と比較して高い触媒活性を示し、逆に EPA 合成酵素では DH_{FabA} が DH_{PKS} よりも高い活性を示した。したがって、本中間体がω6、ω3 系 PUFA の作り分け分岐点であることが分かった。またアシル-SNAC 基質を用いて、DH_{FabA} は脱水反応に続く二重結合の異性化も触媒し、*cis* 二重結合を形成することも証明した。



ω6、ω3 系 PUFA の生成機構

polyunsaturated fatty acid synthase, dehydratase, biosynthesis

発表責任者：大利徹（dairi@eng.hokudai.ac.jp）

講演番号：1D2a10
講演日時：3 月 24 日 10:49～ 1 号館 D2 会場

in vitro 解析による多価不飽和脂肪酸生合成酵素の炭素鎖長制御機構の解明
Control mechanism for carbon chain length in polyunsaturated fatty acid synthases.

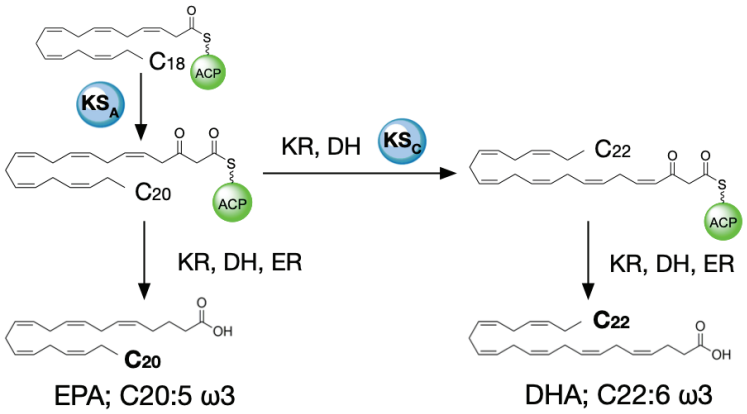
○林 祥平[1]、小笠原 泰志[2]、佐藤 康治[2]、丸山 千登勢[3]、濱野 吉十[3]、氏原 哲朗[4]、大利 徹[2]([1]北大院総合化学、[2]北大院工、[3]福井県大院・生物資源、[4]協和発酵バイオ)
○ Shohei HAYASHI[1], Yasushi OGASAWARA[2], Yasuharu SATOH[2], Chitose MARUYAMA[3], Yoshimitsu HAMANO[3], Tetsuro UJIHARA[4], Tohru DAIRI[2] ([1]Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., [3]Fukui Pref. Univ., [4]Kyowa Hakko Bio)

【研究背景】

ある種の海洋性微細藻類や細菌はポリケチド合成酵素様のマルチドメインから構成される巨大酵素複合体 (PUFA 合成酵素) によりドコサヘキサエン酸 (DHA; C22:6 ω3) やエイコサペンタエン酸 (EPA; C20:5 ω3) を特異的に生合成することが知られている。先の演者が報告したように、当研究室では *Moritella marina* 由来 DHA 合成酵素と *Photobacterium profundum* 由来 EPA 合成酵素を用いた *in vivo* 解析により、サブユニット C にあるβ-ketoacyl synthase (KS_C)/chain length factor (CLF) ドメインが生産物の炭素鎖長を制御していることを明らかとした。そこで本研究では、*in vitro* 解析による詳細な炭素鎖長制機構の解明を試みた。

【方法・結果】

M. marina 由来 DHA 合成酵素と *P. profundum* 由来 EPA 合成酵素には、サブユニット C の KS_C に加え、サブユニット A にも KS ドメイン (KS_A) が存在する。両 KS ドメインの機能を明らかにするため、各 KS ドメインの組換え酵素を調製した。炭素鎖長が異なるアシル-ACP 基質と各組換え酵素を用いて *in vitro* 反応を行った結果、KS_A は何れも炭素鎖長が短い基質を認識する一方、KS_C は何れも中鎖の基質を認識することが分かった。次に、炭素鎖長が C_{18} の基質を用いたところ、何れも KS_A のみが炭素鎖長 C_{18} から C_{20} への縮合反応を触媒することが明らかとなり、EPA 生合成の最後の縮合反応には KS_A が関与することが示された。DHA 生合成の最後の縮合反応も解析した結果、*M. marina* 由来の KS_C のみが炭素鎖長 C_{20} から C_{22} への縮合反応を触媒することが示唆された。以上の結果から PUFA 合成酵素は基質の炭素鎖長を認識し、鎖長伸長に 2 つの KS ドメインを巧妙に使い分けること、また KS_C の僅かな基質特異性の違いが最終生産物の炭素鎖長を制御していることを明らかとした。



PUFA 合成酵素における炭素鎖長制御機構

polyunsaturated fatty acid synthase, ß-ketoacyl synthase, biosynthesis

発表責任者：大利徹（dairi@eng.hokudai.ac.jp）

講演番号：1D2a11
講演日時：3 月 24 日 11:10～ 1 号館 D2 会場

放線菌由来新規 III 型ポリケタイド合成酵素の発見と閉環機構の解析

A new Insight into the mechanism of cyclization by identicfication of a novel type III polyketide synthase

○佐々木 允人、曽根 祐輔、中村 修人、安間 満彦、長谷部 文人、鮒 信学（静県大食栄）
○Makoto SASAKI, Yusuke SONE, Shuto NAKAMURA, Mitsuhiko YASUMA, Fumihito HASEBE, Nobutaka FUNA (Univ. of Shizuoka)

【目的】放線菌由来の III 型ポリケタイド合成酵素（PKS）である RppA（THNS）は、5 分子の malonyl-CoA から 1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene（THN）の合成を触媒する [1]。*Streptomyces sp.* NRRL S-340 由来の *IG64_RS22470*（*70*）は、THNS と 61%の相同性を有する。本研究では、70 の機能解析、70 と THNS のキメラ酵素の構築、70 への部位特異的変異導入による THNS の閉環機構の解析を行った。
【方法および結果】70 の組換え蛋白質を調製し、malonyl-CoA を基質として *in vitro* 反応を行った。70 の反応液の抽出物を HPLC で分析した結果、THN はほとんど検出されなかった。一方、水層を HPLC で分析したところ、UV287 nm で対照実験にはないピークが検出された。HRMS を用いて解析したところ、本ピークは pentaketide-CoA の理論質量と一致した。以上より 70 は、THNS と異なる活性を有することが判明した。malonyl-CoA を HPLC で定量することにより、70 は malonyl-CoA に対し $K_m = 7.9 \pm 1.4$ μM の親和性を有し、$k_{cat} = 6.3 \pm 0.3$ min^{-1} で malonyl-CoA を消費することが分かった。
THNS と 70 遺伝子には、5'-末端から 327 bp（*Bsp*HI）および 806 bp（*Apa*LI）に共通の制限酵素サイトが存在する。そこで両遺伝子を *Bsp*HI、*Apa*LI で切断し、N 末端領域、中央領域、C 末端領域を相互に組み合わせた 6 種のキメラ酵素を作製した。これらの酵素の組換え蛋白質を *S. lividans* TK21 を用いて調製し、malonyl-CoA を基質として *in vitro* 反応を行った。興味深いことに、C 末端領域のみが THNS 型である chimera 4 の反応液中に THN の生産が確認された。さらに THNS と 70 の双方に共通するアミノ酸 A305（THNS）及び A308（70）に silent mutation を導入することで *Nhe*I サイト導入し、それらを連結することで、C 末端領域のさらなる細分化を行った。すると C 末端領域の前半部分（C1 領域）のみが THNS 型である chimera 8 においても THNS 活性が確認された。そこで、C1 領域中に含まれる 70 に特徴的な残基に対して部位特異的変異導入を行ったところ、70 の V279I が THNS 活性を示すことが判明した。
【考察】70 は malonyl-CoA の縮合反応のみを触媒し、pentaketide-CoA を放出する新規な酵素である。現在、[^{13}C]-malonate を用いた *in vitro* 反応により、pentaketide-CoA の構造解析を行っている。70 は THNS と高いアミノ酸相同性を有するにも関わらず、THNS とは異なり、閉環反応を触媒しない。今回、Val279（70）と Ile276（THNS）が両酵素の閉環機構の差異に寄与することが判明した。今後、本残基の違いが如何に触媒ポケットや中間体のホールディングに影響を与えるかを検討する予定である。

1) N. Funa *et al. Nature* **400**, 897-899 (1999)

polyketide, enzyme, cyclization

講演番号：1D2a12
講演日時：3 月 24 日 11:21～ 1 号館 D2 会場

多価不飽和脂肪酸生合成酵素の論理的機能改変

Engineering of polyunsaturated fatty acid synthase to alter the product specificity

○池内 健心[1]、中 真以[1]、林 祥平[1]、大塚 慎[1]、小林 洸太[1]、佐藤 康治[2]、小笠原 泰志[2]、氏原 哲朗[3]、大利 徹[2] ([1]北大院総合化学、[2]北大院工、[3]協和発酵バイオ)
○Kenshin IKEUCHI[1], Mai NAKA[1], Shohei HAYASHI[1], Makoto OTSUKA[1], Kota KOBAYASHI[1], Yasuharu SATOH[2], Yasushi OGASAWARA[2], Tetsuro UJIHARA[3], Tohru DAIRI[2] ([1]Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., [3]Kyowa Hakko Bio Co., LTD)

【研究背景】

ある種の海洋性微細藻類や細菌はマルチドメインから構成される巨大酵素複合体 (PUFA 合成酵素) によりドコサヘキサエン酸 (DHA; C22:6 ω3) やエイコサペンタエン酸 (EPA; C20:5 ω3) を特異的に生合成する。これまで PUFA 合成酵素の詳細な生合成マシナリーが未解明であったため、酵素工学的手法による生産物特異性の改変に成功した例はない。しかし、前演者らが報告したように、当研究室ではその詳細な生合成マシナリーの全容を解明したことから、本知見に基づいた論理的改変による、原核および真核生物由来 DHA 合成酵素の EPA 合成酵素への転換を試みた。

【方法・結果】

前演者が述べたように、原核生物由来 PUFA 合成酵素のサブユニット C にあるβ-ketoacyl synthase (KS_C)/chain length factor (CLF) ドメインが最終生産物の炭素鎖長制御に重要であることが明らかになった。そこで、KS_C/CLF ドメインのアミノ酸配列情報の比較及び Phyre2 を用いた立体構造モデリングから、DHA と EPA 合成酵素の各酵素にそれぞれ保存され、基質認識に重要と考えられるアミノ酸残基を選定した。次いで DHA 合成酵素の各アミノ酸残基を対応する EPA 合成酵素のアミノ酸残基へと置換し、大腸菌を用いた *in vivo* PUFA 生産系を用いて変異酵素を評価した。その結果、CLF ドメインにある 2 つのアミノ酸残基 E665 と R705 変異体がそれぞれ完全に DHA 合成活性を消失する一方で EPA 合成活性を示した。したがって、CLF ドメインの 1 アミノ酸置換で DHA 合成酵素から EPA 合成酵素へ転換することが示された。

真核生物由来 PUFA 合成酵素は全て DHA 合成酵素であり EPA を合成する酵素の報告はない。したがって、比較対象とする配列が存在しないことから上記の手法は使えない。そこで、DHA 合成酵素の KS_B/CLF ドメインをターゲットに Error-prone PCR でランダム変異を導入し、EPA 合成活性を獲得した変異酵素の取得を試みた。KS_B と CLF ドメインの変異体ライブラリーを作成し、上記 *in vivo* PUFA 生産系を用いて約 6000 サンプルをスクリーニングした結果、EPA 合成活性を示す変異酵素の取得に成功した。

polyunsaturated fatty acid synthase, polyketide synthase, biosynthesis

発表責任者：大利徹（dairi@eng.hokudai.ac.jp）

講演番号：1D2a13
講演日時：3 月 24 日 11:32～ 1 号館 D2 会場

Recognition mechanism of substrate chirality in UDP-MurNAc-L-Ala-Glu synthetase

○Ruoyin FENG[1], Yasuharu SATOH[2], Hiroyuki MORITA[3], Yasushi OGASAWARA[2], Tohru DAIRI[2]
([1]Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., [3]Inst. Nat. Med., Univ. Toyama)

Background

D-Glutamate (Glu) supplied by Glu racemases or D-amino acid transaminase is generally used for peptidoglycan biosynthesis in microorganisms. However, we recently revealed that a new pathway for peptidoglycan biosynthesis was operating in some microorganisms such as *Xanthomonas oryzae* [1]. It involves two enzymes, MurD2 and MurL, which catalyzed ligation of L-Glu to UDP-MurNAc-L-Ala and epimerization of the terminal L-Glu of the product, respectively. Interestingly, MurD2 possess 30% identity with canonical MurD which ligates D-Glu to UDP-MurNAc-L-Ala. In this study, we examined how MurD and MurD2 recognize the isomer substrates, D-Glu and L-Glu.

Methods and results

First, we estimated MurD2 structure based on a MurD structure by docking simulations. Several amino acid residues, which were probably responsible for L-Glu recognition, were then replaced with corresponding amino acid residues in MurD. Consequently, we obtained a mutated MurD2 enzyme accepting only D-Glu as the substrate by two amino acid substitutions.

Next, we tried to convert the substrate specificity of MurD by the same strategy, but the mutated enzymes still accepted only D-Glu. Then, we tried isolating a MurD mutant that could accept L-Glu by a random mutagenesis. D-Glu auxotrophic *E. coli* mutant (WM335) can grow by complementation with *murD2* and *murL* [1] but cannot grow with *murD* and *murL*. However, the latter strain plausibly becomes able to grow only when the substrate specificity of MurD is changed from D-Glu to L-Glu. We therefore constructed a plasmid library containing mutated *murD* by error-prone PCR and introduced into WM335 together with MurL, followed by selection on a plate without D-Glu. We obtained a few mutated enzymes and their characterizations are now in progress. Thus, we revealed that only a few amino acid residues in MurD and MurD2 controlled the acceptable substrates with different stereochemistry.

[1] Feng, R.; Satoh, Y.; Ogasawara, Y.; Yoshimura, T.; Dairi, T. *J. Am. Chem. Soc*. **2017**, *139*, 4243.

peptidoglycan biosynthesis, MurD, *Xanthomonas oryzae*

発表責任者：大利徹（dairi@eng.hokudai.ac.jp）

講演番号：1D2a14
講演日時：3 月 24 日 11:43～ 1 号館 D2 会場

Biosynthetic Gene Cluster of a D-Tryptophan-Containing Lasso Peptide, MS-271

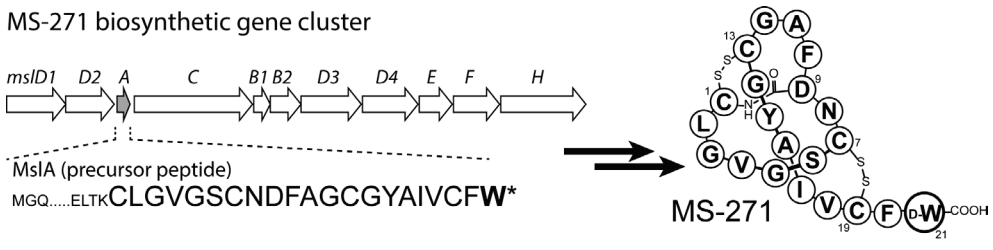
○Zhi FENG[1], Yasushi OGASAWARA[2], Satoshi NOMURA[1], Tohru DAIRI[2] ([1]Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

[Introduction]

MS-271, produced by *Streptomyces* sp. M-271, is a lasso peptide natural product comprising 21 amino acid residues with a D-tryptophan (D-Trp) at its *C*-terminus.[1] Because lasso peptides are ribosomal peptides, the biosynthesis of MS-271, especially the mechanism to introduce D-Trp, is of great interest. In this study, we investigated the biosynthesis of MS-271.

[Results & Discussion]

We first performed draft genome analysis of *Streptomyces* sp. M-271 and identified a gene cluster containing a precursor peptide (*mslA*) and genes for modification enzymes typical for lasso peptide biosynthesis. The *mslA* gene encoded a peptide composed of 42 amino acid residues including a leader peptide at its *N*-terminus, and most importantly, the *C*-terminal core region contained all 21 amino acid residues of MS-271 including the *C*-terminal tryptophan. This indicated that the D-Trp residue is generated via epimerization of the precursor peptide. For posttranslational modification, a lasso peptide isopeptide bond-forming cyclase (MslC), a precursor peptide recognition element (MslB1), a cysteine protease (MslB2), disulfide oxidoreductases (MslE, MslF), and a protein of function unknown (MslH) in the cluster are likely involved. Although the cluster did not encode obvious epimerase genes, heterologous expression of the putative MS-271 cluster in *Streptomyces lividans* showed that it contains all the necessary genes for MS-271 production including a gene for a novel peptide epimerase. Furthermore, gene deletion experiments indicated that all the modification enzymes were required for MS-271 production and that some interactions of the biosynthetic enzymes were essential for the biosynthesis of MS-271.[2]



[References]

[1] Yano, K. *et al. Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 115.

[2] Feng, Z. *et al. ChemBioChem* **2018**, *19*, 2045.

biosynthesis, lasso peptides, D-amino acids

発表責任者：大利徹（dairi@eng.hokudai.ac.jp）

講演番号：1D2a15
講演日時：3 月 24 日 11:54～ 1 号館 D2 会場

放線菌由来β-カルボリン化合物キタセタリン生合成経路の解明
Identification of biosynthetic genes for kitasetaline, a ß-carboline alkaloid from *Kitasatospora setae*

○木谷 茂[1]、上田 祥平[1]、池尻 幸範[1]、難波 卓司[2]、池田 治生[3]、仁平 卓也[1]([1]阪大・生物工学国際交流セ、[2]高知大・農林海洋科学、[3]北里大・北里生命科学研究所)
○Shigeru KITANI[1], Shohei Ueda[1], Yukinori Ikejiri[1], Takushi Namba[2], Haruo Ikeda[3], Takuya Nihira[1] ([1]International Center for Biotechnology, Osaka U, [2]Science Research Center, Kochi U, [3]Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato U)

【背景】
β-カルボリン化合物は、多彩な生理活性を示す有用分子群である。本化合物は、高等植物より主に同定され、多くの生合成経路が解明されている。一方、微生物由来 β-カルボリン化合物の報告は僅かであり、その生合成情報が乏しいのが現状である。我々は、放線菌 *Kitasatospora setae* より、β-カルボリン化合物キタセタリンを同定し、その生産に関与するゲノム領域を見出した(1)。しかし、キタセタリン生合成における最小生合成遺伝子群とその触媒経路は明らかではない。

本研究では、キタセタリンの生合成経路を解明すると共に、新規 β-カルボリン分子を創出することを目的とした。

【結果】
キタセタリン生合成に直接的に関与する遺伝子を同定するため、*kse_70700-kse_70630* 領域を縮小化し、*Streptomyces avermitilis* SUKA22 株に導入した。各種組換え体の生産物を解析した結果、明瞭な機能ドメインを保持しない KslB が、飽和型 β-カルボリン分子であるキタセタリン酸を生合成すること(2)、またシトクロム P450 酵素である KslC がキタセタリン生産に必須であることが明らかとなった。また、休止細胞実験より、酸化還元酵素である KslA が、キタセタリン酸を不飽和型 β-カルボリン分子 JBIR-133 に変換することが分かった。

一方、キタセタリンに含まれる *N*-アセチルシステイン残基は、マイコチオールに由来する可能性が示唆された。キタセタリンと同様に、*N*-アセチルシステイン残基が構造に含まれるシスラブダンは、その生合成の最後の過程はアミド加水分解酵素（マイコチオール付加体アミダーゼ）によって行われる(3)。このアミダーゼ遺伝子（*mca*）を破壊した *S. avermitilis* SUKA22 株に、*kslA-kslB-kslC* 遺伝子を導入した結果、キタセタリンの生産は消失し、マイコチオール付加体が蓄積した。以上より、キタセタリン生合成に関わる複数の酵素遺伝子を同定することに成功した。

次に、*ksl* 遺伝子発現株に、フルオロトリプトファンを添加したところ、4 種の新規 β-カルボリン分子が生産され、その 1 種が新たな生理活性を示した。

(1) Appl Environ Microbiol. 78:8015-24. 2012.
(2) J Antibiot (Tokyo). 71:854-61. 2018.
(3) J Ind Microbiol Biotechnol 43:325-42. 2016.

β-carboline, biosynthesis, Kitasetaline

発表責任者：木谷茂（kitani@icb.osaka-u.ac.jp）

講演番号：1D2p01
講演日時：3 月 24 日 13:50～ 1 号館 D2 会場

ペニシリン結合タンパク質が触媒する非リボソームペプチドの環化反応
Cyclization of non-ribosomal peptide catalyzed by penicillin-binding protein-type thioesterase
○松田 研一[1]、小林 雅和[1]、佐野 文映[1]、倉永 健史[1]、高田 健太郎[2]、松永 茂樹[2]、脇本 敏幸[1] ([1]北大院薬、[2]東大院農)
○Kenichi Matsuda[1], Masakazu Kobayashi[1], Ayae Sano[1], Takefumi Kuragnaga[1], Kentaro Takada[2], Shigeki Matsunaga[2], Toshiyuki Wakimoto[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]The Univ. of Tokyo)

ペプチドの大環状化は現代の有機化学をもってしても難度の高い反応ステップであるが、天然に由来する環状ペプチドの生合成では、各化合物に特化したペプチド環化酵素が位置選択的な環化反応を効率よく触媒する。このため基質特異性の寛容なペプチド環化酵素はペプチド環化触媒としての応用が期待できる。

カテプシン B 阻害物質として *Streptomyces* 属海洋放線菌より単離された環状オクタペプチド surugamides A-E (SA-SE) は、ふたつの非リボソーム型ペプチド合成酵素(NRPS) 、SurA/SurD によって生合成される。さらに、これら NRPS 遺伝子の間には、別の 2 つの NRPS、SurB/SurC をコードする遺伝子が挿入されており、SurB/SurC は SA-SE とは全く異なる直鎖状デカペプチド surugamide F (SF) を生合成する。NRPS は、複数ドメインからなる巨大多機能酵素であり、通常、タンパク質 C 末端に位置する TE ドメインがペプチド鎖チオエステル中間体の放出および環化を担うが、SurA/SurD, SurB/SurC はいずれも C 末端にこれらのドメイン欠いた TE-less NRPS であり、生合成中間体の環化放出機構は全く未知の状況である。そこで本研究では、surugamide 類生合成における中間体ペプチド鎖の NRPS からの環化を伴った放出機構を明らかにすることを目的とした。

SurA 遺伝子の上流にはペニシリン結合タンパク質（PBP）SurE がコードされている。本ファミリーに属するタンパク質は、基質結合ポケットに保存されたセリン残基を介して、D-アミノ酸を含む基質と基質－酵素複合体を形成し、ペプチド鎖の加水分解や新たなペプチド結合形成を触媒する。SurE は、一般にペプチド産物の環化放出を担う TE ドメインと相同性を全く示さないものの、本機構は TE ドメインのそれと類似している。そこで、*surE* 遺伝子を破壊したところ、SA-SE 及び SF の生産が消失したことに加え、遺伝子相補実験によりこれら化合物の生産が回復した。SA-SE 及び SF 生合成中間体をミミックした SNAC 体をペプチド固相合成法により化学合成し、SurE 組換えタンパク質との *in vitro* アッセイに供したところ、SurE は、アミノ酸配列・残基数が全く異なる 2 種類の基質を効率よく環化体へと変換した。以上のことから SurE は surugamide 生合成における二機能型の独立ペプチド環化酵素であり寛容な基質特異性を有することが判明した。今後は SurE のより詳細な機能解析を通じて、ペプチド環化触媒としての可能性を検証する。加えてデータベース検索により、PBP type TE を含む産物未同定の TE-less NRPS 遺伝子クラスターの一群が見出された。PBP type TE 遺伝子を指標としたゲノムマイニングにより、新たな環状ペプチド群の網羅的探索を進める。

non-ribosomal peptide, cyclization, penicillin-binding protein

発表責任者：脇本敏幸（wakimoto@pharm.hokudai.ac.jp）

講演番号：1D2p02
講演日時：3 月 24 日 14:01～ 1 号館 D2 会場

JBIR-34, -35 と JBIR-126 の生合成に関わる NRPS のモジュール間相互作用
Interaction between NRPS modules involved in the biosynthesis of JBIR-34, -35 and JBIR

○角田 毅[1]、勝山 陽平[1,2]、新家 一男[3]、大西 康夫[1,2] ([1]東大院、農生科、応生工、[2]微生物イノベ連携機構、[3]産業技術総合研究所)
○Takeshi TSUNODA[1], Yohei KATSUYAMA[1,2], Kazuo SHIN-YA[3], Yasuo OHNISHI[1,2] ([1]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, [3]AIST)

【背景・目的】JBIR-34 (**1**), -35 (**2**) [1]と JBIR-126 (**3**) [2]は構造が類似した非リボソームペプチド (NRP) であり、特に N 末側の構造は完全に一致する。いずれも、4 つの単モジュール型 NRP 合成酵素 (NRPS, **1**, **2** の生合成を担う FmoA2-A5 と **3** の生合成を担う PgpA2-A5) により生合成される (図)。その構造を反映し、最初の二つのモジュール (FmoA2, A3 および PgpA2, A3) は全く同じドメイン構成である。また、これらの NRPS はその配列情報からモジュール間相互作用を担うドッキングドメインを持たないと推察された。そこで、これらのモジュール間相互作用の機構を明らかにすべく研究を開始した。
【結果】まず同じドメイン構成を持つ FmoA2, A3 と PgpA2, A3 が機能的に相補できるのかに興味を持った。FmoA2 と PgpA3、もしくは PgpA2 と FmoA3 を基質、補因子と反応させ、生成したジペプチドをアルカリ加水分解で NRPS 上から切り離し LC-MS を用いて解析した。その結果、どちらの組み合わせでもジペプチドはほぼ生成していなかった。この原因はモジュール間相互作用の大幅な低下であると推察し、PgpA2 をリガンド、FmoA3、PgpA3 をアナライトとして SPR 解析を行った。その結果、PgpA2 と PgpA3 間の解離定数は 22.53±9.38 μM であり、PgpA2 と FmoA3 間の解離定数は 52.1±35.4 μM であった。これより、2 つのモジュール間相互作用に大きな差はなく、ジペプチドが生成しない原因はモジュール間相互作用の問題ではないことが強く示唆された。そこで、ドメイン間の局所的な相互作用がジペプチドの生成に重要であると考え、PgpA3 の carrier protein (CP) ドメインを FmoA3 の CP ドメインと入れ替えたキメラ酵素を作製した。このキメラ酵素と FmoA2 とを反応させ、先と同様にジペプチドの生成を観察した。その結果、FmoA2/PgpA3 の組み合わせでは見られなかったジペプチド生産が FmoA2/キメラ酵素では 3 割程度まで回復した。これより、CP ドメインがジペプチドの生成に重要であることが強く示唆された。現在、所属研究室により解かれた FmoA3 の結晶構造を参考に CP ドメインに変異導入し FmoA, PgpA システムの交換が生成物を生成しない理由を明らかにすべく研究を継続している。

[1] A. Muliandi *et al*., *Chemistry and Biology*, **2014**
[2] M. Izumikawa *et al*., *Tetrahedron Lett*, **2015**

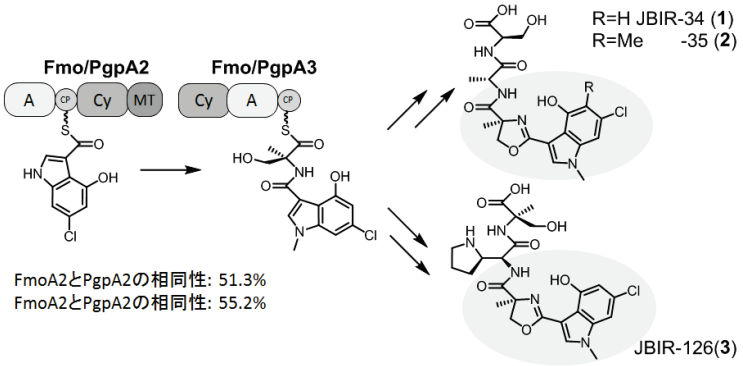


図 JBIR-34, -35とJBIR-126の化学構造式

NRPS, SPR analysis, biosynthetic engineering

発表責任者：大西康夫（ayasuo@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：1D2p03
講演日時：3 月 24 日 14:12～ 1 号館 D2 会場

放線菌が生産するアラゾペプチンの生合成機構の解析

Biosynthesis of alazopeptin in actinomycetes

○菅谷 優子[1]、冨田 宏矢[1]、萩原 亮太[1]、勝山 陽平[1,2]、大西 康夫[1,2] ([1]東大院・農生科、[2]微生物連携機構)
○Yuko Sugaya[1], Hiroya Tomita[1], Ryota Hagihara[1], Yohei Katsuyama[1,2], Yasuo Ohnishi[1,2] ([1]Univ. of Tokyo, [2]CRIIM)

【背景・目的】ジアゾ基を持つ化合物は天然に 200 種類ほど存在し、その多くが重要な生理活性を持つ。しかし、その生合成機構、特にジアゾ基の形成機構はほとんど理解が進んでいない。我々の研究室ではジアゾ基を持つ cremeomycin の生合成に着目し、CreE, CreD の生産する亜硝酸がジアゾ基の形成に関与することを示したが、[1)]*creE*, *creD* のホモログ遺伝子は他の多くの放線菌にも見出されることから、この亜硝酸生合成経路が他のジアゾ化合物の生合成にも関与すると考えられた。Alazopeptin は、放線菌 *Streptomyces griseoplanus* および *Kitasatospora azatica* が生産するジアゾ化合物であり、1 分子の Ala と 2 分子の 6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DON) が縮合したトリペプチドである。[2)]これら生産菌のゲノムには *creE*, *creD* ホモログ遺伝子が存在することから、alazopeptin のジアゾ基形成に亜硝酸が関与することが予想された。そこで、本研究ではジアゾ基の形成機構を含め、alazopeptin の生合成機構の解明を目指した。

【結果・考察】*S. griseoplanus* と *K. azatica* のゲノム情報を比較した結果、*creED* ホモログ周辺において、両遺伝子を含む 17 の遺伝子が両菌株の間で保存されていたため、これらの遺伝子が alazopeptin 生合成遺伝子クラスターを構成すると推測した。両菌株において *creE* ホモログ遺伝子の破壊株を作製したところ、いずれにおいても alazopeptin の生産量が大幅に低下したが、培地への亜硝酸の添加によりその生産は回復した。この結果から、CreED の生産する亜硝酸が alazopeptin の生合成に重要であり、着目した遺伝子クラスターがその生合成を担うことが強く示唆された。次に、安定同位体標識された Lys ([*U*-^{13}C]-Lys) を *K. azatica* 培養液に加え、その代謝物を LC-MS で解析した結果、alazopeptin に標識した Lys が 2 分子取り込まれ、予想通り DON は Lys 由来であることが明らかになった。一方、破壊株作製の容易な *S. griseoplanus* において、*N*-acetyltransferase, AMP-binding protein, PLP-dependent transcriptional regulator をコードするクラスター内の 3 つの遺伝子をそれぞれ破壊したところ、いずれの破壊株においても alazopeptin の生産が消失した。さらに生合成機構を詳細に解析するため、クラスター内にコードされる酵素について、組換えタンパク質を用いた *in vitro* 解析を進めた結果、(i) 遺伝子破壊した *N*-acetyltransferase は DON を特異的に *N*-アセチル化すること、(ii) そのすぐ上流にコードされた oxidoreductase が NAD^+依存的に 5-hydroxylysine を 5-oxolysine に変換する活性を有すること、を明らかにした。現在、新たな遺伝子破壊株の取得と他の組換え酵素の *in vitro* 解析を行っている。

[1)] Sugai *et al.*, ***Nat. Chem. Biol.*** (2016). [2)] Hata *et al.*, ***J. Antibiotic.*** (1973).

biosynthesis, alazopeptin, actinomycetes

講演番号：1D2p04
講演日時：3 月 24 日 14:23～ 1 号館 D2 会場

ε-poly-L-lysine 合成酵素ホモログにおける基質特異性予測手法の確立と新規生理活性ホモポリアミノ酸探索への応用

Specificity prediction of adenylation domains in ε-poly-L-lysine synthetase (Pls) homologs for exploration of novel bioactive poly-amino acids

○木村 ほのか[1]、福本 響[1]、濱野 吉十[2]、老川 典夫[1]、山中 一也[1] ([1]関西大　化生工、[2]福井県大　生物資源)
○Honoka KIMURA[1], Hibiki FUKUMOTO[1], Yosimitsu HAMANO[2], Tadao OIKAWA[1], Kazuya YAMANAKA[1] ([1]Kansai Univ, [2]Fukui Prefectural Univ)

【目的】長年にわたる生理活性化合物探索研究にも拘らず、天然から見出される生理活性ホモポリアミノ酸としては、数種の *Streptomyces* 属放線菌が生産するε-poly-L-lysine（ε-PL)、その類縁体である poly-L-diaminopropionic acid (L-PDP)、 poly-L-diaminobutyric acid (L-PDB)、及び D-PDB の僅か 4 例しか報告されていない。一方、微生物ゲノムデータベース上に登録される e-PL 合成酵素（Pls）ホモログの数は約 3500 にも上ることから、Pls ホモログは多様なホモポリアミノ酸の合成酵素として幅広い微生物に分布していると推定される。我々は、この予測に基づいたゲノムマイニングによる新規生理活性ホモポリアミノ酸の探索研究を進めており、実際に L-β-lysine を構成残基とする新規ホモポリアミノ酸を見出すことにも成功している。しかし、これまでに取得した何れの Pls ホモログにおいても、*in silico* 基質特異性予測ツールにより導き出される推定基質アミノ酸と、実際の基質アミノ酸は殆ど一致せず、*in silico* での解析だけに依存して、更なる新規ホモポリアミノ酸の探索を進めることは容易ではないことも判明した。そこで本研究では、Pls ホモログの基質アミノ酸アデニル化ドメイン（A-domain)の構造機能相関に基づいた基質特異性予測の手法を確立し、新規ホモポリアミノ酸探索への応用の可能性を検証することを目的として研究を行った。
【方法】Pls との一次構造上の相同性比較から、多様なホモポリアミノ酸を合成すると考えられる各種 Pls ホモログを微生物ゲノムデータベースから幅広く抽出した。更に前駆体アミノ酸合成に関与すると推定される遺伝子と翻訳的にカップリングホモログ遺伝子を研究対象として選抜した。既に同定済みの各種 Pls ホモログ及び選抜したホモログの A-domain 領域のみを大腸菌組換え酵素として調製し、基質特異性と一次構造の相関を解析した。
【結果及び考察】これまでに組換え酵素として調製した 11 種の Pls ホモログの A-domain は、L-lysine、L-β-lysine、L-Ornithine、L-diaminobutyric acid、及び D-diaminobutyric acid の各種ジアミノ酸をそれぞれ特異的にアデニル化した。これら Pls ホモログの一次構造と、実際に受容する基質アミノ酸の間に明瞭な相関が見出されたことから、一次構造に基づいて生産され得るホモポリアミノ酸の構造を推定可能であることを確認した。これまでに L-Ornithine を構成残基とするホモポリアミノ酸は見出されていないことから、候補ホモログ酵素保持株の培養液上清から新規ホモポリアミノ酸探索を行った結果、候補株の一つが Ornithine 残基に相当する 114 Da ずつ質量の異なる分子量分布を有するポリマー化合物を生産することを見出した。

Poly-amino acid, Biosynthesis, Non-ribosomal peptido

発表責任者：山中　一也（kazuyay@kansai-u.ac.jp）

講演番号：1D2p05
講演日時：3 月 24 日 14:34～ 1 号館 D2 会場

放線菌 *Streptomyces albulus* の全ゲノム及び網羅的遺伝子発現解析により見出した新奇ペプチド合成酵素遺伝子群の機能解析
Functional analysis of an unusual non-ribosomal peptide biosynthetic gene cluster actively expressed in *Streptomyces albulus*

○友杉 玲那[1]、藤田 彩香[1]、宮本 昂[1]、濱野 吉十[2]、老川 典夫[1]、山中 一也[1]([1]関西大　化生工、[2]福井県大　生物資源)
○Reina TOMOSUGI[1], Ayaka FUJITA[1], Takashi MIYAMOTO[1], Yoshimitsu HAMANO[2], Tadao OIKAWA[1], Kazuya YAMANAKA[1] ([1]Kansai Univ., [2]Fukui Prefectural Univ.)

【目的】多くの放線菌ゲノムには 20～30 に上る休眠状態の二次代謝遺伝子群がコードされていることから、これら潜在的機能の覚醒が新たな創薬資源獲得を導くものと期待されている。放線菌 *Streptomyces albulus* は、抗菌性ホモポリアミノ酸である ε-Poly-L-lysine（ε-PL）を著量生産することから、1980 年代後半から長年にわたり、精力的な二次代謝産物発酵生産及び生合成研究の対象となってきた。しかしながら、本菌からは ε-PL 及びその類縁体である Poly-L-diaminopropanoic acid (L-PDP) 以外の二次代謝産物の報告は無く、その潜在的な二次代謝には大変興味が持たれる。そこで本研究では、全ゲノム及び網羅的遺伝子発現解析に基づいて本菌の二次代謝産物生合成ポテンシャルを明らかにし、未解明の二次代謝産物生合成を明らかにすることを目的として研究を行った。
【方法】まず初めに、PacBio RSII による ε-PL 生産菌 *S. albulus* NBRC14147 株の全ゲノムドラフト配列解析を行った後、AntiSMASH を用いて推定二次代謝遺伝子群を同定した。更に選抜した特徴的な二次代謝遺伝子群については、各種解析ツールを用いてその機能を予測した。また、生育期及び二次代謝期における網羅的遺伝子発現（トランスクリプトーム）比較解析を通して、二次代謝期特異的に発現上昇する遺伝子群を特定した。
【結果及び考察】取得した本菌の全ゲノムドラフト配列全長 9.6-Mbp を解析した結果、37 の推定二次代謝産物生合成遺伝子群が見出され、その一つには新奇ドメイン構造を有するペプチド合成酵素がコードされていることが分った。興味深いことに、本菌の二次代謝期には、主生産物である ε-PL の合成酵素(*pls*)遺伝子オペロンだけでなく、タイプ I ポリケチド合成酵素遺伝子群、更に当該新奇ペプチド合成酵素遺伝子群の 3 つが著しく発現上昇することが判明した。一方、予想に反して、他の研究グループにより L-PDP 合成酵素として同定されている遺伝子(*pdaps*)は殆ど発現していないことも判明した。本研究の過程で見出した新奇ペプチド合成酵素は、2 つのポリペプチド鎖から構成されており、その一方には NRPS 特有のアデニレーション、チオレーション及びチオエステラーゼドメインが、他方には Pls に特有の膜貫通ドメインに挟まれた 3 つの縮合ドメインが認められることから、当該遺伝子群は ε-PL 様のホモポリアミノ酸生合成に関与すると推定された。そこで、*pls* 及び *pdaps* 遺伝子二重破壊株の培養液上清からポリアミノ酸様化合物の探索を行ったところ、86 Da の構成残基から成るポリマー化合物が生産されることを確認した。現在、当該ポリマー化合物の構造及び生合成機構の解析を進めている。

Poly-amino acid, Biosynthesis, Non-ribosomal peptide

発表責任者：山中一也（kazuyay@kansai-u.ac.jp）

講演番号：1D2p06
講演日時：3 月 24 日 14:55～ 1 号館 D2 会場

N-アセチルトランスフェラーゼ様酵素がポリケチドとランチペプチドの新規結合反応を触媒する

N-acetyltransferase like enzyme catalyzes new polyketide-lanthipeptide condensation reaction

○小境 陵介、菅井 佳宣、寺本 和矢、浅水 俊平、尾仲 宏康（東大農生科）
○Ryosuke KOZAKAI, Yoshinori SUGAI, Kazuya TERAMOTO, Shumpei ASAMIZU, Hiroyasu ONAKA (Univ. of Tokyo)

【背景】ゴードスポリン生産菌である *Streptomyces* sp. TP-A0584 株のゲノムマイニングにより全長 28 kb、25 個の遺伝子からなる新規 I 型ポリケチド合成酵素 （PKS）とランチペプチド生合成遺伝子が混在した PKS-RiPPs ハイブリッド生合成遺伝子クラスターを発見した。*Streptomyces albus* を用い、本クラスターを異種発現したところ、8 種類のコンジェナーからなるリポペプチド化合物の生産が認められた。本リポペプチドは末端にトリエチルアミンを有し、ポリケチド（PK）によって生合成される炭素数 32 個の直鎖状構造を持つアシル鎖部分と 8 個のアミノ酸からなる avionin 構造を有するランチペプチド部位がアミド結合によって結合した新規 PK-RiPP ハイブリッド化合物であった。本発表では、このリポペプチド生合成において最も興味深い、GCN5-related *N*-acetyltransferase (GNAT)ホモログによるアシル鎖部分とペプチド部分のユニークな新規縮合反応について報告する。
【実験方法】遺伝子クラスターを精査した結果、GNAT superfamily(GNATs)にアノテーションされる Orf14 がアシル鎖-ペプチド間縮合反応を触媒していると考えられた。この Orf14 には P-loop モチーフが存在せず、一般的な GNATs とは異なり CoA 体を認識しないことが示唆されたため、I 型 PKS の ACP にロードされた基質が直接縮合反応に供されると推定した。そこで、PKS をコードする *orf16* の C 末端 ACP ドメイン、4’-phosphopantheteinyl transferase である Sfp および Orf14 の 3 種類を大腸菌組換えタンパク質として調製した。基質となるペプチド鎖（RiPP 部分）は *S. albus Δorf14* 株の大量培養液より抽出・精製した。アシル鎖（PK 部分）は調製が困難であったため、アシル鎖ミミックとして stearoyl-CoA を代わりに用いた。Stearoyl-CoA、ACP、Sfp を *in vitro* で反応させ、ACP に stearoyl-CoA がロードされていることを LC-MS で解析して確認後、さらに RiPP 部分と Orf14 を加えて反応させた。生成産物は LC-MSMS 解析により同定した。
【結果・考察】Sfp と stearoyl-CoA、ACP を反応させることで、ACP に stearoyl phosphopantheteinyl 基が転移することを LC-MS によって確認した。さらに Orf14 と RiPP を加えた反応系において、RiPP に stearoyl 基が転移した化合物に相当する分子量の MS ピークが確認できた。この MS ピークを MSMS 解析することにより RiPP 部分由来のフラグメントイオンが確認された。以上のことから Orf14 がアシル鎖部分と RiPP 部分の縮合反応を触媒することが証明された。本結果は、アシル鎖とペプチド末端の縮合反応を GNATs が触媒することを示した最初の例であり、様々な生理機能を有するリポペプチド化合物群の創製に GNATs が活用できることを示すものである。

Actinomycetes, secondary metabolism, biosynthesis

発表責任者：尾仲宏康（aonaka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：1D2p07
講演日時：3 月 24 日 15:06～ 1 号館 D2 会場

S-N 結合形成に関わる新規多段階反応型酸化酵素の同定

Characterization of the novel oxygenase involved in the S-N bond formation

○淡川 孝義、胡 志娟、阿部 郁朗（東大薬）
○Takayoshi AWAKAWA, Zhijuan Hu, Ikuro Abe (The Univ. of Tokyo)

【目的】放線菌のアルカロイド骨格は多様性に富み、その生合成反応を詳細に解析することで新奇酵素反応が見出されることが期待される。*Streptomyces sp.* 由来アルカロイド化合物 SB-203208 は isoleucyl-tRNA synthetase 阻害剤として単離された化合物であり、特徴的な窒素含有 5-6 員環構造、スルホンアミド、メチルフェニルアラニル側鎖を含む。そのため、その生合成を解析することにより、新規酵素が発掘されることが予想された。また、その類縁化合物 altemicidin は抗腫瘍活性を持つ化合物であるため、生合成研究によって、医薬品シードとなる有用化合物の生産系が構築されることが期待された。

【方法・結果】昨年度大会にて、生産菌の耐性遺伝子と考えられた isoleucyl tRNA synthetase 遺伝子(SbzA)を含む生合成遺伝子クラスターの異種発現実験による同定を報告した。本年度は、遺伝子破壊により、スルホンアミド構造の生合成に関わる二種の酸化酵素 SbzJ, SbzM を同定した。また、^{13}C, ^{15}N ラベル L-cysteine を投与することによって、L-cysteine が 2-sulfamoylacetic acid の前駆体であること、その窒素原子が cysteine アミノ基に由来することを決定した。さらに、組替え酵素と L-cysteine を基質に用いて、in vitro において SbzJ, SbzM が 2-sulfamoylacetic acid を合成する反応を再構成し、SbzM の単独の反応生成物を各種ラベル化反応、反応 NMR 解析にて構造決定し、SbzM が L-cysteine から二段階の酸化を経て S-N 結合形成までの反応を導く、新規な酸化酵素であることを示した。

Oxygenase, S-N bond, alkaloid

講演番号：1D2p08
講演日時：3 月 24 日 15:17～ 1 号館 D2 会場

ホスホマイシン生合成における新規加水分解酵素 FomD の機能解析

Biochemical and Structural Analysis of FomD that Catalyzes the Hydrolysis of Cytidylyl (*S*)-2-Hydroxypropylphosphonate in Fosfomycin Biosynthesis

○佐藤 秀亮[1]、宮永 顕正[1]、工藤 史貴[1]、葛山 智久[2]、江口 正[1] ([1]東工大理、[2]東大生物工学セ)
○Shusuke SATO[1], Akimasa MIYANAGA[1], Fumitaka KUDO[1], Tomohisa KUZUYAMA[2], Tadashi EGUCHI[1] ([1]Tokyo Tech. Sch. Sci., [2]UTokyo Biotechnol. Res. Ctr.)

ホスホマイシンは *Streptomyces* 属細菌や *Pseudomonas* 属細菌が生産するホスホン酸含有抗生物質であり、臨床で広く利用されている。ホスホマイシンの生合成研究は古くから盛んに行われており、*Streptomyces* 属細菌では、ホスホエノールピルビン酸から三段階かけて生成する 2-ヒドロキシエチルホスホン酸 (HEP) が生合成中間体であることが明らかとなっている (図 1)。また最近我々は、HEP はシチジリル化された後に *C*-メチル化され、シチジリル (*S*)-2-ヒドロキシプロピルホスホン酸 (HPP-CMP) に変換されることを明らかにしている (図 1) [1–3]。(*S*)-HPP からホスホマイシンへの変換に関わる酵素は既に明らかとなっているため、本研究では、(*S*)-HPP-CMP を加水分解して (*S*)-HPP に変換する酵素の機能解明を目指した。ホスホマイシン生合成遺伝子クラスターにコードされる中で唯一、機能未知とアノテーションされていた FomD を大腸菌にて異種発現して解析した結果、FomD は Mn^{2+} または Co^{2+} 存在下で (*S*)-HPP-CMP を (*S*)-HPP に変換することが分かった。また、(*S*)-HPP-CMP とシチジリル 2-ヒドロキシエチルホスホン酸 (HEP-CMP) を用いた酵素反応速度論解析の結果、(*S*)-HPP-CMP は HEP-CMP に対して 10 倍以上の触媒効率で加水分解されることが分かった。これはホスホマイシン生合成において C2 位がメチル化された後に FomD が作用することを支持する結果である。さらに、我々は FomD の結晶構造を 1.38 Åの分解能で解明し、FomD の活性中心には 2 個の 2 価金属イオンが存在することを見出した。これらは触媒サイクルにおいて基質のホスホン酸部分に配位し、ルイス酸として働くと考えられる。(*S*)-HPP-CMP とのドッキング解析の結果、C2 位のメチル基は Trp68 との疎水性相互作用によって認識されることが示唆された。また、部位特異的変異体解析によって、Tyr107 が水分子を活性化し、水分子のホスホン酸部位への求核攻撃を促進することが明らかになった。

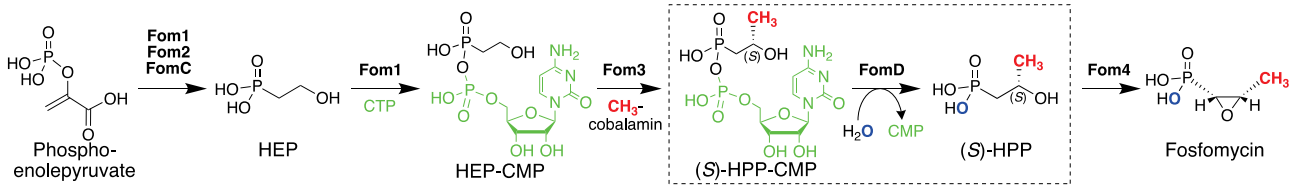


図 1. *Streptomyces* 属細菌におけるホスホマイシン生合成経路

[1] S.-H. Cho, *et al. ACS Chem. Biol.* **12**, 2209−2215 (2017).
[2] S. Sato, *et al. Biochemistry* **56**, 3519−3522 (2017).
[3] S. Sato, *et al. Biochemistry* **57**, 4963−4966 (2018).

fosfomycin, binuclear metallohydrolase, cytidylyl (*S*)-2-hydroxypropylphosphonate

発表責任者：江口正（eguchi@chem.titech.ac.jp.）

講演番号：1D2p09
講演日時：3 月 24 日 15:28～ 1 号館 D2 会場

カルボサイクリックポリケチド化合物の大員環形成メカニズムの解析
Analysis of the macrocyclic formation mechanism of carbocyclic polyketide compounds
○大方 葉月[1]、行吉 裕治[1]、稲橋 佑起[2,3]、高橋 洋子[2]、大村 智[2]、葛山 智久[4,5]、中島 琢自[2,3]、荒川 賢治[1] ([1]広島大院・先端研、[2]北里大・生命研、[3]北里大院・感染制御科学府、[4]東大・生物工学セ、[5]東大・微生物イノベ機構)
○ Haruki OGATA[1], Yuji YUKIYOSHI[1], Yuki INAHASHI[2,3], Yoko TAKAHASHI[2], Satoshi OMURA[2], Tomohisa KUZUYAMA[4,5], Takuji NAKASHIMA[2,3], Kenji ARAKAWA[1] ([1]Grad. Sch. AdSM, Hiroshima Univ., [2]Kitasato Inst. Life Sci., Kitasato Univ., [3]Grad. Sch. Inf. Cont. Sci., Kitasato Univ., [4]BRC, Univ. Tokyo, [5]CRIIM, Univ. Tokyo)

【目的】
放線菌 *Streptomyces rochei* 7434AN4 株は、カルボサイクリック化合物ランカサイジンを生産し、その大環状骨格はアミン酸化酵素 LkcE によって形成される。ポリケチド化合物には しばしば大環状構造を有するものが見られるが,これらはいずれも分子内脱水縮合による大環状ラクトン・ラクタムであり, ランカサイジンで見られるような炭素–炭素結合によるものはほとんど例がなかった。本研究では、ランカサイジン以外のカルボサイクリック化合物としてマングロマイシンに注目した。マングロマイシンは希少放線菌 *Lechevalieria aerocolonigenes* K10-0216 株によって生産されるポリケチドであり、その骨格形成機構や抗トリパノソーマ活性に興味が持たれている。K10-0216 株のシークエンス解析では、３つの P450 モノオキシゲナーゼによるマングロマイシンの酸化への関与が示唆された。大員環形成反応に着目すると、ランカサイジンにおいてはアミン酸化酵素 LkcE によって生じるイミンのエノラートへの分子内求核付加反応、マングロマイシンにおいてはサイクラーゼホモログによるアルデヒド・エノラート間の分子内求核付加反応、が示唆された。そこで、本研究ではポリケチドの大環状形成機構に着目し、ランカサイジンの大環状骨格形成機構の検証およびマングロマイシンの骨格形成機構に注目した生合成解析を行うことにした。

【方法】
lkcE 遺伝子破壊株 KA05 株から LH-20 ゲル濾過クロマトグラフィー及びシリカゲルクロマトグラフィーを用いて線状ポリケチド LC-KA05 及びその C-7 デアセチル体 LC-KA05-2 を単離した。後者を、LkcE との *in vitro* 反応に賦し、MS 解析により生成物の確認を行った結果、アルカリ条件化では環化反応が確認できず、アルデヒド体 LC-KA05-2E が生成した。これは、アミンの酸化反応により生じたイミンが加水分解され、LC-KA05-2E が生成されたと考えられる。一方、本反応を中性条件化にて行ったところ、環化反応が起こり、ランカサイジノールが生成された。また、上述の希少放線菌 *L. aerocolonigenes* K10-0216 から LH-20 ゲル濾過クロマトグラフィー及びシリカゲルクロマトグラフィーを用いてマングロマイシン A およびマングロマイシン B を単離した。本化合物を、３つの P450 モノオキシゲナーゼとの *in vitro* 反応に賦し、MS 解析により生成物の確認を行っている。さらに本化合物生合成の環化反応に関与すると考えられるサイクラーゼホモログの解析も行っており、本発表ではこれらの結果について発表する。

carbocyclic polyketide, biosynthesis, macrocyclization

講演番号：1D2p10
講演日時：3 月 24 日 15:39～ 1 号館 D2 会場

ゲノム情報および網羅的メタボローム解析を基軸にした有用生理活性物質の探索
Exploring of the valuable biologically active metabolites based on genome sequences and comprehensive metabolome analysis
○西浦 凜貴斗、ファウジ アミルディン アフマド、ニンディタ ヨシ、荒川 賢治（広島大院・先端研）
○ Rikito NISHIURA, Amirudin Akhmad Fauzi, Yosi NINDITA, Kenji ARAKAWA (Grad.Sch.AdSM,Hiroshima Univ.)

［目的］
放線菌は、抗生物質を代表として様々な二次代謝産物の生産菌として知られており、実用化抗生物質の約 7 割を生産する。*Streptomyces* 属放線菌は、全長約 8 Mb の線状ゲノム上に 30 種類以上の二次代謝生合成遺伝子クラスターを有していることが知られている。しかし、そのうち発酵生産で得られるのは数種類であり、8-9 割の二次代謝は休眠状態である。新規生理活性物質の発見数が減少傾向にある今、開拓すべき生物資源として、放線菌ゲノムは極めて重要である。*Streptomyces rochei* 7434AN4 株の染色体上には 35 個の二次代謝生合成遺伝子クラスターがコードされていた。内訳として、ポリケチド合成酵素や非リボソーム性ペプチド合成酵素が 22 種類存在し、さらにはユニークな構造かつ顕著な生理活性が期待されるアゾキシアルケン、擬オリゴ糖、C-P 化合物などもコードされていた。しかし、単離・同定された化合物はわずか 6 種類のみであるため、ゲノムマイニングにより潜在的二次代謝生合成遺伝子クラスターを活性化させることで有用二次代謝産物の獲得が期待される。そこで本研究では、*S. rochei* 7434AN4 株のゲノム情報に基づいてメタボローム解析および特定クラスターの異種発現を行い、有用生理活性物質の取得を目指した。
［方法および結果］
S. rochei 7434AN4 株および大規模染色体欠失株 3 株 (YN-P7, YN-P145, 2-39) の代謝産物について、酢酸エチル抽出物を HPLC 解析（溶出溶媒 20% CH_3CN, 0.1% Formic acid; カラム Cholester 4.6 I.D.×250 mm）に供したところ、各株においてピークの差異が認められた。とくに、YN-P7 株において 24 min 付近に顕著なピークが認められた。本サンプルの当該ピークについて LC-MS 解析を行ったところ、分子イオンピーク 138.05 に該当し、分子式 $C_7H_7O_2N$ が考えられた。このピークを 6 L 培養物の酢酸エチル抽出物から分取 HPLC により精製し、NMR 解析に供したところ、Anthranilic acid と同定された。Anthranilic acid は様々な化合物の生合成中間体として知られており、多段階の修飾や転位反応を経て最終産物になると考えられる。さらに水層の抽出物も同様に HPLC 解析（溶出溶媒 H_2O; カラム PBr 4.6 I.D.×250 mm)に供したところ、各株においてピークの差異が認められた。本発表ではその詳細について報告する。

genome mining, secondary metabolite, anthranilic acid

講演番号：1D2p11
講演日時：3 月 24 日 16:00～ 1 号館 D2 会場

安定同位体標識化合物の取込みによるアミプリマシン生合成機構の解析

Feeding experiments revealed the biosynthetic pathway for amipurimycin

○白石 太郎[1,2]、池内 秀雄[1]、新家 一男[3]、西山 真[1,2]、葛山 智久[1,2] ([1]東大・生物工学セ、[2]東大・微生物連携機構、[3]産総研)
○Taro SHIRAISHI[1,2], Hideo IKEUCHI[1], Kazuo SHIN-YA[3], Makoto NISHIYAMA[1,2], Tomohisa KUZUYAMA[1,2] ([1]BRC, UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]AIST)

【背景・目的】

Amipurimycin (APM) はニューギニア土壌サンプルから単離された *Streptomyces novoguineensis* 株の培養液中から発見されたペプチジルヌクレオシド系抗生物質である[1,2]。APM はイモチ病の病原菌である *Pyricularia oryzae* の生育を特異的に阻害するため[1]、新規農薬のリード化合物として期待されている。また APM は 2-aminopurine、cispentacin、1,2-dihydroxyethyl 基を側鎖に持つ糖など特徴的な構造を有しているが、生合成に関する報告はなかった。そこで本研究では APM の生合成経路の全容を解明することで、新規酵素の発見や創薬に繋がる知見を得ることを目的としている。我々はこれまでに遺伝子破壊および異種発現実験により、APM 生産菌 *Streptomyces* sp. C-1 株から APM 生合成遺伝子クラスター（*amc* クラスター）の同定に成功している。

【方法と結果】

amc クラスター中には、核酸と糖構造からなる APM の主骨格から推測される糖骨格の生合成に関与する酵素遺伝子は含まれていなかった一方で、ポリケチド合成酵素や NRPS をコードする遺伝子が含まれていた。これらの酵素がどのように生合成に関与するのかを明らかにするために、*amc* クラスター中にコードされた SARP 遺伝子 *amc0* を導入することで作製した APM 高生産株に、各種 ^{13}C 標識基質の取り込み実験を行った。次いでこれらの培養液から ^{13}C 標識された APM を精製し ^{13}C-NMR および 2D INADEQUATE 測定による解析を行った。これまでに[U-$^{13}C_6$]glucose、[1,2-$^{13}C_2$]acetate、[1,2,3-$^{13}C_3$]glycerol により標識した APM をそれぞれ精製し解析した。その結果、APM の糖構造にはグルコースは直接取り込まれないこと、酢酸は取り込まれないこと、グリセロールは一部取り込まれることが明らかになった。また、生合成経路を予測するために遺伝子破壊株を作製し、代謝物の解析を行った。以上の結果をふまえ、PKS、NRPS が関与する APM 生合成経路を提唱する。

【文献】

1) Iwasa, T., *et al*., *J Antibiot*, **30**, 1-10 (1977)
2) Harada, S. and T. Kishi, *J Antibiot*, **30**, 11-6 (1977)

Streptomyces, polyketide, nucleoside antibiotics

講演番号：1D2p12
講演日時：3 月 24 日 16:11～ 1 号館 D2 会場

アザビシクロ環含有ジペプチド ficellomycin の生合成機構に関する研究

Studies on the biosynthesis of ficellomycin containing 1-azabicyclo[3.1.0]hexane ring

○黒澤 菫[1]、松田 研一[1]、長谷部 文人[1]、富田 武郎[1,2]、葛山 智久[1,2]、西山 真[1,2] ([1]東大・生物工学セ、[2]東大・微生物イノベ連携機構)
○Sumire KUROSAWA[1], Kenichi MATSUDA[1], Fumihito HASEBE[1], Takeo TOMITA[1,2], Tomohisa KUZUYAMA[1,2], Makoto NISHIYAMA[1,2] ([1]BRC, UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

我々はこれまでにアミノ基キャリアタンパク質 AmCP を指標として、放線菌の生産する新規二次代謝産物を探索し、1-azabicyclo[3.1.0]hexane ring（以降、アザビシクロ環）を含む新規化合物 vazabitide A を発見した。アザビシクロ環構造は DNA アルキル化の活性本体として働くことが報告されているが、vazabitide A の生物活性は見出されていない。一方、vazabitide A のアザビシクロ環にグアニジル基が付加した化合物 ficellomycin は抗菌活性を示すことから、アザビシクロ環そのものに加え、修飾基が活性に重要であることが推測された。本研究では、グアニジル基の形成を中心とした ficellomycin の生合成機構の解明を目指した。

ficellomycin 生合成遺伝子クラスター（*fic* クラスター）を vazabitide A 生合成遺伝子クラスター（*vzb* クラスター）と比較したとき、*fic16* が *fic* クラスター中に特異的に見出された。Δ*fic16* において、アザビシクロ環を有する ficellomycin の生合成中間体として予想した化合物 2 が特異的に蓄積していたこと、化合物 2 が Fic16 によって化合物 3 へ変換されることを前回大会にて報告した。今回、*fic* クラスター中に特異的に存在する *fic36* を見出し、その組換え酵素を化合物 3 と *in vitro* により反応させた。反応液を LC-MS にて分析した結果、グアニジル基を形成した化合物 4 に相当する質量が検出された。現在、化合物 2 の構造決定に取り組んでおり、これにより ficellomycin の活性に重要なグアニジル基の形成機構を証明できると考えている。

ficellomycin は vazabitide A と同様、Val 残基とアザビシクロ環含有アミノ酸残基から構成されるジペプチドである。*fic16*、*fic36* の *in vitro* 機能解析の結果から、グアニジル基の形成後に Val 残基は縮合することが示唆された。vazabitide A において、ペプチド結合形成は NRPS によって行われることが示唆されているが、*fic* クラスター中にそのホモログをコードする遺伝子は保存されていなかった。一方、同クラスターに ATP 依存的にペプチド結合を形成する可能性のある ATP-grasp superfamily タンパク質をコードする遺伝子が見出された。その組換え酵素を *in vitro* により反応させ、LC-MS にて分析した結果、化合物 4 に Val 残基が結合した ficellomycin に相当する質量を検出した。これは、AmCP を介して生合成されたアザビシクロ環含有化合物が NRPS 以外にアミノ酸リガーゼの基質となりうることを示している。引き続き AmCP を指標とした探索を行うことで、より特異な構造を有するアザビシクロ環含有化合物を発見し、新規 DNA アルキル化剤の創製に貢献できると考えている。

biosynthesis, natural product, amino-group carrier protein

発表責任者：西山真（umanis@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：1D2p13
講演日時：3 月 24 日 16:22～ 1 号館 D2 会場

Maleimycin Biosynthesis is Mediated by Type II Amino-group Carrier Protein in *Streptomyces* sp.

○Muhammad Prima PUTRA[1], Kenichi Matsuda[1], Takeo Tomita[1,2], Kazuo Shin-ya[1,3], Tomohisa Kuzuyama[1,2], Makoto Nishiyama[1,2] ([1]Biotechnology Research Center, The University of Tokyo, [2]Collaborative Research Institute for Innovative Microbiology, The University of Tokyo, [3]The National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST))

Previously, we discovered a novel carrier protein named Type II Amino-group carrier protein (Type II AmCP) in *Streptomyces* species. *In silico* studies revealed that the gene encoding a Type II AmCP homolog is included in highly conserved gene clusters consisting of sixteen genes in all the *Streptomyces*.

Our studies on Type II AmCP in *Streptomyces* sp. SpE090715-01 (g11) has lead us to the finding that the conserved gene cluster of Type II AmCP is responsible for the biosynthesis of maleimycin, a unique bicyclic maleimide ring-containing compound. By gene knockout experiments, we found that the gene clusters are involved in biosynthesis of three structurally related compounds with *m/z* 154.049 (g11-a), 172.059 (g11-b) and 317.081 (g11-c) ([M+H]+), respectively. We isolated g11-b and g11-c and determined their chemical structures by NMR. This analysis demonstrated that g11-b is a maleimycin with the maleimide-ring opened and g11-c is a maleimycin derivative modified with *N*-acetylcysteine. By LC/MS ion fragmentation patterns, we have concluded that g11-a is the intact maleimycin.

The biosynthetic pathway mediated by Type II AmCP starts from the activation of Orf8 (Type II AmCP) by converting the C-terminal glutamine into glutamate by Orf12 (glutamine amidotransferase homolog), followed by attachment of a glutamate molecule at a carboxyl group of the C-terminal glutamate by the function of Orf9 (LysX homolog) and subsequent phosphorylation/reduction of the attached glutamate by Orf11 (LysZ homolog) and Orf10 (LysY homolog) to yield the glutamate semialdehyde (GSA) moiety. Further gene knockout and co-expression experiments suggested that Orf7 (homocitrate synthase homolog) is involved in the chain elongation of the attached GSA and Orf15 (aspartate aminotransferase homolog) catalyzes the amino-group transfer to the maleimide ring moiety in the late step of the biosynthesis. [1,2-^{13}C] acetate feeding experiment revealed that Orf7 uses a molecule other than acetate for the chain elongation reaction. We will discuss the maleimycin biosynthesis based on the accumulating experimental data.

Streptomyces, Type II amino-group carrier protein, maleimycin

発表責任者：Makoto Nishiyama（umanis@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：1D2p14
講演日時：3 月 24 日 16:33～ 1 号館 D2 会場

抗生物質生産を誘導するブテノライド型シグナル分子 SRB を用いた休眠二次代謝の活性化

Activation of silent secondary metabolism using butenolide type signal molecule SRB inducing antibiotic production

○手島 愛子[1]、住吉 美保[1]、江口 雄聡[2]、荒川 賢治[1]([1]広島大院・先端研、[2]広島大学)
○ Aiko TESHIMA[1], Miho SUMIYOSHI[1], Yuto EGUCHI[2], Kenji ARAKAWA[1] ([1]Grad.Sch.AdSM,Hiroshima Univ., [2]Hiroshima Univ.)

[目的] 放線菌 *Streptomyces rochei* 7434AN4 株は抗生物質ランカサイジン(LC)およびランカマイシン (LM) を生産し、それらの生産は抗生物質生産を誘導するブテノライド型シグナル分子 SRB(*Streptomyces rochei* butenolide)により厳密に制御されている。SRB は SRB 生合成因子 SrrX によって生合成され、2,3-二置換ブテノライド構造を有している。SRB1 は (2-(1’-hydroxyl-6’-oxo-8’-methylnonyl)-3-methyl-4-hydroxybut-2-en-1,4-olide)、 SRB2 は (2-(1’-hydroxyl-6’-oxo-8’-methyldecyl)-3-methyl-4-hydroxybut-2-en-1,4-olide)であり、その生合成マシナリーはもちろんのこと、本分子のシグナル分子としての多様性・普遍性・汎用性に興味が保たれる。放線菌全体のシグナル分子に関して、これまでに約 6 割はγ-ブチロラクトン構造と推測されているが、残り 4 割は、[1]近年発見されたフラン型や SRB などのブテノライド型、[2]新規骨格、[3]シグナル分子非生産、などに大別できる。土壌から分離された放線菌の約 2-3 割は抗生物質非生産菌であると言われているが、シグナル分子は特異的レセプターへの結合によって二次代謝産物生産を引き起こすため、[3]の抗生物質非生産菌は同時にシグナル分子の合成欠損株である可能性が高い。そこで本研究では、シグナル分子 SRB の添加による休眠二次代謝の誘導生産を目指した。
[方法・結果]化学合成 SRB を供試菌 20 株に添加培養し、その代謝産物を TLC 解析したところ、11 株で SRB 添加による代謝プロファイル変化が見られた。SRB 添加によって二次代謝誘導が引き起こされた菌は、何らかの要因で *srrX* ホモログが変異・欠損していたと考えられる。代謝産物の変化が見られた株について、LC/MS によりさらなる解析を行なったところ、*S. pseudogriseolus* では SRB の添加によって新たに[m/z]=120.04, 138.05 のピークが検出された。現在、スケールアップを行い新たに確認されたピークの化合物の分取・構造解析を行うと共に、本学菌保存施設の保有放線菌 100 株を中心として供試菌の数を増やして解析を行なっている。さらに SRB 型分子の構造多様性に関して、炭化水素鎖長とシグナル分子活性の相関性についても解析を進めており、本発表ではそれらの経緯についても報告する。

signal molecule, secondary metabolite, Streptomyces

講演番号：1D2p15
講演日時：3 月 24 日 16:44～ 1 号館 D2 会場

放線菌シグナル分子制御遺伝子群の合理的改変を基軸とした二次代謝生産の網羅的解析

Extensive analysis of secondary metabolites production based on rational alteration of *Streptomyces* signaling molecule regulatory genes

○見﨑 裕也、手島 愛子、荒川 賢治（広島大院・先端研）
○Yuya MISAKI, Aiko TESHIMA, Kenji ARAKAWA (Grad.Sch.AdSM, Hiroshima Univ.)

【目的】 放線菌 *Streptomyces rochei* 7434AN4 株は線状プラスミド pSLA2-L,-M,-S を有し、pSLA2-L 上にはポリケチド抗生物質 Lankacidin(LC)・Lankamycin(LM)の生合成遺伝子クラスターがコードされている。LC・LM の生産は *tetR* 型抑制遺伝子(*srrA, srrB*)、SARP 型活性化遺伝子(*srrY, srrZ*)、さらにシグナル分子 SRB の生合成遺伝子 *srrX* など、複数の制御遺伝子により制御されている。染色体上には 35 種の生合成遺伝子クラスターが存在しており、対応する化合物としてアゾキシアルケン化合物 KA57-A、ポリケチド化合物ペンタマイシンおよびシトレオジオールの 3 種類が取得されている。残りの 32 種の生合成遺伝子クラスターの代謝産物は未同定であり、生産量がごく微量、もしくは生合成遺伝子クラスターが休眠状態にある可能性が考えられた。そこで本研究では、染色体上に存在する *tetR* 型リプレッサー遺伝子の改変により二次代謝産物生産量の増大および休眠二次代謝の活性化を試みた。

【方法及び結果】 リプレッサーSrrB は、高い pI 値(～10)を有するシグナル分子受容体ファミリーに属しており、*Streptomyces virginiae* のバージニアマイシン生産抑制タンパク BarB などと同様に、抗生物質生産を負に制御する役割を持つ。*srrB* が抗生物質生産に与える影響を調べたところ、*ΔsrrB* 株は LC を 10 倍以上高生産し、*srrB* は培養後期における抗生物質生産抑制を担うリプレッサーであると考えられた。そこで、染色体上の *srrB* ホモログを含めた *tetR* 型リプレッサー遺伝子に着目した。

ゲノム解析の結果、*S. rochei* 染色体上には 110 個の *tetR* 型遺伝子がコードされていた。中でも最も高い pI 値(9.99)を有する *SRO_1739* に着目し遺伝子破壊を行った。*SRO_1739* 遺伝子破壊株の培養抽出液を HPLC 解析に供したところ、代謝産物に差異がみられた。現在、10L スケールでの培養を行い代謝産物を十分量取得し、単離・精製を行っている。また、他の *srrB* ホモログである *SRO_3378*、*srrA* ホモログ *SRO_3381* の遺伝子破壊株において、代謝産物プロファイルに顕著な差異が認められなかった。

また、染色体上にはシグナル分子生合成遺伝子 *srrX* ホモログ(*SRO_3382*)が存在している。他のシグナル分子生合成遺伝子と配列を比較したところ、活性に重要な役割を果たす 241 番目のアミノ酸残基がアルギニンでなく、アラニンとなっていた。そこで A241R 変異を導入し、シグナル分子合成活性の評価と代謝産物生産性評価を試みたところ、親株と比較して顕著な差異は認められなかった。本発表では、これら制御遺伝子改変株の比較解析の結果について詳述する。

repressor, regulatory gene, secondary metabolite

講演番号：1D3a02
講演日時：3 月 24 日 09:11～ 1 号館 D3 会場

代謝産物由来のベタイン誘導体の分子機能（１） 蒸気圧測定法を利用したベタインと水溶性化合物間に働く特異な分子間相互作用の解析
Unique property of betaine derivatives derived from cellular metabolites (1) Analysis of unique intermolecular interaction between hydrated betaines and water-soluble molecules using vapor pressure osmometry
○青木 拓真、須賀 ゆかり、甲元 一也（甲南大 FIRST）
○Takuma AOKI, Yukari SUGA, Kazuya KOUMOTO (Konan Univ.FIRST)

［研究背景］
細胞の浸透圧を調整するグリセロールやグリシンベタインのような低分子代謝物質は、細胞機能の維持に重要な役割を担うことが知られている。我々の研究室では、そのグリシンベタインを基体とした構造類似体群（ベタイン型添加剤）を合成し、それらが構造依存的に酵素の活性や安定性を向上させることを明らかとした。溶液物性解析から、そのような活性化・安定化はベタインの水和特性とそれに関連した分子間相互作用に起因していることが示唆された。本研究では、Record Jr らの方法を参考に蒸気圧測定法を用い、ベタイン型添加剤と種々の分子との間で働く水和分子間相互作用を解析し、ベタイン型添加剤が示す構造依存的な水和分子間相互作用について評価した。
［実験方法］
重量モル濃度で調製したベタイン型添加剤(A)、もしくは他の分子(B)水溶液それぞれの蒸気圧（OsmA、OsmB）と、A、B の二分子を混合した水溶液の蒸気圧（OsmAB）を測定し、これらの蒸気圧差 ΔOsm（OsmAB－(OsmA + OsmB)）を算出し、A、B の重量モル濃度積に対してプロットし、その傾きから化学ポテンシャルを算出した。化学ポテンシャルが正の場合、AB 間に排他的な相互作用が働き、逆に負の場合、親和的な相互作用が働く。
［研究結果］
まず、イオン性化合物との相互作用を調べるために、グリシンベタインの炭素鎖が１～４の化合物と NaCl との混合系で測定したところ、１＜２＜３＜４（-0.088～0.27）と鎖長が長くなるにつれて化学ポテンシャルが大きくなった。１と４を用い、片方のイオンを固定し、陽イオンや陰イオンの違いによる相互作用の変化を調べたところ、１、４いずれの場合においても陽イオンのイオン半径が大きくなるほど、また、陰イオンのイオン半径が小さくなるほど化学ポテンシャルが大きくなることが明らかとなった。この序列はホフマイスター系列と一致するもので、この相互作用に溶媒環境が関与していることが強く示唆される。また、１と４では、４の化学ポテンシャルがより正になった（イオンを強く排他する）。１と４の分子間相互作用は中性分子との間にも働き、例えば、グルコースでは金属塩と同様に１＜４となった。ベタイン型添加剤のわずかな構造の違いでも、水和された分子間の相互作用は影響され、溶液中での分子の局在等に影響を与えることが明らかとなった。以上の結果は、細胞内の低分子化合物の機能解明や新しい添加剤の開発へつながるものと期待される。

betaine, Osmolality, repulsive interaction

発表責任者：甲元一也（koumoto@konan-u.ac.jp）

講演番号：1D3a03
講演日時：3 月 24 日 09:22～ 1 号館 D3 会場

代謝産物由来のベタイン誘導体の分子機能(2) ベタイン型添加剤の排他特性を利用した ELISA の効率化

Unique property of betaine derivatives from cellular metabolites (2) Enhanced efficiency in ELISA total protocol utilizing repulsive interaction of betaine-type additives

○三宅 子龍、高木 琴味、甲元 一也（甲南大 FIRST）
○Shiryou MIYAKE, Kotomi TAKAGI, Kazuya KOUMOTO (Konan Univ. FIRST)

［研究背景］

医療診断や食品管理の分野では、夾雑物を多く含む試料の中から微量成分（疾患マーカーやアレルゲンなど）を検出できるＥＬＩＳＡが汎用されている。ＥＬＩＳＡでは、抗原抗体反応と酵素反応とを組み合わせ、特異的に微量成分の濃度を増幅して定量できるが、極微量成分の検出感度やキットの価格、操作時間等に課題も残る。我々の研究室では、グリシンベタインを基体としたベタイン型添加剤がＥＬＩＳＡの標識酵素を活性化することを報告した。その作用メカニズム解析から、ベタイン型添加剤には親水性物質を排他する特異な相互作用があることが示唆された。そのようなベタイン型添加剤がもつ特性は、標識酵素の活性化だけでなく、ＥＬＩＳＡにおける①一次抗体のプレートへの吸着、②一次抗体と抗原、③その複合体と二次抗体、④二次抗体と標識酵素との結合親和性の向上などにも効果を発揮する可能性がある。昨年の農芸化学会において、①と②についてベタインの添加効果について訂正的に解析した結果を報告したが、今回はその定量的な解析に加え、③や④におけるベタイン型添加剤の添加効果やＥＬＩＳＡ（アブカム社、Ｈｕｍａｎ　ＴＮＦ　ａｌｐｈａ用）全体への与える影響について検討したので報告する。

［研究結果］

ベタイン型添加剤として、グリシンベタイン（１）のアンモニウム基の炭素鎖を２～５（２～５）に伸長したアナログを用いた。昨年報告した①の過程で吸着等温式から吸着平衡定数を算出したところ、［４］＝２０mMで平衡定数が約９倍上昇し、添加剤存在下では、同じ吸着量を達成するのに半分の一次抗体の使用量で済むことが明らかとなった。②の過程でも、［５］＝１０mMで結合親和性が向上し、検出限界が約１／２倍、定量限界は約１／３倍に低下した。③や④の過程でも添加剤の効果は現れており、例えば、④の操作では、解離定数が数十 pmol/L オーダーと親和性の高いアビジンービオチン結合（K_d＝１０$^{-15}$）が利用されているが、［３］＝１０mMで約１．３倍にシグナルが増加し、アビジンービオチンのような高い結合親和性を持つ反応においても、相互作用形成を促進できることが明らかとなった。発表ではその他詳細についても説明する。このように、本研究で得られた結果を利用することで、従来よりも低コストで高感度な ELISA のキットが開発できると期待している。

Betaine, Repulsive interaction, enzyme linked immunosorbent assay

発表責任者：甲元　一也（koumoto@konan-u.ac.jp）

講演番号：1D3a04
講演日時：3 月 24 日 09:33～ 1 号館 D3 会場

ベンジルアルコール誘導体の構造と香りの関係の検討
Structure-Odor relationship of benzyl alcohol derivatives
○椛沢 靖翔、長谷川 登志夫（埼玉大院理工学研）
○ Yasuto KABASAWA, Toshio HASEGAWA (Graduate School of Science and Engineering, Saitama Univ.)

【目的・背景】
嗅覚受容体や嗅覚知覚に関する研究はその機構の複雑さ、定量の難しさなどの要因により、体系だった研究手法が確立されていない。我々は、従来行われてきた *in vitro* での細胞実験や嗅覚受容体の構造解析に代わる新たな手法を提唱している。ヒトが化合物のにおいを認識するには、嗅細胞上に存在する約 400 種類の嗅覚受容体群のうち、親和性のある数種類の受容体と化合物とが選択的に相互作用し、神経系での情報処理を介する必要がある。我々は、この嗅覚知覚の始点と終点、すなわちにおい分子の構造とその香気がどのように結びついているかを検討している。今回ターゲットとした化合物の構造は、ベンゼン環、直鎖炭化水素、極性官能基の要素を有するものである。中でも炭化水素鎖の炭素数が 2 個のアルコール体（図 1 のⅡ, R = H）は慣用的にローズ P と呼ばれ香料として多用されている上に、近年では生理活性も報告されている重要な分子である。

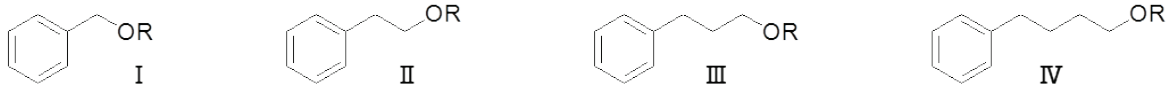


図1 研究対象とした化合物 （R: H, CH_3, $COCH_3$）

【戦略】
低分子医薬品の開発において、化合物と受容体の相互作用に極性官能基や π 電子が重要なのはよく知られている。一方嗅覚受容体では、現状で受容体モデルの構築に至った例が数例しかなく、どういった化合物の構造が認識されているのかに関する知見がほとんどない。本研究では医薬品において重要な構造である極性官能基とベンゼン環を共に有する化合物としてベンジルアルコールに着目した。ところで、われわれは既に炭化水素の鎖状分子において、その鎖長と香気の質に相関がみられることを見出している。そこで、この知見をもとにベンゼン環と官能基の間の炭化水素鎖の長さを変えることで、におい受容における極性官能基とベンゼン環の両構造に関する知見を得ることを計画した。
【結論】
化合物 I からⅣについての官能評価を行った結果、アルコール、メトキシ、アセチルの各官能基において炭化水素鎖の伸長に伴った香気の変化がみられた。また、これらの香気の変化は、対応する脂肪族炭化水素とは異なっていることが認められた。

odor, benzyl alcohol, olfactory receptors

発表責任者：長谷川登志夫（toshihas@gmail.com）

講演番号：1D3a05
講演日時：3 月 24 日 09:44～ 1 号館 D3 会場

希少糖 D-アラビノースの線虫成長阻害メカニズムー糖代謝酵素に対する阻害活性

Growth-inhibitory effect of the rare sugar D-arabinose against the nematode *Caenorhabditis elegans*: Its mechanism of action

小山 麻理子[1]、新谷 知也[2]、○佐藤 正資[1] ([1]香川大農、[2]愛媛大院連合農)
Mariko Koyama[1], Tomoya Shintani[2], ○Masashi Sato[1] ([1]Kagawa Univ., [2]Ehime Univ.)

【目的】熱帯地域を中心に線虫感染症が蔓延している。治療に有効な抗線虫薬の数は少なく，薬剤耐性線虫の出現が問題視されている。そのため，新たな作用メカニズムをもつ抗線虫薬の開発が望まれている。演者らは，天然に存在量の少ない希少な単糖（希少糖）の中から新規な抗線虫薬シーズを探索してきた。その過程で，D-ribose (D-Rib)の C2 エピマーである D-arabinose (D-Ara) が線虫 *Cenorhabditis elegans* の成長を強く阻害することを明らかにした。[1]しかし，その作用メカニズムは分っていない。D-Ara 成長阻害活性は，線虫生育培地への D-Rib，あるいは D-fructose (D-Fru)の添加で打ち消されることから，その阻害活性は D-Rib と D-Fru 代謝に関係することが予想された。線虫体内に取込まれた D-Ara はリン酸化され D-arabinose 5-phosphate（D-Ara-5P）となり，それが糖代謝酵素を阻害し，その結果，成長阻害を示すと推測される。以上から，D-Ara-5P の標的酵素としてペントースリン酸経路の ribose phosphate isomerase (RPI) および解糖系の glucose phosphate isomerase (GPI)に注目し，それぞれについて D-Ara-5P の阻害活性を検証した。
【方法】D-Ara-5P は酵母 hexokinase（Sigma）を用いて, D-Ara から酵素的に合成した。酵素阻害試験には，線虫粗酵素液として成虫ホモジネートを使用した。陽性対照として既報の isomerase 阻害剤 6-phosphogluconic acid（6-PG）を用いた。①RPI 阻害試験：基質 D-Rib-5P，阻害剤 D-Ara-5P と粗酵素を Tris-HCl 緩衝液中で反応させた (pH 7.5, 30℃)。生成した D-ribulose 5-phosphate をプレカラム蛍光標識 HPLC 法により定量分析し，反応を解析した。②GPI 阻害：基質 D-Fru-6P，阻害剤 D-Ara-5P と粗酵素を Tris-HCl 緩衝液中で反応させた(pH 8.0, 30℃)。生成した D-glucose 6-phosphate を酵素的定量法で分析し，反応を解析した。
【結果および考察】D-Ara-5P は，6-PG と比較して RPI を強く阻害することが明らかになった。また，D-Ara-5P は GPI も弱く阻害した。一方，D-Ara には GPI, RPI への阻害活性は認められなかった。D-Ara による線虫成長阻害は，代謝物である D-Ara-5P が GPI と RPI を阻害することで D-Rib（核酸）合成とエネルギー産生を抑制することにより起きる可能性が示された。D-Ara の哺乳動物細胞への毒性は低く，選択毒性の高い有望な薬剤シーズになると考えられた。
[1] Sakoguchi, H., *et al*., *Bioorg. Med. Chem. Lett.,* **26**, 726-729 (2016).

D-arabinose, *Caenorhabditis elegans*, growth inhibitory effect

発表責任者：佐藤正資（sato@ag.kagawa-u.ac.jp）

講演番号：1D3a06
講演日時：3 月 24 日 10:05～ 1 号館 D3 会場

3,5-ジエステル化フラバン-3-オール誘導体の構造-活性相関研究～エステル結合の安定性

Structure-activity relationship study of 3,5-diesterified flavan-3-ol derivatives ~ Stability of ester bond

○道下 僚[1]、西野 祐樹[1]、西村 拓哉[1]、平井 瑞輝[1]、辻 一成[2]、村上 誠[1]、中島 範行[3]、齊藤 安貴子[1,2] ([1]大阪電通大院工・先端、[2]大阪電通大工・環境、[3]富山県大・工)

○Ryo DOGE[1], Yuki NISHINO[1], Takuya NISHIMURA[1], Mizuki HIRAI[1], Issei TSUJI[2], Makoto MURAKAMI[1], Noriyuki NAKAJIMA[3], Akiko SAITO[1,2] ([1]Advanced Science & Engineering, Graduate School of Engineering, OECU, [2]Department of Environmental Science, Faculty of Engineering, OECU, [3]Department of PharmaceuIcal Engineering, Toyama Prefectural University)

【目的】

フラバン-3-オール誘導体は様々な植物に含まれる機能性ポリフェノールとして知られている。一方で、異性体や類縁体が多数存在するため、詳細な構造-活性相関研究を行うための化合物ラインナップを揃えることが難しい化合物群である。そこで我々は有機合成研究により立体や官能基を制御して化合物を確保し構造-活性相関研究を行ってきた。昨年度の本大会において、3 位の立体が異なる(–)-epicatechin と(+)-catechin それぞれから誘導したジガロイル化誘導体 **1**、**2**、及び、**2** のフッ素化誘導体 **3** について、子宮頸ガン細胞 HeLa S3 細胞増殖抑制活性を報告した。3 位の立体に関しては epicatechin 型化合物 **1** の活性が高く、catechin 型の化合物ではフッ素化した誘導体 **3** が高かった。しかし一般的にエステル結合は切断されやすく、この化合物群が細胞に直接影響しているのか判断が難しかった。そこで本大会では、新たな化合物群 **4**~**6** を用いた構造-活性相関に加え、化合物の暴露時間と活性の関係、さらに、本化合物群の安定性や脂溶性などの化合物の物性について検討を行ったので報告する。

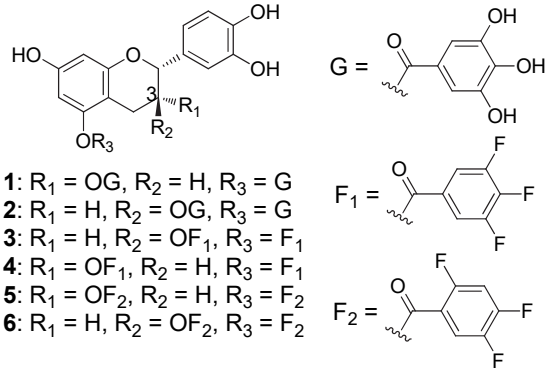


Figure 1. フラバン-3-オール誘導体の構造

【方法・結果】

化合物 **1**~**6** の HeLa S3 細胞増殖抑制活性試験において、3 位の立体は epicatechin 型が優位であることを再確認した。また、フッ素化した化合物群の活性が高いこと、置換位置は F_1 が優位であることが確認できた。化合物 **1** は暴露時間が 3 時間では活性を示さなかったが、フッ素化した化合物群では 3 時間でも高い活性を示した。上記活性測定において、培地中の化合物群の挙動と安定性を LCMS 分析によって追跡したところ、緩衝液によってはエステル結合が加水分解されることを確認した。また、細胞培養の培地 DMEM 中でも化合物は不安定であった。しかし驚くべきことに、細胞を培養している DMEM 中では構造が保持されており、エステルが加水分解された化合物は確認されなかった。本発表では、これらの詳細に加え、化合物の脂溶性の尺度 LogP の測定を行った結果と活性との相関についても述べる。

3,5-diesterified flavan-3-ol derivatives, Structure-activity relationship study, Stability of ester bond

発表責任者：齊藤安貴子（a-saito@osakac.ac.jp）

講演番号：1D3a07
講演日時：3 月 24 日 10:16～ 1 号館 D3 会場

受容体特異的な 3’-alkyl ABA を用いた ABA 受容体機能解析　１．構造活性相関

Selective activation of abscisic acid receptors by 3’-alkyl ABAs. 1. SAR

○由田 和津子[1]、近藤 恭光[1]、岩橋 福松[2]、中野 雄司[3]、本田 香織[1]、永野 栄喜[2]、長田 裕之[1]（[1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー、[2]住友化学・健康農業研、[3]理研 CSRS・機能開発）
○ Kazuko YOSHIDA[1], Yasumitsu KONDOH[1], Fukumatsu IWAHASHI[2], Takeshi NAKANO[3], Kaori HONDA[1], Eiki NAGANO[2], Hiroyuki OSADA[1] ([1]Chem. Biol., RIKEN CSRS, [2]Sumitomo Chemical, [3]Gene Discov., RIKEN CSRS)

【目的】植物ホルモンアブシジン酸（ABA）は、植物において種子休眠や生育制御、乾燥などの非生物ストレス応答において重要な役割を果たす。ABA の受容体である PYR/PYL/RCAR タンパク質は植物において多重に存在しており、シロイヌナズナは 3 つのサブファミリー（sf I, II, III）に分類される 14 種類の受容体をもつ。しかしそれぞれの受容体またはサブファミリーがどの ABA 応答に関わっているのか、その機能分化については未だ不明な点が多い。我々は ABA 受容体の機能解明を目指し、受容体特異的なアゴニストの探索を行った。
【方法と結果】化合物ライブラリー（31791 化合物）のスクリーニングを行い、49 のアゴニスト候補化合物を見出した。これらを、3 種類のサブファミリー受容体の代表として選んだ PYL1, PYL5, PYL10 と下流因子である脱リン酸化酵素タイプ 2C（PP2C）を用いたホスファターゼアッセイに供した。その結果、一連の 3’-alkyl ABA 誘導体がアルキル鎖長に応じて特定の受容体サブファミリーを段階的に活性化することが示された。そこでアルキル鎖長が異なる 5 種類の 3’-alkyl ABA に対して、11 種類のシロイヌナズナ ABA 受容体を用いたホスファターゼアッセイ、シロイヌナズナの種子発芽解析、網羅的遺伝子発現解析、根の伸長の解析、気孔コンダクタンスの測定を行った。その結果から、少なくとも sf III と sf II の活性化を引き起こす#0040 を含む 3 化合物の光学活性体が、ABA と同様の広範な活性をしめすことが明らかになった。さらに、sf III を活性化し、sf II の一部の受容体を弱く活性化する#0062 の光学活性体が、気孔閉鎖や ABA 応答性遺伝子の発現を誘導する一方、主根の伸長を阻害しないことが明らかとなった。

abscisic acid receptor, ABA, agonist

講演番号：1D3a08
講演日時：3 月 24 日 10:27～ 1 号館 D3 会場

受容体特異的な 3’-alkyl ABA を用いた ABA 受容体機能解析　２．ドッキングシミュレーション

Selective activation of abscisic acid receptors by 3'-alkyl ABAs. 2. Docking simulation

○近藤 恭光[1]、由田 和津子[1]、岩橋 福松[2]、中野 雄司[3]、本田 香織[1]、永野 栄喜[2]、長田 裕之[1] ([1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー、[2]住友化学・健康農業研、[3]理研 CSRS・機能開発)
○Yasumitsu KONDOH[1], Kazuko YOSHIDA[1], Fukumatsu IWAHASHI[2], Takeshi NAKANO[3], Kaori HONDA[1], Eiki NAGANO[2], Hiroyuki OSADA[1] ([1]Chem. Biol., RIKEN CSRS, [2]Sumitomo Chemical, [3]Gene Discov., RIKEN CSRS)

【目的】植物ホルモンアブシジン酸（ABA）は、植物において種子休眠や生育制御、乾燥などの非生物ストレス応答において重要な役割を果たす。ABA の受容体である PYR/PYL/RCAR タンパク質は植物において多重に存在しており、シロイヌナズナは 14 種類の受容体をもつ。しかし、それぞれの受容体がどの ABA 応答に関わっているのか、その機能分化については未だ不明な点が多い。我々は受容体特異的な ABA アゴニストとして一連の 3’-alkyl ABA を見出したので、アルキル鎖長の違いによる受容体特異性のメカニズムを検討した。
【方法と結果】アルキル鎖長の異なる 3’-alkyl ABA の受容体特異性の違いが、受容体への結合親和性の違いによるものかを検討するために、PYL5 と 5 種類の 3’-alkyl ABA 誘導体との結合を等温滴定型カロリメトリー（ITC）で評価したが、アゴニスト活性と親和性に相関が見られなかった。そこで、結合親和性ではなく結合様式がアゴニスト活性に重要であると考え、一連の 3’-alkyl ABA のアゴニスト活性のパターンが異なる二つの受容体、PYR1 と PYL10 に注目し、既報の X 線結晶構造(PDB code: 3QN1, 3RT0)を元に 3’-alkyl ABA 誘導体とのドッキングシミュレーションを、AutoDock4.2 を用いて行った。その結果、3’-alkyl ABA 誘導体の母骨格部分は PYR1 に対して ABA とほぼ同じ位置で結合し、アルキル鎖部分は、6 つの疎水性アミノ酸（Phe61, Val83, Leu87, Pro88, Phe159, Val163）から構成される 3’トンネル（Takeuchi et al 2014）を通ることが推定された。一方 PYL10 では、メチル基よりも長いアルキル鎖をもつ 3’-alkyl ABA 誘導体は ABA と異なる位置で結合することが示唆された。ドッキングシミュレーションの結果より、3’トンネル出口付近のアミノ酸残基（L79, L159）が PYL10 と 3’-alkyl ABA の結合様式に影響していると考えられた。そこでアミノ酸変異（L79V, L159V）を導入した PYL10 の組換えタンパク質を作製し、3’-alkyl ABA を用いてアッセイを行い、2 か所のロイシン残基が 3’-alkyl ABA の受容体選択性に関与することを明らかにした。

abscisic acid receptor, ABA, agonist

講演番号：1D3a09
講演日時：3 月 24 日 10:38～ 1 号館 D3 会場

イネの化学防御を担うモミラクトン B の作用機序に関する研究
Mode of action of momilactone B, an anti-proliferative agent from rice
○富田 啓介[1]、松尾 安浩[2]、川向 誠[2]、八代田 陽子[3]、松本 健[3]、吉田 稔[3,4]、野尻 秀昭[1]、岡田 憲典[1] ([1]東大・生物工学セ、[2]島根大・生物資源、[3]理研 CSRS・ケミカルゲノミクス、[4]東大院・農生科・応生工)
○Keisuke TOMITA[1], Yasuhiro MATSUO[2], Makoto KAWAMUKAI[2], Yoko YASHIRODA[3], Ken MATSUMOTO[3], Minoru YOSHIDA[3,4], Hideaki NOJIRI[1], Kazunori OKADA[1] ([1]Biotechnol. Res. Ctr., The Univ. of Tokyo, [2]Fac. of Life and Environ. Sci., Shimane Univ., [3]Chem. Genomics, RIKEN CSRS, [4]Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. of Tokyo)

【背景・目的】
自ら移動することが出来ない植物は様々な環境ストレスに適応するため、多種多様な特化代謝産物を生産する。イネが生産する特化代謝産物の一つにモミラクトン B が挙げられる。モミラクトン B は植物や真菌、細菌の生育を抑制するだけでなく、その生合成遺伝子の抑制変異株においてアレロパシー活性や病害抵抗性が低下することから、イネの化学防御において重要な役割を果たしている。加えて、モミラクトン B は哺乳動物細胞に対しても抗腫瘍活性等の生物活性を持つことが報告されており、幅広い生物種への作用スペクトルを持つことが示唆されている。しかしながら、モミラクトン B が様々な生物種の生育を阻害する分子レベルでの作用機序は未解明である。我々はこれまでに、真核細胞のモデルである分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* を用いて研究を進め、モミラクトン B がマルチセプタムの形成や細胞の分岐、屈曲等の形態異常を引き起こし、細胞分離を阻害することを見出した。今回我々はモミラクトン B が分裂酵母の形態異常を引き起こす原因を探るため、微小管構造に与える影響の解析を行うとともに、モミラクトン B の作用機序の解明の一端として、分裂酵母の非必須遺伝子破壊株ライブラリーからモミラクトン B 感受性変化株をスクリーニングし、モミラクトン B の作用機序に関与する遺伝子を網羅的に探索した。
【方法・結果】
モミラクトン B は分裂酵母の形態異常を引き起こすため、細胞の形態形成に関わる因子に何らかの影響を与えている可能性が考えられた。そこで、GFP 融合 α-tubulin (Atb2) を発現させた分裂酵母をモミラクトン B 含有培地で培養したところ、細胞の頂端において湾曲した微小管が観察された。さらに、ABC トランスポーターをコードする遺伝子 *pmd1* 及び *bfr1* を破壊して多薬剤感受性化した分裂酵母株を用いて作製した ORF 破壊株ライブラリーにモミラクトン B 処理を行った後、各破壊株を識別するバーコード配列を PCR 増幅し、次世代シーケンサーに供した。得られたバーコード配列のカウント数を無処理の対照と比較することで各破壊株のモミラクトン B 感受性を解析した。その結果、細胞分離に関与する転写因子 *ace2* や微小管のフォールディングに関与する *alp31* 等複数の遺伝子破壊株がモミラクトン B 感受性変化株として取得された。現在、これら遺伝子の作用メカニズムへの関与を更に解析している。

momilactone, phytoalexin, fission yeast

発表責任者：富田啓介（uktomita@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：1D3a10
講演日時：3 月 24 日 10:49～ 1 号館 D3 会場

疫病菌交配ホルモン生合成酵素の探索
Studies on biosynthetic enzymes of the *Phytophthora* mating hormones

○有吉 俊、戸村 友彦、小鹿 一（名大院・生命農）
○Suguru ARIYOSHI, Tomohiko TOMURA, Makoto OJIKA (Nagoya Univ.)

【背景・目的】

疫病菌（*Phytophthora* 属植物病原糸状菌）は 2 種類の交配ホルモンを用いて有性生殖を行うことが知られており、これまでに交配ホルモンの化学構造、生合成経路、構造活性相関が明らかにされてきた。一方で生合成酵素の同定や受容体探索などのケミカルバイオロジー的課題は未解決のままである。このうち生合成酵素に関しては、生合成経路（図 1）から cytochrome P450（CYP）と予想される。そこで本研究では、CYP 阻害剤による疫病菌の有性生殖および交配ホルモン生合成の阻害を観測し、CYP の交配ホルモン生合成酵素としての可能性を検証する。

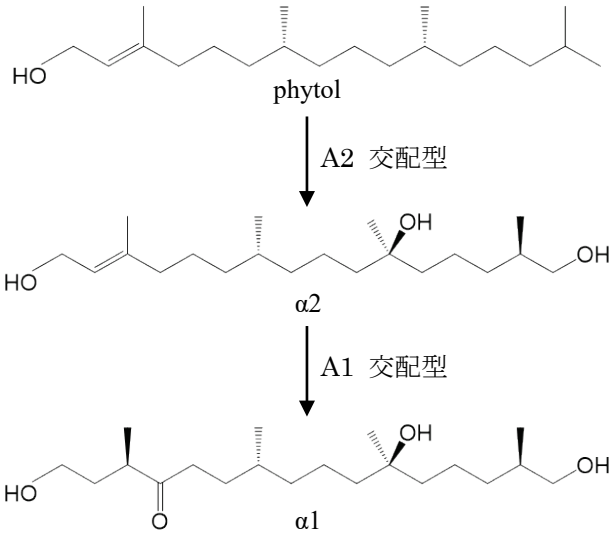


図 1 疫病菌交配ホルモンの生合成経路

【方法・結果】

CYP 阻害剤（cimetidine, piperonyl butoxide, 1-aminobenzotriazole, fluconazole, ketoconazole, metyrapone, amiodarone, ticlopidine）を含む V8 ジュース寒天培地で疫病菌（*P. nicotianae*）の一方の交配型を培養し、別の交配型の疫病菌とでポリカーボネート膜で隔てた対峙培養を行った。5 日後、各交配型寒天片上に形成された卵胞子数を測定することで交配ホルモンの生成阻害を評価した。複数の CYP 阻害剤の中で、fluconazole を投与した場合に生育を阻害することなく相手支配型に濃度依存的な卵胞子数減少が見られ、交配ホルモン生成阻害が確認された。

さらに fluconazole による本阻害効果を液体培養で経時的に調べた。すなわち、fluconazole を含む V8 ジュース液体培地で疫病菌（*P. nicotianae*）の振盪培養を行い、経時的に培養上清を分取した。各サンプルを前処理カラムに通し、交配ホルモン産生量を LC/MS で定量した。その結果、A1 交配型において α1 産生量の顕著な減少が確認された。現在、A2 交配型についても同様の実験を進めており、その結果も合わせて報告する。

Phytophthora, cytochrome P450, fluconazole

発表責任者：有吉　俊（ariyoshi.suguru@f.mbox.nagoya-u.ac.jp）

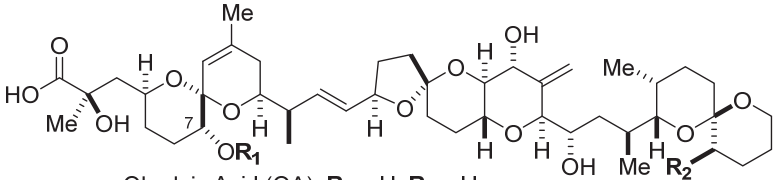
講演番号：1D3a11
講演日時：3 月 24 日 11:10～ 1 号館 D3 会場

ホタテガイ中腸腺のオカダ酸アシル化酵素の探索に向けた活性測定法の開発

Development of a biochemical assay for an enzyme that converts okadaic acid into 7-O-acyl okadaic acid in the digestive gland of the scallop *Patinopecten yessoensis*

○寺内 将斗、古用 幸愛、長 由扶子、山下 まり、此木 敬一 (東北大院農)
○Masato TERAUCHI, Sachie FURUMOCHI, Yuko CHO, Mari YOTSU-YAMASHITA, Keiichi KONOKI (Tohoku Univ.)

【背景】クロイソカイメンより単離されたオカダ酸（okadaic acid, OA）[1]は下痢性貝毒の主要原因毒であり、強力な発がんプロモーション活性を示す。*Dinophysis* 属や *Prorocentrum* 属などの有毒渦鞭毛藻によって生産された OA 並びにその類縁体であるディノフィシストキシン 1（Dinophysistoxin 1, DTX1）は二枚貝の中腸腺に蓄積され、 その一部は 7 位ヒドロキシ基がアシル化されたディノフィシストキシン 3（dinophysistoxin 3, DTX3）へ変換される。DTX3 は OA の分子標的であるタンパク質脱リン酸化酵素 PP1 および PP2A に対する結合性を示さないため、本酵素反応が二枚貝の解毒に関与すると考えられている。我々は食品衛生上の観点から本酵素の機能解明は重要であると捉え、LC/MS を用いて酵素活性を測定する方法（LC/MS 法）により本酵素の単離を目指してきた[2]。その過程で本酵素がミクロソームの膜タンパク質であることが判明したが、膜タンパク質の精製に用いる界面活性剤の残存が分析感度の低下を引き起こすため、LC/MS 法は酵素活性測定として不適であると考えられた[3]。本研究では、蛍光検出器を接続した HPLC により当該酵素の生理活性を測定する方法（LC-FLD 法）を開発したので報告する。



Okadaic Acid (OA): **R**$_1$ = H; **R**$_2$ = H
Dinophysistoxin 1 (DTX1): **R**$_1$ = H; **R**$_2$ = Me
Dinophysistoxin 3 (DTX3): **R**$_1$ = Acyl; **R**$_2$ = H or Me

【方法・結果】OA や DTX1 の分析例がある 9-Anthryldiazomethane（ADAM）を蛍光標識試薬として用い[4]、DTX3 標品と反応させることで得られる蛍光誘導体（AM-DTX3）の LC-FLD 法での分析条件を確定した。続いてホタテガイ中腸腺由来のミクロソーム画分を用いて OA を DTX3 に変換する *in vitro* 酵素変換反応を行った。変換反応抽出物と ADAM を反応させて蛍光標識し、LC-FLD 法を適用した結果、AM-DTX3 標品と同一の保持時間を与えるピークが検出された。現在、LC-FLD 法を用い、界面活性剤で処理した中腸腺ミクロソーム画分より、OA を DTX3 に変換する酵素の分画、精製を進めている。

1) Tachibana, K. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, *103*, 2469. 2) Konoki, K. *et al.*, *Mar. Drugs*, **2013**, *11*, 300. 3) Furumochi, S. *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2016**, *26*, 2992. 4) Lee, J. S. *et al.*, *Agric. Biol. Chem.*, **1987**, *51*, 877.

diarrhetic shellfish poisoning, okadaic acid, LC-FLD

講演番号：1D3a12
講演日時：3 月 24 日 11:21～ 1 号館 D3 会場

電位依存性ナトリウムチャネルに対するサキシトキシン誘導体の阻害活性評価

Evaluation of inhibitory activity of saxitoxin analogues against voltage-sensitive sodium channels

○山田 智士[1]、安達 栞菜[2]、長 由扶子[1]、山下 まり[1]、此木 敬一[1]、長澤 和夫[2]([1]東北大院・農、[2]東農工大院・工)
○Tomoshi Yamada[1], Kanna Adachi[2], Yuko Cho[1], Mari Yamashita[1], Keiichi Konoki[1], Kazuo Nagasawa[2] ([1]Tohoku Univ., [2]Tokyo Univ. of Agric. and Tech.)

【背景・目的】麻痺性貝毒サキシトキシン（Saxitoxin, STX）は電位依存性ナトリウムチャネル（Na_V）の特異的阻害剤である。Na_v は不整脈、癲癇、神経障害性疼痛など様々な疾患の原因となるため、長年にわたり医薬資源探索がなされてきた。Na_V には $Na_V1.1$ から $Na_V1.9$ まで 9 つのサブタイプが存在し、各臓器等において発現するサブタイプの構成や生理機能が異なる[1)]。STX は $Na_v1.5$, 1.8, 1.9 を除く各サブタイプに結合し、構造活性相関研究を基に 12 位の水和されたケト基の存在が重要であることがわかっている。今回、我々は Decarbamoylsaxitoxin（dcSTX）と 12 位が非水和型のケト基になる 4 つの誘導体の Na_V 阻害活性を評価し、各種疾患を治療する際に重要となるサブタイプ選択性を調査したので報告する。

【方法】（１）Neuro2A assay：$Na_v1.2$ を含む複数の Na_v サブタイプを恒常的に発現するマウス神経芽細胞腫 Neuro2A に対して、Na_v のアゴニストである veratridine と Na^+,K^+-ATPase の阻害剤である ouabain を投与し、大半の細胞が致死する条件を決定した。この条件下、致死率を 50%に回復させる STX 誘導体の濃度（EC_{50} 値）を求め、STX 誘導体の阻害活性を評価した（Neuro2A assay）。

（２）電気生理学実験[2)]：不整脈の発症に関与する $Na_V1.5$、神経障害性疼痛の原因となる $Na_V1.7$ に加えて、中枢神経や脳に多く発現する $Na_V1.2$ のサブタイプの cDNA を用いてヒト胎児由来腎臓上皮細胞 293T をトランスフェクションした。電気生理学的手法の一種であるホールセル記録法を適用し、ナトリウム電流を半減する濃度 IC_{50} 値により STX 誘導体の阻害活性を評価した。

【結果・考察】Neuro2A assay は、$Na_v1.2$ を一過的に発現させた 293T 細胞に対して行った電気生理学実験と同等の結果を与え[3)]、ハイスループットスクリーニングが可能である Neuro2A assay の有用性が確認された。電気生理学実験の結果より、dcSTX に対する $Na_v1.2$、1.5、1.7 の IC_{50} 値は文献記載値に近かった[4)]。12 位が非水和型のケト基である STX 誘導体も Na_V を阻害することが明らかとなった。また、STX 誘導体を用いて灌流した 293T 細胞をその後、STX 誘導体を含まないコントロール液で灌流した結果、電流値は STX 灌流以前の値に戻らなかった。そのため、STX 誘導体と Na_V が非可逆的に結合することが考えられた。

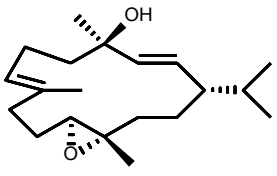
【参考文献】1) Catterall, W. A. *et al., Pharmacol. Rev.* **2005**, *57*, 397-409. 2) Tsukamoto, T. *et al., Br. J. Pharmacol.* **2017**, *174*, 3881-3891. 3) Wang, C. *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 11600-11603. 4) Alonso, E. *et al.*, *Arch. Toxicol.* **2016**, *90*, 479-488.

voltage-sensitive sodium channel, saxitoxin, electrophysiology

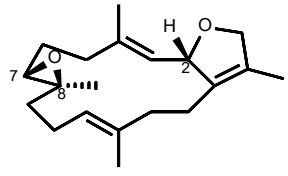
講演番号：1D3a13
講演日時：3 月 24 日 11:32～ 1 号館 D3 会場

ソロモン諸島産の海洋生物中の Na_v 阻害活性物質の探索
Screening for Na_v inhibitory compounds in marine organisms collected in the Solomon Islands
○春日 政人[1]、Clyde Gorapava Puilingi[2]、角替 俊輔[1]、中崎 敦夫[3]、長 由扶子[1]、西川 俊夫[3]、此木 敬一[1]、山下 まり[1] ([1]東北大院農、[2]Pacific Adventist University、[3]名大院生命農)
○Masato KASUGA[1], Clyde Gorapava PUILINGI[2], Shunsuke TSUNOGAE[1], Atsuo NAKAZAKI[3], Yuko CHO[1], Toshio NISHIKAWA[3], Keiichi KONOKI[1], Mari YOTSU-YAMASHITA[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Pacific Adventist Univ., [3]Nagoya Univ.)

【背景・目的】海綿や軟体サンゴなどの海洋生物は、生理活性物質の宝庫である。Veratridine (電位依存性ナトリウムチャネル(Na_v)活性化剤)は ouabain (Na^+, K^+ ATPase 阻害剤)、共存下で神経細胞内の Na^+濃度を上昇させ、Neuro2A 細胞(マウス神経芽細胞腫)に対して毒性を示す。一方、Na_v の特異的阻害剤である tetrodotoxin (TTX)や saxitoxin (STX)は Na^+の細胞内流入を阻害するため、その細胞毒性を軽減する。我々はこの現象を TTX や STX 類縁体の Na_v 阻害活性を評価する方法に用い、Neuro2A assay と呼ぶ [1]。本研究では、Neuro2A assay を利用してソロモン諸島近海で採集された海洋生物より創薬標的となり得る Na_v 阻害活性物質を探索し、単離、同定し、作用機序の解明を目指した。
【方法】ソロモン諸島近海で採集された約 50 種の海洋生物の 70% EtOH 抽出液を Neuro2A assay に供し、活性物質を探索した。陽性検体を逆相カラムで分画し、Neuro2A assay の結果を指標に活性物質を精製した。精製後、高分解能 MS と NMR 分析に供し、構造決定を行った。さらに、Neuro2A 細胞を用いた電気生理実験を行い、Na_v に対する活性物質の作用を調べた。
【結果・考察】活性物質として、軟体サンゴ *Sarcophyton* sp. から既知のセンブレン 2 種 trocheliophorol (**1**)[2]と(2*S*, 7*S*, 8*S*)-(+)-sarcophytoxide (**2**)[3]を単離した。**1** と **2** の Neuro2A assay での EC_{50} は、それぞれ数 10 μM と数 μM であり(TTX：5-10 nM)、Na^+, K^+ ATPase に対する ouabain の阻害活性 [4]には影響しないことを確認した。また、電気生理実験でも **1** の Na_v 阻害活性が確認された。**2** の Ca チャネル阻害作用についての報告はあるが [5]、**1** と **2** ともに Na_v 阻害活性に関する報告はない。他の類似化合物との構造と生理活性の比較から、センブレンの 14 員環構造が活性発現に関与していると考えられた。



trocheliophorol (**1**)



(2*S*, 7*S*, 8*S*)-(+)-sarcophytoxide (**2**)

【Reference】1) Yotsu-Yamashita, M. *et al*., *Toxicon*, **2003**, *42*, 557-560. 2) Kashman, Y. *et al*., *J. Org. Chem*., **1981**, *46*, 4279-4284. 3) Borden, B. F. *et al*., *J. Nat. Prod*. **1987**, *50*, 650-659. 4) Nakazaki, A. *et al., J. Org. Chem*., **2017**, *82*, 9097-9111. 5) Kobayashi, J. *et al*., *Experientia* **1983**, *39*, 67-69.

Sarcophyton sp., cembrene, voltage-gated sodium channels

発表責任者：山下 まり（mari.yamashita.c1@tohoku.ac.jp）

講演番号：1D3a14
講演日時：3 月 24 日 11:43～ 1 号館 D3 会場

海洋天然物アプリロニン A の標的分子における結合位置解析および作用機序の解明

Binding position of the target molecules and mode of action studeis on Aplyronine A, an antitumor merine macrolide

○井熊 純也[1]、瀬口 由宇[2]、山岸 航大[2]、中根 玄貴[2]、臼井 健郎[3]、木越 英夫[2]、北 将樹[1,4]（[1]名大院生命農、[2]筑波大院数理物質、[3]筑波大院生命環境、[4]JST さきがけ）
○Junya IKUMA[1], Yu SEGUCHI[2], Kota YAMAGISHI[2], Hiroki NAKANE[2], Takeo USUI[3], Hideo KIGOSHI[2], Masaki KITA[1,4] ([1]Nagoya Univ., Agric., [2]University of Tsukuba, Pure and Appl. Sci., [3]University of Tsukuba, Life and Environmental Sciences, [4]JST-PRESTO)

アプリロニン A は、海洋軟体動物アメフラシ（*Aplysia kurodai*）より単離された 24 員環マクロリドであり、ヒト子宮頸がん細胞 HeLa S3 に対する強力な細胞増殖阻害活性、P388 白血病モデルマウスにおける顕著な抗腫瘍活性を有する。また本化合物は、アクチンの疎水性クレフト部と相互作用することでアクチン脱重合活性を有する。さらにアクチンと複合体を形成した後、微小管を構成するチューブリンとも相互作用し、ごく低濃度でがん細胞の有糸分裂を阻害する。本研究では、ケミカルプローブを用いてアプリロニン A のチューブリンにおける結合位置を解明し、本化合物が誘導するアクチン・チューブリン間の特異なタンパク質間相互作用を解明することを目指した。

アプリロニン A のこれまでの構造活性相関研究をもとに、C34 位エナミド基から L-Lys リンカーを伸長し、反応性官能基としてスクシニル基、および検出基として蛍光基 TAMRA を導入した ApA-NF を合成した。本プローブを用いてアクチンのラベル化を検討した結果、アプリロニン A が強固に結合するアクチンの疎水性クレフトに近い Lys113 残基の特異的なラベル化がみられた。アクチン、チューブリン両タンパク質の共存下で行ったラベル化についても合わせて発表する。

antitumor natural products, chemical probe, protein-protein interaction

発表責任者：北将樹（mkita@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：1D3a15
講演日時：3 月 24 日 11:54～ 1 号館 D3 会場

アクチン作用性天然物を基盤とした抗腫瘍性リガンドおよび新規ケミカルツールの開発
Development of Antitumor Ligands and Novel Chemical Tools Based on Actin-targeting Natural Products

○藤枝 あかり[1]、高橋 桃子[2]、二木 健太郎[2]、木越 英夫[2]、北 将樹[1,3]（[1]名大院生命農、[2]筑波大院数理物質、[3]JST さきがけ）
○ Akari FUJIEDA[1], Momoko TAKAHASHI[2], Kentarou FUTAKI[2], Hideo KIGOSHI[2], Masaki KITA[1,3] ([1]Nagoya Univ., Agric., [2]University of Tsukuba , Pure and Appl. Sci., [3]JST-PRESTO)

アプリロニン A は，海洋軟体動物アメフラシ（*Aplysia kurodai*）から単離・構造決定された 24 員環マクロリドであり，ヒト子宮頸がん細胞（HeLa S3）に対する強力な細胞増殖抑制活性および p 388 白血病モデルマウスに対する顕著な抗腫瘍活性を示す．本化合物は細胞骨格タンパク質であるアクチンとチューブリンの相互作用を誘導し，ごく低濃度でがん細胞の有糸分裂を阻害することから，新規な作用機序を持つ抗がん剤リード化合物として期待される．本研究では，アプリロニン A の生物活性を保持しつつ，構造を簡略化した人工類縁体を創出し，その作用機序の解明や，細胞骨格タンパク質を精製する新規ツールの開発を目指した．

これまでの構造活性相関研究の知見をもとに，アクチンとの結合に重要な C24-C34 側鎖部と，細胞増殖阻害活性に重要なマクロラクトン部の C1-C9 位を結合した人工類縁体 4 種を合成した．超遠心法により，細胞骨格タンパク質への効果を *in vitro* で評価した結果，いずれの誘導体も，アクチン脱重合活性は天然物の活性をほぼ保持していたが，チューブリンへの作用はみられなかった．また HeLa S3 細胞に対する細胞増殖阻害活性も大幅に低下した．

そこで次に，アプリロニン A の側鎖部の強力なアクチン脱重合活性に着目し，C29–C32 位の四連続不斉中心構造と末端エナミド基のみを持つ，より構造を簡略化した類縁体を合成した．この末端にアジドを導入して，アルキンとの Click 反応により微小管阻害薬と連結した新たな抗腫瘍性リガンドを合成する計画である．またビオチン基を導入して，新たなアクチン精製ツールを開発する計画である．分子モデリング計算による，人工類縁体のアクチンとの相互作用の解析についても合わせて発表する．

actin-targeting natural products, antitumor agents, synthesis

発表責任者：北将樹（mkita@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：1D3p01
講演日時：3 月 24 日 13:50～ 1 号館 D3 会場

TRPV4 agonist による可逆的タイトジャンクション開口機構解析
Analysis of reversible opening of tight junction by TRPV4 agonist
○向山 海凪、山崎 洋平、南雲 陽子、臼井 健郎（筑波大生命環境）
○Minagi Mukaiyama, Yohei Yamasaki, Yoko Nagumo, Takeo Usui (Univ. of Tsukuba)

【背景・目的】上皮細胞間接着構造の一つである Tight Junction (TJ) は、外界からの異物や病原菌の侵入を防ぐバリア機能を担うと同時に、バイオ医薬品などの親水性高分子の通過障壁ともなっている。このためバイオ医薬品等の高分子薬剤の投与は、注射や点滴などの侵襲的な方法を取らざるを得ない。仮に TJ を短時間可逆的に開口することができれば、異物に対するバリア機能を損ねることなく、経口・経皮・経粘膜といった患者の負担が少ない投薬が可能になり、患者の QOL 向上が期待できると考えられる。そこで我々は可逆的 TJ 開口物質の探索・作用機構解析を進めてきた。これまでにトウガラシの辛み成分であり TRPV1 の agonist として知られている capsaicin の可逆的 TJ 開口機構解析を行い、capsaicin が TRPV1 ではなく TRPA1 依存的な Ca^{2+}流入を引き金にして、cofilin の一時的な脱リン酸化と actin 局在変化、及び TJ 構成タンパク質 occludin が分解することで TJ を開口すること、また TJ 閉口には actin 局在が回復することが重要であることを報告してきた[1,2]。これらの結果は、Ca^{2+}流入が初発の反応として重要であることを示唆している。そこで今回、他の TRP ファミリーイオンチャネルの活性化が TJ 開口を引き起こすか検討した。

【方法・結果】イヌ腎臓上皮細胞 MDCK Ⅱ を単層状に培養し、TRP ファミリータンパク質の mRNA 発現を調べたところ、TRPV1 の発現はほとんど見られず、TRPA1、TRPV4 が多く発現していることが明らかになった。そこで TRPV4 agonist である GSK1016790A (GSK) を MDCK Ⅱ 単層に処理したところ、GSK の濃度依存的に Ca^{2+}流入がみられ、TRPV4 antagonist 前処理で抑えられた。これらの結果は、MDCK II単層において TRPV4 が機能的に発現していることを示唆している。そこで次に TRPV4 活性化が TJ 開口を引き起こすかどうか検討した。その結果、GSK が MDCK Ⅱ 単層に対して障害を与えない濃度で TJ を可逆的に開口することを見出した。さらに GSK による可逆的 TJ 開口機構を解析したところ、GSK は cofilin の脱リン酸化を起こさず、capsaicin とは異なる機構で TJ を可逆的に開口している可能性が示唆された。現在、GSK による可逆的 TJ 開口機構の詳細について解析を進めており、合わせて報告する予定である。

1) *PLoS One*, **8**, e79954 (2013)
2) *Sci. Rep.*, **8**, 2251 (2018)

tight junction, TRPV4, capsaicin

発表責任者：臼井健郎（usui.takeo.kb@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：1D3p02
講演日時：3 月 24 日 14:01～ 1 号館 D3 会場

γ- チューブリン特異的阻害剤 gatastatin 類縁化合物の構造活性相関検討
Studies of the structure-activity relationships of γ- tubulin specific inhibitor gatastatin derivatives
○新谷 佳菜[1]、恵比須 春菜[1]、畑中 大成[2]、坂倉 彰[2]、早川 一郎[2]、南雲 陽子[1]、臼井 健郎[1]([1]筑波大生命環境、[2]岡山大院自然)
○ Kana SHINTANI[1], Haruna EBISU[1], Taisei HATANAKA[2], Akira SAKAKURA[2], Ichiro HAYAKAWA[2], Yoko NAGUMO[1], Takeo USUI[1] ([1]School of Life and Environmental Sciences, Univ. Tsukuba, [2]Grad. School of Natural Science and Technology, Okayama Univ.)

【背景・目的】α/β-チューブリンヘテロダイマーの重合体である微小管は、間期には細胞質全体に広がるネットワークを形成して細胞内物質輸送や細胞運動に関わるとともに、細胞分裂期で紡錘体を形成することで染色体分離に必須の機能を果たしている。現在、抗がん剤として利用されている taxoid 類や *vinca* alkaloid 類をはじめとする微小管阻害剤は α/β-チューブリンに直接結合することで細胞分裂期の紡錘体機能を阻害し、がん細胞の細胞周期進行を停止させる。しかしながらこれらの微小管阻害剤は紡錘体形成阻害と同時に間期微小管ネットワーク機能も阻害するため、末梢神経障害等の重篤な副作用を引き起こすことが知られている。そのため、より副作用の少ない化合物の開発が求められている。我々は、イソフラボン化合物 glaziovianin A (AG1) の構造活性相関検討を行い、*O*^{7}-demethylbenzyl AG1 が微小管核形成時に足場として働く γ-チューブリンに対する特異的阻害剤であることを見出し、gatastatin と名付けた [1)]。本物質は間期細胞の微小管ネットワークに対しては形態的影響を示さず、分裂期紡錘体異常を引き起こすことから、γ-チューブリンの特異的阻害剤は副作用の少ない分裂期特異的作用薬となる可能性が考えられる。しかしながら、gatastatin の細胞毒性は他の微小管阻害剤と比較して弱い点が課題であった。そこで本研究では、より強力な γ-チューブリン特異的阻害剤の開発を目的に gatastatin 類縁化合物の構造活性相関検討を行った。
【方法・結果】Gatastatin 類縁体の活性を、1) HeLa 細胞に対する細胞増殖阻害能、2) in vitro 系、細胞系での微小管重合・脱重合阻害能、3) 細胞系での γ-チューブリン nucleation 阻害能、の 3 つを指標に検討を行った。Gatastatin の *O*^{7}-demethylbenzyl を固定した種々の類縁体を合成し、阻害活性を検討したところ、*O*^{6} 位に propargyl 基または benzyl 基を導入した類縁化合物が微小管重合・脱重合阻害活性をほとんど示さずに、gatastatin よりも強い細胞増殖阻害能、及び γ-チューブリン nucleation 阻害活性を示した [2)]。現在、gatastatin の B 環置換基が上記の 3 つの活性に与える影響について検討しており、合わせて報告する予定である。

1) Chinen T, *et al*., *Nat*. *Commun*., **6**, 8722 (2015)
2) 特願 2018-143346

γ- tubulin, gatastatin, structure-activity relationships

発表責任者：臼井健郎（usui.takeo.kb@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：1D3p03
講演日時：3 月 24 日 14:12～ 1 号館 D3 会場

Vicenistatin による出芽酵母膜形態異常

Vicenistatin induces abnormal membrane structure in yeast

○内海 由佳[1]、工藤 駿[1]、工藤 史貴[2]、江口 正[2]、南雲 陽子[1]、臼井 健郎[1] ([1]筑波大生命環境、[2]東工大理)
○Yuka UTSUMI[1], Shun KUDO[1], Fumitaka KUDO[2], Tadashi EGUCHI[2], Yoko NAGUMO[1], Takeo USUI[1] ([1]Tsukuba Univ. of Life Env, [2]Tokyo Tech. of Sci)

【背景・目的】Vicenistatin (Vic) は放線菌 *Streptmyces halstedii* HC-34 株から単離された 20 員環マクロラクタムであり、in vitro, in vivo で抗腫瘍活性を示すことが報告されている [1)]。当研究室では、本物質が動物細胞に対して初期エンドソームの融合を促進することにより、大きな液胞様構造を急速に誘導することを報告してきた [2)]。しかしながら Vic の液胞様構造の誘導機構や標的分子は不明のままである。そこで我々は Vic に対し高い感受性を示す出芽酵母 erg6 破壊株を親株にして種々の耐性変異株を取得し、Vic 感受性に関わる遺伝子の同定・機能解析を進めてきた [3)]。しかしながら Vic が動物細胞と同様、出芽酵母に対しても膜形態異常を引き起こすかどうかは明らかになっていない。そこで本研究では Vic が出芽酵母 *erg6* 破壊株に対しても液胞膜形態の異常を誘導するか検討した。

【方法・結果】液胞膜染色剤 FM4-64 を用いて *erg6* 破壊株の液胞を観察したところ、DMSO 処理細胞では複数の小さな液胞が観察されたのに対し、Vic 処理細胞では紡錘状形態を示す巨大な液胞が観察された。次に Vic は動物細胞に対し初期エンドソーム融合を促進することから、出芽酵母のエンドソームマーカーに GFP タグをつけて局在の変化を検討した。その結果、*trans*-Golgi network マーカーである Sec7p 局在には変化がみられなかったのに対し、pre-vacuolar endosome マーカーである Snx4p は、Vic 処理で形成された紡錘状形態の液胞膜上に多く局在した。以上の結果は、Vic は出芽酵母に対してもエンドソーム融合を促進することにより、紡錘状形態を示す異常な液胞構造を誘導することが明らかとなった。さらに Vic 処理で観察された Snx4p 局在変化、紡錘状液胞は、Vic 感受性に関わる 3 つの遺伝子を破壊した erg6 破壊株でも同様に観察されたことから、感受性に関わる遺伝子群は Vic による紡錘状液胞形成の下流で細胞死に関わることが示唆された。現在、Vic で誘導される液胞の紡錘形状に細胞骨格が関与するかどうか検討を行っており、合わせて報告する予定である。

1) *J. Antibiot.*, **46**, 1076-1081 (1993)
2) *Biosci. Biotechnol. Biochem.,* **80**, 902-910 (2016)
3) 日本農芸化学会関東支部会 2017 年支部大会

Vicenistatin, Endomembrane system, Pre-vacuolar endosome

発表責任者：臼井　健郎（usui.takeo.kb@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：1D3p04
講演日時：3 月 24 日 14:23～ 1 号館 D3 会場

２次元電気泳動を用いた化合物に相互作用するたんぱく質の解析法（2DE-CETSA）の開発
Development of 2DE CETSA, a method for the analysis of small molecule-protein interaction by 2-dimensional electrophoresis based-proteomics.
○室井 誠、永澤 生久子、池野 あゆみ、小川 直子、川谷 誠、長田 裕之（理研 CSRS）
○Makoto Muroi, Ikuko Nagasawa, Ayumi Ikeno, Naoko Ogawa, Makoto Kawatani, Hiroyuki Osada (RIKEN CSRS)

【背景・目的】ケミカルバイオロジー研究において、化合物の標的を同定することは最も重要な過程の１つであるが、時間と手のかかる難しい過程でもある。標的同定にかかる時間を短縮するために、我々は、化合物によって誘導されるプロテオームの変化をプロファイルすることによって化合物の標的を推測する薬剤標的解析システム ChemProteoBase を構築してきた。一方、化合物とたんぱく質が結合することによって熱安定性が変化することを利用した Cellular Thermal Shift Assay (CETSA)が、化合物とその標的たんぱく質の相互作用解析に用いられるようになった。ChemProteoBase のスポット同定情報と CETSA を組み合わせることによって、新規化合物の標的を同定するシステム(2DE-CETSA)の構築を目的とした。
【実験方法】培養した HeLa 細胞についてスクレーパーを用いて回収し、PBS で洗浄した後に、M-PER Reagent を用いて溶解した。遠心後の上清を等量ずつ分画し、薬剤、または、DMSO を添加し、サーマルサイクラーを用い指定の温度で５分間インキュベーションした後、遠心上清について SDS-PAGE あるいは２次元電気泳動で解析を行った。差異の認められたスポットについては、データベースとの照合したのち、質量分析装置を用いてたんぱく質同定を行った。
【結果・考察】HeLa 細胞のライゼートを用いて、HSP90 阻害剤のゲルダナマイシンについて SDS−PAGE で解析したところ、90 KDa 付近に高い熱安定性を示すバンドを見出した。ウエスタンブロッティングで、そのバンドがゲルダナマイシンの標的たんぱく質である HSP90 であることを確認した。同様に処理したサンプルについて、2D-DIGE のシステム用いて２次元電気泳動を行い定量したところ、高い熱安定性を示す２つのスポットを見出した。ChemProteoBase のデータベースに照合したところ１つのスポットは HSP90 に一致した。この２つのスポットを LC-MS/MS 用いて同定したところ、HSP90 並びに、ゲルダナマイシン結合たんぱく質として報告のある GRP98 であることが明らかになった。この実験より本系を用いて、結合たんぱく質が効率よく検出できることが示された。そこで、スクリーニングで得られた大腸がん細胞の増殖を阻害する化合物について、2DE-CETSA を検討したところ、熱安定性の変化するスポットとして PKM2 が同定された。さらに解析を進めることによって、本化合物が PKM2 と相互作用によって起こるシグナルを阻害することが示唆された。本解析系が化合物の標的解析において有効なシステムになると考えられる。

target ID, proteomic analysis, inhibitor

講演番号：1D3p05
講演日時：3 月 24 日 14:34～ 1 号館 D3 会場

がん細胞に活性酸素種産生を誘導する化合物 RKN9055 の発見と作用解析

Identification of RKN9055 as a small-molecule inducer of reactive oxygen species

○河村 達郎[1,2]、二村 友史[3]、室井 誠[1,3]、川谷 誠[1,3]、SHANG Erchang[2]、JANNING Petra[2]、近藤 恭光[3]、野川 俊彦[3]、ZIEGLER Slava[2]、渡辺 信元[1]、WALDMANN Herbert[2]、長田 裕之[1,3] ([1]理研 CSRS・理研-マックスプランク連携、[2]マックスプランク分子生理学研究所、[3]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー)

○ Tatsuro KAWAMURA[1,2], Yushi FUTAMURA[3], Makoto MUROI[1,3], Makoto KAWATANI[1,3], Erchang SHANG[2], Petra JANNING[2], Yasumitsu KONDOH[3], Toshihiko NOGAWA[3], Slava ZIEGLER[2], Nobumoto WATANABE[1], Herbert WALDMANN[2], Hiroyuki OSADA[1,3] ([1]RIKEN-Max Planck Joint, RIKEN CSRS, [2]Max-Planck-Inst. Mol. Physiol., [3]Chem. Biol., RIKEN CSRS)

【背景・目的】活性酸素種(Reactive Oxygen Species; ROS)は、広義には酸素原子を含みかつ反応性に富む化学種の総称であり、量・種類・局在に応じて細胞増殖や細胞死など様々な細胞応答を引き起こすことが知られている。一方で、細胞のレドックス制御の分子メカニズムについては未解明な点も多い。そこで我々は、がん細胞のレドックス制御機構のさらなる理解のため、がん細胞に ROS 産生を誘導するツール化合物の探索に取り組んできた。本研究では、最近見出した ROS 産生誘導化合物 RKN9055 の作用機序解析を目的とした。

【結果】RKN9055 は元々、細胞に特異な形態変化を誘導する化合物として、理研 NPDepo ライブラリーから見出した。プロテオーム変動データに基づくプロファイリングを行った結果、RKN9055 の作用機序はレファレンス化合物と異なるユニークなものであることが示唆された。RKN9055 は様々なヒトがん細胞株に対して細胞毒性を示し、ヒト子宮頸がん HeLa 細胞に対して処理後 1 時間で速やかな細胞死を誘導した。その後、2 次評価を行う過程で、RKN9055 が HeLa 細胞に対して速やかな ROS 産生を誘導することを見出したため、レドックス制御機構解明のためのツール化合物として作用機序の解析を開始した。RKN9055 による ROS 産生誘導を抑制する化合物を探索したところ、staurosporine など一部のプロテインキナーゼ阻害剤に目的の活性を見出した。したがって、RKN9055 が HeLa 細胞に ROS 産生を誘導する際に、何らかのプロテインキナーゼが関与することが示唆された。次に、RKN9055 の結合タンパク質を解析するためにアフィニティー精製を行った結果、3 量体 G タンパク質の一種である Gi のサブユニットを同定した。現在は、RKN9055 が Gi を標的とする可能性を考え、詳細な解析を行っている。

reactive oxygen species, redox, cancer

講演番号：1D3p06
講演日時：3 月 24 日 14:55～ 1 号館 D3 会場

糸状菌 RK17-F0007 より単離した BR-050 立体異性体の構造と活性評価

Structure and biological activity of BR-050 stereoisomer isolated from a fungus RK17-F0007

○野川 俊彦、川谷 誠、岡野 亜紀子、青野 晴美、清水 猛、長田 裕之（理研 CSRS）
○Toshihiko NOGAWA, MAKOTO KAWATANI, AKIKO OKANO, HARUMI AONO, TAKESHI SHIMIZU, HIROYUKI OSADA (RIKEN CSRS)

【背景と目的】放線菌や糸状菌などの微生物は、多様な構造と特異な活性を有する二次代謝産物を生産することで知られている。そのような二次代謝産物を探索するため我々は日本各地で採集した土壌より微生物を分離し、その培養抽出物をもとに微生物抽出物ライブラリーを作製している。このライブラリーを各種生物活性および LC/MS による構造スクリーニングに供することにより、活性および構造の両面から興味ある二次代謝産物の探索を行っている。今回、糸状菌 RK17-F0007 の培養抽出物がグルコース非存在下においてヒト骨肉腫細胞 MG-63 の増殖を特異的に抑制することを見出した。ある種のがん細胞はグルコース非依存的に増殖することが知られており、このような増殖を選択的に抑制する化合物は抗がん剤として有用な候補となり得る。そこで本活性を示す化合物の単離・同定を行うこととした。

【実験】埼玉県羽生市で採集した土壌より分離した糸状菌 RK17-F0007 の 2.0 L 培養液（0.5% yeast extract, 0.5% malt extract, 1% glucose, 1% soluble starch、28 ˚C、150 rpm、4 日間培養）に等量のアセトンを加え抽出した後アセトンを留去、残った水懸濁液を酢酸エチルで分配・抽出し有機溶媒可溶性画分を得た。これをシリカゲル中圧液体クロマトグラフィー（MPLC）、逆相 MPLC により分離し、最終的に逆相 HPLC により精製を行い、目的化合物 **1** を 1.4 mg 単離した。

【結果】高分解能質量分析より **1** の分子式を $C_{27}H_{40}O_4$（found 429.3007 $[M+H]^+$, calcd 429.2999 for $C_{27}H_{41}O_4$）と決定した。各種 NMR スペクトル（^1H, ^{13}C, DEPT, HSQC, DQF-COSY, HMBC）の解析より平面構造が骨吸収抑制物質として糸状菌より単離された BR-050（PCT WO 95/06646, 1995）と一致することを確認した。しかし、^1H NMR スペクトルは報告されているものと異なり、**1** は BR-050 の立体異性体であることが示唆された。BR-050 は当初平面構造のみの報告であったが、その後２つのグループから単離が報告された際に立体が提示された（*Tetrahedron* **65**, 469, 2009, *Tetrahedron* **65**, 6069, 2009）。また、最近 BR-050 の新規エピマーとして higginsianin B の単離が報告されている（*J. Nat. Prod.* **79**, 116, 2016）。そこで **1** の相対立体配置を NOESY スペクトルの相関より検討した。本化合物の相対立体配置は higginsianin B とは異なり、BR-050 として提示された立体と一致した。このことから BR-050 の立体は今まで提示されていた立体とは異なることが示唆された。そこで、**1** の立体構造について詳細に検討を行った。本化合物はグルコース非存在下で選択的に MG-63 細胞の増殖を抑制することを確認した。

microbial metabolite, isolation, structure elcidation

講演番号：1D3p07
講演日時：3 月 24 日 15:06～ 1 号館 D3 会場

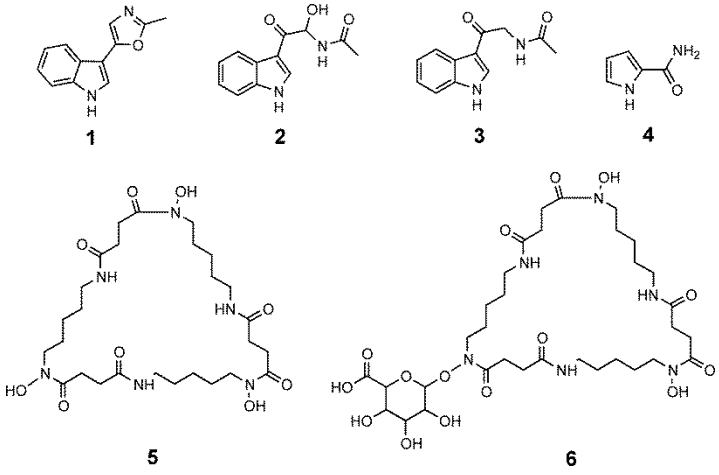
Isolation of Secondary Metabolites from *Streptomyces* sp. Cultured in Different Media

○Julius LOPEZ[1], Toshihiko NOGAWA[1], Yushi FUTAMURA[1], Takeshi SHIMIZU[1], Daisuke HASHIZUME[2], Hiroyuki OSADA[1] ([1]Chemical Biology Research Group, RIKEN CSRS, [2]Materials Characterization Support Team, RIKEN CEMS)

[Background] Microorganisms are a major source of natural products and drug candidates. However, finding new compounds is not an easy task. In this study, the one strain-many compounds (OSMAC) approach was applied to *Streptomyces* strains and sample prioritization was done using the principal component analysis (PCA).

[Methodology] *Streptomyces* spp. were cultured in five different media. Metabolites were extracted with organic solvents, and the extracts were subjected to LC-MS analysis and bioactivity assay screening. PCA was performed on mass and activity data for target selection, and scale-up cultures were prepared. The isolation of compounds was carried out by using solvent partition and column chromatography. Structure elucidation was accomplished by NMR and MS data analyses. Bioactivity against cancer cell lines, bacteria, fungi, and malaria were evaluated.

[Results] PCA results showed that cultures in corn steep liquor-dried yeast (CDY) and oatmeal (OAT) media produced distinct metabolites. Fractions from these samples also exhibited cytotoxicity and antimalarial activity. Isolation efforts led to the purification of pimprinine (**1**), *N*-acetyl-α-hydroxy-β-oxotryptamine (**2**), *N*-acetyl-oxotryptamine (**3**), 1H-pyrrole-2-carboxamide (**4**), nocardamin (**5**), and nocardamin glucuronide (**6**). Compound **6** is a new compound. Its molecular formula is $C_{33}H_{56}N_6O_{15}$ based on the HRESIMS data of the $[M-H]^-$ ion, *m/z* 775.3727; calcd, 775.3720. NMR data and reaction with β-glucuronidase confirmed the presence of the glucuronic acid moiety. Although compound **2** is already known, its stereochemistry and bioactivity have not been reported. X-ray crystallography and derivatization were used to determine the absolute configuration of **2** and **6**, respectively. Compound **2** was found to be cytotoxic to cancer cells in contrast to the inactive compound **3** suggesting the importance of the hydroxyl group. Compound **6** did not show antimalarial activity although **5** showed it. This suggested that the glucuronidation decreased the activity.



secondary metabolites, Streptomyces, principal component analysis

発表責任者：Hiroyuki OSADA（hisyo@riken.jp）

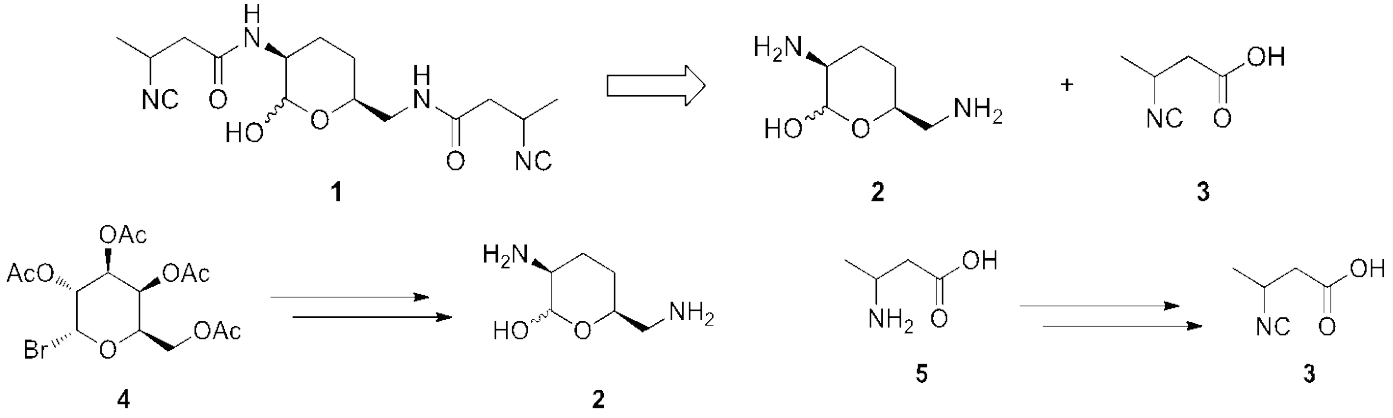
講演番号：1D3p08
講演日時：3 月 24 日 15:17～ 1 号館 D3 会場

Candida albicans に菌糸形態を誘導する化合物 RK-276A の有機合成
Synthesis of RK-276A that induces hyphal transition against *Candida albicans*

○山本 甲斐[1,2]、二村 友史[1]、清水 猛[1]、ウソン レイチェル[1]、長田 裕之[1,2] ([1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー、[2]埼玉大学)
○Kai YAMAMOTO[1,2], Yushi FUTAMURA[1], Takeshi SHIMIZU[1], Rachael USON[1], Hiroyuki OSADA[1,2] ([1]Chem. Biol., RIKEN CSRS, [2]Saitama Univ.)

【目的】ヒト病原性真菌 *Candida albicans* は日和見感染症の一つであるカンジダ症の主要病原菌である。*C. albicans* は酵母と菌糸の２つの形態に変化する二形性真菌であり、この二形性の抑制は病原性を低下させることが知られている。我々はこの二形性に着目し、微生物代謝産物から二形性制御物質の探索を行った。これまでに微生物培養液 3600 種のスクリーニングを実施し、菌糸形態を誘導する化合物 RK-276A(**1**)を見出している。**1** は構造解析の結果、既知化合物 SF2768[1)] と同一平面構造を有する化合物であったが、絶対立体配置と作用機序については明らかになっていない。本研究では作用機序解析および絶対立体配置決定のため、**1** を有機化学的に合成することを目的とした。

【方法・結果】RK-276A(**1**)を合成するにあたり、アミノ糖 **2** および側鎖 **3** をそれぞれ合成後、カップリング反応により合成することにした。糖 **2** の合成では文献[2)]を参考に 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-α-D-galactopyranosyl bromide(**4**)を出発原料として 7 ステップの反応を行い、**4** から 28 %の全収率で **2** を合成した。側鎖 **3** の合成は 3-aminobutyric acid(**5**)を出発原料としてカルボン酸をベンジルエステルに誘導後、計 4 ステップの反応を行った。糖 **2** の合成および側鎖 **3** の合成とカップリング反応の検討について報告する。



1) 発正治、日本公開特許公報、特開平 06-234784、1994-08-23
2) Iriarte Capaccio, C. A. & Varela, O. *Tetrahedron Asymmetry* 11, 4945-4954 (2000).

Chemical biology, yeast to hyphal transition, RK-276A

講演番号：1D3p09
講演日時：3 月 24 日 15:28～ 1 号館 D3 会場

フェノール性抗酸化物質の抗酸化作用とプロオキシダント効果の解析

antioxidation and prooxidation of phenolic antioxidants

○増村 大、水野 美麗、福原 潔 (昭和大薬)
○Dai MASUMURA, Mirei MIZUNO, Kiyoshi HUKUHARA (Showa Univ)

【背景・目的】　近年、国内外問わず、健康増進を目的としてサプリメントやスーパーフードの摂取が推奨されており、多くの商品が流通している。我々は、これらに含有する代表的な成分の抗酸化作用や、相互作用、プロオキシダント効果について解析することとした。

【方法】　光を照射することにより、一重項酸素（$^1O_2$)を発生させる rose bengal を用い、DNA（pBR322）を切断し、それに対する抑制効果を各化合物で判定した。それに加え、２種類の化合物を混合した場合の相互作用についても確認した。このとき、アガロースゲル電気泳動法を用いた。また、rose bengal の他に、$^1O_2$ 発生試薬である Endoperoxide （EP）を用い、発生させた $^1O_2$ に対する抑制効果、プロオキシダント効果を各化合物で、ESR 測定により判定した。

【結果・考察】　DNA 切断試験では Resveratrol, Epigallocatechin gallate (EGCG), Epigallocatechin (EGC), (-)-Epicatechin (EC), (+)-catechin において DNA 切断抑制効果が確認できた。このうち抑制効果が大きかったのは、Resveratrol と EGCG である。この系において、β-carotene では抑制効果が確認できなかった。また、化合物同士の相互作用に関しては著しい相乗効果はみられなかった。

ESR 測定では rose bengal 存在下で Resveratrol, EGC, EC, (+)-catechin, β-carotene の $^1O_2$ 抑制効果はほとんどみられなかった。しかし、シグナルの形には変化があり、この系での $^1O_2$ に何らかの影響を及ぼしていることが示唆された。一方、この系で EGCG は $^1O_2$ のシグナルを増幅し、プロオキシダント効果を示すことが確認された。また、これらの化合物のうち、rose bengal が存在していない条件で $^1O_2$ のシグナルが確認できたのは EGCG と EGC である。つまり、EGCG と EGC は、化合物そのものが $^1O_2$ を発生していると考えられる。次に、EP 存在下での $^1O_2$ のシグナルは、β-carotene, Resveratrol, EGCG において増幅され、特に、EGCG のプロオキシダント効果が大きいことが確認できた。

DNA 切断試験において $^1O_2$ 抑制効果が確認できた化合物が、ESR 測定では抑制効果が確認できなかった理由としては、これらの化合物の還元作用が $^1O_2$ そのものに働くのではなく、$^1O_2$ による DNA 酸化損傷に対する化合物の還元的修復作用によるものだと考えられる。しかしながら、これらの化合物の性質は、まだ不明瞭な部分があり、さらなる解析が必要である。

singlet oxygen, resveratrol, phenolic antioxidants

発表責任者：水野美麗（mizuno@pharm.showa-u.ac.jp）

講演番号：1D3p10
講演日時：3 月 24 日 15:39～ 1 号館 D3 会場

金属イオン配位により活性化する抗酸化物質の開発

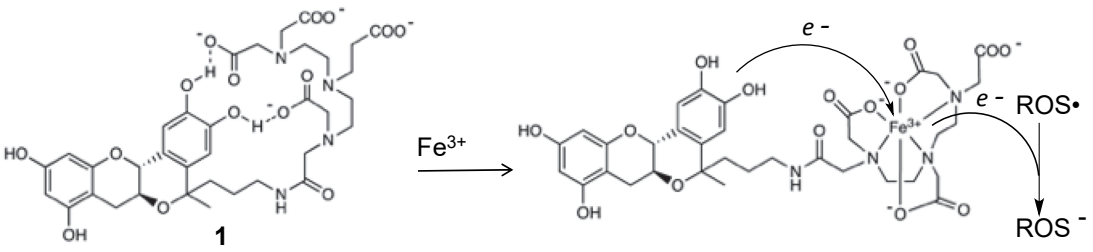
Metal complex triggered antioxidative activity of DTPA conjugated catechin derivative

○福原 潔[1]、今井 耕平[1]、中西 郁夫[2]、松本 謙一郎[2]、大野 彰子[3] ([1]昭和大、[2]放医研、[3]国衛研)
○Kiyoshi FUKUHARA[1], Kohei IMAI[1], Ikuo NAKANISHI[2], Kenichiro MATSUMOTO[2], Akiko ONO[3] ([1]Showa Univ., [2]NIRS, [3]NIH)

【目的】がんやアルツハイマー病などの疾病の発症には金属イオンを伴う酸化ストレスの関与が明らかとなっている．カテキンなどのフェノール性抗酸化物質はラジカル消去作用によって酸化ストレスを抑制する．しかし，金属イオンが存在すると，金属イオンを触媒とした酸素の還元活性化反応が進行して，プロオキシダント効果による毒性を引き起こす．我々が開発した天然カテキンの立体構造を平面に固定化した平面型カテキンは，強力な抗酸化作用を示すとともに，金属イオンによるプロオキシダント効果を示さない．本研究では金属イオンが存在すると抗酸化活性が On になる化合物の開発を試み, プロオキシダント効果を示さない平面型カテキンに金属配位子として DTPA を導入した化合物 **1** を設計・合成した．

【方法・結果】**1** は天然カテキンの立体を Pictet-Spengler 反応によって固定化した後，DTPA を付加させて合成した．活性酸素のモデル化合物であるジフェニルピクリルヒドラジル(DPPH)に対するラジカル消去活性を測定したところ，**1** は平面型カテキンの約 10 分の 1 の活性を示すのに対して，**1** に Fe^{3+}イオンをキレートさせた **1**-Fe^{3+}は平面型カテキンと比べて約 3.7 倍の非常に強力なラジカル消去活性を示した．また，Fenton 反応($FeCl_2/H_2O_2$)による pBR322DNA の切断に対する影響を検討したところ，**1** は DNA 切断に殆ど影響を与えないのに対して，**1**-Fe^{3+}は DNA 切断をほぼ完全に抑制した．Xanthine oxidase / Hypoxanthine によって発生する活性酸素に対しても，**1**-Fe^{3+}は強力に抑制することを ESR スピントラップ法で確認することができた．以上，平面型カテキンに DTPA を結合させた **1** は，Fe^{3+}が配位すると強力な抗酸化作用を示すことが明らかとなった．

【考察】**1** は，疾患の酸化ストレス発症部位において，金属を配位して取り除くことで活性酸素の生成を抑制する. さらに金属と配位した **1** は, 平面型カテキンの還元反応によるラジカル消去に対して，還元反応の活性化エネルギーを低下させることで強力な抗酸化作用を示すことが期待される．



1

catechin, metal, antioxidant

発表責任者：福原　潔（fukuhara@pharm.showa-u.ac.jp）

講演番号：1D3p11
講演日時：3 月 24 日 16:00～ 1 号館 D3 会場

新規なリンカーとタンパク質架橋剤を用いる生理活性化合物の標的タンパク質精製法
Purification of target proteins of a bioactive compound using the novel linker and protein crosslinker

○穴吹 友亮[1]、伊藤 祐輔[1]、塚原 美宙[1]、高須賀 太一[1]、岡本 昌憲[2]、松浦 英幸[1]、高橋 公咲[1] ([1]北大院農、[2]宇都宮大バイオ)
○ Tomoaki Anabuki[1], Yusuke Ito[1], Miu Tsukahara[1], Taichi Takasuka[1], Masanori Okamoto[2], Hideyuki Matsuura[1], Kosaku Takahashi[1] ([1]Res. Fac. Agric., Hokkaido Univ., [2]Ctr. for Biosci. Res. & Educ., Utsunomiya Univ.)

[研究背景] 生理活性化合物の標的タンパク質同定のためには、その分子量を明らかにするだけでなく、標的タンパク質を精製し、アミノ酸配列解析により同定する必要がある。検出用官能基（ビオチンなど）で修飾した生理活性化合物を用いたアフィニティークロマトグラフィーによる標的タンパク質の精製は多くの研究例がある。しかし、夾雑タンパク質の混入や回収率の低さという問題が生じ、標的タンパク質の同定が困難になる場合も少なくない。そこで、本研究ではより効率の良い標的タンパク質精製法の開発を目指した。
[方法・結果] 発表者らにより報告されている標的タンパク質同定法（T. Anabuki et al., *Bioorg., Med., Chem., Lett.*, 28, 783-786, 2018）を基礎とした標的タンパク質の新規精製法を設計した。新規精製法では、タンパク質架橋剤 DTSSP を用いて、標的タンパク質にビオチンを導入する。DTSSP は、両端に活性エステル構造を有し、アミノ基同士の架橋反応に用いられる化合物である。新規精製法ではまず、粗タンパク質抽出液とアジドプローブ（アジド基で化学修飾した生理活性化合物）、リンカー（末端アルキン、アミノ基およびビオチンを有する化合物）および DTSSP を反応させる。ストレプトアビジンを担体としたカラムに本サンプルをチャージする。DTSSP は還元剤 DTT で切断可能なジスルフィド結合を有しているため、アフィニティークロマトグラフィーによる標的タンパク質精製において還元剤を用いた特異的な溶出が可能である。

新規精製法の有効性を確認するため、植物ホルモンの一種であるアブシジン酸（ABA）とその受容体 AtPYL2 の相互作用の検出を試みた。定法に従い、組換え AtPYL2 を過剰発現させた大腸菌由来の粗タンパク質抽出液と ABA 由来のアジドプローブ、リンカーおよび DTSSP を反応させ、ストレプトアビジン担体に供した。溶出画分を電気泳動に供した結果、AtPYL2 の分子量と一致するバンドが確認された。さらに、溶出画分をトリプシン消化後、LC-MS/MS によるアミノ酸配列解析に供した結果、本タンパク質は AtPYL2 由来であると確認された。従って、新規精製法が有効であると示された。新規精製法の有用性をさらに示すため、前述と同様の方法で、シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）由来の粗タンパク質抽出液からの標的タンパク質精製を試みた。溶出画分を電気泳動に供した結果、AtPYL2 の分子量と一致するバンドは確認されなかったが、10 kDa 付近にバンドが確認された。本タンパク質を同定するため、電気泳動後のゲルの切り出しにより更なる精製を行った。現在、LC-MS/MS を用いて、本タンパク質の同定を試みている。

target protein, protein crosslinker, abscisic acid

発表責任者：穴吹友亮（a-tomoaki0119@eis.hokudai.ac.jp）

講演番号：1D3p12
講演日時：3 月 24 日 16:11～ 1 号館 D3 会場

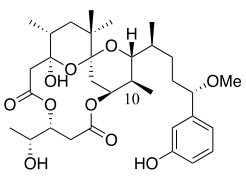
スピロ環をもたない aplysiatoxin 単純化アナログの合成と PKC アイソザイム結合活性
Synthesis and PKC binding of the simplified analogs of aplysiatoxin without a spiro-ring structure
○押村 亜沙美[1]、早川 皓太郎[1]、花木 祐輔[1]、柳田 亮[2]、入江 一浩[1] ([1]京大院農、[2]香川大農)
○Asami OSHIMURA[1], Koutaro HAYAKAWA[1], Yusuke HANAKI[1], Ryo YANAGITA[2], Kazuhiro IRIE[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kagawa Univ.)

【研究背景・目的】

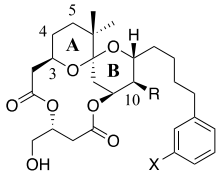
Protein kinase C (PKC) は、細胞内情報伝達において重要な役割を果たしているタンパク質リン酸化酵素である。最近 A. C. Newton のグループにより、多くのヒトのがんにおいて PKC が不活性化の変異を受けていることが明らかにされていることから (C. E. Antal *et al., Cell* **2015**, *160*, 489)、PKC の阻害よりも活性化が制がんにおいて有効と考えられる。しかしながら、天然の PKC 活性化剤の多くは、がん細胞増殖抑制とともに発がんプロモーションや炎症性を示すことから、医薬品としての使用は著しく制限される。本研究グループは、鍵束と考えられる PKC 活性化剤の適切な単純化により副作用を選択的に除去できると考え、海洋天然物・debromoaplysiatoxin (DAT) の骨格を利用して、新規抗がん剤シーズである 10-Me-Aplog-1 (**1**) の開発に成功している (Kikumori, M. *et al*., *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 5614)。しかしながら、**1** の合成には最長直線工程数で 23 段階を要し、総収率は 1.1%に留まっている。ごく最近、18-deoxy-aplog-1 (**2**) の A 環の 4 位と 5 位の炭素原子を取り除いた **3** が合成されたが、PKCδ-C1B ドメインに対する結合能は **2** と比べて 10 倍以上低下した (Y. Ashida *et al., Heterocycles*, in press)。そこで本研究では、**2** の 10 位メチル化体の 3 位と酸素原子間の結合を切断した新規単純化アナログ **4** の合成と PKC アイソザイム結合活性の評価を目的とした。

【結果と考察】

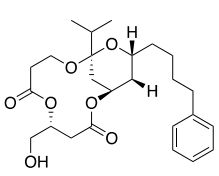
5-Phenylvaleric acid を出発物質とした収束的合成により、最長直線工程数 11 段階で **4** のジベンジル保護体 (**7**) の合成に成功した。目的物 (**4**) とその開環体 (**5**) のエネルギー計算により、ベンジル基の脱保護と同時に閉環すると予想されたが、**5** しか得られなかった。化合物 **5** とベンジル保護基を側鎖に有する **6** について、PKCδ-C1B ドメインに対する結合能を調べた結果、**6** は有意に結合したのに対して (K_i = 112 nM)、**5** はほとんど結合しなかった。以上の結果より、スピロ環構造の構築が PKC との結合に必要であることが示唆された。なお、**5** の閉環反応条件については、現在鋭意検討中である。



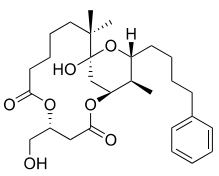
DAT



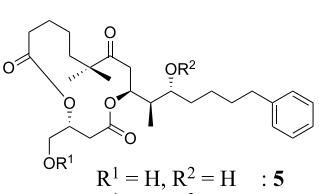
R = Me, X = OH : 10-Me-Aplog-1 (**1**)
R = H, X = H : 18-Deoxy-Aplog-1 (**2**)



3



4



R^1 = H, R^2 = H : **5**
R^1 = H, R^2 = Bn : **6**
R^1 = Bn, R^2 = Bn : **7**

protein kinase C, tumor promoter, aplysiatoxin

発表責任者：入江一浩（irie@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：1D3p13
講演日時：3 月 24 日 16:22～ 1 号館 D3 会場

酵母遺伝子変異株を利用した網膜色素変性症治療薬の探索

Construction of a yeast-based assay to identify therapeutic drugs for retinitis pigmentosa

○八代田 陽子[1]、大橋 佳樹[1,2]、岡本 怜衣香[1]、平野 弘之[3]、長田 裕之[3]、川崎 寿[2,4]、吉田 稔[1,5]（[1]理研 CSRS・ケミカルゲノミクス、[2]東電大院工、[3]理研 CSRS・化合物リソース、[4]東大・生物工学セ、[5]東大院農・応生工）

○Yoko YASHIRODA[1], Yoshiki OHASHI[1,2], Reika OKAMOTO[1], Hiroyuki HIRANO[3], Hiroyuki OSADA[3], Hisashi KAWASAKI[2,4], Minoru YOSHIDA[1,5] ([1]Chemical Genomics Research Group, RIKEN CSRS, [2]Graduate School of Engineering, Tokyo Denki Univ., [3]Chemical Resource Development Unit, RIKEN CSRS, [4]Biotechnology Research Center, Univ. Tokyo, [5]Department of Biotechnology, Univ. Tokyo)

網膜色素変性症（Retinitis Pigmentosa; RP）は視野狭窄や進行性夜盲などの症状を呈し、4,000 人に 1 人の頻度で発症する難治性の遺伝性網膜疾患である。RP の原因遺伝子はこれまでに 60 以上同定されており、その多くは網膜特異的に発現・機能する遺伝子である。本研究では、RP 治療薬候補の探索を目指し、酵母変異株を疾患細胞に見立てた疾患治療薬スクリーニング法の確立を目指した。我々は、原因遺伝子のうち、網膜以外の組織にも発現されており、且つ真核生物全般において必須の pre-mRNA スプライシング機構に関与するヒト遺伝子 PRPF3 および PRPF31 に着目した。真核生物のモデル生物である出芽酵母では、原因遺伝子ホモログである *PRP3* および *PRP31* の温度感受性（Temperature sensitive; Ts 性）遺伝子変異株が報告されている。まず、出芽酵母の Ts 性変異株コレクションから *prp3-1* および *prp31-1* 変異株を入手し、その変異点をシーケンス解析により確認した。その結果、報告されているヒト RP 患者のもつ変異点とは異なるものの、変異の入ったアミノ酸はヒト PRPF3 および PRPF31 にも保存されていた。特に *prp31-1* 変異については、ヒト RP 患者の変異点の隣のアミノ酸であった。そこで、これらの *prp3-1* および *prp31-1* 変異株を用い、Ts 性を回復させる化合物をスクリーニングすることにした。化合物スクリーニングを行うにあたり、*prp3-1* および *prp31-1* 変異を薬剤排出ポンプやその制御因子を破壊した薬剤超感受性型の出芽酵母株に導入した。それらの株を用い、それぞれの制限温度下（*prp3-1* 株：28°C、*prp31-1* 株：33°C）にて Ts 性を回復させる化合物を、理研の天然化合物バンク（NPDepo）に所蔵される 18,720 個から探索したところ、*prp3-1* 株については 15 個、*prp31-1* 株については 1 個のヒット化合物が得られた。次に、これらの化合物が実際に pre-mRNA スプライシングに影響を与えるかどうかを調べるため、イントロン含有遺伝子の mRNA および pre-mRNA の量を解析したところ、ヒット化合物は変異株のスプライシング異常を緩和することが判明した。現在、これらの化合物の作用メカニズムについて解析している。

yeast, screening, retinitis pigmentosa

講演番号：1D3p14
講演日時：3 月 24 日 16:33～ 1 号館 D3 会場

ケミカルジェネティクスによるワールブルグ効果制御機構の解析
A Chemical Genetic Study on the Regulation of the Warburg Effect

○小林 大貴[1]、長田 裕之[3]、吉田 稔[1,2,4] ([1]理研 CSRS・創薬シード、[2]理研 CSRS・ケミカルゲノミクス、[3]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー、[4]東大院農・応生工)
○Hiroki KOBAYASHI[1], Hiroyuki OSADA[3], Minoru YOSHIDA[1,2,4] ([1]Seed Comp. Explor. Unit Drug Discov. Platform, RIKEN CSRS, [2]Chem. Genomics Res. Gr., RIEKN CSRS, [3]Chem. Biol. Res. Gr., RIKEN CSRS, [4]Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo)

【目的】ワールブルグ効果として知られる解糖系の亢進、ミトコンドリア呼吸の低下はがんやミトコンドリア病で見られる代謝的特徴であるが、その制御機構の全容は不明である。私たちはこれまでワールブルグ効果制御機構の一端を解明するため、また上記疾患の新たな治療法開発につながることを期待し、新規な代謝制御物質を理研天然化合物バンクより探索・同定した結果 Tryptolinamide（TLAM）を得た。本研究では当該物質の作用機序解析を行った。【結果】がん細胞に対し TLAM を添加すると解糖系流束が低下し、酸素消費速度が増加する。生化学的解析および細胞外代謝流束解析により、TLAM は AMPK を活性化させ脂肪酸分解を介して酸素消費速度の増加を誘導することを見出した。つぎに標的分子の手掛かりを得るためメタボローム解析を行った。その結果、TLAM の添加により解糖系上流の代謝物 glucose 6-phosphate および fructose 6-phosphate（F6P）が増加した一方で fructose 1,6-bisphosphate（FBP）は減少したことから、TLAM の添加により phosphofructokinase-1（PFK1）が阻害される可能性が示唆された。実際 TLAM は rPFK1 を *in vitro* で阻害し、その阻害様式は ATP 不競合、F6P 競合的であることを明らかにした。また PFK1 ノックアウト細胞は解糖系流束の低下が認められただけでなく TLAM を添加してもそれ以上代謝変化が起きないことから TLAM は細胞レベルでも PFK1 を阻害して代謝を制御することが示された。さらに PFK1 ノックアウト細胞では AMPK 活性が上昇していたことから PFK1 が AMPK／脂肪酸分解を介してミトコンドリア呼吸を制御しうることが示唆された。【結論】ワールブルグ効果では細胞が PFK1 に依存して解糖系優位の状況を作っており、PFK1 活性が呼吸との切り替えスイッチになりうることが示唆された。

chemical biology, metabolism, Warburg effect

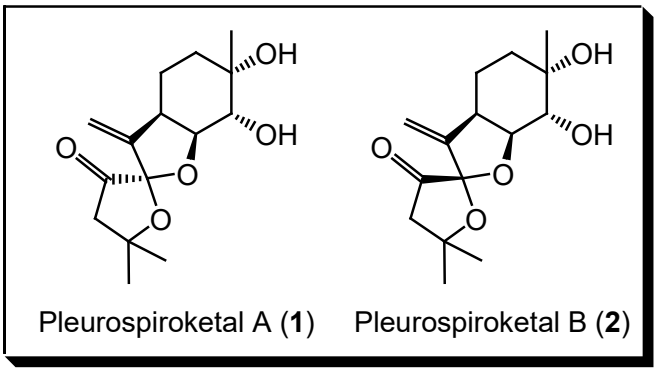
講演番号：1D4a02
講演日時：3 月 24 日 09:11～ 1 号館 D4 会場

Pleurospiroketal 類の合成研究

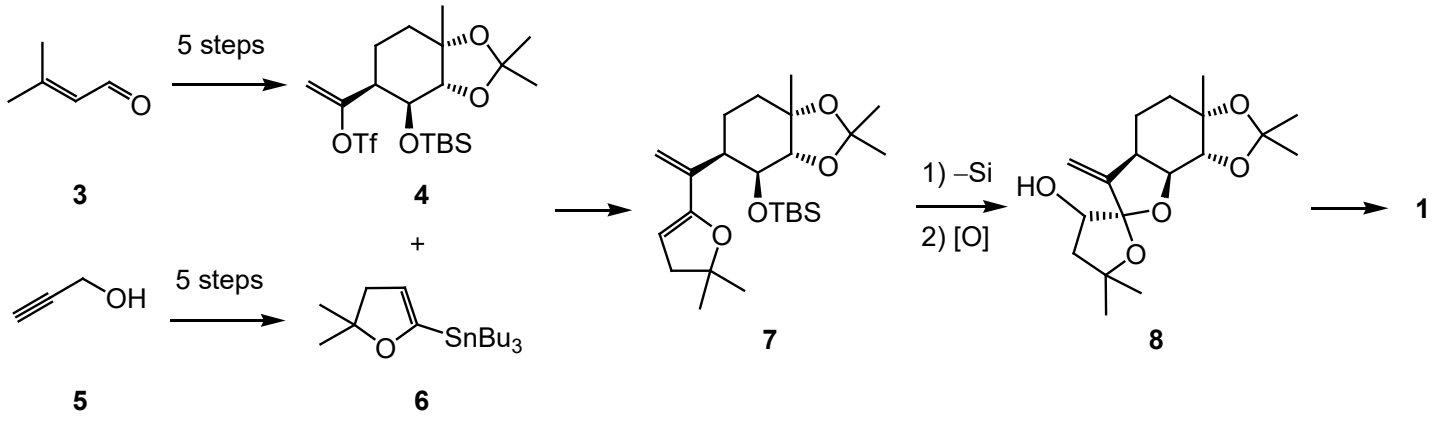
Synthetic studies on Pleurospiroketals

○帯津 陽一、木村 真菜、森 直紀、渡邉 秀典、滝川 浩郷（東大院農生科）
○Youichi OBITSU, Mana KIMURA, Naoki MORI, Hidenori WATANABE, Hirosato TAKIKAWA (Univ. of Tokyo)

Pleurospiroketal A (**1**)およびそのスピロ中心のジアステレオマーである Pleurospiroketal B (**2**)は食用キノコである *Pleurotus cornucopiae* より単離されたセスキテルペノイドである。その活性として、リポ多糖で活性化されたマクロファージの一酸化窒素産生阻害活性を有している。発表者らのグループは、その活性および高度に酸化された骨格に興味を持ち、その合成研究に着手した。



アルデヒド (**3**)を出発原料として 5 工程でエノールトリフラート (**4**)、プロパルギルアルコール (**5**)を出発原料として 5 工程でビニルスズ (**6**)をそれぞれ得た。**4** と **6** の Stille クロスカップリングと連続するジヒドロフラン環の酸化を鍵反応として所望のスピロ環の構築と Pleurospiroketal A (**1**)の合成に成功した。



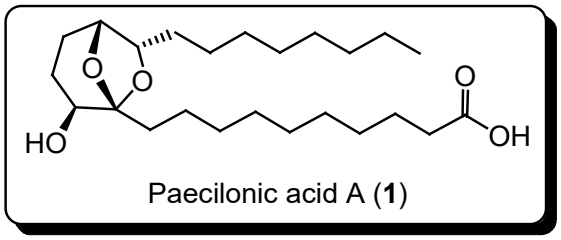
total synthesis, Stille cross coupling, sesquiterpenoid

講演番号：1D4a03
講演日時：3 月 24 日 09:22～ 1 号館 D4 会場

Paecilonic acid A の合成研究

Synthetic study of paecilonic acid A

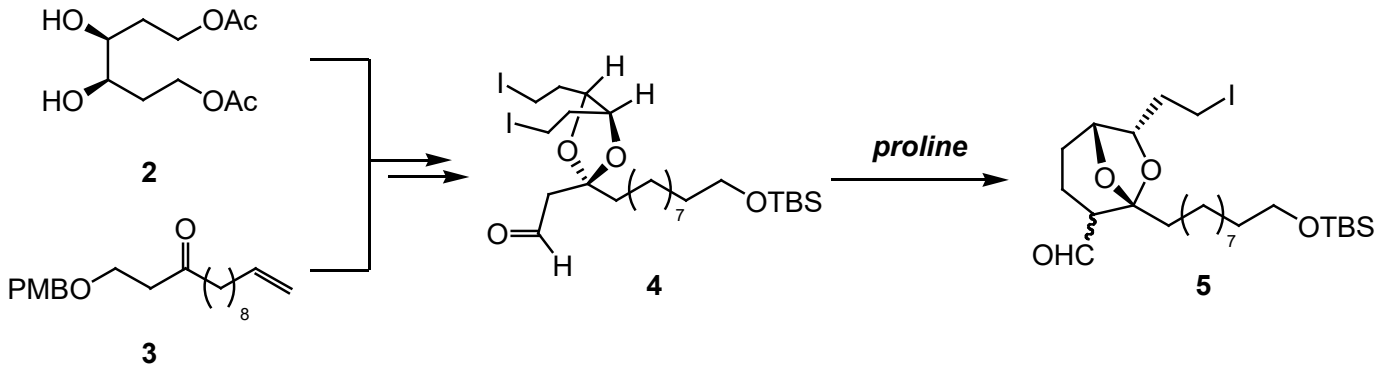
○的場 充弘、森 直紀、渡邉 秀典、滝川 浩郷（東大院農生科）
○Mitsuhiro MATOBA, Naoki MORI, Hidenori WATANABE, Hirosato TAKIKAWA (Univ. of Tokyo)



Paecilonic acid A (**1**)

Paecilonic acid A (**1**)は 2016 年に真菌 *Paecilomyces variotii* より単離，構造決定された脂肪酸化合物であり，その生物活性は明らかにされていない．本化合物の骨格的特徴として 4 つの不斉点を有するジオキサビシクロ[3.2.1]オクタン(以下 DOBCO)が挙げられる．抗 HIV 活性やガン細胞への細胞毒性などの有用な活性を示す DOBCO 化合物が報告されているため，本化合物の活性にも興味が持たれる．以上の背景より，我々は paecilonic acid A の効率的合成法の確立を目的として本研究に着手した．

本研究における重要課題である DOBCO の構築は，プロリン誘導体を触媒とした分子内アルキル化によって行うものとした．まず，容易に調製可能なジオール **2** とケトン **3** とのアセタール化，および数段階の変換を経て，鍵反応の前駆体となるアルデヒド **4** の合成を行った．続いて鍵反応であるプロリン誘導体による分子内アルキル化の条件に附すことによって対称分子の非対称化を行い，エナンチオ選択的に DOBCO の構築に成功した．現在は得られた DOBCO 化合物 **5** の目的物への変換を検討中である．



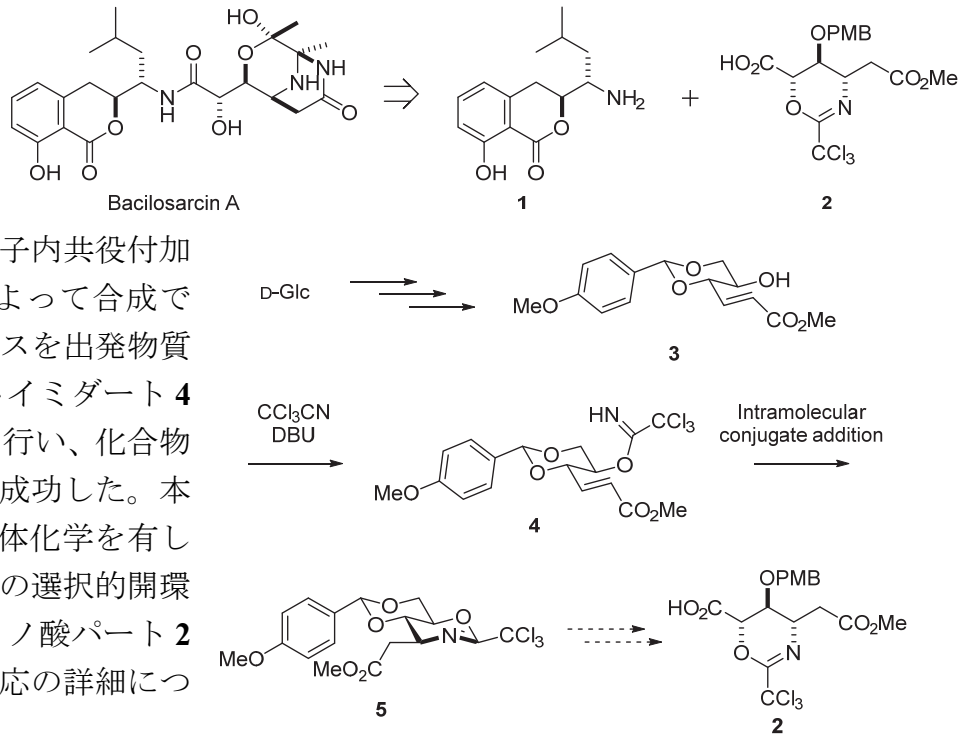
Paecilonic acid A, Desymmetrization, Asymmetric Organocatalysts

講演番号：1D4a04
講演日時：3 月 24 日 09:33～ 1 号館 D4 会場

Bacilosarcin 類の合成研究
Synthetic studies on Bacilosarcins
○小川 由香子、西 克也、中田 恭介、松島 芳隆（東京農業大学・農芸化学科）
○Yukako OGAWA, Katsuya NISHI, Kyousuke NAKATA, Yoshitaka MATSUSHIMA (Tokyo Univ of Agriculture, Dept of Agricultural Chemistry)

【背景と目的】Bacilosarcin A はマイワシの消化管内から得られた *Bacillus subtills* TP-B0611 株の培養液から富山県立大学の五十嵐らによって、単離･構造決定された化合物であり [1] 、過去に合成が一例報告されている [2]。この化合物は、イネ科植物の種子に対して Herbimycin A よりも強力な発芽阻害活性を有していることから実用的に期待が持てる。本研究では Bacilosarcin 類の汎用性の高いルートの確立を目的とする。

【方法・結果】Bacilosarcin 類の逆合成を行い、アミンパート **1** と側鎖アミノ酸パート **2** に分けた。本研究では側鎖アミノ酸パート **2** について合成を開始した。**2** は本研究の鍵反応である分子内共役付加反応による窒素官能基の導入によって合成できると考えた。実際に D-グルコースを出発物質として得られたトリクロロアセトイミダート **4** に対して、分子内共役付加反応を行い、化合物 **5** を立体選択的に合成することに成功した。本化合物は **2** と同等の官能基と立体化学を有したものである。今後はアセタールの選択的開環など、種々の反応を経て側鎖アミノ酸パート **2** の合成を完了する予定である。反応の詳細について報告する。



1) A. Miwa, K. Ogawa, T. Fujita, M. Takeshita, R. Yoshida, T. Furumai, Y. Igarashi, *Tetrahedron*, **2008**, *64*, 6420–6425.
2) M. Enomoto, S. Kuwahara, *Angew. Chem. Int. Ed.,* **2009**, *48*, 1144 –1148.

Bacilosarcins, trichloroacetimidate, intramolecular conjugate addition

発表責任者：松島　芳隆（ym205308@nodai.ac.jp）

講演番号：1D4a05
講演日時：3 月 24 日 09:44～ 1 号館 D4 会場

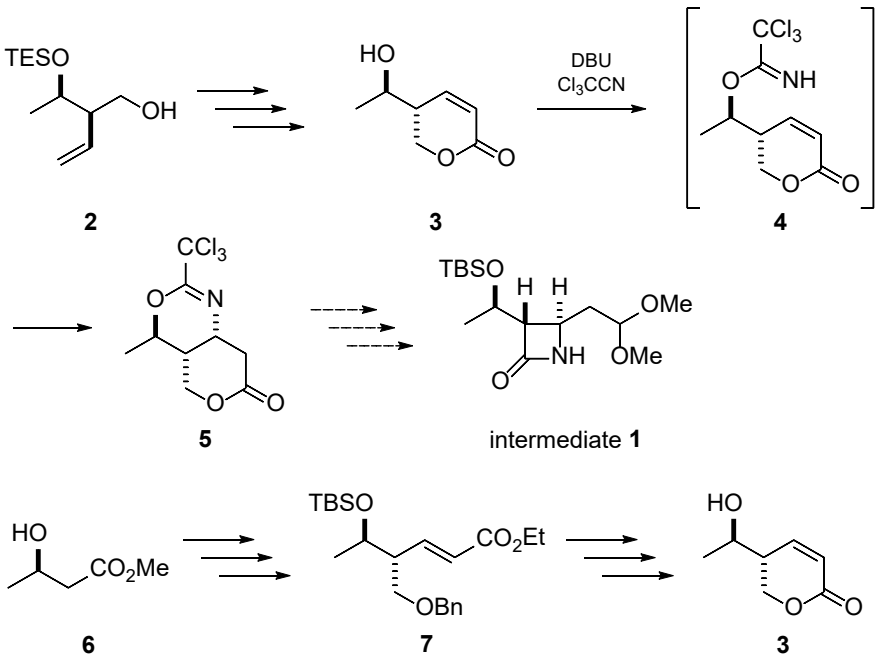
カルバペネム系抗生物質中間体の新規合成法の開発

Development of a new route for intermediates of carbapenem antibiotics

○中丸 夏実、松島 芳隆（東京農業大学・農芸化学科）
○ Natsumi NAKAMARU, Yositaka MATSUSHIMA (Tokyo Univ of Agriculture, Dept of Agricultural Chemistry)

【背景・目的】幅広い抗菌スペクトルをもつカルバペネム系抗生物質中間体の合成法はいくつか確立されているが、本研究ではトリクロロアセトイミダートを用いた分子内共役付加反応を利用し、カルバペネム系抗生物質の 1 つ、イミペネムの合成中間体 **1** の新規合成ルートの開発を目的とする。

【方法・結果】本合成の鍵となるのは、ラクトン **3** より得られるトリクロロアセトイミダート **4** の分子内共役付加反応が立体選択的に進行し、化合物 **5** を得る点である。化合物 **5** は目的の **1** へ導くことのできる官能基と立体化学を兼ね備えている。実際に得られた **4** は不安定であったが、種々の検討の結果、**5** へ誘導することに成功した。今後は **5** から **1** への変換を検討する予定である。なお、ラクトン **3** は、文献既知の化合物 **2**[1]から閉環メタセシス反応などを用いる方法、および市販の化合物 **6** から出発し、立体選択的アルキル化を含む 5 工程で得た化合物 **7**[2]より変換するという、2 通りの合成ルートを確立した。反応の詳細について報告する。



1) H. Sakaguchi, H. Tokuyama, T. Fukuyama, *Org. Lett*. **2007**, *9*, 1635-1638.
2) C. Oh, and W. Ham, *Chem. Commun*. **1999**, 2365-2366.

trichloroacetimidate, intramolecular conjugate addition, carbapenem antibiotics

発表責任者：松島 芳隆（ym205308@nodai.ac.jp）

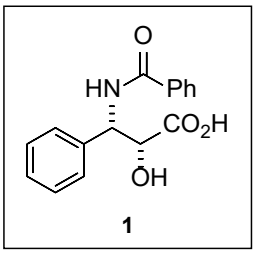
講演番号：1D4a06
講演日時：3 月 24 日 10:05～ 1 号館 D4 会場

bis-トリクロロアセトイミダートの分子内環化を用いたタキソール側鎖アミノ酸の合成研究

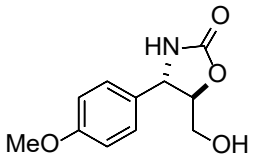
Intramolecular cyclization of a bis-trichloroacetimidate, and it's application for the synthesis of taxol side chain

○折田 未奈、石川 萌、松島 芳隆（東京農業大学・農芸化学科）
○Mina ORITA, Moe ISHIKAWA, Yoshitaka MATSUSHIMA (Tokyo Univ of Agriculture, Dept of Agricultural Chemistry)

【背景・目的】昨年度、本研究室で bis-トリクロロアセトイミダートの環化反応を用いた *epi*-cytoxazone の新規合成経路が確立された [1]。本研究では、この反応の有用性について検討するとともに、タキソールの側鎖アミノ酸 **1** の新規合成を達成することを目的とする。

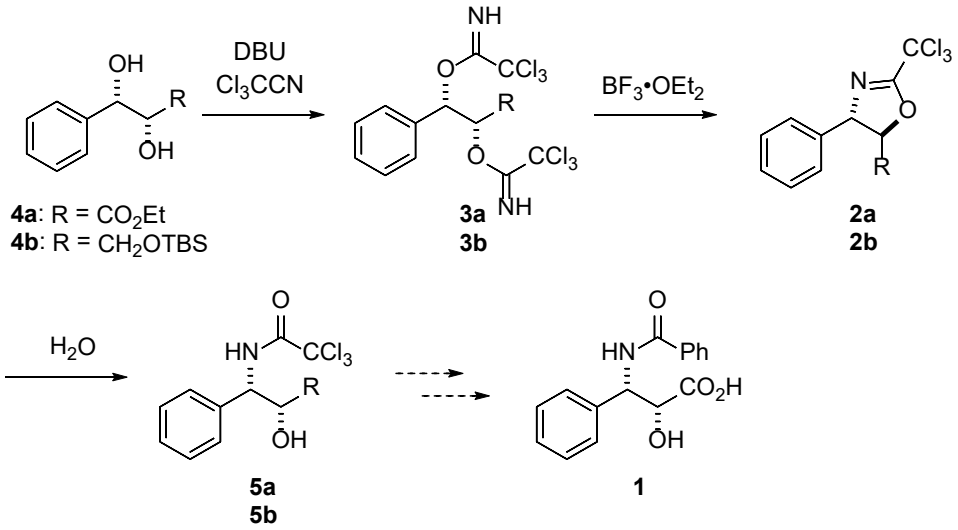


1



epi-cytoxazone

【方法・結果】タキソールの側鎖アミノ酸 **1** の合成計画を図に示した。本計画の鍵となるのは分子内環化反応において立体保持で窒素官能基の導入が進行することである。文献既知の光学活性ジオール **4** を出発物質とし、bis-トリクロロアセトイミダート **3** を得る。その後、鍵反応である bis-トリクロロアセトイミダートの分子内環化反応を行い、オキサゾリン **2** を経て目的のタキソールの側鎖アミノ酸 **1** を得る計画である。出発物質として **4a** および **4b** についてそれぞれ検討した。反応の詳細について報告する。



1) Y. Matsushima, M. Ishikawa, R. Shibasaki, Y. Nojima *Tetrahedron Lett.* **2018**, *59*, 231-233.

trichloroacetimidate, intramolecular cyclization, taxol side chain

発表責任者：松島　芳隆（ym205308@nodai.ac.jp）

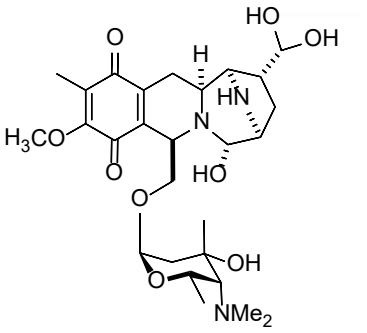
講演番号：1D4a07
講演日時：3 月 24 日 10:16～ 1 号館 D4 会場

抗生物質 lemonomycin のデオキシアミノ糖 lemonose の新規合成法の開発

Development of a new route for lemonose, a deoxyamino sugar part of antibiotic lemonomycin

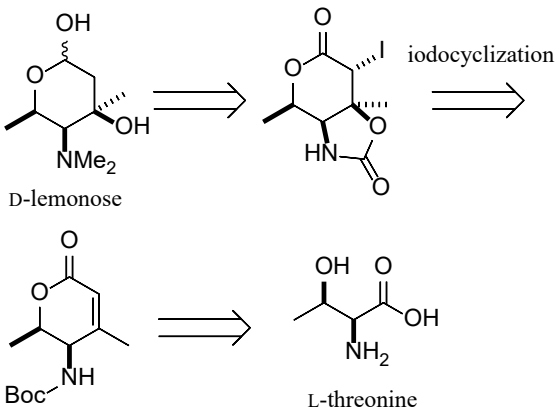
○中谷 俊道、松島 芳隆（東京農業大学）
○TOSHIMICHI NAKATANI, YOSHITAKA MATSUSHIMA (Tokyo Univ. of Agric.)

【背景・目的】デオキシアミノ糖はバンコマイシン、ダウノマイシンなど多くの抗生物質において活性発現に必要な構造単位であることが知られている。Lemonomycin は、1964 年に放線菌 *Streptomyces candidus* (LL-AP191) より単離された抗生物質であり [1]、メチシリン耐性ブドウ球菌、バンコマイシン耐性陽球菌に対し強い活性を有するイソキノリンアルカロイドである。本研究は、lemonomycin のデオキシアミノ糖部位 lemonose の両鏡像体の合成に適用可能な汎用性の高い合成法の開発を目指したものである。



Lemonomycin

【方法・結果】安価で入手可能な L-threonine を出発物質とした D-lemonose の逆合成を図示した。本合成の鍵となるのは、アミノ基のカーバマート保護基を利用したヨード環化反応 iodocyclization (iodocyclocarbamation) [2]によって 3 位の酸素官能基を立体選択的に導入するところであると考えられる。以後は種々の変換で D-lemonose へと導くことができる。実際の合成では、Weinreb アミドを経由したメチルケトン化、分子内 Wittig-Horner 反応などを経て、α,β-不飽和ラクトンを得た。本化合物を用いてヨード環化反応を行ったところ望む化合物へと導くことに成功した。現在はその後の変換について検討している。



1) H. A. Whaley, E. L. Patterson, M. Dann, A. J. Shay, J. N. Porter, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1964**, *8*, 83.
2) Y. Matsushima and J. Kino, *Tetrahedron*, **2017**, *73*, 6831-6839.

lemonose, deoxyamino sugar, iodecyclization

発表責任者：松島　芳隆（ym205308@nodai.ac.jp）

講演番号：1D4a08
講演日時：3 月 24 日 10:27～ 1 号館 D4 会場

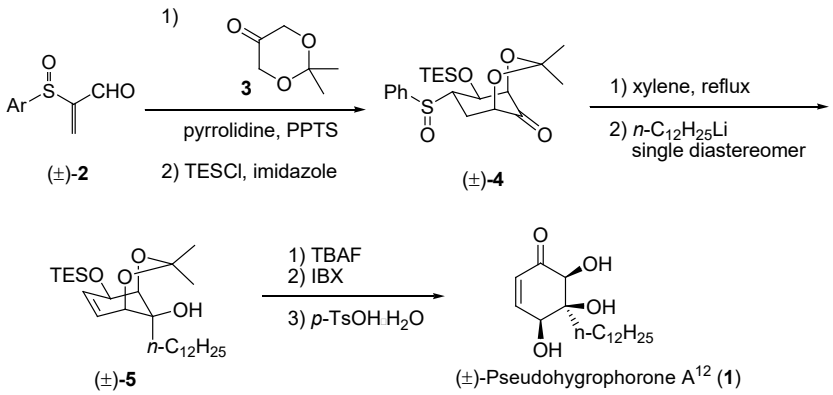
抗植物病原菌活性を有する Pseudohygrophorone 類の合成研究

Synthetic Studies of Pseudohygrophorones

○山本 優月、森 直紀、渡邉 秀典、滝川 浩郷（東大院農生科）
○Yuzuki YAMAMOTO, Naoki MORI, Hidenori WATANABE, Hirosato TAKIKAWA (Univ. of Tokyo)

【目的】Pseudohygrophorone A[12] (**1**)は担子菌の一種である *Hygrophorus abieticola* の子実体より単離されたポリケチドである。植物病原菌に対する抗菌活性を示すことから、新規農薬のリード化合物として有用であることが示唆されている。我々は作用機序の解明及び構造活性相関研究のための試料供給を目的として Pseudohygrophorone A[12] (**1**)の合成研究に着手した。

【方法と結果】文献既知のケトン **3** に対して不飽和アルデヒド **2** を作用させることで Michael 付加反応と続く Aldol 反応を進行させ、生じた水酸基に TES 保護を施すことによって環化体 **4** を得た。**4** に対してスルホキシドの脱離および *n*-$C_{12}H_{25}Li$ の付加を行い、付加体 **5** を単一ジアステレオマーとして得た。**5** に対して TES 基の除去、水酸基の酸化、アセトニドの除去、の 3 工程の変換を施した。得られた化合物の各種スペクトルデータは天然物 **1** の文献値と一致しており、**1** のラセミ体合成を達成したことを確認した。以上のように Michael-Aldol カスケード型反応とアルキルリチウムのジアステレオ選択的付加を利用して立体選択的な **1** の合成ルートを確立することができたため報告する。



【今後の展望】現時点で高鏡像体純度の **2** を調製しており、ラセミ体合成と同様の合成ルートによって光学活性体合成を行っている。**1** の両鏡像体を合成し生物活性試験に供する予定である。加えて、**1** の誘導体化合物を合成し、同様の活性試験を行うことによって構造活性相関の解明に寄与できるものと考えている。

Michael-aldol cascade reaction, Pseudohygrophorones, Anti-phytopathogenic activity

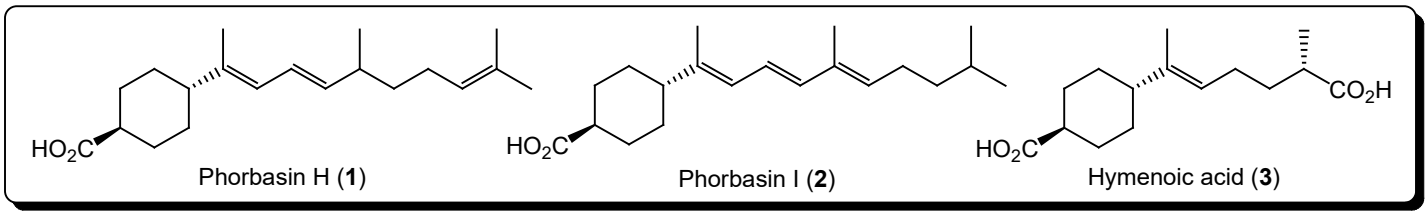
講演番号：1D4a09
講演日時：3 月 24 日 10:38～ 1 号館 D4 会場

Phorbasin H および I の合成研究

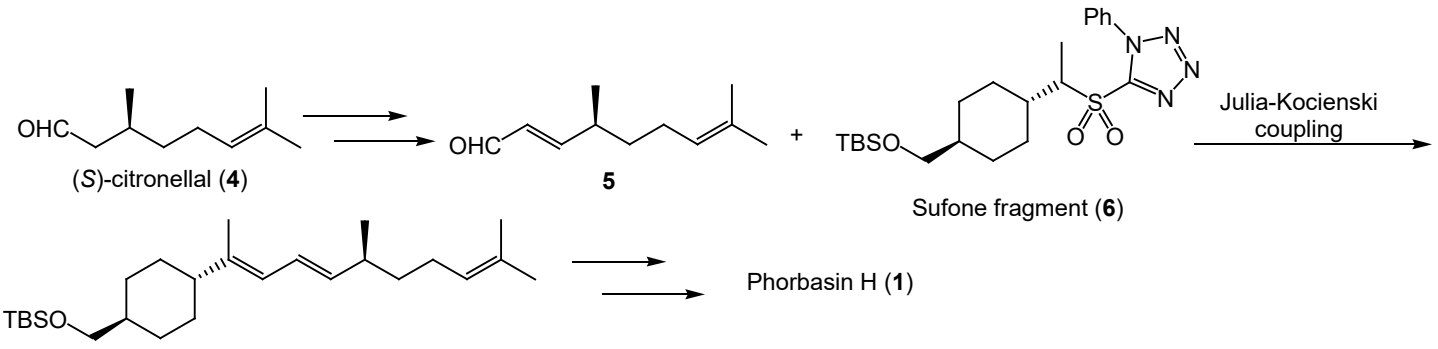
Synthetic Studies on Phorbasins H and I

○髙橋 健輔[1]、久世 雅樹[1]、森 直紀[2]、滝川 浩郷[2] ([1]神大院農、[2]東大院農生科)
○Kensuke TAKAHASHI[1], Masaki KUSE[1], Naoki MORI[2], Hirosato TAKIKAWA[2] ([1]Kobe Univ., [2]Univ. of Tokyo)

Phorbasin H (**1**)および phorbasin I (**2**)は、2008 年に単離されており、不飽和結合を複数有するジテルペンカルボン酸である。Phorbasin H (**1**)は不斉炭素を有しており、天然物の絶対立体配置は未だ報告されていない。また、phorbasin I (**2**)は生物活性が不明である。これらの化合物の合成を達成することは、絶対立体配置の決定、および、生物活性の解明に寄与すると考えられる。これらの化合物は、我々が以前合成を達成した、hymenoic acid (**3**)と類似の骨格を有している。phorbasin H (**1**)および I (**2**)の骨格構築には、hymenoic acid (**3**)を合成した際の鍵反応である、Julia-Kocienski coupling (以下 Julia カップリング)を用いることができると考えた。



まず我々は phorbasin H (**1**)の合成に着手した。(*S*)-citronellal (**4**)から、既知の方法でアルデヒド(**5**)へと誘導し、スルホン(**6**)と Julia カップリングを行うことで目的化合物の骨格を形成することに成功した。その後数段階の変換を経て、phorbasin H (**1**)の合成に成功した。合成した phorbasin H (**1**)の比旋光度は天然物のものと符号が一致し、天然物の絶対立体配置は *S* 体であることが判明した。現在は phorbasin I (**2**)の合成に着手している。



diterpene, Julia-Kocienski olefination, carboxylic acid

講演番号：1D4a10
講演日時：3 月 24 日 10:49～ 1 号館 D4 会場

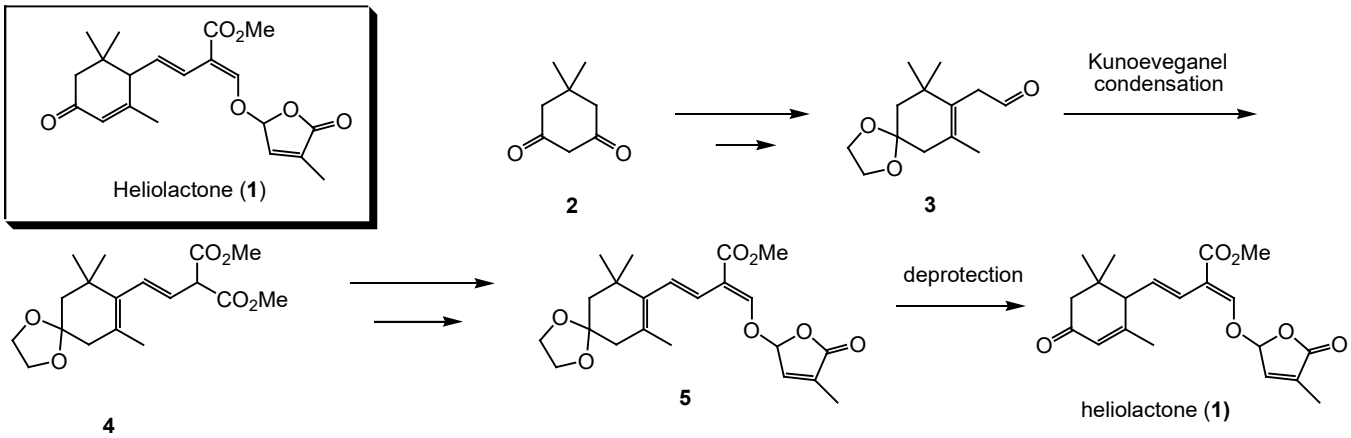
Heliolactone の合成研究

Synthetic studies on heliolactone

○山本 舜也[1]、新子 大樹[2]、森 直紀[1]、杉本 幸裕[2]、滝川 浩郷[1] ([1]東大院農、[2]神大院農)
○Shunya YAMAMOTO[1], Taiki Atarashi[2], Naoki Mori[1], Yukihiro Sugimoto[2], Hirosato Takikawa[1]
([1]Univ. of Tokyo, [2]Univ. of Kobe)

Heliolactone (**1**)は 2014 年にヒマワリの根の滲出液から単離された新種のストリゴラクトンである。ストリゴラクトン類は共通の構造として A, B, C, D 環を有しているが、heliolactone は B, C 環がない構造が提唱された。これはストリゴラクトン類の生合成経路の多様性を示唆しており、これらの研究を進めることで、新たな生合成経路の発見へとつながる可能性がある。しかしこの研究のためには化合物の量的な供給が必要である。そこで heliolactone の合成に着手した。

実際の合成を示す。市販の出発原料(**2**)から数段階の変換を経てアルデヒド(**3**)を得た。この化合物に対して、Knoevenagel 縮合を行い化合物(**4**)を得た。この化合物に対して 2 工程の変換を行い化合物(**5**)を得た後にアセタール部分を脱保護し heliolactone (**1**)のラセミジアステレオマー混合物での合成を達成した。



Storigolactones, Heliolactone, Kunoevenagel

講演番号：1D4a11
講演日時：3 月 24 日 11:10～ 1 号館 D4 会場

イソニトリルを用いたビス（アルキルアミノ）マレオニトリルの合成

A New Methods for Preparing Bis(alkylamino)maleonitriles from Isonitriles

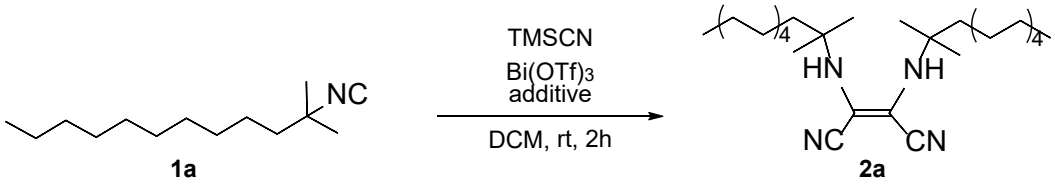
○田福 咲椰佳、福田 拓也、千葉 一裕、北野 克和（東京農工大学）
○Sayaka TAFUKU, Takuya FUKUDA, Kazuhiro CHIBA, Yoshikazu KITANO (Tokyo Univ. of Agri. and Tech.)

【目的】

ジアミノマレオニトリルの *N*-アルキル化体であるビス（アルキルアミノ）マレオニトリルは、ヘテロ環やポルフィリン類縁体の合成原料や染料に用いられる有用な化合物である。これまでに当研究室では、ビス（アルキルアミノ）マレオニトリルの新規合成法として、アルコールからの一段階合成法を構築した。この合成法は、従来法と比べて簡便であり、従来法では困難であった第三級アルキル基の導入も可能とした。しかしながら、イミドなどの窒素原子を含む官能基を有する基質を用いた場合には低収率となり、改善の余地があるといえた。ここで、アルコールからの合成法の反応機構を考えた場合、この反応がイソニトリルを中間体として経由している可能性が示唆された。これより、イソニトリルを基質に用いた場合でも、ビス（アルキルアミノ）マレオニトリルを合成できることが予測された。そこで本研究では、イソニトリルを用いてジアミノマレオニトリル誘導体を合成することを目的とし、この新規反応の条件検討を行った。

【方法と結果】

はじめに、2-isocyano-2-methyldodecane **1a** をアルコールからのビス（アルキルアミノ）マレオニトリル合成反応で最適条件であった TMSCN、TMSOTf、$Bi(OTf)_3$ と DCM 中で反応させた。その結果、2,3-bis(1,1-dimethylundecylamino)maleonitrile **2a** を得ることができ、イソニトリルからでもビス（アルキルアミノ）マレオニトリルの合成が可能であることが示唆された。次に、本合成に関して、金属試薬、添加物、試薬の当量数の検討を行い、反応条件を最適した。さらには、最適化した条件を用いて、様々な官能基を有する第三級アルキルイソニトリルを用いた検討を行った。その結果、窒素原子を含む官能基を有する基質でアルコールよりも高収率で目的物を得ることができた。本反応は、簡便にイソニトリルからビス（アルキルアミノ）マレオニトリルを合成することができ、かつアルコールでは低収率であった基質に関しても改善が見られ、今後新たな合成反応として利用されることが期待される。



1a **2a**

maleonitriles, isonitriles, bismuth

発表責任者：北野克和（kitayo@cc.tuat.ac.jp）

講演番号：1D4a12
講演日時：3 月 24 日 11:21～ 1 号館 D4 会場

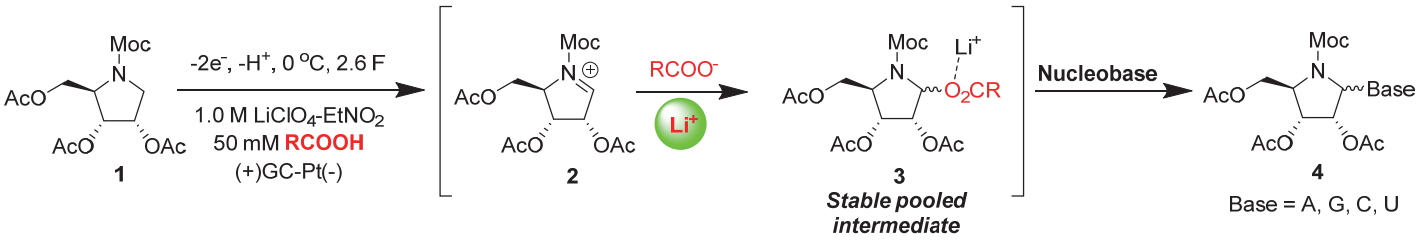
陽極酸化を用いたリボース型アザヌクレオシドの合成

Synthesis of Ribo-Azanucleosides by Anodic Oxidation

岡本 一央、小路 貴生、○筒井 瑞季、信田 尚毅、千葉 一裕（東農工大）
Kazuhiro OKAMOTO, Takao SHOJI, ○Mizuki TSUTSUI, Naoki SHIDA, Kazuhiro CHIBA (Tokyo Univ. of Agri. and Tech.)

【目的】ピロリジン骨格を有するアザヌクレオシドは，その特異な構造に由来する多様な生理活性を示すことから創薬シーズとして注目されている．特に，リボヌクレオシド型アザヌクレオシド（リボアザヌクレオシド）は，2’位水酸基が RNA 依存性 RNA ポリメラーゼによる基質認識など，構造生物学的に重要な役割を果たすことから，高い薬効が期待される．我々は，過塩素酸リチウム-ニトロエタン系における陽極酸化を用いることでプロリノール誘導体からイミニウムカチオン等価体を発生させ，各種の求核剤と反応させることでリボアザヌクレオシドの合成を目指した．

【実験方法・結果】陽極酸化は 1.0 M 過塩素酸リチウム-ニトロエタン-50 mM カルボン酸（酢酸またはトリフルオロ酢酸）を用いて行った．その結果，カルボン酸としてトリフルオロ酢酸を用いた場合には，高い収率で目的生成物を与えた．反応メカニズム解析の結果，本条件下で生じるイミニウムカチオンは共存するカルボン酸にトラップされ，アザリボース誘導体として安定的に蓄積・維持されており，ニトロエタン中で高いルイス酸性を維持しているリチウムカチオンによりアノマー位脱離基がアクティベートされていることが明らかとなった．リボアザヌクレオシドの前駆体であるプロリノールは 2’位の電子吸引性アセトキシ基により disarmed なグリコシドドナーとなっているため，アセトキシ基よりも脱離能の高いトリフルオロアセトキシ基をアノマー位に有するグリコシドドナーを *in situ* で発生させることで，求核剤に対する反応性が向上したものと考えられる．更に，電解ヒドロキシ化を経由する silyl-Hilbert-Johnson 条件を用いることで，高い立体選択性で各種リボアザヌクレオシドを合成することに成功した．



参考文献
Okamoto, K.; Shoji, T.; Tsutsui, M.; Shida, N.; Chiba, K. *Chem. Eur. J.* **2018**, 17902-17905.

Electrochemistry, Nucleoside analogue, C-H activation

講演番号：1D4a13
講演日時：3 月 24 日 11:32～ 1 号館 D4 会場

フェナジノン天然物群の全合成研究

Synthetic studies on naturaly occurring phenazinones

○古波津 春希、加茂 翔伍、友重 秀介、倉持 幸司（東理大理工）
○Haruki KOHATSU, Shogo KAMO, Shusuke TOMOSHIGE, Kouji KURAMOCHI (Tokyo Univ. of Science)

【目的】 フェナジノン類は、フェナジンの窒素原子にアルキル基が置換した構造を有する。天然物として、メチル基が置換した Pyocyanin (**1**) に加え、テルペンやプレニル基が置換した Lavanducyanin (**2**) や WS-9659 B (**3**)、Marinocyanin A (**4**)、B (**5**) などが単離されている (**Fig. 1A**)。これら天然物群は、がん細胞に対する細胞毒性や抗菌活性など様々な生物活性を示すため、医農薬開発のリード化合物として注目を集めている。しかし、化合物 **1** 以外のフェナジノン類の合成例は少ない。唯一北原らが化合物 **2** の合成を達成しているが、フェナジンの窒素原子のアルキル化は進行しにくく、高圧条件等を用いても低収率であった。そこで我々は従来法とは異なる戦略で、フェナジノン類の簡便で効率的な合成を目指した。

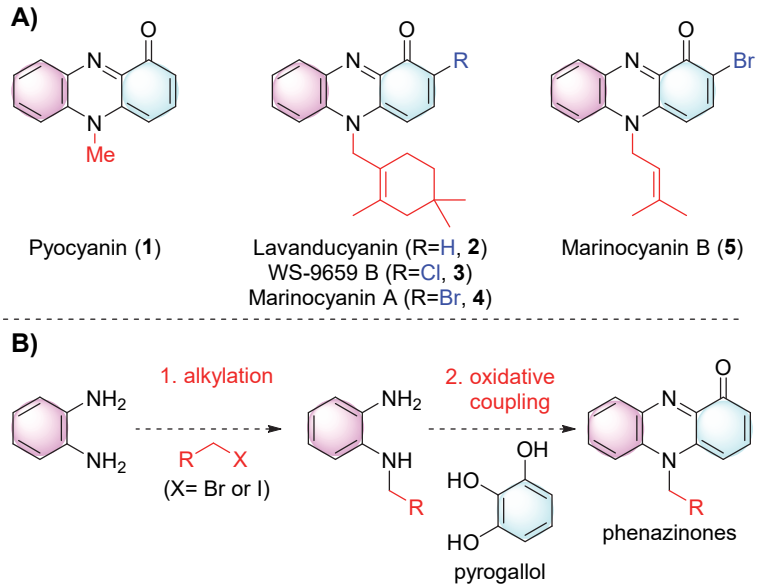


Figure 1. A) フェナジノン天然物の構造 B) フェナジノン天然物合成戦略

【手法・結果】 我々は、モノアルキル化した *o*-フェニレンジアミン誘導体とピロガロールとを酸化的に縮合させることで、様々なフェナジノン誘導体を一挙に合成できると考えた (**Fig. 1B**)。まず *N*-メチルベンゼン-1,2-ジアミンを用い、Pyocyanin (**1**) の合成を検討した。反応条件の検討を行った結果、酸素雰囲気下に 2-propanol を溶媒とする条件が最適であった。また同様の手法で Marinocyanin B (**5**) の初の全合成をわずか 3 工程で達成した (**Fig. 2A**)。さらに天然物 **2**–**4** に共通するモノテルペン部位の合成を検討し、市販のイソブチルアルデヒドから 5 工程で臭化物 **6** を得た (**Fig. 2B**)。今後はフェナジノン類 **2**–**4** の合成を達成し、合成品を用いた生物活性・物性評価への応用を目指す。

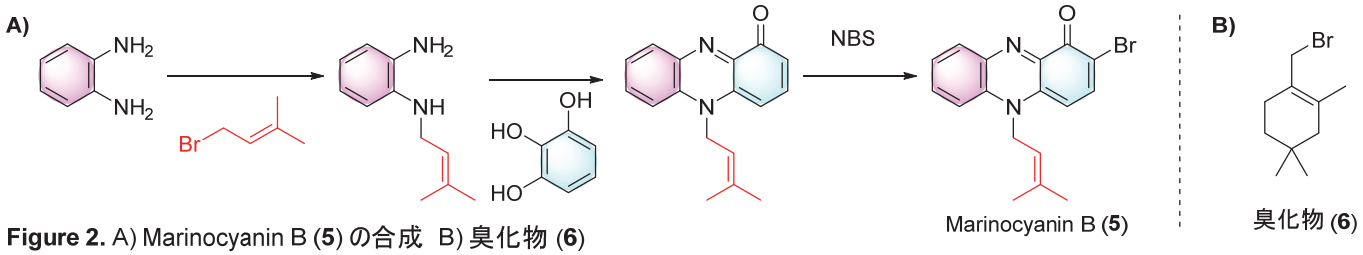


Figure 2. A) Marinocyanin B (**5**) の合成 B) 臭化物 (**6**)

Phenazinone, Oxidative coupling, Total synthesis

発表責任者：倉持 幸司（kuramoch@rs.tus.ac.jp）

講演番号：1D4a14
講演日時：3 月 24 日 11:43～ 1 号館 D4 会場

煙に含まれる発芽促進物質 Karrikinolide の 3 工程合成

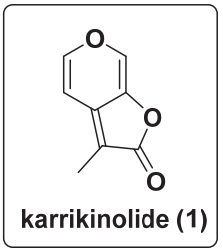
The three-step synthesis of karrikinolide, a germination promoter in smoke

○桐田 奏、細川 誠二郎（早稲田大学）
○Kanade KIRITA, Seijiro HOSOKAWA (Waseda Univ.)

【背景】

Karrikinolide(**1**)は、2004 年に Flematti ら [1]により植物を燃やしたときに生じる煙の中から単離された化合物である。種々の植物の種子に対して、1 nM 以下という極めて低い濃度においても発芽を促進する活性を有している。

Karrikinolide は天然に存在する化合物であるため環境負荷が少なく、園芸、農業への利用が期待されている。



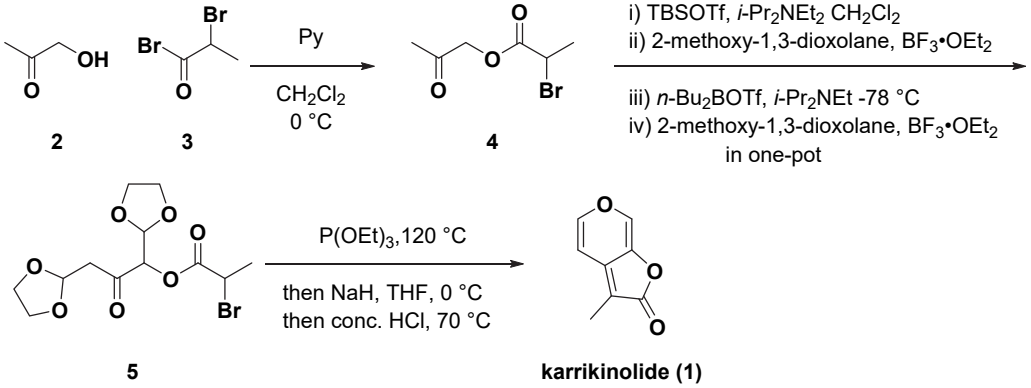
【目的】

Karrikinolide は 2005 年に Flematti らにより初の全合成が達成されて以来、今日までに 6 つの研究グループによって全合成がなされており [2]、世界的にも注目されている化合物である。しかし、いずれの合成方法も 7 工程以上を要し、工程数の多さからその量的供給は未だ困難な状況にある。

そこで我々は karrikinolide の量的供給を目的とした短工程での合成を目的とし研究を行った。

【研究内容】

アセトール(**2**)を出発原料とし、酸臭化物との縮合によりエステル(**3**)を構築した。続いてケトンの 2 つの α 位に対してオルトエステルを用いたアセタールの導入により必要な炭素数を有する鎖状中間体(**4**)へと 2 工程で導いた。最後にリン酸エステルの導入および HWE 反応によるオレフィン形成、酸性条件でのビスアセタールの環化を one-pot で行うことにより karrikinolide(**1**)を 3 工程で合成した。



2 **3** **4** **5** **karrikinolide (1)**

1) G. R. Flematti, E. L. Ghisalberti, K. W. Dixon, R. D. Trengove, *Science*, **2004**, *305*, 977.
2) Alain De Mesmaeker *et al.*, *Helv. Chim. Acta*. **2018**, *101*, e201800081. and references therein.

karrikinolide, germination promoter, synthesis

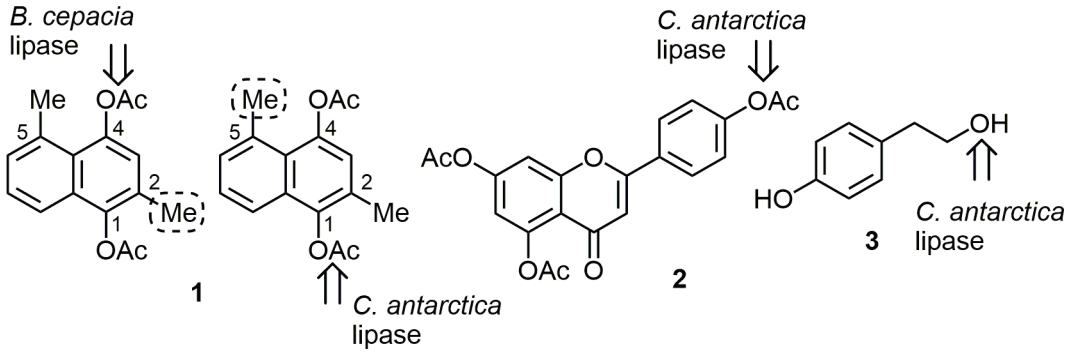
講演番号：1D4a15
講演日時：3 月 24 日 11:54～ 1 号館 D4 会場

生物活性物質合成に有用な、リパーゼが触媒する位置・官能基選択的反応

Lipase-catalyzed site- and chemoselective transformations in bioactive compound synthesis

○須貝 威、橋本 理一、坂倉 彩香、藤田 理愛、花屋 賢悟、東林 修平（慶應大薬）
○Takeshi SUGAI, Riichi HASHIMOTO, Ayaka SAKAKURA, Rie FUJITA, Kengo HANAYA, Shuhei HIGASHIBAYASHI (Keio Univ.)

加水分解触媒の一種リパーゼはさまざまな種類が容易に入手可能である。有機溶媒中では、加水分解における本来の求核剤である水に代わり、アルコールが作用(エステル交換)し、アルコールのアシル化やフェノールエステルの脱アシル化が可能である。本研究では、生理活性物質の効率よい合成に向け、触媒機能の「官能基・位置選択性」を検証した。その方法としては、有機溶媒中、分子内に複数のフェノール性酢酸エステルを有する基質 **1**, **2** に対し、第二級アルコールを求核剤とする脱アシル化を試みた。また、有機溶媒中、分子内に第一級・第二級アルコールやフェノールが共存する基質 **3** に対し、脂肪酸ビニルエステルをアシル供与体としたアシル化を試みた。反応の官能基・位置選択性は、生成物の TLC, NMR 分析等により決定した。
上記反応のいずれも、立体障害の少ない位置で優先的に反応が進行し、選択的変換が可能になった。フェノール性の基質では、隣接位に置換基が導入された位置の反応性が特に低下した酵素触媒の選択性は、リパーゼの種類によらず同様の傾向が見られたが、その中で、ナフトヒドロキノンジアセート **1** を基質とした場合、*Burkholderia cepacia* 由来のリパーゼと *Candida antarctica* リパーゼ B による脱アシル化は相補的な位置選択性を示した。
本反応で得られた生成物は、それぞれ生物活性物質に誘導した。リパーゼを用いた反応は、保護・脱保護の工程数削減に有益であった。



1 **2** **3**

R. Tsunekawa, K. Hanaya, M. Shoji, T. Sugai, in “Future Directions in Biocatalysis (Second Edition)”, T. Matsuda, ed., pp, 279-295, Elsevier (2017).

lipase, site- and chemoselective transformations, transesterification

発表責任者：須貝 威（sugai-tk@pha.keio.ac.jp）

講演番号：1D4p01
講演日時：3 月 24 日 13:50～ 1 号館 D4 会場

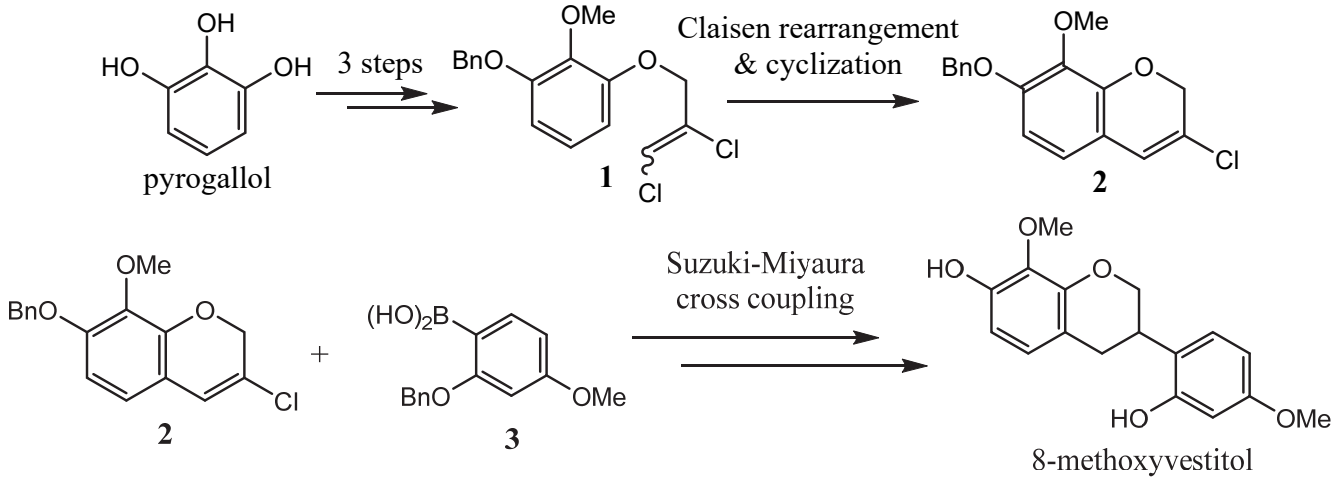
8-Methoxyvestitol の合成研究

Synthesis of 8-methoxyvestitol

○大江 拓人[1]、滝川 浩郷[2]、久世 雅樹[1] ([1]神戸大農、[2]東京大農)
○Takuto OE[1], Hirosato TAKIKAWA[2], Masaki KUSE[1] ([1]Kobe Univ. of Agric., [2]Tokyo Univ. of Agric.)

【目的】我々のグループが報告した Claisen 転位とそれに引き続く分子内環化反応を用いた独自のクロメン骨格構築法を応用することで、イソフラバン骨格を母骨格とする化合物群を容易に合成できると考えた。その一環として、8-methoxyvestitol の合成に着手した。8-Methoxyvestitol は 1994 年に *Astragalus* 属の植物から単離されたイソフラバンであり、グラム陽性菌に対する抗菌活性を持つことが知られている。

【方法】市販の pyrogallol を allylic ether (**1**)へと変換し、鍵反応となる Claisen 転位-分子内環化反応により 2*H*-chromene (**2**)を得た。4-Bromoresorcinol より合成した boronic acid (**3**)と 2*H*-chromene (**2**)を用いて Suzuki-Miyaura クロスカップリングを行い、水素添加反応によって 8-methoxyvestitol を得た。



【結果】合成した 8-methoxyvestitol の NMR データは、報告されているものと一致しなかったが、合成品の構造は間違いなく 8-methoxyvestitol であると決定できた。天然物の真の構造を明らかにするため、8-methoxyvestitol と異なる置換様式を持つ 7 種のイソフラバンを合成したが、真の構造の解明には至らず、現在も検討中である。

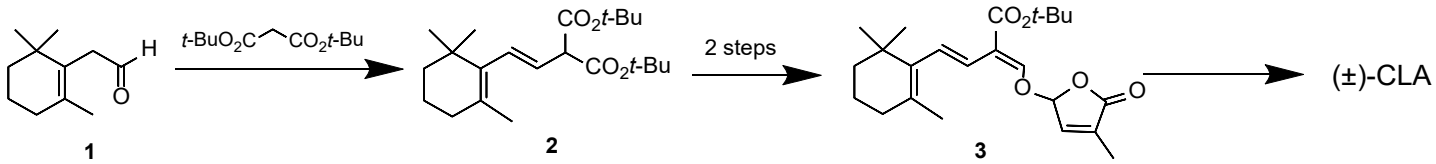
8-Mehoxyvestitol, Claisen rearrangement, Suzuki-Miyaura cross coupling

講演番号：1D4p02
講演日時：3 月 24 日 14:01～ 1 号館 D4 会場

カーラクトン酸の合成研究
Synthesis of Carlactonic acid
○溝川 孝紀[1]、大倉 裕貴[1]、滝川 浩郷[2]、三宅 秀芳[1]、新子 大樹[1]、杉本 幸裕[1]、久世 雅樹[1] ([1]神戸大、[2]東京大)
○ Koki MIZOKAWA[1], Yuki OKURA[1], Hirosato TAKIKAWA[2], Hideyoshi MIYAKE[1], Taiki ATARASHI[1], Yukihiro SUGIMOTO[1], Masaki KUSE[1] ([1]Kobe Univ., [2]Tokyo Univ.)

【目的】ストリゴラクトンと呼ばれる化合物群はβ-カロテンから生合成される植物の二次代謝産物であり、根寄生雑草の種子発芽刺激物質や枝分かれを制御する植物ホルモンとして知られている。生合成経路では carlactonoic acid (CLA)を経由してストリゴラクトン類が合成されると考えられているが、CLA 以降の詳細は解明されていない。本研究では、生合成上の重要中間体と位置づけられる CLA を合成することを目的としている。

【方法】市販の 2,6,6-trimethyl-1-cyclohexene-1-acetaldehyde (**1**)を出発原料とし、マロン酸エステルとの Knoevenagel 縮合を行うことで、化合物 **2** を得た。次に、化合物 **2** を選択的に還元させたのちにブロモラクトンを縮合させ、化合物 **3** を得た。最後に、化合物 **3** を文献既知の方法で加水分解し、目的化合物である CLA のラセミ体合成を達成した。



【結果】目的化合物である CLA の合成は達成されたが、還元および、ブロモラクトンとの縮合、加水分解に関して、収率が低いため、更なる反応条件の検討が必要である。

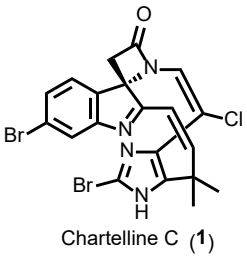
Carlactonic acid, Strigolactones

講演番号：1D4p03
講演日時：3 月 24 日 14:12～ 1 号館 D4 会場

Chartelline C の全合成研究
Synthetic Studies on Chartelline C

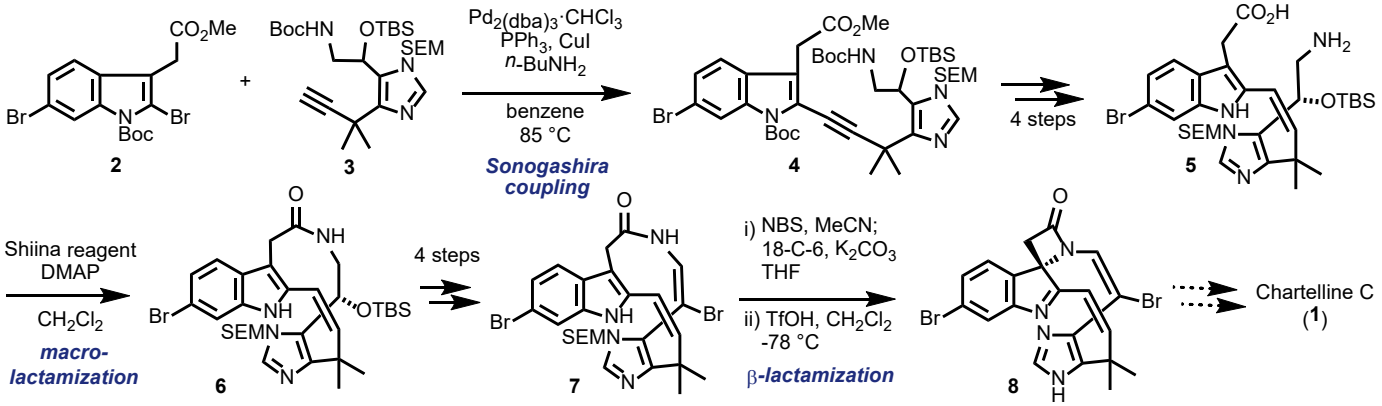
○中根 嘉祈、中崎 敦夫、西川 俊夫 (名大院生命農)
○Yoshiki NAKANE, Atsuo NAKAZAKI, Toshio NISHIKAWA (Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University)

【研究背景】 Chartelline C（**1**）は北海に生息するコケムシから単離、構造決定された天然有機化合物であり、単離されてから 30 年近くが経つにも関わらず、その生物活性は謎に包まれている [1]。**1** の未知の生物活性が明らかになれば、未だ謎が多いコケムシの生態への理解に繋がるほか、その活性がユニークであった場合には、創薬のリード化合物や研究用実験ツールとしての応用も期待できる。しかし、**1** が持つ他に類を見ない特異な構造がその化学合成を難しくしており、現在までにその全合成は 2006 年に Baran らによって報告されたラセミ合成 1 例に留まっている [2]。そこで我々は、**1** の未知の生物活性解明を目指し、**1** の新規合成法の開発に着手した。



Chartelline C (**1**)

【実験結果】 インドール酢酸誘導体 **2** とイミダゾール誘導体 **3** を薗頭カップリング反応によってアルキン **4** へと変換後、4 段階の反応を経てマクロラクタム前駆体 **5** を調製した。得られた **5** を用いてマクロラクタム化を種々検討した結果、椎名試薬による縮合反応の条件にて目的とする **6** を合成することに成功した。続いて、**6** の水酸基を脱水、臭素化してブロモエナミド **7** へと変換後、*β*-ラクタム化を種々検討した結果、Baran らと同様の条件にて*β*-ラクタムの構築に成功した [2]。現在までに、SEM 基を脱保護した **8** の合成まで完了しており、今後、ハロゲンを導入することで **1** の全合成を達成する計画である。



【参考文献】

1) U. Anthoni; L. Chevolot; C. Larsen; P. H. Nielsen; C. Christophersen, *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 4709.
2) P. Baran; R. A. Shenvi, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14028.

indole alkaloid, macrolactam, *β*-lactam

発表責任者：中根嘉祈（nakane.yoshiki@b.mbox.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：1D4p04
講演日時：3 月 24 日 14:23～ 1 号館 D4 会場

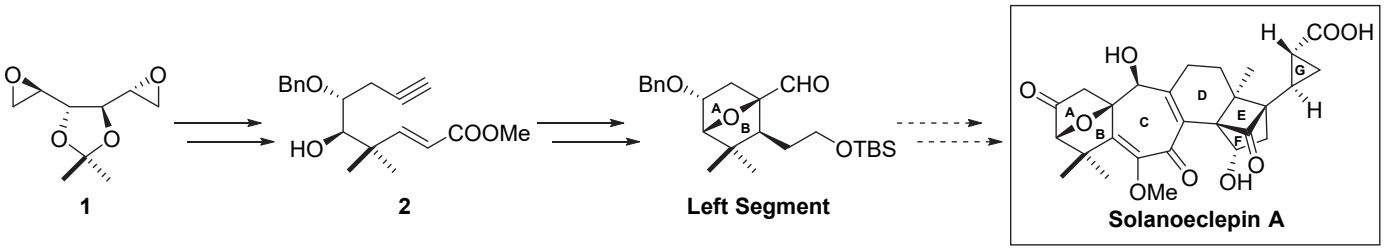
ジャガイモシスト線虫孵化促進物質ソラノエクレピン A 左側部分の合成研究

Synthetic Studies on Left Segment of Solanoeclepin A, a Hatching Agent of Potato Cyst Nematode

○立松 怜史、安立 昌篤、西川 俊夫 (名大院生命農)
○Satoshi TATEMATSU, Masaatsu ADACHI, Toshio NISHIKAWA (Nagoya University)

【目的】ソラノエクレピン A は、ジャガイモシスト線虫に対する孵化促進活性を持つ天然有機化合物であり、農薬の新規リード化合物として期待されている。しかし、天然から極微量しか得られないため、その生理活性の作用機構や構造活性相関は未だ明らかとなっておらず、化学合成による量的供給が必要とされている。我々は、収束的な合成法によってソラノエクレピン A を全合成するため、オキサビシクロ[2.2.1]ヘプタノン骨格を持つ左側部分とトリシクロ[5.2.1.$0^{1,6}$]デカン骨格を持つ右側部分を連結し、合成終盤で 7 員環(C 環)を構築する合成法を計画した。当研究室では、既に左側部分の合成に成功しているが [1]、酸化・還元や保護基の脱着に多段階を要することが問題であった。本研究では、より効率的な左側部分の合成を検討した。

【方法・結果】D-マンニトールから得られる既知のエポキシド **1** から、アセチレンの導入と不斉アルドール反応を含む数工程を経て不飽和エステル **2** を合成した。既に報告したラジカル環化反応とヨードエーテル化反応によって、オキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン骨格を持つ左側部分の合成に成功した。



1) Adachi, M.; Torii, M.; Nishikawa, T. *Synlett* **2015**, *26*, 965.

solanoeclepin A, natural product synthesis, oxabicyclo

発表責任者：安立昌篤（madachi@agr.nagoya-u.ac.jp）

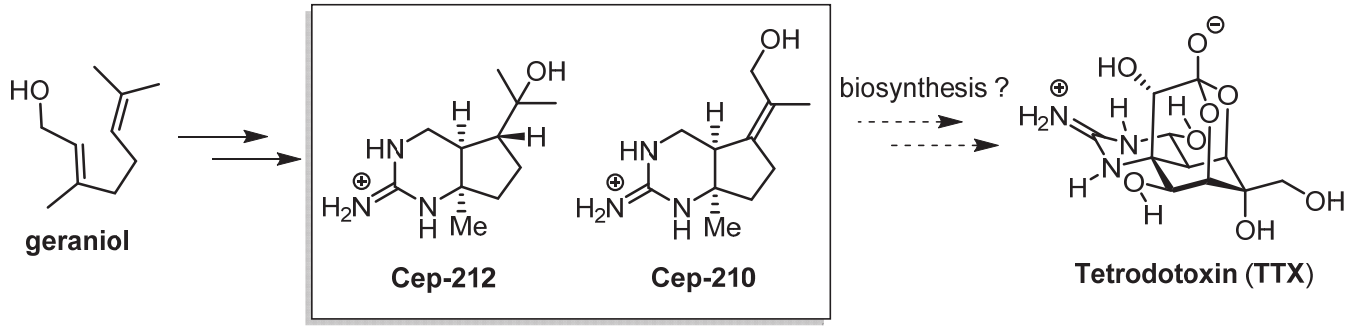
講演番号：1D4p05
講演日時：3 月 24 日 14:34～ 1 号館 D4 会場

テトロドトキシンの推定生合成中間体の全合成と絶対立体配置の決定
Total Syntheses and Determination of Absolute Configurations of Predicted Biosynthetic Intermediates of Tetrodotoxin

○宮坂 忠親[1]、安立 昌篤[1]、工藤 雄大[2]、杉本 敬太[2]、山下 まり[2]、西川 俊夫[1]([1]名大院生命農、[2]東北大院農)
○ Tadachika MIYASAKA[1], Masaatsu ADACHI[1], Yuta KUDO[2], Keita SUGIMOTO[2], Mari YAMASHITA[2], Toshio NISHIKAWA[1] ([1]Nagoya Univ. of Bioagric., [2]Tohoku Univ. of Agric.)

【目的】
フグ中毒の原因物質として知られるテトロドトキシン(TTX)は、電位依存性 Na^+チャネルに対する強力な阻害剤である。また、フグだけでなくイモリやカエル、タコなど様々な生物が保有していることが明らかとなっており、TTX の生合成研究の中で様々な TTX 類縁体が発見されたものの、現在もその生合成経路は未解明である。近年、東北大学の山下らは、オキナワシリケンイモリ(*Cynops ensicauda popei*)から環状グアニジン Cep-212 および Cep-210 を単離した[1]。これら二つの天然物は、その特徴的な構造から TTX の生合成中間体の可能性が指摘されている。しかし、単離された Cep-212 と Cep-210 の量は極僅かであり、また絶対立体配置が未決定である。そこで本研究では、化学合成による量的供給および絶対立体配置の決定を目的として、これらの合成を検討した。

【方法・結果】
ゲラニオールに対する Sharpless 不斉エポキシ化反応を足掛かりとして、Cep-212 および Cep-210 の不斉全合成を達成した[2]。また、同様の方法によって Cep-212 のエナンチオマーも合成した。Cep-212 の両エナンチオマーおよび天然物を化学誘導化し、キラル HPLC/MS を用いて絶対立体配置を決定した。



Reference
1) Kudo, Y.; Yotsu-Yamashita, M. *et al*. *Angew. Chem. Int. Ed*. **2016**, *55*, 8728.
2) 宮坂忠親、安立昌篤、杉本敬太、山下まり、西川俊夫、日本農芸化学会 2018 年度大会予稿集 3A16p05

tetrodotoxin, biosynthesis, chemical synthesis

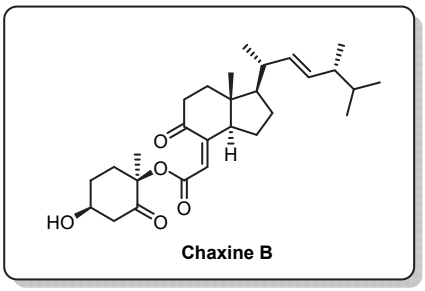
講演番号：1D4p06
講演日時：3 月 24 日 14:55～ 1 号館 D4 会場

Chaxine 類とその類縁体の合成研究

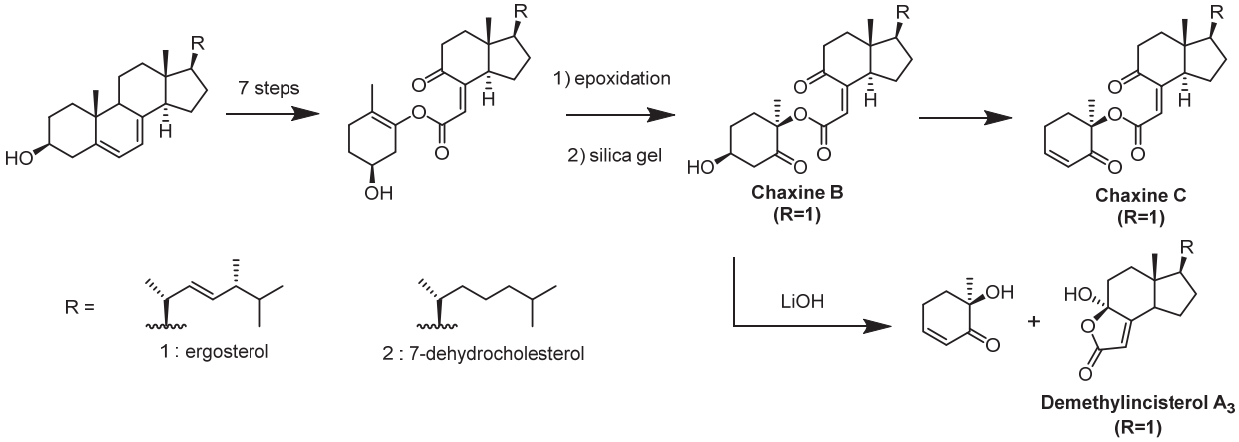
Scale up synthesis of Chaxine and its analogs

○二木 美咲[1]、平田 裕嗣[1]、中崎 敦夫[1]、呉 静[2]、河岸 洋和[2,3,4]、西川 俊夫[1] ([1]名大院生命農、[2]静大農・応生科、[3]静大・グリーン研、[4]静大院・創造)
○Misaki NIKI[1], Yushi HIRATA[1], Atsuo NAKAZAKI[1], Jing WU[2], Hirokazu KAWAGISHI[2,3,4], Toshio Nishikawa[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Grad. Sch. of Inte. Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [3]RIGST, Shizuoka Univ., [4]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ.)

【目的】Chaxine 類は、中国産食用キノコである茶樹茸から単離されたステロイド骨格を持つ天然物である[1)]。ステロイドの A 環部分と C 環部分がエステル結合によって連結した非常にユニークな構造を有している。当研究室では、2017 年に ergosterol を出発原料とした Chaxine 類の合成を報告した[2)]。これら合成化合物のキノコに対する活性試験を行ったところ、その中の一つがマツタケの菌糸の成長を促進させる効果を示すことがわかった。そこで本研究では、Chaxine 類のさらなる供給のために合成法を改良し、構造活性相関研究を目的として Chaxine 類縁体を合成した。



【方法・結果】各工程を大量合成に適したものへと改良を加えた結果、従来の 10 倍以上のスケールでの Chaxine 類の合成に成功した。更に Chaxine B を加水分解し、天然に存在する Demethylincisterol A_3 も得た。また、側鎖部分に関する構造活性相関を調べるため、ergosterol 類縁体で入手可能な 7-dehydrocholesterol を出発原料として各種類縁体(R=2)を合成した。



【参考文献】

1) Kawagishi, H. *et al. Tetrahedoron* **2009**, *65*, 9850.
2) Hirata, Y. *et al. Org. Lett.* **2017**, *19*, 560.

Chaxine, steroidal natural product, Scale up synthesis

講演番号：1D4p07
講演日時：3 月 24 日 15:06～ 1 号館 D4 会場

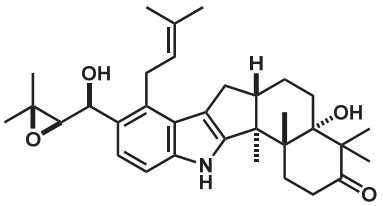
多環テルペンインドールの新合成法

A new synthetic route of polycyclic terpene indoles

○山口 将司、小野 義貴、樋口 恵子、杉野 公美、安立 昌篤、中崎 敦夫、西川 俊夫 (名大院生命農)
○Masashi YAMAGUCHI, Yoshiki ONO, Keiko HIGUCHI, Kumi SUGINO, Masaatsu ADACHI, Atsuo NAKAZAKI, Toshio NISHIKAWA (Nagoya Univ.)

【背景・目的】

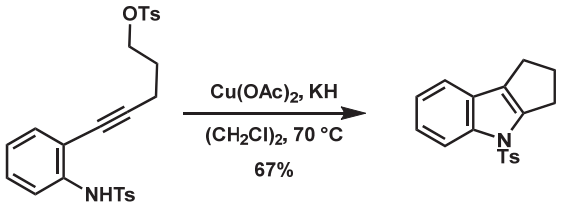
自然界には多くのテルペンインドールアルカロイド類が存在し、中でも、sespendole(**1**)などの多環インドール骨格を持った化合物は、そのユニークな構造的特徴と興味深い生物活性から注目を浴びている。しかし、これらの多環インドールアルカロイドの骨格合成法は極めて限られている。そこで、本研究では上記アルカロイドの収束的合成を可能にする多環インドール骨格の新たな合成ルートの開発を目的とした。



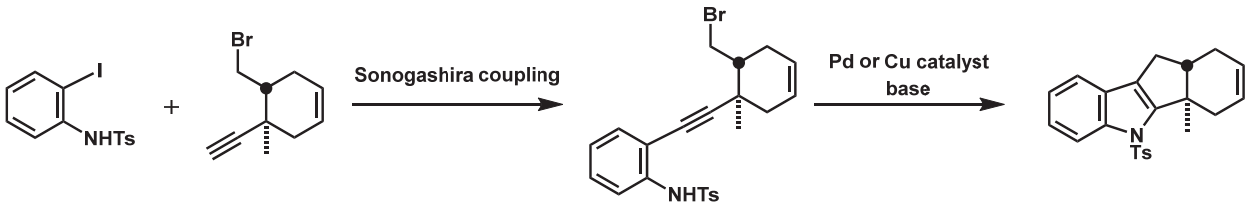
sespendole (1)

【方法・結果】

Hiroya らは、過剰量の強塩基存在下で銅触媒を作用させることで、N-Ts-アルキニルアニリド(**2**)から一段階で三環性のインドール化合物(**3**)を合成できると報告した [1] (Scheme 1)。この反応を参考にして、シクロヘキサンを有した基質の環化によって四環性化合物の合成を目指した。まず、N-Ts-ヨードアニリド(**4**)とシクロヘキサン骨格上に脱離基を有するアセチレン(**5**)の Sonogashira Coupling により、環化前駆体(**6**)を調製した。本化合物を用いて種々検討した結果、銅及びパラジウム触媒を用いると、望む連続環化反応が進行し、化合物(**7**)を与えることを見出した(Scheme 2)。現在、反応条件の最適化と基質一般性を調べている。



2 (Scheme 1) 3



4 5 6 7

(Scheme 2)

1)Hiroya, K.; Itoh, S.; Sakamoto, T. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 1126-1136.

natural product synthesis, polycyclic terpene indoles, cascade reaction

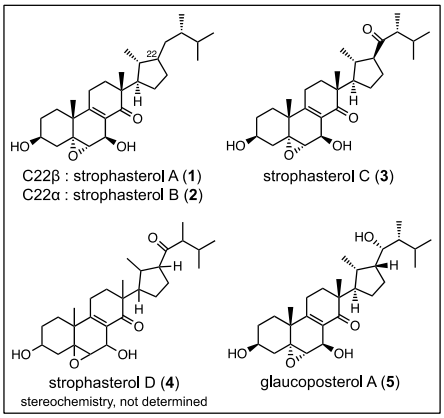
発表責任者：山口将司（yamaguchi.masashi@b.mbox.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：1D4p08
講演日時：3 月 24 日 15:17～ 1 号館 D4 会場

strophasterol C, D 及び glaucoposterol A の合成研究

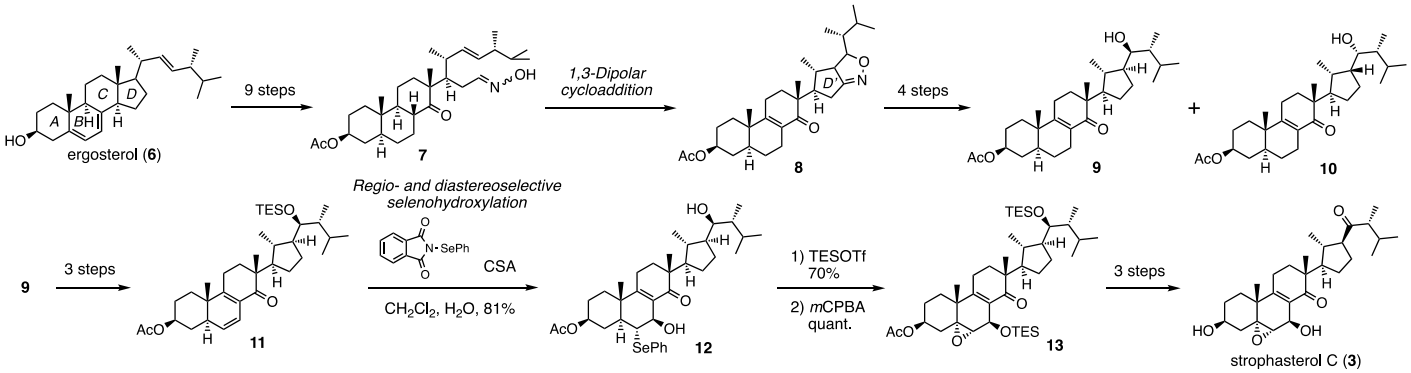
Synthetic studies on strophasterols C, D and glaucoposterol A

○佐藤 俊太郎、桑原 重文（東北大院農）
○SHUNTARO SATO, SHIGEFUMI KUWAHARA (Tohoku Univ. of Agric.)



【背景】 Strophasterol A-D (**1-4**) はサケツバタケ (*Stropharia rugosoannulata*)から、glaucoposterol A (**5**)はアオアシフウセンタケ (*Cortinarius glacopus*)から単離された新規ステロイド誘導体である[1,2,3]。**1** はキノコ子実体形成誘導活性を示し、分類学的に異なる 82 種類のキノコにおける内在が確認されたことから、世界初のキノコホルモンである可能性が示唆されている (**2-5** の生物活性は不明)。我々は **1-5** の量的供給の実現と、詳細な活性評価の実施を目的として合成研究を行っており、これまでに **1** 及び **2** の合成が完了している[4]。

【方法・結果】 昨年度大会では、出発原料である ergosterol (**6**)から、ニトリルオキシドの分子内 1,3-双極子環化付加反応を含む 14 工程を経て **9** 及び **10** を合成したことを報告した。今回我々は、中間体 **9** から strophasterol C (**3**)の合成を達成した。すなわち、**9** に対して B 環に官能基修飾を施し、ジエン **11** へ導いた。**11** に対するセレノヒドロキシ化反応は位置及び立体選択的に進行し、**12** を 81%の収率で得た。その後 2 つのヒドロキシ基を保護した後に、*m*CPBA を作用させると、セレノキシドの脱離と立体選択的なエポキシ化が一挙に進行し、**13** を高収率で得ることができた。最後に側鎖のヒドロキシ基の酸化と脱保護を行うことで **3** の初の合成を達成した。現在は中間体 **10** から立体化学が未決定である **4** の合成と立体化学の決定に取り組んでいる。



1) H. Kawagishi, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10820. 2) J. Wu, *et al., Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2013**, *77*, 1779. 3) H. T. Aung, *et al.*, *Chem. Biodivers.* **2017**, *14*, e1600421. 4) S. Sato, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 10911.

total synthesis, strophasterol, mushroom

発表責任者：佐藤俊太郎（syuntarou.satou.r8@dc.tohoku.ac.jp）

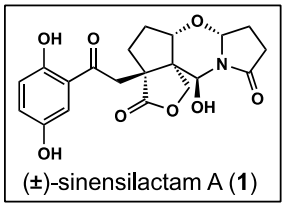
講演番号：1D4p09
講演日時：3 月 24 日 15:28～ 1 号館 D4 会場

Sinensilactam A の全合成

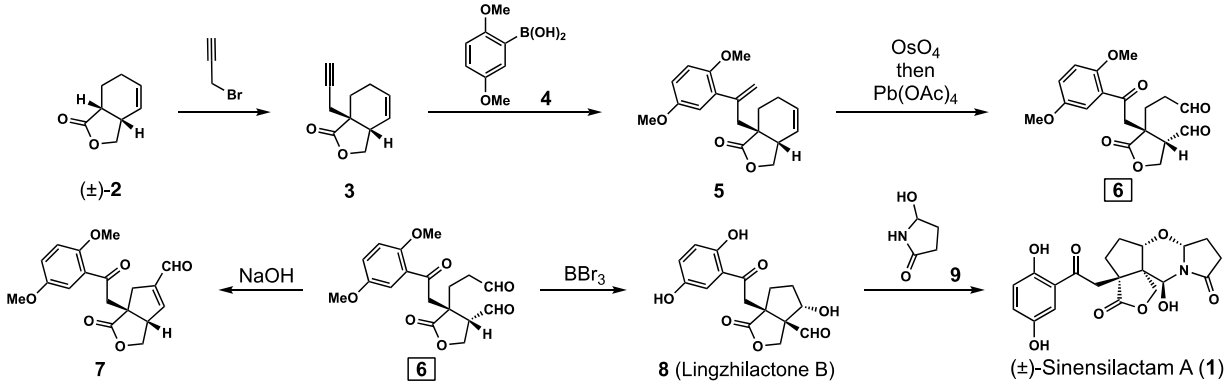
Total synthesis of Sinensilactam A

○小宅 真理、佐藤 俊太郎、小倉 由資、桑原 重文（東北大院農）
○Mari OYAKE, Shuntaro SATO, Yusuke OGURA, Shigefumi KUWAHARA (Tohoku Univ.)

【背景】(±)-Sinensilactam A (**1**)は、2015 年 Cheng らによって、マンネンタケ科のキノコである *Ganoderma Sinensis* より単離、構造決定されたメロテルペノイドである。**1** は腎線維症等の疾患に関与しているタンパク質、Smad 3 のリン酸化を阻害する [1)]。また構造的特徴として、天然物では類を見ないピロロオキサジン構造を含む 5/5/6/5 四環性縮環構造と、5 つの不斉点を有しており、有機合成化学的にも挑戦的な化合物である。本研究では興味深い活性と特異な骨格を有する **1** の効率的な全合成を目指した。



【方法・結果】我々は、単離者によって提唱されている予想生合成中間体 **8** を経由した合成計画を立案し合成に着手した。すなわち、既知化合物であるラクトン (±)-**2** を出発原料として、まずプロパルギルブロミドを用いたアルキル化によって、アルキン **3** を得た。その後、**3** とボロン酸 **4** をパラジウムによるカップリング反応に付し **5** を調製した。次に四酸化オスミウムを用いて **5** の 2 箇所の二重結合をジオール化した後、ワンポットで四酢酸鉛を加えることで、ケトジアール **6** へと導いた。続いて **6** の位置選択的な分子内アルドール反応を種々検討した。その結果、水酸化ナトリウムを用いた塩基性条件下では、望まない位置でアルドール反応が進行し、脱水まで起こった **7** が得られたが、三臭化ホウ素を用いてルイス酸条件に付すと、望みの位置で反応が進行し、同時に脱メチル化も起こって一挙に **8** が得られることを見出した。最後に **8** と既知のラクタム **9** を縮合することで、(±)-**1** の合成を達成した。今後は各工程の収率向上を目指すとともに、不斉合成へと展開する予定である。



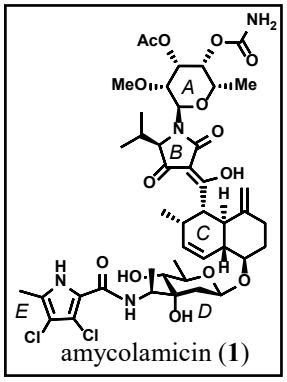
1) Yong-Xian Cheng,*et al.*,*Org. Lett.* **2015**,*17*, 1516–1568.

total synthesis, Smad 3, meroterpenoid

講演番号：1D4p10
講演日時：3 月 24 日 15:39～ 1 号館 D4 会場

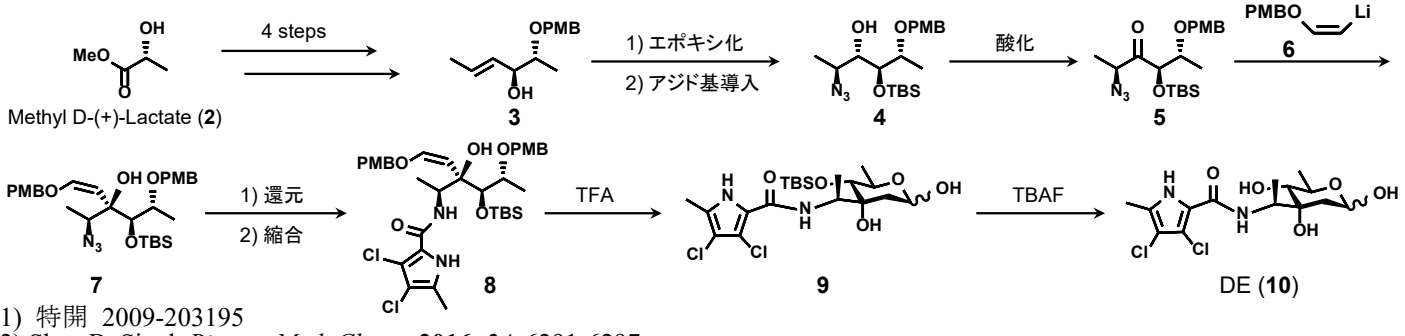
Amycolamicin の DE ユニットの合成
Synthesis of the DE unit of amycolamicin

○目黒 康洋、小倉 由資、桑原 重文（東北大院農）
○yasuhiro meguro, yusuke ogura, shigefumi kuwahara (Tohoku Univ. Grad. Sch. Agric.)



【背景】amycolamicin（**1**）は希少放線菌 *Amycolatopsis*sp.MK575-fF5 および *Kibdelosporangium*sp.MA7395が生産する抗生物質でありメチシリン耐性黄色ブドウ球菌, バンコマイシン耐性腸球菌を始め極めて広範なグラム陽性・陰性の薬剤耐性菌に対して強力な抗菌作用を示す[1]。**1**の標的タンパク質は、細菌のDNA合成必須酵素であるDNA gyraseのGyrB subunit及びtopoisomerase IVのParE subunitでありながら、ヒトのtopoisomerase IIは阻害せず、マウスに対する急性毒性も無い。作用機序的にも新規であり、新たな抗生物質リードとして大きな注目を集めている[2]。また、amycolamicinは2つの新規単糖ユニットを含む過去に類例の無いハイブリッド型化学構造であり、有機合成化学的見地からも近年稀に見る挑戦的な合成標的である。構造活性相関を含めて，有機合成化学的アプローチは皆無である。我々は、各種誘導体の合成にも柔軟に対応できる収束的合成経路を開拓して**1**の初の全合成に挑む。本発表では、**1**のDEユニットの合成について報告する。

【結果】D-乳酸メチルを出発原料として既存の合成手法を用い、4工程にてアリルアルコール**3**を調整した。更に、Sharpless不斉エポキシ化および位置選択的アジド基の導入により**4**に導いた。**4**をDess-Martin酸化により**5**に変換後、ビニルリチウム**6**との付加反応に付したところ、反応はジアステレオ選択的に進行し、**7**を単一立体異性体として与えた。更に、アジド基の還元と予め調製したピロールカルボン酸ユニットとの縮合反応によりアミド**8**を得た。**8**をトリフルオロ酢酸（TFA）で処理することで2つのPMB基を脱保護し、一挙に糖骨格を有する**9**へと導いた。最後にTBAFによるTBS基の除去によりDEユニット（**10**）の合成を完了した。



1) 特開 2009-203195
2) Sheo B. Singh *Bioorg. Med. Chem.*, **2016**, *24*, 6291-6297

Natural product, Synthetic organic chemistry, sugar chemistry

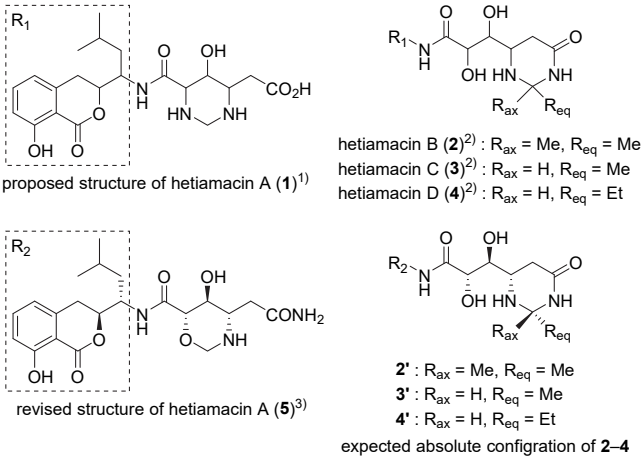
講演番号：1D4p11
講演日時：3 月 24 日 16:00～ 1 号館 D4 会場

Hetiamacin A-D の全合成

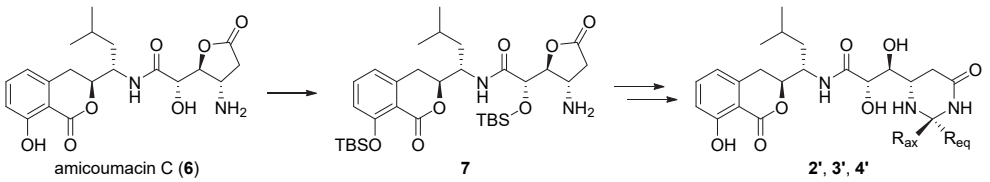
Total synthesis of hetiamacins A-D

○塚口 頌悟、十和田 諒、小倉 由資、榎本 賢、桑原 重文（東北大院農）
○Shogo Tsukaguchi, Ryo Towada, Yusuke Ogura, Masaru Enomoto, Shigefumi Kuwahara (Tohoku Univ.)

【背景】hetiamacin A (**1**)は2013年に、hetiamacin B–D (**2**–**4**)は2016年にSunらによって真正細菌 *Bacillus subtilis* PJS から単離された新規アミクマシン型天然物であり、HeLa 細胞に対する細胞毒性や抗 MRSA 活性を有する [1,2]。本化合物群はアミクマシン型天然物に共通するジヒドロイソクマリン部位と異常アミノ酸とがアミド結合で連結した構造を有し、特に **1** はヘキサヒドロピリミジン環、**2**–**4** はテトラヒドロ-4-ピリミジノン環という天然物には珍しい構造単位を含むことが提唱された。その後 2018 年に、単離者らにより hetiamacin A の構造が **1** から **5** (立体化学を含む)へと訂正されたが [3]、hetiamacin B–D の立体化学は未だ決定されていない。そこで我々は、hetiamacin B–D の全合成と立体化学の決定を目的に合成研究に着手した。



【方法･結果】これまで単離報告されてきたアミクマシン型天然物の立体化学と単離文献の NMR データの解析により **2**–**4** の立体化学をそれぞれ **2'**–**4'** と予想した。昨年度大会で我々は中間体である amicoumacin C (**6**) (下図)の改良合成法を確立し、**6** の官能基変換による **5** の全合成を報告した。今回は同様の手法に基づき、**6** に対する種々の官能基変換を行うことで **2'**–**4'** の全合成を目指した。出発原料である L-アスパラギン酸より 9 工程で調製した **6** の水酸基を TBS 基で保護し **7** を得た。その後アンモニアを用いた五員環ラクトンの開環と *N*,*N*-アセタール環の構築、脱保護を行うことで、**2'** と **4'** の全合成を達成した。天然の hetiamacin B, D がそれぞれ **2'**, **4'** と同一の NMR を示したことから、天然物の立体化学を決定した。現在 hetiamacin C の立体化学決定に向け、**3'** の合成を行っている。



1) C. Sun *et al*., *J. Antibiot*. **2013**, *66*, 281. 2) C. Sun *et al*., *J. Antibiot*. **2016**, *69*, 769.
3) C. Sun *et al*., *Org. Lett*. **2018**, *20*, 3566.

total synthesis, structure determination, amicoumacin

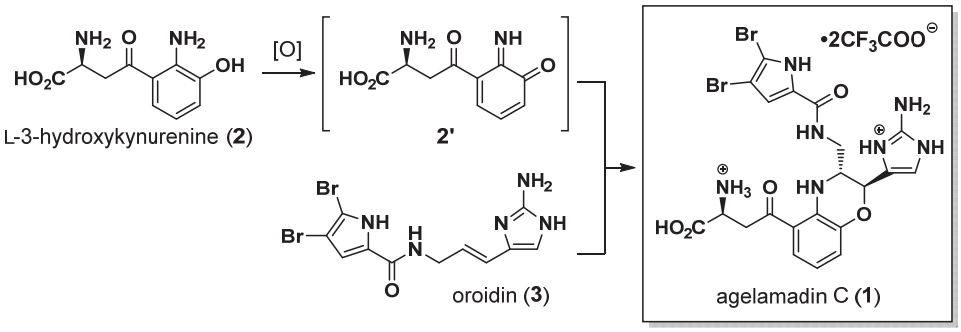
講演番号：1D4p12
講演日時：3 月 24 日 16:11～ 1 号館 D4 会場

推定生合成経路に基づく Agelamadin C の合成研究

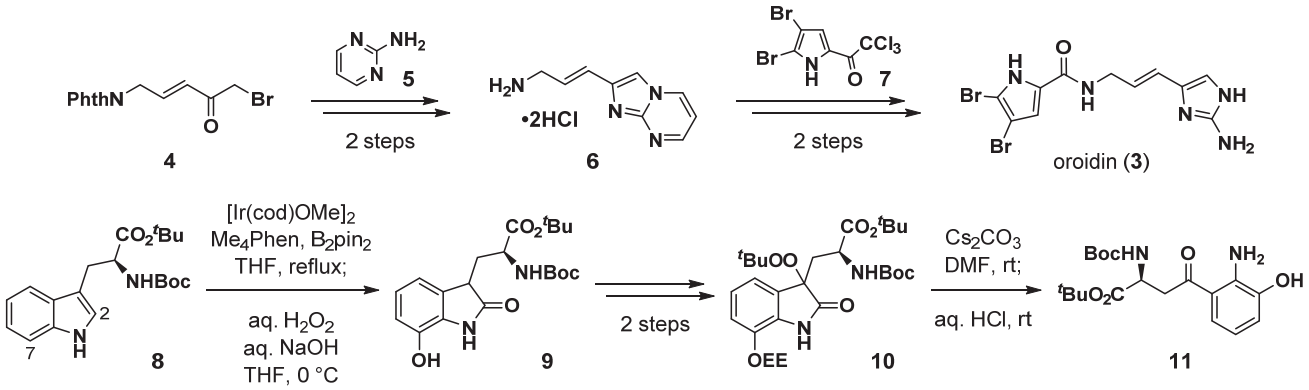
Synthetic study of agelamadin C based on proposed biosynthesis

○高橋 和暉、桑原 重文、榎本 賢（東北大農）
○Kazuki TAKAHASHI, Shigefumi KUWAHARA, Masaru ENOMOTO (Tohoku Univ.)

【目的】Agelamadin C (**1**)は、2014 年に Kobayashi らにより海綿 Agelas sp.から単離されたブロモピロールアルカロイドであり、L-3-hydroxykynurenine 酸化体 **2'** と oroidin (**3**)が Diels–Alder (D–A)反応により連結したと予想されるハイブリッド構造を有する [1]。このようなオルトアザキノンを基質とした D–A 反応による生合成は類例に乏しく、これまでほとんど研究が行われていない。そこで **2'** および **3** を調製し、分子間 D–A 反応による **1** の全合成を目指すとともに、生合成に関する知見を得ることとした。



【方法・結果】まず、既知のα-ブロモケトン **4**[2]から 2-アミノイミダゾール部位とジブロモピロール部位の導入を含む 4 工程により、**3** の改良合成を行った。続いて **2** の調製に着手した。L-トリプトファン保護体 **8** を 2 位および 7 位のホウ素化/酸化により **9** としたのち、Stoltz らによる手法 [3]を基に過酸化物 **10** を経由してオキシインドール環を開裂することで L-3-hydroxykynurenine 保護体 **11** を得た。現在、**11** をモデル基質として酸化/D–A 反応の最適条件を検討中である。



1) J. Kobayashi *et al.*, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 5176. 2) T. L. Little and S. E. Webber, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 7299.
3) B. M. Stoltz *et al.*, *Org. Lett.* **2017**, *19*, 988.

Total synthesis, Biomimetic synthesis, Hybrid natural products

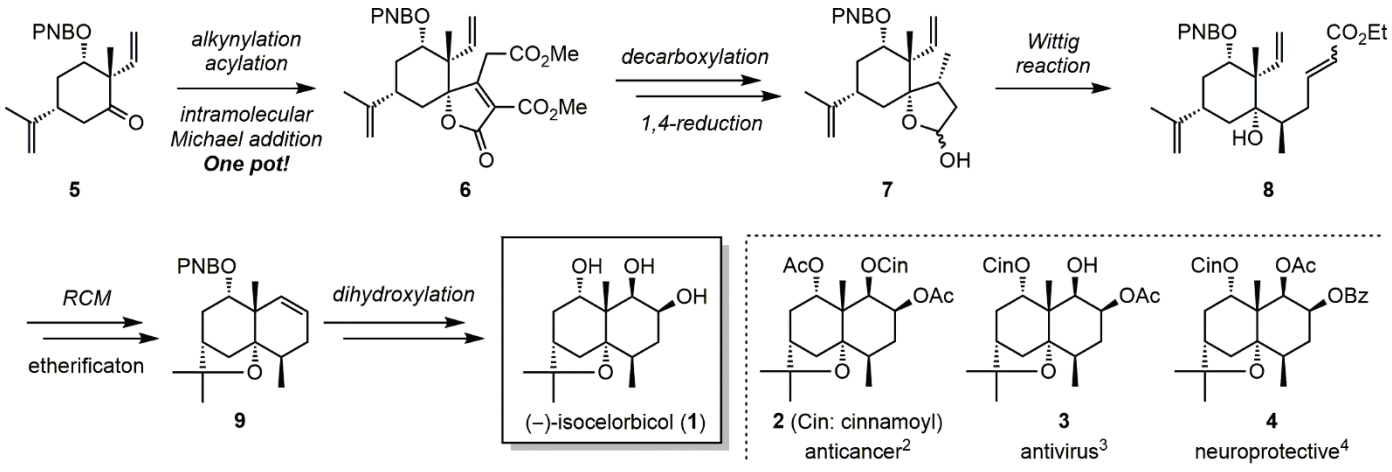
講演番号：1D4p13
講演日時：3 月 24 日 16:22～ 1 号館 D4 会場

(-)-Isocelorbicol および関連天然物の高立体選択的合成研究

Highly Stereocontrolled Synthetic Study of (-)-Isocelorbicol and The Related Natural Products

○毛利 朋世[1]、高橋 祐介[1]、權 垠相[2]、桑原 重文[1]、小倉 由資[1] ([1]東北大院農、[2]東北大院理)
○Tomoyo MOHRI[1], Yusuke TAKAHASHI[1], Eunsang KWON[2], Shigefumi KUWAHARA[1], Yusuke OGURA[1] ([1]Graduate School of Agricultural Science, Tohoku Univ., [2]Graduate School of Science, Tohoku Univ.)

【目的】(–)-Isocelorbicol (**1**)は 1976 年に Smith らによってニシキギ科の植物であるツルウメモドキ(*Celastrus orbicrutus*)の種子油けん化物より単離・構造決定されたジヒドロ-β-アガロフラン骨格を有するセスキテルペンであり、密集した 7 つの不斉炭素を有する[1]。本化合物の生物活性は不明だが、その 3 つの水酸基が種々のカルボン酸とのエステルになった天然物には抗がん活性 (**2**)、抗ウイルス活性 (**3**)、神経保護作用 (**4**)など多様な生理活性が報告されている[2-4]。そのため **1** とその関連天然物は医薬開発の起点となり得る化合物として多くの注目を集めている[5]。そこで我々は同骨格を有する天然物の効率的かつ高立体選択的な合成手法の確立と、その量的供給を目的として本研究に着手した。
【方法・結果】前年度大会にて我々は **1** の高立体選択的な全合成の達成を報告した。しかしその合成経路ではスピロラクトン形成時に 6-*endo-dig* 型閉環が、Wittig 炭素鎖延長の際に Grob 開裂が副反応として起こり、大幅な収率低下をもたらした。今回我々は、**5** に対する求核剤としてプロピオール酸メチルを用いることで前者の問題を解決するとともに、**6** へのワンポット・高収率変換を実現した。また、**7** から **8** への変換に安定イリドを用いることで後者の問題も解決した。不飽和エステルに対する RCM 反応は前例がなかったが、**8** の RCM は減圧下で行うことで円滑に進行し、**9** を経て、**1** の改良合成を達成した。現在、生物活性を有する天然物 **2-4** への変換を検討中である。



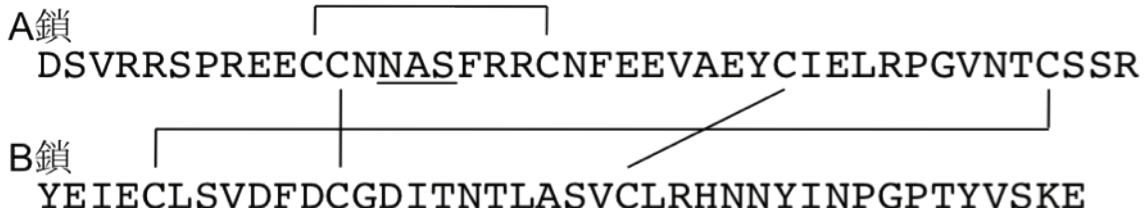
1) Smith, C. R., Jr. *et al*., *J. Org. Chem*. **1976**, *41*, 3264. 2) Zhao, W. *et al*., *J. Nat. Prod*. **2008**, *71*, 1005. 3) Ohshima, S. *et al*., *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 815. 4) Zhao, W. *et al*., *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 2175. 5) Gao, J. M. *et al*., *Nat. Prod. Rep*. **2007**, *24*, 1153.

total synthesis, terpene, dihydro-ß-agarofuran

講演番号：1D4p14
講演日時：3 月 24 日 16:33～ 1 号館 D4 会場

オニテナガエビ *Macrobrachium rosenbergii* のインスリン様造雄腺因子の化学合成
Chemical synthesis of insulin-like androgenic gland factor from the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*
○片山 秀和（東海大工・生命化学）
○Hidekazu KATAYAMA (School of Engineering, Tokai Univ.)

【背景・目的】
甲殻類のオスへの性分化は、オス特有の性ホルモンである造雄腺ホルモンによって誘導されることが知られており、十脚目甲殻類（エビ・カニ類）では、インスリン様造雄腺因子（Insulin-like androgenic gland factor、IAG）が造雄腺ホルモンであると考えられている。テナガエビ科動物の IAG は、他の一般的なインスリン様ペプチドとは異なり、分子内に 4 対のジスルフィド結合が存在している。オニテナガエビ *Macrobrachium rosenbergii* の IAG では、A 鎖内に N-結合型糖鎖付加モチーフが存在していることから糖ペプチドであると推定されている。2017 年の本大会において、同様に 4 対のジスルフィド結合を有するイソスジエビ *Palaemon pacificus* の IAG の化学合成を報告したが、イソスジエビ IAG には糖鎖結合モチーフが存在していない。本研究では、イソスジエビ IAG の合成法が糖ペプチドの合成にも適用可能であるかを検証することを目的とし、オニテナガエビ IAG の化学合成を試みることにした。
【方法・結果】
A 鎖および B 鎖を常法であるペプチド固相合成法によって調製した。その際、ジスルフィド結合を位置選択的に形成できるよう、Cys 残基側鎖保護基として、Trt 基、MeOBn 基、Acm 基ならびに Bu^t 基を使用した。また、N 結合型糖鎖付加部位である Asn には、TFA によって簡便に脱保護可能な保護基を有する Asn(GlcNAc)誘導体を使用した。得られた A 鎖および B 鎖に順次ジスルフィド結合を位置選択的に形成することにより、収率は十分でないものの、目的とする IAG を得ることに成功した。本発表では、その詳細について報告する。



図．オニテナガエビ IAG の構造．下線は N 結合型糖鎖付加モチーフを示している．

glycopeptide, insulin-like androgenic gland factor, *Macrobrachium rosenbergii*

発表責任者：片山　秀和（katay@tokai-u.jp）

講演番号：1D4p15
講演日時：3 月 24 日 16:44～ 1 号館 D4 会場

ComXnatto フェロモンの合成
Synthesis of ComXnatto Pheromone
○岡田 正弘（神奈川大工）
○Masahiro OKADA (Kanagawa University)

納豆菌由来の ComXnatto フェロモンは、Lys-Trp-Pro-Pro-Ile-Glu のアミノ酸配列を有し、N 末端から 2 番目のトリプトファン残基が翻訳後修飾により環化を伴うファルネシル化を受けた修飾ヘキサペプチドである (図 1)。この ComXnatto フェロモンは、納豆菌のクオラムセンシングフェロモンとして、納豆のネバネバの原因物質であるポリガンマグルタミン酸の生産を誘導する。

以前、我々は液相および固相ペプチド合成法により ComXnatto フェロモンを化学合成し、合成 ComXnatto フェロモンを用いて、納豆菌におけるポリガンマグルタミン酸の生産誘導活性を調べた結果、ComXnatto フェロモンの添加濃度が 1 nM 以上の場合に、納豆菌のポリガンマグルタミン酸の生産量の増加が観測された。そこで今回は構造活性相関研究を行い、活性発現と修飾トリプトファン残基の相関を明らかにすることにした。

まずは、以前の合成法では反応収率や回収率が低かったところをいくつか改良し、安定的に供給できるようにしたので、そうした ComXnatto フェロモンの化学合成を中心に発表を行うことにする。

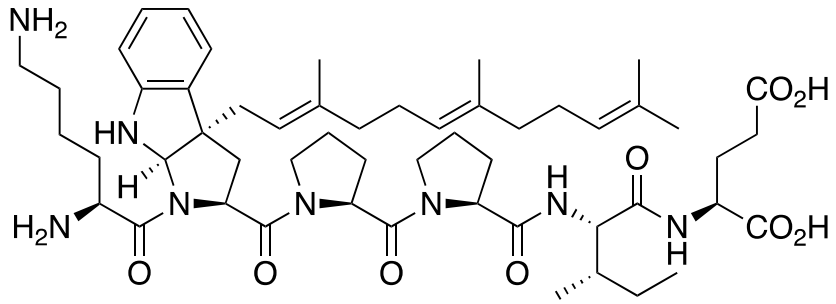


図 1. ComXnatto フェロモンの化学構造

quorum sensing, post-translational modification, isoprenylation

発表責任者：岡田正弘（okada@kanagawa-u.ac.jp）

講演番号：1D5a02
講演日時：3 月 24 日 09:11～ 1 号館 D5 会場

ワラジムシ由来の防御物質キナルジン酸誘導体の同定と生物活性評価
Identification and biological activity evaluation of quinaldic acid derivative as defense substance in Isopoda

○永井 禎己[1]、石丸 善明[1]、唐澤 重孝[2]、清水 伸泰[1] ([1]京都学園大学、[2]鳥取大学)
○Yoshiki Nagai[1], Yoshiaki Ishimaru[1], Shigenori Karasawa[2], Nobuhiro Shimizu[1] ([1]Kyoto Gakuen Univ., [2]Tottori Univ.)

【目的】

節足動物は捕食者から身を守るための防御機構を備えている。例えばカメムシは特有の匂いを放出することで敵を忌避させる化学的防御が、ダンゴムシは身を丸めることで敵の攻撃から逃れる物理的防御などが知られている。甲殻類ワラジムシ亜目ワラジムシ *Porcellio scaber* をピンセットで強く刺激すると、尾肢からは強い粘性を示すタンパク質が、外側板からは粘性の低い低分子化合物が分泌される。よってワラジムシは捕食者に対する化学的防御としてこれらの物質群を利用していることが推察される。本研究では外側板分泌物に注目して、低分子化合物の同定と化学生態学的な機能を明らかにすることを目的とした。

【方法と結果】

外側板分泌物をジクロロメタンで抽出し、GC-MS で分析した結果、保持時間 15.5 分付近に特徴的なピークを検出した。マススペクトルより本化合物は分子イオン（M+）を *m/z* 203 に認める含窒素化合物であると推測できた。フラグメンテーションからキノリン骨格を有するキナルジン酸誘導体であることが示唆された。NMR を測定するだけのサンプル量が得られなかったため、候補物質として挙げた methyl 3-hydroxyquinoline-2-carboxylate (1)を合成することで天然物の同定を行うこととした。化合物 1 は 2 段階で合成した。出発原料の 2-aminobenzaldehyde に methyl bromopyruvate と pyrrolidine を反応させてアミノ化キナルジン酸メチルを得た。次に、酸性条件下で亜硝酸ナトリウムと反応させた後、硫酸で処理することで目的物 1 を合成した。合成品はワラジムシ由来の分泌物と GC 保持時間およびマススペクトルが一致した。

アリに対する防御効果を試験したところ、殺虫効果は認められなかったものの、ろ紙接触法では予備試験レベルながら忌避効果を認めた。現在、忌避試験を継続中であり、化合物 1 の化学生態学的な機能をこれらの結果から考察したい。

defense substance, quinaldic acid derivative, Isopoda

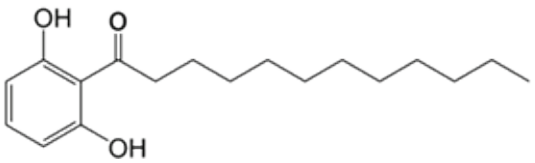
発表責任者：清水伸泰（shimizu@kyotogakuen.ac.jp）

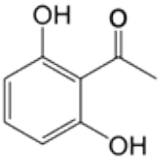
講演番号：1D5a03
講演日時：3 月 24 日 09:22～ 1 号館 D5 会場

シキミグンバイ若虫分泌物とその類縁体の抗菌活性評価
Antibacterial activity evaluation of the exocrine secretions in the nymphs of*Stephanitis svensoni* and these analogs
○高原 千尋、清水 伸泰（京都学園大院バイオ環境）
○Chihiro Takahara, Nobuhiro Shimizu (Kyoto Gakuen Univ.)

放線菌や真菌からは実に多くの生理活性物質が見つかっており、抗菌活性物質探索も土壌中の放線菌を主な探索源として進められてきた。その中には医薬品や農薬として実用化されているものも少なくないが、今後さらに土壌から新規骨格の抗菌活性物質を発見することは難しいと言われている。全生物の半数以上を占めると言われる昆虫では、生物間相互作用と関連付けられてさまざまな二次代謝物が同定されている。当研究室では昆虫を含む節足動物全般を未利用資源と捉え、有用な生理活性物質の探索研究を進めている。その中で本研究では、昆虫の外分泌物の抗菌活性について検討した。

シキミの吸汁性害虫であるシキミグンバイ *Stephanitis svensoni*（カメムシ目グンバイムシ科）の若虫分泌物に 1-(2,6-dihydroxyphenyl)dodecan-1-one （1）をはじめとする抗菌活性を示す物質を認めた。[1)] ペーパーディスク法で試験を行ったところ、化合物 1 は大腸菌と黄色ブドウ球菌に対して 30 µg の処理量で抗菌活性を示したが、この化合物より側鎖が短い 2,6-dihydroxyacetophenone （2）では 30 µg の処理量で活性が認められなかった。活性の強さに側鎖の長さが関係していると考え、炭素鎖長を変えた類縁体を種々合成し、抗菌活性評価を行った。[2)] 合成した類縁体の炭素鎖長はそれぞれ 6、8、10、14 とした。合成については 1,3-cyclohexadiketone と任意の炭素鎖のカルボン酸無水物を反応させてらエノールエーテルとした後、転移反応と不飽和化を経て目的物を得た。300 µg の処理量ではこれらの化合物すべてに大腸菌及び黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性が認められた。30 µg の処理量では両菌に対して炭素鎖長 6、8、10 の類縁体が抗菌活性を示した。さらに、化合物 1 の置換基の位置と抗菌活性の構造活性相関も併せて検討した。1-(2,4-dihydroxyphenyl)dodecan-1-one は 300 µg の処理量で黄色ブドウ球菌にのみ抗菌活性を示したことから、置換基の位置を変化させると著しく抗菌活性が低下することが分かった。現在、さらに類縁体の合成を進めるとともに、前述の化合物について最小発育阻止濃度の測定を行っている。

1 

2 

１）日本農芸化学会 2018 年(平成 30 年)大会〔名古屋〕
２）日本環境動物昆虫学会創立 30 周年記念大会

Antibacterial compound, Stephanitis svensoni, Tingidae

発表責任者：清水伸泰（shimizu@kyotogakuen.ac.jp）

講演番号：1D5a04
講演日時：3 月 24 日 09:33～ 1 号館 D5 会場

ヒキガエルが持つステロイド毒 bufadienolide 類の化学分析
Chemical analysis of bufadienolides in Japanese toad
○井上 貴斗[1]、氏家 里奈子[2]、吉永 直子[2]、森 哲[3]、森 直樹[2] ([1]京大農、[2]京大院農、[3]京大院理)
○Takato Inoue[1], Rinako Ujiie[2], Naoko Yoshinaga[2], Akira Mori[3], Naoki Mori[2] ([1]Kyoto Univ. of Agric, [2]Kyoto Univ. of Agric.Grad.Sch, [3]Kyoto Univ. of Sci.Grad.Sch)

[背景と目的]
日本に生息するヤマカガシ (*Rhabdophis tigrinus*) は, 捕食時に用いるタンパク毒とは別に, 首の後ろにある頸腺に毒液を蓄積し, 天敵に対する防御に役立てている. この毒液の主成分は bufadienolide と呼ばれる強心性ステロイドで, ヤマカガシはこの化合物を餌であるヒキガエル (*Bufo japonicus*) から摂取して蓄積しており, その bufadienolide 類の組成は地域や個体により多様である. 本研究ではヤマカガシの bufadienolide 類の多様性が毒源のヒキガエルに由来するのかどうかを解明するための第一段階として, 日本各地のヒキガエルの bufadienolide 類の多様性を調べた.

[方法と結果]
日本各地で採集したヒキガエル (*N=72*) の耳腺蓄積液を MeOH で抽出し, その粗抽出物を LC-MS で分析した. その結果,分子量と UV スペクトルから bufadienolide 類であると考えられる化合物を多数検出した. それらの中から地域共通性の高い bufadienolide が 6 つ検出された. その内 $[M+H]^+$ = 445 の化合物を Sep-Pak C18 及び HPLC を用いて精製し, 各種 NMR による構造解析を行った結果, 既知化合物 bufotalin であることが明らかになった. また, 採取地域を青森, 山形/秋田, 北関東, 関東, 長野, 近畿北陸, 京都, 伊島, 島根/広島, 九州, 五島列島, 屋久島の 12 地域に分け, これらを bufadienolide 類の組成で分類することを試みた. Bufadienolide 組成の類似度を客観的な手法で定義し, 各地域間の類似度を算出した. その類似度から各地域の「異なり度合い」を NMDS (非計量多次元尺度構成法) プロットで表したところ, 日本の東側と西側のヒキガエルでは bufadienolide 類の組成が大きく異なり, さらにそれぞれの郡内でも多様であった。このプロットを用いて各地域サンプルの bufadienolide 組成をより詳細に確認した結果, 地域特異的 bufadienolide を多数検出した.

Bufadienolides, Bufo japonicus, Chemical analysis

発表責任者：井上　貴斗（chem-riku.it@outlook.jp）

講演番号：1D5a05
講演日時：3 月 24 日 09:44～ 1 号館 D5 会場

ヤマカガシ属ヘビ *Rhabdophis pentasupralabialis* が蓄積する毒性ステロイド bufadienolide の由来

The origin of the defensive steroids sequestered in a Chinese snake *Rhabdophis pentasupralabialis*

○氏家 里奈子[1]、竹内 寛彦[2]、城野 哲平[3]、チェン チン[4]、ディン リー[4]、タン イェチョン[4]、ツァイ テインシュン[5]、ツァオ チェンチャン[6]、アラン サビツキー[7]、油屋 駿介[1]、青木 航[1]、吉永 直子[1]、森 哲[8]、森 直樹[1] ([1]京都大農、[2]日本大生物資源、[3]琉球大熱生研、[4]成都生物研、[5]ピントン科技大、[6]楽山師範大、[7]ユタ大、[8]京大理)

○Rinako UJIIE[1], Hirohiko TAKEUCHI[2], Teppei JONO[3], Qin CHEN[4], Li DING[4], Yezhong TANG[4], Tein-Shun TSAI[5], Chengquan CAO[6], Alan SAVIZTKY[7], Shunsuke ABURAYA[1], Wataru AOKI[1], Naoko YOSHINAGA[1], Akira MORI[8], Naoki MORI[1] ([1]Kyoto Univ. Grad. Sch. Agri., [2]Bioresource Sci., Nihon Univ., [3]TBRC Univ. of the Ryukyus, [4]CIB, [5]Pingtung Univ. of Sci and Tech., [6]Leshan Normal Univ., [7]Utah State Univ., [8]Kyoto Univ. Grad. Sch. Sci.)

[背景と目的]

日本に生息し、有鱗目ナミヘビ科ヤマカガシ属に分類されるヤマカガシ *Rhabdophis tigrinus* は，カエル類を主食とし、なかでもヒキガエルから強心性ステロイド bufadienolide を摂取し，防御用に蓄積する．一方，中国の同属のヘビ，*R. pentasupralabialis* はミミズを主食とし，同様に bufadienolide 類を蓄積する．我々は以前の大会でこのヘビ由来の bufadienolide 4 種（*Rp*-A~D）の同定を報告した．それらの構造，および本種の胃からマドボタル亜科ホタル *Diaphanes* sp. を発見したことから，このヘビが持つ bufadienolide の由来はホタルであると示唆された．しかしアジアのホタルから bufadienolide が同定された報告はないため，本研究ではアジアのマドボタル亜科において bufadienolide の有無を検証した．

[方法と結果]

中国の *Diaphanes* sp., *Pyrocoelia* sp.，台湾の *D. lampyroides*，及び日本の *P. atripennis*（オオシママドボタル）を採集し，破砕後，MeOH で抽出した．それぞれの粗抽出物を LCMS で分析した結果，すべてのホタルから複数の bufadienolide 類を検出した．

また，台湾の *D. lampyroides* の粗抽出物について Orbitrap LC-MS で分析を行った結果，ヘビから同定された 2 種の bufadienolide（*Rp*-A, B）を同定した．さらに NMR による構造解析の結果，日本のオオシママドボタルから *Rp*-D と同様の xylose が結合した bufadienolide 配糖体を同定した．動物では xylose 配糖体はホタルからのみ報告されている．

以上のことから，*R. pentasupralabialis* が蓄積する bufadienolide 類はホタル由来であると結論した．ホタルを選択的に食べるヘビはこれまで報告がない．このヘビはヤマカガシなどのカエル食からミミズ食へと主食が変わる過程で，ヒキガエルではなくホタルを毒源として利用するようになったと考えられる．

Bufadienolide, Snake, Firefly

講演番号：1D5a06
講演日時：3 月 24 日 10:05～ 1 号館 D5 会場

マツリカ（*Jasminum sambac*, 花部）の成分探索

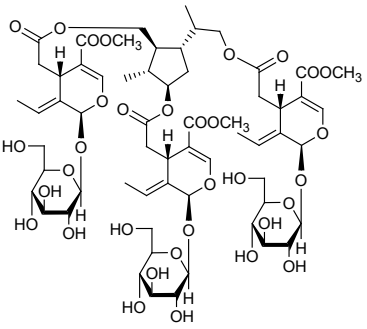
Chemical Structures of New Secoiridoids from the flowers of *Jasminum sambac*

○井上 尚樹[1]、二宮 清文[1,2]、吉川 雅之[1]、村岡 修[1,2]、森川 敏生[1,2]（[1]近畿大・薬総研、[2]アンチエイジングセ）

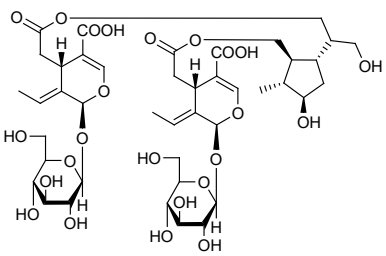
○Naoki INOUE[1], Kiyofumi NINOMIYA[1,2], Masayuki YOSHIKAWA[1], Osamu MURAOKA[1,2], Toshio MORIKAWA[1,2] ([1]Pharmaceutical Research and Technology Institute, Kindai Univ., [2]Antiaging Center, Kindai Univ.)

【目的】マツリカ (*Jasminum sambac*) はモクセイ科 (Oleaceae) の熱帯性常緑低木であり，東南アジアからヨーロッパに広く分布している．夏に白色の花を咲かせるマツリカは，フィリピンでは sumpaguita と呼ばれ，インドネシアと同様，国花として親しまれている．乾燥した花部はジャスミンティーに利用されるほか，花部から抽出したジャスミン油が香水などに用いられている．マツリカ花部は中医学では下痢，腹痛や結膜炎の治療，アーユルヴェーダー医学では坑潰瘍，抗がん，坑ハンセン病，皮膚疾患や傷の治療などに利用されている．マツリカ花部の含有成分として sambacoside A, E や molihuaside A－E などのセコイリドイド配糖体などが報告されている．我々はこれまでに 1 種の新規セコイリドイド配糖体 **1** を単離・構造決定している．[1)] 今回，さらにマツリカ花部の含有成分の精査を目的に，成分探索研究を実施した．

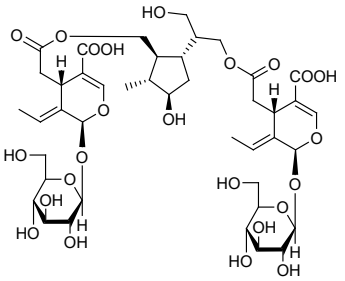
【結果･考察】広西省産マツリカ花部を MeOH にて還流抽出して, MeOH 抽出エキスを得た. 得られた MeOH 抽出エキスを水に懸濁した後, EtOAc にて溶媒分配を行い脂溶性分画である EtOAc 移行部と水層を得た．得られた水層を Diaion HP-20 カラムに付し，水溶出部と MeOH 溶出部を得た．得られた分画について順相および逆相カラムクロマトグラフィー，次いで逆相 HPLC にて繰り返し分離・精製した結果，2 種の新規セコイリドイド配糖体 **2** および **3** を単離・構造決定するとともに，37 種の既知化合物を単離・同定した．今回，単離した **2** および **3** の化学構造は NMR，MS などの各種スペクトルデータの解析および化学反応の結果からいずれも 11 位にカルボン酸を有する 2 つのセコイリドイド配糖体部分と 4 つの水酸基を有するイリダン型のモノテルペン部分からなるセコイリドイド配糖体であると決定した．



1



2



3

1) 日本農芸化学会 2018 年度大会講演要旨集，名古屋，2018，p．1549.

Jasminum sambac, secoiridoid, Jasmin

発表責任者：森川敏生（morikawa@kindai.ac.jp）

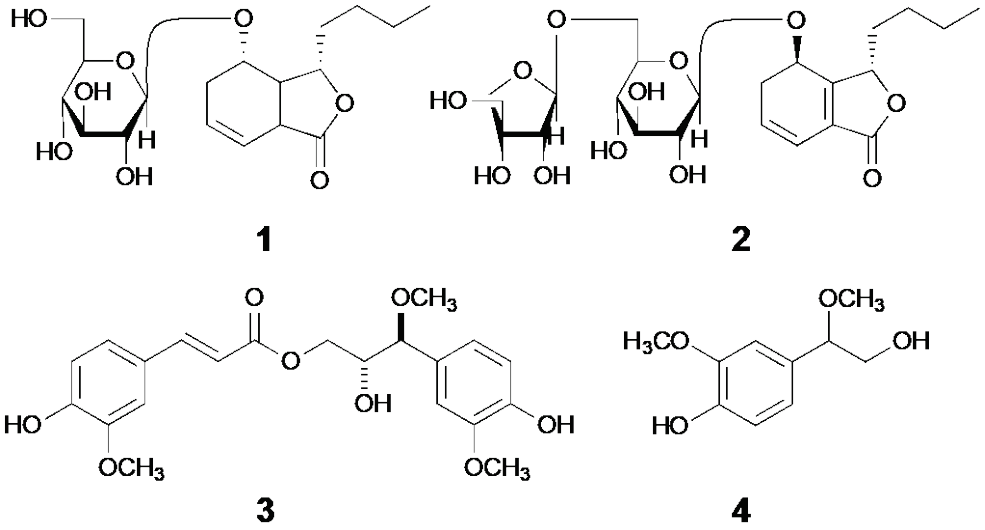
講演番号：1D5a07
講演日時：3 月 24 日 10:16～ 1 号館 D5 会場

センキュウ（*Cnidium officinale*, 根茎）の新規フタリド配糖体および芳香族化合物
Chemical Structures of New Phthalide Glycosides and Aromatic Compounds from the rhizome of *Cnidium officinale*

○山本 紗也、二宮 清文、塩谷 美幸、森川 敏生（近畿大・薬総研）
○ Saya YAMAMOTO, Kiyofumi NINOMIYA, Miyuki SHIOTANI, Toshio MORIKAWA (Pharmaceutical Research and Technology Institute, Kindai Univ.)

【目的】セリ科 (Umbelliferae) 植物センキュウ (*Cnidium officinale*) は, 中国原産の多年草で, その根茎を通例, 湯通したものは生薬 「川芎」 として第十七改正日本薬局方に収載されている. センキュウは主に北海道, 奈良県および岩手県などで栽培され, 婦人病, 冷え性, 皮膚疾患の改善や消炎排膿を目的とする漢方方剤に配剤される. また, 脂質異常症, 肥満症などの生活習慣病の改善を目的として利用される防風通聖散の構成生薬である. 我々はこれまでに, 川芎より調製した MeOH 抽出エキスのマウスへの経口投与で, 耐糖能の改善と肝臓中中性脂肪含量の有意な低下が観察されることを見いだしている. また, 川芎の成分研究を実施し, 一部のフタリド成分が肝細胞内の中性脂肪含量を有意に低下させることを明らかにしている. 今回, 含有成分の精査をさらに進めた結果, 4 種の新規化合物を単離・構造決定したので報告する.

【方法・結果】北海道産川芎を MeOH にて還流抽出し, 得られた MeOH 抽出エキスを EtOAc および水にて溶媒分配し, 脂溶性分画である EtOAc 移行部および水移行部を得た. その水移行部を Diaion HP-20 カラムに付し, 水溶出部および配糖体を多く含有する分画である MeOH 溶出部を得た. 得られた EtOAc 移行部および MeOH 溶出部を, 順相および逆相カラムクロマトグラフィー, 次いで HPLC にて繰り返し分離・精製したところ, 天然物由来の配糖体成分としては報告例の少ないフタリド配糖体 2 種を新規化合物 (**1**, **2**) として, 1 種の新規フェニルプロパノイド (**3**) および 1 種の新規フェニルエタノイド (**4**) を単離・構造決定するとともに, 14 種のフタリドおよび 4 種のフェニルプロパノイドなど計 29 種の化合物を単離･同定した. 新規化合物の構造は, NMR や MS などの各種スペクトルデータの解析により構造決定した.



Cnidium officinale, phthalide glycoside, aromatic compound

発表責任者：森川敏生（morikawa@kindai.ac.jp）

講演番号：1D5a08
講演日時：3 月 24 日 10:27～ 1 号館 D5 会場

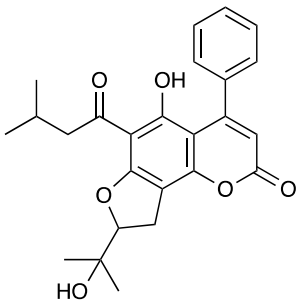
タイ天然薬物 *Mammea siamensis* 花部に含まれるプレニルクマリンのアロマターゼ阻害活性

Aromatase inhibitory activity of prenylcoumarins isolated from the flower of Thai medicinal plant *Mammea siamensis*

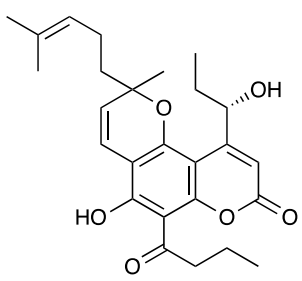
○羅 鳳琳[1]、二宮 清文[1]、柴谷 華苗[1]、チャイペック サワニ[1,2]、ポンピリヤダチャ ユタナ[2]、村岡 修[1]、森川 敏生[1] ([1]近畿大・薬総研、[2]ラジャマンガ工科大)
○Fenglin LUO[1], Kiyofumi NINOMIYA[1], Kanae SHIBATANI[1], Saowanee CHAIPECH[1,2], Yutana PONGPIRIYADAHCA[2], Osamu MURAOKA[1], Toshio MORIKAWA[1] ([1]Pharmaceutical Research and Technology Insitute , Kindai Univ., [2]Rajamangala University of Technology Srivijaya)

【目的】近年乳癌の罹患者数は増加傾向にあり，特に閉経後女性のホルモン感受性乳癌の場合には，制癌を目的に女性ホルモンの生合成に関わるアロマターゼの阻害薬が使用される．我々はタイ産 *Mammea siamensis* 花部の MeOH 抽出エキスにアロマターゼ阻害活性を見いだしたことから，活性寄与成分の解明を目的に本研究を実施した．テリハボク科 (Calophyllaceae) 植物 *M. siamensis* は，タイなどの東南アジア地域に分布する常緑樹である．タイでは，その花部が古くから民間薬として慢性心不全や発熱，食欲不振の改善などを目的に用いられてきた．我々はこれまでに，含有成分を精査し，得られた成分から，新規プレニルクマリンとして得られた mammeasin C，mammeasin D をはじめ，mammea B/AB cyclo D などを主活性成分として明らかにしている．今回，我々は，*M. siamensis* 花部から新たに単離した化合物のアロマターゼ阻害活性を検討したので報告する．

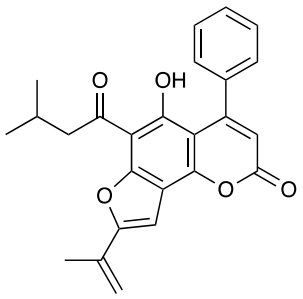
【方法・結果】基質として dibenzylfluorescein を使用し，補酵素として NADPH を用いてアロマターゼ阻害活性試験を実施した．37ºC で 30 分間反応させた後，NaOH 水溶液を加え加温した後，生成した蛍光物質の蛍光強度 (Ex 485 nm，Em 535 nm) を測定した．花部の MeOH 抽出エキスから調製した脂溶性分画および配糖体分画にアロマターゼ阻害活性が集約したことから，これらの分画から得られた成分のアロマターゼ阻害活性を検討した．その結果，mammea A/AA cyclo F (**1**)，kayeassamin I (**2**) および新規化合物として得られた化合物 **3** がアロマターゼ阻害活性を示すことを明らかにした．これらの化合物について，基質としてテストステロンを用い，ラインウェーバーバーク プロットによる阻害様式の検討を行った．また，genistein のエストロゲン様活性を指標として，ヒト乳腺癌由来細胞株 MCF7 細胞における細胞増殖能におよぼす影響についても評価した．さらに，アロマターゼ阻害作用の特異性を確認する目的で，アロマターゼと同じくテストステロンを基質とする酵素である 5α-リダクターゼに対する阻害活性を併せて検討したので報告する．



mammea A/AA cyclo F (**1**)



kayeassamin I (**2**)



3

aromatase, mammea siamensis, breast cancer

発表責任者：森川敏生（morikawa@kindai.ac.jp）

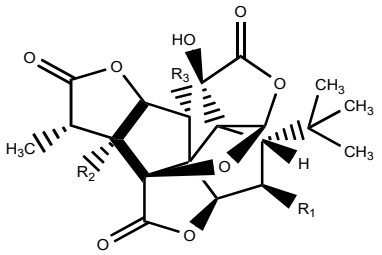
講演番号：1D5a09
講演日時：3 月 24 日 10:38～ 1 号館 D5 会場

ギンナンに含まれるギンコライド類の研究
Study of Ginkgolides contained in Ginkgo Seeds

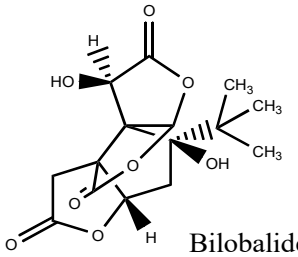
○藤野 和孝、松本 恵実、中塚 進一 (長良サイエンス株式会社)
○Kazutaka FUJINO, Emi MATSUMOTO, Shin-ichi NAKATSUKA (Nagara Science Co., Ltd.)

【背景・目的】イチョウ葉エキスは血栓形成の防止、アレルギー抑制、活性酸素の除去といった血流改善効果があり、1960 年代から痴呆予防や記憶力減退の改善薬等の医薬品として研究、利用されてきた。日本においては機能性表示食品や栄養補助食品としても販売されており、記憶力の維持等が期待されている。その有効成分の一つがギンコライド類[1]と言われているが、ギンコライド類はイチョウの葉や根皮に存在することはよく知られている一方で、ギンナン中に含まれている報告[2]はわずかしかなく、ギンナン中には含まれていないとの記述も見受けられた。そこで我々はギンナン等に含まれるギンコライド類を調査し、含有成分とその作用や摂取量などの探索を目的とした。

【方法・結果】イチョウの緑葉、黄色に変わりつつある葉、ギンナン、果皮、数十センチの若木を採取して、HPLC 等でギンコライド類の含量を調べた。その結果、含量の違いはあるもののすべての試料からギンコライド類が検出された。また、ギンナンも藤九郎、久寿、栄神の 3 種類の品種をそれぞれ分析して、3 種類ともギンコライド類が含まれていることが分かった。ギンナンに含まれるギンコライド類はギンコライドA、B、Cが報告されているが、イチョウ葉エキスと同様にギンコライドJやビロバライドも含まれていることが初めて分かった。ギンコライド類のうち、活性が強いといわれているギンコライドBに着目すると、粒が大きい藤九郎では 6 個程度食すことで、医薬品や機能性食品のイチョウ葉エキス 1 日摂取目安量と同程度のギンコライドBが含まれていることが判明した。ギンナンにはギンコトキシン（弱い毒性成分）が少量含まれているので、食べ過ぎに注意する必要があるが、摂取許容範囲内でギンナンから充分な機能性成分を得ることができると思われる。現在、新規関連成分の研究を続けている。



	R_1	R_2	R_3
Ginkgolide A	-H	-OH	-H
Ginkgolide B	-H	-OH	-OH
Ginkgolide C	-OH	-OH	-OH
Ginkgolide J	-OH	-OH	-H



Bilobalide

1) K.Nakanishi, *Pure Appl. Chem.*, **14**, 89(1967).
2) H.Inoue *et al.*, *J. Wood Sci.*, **44**, 375-378(1998).

Ginkgolide, *Ginkgo Biloba*, Dementia prevention

発表責任者：中塚進一（nagara@nsgifu.jp）

講演番号：1D5a10
講演日時：3 月 24 日 10:49～ 1 号館 D5 会場

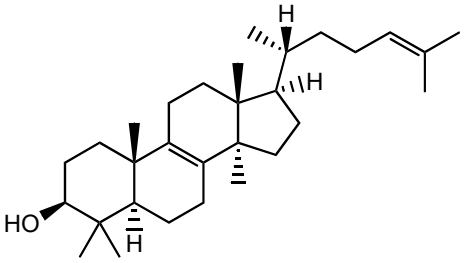
ラノステロール及びジヒドロラノステロールの高純度試薬の量産

Large scale purification of Lanosterol and Dihydrolanosterol

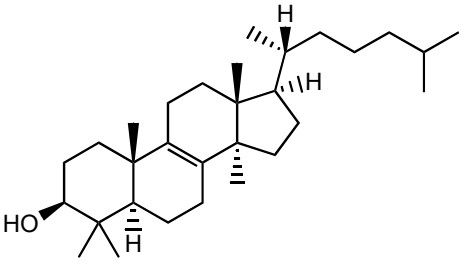
○田村 敦裕、森 拓哉、松本 恵実、中塚 進一（長良サイエンス株式会社）
○Atsuhiro TAMURA, Takuya MORI, Emi MATSUMOTO, Shin-ichi NAKATSUKA (Nagara Science Co., Ltd.)

【目的】ラノステロール及びジヒドロラノステロールは生体に含まれるステロイドで、コレステロールなどの前駆体として重要な化合物で、2015 年にラノステロールを含む点眼薬が白内障に有効である可能性が示された[1)]。しかしながら、市販のラノステロールは純度が低く、正確な薬理活性を解明するには十分ではない。そこで、本研究ではラノステロール等の高純度試薬の量産法を開発することにした。

【方法・結果】ラノリン(羊毛脂)からラノステロール等を量産する場合、構造の近いジヒドロラノステロールとの分離が困難で、市販試薬の純度が悪い一因となっている。そこで、我々は分離精製に用いる順相、逆相の各種シリカゲル系担体を独自の方法で精密に分級（粒ぞろえ）し、分離性能を上げることにより、精密な分離精製を可能にした。分級した各種シリカゲル系担体を用いたオープンカラム、HPLC、誘導化法、結晶化法等を組み合わせて、ラノリンからラノステロール及びジヒドロラノステロールを 99.5%以上の高純度試薬として、初めて数十グラム単位で量産できた[2)]。なお、ラノステロール等は、ラノリン中では極めて複雑なエステル混合物として存在しているので、その構造研究を進めている。本研究の成果は、ラノステロール及びジヒドロラノステロールの薬理活性の解明並びに白内障の新たな治療法の開発に貢献できると考えている。



Lanosterol



Dihydrolanosterol

1) Zhang, K. *et al.*, *Nature* **2015**, *523* , 607-611.
2) 田村敦裕, 中塚進一ら, 日本農芸化学会中部支部第 177 回例会 (2016).

Lanosterol, Dihydrolanosterol, Lanolin

発表責任者：中塚進一（nagara@nsgifu.jp）

講演番号：1D5a11
講演日時：3 月 24 日 11:10～ 1 号館 D5 会場

ツキヨタケ（*Omphalotus guepiniformis*）子実体に含まれるセスキテルペン類について
Sesquiterpenes from Fruiting Body of *Omphalotus guepiniformis*
○青木 聡樹[1]、網干 貴子[1,2]、塩野 義人[1,2]、新井 大輔[3]、飯塚 禎明[3]、村山 哲也[1,2]（[1]岩手大院連農、[2]山形大農、[3]FSC）
○Satoki AOKI[1], Takako ABOSHI[1,2], Yoshihito SHIONO[1,2], Daisuke ARAI[3], Yoshiaki IIDUKA[3], Tetsuya MURAYAMA[1,2] ([1]UGAS, Iwate Univ., [2]Fac. of Agric. Yamagata Univ., [3]FSC, Yamagata Univ.)

【目的】
ツキヨタケ(*Omphalotus guepiniformis*)はキシメジ科ツキヨタケ属に分類される担子菌類である。わが国では毒キノコとして知られており、ムキタケやヒラタケと似た外観からしばし誤食による食中毒事故が発生している。本種の毒成分として illudane 型セスキテルペノイドの illudin S 及び dihydroilludin S, neoilludin A, B が知られている。一方海外産の近縁種からは protoilludane 型並びに africanane 型セスキテルペン類などのセスキテルペノイドを中心に多種多様な新規化合物の存在が報告されているのに対し、本種に含まれる成分に関する研究はそれらと比較するとあまり行われていない。そこで本研究室ではツキヨタケの成分に注目して新規化合物の探索を行っており、これまでに 4 種の新規化合物を報告した。本発表では新たに 3 種の化合物を得たので報告する。
【実験】
ツキヨタケ子実体をメタノールに浸漬し、得られた粗抽出物を分液ロートを用いてヘキサン、酢酸エチル、ブタノールでそれぞれ分画した。得られた各画分のうちブタノール画分についてシリカゲルクロマトグラフィー並びに ODS クロマトグラフィーなどを用い、化合物 5-7 を得た。
【結果】
各化合物について各種分析を試みた。化合物 5 は得られた ^{1}H NMR 並びに ^{13}C NMR スペクトルについて文献との比較を行ったところ、担子菌類の一種である *Dichomitus squalens* より単離が報告されている既知の protoilludane 型セスキテルペン 5-hydroxydichomitol と一致した。ツキヨタケより本化合物の存在を報告するのは本研究が初めてである。また、化合物 6 は 2017 年度大会にて報告した新規 protoilludane 型セスキテルペンの化合物 1 と同様の平面構造を有することが示唆され、NOE 差スペクトルを用いた分析の結果、15 位の立体が異なる新規立体異性体であることが示唆された。化合物 7 は ^{1}H NMR 並びに ^{13}C NMR, ^{1}H-^{1}H COSY, HMQC HMBC を用いて平面構造を調べた結果、protoilludane 骨格の六員環部分が開裂した fomannosane 型セスキテルペンの 1 種であることが示唆された。

sesquiterpene, *Omphalotus guepiniformis*, mushroom

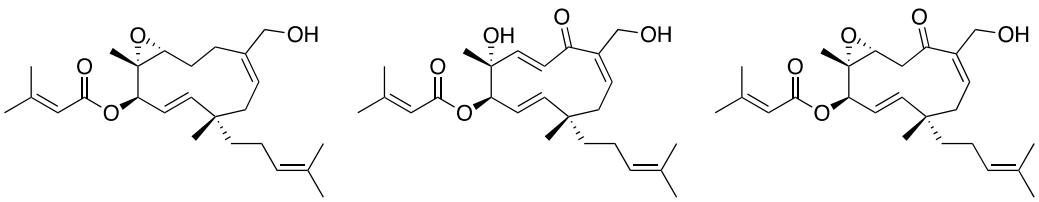
講演番号：1D5a12
講演日時：3 月 24 日 11:21～ 1 号館 D5 会場

サンゴジュの花芽に含まれるビブサニン類の分析と生物活性評価
Isolation and biological activities of vibsanin diterpenes from flower buds of *Viburnum odoratissimum*

○柳田 亮[1]、植松 紗和子[2]、西 皓冬[1]、芦田 能基[3]、川浪 康弘[1]、入江 一浩[4] ([1]香川大農、[2]香川大院農、[3]愛媛大院連合農、[4]京大院農)
○Ryo C. YANAGITA[1], Sawako UEMATSU[2], Hiroto NISHI[1], YOSHIKI ASHIDA[3], Yasuhiro KAWANAMI[1], Kazuhiro IRIE[4] ([1]Kagawa Univ., [2]Kagawa Univ., [3]Ehime Univ., [4]Kyoto Univ.)

【目的】ガマズミ属樹木サンゴジュ（*Viburnum odoratissimum*）からは 80 種類を超えるビブサン型ジテルペノイドが単離されている．これらの中で，vibsanin A（**1**）はプロテインキナーゼ C（PKC）活性化[1]，vibsanin B（**2**）は Hsp90β 阻害[2]を通して，がん細胞増殖抑制活性を示す．特に vibsanin A は抗炎症誘導活性を示すユニークな PKC 活性化剤として注目されている．我々はビブサニン類縁体の PKC C1 ドメイン結合能と推定結合様式について以前報告した[3]．これまでのサンゴジュからのビブサニン類の単離は葉および枝を探索源として行われてきたが，花芽に含まれるビブサニン類に関する報告はなかった．そこで本研究では，サンゴジュの花芽に含まれるビブサニン類の分析を行った．
【方法･結果】サンゴジュ花芽のメタノール抽出物から,UV 吸収を指標として各種クロマトグラフィーによる分画・精製を進め，既知化合物 **1**，**2**，および epoxyvibsanin B（**3**）[4] を単離同定した．サンゴジュの葉に含まれる主要なビブサニン類は **2** であるのに対して[5]，花芽には主要な類縁体として **3** が含まれることが明らかとなった．

化合物 **3** はインターロイキン-12（IL-12）産生抑制物質として見いだされており[4]，**1** の抗炎症誘導活性の作用機序を解明するうえで興味がもたれるが，PKC に対する活性はこれまで評価されていない．本講演では単離したビブサニン類の PKC 結合能およびがん細胞増殖抑制活性について報告する．



Vibsanin A (**1**)　Vibsanin B (**2**)　Epoxyvibsanin B (**3**)

1) Yu, Z.-Y., *et al.*, *Cancer Res.* **2016**, *76*, 2698-2709.
2) Ye, B.-X., *et al.*, *J. Immunol.* **2015**, *194*, 4489-4497.
3) 植松紗和子ら，2018 年度日本農芸化学会中四国支部大会，2018 年 9 月，松江.
4) Ono, M., *et al.*, Epoxyvibsanin B, World Patent WO 2002/060922, Aug. 8, 2002.
5) Kawazu, K. *Agric. Biol. Chem.* **1980**, *44*, 1367-1372.

vibsanin, tumor promoter, protein kinase C

講演番号：1D5a13
講演日時：3 月 24 日 11:32～ 1 号館 D5 会場

クマイザサ葉身に含まれる氷核形成阻害物質（過冷却促進物質）の同定
Identification of anti-ice nucleation (supercooling promoting) substances in *Sasa senanensis* leaf blade
○鈴木 伸吾、福士 幸治、荒川 圭太（北大院農）
○Shingo SUZUKI, Yukiharu FUKUSHI, Keita ARAKAWA (Hokkaido Univ.)

【目的】 これまでに樹木の木部組織などの植物組織から氷核細菌の氷核活性を阻害する物質が見つかっている。これらは氷核形成阻害物質（または過冷却促進物質）と呼ばれ、フラボノール配糖体や加水分解性タンニン、テルペン類の一種などが同定されている。これらの二次代謝産物は様々な植物に含まれ、フラボノール配糖体などは抗酸化物質として知られている。そのため、樹木の木部以外の組織や草本植物に含まれるポリフェノール類にも同様に氷核活性を阻害することが期待できる。

植物の凍霜害は植物表面に存在する氷核細菌が-2～-3℃程度の比較的高い氷点下温度で氷核形成を促して水を凍結させることが一因となっていると考えられている。そこで我々は植物抽出物がどの程度効果的に霜害を防止できるかを検証するため、氷核細菌を添加した 65 種の植物抽出物を用いて氷核形成阻害活性を測定した。抽出物の水溶液（生鮮重 0.1 g 相当/mL）に氷核細菌（*Erwinia ananas*）を加えて試料溶液を調製し、これを分注した液滴（2 μL）を 0.2℃/分で冷却して凍結温度を測定し、氷核形成阻害活性を評価した（ドロップレット凍結法）。その結果、クマイザサやセイヨウタンポポ抽出物などは比較的活性が高く、凍結温度を約 3℃下げた。そこで、冬季には－20℃程度まで細胞内を過冷却状態で維持することができるクマイザサ葉身に含まれる氷核形成阻害物質の同定を試みた。

【方法および結果】 2017 年の 8 月に採取したクマイザサ葉身を粉砕し、試料生重量の約 5 倍量のメタノールで抽出、ろ過してから乾固して抽出物を得た。クマイザサ葉身抽出物を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、逆相 HPLC で分画、分取した。適宜ドロップレット凍結法にて分画した画分の氷核形成阻害活性を測定して、活性を有する画分を確かめた。逆相 HPLC で分取したピークのうち、氷核形成阻害活性を有していたピークを質量分析に供した。得られた分子量、紫外線領域の吸収スペクトルとクマイザサに含まれていることが報告されている化合物を照合すると、クマイザサに含まれる氷核形成阻害活性をもつ化合物はフラボン配糖体であることが示唆された。

flavonoid glycoside, anti-ice nucleation, *Sasa senanensis*

発表責任者：荒川圭太（keita-ar@for.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：1D5a14
講演日時：3 月 24 日 11:43～ 1 号館 D5 会場

暖海性ホンダワラ類から単離したフロロタンニン類の構造解析
Structural analysis of phlorotannins isolated from warm temperate species of Sargassum
○谷口 凌佑[1]、井藤 千裕[2]、村田 直輝[1]、松井 卓哉[3]、三宅 義明[4]、糸魚川 政孝[5]、植田 充美[6,8]、柴田 敏行[1,7,8]（[1]三重大院生資、[2]名城大薬、[3]愛知医科大医、[4]愛知淑徳大健康医療科学、[5]東海学園大スポーツ健康科学、[6]京都大院農、[7]三重大海藻バイオ研、[8]JST・CREST）
○Ryosuke TANIGUCHI[1], Chihiro ITO[2], Naoki MURATA[1], Takuya MATSUI[3], Yoshiaki MIYAKE[4], Masataka ITOIGAWA[5], Mitsuyoshi UEDA[6,8], Toshiyuki SHIBATA[1,7,8] ([1]Mie Univ. Grad. Sch. of Bio., [2]Meijyo Univ. of Parm., [3]Aichi Medical Univ. of Med., [4]Aichi Shukutoku Univ. of Heal. and Med. Sci., [5]Tokai gakuen Univ. of Sports and Heal. Sci., [6]Kyoto Univ. Grad. Sch. of Agric., [7]Mie Univ. Seaweed Res., [8]JST・CREST)

【目的】フロロタンニン類（フロログルシノール・オリゴマー）は，褐藻類特有のポリフェノール類であり，抗酸化作用や抗糖化作用[1,2]など多彩な生理機能を持つことが明らかになっている．東アジアにおけるフロロタンニン類の研究は，アラメ属・カジメ属褐藻類やそれらに含まれる Eckol 類をターゲットとしており，他属の藻種を対象とした報告は極めて少ない．本研究では，移入種の暖海性ホンダワラ類を対象にフロロタンニン類のスクリーニングを行い，化合物の単離と構造解析を行った．さらに得られたフロロタンニン類について MTT 試験を行い，細胞毒性の有無を判定した．
【方法】ホンダワラ類の乾燥粉末から Folch 法に準じて抽出と分配を行い，得られた水溶性画分に対して酢酸エチルを用いて再度分配を行った．酢酸エチル層を回収し，減圧濃縮したものをサンプルとした．フロロタンニン類のスクリーニングには，TLC 法を用いた．分取 HPLC を用いてサンプルから化合物を精製し，LC/ESI/MS 測定，NMR（^{1}H-NMR，^{13}C-NMR，二次元 NMR）測定により構造を解析した．
【結果】検出試薬にバニリン－硫酸を用いて TLC を行った結果，一つのサンプルからフロロタンニンを示唆するバンドが複数検出された．LC/ESI/MS の負イオン測定を行った結果，*m/z* 373，497，621 にプロトン脱離イオン[M-H]$^{-}$を示唆するピークを持つ化合物がそれぞれ分離・検出された．NMR 測定の結果，それらは diphlorethol を基本骨格とした triphlorethol-A（フロログルシノール三量体），tetraphlorethol-C（フロログルシノール四量体），pentaphlorethol-A（フロログルシノール五量体）であることが分かった．動物培養細胞（HeLa 細胞，Caco-2 細胞および 3T3L-1 細胞）を用いて MTT 試験を行った結果，同定した phlorethol 類は，試験した化合物濃度の範囲内では，細胞毒性を有していないことも分かった．

本研究は，科学技術振興機構・戦略的創造研究推進事業 CREST（研究領域：藻類・水圏微生物の機能解明と制御によるバイオエネルギー創成のための基盤技術の創出）の支援を受けて行われた．

1) *Nat. Prod. Commun.*, 12: 1793-1796 (2017).
2) *Nat. Prod. Commun.*, 13: 1007-1010 (2018).

phlorethols, phlorotannins, Sargassum species

発表責任者：柴田 敏行（shibata@bio.mie-u.ac.jp）

講演番号：1D5a15
講演日時：3 月 24 日 11:54～ 1 号館 D5 会場

ウメ花粉の発達に関与する *p*-クマロイルスペルミジンの新規異性体の同定と *ZZZ* 体のユニークな熱力学的安定性

New isomers of the *p*-coumaroylspermidine involved in pollen development of *Prunus mume* and their unusual preference for *(ZZZ)*-isomer

○平井 伸博[1]、森 信之介[1]、赤松 美紀[1]、福井 宏至[2]、月岡 淳子[3]、後藤 勝実[3]（[1]京大院農、[2]香川大農、[3]京都薬大薬用植物園）

○Nobuhiro Hirai[1], Shinnosuke Mori[1], Miki Akamatsu[1], Hiroshi Fukui[2], Junko Tsukioka[3], Katsumi Goto[3] ([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Fac. Agric., Kagawa Univ., [3]Garden of Med. Plants, Kyoto Pharm. Univ.)

【目的】ウメの果実は単位面積当たりの収量が低く不安定である。その原因として、ウメが自家不和合性を有することや主要品種の一部が雄性不稔性であること、開花期が早いため低温障害を受けやすく雌蕊が正常に発達しないことなどが指摘されている。我々は花粉の発達に着目し、生産量の多い雄性稔性品種・南高の花粉を調べた。その結果、調査した個体では約 30％の花に葯の発達異常が認められ、これらの葯に含まれる花粉は不稔であった。異常葯とそれに含まれる花粉の形態およびクロロゲン酸の過剰な蓄積から、花粉一細胞期以前に受けた低温ストレスが発達異常の原因と考えられた。正常葯と異常葯の抽出物を比較した結果、正常葯には N^1,N^5,N^{10}-tri-*p*-coumaroylspermidine の *E*-*Z* 異性体 8 種（新規異性体 3 種を含む）が含まれていたのに対し、異常葯にはその *ZZZ* 体しか含まれなかった。また異常葯中の *ZZZ* 体の含量は、正常葯における異性体 8 種の含量の合計の約 30%であった（2018 年度農芸化学会大会）。今大会では新規異性体 3 種の構造決定と異性体 8 種の平衡比ならびにユニークな熱力学的安定性を示す *ZZZ* 体のコンホメーションと分子内相互作用を報告する。

【方法と結果】正常葯から N^1,N^5,N^{10}-tri-*p*-coumaroylspermidine の *E*-*Z* 異性体 8 種を単離し、その内 *ZEZ*、*ZEE*、*EEZ* 体を新規異性体として同定した。*EEE* 体の MeOH 溶液に UV254 nm を照射して光異性化させた結果、最終平衡比 (*ZZZ*):(*ZEZ*, *EZZ*, *ZZE*):(*EZE*):(*ZEE*, *EEZ*):(*EEE*) = 33:45:12:8:2 の混合物を与えた。この結果は *p*-coumaric acid の平衡比が (*E*):(*Z*) = 90:10 であるにもかかわらず、N^1,N^5,N^{10}-tri-*p*-coumaroylspermidine は *E* 体よりも *Z* 体を多く含む異性体の方が熱力学的に安定であることを示している。*ZZZ* 体が最安定である理由として *p*-(*Z*)-coumaroyl 基の分子内相互作用が考えられた。

ZZZ 体の分子内相互作用を明らかにするため、そのコンホメーションを解析した。その結果、^{1}H NMR スペクトルにおけるシグナルの高磁場シフトと NOESY における相関から、spermidine と *p*-(*Z*)-coumaroyl 間の CH/π 相互作用ならびに N^1-と N^5-*p*-(*Z*)-coumaroyl 基間の T-shaped π/π 相互作用が存在する可能性が示された。さらに *ab initio* 分子軌道法計算（MP2/cc-pVTZ）によって *ZZZ* 体のモデル化合物を構造最適化した結果、N^5-*p*-(*Z*)-coumaroyl 基のカルボニル基と N^{10}-*p*-(*Z*)-coumaroyl 基の水酸基が近接し、水素結合することも示唆された。これらの結果より、複数の分子内相互作用が *ZZZ* 体にユニークな安定性をもたらしている可能性が強く示された。*ZZE* や *EEZ* などの *Z* 配置を含む他の異性体においても、これらの分子内相互作用の一部が安定化に寄与していると考えられる。

Coumaroylspermidine, Prunus mume, Pollen

発表責任者：平井伸博（hirai@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：1D5p01
講演日時：3 月 24 日 13:50～ 1 号館 D5 会場

落葉由来放線菌二次代謝産物からの新規抗生物質の発見
MM696L-181F4 A, a new antibiotic from leaf litter-derived actinomycete.
○竹花 康弘、木村 智之、村松 秀行、澤 竜一、梅北 まや、林 千草、澁谷 優子、五十嵐 雅之（微化研）
○ YASUHIRO TAKEHANA, TOMOYUKI KIMURA, HIDEYUKI MURAMATSU, RYUICHI SAWA, MAYA UMEKITA, CHIGUSA HAYASHI, YUKO SHIBUYA, MASAYUKI IGARASHI (BIKAKEN)

【目的】　土壌から分離された放線菌は有用な生理活性物質の生産菌として盛んに研究が進められてきたが、近年では新規生理活性物質の獲得効率が減少しつつある。これに対し深海底泥や落葉等、土壌とは異なる環境に生きる放線菌は、生育環境の違いから土壌由来のものとは異なる二次代謝産物の生産性を有するとして注目されている。本研究では、当研究所で進められている抗菌活性スクリーニングにおいて落葉由来放線菌の培養液中に新規抗生物質を見出し、その単離に成功した。本発表にてその単離精製、構造決定および生物活性について報告する。
【方法・結果】　種々の放線菌培養物について、グラム陽性細菌、グラム陰性細菌、そして真菌を含む抗菌活性スクリーニングパネルを用いて活性評価を行い、東京都武蔵野市にて採集された落葉由来放線菌 MM696L-181F4 株の培養物中に *Staphylococcus aureus*、*Klebsiella pneumoniae*、*Candida albicans* に対する抗菌活性を見出した。 MM696L-181F4 株は、その 16S rRNA 遺伝子部分配列(802 bp)が *Saccharothrix* 属各種に対して 96.75～93.38%の相同値を示し、系統樹上でも *Saccharothrix* 属のクラスターに含まれ、最近縁種 *S. xinjiangensis* AS 4.1731^{T}株に対して 98.38%の相同値を示したことから、*Saccharothrix* 属の新種の可能性が高いと考えられた。培養物を分取 HPLC で分画し、活性画分を LC-HRESI/MS で分析した結果、抗菌活性を示すピークの *m/z* 276.0983 から算出された精密質量は Dictionary of Natural Products 掲載化合物のそれとは一致しないことが明らかになった。活性物質を抗菌活性と LC/MS における *m/z* を指標として以下の手順にて単離精製を行った。培養液 2.5 リットルを菌体も含めて等量の 1-BuOH で抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、ODS 分取 HPLC による精製を順次行い、37.7 mg の目的物を単離し、MM696L-181F4 A とした。本物質の分子式は、ESI/MS の精密質量から $C_{13}H_{13}N_3O_4$ と決定した。更に NMR スペクトルの詳細な解析と、結晶化による X 線結晶構造解析から、本物質は 5-hydroxy-3,4-dimethoxy-[2,2'-bipyridine]-6-carboxamide であると決定した。本物質は *S. aureus* に 32 μg/ml、*K. pneumoniae* に 16 μg/ml、*C. albicans* に 32 μg/ml で抗菌活性を示した。

actinomycetes, new bioactive compound, leaf-litter

発表責任者：竹花　康弘（takehanay@bikaken.or.jp）

講演番号：1D5p02
講演日時：3 月 24 日 14:01～ 1 号館 D5 会場

18T138A および B, 放線菌の生産する新規アスカマイシン類縁体
18T138A and B, New askamycin family compounds from *Streptomyces* sp.
○菰田 俊一[1]、武田 蛍[1]、竹中 慶香[1]、鈴木 眞依[1]、小関 良卓[2] ([1]宮城大学食産業、[2]東北大院)
○Toshikazu Komoda[1], Hotaru Takeda[1], Yoshika Takenaka[1], Mai Suzuki[1], Yoshitaka Koseki[2] ([1]MIYAGI Univ., [2]Tohoku Univ.)

[目的]
放線菌は、様々な二次代謝物を生産することが知られており、従来から生理活性物質の探索源として利用されてきた。本研究では、DPPH ラジカル捕捉能を指標にしながら、放線菌の代謝産物中に新たな機能性成分を見出し、その化学構造を明らかにすること、また、見出した成分の持つ生理機能を明らかにすることを目的とした。

[方法および結果、考察]
はじめに、仙台市内を中心として各地より土壌から放線菌を単離し、ここから活性菌を選抜した。採取した土壌サンプルを平板培地に塗布し、約 1 週間の静置培養を行った。培養後、平板培地上に生育した放線菌を斜面培地に移植し、検索対象の放線菌とした。単離された放線菌は試験管による培養を行い、その培養ろ液を HPLC に供すことで、1 次スクリーニングを行った。約 200 の放線菌をいくつかの培地にて培養した結果、18T138 株の培養ろ液に DPPH ラジカル捕捉能があることがわかった。そこで、この放線菌 18T138 株を、大量培養に供することとした。グルコース、酵母エキスおよび市販の「和風だしの素」を含む培地中、回転培養により、7 日間の培養を行った後、ろ液(9.6L)をダイアイオン HP-20 に吸着させ、メタノール溶出画分を得た。続いて、この画分をシリカゲルカラムクロマト、分取 HPLC 法にて精製し、活性物質 18T138A(**1**)および 18T138B(**2**)をそれぞれ 20 mg ずつ得た。**1** および **2** の分子式は高分解能質量分析により得られ、共に $C_{29}H_{36}N_2O_7$ であることが示された。また、これら両物質の平面構造は、^{1}H-NMR、^{13}C-NMR および各種二次元 NMR の測定において、同一の構造であることが示された。さらに、これらの構造は既知のアスカマイシン抗生物質の類縁化合物であることも示された。示された平面構造については、これまでに学会報告はあるものの、詳細な報告はされていない。また、立体化学の解析などについては報告がされておらず、本報告がはじめてのものであった。**1** および **2** は、アスカマイシン類に共通する 6 員環部分と 2 つのオレフィン側鎖、末端のシクロヘキサン環を持つことが示された。また、^{1}H-NMR、^{13}C-NMR で観測されにくい部分構造を含むことも分かった。本研究では、与えられた分子式、既存の文献情報などを組み合わせながら解析を行い、**1** および **2** が立体異性の関係であることを導いた。現在、DPPH ラジカル捕捉能の評価や各種生物活性の測定などを進めている。

Streptomyces sp., askamycin antibiotics, DPPH

発表責任者：菰田俊一（komoda@myu.ac.jp）

講演番号：1D5p03
講演日時：3 月 24 日 14:12～ 1 号館 D5 会場

インドネシア微生物資源からの抗赤痢アメーバ化合物の探索

A search for antiamebic compounds from cultured broths of Indonesian microbes

○森 美穂子[1,2]、Arif Nurkanto[3]、山下 道雄[3]、Danang Waluyo[4]、Amila Pramisandi[2,4]、土橋 和之[1]、大村 智[1]、塩見 和朗[1,2]、野崎 智義[3] ([1]北里生命研、[2]北里大院感染制御、[3]東大院医、[4]インドネシア技術評価応用庁)

○Mihoko Mori[1,2], Arif Nurkanto[3], Michio Yamashita[3], Danang Waluyo[4], Amila Pramisandi[2,4], Kazuyuki Dobashi[1], Satoshi Omura[1], Kazuro Shiomi[1,2], Tomoyoshi Nozaki[3] ([1]Kitasato Inst. for Life Sci., [2]Kitasato Univ., [3]The Univ. of Tokyo, [4]BPPT)

【背景・目的】赤痢アメーバ症は単細胞の寄生虫（原虫）である赤痢アメーバ（*Entamoeba histolytica*）が腸管に寄生して起こる下痢症である。赤痢アメーバが肝臓、肺、脳へ移行して膿瘍を形成し、重症化するケースもある。発展途上国を中心に罹患者は 5,000 万人、死者は原虫症の中ではマラリアに次いで多く、年 10 万人と推定されている。日本でも感染症法により届出が必要な寄生虫症であり、近年報告数が増加している。赤痢アメーバ症の治療には抗菌・抗原虫薬であるメトロニダゾールが用いられているが、耐性を持つ赤痢アメーバの出現、催奇形性などの副作用があること、感染に関与するシスト状態の赤痢アメーバには効果がないこと等のため、新しい治療薬が求められている。

我々は新たな赤痢アメーバ症治療薬のシーズ化合物を微生物二次代謝産物より探索している。2017 年の本大会において、*Metarhizium* 属糸状菌 FKI-6809 が生産する ovalicin が肝膿瘍モデルハムスターで既存薬メトロニダゾール 10 mg/kg（経口投与）に匹敵する治療効果を皮下投与 1 mg/kg で示すことを報告した。現在、SATREPS プロジェクトで、インドネシアの微生物資源を用いて抗赤痢アメーバ化合物の探索研究を進めている。本発表では本プロジェクトにおける探索研究の進行状況について、インドネシアのカウンターパートの研究体制などの状況も含めて報告する。

【方法】インドネシア天然資源からの放線菌および糸状菌の分離と保存はインドネシア技術評価応用庁で行われた。培養はインドネシアまたは、菌株を輸入して日本で行った。抗赤痢アメーバ活性を指標として、各種カラムクロマトグラフィーにより抗赤痢アメーバ化合物を微生物培養液から単離し、機器分析により化学構造を決定した。

【結果】年間 4,000 を超える微生物培養液サンプルが供給され、スクリーニングとスケールアップ培養試験の結果、糸状菌培養液 2 サンプルに抗赤痢アメーバ活性を確認できた。シリカゲルカラム、HPLC で精製を行った結果、両サンプルに含まれる主たる抗赤痢アメーバ化合物は citrinin であることがわかった。また、インドネシアでの大量培養物の活性再現率が低いため、日本へインドネシアの糸状菌と放線菌約 30 株を輸入して各種培地を用いて培養した。赤痢アメーバとヒト繊維芽細胞に対する毒性を評価して赤痢アメーバ選択的な毒性を示す培養液を調べた結果、7 株の培養液が選択的な抗赤痢アメーバ活性を示した。

citrinin, *Entamoeba histolytica*, Indonesian microbes

発表責任者：森美穂子（morim@lisci.kitasato-u.ac.jp）

講演番号：1D5p04
講演日時：3 月 24 日 14:23～ 1 号館 D5 会場

Physicochemical screening による新規化合物の探索 -*Trichoderma virens* FKI-7573 株が生産する新規含窒素化合物について-

Search for new compounds by physichochemical screening -A new nitrogenous compound produced by *Trichoderma virens* FKI-7573-

○宮野 怜[1]、松尾 洋孝[2]、野中 健一[2]、目代 貴之[3]、庭野 吉己[3]、塩見 和朗[2]、高橋 洋子[2]、大村 智[2]、中島 琢自[2] ([1]北里大院・感染制御、[2]北里大・生命研、[3]東北大院・歯)
○Rei MIYANO[1], Hirotaka MATSUO[2], Kenichi NONAKA[2], Takayuki MOKUDAI[3], Yoshimi NIWANO[3], Kazuro SHIOMI[2], Yoko TAKAHASHI[2], Satoshi OMURA[2], Takuji NAKASHIMA[2] ([1]Graduate School of Infection Control Science, Kitasato Univ., [2]Kitasato Institute for Life Science, Kitasato Univ., [3]Graduate School of Dentistry, Tohoku Univ.)

【背景・目的】糸状菌は penicillin[1] の発見以来、生理活性物質の探索源として世界中で研究されている。近年のゲノム解析の結果、糸状菌は多くの二次代謝産物の生合成遺伝子を持つことが報告[2] されており、糸状菌は新規生理活性物質の探索源として期待される。

ゲノム・疾患・医薬品のデータベースである KEGG MEDICUS[3] に登録されている低分子化合物に含まれる元素の割合を調べると、79% の化合物が窒素を含んでいた。このことから窒素を含む新規化合物は医薬品に応用できる可能性が高いと考えられる。

当研究室は化合物の物理化学的性状を指標にした新規化合物の探索方法である physicochemical (PC) screening を行ってきた。PC screening は、培養物抽出液を LC/UV-MS で分析することで得られた二次代謝産物の物理化学的性状 (分子量、化学式、UV 極大吸収、極性など) を天然物データベースと比較し、新規性を予測することで新規化合物を探索し、取得後に様々な生物活性評価を行い、その有用性を見出していく方法である[4]。

本研究は、糸状菌が生産する新規含窒素化合物を PC screening によって見出すことを目的とした。

【方法・結果】糸状菌 105 株を硫酸アンモニウム添加米培地で 2 週間静置培養した。これらの培養物抽出液を LC/UV-MS 解析し、含まれている化合物の物理化学的性状を収集した。

探索の結果、糸状菌 *Trichoderma virens* FKI-7573 株が生産する分子量 509 の化合物 (FKI-7573 A 物質) を新規含窒素化合物と推定した。FKI-7573 A 物質を取得するため、本菌株を 2 kg の生産培地で 2 週間静置培養した。培養後、メタノールを添加して培養物抽出液を得、液液分配、カラムクロマトグラフィーを行い、FKI-7573 A 物質を 28.6 mg 得た。NMR 構造解析より、本化合物は ergothioneine[5] を有する新規含窒素化合物であると明らかになった。子のう菌由来で ergothioneine を部分構造に有する二次代謝産物は初の報告である。本化合物を *Trichoderma* 属糸状菌から得られた ergothioneine を有する化合物であることに因み、trichothioneic acid と命名した。Trichothioneic acid は抗菌活性試験 (グラム陽性菌、グラム陰性菌、真菌) および細胞毒性試験では活性を示さず、活性酸素種消去活性を有していた。

1) *Yale J. Biol. Med*., **90**, 135 (2017), 2) *Nat. Rev. Microbiol*., **3**, 937 (2005), 3) *Nucleic Acids Res*., 38, D355 (2010), 4) *Biochem. Pharmacol*. **15**, 42 (2017), 5) *Bull Coll Agric Tamagawa Univ*, **1**, 17 (2016)

Physicochemical screening, Trichoderma virens, ergothioneine

講演番号：1D5p05
講演日時：3 月 24 日 14:34～ 1 号館 D5 会場

Stenotrophomonas maltophilia 種内のシデロフォアタイプについて
Siderophore type produced by *Stenotrophomonas maltophilia*
○久富 敦[1]、鈴木 智典[2]、志波 優[2]、藤田 信之[2]、田中 尚人[1,2] ([1]東農大院醸造、[2]東農大生命)
○Atsushi HISATOMI[1], Tomonori SUZUKI[2], Yuh SHIWA[2], Nobuyuki FUJITA[2], Naoto TANAKA[1,2]
([1]Tokyo Univ. of Agric. graduate school, [2]Tokyo Univ. of Agric.)

<目的>
Stenotrophomonas maltophilia は海洋中や土壌中、植物などの自然環境に広く生育し、日和見感染菌としても知られている。本種は鉄飢餓状態において金属キレート物質であるシデロフォアを産生することが報告されているが詳細は明らかにされていない。シデロフォアとは、三価の鉄に対し高親和性を示すキレート物質であり、様々な植物や微生物が鉄欠乏時に産生し、鉄の獲得を行う。その構造はキレート部位の特徴により catecholate、phenolate、carboxylate、hydroxamate の 4 つのタイプに分類される。2013 年、泉は *S. maltophilia* には catecholate type のシデロフォアを産生する株と catecholate type 以外のシデロフォアを産生する株の存在を報告した。本種が様々な環境から分離されていることから、種内でのシデロフォアの多様性および catecholate type 以外の新規のシデロフォアの発見が期待できる。
そこで本研究では分離源の異なる *S. maltophilia* 株が産生するシデロフォアタイプの特定を目的とする。
<実験方法>
シデロフォア産生株計 8 株を用いた。シデロフォア検出試薬である CAS を添加した寒天培地を使用し、クリアゾーンが形成されるか確認を行った。タイプを判別するため catecholate type と phenolate type を検出する Arnow assay と hydroxamate type を検出する Casky assay を行った。Arnow assay は catecholate type が含まれる溶液中では黄色から赤色へと特異的な色の変化を生じる。また phenolate type が含まれる溶液中では黄色が残り続ける反応である。Casky assay は hydroxamate type が含まれる溶液中では無色から紫色へと特異的な色の変化を生じる。また Arnow assay 陽性であるシデロフォアの精製を行い、LC/MS による分子量、分子式推定を行った。
<結果>
供試菌株全てのシデロフォア産生を確認した。Arnow assay では catecholate type と phenolate type を確認した。また Casky assay では全株で活性を確認した。精製を行った結果 LC/MS により *m/z* =164, *m/z* =240 の化合物が検出された。本研究によって 2013 年泉が確認した catecholate type のシデロフォアを全株が産生することに加え、phenolate type のシデロフォアも *S.maltophilia* が産生している可能性が高いことが分かった。また、これらのシデロフォアは新規のシデロフォアである可能性が高い *m/z* =164, *m/z* =240 の化合物であることが推定された。
泉ら 2013 年度日本農芸化学会年次大会 2C20p15

Stenotrophomonas maltophilia, siderophore, CAS assay

発表責任者：久富敦（isuta444@gmail.com）

講演番号：1D5p06
講演日時：3 月 24 日 14:55～ 1 号館 D5 会場

深海由来糸状菌 *Penicillium* sp. FKJ-0123 株が生産する新規シンナモイルトリペプチドについて

A new *N*-cinnamoyl tripeptide isolated from deep-sea derived fungal strain *Penicillium* sp. FKJ-0123

○松尾 洋孝[1,2]、目代 貴之[3]、野中 健一[1,2]、長野 由梨子[4]、矢吹 彬憲[4]、藤倉 克則[4]、庭野 吉己[5]、高橋 洋子[1]、大村 智[1]、中島 琢自[1,2] ([1]北里大・生命研、[2]北里大院・感染制御、[3]東北大・金属材料研、[4]海洋研究開発機構、[5]東北大院・歯)
○Hirotaka MATSUO[1,2], Takayuki MOKUDAI[3], Kenichi NONAKA[1,2], Yuriko NAGANO[4], Akinori YABUKI[4], Katsunori FUJIKURA[4], Yoshimi NIWANO[5], Yoko TAKAHASHI[1], Satoshi OMURA[1], Takuji NAKASHIMA[1,2] ([1]Kitasato Inst. for Life Sci., [2]Grad. Sch. of Infect. Cont. Sci., [3]Inst. for Materials Res., Tohoku Univ., [4]JAMSTEC, [5]Grad. Sch. of Dentistry)

『背景・目的』

微生物はこれまでに、人知の及ばない構造を有する化合物を提供してきた。化学構造の多様性は、生物活性の多様性と深く関わっており、新規化合物の取得が強く望まれている。特に、糸状菌からは医薬品、農薬、生化学試薬となった様々な有用物質が取得され、今日においても有用物質の探索源として広く用いられている。中でも、含窒素物質は強力で特異な生物活性を示すものが多いため、積極的に取得されてきた。

これまで糸状菌の分離源として陸上の土壌などが主に用いられてきたが、近年、海洋由来の糸状菌が新たな探索源として注目され、様々な新規物質が取得されてきた (Pang K-L. et al. *Br. Mycol. Soc.*, 30, 163-175, 2016)。しかしながら、海洋の大部分を占める水深 200 m 以深の深海に生息する糸状菌をターゲットとした化合物探索例はまだ少なく、新たな有用物質発見の可能性を秘めている。そこで本研究では、深海由来糸状菌が生産する含窒素物質に着目し、新規物質の探索に特化した方法 physicochemical screening (Nakashima T. et al. *Biochem. Pharmacol.*, 134, 42-55, 2017) により、新規含窒素物質の取得を目的とした。

『方法・結果』

深海由来糸状菌 280 株を 4 つの異なる培地で培養し、計 1,120 サンプルを得た。これらの培養液を酢酸エチルで抽出後、TLC で展開 ($CHCl_3$:MeOH＝9:1) し、ドラーゲンドルフ試薬を噴霧した。ドラーゲンドルフ陽性物質を含む培養液 (生産菌) を選定し、その培養液を LC/MS で解析した。その結果、*Penicillium* sp. FKJ-0123 株が米を主成分とする培地で生産する物質 (FKJ-0123A 物質と仮称) を選択した。FKJ-0123A 物質は *m/z* = 478.2331 $[M+H]^+$ (calcd. for $C_{27}H_{32}N_3O_5$, 478.2342) に擬分子イオンピークを有し、205 および 283 nm に UV 極大吸収を示す物質であった。これらの情報を天然物データベース「Dictionary of Natural Products」で検索した結果、該当する物質がなかったため、新規物質と推定した。そこで、*Penicillium* sp. FKJ-0123 株を米培地 2 kg で 13 日間 27 ℃で培養後、培養物をメタノールで抽出した。メタノールを留去後、酢酸エチルで抽出し、濃縮物をシリカゲルカラムおよび ODS カラムクロマトグラフィーで分画した。最終的に分取 HPLC で精製し、FKJ-0123A 物質を 13.4 mg 得た。NMR 等により構造解析した結果、シンナモイル基を含むトリペプチドであることが明らかとなった。また、3 つのアミノ酸の絶対立体配置は改良マーフィー法にて決定した。抗菌活性、抗腫瘍活性、抗マラリア活性、抗酸化活性 (スーパーオキシドアニオンラジカル、ヒドロキシラジカル、一重項酸素消去活性) を評価した結果、ヒドロキシラジカル消去活性を見出した。

anti-oxidant, cinnamoyl tripeptide, deep-sea derived fungus

発表責任者：松尾洋孝（matsu-h@lisci.kitasato-u.ac.jp）

講演番号：1D5p07
講演日時：3 月 24 日 15:06～ 1 号館 D5 会場

マクロリドを有するトリコテセンは 12 位エポキシドがなくても毒性を示す

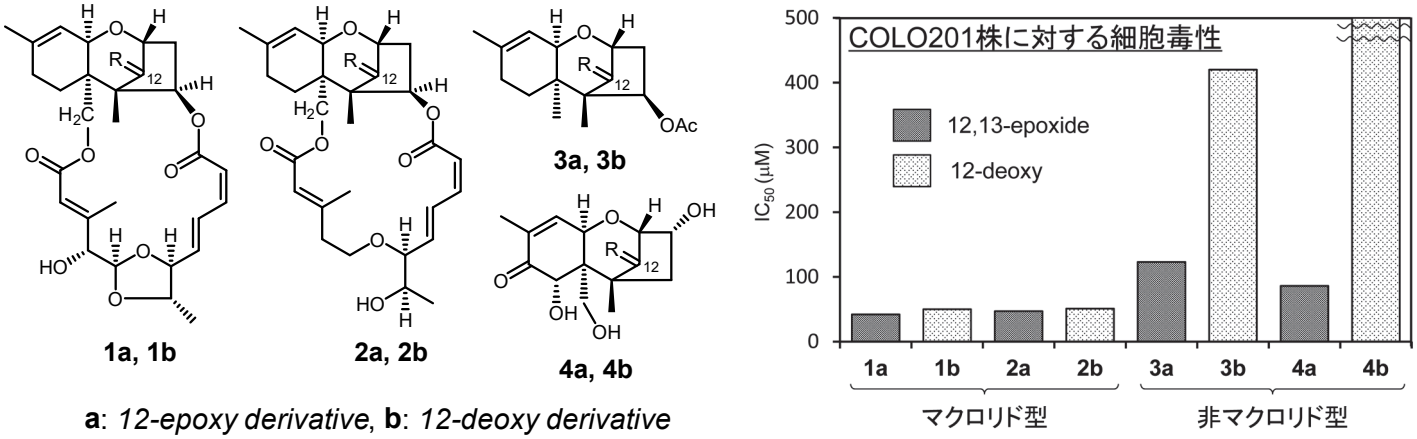
Trichothecens with macrolide exhibit cytotoxicity even whithout the 12-epoxide.

○松本 愛美[1]、西山 真未[1]、前多 隼人[1]、殿内 暁夫[1]、紺野 勝弘[2]、橋本 勝[1] ([1]弘前大、[2]富山大和漢研)
○ Manami MATSUMOTO[1], Mami NISHIYAMA[1], Hayato MAEDA[1], Akio TONOUTHI[1], Katsuhiro KONNO[2], Masaru HASHIMOTO[1] ([1]Hirosaki Univ., [2]Toyama Univ.)

Trichothecene 類は、マクロリド構造を合わせ持つ roridin 類とともに重篤な中毒を引き起こすマイコトキシンである。発表者は *Calcarisporium arbuscular* 培養液から、既知の Trichothecene 類 **1a**, **2a**, **3a** とともに、12-deoxyroridin 類 **1b**, **2b** を単離し、前年度本大会で報告した[1)]。今回、*Tricoderma* sp 1212-03 から 12-deoxytrichodermin (**3b**)を見出した[2)]。

Trichothecene 類の毒性は 12 位エポキシドの高い反応性が関与するといわれている。しかし、総合的な構造活性相関実験の報告は無かったことから、市販の DON (**4a**), DOM-1 (**4b**)を加えてヒト結腸癌 COLO201 細胞に対する構造活性相関実験を行った。

予想通り、通常型 trichothecene **3a**, **4a** 及び通常型 rodidin **1a**, **2a** は強い細胞毒性を示し、マイコトキシンとしての危険性を確認した。中でもマクロリド型の **1a**, **2a** はより強い活性を示した。また、12-deoxytrichodermin 類 **3b**, **4b** では毒性が見られず、これまで提唱されてきたエポキシドの関与を裏付けるものとなった。一方、マクロリドを有する 12-deoxy 型 roridin 類 **1b**, **2b** では、非エポキシド構造にも関わらず、通常型の **1a**, **2a** と同等の強い毒性を示した。即ち、roridin 類では、単純型 trichothecene とは異なり、マクロリド構造が毒性に大きく寄与しているという興味深い結果を得た。本発表では **3b** の構造決定及び細胞毒性機構の考察を合わせて報告する。



a: *12-epoxy derivative*, **b**: *12-deoxy derivative*

1) 松本、橋本、日本農芸化学会2018年度大会（発表番号3A18a01）
2) Matsumoto, M.; Tanaka, S.; Tonouchi, A.; Hashimoto, M., *Tetrahedron Lett.* **2018,** *59*, 1992-1995.

mycotoxins, trichothecenes, biological activity

発表責任者：松本愛美（eternal-mkm-21@docomo.ne.jp.）

講演番号：1D5p08
講演日時：3 月 24 日 15:17～ 1 号館 D5 会場

New polyketides, fusopoltide derivatives isolated from *Fusarium solani* B-18

○Nanang Rudianto ARIEFTA[1,2], Takako ABOSHI[2], Tetsuya MURAYAMA[2], Takuya KOSEKI[2], Yoshihito SHIONO[1,2] ([1]UGAS, Iwate Univ., [2]Fac. of Agri., Yamagata Univ.)

[Background]

A recent large eruption of Merapi mountain in 2010 caused many changes to the environment, including plants and microorganisms. It was assumed that during the post-eruption in this area, fungal endophytes were not investigated as metabolite sources. We explored novel metabolite sources from the damaged area, which led to the isolation of several fungal strains. Strain B-18 was obtained from the inner tissue of unidentified forest litter and subsequently identified as *Fusarium solani*.

[Method and Results]

The fungus strain *F. solani* B-18 was fermented in sterilized brown rice at 25 °C for four weeks. The resulting molded media was then extracted using MeOH and then dried under vacuum. The MeOH extract was then partitioned between H_2O and EtOAc. Purification of the EtOAc extract led to the isolation of polyketides featured with unprecedented pentaleno[1,2-c]pyran (**1**, **2**), pentaleno[1,2-c]tetrahydropyran (**3**), and pentaleno[1,2-c]furan (**4**, **5**) ring system. Their structures were determined on the basis of 1D/2D-NMR spectroscopy and HRESITOFMS in combination with ECD calculations.

endophyte, *Fusarium solani*, fusopoltides

講演番号：1D5p09
講演日時：3 月 24 日 15:28～ 1 号館 D5 会場

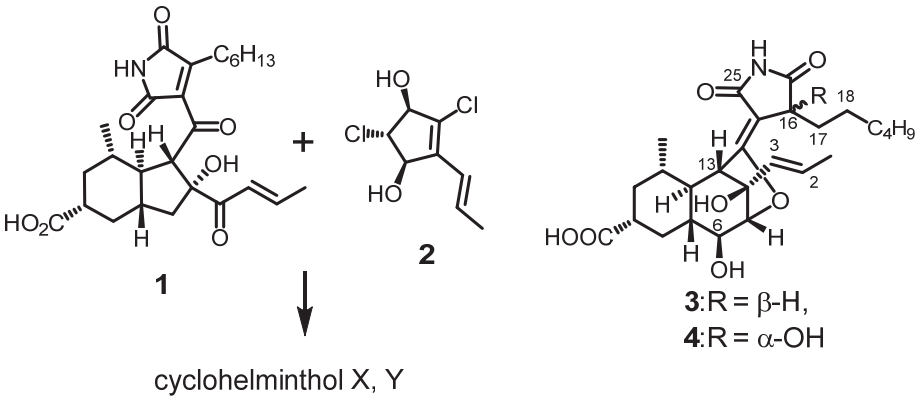
Cyclohelminthol CP-1,2 の構造
The structures of Cyclohelminthol CP-1,2

○田中 静也、田中 和明、橋本 勝 (弘前大)
○Shizuya TANAKA, Kazuaki TANAKA, Masaru HASHIMOTO (Hirosaki Univ)

Helminthosporium velutinum yone96 は、cyclohelminthol X[1] および Y[2] を生産する。報告者は、これら化合物はマレイミド **1** と同菌が生産する cyclohelminthol IV(**2**)[3] が縮合して生合成されると推定した。そこで、生産菌培養液から **1** の分子量を参考に探索を行い二つの化合物 cyclohelminthol CP-1(**3**),CP-2(**4**)と命名した化合物を単離し、その全構造を明らかにした(CP: counterpart)。

ESI-MS スペクトルから **3** の分子量は 475 で **1** のそれより 2 Da 大きい。通常の NMR スペクトル解析から、その平面構造およびデカリン部相対構造を決定した。H-13 シグナルは 3.7 ppm と高周波に現れたことから、25 位カルボニル基から非遮蔽を受ける *E*-配置と決定した。また、H-6/H-17 間に NOE を観測し、16 位相対立体化学を決定した。さらに DFT 計算によりこれらを確認した。

4 は正イオン検出法で *m/z* 474 を最大シグナルとして与えたが、陰イオン検出スペクトルの解析から、上記イオンは脱水体に由来することが判明、分子量は 491 であった。即ち、**4** は、**3** より 16 Da 大きい。^{1}H NMR スペクトルは **3** のそれと極めて似ており、解析の結果 **4** は **3** の 16 位アルコール体であると推定した。しかし、18 位メチレンプロトンは **3** のそれに比べ 0.2 ppm ほど低周波側にシフトしていた。これは C2C3 二重結合による遮蔽効果で説明でき、図に示した配置を推定、更に C17-C22 側鎖メチレンと 1 位メチル基との間に NOE を観測しこれを確認した。両化合物は 250 nm 付近に負のコットン効果を示し、これを DFT 計算により再現することで絶対配置を確認した。発表では、**3** のデカリン部のヒドリンダン骨格への環縮小についても言及する。



1) Tanaka, S.et al., *J. Org. Chem*. **2017**, *82*, 5574, 2) Tanaka, S.*et. al*., *J. Org. Chem*. **2018**, *83*, 5688, 3) M. Hashimoto et al, *Tetrahedron,* **2016**, *72*, 1400.

cyclohelminthol, ECD analysis, biosynthesis

講演番号：1D5p10
講演日時：3 月 24 日 15:39～ 1 号館 D5 会場

イネのアミド型ファイトアレキシンの病原真菌による代謝
Metabolism of rice amide-type phytoalexins by pathogenic fungi

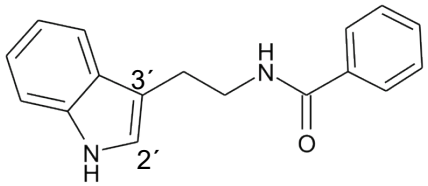
○隠塚 修平、木村 塁、香川 明慶、西脇 萌、戸嶋 浩明、長谷川 守文（茨城大農）
○Shuhei ONZUKA, Rui KIMURA, Akiyoshi KAGAWA, Moe NISHIWAKI, Hiroaki TOSHIMA, Morifumi HASEGAWA (Ibaraki Univ.)

【目的】

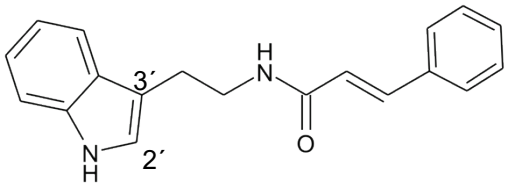
植物は病原菌の感染に対して，低分子抗菌性化合物であるファイトアレキシンを生産する．一方で，植物病原菌はファイトアレキシンを解毒代謝することで抗菌活性を低下させる．イネいもち病菌（*Pyricularia oyzae*）はイネのジテルペン型ファイトアレキシンであるモミラクトン A をジオール化，フラボノイド型ファイトアレキシンのサクラネチンを脱メチル化やヒドロキシ化することで解毒する．しかし，イネ紋枯病菌（*Rhizoctonia solani*）はモミラクトン A をヒドロキシ化，サクラネチンをキシロシル化することで解毒する．病原菌によってファイトアレキシンの代謝産物が異なっているのは，病原菌がそれぞれ独自に代謝能を獲得したためと考えられる．本研究は，イネのアミド型ファイトアレキシンである *N*-ベンゾイルトリプタミン（**1**）と *N*–シンナモイルトリプタミン（**2**）の植物病原菌による代謝産物の単離・構造決定を目的とした．

【方法・結果】

N-ベンゾイルトリプタミンと *N*–シンナモイルトリプタミンを添加したいもち病菌液体培地の抽出液を LC/MS/MS により定量分析したところ，時間経過とともに濃度は低下した．また，LC/MS による分析において，抽出液中からは，それぞれの$[M+H]^+$である *m/z* 265 と *m/z* 291 より 16 大きい *m/z* 281 と *m/z* 307 のイオンを示すピークが検出された．このことから代謝産物は酸化された構造の化合物であることが示唆された．次に培養をスケールアップし，シリカゲルカラムクロマトグラフィーと逆相 HPLC により LC/MS で検出された化合物を単離した．得られた化合物について NMR を用いて構造解析を行ったところ，その構造は **1** および **2** の 2′,3′-エポキシドであると推定された．



N-ベンゾイルトリプタミン（**1**）



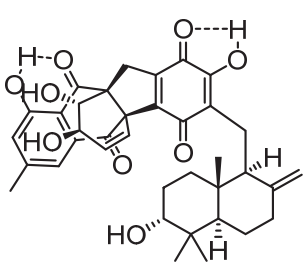
N-シンナモイルトリプタミン（**2**）

phytoalexin, rice, *Pyricularia oryzae*

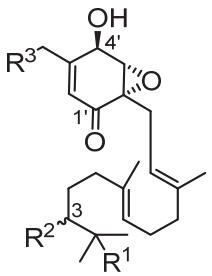
講演番号：1D5p11
講演日時：3 月 24 日 16:00～ 1 号館 D5 会場

*Trichoderma sp.*1212-03 の生産する neomacrophorin 類関連物質の構造について
The structures of secondary metabolites produced by *Trichoderma sp.* 1212-03
○西山 真未、橋本 勝、殿内 暁夫 (弘前大学)
○Mami NISHIYAMA, Masaru HASHIMOTO, Akio TONOUCHI (Hirosaki Univ)

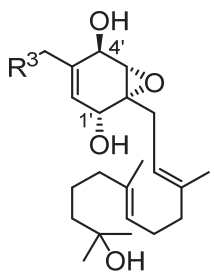
Trichoderma sp.1212-03 は、neomacrophorin X など複数のメロテルペノイドを生産する[1)]。本菌培養液を更に探索したところ、以下に示した 9 種の新規関連化合物を単離した。化合物 **3** は 3 位に関するジアステレオマー比 1:1 の混合物である。これまでに単離した neomacrophorin 類の NMR スペクトルとの比較を中心に構造決定を行った。**1- 4** では ^{1}H-NMR スペクトルにおいて非環式イソプレン特有のアルケニルメチン、及びアルケンに結合したメチル基などを観測し直鎖構造を確認した。**5-9** では他の neomacrophorin 類と同様にドリメン骨格を有していいたが、**5-8** では H-3 オキシメチンプロトンが欠失していた。その後の二次元スペクトルの解析により、**5**, **6** は 3-デオキシ体、**7**, **8** は 3-オキソ体であることが判明した。これまでの研究から **1-3**, **8** 及び **9** の 2'3'-エポキシアルコール部立体化学について、ECD スペクトルによりジアステレオマーを含めて区別できることを明らかにしており、これを活用して決定した。その結果 **8** は、佐々らが報告した macrophorin B[2)]の 4'位に関するジアステレオマーであると判明した。エポキシジオール **4** は対称性が高く UV 領域に明確な発色団をもたないため、ECD スペクトルにおけるコットン効果は期待できない。そこで、モデル化合物を用い可能なジアステレオマーの理論 ^{13}C NMR 化学シフトを密度汎関数計算により求め、実験スペクトルと比較することにより決定した。発表では、これら化合物の構造決定の詳細を報告する。



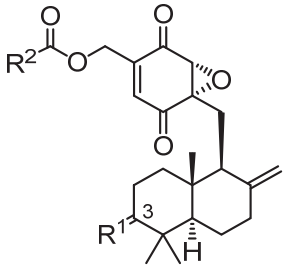
neomacrophorin X



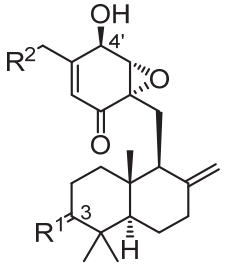
1: R^1 = OH, R^2 = R^3 = H
2: R^1 = OH, R^2 = H, R^3 = $OCOCH_2CH(OH)CH_3$
3: R^1 = R^2 = OH R^3 = H



4



5: R^1 = H_2, R^2 = $CH(OH)CH(OH)CH_3$
6: R^1 = H_2, R^2 = $CH_2CH(OH)CH_3$
7: R^1 = O, R^2 = $CH(OH)CH(OH)CH_3$



8: R^1 = O, R^2 = OH
9: R^1 = OH, R^2 = H

1) Hashimoto, M. *et. al*., *J. Nat. Prod.* **2017,** *80*, 1484-1492., *Tetrahedron*. **2014,** *70*, 1458-1463
2) Sassa T, *et. al*.,Agric. Biol. Chem., 1983, *47*, 187-189.

meroterpenoid, macrophorin, ECD spectrum

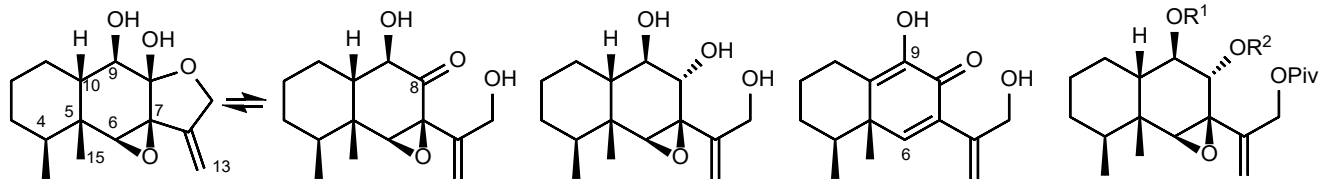
講演番号：1D5p12
講演日時：3 月 24 日 16:11～ 1 号館 D5 会場

Peribysin O, P 及び Q の構造
Structure of peribysin O, P, and Q

○猪瀬 航太[1]、田中 和明[1]、山田 剛司[2]、越野 広雪[3]、橋本 勝[1] ([1]弘前大学農学生命、[2]大阪薬科大学、[3]理研 CSRS)
○Kota INOSE[1], Kazuaki Tanaka[1], Takeshi Yamada[2], Hiroyuki Koshino[3], Masaru Hashimoto[1] ([1]Hirosaki Univ, [2]Osaka Univ. of Pharm. Sci, [3]Riken CSRS)

Periconia macrospinosa KT3863 から三つの新規 eremophilane を単離した。山田らは同属菌から複数の eremophirane 類を単離し peribysin と命名していることから[1)]、これに倣い peribysin O (**1**)、P (**2**)、及び Q (**3**)と命名した。

Peribysin O (**1**)では二次元 NMR スペクトル解析及び、H-10/H_3-15 間に観測した NOE などから, *cis*-eremophirane 構造を推定した。6,7-epoxide の立体配置を通常の NOE 実験から言及することはできなかったが、H-6 を照射して得られる H-13, H_3-14, H_3-15 位の NOE 強度の逆数は、**1** の構造において分子モデリングで得た水素間距離の 6 乗に良い相関（R = 0.96）を示したことからその配置を推定した。最終的に X 線結晶解析により推定した相対構造を確認した。絶対配置は 9 位を MTPA エステルとした後、新 Mosher 法により決定した。**1** は、重クロロホルム中では 8 位ケタールが開裂し、ケト体 **1'**が 5%ほど存在することを明らかにした。同様な NMR 解析により peribysin P (**2**) の相対構造を決定した。絶対配置を MTPA エステル **4** に変換後、新 Mosher 法により推定、さらに、ジベンゾアート **5** において負の ECD 分裂を観測して確認した。Peribysin Q (**3**)の ^{1}H NMR スペクトルでは、オキシメチン水素のシグナルが観測されず、HMQC, HMBC スペクトルの解析からアルケンとなっていることが示唆された。H-6 は C4, C5 及び C7 に HMBC 相関を与えたことからこれを帰属した。H_3-14/H_3-15 間に NOE を観測し、二つのメチル基は *syn* 配置と決定した。密度汎関数を用いた理論 ECD スペクトルは実験 ECD スペクトルを再現し、その絶対配置を確認した。**1-3** の可能な全ての異性体について、密度汎関数法により ^{13}C 化学シフトを計算、比較したところ、推定構造が最も支持された。



1 **1'** **2** **3** **4**: R^1 = MTPA, R^2 = H; **5**: R^1 = R^2 = Bz

1) Yamada T. et al., *J. Antibiot.*, **58**, 185-191 (2005).

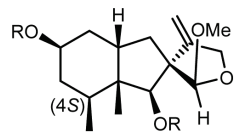
isolation, structure determination

講演番号：1D5p13
講演日時：3 月 24 日 16:22～ 1 号館 D5 会場

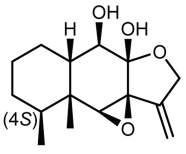
ECD を用いた Peribysin 類の絶対配置に関する再考察
Chiral re-investigation of peribysins based on ECD spectra
○橋本 勝[1]、猪瀬 航太[1]、田中 和明[1]、山田 剛司[2]、越野 広雪[3] ([1]弘前大学農生、[2]大阪薬科大学、[3]理研 CSRS)
○ Masaru HASHIMOTO[1], Kota INOSE[1], Kazuaki TANAKA[1], Takeshi YAMADA[2], Hiroyuki KOSHINO[3] ([1]Hirosaki Univ., [2]Osaka Univ. of Pharm. Sci, [3]Riken CSRS)

先の演者が報告したように、*Periconia macrospinosa* KT3863 の生産する 5,10-*cis*-エレモフィラン peribysin 類はすべて (4*S*)-配置である。これは山田らが海産性真菌 *P. byssoides* OUPS-N133 から単離した peribysin 類の絶対配置と一致する [1)]。さらに山田らは同菌から *cis*-ヒドリンダン構造を有する peribysin E (**1**)を単離、新 Mosher 法により(4*S*)-配置を決定した。**1** はエレモフィラン型 peribysin の環縮小により生合成されたと説明することができ、その絶対配置に矛盾は無い。一方、Danishefsky らは **1** のキラル全合成を通して、(4*R*)-配置に訂正している [2)]。これらの矛盾を解消すべく、peribysin 類の絶対配置について再検討を行った。しかし、*P. byssoides* OUPS-N133 による peribysin 類ストックは十分ではなく、さらに菌による生産能力は低下しており、新たに単離･調製することは困難であった。そこで高感度な ECD（電子円二色性）スペクトル解析を活用した。

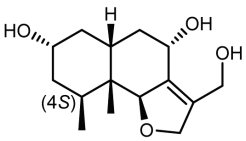
Peribysin E acetate (**1'**), peribysin O (**2**) 及び H (**3**)は、環構造に固定された二重結合を有している。これら化合物は 200 nm 付近に明瞭なコットン効果を示した。観測したコットン効果の波長は孤立二重結合の UV 吸収と合致することから、Scott が提唱した、孤立二重結合（C11C13）に由来するコットン効果と帰属した [3)]。これは C11C13 位二重結合の回転可能な peribisyn 類では明瞭なコットン効果を示さなかったことも符合する。しかし、Scott のオクタント則からキラリティーを議論することは困難であったため、密度汎関数計算によりスペクトルを計算し、全て(4*S*)-配置であることを確認した。以上の結果から Danishefsky らによって(4*R*)-配置に訂正された **1** は、オリジナルの (4*S*)-配置に再訂正すべきと結論した。



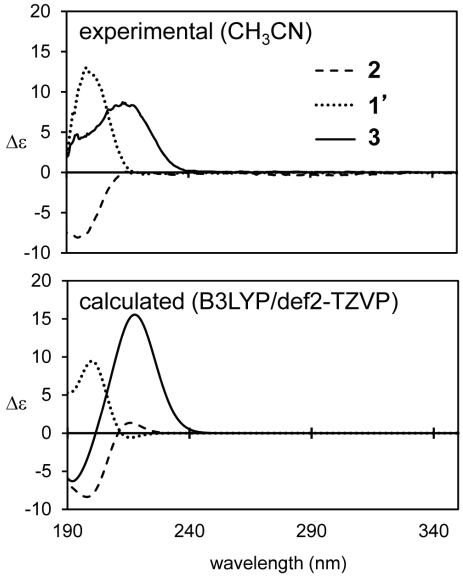
1: R = H, **1'**: R = OAc



2



3



1) T. Yamada *et al*., *J. Antibiot*. **2005**, *58*, 185-191.
2) S. Danishefsky *et al*., *Angew. Chem. Int. Ed*. **2007**, *46*, 1451-1454.
3) A. I. Scott et al., *J. Chem. Soc. Chem. Commun*. **1969**, 1182-1184.

Peribysin, chiral re-investigation, ECD

発表責任者：橋本勝（hmasaru@hirosaki-u.ac.jp）

講演番号：1D7a01
講演日時：3 月 24 日 09:00～ 1 号館 D7 会場

放線菌由来植物アルカロイド分解酵素の機能解析
Characterization of a plant alkaloid-degrading enzyme in actinomycete

○木村 澪、熊野 匠人、栗崎 誠、橋本 義輝、小林 達彦（筑波大院・生命環境）
○Mio KIMURA, Takuto KUMANO, Makoto KURISAKI, Yoshiteru HASHIMOTO, Michihiko KOBAYASHI (Grad. School of Life and Environm. Sci., Univ. of Tsukuba)

【目的】

ピペリンはコショウに含まれる辛味成分で、ピペリン酸にピペリジンが 3 級アミド結合により結合した植物アルカロイドである。ピペリンは抗酸化、抗炎症、抗菌、抗カビ活性に加え、肝臓の薬物代謝酵素阻害活性をもち、薬剤の生物学的利用能を向上させることが知られている。例えば、ウコンに含まれる黄色物質で抗酸化活性を有するクルクミンの場合、ピペリンを同時に摂取すると生物学的利用能が約 20 倍上昇したという報告がある。一方で、ピペリンを分解（代謝）する酵素も存在すると考えられるがこれまで報告されていない。そこで本研究では、3 級アミド結合というユニークな構造を有するピペリンを分解する酵素の同定と機能解明を目的とした。

【方法・結果】

本研究ではまず、ピペリンを単一炭素源とする液体培地を用いて、数回の植継ぎを行う集積培養によって、ピペリン資化能をもつ複数の菌の単離に成功した。次に単離した菌株毎に代謝活性の比較を行った。その結果、最も強いピペリン分解活性を示した菌（以下本菌とする）を 16SrRNA 配列により同定した。本菌をピペリン単一炭素源プレート上で生育させると（プレートに析出した）コロニー周辺のピペリンの結晶が消失することが確認された。従って、本菌はピペリン分解酵素を細胞外に分泌していると示唆された。そこで、本菌培養液上清に硫酸アンモニウムを加え、タンパク質を沈殿させ回収した。得られたタンパク質を透析後、ピペリンとの反応を試みたところ、ピペリンの分解産物と考えられる化合物が検出され、分子量および標品との比較から、分解産物はピペリン酸であることが判明した。また、硫安沈殿により得られたタンパク質を各種カラムクロマトグラフィーに供することで、ピペリン分解酵素を SDS-PAGE 上で単一になるまで精製することができた。今大会では、精製したピペリン分解酵素の諸性質について、酵素動力学的定数、温度、pH 安定性および依存性、金属・低分子化合物（阻害剤）の酵素活性への影響について発表を行う。

plant alkaloid, microorganism, metabolism

講演番号：1D7a02
講演日時：3 月 24 日 09:11～ 1 号館 D7 会場

微生物による赤色色素分解
The microbial degradation of a red pigment
○堀 早苗、熊野 匠人、寺下 柚子、橋本 義輝、小林 達彦（筑波大院・生命環境）
○Sanae HORI, Takuto KUMANO, Yuzu TERASHITA, Yoshiteru HASHIMOTO, Michihiko KOBAYASHI (Grad. School of Life and Environm. Sci., Univ. of Tsukuba)

【目的】
色素は天然・非天然問わず様々な化合物が食品・化粧品・医薬品に幅広く使用されている。それら色素の生体・環境に対する安全性は各種試験により担保されているが、天然においてどのように分解（代謝）されているのかについては酵素・遺伝子レベルではほとんど解明されていない。そこで本研究では、天然由来の赤色色素を基質として、これを資化する微生物を天然から探索し、その代謝経路を酵素レベルで解明することを目的とした。

【方法・結果】
まず、赤色色素を単一の炭素源とする培地を作製し、これに各地より採取した土壌を添加し振盪培養を行った。菌の生育が見られた試験管について、培養液を同組成の培地に植継ぐことを繰り返したのち、同組成の寒天培地に希釈して塗布しコロニーを単離した。そのうちの 1 株で、生育にともない培地の赤色の消失が観察された。本菌は 16SrRNA 遺伝子解析により放線菌の 1 種であると同定された。
本菌を単独培養し、無細胞抽出液を調製して赤色色素とともにインキュベート後、等量のメタノールで反応停止し、高速液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS)に供した。その結果、赤色色素が減少し、反応産物と考えられる化合物が検出された。次に、赤色色素分解酵素の精製を試み、各種カラムクロマトグラフィーを行った。その結果、SDS-PAGE 上で目的酵素のバンドを特定することができた。本発表では、本酵素の酵素動力学的定数や温度・pH に対する安定性・依存性などの諸性質について述べる。

microorganism, metabolism, red pigment

講演番号：1D7a03
講演日時：3 月 24 日 09:22～ 1 号館 D7 会場

Mycobacterium smegamatis が産生する hydrazidase の発見と解析
Discovery and analysis of a hydrazidase from *Mycobacterium smegamatis*
○栄山 新[1,2]、老沼 研一[1,2]、金子 幸弘[1,2] ([1]大阪市大院医・細菌、[2]大阪市大院医・感染科学研セ)
○Arata SAKIYAMA[1,2], Ken-Ichi OINUMA[1,2], Yukihiro KANEKO[1,2] ([1]Osaka City Univ. Grad. Sch. Med., Dpt. Bacteriol, [2]Osaka City Univ., RCIDS)

【目的】イソニコチン酸ヒドラジド（INH）は、結核治療の第一選択薬として使用される医学的に重要な化合物である。INH は結核の原因菌である *Mycobacterium tuberculosis* に対し強い殺菌作用を示すが、非結核性抗酸菌（NTM）に対しては有効性が低い。NTM の INH 耐性メカニズムの一つとして、INH をイソニコチン酸（INA）とヒドラジン（H_2N-NH_2）に加水分解する酵素（hydrazidase）が報告されている。本酵素は 1950 年代に *Mycobacterium avium* から発見され、ある程度の生化学的解析がなされたものの、その後追随する研究報告はなく、遺伝子は未同定のままである。我々は、NTM の INH 耐性メカニズムを検討する過程で、*Mycobacterium smegmatis* も同様の酵素を持つことを示唆するデータを得た。今回、当該酵素の産生条件の検討、および、遺伝子の同定に向けたタンパク質精製を行ったので結果を報告する。

【方法と結果】*M. smegmatis* の無細胞抽出液を用いて INH 分解活性を検討したところ、弱いながらも分解産物である INA の生成が確認された。そこで、本分解反応に関わる酵素の産生を促進する培養条件を検討した結果、Middlebrook 7H9 培地で菌を生育させた後、INH を含み、かつ、窒素源の枯渇した合成培地に植え継ぎ、数時間液体培養することにより、菌体内の酵素量が比活性で 60 倍程度に上昇することが判明した。植え継ぎ後の培地への塩化アンモニウムの添加は、酵素の誘導産生をほぼ完全に抑制した。次に、上述の INA 生成活性を指標に、*M. smegmatis* 無細胞抽出液からの当該酵素の精製を試みた。結果、硫安分画と 4 種類のカラムクロマトグラフィーを組み合わせることにより、培養液 2 L 分の菌体から最終的に 0.027 mg の精製酵素（純度 99%程度）を得ることに成功した。本精製酵素は、2.11 μmol min^{-1} mg^{-1} の INA 生成活性を示し、同時にもう一つの分解産物とみられるヒドラジンを、INA と同等の速度で生成することが確認された。このことから、本酵素はかつて *M. avium* から発見された酵素と同様、INH を基質とする hydrazidase であるものと結論した。現在、MALDI-TOF MS によるタンパク質の同定を試みている。

hydrazidase, Isonicotinic acid hydrazide, mycobacteria

発表責任者：老沼　研一（oinuma.kenichi@med.osaka-cu.ac.jp）

講演番号：1D7a04
講演日時：3 月 24 日 09:33～ 1 号館 D7 会場

乳酸菌 *Lactobacillus sakei* ZH-2 株のアミノ酸ラセマーゼに関する研究
Characteristics of amino acid racemase in *Lactobacillus sakei* ZH-2
○松本 菜月[1]、戦 思彤[2]、金内 誠[1]、佐々木 瞳[1]、レーティゴック ラン[1] ([1]宮城大 食産業、[2]東北大 農)
○Natsuki MATSUMOTO[1], Sitong ZHAN[2], Makoto KANAUCHI[1], Hitomi SASAKI[1], Lan LE THI NGOC[1] ([1]Miyagi Univ., [2]Tohoku Univ.)

【背景及び目的】アミノ酸は、生物のタンパク質等を構成する重要成分である。L 体と光学異性体の D 体が存在するが、タンパク質を構成するすべてのアミノ酸は L 体のため、これまでのアミノ酸の研究対象は L 体が中心であった。近年、分離技術の発達による D-アミノ酸の存在と生体内での機能性が報告され、特に発酵食品には多く含まれている。発酵食品中の D-アミノ酸は乳酸菌中のアミノ酸ラセマーゼ(AARase)が L-アミノ酸を基質として変換することにより生成される。この AARase を利用することにより、D-アミノ酸強化食品の開発を可能にできると考えられる。しかし、D-アミノ酸の生成及び AARase の特性は菌株ごとに異なっており、各菌株の AARase の酵素学的特性や D-アミノ酸の生成との関連性については、未だに解明されていない。そこで本研究では、アミノ酸高生産乳酸菌を分離し、分離株の AARase の特性を酵素学的及び分子生物学的に解析すること目的とした。
【方法】供試菌は、アミノ酸高生産乳酸菌として選抜した ZH-2 株(*Lactobacillus sakei*)を使用した。ZH-2 株中の AARase 活性(L→D)を測定するため、菌体から粗酵素液を抽出した。抽出した粗酵素液は 50mM CHES/NaOH buffer(pH9.0)に溶解した L-アミノ酸と 37℃で 10 分間ラセミ化反応させた。これを 6U/mL D-amino acid oxidase、1mg/mL 3,3'-Diaminobenzidine, tetrahydrochloride、10U/mL Peroxidase を含む混合反応液と 37℃で 10 分間反応させた。反応後、450nm の吸光度を測定した。次に、alanine racemase(ALRase)の酵素学的特性を検討した。TA-Cloning 法により ALRasse 遺伝子(*alr*)をクローニングした。プラスミド pMD20-*alr* を調製し大腸菌コンピテントセルへ導入した。酵素消化法により粗酵素液を抽出し、酵素法に従って ALRase 活性を測定した。更に酵素学的特性試験を行うため、タンパク質発現系を構築した。
【結果】酵素法によって 19 種類の AARase 活性を測定した結果、各種 L-アミノ酸に対して AARase 活性を示したのは 6 種類(Ala、Ser、Arg、Pro、Leu、Val)であった。また、キラルカラム CROWNPAK CR(+)を用いた HPLC 分析によって 2 種類(Glu、Asp)のアミノ酸が AARase 活性を示した。最も高い AARase 活性を示したアミノ酸は L-Alanine であり、13.8U / mg であった。また、TA-Cloning 法によりプラスミド pMD20-*alr* を得た。本プラスミドを導入した *E.coli* DH5α の ALRase 活性は、13.9U /mg であった。一方、非導入株における ALRasse 活性が 1.37U / mg であった。これにより、pMD20-*alr* は形質転換体で発現していることが明らかとなった。また、組換え体タンパク質(*r*ALRase)の発現系について検討した結果、コールドショック発現系システムによって発現することが明らかとなった。

D-amino acid, amino acid racemase, Lactic acid bacteria

講演番号：1D7a05
講演日時：3 月 24 日 09:44～ 1 号館 D7 会場

クチナーゼ Cut190 の機能や安定性に対する二価金属イオンの影響
Effects of divalent metal ions on function and stability of cutinase, Cut190
○千賀 明香音[1]、判谷 吉嗣[1]、木村 優希[2]、河合 冨佐子[3]、織田 昌幸[1] ([1]京府大、[2]京工繊大、[3]岡山大)
○Akane SENGA[1], Yoshiji HANTANI[1], Yuki KIMURA[2], Fusako KAWAI[3], Masayuki ODA[1] ([1]Kyoto Pref. Univ., [2]Kyoto Inst. Technol., [3]Okayama Univ.)

クチナーゼは、ポリエチレンテレフタレート（PET）を加水分解する機能を有し、産業応用が期待される。放線菌 *Saccharomonospora viridis* AHK190 から単離されたクチナーゼ（Cut190）は、Ca^{2+}によってその機能が制御され、活性は 1-5 mM Ca^{2+}存在下、熱安定性は 250 mM 以上の Ca^{2+}存在下において、それぞれ最も高い値を示す。また、Cut190 S226P/R228S（Cut190*）の不活性型 Cut190*S176A を用いた、X 線結晶構造解析と質量分析から、3 ヶ所の Ca^{2+}結合部位を明らかにし、Site 2 と 3 が Zn^{2+}に置き換わった構造も取得した（Biochemistry **57**, 5289, 2018）。さらに，変異体を用いた結合部位の解析により、Site 1 は活性、Site 2 は熱安定性に寄与することを示した（Appl. Microbiol. Biotech. **102**, 10067, 2018）。本研究では、Ca^{2+}を対照として、他の二価金属イオン－Zn^{2+}、Mn^{2+}、Mg^{2+}－が Cut190*の機能や安定性に与える影響を、各金属イオンの結合比や結合力の観点から評価した。

長鎖脂肪族ポリマーpoly(butylate succinate-*co*-adipate) (PBSA) を基質に、金属イオン存在下における活性を測定した。その結果、至適条件である 2.5 mM Ca^{2+}存在下と比較して、0.25 mM Mn^{2+}と 2.5 mM Mg^{2+}存在下で、それぞれ 90%と 40%の活性を維持した。一方で、Zn^{2+}存在下での活性は低かった。等温滴定カロリメトリー(ITC)を用いて各金属イオンの結合を測定した結果、Cut190*S176A との結合比は Mn^{2+}と Mg^{2+}では 1 であるのに対し、Zn^{2+}では 3 であった。結合定数 K_a は、Zn^{2+}、Mn^{2+}では、それぞれ 7.5×10^5、6.9×10^5 M^{-1} であるのに対し、Mg^{2+}では 3.6×10^4 M^{-1} と一桁低い値を示した。一方で、Ca^{2+}との結合熱は観測されず、Mg^{2+}よりも弱い結合であると考えられた。次に、円二色性分散（CD）を用いて、各金属イオンの結合に伴う二次構造と熱安定性の変化を測定した。その結果、Mn^{2+}と Mg^{2+}存在下では Ca^{2+}と同様の CD スペクトルを示した一方、Zn^{2+}存在下では Zn^{2+}濃度増加に伴い、平均モル残基楕円率は減少した。また、熱変性中点温度 T_m は、0.25 mM までは Mn^{2+}、Zn^{2+}の方が Ca^{2+}よりも高いが、2.5 mM 以上では Ca^{2+}の方が高かった。以上の結果より、金属イオン結合部位 3 ヶ所すべてに弱く結合する Ca^{2+}は、Cut190*の機能制御に最適であり、低濃度の Mn^{2+}は Ca^{2+}の代替となると考えられた。Mn^{2+}は、安定性に寄与する Site 2 へ強く結合し、活性に関わる Site 1 へは弱く結合することにより、Cut190*の機能を制御すると推定された。

cutinase, metal binding, PET hydrolyzing enzyme

講演番号：1D7a06
講演日時：3 月 24 日 10:05～ 1 号館 D7 会場

Development of antigen-displaying virus-like particle by SpyTag/SpyCatcher superglue in the silkworm-bacmid expression system

○Jian Xu[1], Hamizah Suhaimi[2], Mikiko Hayashidani[3], Tatsuya Kato[1,2,3], Enoch Y. Park[1,2,3] ([1]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ., [3]Grad. Sch. of Integr. Sci. Technol. Shizuoka Univ.)

Virus-like particles (VLPs) are recognized as versatile tools in biomedical research and vaccines. Genetic fusion of an antigen to a viral coat protein could sometimes create antigen-displaying VLPs, although many drawbacks, *e.g.* uncertain stability and misfolding, remain to be resolved. Recently, it has been proved that the split protein CnaB2 (SpyTag/SpyCatcher) from *Streptococcus pyogenes* can induce covalent conjugation rapidly and efficiently under various conditions. In light of this finding, we introduced SpyTag/SpyCatcher to capsid protein VP2 of *Canine* parvovirus type 2 (CPV-2) and several target antigens respectively and produced them separately in the silkworm-bacmid expression system. We first confirmed that a competent ligation occurred in vivo in silkworm larvae by co-infection of several recombinant viruses. The decorated CPV-VLPs are also achieved by a simple in vitro mixture of purified SpyCatcher-VLP and SpyTag-antigen proteins, *e.g.* EGFP and Profilin from *Neospora caninum*. Our results share an alternative method for mass-production of antigen-displaying VLP vaccines against various diseases.

Virus-like particle, SpyTag/SpyCatcher, Silkworm

発表責任者：Enoch Y. Park（park.enoch@shizuoka.ac.jp）

講演番号：1D7a07
講演日時：3 月 24 日 10:16～ 1 号館 D7 会場

ブチルシアノアクリレートナノ粒子がヤケイロタケのマンガンペルオキシダーゼ生産に与える影響
Effect of butyl cyanoacrylate nanoparticles on manganese peroxidase production by *Bjerkandera adusta*

○神尾 瑞[1]、山田 翔吾[1]、堀沢 栄[1]、飯田 大介[2]、小松 千景[2]([1]高知工科大、[2]チカミミルテック株式会社)
○Mizuki KAMIO[1], Shogo YAMADA[1], Sakae HORISAWA[1], Daisuke IIDA[2], Chikage KOMATSU[2]
([1]Kochi Univ. of Tech., [2]Chikami Miltec inc.)

【目的】ブチルシアノアクリレートは生分解性を持つ、人体に無害な化合物である。イソブチルシアノアクリレートナノ粒子(以下 IBCA ナノ粒子)は、イソブチルシアノアクリレートモノマーを安定化剤の下で重合させることで得られる粒子で、直径を約 20nm～400nm に調製できる。この IBCA ナノ粒子はグラム陽性菌に対して抗菌効果を示すことがわかっている。また、菌糸の増殖速度を低下させることから、真菌類に対して何らかの生理活性を及ぼしていると考えられる。本研究では IBCA ナノ粒子の抗菌性以外の生理活性に着目し、酵素生産の刺激となるのではないかと考えた。今回の研究では担子菌のリグニン分解酵素生産に対する影響を調べた。担子菌への刺激を期待して IBCA ナノ粒子を添加した培地でリグニン分解酵素の高生産株を培養し、マンガンペルオキシターゼ(MnP)生産への影響を調べた。IBCA ナノ粒子の効果によってリグニン分解酵素の生産性を高められることが可能になれば、新しい酵素生産技術として提案できる。

【方法・結果】本研究ではリグニン分解酵素生産菌として、ヤケイロタケ（ *Bjerkandera adusuta* ）Iwa5b 株を用いた。IBCA ナノ粒子はチカミミルテック株式会社で製造された直径 30nm 及び 200nm のもの（ 1.0%、4℃の低温室で保存 ）を用いた。液体培地（ 0.1% Glucase、0.1%NH_4NO_3、0.08%KH_2PO_4、0.02%Na_2HPO_4、0.05%MgSO4・7H2O、0.2%Yeast extract ）を 200ml フラスコに 60ml 調製した。比較対象として IBCA ナノ粒子の代わりに蒸留水を加えた培地を調製した。加熱・ろ過滅菌した IBCA ナノ粒子を終濃度 0.05%、0.1%、0.2% となるように加えた。培地で前培養した Iwa5b のコルクボーラーで打ち抜いた菌糸片を種菌として接種した。インキュベーター内で回転培養を行い、2 日置きに培養液を採取した。分光光度計を用い、グアヤコールを基質として培養液中の MnP 活性を測定した。培養期間は 14 日を基本とし、繰り返し条件は 3 とした。

30nm のナノ粒子を添加した条件においては比較対象(水)よりも MnP 生産開始および生産量ピークは遅れ、その量は増加した。一方、ピーク後の MnP 活性は減少した。200nm 条件では比較対象よりも MnP 生産のピークは遅くなり、その量に有意な増加はなかった。一方、ピーク後の MnP 活性は維持された。

IBCA ナノ粒子の濃度変化と MnP 生産量への影響を調べた。30nm においては 0.2%濃度の時 MnP 生産のピークはさらに遅くなったが、その量は 0.1%時より増加した。200nm においては濃度変化において、0.1%時の MnP 生産量と有意な差は見られなかった。よって、IBCA ナノ粒子は粒径と濃度によってヤケイロタケの MnP 生産に及ぼす影響が異なることがわかった。

Cyanoacrylate nanoparticles, Manganese peroxidase, *Bjerkandera adusuta*

発表責任者：堀沢栄（horisawa.sakae@kochi-tech.ac.jp）

講演番号：1D7a08
講演日時：3 月 24 日 10:27～ 1 号館 D7 会場

Gluconobacter 属酢酸菌の膜結合型グルコース脱水素酵素の高発現によるラクトースの高速酸化
High-speed lactose oxidation via overexpression of the membrane-bound glucose dehydrogenase from *Gluconobacter* spp., acetic acid bacteria

ケオケン トラポン[1]、内田 侑里[2]、桐生 高明[3]、松谷 峰之介[4]、片岡 尚也[2,4,5]、松下 一信[2,4,5]、○薬師 寿治[2,4,5] ([1]ラオス国立大、[2]山口大農、[3]大阪産技研、[4]山口大院創成科学、[5]山口大中高温微セ)
Toulaphone KEOKENE[1], Yuri UCHIDA[2], Takaaki KIRYU[3], Minenosuke MATSUTANI[4], Naoya KATAOKA[2,4,5], Kazunobu MATSUSHITA[2,4,5], ○Toshiharu YAKUSHI[2,4,5] ([1]Natl. Univ. Laos, [2]Fac. Agr. Yamaguchi Univ., [3]Osaka Res. Inst. Ind. Sci. Tech., [4]Grad. Sch. Yamaguchi Univ., [5]RCTMR Yamaguchi Univ.)

【背景・目的】ラクトースの酸化産物であるラクトビオン酸は，腸内細菌叢の改善を目的に機能性食品や医療サプリメントとして，また保湿剤として化粧品領域での利用価値が期待される。食経験のある酢酸菌を利用してラクトースからのラクトビオン酸生産が検討されてきており，その責任酵素が膜結合性 PQQ 依存型グルコース脱水素酵素（GDH）であることが報告されている[1]。しかしながら，ラクトースに対する GDH の反応性は極めて低いため，野生型酢酸菌を用いると長時間の反応が要求される。あるいは，高密度の菌体を調製する必要がある。本研究では，酢酸菌を宿主として GDH の高発現株を作製し，短時間での酢酸菌によるラクトース酸化を検討したので報告する。
【方法・結果】*Gluconobacter frateurii* NBRC3285, *Gluconobacter oxydans* NBRC3292, NBRC3293, NBRC3293 の GDH 破壊株, この 4 菌株の休止菌体を用いて, ラクトースの酸化を行った。NBRC3285 が最も成績が良く，84 μM/h/OD でラクトビオン酸を生産した。NBRC3293 株は比較的遅くラクトビオン酸を生産したが，その GDH 破壊株ではほとんど生産を認めることは出来なかった。GDH 破壊株に *G. oxydans* 621H 株由来の GDH ならびに耐熱性 *Gluconobacter* sp. CHM43 株由来の GDH を発現させた。NBRC3293 野生株と比べ，GDH^{621H} 発現株は約 40 倍，GDH^{CHM43} 発現株は約 30 倍の GDH 活性を示した。高発現株の休止菌体を用いてラクトースの酸化を行ったところ，GDH^{621H} 高発現株は 190 μM/h/OD, GDH^{CHM43} 高発現株は 330 μM/h/OD でラクトビオン酸を生産した。すなわち，グルコースの酸化が低い GDH^{CHM43} 高発現株の方がラクトビオン酸の生産速度が高かった。膜画分を用いてラクトース脱水素酵素活性を測定したところ, グルコースに対して GDH^{621H} 高発現株は 0.15%, GDH^{CHM43} 高発現株は 0.93%の相対活性を示した。この結果から，GDH^{CHM43} 高発現株の方がラクトビオン酸の生産効率が高いことが説明できると考察した。GDH^{CHM43} 高発現株の膜画分を用いて，グルコースとラクトースに対する K_M 値を求めたところ，グルコースは 1.9 mM となり，既報に近かった[2]。一方，ラクトースでは活性がラクトース濃度依存的に上昇し，K_M 値の算出が出来なかった。以上より，GDH はラクトースに対する親和性と反応性が極めて低いものの，確かにラクトビオン酸生産に直接的に関わっていることが示された。また，このような酵素であっても高発現することによって，バイオトランスフォーメーションに利用可能であることがわかった。
[1] 桐生ら，日本農芸化学会 2015 年度大会, [2] Ameyama et al. (1981) Agric Biol Chem 45:851.

acetic acid bacteria, lactobionic acid, PQQ

発表責任者：薬師寿治（juji@yamaguchi-u.ac.jp）

講演番号：1D7a09
講演日時：3 月 24 日 10:38～ 1 号館 D7 会場

酢酸菌 *Komagatabacter europaeus* を宿主とする物質生産の試み

Trial of heterogeneous gene expression in acetic acid bacteria

○植川 泰好[1]、繁 宥樹[1]、東久保 遥[1]、石井 友理[1]、赤坂 直紀[2]、佐古田 久雄[2]、福田 青郎[1]、藤原 伸介[1] ([1]関西学院大理工、[2](株)マルカン酢)
○Yasuyoshi UEKAWA[1], Yuki SHIGE[1], Haruka HIGASHIKUBO[1], Yuri ISHII[1], Naoki AKASAKA[2], Hisao SAKOTA[2], Wakao FUKUDA[1], Shinsuke FUJIWARA[1] ([1]Kwansei-Gakuin Univ. of Sci. and Tec., [2]Marukan Vineger Co., Ltd.)

[研究目的] 酢酸菌 *Komagataeibacter europaeus* は食酢製造に広く用いられている。本菌は通気撹拌培養が可能であり、十分な菌体収量を確保する事ができる。更に *K. europaeus* KGMA0119 株 (野生株) には 3 種の潜在性プラスミドが存在し、独立の安定なレプリコンとして機能する (1)。酢酸菌はエタノール酸化により酢酸を産生し、外環境 pH の低下を招き、他の微生物の繁殖を防ぐ。特に本菌は、培地 pH は低下させる一方で、細胞内の pH は定常期初期まで 5 以上に保たれることが示されている (2)。しかし定常期以降の細胞内 pH は 5 を下回る。実際に大腸菌由来 β-ガラクトシダーゼ (β-Gal) を酢酸菌細胞内で発現させたところ、対数増殖期には高い β-Gal 活性が検出されたが、定常期において顕著に活性が減少した。この現象は細胞内に流入した酢酸の影響だと考えられる。そこで定常期における β-Gal 活性を回復させるため、超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* 由来の分子シャペロニン CpkA もしくは CpkB との共発現を試みた。
[実験結果と考察] β-ラクタマーゼ遺伝子プロモーターの直下に β-Gal 遺伝子、および pUC19 由来ラクトースオペロンプロモーターの直下に分子シャペロニン遺伝子 (*cpkA* または *cpkB*) を導入したプラスミドをそれぞれ構築し、これら遺伝子を酢酸菌に導入した。これらの株の細胞を経時的に採取し β-Gal 活性の変動を評価したところ、β-Gal 導入した株では活性が対数増殖期から定常期になるに従い低下したのに対し、CpkA または CpkB を β-Gal と共発現させることで、定常期においても高い β-Gal 活性が検出された。特に CpkA 共発現株よりも CpkB 共発現株の方が高い β-Gal 活性を示した。CpkB は CpkA に比べ標的分子認識部位が酸性アミノ酸に富んでいることから、細胞内に流入した酸によって正に荷電した標的分子は優先的に CpkB に捕捉されたのではないかと考えられた。これまでに CpkB は中性環境下において、塩基性タグ S1(GGRRGR) を有する分子を優先的に補足することが知られている (3)。そこで CpkB の効果をより増強するため β-Gal に塩基性タグを付加した。この塩基性タグ付加によって、定常期において β-Gal 活性が大幅に上昇した。しかし塩基性タグ付き β-Gal の活性は CpkA または CpkB 共発現下では相乗効果は見られなかった。このように、*T. kodakarensis* 由来シャペロニンや塩基性タグが酢酸菌内での異種タンパク質の安定化に寄与することが明らかになったが、その一方で酸性環境下において複合的な安定化効果を得るには、発現タンパク質の種類が重要であると示唆された。

[参考文献] (1) Akasaka, N., *et al*., J. Biosci. Bioeng., **119**, 661 (2015) (2) 繁宥樹ら., 第 69 回日本生物工学大会要旨集., p.121. (2017) (3) Gao, L., *et al.*, J. Biosci. Bioeng.124, 283-288 (2017)

Gene expression, Acetic acid bacteria, Host

発表責任者：藤原伸介（fujiwara-s@kwansei.ac.jp）

講演番号：1D7a10
講演日時：3 月 24 日 10:49～ 1 号館 D7 会場

Pseudomonas citronellolis LA18T 株由来レブリニル CoA 合成酵素の解析
Characterization of levulinyl-CoA synthetase from *Pseudomonas citronellolis* LA18T

○羽部 浩[1]、佐藤 由也[1]、小池 英明[2]、飯村 洋介[1]、堀 知行[1]、菅野 学[2]、木村 信忠[2]、桐村 光太郎[3]([1]産総研・環境管理、[2]産総研・生物プロセス、[3]早稲田・応化)
○Hiroshi HABE[1], Yuya SATO[1], Hideaki KOIKE[2], Yosuke IIMURA[1], Tomoyuki HORI[1], Manabu KANNO[2], Nobutada KIMURA[2], Koutaro KIRIMURA[3] ([1]AIST, EMRI, [2]AIST, BPRI, [3]Waseda Univ.)

【背景・目的】レブリン酸（LA）は、木質バイオマスからハイブリッド酸触媒等により 1 段階で合成可能な基幹化合物であり、杉木粉から対セルロース収率 86%で LA が製造できる[1)]。既に GFBiochemicals 社では、バイオマス由来 LA を商用スケールで生産しており、今後 LA が安価かつ大量に供給されれば、糖に続くセルロース由来基幹物質として LA も注目される可能性がある。LA を基質としたバイオ変換により、従来の糖プラットフォームや LA の化学触媒反応では製造が難しい化学品の生産が期待されるが、現在までに LA の微生物代謝系酵素や遺伝子に関する知見は非常に少ない。そこで我々は LA 資化菌を探索し、単離された *Pseudomonas citronellolis* LA18T 株[2)]の LA 代謝系を調べるため、ドラフトゲノム解析等を進めてきた[3)]。昨年度本大会では、比較トランスクリプトーム解析によって明らかにした、LA 生育時に高発現する遺伝子クラスターについて報告している。
【実験・結果】LA18T 株で取得されたゲノム領域には、*P. putida* KT2440 株の LA 代謝系遺伝子群（*lvaABCDEFG*）と相同性を有する遺伝子群が存在した。このうち、KT2440 株の LA 初発変換反応に関与するレブリニル CoA（LA-CoA）合成酵素（LvaE）とアミノ酸レベルで 35%の相同性を示す遺伝子が見出されたため、*lvaE2* と命名した。*lvaE2* 遺伝子を pCold ベクター（タカラ）に連結したプラスミドで大腸菌 JM109 株あるいは DH5α株を形質転換し、各種発現条件検討、SDS-PAGE 解析を行ったところ、いずれの大腸菌においても可溶性画分での LvaE2 タンパク生産が確認された。大腸菌粗酵素、ATP、補酵素 A（HS-CoA）を用い、LA から LA-CoA への変換反応を行ったところ、液体クロマトグラフィーにより、経時的な LA-CoA ピークの増加および HS-CoA ピークの減少が確認された。一方、コントロールである pCold ベクターのみを保持した大腸菌粗酵素では LA-CoA の生成は見られなかった。加えて、反応系から ATP あるいは HS-CoA を除いた場合も、LA の生成は確認されなかった。さらに、*lvaE2* 開始コドンの下流 30 bp にもう一つ可能性のある開始コドンが存在したため、5’末端を 30 bp 短くした領域での発現を試みたが、発現も LA-CoA 合成活性も確認されなかった。以上より、LvaE2 は、LvaE と相同性が比較的低く、分子系統的には異なる LA-CoA 合成酵素であることが明らかとなった。LvaE2 と LvaE についてはモデリングを行い、推定立体構造の観点から比較・検討することで、LA-CoA 合成酵素としての両者の相違点について考察した。

1)Nemoto *et al.* (2015) Bull. Chem. Soc. Jpn. 88: 1752、2)Habe *et al.* (2015) Bioresour. Technol. 177: 381、3)Inaba *et al.* (2018) Microbiol. Resour. Announc. 7(5):e00906-18.

Levulinic acid, Biomass conversion, Fatty acid CoA synthetase

講演番号：1D7a11
講演日時：3 月 24 日 11:10～ 1 号館 D7 会場

Cloning and sequencing analysis of chitinase and AA10 protein genes in chitinase system of Serratia plymuthica SWSY-3.47

○ IULIIA PENTEKHINA[1,2], DINH MINH TRAN[3], TATSUYUKI HATTORI[1], TAKESHI WATANABE[1], HAYUKI SUGIMOTO[1], KAZUSHI SUZUKI[1] ([1]Niigata University, Niigata, Japan, [2]Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia, [3]Tay Nguyen University, Buon Ma Thuot City, Vietnam)

Chitinases are enzymes that able to degrade the chitin, one of the most insoluble polysaccharides in the environment. Chitinolytic bacteria produce chitinases and play a considerable role in the chitin degrading process. Moreover, chitinolytic bacteria and their chitinases are increasingly being used as inhibitors the pathogenic fungi, especially, in agriculture. To find a novel type of chitinolytic bacteria, we isolated and screened more than 5,000 strains from Sakata, a sand dune lake, in Niigata, Japan. Among of four isolates which showed high chitinase activity, biofilm formation, and based on phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene by sequencing, bacterial strain SWSY-3.47 (*Serratia plymuthica*) showed the highest chitinase and antifungal activities. Comparison of the results between *Serratia plymuthica* SWSY-3.47 and well known chitinolytic bacterium *Serratia marcescens* 2170 of antifungal activity against *Trichoderma reesei* using crude proteins indicated that isolated strain exhibited the strongest inhibition of hyphal extension. To determine the difference in chitinase system of mentioned strains, we designed primers for identification of chitinase genes related to GH18 and GH19 chitinases and auxiliary activities family 10 (AA10) proteins in *S. plymuthica* SWSY-3.47. The amplification products were cloned into *Escherichia coli* DH5α harboring pUC19 plasmids and completely sequenced. Sequencing results showed that the chitinase system of *S. plymuthica* SWSY-3.47 consists of five genes appropriate to GH18 chitinases and four genes appropriate to AA10 proteins. Currently, we construct the expression and purification systems for these enzymes for further characterization of purified enzymes and establishing the most important chitinases of *S. plymuthica* SWSY-3.47 involved in chitin degradation.

Serratia plymuthica, chitinase, auxiliary activities family 10

講演番号：1D7a12
講演日時：3 月 24 日 11:21～ 1 号館 D7 会場

Heterologous production and analysis of cellular responses to the expression of GH11 xylanase from a symbiotic protist in the lower termite

○Minh Trang PHAM[1], Gaku TOKUDA[2], Hirofumi WATANABE[3], Minoru YOSHIDA[1,4,5], Manabu ARIOKA[1,4] ([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]Univ. of the Ryukyus, [3]Nat. Inst. Agrobiol. Sci., [4]CRIIM, UTokyo, [5]RIKEN CSRS)

Xylan is the most abundant non-cellulosic polysaccharide in nature. It constitutes the predominant hemicellulose in plants cell wall and accounts for nearly one-third of renewable organic carbon source. Xylanase, which is required for xylan degradation, therefore, is in high demand for bio-fuel production and other related industrial application. In this study, cDNA encoding CfXyn11-3A, a GH11 xylanase from the symbiotic protist of lower termite *Coptothermes formosanus,* was cloned and expressed in the Origami (DE3) strain of *Escherichia coli*. His-tagged fusion protein produced in a soluble form in the cell extract was purified by Ni-NTA column chromatography and used for biochemical characterization. It was active over a broad range of temperature (20-70℃) and pH (5-9) with the optimum activity at 50℃ and pH 7. This enzyme showed activity for beechwood xylan with K_m and V_{max} of 2.351 mg.mL^{-1} and 0.048 U.mg^{-1}, respectively. The hydrolysis of xylohexaose released xylotriose and larger oligosaccharides. To our knowledge, this is the first GH11 xylanase from a protist in the symbiont of lower termite, which has been heterologously expressed and characterized, although the kinetic parameters were lower compared to those of the native enzyme.

Since CfXyn11-3A has an eukaryotic origin, we assumed that the eukaryotic host might be better suited for its expression. We therefore expressed it in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a promising host candidate for bio-fuel production. CfXyn11-3A was expressed in different strain backgrounds using prepro-alpha factor sequence and Kex2 processing site added at the N-terminus as a carrier for secretory production. Interestingly, among all the host strains used in this study, only in the strain deleted for *PEP4* encoding the vacuolar protease, pro-sequence-processed CfXyn11-3A (EGFP) was produced. The dependence of this processing on Kex2 is being analyzed. Moreover, when expressed under the control of the constitutive *GAP* promoter, CfXyn11-3A was partially produced in a soluble form, and a small amount of the protein was secreted to the culture medium; meanwhile it was insoluble and formed punctate structures in the cells when expressed under the control of the *GAL1* promoter. These findings suggest that both Pep4 and protein expression levels are the factors in determining the productivity of the heterologous protein.

GH11 xylanase, Termite, Cellular response

発表責任者：Manabu Arioka（arioka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：1D7a13
講演日時：3 月 24 日 11:32～ 1 号館 D7 会場

Clostridium perfringens の T7 発現系による cellulosome 構成酵素の発現
Analysis of cellulosomal enzymes using *Clostridium perfringens* T7 expressiion system
○澤入 駿哉、川畑 博暉、加藤 実希、森山 龍一、宮田 茂 (中部大・応生)
○Shunya SAWAIRI, Hiroki KAWAHATA, Miki KATO, Ryuichi MORIYAMA, Shigeru MIYATA (Coll. Biosci. Biotech., Chubu Univ.)

【目的】

Clostridium 属細菌は遺伝子が極端に AT-rich であるため、大腸菌などの発現系では特に高分子量タンパク質の発現が困難である。Clostridial protein の高発現を目指し、我々は今までに *C. perfringens* を用いて T7 発現系を開発してきた。致死毒素遺伝子であるα毒素の遺伝子座に *C. perfringens* の低頻度コドンを高頻度コドンに置換した T7 RNA polymerase 遺伝子を挿入し、培養上清中のメジャータンパク質を欠失させた mT7VI 株を作製した。更に、inducer として用いているキシロースの取り込み系遺伝子を *C. beijerinckii* からクローニングし、低キシロース濃度でのレスポンスを改善した XmT7VI 株を作製した。それぞれ大きさや分泌性の異なる 3 種の Clostridial protein である NanH, EglA 及び NagH の発現に成功した。今回、mT7VI 株で EglA 同様 cellulase の一種である CA_C0912 及び CA_C0913 を発現して活性を比較し、広範な組換えタンパクの発現が可能であることに加え、cellulose 分解の研究に応用できる可能性を検討した。

【方法・結果】

C. acetobutylicum の cellulosome 構成酵素遺伝子である CA_C0912 及び CA_C0913 を pCC13 の T7 プロモーター下流に挿入し、発現プラスミドを構築した。キシロースにより T7 RNA ポリメラーゼの発現が誘導される mT7VI 株をこれらのプラスミドで形質転換し、発現誘導後、SDS-PAGE で培養上清中の発現産物を解析するとともに、cellulase 活性を調べた。その結果、CA_C0913 では培養液中に発現産物が観察され、高い endoglucanase 活性が検出された。一方、CA_C0912 では培養液中に発現産物が観察されなかった。データベースに登録された配列及びゲノム・ダイレクト・シークエンシングの結果では、CA_C0912 には明確なリボソーム結合部位やシグナル配列は観察されなかった。シグナル配列中でフレームシフト変異を起こしていると考えられたので、現在、フレームの修正とその他の cellulosome 構成酵素遺伝子の発現を検討している。

Clostridium perfringens, T7 expression system, cellulosome

講演番号：1D7a14
講演日時：3 月 24 日 11:43～ 1 号館 D7 会場

ウェルシュ菌のグリセロール代謝経路と水素生産

Metabolic engineering of *Clostridium perfringens* for the production of hydrogen from glycerol

○加藤 実希、澤入 駿哉、矢野 智奈美、和田 俊夫、宮田 茂（中部大院・応生）
○Miki KATO, Shunya KAWANO, Chinami Yano, Toshio Wada, Shigeru MIYATA (Grad. Sch. Biosci. Biotech., Chubu Univ.)

【目的】
C. perfringens は、ガス壊疽の起因菌であり、嫌気要求度の低い偏性嫌気性菌である。現在知られている細菌のなかで最も速い増殖速度を示す。旺盛な有機物分解能を有し、増殖時に H_2 : CO_2 = 1 : 1 からなるガスを産生する。以前、我々はグルコースを炭素源として用いた場合、D-, L-lactate dehydrogenase 遺伝子及び aldehyde-alcohol dehydrogenase E 遺伝子の欠失が水素生産量の向上に大きく寄与することを示した。そこで今回、グリセロールを炭素源として用いた場合の代謝産物を調べ、代謝経路の遺伝子の欠失が水素産生に及ぼす影響を解析した。
【方法及び結果】
C. perfringens 13（CP13）をグリセロール含有培地で培養した結果、グルコース含有培地の場合と比較して、大幅に生育が抑制された。シリンジ・カルチャーによりトータル・ガス量を調べた結果、グルコース含有培地と比較して、グリセロール含有培地ではガス産生量が大幅に低下した。グリセロール含有培地で、37℃、7 時間培養後の培養上清をガスクロマトグラフィーで調べた結果、0.44% の 1,3-プロパンジオールが含まれていた。次に、当研究室で開発したゲノム編集法を用いてグリセロールから 1,3-プロパンジオールへと代謝する初発酵素である glycerol dehydratase 遺伝子（CPE0929, 0930, 0931; *pduCDE*）を欠失させた *C. perfringens* 13 pdu 株（CP13-pdu）を構築した。CP13-pdu は、グルコース含有培地で CP13 と同等な生育速度及びガス産生量を示したのに対し、グリセロール含有培地では CP13 と比較してガス産生量の向上と静止期の菌濃度の上昇が認められた。グリセロール代謝経路が解糖系に傾き ATP 量と NADH 量が増加したためであると考えられた。

Clostridium perfringens, glycerol metabolism, genome-editing

講演番号：1D7a15
講演日時：3 月 24 日 11:54～ 1 号館 D7 会場

枯草菌クオルモン修飾酵素 ComQ の基質認識を担うアミノ酸残基の探索と解析

Analysis of amino acid residues involved in substrate recognition of a quormone-modifying enzyme, ComQ, in *Bacillus subtilis*

○塩田 紗希[1]、広岡 和丈[1,2]（[1]福山大院工、[2]福山大生命工・生物工）
○Saki SHIODA[1], Kazutake HIROOKA[1,2] ([1]Grad. Sch. Eng., Fukuyama Univ., [2]Dept. Biotech., Fukuyama Univ.)

【目的】細菌はクオラムセンシング（QS）機構によって周囲の同族細胞密度を感知して、各種の遺伝子発現を調節し、バイオフィルム形成を始めとした様々な現象を集団的に誘導する。枯草菌は、細胞密度を感知するためのシグナル分子（クオルモン）として主に ComX ペプチドを分泌し、同族種の生産する ComX のみを ComPA 二成分制御系を介して特異的に認識し、特定の遺伝子群の発現誘導（QS 応答）を行う。枯草菌亜種ごとに ComX 配列は異なるが特定のトリプトファン残基は保存されており、この残基は C_{10} または C_{15} のプレニル修飾を受ける。この修飾反応は ComQ によって行われ、いずれかの鎖長のプレニル二リン酸が基質として用いられる。したがって、ComQ は ComX 配列とプレニル二リン酸鎖長の両方を特異的に認識していることになる。この認識機構を明らかにすることを目的に、これまでの研究で C_{10} または C_{15} 型 ComX をもつ枯草菌 RO-E-2 株および 168 株の ComQX からキメラ型 ComQX を作製し、基質認識特異性の改変を試みたが、活性を有するものを得ることはできなかった。そこで本研究では、枯草菌数種で ComQ のアミノ酸配列の比較を行い、C_{15} 型間と C_{10} 型間では共通するが、C_{15} 型と C_{10} 型では異なるアミノ酸残基を抽出し、RO-E-2 株 ComQ（C_{10} 型）内で対応するアミノ酸残基を 168 株のもの（C_{15} 型）に置換し、活性に重要なアミノ酸残基の探索を行った。
【実験および結果】RO-E-2 株 ComQ 内の選出したアミノ酸残基を置換するために、PCR を用いて RO-E-2 株 *comQX* 遺伝子に点変異導入を行った。構築した各変異型 *comQX* 遺伝子を発現させた大腸菌を、自身は ComX を生産できないが C_{10} または C_{15} 型 ComX に応答して *lacZ* レポーター活性が誘導される 2 種類の枯草菌テスター株と X-Gal を含む固体培地で共培養し、いずれのテスター株の LacZ 活性が誘導されるかを調べた。その結果、構築した 8 種類の変異体のうち、I49A、T92L、P134S、T152I、および K202N 変異体では野生型と同様に RO-E-2 型テスター株のみが応答を示し、F63S、N186G、および G190V 変異体ではいずれのテスター株も応答を示さなかった。さらに Phe-63 を種々のアミノ酸残基に置換して解析したところ、F63I 変異体は野生型と同じ活性を示し、F63V 変異体では活性は消失した。これらの結果から、推定プレニル二リン酸結合モチーフ上流に位置する 63 位のアミノ酸が嵩高い疎水性残基であることが活性に必要であり、これが C_{10} プレニル鎖と相互作用することが示唆された。また Asn-186 と Gly-190 は RO-E-2 ComQ の推定 ComX 認識部位に含まれており、これらのアミノ酸残基の置換が ComX 認識に影響を及ぼしたと考えられた。

quorum sensing, prenyltransferase, *Bacillus subtilis*

発表責任者：広岡和丈（hirooka@fukuyama-u.ac.jp）

講演番号：1D7p01
講演日時：3 月 24 日 13:50～ 1 号館 D7 会場

Geraniol dehydrogenase の異種発現による *Acinetobacter* sp. Tol 5 の citral 生物変換に関わる代謝経路の同定

Heterologous expression of geraniol dehydrogenase for identifying the metabolic pathways involved in the biotransformation of citral by *Acinetobacter* sp. Tol 5

○宇佐見 享嗣、石川 聖人、堀 克敏（名大院工）
○Atsushi USAMI, Masahito ISHIKAWA, Katsutoshi HORI (Nagoya Univ.)

【目的】

香料、医薬、機能性食品、工業原料として重要な monoterpenoid である citral の生物変換は、これまで多くの微生物を生体触媒として利用し広範に研究されてきた。しかし、citral は *trans* 体の geranial と *cis* 体の neral の混合物であり、容易に転化や自然酸化する不安定な化合物のため、その生体内変換に関わる代謝経路は不明であった。そこで、我々は geranial と neral のより安定な前駆体 (geraniol と nerol) を利用すれば、代謝経路を明らかにできると考えた。本研究では、 geraniol を geranial に、nerol を neral に特異的に変換する geraniol dehydrogenase をコードする遺伝子 *geoA* の異種発現によって、citral の生体内変換に関与する代謝経路の同定を目的とした。

【方法・結果】

本研究の有用性を実証するために、多様な化合物に対し耐性と代謝能力を有し、*geoA* のオルソログを持たず、遺伝子組換え手法が確立している *Acinetobacter* sp. Tol 5 を生体触媒に用いた。生物変換の継時変化は GC-MS にて分析し、変換化合物を解析した。変換化合物は GC-MS による同定および単離精製し NMR、旋光計、フーリエ変換赤外分光光度計等の機器分析により構造決定した。その結果、Tol 5 株は citral を (1*R*,3*R*,4*R*)-1-methyl-4-(1-methylethenyl)-1,3-cyclohexanediol (MMC) と geranic acid に変換した。生物変換における MMC の検出は初となった。続いて、 *geoA* を発現する Tol 5 形質転換体を作成し、 citral の前駆体 (geraniol および nerol) を基質に用いた生物変換の結果、変換化合物は geranial から特異的に生産し、neral に対し Tol 5 株は変換能力を有しないことを明らかにした [1)]。これらの結果から我々の方法論は、不安定で幾何異性体を含む基質の生体内変換に関与する代謝経路のより良い理解を促進することが示唆された。

【参考文献】

1) Usami A. Ishikawa M. Hori K. Heterologous expression of geraniol dehydrogenase for identifying the metabolic pathways involved in the biotransformation of citral by *Acinetobacter* sp. Tol 5. Biosci Biotech Biochem. 2018;82: 2012-2020.

biotransformation, heterologous expression, *Acinetobacter* sp. Tol 5

講演番号：1D7p02
講演日時：3 月 24 日 14:01～ 1 号館 D7 会場

配糖化酵素遺伝子のクローニングと形質転換体によるリナロールなどのアルコールへの反応
Cloning and expression of α-glucosidase genes, which catalyze transglucosylation of linalool.

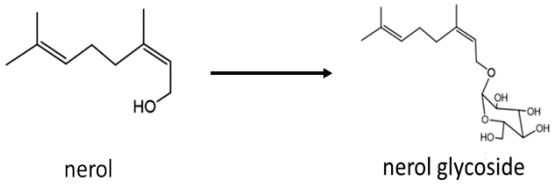
○鈴木 達也[1]、深谷 美優[1]、高橋 一樹[1]、佐藤 浩志[2]、上田 誠[1] ([1]小山高専物質工学科、[2]日生バイオ株式会社)
○Tatsuya SUZUKI[1], Miyuu HUKAYA[1], Kazuki TAKAHASHI[1], Hiroshi SATOH[2], Makoto UEDA[1]
([1]National Institute of Technology, Oyama College, [2]Nissei Bio Company)

【背景・目的】配糖化は、化合物の安定性や溶解性等の諸性質を改善する有効な手段であり、ポリフェノールに代表されるフェノール性水酸基への配糖化は多くの報告がある。その一方でアルキルアルコールへの配糖化例は少ない。そのため本研究室ではこれまでに、*Rhizobium* 属や *Ensifer* 属などの土壌細菌によるアルキルアルコールへの配糖化を検討し、6-ジンゲロールおよびネロールへの微生物配糖化について報告してきた [1, 2)]。本研究では、これらの活性株から配糖化酵素遺伝子をクローニングし、大腸菌で発現させ、各種基質に対する基質特異性の検討等を行う。

【方法】所望の配糖化活性を持ち、ゲノム情報が公開されている株から遺伝子のクローニングを行った。対象遺伝子として、GH family13 の保存領域から検索した α-グルコシダーゼ遺伝子を選択した。制限酵素配列を付加した対象遺伝子を PCR で増幅し pET ベクターに挿入した。これを大腸菌 BL21(DE3）株に導入し形質転換を行い、IPTG による発現誘導を行った。形質転換体の配糖化活性の確認は、洗浄菌体およびドナーとしてマルトース、アクセプターとしてネロールを用いた反応により行った。各種基質に対する配糖化活性の評価は TLC および HPLC で行い、リナロール配糖体は分取精製後 NMR による同定を行った。

【結果】活性株の α-グルコシダーゼ遺伝子を挿入した pET ベクターを有する形質転換体は、6-ジンゲロールやネロールへの配糖化活性を示した。さらに種々の基質への反応の結果、三級アルコールのリナロールに対して配糖化活性を示すことを確認した。その他の基質への配糖化活性や種々の糖に対する加水分解活性についても合わせて報告する。

1) R. Matsumoto, H. Satoh, M. Ueda, J. Mol. Catal. B, 133, S200-S203 (2016)
2) K. Takahashi, I. Terauchi, M. Ono, et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 82, 2205-2211 (2018)



linalool, α-glucosidase, glucosylation

発表責任者：上田誠（mueda@oyama-ct.ac.jp）

講演番号：1D7p03
講演日時：3 月 24 日 14:12～ 1 号館 D7 会場

鉄還元酵素を利用した香気を有するセスキテルペノイド(-)-ロタンドン合成法の開発

Development of synthetic methods of odor sesquiterpenoid, (-)-rotundone, using ferric-chelate reductase

○梅澤 覚[1,2]、木野 邦器[1] ([1]早大院・先進理工・応化、[2]長谷川香料（株））
○Satoru UMEZAWA[1,2], Kuniki KINO[1] ([1]Dept. Appl. Chem., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]T. Hasegawa Co., LTD)

【背景・目的】食品や香粧品に香りを付加する香料は、人々の生活に豊かさを与えることができる。植物に多く含まれるセスキテルペノイドは、抗ストレス、抗腫瘍等の生理活性を有する香気成分でもあり、その産業有用性が高く注目されている。その中でも、黒胡椒の重要香気成分で、シラー種ワインのスパイシーな香りを特徴づける(-)-ロタンドンは、その香気閾値が天然化合物中で最も低い水準にあることに加え [1)]、様々な種類の果実香味を増強する効果を有し、香料全体の価値を高める可能性が見出されている [2)]。しかし、(-)-ロタンドンは天然含量が少なく、最も含量の多い黒胡椒でも ppm オーダーであるため、その工業的利用には効率的な合成プロセスが求められている。本研究では、鉄還元酵素(ferric-chelate reductase)を利用した新規なセスキテルペノイド合成系を見出したので、 (-)-ロタンドンの効率的生産法の構築を目的として、生体触媒を用いた当該合成プロセスの検証を行った。

【方法・結果】(-)-ロタンドンの前駆体であるα-グアイエンの酸化を種々検討した結果、Fe^{2+}が当該反応に関与することを見出した。この Fe^{2+}による酸化反応に関しては、biomimetic catalyst の分野で研究が進められているが、特に oxygenase タイプの模倣型として、非ヘム型 Fe^{2+}-chelate 触媒を用いたアリル位酸化が報告されている [3)]。そこで、生体内で Fe^{2+}-chelate 生成を担う鉄還元酵素に着目し、大腸菌由来の ferric-chelate reductase である YqjH を用いて、NAD(P)H 依存的な Fe^{2+}-chelate 供給を行った結果、α-グアイエンから(-)-ロタンドンへの酸化的合成を確認することができた。本反応系は、酵素的還元反応と触媒酸化反応が相互に連携した新規かつユニークな反応システムとなっており、セスキテルペノイド合成における新たな知見と言える。また、過酸化物等の酸化剤を必要としないため、分子状酸素を酸素供給源としたクリーンな製法であると推察している。さらに、シクロデキストリンを用いた基質および生成物の安定化や、glucose dehydrogenase を用いた NAD(P)H 再生系との共役による効果を検討するなど、(-)-ロタンドンの効率的合成プロセス構築に向けた知見を蓄積した。

1) C. Wood *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 3738-3744, (2008).
2) 中西ら, 特許第 6262170 号, 特許第 6262171 号.
3) Y.-M. Lee *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 10668-10670, (2010).

(-)-rotundone, ferric-chelate reductase, oxygenation

発表責任者：木野邦器（kkino@waseda.jp）

講演番号：1D7p04
講演日時：3 月 24 日 14:23～ 1 号館 D7 会場

非対称カロテノイド生合成経路の代謝進化工学

Directed Evolution of pathways for Asymmetric Carotenoids

○尾島 匠、関 貴洋、李 伶、河合 繁子、斎藤 恭一、梅野 太輔（千葉大・工学部・共生応用）
○Takumi OJIMA, Takahiro SEKI, Ling LI, Shigeko KAWAI, Kyoichi SAITO, Daisuke UMENO (Chiba Univ. Applied Chem. & Biotech.)

【目的】
自然界には 750 を超える種類のカロテノイドが知られている。天然に存在するカロテノイドのほとんどは，ゲラニルゲラニル二リン酸(C20PP)が二分子縮合して形成したフィトエン（炭素数 40）骨格の不飽和化，末端の環化，修飾などによって生合成されるため，対称性の高い構造を有している。微生物の中には，ファルネシル二リン酸(C15PP)が二分子縮合して形成したジアポフィトエン（炭素数 30）骨格を基礎とするカロテノイド生合成をするものも知られるが，これも骨格そのものは対称性が高い。一方，光合成マシナリーの中で，クロロフィルへの高効率エネルギー伝達の実現には，分子内電荷移動（ICT）励起状態の存在が重要とされる。我々は，ジアポフィトエン合成酵素 CrtM(*Staphylococcus aureus* 由来)の基質特異性を改変し， C35，C45，C55 などの非対称骨格を持つカロテノイドの生合成に成功しているが，C35 を除くすべての非対称カロテノイドの生合成経路は，対称型カロテノイドの副産物として得られるのみであった。
【方法・結果】
非対称骨格の生合成の難しさの一つは，サイズの異なる 2 種類のイソプレニル二リン酸基質を同時に供給することの困難にある。そこで我々は，生産物特異性の異なるイソプレニル二リン酸合成酵素群（C10PP，C15PP，C20PP，C25PP，C30PP，C35PP）のうち２つを共発現する大腸菌を取り揃え，これらに，サイズ特異性の異なる様々な CrtM 変異体をコンビナトリアル導入した。その結果，いままで痕跡量しか作れなかった非対称カロテノイド（C20+C35=C55 など）の生産量が飛躍的に増大した。カロテノイド原料酵素，また，これら非対称カロテノイド骨格合成酵素に不飽和化酵素を追加発現することによって，非対称な新規カロテノイド色素の蓄積も観察された。

carotenoid, pathway engineering, enzyme engineering

講演番号：1D7p05
講演日時：3 月 24 日 14:34～ 1 号館 D7 会場

Simultaneous production of 3-Hydroxypropionic acid and 1,3-Propanediol by psychrophile-based simple biocatalysts in Shewanella sp.

○Mohammad MOJARRAD, Takahisa TAJIMA, Akiko HIDA, Junichi KATO (Hiroshima Univ., Department of Molecular Biotechnology)

3-Hydroxypropionic acid (3-HP) and 1,3-propanediol (1,3-PDO) are a three-carbon organic molecule and have a vast range of applications in the cosmetics, food, pharmaceutical, textile industries. The biological synthesis of them from glycerol had been scrutinized for industrial production. The reductive pathway of glycerol for production of these organic molecules chiefly consists of two routes for production them in *Klebsiella pneumonia*. To start with a dehydration reaction catalyzed by the glycerol dehydratase enzyme (*Dha*B) which converting glycerol to 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA). Then, the 3-HPA intermediate is oxidized and reduced to 3-HP (aldehyde dehydrogenase enzyme (*Puu*C)) and 1,3-PDO (1,3-propanediol oxidoreductase enzyme (*Dha*T)), respectively. Psychrophile-based Simple bioCatalyst (PSCat) is an innovative biological approach which consists of a selection of suitable pathways which involve in, a valuable compound from mesophilic bacteria. Then transformation and expressions of these pathways in psychrophile host bacteria. After that, intrinsic host bacteria pathways are inactivated by the cell suspension high-temperature treatment while recombinant mesophilic enzymes retain their catalytic activity. This study will examine the potential of the PSCat approach in the production of these valuable compounds.

The psychrophile host bacteria (*Shewanella livingstonensis* and *Shewanella frigidimarina*) were transformed by *Dha*B, *Dha*T and *Puu*C. Several tests were carried out to find the best time and temperature for pre-heat treatment, the best condition for enzymatic activity reaction and the optimum concentration of NADH and NAD^+ for Aldehyde dehydrogenase (*Puu*C) and 1,3-propanediol oxidoreductase (*Dha*T). The desired result for aldehyde dehydrogenase in both transformed bacteria was obtained when the concentration of NADH was 0.5 and 1 mM. Moreover, 40° C was the optimum temperature for measuring the enzymatic activity. Furthermore, all samples should be placed at 45° C for 15 minutes before measuring enzymatic activity. The results revealed that for both transformed bacteria by *Dha*T, the optimum concentration of NAD^+ was 0.5 and one mM and the best temperature for pre-heat treatment were 40° C (15 minutes). Moreover, the best temperature for measuring the 1,3-propanediol oxidoreductase activity was 40 ° C in both transformed bacteria.

For reach to our purpose in this project, we examine the potential of the PSCat approach in the production of 3-HP and 1,3-PDO and following that the co-production of these compounds.

3-Hydroxypropionic acid, 1,3-Propanediol, Shewanella sp.

発表責任者：Junichi KATO（jun@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：1D7p06
講演日時：3 月 24 日 14:55～ 1 号館 D7 会場

組換え大腸菌によるゼアキサンチン代謝物としての新規カロテノイド生産

Production of a new carotenoid using zeaxanthin biosynthetic and metabolic genes by recombinant *Escherichia coli*

○下出 早貴[1]、宮田 佳奈[1]、島田 裕士[2]、竹村 美保[3]、三沢 典彦[3]、新藤 一敏[1] ([1]日女大・家政・食物、[2]広島大・理、[3]石川県大・生資研)
○Saki SHIMODE[1], Kana MIYATA[1], Hiroshi SHIMADA[2], Miho TAKEMURA[3], Norihiko MISAWA[3], Kazutoshi SHINDO[1] ([1]Japan Women's Univ., [2]Hiroshima Univ., [3]Ishikawa Pref. Univ.)

【目的】カロテノイドはイソプレン構造を基本とする長鎖の化合物で、植物と微生物によって生合成される脂溶性色素である。天然に存在するカロテノイドは植物、藻類、細菌、鳥類や魚類、海生・陸上動物等から 750 種以上が報告されている。近年の研究により、カロテノイドの抗酸化作用を始め lycopene は前立腺癌のリスクを軽減する、lutein や zeaxanthin は眼病予防に効果的であるといったさまざまな優れた生理活性を有することが明らかとなっている。これらのカロテノイドについては、カロテノイド生合成遺伝子を導入した組換え大腸菌での効率生産が可能であるが、同手法では epoxide 構造を含むカロテノイドの効率生産は現在までのところ容易ではない。そこで本研究では、種々の生物由来のカロテノイド生合成遺伝子を大腸菌に組み込み epoxide 構造を有し優れた抗酸化作用を有する antheraxanthin, violaxanthin の効率的生産を目指した。しかしながら目的化合物以外に、予想外の新規カロテノイドが得られるという結果となった。今回は新規カロテノイドの構造と生理活性を報告する。
【方法】大腸菌に *Pantoea ananatis* 由来 *crtE, B, I, Y, Z* とパプリカの *CaZEP* 及びシロイヌナズナの *AtCYO1*（シャペロン様機能を有する）を発現するプラスミドを組み込んだ。大腸菌は 2YT 培地で培養後、遠心処理により菌体を回収し超音波処理による抽出（CH_2Cl_2: MeOH=1: 1）、二相分配（ethyl acetate: H_2O=1: 1）、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（CH_2Cl_2: diethyl ether=6: 1）、シリカゲル HPLC 分析（CH_2Cl_2: diethyl ether=4: 1）によって観測された主要な 4 つのピークを分取し、それぞれの純品を得た。新規カロテノイドについては、ESI-MS（$(M+Na)^+$），各種 NMR（^1H, ^{13}C, DQF COSY, HMBC, HMQC, NOESY）スペクトルにより構造を決定した。また、ラジカル消去活性と一重項酸素消去活性の 2 種類の抗酸化試験を行った。残り 3 つのピークは ^1H NMR 解析で既知カロテノイドと同定した。
【結果】新規カロテノイドの化学構造は、6’-hydroxy-3’-didehydro-lutein と決定した。また残りの 3 カロテノイドは zeaxanthin, (8*R*)-mutatoxanthin, (8*S*)-mutatoxanthin（mutatoxanthin は antheraxanthin の酸分解物）と同定した。今回の培養では violaxanthin 及びその酸分解物である auroxanthin は見出されなかった。新規カロテノイドの抗酸化試験の結果、ポジティブコントロールと比較しラジカル種消去活性（IC_{50} β-carotene: 72 μM、新規カロテノイド:2.5 μM）と一重項酸素消去活性（IC_{50} astaxanthin: 1.2 μM、新規カロテノイド: 3.2 μM）ともに優れた抗酸化活性を示すことが確認された。この成果の一部は、NEDO「スマートセルインダストリー」プロジェクトの中で実施された。

antioxidant activity, new carotenoid, mutatoxanthin

発表責任者：新藤一敏（kshindo@fc.jwu.ac.jp）

講演番号：1D7p07
講演日時：3 月 24 日 15:06～ 1 号館 D7 会場

シトリニン資化性微生物の探索
Screening of citrinin-utilizing microorganisms
○山下 涼香、橘 信二郎 (琉球大・農)
○Suzuka YAMASHITA, Shinjiro TACHIBANA (Univ. Ryukyus, Fac. Agric.)

【背景・目的】シトリニンは *Penicillium citrinum* Thom から最初に単離された毒性二次代謝産物であり、*Penicillium* 属や *Aspergillus* 属、一部の *Monascus* 属などの糸状菌において産生される。本化合物は、その抗菌活性により抗生物質として注目されていたが、動物試験において腎毒性が確認されている。このため、シトリニンによる穀物や食品の汚染は、他のカビ毒とともに食品衛生上の問題となっている。現在、シトリニンの検出・定量には、競合酵素免疫測定法(ELISA)や、HPLC 蛍光検出法、LC-MS/MS 法が広く用いられている。しかし、これらの方法は、コストと煩雑な前処理が課題となっており、より簡便で迅速なシトリニンの検出・定量法の開発が必要とされている。本研究では、酵素反応を利用した定量法を開発することを目的として、自然界よりシトリニン資化性微生物を探索し、シトリニン分解の性質について調べた。
【方法・結果】沖縄県内外の土壌サンプルを採取し、最少培地に対してシトリニン濃度を段階的に上げた液体培地中で 76 日間馴養培養し、シトリニン存在下で生育可能な菌をシトリニン資化性候補株として 47 株を選抜した。選抜した候補株を、25 μg/mL のシトリニン添加 TGY 培地で 800 rpm、31℃で 3 日間培養し、培地中のシトリニン残存量を HPLC 蛍光検出法によって確認した。その結果、シトリニンに相当するクロマトピークが完全に消滅した候補株 2 株を得た。候補株をシトリニン添加液体培地で振とう培養し、培養液を経時的にサンプリングして HPLC 分析に供した。培養時間の経過に伴いシトリニンの蛍光は減少したが、分解産物と想定される新たな蛍光クロマトピークは観察されなかった。一方、同一サンプルを UV-vis で分析したところ、シトリニンの減少に伴って増大する分解産物と想定されるクロマトピークの出現が確認された。これらの結果より、本研究においてシトリニン資化性の候補株 2 株を見出すことができた。これらの菌株を用いることで、簡便なシトリニンの検出法を開発できることが示唆された。

citrinin, screening, mycotoxin

講演番号：1D7p08
講演日時：3 月 24 日 15:17～ 1 号館 D7 会場

アコニット酸イソメラーゼ遺伝子を高発現させた大腸菌生菌体による *Aspergillus niger* クエン酸発酵液からの *trans*-アコニット酸生産
trans-Aconitic acid production from the *Aspergillus niger* fermentation broth containing citric acid by living cells of *Escherichia coli* highly expressing aconitate isomerase gene
○吉岡 育哲、小田 祐之亮、滝口 有沙、桐村 光太郎（早大・先進理工・応化）
○Isato YOSHIOKA, Yunosuke ODA, Arisa TAKIGUCHI, Kohtaro KIRIMURA (Dept. Appl. Chem., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

【目的】
trans-アコニット酸（*t*AA）は不飽和のトリカルボン酸で、可塑剤やハイパーブランチポリマーの原料モノマー等に利用されている。演者らは、クエン酸回路の中間体である *cis*-アコニット酸（*c*AA）を *t*AA に異性化する酵素である aconitate isomerase（EC 5.3.3.7; AI）を *Pseudomonas* 属細菌より世界で初めて同定し、その遺伝子クローニングに成功している［1］。また、演者らは、発酵生産によって安価に供給可能なクエン酸を原料として AI を用いた *t*AA 生産を検討しており、AI 遺伝子を高発現させた大腸菌の凍結融解菌体を触媒として 400 mM のクエン酸から 91 mM の *t*AA 生産に成功している［2］。しかし、凍結融解菌体を用いた変換（酵素反応による変換）では、クエン酸、*c*AA、*t*AA 間での化学平衡による収率の上限が存在する。そこで、演者らは、大腸菌の生菌体を用いることによって *t*AA の生産を「細胞内での生成」と「細胞外への排出」に分割することで収率の向上が可能かどうかを検討した。本発表では、大腸菌生菌体におけるクエン酸輸送に着目したクエン酸の変換活性の向上と糸状菌 *Aspergillus niger* のクエン酸発酵液からの *t*AA 生産試験について報告する。
【方法および結果】
生菌体を用いる場合、原料のクエン酸や生成物の *t*AA は大腸菌の膜を透過できないため、輸送機構の導入が必要である。大腸菌の主要なクエン酸輸送体タンパクとして、コハク酸（ジカルボン酸）やクエン酸（トリカルボン酸）の交換輸送を行う CitT が知られている。そこで、演者らは AI 遺伝子と CitT 遺伝子を共発現させた *Escherichia coli* BL21(DE3) を作製した。研究室保有のクエン酸高生産菌 *A. niger* WU-2223L の発酵液の組成に基づき［3］、クエン酸が 60 g/L 含まれた基質溶液を調製し、*t*AA 生産の模擬発酵液として使用した。AI 遺伝子と CitT 遺伝子を共発現させた大腸菌の生菌体を用いた場合、*t*AA 生産は 48 時間で最大収量に達し、AI のみを発現させた生菌体を用いた 120 時間の反応による最大収量と比較して 38% 増大した。以上より、AI 遺伝子と CitT 遺伝子を共発現させた大腸菌（生菌体）を *t*AA 生産に利用可能なことを明らかにした。
（本研究は「早稲田大学理工総研-JXTG 若手研究奨励研究」の助成を受けて実施した。）
[1] K. Yuhara, *et al*., FEBS J., **282**, 4257-4267 (2015), Editor’s choise.
[2] K. Kobayashi, *et al.,* ChemistrySelect, **1**, 1467-1471 (2016).
[3] K. Kirimura, *et al*., Biosci. Biotechnol. Biochem., **80**, 1737-1746 (2016). 他

aconitate isomerase, *trans*-aconitic acid, *Aspergillus niger* citric acid fermentation

発表責任者：桐村　光太郎（kkohtaro@waseda.jp）

講演番号：1D7p09
講演日時：3 月 24 日 15:28～ 1 号館 D7 会場

基質流入口の拡大によるサリチル酸脱炭酸酵素の基質特異性の拡張

Expanding substrate specificity of salicylate decarboxylase through expansion of the entrance region by site-directed mutagenesis.

○飯塚 恭平、石原 真奈、荒木 優大、石井 義孝、桐村 光太郎（早大・先進理工・応化）
○Kyohei IIDUKA, Mana ISHIHARA, Masahiro ARAKI, Yoshitaka ISHII, Kohtaro KIRIMURA (Dept. Appl. Chem., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

【目的】

Trichosporon moniliiforme WU-0401 由来 salicylate decarboxylase (EC 4.1.1.91; Sdc) は、常温常圧下の水系反応でサリチル酸の脱炭酸およびフェノールへの炭酸固定を可能にする可逆的な脱炭酸酵素である［1］。また、演者らは Sdc の活性中心付近の非保存領域への部位特異的変異導入により Y64T-F195Y-Sdc を作製し、*p*-アミノサリチル酸の高収量生産 (21.4 g･L^{-1}) を達成している［1, 2］。本研究では、Sdc を用いたメチルサリチル酸の生産を目的として、基質流入口への部位特異的変異導入により酵素改変を行った［3］。

【方法および結果】

演者らは、構造解析により取得した Sdc の推定立体構造から基質流入口を特定し、その近傍に存在するアミノ酸残基に着目した。とくに、23 位の Lys の部位特異的変異体をモデリングで作製し、さらに、基質流入口を拡大するために Ala に置換した K23A-Sdc、Gly に置換した K23G-Sdc を実際に作製した。サリチル酸に対する脱炭酸比活性は、野生型 Sdc と比較してそれぞれ 1.6 倍、0.60 倍であった。また、Lineweaver-Burk plot を用いてサリチル酸とフェノールを基質とした際の動力学定数を算出した。サリチル酸の脱炭酸反応では Sdc と比較して K23A-Sdc の k_{cat}, k_{cat}/K_m, V_{max} がそれぞれ 1.2 倍, 1.1 倍, 1.2 倍に増大し、フェノールへの炭酸固定反応ではそれぞれ 1.3 倍, 1.4 倍, 1.6 倍に増大した。予想通り、K23A-Sdc では基質流入口の拡大によって基質の活性中心への進入が容易になり、速度定数（k_{cat})、触媒定数（k_{cat}/K_m）および最大反応速度（V_{max})が増大したことを明らかにした。野生型 Sdc は、3-メチルサリチル酸に対する脱炭酸活性を有しているが、逆反応である *o*-クレゾールに対する炭酸固定活性は検出されない。基質流入口を拡大した K23A-Sdc および K23G-Sdc は *o*-クレゾールに対する炭酸固定活性が検出されるようになり、K23A-Sdc の比活性は K23G-Sdc のそれの 2.2 倍であった。以上より、基質流入口の拡大によって Sdc の基質特異性の拡張が達成された。

[1] K. Kirimura and Y. Ishii, Future Directions in Biocatalysis, 2nd ed. (T. Matsuda, ed.), p. 135-147, Elsevier, London (2017).
[2] S. Ienaga, *et al.*, Bull. Chem. Soc. Jpn., **86**, 628-634 (2013).
[3] K. Kirimura, *et al.*, Chem. Lett., **48**, in press (2019), doi:10.1246/cl.180755.

enzymatic Kolbe-Schmitt reaction, salicylate decarboxylase, substrate specificity

発表責任者：桐村光太郎（kkohtaro@waseda.jp）

講演番号：1D7p10
講演日時：3 月 24 日 15:39～ 1 号館 D7 会場

SDGs に重要なアンモニアを生産する酵母セルファクトリーの構築
Establishment of the yeast cell factories for ammonia production important for SDGs
○渡邉 幸夫[1]、黒田 浩一[1]、立道 祐輝[2]、仲原 丈晴[2]、植田 充美[1]([1]京大院・農・応用生命、[2]キッコーマン株式会社・研究開発本部)
○ Yukio WATANABE[1], Kouichi KURODA[1], Yuki TATEMICHI[2], Takeharu NAKAHARA[2], Mitsuyoshi Ueda[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Res. & Dev. Div., Kikkoman Corp.)

【背景・目的】
アンモニアは、食料の生産に必須な肥料の原料である。また、現在開発が進んでいる水素型社会に必要な水素のキャリアーとしても利用が期待されている SDGs (Sustainable Development Goals)にとって重要な物質の一つである。100 年以上にわたってアンモニアはハーバー・ボッシュ法によって作られてきた。しかしながら、この方法は高温・高圧条件が必要なため、化石燃料を大量に消費する。そこで、我々はすでに大腸菌を用いて世界一のアンモニアを大量に生産する株を構築してきた[1]。次に、酵母を用いた化石燃料に頼らない廃棄物からのアンモニア生産を目的とした。代謝工学の手法を用いた場合、酵母の窒素同化能は強く、細胞内で生産したアンモニアは同化に用いられてしまうため、高収率の達成は難しいと考えられた。そこで本研究では、当研究室が独自に開発した細胞表層工学の手法を用い、細胞外でアンモニア生産を行うことにより、細胞のもつ窒素同化能を免れ、酵母による高効率な新規アンモニア生産法の構築を試みた。
【方法と結果】
細胞表層工学によるアンモニア生産のモデルとして、まずグルタミンからアンモニアを生産する酵素であるグルタミナーゼを用いた系を構築した。グルタミナーゼの N 末端側に分泌シグナル、C 末端側に GPI アンカー付着シグナルを含んだα-アグルチニンの細胞壁アンカリングドメインと融合して発現させることで、酵母の細胞表層に提示した。FLAG 抗体を用いた抗体染色による蛍光で表層提示を確認した。構築した酵母を培養後、グルタミン溶液に移し、37°C でグルタミンからのアンモニア生産を行った。その結果、8 時間の反応で約 2.0 g/L（収率約 95%）のアンモニアが生産された。これは今まで報告されたアンモニア生産量の中でも最高値であった。したがって、細胞表層工学により構築した細胞外でのアンモニア生産法が有効に働き、廃棄物中のアミノ酸からアンモニアを生産できる可能性が示唆されたため、グルタミン以外のアミノ酸からのアンモニア生産にも応用可能であると考えられる[2]。
[1] Y. Mikami, et al., *AMB Express*, 7:83 (2017)
[2] Y. Watanabe, et al., submitted.

ammonia production, cell surface engineering, SDGs (Sustainable Development Goals)

講演番号：1D7p11
講演日時：3 月 24 日 16:00～ 1 号館 D7 会場

エクオールを水酸化する酵素の発見
Discovery of enzymes catalyzing the hydroxylation of equol
橋本 貴史[1]、向井 克之[2]、松山 彰収[2]、○古屋 俊樹[1] ([1]東京理科大理工・応生、[2]（株）ダイセル)
Takafumi Hashimoto[1], Katsuyuki Mukai[2], Akinobu Matsuyama[2], ○Toshiki Furuya[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Sci., Fac. Sci. Tec., Tokyo Univ. Sci., [2]Daicel Corp.)

【背景・目的】
ポリフェノールの(*S*)-エクオールは、大豆イソフラボン中のダイゼインが腸内細菌による代謝を受けて生成される化合物であり、近年、その生理活性が注目されている。例えば、エストロゲン作用によるシワや骨密度の改善、抗アンドロゲン作用、抗酸化作用が明らかにされている。ポリフェノールの生理活性はヒドロキシ基の数と位置により大きく変化するため、エクオールのヒドロキシ体にも生理活性の向上や新しい機能の発現が期待される。本研究では、ヒドロキシエクオールのエクオールからの選択的合成手法の確立を目的として、エクオール水酸化酵素を探索した。
【方法・結果】
Pseudomonas aeruginosa 由来の酸化酵素 HpaBC は、フラビン依存性モノオキシゲナーゼコンポーネント HpaB と、HpaB に還元型フラビンを供給する NAD(P)H:フラビンオキシドレダクターゼコンポーネント HpaC からなるタンパク質であり、レスベラトロール等のポリフェノールに対して水酸化活性を示す[1]。そこでまず、HpaBC のエクオールに対する変換活性を、本酵素を発現させた大腸菌細胞を利用して評価した。その結果、(*S*)-および(*R*)-エクオールと反応させた場合の両方において、HPLC 分析により変換産物と予想されるピークが微弱ながら検出された。HpaB のエクオールに対する変換活性は低かったが、そのホモログ酵素の中には活性の高いものも存在することを予想し、HpaB ホモログ酵素の活性を評価した。具体的には、HpaB とアミノ酸配列で 50～75%の相同性を有する酵素を 7 種選択し、これらの酵素を HpaC と大腸菌内で共発現させ、変換活性を評価した。その結果、*Rhodococcus opacus* 由来の酵素が(*S*)-および(*R*)-エクオールに対して高い変換活性を示すことが判明した。変換産物を精製して質量分析および NMR 分析に供したところ、3'位が水酸化された 3'-ヒドロキシエクオールと同定された（図 1）。本研究は、エクオールを水酸化する酵素の初めての報告である。
1) T. Furuya, K. Kino, Tetrahedron Lett., 55, 2853-2855 (2014).

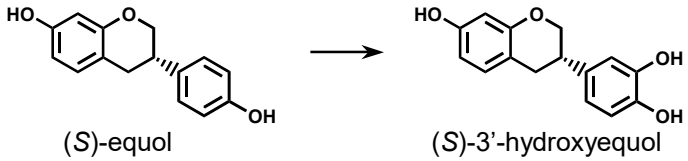


図 1　(*S*)-エクオールの(*S*)-3'-ヒドロキシエクオールへの変換

equol, hydroxylation, monooxygenase

発表責任者：古屋俊樹（tfuruya@rs.tus.ac.jp）

講演番号：1D7p12
講演日時：3 月 24 日 16:11～ 1 号館 D7 会場

菌体反応系を利用したイミダゾールジペプチド生産技術の開発

Development of imidazole dipeptides production process by whole cell reaction

○倉本 歩[1,3]、駒林 卓磨[2]、木野 邦器[1,2] ([1]早大・理工総研、[2]早大院・先進理工・応化、[3]東海物産)
○Ayumu KURAMOTO[1,3], Takuma KOMABAYASHI[2], Kuniki KINO[1,2] ([1]Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [3]Tokai bussan Co., Ltd.)

【目的】イミダゾールジペプチドは抗酸化作用の他、抗疲労効果や脳機能改善効果など多様な生理機能を有する化合物として注目されている。現在は鶏肉や魚肉等からの抽出による生産が主流であるが、需要増に対する原料供給の不安定性から新たな生産法の開発が求められている。我々は、L-アミノ酸リガーゼ(Lal)に着目し、その改変酵素を用いた酵素反応によるカルノシンやアンセリンの高収率生産を報告した [1)]。さらに、Lal の発現大腸菌を触媒として用い、宿主微生物の糖代謝系を利用することで、基質として高価な ATP の添加を必要としない生産プロセスを実現した [2)]。一方、チューブ・試験管内における小スケール（300μL～5mL）での検討であったため、実生産への展開に向け生産スケールの拡大による課題抽出を検討した。本研究では、反応槽として 0.25L 容ジャーファーメンターを用い、カルノシン生産をモデルとして pH や温度、基質添加条件などを検討し、菌体反応系を利用したイミダゾールジペプチド生産に関する新たな知見を得ることを目的とした。
【実験方法・結果】反応槽をジャーファーメンターへ移行し、通気および攪拌の改善によって対基質変換率 90%以上の高収率でカルノシンを合成できる反応条件を確立した。また、pH 緩衝剤である HEPES を使用せずに反応を試みた結果、反応中に pH が顕著に低下し、収率が 65.6%にまで低下した。宿主大腸菌の糖代謝によって生じた有機酸により pH が低下し、その影響と考えた。そこで、pH が常に 7.6 以上となるように NaOH 溶液による下限制御をしたところ、予想通り改善された。また、基質であるアミノ酸（β-アラニンおよび L-ヒスチジン）およびグルコースの添加量が生産量にどのように影響するのかを調べた。グルコースの初期濃度を 100mM と 200mM として合成量の比較を行った結果、200mM の条件ではグルコース消費速度が低下し、それに伴ってカルノシン合成量も低下した。なお、当該菌体反応プロセスはアンセリン生産にも適用できることを明らかにしている。
　現在、安定的な工業化プロセス構築に向け、基質量やその添加方法をはじめ、反応諸条件を鋭意検討している。菌体反応さらには発酵によるイミダゾールジペプチド生産技術を確立することは、天然資源に頼らない安定な供給を可能とし、健康社会増進に大きく貢献するものと期待している。

1）駒林ら，日本農芸化学会 2017 年度大会講演要旨集，2C26p08
2）駒林ら，日本生物工学会 2018 年度大会講演要旨集，3Ma03

imidazole dipeptide, L-amino acid ligase, whole cell reaction

発表責任者：木野邦器（kkino@waseda.jp）

講演番号：1D7p13
講演日時：3 月 24 日 16:22～ 1 号館 D7 会場

Rhodococcus wratislaviensis C31-06 株の示すα-アミノイソ酪酸代謝の解析
Analysis of the α-aminoisobutyric acid metabolism in *Rhodococcus wratislaviensis* C31-06
日比 慎[1,2]、福田 大[2]、間中 千尋[2]、○加藤 健太[2]、野尻 増俊[3]、八十原 良彦[3]、高橋 里美[2]、小川順[2] ([1]富山県立大工・生工研セ、[2]京大院農、[3]カネカバイオテクノロジー研究所)
Makoto HIBI[1,2], Dai FUKUDA[2], Chihiro KENCHU[2], ○Kenta KATO[2], Masutoshi NOJIRI[3], Yoshihiko YASOHARA[3], Satomi TAKAHASHI[2], Jun OGAWA[2] ([1]Toyama Prefectural University, [2]Kyoto University, [3]Kaneka Corporation)

【背景・目的】α,α-二置換 α-アミノ酸の一種である α-メチル-D-セリン（D-MeSer）は医薬品の合成中間体として重要な化合物である。しかし、D-MeSer を立体選択的に合成することは困難であり、効率的な生産プロセスの開発が望まれている。本研究では、α-アミノイソ酪酸（AIB）を基質とした効率的に D-MeSer を生産するバイオプロセスの開発を目的とした。微生物をスクリーニングにより、AIB から D-MeSer を生成する活性を保持した菌株を探索し、単離菌に対して詳細な AIB 代謝解析を行った。
【方法・結果】AIB を単一炭素源または窒素源とする培地を用いることで微生物の集積培養を行い、土壌などから約 2,500 株の菌株を単離した。それぞれの単離菌の培養液や菌体反応液を各種クロマトグラフィーで分析し、AIB の代謝活性を評価した結果、単離菌のうち 45 株が AIB の分解活性を有していた。これまでに AIB の分解に関わる酵素としては、α,α-ジアルキルグリシンデカルボキシラーゼ（DGD）が報告されている。DGD はピリドキサールリン酸（PLP）依存性であり、AIB の脱炭酸反応とアミノ基転移反応を触媒し、最終生成物としてアセトンを生成する。そこで上記 AIB 分解菌のアセトン生成能や PLP 酵素阻害剤の添加効果を解析したところ、42 株においてはアセトンの生成と、PLP 酵素阻害剤による AIB 分解能の消失が確認されたことから、これらの株は DGD により AIB を分解していると考えられた。一方、残りの 3 株については、AIB 分解において PLP 酵素阻害剤の影響を受けず、またアセトンの生成も見られなかったことから、DGD 非依存性の代謝経路が機能していると考えられた。これら 3 株の中の 1 株（C31-06 株）は、*Rhodococcus wratislaviensis* であると同定され、本菌株に対して詳細な AIB 代謝解析を行った。C31-06 株を菌体反応に供した際、AIB から D-MeSer が高光学純度で生成したことから、本菌株は立体選択的な AIB 水酸化酵素活性を有していることが明らかとなった。また C31-06 株は AIB を代謝する過程で、D-MeSer の他にいくつかのアミノ酸を代謝物として生じる事が確認された。以上の結果より、C31-06 株は水酸化反応やその他のアミノ酸代謝関連酵素反応から構成される代謝経路により、AIB を分解・資化することが示された。

α-aminoisobutyric acid, α-methyl-D-serine, *Rhodococcus*

講演番号：1D7p14
講演日時：3 月 24 日 16:33～ 1 号館 D7 会場

Rhodococcus wratislaviensis C31-06 株における新規α-アミノイソ酪酸代謝経路の全容解明

Entire elucidation of metabolism of α-aminoisobutyric acid in *Rhodococcus wratislaviensis* C31-06

○日比 慎[1,2]、間中 千尋[2]、福田 大[2]、油谷 駿介[2]、青木 航[2]、植田 充美[2]、野尻 増俊[3]、八十原 良彦[3]、高橋 里美[2]、小川 順[2]([1]富山県立大工・生工研セ、[2]京大院農、[3]カネカバイオテクノロジー研究所)

○Makoto HIBI[1,2], Chihiro KENCHU[2], Dai FUKUDA[2], Shunsuke ABURAYA[2], Wataru AOKI[2], Mitsuyoshi UEDA[2], Masutoshi NOJIRI[3], Yoshihiko YASOHARA[3], Satomi TAKAHASHI[2], Jun OGAWA[2] ([1]Toyama Prefectural University, [2]Kyoto University, [3]Kaneka Corporation)

【背景・目的】α-アミノイソ酪酸（AIB）の新規な代謝経路を有する微生物として、*Rhodococcus wratislaviensis* C31-06 株を単離した。C31-06 株は AIB を立体選択的に水酸化して α-メチル-D-セリン（D-MeSer）を生成する活性を示す他、複数のアミノ酸代謝関連酵素反応が AIB 代謝に関与していると考えられる。本研究では比較プロテオーム解析により AIB 代謝に関与する酵素を抽出することで、AIB 代謝に関わる遺伝子群の同定と代謝経路の全容解明を目的とした。

【方法・結果】*R. wratislaviensis* C31-06 株の生理学的解析の結果、本株の AIB 水酸化活性は培地中に AIB を添加したときのみ誘導されることが明らかとなった。そこで、AIB 含有培地と非含有培地で培養した菌体からそれぞれ全タンパク質画分を抽出し、プロテアーゼ消化・誘導体化したペプチドサンプルを LC-MS/MS 分析による比較プロテオーム解析に供した。その結果、AIB を添加した際に発現量が増大するタンパク質群が見いだされ、特にある遺伝子クラスター（*aib* 遺伝子クラスター）にコードされているタンパク質群の発現量が顕著に増大することが明らかになった。*aib* 遺伝子クラスターにコードされる各タンパク質の機能を詳細に解析したところ、D-MeSer 代謝に関与する酵素が複数存在していることが分かった。*aib* 遺伝子クラスター内には、既知の水酸化酵素がコードされていなかったが、電子伝達タンパク質であるフェレドキシンレダクターゼ（AibF）とフェレドキシン（AibG）に隣接して２つの機能未知タンパク質（AibH1、AibH2）がコードされており、AIB 水酸化反応に関与している可能性が示唆された。そこで AibFGH1H2 を発現する組換え放線菌株を構築し AIB 含有培地で培養したところ、培養液中に高光学純度の D-MeSer の生成が確認できた。AibFGH1H2 はこれまでに類を見ない新規なタイプの水酸化酵素であり、AIB の持つ２つのメチル基のうち一方のみを選択的に水酸化する活性を持つことを明らかにした。以上の結果より、*R. wratislaviensis* C31-06 株のゲノム上より見いだした *aib* 遺伝子クラスターは、誘導型の AIB 代謝酵素群をコードしていることが分かり、AIB 水酸化反応を起点とする一連の AIB 代謝経路の全容を解明することができた。

α-aminoisobutyric acid, α-methyl-D-serine, amino acid metabolism

講演番号：1D7p15
講演日時：3 月 24 日 16:44～ 1 号館 D7 会場

Rhodococcus wratislaviensis C31-06 株由来の新規α-アミノイソ酪酸水酸化酵素の機能解析と応用

Characterization and application of a novel α-aminoisobutyric acid hydroxylase from *Rhodococcus wratislaviensis* C31-06

○小川 順[1]、間中 千尋[1]、福田 大[1]、野尻 増俊[2]、八十原 良彦[2]、高橋 里美[1]、日比 慎[1,3] ([1]京大院農、[2]カネカバイオテクノロジー研究所、[3]富山県立大工・生工研セ)

○Jun Ogawa[1], Chihiro Kenchu[1], Dai Fukuda[1], Masutoshi Nojiri[2], Yoshihiko Yasohara[2], Satomi Takahashi[1], Makoto Hibi[1,3] ([1]Kyoto University, [2]Kaneka Corporation, [3]Toyama Prefectural University)

【背景・目的】*Rhodococcus wratislaviensis* C31-06 株は α-アミノイソ酪酸（AIB）の新規な代謝経路を有しており、その初発酵素として非常に新規性の高い AIB 水酸化酵素を持つ。本研究では AIB 水酸化酵素の諸性質の解明、およびその応用開発を目指した。

【方法・結果】*R. wratislaviensis* C31-06 株の AIB 水酸化酵素は、フェレドキシンレダクターゼ（AibF）、フェレドキシン（AibG）、モノオキシゲナーゼ（AibH1H2）の３つのユニットから構成される。このうち AibH1H2 はアミドヒドロラーゼスーパーファミリーに属する２種のサブユニットからなり、極めて新規性が高い。AibF は FMN を補酵素として持つフラビン含有酵素であった。2,6-dichlorophenolindophenol を電子受容体に用いた AibF のジアホラーゼ活性を測定したところ、電子供与体として NADPH に対する K_m 値が NADH に対する K_m 値よりも約 100 倍大きかったことから、AibF は NADH をより良い電子供与体とすることが判明した。AibG は[Fe-S]クラスターを有するリスケタンパク質と高いアミノ酸配列相同性を示し、AibF から AibH1H2 への電子伝達を仲介すると考えられた。AibH1H2 は各サブユニット（AibH1 と AibH2）がそれぞれ２個ずつ強固に結合したヘテロテトラマー構造をとることが分かった。AIB 水酸化酵素（AibFGH1H2）高発現組換え放線菌株は、AIB 含有培地を用いた培養液中において、反応産物である α-メチル-D-セリン（D-MeSer）を蓄積した。C31-06 株の AIB 代謝に関わる *aib* 遺伝子クラスターを詳細に解析したところ、本クラスター中に未知のアミノ酸トランスポーター（AibT）がコードされていることを見いだした。そこで AibFGH1H2/AibT を発現する組換え放線菌株を構築し AIB 水酸化反応に供したところ、D-MeSer 蓄積量が大幅に向上した。AibT は AIB や D-MeSer の細胞内外輸送に関わると示唆された。次に AibFGH1H2/AibT 発現組換え放線菌株を用いて、様々なアミノ酸に対する水酸化活性を評価した。この結果、D-α-アミノ酪酸、L-α-アミノ酪酸、D-イソバリン、L-イソバリンを基質とした場合に水酸化反応が進行することが分かり、それぞれ D-*allo*-スレオニン、L-*allo*-スレオニン、(2*R*,3*R*)-α-メチルスレオニン、(2*S*,3*S*)-α-メチルスレオニンが生成物として生じることを見いだした。AibFGH1H2/AibT 発現組換え放線菌株は新規な水酸化酵素触媒として今後の応用利用が期待される。

α-aminoisobutyric acid, α-methyl-D-serine, hydroxylase

発表責任者：小川　順（ogawa@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：1D8a07
講演日時：3 月 24 日 10:16～ 1 号館 D8 会場

BIOENGINEERING OF A STABLE MOLYBDATE BINDING SYSTEM USING Saccharomyces cerevisiae

○STEPHANIE AUDREY[1], Mei-Fang CHIEN[1], Naoya IKEDA[1], Kengo KUBOTA[2], Chihiro INOUE[1] ([1]Graduate School of Environmental Studies, Tohoku University, [2]Department of Civil and Environmental Engineering, Tohoku University)

Biosorption has garnered a lot of attention to fulfill the burgeoning need in recovering rare metals due to its high recoverability and area-to-surface volume, and yet studies about molybdenum biorecovery are still few and far in between. Saccharomyces cerevisiae has been genetically engineered to express ModE, a molybdate binding transcriptional regulator, on the cell surface. C-terminal domain of ModE was fused with α-agglutinin, inserted into pSP-G1, and transformed into the yeast cells. The study found that the addition of GS Linker in the insert cassette enhanced the adsorption capability of the mutant. Moreover, the biosorption improved even further upon replacing the yeast promoter in the plasmid with Escherichia coli's. Despite that, the instability of the plasmid-based transformation resulted in inconsistent adsorption rate of the yeast. Stabilization by the means of inserting the cassette containing ModE into the genome is being carried out with the results still undergoing tests.

molybdenum, biorecovery, Saccharomyces cerevisiae

発表責任者：Chien Mei-Fang（meifangchien@tohoku.ac.jp）

講演番号：1D8a08
講演日時：3 月 24 日 10:27～ 1 号館 D8 会場

乳酸菌を模倣した金ナノ粒子合成手法の開発

Development of gold nanoparticle synthesis method mimicking *Lactobacillus casei*

○加藤 由悟[1]、菊池 郁也[1]、吉村 悦郎[1,2]、鈴木 道生[1] ([1]東大院農、[2]放送大教養)
○Yugo KATO[1], Fumiya KIKUCHI[1], Etsuro YOSHIMURA[1,2], Michio SUZUKI[1] ([1]UTokyo, [2]OUJ)

金ナノ粒子とは 1 nm から 100 nm の大きさの金属の結晶であり、特異的な光学特性を有し、医療や工学の分野で数多く利用されている。現在用いられている化学的手法は環境への負荷が懸念されており、微生物を用いた生産方法が注目されている。金ナノ粒子の合成には金イオンを還元する還元剤と、粒子間の凝集を抑える分散剤が必要である。本研究では乳酸菌 *Lactobacillus casei* ATCC393 株（以下、乳酸菌）を用いて金ナノ粒子を生成し、その還元剤および分散剤の探索を行うことにより、微生物における金ナノ粒子生成機構の解明を目指している。

乳酸菌の懸濁液にテトラクロリド金(III)酸カリウムを加えることで金ナノ粒子が合成された。低温電子顕微鏡による観察から、金ナノ粒子は細胞膜表面近傍で合成されており、細胞膜成分と菌体外に放出している成分（菌体外成分）に着目して分析を行った。

まず、乳酸菌の脂質を TLC により分離して還元に関与する脂質を抽出し、質量分析を行った結果、乳酸菌の細胞膜に含まれる糖脂質であるジグリコシルジアシルグリセロール（DGDG）がナノ粒子の生成に関与していることが判明した。分離・精製した DGDG により、*in vitro* での金ナノ粒子の生成を試みたところ、金ナノ粒子を合成することに成功したことから、DGDG は金ナノ粒子の合成において還元剤及び分散剤として大きな役割を果たすことが確認できた。

次に乳酸菌の菌体外成分に金酸溶液を加えたところ、粒子径の小さな金ナノ粒子が合成されたため菌体外成分が優秀な分散剤として機能することが分かった。合成された金ナノ粒子を走査型電子顕微鏡によって観察したところ、金ナノ粒子の周りが繊維状の有機物質に覆われており、この繊維状の物質が金ナノ粒子合成において分散剤として寄与していると考え、成分の解析を行った。アミドカラムを用いた液体クロマトグラフィにより分離した菌体外成分のうち、金ナノ粒子合成活性画分を ^{1}H-NMR および質量分析装置を用いて分析したところ、lacto-*N*-triose と乳酸が金ナノ粒子合成に活性を持つことを突き止めた。

Lacto-*N*-triose と乳酸および DGDG の混合溶液に金酸を添加したところ、乳酸菌が作る金ナノ粒子と同じサイズの金ナノ粒子の合成に成功したことから、これらの成分が協調して乳酸菌の中で金ナノ粒子が生成されるというメカニズムを初めて明らかにした。

様々な微生物を用いた金属ナノ粒子の合成手法の報告があるが、原因物質や合成機構はほとんど解明されていない。本研究は微生物を活用した効率的なナノ粒子合成手法開発につながる発見である。

Lactobacillus casei, gold nanoparticles, biomineralization

発表責任者：鈴木道生（amichiwo@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：1D8a09
講演日時：3 月 24 日 10:38～ 1 号館 D8 会場

環境水中から単離した *Vibrio rumoiensis* と *Bacillus simplex* による金ナノ粒子合成機構の解析
Studies on the mechanism of gold nanoparticles synthesis by *Vibrio rumoiensis* and *Bacillus simplex* from environmental water.
○LI Yiting、加藤 由悟、鈴木 道生（東大院農）
○Yiting LI, Yugo KATO, Michio SUZUKI (UTokyo)

背景・目的：粒径が小さく、量子サイズ効果を持つ金属ナノ粒子は工学、医薬検測分野に応用されている。これまで金属ナノ粒子を生成するには高い温度、気圧が必要であり、また有害な副産物を生じることから環境に負荷が大きいと考えられている。このことから、微生物による金属ナノ粒子生産という環境にやさしい方法を利用して、様々な形態や粒子サイズを有する金属ナノ粒子を高効率に作り出すことを目的とした。

これまでの研究から、金ナノ粒子を用いた発色スクリーニングにより、金属を濃集しナノ化する微生物を効率的に見出すことができることが知られている。そこで、様々な環境から採取した微生物ライブラリーから金の濃集と分散化を効率的に行う微生物を探索し、その成分の解析を行った。

方法・結果：東京湾の人口埋め立て地付近と岐阜県飛騨市神岡鉱山付近の鉱物が豊富な水のサンプルを採取し、適当の培地に植菌した。植菌した微生物から、各微生物株を単離しライブラリーを作製した。単離したそれぞれの微生物をウェルプレートに入れ、0.5 もしくは 1.0 mM の金酸を添加し、24 時間後の色の変化を観察した。金ナノ粒子は表面プラズモン共鳴による光の吸収作用により、赤から紫色を呈する。そのため、目視により金ナノ粒子の合成量を見積もることが可能である。その結果、最も金ナノ粒子を合成する微生物として東京湾から *Vibrio rumoiensis* と神岡鉱山から *Bacillus simplex* を得た。電子顕微鏡による観察の結果、*V. rumoiensis* は金ナノ粒子が菌体の周囲で形成され、球状の形態以外に結晶面が卓越した金結晶も多く析出することが判明した。元素分析および X 線回折の解析からも、これらの粒子が単体の金で構成されることが判明した。一方で、*B. simplex* は 10 nm 以下の非常に小さい金ナノ粒子を、菌体から離れた場所に多数形成することが判明した。このことは、*B. simplex* が分泌する細胞外マトリックスが形成に関与する可能性が示唆された。同様に元素分析および X 線回折を行ったところ、単体の金で構成されることが判明した。

それぞれの微生物のどの成分が金ナノ粒子の生成に関与するのか明らかにするために、菌体の浸出液、超音波破砕液、メタノール抽出液を調整し、どの成分が金ナノ粒子の形成に最も寄与するのか確認した。その結果、*V. rumoiensis* は超音波破砕液で金ナノ粒子を合成が可能であるが、高濃度の金酸を添加すると結晶のサイズの大きいバルクの金が合成された。*B. simplex* は細胞外成分が効率よく金ナノ粒子を生成でき、粒子のサイズも菌体から合成したものとほぼ一致していた。そこで、*B. simplex* の細胞外成分から、金ナノ粒子合成に寄与する分子の、単離・精製、構造・機能解析を進めている。

gold nanoparticles, bacteria, biomineralization

発表責任者：鈴木　道生（amichiwo@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：1D8a10
講演日時：3 月 24 日 10:49～ 1 号館 D8 会場

Collimonas sp. D-25 による金属ナノ粒子の生成機構の解明
Investigating biosynthetic mechanism of metal nanoparticles generated by *Collimonas sp.* D-25
○唐 冬林[1]、加藤 由悟[1]、張 定坤[1]、安藤 司[2]、亀田 学[2]、鈴木 道生[1] ([1]東大院農、[2]ジパング)
○Donglin TANG[1], Yugo KATO[1], Dingkun ZHANG[1], Tsukasa ANDO[2], Manabu KAMEDA[2], Michio SUZUKI[1] ([1]UTokyo, [2]JIPANGU INC)

［背景・目的］
金属ナノ粒子は特異的な光学特性を有するほか、様々な特徴を持っており、多くの分野で応用されている。金属ナノ粒子の合成には、金属イオンを還元する還元剤に加えて、粒子間の凝集を抑える分散剤を添加する必要がある。これまでの金属ナノ粒子の合成では、反応に高温・高圧条件を必要とすることや、有機溶媒中で有害な反応副産物の生成などの問題による環境への負荷が懸念されている。そこで、微生物を用いて生体内で金属ナノ粒子を合成する方法が近年注目されており、多くの微生物が金属ナノ粒子を合成可能であることが報告されているが、その生成機構についてはほとんど明らかになっていない。本研究では金鉱山から見つかった微生物を用いて、金ナノ粒子の形成に働く還元剤および分散剤を微生物から探索し、そのメカニズムを明らかにすることと同時に、この微生物を用いて生成した金ナノ粒子の特性を評価することを目的とした。
［方法・結果］
本研究で用いた微生物である *Collimonas sp.* D-25 は秋田県内で採取した土壌やコンポスト等の環境資料を分離源とした金酸イオン還元能力を持つグラム陰性菌である。この細菌は好気、嫌気の両条件で金イオンを還元し、金ナノ粒子を合成できることが報告されていた。
本研究においては、D-25 の増殖曲線を記録し、対数増殖期の菌体を用いることで、最も効率よく金ナノ粒子を合成できる菌体の量と金酸濃度の比率を明らかにした。菌体のどの成分が金ナノ粒子の合成に関与するのか明らかにするために、D-25 から様々な方法で菌体成分を抽出し、それぞれについて金ナノ粒子合成能の確認を行った。菌体の超音波破砕の上清に含まれる水溶性成分には金ナノ粒子の分散を促進する分散剤として働く新規のタンパク質が含まれることが明らかとなった。また、クロロホルム・メタノール抽出により脂溶性成分を抽出したところ、水層ではなく有機層の中で金ナノ粒子の生成を促進する因子があることが示唆された。有機層中で金ナノ粒子を生成可能であるということは、D-25 に金酸の還元と分散に関与する特別な脂質成分が含まれることを示唆している。現在、この成分の同定を進めている。
また、D-25 由来の金ナノ粒子を用いてベンジルアルコールからベンズアルデヒドへの酸化反応を触媒したところ、大腸菌由来の金ナノ粒子よりも高い触媒活性を示した。

Collimonas sp. D-25, goldnanoparticles, biosynthesis

発表責任者：鈴木道生（amichiwo@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：1D8a11
講演日時：3 月 24 日 11:10～ 1 号館 D8 会場

鉄鋼スラグから鉄ナノ粒子を生成する微生物の探索
Search for the bacteria synthesizing iron nanoparticles from steel slag
○大竹 晟佳[1]、月舘 秀典[2]、加藤 由悟[2]、吉村 航[3]、鈴木 道生[2] ([1]東大農、[2]東大院農、[3]新日鉄住金先端研)
○Seika OTAKE[1], Hidenori TSUKIDATE[2], Yugo KATO[2], Ko YOSHIMURA[3], Michio SUZUKI[2] ([1]Agri-UTokyo, [2]Agri UTokyo, [3]NSSMC)

背景と目的

鉄鋼スラグは製鉄過程で生じる副産物であり、石灰やシリカ、酸化鉄を含む。現在、鉄鋼スラグはコンクリートやセメントの原料として使われているが、より高付加価値のある新しい利用方法が模索されている。近年、日本の沿岸域では藻場が消失する磯焼けと呼ばれる現象が問題になっている。その原因のひとつとして、海水中の鉄分が不足していることが考えられている。そこで、藻場が消失した海域に鉄鋼スラグと腐植土を混合した資材を埋設したところ、藻場が再生したという事例がある。しかし、鉄鋼スラグから海藻に、鉄がどのような化学形態で供給されているかは明らかではない。それを解明することは、より効率的な鉄供給につながると期待される。我々は、鉄鋼スラグから生物に、鉄が鉄イオンの形だけではなく、ナノ粒子の形で供給された可能性があると考えた。そこで、本研究では、鉄供給資材による藻場の再生を実施している北海道増毛町で現場海水を採取し、そのなかに存在する微生物から、鉄ナノ粒子を合成する微生物をスクリーニングした。また、それらの微生物が鉄鋼スラグから鉄ナノ粒子を生成可能であるか調べた。

実験概要

北海道増毛町の海水から、微生物を単離培養し、175 株のライブラリーを作製した。各微生物株を Marine Broth 2216 培地で培養し、そこに鉄鋼スラグを添加し、さらに振盪培養を行った。鉄鋼スラグから鉄ナノ粒子が生成される過程では、鉄鋼スラグから鉄イオンが溶出し、これが鉄キレーター物質により凝集することで鉄ナノ粒子が生成されると考えられたため、培養液に溶出した鉄イオン量を誘導結合プラズマで測定した。この結果、M97 株の培養液中に最も多くの鉄イオンが溶出していることが分かった。さらに、培養後の M97 株を透過型電子顕微鏡で観察したところ多くのナノ粒子が菌体の周囲に凝集している様子が観察された。また、この微生物がどのような鉄化合物からナノ粒子を生成するか探索するため、Marine Broth 2216 培地で硫化鉄(Ⅱ)と培養したところ、微生物の周囲に鉄ナノ粒子が合成された。さらに、M97 株は菌体外に多くの鉄キレーター分子を放出することが明らかとなり、これらの因子が鉄ナノ粒子の形成に関与する可能性が示唆された。

nanoparticles, steel slag, bacteria

発表責任者：鈴木道生（amichiwo@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：1D8a12
講演日時：3 月 24 日 11:21～ 1 号館 D8 会場

微生物を用いた鉄鋼スラグからの鉄溶出法の開発

Development of the methods of iron elution from steel slag using marine bacteria

○月舘 秀典[1]、吉村 航[2]、永田 宏次[1]、吉村 悦郎[3]、鈴木 道生[1]([1]東大院農、[2]新日鐵住金株式会社、[3]放送大)
○Hidenori TSUKIDATE[1], Koh YOSHIMURA[2], Koji NAGATA[1], Etsurou YOSHIMURA[3], Michio SUZUKI[1] ([1]UTokyo, [2]NIPPON STEEL & SUMITOMO METAL CORPORATION, [3]The Open University of Japan)

【背景・目的】

沿岸域で大型藻類が消失する「磯焼け」という現象は、鉄分の供給によって改善されることがあるということが報告されている。そして鉄鋼業界では鉄鋼を生産する際にできる副産物である鉄鋼スラグの、より付加価値の高い新規活用法を模索している。そこで、鉄鋼スラグを大型藻類の鉄分供給源として活用する方法が研究されている。本研究では海洋中の微生物と鉄鋼スラグが相互作用することにより鉄分が効率よく溶出するのではないか、という仮説を立て、鉄鋼スラグと共に培養した時に鉄を多く溶出させる微生物の探索と関係する分子の同定を試みた。また、鉄を溶出する微生物を鉄鋼スラグ表面に微生物を保持するためのバイオフィルムを産生する微生物についても探索を行った。

【方法】

まず、海水から微生物を単離培養し、鉄鋼スラグと 3 日間培養し、鉄を含む遷移金属濃度をルミノールで測定した。また、ICP-AES で鉄濃度のみの測定も行った。これらの実験により鉄を多く溶出させる細菌を探索した。次に、*Pseudoalteromonas tunicata* を培養して得られたバイオフィルムおよびアガロースから成る人工バイオフィルムを鉄鋼スラグと混ぜ、鉄を多く溶出させる細菌と共に海水中で培養し、海水中の鉄濃度の経時変化を調べた。最後に、鉄を多く溶出させる細菌の培養液上清を HPLC で分離し、鉄鋼スラグからの鉄溶出に関係があると思われる鉄キレーターの存在を検証した。

【結果・考察】

鉄鋼スラグから鉄を多く溶出させる細菌が複数見出された。その中で、*Sulfitobacter* sp. と *Pseudomonas* sp. を共培養したときに最も効率よく溶出するということが発見された。培養液上清を HPLC で分離したところ、鉄のキレーター分子が含まれていることを示唆する結果が得られた。溶媒分画によって分けたところ、鉄のキレーターは有機酸であることが分かった。現在、質量分析や NMR などでキレーター分子の構造解析を進めている。鉄鋼スラグとバイオフィルム(*P. tunicata* 由来または人工バイオフィルム)を混ぜ、*Sulfitobacter* sp. 及び *Pseudomonas* sp. を加え培養したところ、海水中の鉄濃度は *Sulfitobacter* sp. 及び *Pseudomonas* sp. を添加しない条件に比べ添加した条件で高かった。これはバイオフィルム中に細菌が生育し、鉄鋼スラグと相互作用する分子を生産していたためだと考えられる。

steel slag, iron supply, bacterial secretion

講演番号：1D8a13
講演日時：3 月 24 日 11:32～ 1 号館 D8 会場

ウロコフネタマガイ由来の有機高分子を利用した pyrite ナノ粒子の合成
Synthesis of pyrite nanoparticles using organic molecules from Chrysomallon squamiferum
○山下 達也[1]、松田 大輝[1]、アーサン ナズムル[2]、岡田 至崇[2]、鈴木 庸平[3]、鈴木 道生[1] ([1]東大院農、[2]東大先端研、[3]東大院理)
○ Tatsuya YAMASHITA[1], Hiroki MATSUDA[1], Nazuml Ahsan[2], Yoshitaka OKADA[2], Yohey SUZUKI[3], Michio SUZUKI[1] ([1]UTokyo, [2]UTokyo, RCAST, [3]UTokyo,)

【背景・目的】ウロコフネタマガイ(*Chrysomallon squamiferum*)は、中央インド洋海嶺「かいれいフィールド」の熱水噴出孔付近で発見された深海性の巻貝である。この巻貝は軟体部の腹足の表面にナノ粒子状の硫化鉄(pyrite,FeS_2)を含む鱗状の構造を持ち、外殻は炭酸カルシウム層上が硫化鉄層で覆われている。pyrite ナノ粒子は優れた光起電力特性を持ち、太陽光発電などへの応用が期待されている物質である。しかしその安価かつ安定した化学的合成手法は未だ確立していない。そのためウロコフネタマガイの pyrite ナノ粒子生成機構を解明し、それを工業的に応用することが期待されている。また金属ナノ粒子の生成には、粒子が凝集し、マクロ化することを防ぐ分散剤の存在が重要であると考えられている。そのため本研究では、ウロコフネタマガイの生体中において pyrite ナノ粒子に結合し、凝集を防ぐ鉄結合能を持つ物質を同定し、それを用いた硫化鉄ナノ粒子の *in vitro* での合成、並びに pyrite ナノ粒子合成機構の解明を目的としている。
【概要】本研究ではウロコフネタマガイの外殻より抽出された有機物質を分析し、鉄との相互作用により pyrite ナノ粒子の生成に関わる因子の探索を行った。そこで、外殻を 1 M 酢酸を用いて炭酸カルシウム層を溶解した後、酢酸不溶である硫化鉄層に対し SDS/DTT を用いた抽出を行った。この外殻由来の抽出液に対し SDS-PAGE を行ったところ硫化鉄層に特異的なバンドが得られた。このバンドは LC-MS/MS 解析によりミオグロビン様タンパク質であることが判明した。ミオグロビンは生体内で鉄と結合していることが知られており、この外殻由来のミオグロビン様タンパク質も鉄との結合に関与し、硫化鉄構造の形成、及び硫化鉄のナノ粒子化に深く関わっていると予想される。

そこで、市販のウマ由来のミオグロビンを用いて pyrite ナノ粒子の合成を試みたところ、100°C 以下の水系の溶液で非常に効率よく、粒径の揃った pyrite ナノ粒子を合成できることを見出した。また、ウマ由来のミオグロビンをトリプシン消化することで得られたペプチドを逆相 HPLC で分離・精製した画分を用いて pyrite ナノ粒子の合成を試みた。pyrite ナノ粒子の合成が可能であった画分を MALDI-MS/MS で分析することで pyrite ナノ粒子の合成に関与していると思われるアミノ酸配列を特定した。

さらにウロコフネタマガイ由来のミオグロビン組換え体の配列を遺伝子合成し、大腸菌用の発現ベクターに組み込むことで、ミオグロビン様タンパク質を得た。精製したミオグロビン様タンパク質を用いて pyrite ナノ粒子の合成を試みたところ、pyrite ナノ粒子の合成を確認することができた。

Chrysomallon squamiferum, Myoglobin, pyrite nanoparticles

発表責任者：鈴木道生（amichiwo@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：1D8a14
講演日時：3 月 24 日 11:43～ 1 号館 D8 会場

線虫を用いた ^{137}Cs 汚染土壌に対する新規除染及び減容化プロセスの構築
Construction of new decontamination and volume reduction process for ^{137}Cs contaminated soil using Nematodes

合田 亮[1]、濱野 樹[2]、星 英之[3]、○倉橋 健介[4]、吉原 静恵[2]、徳本 勇人[2]（[1]阪府大院・工、[2]阪府大院・理、[3]阪府大院・人社、[4]阪府大高専）
Ryo GODA[1], Itsuki HAMANO[2], Hidenobu HOSHI[3], ○ Kensuke KURAHASHI[4], Shizue YOSHIHARA[2], Hayato TOKUMOTO[2] ([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Pref. Univ., [2]Grad. Sch. Sci., Osaka Pref. Univ., [3]Grad. Sch. Humanities and Sustainable Syst. Sci., Osaka Pref. Univ., [4]Osaka Pref. Univ. Coll. Technol.)

【背景・目的】福島第一原発事故により拡散した放射性物質のうち、^{137}Cs は半減期が 30 年であるため、長期に渡る被曝が懸念されている。ここで、森林や山地などの低線量地域の除染は、必然的に後回しにされるため、膨大な量の放射性物質が残留することになる。そのため、費用対効果の高い微生物による除染及び減容化が期待される。しかし、土壌中の ^{137}Cs を吸収した微生物を回収するには、攪拌動力や化学薬品が必要で、実用化は厳しい。そこで、遊動性及び光忌避性を有する線虫を利用し、微生物を捕食させた線虫を光照射により回収することで、土壌中から攪拌操作なしに ^{137}Cs を回収できるのではないかと考えた。本研究では、微生物と線虫による汚染土壌の新たな除染及び減容化プロセスの構築を目的とし、微生物から線虫への Cs 移行、及びプロセスの連続化について検討を行った。
【方法・結果】本実験では、線虫のモデルとして *Caenorhabditis elegans* N2 株、^{137}Cs 吸収菌のモデルとして *Rhodococcus erythropolis* CS98 株を用いた。まず、プロセス設計のモデル実験として、CsCl を吸収させた ^{137}Cs 吸収菌を塗布した寒天培地上で線虫を 9 日間静置培養した。その結果、^{137}Cs 吸収菌から線虫体内へ 28.7%の CsCl の移行が確認できた。次に、滅菌土壌で同様に培養したところ、寒天培地に比べ、線虫の回収効率が低下する土壌中であるにも関わらず、^{137}Cs 吸収菌から線虫体内へ 3.0%の Cs を移行させることに成功した。そこで、Cs の回収率を向上させるために、プロセスの連続化を検討した。半回分操作により線虫の回収を 3 回実施した場合に、線虫により回収できる Cs 量を測定した。その結果、連続培養であっても線虫が良好に増殖できることを確認した。さらに、半回分操作の回数に伴い、線虫乾燥重量当りの Cs 量は 2.25×10^{-4} mg/g-dw から 9.51×10^{-4} mg/g-dw に増加していた。従って、本プロセスは、新たに線虫を投与せず、基質を投与するだけで定期的に Cs を回収できるため、低コストな Cs の高回収が期待できる。以上の結果を踏まえ、実際に、寒天培地上で ^{137}Cs を使ったラボスケールの実証試験を行った。^{137}Cs 濃度を 1000 Bq/mL に調製した培養液中で、^{137}Cs を吸収させた ^{137}Cs 吸収菌を線虫に給餌し、20℃で 9 日間静置培養した。培養後、ガンマカウンターを用いて、回収した線虫から放出されるガンマ線を計測したところ、2.58×10^{5} 頭の線虫から 1.72 Bq の ^{137}Cs が検出された。そこで、低線量汚染土壌と線虫の単位体積当りの ^{137}Cs の放射能を試算すると、当初、土壌は 3.47×10^{6} Bq/m^3 であるが、線虫だけの容積では 1.06×10^{9} Bq/m^3 となり、汚染土壌を約 1/100 に減容化できることが推算された。また、本プロセスは、一度の ^{137}Cs 回収量が少量であるため、従事する作業者への被曝の影響を抑え、除染プロセスを実施できる可能性が高いことも示唆される。

C. elegans, Radioactive cesium, Bioremediation

発表責任者：徳本勇人（tokumoto@b.s.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：1D8p01
講演日時：3 月 24 日 13:50～ 1 号館 D8 会場

亜硫酸イオンの酸化によるスルホン化芳香族アミン化合物の微生物分解促進

Stimulation of Sulfonated aromatic amine biodegradation by oxidizing sulfite ion

○早瀬 伸樹、近藤 美咲、喜多 晃久、中川 克彦（新居浜高専　生物応用化）
○Nobuki Hayase, Misaki Kondo, Akihisa Kita, Katsuhiko Nakagawa (Niihama College)

【目的】水溶性アゾ染料の多くは、水への溶解性を改善し、染色性を向上させるため、染料分子にスルホン酸基が導入されている。排水処理施設や環境水中に流出した水溶性アゾ染料は、比較的容易に還元的にアゾ結合が開裂し、発ガン性や毒性が懸念されているスルホン化芳香族アミン化合物に分解される。本研究室では、水溶性アゾ染料のオレンジ II が分解することによって生じるスルホン化芳香族アミン化合物であるスルファニル酸をモデルとして、その微生物分解について解明を進めている。これまでの研究において、スルファニル酸集積培養液から 624-S 株と 624-L 株を単離し、これら 2 株によるスルファニル酸分解機構について検討を行ってきた。本研究では、スルファニル酸分解にともない副生する亜硫酸イオンのスルファニル酸分解への影響について検討を行った。
【方法と結果】スルファニル酸を単一炭素源とした長期の集積培養より 624-S 株、624-L 株を分離した。分離された 624-S 株はスルファニル酸分解能を有していたが、624-S 株においてはスルファニル酸の分解は確認できなかった。624-L 株、624-S 株をそれぞれ別々に、また両菌株を混合して植菌し、約 4mM のスルファニル酸分解試験を一週間行ったところ、624-S 株の単独培養においてはスルファニル酸が約 60%分解され、624-S 株と 624-L 株との混合培養では、スルファニル酸はほぼ完全に分解された。以上の結果から、両菌株が共生することによってスルファニル酸の速やかな分解が可能になっていると推測された。そこで、スルファニル酸分解にともない、増殖阻害性の亜硫酸イオンが蓄積している可能性を考え、各培養液の亜硫酸イオン濃度を測定した。その結果、624-S 株の単独培養においてはスルファニル酸分解に伴っての亜硫酸イオンの蓄積が確認された。一方、両菌株の混合培養では、亜硫酸イオンの蓄積は見られなかった。そこで、624-L 株の亜硫酸イオン除去能力を確認したところ、5mM の亜硫酸イオンを 24 時間で硫酸イオンに酸化していることが明らかになった。以上の結果から 624-L 株のスルファニル酸分解促進効果は亜硫酸イオンを酸化除去することにより 624-S 株の増殖阻害を防止している可能性が示唆された。現在、亜硫酸酸化触媒として機能する金属イオンの添加による 624-S 株のスルファニル酸分解促進効果について検討を行っている。

biodegradation, sulfonated aromatic amine, sulfanilic acid

発表責任者：早瀬伸樹（hayase@chem.niihama-nct.ac.jp）

講演番号：1D8p02
講演日時：3 月 24 日 14:01～ 1 号館 D8 会場

Construction of efficient bioremediation system by using biomass containing hydrocarbon-degrading bacteria

○ADI TIYA YANUAR, KIWAKO S. ARAKI, MOTOKI KUBO (Ritsumeikan University)

[Background] Environmental pollution by petroleum hydrocarbon is a serious problem all over the world. Bioremediation system has been developed to remove the pollutant by hydrocarbon-degrading bacteria (HDB). In our previous studies, organic materials and symbiotic bacteria enhanced activities of HDB. In this study, the efficient bioremediation system by using biomass containing hydrocarbon-degrading bacteria was constructed.

[Materials and Methods] Hydrocarbon-contaminated soil (5,000 mg/kg-soil) was prepared with base oil. Hydrocarbon-degrading bacteria and symbiotic bacteria used were *Rhodococcus erythropolis* NDKK6 and *Bacillus subtilis* natto, respectively. Soybean meal and peat moss were used for biomass, and C/N ratio was adjusted to 20. Bioremediation experiments were carried out as follows. Treatment A: soybean meal and peat moss without bacteria, Treatment B: soybean meal and peat moss with strains NDKK6, Treatment C: soybean meal and peat moss with strains NDKK6 and *B. subtilis* natto, Treatment D: treatment B + *B. subtilis* natto that was inoculated to the soil directly. All treatments were incubated at 30 ^{0}C for 4 weeks. Total bacterial biomass, strains NDKK6 and hydrocarbon concentration in soil were analyzed by the slow-stirring method, real-time PCR, and infrared spectroscopy, respectively.

[Results] Total bacterial biomass varied from 1.23 x 10^8 cells/g-soil at the starting point up to 1.6 x 10^9 cells/g-soil at 4 weeks. Strains NDKK6 also varied from 0.25 x 10^7 cells/g-soil at the starting point up to 4.6 x 10^7 cells/g-soil at 4 weeks. Strains NDKK6 in Treatment C was the highest in this experiment. Hydrocarbon degradation ratios of Treatments A, B, C, and D were 42%, 68.5%, 73.7%, and 68.9%, respectively. Therefore, Treatment C is the most efficient condition for degrading hydrocarbon, and the result shows that use of *B. subtilis* natto as symbiotic bacteria seems to enhance the hydrocarbon degrading ability of strain NDKK6.

biodegradation, hydrocarbon-degrading bacteria, organic materials

講演番号：1D8p03
講演日時：3 月 24 日 14:12～ 1 号館 D8 会場

ペンタクロロフェノールの微生物分解を促進する固体腐植物質の特徴

Characterization of solid-phase humin involved in biodegradation of pentachlorophenol

○笠井 拓哉[1,2]、ファム デュエン ミン[1]、章 春芳[2]、片山 新太[1,2]（[1]名大・未来研、[2]名大院・工）
○Takuya Kasai[1,2], Duyen Minh Pham[1], Chunfang Zhang[2], Arata Katayama[1,2] ([1]IMaSS, Nagoya Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ.)

【背景・目的】腐植物質とは生物的・化学的反応による生体有機物（植物や動物などの死骸）の分解物質である。腐植物質は土壌や底質など幅広い環境に普遍的に存在し、環境中ではカーボンシンクや電子伝達物質として重要な機能を担うことが知られている。腐植物質の中でも、酸・アルカリ条件で不溶な物質は腐植ヒューミンと総称され、腐植ヒューミンが微生物のさまざまな還元反応を促進することが明らかになっている。本研究では、腐植ヒューミンが難分解性かつ残留性有機化合物として知られるペンタクロロフェノール（PCP）の脱塩素反応を促進することを見出し、腐植ヒューミンの電気化学的・物質的特徴から腐植ヒューミンが及ぼす PCP の生物的脱塩素反応への作用機序について解析を行った。
【方法・結果】PCP を唯一の電子受容体とした腐植ヒューミン添加最少培地へ PCP 汚染土壌を植菌源として嫌気条件で継代培養を行ったところ、PCP の脱塩素活性が促進・保持されることが明らかになった。さらに、腐植ヒューミンの代わりに可溶性の腐植物質（フミン酸）を添加した条件では、PCP の脱塩素活性が継代培養で失われることを示し、腐植ヒューミンが微生物を用いた PCP の脱塩素反応に重要な機能を担うことが示された。これまでに、フミン酸が電子伝達物質として機能することが報告されている。そこで我々は、腐植ヒューミンが電子伝達物質として機能し、微生物による脱塩素活性を促進している可能性を考え、PCP 脱塩素活性がある微生物群を還元型腐植ヒューミンを電子供与体とした最少培地を用いて PCP 脱塩素条件下で培養を行ったところ、PCP の分解が観察された。さらに、酸化型腐植ヒューミンでは PCP の脱塩素反応が起こらなかったことから、腐植ヒューミンは細胞外電子伝達能を持ち、腐植ヒューミンから脱塩素細菌へ電子が還元力として供給され、PCP の脱塩素反応を促進されることが明らかになった。次に我々は腐植ヒューミンを介した細胞外電子伝達の作用機序を明らかにするため、腐植ヒューミンの電気化学的・物質的特徴の解析を行った。サイクリックボルタンメトリーによる電気化学的解析を行ったところ、腐植ヒューミンの等電点が-0.30～-0.13 V（vs. 標準水素電極）の範囲に存在することが明らかになった。さらに、フーリエ変換赤外分光光度計および電子スピン共鳴を用いて腐植ヒューミンの物質的特徴を解析したところ、腐植ヒューミンはキノン様構造およびペプチドグリカンに硫黄が関与する構造を有し、これらの構造が腐植ヒューミンの細胞外電子伝達において重要な機能を担う可能性が示唆された。

Solid-phase humin, Pentachlorophenol, Extracellular electron transfer

講演番号：1D8p04
講演日時：3 月 24 日 14:23～ 1 号館 D8 会場

ポリ塩化ビフェニル類汚染化による土壌微生物生態系への影響評価
The effects of polychlorinated biphenyls on the soil bacterial community structure
○櫻間 晴子[1]、比良岡 祐希[1]、山下 舞[1]、澤 誠人[1]、羽賀 雄紀[2]、松村 千里[2]、乾 秀之[3]、中野 武[4]、萩下 大郎[1]([1]京都学園大バイオ環境、[2]兵庫県環境研セ、[3]神戸大バイオ、[4]大阪大環境安全研究管理セ)
○Haruko Sakurama[1], Yuuki Hiraoka[1], Mai Yamashita[1], Masato Sawa[1], Yuuki Haga[2], Chisato Matumura[2], Hideyuki Inui[3], Takeshi Nakano[4], Tairo Hagishita[1] ([1]Fac. of Bioenv. Sci., Kyoto Gakuen Univ., [2]Hyogo Pref. Inst. of Env. Sci., [3]Biosignal. Res. Cent., Kobe Univ., [4]Res. Cent. Env. Preserv., Osaka Univ.)

【背景】
ポリ塩化ビフェニル類（PCBs）は著名な有機塩素系の環境汚染物質である．環境中に残存した汚染物質の自然浄化に土着微生物の分解能力が極めて重要な役割を果たすことから，汚染化に対する土着微生物の動態を知ることが汚染物質の廃絶につながると考える．
PCBs は，「嫌気性細菌による脱塩素化反応」により低塩素化され，「好気性細菌による酸化反応」により低分子化し分解され自然浄化されることが示唆されてきた．PCBs や水酸化 PCBs の脱塩素化反応を行う嫌気性細菌として *Dehalococcoides* 属とその近縁種，*Dehalobacter* 属，および *Desulfitobacterium* 属が知られている．一方で，PCBs の酸化反応を行う好気性細菌としてビフェニル分解菌が知られ，PCBs の無害化に直接寄与している．そこで，本研究では，PCBs 汚染化に対するこれら嫌気性の脱塩素化細菌ならびに好気性のビフェニル分解細菌群集の動態と，これら細菌群集の関係性を明らかにすることを目的とする．
【方法】
PCBs 汚染土壌として 19 箇所の底質土（河川 2 箇所，内湾 7 箇所，化学工場排水路 5 箇所，製紙工場排水路 5 箇所）を用い，これらから DNA を抽出した．その DNA を鋳型として，上記 3 種類の嫌気性の脱塩素化細菌の 16S rDNA を検出した．さらに，これら PCBs 汚染土壌を単離源としてビフェニル分解細菌を探索した．
【結果と考察】
現在までに，10 箇所の土壌解析が終了した．その結果，どの汚染土壌にも嫌気性の脱塩素化細菌が検出されたが，検出された脱塩素化細菌の種類は汚染場所により異なっていた．また，これら PCBs 汚染土壌のうち，河川底質土 1 箇所から 3 種類のビフェニル分解細菌（*Bacillus* 属 2 種，*Psychrobacillus* 属 1 種）を，PCBs 濃度が 0.12 ppm である内湾の底質土から 3 種類の分解細菌（*Paenibacillus* 属 2 種，*Rhodococcus* 属 1 種）を，PCBs 濃度が 2.55 ppm である内湾の底質土から 1 種類の分解細菌（*Staphylococcus* 属）を取得した．同湾内にもかかわらず PCBs 濃度の違いにより異なる細菌が取得できたことから，PCBs 汚染濃度は好気性のビフェニル分解菌の誘導に影響を与える可能性を示唆した．

polychlorinated biphenyl, Environmental DNA, biphenyl dioxygenase

発表責任者：櫻間晴子（sakurama@kyotogakuen.ac.jp）

講演番号：1D8p05
講演日時：3 月 24 日 14:34～ 1 号館 D8 会場

Identification of phenol as a key metabolite of anaerobic benzene biodegradation by *Azoarcus* sp. DN11

○Allan DEVANADERA[1], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1,2], Yuki KASAI[3], Yoh TAKAHATA[4], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1,2] ([1]BRC, UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Chuo Univ., [4]Taisei Corp.)

[Introduction] Benzene is a common soil and groundwater pollutant, which causes a major global health concern because of its carcinogenicity. Oxygen-dependent pathways for microbial benzene metabolism have been studied extensively to design bioremediation processes. In contrast, hydrocarbon-contaminated subsurface sites usually become anoxic which renders the study on anaerobic benzene degradation highly important. Three initiating pathways have previously been proposed for anaerobic benzene ring activation: methylation to toluene, hydroxylation to phenol and carboxylation to benzoate. *Azoarcus* sp. DN11, a denitrifying bacterium, has been shown to be capable of degrading benzene, toluene, benzoate, but not phenol, under both aerobic and anaerobic conditions (Kasai *et al.*, 2007*, Environ. Sci. Technol.*, 41, 6222-6227). However, corresponding pathways for anaerobic benzene degradation have not yet been clarified. This study aims to identify the [^{13}C] metabolites produced during anaerobic degradation of benzene by *Azoarcus* sp. DN11. **[Methods]** Metabolic intermediates produced by DN11 during anaerobic benzene degradation were analyzed by GC-MS for incorporation of [^{13}C] to shed light on the possible route of degradation by the strain. Media preparations and laboratory manipulations were conducted under strict anoxic conditions for anaerobic experiments. 15 μM [^{13}C] benzene was used as initial concentration of benzene. The anaerobic medium (Kasai *et al.,* 2005, *Environ. Microbiol.*, 7, 806-818) was supplemented with nitrate as an electron acceptor. During anaerobic benzene degradation, culture medium were extracted periodically using diethyl ether following the method described by Ulrich *et al.* (2005, *Environ. Sci. Technol.*, 34, 1216-1220) with modifications. Headspace [^{13}C] benzene concentration and [^{13}C] metabolites formed during anaerobic benzene degradation by DN11 were analyzed using the GC-MS. **[Results]** The presence of [^{13}C] phenol was identified and confirmed as one of the intermediates of anaerobic [^{13}C] benzene degradation by DN11. Mass spectral evidence also supported the production of [^{13}C] phenol from [^{13}C] benzene during anaerobic benzene degradation by DN11. On the other hand, no [^{13}C] toluene or [^{13}C] benzoate was detected. These findings suggest that phenol is an intermediate in the anaerobic benzene metabolism of DN11 and that the biodegradation proceeds via the hydroxylation pathway. In the future, anaerobic medium will be supplemented with $H_2{}^{18}O$ to provide evidence on the origin of oxygen for phenol production in DN11 cultures. The incorporation of oxygen from $H_2{}^{18}O$, producing ^{18}O-labeled phenol, will demonstrate that molecular oxygen is not involved in the benzene activation. In addition, whole transcriptiome analysis using RNA-Seq will be performed to provide genetic evidence on the anaerobic benzene degradation of DN11.

biodegradation, benzene, *Azoarcus*

発表責任者：Allan Devanadera（allandvndr@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：1D8p06
講演日時：3 月 24 日 14:55～ 1 号館 D8 会場

回転型スラリーバイオリアクターを用いた A 重油汚染土壌の浄化とその分子メカニズムの解析
Remadiation of contaminated soil by A-fuel oil with rotated slurry bioreacter and analysis of its molecular mechanism

○三好 佑奈[1]、岡田 丈[2]、新谷 政己[1]、金原 和秀[1] ([1]静大院・総合科技、[2]静大・工)
○ Yuna MIYOSHI[1], Joh OKADA[2], Masaki SHINTANI[1], Kazuhide KIMBARA[1] ([1]Grad. Sch. Shizuoka Univ., [2]Fac. Eng., Shizuoka Univ.)

【背景・目的】バイオオーグメンテーションは，環境汚染物質で汚染された場所に，人為的に培養した当該物質の分解微生物を接種することで汚染の除去をはかる手法である．本手法は，低コスト，低環境負荷とされている一方，浄化に必要な期間が予測できないなど確実性が低いとされている．我々は，燃料油の一種である A 重油で汚染された土壌の効率的浄化法の開発を行っており，*Rhodococcus erythropolis* に属する 2 種の油分解菌で，ドラフトゲノムシークエンス解読済みの菌株 A，C（「微生物によるバイオレメディエーション利用指針」適合確認済）を用い，汚染土壌中の迅速な A 重油分解を報告している[1)]．本研究では，高濃度の A 重油で汚染された実汚染土壌の高速処理を目指し，回転型スラリーバイオリアクターを用いた浄化法の開発を行った．また，15°C という低温環境下で分解が活性化・進行する分子メカニズムを遺伝子の発現レベルで明らかにすることを目指した．
【方法】ドラム型リアクターを用い，赤玉土 180 g，芝目砂 120 g，無機培地 200 mL を混合したモデルスラリーを調製した．そこに菌株 A，C を約 3.0×10^8 cells/g-slurry となるよう接種し，A 重油を終濃度 2500，5000 mg/kg-slurry となるよう加え，15°C の低温条件下で回転して分解試験を行い，1 日おきに A 重油残存濃度および菌数の測定を行った．また，A 重油を添加した無機液体培地において，油分解菌を接種して 30，15°C の条件下で A 重油を単一炭素源として振盪培養し，RNA 抽出，qRT-PCR を行うことで，2 種の菌株 A，C がもつ中鎖アルカン分解に関与するアルカンモノオキシゲナーゼをコードする *alkB* 遺伝子の発現の有無とその違いを調査した．
【結果・考察】A 重油濃度 2500 ならびに 5000 mg/kg とした土壌スラリーに分解菌を接種し，リアクターを回転させることで，96 h までに約 98%，144 h までに約 91%の A 重油が分解された．対照実験の結果と比べると，分解菌の接種とリアクターの回転によって，A 重油分解の速度・効率が促進したことが示された．*alkB* の発現を調査した結果，30，15°C の両条件で A 重油を炭素源として培養した際に，*alkB* 遺伝子の発現が認められた．また，使用した菌株 A には 5 種，C には 4 種類存在する *alkB* 遺伝子のホモログの中には，30℃に比べ 15°C において，有意に強い発現を示すものが存在した．現在，菌株 A，C に存在する異なる役割を持つと考えられる *alkB* 遺伝子のホモログにおいて，どの遺伝子が 15°C の環境下での A 重油分解に関与しているのかを調査している．

1. Shintani *et al.*, 2018, J. Biosci. Bioeng., in press.

oil degrading bacteria, rotated slurry bioreacter, alkane monooxygenase

発表責任者：金原和秀（kinbara.kazuhide@shizuoka.ac.jp）

講演番号：1D8p07
講演日時：3 月 24 日 15:06～ 1 号館 D8 会場

Characteristics of rapid growth of Paenibacillus sp. strain 4B1 on dibenzofuran in moderate thermophilic condition

○HA THANH LE THI[1,4], MASAKI SHINTANI[2], RYOTA MORIUCHI[3], HIDEO DOHRA[3], HOANG LOC NGUYEN[4], KAZUHIDE KIMBARA[1] ([1]Department of Environment and Energy System, Graduate School of Science and Technology, Shizuoka Univ., Japan, [2]Department of Bioscience, Graduate School of Science and Technology, Shizuoka Univ., Japan, [3]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, Japan, [4]College of Sciences, Hue University, Vietnam)

Agent Orange containing dioxin-related compounds, which were used by the US military during the Vietnam war, has remained serious consequences to the environment and human being. These hazardous compounds are highly toxic, carcinogenic and persistent in the environment. The microbiological approach represents an environmental friendly and cost-effective remediation technology for dioxin-contaminated soil. A dibenzofuran-degrader, *Paenibacillus* sp. strain 4B1, was isolated from a former airbase in A Luoi district in the central of Vietnam, of which the levels of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin were 20-21 pg/g-dry matter (10-fold of average value monitored in Japan). This isolate showed optimal growth at 40-45°C in the presence of dibenzofuran as a sole source of carbon and energy. Interestingly, strain 4B1 showed faster growth than another degrader, *Paenibacillus* sp. strain YK5, which was reported as the first dibenzofuran-degrading strain belonging to the group of low G+C (around 50%) Gram-positive bacteria (Iida et al., 2006, Arch. Microbiol. 184: 305-315; Daane et al., 2002, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52: 131-139). The highest OD_{600} of strain 4B1 reached to 1.1 after 48 hours, while strain YK5 reached the highest growths (OD_{600} was around 0.9) after 54 hours of cultivation at 45°C with dibenzofuran as a carbon source. The strain 4B1 could degrade around 90% of 1000 mg/L of dibenzofuran in liquid cultures within 2 days incubated at 45°C, which showed a faster degradation ability in comparison to strain YK5. To understand characteristics of their dibenzofuran degradation pathways, draft genome sequences of these two strains were determined by MiSeq (Illumina). These results proposed that complete mineralization of dibenzofuran by these *Paenibacillus* strains might be initiated with hydroxylation at the angular position of dibenzofuran, then following gentisate metabolic pathway. The *dbfA1A2BC* genes involved in the upper pathway of dibenzofuran degradation of these two strains were well-conserved (approximately 99% identity in nucleotide sequences level). Nevertheless, their growths were significantly different; these results implied that their transcription might be differently regulated in each strain. The amount of transcriptional products of each *dbfA1* genes encoding alpha subunit of dibenzofuran dioxygenase were compared by using quantitative RT-PCR. The expression level of strain 4B1 showed 4-fold higher than that of strain YK5 after 3 hours of cultivation with dibenzofuran. These results suggest that strain 4B1 has an advantage for applying in the bioremediation of environments contaminated by dioxin or dioxin–related compounds.

dibenzofuran, Paenibacillus, genome sequences

発表責任者：Kazuhide Kimbara（kimbara.kazuhide@shizuoka.ac.jp）

講演番号：1D8p08
講演日時：3 月 24 日 15:17～ 1 号館 D8 会場

Sphingomonas bisphenolicum AO1 株のビスフェノール A (BPA)分解能の不安定化評価系の構築
Establishment of the destabilization evaluation system for the degradation ability to the bisphenolA in *Sphingomonas bisphenolicum* AO1

○村上 将和[1]、仲野 育惠[1]、松村 吉信[1,2] ([1]関西大・生命生物工、[2]関西大・ORDIST)
○ Masakazu Murakami[1], Ikue Nakano[1], Yoshinobu Matsumura[1,2] ([1]Kansai University・Department of Life Science and Bioengineering, [2]Kansai University・ORDIST)

【背景】 ビスフェノール A (BPA) はポリカーボネート樹脂などの原料として利用される物質で、発がん作用や内分泌撹乱作用を示すことが確認されている。そこで当研究室では、BPA 汚染環境の修復に利用可能な BPA 分解菌の探索を試み、BPA を約 6 時間で分解できる *Sphingomonas bisphenolicum* AO1 株を単離した。本株はビフェニル類化合物等も分解でき、合成化合物全般の環境浄化に利用できるものと考えている。また、ゲノム解析の結果により AO1 株は 2 つの染色体 (Chromosome 1-2) と 4 つのプラスミド (pBAR 1-pBAR4) で構成されており、その中のプラスミドの 1 つである pBAR1 に BPA 分解関連遺伝子である *bisdAB*、*adh*、*lsd*、*bisdF* がコードされていることが明らかとなった。一方、本株は BPA 分解時に一時的な増殖能の低下や BPA 非分解菌 (AO1L 等) の出現などゲノム構造の不安定性が実用化への問題点となっている。しかし、この不安定性の要因や頻度は明らかとなっていない。そこで、本研究では AO1 株のゲノム不安定化頻度を評価するため、BPA 分解能の不安定化評価系を構築することを目的とした。
【方法と結果】AO1 株不安定化頻度の測定には BPA 非分解細胞の出現率で評価した。様々な条件で培養した AO1 株細胞を BPA (115 μg/mL) とカザミノ酸 (1 g/l)、グルコース (1 g/l) を含む BSM 改変培地 (以下 BPA-BSM 改変培地) と BPA を含まない BSM 改変培地で培養した。30℃、3 日間培養を行い、BPA-BSM 改変培地で生育しなかった AO1 株の割合を BPA 非分解細胞出現率とした。必要に応じて、BPA-BSM 改変培地で出現したコロニーを再度、新鮮な同組成の培地に植え継ぎ評価した。まず、AO1 株を BPA 存在下の BPA-BSM 改変培地で培養した場合では不安定化頻度は 0%であるのに対して、BPA 非存在下の BSM 改変培地で培養した場合の不安定化頻度は約 60%であった。このことは、BPA が AO1 株の BPA 分解能力を安定化させていることを示唆している。また、BPA-BSM 改変培地にて生育できなかった株を多数単離することができた。現在、これらの株の BPA 分解遺伝子の確認や発現量の解析を行い、BPA 非存在下で生育が確認されなかった原因の特定を試みている。

BisphenolA, genome stability, Sphingomonas

発表責任者：松村吉信（ymatsu@kansai-u.ac.jp）

講演番号：1D8p09
講演日時：3 月 24 日 15:28～ 1 号館 D8 会場

Meiothermus ruber H328 株由来 protein disulfide oxidoreductase (PDO)発現増強株における転写の検討―トリ羽毛分解への影響調査―

Effect of protein disulfide oxidoreductase produced by *Meiothermus ruber* H328 -transcriptional analysis of *pdo7* for chicken feather degradation-

武田 梨花[2]、○淺野 優希[1]、渡部 邦彦[2] ([1]京府大・生命環境、[2]京府大院・生命環境)

Rika TAKEDA[2], ○Yuki ASANO[1], Kunihiko WATANABE[2] ([1]Kyoto Prefectural Univ., [2]Kyoto Prefectural Univ. Graduate Sch.)

【背景・目的】

好熱性細菌 *Meiothermus ruber* H328 株はケラチン分解性プロテアーゼを細胞外に分泌し、難分解性のトリ羽毛を強力に分解する。トリ羽毛の主成分はケラチンであり、強固な構造の主因と考えられるジスルフィド結合を有する。そのため、トリ羽毛分解の主体となる酵素としてジスルフィド結合を還元する protein disulfide oxidoreductase (PDO) に着目した。H328 株のゲノムデータから PDO 候補遺伝子として *pdo7* 遺伝子を選抜した。昨年の本大会では H328 株由来の強力なプロモーターを組み込んだ *pdo7* 発現増強株を作製し、トリ羽毛分解への影響を調査し報告したが、今回はさらに定量リアルタイム PCR を用いた培養経過に伴う *pdo7* 遺伝子の転写量変化の調査を行い、走査型電子顕微鏡によるトリ羽毛の分解過程の観察および複数の基質を用いた Pdo7 還元活性測定を行った。

【方法・結果】

まず定量リアルタイム PCR により、野生株と *pdo7* 発現増強株の *pdo7* 遺伝子転写量の変化を YS 培地 (yeast extract 1%, sucrose 1%, pH 8.0) において調査した。その結果、*pdo7* 発現増強株では培養 6 時間で転写量が最大に達し、また野生株と比較して顕著に高い転写量が見られた。このことから、プロモーターの強化が *pdo7* の転写量増加を引き起こし、別途行った Pdo7 タンパク質発現量の解析においても、*pdo7* 発現増強株は同時期の Pdo7 発現量が野生株よりも高いことから、同タンパク質による機能増強に繋がりトリ羽毛分解を早めると推察された。

次に、走査型電子顕微鏡解析のために、両株のトリ羽毛含有培地 (YS 培地, トリ羽毛 3%, $CaCO_3$ 0.5%) で 6 日間培養を行い、培養 1 日目から 6 日目にかけてトリ羽毛を採取した。このトリ羽毛分解を観察したところ、*pdo7* 発現増強株は野生株に比べて分解が早く、培養 1 日目から観察された。

また、Pdo7 タンパク質発現量が最大になる培養 9 時間の菌体に対しジスルフィド結合を有するシスチンを用いて Pdo7 還元活性を測定した。その結果、*pdo7* 発現増強株は野生株の 2 倍程度高い活性を示すことが判った。現在他の基質を用いた活性についても調査しており、発現が強化された Pdo7 が直接ケラチンのジスルフィド結合を還元するかを調査しており、トリ羽毛含有培地での培養時についても検討している。

transcriptional analysis, chicken feather degradation, Scanning Electron Microscope

講演番号：1D8p10
講演日時：3 月 24 日 15:39～ 1 号館 D8 会場

ユーグレナの明暗条件下における生育と内分泌攪乱物質；ノニルフェノールの代謝機能の関連性
Association of the metabolic function of the endocrine disrupting chemical；nonylphenol in the growth of *Euglena gracilis* under light and dark conditions

大桑（林） 浩孝[1,2]、乾 博[1,3]、岡井 康二[1]、阪本 龍司[1,4]、○中野 長久[1]([1]大阪府大・研究推進機構生物資源、[2]大阪府立環農水研、[3]大阪府大院・栄養、[4]大阪府大院・生命環境科学)
Hirotaka Okuwa-Hayashi[1,2], Hiroshi Inui[1,3], Yasuji Okai[1], Tatsuji Sakamoto[1,4], ○Yoshihisa Nakano[1] ([1]Center for Research and Development of Bioresources, Osaka Pref. Univ., [2]Research Institute of Environment, Agriculture and Fisheries, Osaka Prefecture, [3]Div. Clin. Nutr., Osaka Pref. Univ., [4]Div. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)

【目的】ユーグレナ（ミドリムシ）は葉緑体を有し、分類学上動物界と植物界の両方に分類される生物であり、暗中では従属栄養により生育し、光存在下では独立栄養で生育可能な生物である。典型的な内分泌攪乱物質であり、発がん性が懸念される p-ノニルフェノール(PNP)が 20 年間で海水中に 50 倍に蓄積されたといわれ、東京湾では海底泥に 200 倍に蓄積されているとされる。そして、そこに住む魚介類の消化管に蓄積し、私達の食生活、健康に影響することが懸念されている。更にこれらの化合物の代謝系に関する検討も最近はほとんど行われていないのが現状である。わずかに藤井ら(*)の細菌による PNP の分解の事実の報告があるのみで、その代謝経路が明らかにされていない。そこで, ユーグレナ細胞の増殖に対する影響とその機能について検討した。

[方法]ユーグレナの野生株 *Euglena gracilis* Z(Z 株)、および葉緑体欠損株 *Euglena gracilis* SM-ZK(SM-ZK 株)を用いて明暗条件下での細胞増殖への影響を検討した。環境ホルモンとして、PNP を用いた。

[結果と考察]低濃度(25 μM)の内分泌攪乱物質ある PNP により、酵母や数種のバクテリアは細胞増殖が完全に抑制されるが、ユーグレナにおいては極めて高濃度（500 μM）の PNP に対しても細胞増殖の抑制が認められなかった。そこで、その抵抗性がユーグレナの光合成器官に依存するかどうかを検討するために、光照射下で培養した野生株 Z 株の葉緑体欠損株 SM-ZK 株を用いて検討したところ、同様に細胞増殖の抑制が認められなかった。次に、暗条件下で培養した Z 株及び SM-ZK 株を用いて細胞増殖に対する影響を検討したところ、両株において有意の細胞増殖抑制効果が認められた。酸化ストレスとの関連を検討するために、抗酸化物質として作用するビタミン；トコフェロール、β-カロテン、アスコルビン酸、及びグルタチオンを添加したところ、脂溶性ビタミンであるトコフェロール、β-カロテンが細胞増殖に対して防御効果を示した。光照射下では、培地中、及び細胞内でも PNP がほとんど認められなくなったことから、酸化ストレス抑制だけでなく、他の要因が示唆された。

(*)：藤井克彦、浦野直人、化学と生物、39、63-70(2001).

Euglena gracilisis, p-nonylphenol, environmental remediation

講演番号：1D8p11
講演日時：3 月 24 日 16:00～ 1 号館 D8 会場

Construction of organic soil based on soil fertility index (SOFIX)

○ PITCHAYAPA PHOLKAW, AYAKA MURAJI, QUOC THINH TRAN, KIWAKO S. ARAKI, MOTOKI KUBO (Ritsumeikan University)

【Background】

With increasing concern around conventional agricultural systems in terms of environmental impacts, food security and economics, there is increasing interest in organic agriculture. The soil fertility index (SOFIX) was developed considering the importance of biological factors in soil fertility. According to the concept of SOFIX, bacterial biomass and their activities are the main factors that determine the soil fertility. More than 5,000 agricultural soil samples have been analyzed by the SOFIX, and the database has also been constructed for improvement of agricultural field. Total carbon (TC): 18,000 mg/kg, total nitrogen (TN): >1,000 mg/kg, total phosphate (TP): >800 mg/kg, and total potassium (TK): >1,000 mg/kg were suitable soil condition for organic agriculture by the SOFIX database. In this study, organic soils based on the SOFIX database was tried to construct.

【Materials and methods】

Black soil, mountain soil, peat moss, vermiculite, and wood chips were used for base soil. Oil cake, soybean, bone meal, and cow manure were used as additive materials. Soils and additive materials were analyzed by SOFIX, MQI (manure quality index), and OQI (organic material quality index). *Brassicas rapa* was used for plant, and the plant cultivation was carried in the plant growth room.

【Results】

Values of TC, TN, and TP in the black soil was higher than the mountain soil, while value of TK in the mountain soil was high level. Values of TC in the additive materials were relatively higher except for vermiculite, but value of TK in the vermiculite was high. Properties of the additive materials were also analyzed. The values of TC and TN in the oil cake and the soybean meal were relatively higher (above 30% and 3%), and the cow manure contains well balanced organic materials.

Several organic soils based on the SOFIX database was prepared using these base soils and additive materials. Bacterial biomass in all organic soils were reached to 6.0×10^8 cells/g-soil after 1 week at room temperature with 30% water, and nitrogen and phosphate circulation activities became higher. The growth of *B. rapa* with the organic soils were higher than that with the chemical soil.

organic soil, bacterial biomass, soil environment

講演番号：1D8p12
講演日時：3 月 24 日 16:11～ 1 号館 D8 会場

毒素―抗毒素系の多重化により堅牢にした非天然アミノ酸要求性による生物学的封じ込め法
A robust biological containment using a multi-layered toxin-antitoxin system
○加藤 祐輔（農研機構生物機能）
○Yusuke KATO (NIAS, NARO)

「生物学的封じ込め」とは、人間の管理下では生きられるが、自然環境中では死ぬように、生物を遺伝的にプログラムする技術である。この技術によって、安全性が確認されていない遺伝子組換え生物、病原体、侵略的外来生物など、「役に立つが、危険性もある」生物を、意図せず自然環境中にはびこらせるのを防ぎ、安全に利用することができる。

理想的な生物学的封じ込めは、「自然には存在しない物質がないと生きられない生物」である。そのような生物を作出する新しい方法として、自然には存在しない非天然アミノ酸を栄養として与えないと死んでしまう遺伝回路を構築し、大腸菌に適用した例について、以前に報告した[1]。この方法は、ColE3-ImmE3 毒素－抗毒素遺伝子を用いる。また、非天然アミノ酸 3-ヨウ化-$_L$-チロシン(IY)をアンバー終止コドンに導入するためのアミノアシル tRNA シンテターゼ[2]、およびその基質となるアンバー抑制性 tRNA も、導入する。抗毒素遺伝子には、アンバー終止コドンが挿入されており、IY が与えられないと、作られない。したがって、この遺伝回路を施された大腸菌は、IY 存在下では抗毒素が発現し毒素を中和するので生存・増殖できる。しかし、IY がなければ抗毒素は作られず、遊離の毒素が蓄積し、死滅する。特に、高い免疫誘導性をもちながら病原性は低く、かつ環境への拡散の心配がない、人畜に対する生ワクチン株を作るために、有効な方法である。

この方法の欠点は、遺伝的変異によって、封じ込めが機能しなくなり、生き残る菌体の発生率が、比較的高いことである。上記の ColE3-ImmE3 と IY 導入系を用いた系では、約 10 万分裂で 1 つの確率で、そのような生き残りを生じた。そこで、複数の毒素－抗毒素を導入して、相乗的に生き残りの発生確率を抑えることを試みた。また、異なる非天然アミノ酸導入系を用いて、改善するか確かめた。その結果、生き残りの発生確率が、10 億分裂に 1 以下になる封じ込め菌株を得た。この値は、NIH 基準（10 億分裂に 10 以下）に適合する。

[1] Kato Y (2015) An engineered bacterium auxotrophic for an unnatural amino acid: a novel biological containment system. *PeerJ* **3**:e1232.
[2] Sakamoto K, Maruyama K, Oki K, Iraha F, Kato-Maruyama M, Takahashi M, Ohtake K, Kobayashi T, Kuramitsu S, Shirouzu M, Yokoyama S. (2009) Genetic encoding of 3-iodo-$_L$-tyrosine in *Escherichia coli* for single-wavelength anomalous dispersion phasing in protein crystallography. *Structure* **17**:335-344.

biological containment, unnatural amino acid, Escherichia coli

発表責任者：加藤祐輔（kato@affrc.go.jp）

講演番号：1D8p13
講演日時：3 月 24 日 16:22～ 1 号館 D8 会場

POM を介した魚類と水の関係性構築

Relationship between fish and water via POM

○鈴木 漱星[1]、朝倉 大河[2]、松本 朋子[2]、守屋 繁春[1,2]、菊地 淳[1,2,3] ([1]横市院・生命医、[2]理研・環境資源、[3]名大院・生命農)
○Sosei SUZUKI[1], Tomoko MATUMOTO[2], Tomoko MATUMOTO[2], Shigeharu MORIYA[1,2], Jun KIKUCHI[1,2,3] ([1]Grad. Sch. Med. Life Sci., Yokohama City Univ, [2]RIKEN CSRS, [3]Grad. Sch. Bioagri. Sci., Nagoya Univ.)

【背景と目的】世界第 6 位の排他的経済水域を有する日本近海は、暖流と寒流から流れ込む豊かな栄養塩に恵まれ世界有数の生物多様性を誇る。一方で自然および人為的要因による富栄養化、例えば赤潮の頻発化により生態系破壊も頻発している[1,2]。環境水中には、魚類の餌となるプランクトンが多く存在し、魚類はこれらのプランクトンを始めとした食物連鎖を形成している。魚類からは体表の分泌や鱗の剥がれ、糞便などの排泄物により、物質を介して環境水と相互に影響を及ぼすことが予想される[3,4]。これらの懸濁有機物(POM)は、海洋中にいる微生物が分解し、溶存有機物(DOM)へ変換している[5]。DOM に着目した水質評価が存在するが[6]、水や魚類が POM を介して、どのようにして互いに影響を及ぼしているのかは不明である。環境水と魚類が互いに影響を与える POM を明らかにすることで、海洋環境持続性における新たな水質評価法として利用可能であると考えた。本実験では、魚種と環境を確立させた水槽水の水質測定、濾過物の NMR 計測、及び魚類と水の細菌叢の DNA 抽出を行い、魚類と水の関係性を示す要因有機物質を把握する初期的検討を遂行した。
【方法】POM を用いた水質評価として、飼育水槽において異なる魚種及び環境負荷を与えた水槽水 POM、魚種ごとの皮膚粘膜、及び東京湾沿岸の自然環境水 POM との差に着目して NMR による測定及び解析を試みた。各環境水の水温、溶存酸素量(DO)、電気伝導度(Cd)、塩濃度、pH、簡易クロロフィル濃度のなどの既存の水質計測を行った。各水槽水を 2 L ずつ、8.0、1.0、0.2 μm のフィルター径にて濾過し、フィルター上 POM を KPi によって抽出し、2D- *J*res による NMR 計測を行った。
【結果】既存の水質計測における大きな差は見られなかった。各種スペクトルデータ比較をした結果、自然水と水槽水において大きな違いが見られ、異なる魚種の水槽間においても違いがみられた。各魚種の差は、餌の違いか魚の粘膜や腸内にいる微生物による違い、あるいはその両方を示すと考えられた。同じ魚種においても、環境負荷による差及びスペクトル変動が見られた。

Ref. [1] Kikuchi & Yamada, Analyst 142, 4161-4172 (2017). [2] Oita et al., Sci.Total Environ. 636, 12-19 (2018).[3] Asakura et al., PeerJ 2, e550 (2014).[4] Mekuchi et al., PLoS One 13, e0197256 (2018).[5] Asakura et al., Anal. Chem. 86, 5425-5432 (2014).[6] Uchimiya et al., Metabolites 7, e52 (2017).

particulate organic matter, profiling, aquatic environment

発表責任者：鈴木　漱星（w185418c@yokohama-cu.ac.jp）

講演番号：1D8p14
講演日時：3 月 24 日 16:33～ 1 号館 D8 会場

紅藻類大型海藻オゴノリによる栄養塩吸収
Nutrient uptake by Gracilaria vermiculophylla
○柳岡 直樹[1]、鹿川 紗希[2]、孝志 ちあき[2]、垣田 浩孝[2]、小比賀 秀樹[3] ([1]日本大学大学院　総合基礎科学研究科、[2]日大文理、[3]産総研健康工学)
○ Naoki YANAOKA[1], Saki SHIKAGAWA[2], Chiaki TAKASHI[2], Hirotaka KAKITA[2], Hideki OHIGA[3] ([1]Grduate School of Integrated Basic Sciences, Nihon Univ., [2]College of Humanities and Sciences, Nihon Univ., [3]Health Research Institute, AIST)

【諸言】魚類養殖は大きな海面浮上型の生け簀を用いて行うことが多く、その大きさに伴った魚が養殖される。これらの魚を養殖するためには多くの餌が必要となり、それに伴い排出される糞なども多くなっていくため、これらが流出すると栄養塩濃度が上昇することになってしまう。この栄養塩濃度の上昇を食い止めることと、水質を浄化することは、科学的側面や文化的側面から非常に重要であると考えられる。栄養塩除去の方法の研究は様々行われており、その中にはバクテリアや薬剤を使う方法などがある。しかし、現在までに行われてきた研究は栄養塩を除去することができても薬剤投与することで高コストになってしまうという経済的デメリットや、大量除去するまでに至らないなどの課題がある。一方、海藻の栄養塩吸収能は少ないが、海藻は栄養塩をある一定期間海藻藻体内に留めておくことが可能である。海藻を使った水質浄化の可能性は当該海藻の栄養塩吸収能や成長能を見積もることにより評価できる。そこで本研究では、食用としても重要な海藻であるオゴノリ科海藻を選び、当該海藻の栄養塩吸収能力や成長能力を様々な温度や栄養塩濃度条件で評価することを目的とした。【材料・方法】オゴノリ科海藻の成熟藻体を天然海域で採取した。藻体を洗浄後、実験室内でプロバゾーリの補助栄養塩を添加した海水（滅菌処理済み）を用いて静置培養を行った。次いで水温１８℃、光強度６０～８０μｍｏｌ／ｍ２・ｓ、日長時間１４時間明期／１０時間暗期の条件下でエアレーション培養を行った。培地交換は１週間毎に実施した。エアレーション培養により得られた培養藻体を先端部を５ｍｍの長さに切断して頂端切片を得た。頂端切片を２００ｍＬの培地の入った三角フラスコに植え付け、振とう培養を行った。水温は１５℃、２０℃、２５℃の３条件で行い、光強度は６０～８０μｍｏｌ／ｍ２・ｓ、日長時間は１４時間明期／１０時間暗期の条件で行った。培地交換は１週間毎とし、培地交換の際に頂端切片の湿重量を測定し、海藻成長率を算出した。窒素化学形態の海藻窒素吸収量への影響を明らかにするために、アンモニア態窒素含有海水とアンモニア態窒素含有培地で成長及び栄養塩吸収量比較を行った。栄養塩吸収量の算出にはオートアナライザーを用いた。オゴノリ科海藻の成長への水温の影響を３種類のオゴノリ科海藻で比較した。【結果・考察】徳島県採取のオゴノリ科海藻は水温２０℃で最も成長が早く、栄養塩吸収量も高かった。アンモニア態窒素の方が硝酸態窒素よりも多く海藻に吸収されることを明らかにした。

Seaweed, Nutrient, Temperature

発表責任者：垣田浩孝（Kakita.hirotaka@nihon-u.ac.jp）

講演番号：1E1a01
講演日時：3 月 24 日 09:00～ 1 号館 E1 会場

ヒトドリコールキナーゼ hDK の物理的相互作用に重要な領域の解析

Analyses of regions critical for the physical interactions of the human dolichol kinase (hDK)

○高橋 哲夫、杉村 知夏、山本 達也（東海大工）
○Tetsuo Takahashi, Chinatsu Sugimura, Tatsuya Yamamoto (Tokai Univ.)

【目的】

ヒト粗面小胞体(rER)膜に局在するポリトピック型酵素であるドリコールキナーゼ(hDK)は、ドリコール(Dol)の CTP 依存性リン酸化反応を触媒することにより、*N*-グリカンの前駆体であるドリコール中間体(DLO)を生合成する Dol サイクルにおいて、必要とされるドリコールリン酸(Dol-P)を *de novo* で供給している。我々はこれまでに、酵母 split-ubiquitin システムを利用して、hDK が少なくとも 10 の膜貫通ドメインを有すること、本酵素同士で物理的に相互作用しホモダイマー(またはオリゴマー)を形成していること、並びに、本酵素が同じ Dol サイクルで働くヒト GlcNAc-1-P 転移酵素(hGPT)、ヒト Dol-P-Man 合成酵素(hDPMS)の膜貫通サブユニット hDPM3 及びヒトドリコールピロリン酸ホスファターゼ (hDPP)と物理的に相互作用することを見出した。今回我々は、当システムによる解析をさらに進め、hDK と各酵素間の物理的相互作用に必要な領域を限定することを試みた。

【方法、結果及び考察】

hDK1 で想定された疎水性領域(hydrophobic region; HR)またはループ領域 loop region; LR)毎に N 末端及び C 末端側から欠失を行った hDK を発現する欠失ベイトコンストラクトを適宜調製した。また相互作用の相手となる 3 種類の酵素についても同様の欠失プレイコンストラクトを作成した。そしてこれらのベイト/プレイの各共発現酵母株について、レポーター遺伝子 *HIS3* 及び *ADE2* の発現を検出する為の 2 種類の選択培地(SD-LWH 及び SD-LWHA)上での増殖性を観察することにより相互作用の有無を検証した。その結果、hGPT との相互作用には hDK 側の第 2 疎水性領域(HR2)及び第 3 ループ領域(LR3)と、hGPT 側の HR2 及び LR3 が重要であることが判明した。また、hDPM3 との相互作用には hDK 側の第 4 疎水性領域(HR4)及び第 5 ループ領域(LR5)と、hDPM3 側の第 2 疎水性領域(HR2)が重要であることが判明した。さらに、hDPP との相互作用には hDK 側の HR4 及び LR5 と、hDPP 側の HR1 及び LR2 が重要であることが判明した。現在、これらの各相互作用に必須な領域のさらなる限定を試みている。

dolichol kinase, physical interaction, split-ubiquitin system

講演番号：1E1a02
講演日時：3 月 24 日 09:11～ 1 号館 E1 会場

Caldanaerobacter subterraneus 由来 CE-4 酵素のドメインマッピング
Domain mapping of CE-4 deacetylase from *Caldanaerobacter subterraneus*
○佐々本 康平[1,2]、森芳 邦彦[3]、大本 貴士[3]、上垣 浩一[4]、西矢 芳昭[2]、中村 努[1]([1]産総研、[2]摂南大学院、[3]大阪産業技術研究所、[4]近畿大学)
○Kohei SASAMOTO[1,2], Kunihiko MORIYOSHI[3], Takashi OHMOTO[3], Koichi UEGAKI[4], Yoshiaki NISHIYA[2], Tsutomu NAKAMURA[1] ([1]Natl Inst Adv Ind Sci & Technol, [2]Grad. School Sci. Eng. Setsunan Univ., [3]Osaka Municipal Technical Research Institute, [4]Kindai Univ.)

【背景】
Carbohydrate-Active enZymes (CAZy) の Carbohydrate Esterase（CE）ファミリーに属する多くの酵素が、1 分子の中に 2 以上のドメイン構造を持つ。研究対象とした *Caldanaerobacter subterraneus* subsp. *tengcongensis*（別名 *Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4）由来 TTE0866 acetylxylan esterase は、1 分子当たり 324 のアミノ酸残基から構成される。TTE0866 は CE ファミリー4 に分類される約 200 残基領域の N 末端側に約 100 残基の機能未知の領域（TTE0866-N 末端領域）があり、さらに N 末端 22 残基は分泌シグナル配列である。シグナル配列を除いた TTE0866（以下野生型 TTE0866 とする）は酢酸セルロースの脱アセチル化活性を持ち、その最適温度は 60℃である。この触媒活性は C 末端側の CE ファミリー4 の領域に由来することが考えられる。TTE0866-N 末端領域と相同性の高い配列は同属バクテリアのゲノム中に多数見られるが、その構造機能は未知である。そこで本研究では、TTE0866 の N 末端を順次欠失させた変異体を作製し、N 末端欠失が二次構造と熱安定性に与える影響を検討した。
【結果】
二次構造と熱安定性は、CD 測定により検討した。シグナル配列と TTE0866-N 末端領域の N 末端側 20 残基および 40 残基を欠失させた変異体（Δ20 および Δ40、以下同様に名付ける）は、野生型 TTE0866 に比べてαヘリックス含量が増加していた。逆に Δ60、Δ80、Δ100 は、αヘリックス含量が減少していた。また、昇温による 220nm のモル楕円率の変化で熱変性を検討したところ、野生型 TTE0866 が約 75℃で変性するのに対して、Δ40 は 80℃まで変性しなかった。しかし、TTE0866-N 末端領域を全て欠失させた Δ110 では約 70℃で変性することが分かった。これらのことから、TTE0866-N 末端領域の N 末端側約 40 残基を除くことで、Δ40 は規則的な二次構造含量が増し、熱安定性が向上すると考えた。また、TTE0866-N 末端領域を全て欠損させた Δ110 では、野生型 TTE0866 と比べ変性温度が低下したことから、TTE0866-N 末端領域は酵素全体の構造安定化に寄与している事が示唆された。

carbohydrate esterase, *Thermoanaerobacter tengcongensis*, protein engineering

発表責任者：中村努（nakamura-t@aist.go.jp）

講演番号：1E1a03
講演日時：3 月 24 日 09:22～ 1 号館 E1 会場

分離菌 A34 株 N-アセチルヘキソサミニダーゼの糖転移作用

Transglycosylation of N-acetyhexosaminidase from A34 strain

○倉掛 昌裕、天井 裕可里（福山大海洋生物）
○Masahiro Kurakake, Yukari Amai (Fukuyama Univ., Marine Bioscience)

【目的】カニやエビ殻等の成分であるキチンは N-アセチルグルコサミンがβ-1,4 結合した多糖であり医療や食品等に利用されている。キチン分解酵素系の中で N-アセチルグルコサミンを遊離させる N-アセチルヘキソサミニダーゼには糖転移作用を有するものもあり、新規オリゴ糖の合成が期待できる。昨年、土壌よりキチンオリゴ糖分解菌の分離を行い、その中で比較的高い糖転移作用を有する N-アセチルヘキソサミニダーゼを生産するカビ類 A34 株を得た。本研究では A34 株 N-アセチルヘキソサミニダーゼの糖転移性等の酵素的性質について調べた。

【方法】A34 株を 0.5%キチンオリゴ糖（東京化成㈱）、1.5%寒天の平板培地にて 30℃で培養し種菌に用いた。液体培養は 0.5%キチンオリゴ糖、0.25%酵母エキスの液体培地 100ml（500ml 三角フラスコ）にて、150rpm、30℃で 4 日間行い、培養ろ液に 80%飽和となるように硫酸アンモニウムを添加し塩析させることで粗酵素を調製し、各種クロマトカラムでの分画に供した。酵素活性は 1mM *p*-ニトロフェニル-β-D-N-アセチルグルコサミニドに pH 5、40℃にて 10 分間反応させ、遊離する *p*-ニトロフェノール量を比色法で測定することで求めた。1 分間に 1μmol の *p*-ニトロフェノールを生成させる酵素量を 1U と定義した。糖転移反応では基質に 2%の N,N'-ジアセチルキトビオース（東京化成㈱）を用い、主に pH7、40℃で 24 時間作用させた。また 8%の受容体（糖アルコール、糖類、ポリフェノール等）を加えて反応させ、受容体特異性について調べた。生成糖の分析には GL-C610 カラム（日立化成㈱）を有する HPLC（流速 1.0ml/min、キャリアー　蒸留水、カラム温度 60℃）を用いた。

【結果および考察】A34 株酵素の糖転移反応はその酵素濃度の影響を受け、高濃度では加水分解が進行し糖転移率は減少した。基質 N,N'-ジアセチルキトビオースの分解率が 48.6-49.9%の時の糖転移性が最も高くなり、3 糖以上のオリゴ糖組成は 31%程度となった。生成オリゴ糖は、3 糖類のトリアセチルキトトリオースの他に 4 および 5 糖類のテトラアセチルキトテトラオースおよびペンタアセチルキトペンタオースも生成した。受容体特異性について調べたところ、糖アルコールではグリセリンへの糖転移性が高く、2 糖類ではマルトースおよびラクトースへの糖転移が認められた。硫安塩析粗酵素を Sephadex G-25 および Super Q Toyopearl カラムより分離し、酵素的性質について調べたところ A34 株酵素の最適 pH は 5.1 付近と酸性側で、最適温度は 40℃付近であった。しかし糖転移反応ではアルカリ性になるほど糖転移率は増加し、オリゴ糖の生成量は pH8 付近で最大となった。

N-acetylhexosaminidase, transglycosylation, oligosaccharides

講演番号：1E1a04
講演日時：3 月 24 日 09:33～ 1 号館 E1 会場

Gongronella butleri 由来エキソ-キトビオハイドロラーゼの発現と酵素化学的性質
Expression in *Pichia pastoris* and characterization of exo-chitobiohydrolase from *Gongronella butleri*

○野口 晴菜[1]、満行 将太郎[1]、関 清彦[1]、永野 幸生[2]、後藤 正利[1]、光富 勝[1]([1]佐賀大農、[2]佐賀大分析セ)
○Haruna NOGUCHI[1], Shotaro MITSUYUKI[1], Kiyohiko SEKI[1], Yukio NAGANO[2], Masatoshi GOTO[1], Masaru MITSUTOMI[1] ([1]Saga Univ., [2]ARCES)

【目的】キトサン加水分解酵素として、キトサンの β-1,4 グルコサミニド結合に作用しキトオリゴ糖を生成するエンド型キトサナーゼ（EC 3.2.1.132）およびキトサンを非還元末端からグルコサミン単位で切断するエキソ-β-D-グルコサミニダーゼ（EC 3.2.1.165）の存在が知られている。我々は、キトサンを非還元末端からキトビオース単位で切断するエキソ-キトビオハイドロラーゼ（CBH）を *Gongronella butleri* の培養濾液から精製し、その基質特異性および作用様式を明らかにした[1)]。しかし、本酵素の構造および機能についてはまだ解明されていない。そこで、本酵素の構造を明らかにするために一次構造を決定するとともに、*Pichia pastoris* を宿主とした発現系を構築した。
【方法と結果】*G. butleri* をキトサンオリゴ糖含有培地で培養し、培養上清から陽イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過クロマトグラフィーにより酵素を精製した。精製酵素をプロテインシーケンサーおよび LC-MS/MS により解析し、3 つの内部アミノ酸配列を決定した。さらに、トランスクリプトーム解析により、これら内部アミノ酸配列を含むタンパク質をコードする遺伝子を見いだし、これを CBH 遺伝子と推定した。この遺伝子にコードされるタンパク質は 391 のアミノ酸（推定シグナルペプチド 18 アミノ酸を含む）から構成され、平均分子量 41,792.67 と算出された。

CBH 推定遺伝子をメタノール資化性酵母 *P. pastoris* を用いて分泌発現するため、発現ベクター pPICZα-*cbh* を構築した。メタノール誘導発現後、陽イオン交換クロマトグラフィーにより分泌タンパク質を精製した。SDS-PAGE により分子量約 6.5 万の組換えタンパク質が検出された。トランスクリプトーム解析により算出された分子量とは約 2.3 万の差があり、これは宿主である *P. pastoris* によるハイマンノース型 *N*-結合糖鎖修飾のためであると考えられた。また、キトサンを基質として組換え酵素を作用させたところ、キトサンを分解し、キトビオースのみを生成した。このことから、トランスクリプトーム解析により推定した遺伝子は、CBH の遺伝子であることが明らかとなった。

相同性検索から CBH は GH-46 キトサナーゼファミリーに属することが示された。そこで GH-46 キトサナーゼの系統樹を作成したところ、本酵素は、エンド型キトサナーゼのクラスターとは異なる、ケカビ亜門に属する真菌由来のクラスターを形成することが明らかになった。これらケカビ亜門真菌は細胞壁にキトサンを含んでおり、本酵素が真菌自身の形態形成に関わる可能性が示唆された。

1）Seki et al., *J. Biosci. Bioeng.*, in press.

chitosanase, exo-chitobiohydrolase, *Gongronella butleri*

発表責任者：関　清彦（sekik@cc.saga-u.ac.jp）

講演番号：1E1a05
講演日時：3 月 24 日 09:44～ 1 号館 E1 会場

リステリアキチナーゼの機能未知領域の機能
The role of unknown function region in *Listeria* chitinase
○坂口 政吉、本田 翔太郎、木村 将大、脇田 悟誌、岡 侑司、川喜田 正夫（工学院大先進工）
○Masayoshi Sakaguchi, Shotaro Honda, Masahiro Kimura, Satoshi Wakita, Yuji Oka, Masao Kawakita (Kogakuin University)

【目的】キチナーゼは，単独，もしくは複数のドメインで構成される。最近，我々は細菌リステリア属の二種のキチナーゼ (LinChi78，LinChi35) の酵素化学的性質を報告した。LinChi78 は，N 末端側から触媒ドメイン (CatD)，フィブロネクチン III 様ドメイン (FnIII，F)，キチン結合ドメイン (ChBD，C) を持つと推定され，さらに CatD と FnIII との間に機能未知領域 (UFR，U) が存在する。約 150 アミノ酸の UFR は，ドメインデータベース上類似ドメインが見いだせない。本研究では，リステリアキチナーゼ LinChi78 の C 末端領域欠損体および変異導入体を構築，解析し，各ドメインと UFR の機能を調べることを目的とした。
【方法】LinChi78 を研究対象として，C 末端から欠損した欠損体 (ΔC，ΔFC，ΔUFC および部分欠損した欠損体 (ΔF，ΔU) を作製し，人工基質やコロイダルキチンに対する活性，そしてキチンビーズに対する結合能を調べた。さらに，変異導入体の人工基質 [4NP-$(GlcNAc)_2$] に対する分解活性を評価した。
【結果】ΔC，ΔF，ΔFC の人工基質に対する活性は，LinChi78 と比較して大きな変化がなかったが，ChBD を欠損した欠損体 (ΔC，ΔFC) は，コロイダルキチンに対する活性が約 30%と低下した。 一方，UFR を欠損した欠損体 (ΔUFC，ΔU) は，人工基質，コロイダルキチンに対する分解活性を著しく減少させた。キチンビーズに対する結合能は，ChBD を欠損した欠損体 (ΔC，ΔFC，ΔUFC) で減少した。活性に重要な UFR 部分を同定するために，ΔFC (LinChi78-586) の C 末端を順次欠損した欠損体を構築し，調べた。LinChi78-571 は ΔFC と同程度の活性を示したが，LinChi78-566 の活性が著しく減少したことから，UFR 中 567 番目から 571 番目のアミノ酸(^{567}GKQTI^{571}) が活性に関与していることがわかった。そこで、これらのアミノ酸を Ala 残基へと置換した変異体を調査した結果，Gln569Ala と Ile571Ala において活性が減少し，これらの二重変異体が LinChi78-571 の活性の 10%にまで低下した。つまり，これら 2 つのアミノ酸が UFR の機能に関与していることを示した。これらの結果は，UFR は活性部位形成に寄与すること，LinChi78 は UFR が付加された独特の触媒ドメインを持つことが示唆された。

chitinase, truncation, insertion region

発表責任者：坂口政吉（bt11532@ns.kogakuin.ac.jp）

講演番号：1E1a06
講演日時：3 月 24 日 10:05～ 1 号館 E1 会場

Methylomonas sp. 由来 D-アルロース 3-エピメラーゼの発現と構造解析
Expression and X-ray structure analysis of recombinant *Methylomonas* sp. D-allulose 3-epimerase

○吉田 裕美[1,3]、吉原 明秀[2,3]、加藤 志郎[2,3]、望月 進[2,3]、秋光 和也[2,3]、何森 健[2,3]、神鳥 成弘[1,3] ([1]香川大・総合生命研究セ,医、[2]香川大・農学部、[3]香川大・国際希少糖研究教育)
○ Hiromi YOSHIDA[1,3], Akihide YOSHIHARA[2,3], Shiro KATO[2,3], Susumu MOCHIZUKI[2,3], Kazuya AKIMITSU[2,3], Ken IZUMORI[2,3], Shigehiro KAMITORI[1,3] ([1]Life Sci. Res. Center & Fac. Med., Kagawa Univ., [2]Fac. Agric., Kagawa Univ., [3]Int'l Inst. Rare Sugar Res. and Educ., Kagawa Univ.)

【目的】希少糖 D-アルロース(別名 D-プシコース)は、血糖値上昇の抑制効果、動脈硬化の予防や肥満の抑制効果などが見いだされ、D-アルロースを含む甘味料や食品、飲料が機能性食品として市販されている。酵素を利用した D-アルロースの生産には、天然に大量に存在する D-フルクトースから、基質特異性の広いホモダイマー酵素の *Pseudomonas cichorii* D-タガトース 3-エピメラーゼ(D-TE)を用いる生産、D-アルロースに対して高い触媒活性を示すホモテトラマー酵素の *Agrobacterium* 属、*Clostridium* 属、 *Arthrobacter* 属由来 D-アルロース 3-エピメラーゼ (D-AE) を用いる生産が報告されている。本研究では、これらの酵素と相同性を示すアミノ酸配列をデータベースから検索し、*Methylomonas* sp. 由来のアミノ酸配列について、合成遺伝子を用いて発現させ、その酵素活性と構造解析を行うことを目的とした。
【方法】BLAST 検索の結果より、*Methylomonas* sp. 由来の推定糖異性化酵素の遺伝子を合成し、C 末端に His タグを持つ Met_D-AE を大腸菌を宿主とする組換え体として発現させた。アフィニティーカラムを用いて精製後、ケトースに対する酵素活性の確認を行った。また、結晶化を行い、得られた結晶を用いて、高エネルギー加速器研究機構 PF BL5A にてデータ収集を行った。
【結果】リコンビナント Met_D-AE は D-allulose に対して酵素活性を示すことが確認された。また、得られた結晶から 1.8Å分解能でデータ収集を行った。Met_D-AE の構造は結晶中には非対称単位あたり 2 分子存在し、ダイマー構造を示した。Met_D-AE のモノマー構造は、ホモダイマーを形成する D-TE のモノマー構造、これまでに報告されているホモテトラマーを形成する D-AE とよく類似していた。

D-allulose (D-psicose) 3- epimerase, rare sugar, X-ray structure

発表責任者：吉田　裕美（h.yoshi@med.kagawa-u.ac.jp）

講演番号：1E1a07
講演日時：3 月 24 日 10:16～ 1 号館 E1 会場

イトマキヒトデ膵臓由来のα-L-フコシダーゼの精製、諸性質決定および構造解析

Purification, characterization and structural analysis of α-L-fucosidase from the *pancreas of Patiria pectinifera*.

○鈴木 智大[1]、小野 晶子[1]、後藤 咲季[2]、河野 はるか[2]、松井 萌[2]、青木 大地[1]、松田 勝[1]、河岸 洋和[3,4]、尾形 慎[2] ([1]宇大・バイオ、[2]福島高専・化学バイオ、[3]静岡大・農、[4]静岡大・グリーン研)
○Tomohiro SUZUKI[1], Akiko ONO[1], Saki GOTOH[2], Haruka KONO[2], Megumi MATSUI[2], Daichi AOKI[1], Masaru MATSUDA[1], Hirokazu KAWAGISHI[3,4], Makoto OGATA[2] ([1]C-Bio, Utsunomiya Univ., [2]Dept. of Appl. Chem. and Biochem., Natl. Inst. of Technol., Fukushima Col., [3]Fac. of Agric., Shizuoka Univ., [4]Res. Inst. of Green Sci. and Technol., Shizuoka Univ.)

[目的]

フコースは 6-デオキシ糖の一種であり、主に糖質の還元末端糖として広く生物界に存在しており、様々な生命現象に関与している。これまでに、フコースを加水分解する酵素として、ブタ肝臓由来やキヒトデ由来の酵素が報告されている[1,2]。しかし、これらの酵素は生物種により基質特異性や反応効率などが大きく異なり、新規酵素の探索は新たな用途展開のために有用である。そこで本研究では様々な動物や微生物中から L-フコース加水分解をする新規酵素を探索した。その結果、イトマキヒトデの膵臓中から新規α-L フコシダーゼを見出したため、本酵素の同定および一次アミノ酸配列を決定することを目的とした。

[方法及び結果]

イトマキヒトデの膵臓を摘出し、PBS にて抽出・遠心分離後、硫安沈殿を行った。その結果、50～70%硫安沈殿画分に活性が見られた。その沈殿画分を各種クロマトグラフィーにより分画し、SDS-PAGE に供した結果、55 kDa に単一バンドが確認された。精製したα-L-フコシダーゼの諸性質を検討した結果、最適温度は 70℃であること、最適 pH は pH 4.0～5.0 であることが明らかになった。また、本酵素は Hg^{2+}によって活性が阻害された。本酵素の基質特異性を検討した結果、Fuc-α-*p*NP を選択的に加水分解すること、また 2-sulfo-Fuc-α-*p*NP および fucosyl-α-lactoside（Fuc-α-Galβ1→4Glc-β-*p*NP）を加水分解可能であることが明らかとなった。

さらに、別途我々が取得したイトマキヒトデのゲノム情報を使用した LC-MS/MS 解析等によって、本酵素の 1 次構造を決定に成功した。その 1 次構造解析を各種インフォマティクスツールを用いて行った結果、これまでに報告されているα-L-フコシダーゼに広く保存されている *C* 末端領域を欠損した特異な構造を有していることが明らかになった。また、リアルタイム PCR を用いて、イトマキヒトデの各組織における定量的遺伝子発現解析を行った結果、膵臓における発現が卵巣よりも 5 倍高く、膵臓に特異的に発現していることが示唆された。

1) Zeng, X., et al. 1999. J. Appl. Glycosci. 46, 241.
2) Visa, M., et al. 2012. Biochimie, 94, 1199.

α-L-fucosidase, *Patiria pectinifera*, structural analysis

発表責任者：鈴木智大（suzukit@cc.utsunomiya-u.ac.jp）

講演番号：1E1a08
講演日時：3 月 24 日 10:27～ 1 号館 E1 会場

Microbacterium arabinogalactanolyticum 由来の組み換え endo-D-arabinase の機能解析
Characterization of a recombinant endo-D-arabinase from *Microbacterium arabinogalactanolyticum*

○藤田 清貴[1]、田中 悠暉[1]、石渡 明弘[2]、伊藤 幸成[2]、隅田 泰生[3]、北原 兼文[1]([1]鹿児島大農、[2]理研、[3]鹿児島大院理工)
○Kiyotaka Fujita[1], Yuki Tanaka[1], Akihiro Ishiwata[2], Yukishige Ito[2], Yasuo Suda[3], Kanefumi Kitahara[1] ([1]Faculty of Agriculture, Kagoshima university, [2]Riken, [3]Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima university)

【目的】結核菌に代表される抗酸菌の細胞壁には、D-アラビナン鎖で構成されたリポアラビノマンナン(LAM)やアラビノガラクタン(AG)が含まれている。これらの D-アラビナン鎖は、α1,5-主鎖で構成された D 体のアラビノフラノース(D-Ara*f*)が部分的にα1.3-分岐した基本構造を持っている。endo-D-arabinase は、LAM や AG の α-D-Ara*f* 結合をエンド型で切断する糖質加水分解酵素として知られている。これまでに、*Microbacterium arabinogalactanolyticum* JCM9171（=*Aureobacterium* sp. M2 株）(Kotani, et al. Biken J. 14, 379-387 (1971))、*Cellulomonas* sp.（Xin, et al. Biochim. Biophys. Acta, 1473, 267-271 (1999))、そして *Mycobacterium smegmatis*（Sun, et al. Protein J, 31, 51-58 (2012)) で endo-D-arabinase の酵素活性が報告されていたものの、クローニングは行われていなかった。最近、我々は *Mi. arabinogalactanolyticum* JCM9171 由来の endo-D-arabinase をコードする AbnMA1 遺伝子のクローニング及びその機能解析に成功し、2018 年度の第 91 回日本生化学会などで報告している。そこで本研究では、AbnMA1 と 26%の同一アミノ酸を持つ AbnMA2 のクローニング及びその組換え酵素の機能解析を行い、AbnMA1 との基質特異性の比較を行うことを目的とした。

【方法】大腸菌で発現させた組換え AbnMA2 を、結核菌青山 B 株由来の LAM(ナカライテスク)、*Mycobacterium smegmatis*（スメグマ菌)由来の LAM 及び AG 画分、合成分岐アラビナン 22 糖等の合成 D-アラビナン鎖に作用させた。LAM 分解物の解析は、silver-PAS 染色による糖脂質の検出と HPAEC-PAD による遊離糖の検出を組み合わせて行い、AG 及び合成 22 糖分解物の解析は、TLC と HPAEC-PAD を用いて行った。

【結果】組換え AbnMA2 の酵素処理により結核菌とスメグマ菌由来 LAM のリポマンナン(LM)への分解とオリゴ糖の遊離が確認された。また、AG 及び合成 22 糖からのオリゴ糖の遊離が確認された。このため、AbnMA2 がα1,5-D-アラビナン鎖を切断する endo-D-arabinase であることが明らかとなった。様々な D-アラビナン鎖に対する分解性を比較した結果、AbnMA2 はサブサイト-3 から＋2 で D-アラビノオリゴ糖を認識するのに対して、AbnMA1 はサブサイト-3 から＋1 で認識すると予想された。endo-D-arabinase の基質特異性は、サブサイト＋側の基質認識の違いに大きく影響されると考えられる。

endo-D-arabinase, lipoarabinomannan, Mycobacterium

発表責任者：藤田清貴（k4022897@kadai.jp）

講演番号：1E1a09
講演日時：3 月 24 日 10:38～ 1 号館 E1 会場

Bacteroides thetaiotaomicron 由来 GH97 酵素：5 つの機能未知パラログの解析
Characterization of five GH97 paralogs from *Bacteroides thetaiotaomicron*
○菊池 麻子、中川 雄登、奥山 正幸、田上 貴祥、木村 淳夫（北大院農）
○ Asako KIKUCHI, Yuto NAKAGAWA, Masayuki OKUYAMA, Takayoshi TAGAMI, Atsuo KIMURA (Hokkaido Univ.)

【背景と目的】糖質加水分解酵素はアミノ酸配列の類似性に基づいて glycoside hydrolase family (GH) に分類される．一般に，同一 GH に属する酵素の触媒機構は統一されているが，GH97 は反転型と保持型の触媒機構を示す酵素が共存するユニークな集団である．腸内細菌 *Bacteroides thetaiotaomicron* は 10 個の GH97 酵素を有し，これまでに 1 つの反転型 α-glucoside hydrolase，3 つの保持型 α-galactosidase および 1 つの保持型 β-L-arabinopyranosidase/α-galactosidase について報告されている．*B. thetaiotaomicron* 由来 GH97 酵素は共通の祖先遺伝子から派生したパラログ同士であり，GH97 酵素は分子進化の過程で活性中心を構成するアミノ酸残基に変異が導入されたことにより触媒機構および基質特異性が多様化したと考えられる．本研究では，*B. thetaiotaomicron* VPI-5482 が有する GH97 酵素のうち，現在までに解析がなされていない 5 個の遺伝子 *bt_0132*，*bt_0683*，*bt_3163*，*bt_3294* および *bt_4581* の産物である BT0132，BT0683，BT3163，BT3294 および BT4581 の基質特異性を解析することで，GH97 の分子進化について新たな知見を得ることを目的とした．
【方法と結果】大腸菌発現系を用いて個々の組換えタンパク質を生産し，Ni^{2+}-アフィニティークロマトグラフィーにより精製した．種々の *p*-nitrophenyl (*p*NP) 合成基質を用いて，これらタンパク質の基質特異性を評価した．BT0132 は *p*NP α-D-glucopyranoside (*p*NP Glc) をわずかに加水分解し，反応速度 0.0022 μmol/min/mg を示したが，低活性のため機能は判断できなかった．一方，BT0683 および BT4581 は *p*NP Glc を最もよく加水分解した．BT0683 および BT4581 の *p*NP Glc に対する反応速度パラメータ (k_{cat}/K_m) はそれぞれ 370 $s^{-1}mM^{-1}$，4500 $s^{-1}mM^{-1}$ であった．BT3163 および BT3294 は *p*NP α-D-galactopyranoside (*p*NP Gal)を最もよく加水分解した．BT3163 および BT3294 の *p*NP Gal に対する k_{cat}/K_m はそれぞれ 0.24 $s^{-1}mM^{-1}$，8.9 $s^{-1}mM^{-1}$ であった．これより BT0683 と BT4581 は α-glucoside hydrolase，BT3163 と BT3294 は α-galactosidase であると決定した．マルトオリゴ糖およびガラクトオリゴ糖に対する反応については現在解析中である．GH97 に属する酵素のアミノ酸配列を系統解析に基づいて分類すると，BT0683 および BT4581 は反転型 α-glucoside hydrolase と，BT3163 および BT3294 は保持型 α-galactosidase とそれぞれ近縁であり，触媒残基も保存されていることが分かった．以上の結果から，GH97 は反転型 α-glucoside hydrolase 群と保持型 α-galactosidase 群に分子進化したことが示唆された．

Glycoside hydrolase family 97, molecular evolution, *Bacteroides thetaiotaomicron*

発表責任者：菊池　麻子（akikuchi@abs.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：1E1a10
講演日時：3 月 24 日 10:49～ 1 号館 E1 会場

変異型 galacto-*N*-biose/lacto-*N*-biose I phosphorylase を利用した lacto-*N*-tetraose の酵素合成法の開発

Enzymatic synthesis of lacto-*N*-tetraose using a mutant galacto-*N*-biose/lacto-*N*-biose I phosphorylase

○則岡 翼[1]、後藤 愛那[1]、加藤 紀彦[1]、諏訪 英理子[2]、松尾 道憲[2]、北岡 本光[3]、片山 高嶺[1]([1]京大院生命、[2]京女大院家政、[3]農研機構　食品研)
○Tsubasa NORIOKA[1], Aina GOTOH[1], Toshihiko KATOH[1], Eriko SUWA[2], Michinori MATSUO[2], Motomitsu KITAOKA[3], Takane KATAYAMA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Woman's Univ., [3]National Agriculture and Food Research Organization)

【背景・目的】

乳児の腸管内では一般的にビフィズス菌が最優勢となり、ビフィズスフローラと呼ばれる特殊な細菌叢が形成される。この独特の細菌叢は、免疫機能が未熟な乳児を病原性細菌やウイルスの感染などから守るとともに、細胞分裂の活発な乳児に葉酸を提供するという点で重要な役割を果たしていると考えられている。人工乳栄養児と比べて母乳栄養児ではビフィズス菌の占有率がより高い、成熟したビフィズスフローラが形成されることから、ヒトの母乳中にはビフィズス菌の増殖を促す「ビフィズス因子」が存在することが予想されていた。当研究室では、母乳に含まれるヒトミルクオリゴ糖(Human Milk Oligosaccharides: HMOs)のビフィズス因子としての機能に特に注目し、ビフィズス菌の HMOs 代謝経路について明らかにするとともに、HMOs 合成方法の開発を行っている。本研究では主要な HMOs の 1 つであり、HMOs の基本骨格として最も多く含まれている lacto-*N*-tetraose (LNT) の酵素合成法の開発を試みた。

【方法・結果】

HMOs 代謝に関わる酵素である galacto-*N*-biose/lacto-*N*-biose-I phosphorylase (GLNBP) は、galacto-*N*-biose および lacto-*N*-biose I の 2 糖構造を認識し、加リン酸分解反応およびその逆反応を触媒する。*Bifidobacterium longum* 由来 GLNBP の X 線結晶構造を参考にして様々な変異体を作製し、各変異体酵素の LNT に対する加リン酸分解活性を調べた結果、ある領域を数個のグリシン残基に置換した変異体が野生型酵素には見られない LNT の加リン酸分解反応を触媒することを見出した。これらグリシン置換体を精製して活性測定を行った結果、3 個の連続するグリシン残基に置換した変異体が最も高い比活性を有することが明らかとなったため、次にこの 3 個のグリシン残基のいずれか 1 個をさらに他のアミノ酸残基に置換した変異体を作製し、LNT に対する活性が最も高くなる変異体を選抜した。最終的に最も高い活性が得られた変異体酵素を用いて基質特異性などを検討すると共に、galactose 1-phosphate と lacto-*N*-triose II を基質として LNT 合成反応を試みた。galactose 1-phosphate から生じるリン酸を消費する目的で、sucrose および sucrose phosphorylase の存在下で合成反応を行ったところ、添加した galactose 1-phosphate 量と lacto-*N*-triose II 量から推定される化学当量に対応する量の LNT が合成された。なお、合成 LNT は脱塩および HPLC による精製後、^{1}H-NMR および MALDI-TOF MS 解析によってその構造を確認した。

Human milk oligosaccharides, Lacto-*N*-tetraose, Bifidobacterium

発表責任者：片山高嶺（takane@lif.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：1E1a11
講演日時：3 月 24 日 11:10～ 1 号館 E1 会場

Bifidobacterium bifidum 由来スルフォグリコシダーゼ BbhII の X 線結晶構造解析
Crystal structure of sulfoglycosidase BbhII from *Bifidobacterium bifidum*

○加藤 紀彦[1]、山田 千早[2]、前渋 貴子[1]、芦田 久[3]、伏信 進矢[2]、片山 高嶺[1]([1]京大院生命、[2]東大院農、[3]近畿大生物理工)
○ Toshihiko KATOH[1], Chihaya YAMADA[2], Takako MAESHIBU[1], Hisashi ASHIDA[3], Shinya FUSHINOBU[2], Takane KATAYAMA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Univ. of Tokyo, [3]Kindai Univ.)

ヒト腸管に生息するビフィズス菌 *Bifidobacterium bifidum* は、ヒトミルクオリゴ糖やムチン糖鎖に対して作用する糖質分解酵素を細胞表層に多数保持している。*B. bifidum* JCM1254 株由来の細胞表層糖質分解酵素のひとつ BbhII は、ムチン硫酸化糖鎖から末端の 6 位硫酸化 *N*-アセチルグルコサミン（GlcNAc-6S）残基を遊離するスルフォグリコシダーゼとして同定された。本酵素は Carbohydrate Binding Module（CBM）32 ドメインと Glycoside Hydrolase family 20 ドメインを含む 1060 アミノ酸からなり、硫酸基の無い GlcNAc 基質に対しては活性が低く、硫酸化糖鎖特異的に作用する。本研究では硫酸化糖鎖の認識メカニズムについてより詳細に調べるために、本酵素の X 線構造解析を行った。

BbhII は pET23b を用いて大腸菌 BL21(DE3)株において C 末端 His6 タグ融合タンパク質として発現・精製した。N 末端、C 末端それぞれからトリミングした本酵素について比活性を調べたところ、アミノ酸配列 39-861aa を有するタンパク質において約 6 割の活性を保持したことからこれを活性保持最小領域として結晶化を行った。作製した Se-Met 置換体および Native BbhII の結晶を用いて SPring-8 にて X 線回折実験を行った結果、Se-Met 置換体により初期位相の決定に成功し、Native 結晶で GlcNAc-6S との複合体の構造を分解能 1.7Å で決定した。

BbhII の全体構造は３つのドメイン（N-domain、catalytic domain、C-domain）からなり、N-domain（46-197 aa）は CBM32 と類似しており、catalytic domain（198-750 aa）は他の GH20 ファミリーと同様に$(\beta/\alpha)_8$-barrel 構造をとるが、C-domain（751-861 aa）に関しては類似の構造は見られなかった。Catalytic domain のサブサイト-1 に GlcNAc-6S の結合が見られ、基質の *N*-アセチル基の求核攻撃を助ける残基(Asp552)、酸/塩基触媒残基（Glu553)の他に GlcNAc-6S の 6 位スルホン酸と直接水素結合する残基として Gln640 と Trp651 が特定された。さらに疎水性残基の Pro や Val も周囲に存在し、*Streptomyces plicatus* の β-*N*-acetylhexosaminidase 結晶構造(PDB: 1HP4)との重ね合わせによる比較においても、GlcNAc6 位スルホン酸を認識する基質ポケットの存在が推定された。さらに N-domain においても GlcNAc-6S の結合が観察され、CBM32 のムチン硫酸化糖鎖認識への関与が考えられた。以上より、GlcNAc-6S を含む糖鎖に対して活性を示すスルフォグリコシダーゼ BbhII の構造的基盤を明らかにした。

Sulfoglycosidase, GH20, sulfated glycan

発表責任者：加藤紀彦（tkatoh@lif.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：1E1a12
講演日時：3 月 24 日 11:21～ 1 号館 E1 会場

GH127 β-L-アラビノフラノシダーゼと阻害剤の複合体構造
Crystal structure of GH127 ß-L-arabinofuranosidase in complex with inhibitor
○澤野 孝太[1]、成田 覚[2,3]、荒川 孝俊[1,4]、山田 千早[1,4]、藤田 清貴[5]、石渡 明弘[3]、伊藤 幸成[3]、伏信 進矢[1,4]([1]東大院・農生科・応生工、[2]芝浦工大院理工、[3]理研、[4]東大・微生物連携機構、[5]鹿児島大院農)
○Kota SAWANO[1], Satoshi NARITA[2,3], Takatoshi ARAKAWA[1,4], Chihaya YAMADA[1,4], Kiyotka FUJITA[5], Akihiro ISHIWATA[3], Yukishige ITO[3], Shinya FUSHINOBU[1,4] ([1]Univ of Tokyo, [2]Shibaura institute of technology, [3]RIKEN, [4]CRIIM, UTokyo, [5]Kagoshima Univ)

植物はヒドロキシプロリン(Hyp)に富む糖タンパク質(Hydorxyproline-rich glycoproteins：HRGP)を様々な生物学的プロセスに利用している。植物細胞壁には構造タンパク質であるエクステンシンといいう HRGP が含まれている。この HRGP の Hyp 残基には最大 4 単位のアラビノフラノース(Ara*f*)からなるβ-アラビノオリゴ糖(Ara*f*-α1,3-Ara*f*-β1,2-Ara*f*-β1,2-Ara*f*-β1-*O*-Hyp)が結合している。2011 年に *Bifidobacterium longum* からこのβ-アラビノオリゴ糖を分解する酵素群が発見された。そのうち、GH127 に属するβ-L-アラビノフラノシダーゼ(HypBA1)は構造解析も行われ、HypBA1 の活性中心には 3 残基のシステイン(Cys)と 1 残基のグルタミン酸が配位した 2 価亜鉛イオンが存在し、そのうちの 1 つである Cys417 が求核性触媒残基として働く新規触媒機構が提唱されている。これまでに、アポ構造だけでなく、反応産物であるβ-L-Ara*f* との複合体、合成基質である *p*-nitrophenyl(*p*NP)-β-L-Ara*f* との複合体を得ている。今回、反応中間体の構造を得るためにβ-L-アラビノフラノシダーゼの Cys と共有結合することで不可逆な阻害剤として働くと考えられるブロモアセチル基を有するβ-L-アラビノフラノシルアミン誘導体との複合体構造を得たので報告する。
大腸菌を宿主として HypBA1 の組換えタンパク質を発現・精製を行い、ブロモアセチル基を有するβ-L-アラビノフラノシルアミン誘導体との共結晶化を行った。SPring-8 にて X 線回折実験を行い、2.6 Åの分解能で決定した。その結果、Cys417 と結合した L-アラビノフラノシルアミン誘導体とみられる電子密度が観察された。さらに、合成基質である *p*NP-β-L-Ara*f* を使用しハロアセチル基を有するβ-L-アラビノフラノシルアミン誘導体の阻害定数も報告する。
GH127, GH146 に属するβ-L-アラビノフラノシダーゼの構造ではこれらの活性中心は保存されており、システイングリコシダーゼの反応メカニズムを使用している可能性が高い。

Crystal structure, Glycoside hydrolase, Cysteine glycosidase

講演番号：1E1a13
講演日時：3 月 24 日 11:32～ 1 号館 E1 会場

アラビノース含有糖鎖の分解に関わる *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 由来の GH51 酵素の解析
GH51 α-L-arabinofuranosidases from *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* are involved in degradation of arabinose-containing oligosaccharides
○吉原 侑希[1]、宮原 祐貴[2]、米野 雅大[1]、芦田 久[1,2] ([1]近畿大院　生物理工、[2]近畿大　生物理工)
○YUKI YOSHIHARA[1], YUKI MIYABARA[2], MASAHIRO KOMENO[1], HISASHI ASHIDA[1,2] ([1]Biology-Oriented Science and Technology, Kindai Univ. Grad. Sch., [2]Biology-Oriented Science and Technology, Kindai Univ.)

ビフィズス菌は、ヒト大腸内で難消化性の植物性多糖を資化することで乳酸や酢酸を産生し、腸内 pH を下げ、腸内環境を整える働きがある。ヒト腸内にはビフィズス菌 7 種が主に生息しているが、年齢により菌叢が変わることが知られている。乳児期にはヒトミルクオリゴ糖がビフィズス菌の主な炭素源となっているが、離乳を機に野菜などから摂取される難消化性多糖が炭素源の対象となる。本研究は、ビフィズス菌の中でも乳児から成人に広く分布する *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* のヘミセルロース資化分子機構を明らかにするものである。タイプ株である *B. longum* subsp. *longum* JCM 1217 はアラビノースを含有するヘミセルロースを資化できるが、その分子機構は完全に明らかにされていない。本菌のゲノム上に存在する α-L-アラビノフラノシダーゼ候補遺伝子は糖質加水分解酵素ファミリーGH43 または GH51 に分類されており、9 個存在する GH43 酵素は全て菌体外に、4 個存在する GH51 酵素は菌体内に局在することがアミノ酸配列から予想されている。これまでに GH43 酵素についてはほぼ解析が進んでいるため、本研究では GH51 に属する候補遺伝子 4 個のうち解析されていない *bllj_0474* と *bllj_0101* の諸性質を解析した。これらの遺伝子の全長を PCR で増幅させ、in-fusion 法を用いて pET-23b ベクターにクローニングし、組換えタンパクを *E. coli* BL21(λDE3) で大量発現させた。BLLJ_0474 と BLLJ_0101 はいずれも合成基質 pNP-α-L-アラビノフラノシドに対して作用する α-L-アラビノフラノシダーゼであり、天然基質であるアラビナンやアラビノキシランからアラビノースを遊離させた。BLLJ_0101 は α-L-アラビノフラノシドに特異的であったが、BLLJ_0474 は β-D-キシロピラノシドや α-L-アラビノピラノシドにも作用する基質特異性の広い酵素であった。BLLJ_0474 をアラビノオリゴ糖に作用させたところ、糖鎖が短いほど速やかに分解された。また、側鎖を持つアラビノオリゴ糖では主鎖が同じ長さでも遊離するアラビノース量が極端に減少した。このため、BLLJ_0474 はアラビナン主鎖由来の α-1,5 アラビノオリゴ糖の菌体内における分解に関わる酵素であると考えられる。

Bifidobacterium, arabinofuranosidase, probiotics

講演番号：1E1a14
講演日時：3 月 24 日 11:43～ 1 号館 E1 会場

Bifidobacterium pseudocatenulatum の *N*-アセチルスクロサミン加水分解酵素の精製と諸性質調査
Purification and characterization of *N*-acetylsucrosamine-hydrolyzing enzyme of *Bifidobacterium pseudocatenulatum*

○永嶋 誠[1]、吉野 貴紘[2]、藤田 宙[2]、平野 貴子[1,2]、袴田 航[1,2]、西尾 俊幸[1,2] ([1]日大院生資科、[2]日大生資科・生命化)
○Makoto NAGASHIMA[1], Takahiro YOSHINO[2], Sora FUJITA[2], Takako HIRANO[1,2], Wataru HAKAMATA[1,2], Toshiyuki NISHIO[1,2] ([1]Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon Univ., [2]Chem. and Life Sci., College of Bioresource Sciences, Nihon Univ.)

【目的】

キチンオリゴ糖やヒトミルクオリゴ糖に由来するオリゴ糖のように、様々な *N*-アセチルグルコサミン（GlcNAc）を構成糖として含むオリゴ糖には、様々な有用生理機能特性があることが報告されている。このことから、当研究室では新規な GlcNAc 含有ヘテロオリゴ糖の合成について検討している。これまでに、GlcNAc とスクロースの混合溶液に糖転移型 β-フルクトフラノシダーゼを作用させることによって、スクロースのグルコース残基が GlcNAc に置換された構造を有する *N*-アセチルスクロサミン（SucNAc）の効率的な酵素合成法の確立に成功している。また、本オリゴ糖の諸性質について調査を行った結果、スクロースと比較して酸や熱に安定なことや、*Bifidobacterium pseudocatenulatum* や *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* といった特定のビフィズス菌に対して特異的に資化されることがわかっている。このことから、*B. pseudocatenulatum* について SucNAc の分解に関わる酵素の探索を行ったところ、2 種類の SucNAc 加水分解酵素が存在していることが分かった。そこで、これらの酵素の精製を行い、諸性質を調査することにした。

【方法・結果】

B. pseudocatenulatum を、GAM 培地によって前培養を行った後、生理食塩水を用いて菌体洗浄を行って GAM 培地由来のグルコースを除去した。次いで、グルコースを含まない 30 mM SucNAc 含有 MRS 培地に OD_{600} が 1 となるように希釈して接種した後、終濃度 5 mM になるようにグルコースを添加し、嫌気的に培養を行った。その後、遠心分離により回収した菌体を 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.0）により洗浄し、フレンチプレスを用いて菌体を破砕した。それに界面活性剤を添加し、目的酵素を抽出した。まず、陰イオン交換カラムクロマトグラフィー（SuperQ-650S）により、2 種類の酵素を分けた後、その片方についてさらなる精製を行った。次いで、DEAE-Sepharose を用いた陰イオン交換カラムクロマトグラフィー、疎水性相互作用カラムクロマトグラフィー（Phenyl-Sepharose）、およびゲル濾過カラムクロマトグラフィー（Sephacryl S-100）によって、SucNAc の分解に関わる酵素を電気泳動的に単一になるまで精製した。その後、本精製酵素について、TLC 分析による基質特異性の調査や HPLC 分析による比活性の算出などの酵素化学的性質の調査を行った。その結果、本菌が生産する SucNAc 分解酵素は β-フルクトフラノシダーゼであることが示唆された。現在、もう一方の酵素の精製を行っており、そちらの結果も合わせて報告する。

N-acetylsucrosamine, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, Glycosidase

発表責任者：西尾 俊幸（nishio.toshiyuki@nihon-u.ac.jp）

講演番号：1E1a15
講演日時：3 月 24 日 11:54～ 1 号館 E1 会場

N-アセチルスクロサミンによって誘導される *Bifidobacterium pseudocatenulatum* のグリコシダーゼに関する研究
Glycosidases of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* induced by *N*-acetylsucrosamine.
○石倉 葉月、平野 貴子、袴田 航、西尾 俊幸（日大院生資科）
○Hazuki ISHIKURA, Takako HIRANO, Wataru HAKAMATA, Tosiyuksi NISIO (Graduate School of Bioresource Science, Nihon Univ.)

【背景・目的】 *N*-アセチルスクロサミン（SucNAc）に対する各種のビフィズス菌の資化性を調査したところ、*Bifidobacterium pseudocatenulatum* および *Bidifobacterium longum* subsp. *infantis* といった、特定のビフィズス菌により資化されることが分かった。さらに、少量のグルコースを添加して資化性試験を行ったところ、これらの菌がグルコースを優先的に資化した後に、飢餓状態を経てから SucNAc の資化が始まり劇的に増殖が起こるといった糖の 2 段階資化（ジオーキシ）の現象が起こることが観察された。本菌が SucNAc を資化して増殖しているときに本 2 糖の分解酵素が生産され、それにより単糖に分解されることが分かっている。このとき、SucNAc 加水分解酵素以外にも様々な糖質分解酵素が同時に誘導されている可能性があると考えられる。そこで、SucNAc と少量のグルコースを培地に加えたときに誘導される *B. pseudocatenulatum* の糖質分解酵素について解析を行うことにした。

【方法・結果】30mM のスクロースあるいは SucNAc を含む MRS(-Glc)培地に、OD_{600} が約 0.5 となるように *B. pseudocatenulatum* を懸濁し、そこに終濃度 5 mM になるようグルコースを添加した後、嫌気的に培養した。培養後、菌体をフレンチプレスで破砕し、菌体内の酵素液を調製した。この酵素液を 30mM マルトース、メリビオース、ラフィノース、スクロース、ケストース、SucNAc 、セロビオース、ラクトース、$(GlcNAc)_2$ 、およびキシロビオースに作用させた。
その結果、SucNAc と少量のグルコース添加系とスクロースと少量のグルコース添加系どちらにおいても、菌体内酵素により多くの基質が分解されたことがわかった。しかし、SucNAc と少量のグルコース添加系では、スクロース添加では見られなかった SucNAc 分解酵素（β-fructofranosidase）と $(GlcNAc)_2$ 分解酵素（β-*N*-acetylhexosaminidase と推測される）が誘導・発現されていることが基質レベルで確認ができた。そこで、$(GlcNAc)_2$ 分解酵素に着目し実験を行った。$(GlcNAc)_2$ と少量のグルコースを添加した培地で培養してみたところ、ジオーキシ現象は起こらず菌が増殖しなかったことから、本 2 糖ではβ-*N*-acetylhexosaminidase は誘導されていないことが確認できた。
現在は、SucNAc と少量のグルコース添加系で誘導された$(GlcNAc)_2$ 分解酵素の単離・同定を試みている。

N-acetylsucrosamine, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, Glycosidase

発表責任者：西尾俊幸（nishio.toshiyuki@nihon-u.ac.jp）

講演番号：1E1p01
講演日時：3 月 24 日 13:50～ 1 号館 E1 会場

ヒト腸内細菌 *Bacteroides thetaiotaomicron* の カルボキシスペルミジン脱炭酸酵素の遺伝学的・生化学的解析

Human intestinal bacteria *Bacteroides thetaiotaomicron* Genetic and biochemical analysis of carboxyspermidine decarboxylase

○下川 ひろみ[1]、阪中 幹祥[1,2]、栗原 新[1] ([1]石川県大・生資環、[2]デンマーク工科大)
○Hiromi SHIMOKAWA[1], Mikihiro SAKANAKA[1,2], Shin KURIHARA[1] ([1]Ishikawa Pref. Univ., [2]DTU)

【背景・目的】 近年、ポリアミンが様々な生物の健康寿命延伸に大きく寄与していることが明らかとなった。大腸腸管内腔における最大数 mM のポリアミンは腸内細菌由来である。これまで、腸内細菌のポリアミン生合成・輸送系の解析は大腸菌を中心に進められてきた。しかし大腸菌は腸内常在菌叢の中では優勢な菌種ではないために、ヒト大腸腸管内腔においてポリアミン濃度を最適化するためには、ヒト腸内に優勢に存在する菌種のポリアミン生合成機構の解明が必要である。そこで本研究では、ヒト腸内常在菌叢最優勢 8 位の菌種であり、遺伝子操作が可能な *Bacteroides thetaiotaomicron* を研究対象として、そのポリアミンの生合成機構の遺伝学的・生化学的解析を行った。

【結果・考察】*B. thetaiotaomicron* のポリアミン生合成系を Blast 解析した結果、本菌はカルボキシスペルミジンを反応中間体とするスペルミジン生合成経路を有することが推定された。本研究ではこれらの推定スペルミジン生合成系を構成する遺伝子の機能検証の一環として、カルボキシスペルミジンをスペルミジンへと変換する酵素であるカルボキシスペルミジン脱炭酸酵素（CASDC）の遺伝学的・生化学的解析を行った。

まず *casdc* 遺伝子破壊株を作出し、ポリアミンを含まない最少培地で培養した親株と各欠損株の細胞内ポリアミンを HPLC により解析した。この結果、親株で検出されたスペルミジンが遺伝子破壊株では検出されなかったことから、*B. thetaiotaomicron* において CASDC はスペルミジン生合成に必要不可欠であることが明らかとなった。

精製 CASDC-$(His)_6$ を用いてその酵素活性を解析したところ、カルボキシスペルミジンをスペルミジンへと変換する能力を有しており、K_m は 48.8 (μM)、k_{cat} は 345 (s^{-1})であった。また、CASDC の酵素活性がポリアミン（プトレッシン、スペルミジン、スペルミン）あるいはポリアミン合成系における反応中間体（アルギニン、アグマチン、*N*-カルバモイルプトレッシン）によって阻害されるか否かについて解析を行った。その結果、CASDC-$(His)_6$ はスペルミジン生合成経路の代謝産物によって阻害され、特にアグマチンと生成物であるスペルミジンの添加によりほぼ 100%活性が消失することが明らかとなった。以上の結果から、ポリアミン合成系における反応中間体とスペルミジンによる CASDC の酵素活性のフィードバック阻害を通じたポリアミンホメオスタシスの存在が示唆された。

gut microbe, *Bacteroides thetaiotaomicron*, spermidine metabolism

発表責任者：栗原 新（kuri711@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：1E1p02
講演日時：3 月 24 日 14:01～ 1 号館 E1 会場

Lactobacillus sakei LK-145 のアスパラギナーゼホモログ遺伝子の大腸菌を宿主とする高発現系の構築と遺伝子産物の機能解析
Expression of asparaginase homologous gene from *Lactobacillus sakei* LK-145 in *Escherichia coli* and functional analysis of its gene product
○田村 和也、山中 一也、老川 典夫（関大 化学生命工）
○Kazuya TAMURA, Kazuya YAMANAKA, Tadao OIKAWA (Kansai Univ.)

【目的】先にわれわれは、D-アミノ酸高生産乳酸菌 *Lactobacillus sakei* LK-145 の全ゲノムを次世代シーケンサーを用いて解析し、本菌のゲノム中にアスパラギナーゼ(ASP)ホモログ遺伝子(*Ls-asn1*)が存在することを明らかにした。そこで本研究では、大腸菌を宿主とする *Ls-asn1* の高発現系を構築し、その遺伝子産物の酵素科学的性質を解明することを目的とする。
【方法】*Ls-asn1* をポリメラーゼ連鎖反応(PCR)で増幅し pET21b に挿入した。pET21b-*Ls-asn1* を *Escherichia coli* BL21(DE3)に形質転換後、*Escherichia coli* BL21(DE3)/ pET21b-*Ls-asn1* を LB+カルベニシリン培地で 37℃、20 時間振盪培養し *Ls*-Asn1 を可溶性画分に発現した。得られた菌体を超音波破砕し、無細胞抽出液から Ni-NTA カラムを用いて *Ls*-Asn1 を精製した。ASP 活性は L-Asn を基質として 37℃で酵素反応を行い、生成する NH_3 をネスラー試薬で定量し測定した。酵素活性 1 U は 1 分間に 1 μmol の NH_3 を生成する反応を触媒する酵素量とした。精製酵素を用い *Ls*-Asn1 の酵素科学的諸性質を検討した。また *Ls*-Asn1 の変異型酵素は Quick change 法を用いて調製した。
【結果及び考察】*L. sakei* LK-145 のゲノム情報から *Ls*-Asn1 は 975 bp の遺伝子でコードされており、総アミノ酸残基数 325 のポリペプチド鎖からなり、またゲル濾過及び SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果から、サブユニットの分子質量 34.5 kDa のホモダイマーであることが明らかとなった。*Ls*-Asn1 は ASP 活性を示し、最適 pH、最適温度はそれぞれ 7.5, 35℃であった（比活性：約 130 U/mg）。また *Ls*-Asn1 は 50℃、1 時間の熱処理後も 80%以上の残存活性を示し、pH 6.0 から 10.5 の緩衝液中で 4℃で 24 時間インキュベート後も 70%以上の残存活性を示した。*Ls*-Asn1 は L-Asn に高い基質特異性を示し、D-Asn, L-Gln, D-Gln に対する相対活性はそれぞれ 0.1, 0.7, 0.03%であった。各種金属イオンや阻害剤が *Ls*-Asn1 の ASP 活性に及ぼす影響を検討したところ、Hg^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}や *p*-クロロマーキュリ安息香酸で著しく阻害され、本酵素の活性発現に Cys 残基の SH 基が関与することが明らかとなった。そこで本酵素の一次構造中に存在する 3 つの Cys 残基(C196, C264, C290)の 1 つまたは 2 つを網羅的に Ser 残基に置換した 7 種の変異型酵素を調製し酵素活性を測定したところ、C196S, C290S, C196S/ C290 変異型酵素は、野性型酵素の 46%以上の相対活性を示したが、C264S, C196S/ C264S, C264S/C290S 変異型酵素は、野生型酵素の 19%以下の相対活性を示し、C196S/C264S/C290S は不活性化した。また酸化的条件下で 1 h インキュベートすると野性型酵素の相対活性は 0.7%に減少したが、C196S は 48%の相対活性を示し、野生型酵素に比べ酸化的ストレスに対して著しく安定化した。

Lactobacillus sakei, asparaginase, site-directed mutagenesis

発表責任者：老川典夫（oikawa@kansai-u.ac.jp）

講演番号：1E1p03
講演日時：3 月 24 日 14:12～ 1 号館 E1 会場

Thermobacillus composti 由来アスパラギン酸アミノ基転移酵素の諸性質
Characterization of aspartate aminotransferase from *Thermobacillus composti*
○三原 久明、紀戸 彩加、戸部 隆太、谷 泰史（立命大・生命）
○Hisaaki MIHARA, Ayaka KIDO, Ryuta TOBE, Yasushi TANI (Ritsumaikan Univ.)

アスパラギン酸アミノ基転移酵素は、酸性アミノ酸とα-ケト酸の間のアミノ基転移反応を可逆的に触媒するピリドキサール 5′-リン酸（PLP）依存性酵素である。本酵素群は、PLP 依存性アミノ基転移酵素のファミリー I に属し、さらにファミリー I はサブグループ Ia とアーキアや好熱性真細菌などの酵素が属するサブグループ Ib に大別される。サブグループ Ia に属する AspAT とサブグループ Ib に属する AspAT 間のアミノ酸配列相同性は 15%程度と低い。サブグループ Ia の AspAT は古くから詳細に研究されている一方で、サブグループ Ib の酵素に関する報告は未だ少ない。*Thermobacillus composti* は、至適生育温度 50℃、至適生育 pH 9 を示す中等度好熱菌である。本菌のゲノムに見出された推定アスパラギン酸アミノ基転移酵素 AspAT (tcAspAT) はアライメントや系統樹の解析から、サブグループ Ib に属すると考えられた。しかし、同じくサブグループ Ib に属し詳細な解析が行われている *Thermus thermophilus* HB8 由来の AspAT とは 14%程度しかアミノ酸配列一致を示さない。さらに、tcAspAT は、その N 末端に約 20 アミノ酸残基のエクステンション領域を有しており、本領域はサブグループ Ib に属する既報の酵素の中でも、比較的アルカリ側で高い活性を示す *B. cirqulans* および *B. subtilis* B3 の AspAT などにのみ認められた。

T. composti ゲノム DNA を鋳型として、tcAspAT をコードする theco_1131 遺伝子を PCR クローニングし、大腸菌を宿主として生産させた His-tag 融合タンパク質を精製した。本精製酵素を用いて解析を行った結果、本酵素は L-アスパラギン酸とα-ケトグルタル酸の間のアミノ基転移反応を触媒した。本酵素の至適温度は 80℃、熱安定性 (T_m) は 70℃、至適 pH は 10 であり、これまで報告されている AspAT 中で最も高い至適 pH を示した。本酵素の L-アスパラギン酸に対する K_m と V_{max} は、それぞれ、6.4 mM および 101 μmol/min/mg であった。また、本酵素は L-トリプトファンに対して、L-アスパラギン酸の約 30%程度の活性を示したが、それ以外のアミノ酸に対して有意な活性を示さなかった。*T. thermophilus* HB8 由来 AspAT では、酸性アミノ酸基質の末端カルボキシ基の認識を Lys109 が担っている一方で、サブグループ Ia の AsspAT では Arg292 がその認識に関わることが知られている。興味深いことに、tcAspAT のアミノ酸配列において、Arg292 は保存されている一方で、同じサブグループ Ib に属するにも関わらず、Lys109 は保存されていなかった。すなわち、tcAspAT の酸性アミノ酸に対する基質認識機構はサブグループ Ia 酵素と類似する可能性が示唆された。

aspartate aminotransferase, substrate recognition, amino acid sequence conparison

発表責任者：三原久明（mihara@fc.ritsumei.ac.jp）

講演番号：1E1p04
講演日時：3 月 24 日 14:23～ 1 号館 E1 会場

超好熱アーキア *Pyrococcus horikoshii* 由来オルニチン:2-オキソグルタル酸アミノトランスフェラーゼの機能・構造解析

Structural and functional analyses of ornithine:2-oxoglutaric acid aminotransferase from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii*

○大志田 達也[1]、半澤 七菜[2]、大島 敏久[3]、櫻庭 春彦[1]、川上 竜巳[4] ([1]香川大農、[2]徳島大総科、[3]大阪工大工、[4]徳島大院社産理工)

○ Tatsuya OHSHIDA[1], Nana HANZAWA[2], Toshihisa OHSHIMA[3], Haruhiko SAKURABA[1], Ryushi KAWAKAMI[4] ([1]Fac. of Agric., Kagawa Univ., [2]Fac. of IAS, Tokushima Univ., [3]Fac. of Eng., Osaka Inst. of Tech., [4]Grad. Sch. of Tech., Ind. and Soc. Sci., Tokushima univ.)

【背景】我々はこれまでに、超好熱アーキア *Pyrococcus horikoshii* から PLP 依存性の低基質特異性アミノ酸ラセマーゼ(BAR)を見出し、D-アミノ酸資化に関与することを明らかにしている[1)、2)]。BAR は PH0138 遺伝子によってコードされており、ゲノム情報では 4-アミノ酪酸：2-オキソグルタル酸アミノトランスフェラーゼ(GABA-AT)として推定されている。ゲノム情報からは、PH0138 の他に GABA-AT と推定されている遺伝子が 3 種類（PH0782、PH1423 及び PH01501）存在していることも明らかになった。これらがコードするタンパク質の 1 次配列は互いに 45%程度の相同性を示しており、各遺伝子産物がアミノ酸ラセマーゼをコードしていることが強く示唆された。実際に、PH0782 の産物はアラニンとセリンに反応性を示し[3)]、PH1501 の産物もいくつかのアミノ酸に反応性を示すことを確認できた。しかしながら、PH1423 の産物はアミノ酸ラセマーゼ活性を全く示さなかった。そこで本研究では、PH1423 の酵素反応の同定と機能解析及び構造解析を行うことを目的とした。

【方法・結果】PH1423 の大腸菌発現系は pET15b を用いて構築した。PH1423 を組換え発現させた大腸菌から超音波破砕により酵素を抽出し、100℃のオイルバス中で 30 分間の熱処理後、Ni chelating Sepharose カラムで精製した。精製酵素を GABA、2-オキソグルタル酸とともに反応させるとグルタミン酸を検出できたことから、PH1423 は GABA-AT 活性を持つことを確認できた。さらに、基質特異性を解析したところ、この酵素はアミノドナーとしてオルニチン、アミノアクセプターとして 2-オキソグルタル酸を用いたとき最も高い活性を示した。このことから本酵素は、オルニチン：2-オキソグルタル酸アミノトランスフェラーゼとして機能することを明らかにできた。さらに、本酵素の結晶化に成功し、1.8Åの分解能で X 線結晶構造解析に成功した。本発表では、PH1423 の機能解析とともに、結晶構造解析から明らかになった特徴について報告する。

【参考文献】

1)R. kawakami et al., *Amino Acids*,47(2015), 1579-1587
2)R. kawakami et al., *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 124(2017), 23-27
3)R. kawakami et al., *Frontiers in Microbiology*, 9(2018), 1481

Ornithine:2-oxoglutaric acid aminotransferase, *Pyrococcus horikoshii*, crystal structure

発表責任者：櫻庭　春彦（sakuraba@ag.kagawa-u.ac.jp）

講演番号：1E1p05
講演日時：3 月 24 日 14:34～ 1 号館 E1 会場

酵母における *N*-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1 依存的な新規アルギニン合成機構

A novel synthetic mechanism of arginine mediated by *N*-acetyltransferase Mpr1 in yeast

○那須野 亮、神庭 拓也、乗船 沙紀、高木 博史（奈良先端大・バイオ）
○Ryo NASUNO, Takuya KANBA, Saki NORIFUNE, Hiroshi TAKAGI (Div. of Biol. Sci., Nara Inst. of Sci. and Tech.)

【背景と目的】*N*-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1（sig**m**a 1278b gene for L-**p**roline analogue **r**esistance）は、プロリンの毒性アナログであるアゼチジン-2-カルボン酸をアセチル化により解毒する酵素として、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* より当研究室で同定した。その後の解析から、Mpr1 が新規のアルギニン（Arg）合成経路に関与することが明らかになった。酵母において Arg は、グルタミン酸から *N*-アセチルグルタミン酸（NAG）を合成する反応を初発段階とし、続く 7 段階の酵素反応により合成される。これまでの遺伝学的解析により、Mpr1 が NAG の生成に関与していることが示唆されているが、Mpr1 依存的な Arg 合成については未だ不明な点が多い。本研究では、Mpr1 依存的な新規 Arg 合成経路の分子機構を解明することを目的とした。

【方法・結果】酵母においては、NAG を合成する酵素として、NAG 合成酵素（NAGS）Arg2、およびオルニチンアセチルトランスフェラーゼ（OAT）活性と NAGS 活性を有する二機能性酵素 Arg7 が、報告されている。これらの遺伝子破壊株の表現型に及ぼす Mpr1 の影響を解析したところ、*MPR1* の過剰発現は、*ARG2* 破壊株の Arg 要求性を相補したが、*ARG7* 破壊株や *ARG2/ARG7* 二重破壊株の Arg 要求性を相補しなかったことから、Mpr1 依存的な Arg 合成には Arg7 が関与していると考えられた。また、*ARG2* 破壊株の Arg 要求性は *ARG7* の過剰発現によって相補されたことから、Mpr1 が何らかの機構で Arg7 の NAG 合成活性を上昇させることにより細胞の Arg 合成能が亢進する可能性を考えた。そこで、まず *ARG7* 転写量が Mpr1 依存的に変化すると考え、*ARG7* の転写量をリアルタイム PCR により定量的に解析したが、*MPR1* 過剰発現は、培養条件に関わらず *ARG7* 転写量に影響を及ぼさなかった。続いて、Mpr1 がタンパク質レベルで Arg7 を制御していると考え、Arg7 タンパク質量をウェスタンブロットにより解析した。Arg7 は翻訳後、オートプロセシングにより N 末端側（N-Arg7）と C 末端側（C-Arg7）に切断され、両者が複合体を形成することで機能する。解析の結果、*MPR1* 過剰発現によって N-Arg7、C-Arg7 ともにタンパク質量が増加することが明らかになった。このことから、Mpr1 は成熟型 Arg7 のタンパク質量を増加させ NAG 合成を亢進することで Arg 合成を促進する、と結論付けた。現在、Arg7 と Mpr1 の相互作用解析等により、Mpr1 による Arg7 タンパク質量増加の詳細な機構を解析している。

arginine, yeast, N-acetyltransferase

講演番号：1E1p06
講演日時：3 月 24 日 14:55～ 1 号館 E1 会場

超好熱・好酸性古細菌 *Sulfolobus acidocaldarius* 由来のホモクエン酸合成酵素の構造・機能解析
Structural and kinetic analysis of homocitrate synthase (HCS) from *Sulfolobus acidocaldarius*
○鈴木 智大[1]、富田 武郎[1,2]、葛山 智久[1,2]、西山 真[1,2] ([1]東大生物工学セ、[2]東大 CRIIM)
○ Tomohiro SUZUKI[1], TAKEO TOMITA[1,2], TOMOHISA KUZUYAMA[1,2], MAKOTO NISHIYAMA[1,2] ([1]BRC, Tokyo Univ, [2]CRIIM, Tokyo Univ)

超好熱・好酸性古細菌 *Sulfolobus acidocaldarius* はα-アミノアジピン酸(AAA)を中間体とする AAA 経路でリジンを生合成する。リジン生合成の後半部を担う酵素遺伝子群がクラスターを形成する一方で、前半部を担う酵素遺伝子候補はゲノム上に散在しており各遺伝子がコードする酵素の機能及び制御機構は不明であったが、我々は Saci_1304 (SaHCS) がリジン生合成の初発酵素であるホモクエン酸合成酵素 (HCS) であることを明らかにした。HCS はα-ケトグルタル酸(α-KG)に対しアセチル CoA のアセチル基を縮合させることによりホモクエン酸を生成する反応を触媒する。既知の HCS はリジンがα-KG 結合サイトに結合する競合阻害によって制御されるが、SaHCS では既知の HCS 間で保存されているリジン認識に関わる残基が保存されていない。一方、SaHCS の C 末端側には RAM (Regulation of Amino acid Metabolism) ドメインが存在している。RAM ドメインは Lrp (leucine responsive regulatory protein) 転写制御因子ファミリーのアミノ酸結合ドメインとして知られている。このことから SaHCS は RAM ドメインを介してリジンによる阻害を受けることが予想された。
前回大会で SaHCS オルソログである *S. tokodaii* 由来の HCS(StHCS)のリジンによる阻害が RAM ドメイン依存的に起こることと、リジンによって StHCS の会合状態が 4 量体から 8 量体と 16 量体の平衡状態に変化することを示し、RAM ドメインにリジンが結合し StHCS の会合状態が変化することで阻害型の構造を取り、活性が阻害される仮説を立てた。今回、RAM ドメインを持つ転写因子の構造情報を基に StHCS でリジン認識を担うと考えられる残基の変異体を作製した。各変異体に対し活性測定及び会合状態の解析を行ない、野生型酵素ではリジンによって非存在時の 20%程度まで活性が阻害されたが、変異体では最大でも 65%程度までの活性低下に留まった。さらに全ての変異株でリジンの有無に関わらず 4 量体で存在していた。これらの結果は上記で示した仮説を支持している。
また、SaHCS (ΔRAM) の結晶構造解析に成功し、触媒ドメインと RAM ドメインをつなぐリンカードメイン中のサブドメイン II が CoA の認識に関与していることを前回大会で明らかにした。今回、この構造情報からサブドメイン II において CoA の認識に関与すると考えられる残基に変異を導入し、各変異体についてアセチル CoA 及びα-KG に対する酵素動力学的解析を行なった。その結果、野生型酵素と比較してアセチル CoA 及びα-KG に対する K_m の増加及び k_{cat} の減少が見られ、さらにいくつかの変異体ではアセチル CoA に対する K_m の増加が顕著に見られた。この結果からサブドメイン II がアセチル CoA の認識に関与していることを実証することができた。

homocitrate synthase (HCS), RAM domain, acetyl-CoA

講演番号：1E1p07
講演日時：3 月 24 日 15:06～ 1 号館 E1 会場

Staphylococcus condimenti 及び *Aerococcus sanguinicola* 由来イソロイシン 2-エピメラーゼホモログの機能解析
Characterization of isoleucine 2-epimerase homologs from *Staphylococcus condiment* and *Aerococcus sanguinicola*
○牟田口 祐太、春日 和、小嶋 郁夫（秋田県大生資）
○Yuta MUTAGUCHI, Kano KASUGA, Ikuo KOJIMA (Akita Pre. Univ.)

【背景と目的】
イソロイシン 2-エピメラーゼ（ILEP）は分岐鎖アミノ酸を含む非極性アミノ酸のα炭素の光学異性を転換する酵素として、乳酸菌 *Lactobacillus buchneri* から同定された。*L. buchneri* は D 型の分岐鎖アミノ酸（D-*allo*-Ile, D-Leu, D-Val）を生産するが、これらは ILEP によって生成されると考えられている。また、*Leuconostoc* 属、*Weissella* 属、*Oenococcus* 属には ILEP ホモログ遺伝子を持つ乳酸菌が数種存在し、その多くが D-分岐鎖アミノ酸を生産することが明らかとなっている。しかし、上記 4 属以外の細菌において ILEP ホモログの分布は明らかになっていない。KEGG データベースにゲノム情報が登録されている *Firmicutes* 門 *Bacilli* 綱のうち上記 4 属を除いた 51 属を対象として、*L. buchneri* 由来 ILEP のアミノ酸配列に基づく相同性検索（BLAST）を行ったところ、*Staphylococcus condimenti* 及び *Aerococcus sanguinicola* に *L. buchneri* 由来 ILEP と高い類似性を示すタンパク質をコードする遺伝子（それぞれ A4G25_06260 及び AWM72_06300）を見出した。本研究では、これら 2 つの遺伝子産物の酵素学的性質を明らかにすることを目的とした。
【方法と結果】
A4G25_06260 及び AWM72_06300 を pCold ProS2 にそれぞれクローニングし、発現用ベクターを構築した。これらの発現用ベクターを *Escherichia coli* BL21(DE3)に導入後、各組換えタンパク質の発現を誘導した。Ni キレートカラムを用いて組換えタンパク質を精製し、トロンビン処理によって組換えタンパク質の Tag 領域を除去した。これを精製酵素として使用し、種々のアミノ酸に対するラセマーゼ活性及びエピメラーゼ活性の検出を試みた。酵素活性は L-アミノ酸を基質として反応を行い、生成した D-アミノ酸を高速液体クロマトグラフィーで測定し検出した。その結果、*S. condimenti* 由来 ILEP ホモログタンパク質は、Ile 及び Thr に対するエピメラーゼ活性と、Leu、Val、Phe、Met、Tyr、Ala に対するラセマーゼ活性を示した。一方、*A. sanguinicola* 由来 ILEP ホモログタンパク質は Met 及び Leu に対してのみラセマーゼ活性を示した。また、その Met に対する活性は Leu に対するものよりも顕著に高かった。この特徴は *L. buchneri* 由来 ILEP とは異なるものであり、*A. sanguinicola* 由来 ILEP ホモログタンパク質が基質特異性において新規性の高い酵素である可能性が示された。現在、これら 2 つの酵素のより詳細な酵素学的性質の解析を進めている。

racemase, epimerase, D-amino acid

発表責任者：牟田口祐太（y-muta@akita-pu.ac.jp）

講演番号：1E1p08
講演日時：3 月 24 日 15:17～ 1 号館 E1 会場

D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼを用いた D-アミノ酸生合成酵素遺伝子のスクリーニング

Screening of the genes encoding D-amino acid-synthesizing enzymes with D-amino acid aminotransferase

○那須 涼麻[1]、伊藤 智和[1]、武藤 菜摘[1]、坂神 晴菜[1]、邊見 久[1]、森 寿[2]、吉村 徹[1]([1]名大院・生命農、[2]富山大院・医学薬学)

○Ryoma Nasu[1], Tomokazu Ito[1], Natsumi Muto[1], Haruna Sakagami[1], Hisashi Hemmi[1], Hisashi Mori[2], Tohru Yoshimura[1] ([1]Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, [2]Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences, Toyama University)

近年、様々な D-アミノ酸が原核生物だけではなく哺乳動物を含む多くの生物にも存在し、重要な機能を担っていることが明らかとなってきた。しかし哺乳動物における D-アスパラギン酸のように、その生合成機構が未だ解明されていない D-アミノ酸もある。そのため我々は新奇 D-アミノ酸合成酵素の同定を目的としたスクリーニング系の開発を行っている。この系は、アラニンラセマーゼ遺伝子(*alr*、*dadX*)およびグルタミン酸ラセマーゼ遺伝子 (*murI*)を欠損させ両アミノ酸要求性とした大腸菌（MB3000 株）に、様々な D-アミノ酸とα-ケト酸の間のアミノ基転移反応を触媒する D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ（DAAT）遺伝子を導入した菌株で、菌体内で何らかの D-アミノ酸生合成酵素が発現すれば両アミノ酸要求性が相補される。本菌は極めて微弱なアミノ酸ラセマーゼ活性を有するシスタチオニンβ-リアーゼ遺伝子（*metC*）の導入によって、D-アミノ酸非添加培地にも生育できるようになったが、長時間培養した場合には、D-アミノ酸合成酵素遺伝子の導入がなくても同培地での生育が認められた。我々はこの現象が DAAT の有する微弱なセリンラセマーゼ活性によるものであり、その活性発現にはリン酸イオンが必要であることを明らかにした。本大会では、DAAT のラセマーゼ活性の発現機構と D-アミノ酸生合成酵素遺伝子スクリーニング系の状況について報告する。

D-amino acid, amino-acid racemase, D-amino acid transaminase

講演番号：1E1p09
講演日時：3 月 24 日 15:28～ 1 号館 E1 会場

超好熱菌由来シスタチオニンβ-リアーゼの D-アミノ酸代謝能の解析
Functional analysis of cystathionine ß-lyase from hyperthermophilc bacterium toward D-amino acids
○宮本 哲也、松浦 美帆、吉田 真梨愛、齋藤 康昭、関根 正恵、片根 真澄、本間 浩（北里大薬）
○Tetsuya MIYAMOTO, Miho MATSUURA, Maria YOSHIDA, Yasuaki SAITOH, Masae SEKINE, Masumi KATANE, Hiroshi HOMMA (Kitasato Univ. of Pharm.)

超好熱菌 *Thermotoga maritima* は、至適生育温度を 80°C とするグラム陰性の嫌気性細菌である。その細胞壁ペプチドグリカンは、一般的な D-アラニン (D-Ala) と D-グルタミン酸 (D-Glu) 以外に D-リジン (D-Lys) を含むというユニークな特徴を有している。また、グラム陰性細菌において一般的な構成成分であるメソ-ジアミノピメリン酸は含まれていない。最近になって、細菌のペプチドグリカンに様々な D-アミノ酸が導入されることによりペプチドグリカンの構造変化が起こり、バイオフィルムの形成抑制や解体に影響することが報告されているなど、ペプチドグリカンは単に細胞構造の維持だけでなく、変化する環境に対応し、生存するために重要な構造体であると言われている。したがって、ペプチドグリカンに含まれる D-アミノ酸は、細菌が変化する環境に対応し、生存するための重要な構成成分であると考えられる。そのため、極限環境下で生育できる *T. maritima* のペプチドグリカンの構造および構成成分は興味深い。しかしながら、*T. maritima* において、これら D-アミノ酸の生合成経路は正確には同定されていなかった。本研究では、*T. maritima* における D-アミノ酸生合成経路を明らかとするため、シスタチオニンβ-リアーゼに注目した。シスタチオニンβ-リアーゼは、L-メチオニン (L-Met) 生合成経路においてシスタチオニンをホモシステインとピルビン酸へ分解する反応を触媒する酵素である。これまでに我々は、大腸菌由来シスタチオニンβ-リアーゼがリアーゼ活性だけでなく、アミノ酸ラセマーゼ活性およびセリン (Ser) デヒドラターゼ活性を有することを見出している。そこで、本酵素の D-アミノ酸代謝能について解析した。

T. maritima の上記遺伝子を発現ベクターにクローニングし、大腸菌体内で発現させた後、Ni カラムを用いて精製した。アミノ酸ラセマーゼ活性は、精製酵素と各種 L-または D-アミノ酸と反応させ、反応液中の D/L-アミノ酸を蛍光誘導体化し、HPLC を用いて光学分割することで測定した。Ser デヒドラターゼ活性は、反応生成物であるピルビン酸をヒドラジンを用いた比色定量法により測定した。

本酵素は、Glu や Ala を含む 14 種類のアミノ酸に対してラセマーゼ活性を示し、そのうち Glu に対して最も高い活性を示した。また、大腸菌のシスタチオニンβ-リアーゼと同様に、D-Ser および L-Ser に対するデヒドラターゼ活性を有していることを確認した。したがって、本酵素はリアーゼ活性、アミノ酸ラセマーゼ活性、Ser デヒドラターゼ活性を有する多機能型酵素であることが明らかとなり、*T. maritima* において D-アミノ酸代謝に関与している可能性が示唆された。

D-amino acid, cystathionine ß-lyase, Thermotoga maritima

講演番号：1E1p10
講演日時：3 月 24 日 15:39～ 1 号館 E1 会場

Lactobacillus sakei Uonuma 株由来アラニンラセマーゼ(AlaR)の解析

Analysis of Alanine racemase (AlaR) from Lactobacillus sakei Uonuma strains

○中山 栞[1]、大越 正貴[1]、吉井 郁弥[1]、市村 光[1]、平賀 晴菜[1]、古川 那由太[1]、西脇 俊和[2]、井深 章子[1] ([1]新潟薬大・応生科、[2]新潟農総研・食研セ)

○ Shiori NAKAYAMA[1], Masaki OKOSHI[1], Fumiya YOSHII[1], Hikaru ICHIMURA[1], Haruna HIRAGA[1], Nayuta FURUKAWA[1], Toshikazu NISHIWAKI[2], Akiko IBUKA[1] ([1]Niigata Univ. Pharm.Appl. Life Sci., [2]Niigata Agricultural Res. Inst.)

［目的］自然界に存在しているアミノ酸の多くには鏡像異性体（D 型、L 型）が存在する。近年分析技術の進化により様々な食品中や生物中から D-アミノ酸は検出されている。特に乳酸発酵食品は、多くの D-アミノ酸を含むことが知られている。アミノ酸は甘味、苦み、辛味など様々な味を誘発するが、複数の D-アミノ酸が L-アミノ酸よりも強い甘みを呈することがわかっており、これが発酵食品の味に影響を与えているのではないかと考えられる。この D-アミノ酸と L-アミノ酸の相互変換を触媒する酵素がアミノ酸ラセマーゼである。自然界に多く存在する L-アミノ酸から D-アミノ酸を合成するラセマーゼを制御することで、呈味性など第二次機能を向上させた食品の開発が期待される。本研究では D 型でより強い甘みを呈するアラニンに着目し、新潟県魚沼地域の雪室保存した野沢菜漬から分離した乳酸菌 *Lactobacillus sakei* Uonuma 株由来アラニンラセマーゼ(AlaR)の解析を行った。

［方法］データベースに登録された既知 AlaR 遺伝子の塩基配列情報を基に縮重プライマーを設計して塩基配列を決定し、大腸菌での発現プラスミドを作製した。発現・精製条件を確立し、HPLC(高速液体クロマトグラフィー)を用いて活性測定を行った。また、クリスタルスクリーンキットを用いてハンギングドロップ蒸気拡散法により結晶化条件を検討した。

［結果］*L. sakei* Uonuma 株（U1, U2, U3）３株のうち、U1 および U3 由来 AlaR の塩基配列を取得し、大腸菌を用いた発現系の構築に成功した。性状解析の結果、U1 由来 AlaR の至適温度は 35℃、至適 pH は pH 7.5 付近であった。熱安定性を調べたところ、40℃まで酵素の活性は保持されていたが、70℃で完全に失活した。pH 安定性試験では pH 5.0 付近が最も安定であった。U3 由来 AlaR の至適温度は 30℃、至適 pH は pH 7.5 付近であり、pH 安定性試験では pH 5.5 付近が最も安定であった。結晶化条件のスクリーニングの結果、0.2 M 酢酸ナトリウム、0.1 M Tris-HCl(pH 7.0)、23%w/v PEG4000 を含むリザーバー溶液と、0.25 M 酢酸ナトリウム、0.1 M Tris-HCl(pH 7.0、7.5)、23%w/v PEG4000 を含むリザーバー溶液の 2 条件において 16℃で結晶が得られた。現在、X 線回折データの取得に成功し、構造解析を進めている。

alanine racemase, lactobacillus, kinetics

講演番号：1E2a01
講演日時：3 月 24 日 09:00～ 1 号館 E2 会場

極性脂質に含まれるヒト ABCG4 の輸送基質探索および認識機構の解析
The analysis of unidentified transport substrate of human ABCG4 in polar lipid extract.
○末永 光[1]、見月 俊吾[1]、木岡 紀幸[1]、植田 和光[1,2]、木村 泰久[1] ([1]京大院農、[2]京大 iCeMS)
○Hikaru SUENAGA[1], Shungo MITSUKI[1], Noriyuki KIOKA[1], Kazumitsu UEDA[1,2], Yasuhisa KIMURA[1] ([1]Gard. Sch. of Agri., Kyoto Univ., [2]iCeMS, Kyoto Univ.)

【背景】
ATP-Binding Cassette (ABC)タンパク質は ATP 加水分解依存的に能動輸送を行うトランスポーターである。ABCG4 は脳に多く発現し、コレステロールを輸送することから、脳内のステロール恒常性の維持に重要であると推測されている。また、アルツハイマー病患者の病変部位(老人斑)近傍のマクロファージに ABCG4 が過剰発現することから、アルツハイマー病やその他の神経変性疾患との関連も示唆されている。ABC タンパク質の ATP 加水分解は基質輸送と共役しており、輸送基質による誘導を受ける場合が多い。このため ATP 加水分解活性を解析することによって輸送活性を評価することができる。ABCG4 に関しても、基質であるコレステロールによって ATP 加水分解活性が誘導されることが先行研究により明らかにされている。また、先行研究では脳組織より抽出した極性脂質を用いて作製したリポソームに再構成した ABCG4 が、卵黄由来レシチンなど、様々な脂質からなるリポソームに再構成した場合にくらべ、はるかに高い ATP 加水分解活性を示すことも明らかになった。非極性脂質であるコレステロールは脳極性脂質試料中には微量しか含まれないため、脳極性脂質に未知の ABCG4 輸送基質が存在する可能性が示唆された。本研究は、脳極性脂質中に存在する ABCG4 の未知基質を同定し、その認識機構を明らかにする事を目的とした。
【方法・結果】
ヒト ABCG4 を HEK293 細胞派生株(FreeStyle293)に一過的に発現させ、FLAG タグアフィニティー精製によって ABCG4 精製標品を得た。この精製標品を様々な組織由来の極性脂質から作成したリポソームに再構成し、ATP 加水分解活性を評価した。その結果、脳極性脂質において見られた活性誘導が、肝臓や心臓などの異なる組織由来の極性脂質においても確認された。このことから、生体内に広く存在する何らかの極性脂質が ABCG4 によって輸送されることが示唆された。一方、ABCG4 の膜ドメインに存在するコレステロール認識配列を潰した ABCG4 変異体では、脳極性脂質の濃度依存的な活性誘導の傾向が野生型と異なったため、脳極性脂質中の未知基質の認識・輸送に ABCG4 のコレステロール認識配列が重要である可能性が示唆された。現在、生体内に存在する複数の極性脂質が ABCG4 の活性を誘導するか調査している。

ABCG4, ABC transporter, cholesterol

講演番号：1E2a02
講演日時：3 月 24 日 09:11～ 1 号館 E2 会場

超音波法によるヒト間葉系幹細胞の接着斑単離とその最適化
Isolation of focal adhesions of human mesechymal stem cells by sonication
○柴原 正和[1]、木村 泰久[1]、植田 和光[1,2]、木岡 紀幸[1,2] ([1]京大農、[2]iCeMS)
○ Masakazu SHIBAHARA[1], Yasuhisa KIMURA[1], Kazumitsu UEDA[1,2], Noriyuki KIOKA[1,2] ([1]Kyoto Univ., [2]iCeMS)

動物細胞は生体内で細胞外マトリックス(ECM)に囲まれており、ECM の種類や密度、硬さといった性質によって細胞の分化や遊走が調節されている。細胞-ECM 間接着部位に形成される接着斑は、数百種類のタンパク質から構成されている複合体である。接着斑は ECM の性質を感知し、その情報を細胞内部に伝達する働きを持っている。これらの働きを包括的に明らかにするためには、細胞から接着斑を単離し、そのタンパク質組成を網羅的に分析することが有効である。これまでに当研究室では超音波処理を用いたマウス胎児線維芽細胞(MEF)の接着斑を単離する実験系(超音波法)を確立した。しかし超音波法が MEF 以外の細胞種に対して有効か確認できていなった。またプロテオーム解析に供するために接着斑の回収効率を向上させる必要があった。そこで本実験ではヒト間葉系幹細胞株 UE7T-13 を用いた接着斑単離と実験系の最適化を行った。超音波法による接着斑単離は以下の操作によって行った。ECM タンパク質のフィブロネクチンでコートしたプレート上に UE7T-13 を播種し接着させ、前処理として低張液処理を行い、細胞構造を脆弱化させた。その後、超音波処理を行い、細胞から細胞質、細胞膜、細胞小器官等を除去し、残留した画分を接着斑画分として単離した。さらにプレート全体が均一に超音波処理されるように、縦横に 3×3 の合計 9 カ所に移動できる専用の可動型ステージを用いた。超音波強度は MEF の接着斑単離と同じ 1 カ所あたり約 33 J/s で行った。次に超音波法の最適化のために前処理の条件を検討した。従来の超音波法では低張液処理による細胞構造の脆弱化によって回収効率が低下していると考え、この代替として接着分子インテグリンを活性化するマンガンイオンを添加し、接着斑を安定化させた条件を検討した。UE7T-13 の接着斑単離はウエスタン法によって確認した。その結果、超音波処理したサンプルから細胞質タンパク質の ERK2, 細胞膜タンパク質の Na/K ATPase, 小胞体タンパク質の KDEL のシグナルは検出されなかったが、接着斑タンパク質のリン酸化パキシリン, ビネキシンα, ビンキュリンのシグナルは検出された。この結果から UE7T-13 においても超音波法が有効であることが分かった。またマンガンイオン添加処理を行った時の接着斑の回収効率をウエスタン法で評価した。その結果、接着斑タンパク質のリン酸化パキシリンの回収率が低張液処理に比べ増加していることが分かった。今後は最適化した超音波法とプロテオーム解析を組み合わせて用いることで、ECM の種類や硬さによる接着斑タンパク質組成の調節について明らかにしていく予定である。

focal adhesion, mesenchymal stem cell, mechanobiology

発表責任者：柴原　正和（smasa@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：1E2a03
講演日時：3 月 24 日 09:22～ 1 号館 E2 会場

ELSD 法を用いたヒト ABC タンパク質の脂質輸送能解析手法の構築

HPLC-ELSD method for the analysis of the lipid efflux mediated by human ABC proteins

○高橋 智[1]、北 悠人[1]、木岡 紀幸[1]、植田 和光[1,2]、木村 泰久[1] ([1]京大院・農・応用生命、[2]京大・iCeMS)
○ Satoshi TAKAHASHI[1], Yuto KITA[1], Noriyuki KIOKA[1], Kazumitsu UEDA[1,2], Yasuhisa KIMURA[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. of Agri., Kyoto Univ., [2]iCeMS, Kyoto Univ.)

［目的］ ABC タンパク質は、能動輸送を行う膜タンパク質であり、ATP 結合・加水分解のエネルギーを用いて基質を輸送する。ヒトには 48 種類の ABC タンパク質が存在し、脂質恒常性の維持や脂溶性化合物からの生体の保護等の役割を担う。特に脂質輸送型の ABC タンパク質はリン脂質やコレステロールの輸送に関与し、その機能異常は、動脈硬化やアルツハイマー病など、様々な疾病に関連している。ヒト ABC タンパク質には機能未知のものも多く、この中には多くの脂質輸送体が含まれると推測される。これらの ABC タンパク質によって輸送される脂質を明らかに出来れば、脂質恒常性維持機構の解明に大きく寄与する。輸送基質を明らかにするためには複数の脂質を測定する必要がある。しかし、現在汎用されている酵素を用いた定量法では複数の脂質を同時定量する事は困難であり、一斉分析に応用することは難しい。そこで本研究では、ヒト ABC タンパク質の輸送基質を検出および定量する一斉分析系の確立を目的とした。

［方法・結果］ クロロホルムを含む分離溶媒とジオールカラムを用いた順相クロマトグラフィーで、リン脂質を極性頭部の構造によって分離することを試みた。脂質の検出には蒸発光散乱光検出器を用いた。まず、グラジエント条件の最適化によりホスファチジン酸(PA)、ホスファチジルコリン(PC)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)、ホスファチジルセリン(PS)、スフィンゴミエリン(SM)、リゾホスファチジルコリン(LPC)を分離できるグラジエント条件を確立した。次いで胆汁酸依存的な PC、コレステロールの輸送が報告されているヒト ABCB4 を対象とし、本手法が実際に ABC タンパク質による脂質輸送を評価できるかを検討した。ヒト ABCB4 を HEK293 細胞に一過的に発現させ、脂質アクセプターとして胆汁酸を加えた。この培地を回収し、 HPLC-ELSD 法で分析したところ、報告通り PC とコレステロールを検出することができた。本研究で構築した手法は様々な ABC タンパク質の脂質輸送能解析に応用可能であると期待できる。

ABC protein, lipid homeostasis, HPLC

発表責任者：木村　泰久（ykimura@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：1E2a04
講演日時：3 月 24 日 09:33～ 1 号館 E2 会場

AMPK による SRSF1 のリン酸化を介した選択的スプライシング制御機構の解明

Effect of AMPK-induced SRSF1 phosphorylation on alternative splicing.

○松本 英里[1]、鈴木 司[1,2]、井上 順[1,2]、山本 祐司[1,2]([1]東農大院・農・農化、[2]東農大・応生・農化)
○Eri MATSUMOTO[1], Tsukasa Suzuki[1,2], Jun Inoue[1,2], Yuji Yamamoto[1,2] ([1]Tokyo Univ. Agric., Grad. Sch., [2]Tokyo Univ. Agric.)

【目的】AMP-activated protein kinase(AMPK)は細胞内エネルギーセンサーとして、AMP/ATP 比の上昇に応答して活性化される Ser/Thr キナーゼである。様々な基質のリン酸化を介して AMPK は糖・脂質代謝、タンパク質合成、細胞増殖などを制御している。我々はこれまでに、AMPK の新規基質を探索するため、Tandem Affinity Purification (TAP) 法および LC-MS/MS により AMPK 結合タンパク質の網羅的な解析を行い、RNA 結合タンパク質である Serine/Arginine-rich splicing factor 1 (SRSF1) を同定している。本研究では、AMPK が SRSF1 をリン酸化するか検討するとともに、そのリン酸化による機能の変化について明らかにすることを目的とした。
【方法】In vitro kinase assay にて AMPK による SRSF1 のリン酸化部位を同定し、そのリン酸化部位特異的な抗体を作製した。細胞内においても AMPK が SRSF1 をリン酸化するか検討するために HEK293T 細胞を用いて、本抗体を使用したウェスタンブロットを以下の 3 つのサンプルで行った。
① AMPK と野生型 SRSF1 および非リン酸化変異体の共発現
② ①のサンプルに脱リン酸化酵素を処理
③AMPK 活性化剤および阻害剤の添加（内因性 SRSF1 のリン酸化を検出）
SRSF1 は Ron mRNA 前駆体の選択的スプライシングを制御している。AMPK による SRSF1 のリン酸化によって、Ron mRNA 前駆体のスプライシングパターンが変化するか、AMPK 活性化剤を添加して RT-PCR 法で検討した。続いて、AMPK が SRSF1 をリン酸化することで SRSF1 と標的 RNA 配列との結合が変化するかを in vitro RNA pull-down assay により解析した。
【結果】In vitro、細胞内において AMPK は SRSF1 をリン酸化していることが明らかとなった。また、AMPK によって Ron mRNA 前駆体のスプライシングパターンは変化した。In vitro において SRSF1 と標的 RNA の結合性は AMPK によるリン酸化で減少した。今後は、細胞内において Ron mRNA と SRSF1 の結合が AMPK のリン酸化によって変化するかを検証する予定である。本研究によって AMPK の新規基質として SRSF1 を同定し、そのリン酸化を介して選択的スプライシングを制御するという AMPK の新たな機能が示された。

AMPK, SRSF1, splicing

講演番号：1E2a05
講演日時：3 月 24 日 09:44～ 1 号館 E2 会場

ApoA-I を封入した巨大リポソーム(GUV)の作製
Preparation of the apoA-I-enclosed giant unilamellar vesicles (GUVs)
○坂田 和樹[1]、木岡 紀幸[1]、植田 和光[1,2]、木村 泰久[1] ([1]京大院・農・応用生命、[2]京大・iCeMS)
○Kazuki SAKATA[1], Noriyuki KIOKA[1], Kazumitsu UEDA[1,2], Yasuhisa KIMURA[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. of Agri., Kyoto Univ., [2]iCeMS, Kyoto Univ.)

＜背景・目的＞
末梢組織中の過剰なコレステロールと脂質は高密度リポタンパク質 (HDL)によって肝臓へ運ばれる。血中 HDL 濃度は動脈硬化のリスクと逆相関するため、HDL は善玉コレステロールとも呼ばれている。この HDL は ABCA1 という脂質輸送体が細胞内のコレステロールおよび脂質を血中のアポリポタンパク質 A-I(apoA-I)に受け渡すことによって形成が開始されるが、その詳細は不明である。ABCA1 による HDL 形成を詳細に理解するためには精製標品を用いて HDL 形成反応を試験管内で解析する技術の開発が必要不可欠である。現在汎用されている膜タンパク質の機能解析手法の一つとして、人工脂質二重膜であるリポソームを用いた実験系が上げられる。しかし SUV や LUV などの粒径が小さいリポソームではリポソーム内腔に apoA-I を封入できず、in vitro における HDL 形成初期反応を再現できない。そこで、細胞ほどの大きさを持つ巨大リポソーム(GUV)を用いた実験系の構築を目的とした。
＜方法・結果＞
封入された apoA-I を可視化するためには、蛍光標識した apoA-I の精製標品が必要となる。本研究では大腸菌を用いてヒト apoA-I を大量精製し、標識体を取得した。N 末端に His タグを融合したヒト apoA-I を BL21 を用いて発現させた。ついで Ni-アフィニティークロマトグラフィーによって精製し、Alexa-647 を用いて標識後、余剰の蛍光色素をゲルろ過クロマトグラフィーを用いて除去することで蛍光 apoA-I を得た。
GUV の作成には薄層膨潤法を用いた。平板電極にクロロホルムに溶解した脂質溶液を塗布し、真空乾燥によって薄膜を形成させた。そこに蛍光標識された apoA-I を添加し、交流電流を印加する事で apoA-I を含む GUV を形成させた。この GUV を共焦点蛍光顕微鏡を用いて観察したところ、GUV の内部に蛍光が均一に確認され、形成された GUV が apoA-I を内部に含有することが確かめられた。apoA-I 含有 GUV は HDL 形成反応を人工的に再現する場としての応用が期待される。

apoA-I, GUVs, HDL

講演番号：1E2a06
講演日時：3 月 24 日 10:05～ 1 号館 E2 会場

新規物質生産宿主としてのミミズ細胞培養基盤技術の開発
Development of earthworm cell culture basic technology as a novel animal host cell enabled for recombinant protein production
○伊佐 猛[1]、赤澤 真一[1]、大沼 清[2]、志田 洋介[2]、小笠原 渉[2] ([1]長岡高専物質工、[2]長岡技大生物)
○ Takeru ISA[1], Shin-ichi AKAZAWA[1], Kiyoshi OHNUMA[2], Yosuke SHIDA[2], Wataru OGASAWARA[2] ([1]Natl. Inst. Technol., Nagaoka Coll., [2]Nagaoka Univ. Tech.)

【背景】バイオ医薬品生産は動物細胞を用いて生産される事が多いが，嫌気培養であり，高コストで有る事が課題となっている[1)]．一方で，シマミミズ *Eisenia fetida* の細胞は好気条件で培養可能である事が報告されており，生産の低コスト化が期待できる[1,2)]．さらに，世界経済協力開発機構 OECD により土壌毒性試験のモデル生物として指定されている事から[3)]，ミミズ細胞培養系は物質生産のみならず，土壌汚染のアッセイなど様々な分野に応用可能である[2)]．しかしながら，ミミズの細胞培養に関する知見は少なく，単一細胞培養系や継代培養法も確立されていない．そこで，本研究では *E. fetida* 並びに同じく OECD からモデル生物として指定されている *Eisenia andrei* 体腔細胞の継代培養法の開発を目指し，その前段階として細胞採取法，培養条件，細胞の生死判別法等の確立を試みた．
【方法】体腔細胞は，*Eisenia* spp.を 48 時間絶食させ洗浄した後，液体窒素法並びに超音波法で体腔細胞を取り出し細胞数を計測した．細胞の培養は，5.0×10^5 個ずつ細胞を Hansen S-301 培地及び SFX 昆虫培地に懸濁し, 25°C, 好気条件下で培養を行った. 細胞の生死判定は, 生細胞染色試薬である Calcein AM で染色し行った．また，単一細胞の取得として，*E. andrei* を 24 時間絶食させ抗生物質含有緩衝液で洗浄した後，解剖を行い，取得した臓器を破砕し，生死細胞の判定を蛍光観察にて行った．
【結果と考察】液体窒素法により $7.3\pm1.0\times10^4$ 個／匹の体腔細胞を得る事に成功したが，本法ではミミズが死滅した．そこで，超音波法を用いた体腔細胞の採取を試みたところ，ミミズを殺すことなく，$6.2\pm3.5\times10^5$ 個／匹の細胞を取得することに成功した．次に，培養条件の検討を行った結果，Hansen S-301 培地を用いて 26 日間の培養に成功した．また，細胞の生死判別法について検討したところ，蛍光試薬を用いることで取得した細胞の生死判別に成功した．最後に，単一細胞取得法について検討するために，ミミズを解剖し，心臓，精嚢，受精嚢から細胞を取得した．これらの細胞の蛍光観察を行った結果，死細胞はほとんど無く，精嚢において生細胞が多数観察された．これらの結果は，ミミズの基本的な細胞培養技術の開発に大きく寄与する．本研究は高専-長岡技科大共同研究助成並びに住友財団基礎科学研究助成を受けて実施された．
[1] Fuller-Espie, S.L. et al. J. Pa. Acad. Sci., 89(2): 57-68 (2015).
[2] Hendawi, M. et al. Ecotoxicol Environ Saf, 17-22 (2004).
[3] OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2: effects on biotic systems. Test No. 207: Earthworm, Acute Toxicity Tests. Paris, France. Paris, Organization for Economic (1984).

Earthworm, Animal cell, Cell culture

発表責任者：赤澤真一（s-akazaw@nagaoka-ct.ac.jp）

講演番号：1E2a07
講演日時：3 月 24 日 10:16～ 1 号館 E2 会場

コラーゲン架橋構造ピリジノリンは糖化タンパク質受容体 RAGE の内因性のリガンドである

Pyridinoline, a collagen cross-link, is an intrinsic ligand for the receptor for advanced glycation end-products (RAGE)

○三宅 春奈[1]、村上 庸人[1]、岡田 楓夏[1]、藤野 峻行[1]、倉知 遼太郎[1]、長谷川 俊樹[1]、臼井 照幸[2]、早瀬 文孝[1]、渡辺 寛人[1] ([1]明治大農、[2]女子栄養大栄養)

○ Haruna MIYAKE[1], Yoto MURAKAMI[1], Fuka OKADA[1], Takayuki FUJINO[1], Ryotaro KURACHI[1], Toshiki HASEGAWA[1], Teruyuki USUI[2], Fumitaka HAYASE[1], Hirohito WATANABE[1] ([1]Meiji Univ., [2]Kagawa Nutrition Univ.)

【目的】糖尿病患者の体内においてはタンパク質と糖とのメイラード反応により、最終糖化産物（Advanced glycation end-products; AGEs）が生成する。組織に蓄積した AGEs は Receptor for AGEs（RAGE）との相互作用を介して細胞の機能障害をひきおこし、糖尿病合併症の発症に関与することが知られている。AGEs は多様な修飾構造の総称であるが、われわれは最近 3-ヒドロキシピリジニウム (3-HP) 構造を有する AGE が RAGE への結合を介して細胞毒性を発揮することを見出した[1)]。しかしながら一方、AGEs の蓄積しない状況下において、RAGE が 3-HP 構造を認識する生理的意義は不明であった。

われわれは「3-HP 構造をもつ未知の RAGE リガンドが存在する」と仮説立て、3-HP 構造を有する内因性分子としてピリジノリン（pyridinoline）に着目した。ピリジノリンは細胞外マトリクスの主要成分であるコラーゲンの架橋構造である。これまでピリジノリンが組織の物性に関与すること、骨吸収の指標となることが知られているが、その生理作用、さらには受容体に関する報告は皆無であった。そこで本研究では、ピリジノリンの受容体の同定、さらには受容体を介した作用を明らかにすることを目的として解析を行った。

【方法および結果】ウシアキレス腱を加水分解し、陽イオン交換クロマトグラフィー、固相抽出および逆相 HPLC に供し、ピリジノリンを単離した。ラット神経細胞 PC12 にピリジノリンを作用させたところ、濃度依存的に生存率が低下した。一方、この作用は抗 RAGE 抗体および組換え RAGE タンパク質の共存により抑制された。

次に Biacore システムを用いて表面プラズモン共鳴解析を行ったところ、ピリジノリンと RAGE の特異的な結合が検出され、解離定数 K_d は 4.38×10^{-5} (M) と算出された[2)]。これらのことから、ピリジノリンが RAGE の内因性のリガンドとして機能しうることが示された。

ピリジノリンはコラーゲン分解にともなって遊離することが知られている。したがって本研究の成果は「ピリジノリンがコラーゲン分解を細胞に感知させる因子として作用する」こと、および「RAGE の本来の機能の 1 つがコラーゲン分解の感知である」ことを示唆するものであると考えられる。

1) Murakami Y et al. *Biosci Biotechnol Biochem.* 82, 312-319 (2018).
2) Murakami Y et al. *Biosci Biotechnol Biochem.* 82, 1508-1514 (2018).

Receotor for advanced glycation end-products, Pyridinoline, Collagen

講演番号：1E2a08
講演日時：3 月 24 日 10:27～ 1 号館 E2 会場

アデノウイルス E1A による cyclin A-CDK2 複合体形成促進を介した G2/M 期停滞機構の解析
Mechanism of G2/M-phase arrest via promoting cyclin A-CDK2 complex formation by adenoviral E1A.

○赤池 康範、千葉櫻 拓（東農大バイオ）
○Yasunori AKAIKE, Taku CHIBAZAKURA (Tokyo Univ. of Agric.)

我々は、これまでに細胞周期制御因子の１つ cyclin A(CycA)-CDK 複合体の活性亢進の影響を解析するため、分解シグナル配列を欠損した分解抵抗性 CycA(CycAΔ80)をヒト細胞株に発現させたところ、G2/M 期停滞が誘導されることを見出した。また、G2/M 期停滞が誘導される誘導強度には細胞株間で差がみられ、アデノウイルス感染ヒト細胞株 HEK293 で最も強かったことから、その原因がアデノウイルス由来タンパク質 E1A によるものであると示唆された。E1A はがん原タンパク質として知られており、がん抑制因子 pRb と結合することで細胞周期関連因子の転写を担う E2F を活性化し、細胞周期進行を促進することでがん化を誘導することが知られている。また、E1A は Rb ファミリータンパク質である p107 を介して CycA-CDK2 もしくは cyclin E-CDK2 と四者複合体を形成していることが知られているが、この複合体形成の意義は未だ明らかになっていない。そこで、本研究においては、E1A が CycA-CDK 活性亢進による G2/M 期停滞を促進するメカニズムについて検証を進めた。
まず、HEK293 において E1A をノックダウンしたところ、G2/M 期停滞が抑制された。また、E1A を発現していないヒト細胞株 MDAH041 において E1A を CycAΔ80 と共発現させたところ、G2/M 期停滞が促進された。そこで、両条件下での CycA-CDK2 複合体形成量を比較したところ、HEK293 における E1A ノックダウン時には CycA-CDK2 複合体形成量が減少する一方で、MDAH041 における E1A 共発現時には CycA-CDK2 複合体形成量が増加していた。以上の結果から、E1A は CycA-CDK2 複合体形成を促進することが示唆され、これにより CycA-CDK 活性亢進による G2/M 期停滞が促進していると考えられる。
次に、E1A の G2/M 期停滞促進能の p107 依存性について検証した。HEK293 において CRISPR-Cas9 を用いて p107 ノックアウト株を作製し CycAΔ80 を発現させたところ、依然として G2/M 期停滞が誘導された。さらに、E1A と CycA-CDK2 の相互作用解析により p107 非存在下でも結合が確認された。以上のことから、E1A と CycA-CDK2 の結合及び CycA-CDK2 活性亢進による G2/M 期停滞誘導には p107 は非必須であると示唆された。

cyclin A, E1A, G2/M-phase arrest

講演番号：1E2a09
講演日時：3 月 24 日 10:38～ 1 号館 E2 会場

がん細胞における 5-アミノレブリン酸と温熱ストレスによる細胞周期進行への影響

Effect of 5-aminolevulinic acid and thermal stress on cell cycle progression in cancer cells.

○小澤 峻一[1]、飯田 友貴[2]、高橋 究[2]、中島 元夫[2]、田中 徹[2]、千葉櫻 拓[1]([1]東農大農、[2]SBI ファーマ(株))
○ Shunichi OZAWA[1], Tomoki IIDA[2], Kiwamu TAKAHASHI[2], Motowo NAKAJIMA[2], Tohru TANAKA[2], Taku CHIBAZAKURA[1] ([1]Tokyo Univ. of Agric., [2]SBI Pharmaceuticals Co., Ltd.)

がんの温熱療法は、がん細胞が正常細胞と比べて温熱に高い感受性を示すことを利用した治療法である。副作用が少なくがん選択性が高いが、その反面効果が穏やかであるため、補助的療法にとどまっている。そこで、温熱療法の効果増強を目的とし、天然アミノ酸である 5-アミノレブリン酸（5-ALA）に着目した。5-ALA はヘムを含むテトラピロール化合物の前駆体であり、その投与によりがん組織特異的にヘム前駆体で光増感物質であるプロトポルフィリン IX（PpIX）が蓄積することから、がんの光線力学療法に適用されている。我々は、種々のヒトがん細胞株において 5-ALA を温熱条件下で添加したところ、数種のがん細胞株において細胞死の増強効果を新たに見出した（ALA 温熱効果）[1,2]。これまでの研究より、ALA 温熱条件下での PpIX の蓄積と、活性酸素種（ROS）および DNA 損傷の増大が ALA 温熱効果と相関することが示唆されている。

ALA 温熱効果のあるがん細胞株 HepG2 を移植した担がんマウスを用いて、5-ALA の経口投与と温熱処置を施し腫瘍増殖の経時的観察を行った。その結果、5-ALA 投与と温熱処理を併用した群は温熱処理のみの群と比べて有意に腫瘍増殖が抑制された。しかし、腫瘍サイズはゆっくりと増大していたため、動物個体レベルの実験においては、5-ALA 温熱処理による細胞死の誘導ではなく細胞増殖能の低下が示唆された。

そこで、ALA 温熱効果のある HepG2 細胞と効果のないがん細胞株 U-2 OS について、ALA 温熱条件下での細胞周期への影響を検証することにした。それぞれの DNA 含量を FACS 解析したところ、温熱ストレス下において HepG2 では細胞周期が M 期で、U-2 OS では S/G2 期で停滞したが、温熱ストレスと 5-ALA の併用条件下においては、HepG2 では同様に M 期で停滞する一方で、U-2 OS では停滞が解除された。次に、BrdU の取り込みによる複製活性のアッセイを行なった結果、HepG2 では 5-ALA と温熱処理によって複製活性が低下しており、U-2 OS では複製活性の低下が見られなかった。

以上のことから、温熱条件下での 5-ALA 添加は、がん細胞種に応じて PpIX 蓄積に伴う ROS の増大・DNA 損傷による細胞死の惹起と同時に、細胞周期に対しても影響を及ぼすことが示唆された。

1. 2013 年度本大会シンポジウム 4SY18-9
2. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 79: 422-431 (2015)

5-aminolevulinic acid, Hyperthermia, Cell cycle

発表責任者：小澤　峻一（44218006@nodai.ac.jp）

講演番号：1E2a10
講演日時：3 月 24 日 10:49～ 1 号館 E2 会場

低酸素条件下におけるマウスメラノーマ細胞悪性化の機構解析

Molecular Mechanisms for Hypoxia-Induced Acquisition of Malignancy in Mouse Melanoma Cells

○川原 唯、橋本 康太郎、三浦 豊（東農工大農）
○ Yui KAWARA, Kotaro HASHIMOTO, Yutaka MIURA (Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

【目的】原発巣内において、がん細胞はしばしば酸素や栄養が行き届かない低酸素環境に曝されており、低酸素環境においてがん細胞は悪性化することが知られている。当研究室のこれまでの研究において、マウスメラノーマ細胞 B16F10 を低酸素培養処理することにより増殖能と運動能に変化が現れることが明らかとなり、これががん細胞の悪性化に関わる可能性がある。さらに、低酸素環境下で細胞膜マイクロドメインのタンパク質発現が変化することも示唆されている。そこで本研究では、低酸素培養処理により発現量が変化する細胞膜マイクロドメインタンパク質を同定し、低酸素条件下におけるがん細胞悪性化との関連を検討した。
【方法】マウスメラノーマ細胞 B16F10 を通常酸素条件下（20%O_2）で 24 時間培養後、低酸素条件下（1%O_2）で 72 時間培養したものを低酸素培養群とし、通常酸素条件下で 96 時間培養した通常酸素培養群と比較した。細胞膜マイクロドメイン画分の調製はショ糖密度勾配超遠心法により行った。LC-MS/MS を用いて細胞膜マイクロドメインタンパク質を同定した。タンパク質の局在変化は Western Blotting と細胞免疫染色により検討した。
【結果と考察】細胞膜マイクロドメイン中のタンパク質として、ATP synthase subunit ß（ATPB）が同定された。通常酸素培養群と比較して低酸素培養群での ATPB の発現量は細胞全体では減少傾向が見られた。さらに、ATPB の発現量は細胞膜画分では変化が見られなかったが、細胞膜マイクロドメイン画分では低酸素培養処理群において減少している様子が観察された。これらの結果から低酸素培養処理により B16F10 細胞において、細胞膜上の ATP synthase はマイクロドメインからマイクロドメイン以外の流動性の高い膜の層へ移行する可能性が示唆された。また、細胞免疫染色によって細胞膜上の ATP synthase の向きは細胞の外側に ATP 合成部位が存在していることが示された。低酸素条件下では、細胞内は解糖系の活性化により酸性になるため、細胞膜上の ATP synthase は細胞外に ATP を産生する方向に機能することが考えられる。これらの結果は、細胞外 ATP 産生能の変化が細胞内シグナルに影響を与え、それが低酸素環境下でのがん細胞悪性化につながっている可能性を示唆している。現在、低酸素培養処理時の細胞外 ATP 量の測定と細胞外 ATP 産生が低酸素培養処理時の B16F10 の増殖能・運動能変化に与える影響を検討中である。

melanoma, hypoxia, membrane microdomain

発表責任者：三浦豊（eiyouym@cc.tuat.ac.jp）

講演番号：1E2a11
講演日時：3 月 24 日 11:10～ 1 号館 E2 会場

CDK 阻害因子 p27 の新規な機能抑圧経路
A novel pathway suppressing the function of CDK inhibitor p27

○米谷 達哉、千葉櫻 拓（東農大院バイオ）
○Tatsuya KOMETANI, Taku Chibazakura (Dept. Bioscience, Tokyo Univ. of Agric.)

細胞周期の進行は cyclin-cyclin 依存性キナーゼ（CDK）複合体により正に制御され、その複合体に結合し活性を阻害する CDK 阻害因子により負に制御されている。CDK 阻害因子の一つである p27 を誘導発現させると、正常細胞では細胞周期が停止するが、ある種のがん細胞では細胞周期が停止しないことが本研究室において見出されている。即ち、ある種のがん細胞において p27 の機能を抑圧する因子の存在が示唆された。そこで、p27 の機能抑圧因子は p27 と相互作用すると仮定し、p27 相互作用因子の網羅的探索を行った結果、核小体タンパク質 nucleophosmin isoform 1 (NPM1) が p27 と特異的に相互作用することが見出された。既に、その相互作用は正常細胞ではほとんど検出されず、がん細胞でのみ検出されること、また、がん細胞では NPM1 の遺伝子に変異は見られないが、タンパク質発現量は正常細胞に比べ増大していることが示されている。以上の結果を踏まえ、本研究では NPM1 による p27 機能抑圧メカニズムの解明を目的とした。

正常細胞の p27 誘導発現株に NPM1 を安定導入し、増殖検定を行った結果、NPM1 導入株は非導入株に比べ p27 誘導発現下での増殖率が増加していた。一方で、がん細胞における p27 誘導発現株の NPM1 発現抑制株を作製し、同様に増殖検定を行った。その結果、NPM1 発現抑制株は非発現抑制株に比べ p27 誘導発現下での増殖率が低下していた。つまり、NPM1 の高発現により p27 の機能が抑圧されていることが示唆された。また、細胞内局在解析から、がん細胞特異的に p27 が NPM1 と核小体に共局在することが示された。また、NPM1 に対し、拮抗的に働くがん抑圧因子 ARF が当該がん細胞において欠損していることが確認された。そこで、当該がん細胞に一過的に ARF を導入した。その結果、ARF が導入されたがん細胞において NPM1 のタンパク質発現量が減少し、p27 の核小体局在が解除されたことが確認された。

以上のことから、当該がん細胞においては、がん抑圧因子 ARF の欠損により NPM1 が高発現される結果、NPM1 が p27 を核小体に隔離することでその機能を抑圧すると考えられる。一方、正常細胞の NPM1 安定導入株はがん細胞ほどの p27 機能抑圧を示さないことから、NPM1 と共役する他の因子の存在が示唆される。

p27, cell cycle, nucleolus

発表責任者：米谷達哉（44318002@nodai.ac.jp）

講演番号：1E2a12
講演日時：3 月 24 日 11:21～ 1 号館 E2 会場

NPM1 との相互作用を介した p27 機能抑圧メカニズムの解析
Analysis on mechanism suppressing the function of p27 via interaction with NPM1
○松下 凪沙、小林 加奈、米谷 達哉、千葉櫻 拓（東農大院 バイオ）
○Nagisa Matsushita, Kana Kobayashi, Tatsuya Kometani, Taku Chibazakura (Dept. Bioscience, Tokyo Univ. of Agric.)

動物細胞周期を進行させる cyclin-CDK 複合体に結合してその活性を阻害し、細胞周期進行を負に制御するのが CDK 阻害因子（CKI）である。p27 は主要な CKI の 1 つであり、その欠損によるがん誘発頻度の上昇、発現量とがん悪性度の負の相関などから、がん抑制因子としても知られている。当研究室において、正常細胞において p27 を誘導発現させると細胞周期は停止するが、一部のがん細胞株では p27 誘導発現下でも細胞周期が停止しないことが見出されており、それらのがん細胞には p27 と結合してその機能を抑圧する因子が存在すると考えられた。p27 相互作用因子網羅的探索を質量分析法により行い、酵母ツーハイブリッド（Y2H）法によるスクリーニングの結果 nucleophosmin isoform 1（以下 NPM1）と p27 との相互作用が確認された。またその後の研究結果から NPM1 は動物細胞内で p27 と相互作用し、その機能を抑圧することが示唆されている（本年度本大会、米谷ら）。そこで本研究では、NPM1-p27 の結合部位の同定とその相互作用の特異性について明らかにすることを目的とした。p27 に対する NPM1 の結合部位の解明は、がんにおける p27 の機能抑圧メカニズムの解明や NPM1 を標的とした創薬への応用に貢献すると考えられる。

まず p27 と NPM1 の相互作用部位について、数種の NPM1 変異体（欠損、点変異）を用いた Y2H 法により解析し、p27 との結合能が下がる NPM1 変異体（C 末端領域の 3 アミノ酸残基におけるアラニン置換変異；以下 NPM1-C3A）が得られた。そこで、NPM1-C3A を用いた p27 機能抑圧の検証を行う端緒として、動物細胞内での p27 と NPM1-C3A の相互作用解析を免疫沈降法により行った。p27 誘導発現下で細胞周期が停止しないがん細胞において、NPM1 野生型（WT）と NPM1-C3A を導入し誘導発現した p27 との結合能の比較をした結果、動物細胞内でも NPM1-C3A は WT に比べ p27 に対する結合能が低下していることが示された。

また、正常細胞において NPM1 WT を安定導入すると p27 の機能が抑圧され、p27 誘導発現下での増殖率が上がることが確認されている。そこで p27 と結合しない NPM1-C3A を正常細胞に安定導入し、同様の検証をした結果、NPM1-C3A を導入した細胞株では p27 誘導発現下での増殖率の上昇は見られなかった。つまり、NPM1-C3A は p27 機能抑圧能を欠損していることが示唆され、NPM1 による p27 機能抑圧には p27 との結合が必須と考えられる。

p27, NPM1, cell cycle

発表責任者：松下凪沙（44218033@nodai.ac.jp）

講演番号：1E2a13
講演日時：3 月 24 日 11:32～ 1 号館 E2 会場

内因性酸化ステロールによるコレステロール恒常性制御

The regulation of cholesterol homeostasis by endogenous oxysterols

○齋藤 穂高、山内 祥生、佐藤 隆一郎（東大院・農生科・応生化）
○Hodaka SAITO, Yoshio YAMAUCHI, Ryuichiro SATO (Dept. of Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. of Agr. and Life Sci., The Univ. of Tokyo)

コレステロール生合成は小胞体に局在する転写因子 SREBP-2 により厳密に制御される．SREBP−2 前駆体は小胞体にて SCAP と複合体を形成しており，小胞体コレステロール量依存的にゴルジ体に輸送され，2 種類のプロテアーゼによって切断されることで活性型となり，コレステロール合成酵素遺伝子群の転写を亢進する．一方，小胞体に局在する Insig は SCAP と結合し，SREBP-2/SCAP 複合体を小胞体へ繋留する SREBP-2 抑制因子として働く．Insig はコレステロール代謝産物である酸化ステロールと結合することでその分解が抑制され，その結果，SREBP-2/SCAP/Insig 複合体形成が促進され，SREBP-2 は抑制される．酸化ステロールのコレステロール代謝制御に関するこれまでの研究では，培地中に添加された“外因性”酸化ステロールの影響が解析されており，細胞内で産生される“内因性”酸化ステロールによるコレステロール代謝制御を解析した報告は乏しい．本研究では，25-Hydroxycholesterol (25-HC)を産生する CH25H， 27-HC を産生する CYP27A1，7α-HC を産生する CYP7A1 の発現が SREBP-2 をはじめとするコレステロール代謝に及ぼす影響について解析した．

【方法と結果】

SREBP-2 標的遺伝子の HMG-CoA 合成酵素(HMGCS)のプロモータ領域を挿入したレポータプラスミドを HEK293T に導入し，3 種類のコレステロール水酸化酵素が HMGCS プロモータ活性に及ぼす影響を検討した．CH25H 発現はそのプロモータ活性を約 50%抑制したが，CYP27A1 と CYP7A1 発現では抑制されなかった．さらに，上記の酵素が HMGCS 遺伝子発現に及ぼす影響について定量 RT-qPCR により解析した. その結果, CH25H 発現はその遺伝子発現を抑制したが, CYP27A1 と CYP7A1 発現はそれを抑制しなかった．一方，CHO 細胞を用いて同様の解析をしたところ，CH25H の他，CYP27A1 発現によっても HMGCS の遺伝子発現は抑制された．さらに，CHO 細胞では，CH25H と CYP27A1 発現による SREBP-2 活性化の抑制も確認された．SREBP 活性を最も抑制した CH25H を用いて Insig の分解について検証したところ, CH25H の発現によって Insig1 の分解が抑制されることが示された．以上の結果から，① CH25H と CYP27A1 発現により SREBP-2 活性は抑制されるが，CYP7A1 発現ではその活性は抑制されないこと，② CYP27A1 発現による SREBP-2 活性抑制は細胞種依存的であることが明らかになった．現在，コレステロール水酸化酵素の発現が，酸化ステロールをリガンドとする核内レセプターLXR へ及ぼす影響についても解析中であり，その結果も合わせて報告したい．

Oxysterols, Cholesterol homeostasis, SREBP-2

発表責任者：齋藤穂高（adca1066@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：1E2a14
講演日時：3 月 24 日 11:43～ 1 号館 E2 会場

SCAP 安定化による SREBP プロセシング調節
Regulation of SREBP processing by stabilizing SCAP
○丸山 貴史、官 彦州、清水 誠、山内 祥生、佐藤 隆一郎（東大院・農生科・応生化）
○Takashi MARUYAMA, Yen-Chou KUAN, Makoto SHIMIZU, Yoshio YAMAUCHI, Ryuichiro SATO (Dep. of Appl. Biol. Chem.,Grad..Sch. of Agr.and Life Sci.,Univ. of Tokyo)

【背景・目的】
脂質の代謝を転写レベルで調節しているのが Sterol regulatory element-binding proteins(SREBP)である。SREBP は小胞体膜上で前駆体として合成され、ゴルジ体でプロセシングを受けて活性型になり、転写因子として機能する。SCAP は小胞体膜上に局在している 8 回膜貫通型タンパク質で、SREBP のゴルジ体への輸送に不可欠である。細胞内ステロール量を感知し、過剰時には SREBP を小胞体膜上にアンカーしプロセシングを抑制し、不足時にはゴルジ体への移行を促し SREBP を活性化させることで、脂質の生合成を制御している。近年、SCAP は糖鎖修飾によって安定化され、SREBP の活性化には糖代謝も深く関わってくることが示唆された。一方で当研究室では HSP90 が SCAP の安定化に関与し SREBP の活性化を促す事を示した。(Kuan et al. J.B.C.)本研究では SCAP への糖鎖修飾と HSP90 の SCAP/SREBP 複合体安定化の関係性を明らかにし、SCAP をターゲットとした脂質代謝改善研究の基礎的知見の提供を目的としている。
【方法】
HuH-7 細胞に、グルコース枯渇処理を行うことで糖鎖修飾を抑制し、SCAP のタンパク質量をウェスタンブロットにて検出した。HSP90 阻害剤 17-AAG の添加もしくは HSP90 の siRNA の添加により HSP90 活性を低下させ、SCAP のタンパク質量をウェスタンブロットにて検出した。myc-Tag を付加した HSP90 発現ベクターをトランスフェクションし、グルコース枯渇処理を行いその後、抗 myc 抗体を用いて共免疫沈降にて、HSP90 と SCAP の結合の有無を確認した。SCAP の糖鎖修飾部位である 3 つのアスパラギンのいずれかをグルタミンに置換した SCAP に Flag-tag を付加した発現ベクターをトランスフェクションした後、抗 Flag 抗体を用いて共免疫沈降にて、HSP90 と SCAP の結合の有無を確認した。
【結果・考察】
HuH-7 細胞にグルコース枯渇処理を施した結果、GBM 由来細胞を用いた先行研究での報告と同様に SCAP は不安定化され、活性型 SREBP が減少した。一方で HSP90 を阻害することによっても SCAP の不安定化が確認されたが、HSP90 阻害時にグルコース枯渇によって更なる不安定化は見られなかった。これら不安定化は共にプロテアソーム阻害剤である MG132 によってキャンセルされたことから、糖鎖修飾と複合体形成の間に機能相関がある可能性が示唆された。今後は糖鎖修飾の阻害によって SCAP と HSP90 の相互作用に影響があるか解析を進めていく。

SCAP, HSP90, SREBP

発表責任者：丸山貴史（maruyama-takashi-38c@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：1E2a15
講演日時：3 月 24 日 11:54～ 1 号館 E2 会場

酸化ステロールは Insig を介して細胞死を誘発する

Oxysterols induce cell death *via* Insigs

○渡邉 雄一、三吉 翔子、清水 誠、山内 祥生、佐藤 隆一郎（東大院・農生科・応生化）
○Yuichi WATANABE, Shoko MIYOSHI, Makoto SHIMIZU, Yoshio YAMAUCHI, Ryuichiro SATO
(Dept. of Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., Univ. of Tokyo)

【背景･目的】酸化ステロールは生体内においてコレステロール代謝を最も強力に制御する因子の一つであり、Insig はその機能メディエーターとして働く小胞体膜タンパク質である。Insig は酸化ステロールと結合することで､SREBP 活性制御や HMG-CoA 還元酵素の分解制御を介した脂質代謝調節を担う｡Insig はこれら脂質代謝制御以外にも､抗ウイルス機能を有するタンパク質の制御に関わるなど、多様な機能を有している。近年、酸化ステロールによりストレス応答性の転写因子 ATF4 が誘導されることが報告され、我々はこの ATF4 発現に Insig が関与することを示唆する結果を得た。ATF4 はアミノ酸代謝関連遺伝子や糖脂質代謝関連遺伝子、アポトーシス関連遺伝子などの発現を調節することで生体内恒常性の維持を担っている。そこで、本研究では酸化ステロール–Insig による新機能の解明を目的として、Insig と酸化ステロールによる ATF4 発現調節機構について解析を試みた。

【方法】CHO-7(Chinese hamster 卵巣由来)細胞並びに Insig 欠損 CHO-7 株 SRD-15 に、25-Hydroxycholesterol (25HC)をはじめとする 7 種の酸化ステロールを 5 μM, 24h 処理し、WB 及び RT-qPCR 法により各種タンパク質及び遺伝子発現解析を行った。また、Insig1、Insig2 に関してレンチウイルスベクターを用いて SRD-15 に発現させ、ATF4 発現制御における Insig の分子機能について検証した。さらに、25HC 処理による CHO-7 及び SRD-15 の細胞生存率を MTT assay により評価した。

【結果・考察】処理した 7 種の酸化ステロールのうち 25HC を含む Insig 結合能の高い 3 種の酸化ステロールの添加により CHO-7 においては ATF4 タンパク質の発現が亢進した。一方で、Insig 欠損株 SRD-15 における ATF4 タンパク質の発現上昇はわずかであった。さらに、レンチウイルスベクターを用いた Insig の発現により、SRD-15 における 25HC による ATF4 の発現亢進が回復した。これらの結果から、Insig が酸化ステロールによる ATF4 発現に関与することが示唆された。また、RT-qPCR の結果から、25HC による ATF4 発現上昇はその標的遺伝子のうちアポトーシス関連遺伝子の発現を顕著に亢進し､一方 SRD-15 においてはこれらアポトーシス関連遺伝子の発現亢進は見られなかった。その結果、25HC 処理下における細胞生存率は CHO-7 において顕著に低下したのに対し、SRD-15 においてはほとんど変化しなかった。本研究結果より、酸化ステロールは Insig を介して ATF4 発現を上昇させ、細胞死を誘発することが示唆された。

Oxysterol, ATF4, proapoptotic genes

講演番号：1E2p01
講演日時：3 月 24 日 13:50～ 1 号館 E2 会場

リボヌクレアーゼ H2 を欠損させたマウス線維芽由来 NIH3T3 細胞の作製

Establishment of ribonuclease H2 knockout NIH3T3 mouse fibroblast cells

月足 元希、馬場 美聡、○兒島 憲二、姫田 康平、滝田 禎亮、保川 清（京大院農）
Motoki TSUKIASHI, Misato BABA, ○Kenji KOJIMA, Kohei HIMEDA, Teisuke TAKITA, Kiyoshi YASUKAWA (Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ.)

【目的】リボヌクレアーゼ H (RNase H) は、RNA/DNA ハイブリッドの RNA を加水分解する酵素であり、アミノ酸配列と基質特異性に基づき、1 型の RNase H1 および 2 型の RNase H2 (RNH2) に分類される。真核生物の RNH2 は、A、B および C サブユニットから成るヘテロ三量体であり、活性部位は A サブユニットにある。RNH2 は二本鎖 DNA に取り込まれた 1 個のリボヌクレオチド (R) の 5’末端側を切断する活性を有するが、RNase H1 はこの活性を有していない。近年、DNA 複製時に DNA ポリメラーゼによりゲノムに R が取り込まれること、そして RNH2 がそれを除去しゲノム安定性維持に寄与していることが明らかになった [1)]。本研究では、ゲノム安定性維持における RNH2 の役割を詳細に調べるため、CRISPR/Cas9 法により RNH2 を欠損したマウス繊維芽由来 NIH3T3 細胞株を樹立することを目的とした。

【方法・結果】CRISPRdirect を用いて、マウス RNH2 の A サブユニットをコードする遺伝子 (*Rnaseh2a*) を標的とするガイド RNA を検索したところ、オフターゲットの可能性が最も低い標的配列がエキソン 2 において見出された。見出されたガイド RNA と同じ塩基配列を有するオリゴ DNA を、Cas9 をコードする遺伝子を含む pGuide-it-ZsGreen1 ベクター (Clontech) に導入した。構築したベクターを NIH3T3 細胞にトランスフェクションした後、限界希釈法により単一クローンを得た。4 個のクローンについて標的配列を PCR により増幅し、塩基配列を解析したところ、16 塩基が欠失しフレームシフト変異を起こしていると考えられる 1 クローン (KO 株) が得られた。NIH3T3 細胞の野生株および KO 株の細胞溶解液について、RNH2 の A サブニットに対する抗体を用いてウェスタンブロット解析を行ったところ、KO 株では A サブユニットに相当するバンドが検出されなかった。また、1 個の R を含む 12 bp の二本鎖 DNA を基質として、細胞溶解液における RNH2 の酵素活性を測定したところ、KO 株では活性が検出されなかった。これらのことから、KO 株では RNH2 の発現が消失していることが示された。MTT 法により細胞増殖速度を測定したところ、対数増殖期における倍加時間は野生株が 18 時間、KO 株が 29 時間であり、RNH2 の欠損により細胞増殖速度が低下した [2)]。

1) Reijns, M.A., et al. *Cell* **149**, 1008–1022 (2012)
2) Tsukiashi, M., et al. *J. Biochem.* in press, https://doi.org/10.1093/jb/mvy101

ribonuclease H2, CRISPR/Cas9, genome stability

発表責任者：兒島憲二（kojimak@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：1E2p02
講演日時：3 月 24 日 14:01～ 1 号館 E2 会場

リボヌクレアーゼ H2 を欠損させたマウス線維芽由来 NIH3T3 細胞の性状解析

Characterization of ribonuclease H2 knockout NIH3T3 mouse fibroblast cells

○馬場 美聡、月足 元希、兒島 憲二、姫田 康平、滝田 禎亮、保川 清（京大院農）
○Misato BABA, Motoki TSUKIASHI, Kenji KOJIMA, Kohei HIMEDA, Teisuke TAKITA, Kiyoshi YASUKAWA (Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ.)

【目的】リボヌクレアーゼ H (RNase H) は、RNA/DNA ハイブリッドの RNA を加水分解する酵素である。2 型の RNase H (RNH2) は、二本鎖 DNA に取り込まれた 1 塩基のリボヌクレオチド (R) の 5’末端側のホスホジエステル結合も加水分解する。近年、ゲノムに R が数千塩基に 1 塩基の割合で取り込まれていること、取り込まれた R は RNH2 による 5’末端側の切断から始まるリボヌクレオチド除去修復により除去され、ゲノムは修復されることが明らかになった。遺伝要因により RNH2 の活性が低下すると、ゲノム中の R が除去されずに蓄積することでゲノムが不安定化し、自己免疫疾患を発症することが報告されている。RNH2 を欠損させたマウスは胎生致死を示し、その胎児の性状解析は行われているが、RNH2 を欠損させた培養動物細胞の性状解析はなされていない。本研究では、CRISPR/Cas9 法により RNH2 を欠損させたマウス線維芽由来 NIH3T3 細胞株 (KO 株) について、ゲノム中の R の蓄積に着目して、その性状を解析した。

【方法・結果】NIH3T3 の野生株および KO 株のゲノムに含まれる R の量を、アルカリアガロースゲル電気泳動法およびニックトランスレーション法により比較した。前者では、R がアルカリ条件下で加水分解されやすい性質を利用しており、0.3 M KOH で処理したゲノム DNA を電気泳動に供したところ、KO 株のゲノムは野生株より低分子側に移動した。後者では、*E. coli* RNase HII を用いて R の 5’末端にニックを入れた後、［α-^{32}P］dCTP 存在下で *E. coli* DNA ポリメラーゼ I によるニックトランスレーション反応を行ったところ、KO 株のゲノムには野生株より多くの ^{32}P が取り込まれた。これらの結果から、RNH2 の欠損によるゲノム中への R の蓄積が示された。RNH2 の活性低下に伴って発現レベルが上昇することが知られているインターフェロン誘導性遺伝子群 (IFIT1, IFIT2, IFIT3, IRF7)、ケモカイン遺伝子 (CXCL10)、および cGAS/STING 遺伝子の mRNA の発現量を qRT-PCR 法により測定した。KO 株での IFIT3 および IRF7 の発現量はそれぞれ野生株の 2.7 倍および 1.8 倍に増大し、CXCL10 は野生株の 1/2 に減少し、その他は有意な差が見られなかった。本結果は、タモキシフェン誘導型 RNH2 コンディショナルノックアウトマウス由来の線維芽細胞では、これらの発現量が誘導前の 20～40 倍上昇したという先行研究の結果とは異なった [1)]。これらのことから、ゲノム中の R の蓄積に伴う表現形質の出現は、細胞の種類等の様々な要因に依存して変動する可能性が示された [2)]。

1) Bartsch, K., et al. *Hum. Mol. Genet.* **26**, 3960–3972 (2017)
2) Tsukiashi, M., et al. *J. Biochem.* in press, https://doi.org/10.1093/jb/mvy101

ribonuclease H2, ribonucleotide accumulation, interferon-stimulated gene

発表責任者：馬場美聡（baba.misato.34a@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：1E2p03
講演日時：3 月 24 日 14:12～ 1 号館 E2 会場

キノロン系抗菌薬の新規構造類縁体である BFF122 の抗結核菌活性と DNA gyrase に対する阻害活性

Anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity and inhibitory activities against DNA gyralses of BFF122, which is a novel quinolone analogue

○森 茂太郎[1]、金 玄[1]、田村 敏生[2]、前田 百美[2]、林原 絵美子[1]、Rizzi Menico[3]、柴山 恵吾[1]([1]感染研細菌第二部、[2]感染研ハンセン病研究センター、[3]東ピエモンテ大学薬学部)
○Shigetarou MORI[1], Hyun Kim[1], Toshiki Tamura[2], Yumi Maeda[2], Emiko Rimbara[1], Menico Rizzi[3], Keigo Shibayama[1] ([1]NIID, Bacteriology II, [2]NIID, Leprosy Research Center, [3]University of Piemonte Orientale, Pharmaceutical Sciences)

目的
結核の治療において重要なイソニアジドとリファンピシンの 2 剤に耐性を示す多剤耐性結核が世界中でまん延しており、大きな問題となっている。そのため、新たな抗結核薬の開発が求められている。そこで我々は、キノロン系抗菌薬であるレボフロキサシンの構造類縁体である BFF122 に着目している。BFF122 は、これまでにキヌレリンアミノトランスフェラーゼの阻害剤として解析されてきたが、抗菌薬としての検討は行われてこなかった。そのため、本研究では新規抗結核薬の開発を目標として、BFF122 の抗結核菌活性と DNA ジャイレースに対する阻害活性を明らかにすることを目的とした。
方法
液体微量希釈法により、結核菌に対する BFF122 の最小発育阻止濃度（MIC 値）の測定を行った。結核菌及びらい菌由来の DNA ジャイレース（DNA ジャイレース A サブユニットと B サブユニット）の組換え体をそれぞれ大腸菌内で発現させた後に精製を行い、阻害活性の測定に用いた。阻害活性の測定では、BFF122 の濃度を段階的に希釈して反応系に加えることによって DNA ジャイレースが示す DNA スーパーコイリング活性を 50%阻害する濃度（IC_{50} 値）を決定するとともに、レボフロキサシンを含む既存のキノロン系抗菌薬における IC_{50} 値との比較を行った。さらに、DNA ジャイレースに対する BFF122 の結合部位について、*in silico* での予測を行った。
結果・考察
結核菌に対する BFF122 の MIC 値は 0.4 μg/mL であり、既存のキノロン系抗菌薬に対する MIC 値とほぼ同じであった。一方、結核菌由来の DNA ジャイレースに対する BFF122 の IC_{50} 値は 9.4 μg/mL であり、これまでに報告されているレボフロキサシンにおける IC_{50} 値（34 μg/mL）よりも低い値であった。このことから、BFF122 はレボフロキサシンよりも強く結核菌由来 DNA ジャイレースの活性を阻害することが示された。BFF122 の構造はレボフロキサシンと非常に類似しているが、BFF122 はレボフロキサシンには存在しないアミノ基を有している。*In silico* で予測した結果、このアミノ基が DNA ジャイレースの B サブユニットと結合していることが示唆され、BFF122 がレボフロキサシンよりも強く結核菌由来 DNA ジャイレースと結合する要因であることが示唆された。また、BFF122 はらい菌由来 DNA ジャイレースの活性も阻害したことから（IC_{50} 値；9.4 μg/mL）、BFF122 はらい菌に対しても有効であることが示唆された。

DNA gyrase, Mycobacterium tubetculosis, Mycobacterium leprae

発表責任者：森　茂太郎（mshige@niid.go.jp）

講演番号：1E2p04
講演日時：3 月 24 日 14:23～ 1 号館 E2 会場

Methanocaldococcus jannaschii 由来の熱安定性制限酵素 Mja I の特徴解析
Characterization of a thermostable restriction enzyme Mja I from *Methanocaldococcus jannaschii*
○青野 未来、志田 敏夫（信大院繊・応生）
○Miku AONO, Toshio SHIDA (Div. Appl. Biol., Grad. Sch. Sci & Tech., Shinshu Univ.)

【目的】
制限酵素は DNA 中の標的配列の認識精度が高く、正確に目的遺伝子を切り出すので、遺伝子組換えに必須のツールとして遺伝子工学の発展に貢献してきた。その特性を利用し DNA の認識・切断メカニズムの解明のためのモデル酵素として研究されており、近年では、ホーミングエンドヌクレアーゼとの融合タンパク質による遺伝子ターゲティングや 5-hmC の高分解能マップのプロファイリングの作成などへの研究に応用されている。
本研究は超好熱性古細菌 *Methanocaldococcus jannaschii* が持つ二本鎖 5’-CTAG-3’を切断する制限酵素 Mja I の生化学的特徴について報告する。すでに多くの制限酵素に関して基礎研究は行われているが、古細菌や好熱菌の制限酵素に関する研究はほとんどあまり行われていない。*M. jannaschii* は超好熱古細菌に分類され、深海の熱水噴出孔という特殊な環境で生育しているため、他の生物にないユニークな特徴を持った酵素を有している可能性がある。好熱菌由来の制限酵素 Mja I の酵素特性を明らかにすると共に、応用的可能性を見出すために、Mja I の活性条件や基質特異性などの特徴付けを行った。
【方法・結果】
発現株 *P. pastoris* :: pPICZα-mja IR を作成し、EDTA と PMSF を含む BMMY 培地で 4 日間培養後、各種クロマトグラフィーを用いて培養上清から Mja I を精製した。*E. coli* Rosetta2 (DE3) を発現宿主に活性残基と予想されるアミノ酸残基を置換した Mja I 変異体（D122N、E158Q、K160Q、D163N、S176A、K178R）を発現させ、精製した。Mja I の標的配列を含む合成 DNA を基質として使用し、^{32}P 標識することで基質の切断率などをモニターした。また、基質特異性について調べるために、標的配列中に揺らぎ塩基対を導入した基質を使用した。Mja I の至適温度は 80℃、至適 pH は 8.0、至適塩濃度は 200 mM である。Mja I は認識配列中の G が I に置換された基質に対して著しい活性の低下を示し、C が U に置換された基質を切断しなかったことから、Mja I は G の 2 位のアミノ基や二本鎖 DNA の歪みを認識することがわかった。Mja I の有用性を検討するために、カイネティック解析、メチル感受性の調査や結晶構造解析のための結晶化スクリーニングを行っている。

restriction enzyme, thermostable protein, hyperthermophilic archaea

発表責任者：志田敏夫（shida@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：1E2p05
講演日時：3 月 24 日 14:34～ 1 号館 E2 会場

黄色ブドウ球菌の *pptB* 産物によるウンデカプレニル二リン酸およびウンデカプレニルリン酸の脱リン酸化

Dephosphorylation of undecaprenyl diphosphate and undecaprenyl phosphate catalyzed by the *pptB* product of *Staphylococcus aureus*.

○川上 直輝、嶋田 圭純、藤田 高彬、藤崎 真吾（東邦大理）
○Naoki KAKWAKAMI, Kasumi SHIMADA, Takaaki FUJITA, Shingo FUJISAKI (Tokyo Univ. of Sci.)

[目的] ウンデカプレニルリン酸（UP）は細菌の細胞壁の合成に必須の物質であり、ウンデカプレニル二リン酸（UPP）の脱リン酸化により生成する。黄色ブドウ球菌や枯草菌などのグラム陽性菌にはウンデカプレノール(UOH)が存在し、UPP の脱リン酸化により生成すると考えられるが、関与する酵素について詳細は不明である。黄色ブドウ球菌ゲノムには UPP ホスファターゼ遺伝子 *bacA* のホモログが 1 個、2 型ホスファチジン酸ホスファターゼ（PAP2）遺伝子ホモログが *pptA, pptB* の 2 個存在する。我々はこれらの遺伝子の UP 代謝への関与を明らかにするため、遺伝子破壊株の作成、遺伝子産物の大腸菌における発現等を行った。本研究では、大腸菌で発現した遺伝子産物 PptB を可溶化、精製し、酵素活性について調べることを目的とした。
[方法] His-tag 融合 PptB を含む膜画分より、タンパク質を 0.5%ドデシルマルトシドにより可溶化して Ni-NTA agarose ゲルカラムクロマトグラフィーにより精製した。0.05%ドデシルマルトシドを含む 250 mM イミダゾールによる溶出画分を透析し、セントリカットウルトラミニ（分画分子量 1 万）を用いて限外濾過により約 1/10 に濃縮し、もとの 1/2 容まで希釈して酵素標品とした。基質の[^{14}C]UPP は、大腸菌の UPP 合成酵素を用いてファルネシル二リン酸と[^{14}C]イソペンテニル二リン酸の反応により合成した。[^{14}C]UP は[^{14}C]UPP をアルカリ処理して作成した。基質を 0.5% TritonX-100 を含む 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH7.5）に懸濁して基質溶液とし、酵素溶液を加えて反応を開始した。反応後薄層クロマトグラフィーで酵素反応液中の基質と反応産物を分離し定量した。
[結果] 精製した酵素標品を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析すると 26 kDa の位置にバンドがみとめられた。精製した PptB は[^{14}C]UPP を[^{14}C]UP に脱リン酸化する活性を示した。[^{14}C]UPP の K_m値は 76.6 μM であった。[^{14}C]UPP を[^{14}C]UP に脱リン酸化する活性は、反応液にカルジオリピン（CL）、ホスファチジン酸(PA)、ホスファチジルグリセロール(PG)を添加すると終濃度 2 mM 添加した場合それぞれ 1.3 倍、8 倍、1.5 倍に増加した。[^{14}C]UP を基質としたとき、反応液中に PG を添加した場合にのみ UOH が生成した。
[考察] 精製した PptB は UPP の脱リン酸化活性、UP の脱リン酸化活性を示した。*pptB* と *bacA* の二重欠損は致死であり、*pptB* 破壊株では UOH 含量が低下するので、*pptB* 産物は *in vivo* においてこれらの反応にかかわっていると考えられる。

undecaprenyl phosphate, lipid phosphatase, Staphylococcus aureus

講演番号：1E2p06
講演日時：3 月 24 日 14:55～ 1 号館 E2 会場

脂肪酸伸長酵素 ELOVL5 のリン酸化による脂肪酸代謝の制御メカニズム
Control mechanism of fatty acid metabolism by phosphorylation of ELOVL5

○市 育代[1]、林 優里[2]、安田 菜美季[2]、藤原 葉子[1] ([1]お茶大・基幹研究院、[2]お茶大院・ライフサイエンス)
○Ikuyo ICHI[1], Yuri HAYASHI[2], Namiki YASUDA[2], Yoko FUJIWARA[1] ([1]Ochanomizu Univ. of Fac. Core Res., [2]Ochanomizu Univ. of Grad. Sch. Life Sci.)

【目的】脂肪酸伸長酵素 ELOVL5 は、多価不飽和脂肪酸（PUFA）の炭素鎖の伸長を行う酵素で、哺乳動物では C18PUFA から C20PUFA の産生を担う唯一の伸長酵素である。一方で、我々は必須脂肪酸欠乏にある細胞において ELOVL5 が一価不飽和脂肪酸であるオレイン酸（18:1n-9）を伸長し、必須脂肪酸欠乏時に増加するミード酸（20:3n-9）の産生に関与することを明らかにしている［BBA, 2014］。そして、必須脂肪酸欠乏細胞に PUFA を添加すると、ELOVL5 の 18:1n-9 に対する伸長活性が消失し、ELOVL5 のリン酸化修飾が生じることを報告してきた。本研究では、細胞内の PUFA 量に依存した ELOVL5 のリン酸化による脂肪酸代謝の制御機構について検討した。

【結果】必須脂肪酸欠乏状態にある NIH3T3 細胞にリン酸化酵素である GSK3 の阻害剤を添加したところ、PUFA 添加時の ELOVL5 のリン酸化修飾が消失した。一方、PKC の阻害剤では ELOVL5 のリン酸化の消失はみられなかったことから、ELOVL5 のリン酸化が GSK3 依存的であることが示された。また、必須脂肪酸欠乏細胞への PUFA 添加では ELOVL5 の 18:1n-9 に対する伸長活性は消失するが、GSK3 阻害剤の存在下ではその活性消失はみられなくなった。したがって、ELOVL5 の 18:1n-9 に対する伸長活性はリン酸化修飾を介している可能性がある。そこで、ELOVL5 のリン酸化部位と予想される C 末端領域の 3 つのアミノ酸（281T, 283S, 285S）を Ala に置換した非リン酸化変異体を作成し、ELOVL5 の 18:1n-9 に対する伸長活性を調べた。すると、非リン酸化変異体を導入した細胞では PUFA 添加による ELOVL5 の 18:1n-9 に対する活性消失はみられなくなった。これらの結果より、必須脂肪酸欠乏時の ELOVL5 はリン酸化を介して 18:1n-9 に対する伸長活性を獲得し、ミード酸が産生されることが示唆された。さらに、この活性制御は C18PUFA 添加ではみられず、C20PUFA に特異的であることもわかった。

以上より、Elovl5 のリン酸化を介した活性制御は、必須脂肪酸欠乏時に C20PUFA のような長鎖脂肪酸の欠乏を補うための機構である可能性が示唆された。

fatty acid, phosphorylation, lipid

発表責任者：市　育代（ichi.ikuyo@ocha.ac.jp）

講演番号：1E2p07
講演日時：3 月 24 日 15:06～ 1 号館 E2 会場

Escherichia coli 由来新規リゾホスファチジン酸アシル基転移酵素 YihG の基質特異性と生理機能解析

Substrate specificity and physiological function of a novel lysophosphatidic acid acyltransferase YihG in *Escherichia coli*

○豊竹 洋佑、川本 純、西山 雅祥、小川 拓哉、栗原 達夫（京大化研）
○Yosuke TOYOTAKE, Jun KAWAMOTO, Masayoshi NISHIYAMA, Takuya OGAWA, Tatsuo KURIHARA (Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.)

細胞膜の主要成分であるリン脂質には、構造の異なる様々なアシル鎖が結合している。多様なアシル鎖組成は、細胞膜の物理的性質を決定づける重要な因子であり、膜タンパク質の構造や機能に影響することや、細胞分裂などの細胞機能に重要な役割を担うことが知られる。このようなアシル鎖の多様性を生み出す主要な酵素がリゾホスファチジン酸アシル基転移酵素(LPAAT)である。LPAAT はリゾホスファチジン酸 *sn*-2 位へのアシル基転位反応を触媒する。*Pseudomonas fluorescens* など、単一細胞内で複数の LPAAT ホモログを有する細菌が報告されており、各 LPAAT ホモログの基質特異性の違いが膜リン脂質のアシル鎖に多様性をもたらすと考えられている。当研究室では、好冷性細菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 が 5 種の LPAAT ホモログ（SlPlsC1-5）を有しており、そのうちの SlPlsC4 は分枝鎖飽和脂肪酸に対する活性が高いことを見出している。SlPlsC4 は *Escherichia coli* の機能未知タンパク質 YihG と 39.1%の相同性を有している。YihG は *Salmonella typhimurium* や *Vibrio cholerae* などでも保存されており、低温環境以外で生息する細菌においても、SlPlsC4 のオーソログがなんらかの生理機能を有していることが予想された。そこで本研究では *E. coli* 由来 YihG の機能解析を行った。

E. coli は SlPlsC1 のオーソログである PlsC をもつが、本酵素遺伝子の温度感受性変異株である JC201 株に YihG 高発現ベクターを導入し、非許容温度における本変異株の生育を調べた。その結果、YihG の高発現によって本株の生育不全が抑制されたことから、YihG が LPAAT 活性を有することが示された。次に、YihG 高発現株と PlsC 高発現株における膜リン脂質 *sn*-2 位のアシル鎖組成を GC-MS で解析した。その結果、YihG 高発現株ではミリスチン酸（14:0）と *cis*-バクセン酸（18:1）の相対量が PlsC 高発現株と比較して有意に高かった。このことから、YihG は 14:0 と 18:1 に対する基質選択性が PlsC よりも高いことが示唆された。また、*yihG* 欠損株における膜リン脂質 *sn*-2 位のアシル鎖組成を GC-MS で解析した結果、18:1 の相対量が野生株と比較して有意に低下していたことから、生理的条件下において YihG は 18:1 をリン脂質に導入するものと考えられた。さらに、顕微鏡を用いて細胞の運動能を詳細に解析すると、運動性をもつ細胞の割合・遊泳速度、どちらも野生株と比べて *yihG* 欠損株の方が著しく高いことが示された。以上から、YihG によって調節される膜リン脂質組成が *E. coli* の運動機能に影響することが示唆された。

Phospholipid biosynthesis, Membrane lipid diversity, Swimming motility

発表責任者：豊竹洋佑（toyotake@mbc.kuicr.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：1E2p08
講演日時：3 月 24 日 15:17～ 1 号館 E2 会場

カルパイン-1 の制御因子としてのカルパイン-2

Calpain-2 regulates protease activity of calpain-1.

○大内 史子[1]、進藤 真由美[2]、秦 勝志[1]、土井 奈穂子[1]、小野 弥子[1]([1]都医学研 カルパイン PJ、[2]都医学研 基盤技術研究センター)
○Fumiko Shinkai-Ouchi[1], Mayumi Shindo[2], Shoji Hata[1], Naoko Doi[1], Yasuko Ono[1] ([1]Calpain PJ, Tokyo Metropolitan Inst. Med .Sci., [2]Center for Basic Technol Res., Tokyo Metropolitan Inst. Med .Sci.)

カルパインは細胞内カルシウム濃度依存的システインプロテアーゼで、基質の特定の位置を切断することで、その活性、安定性、局在などを調節し生理機能を果たしている。カルパイン-1、-2 は、構造や基質特異性が似ている一方で、活性化に必要なカルシウム濃度や自己分解による活性抑制機構には差が認められている。両者の生理的機能は長らく相補的だと考えられてきたが、近年、サブタイプ特異的な機能に着目した研究がすすみ、神経幹細胞においてカルパイン-1 は自己複製、カルパイン-2 はグリアへの分化に関与することや、カルパイン-2 のノックアウトマウスは胎生致死であるのに対しカルパイン-1 のノックアウトマウスはほぼ正常であることが報告された。そこで、本研究では生化学的性質と生理的機能を繋ぐ機構を明らかにすることを目的として、以下の解析を行った。

まず、カルパイン-1、-2 の自己分解物を質量分析器を用いて詳細に解析し、プロテアーゼドメイン内数カ所にカルパイン-2 特異的な自己切断点（以下 CvH）を見いだした。CvH は活性中心を取り囲む溝を裏打ちする分子表面のα-ヘリックスの両端に位置しており、カルシウム結合により分子表面への露出が大きくなると推察された。また、カルパイン-1 とカルパイン-2 のアミノ酸配列の相同性は分子全体で 80%と比較的高いが、CvH に挟まれるα-ヘリックスのアミノ酸配列では 45.4%であった。この領域の配列は種を超えて各サブタイプ内では保存されていた（哺乳類のカルパイン-1，-2 それぞれの相同性は 70%程度)。

次に、CvH における切断がカルパイン-2 の基質としての性質に依存するのか、あるいは酵素としての基質認識の差によるのかを、活性中心に変異を導入したプロテアーゼ活性欠失型（CS 型）のカルパインを用いて検討した。その結果、CS 型カルパイン-2 の CvH はカルパイン-1 により切断されなかったが、CS 型カルパイン-1 の CvH に相当する部位はカルパイン-2 により切断された。この結果は、カルパイン-1、-2 の基質特異性の差を示すと共に、カルパイン-2 がカルパイン-1 の活性を抑制的に調節する可能性を示している。そこで、カルパイン-1 選択的な蛍光基質を用いてカルパイン-1 の活性を測定したところ、カルパイン-2 共存下ではカルパイン-1 の活性は抑制された。

以上より、カルパイン-2 はカルパイン-1 をプロテアーゼドメイン内で切断することでその活性を抑制的に調節する独自の機能を持つことが示唆された。つまり、カルパイン-2 の機能欠失は自身の活性欠失に加えてカルパイン-1 の活性制御不全をきたすことで細胞機能の異常を引き起こす可能性があると考えられる。

Calpain, substrate specificity, protease

講演番号：1E2p09
講演日時：3 月 24 日 15:28～ 1 号館 E2 会場

ナメコ子実体でチロシナーゼを活性化する金属プロテアーゼ
A metalloprotease activates tyrosinase in Pholiota nameko

○小西 康子[1,2]、老泉 琴乃[2]、笹木 哲也[3] ([1]東京家政大、[2]石川県大、[3]石川県工試)
○Yasuko Konishi[1,2], Kotono Oizumi[2], Tetsuya Sasaki[3] ([1]Tokyo-Kasei Univ., [2]Ishikawa Pref. Univ., [3]Industrial Res. Inst. Ishikawa)

【諸言】菌類のチロシナーゼは不活性な前駆体（プロチロシナーゼ）として発現し、C 末端側がプロセッシングを受けて切断除去されることにより活性型となることが知られているが、活性化に関与する特異的プロテアーゼは明らかになっていない。食用キノコであるナメコに含まれるプロチロシナーゼ（67 kDa）は、Phe 387 で切断されて C 末端側（25 kDa）が除去されることにより活性化された成熟体チロシナーゼ（42 kDa）となることが分かっている。我々は、ナメコ子実体には亜鉛を有し EDTA で強く阻害される 29 kDa のプロテアーゼが存在し、この酵素は大腸菌発現系を用いて調製された不活性な組換えチロシナーゼ前駆体（チオレドキシンとの融合タンパク質：84 kDa）を活性化することを見出した。本研究では、本酵素がプロチロシナーゼの活性化に関わるプロテアーゼであるかを明らかにするため、基質特異性について検討した。

【方法】プロテアーゼは、ナメコ子実体を破砕後、硫安沈殿、疎水性カラムおよびイオン交換カラムを用いて精製した。活性は、アゾカゼインを基質として 50 mM リン酸緩衝液（pH 8.0）中、37℃で 1 時間反応させ、TCA 添加後の遠心上清について 405 nm の吸光度を測定して求めた。基質特異性の検討には、7 種類の合成基質（Bz-Tyr-pNA、Bz-L-Arg-pNA、Ala-pNA、Glu-pNA、Leu-pNA、Phe-MCA、Lys-MCA）と、成熟体チロシナーゼの C 末端配列（Gly383-Phe387）に pNA を結合させたペプチド基質 （GASVF-pNA）を使用した。活性は吸光度の増加で測定した。プロチロシナーゼの C 末端切断箇所付近の配列（Gly383-Ala392）を含む合成ペプチド（Ac-GASVFSGFAA-NH_2）を基質として、反応時間ごとに分取したサンプルを LC/MS により分析した。

【結果・考察】7 種類の合成基質に対する活性は、Leu-pNA と GASVF-pNA でのみ認められ、Phe-MCA では検出されなかった。反応初速度は、Leu-pNA よりも GASVF-pNA の方が約 8 倍速かった。Ac-GASVFSGFAA-NH_2 を基質として分解反応のタイムコースを調べたところ、まず Ac-GASVFSGF へと分解され、さらにこれが Ac-GASVF へと分解されていたが、それ以上の分解はなかった。以上の結果から、本酵素はアミノ酸配列中の Phe を認識してその C 末端側を切断するプロテアーゼで、ナメコ子実体中ではプロチロシナーゼを Phe 340 および Phe 387 で切断し、チロシナーゼを活性化する酵素であると考えられる。

protease, tyrosinase, activation

発表責任者：小西康子（konishi-y@tokyo-kasei.ac.jp）

講演番号：1E2p10
講演日時：3 月 24 日 15:39～ 1 号館 E2 会場

白癬菌 *Trichophyton mentagrophytes* 由来メタロプロテアーゼ 4 の性状解析
Characterization of metalloproteinase 4 from *Trichophyton mentagrophytes*
○古川 那由太[1]、梅田 菜摘[1]、風間 愛[1]、高橋 佑果[1]、鈴木 まゆみ[1]、小瀬 知洋[1]、山田 剛[2]、井深 章子[1] ([1]新潟薬大応生科、[2]帝京大医真菌研)
○ Nayuta FURUKAWA[1], Natsumi UMEDA[1], Ai KAZAMA[1], Yuka TAKAHASHI[1], Mayumi SUZUKI[1], Tomohiro KOSE[1], Tsuyoshi YAMADA[2], Akiko IBUKA[1] ([1]NUPALS, [2]TIMM)

［目的］
白癬菌は白癬(水虫)の原因となる真菌で、毛や角質の主成分である難分解性線維状タンパク質ケラチンを分解して炭素源・窒素源・エネルギー源にする特徴がある。ケラチン分解には種々の分泌型プロテアーゼ（ケラチナーゼ）が関与しているが、詳細な分子メカニズムは未だ明らかになっていない。白癬菌のゲノム上には 5 種類のメタロプロテアーゼ (MEP)遺伝子が存在するが、中でも本研究で着目した MEP4 は白癬菌 *Trichophyton mentagrophytes* において病原性への関与が指摘されており、ヒトの白癬の原因菌の大半を占める白癬菌 *Trichophyton rubrum* において MEP4 遺伝子の発現量はケラチン存在下で 15 倍増加することが報告されている。したがって MEP4 がケラチン分解の主要なプロテアーゼである可能性が高い。そこで本研究では、*T. mentagrophytes* 由来組換え型 MEP4 (TmMEP4)の性状解析を行い、本酵素の生理的役割を明らかにすることを目的とした。
［方法・結果］
TmMEP4 の安定性および活性の pH と温度の依存性を調べた結果、本酵素は pH 6.5 から 9.0 および 20℃以下で安定に存在し、至適 pH は 7 以上、至適温度は 50°C だった。TmMEP4 の性状に対する金属イオンの影響を調べたところ、0.1 mM $CaCl_2$ 存在下で TmMEP4 の温度安定性が向上し、亜鉛イオン存在下で活性が阻害されることが判明した。誘導結合プラズマ質量分析を行った結果、1 分子の TmMEP4 あたり 1 つ亜鉛イオンが結合していることが示唆された。ケラチンに対する活性を調べたところ、TmMEP4 は不溶性であるケラチンアズールに対して低い活性を示し、可溶性である粉末ケラチンに対して高い活性を示した。白癬菌はケラチナーゼの他に亜硫酸イオンを分泌してケラチンを還元・変性させなければケラチンを十分に分解できずに増殖が抑制される。TmMEP4 のケラチンに対する活性は白癬菌のケラチナーゼの特徴と一致している。酸化型インスリン B 鎖を用いて認識配列を調べた結果、TmMEP4 はロイシン残基の N 末端側を好んで切断した。ケラチンのロッドドメインにはロイシンが豊富に含まれているが、強力な疎水性相互作用を形成しているため TmMEP4 はロイシン残基に接近できない。ケラチンが変性するとロイシン残基が水に露出するため、TmMEP4 はロイシン残基に容易に接近できるようになり、結果として変性ケラチンに対して高い活性を示したと考えられる。以上のことから TmMEP4 はアルカリ好性亜鉛要求性ケラチナーゼであると示唆される。

Trichophyton mentagrophytes, Metalloproteinase, Keratinase

発表責任者：古川那由太（furukawa@nupals.ac.jp）

講演番号：1E2p11
講演日時：3 月 24 日 16:00～ 1 号館 E2 会場

キノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素の活性中心サブユニット生合成に関与するセリンプロテアーゼの機能解析

Functional analysis of serine proteinase involved in biosynthesis of active-site subunit of quinohemoprotein amine dehydrogenase

○大関 俊範[1]、中井 忠志[2]、谷澤 克行[1]、岡島 俊英[1]([1]阪大　産業科学研究所、[2]広島工大　生命)
○Toshinori OOZEKI[1], Tadashi Nakai[2], Katsuyuki Tanizawa[1], Toshihide Okajima[1] ([1]Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University, [2]Department of Food Sciences and Biotechnology, Faculty of Life Sciences , Hiroshima Institute of Technology)

キノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素(QHNDH)は、各種のグラム陰性細菌において一級アミン類の酸化的脱アミノ反応を触媒するヘテロ三量体酵素である。活性中心を形成する 9 kDa のサブユニット QhpC には、キノン補酵素システイントリプトフィルキノン(CTQ)を含む 2 種類のユニークな翻訳後修飾構造が存在し、3 つの修飾酵素が関与する多段階ステップによって生合成される。これまでの解析の結果、まず、細胞質内でラジカル SAM 酵素 QhpD が Asp/Glu 残基と Cys 残基との間に 3 ヶ所の分子内チオエーテル架橋を形成し、次に FAD 依存性水酸化酵素 QhpG が前駆体 Trp 残基のインドール環を水酸化し、CTQ 形成の初発反応を行うと考えている。その後、QhpD との相互作用に必要であった QhpC の N 末端 28 残基のリーダーペプチドは、サブチリシン様セリンペプチダーゼ QhpE によって除去される。このような多段階の QhpC の生合成反応がどのように制御されているのか解明することが本研究の目的である。今回の発表では、*Pseudomonas putida* QhpE を用いて QhpC に対する反応性を解析した。*Ps. putida* に関しては、QhpC およびその翻訳後修飾に関わる修飾酵素 QhpD、 QhpG、QhpE すべてで、大腸菌発現系を用いた調製に成功しており、それらを用いた反応解析が可能である。架橋形成された QhpC に関しては、QhpD と共発現させ、試験管内反応によって調製することができた。

まず、QhpE と QhpC を混合し、終夜反応物を MALDI-TOF-MS 解析したところ、QhpC の架橋形成の有無に関わらず、リーダーペプチドが切断されることがわかった。さらに、C_{18} カラムを用いた逆相 HPLC 分析によって、リーダーペプチドの解離の時間経過を観測したところ、架橋 QhpC では未架橋 QhpC に比べて、QhpE に対する反応速度が大幅に上昇していることがわかった。QhpE と QhpC の複合体形成能を調べるため、両者を混合し Native PAGE を行ったところ、未架橋 QhpC では複合体のバンドが観察されたのに対して、架橋 QhpC では、そのバンドを確認することができなかった、おそらく、QhpE がリーダーペプチドを切断し、架橋 QhpC が解離したためであると考えられた。活性中心 Ser 残基を破壊した QhpE 変異体(S180A)では、同様の解析で架橋 QhpC との間に強い相互作用が観測された。この結果は、HPLC による反応解析の結果と合致している。すなわち、QhpE は QhpC の架橋形成構造を認識し、その活性が制御されていることが判明した。QhpC の架橋形成と CTQ 形成初発反応にはリーダーペプチドを必要とするため、このような QhpE の反応性は、翻訳されたばかりの未架橋 QhpC のリーダーペプチドが素早く切断されるのを防ぐことに役立っていることが示唆された。

serine protease, post-translational modification, leader peptide

発表責任者：大関　俊範（toshinori-oozeki44@sanken.osaka-u.ac.jp）

講演番号：1E2p12
講演日時：3 月 24 日 16:11～ 1 号館 E2 会場

Stenotrophomonas maltophilia 由来 Dipeptidyl peptidase 7 の基質 P2 認識機構の解析
Analysis of substrate recognition mechanisms at the P2 position of Dipeptidyl peptidase 7 from *Stenotrophomonas maltophilia*

○中村 彰宏[1]、橋口 太一[1]、本間 宣行[1]、鈴木 義之[1]、阪本 泰光[2]、田中 信忠[3]、小笠原 渉[1]([1]長岡技科大、[2]岩手医科大、[3]昭和大)
○Akihiro NAKAMURA[1], TAICHI HASHIGUCHI[1], Nobuyuki HONMA[1], Yoshiyuki SUZUKI[1], Yasumitsu SAKAMOTO[2], Nobutada TANAKA[3], Wataru OGASAWARA[1] ([1]Nagaoka Univ. of Tech., [2]Iwate Med. Univ., [3]Showa Univ.)

Family-S46 ペプチダーゼ(S46)は真正細菌のみが持つ、ペプチドの N 末からジペプチドを遊離するエキソ活性を示す Dipeptidyl peptidase (DPP)である。S46 には DPP7 と DPP11 が含まれ、ペリプラズム空間において協調して、オリゴペプチドの資化を担う。タンパク質のみをエネルギー源とする糖非発酵性グラム陰性細菌(NF-GNB)では、S46 を破壊すると生育が低下することが示されており、S46 は NF-GNB の生育に重要である(JBC 289, 5436 (2014))。また、ヒトは S46 を持たないため、S46 は NF-GNB 特異的抗菌薬の標的分子として利用可能である。多剤耐性日和見感染菌として脅威とされる *Stenotrophomonas maltophilia* (SM)は 2 つの S46 を持つ NF-GNB であり、SM が起因する肺炎や菌血症での死亡率は 5～7 割に達するため、新規作用機序を有する抗菌薬の開発が望まれている。

これまでに DPP7 および DPP11 は基質 P1 特異性が大きく異なる一方で、基質 P2 特異性は疎水性残基に特異的であることが示唆されている(FEBS Open Bio 177, 2211 (2013))。加えて、S46 において S2 サブサイト構成残基は高度に保存されている。しかし、S2 サブサイトにおける分子認識機構の詳細は不明である。本研究では S46 による基質 P2 特異性の分子基盤を解明するため、SM 由来 DPP7(SmDPP7)の基質 P2 認識機構の解析を実施した。

我々は最初にジペプチドライブラリーを用いた基質との競合阻害試験を行うことで、S46 の基質 P2 特異性を解析した。その結果、既報の通りに SmDPP7 は基質 P2 の疎水性残基に特異的であることが示された。興味深いことに、SmDPP7 は疎水性度とは関係なく、基質 P2 の Asn に対し特異性を持つことを新たに発見した。現在、他の S46 における基質 P2 の Asn 特異性の生化学的解析および P2-Asn のジペプチドとの共結晶構造の取得を試みている。

さらに、我々は SmDPP7 のアポ体の結晶構造およびジペプチドとの共結晶構造を高分解能(最大 1.88 Å)で解析に成功し、S2 サブサイト残基を同定した。共結晶構造解析は S2 サブサイトの Lys206 残基が基質 P2 残基の固定を担うことを示唆した。実際に基質固定に関与しているか実証するため、Lys206 を含む S2 サブサイトの 4 残基について、部位特異的変異解析を実施した。その結果、K206A および T220A 変異体は予想に反し、親和性、活性に顕著な変化はなかった。一方で、Phe671 変異体は親和性が顕著に低下した。これは既報の結果と一致し、基質認識への関与が示唆された。また、R218A 変異体は非活性体で発現した。Arg218 は基質 N 末認識残基の側鎖の固定に関与しているため、変異体では活性を示さないと考えられる。

DPP, S46 peptidase, substrate recognition

発表責任者：中村彰宏（s131073@stn.nagaokaut.ac.jp）

講演番号：1E2p13
講演日時：3 月 24 日 16:22～ 1 号館 E2 会場

超好熱古細菌 *Aeropyrum camini* 由来セリンプロテアーゼの生化学的特徴解析
Biochemical characterization of a thermostable serine protease from *Aeropyrum camini*
○内海 雄太、志田 敏夫（信大院繊・応生）
○Yuta UTSUMI, Toshio SHIDA (Div. Appl. Biol., Grad. Sch. Sci & Tech., Shinshu Univ.)

【目的】
プロテアーゼはタンパク質のペプチド結合を加水分解する酵素であり、活性アミノ酸残基の種類により複数のファミリーに分類されている。特にセリンプロテアーゼは幅広い産業に利用されていて、洗剤産業においてはその重要度が高い。プロテアーゼを利用する場合、酵素の安定性が高いことは重要な要素である。長時間にわたり失活することなく活性が維持され、界面活性剤などの薬剤存在下でも活性を失わなければ、生産性の向上につながる。このような性質を持った酵素を獲得する上で、高い安定性を有する酵素の供給源として、深海熱水噴出孔といった高温度地域に生息する極限環境微生物が注目されている。
本研究では超好熱性古細菌 *Aeropyrum camini* の遺伝子にコードされているセリンプロテアーゼの遺伝子をクローニングし、大腸菌で大量発現させた酵素 ACSP（*A. camini Serine Protease*）の諸性質について報告する。*A. camini* は至適生育温度が 85℃の超好熱古細菌であり、70-97℃の高温度帯で増殖が可能な古細菌である。好熱菌由来のプロテアーゼの報告はあるものの、超好熱古細菌由来の耐熱性プロテアーゼに関する報告例は少ない。極限環境下での酵素活性・安定性の解明と応用に向けて、ACSP の至適反応条件や安定性について評価した。

【方法・結果】
プロドメイン領域を N 末端に持つ proACSP をコードする遺伝子を増幅し、大腸菌発現用ベクターに挿入した。大量発現させたところ、封入体を形成したため、尿素で可溶化した。得られた可溶化サンプルを精製し、段階透析法による尿素の除去と活性化を経て、活性体 Mat-ACSP を得た。
リゾチームを基質とした活性測定では、ACSP の至適温度は 80℃、至適 pH は pH 9.0 であった。70-100℃にかけての高温条件下で高い活性を示した。界面活性剤 SDS の添加で活性は最大 2.3 倍に向上した。幾つかの二価金属イオンは活性を向上させ、特に Ca^{2+}は濃度増加に伴い、活性が最大 2.8 倍上昇した。Ca^{2+}イオンなどによる熱安定性獲得と活性向上の要因を解明するため、実験を進めている。

hyperthermophilic archaea, serine protease, thermostable protein

発表責任者：志田敏夫（shida@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：1E3a01
講演日時：3 月 24 日 09:00～ 1 号館 E3 会場

脳梗塞患者の全血を用いた脳梗塞バイオマーカーmiRNA の探索

Exploring the microRNAs as ischemic stroke biomarkers from the whole blood of patients with cerebral infarction

○田中 まゆひ[1]、阿部 新[2]、斎藤 芳和[3]、安岡 顕人[3]、阿部 啓子[3,4]、朝倉 富子[3]([1]東大農、[2]多摩総合医療センター、[3]東大院・農生科、[4]KISTEC)
○Mayui TANAKA[1], Arata ABE[2], Yoshikazu SAITO[3], Akihito YASUOKA[3], Keiko ABE[3,4], Tomiko ASAKURA[3] ([1]Fac. of Agric., The Univ. of Tokyo, [2]Tama Medical Center, [3]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., The Univ. of Tokyo, [4]KISTEC)

［背景・目的］
脳梗塞は高致死率であり、身体麻痺、記憶障害などの後遺症をもたらす重篤な疾患の一つであり、患者数や関連死者数は年々増加している。日本においては、脳梗塞を含む脳血管疾患の死亡率は減少してきたが、今なお死因の第 4 位に位置し、脳梗塞はその 57%を占める。高齢化に伴う医療費・介護費の増大を背景にして脳梗塞の予防や後遺症を軽微に抑えることが急務となっており、脳梗塞の予防・予後状態改善のために、脳梗塞特異的なバイオマーカーの活用が期待されている。求められる特性としては、高い感度と特異性、発症直後より安定した発現などが挙げられる。また測定が定量的に出来ること、迅速で低コストであることも重要な要素である。脳梗塞のバイオマーカーに関わる研究は盛んに行われているものの、実用化まで辿り着くものは少ない。近年がんのバイオマーカーとして、血中に安定して存在する microRNA（miRNA）が注目されており、実用化に向けた臨床試験も行われている。
本研究では、ヒトにおいて脳梗塞によって生じる全血中の miRNA の発現変動を観察し、血中バイオマーカーとして脳梗塞特異的に発現変動する miRNA を探索することを目的とした。
［方法・結果］
日本医科大学武蔵小杉病院にて脳梗塞の患者と脳梗塞でない患者から採血を行い、さらに一部の脳梗塞患者については来院直後に加え、治療後にも採血を行った、それぞれ脳梗塞群と非脳梗塞群、治療群のサンプルとした。全血から total RNA を抽出し、miRNA のマイクロアレイ解析を行った。脳梗塞発症後の経過日数・重症度・脳梗塞の種類等で脳梗塞群を細分化し、脳梗塞群・非脳梗塞群で性別・年齢がなるべく揃うように群分けをした。各項目別に脳梗塞群と非脳梗塞群の 2 群間比較により p-value < 0.05 かつ|Fold Change| ≧ 1.5 を満たす miRNA を有意に発現変動したものとして抽出した。さらに治療群についても、脳梗塞群との二群間比較により p-value < 0.01 かつ|Fold Change| ≧ 1.5 を満たす miRNA を有意に発現変動したものとして抽出した。その結果、脳梗塞特異的と思われる miRNA がいくつか抽出された。
［謝辞］
本研究は、総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」によって実施されました。

stroke, miRNA, biomarker

講演番号：1E3a02
講演日時：3 月 24 日 09:11～ 1 号館 E3 会場

高脂肪食給餌マウスのエネルギー代謝に関する研究

Studies on energy metabolism in high-fat diet fed mice

○世良 悠夏[1]、児山 有希[2]、渡邊 美優[2]、三浦 徳[1]、増澤(尾﨑) 依[2]、細野 崇[1,2]、関 泰一郎[1,2] ([1]日大院・生資科・応生科、[2]日大・生資科・生命化)
○Yuuka Sera[1], Yuki Koyama[2], Miyu Watanabe[2], Atushi Miura[1], Yori Ozaki-Masuzawa[2], Takashi Hosono[1,2], Taiichiro Seki[1,2] ([1]Nihon Univ. Grad.School of Bioresouce Sci., [2]Nihon Univ. Coll Bioresouce Sci.)

＜背景＞　肥満は摂取エネルギーが消費エネルギーを上回ることが原因である。しかしながら、マウスに高脂肪食を自由に摂取させると通常食を自由に摂取させたマウスと摂取エネルギーがほぼ等しいにもかかわらず、体重の増加が認められる。本研究では、高脂肪食摂取により消費エネルギーが低下した結果、肥満になるのではないかと考え、高脂肪食による肥満誘導のメカニズムを明らかにすることを目的として研究を実施した。
＜方法＞　C57BL/6J マウスを通常食 (CRF-1, オリエンタル酵母社製、脂質 13.6 kcal%)を与える通常食群、あるいは高脂肪食 (D12492, リサーチダイエット社製、脂質 60 kcal%)を与える高脂肪食群の 2 群に群分けした。マウスの呼吸代謝をエネルギー代謝測定装置 (Oxymax 等流量システム、コロンバス社製)、自発運動量をビームセンサー式運動量測定装置 (LOCOMO, メルクエスト社製)を用いて測定した。また、糞中の炭素含有量を燃焼法による元素分析装置（スミグラフ、住友化学分析センター社製）を用いて測定した。
＜結果＞　高脂肪食給餌マウスは通常食給餌マウスと比較して、摂取エネルギーが同等にもかかわらず体重が増加した。本試験開始直後の呼吸代謝を測定した結果、高脂肪食給餌マウスは通常食給餌マウスと比較して、エネルギー消費の指標である酸素消費量 (VO_2)は明期、暗期ともに高い値を示した。このときの自発運動量は両群で差が認められなかった。さらに本試験開始 8 週間後の呼吸代謝を測定した結果においても、高脂肪食給餌マウスは通常食給餌マウスと比較して VO_2 は高い値を示した。体重と VO_2 の関係をプロットすると、正の相関が認められたことから、VO_2 は体重に依存していることが明らかとなった。一方、高脂肪食給餌マウスでは通常食給餌マウスと比べて糞の排出量の低下が認められた。さらに糞中の炭素含有量を測定した結果、高脂肪食給餌マウスの糞中の炭素排出量が少ないことか明らかとなった。
＜結語＞ 高脂肪食給餌マウスは通常食給餌マウスと比べてエネルギー消費量を低下させないこと、飼料の吸収効率が高いために摂取エネルギーが同等でも肥満となることが示唆された。

obesity, energy metabolism, high fat diet

発表責任者：関　泰一郎（tseki@brs.nihon-u.ac.jp）

講演番号：1E3a03
講演日時：3 月 24 日 09:22～ 1 号館 E3 会場

父親の肥満と母親の妊娠期栄養制限がマウス次世代の糖・脂質代謝に及ぼす影響

Effect of paternal obesity and maternal nutritional restriction during gestation on glucose and lipid metabolism of mice offspring

○石井 彩香、平井 静、中村 絵里、小澤 彩花、江頭 祐嘉合（千葉大院・園芸・応生化）
○Ayaka ISHII, Shizuka HIRAI, Eri NAKAMURA, Ayaka OZAWA, Yukari EGASHIRA (Chiba Univ. of Horticulture)

【目的】
妊娠期の摂取総エネルギー制限やたんぱく質制限による低栄養状態は、次世代において糖・脂質代謝異常を引き起こすことが報告されている。これまで、当研究室では、摂取エネルギーの主体である糖質に着目し、マウスを用いて妊娠期の糖質制限が出生仔の糖・脂質代謝に及ぼす影響を検討してきた。その結果、マウス妊娠期の総エネルギー制限が出生仔の糖・脂質代謝異常を増悪化する一方、糖質制限では糖代謝の改善傾向が認められることが示された。本研究では、現在の日本において、女性では痩せの割合が増加している一方、男性では肥満者の割合が高いことを考慮し、父親の肥満と母親の妊娠期低栄養が出生仔の糖・脂質代謝に及ぼす影響を検討した。
【方法】
Ｃ５７ＢＬ／６Ｊ雄マウスを、普通食を給餌するＮｏｒｍａｌ　ｄｉｅｔ（ＮＤ）群、６０％ｋｃａｌ高脂肪食を給餌するＨｉｇｈ　ｆａｔ　ｄｉｅｔ（ＨＦＤ）群に分け１３週間飼育し、雌マウスと交配させた。妊娠後期から、ＮＤ群と交配させた雌マウスには普通食を与えＮｏｒｍａｌ（Ｎ）群とし、ＨＦＤ群と交配させた雌マウスは普通食を給餌するＣｏｎｔｒｏｌ（Ｃ）群、摂食量を４０％制限するＲｅｓｔｒｉｃｔｉｏｎ（Ｒ）群、糖質のみを減らし４０％エネルギー制限を行うＣａｒｂｏｈｙｄｒａｔｅ　ｒｅｓｔｒｉｃｔｉｏｎ（ＣＨＲ）群に分け出産させた。成獣した仔に高脂肪食を１６週間給餌し、経口糖負荷試験の後に解剖を行った。
【結果】
肥満の雄マウスでは、交配成功率および交配した雌マウスの腹仔数が減少し、生殖能力の低下が示唆された。Ｒ、ＣＨＲ群の仔は低体重で出生したが、生後に通常の栄養を摂取することで追いつき成長した。またＣＨＲ群は成獣期の高脂肪食負荷による体重増加が抑制された。経口糖負荷試験において、血糖値はＣＨＲ群で低値を示し、インスリン濃度はＲ、ＣＨＲ群ともに低値を示した。膵臓重量はＲ群で低下したがＣＨＲ群はＮ、Ｃ群と同程度であった。膵臓のインスリン免疫組織化学染色を行ったところ、Ｒ群では膵島数の減少により膵島総面積が低下傾向にあった一方、ＣＨＲ群では膵島の発達に影響は認められなかった。また、Ｃ、Ｒ群の内臓脂肪組織では大型の脂肪細胞が増加した一方、ＣＨＲ群では脂肪細胞の小型化が認められた。以上より、Ｒ群では膵臓の発達不全によるインスリン分泌能低下、ＣＨＲ群では脂肪細胞の小型化によるインスリン感受性向上の可能性が見出された。

maternal nutritional restriction, carbohydrate restriction, paternal obesity

講演番号：1E3a04
講演日時：3 月 24 日 09:33～ 1 号館 E3 会場

MIG12 による ACC 活性化機構の解析
The activation of Acetyl-CoA carboxylase by MIG12
○平口 遥香[1]、小林 里奈[2]、鈴木 司[2]、山本 祐司[2]、清水 誠[1]、佐藤 隆一郎[1]、井上 順[2] ([1]東大院・農生科・応生化、[2]東農大・応生・農化)
○Haruka HIRAGUCHI[1], Rina KOBAYASHI[2], Tsukasa SUZUKI[2], Yuji YAMAMOTO[2], Makoto SHIMIZU[1], Ryuichiro SATO[1], Jun INOUE[2] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Tokyo Univ. Agric.)

【背景と目的】LXR (Liver X Receptor)は脂質代謝関連遺伝子の転写制御に関わる核内受容体である。我々は LXR の新規標的遺伝子として MIG12 を同定し、MIG12 が脂肪酸・トリグリセリド合成に関与することを示してきた[1)]。MIG12 は脂肪酸合成の律速酵素である ACC (Acetyl-CoA Carboxylase)のポリマー化を亢進することにより ACC を活性化し、脂肪酸合成を上昇させる。しかし、近年 ACC のポリマーには活性型と不活性型があることが報告されており[2)]、MIG12 によって形成が促進されるポリマーがどちらであるのかは明らかになっていない。そこで今回我々は MIG12 が ACC 活性に与える影響を確かめることを目的として研究を行なった。
【方法】ACC の酵素活性を測定するため、HEK293 細胞に MIG12-RGS-His をトランスフェクションし、細胞を回収した。タンパク質サンプルに、基質である $KHCO_3$ や反応に必要な NADH, ATP などを含む反応溶液を添加し、37℃、340nm の吸光の減少を測定した。
また、HEK293 細胞に C 末端に 3×Flag タグを付加した ACC-3Flag と C 末端に RGS-His タグを付加した MIG12-RGS-His を同時にトランスフェクションし、細胞を回収した。タンパク質サンプルを Western blot に供し、pACC (Ser80)抗体を用いて ACC Ser80 のリン酸化レベルを検証した。
【結果と考察】HEK293 細胞に MIG12 を過剰発現させ ACC 酵素活性を測定した結果、MIG12 存在下では ACC 活性が上昇することが示された。ACC は 5 つのドメインから構成されるタンパク質であり、我々はこれまで、MIG12 は ACC の BT ドメイン(656-781aa)に結合し、BT ドメインを欠失した ACC は MIG12 によるポリマー化亢進が減弱することを明らかにしてきた。ACC ポリマーには活性型と非活性型があり、活性型ポリマーの形成には Ser80 の脱リン酸化が重要である。このことから、MIG12 が ACC に結合することで Ser80 のリン酸化レベルが変動すると予想し、Western blot にて ACC Ser80 リン酸化抗体で検出を行った。その結果、MIG12 強制発現下では Ser80 のリン酸化レベルが低下することが示された。以上のことから、MIG12 は ACC に結合することで ACC Ser80 のリン酸化レベルを低下させ、ACC の活性型ポリマーの形成を促進させる可能性が考えられる。今後は、MIG12 による内因性の ACC Ser80 のリン酸化レベルの変動や、BT ドメインを欠失した ACC の活性を検証していく予定である。

1) J. Inoue et al. *Mol.Endocrinol.* **25**. 995-1005 (2011)
2) Hunkeler M et al. *Nature*. **558**. 470-474. (2018)

MIG12, ACC, LXR

発表責任者：井上順（ji206785@nodai.ac.jp）

講演番号：1E3a05
講演日時：3 月 24 日 09:44～ 1 号館 E3 会場

ACC 活性化因子 MIG12 の新規結合タンパク質の同定
Identification of novel binding protein of MIG12

○小林 里奈[1]、平口 遥香[2]、菊地 瑛登[1]、高橋 舜[1]、鈴木 司[1,3]、山本 祐司[1,3]、井上 順[1,3]（[1]東農大・応生・生応、[2]東大院・農生科・応生化、[3]東農大・応生・農化）
○Rina KOBAYASHI[1], Haruka HIRAGUCHI[2], Akito KIKUCHI[1], Shun TAKAHASHI[1], Tsukasa SUZUKI[1,3], Yuji YAMAMOTO[1,3], Jun INOUE[1,3] ([1]Tokyo Univ. of Agric., [2]The Univ. of Tokyo., [3]Tokyo Univ. of Agric. Dept. of Agric. Chem.)

【背景と目的】
これまでに我々は、MIG12 が脂肪酸合成の律速酵素 ACC のポリマー化を亢進することでその酵素活性を上昇させ、脂肪酸合成・TG 合成を正に制御していることを明らかにしてきた。本研究では MIG12 による脂質合成制御の理解を深めることを目的とし、また MIG12 が持つ新たな機能の解析に向けて、MIG12 の新規結合因子の同定・解析を行った。

【方法】
結合因子同定のため、C 末端に Flag タグを付加したヒト MIG12(以降、hMIG12-3FL と示す)をヒト肝がん由来 HepG2 細胞にレンチベクターウイルスを用いて安定発現させた。FLAG 抗体を用いて hMIG12-3FL の免疫沈降を行い、MIG12 と共沈降したタンパク質を質量分析で解析した。複数のタンパク質の中から、ATP citrate lyase(ACL)に注目した。次に ACL と MIG12 が実際に結合していることを確認するために、MIG12 と ACL を過剰発現させてその結合を検証した。N 末端に RGS-His タグを付加した ACL（以降、His-ACL と示す）を発現するプラスミドを作製し、hMIG12-3FL と共にヒト胎児腎臓由来 HEK293T 細胞に導入した。回収したタンパク質を FLAG 抗体で免疫沈降を行い、SDS-PAGE に供した後に RGS-His 抗体で検出した。続いて ACL と MIG12 の結合部位を探索するため、ACL の deletion construct を作製し、上記と同様の検証を行った。また、ACL が ACC ポリマーに含まれているのか検証を行った。HepG2 細胞へ hMIG12-3FL と His-ACL を片方のみ、もしくは同時に導入し、細胞を回収した。得られたタンパク質を BN-PAGE に供した後に RGS-His 抗体と ACL 抗体で検出した。

【結果と考察】
MIG12 の新たな結合因子として Ubiquitin Specific processing Protease 7 (USP7)や ATP-dependent RNA helicase など様々なタンパク質が検出された。その中から今回我々は ACL に注目した。ACL は TCA サイクルから供給されたクエン酸をアセチル CoA に変換する酵素であり、アセチル CoA は ACC の基質となる。ACL と MIG12 が実際に結合しているかを免疫沈降法で検証したところ、両者の結合が示された。ACL の MIG12 結合部位については現在解析中である。また、MIG12 と結合している ACL が MIG12 同様に ACC ポリマーに含まれているか検証を行ったところ、ACL はポリマー化 ACC ではなく二量体 ACC に含まれることが示唆された。ACL は糖代謝と脂質合成を結ぶ重要な酵素であり、MIG12 と ACL が結合することは脂肪酸合成において何らかの生理的意義があると考えられるが、現段階ではその詳細は不明である。今後は ACL が ACC のポリマー化に関与している可能性もふまえ、さらなる検討をしていく予定である。

ACL, ACC, Fatty acid

発表責任者：井上順（ji206785@nodai.ac.jp）

講演番号：1E3a06
講演日時：3 月 24 日 10:05～ 1 号館 E3 会場

毛髪及び体毛の物性・代謝解析
Analysis of physical property and metabolism in hair
○塚本 楓[1]、坂田 研二[2]、菊地 淳[1,2,3] ([1]横市院・生命医、[2]理研・環境資源、[3]名大院・生命農)
○Kaede TSUKAMOTO[1], Kenji SAKATA[2], Jun KIKUCHI[1,2,3] ([1]Yokohama City Univ., [2]RIKEN CSRS, [3]Nagoya Univ.)

【背景・目的】ヒトを含む動物の健康状態を解析し得る生体試料には血液[1]、唾液[2]、尿[3]、糞便[4-7]等があるが、前述の生体試料は概日リズムの影響を大きく受け[8]、また採取後においても劣化防止が必要である。一方、このような代謝変動等の為に管理や保管に留意すべき生体試料に比べ、体毛は簡便にサンプリングが可能で、劣化しにくい特徴を有する。この体毛から有用な生体情報を抽出可能であれば、食の品質評価・疾患の早期発見等への展開が期待出来る。現在、NMR を用いた毛髪や体毛の代謝プロファイルに関する報告がないことから、本研究では溶液 NMR(700 MHz)、固体 NMR(500 MHz)、卓上 NMR(60 MHz)を用いて体毛中における有用な情報を抽出するために、試料の抽出や分析条件検討を行い、毛髪や体毛の代謝プロファイルの取得や物理化学的特徴の抽出を目的とする。
【方法】水、メタノール溶媒により洗浄した毛髪、体毛試料は凍結破砕を行い、溶液 NMR、Intact 試料は固体 NMR を用いて ^{1}H-NMR, CP/MAS, HR-MAS 計測し、洗浄条件の評価を行った。確立した洗浄条件を用い、多種多様な試料を NMR 計測により水溶性、脂溶性、および固体成分の評価を行った。また保存条件の異なる毛髪、体毛試料を用いて、固体 NMR により異方性スペクトルを取得し、水の運動性の評価を行い、毛髪、体毛における試料安定性の評価を行った。
【結果】無洗浄と水、メタノール溶媒洗浄した Intact 試料の CP/MAS スペクトルを比較した結果、相違は検出されなかったが、HR-MAS により得られたスペクトルを比較した結果、洗浄試料では油等の代謝物のシグナル強度が大きく減少した。このことからケラチン構造を保持し、試料の外部付着物が洗浄されたと考えられる。異方性 ^{1}H スペクトルを用いて各種毛髪、体毛中における水の運動性の異なる 3 成分(自由水、中間水、結合水)を分離し比較した結果、保存条件が異なる毛髪試料のばらつきが小さく、毛髪及び体毛の安定性が示唆された。本発表ではこれらの結果に加え Autograph による破断強度、FT-IR による固体プロファイル、TD-NMR による緩和曲線・水分・油分含有量、TG/DTA による物理化学的特性を統合的解析手法により毛髪、体毛中における特徴抽出についても報告する。
1 Motegi, H. *et al. Sci Rep* **5**, 15710, (2015). 2 Misawa, T., Date, Y. & Kikuchi, J. *J Proteome Res* **14**, 1526-1534, (2015). 3 Shiokawa, Y., Misawa, T., Date, Y. & Kikuchi, J. *Anal Chem* **88**, 2714-2719, (2016). 4 Fukuda, S. *et al. Nature* **469**, 543-547, (2011). 5 Furusawa, Y. *et al. Nature* **504**, 446-450, (2013). 6 Misawa, T., Komatsu, T., Date, Y. & Kikuchi, J. *Chem Commun* **52**, 2964-2967, (2016). 7 Shima, H. *et al. Nutrients* **9**, e1307 (2017). 8 Mekuchi, M., Sakata, K., Yamaguchi, T., Koiso, M. & Kikuchi, J. *Sci Rep* **7**, 9372, (2017).

Hair, Profiling, Physical property

講演番号：1E3a07
講演日時：3 月 24 日 10:16～ 1 号館 E3 会場

刺胞動物ミズクラゲの変態における細胞増殖の解析
Analysis of cell proliferation during metamorphosis in the moon jellyfish, *Aurelia* sp. 1
○藤井 夏鈴、小山 寛喜、国吉 久人 (広島大・院生物圏)
○Karin FUJII, Hiroki KOYAMA, Hisato KUNIYOSHI (Grad. Sch. Biosphere Sci. Hiroshima Univ.)

［背景］刺胞動物ミズクラゲ *Aurelia* sp. 1 の生活環は、雌雄異体の成体クラゲが有性生殖を行う有性世代と出芽や分裂によって無性的に増殖するポリプの無性世代から成る。ポリプは冬季に海水温が低下すると、胴体部分に複数の分節を持ったストロビラへと変態する。その後、それぞれの分節は 8 個の弁を持ったディスクに変化し、各ディスクは 1 枚ずつ遊離してエフィラとなる。分節が形成されてから、エフィラが放出されるまでの変態過程をストロビレーションと呼ぶ。ストロビレーションは、口側から反口側に向かって順に一つずつ分節が増える「分節形成期」とエフィラへと形態を変える「形態形成期」に分けられる。研究室内においては、ポリプの飼育温度を 22-25℃から 10℃に下げる低温処理や、indomethacin または 5-methoxy-2-methylindole (MMI)の投与によりストロビレーションを誘導できる[Kuniyoshi *et al.*, 2012, Fuchs *et al.*, 2014]。本研究では、ストロビレーションを細胞レベルで解析することを目的として、(1)細胞増殖阻害剤 hydroxyurea(HU) [Bode *et al.*, 1976]の投与実験により、ストロビレーションと細胞増殖の関係を調べた。また、(2)BrdU ラベル法を用い、ストロビレーション中の細胞増殖の領域を特定した。
［方法］(1)ポリプを MMI を含む海水中で 23℃で培養し、【A】ストロビレーション前のポリプ、【B】分節形成前期ストロビラ（分節 2～4 個)、【C】分節形成後期ストロビラ（分節 4～7 個）にそれぞれ HU を投与し、ストロビレーションが正常に進行するか観察した。(2)BrdU を含む海水中で培養したポリプおよびストロビラを 10%ホルマリン/人工海水により固定し、エタノール系列を用いて脱水した。パラフィン切片を作製し、抗 BrdU 抗体を用いて細胞増殖を可視化した。
［結果］(1)【A】ストロビレーションが開始せず、ポリプ形態のままであった。【B】分節形成が途中で停止し、エフィラへの形態形成は進行しなかった。また、水ぶくれのような奇形が現れ、切片観察の結果では中膠 (内胚葉と外胚葉にはさまれた部分) の肥大に起因するものと考えられた。【C】エフィラへの形態形成が不完全に進行し、小さく丸まった奇形エフィラが遊離した。(2)ポリプでは細胞増殖はほとんど検出されなかった。一方で、ストロビラの分節部分と次の分節が形成される領域で細胞増殖が検出され、反口側の末端では検出されなかった。また、内胚葉、外胚葉とも細胞増殖が観察された。以上の結果から、ストロビレーションの開始、分節形成、形態形成のすべての段階で細胞増殖が必要であり、細胞増殖はストロビラの分節形成領域で集中して起こっていることが示唆された。

jellyfish, metamorphosis, cell proliferation

講演番号：1E3a08
講演日時：3 月 24 日 10:27～ 1 号館 E3 会場

カイコの寄主植物選択に関わる味覚受容体の探索

Investigation of gustatory receptors involved in host plant selection of the silkworm

○鈴木 俊太、木内 隆史、嶋田 透、東原 和成（東大農）
○Shunta Suzuki, Takashi Kiuchi, Toru Shimada, Kazushige Touhara (Univ. of Tokyo)

【背景】

植食性昆虫は多くの植物種の中から自らの寄主植物を選び摂食している。ある植物が自らの食餌として適切か否かという判断には、味情報が大きく関与している。植食性昆虫は植物に含まれる化合物を味覚受容体により感知し、摂食を開始するか、あるいは忌避するかを決定していると考えられている。昆虫の寄主植物選択メカニズムは古くから研究が行われてきた。しかし、植食性昆虫の味覚受容体の機能解析はほとんど行われておらず、昆虫が植物の味情報を受容、処理するメカニズムについては不明な点が多い。この一因として、一部の例外を除き、昆虫の味覚受容体を培養細胞等で機能的に発現させることが困難であるということが挙げられる。そこで我々は、古くから植食性昆虫のモデル生物として研究が行われてきたカイコを用い、味覚受容体を CRISPR/Cas9 システムによりノックアウトすることで機能解析を試みた。

【方法・結果】

ある植物が食餌として相応しいか否かの判断には、摂食を促進する摂食誘因物質と、摂食を阻害する忌避物質が重要であると考えられる。我々は忌避物質に焦点を当て、味物質によるカイコの忌避行動を評価するアッセイ系の確立を行った。このアッセイ系を用いて様々な植物の抽出液や化合物のカイコに対する忌避活性を評価した。その結果、クヌギなどのブナ目植物抽出液やアルカロイド系化合物などが忌避活性を有することを見出した。

忌避化合物の受容に関わる味覚受容体を同定するため、味覚受容体欠損カイコの作製を行った。カイコは 76 種の味覚受容体遺伝子を有する。発現パターンから、特に重要と思われる 17 種の味覚受容体遺伝子を CRISPR/Cas9 システムによりノックアウトした。現在までに系統化に成功した味覚受容体欠損カイコを、忌避物質に対する行動アッセイに供した。その結果、いくつかの変異体では、アルカロイドなどの忌避化合物に対する忌避行動の減少がみられた。また、ある味覚受容体の欠損系統においては、強力な忌避活性を有するクヌギ粗抽出液に対する忌避行動の減少がみられた。

以上の結果から、忌避化合物の受容に関わるカイコ味覚受容体が明らかとなった。さらに、味覚受容体を 1 種のみ欠損したカイコが、忌避活性を有する植物抽出液を摂食するようになったことから、特定の味覚受容体が特定の植物の認識に大きく関与する、という対応関係があることが示唆された。

silkworm, gustatory receptor, taste

発表責任者：東原和成（ktouhara@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：1E3a09
講演日時：3 月 24 日 10:38～ 1 号館 E3 会場

線虫の環境因子による寿命制御機構の解析
Analysis of lifespan regulation by environmental factors in C.elegans
○馬場 真衣子、近藤 春佳、久米 一規、水沼 正樹（広島大院先端研）
○Maiko BABA, Haruka KONDO, Kazunori KUME, Masaki MIZUNUMA (Hiroshima Univ. of Adsm)

【目的】 mTOR は、免疫抑制剤・ラパマイシンの標的分子で、栄養状態に応じて細胞の様々な機能を制御している。mTOR は 2 種類の複合体（mTORC1 と mTORC2）が存在し、mTORC1 における変異はがんや糖尿病など老化に伴う疾患に深く関与し、詳細に解析されている。一方、mTORC2 の機能は不明な点が多い。これまでに、我々は線虫を用いて、RNA 干渉によって酸化ストレス耐性や寿命延長に重要な役割を果たす Skn-1(Nrf2 転写因子ホモログ)の活性を上昇させるものをスクリーニングした。その結果、mTORC2 複合体の一つ rictor を同定した。そこで、本研究では、線虫 Rict-1 の機能解析を通して、新規寿命制御機構の詳細を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】線虫の野生株を用いて *rict-1*RNAi を行ったところ、Skn-1 の腸の核への移行が観察された。さらに、高温や酸化ストレスに対して耐性を示した。その表現型は、*skn-1* 変異株では観察されなかったことから、*rict-1*RNAi の効果は Skn-1 を介したものであることが分かった。さらに、高温(25 度)における寿命を測定したところ、Skn-1 依存的に寿命が延長した。

次に、*rict-1*RNAi の結果を確かめるため、*rict-1* 変異株を用いて実験を行った。驚いたことに、*rict-1* 変異株では Skn-1 の腸の核への移行が観察されなかった。RNAi では HT115 という通常の餌(OP50)とは異なる大腸菌を用いるため、HT115 を食餌として与えて同様の実験を行ったところ、*rict-1* 変異株では Skn-1 の腸の核への移行およびストレス耐性を示した。

さらに、寿命を測定したところ、*rict-1* 変異株は、低温(15, 20 度)では食餌に関係なく短命であった。一方、高温(25 度)では OP50 を与えても短命であったが、HT115 を用いた時に寿命が延長することを見出した。以上のことから、温度および食餌に依存した寿命延長機構の存在が明らかとなった。

現在、Rict-1 経路と遺伝的に関連する因子を同定したので、これらとの機能関連を詳細に解析中である。

C.elegans, lifespan, SKN-1

発表責任者：馬場　真衣子（b151613@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：1E3a10
講演日時：3 月 24 日 10:49～ 1 号館 E3 会場

線虫の遺伝子発現および記憶保持能に及ぼす 4-ヒドロキシノネナールの影響
Effect of 4-hydroxynonenal on gene expressions and memory retention in *Caenorhabditis elegans*
○藪田 行哲、萩野 侑、井上 和、吉田 佳代子、美藤 友博、渡邉 文雄（鳥取大農）
○Yukinori YABUTA, Yu HAGINO, Nodoka INOUE, Kayoko YOSHIDA, Tomohiro BITO, Fumio WATANABE (Tottori Univ. Fac. Agric.)

【目的】ビタミンB_{12}（B_{12}）は主に動物性食品に含まれており、生体内では分岐鎖アミノ酸に代謝関わるメチルマロニルCoAムターゼとメチオニン合成酵素の補酵素として機能している。我が国の推奨量は2.4 μg/日とされており、極めて微量で有効である。しかしながら、中高齢者では胃酸分泌の低下や胃切除によりB_{12}吸収不全によるB_{12}欠乏症が多発している。B_{12}欠乏によりメチルマロン酸尿症やホモシステイン血症の他、手足のしびれや痛みなどの神経障害や認知症が引き起こされる。しかしながら、神経障害や認知症の詳細な発症メカニズムは明らかではない。申請者らはこれまでに線虫を用いてB_{12} の機能について研究を行ってきた。その結果、線虫は哺乳動物と同様に生育にB_{12}を要求すること、短期間でB_{12}欠乏線虫を調製できることを報告した（Bito et al., 2013）。最近その欠乏は酸化ストレスを惹起すること、そして非常に興味深いことに、B_{12}欠乏は線虫の記憶能を著しく低下させることを発見した（Bito et al., 2017）。ヒトにおいてもB_{12} 欠乏は痴呆症を引き起こす。ところで、アルツハイマー病などの神経変性疾患の患者の脳内には脂肪酸の酸化物に由来するアクロレインや4-ヒドロキシノネナル（HNE）などのカルボニル化合物が付加したタンパク質（カルボニル化タンパク質）が蓄積し、これらが神経細胞の損傷を増大させていると考えられている。以上よりB_{12}欠乏の線虫では酸化ストレスに伴い、カルボニル化合物やカルボニル化タンパク質が蓄積しこれらが記憶能の低下に関わっているのではないかと考えた。そこで、代表的なカルボニル化合物であるHNE処理による線虫の遺伝子発現および記憶保持能への影響について解析した。
【方法】線虫は NGM プレートで同調培養し、培養 3 日目の線虫を 0.5 mM HNE を含む S バッファー中で 24 時間処理し、各種解析に供した。
【結果】HNE 処理により線虫内の HNE レベルは 4.7 倍以上に増加した。RNA-seq 解析により、HNE 処理により 181 遺伝子の発現が上昇し、15 遺伝子の発現は低下していた。発現が増加した遺伝子の GO 分析を行ったところ、グルタチオン転移酵素活性やグルクロン酸転移酵素活性を持つ事が推測されるタンパク質をコードする遺伝子が多く含まれており、HNE 処理により増加した HNE の解毒の為であろうと推測された。現在記憶能への影響について解析を行っている。

Caenorhabditis elegans, 4-hydroxynonenal, memory retention

発表責任者：藪田行哲（yabuta@tottori-u.ac.jp）

講演番号：1E3a11
講演日時：3 月 24 日 11:10～ 1 号館 E3 会場

胎児期および授乳期のタンパク質欠乏が仔マウスの肝臓 FGF21 発現におよぼす影響

Effect of maternal protein restriction in pregnancy and lactation on hepatic FGF21 expression in mice

○加藤 拓、島村 紘平、竹中 麻子（明治大農）
○Taku KATO, Kohei SHIMAMURA, Asako TAKENAKA (Meiji Univ. Agri.)

【背景と目的】タンパク質欠乏の母親から生まれた子供は出生時の体重が小さく (intrauterine growth restriction, IUGR) 、生後の通常食摂取により急速な追いつき成長 (catch-up growth) をすることが知られており、この成長制御には insulin-like growth factor (IGF) -I が関与することが報告されている。さらに近年、タンパク質欠乏により肝臓 fibroblast growth factor (FGF) 21 発現と血中濃度が大幅に増加することを我々は報告し、この FGF21 の発現増加が低栄養による IGF-I 発現低下を引き起こすことも示された。そこで本研究では、IUGR 及び catch-up growth における FGF21 の重要性を明らかにする目的で、胎児期・授乳期のタンパク質欠乏が仔マウスの FGF21 発現に及ぼす影響を解析した。
【方法】実験 1 : IUGR における FGF21 の発現変化 C57BL/6J 雌マウスを雄と 4 日間同居させた後、通常食（NP, 20%タンパク質含有）あるいは低タンパク質食（LP, 5%タンパク質含有）を与えて出産まで飼育した。 **実験 2 : catch-up growth における FGF21 の発現変化** C57BL/6J 雌マウスを雄と 4 日間同居させた後、NP あるいは LP を与えて離乳（4 週齢）まで飼育した。離乳後の各群の仔マウスをさらに 2 群に分け、NP あるいは LP を与えて 3 週間飼育後、解剖した。仔マウスの実験群は NP/NP、NP/LP、LP/NP、LP/LP とした。実験 1 では出生時、実験 2 では解剖時の仔マウスの肝臓 FGF21 mRNA 量をリアルタイム PCR により測定した。
【結果】実験 1 : 母マウスの摂食量及び体重は LP の影響を受けなかった。出生時の仔マウスの体重・体長・肝臓重量は雌雄ともに LP で有意に低く、IUGR が確認できた。仔マウスの肝臓 FGF21 mRNA 量及び IGF-1 mRNA 量は雌雄いずれも LP により変化しなかった。IGF 結合タンパク質 (IGFBP-1, -3) の遺伝子発現は、雌雄いずれも LP 群で高かった。**実験 2 :** 母マウスの摂食量及び体重は LP の影響を受けなかった。離乳後 15 日以降の仔マウスの摂食量は、胎児期 NP 群で多かった。体重は、離乳時は胎児期 LP 群で小さかったが、離乳後の NP 摂取により胎児期 NP 群に追いつき、catch-up growth が確認できた。離乳後の体重増加量は、LP/NP 群で有意に高かった。離乳後の LP 摂取で肝臓 FGF21 mRNA 量は高くなり、肝臓 IGF-1 mRNA 量は低くなったが、胎児期 LP の影響は受けなかった。IGFBP-1, -3 の遺伝子発現には群間で差がなかった。
【結論】IUGR、catch-up growth いずれでもマウスの肝臓 FGF21 遺伝子発現は胎児期・授乳期のタンパク質欠乏の影響を受けなかった。生後のタンパク質欠乏による成長低下には FGF21 の増加が寄与するが、IUGR と catch-up growth はこれとは異なる機構によって制御されることが示された。

intrauterine growth restriction, catch-up growth, FGF21

発表責任者：竹中麻子（takenaka@meiji.ac.jp）

講演番号：1E3a12
講演日時：3 月 24 日 11:21～ 1 号館 E3 会場

アルコール摂取による有害効果への内在性オキシトシン系の抑制機能について

Ameliorative function of endogenous oxytocin receptor system to harmful effects of ethanol intake

○大塚 彩乃、日出間 志寿、西森 克彦（東北大農）
○Ayano OTSUKA, Shizu HIDEMA, Katsuhiko NISHIMORI (Tohoku Univ. of Agric.)

【背景・目的】
アルコールによる年間死亡者数は世界で 300 万人に上り、過度の飲酒への対策が求められている。近年、オキシトシン(OXT)の投与がアルコールの摂取抑制とアルコール依存症の改善効果を示す可能性や、アルコールにより引き起こされる運動機能障害などの有害な作用を抑制する可能性が報告されている。OXT は脳内の室傍核と視索上核で合成される 9 アミノ酸からなるペプチドホルモンであり、脳内では神経伝達物質として働き、末梢ではホルモンとして働く。オキシトシン受容体(OXTR)は 7 回膜貫通領域をもつ G プロテイン共役型受容体であり、脳内の様々な領域で発現する。OXT/OXTR 系は分娩・射乳の制御のほか、様々な社会行動の制御に関わる。OXT/OXTR 系とアルコールとの関わりについては、そのメカニズムを含め、詳細は明らかになっていない。本研究では OXT/OXTR 系がアルコールの摂取やアルコールによる有害な作用を抑制する効果の有無とそのメカニズムを遺伝子改変マウスを用いて解明することを目的とする。
【方法・結果】
我々は OXTKO マウスと OXTRKO マウスを用いて二瓶選択試験によりアルコール嗜好性を解析した。その結果、OXTKO マウスと OXTRKO マウスはともに野生型マウスと比較してアルコール嗜好性に有意な差はみられなかった。また、OXTKO マウスと OXTRKO マウスに EtOH を腹腔内投与して各種行動試験を行い、アルコール投与時の不安行動や運動機能、うつ行動などを解析した。その結果、運動機能や筋力を評価する Wire Hanging Test において、OXTKO マウスと OXTRKO マウスはともに野生型マウスと比較してアルコールによる運動障害からの回復が遅れることを見出した。
【考察】
これらの結果は内在性の OXT/OXTR 系がアルコール嗜好性には大きく寄与はしない可能性がある一方で、アルコールによる運動機能障害からの回復には必須な役割を果たしている可能性を示唆する。

oxytocin, alcohol, behavior

講演番号：1E3a13
講演日時：3 月 24 日 11:32～ 1 号館 E3 会場

フルクトース摂取過多による肝障害のメカニズム解析
The investigation of regulatory mechanisms of fructose-induced liver disorder
○松川 隼也[1]、酒井 真志人[1]、長沼 孝雄[1]、赤星 志織[1,2]、満島 勝[1]、八木 孝[1,3]、矢野 宏行[1,3]、松本 道宏[1]([1]国立国際医療研究センター、[2]横浜市大医、[3]日本医科大生体制御)
○Toshiya MATSUKAWA[1], Mashito SAKAI[1], Takao NAGANUMA[1], Shiori AKAHOSHI[1,2], Masaru MITSUSHIMA[1], Takashi YAGI[1,3], Hiroyuki YANO[1,3], Michihiro MATSUMOTO[1] ([1]NCGM, [2]Yokohama City Univ. School of Medicine, [3]Department of Bioregulation, Nippon Medical School)

［目的］
フルクトースはグルコースよりも甘味が強いことから甘味料として清涼飲料水などに汎用されている。一方で、その摂取量の増大に伴い、肥満や 2 型糖尿病の患者数や発症リスクが増加することが報告されている。体内に吸収されたフルクトースは主に肝臓で Aldolase B により代謝され解糖系で利用される。我々は、この Aldolase B の発現がフルクトースの過剰摂取である肥満、2 型糖尿病のモデルマウスの肝臓で増加することを見出した。一方で、フルクトースの摂取過多による肝障害や、Aldolase B の欠損マウスではフルクトース摂取に伴い肝障害が惹起されることなども報告されている。つまり生体はフルクトースを適切に代謝させるために Aldolase B の発現量を調節するが、フルクトース代謝の破綻により生じた代謝産物が生体に悪影響を与える可能性が想定される。Aldolase B 欠損マウスはフルクトースを代謝できないが故に、フルクトース摂取過多による代謝障害と共通の現象が惹起されていると考えられる。本研究では、フルクトース代謝における Aldolase B の役割と破綻に伴う代謝障害の分子機構を、マウス及び、初代培養肝細胞を用いて解明することを目的とした。
[方法]
CRISPR/Cas9 システムを用いて Aldolase B 欠損マウスを作出した。フルクトースを摂食させた Aldolase B 欠損マウスの肝臓より RNA、タンパク質を抽出し、DNA マイクロアレイや Western Blotting を行なうことで Aldolase B の活性低下におけるフルクトースの生体への影響を評価した。さらに、野生型マウス及び、Aldolase B 欠損マウスより単離した初代培養肝細胞にフルクトースの処理を行い、フルクトースの肝細胞に与える影響を Real-Time PCR などにより評価した。
[結果・考察]
フルクトースの処理により野生型マウスの初代培養肝細胞で Aldolase B の発現量は増大した。同時に、酸化ストレスや小胞体ストレスに関連する遺伝子の発現増加が認められた。さらに、Aldolase B 欠損マウスの初代培養肝細胞にフルクトース処理を行なうと細胞内 ROS 産生量の増加が認められた。また、フルクトースを長期摂食した Aldolase B 欠損マウスでは肝障害が惹起されおり、肝臓における酸化ストレスと小胞体ストレスの増加が認められた。つまり、Aldolase B の破綻/活性低下に伴い増加するフルクトースの代謝産物により酸化ストレスや小胞体ストレスが惹起され、肝障害が引き起こされると考えられる。

Fructose, Liver disorder, Aldolase B

発表責任者：松川隼也（tmatsukawa@ri.ncgm.go.jp）

講演番号：1E3a14
講演日時：3 月 24 日 11:43～ 1 号館 E3 会場

薬物性肝障害の再生過程におけるマクロファージ除去の影響

The effect of macrophage-depletion on the liver regeneration in drug-induced liver injury model

○三浦 徳[1]、木原 正峰[2]、世良 悠夏[1]、日高 なつみ[2]、渡辺 高大[2]、増澤（尾﨑） 依[2]、細野 崇[1,2]、関 泰一郎[1,2]（[1]日大院・生資科・応生科、[2]日大・生資科・生命化）

○Atsushi Miura[1], Masataka Kihara[2], Yuuka Sera[1], Natsumi Hidaka[2], Takahiro Watanabe[2], Yori Ozaki-Masuzawa[2], Takashi Hosono[1,2], Taiichiro Seki[1,2] ([1]Nihon Univ. Grad. School, [2]Nihon Univ.)

【背景と目的】肝臓は大部分が障害を受けても、肝細胞の増殖や組織リモデリングなど強力な再生機構を通じてその機能を回復する。マクロファージは炎症性サイトカインの産生や細胞外マトリクスの分解、壊死細胞の除去を介して肝再生を促進する。一方、マクロファージが肝機能の回復に関与するかは不明である。本研究では、四塩化炭素誘導急性肝障害の再生過程におけるマクロファージの選択的除去が、肝組織の修復や肝機能の回復に及ぼす影響を検討した。

【方法】C57BL/6J マウス（8-12 週齢、オス）に四塩化炭素（1 mL/kg b.w.）を経口投与し、急性肝障害を惹起した。急性期応答が終了する四塩化炭素投与 48 時間後から、マクロファージの選択的除去剤であるクロドロン酸リポソーム(以下 CLO; 100 μL/mouse)を 2 日毎に腹腔内投与した(CLO 群)。対照群にはクロドロン酸を含まないリポソームを同様に投与した（vehicle 群)。四塩化炭素投与 144 時間後まで経時的に肝臓および血液を回収し、各種解析を実施した。

【結果】肝臓におけるマクロファージマーカーおよび貪食マーカーの遺伝子発現レベルは、vehicle 群において四塩化炭素投与後に経時的に増加した。一方、CLO 群ではこれらの遺伝子発現レベルの増加はキャンセルされた。肝障害マーカーである血漿 ALT は、CLO 投与により四塩化炭素投与 96, 144 時間でも高値が維持された。またヘマトキシリン・エオシン染色による組織学的解析の結果、CLO 群の肝臓では組織の修復が著しく遅延していることが明らかとなった。一方、肝臓における細胞増殖マーカーのタンパク質発現レベルに関しては両群に差はなかった。ガスクロマトグラフ質量分析計を用いたメタボローム解析の結果、CLO 群の肝臓では vehicle 群と比較して多くの代謝物が低下していることが示された。さらにパスウェイ解析によって、アミノ酸代謝に関連する複数の代謝経路が CLO 投与により低下していることが明らかとなった。

【結語】本研究では、薬物性肝障害の再生過程において、マクロファージが肝組織のリモデリングだけでなく肝機能の回復にも必須であることを明らかにした。

Liver regeneration, Macrophage, Metabolomics

発表責任者：関泰一郎（tseki@brs.nihon-u.ac.jp）

講演番号：1E3a15
講演日時：3 月 24 日 11:54～ 1 号館 E3 会場

転写調節因子 EHF がランゲルハンス細胞において果たす役割の解析
Role of the transcription factor EHF in Langerhans cells
○中野 信浩[1]、矢野 堅士[1,2]、八代 拓也[2]、西山 千春[1,2]、北浦 次郎[1]、奥村 康[1]、小川 秀興[1]([1]順天堂大院医、[2]東理大基工)
○ Nobuhiro NAKANO[1], Kento YANO[1,2], Takuya YASHIRO[2], Chiharu NISHIYAMA[1,2], Jiro KITAURA[1], Ko OKUMURA[1], Hideoki OGAWA[1] ([1]Juntendo Univ., [2]Tokyo Univ. of Sci.)

【背景】ETS homologous factor（EHF）は ETS ファミリーの転写調節因子であり、特定の遺伝子において転写抑制因子として働くことが知られている。これまで EHF は上皮細胞特異的な転写因子と考えられていたが、近年、血球系細胞である単球由来樹状細胞の分化に関与していることが報告されている。しかしながら、EHF が生体の免疫機能に与える影響はほとんどわかっていない。
【目的】免疫系における転写調節因子 EHF の役割を明らかにするため、本研究では、EHF の欠損が樹状細胞の機能や樹状細胞が関与する疾患に与える影響を解析した。
【方法】CRISPR-Cas システムにより、C57BL/6 バックグランドの、EHF タンパク質を欠損する変異マウスを作製した。本マウスを用いて、接触性皮膚炎マウスモデルを作製し解析を行った。
【結果】CRISPR-Cas システムにより作製された変異マウスは、10 塩基欠損によるフレームシフト変異により中途終止コドンが出現した結果、機能のある EHF タンパク質を欠損していた。野生型マウスでは、*Ehf* mRNA が脾臓樹状細胞に比べ、真皮樹状細胞と表皮特異的樹状細胞であるランゲルハンス細胞に高発現していたことから、*Ehf* 欠損マウス皮膚の樹状細胞について解析を行った。野生型マウス表皮内の抗原提示細胞は、ほとんどが MHC class II (MHCII)^{hi}CD11b^{+}Langerin (CD207)$^{+}$ランゲルハンス細胞であったが、*Ehf* 欠損マウスでは MHCII^{hi}CD11b^{+}CD207^{+}細胞と MHCII^{int}CD11b^{-}CD207^{-}細胞の 2 つの細胞集団がみられた。*Ehf* 欠損マウスを用いた接触性皮膚炎モデルでは、ハプテン塗布により惹起される皮膚の肥厚が抑制されており、炎症に関与するサイトカイン IL-6 の mRNA 発現も抑制されていた。
【結論】転写調節因子 EHF はランゲルハンス細胞の分化または機能発現に関与しており、接触性皮膚炎において炎症の増悪に関わることが示唆された。

Transcription factor, Langerhans cell, Contact dermatitis

発表責任者：中野信浩（nbnakano@juntendo.ac.jp）

講演番号：1E3p02
講演日時：3 月 24 日 14:01～ 1 号館 E3 会場

ドーパミン D1/5 受容体による cAMP 情報伝達経路活性化を介した海馬依存性記憶制御

Regulation of hippocampus-dependent memory retrieval by dopamine D1/D5 receptors-cAMP signaling pathways

○六川 智博、長谷川 俊介、喜田 聡（東農大・応生科・バイオ）
○Tomohiro ROKUKAWA, Shunske HASEGAWA, Satoshi KIDA (Dep. of Bioscience, Tokyo Univ. of Agriculture)

ドーパミン情報伝達経路は快情動、報酬行動、意欲、学習と記憶形成など多岐にわたる脳機能を制御する神経伝達を担っている。一方、サーカディアンリズム産生を司る生物時計は学習・記憶能力を中心とする認知機能を制御すると考えられているが、認知機能との関連性は不明であった。我々は学習・記憶能力に対する生物時計の役割を明らかにするために、前脳特異的にドミナントネガティブ型 BMAL1(dnBMAL1)を発現する遺伝子改変マウス(dnBMAL1 マウス)を作製し、この変異型マウスの学習・記憶能力の解析を進めてきた。その結果、この変異型マウスは時間帯依存的（明期開始後 10 時間; ZT10）に海馬依存性記憶の想起障害を示したことから、海馬依存性記憶の想起が海馬生物時計によるサーカディアン制御を受けることが強く示唆された。さらに、この変異型マウス海馬のトランスクリプトーム解析結果の Gene Set Enrichment 解析により、dnBMAL1 マウス海馬では、G タンパク質共役型受容体群と cAMP 情報伝達因子群の発現が異常を示すことが示された。この結果に基づいた定量的 RT-PCR 解析からアデニル酸シクラーゼ 1(AC1)、AKAP5、ドーパミン受容体 D1R 及び D5R の mRNA 量が顕著に低下していることが明らかとなった。これらの結果に一致して、dnBMAL1 マウス海馬では cAMP 量も低下していることも明らかとなり、海馬では、dnBMAL1 の発現によって D1/5R による cAMP 産生が低下していることが強く示唆された。そこで、本研究では、海馬依存性記憶想起に対する D1/5R による cAMP 産生の役割を明らかにすることを目的として、社会的認知記憶課題を用いた行動薬理学的解析を行った。その結果、野生型マウスに対する D1/5R アンタゴニストの腹腔内投与は ZT4（明期開始後 4 時間）における記憶想起には影響を与えなかったものの、ZT10 における記憶想起を阻害することが示された。一方、dnBMAL1 マウスに対するロリプラムあるいは D1/5R アゴニストの腹腔内投与は ZT10 における社会的認知記憶想起の障害を改善することが示された。さらに、ZT10 において野生型マウスの海馬に cAMP 濃度上昇を誘導するロリプラムと D1/5R アンタゴニストを投与した結果、D1/5R アンタゴニストを投与した場合には腹腔内投与結果と同様に記憶想起の阻害が観察され、この D1/5R アンタゴニストによる記憶想起阻害はロリプラムの同時投与によって解消された。以上の結果から、海馬生物時計は D1/5R-cAMP 情報伝達経路を介して記憶想起を正に制御すると結論し、ドーパミン情報伝達経路が記憶想起を制御することが初めて明らかとなった。

memory, dopamine, hippocampus

講演番号：1E3p03
講演日時：3 月 24 日 14:12～ 1 号館 E3 会場

海馬における神経炎症性サイトカイン TNFα は恐怖記憶想起を負に制御する

Hippocampal neuroinflammation cytokine TNFα negatively regulates fear memory retrieval

○高橋 翔平、福島 穂高、喜田 聡（東農大院・農・バイオ）
○Shohei TAKAHASHI, Hotaka FUKUSHIMA, Satoshi KIDA ((1. Dep. of Bioscience, Tokyo Univ. of Agriculture)

脳内炎症は統合失調症を代表とする精神疾患及び、アルツハイマー病とパーキンソン病など神経変性疾患の病態であることが示唆されている。神経炎症調節因子であるサイトカイン腫瘍壊死因子 α（Tumor Necrosis Factor α ; TNF α）は脳内ミクログリアから放出され、シナプス変性や長期増強の障害を引き起こす。興味深いことに、TNF α が恐怖記憶消去制御に関わることが示唆され（Yu et al., 2016）、TNF α と心的外傷後ストレス障害発症との関連も予想されている。しかし、恐怖記憶制御プロセス群に対する TNF α の役割は未だ不明である。一方、記憶は固定化を経て不安定な短期記憶から安定な長期記憶へと変換される。その後、長期記憶は想起されると不安定な状態に戻り、再固定化を経て再貯蔵される。現在までに、我々は海馬が恐怖条件づけ文脈記憶の固定化と再固定化に中心的役割を果たすことを示してきた。以上の背景から、本研究では、海馬への局所投与法を用いて、恐怖記憶制御に対する海馬 TNF α の役割の解明を試みた。小箱内でマウスに電気ショックを与え（恐怖文脈条件付け）、24 時間後に小箱に戻し、マウスの恐怖反応であるすくみ反応を示した時間の長さを指標に恐怖記憶を評価した(テスト)。恐怖条件付け 6 時間前に海馬に TNF α（20 ng/side）を局所投与した場合には、この 24 時間後に長期記憶が認められ、TNF α 投与の影響は観察されなかった。しかし、テストの 18 あるいは 6 時間前に TNF α を投与した場合、テストにおけるすくみ反応は対照群よりも有意に短くなり、恐怖記憶想起の阻害が示唆された。さらに、この 24 時間後にテストを行った場合にも、すくみ反応の有意な低下が認められ、TNF α 投与により再固定化も阻害されることが示唆された。一方、テストの 2 あるいは 24 時間前投与では記憶想起に対する TNF α 投与の影響は観察されなかった。さらに、記憶想起に対する TNF α 投与の影響を生化学的に評価するため、恐怖記憶想起後の海馬 CA1 領域における神経細胞活性化マーカー（c-fos）の遺伝子発現を解析した結果、記憶想起阻害に一致して、TNF α 投与後には記憶想起に伴い誘導される c-fos 発現も有意に低くなった。また、海馬への TNF α 投与により新規環境における行動活性の変化は認めらなかったため、TNF α 投与後のテストにおけるすくみ反応の低下は行動活性異常に起因しないと判断された。以上の結果から、海馬 TNF α が恐怖記憶想起を負に制御することを初めて明らかにし、脳内炎症が記憶想起障害を導く可能性を示唆した。

TNFα, fear memory, retrieval

講演番号：1E3p04
講演日時：3 月 24 日 14:23～ 1 号館 E3 会場

抗肥満ホルモン FGF21 は骨格筋萎縮に応答する

Induction of the anti-obese hormone FGF21 by muscle atrophy

○清水 誠[1]、三浦 雄也[1]、橋詰 力[2]、山内 祥生[1]、佐藤 隆一郎[1] ([1]東大農、[2]静岡県大食)
○Makoto Shimizu[1], Yuya Miura[1], Tsutomu Hashidume[2], Yoshio Yamauchi[1], Ryuichiro Sato[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Univ. of Shizuoka)

【背景】FGF21(Fibroblast growth factor 21)は肝臓で合成・分泌される内分泌性の繊維芽細胞増殖因子である。FGF21 の遺伝子発現は脂肪酸などの栄養シグナルにより制御され、糖脂質代謝の改善や体重増加抑制など様々なエネルギー代謝改善効果を有することが知られている。我々はこれまでに、ストレスシグナルにより活性化される転写因子 ATF4 が FGF21 の遺伝子発現を制御し、FGF21 が小胞体ストレスに対するネガティブフィードバック因子であることを報告した。

近年、FGF21 は骨格筋でも検出され、マイオカイン（骨格筋より分泌される生理活性物質）として認知されつつある。サルコペニアなどの筋萎縮状態では、筋組織内において様々なストレスシグナルが活性化することが知られている。これらの背景から、我々は骨格筋の FGF21 が肝臓と同様にストレスシグナルに関与すると考え、筋萎縮モデルマウスを用いた解析を行った。

【方法・結果】2 つの筋萎縮モデルマウス（坐骨神経切除、ギブス固定）の骨格筋より RNA を調製し、リアルタイム PCR を用いた遺伝子発現解析を行った。その結果、筋萎縮により骨格筋の FGF21 の遺伝子発現が著名に増加することを見出した。一方、血中 FGF21 の有為な変動は認められなかったため、筋由来の FGF21 は骨格筋周辺でオートクライン・パラクライン様に作用する可能性が示唆された。次に、骨格筋細胞 C2C12 細胞を用いてどのような筋萎縮シグナルが FGF21 の発現制御に関与するか検討した。その結果、TGFβ（Transforming growth factorβ）が FGF21 の遺伝子発現を亢進することを見出した。

筋萎縮における FGF21 の機能解析のため、プラスミドを用いた強制発現実験を行った。in vivo エレクトロポレーション法を用いて、野生型マウスの前脛骨筋に FGF21 の発現プラスミドを導入し、坐骨神経切除を行った。その結果、FGF21 の発現により筋萎縮時の骨格筋重量が低下することが示された。現在、ユビキチン E3 リガーゼのタンパク質発現の検討など詳細な作用機序の解析を行っている。

以上の結果より、我々は骨格筋において FGF21 の遺伝子発現が筋萎縮で著明に増加すること、また FGF21 は筋萎縮での骨格筋重量を低下させることを見出した。

Skeletal muscle, FGF21, muscle atrophy

講演番号：1E3p05
講演日時：3 月 24 日 14:34～ 1 号館 E3 会場

筋萎縮時に応答する新規繊維芽細胞増殖因子の同定
Identification of a novel growth factor that is increased by muscle atrophy.
○野口 惇、清水 誠、小田 耕司、山内 祥生、佐藤 隆一郎（東大院・農生科・応生化）
○Makoto NOGUCHI, Makoto SHIMIZU, Koji ODA, Yoshio YAMAUCHI, Ryuichiro SATO (Dept. of Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. of Agr. and Life Sci., Univ. of Tokyo)

【目的】超高齢化社会に突入した我が国において、加齢に伴う筋力・筋量の低下(サルコペニア)は QOL の低下や医療・介護費の増大を招く深刻な問題である。サルコペニアの予防は健康寿命の延伸や医療・介護費の削減につながる。このことから、筋力・筋量の制御メカニズムの解明は我が国の重要な課題と言える。我々はこれまでに肝臓で合成・分泌される抗肥満ホルモン FGF21 が様々なストレスで増加することを報告した。筋萎縮においても様々なストレスシグナルが活性化することが知られており、我々は骨格筋で FGF (Fibroblast growth factor) 21 の発現が顕著に増加することを見出した。本研究では、他の FGF ファミリーの筋萎縮における発現制御に関する検討を行った。

【方法・結果】除神経・ギプス固定により筋萎縮を誘導した 9 週齢の若齢マウス骨格筋における全 FGF ファミリーの遺伝子発現を、リアルタイム PCR を用いて解析した。その結果、FGF21 と FGF13 の遺伝子発現が筋萎縮により亢進した。また、10 ヶ月齢マウスを用いた実験の結果、若齢マウスと同様に FGF21 と FGF13 の発現増加がみられた。FGF13 は中枢神経系や心筋、骨格筋で選択的に発現する繊維芽細胞増殖因子であり、5 つのアイソフォーム(s, u, v, vy, vy/y)が存在する。FGF13 の各アイソフォームの遺伝子発現解析を行った結果、FGF13vy/y の発現変動が最も顕著であった。次に、骨格筋細胞モデルである C2C12 細胞を用いて筋分化における FGF13 の発現変動をリアルタイム PCR によって解析した。筋分化により FGF13 の遺伝子発現は顕著に増加し、各アイソフォームを解析した結果、FGF13vy/y の発現が最も高いことが示された。酸化ストレスや糖質コルチコイドは筋委縮を誘発することが知られている。C2C12 細胞に酸化ストレス(H_2O_2)や糖質コルチコイド(デキサメタゾン)を与え、遺伝子発現解析を行った。その結果、FGF13 および FGF13vy/y の発現変動は認められなかった。このことから FGF13 発現は他の筋萎縮シグナルによる制御を受けていると考えられる。現在はマウス骨格筋での FGF13 強制発現実験による解析を行っている。以上のように本研究では、筋萎縮に応答する新規繊維芽細胞増殖因子として FGF13 を同定した。また、FGF13vy/y が筋萎縮に応答する主要なアイソフォームであることを明らかにした。

muscle atrophy, FGF13, FGF21

講演番号：1E3p06
講演日時：3 月 24 日 14:55～ 1 号館 E3 会場

リジン長鎖アシル化タンパク質の網羅的な探索法の開発

Development of comprehensive exploration methods for lysine long-chain fatty acylayted proteins

○加藤 竜[1]、則次 恒太[1,2,3]、鈴木 健裕[4]、堂前 直[4]、吉田 稔[2,3]、伊藤 昭博[1,2] ([1]東薬大・生命科学、[2]理研 CSRS・ケミカルゲノミクス、[3]東大院・農生科・応生工、[4]理研 CSRS・生命分子解析)
○Ryu KATO[1], Kota Noritsugu[1,2,3], Takehiro Suzuki[4], Naoshi Dohmae[4], Minoru Yoshida[2,3], Akihiro Ito[1,2] ([1]Sch. of Life Sci., Tokyo Univ. of Pharm. and Life Sci., [2]Chem. Genomics Res. Gr., RIKEN CSRS, [3]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [4]Biomolec. Character. Unit, RIKEN CSRS)

真核生物におけるタンパク質の代表的な翻訳後修飾のひとつにリジンアセチル化がある。この修飾はリジンアセチル化酵素（KAT）とリジン脱アセチル化酵素 （KDAC）によって可逆的に制御されており、タンパク質の機能や局在を制御することで遺伝子発現やエネルギー代謝などを調節している。KDAC は亜鉛イオン依存的な HDAC ファミリーと NAD^+依存的なサーチュインの 2 種類に大別されるが、近年サーチュインファミリーの多くがアセチル化以外の様々なリジンアシル化修飾を基質とすることが明らかとなっている。なかでも SIRT6 や SIRT2 などのサーチュインがミリストイル化やパルミトイル化といった長鎖アシル化修飾を基質とすることが示され、更に HDAC ファミリーの一部が脱長鎖アシル化活性を有していることが最近報告され、新たな翻訳後修飾としてリジン長鎖アシル化が注目されつつある。実際、TNF-α などのいくつかのタンパク質がリジン長鎖アシル化修飾を受けることが報告されているが、その数は未だに少ない。しかし、複数の KDAC が脱長鎖アシル化酵素活性を有していることから、それらの基質となる未知のリジン長鎖アシル化タンパク質の存在が示唆される。

そこで、未知のリジン長鎖アシル化タンパク質の発見を目的とし、2 つのアプローチで長鎖アシル化タンパク質を網羅的に探索する方法の確立を試みたので報告する。1 つ目はクリックケミストリーを利用した方法である。本法は、末端がアルキンである脂肪酸類縁体とアジドが付加する Huisgen 環化付加反応によってアシル化修飾依存的に標的のタンパク質をビオチンでラベルすることができる。この方法を利用してヒト肝臓がん由来の Huh7 細胞におけるアシル化タンパクの探索を行った結果、アルキン脂肪酸依存的にいくつかのタンパクを精製することに成功した。2 つ目は抗リジンミリストイル抗体を用いた免疫沈降法による探索法である。我々はミリストイル化リジンの前後に任意のアミノ酸を付加したペプチド混合物を抗原として用いることにより、アミノ酸配列に依らずリジンミリストイル化を選択的に認識する抗ミリストイル化リジン抗体の作製に世界で初めて成功した。現在この抗体を用いた免疫沈降法によるリジンミリストイル化ペプチドの濃縮法の確立を試みているので、クリック反応を用いた方法と合わせて報告したい。

click chemistry, acylome, lysine-acylation

講演番号：1E3p07
講演日時：3 月 24 日 15:06～ 1 号館 E3 会場

転写因子 TEAD のリジン長鎖アシル化修飾を介した転写制御機構

The regulatory mechanism of transcription by long-chain fatty acylation of TEAD transcription factors

○則次 恒太[1,2,3]、伊藤 昭博[2,3]、小川 健司[2]、鈴木 健裕[4]、堂前 直[4]、吉田 稔[1,2]([1]東大院農・応生工、[2]理研 CSRS・ケミカルゲノミクス、[3]東薬大・生命科学、[4]理研 CSRS・生命分子解析)
○Kota NORITSUGU[1,2,3], Akihiro ITO[2,3], Kenji OGAWA[2], Takehiro SUZUKI[4], Naoshi DOHMAE[4], Minoru YOSHIDA[1,2] ([1]Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo, [2]Chem. Genomics Res. Gr., RIKEN CSRS, [3]Sch. of Life Sci., Tokyo Univ. of Pharm. and Life Sci., [4]Biomolec. Character. Unit, RIKEN CSRS)

近年、リジン脱アセチル化酵素のうち、いくつかがリジン脱長鎖アシル化活性を有していることが報告されており、新たな翻訳後修飾としてリジン長鎖アシル化が注目されている。われわれは独自に行ったランダム修飾プロテオーム解析により、がん抑制経路である Hippo シグナルの制御下にある転写因子 TEAD のファミリー間、および種を超えて保存されているリジン残基がミリストイル化およびパルミトイル化されていることを見いだした。

TEAD は転写共役因子の YAP/TAZ と結合することで標的遺伝子の発現を制御しており、発生や器官サイズの調節に加えがん化にも寄与している。この結合は Hippo 経路をはじめとしたシグナル経路による YAP/TAZ のリン酸化を介して制御されていることがよく知られている。さらに最近になって TEAD のシステイン残基における自己パルミトイル化が YAP/TAZ との結合および TEAD の安定化に寄与していることが報告された。しかしながら TEAD のリジン残基における長鎖アシル化修飾の制御機構と生理的な意義については全く知られていない。

我々はこれまでに、世界に先駆けて TEAD のリジン長鎖アシル化を特異的に認識するモノクローナル抗体の作製に成功した。この抗体を用いた解析により、TEAD がシステインのアシル化を介したリジン自己アシル化活性を有することを当学会で報告した。本発表では、TEAD のリジン長鎖アシル化の生理的な意義について報告する。TEAD のアシル化リジン残基をアルギニンに置換した KR 変異体を用いた免疫沈降法を行ったところ、還元剤である DTT の有無によって YAP との結合状態が変化することを見いだしていた。そこで、NanoBiT（NanoLuc Binary Technology）を利用した生細胞内での結合評価系を構築し、リジンアシル化修飾が YAP との結合に与える影響を検討した。その結果、KR 変異体は野生型と比較して YAP との結合が有意に減少することを見いだした。さらに、GAL4 の DNA 結合ドメインと TEAD1 の融合タンパクを用いたレポーターアッセイ系において、結合レベルの減少と同様に転写活性も減少することを見いだした。以上の結果から、TEAD のリジン長鎖アシル化が YAP との結合を介した TEAD の転写活性の亢進に寄与していることが示唆された。

TEAD, lysine long-chain fatty acylation, transcription factor

発表責任者：則次恒太（kota.noritsugu.4312@gmail.com）

講演番号：1E3p08
講演日時：3 月 24 日 15:17～ 1 号館 E3 会場

恐怖記憶消去を制御する脳領野同定による消去機構の組織学的解析

Identification of brain regions that contribute to acqisition and consolidation of contextual fear memory extinction

○立花 亮太、喜田 聡（東農大院）
○Ryota Tachibana, Satoshi Kida (Tokyo Univ. of Agric.)

恐怖記憶は動物が危険を回避するための防御機構の一つであるが、恐怖記憶制御の破綻は心的外傷後ストレス障害（PTSD）などの重篤な精神疾患を引き起こす。恐怖記憶は遺伝子発現を必要とする固定化のプロセスを経て安定な記憶として貯蔵される。恐怖記憶は想起されると不安定化され、遺伝子発現を必要とする再固定化が誘導されて維持される。一方で、想起される時間が長くなると、恐怖反応を減弱させる「消去（安全学習)」も誘導される。この消去記憶の固定化にも遺伝子発現が必要とされる。現在、最も効果的な PTSD の認知行動療法として、恐怖記憶を繰り返し想起するエクスポージャー療法が知られている。このエクスポージャー療法の生物学的基盤は恐怖記憶消去であることが世界的にも認識されており、消去機構の解明がこの治療方法の改善に寄与すると考えられている。我々は恐怖条件付け文脈学習課題を用いて、前頭前野と扁桃体における転写因子 CREB 依存性遺伝子発現が消去記憶の固定化に必要とされるなど、消去制御を司る分子機構の解明を進めてきた。一方、最近の他グループの解析から、視床や 水道周囲灰白質など前頭前野、扁桃体と海馬以外の脳領域が恐怖記憶制御に関わることが示唆されている。そこで、本研究では、恐怖記憶消去を制御する神経回路を解明することを目的として、CREB の標的遺伝子であり、記憶固定化に必要とされる遺伝子発現のマーカーである初期応答遺伝子 c-fos の発現を指標にして、恐怖記憶消去誘導後において活性化される脳領野の同定を試みた。恐怖条件付け文脈課題を用いて、電気ショックチャンバーにマウスを入れ、この 148 秒後に電気ショック（0.4mA）を 2 秒間与え、その 30 秒後にマウスを取り出した。この 24 時間後に消去誘導のため、マウスを再び電気ショックチャンバーに 30 分間入れ（再エクスポージャー)、この 90 分後の c-fos 陽性細胞数を免疫組織染色により測定した（消去誘導群)。その結果、過去の結果と一致して、消去誘導群では 30 分間の再エクスポージャー時にすくみ反応の有意な低下が観察され消去誘導が認められ、また、電気ショックを与えなかったコントロール群と比較して、前頭前野及び扁桃体において有意に多い c-fos 陽性細胞が観察された。興味深いことに、うつ病との関連が注目されている外側手綱核においてもコントロール群と比較して有意な c-fos 陽性細胞数の増加が観察され、消去制御に対する外側手綱核の重要性が示唆された。現在、他の脳領域における c-fos 陽性細胞数を測定すると共に、恐怖記憶消去に対する外側手綱核の役割を解析しており、これらの結果を報告する。

habenular, fear memory, extinction

講演番号：1E3p09
講演日時：3 月 24 日 15:28～ 1 号館 E3 会場

恐怖記憶想起後に再固定化を停止し、消去誘導を開始する移行プロセスの同定と機構解析

Mechanisms of memory phase shift from reconsolidation to extinction

○福島 穂高、喜田 聡（東農大）
○Hotaka FUKUSHIMA, Satoshi KIDA (Tokyo Univ. of Agric.)

恐怖記憶は転写因子 CREB 依存性の遺伝子発現を必要とする固定化のプロセスを経て貯蔵される。恐怖記憶が想起されると、恐怖反応を維持または強化する再固定化が誘導され、一方、持続的に、または繰り返し恐怖記憶が想起されると、恐怖反応の表出を抑制する消去が誘導される。このように、恐怖記憶が想起されると、恐怖反応が強化あるいは減弱する正反対の制御プロセスである再固定化と消去が想起時間に応じて誘導される。受動的回避反応課題では、明箱と暗箱が連結した装置を用いてマウスが明箱から暗箱に移動すると電気ショックが与えられ、暗箱に対する恐怖記憶が形成される。我々の解析から、恐怖記憶形成後、マウスを明箱に入れると再固定化を経て恐怖記憶が増強され、一方､マウスが暗箱へ移動後暗箱に 10 分間滞在させると消去が誘導されること､また、転写因子 CREB を介する遺伝子発現が再固定化時には海馬、前頭前野、扁桃体において、一方、消去時には前頭前野と扁桃体において必要とされることが明らかとなっている(Fukushima et al., 2014)。興味深いことに、マウスを暗箱に移動後に 1 分間のみ滞在させた場合では、再固定化誘導と再固定化に伴う遺伝子発現がキャンセルされ、消去も誘導されないことが示されている。従って、暗箱に移動後に再固定化から消去に移行するためのプロセスが作動する機構の存在が示唆された。そこで、本研究では、この再固定化から消去へと記憶フェーズが移行するメカニズムの解明を目的として、転写因子 CREB の上流キナーゼとして知られる Extracellular signal-regulated kinase (ERK)に着目し、想起後の恐怖記憶制御に対する ERK の役割を解析した。蛍光免疫組織染色法を用いて ERK 活性化のマーカーである ERK のリン酸化レベル（pERK）を解析した結果、明箱での滞在、明箱から暗箱に移行後 1 あるいは 10 分間滞在 5 分後において、それぞれ海馬、前頭前野、扁桃体における pERK 陽性細胞数の有意な増加が観察された。この結果に一致して、明箱あるいは暗箱(10 分間)滞在直後の海馬、前頭前野あるいは扁桃体への ERK 阻害剤（U0126）の局所注入は再固定化と消去をそれぞれ阻害した。興味深いことに、暗箱移動後 1 分間滞在直後に U0126 をこれら脳領野に注入した結果、恐怖記憶の増強が再び観察され、再固定化停止が阻害されたことが示唆された。以上の本研究から、ERK の活性化を介して再固定化をキャンセルし、消去誘導を開始するための移行プロセスの存在が明らかとなった。

fear memory, mouse, hippocampus

講演番号：1E3p10
講演日時：3 月 24 日 15:39～ 1 号館 E3 会場

ビタミン B1 欠乏誘導性の記憶障害は脳内炎症と転写因子 CREB 不活性化による海馬神経変性によって引き起こされる

Vitamin B1 deficiency-induced memory impairments via hippocampal degeneration led by neuralinflammation and inactivation of transcription factor CREB signaling

○辻 竜平、渡辺 玉絵、喜田 聡（東京農大院・農・バイオ）
○Ryuhei TSUJI, Tamae WATANABE, Satoshi KIDA (Dept. of Bioscience, Tokyo Univ. of Agriculture)

ビタミン B1(B1)の重篤な欠乏は不可逆的な記憶障害を病態とするウェルニッケ・コルサコフ症候群を引き起こすが、その発症機構は未だ不明である。我々は B1 欠乏による記憶障害の発症メカニズムの解析を進め、まず、B1 欠乏を経験したマウス(B1 欠乏回復マウス)では不可逆的な海馬依存性記憶の障害が観察されること、また、このマウスでは海馬ニューロンの欠落と樹状突起スパイン密度の減少が観察されることを示し、B1 欠乏による記憶障害の原因が海馬の変性であることを示唆した。以上の背景から、本研究では、B1 欠乏誘導性の記憶障害と海馬変性の分子機構解明を目的として、次世代シークエンサーを用いて B1 欠乏直後と回復後のマウス海馬のトランスクリプトームを解析した。その結果、B1 欠乏時の海馬では、脳内炎症のマーカーである炎症性サイトカイン TNFα をはじめとする炎症関連遺伝子群の劇的な発現量の増加が観察され、細胞への傷害作用を示すことが知られる M1 ミクログリアのマーカー遺伝子の発現増加も観察された。さらに、B1 欠乏時からの回復後に至るまで海馬ではグルタミン酸受容体群を代表とするシナプス伝達関連遺伝子群の発現異常も観察された。興味深いことに、B1 欠乏からの回復後に至るまで海馬では、転写因子 CREB の標的である Arc を中心とする初期応答遺伝子群の有意な発現低下が観察され、さらに、B1 欠乏から回復に至るまで CREB さらに、CREB 上流因子であるアデニル酸シクラーゼ Adcy1 の mRNA 量にも有意な発現低下が観察された。以上より、B1 欠乏によって海馬に強烈な脳内炎症と海馬神経変性が引き起こされ、CREB 情報伝達系が慢性的に不活性化されることで記憶能力が不可逆的に低下する機構の存在が示唆された。この仮説を検証するため、我々が開発した前脳特異的活性化型 CREB 変異体発現マウス(DIEDML マウス; J. Neurosci., 2011）に B1 欠乏を誘導し、その性状を解析した。その結果、DIEDML マウスでは B1 欠乏を経験しても海馬依存性記憶障害は観察されず、しかも、海馬ニューロン欠落とスパイン密度の減少による海馬の神経変性も認められなかった。従って、CREB 活性化により B1 欠乏誘導性の記憶障害と海馬の神経変性の両方が妨げられることが明らかとなった。以上のように、本研究から、B1 欠乏が脳内炎症から CREB 情報伝達経路の障害に至る現象を引き起こし、その結果、慢性的な記憶障害が残ることが強く示唆された。ウェルニッケ・コルサコフ症候群による記憶障害のメカニズムは永く不明であったが、本研究から B1 欠乏が導く記憶障害の分子機構が初めて明らかとなった。

B1, memory impairments, CREB

講演番号：1E3p11
講演日時：3 月 24 日 16:00～ 1 号館 E3 会場

FOXO1 の転写活性を指標とした筋萎縮を抑制する化合物の探索 【ビタミン D による FOXO1 の抑制効果】
Screening of compounds regulating FOXO1 transcriptional activity 【Attenuation of FOXO1 by vitaminD】
○大西 拓己、松田 凛太郎、広瀬 優真、内冨 蘭、畑澤 幸乃、亀井 康富（京都府立大学）
○Takumi Onishi, Rintaro Matsuda, Yuma Hirose, Ran Uchitomi, Yukino Hatazawa, Yasutomi Kamei (Kyoto Prefectural University)

【背景・目的】骨格筋は人体最大の組織であり、運動や糖取込み、エネルギー代謝などの重要な役割を果たしている。骨格筋の萎縮は寝たきりや加齢などにより生じ、生活の質(QOL)を低下させる。また、加齢による筋萎縮はサルコペニアと呼ばれ、高齢者の自立的な活動を制限し QOL を低下させるため、超高齢社会で大きな問題となっている。そのため、筋萎縮を防ぎ、骨格筋を維持することは健康増進の観点から重要である。転写調節因子 FOXO1 は様々な筋萎縮時に骨格筋で発現増加する。FOXO1 はカテプシン L（リソソームタンパク質分解酵素）や Atrogin-1（ユビキチンリガーゼ）などの筋萎縮関連遺伝子の発現を誘導することが知られている。そのため FOXO1 が筋萎縮を引き起こす重要な因子であると考え、その転写活性を抑制することで筋萎縮が抑制できる可能性がある。そこで我々は FOXO1 の転写活性能を指標とした筋萎縮を抑制する化合物の探索を試みたところ、$1,25(OH)_2D_3$（活性型ビタミン D3）が検出された。本研究では、ビタミン D が筋萎縮を予防・改善するメカニズムとして FOXO1 との相互作用に着目して分子機序を解析することを目的とした。
【方法】＜FOXO1 の転写活性を抑制する化合物のスクリーニング＞
HEK293T 細胞に GAL4-FOXO1 融合タンパク質発現プラスミドと、レポーター（ルシフェラーゼ）の上流に UAS（GAL4 認識配列）を付加したプラスミドをトランスフェクションすることで FOXO1 の転写活性を測定した。この実験系を用いて食品・植物由来成分 520 種を使用して FOXO1 の転写活性を抑制する化合物のスクリーニングを行った。
＜ビタミン D による FOXO1 抑制効果の検討＞
C2C12 筋細胞に合成グルココルチコイドであるデキサメタゾン（DEX、筋萎縮誘導剤）及び、ビタミン D 代謝物を添加した。添加から 24 時間後に細胞を回収し、FOXO1 及びその標的遺伝子であるカテプシン L や Atrogin-1 などの筋萎縮時に増加する遺伝子の発現変化をリアルタイム PCR を用いて調べた。
【結果・考察】レポーターアッセイを用いて FOXO1 の転写活性を測定したところ、$1,25(OH)_2D_3$ が FOXO1 転写活性を抑制した。グルココルチコイドは骨格筋の萎縮を誘導し、また FOXO1 を活性化することが報告されている。C2C12 筋細胞において DEX によって FOXO1 の標的である筋萎縮関連遺伝子（カテプシン L、Atrogin1）の発現が増加し、$1,25(OH)_2D_3$ によってその発現増加が抑制された(Hirose, Onishi et al. **J Nutr Sci Vitaminol**, 2018)。さらに 25(OH)D や $24(R),25(OH)_2D_3$ といったその他のビタミン D 代謝物も DEX による Atrogin1 の発現増加を抑制した。以上の結果より、これらのビタミン D 代謝物は FOXO1 の転写活性やそのターゲット遺伝子である筋萎縮関連遺伝子を抑制することが示唆された。

FOXO1, atrophy, vitaminD

発表責任者：亀井康富（kamei@kpu.ac.jp）

講演番号：1E3p12
講演日時：3 月 24 日 16:11～ 1 号館 E3 会場

海馬神経新生エンハンサーメマンチンによるニコチン依存性記憶忘却の促進

Forgetting of nicotine addiction memory by hippocampal neurogenesis enhancer memantine

○南 朱夏、喜田 聡（東農大院）
○Ayaka MINAMI, Satoshi KIDA (Tokyo Univ. of Agric.)

現代の大きな社会問題である薬物依存症は快情動の記憶に基づく疾患である。依存症の機構解明も進んでいるが、その解決方法は未だ認知行動療法を主流としており、効果的な改善方法は開発されていない。条件づけ場所嗜好性課題は、薬物摂取による快感と文脈（場所）の関連づけを記憶し、嗜好性記憶を形成させる課題であり、薬物依存性を検証するモデルである。一方、我々のグループでは、トラウマ記憶を原因として発症する心的外傷後ストレス障害の改善方法を開発するため、海馬神経新生エンハンサーによる記憶忘却効果を利用してトラウマ記憶を忘却する PTSD 改善方法を提言し、マウスモデルを用いてその有用性を実証してきた（elife 2016, Psychopharmacology 2018）。そこで、本研究では、薬物依存症治療法提案を目的として、海馬神経新生エンハンサーによる忘却効果を利用して、トラウマ記憶忘却と同様に、マウスにおける薬物に対する快情動記憶の忘却を誘導できないかを検討した。海馬神経新生エンハンサーとして、NMDA 受容体非競合的阻害剤であり認知症治療薬でもあるメマンチンを用い、薬剤依存症モデルとして、ニコチン誘導性の条件づけ場所嗜好性課題を用いた。黒い壁に囲まれた黒箱と白い壁に囲まれた白箱が連結しており、黒箱と白箱を自由に往来できる解析装置を用い、まず、マウスに解析装置内を 1 日 20 分自由に探索させて、場所に対する馴化学習を 4 日間行った。5 日目から、箱の間に仕切りを入れて往来をできなくした状態で、ニコチン（3 mg/kg）投与後 20 分間白箱に滞在させ、この 6 時間後に溶媒投与後 20 分間黒箱に滞在させた。ニコチン依存性場所嗜好性記憶を形成させるために、この条件づけを 5 日間行い（ニコチン群）、対照群には溶媒のみを投与した（トレーニング）。10 日目に仕切りを取り除いた状態でマウスを解析装置に入れ、黒箱と白箱における滞在時間を測定した（テスト）。その結果、ニコチン群では白箱における滞在時間が対照群よりも有意に長くなり、ニコチン依存性場所嗜好性記憶が認められた。その後、メマンチン（50 mg/kg）を 1 週間毎に計 4 回腹腔内投与し、メマンチン投与によるニコチン依存性記憶の忘却効果を解析した。メマンチン最終投与から 1 週間後に、テストと同様に場所嗜好性記憶を評価した結果、メマンチンを投与されたニコチン群では、溶媒を投与されたニコチン群よりも白箱に滞在した時間が有意に短かくなり、場所嗜好性記憶の忘却が認められた。以上の結果から、神経新生エンハンサーによる忘却効果により、薬物依存的記憶の忘却が促進されることが初めて示唆され、新たな視点からの薬物依存症改善策開発の可能性が示された。

nicotine, memantine, addiction

講演番号：1E3p13
講演日時：3 月 24 日 16:22～ 1 号館 E3 会場

海馬神経新生エンハンサーメマンチンによる社会的敗北ストレス後の PTSD 様行動異常の改善

Improvement of social defeat stress-induced PTSD-like behaviors by hippocampal neurogenesis enhancer

○石川 理絵、内田 千晶、喜田 聡（東農大・生命科学・バイオ）
○Rie ISHIKAWA, Chiaki UCHIDA, Satoshi KIDA (Tokyo Univ. of Agric.)

心的外傷後ストレス障害（PTSD）は恐怖体験の記憶（恐怖記憶）を原因とする精神疾患であり、恐怖記憶のフラッシュバックが繰り返され、不安障害等の精神症状を発症する。現在、PTSD の主要な治療方法は認知行動療法であり、他は対処療法しかなく、簡便な治療方法開発が待たれている。我々は PTSD の改善方法開発を目指して、認知症治療薬であり、海馬神経新生を劇的に亢進する NMDA 受容体非競合的阻害剤メマンチン（MEM）を神経新生エンハンサーとして、海馬神経新生亢進が恐怖条件づけ記憶の忘却を促進することを示し、海馬神経新生亢進によって恐怖記憶を忘却させる PTSD 改善方法を提言した（eLife 2016, Psychopharmacology 2018）。しかし、恐怖条件づけ記憶は世界的に PTSD モデルとして用いられているものの、恐怖条件づけ後に不安様症状が認められないため、妥当性の高いモデルとは言い難い。一方、マウス社会的敗北ストレス課題では、攻撃性の高いマウスに繰り返し攻撃を受けることで、このマウスに対する社会忌避のみならず、慢性的な不安行動の亢進、すなわち、PTSD 様症状が引き起こされる。そこで、本研究では、忘却促進による PTSD 改善方法の有用性を検討するため、より妥当性の高い PTSD モデルとしてこの社会的敗北ストレス課題に着目し、この課題における PTSD 様症状に対する MEM 投与の効果を解析した。1 日 10 分間、10 日間連続で C57BL/6 雄マウスに攻撃性の高い ICR 雄マウスからの攻撃を受けさせた（Social Defeat 処置; SD 処置；トラウマ体験モデル）。その後、筒に入れた ICR マウスを配置したオープンフィールド内でマウスを探索させて、ICR マウスに対する忌避行動、すなわち、社会忌避記憶を測定した。その結果、SD 処置群は対照群と比較して、ICR マウス近辺の滞在時間の有意な減少と遠方の滞在時間の有意な増加が観察され、社会忌避記憶の形成が観察された。さらに、高架式ゼロ迷路課題による不安行動評価では、SD 群では対照群に比較してオープンセクションにおける滞在時間と侵入回数の有意な低下が観察され、PTSD 様の不安行動も認められた。その後、MEM（50 mg/kg）を 1 週間毎に計 4 回投与した結果、社会忌避記憶の忘却（遠方滞在時間の有意な減少）と不安行動の改善（オープンセクション滞在時間と侵入回数の有意な増加）が観察された。さらに、その後、単回の SD 処置を受けても社会忌避記憶の回復が認められなかった。以上の結果から、MEM 投与が社会忌避記憶の忘却のみならず、ストレス誘導性の不安行動も改善することが示唆され、忘却促進による PTSD 改善方法の有用性が強く示唆された。

PTSD, memantine, social defeat stress

講演番号：1E4a01
講演日時：3 月 24 日 09:00～ 1 号館 E4 会場

FRET 型プローブを用いた endo-α-mannosidase の活性評価

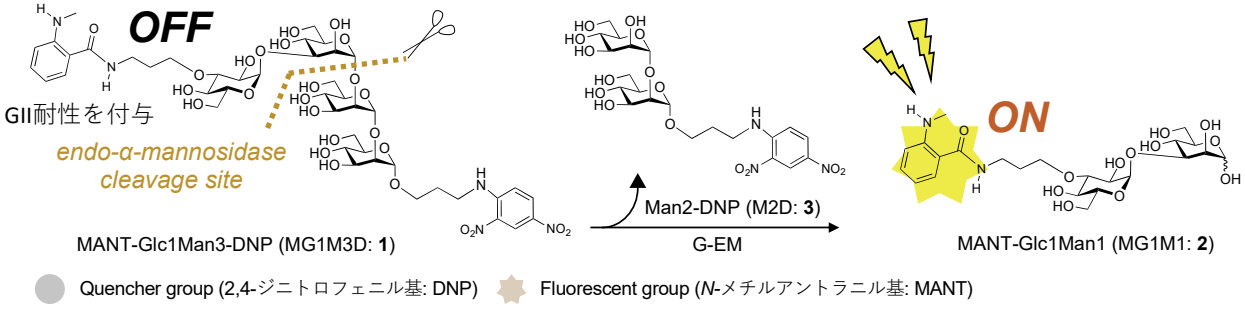
Monitoring the hydrolysis activity of endo-α-mannosidase by using FRET probes

○佐野 加苗[1]、栗原 大輝[2]、黒岩 歩美[1]、石井 希実[1]、戸谷 希一郎[2]、吉原 利忠[1]、松尾 一郎[1]
([1]群馬大院理工、[2]成蹊大理工)
○Kanae SANO[1], Taiki KURIBARA[2], Ayumi KUROIWA[1], Nozomi ISHII[1], Kiichiro TOTANI[2], Toshitada YOSHIWARA[1], Ichiro MATSUO[1] ([1]Gunma Univ., [2]Seikei Univ.)

【背景】Golgi Endo-α-mannosidase(G-EM)は、ゴルジ体に局在するエンド型の糖加水分解酵素で、アスパラギン(*N*-)結合型糖鎖構造のグルコシルマンノース残基を切断する[1]。この基質特異性から、ゴルジ体内に誤って輸送された小胞体型の糖鎖を有する糖タンパク質を正常なプロセシング経路へと導く役割を担うと考えられている。近年、小胞体内において G-EM と同様の酵素の存在が議論されており、新生糖タンパク質の品質管理機構との関係が注目されている。

G-EM の活性測定については、蛍光基として 4-メチルウンベリフェロンを導入した 2 糖基質[2]や、蛍光基としてダンシル基が導入された 4 糖基質[3]を用いた方法がこれまでに報告されている。しかし、細胞内での酵素活性を測定した例はない。そこで本研究では細胞内 G-EM 活性測定を志向して、FRET ペアーとなる 2 つの蛍光基を同一分子内に導入[4]、酵素の活性により糖鎖基質が切断されると感度良く蛍光を発する新規 G-EM 活性測定プローブ **1**(MANT-Glc1Man3-DNP)を合成した。

【結果】G-EM の認識に必要な 4 糖構造を構築後、非還元末端のグルコース残基にアミノプロピル基を介して *N*-メチルアントラニル(MANT)基を、還元末端部分のマンノース残基のアノマー位にアミノプロピル基を介して 2,4-ジニトロフェニル(DNP)基を導入した。プローブ **1** の MANT の蛍光寿命を測定した結果、FRET クエンチング効率が約 94%であり、MANT の蛍光はほぼ消光されていることが確認された。プローブ **1** に対し G-EM を作用させて HPLC とマイクロプレートリーダーで反応を追跡した。その結果、HPLC により 2 糖単位でプローブが切断されることを確認した。マイクロプレートリーダーにより蛍光強度の増大を確認、酵素反応の追跡が可能であることを確認した。また、プローブ **1** はグルコシダーゼ II に対して耐性を有することから細胞内での酵素活性検出の可能性が示唆された。



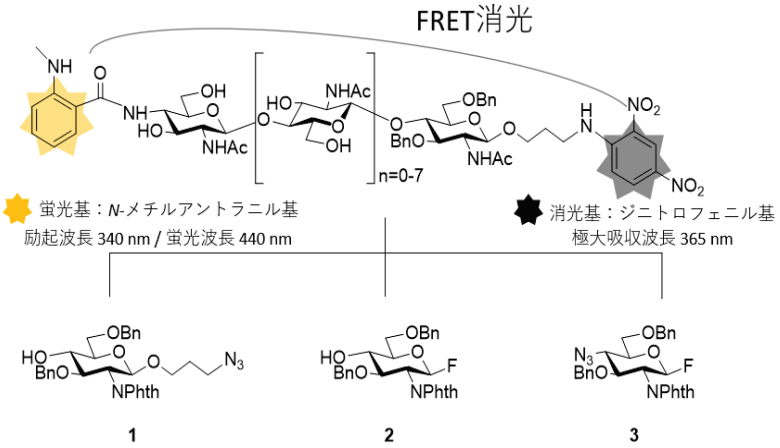
参考文献:[1] M. J. Spiro *et al*., *J. Biol. Chem*., **1997**, *272*, 29356-29363., [2] C. Vogel *et al*., *J. Carbohydr. Chem*., **2000**, *19*, 1247-1258., [3] S. Iwamoto *et al*., *ChemBioChem*, **2017**, *18*, 1376-1378.,[4] N. Ishii *et al*., *ChemBioChem*, **2018**, *19,* 660-663.

endo-α-mannosidase, FRET probe

講演番号：1E4a02
講演日時：3 月 24 日 09:11～ 1 号館 E4 会場

N-アセチルグルコサミンオリゴマーを用いた FRET クエンチング効率の検証
Systematic synthesis of GlcNAc oligomer for analysis of FRET quenching efficiency
○白井 彰、佐野 加苗、松尾 一郎（群馬大院）
○Sho SHIRAI, Kanae SANO, Ichiro MATSUO (Division of Molecular Science, Gunma Univ.)

【背景】我々は、エンド-β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ(ENGase)に対し高感度かつ簡便に酵素活性検出が行なえる糖鎖プローブを開発した。これは FRET クエンチングペアーとなる消光基と蛍光基を導入することで ENGase により糖鎖部分が切断されると蛍光を発し、酵素反応が追跡できることを明らかにした [1), 2)]。しかし糖鎖プローブにおける蛍光基と消光基の分子間距離と消光率の相関について詳細な検討は行なっていなかった。本研究では、*N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)のオリゴマーを系統的に合成した後、糖鎖還元末端部分に消光基を、非還元末端部分に蛍光基を導入し、分子間距離の異なるプローブを合成することで蛍光基と消光基の分子間距離と消光率との関係を明らかにすることとした。
【結果】分子間距離を制御するにあたり直鎖上の構造をとると考えられる GlcNAc のオリゴマーを用いることとした [3), 4)]。重合度が異なる GlcNAc のオリゴマーを効率よく得るために、連続的グリコシル化反応を検討した。具体的には、糖受容体 **1**、糖受容体と糖供与体の両方の役割を担う化合物 **2**、糖供与体 **3** をそれぞれ合成後、糖受容体 **1** に対して **2** を反応させることでグルコサミン 2-8 残基からなるオリゴ糖と未反応の単糖 **1** からなる混合物を得た。続いて、その混合物と糖供与体 **3** を反応させることで、還元末端部分にアジドプロピル基を、非還元末端部分にアジド基を有するグルコサミンオリゴマー(2-9 残基)を得た。この混合物をゲル濾過クロマトグラフィーにて分離後、それぞれ保護基の除去、還元末端部分のアミノ基に対し選択的に消光基を、非還元末端部分のアミノ基に蛍光基を導入し、糖鎖プローブへと導いた。得られた糖鎖プローブ上の蛍光基の蛍光寿命を測定することで分子間距離と消光率との相関を調べた。



1)N. Ishii.; *et al.*, *ChemBioChem*, **2018**, *19*, 660-663. 2) https://www.tcichemicals.com/ja/jp/support-download/brochure/GG022.pdf. 3)O. Kanie.; *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, *13*, 3891. 4) H. Hashimoto.; *et al.*, *J. Carbohydr. Chem.*, **1989**, *8*, 307-311.

fret, sequential glycosylation, chitooligosaccharide

発表責任者：松尾一郎（matsuo@gunma-u.ac.jp）

講演番号：1E4a03
講演日時：3 月 24 日 09:22～ 1 号館 E4 会場

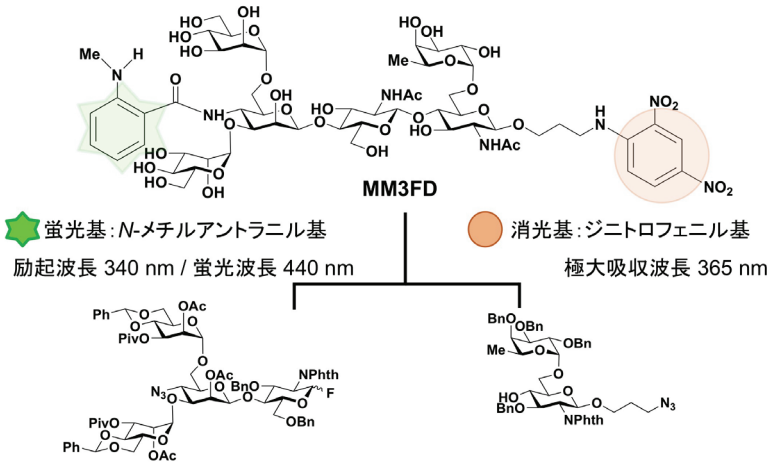
コアフコースを有する糖鎖に作用する ENGase 探索に向けた蛍光プローブの合成

Fluorescent probe for detection of ENGase activity acting on core fucosylated N-glycan

○松尾 一郎[1]、石井 希実[1]、永田 光穂[1]、佐野 加苗[1]、加藤 紀彦[2]、山本 憲二[3]、飯野 健太[4]、松崎 祐二[4]、西川 宜秀[4]（[1]群馬大理工、[2]京大生命科学、[3]石川県立大生物資源、[4]東京化成工業）
○ Ichiro Matsuo[1], Nozomi Ishii[1], Mitsuo Nagata[1], Kanae Sano[1], Toshihiko Katoh[2], Kenji Yamamoto[3], Kenta Iino[4], Yuji Matsuzaki[4], Yoshihide Nishikawa[4] ([1]Gunma Univ., [2]Kyoto Univ., [3]Ishikawa Pref. Univ., [4]Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.)

【背景】抗体医薬品など糖タンパク質製剤上のアスパラギン（*N*-）結合型糖鎖の構造を均一化する方法としてエンド型の糖質関連酵素 Endo-β-*N*-acetylglucosaminidase（ENGase）による糖鎖リモデリング技術が研究されている。[1] ENGase は *N*-結合型糖鎖の還元末端部分にあるキトビオース構造の β1–4 結合したグルコサミン残基間を加水分解するが、抗体や糖タンパク質上に頻出するコアフコースが結合した *N*-結合型糖鎖に作用する ENGase は限られている。そのため、糖タンパク質上のコアフコース結合糖鎖に効率よく作用する ENGase 探索が進められている。[2,3] 近年、我々は蛍光検出を基盤とする高感度かつ簡便な ENGase 活性測定法の確立を目的に、ENGase が認識する *N*-結合型糖鎖還元末端構造に対応する 5 糖部分を合成し、その還元末端部分に消光基、非還元末端部分に蛍光性置換基を導入、ENGase により糖鎖部分が切断されると蛍光を発する FRET 型 ENGase 基質：MM3D を開発した。[4,5] 本研究では、同様の作動原理でコアフコース結合糖鎖に作用する ENGase の活性検出が可能な新規 FRET 型 ENGase 基質を合成、酵素活性検出に用いた結果について報告する。

【結果】フコースが結合した 6 糖構造の合成は非還元末端部分の 4 糖構造とフコース残基が結合した 2 糖を合成後、カップリングすることで得た。得られた 6 糖の保護基を除去した後に、還元末端部分のアミノプロピル基上のアミノ基に対して選択的にジニトロフェニル（DNP）基を導入、その後 β-マンノース残基の 4 位に導入したアミノ基に対して N-メチルアントラニル（MANT）基を導入、FRET 型基質：MM3FD へと導いた。得られた基質を用いてフコースが結合した糖鎖に作用する ENGase：endo-M 変異体（W251N）の酵素活性を測定した結果、酵素量依存的に蛍光強度の上昇を確認、酵素活性の検出が可能であることを確認した。



[1] A. Fairbanks. Chem. Soc. Rev., 2017, 46, 5128-5146.; [2] T. Katoh *et al*., *J. Biol. Chem,* 2016, 291, 23305-23317.; [3] Y. Uang *et al*., *Scentific Rep*, 2018, 8, 246, DOI:10.1038/s41598-017-17467-y.; [4] N. Ishii *et al*., *ChemBioChem*, 2018, 19, 7, 660-663.; [5] https://www.tcichemicals.com/eshop/ja/jp/commodity/M3174/

ENGase, Fluorescent probes, N-Glycan

発表責任者：松尾一郎（matsuo@gunma-u.ac.jp）

講演番号：1E4a04
講演日時：3 月 24 日 09:33～ 1 号館 E4 会場

シャペロン融合型 EDEM タンパク質の発現と精製

Expression and purufication of chaperone-fused EDEM proteins

○相川 順一、伊藤 幸成 (理研開拓研究本部)
○Junichi Aikawa, Yukishige Ito (RIKEN)

＜目的＞

アスパラギン結合型糖鎖(*N*-glycan)を持つ糖タンパク質は、粗面小胞体（ER）における品質管理機構により機能的なものが選別され、最終的に細胞外や細胞表層などに輸送される。一方、不適切な折りたたみをされたと判断された糖タンパク質は ER-associated degradation により、細胞質に移行し、その後分解される。ここで、ER における糖タンパク質の *N*-glycan はハイマンノース型であり、それらは Glycoside Hydrolase Family 47(GH47)に属する蛋白によっても認識、切断されると考えられる。

そこで、本研究では、GH47 に属するタンパク質のうち、ER degradation-enhancing mannosidase-like protein (EDEM)がハイマンノース型 *N*-glycan を有する糖タンパク質と相互作用する機構を探求するため、組換え型 EDEM を調製することを目的とした。昨年度の大会では、界面活性剤存在下で発現させた S-S 結合形成に関わる酵素と EDEM との融合タンパク質を直接酵素活性測定の系に供したが、活性が検出されなかった。そこで、今回は界面活性剤非存在下で融合蛋白質として発現させ、精製を行ったので、報告する。

＜方法＞

EDEM1/2 を Trx, DsbA 及び DsbC との融合タンパク質の形で発現可能なプラスミド DNA を構築し、再構成型無細胞タンパク質合成系 PURExpress®の鋳型に供した。得られた反応液の可溶性画分から、ポリペプチドを TALON レジンにより精製した。

＜結果＞

発現された EDEM 融合タンパク質の中には界面活性剤なしでも可溶性画分に回収されるものがあった。さらに、アフィニティー精製を行い、溶出画分に融合タンパク質を回収した。現在、EDEM 融合タンパク質を含む溶出画分を酵素源として、活性測定の系に供し、活性検出を試みている。

[1] *Glycoconj. J.* **29**, 35-45 (2012); *J. Biochem.* **155**, 375-384 (2014)

mannosidase, ERAD, chaperone

発表責任者：相川　順一（aikawa@riken.jp）

講演番号：1E4a05
講演日時：3 月 24 日 09:44～ 1 号館 E4 会場

EDEM タンパク質の人工糖鎖基質に対する活性評価
Activities of EDEM proteins toward glycan substrates
○山口 実愛[1]、菊間 隆志[1]、瀬古 玲[2]、伊藤 幸成[2,3]、武田 陽一[1]([1]立命館大生命科学、[2]JST-ERATO、[3]理研)
○Mia YAMAGUCHI[1], Takashi KIKUMA[1], Akira SEKO[2], Yukishige ITO[2,3], Yoichi TAKEDA[1] ([1]Ritsumeikan Univ., [2]JST-ERATO, [3]RIKEN)

多くの分泌タンパク質は小胞体(ER)内で特定のアスパラギン残基に糖鎖（*N* 結合型糖鎖）が付加される。この糖鎖の構造を指標として ER 内に存在する酵素やレクチンが働きタンパク質はフォールディングされ、正しい高次構造をとったタンパク質のみがゴルジ体を経てそれぞれの場所へ輸送される。一方、正しくフォールディングされなかったタンパク質は細胞質へ逆行輸送され、プロテアソームによって分解される。このような ER 内で行われるタンパク質のフォールディングや選別は ER における糖タンパク質品質管理機構と呼ばれる。タンパク質が分解経路に導かれ、分解される現象は小胞体関連分解(ERAD: ER associated degradation)と呼ばれ、ERAD への選別には *N* 結合型糖鎖の構造が重要であると考えられている。

EDEMs(ER degradation enhancing α-mannosidase-like proteins)はミスフィールディングしたタンパク質の ERAD を促進する。また、EDEMs は ERα-mannosidase I(ER ManI)と同様にクラス I α-1,2 マンノシダーゼモチーフを有しており、これらのタンパク質における *N*結合型糖鎖のマンノースをトリミングすると考えられている。しかし、in vitro における EDEMs のマンノシダーゼ活性は未だ確認されておらず、ERAD へと導く詳細な分子機構は不明である。そこで本研究では EDEMs のマンノシダーゼ活性の有無を明らかにすることを目的とした。

EDEMs の N 末端に 3×FLAG 配列が付加される発現プラスミドをヒト胎児由来腎臓上皮細胞(293T 細胞)にトランスフェクションし、組換えタンパク質として EDEMs を調製した。EDEMs とマンノースを 9 個有する *N* 型糖鎖 Man9GlcNAc2 誘導体を様々な緩衝液および pH 条件下で反応させ、マンノースのトリミングを評価した。

MES 緩衝液(20 mM MES, 150 mM NaCl, 5 mM $CaCl_2$, 0.05% Triton-X100, (pH7.0))中で EDEM1、EDEM2 をそれぞれ BODIPY 標識された N 型糖鎖 Man9GlcNAc2 (Man9GlcNAc2-BODIPY) と反応させ HPLC により検出した結果、Man9GlcNAc2-BODIPY に加え Man8GlcNAc2-BODIPY のピークが検出されたことから、マンノースのトリミングが起きていることが示唆された。また、EDEM2 は pH を 5.5 に下げることでさらに Man7GlcNAc2-BODIPY へのトリミングが確認された。マンノシダーゼ活性が報告されている ER ManI を用いた場合においても pH の低下に伴いマンノースのトリミングが亢進した。本発表では、EDEMs の推定活性部位残基を置換した変異 EDEMs でのトリミング活性についても併せて報告する。

EDEM, ER associated degradation, High mannose-type glycan

発表責任者：武田陽一（yotakeda@fc.ritsumei.ac.jp）

講演番号：1E4a06
講演日時：3 月 24 日 10:05～ 1 号館 E4 会場

O-マンノシルグリカンの部分構造，Xylβ1-4Rbo5-P-1Rbo の合成

Synthesis of Xylβ1-4Rbo5-P-1Rbo, partial structure of *O*-mannosylglycan

○田村 敬裕、田村 純一（鳥取大院農）
○Takahiro TAMURA, Jun-ichi TAMURA (Dep. Agric., Tottori Univ.)

ジストログリカン (DG)はジストロフィン–糖タンパク質複合体の成分として骨格筋に存在する．DG はαとβの二つのサブユニットからなり，α-DG は高度に糖鎖で修飾されている．*O*-マンノシルグリカン(MG)はα-DG を修飾する糖鎖の一つであり，α-DG の糖鎖修飾は筋ジストロフィー症と密接な関係にある．*O*-MG の非還元側に位置するキシロース(Xyl)–グルクロン酸からなる繰返し二糖は，細胞外マトリックスとの結合におけるリガンドの役割を果たしており，筋繊維の安定化に寄与している．

近年, *O*-MG の core M3 の全体構造が報告された [1]. *O*-MG の形成はα-DG の Ser/Thr 残基に対して，POMT によりマンノースが転移されることから始まり [2]，相当する糖転移酵素によって逐次伸長される．*O*-MG が細胞外マトリックスと結合するためには，正常な糖鎖伸長が不可欠である．本研究では *O*-MG の再構築による構造決定と糖転移酵素の基質特異性などの生合成機構の解明のために *O*-MG の部分構造を精密化学合成することとした．

リボースを出発原料として，4 位遊離のリビトール(Rbo)誘導体を 8 工程で合成した．その Rbo 誘導体とキシロシルクロリドを AgOTf と collidine 存在下，1,2-ジクロロエタン中で縮合させることで，β選択的に Xyl1-4Rbo を高収率で得た．さらに，別の Rbo 誘導体の 1 位を選択的に亜リン酸化し，ホスホロアミダイト法を用いて Xyl1-4Rbo と縮合させた．その後，適切に脱保護を行い標的化合物である Xylβ1-4Rbo5-P-1Rbo を合成した．

1）M. Kanagawa et al., *Cell Rep.*, 2016, **14**, 2209-2223.
2）H. Manya et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, **101**, 500-505.

dystroglycan, mannosylglycan, glycosylation

講演番号：1E4a07
講演日時：3 月 24 日 10:16～ 1 号館 E4 会場

GH127 β-L-アラビノフラノシダーゼ阻害剤の合成検討

Synthetic study on GH127 ß-L-arabinofuranosidase inhibitor

○石渡 明弘[1]、成田 覚[1,2]、藤田 清貴[3]、澤野 孝太[4]、伏信 進矢[1]、伊藤 幸成[1] ([1]理研、[2]芝浦工大院理工、[3]鹿児島大院農、[4]東大院農)
○ Akihiro ISHIWATA[1], Satoru NARITA[1,2], Kiyotaka FUJITA[3], Kota SAWANO[4], Shinya FUSHINOBU[1], Yukishige ITO[1] ([1]RIKEN, [2]Shibaura Inst. of Technol., [3]Kagoshima Univ., [4]Univ. of Tokyo)

Bifidobacterium longum より、近年、植物細胞壁に含まれるβ-L-アラビノオリゴ糖を加水分解する酵素群が見出された [1,2]。そのうち、GH127 に属する新規β-L-アラビノフラノシダーゼ (HypBA1) は、３残基のシステイン残基が２価亜鉛イオンに配位した特異な活性中心構造を有し、そのうちの一つのシステイン残基が求核性残基として機能する新規触媒機構をもつと提唱されている [2]。すでに我々は立体選択的グリコシル化の手法にて、*p*-ニトロフェニル β-L-アラビノフラノシド [3]、各種オリゴアラビノフラノシドを合成し、HypBA1 の新規触媒機構をサポートする知見を得ている。今回、その触媒機構のさらなる検証のために、アラビノフラノース構造を有し、１位に窒素官能基を導入した競合及び非競合阻害を考慮した L-アラビノフラノース誘導体プローブのデザインと合成検討をおこなったので報告する。

L-アラビノフラノース構造を選択的に合成した後に、アジド基として１位に窒素官能基を導入し、まずアラビノフラノシルアジドの合成を行った。また、１位アジド体より還元―アミド化にてアミド型プローブを合成する手法および、保護された L-アラビノフラノースのヘミアセタール体よりオキシムを経由し誘導する手法をすすめることとした。競合型として期待される、１位にアセトアミド基を有する非分解性プローブ、酸塩基触媒との相互作用可能なヒドロキシモラクトン体プローブを調整し、次に、推定求核残基のシステインを共有結合で捕捉可能な非競合型のハロアセチル基を有する L-アラビノフラノシルアミン誘導体プローブ両アノマーを立体選択的に合成した。β-L-アラビノフラノシダーゼに対する阻害活性についても現在検討中であり、合わせて報告したい。

1) Fujita, K. et al. *JBC* **2014**, *289*, 5240; 2) Ito, T. et al. *BBRC* **2014**, *447*, 32; 3) Kaeothip S. et al. *CR* **2013**, *382*, 95.

synthetic carbohydrate chemistry, glycoside hydrolase, bifidobacterium longum

発表責任者：石渡明弘（aishiwa@riken.jp）

講演番号：1E4a08
講演日時：3 月 24 日 10:27～ 1 号館 E4 会場

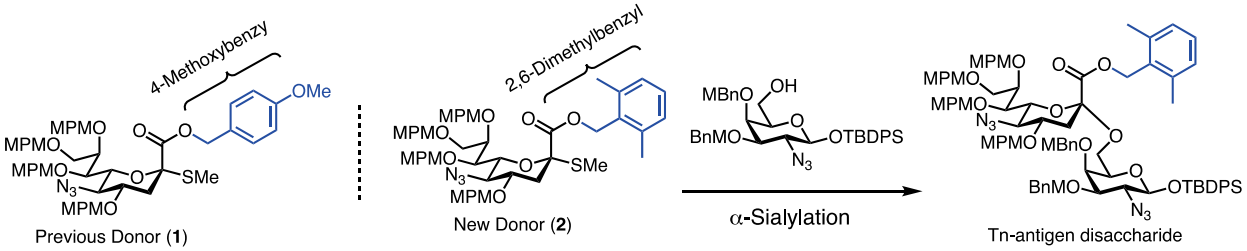
糖ペプチド合成を志向したシアル酸カルボキシ保護基の検討

Study of Sialic Acid Carboxy Protecting Group Toward Glycopeptide Synthesis.

○伊藤 駿、朝比奈 雄也、北條 裕信（大阪大学蛋白質研究所）
○Shun ITO, Yuya ASAHINA, Hironobu HOJO (Institute for Protein Research, Osaka University)

シアル酸含有糖ペプチドの化学合成は、極めて酸に不安定なシアリル結合の欠損を最小限に抑えつつ、如何に完全脱保護体を得るかが課題である。そこで、我々は、トリフルオロ酢酸（TFA）感受性保護基である 4-methylbenzyl (MBn) 基と 4-methoxybenzyl (MPM) 基を、シアリル糖ペプチド合成に利用する方法論を報告した。これら保護基は、糖鎖骨格構築のためのグリコシル化や、保護基操作の条件下では安定な保護基として機能し、なおかつ、固相合成後には、一般的なペプチド脱保護に利用される TFA カクテルにより、1 工程で除去することができた。加えて、この保護基戦略であれば、シアル酸の脱落を生じることなく完全脱保護体を得ることも可能であり、汎用的なシアル酸含有糖ペプチドの合成法になることが期待される。しかし、先行研究では、シアル酸のグリコシル化反応中に、**1** のエステル部分の MPM 基が糖受容体水酸基に転移する副反応が生じてしまい、収率の低下の要因となっていた。この副反応は、MPM エステルが、グリコシル化系中の酸性条件で、不安定すぎることが原因であると考えられる。そこで、本研究では、グリコシル化反応中の酸性条件では、MPM エステルよりも安定で、なおかつ、TFA による最終脱保護反応では除去できる中間的な安定性を持つエステル型保護基を選定し、α-シアリル化と最終脱保護の再検討を行うことにした。

上記の要件を満たすと予想される 2,6-dimethylbenzyl (DMBn) 基をシアル酸カルボキシ基の保護基として選定した。まず、誘導体 1 から DMBn 保護シアル酸 **2** を調製し、GalNAc とのグリコシル化を検討した。その結果、今まで問題となっていたカルボン酸保護基の転位反応を起こすことなく、シアリル Tn 型 2 糖を高収率およびα:β=10:1 の立体選択性にて調製することに成功した。次に、最終脱保護時に、DMBn 基が従来の MPM 基と同様に除去できるのか検証を行った。得られた DMBn エステル 2 糖を Fmoc-糖アミノ酸へ誘導体し、続く、ペプチド固相合成により得られた糖ペプチド樹脂を TFA カクテル処理を行った。その結果、以前の MPM 保護法と同じように、糖鎖とペプチドの保護基を一挙に脱保護できることが見出された。



Sialic acid, Glycosylation, Glycoprotein

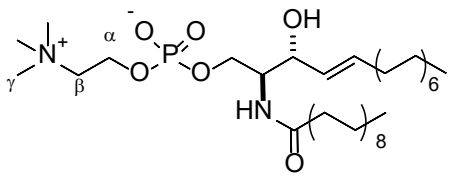
講演番号：1E4a09
講演日時：3 月 24 日 10:38～ 1 号館 E4 会場

脂質膜上でのスフィンゴ脂質頭部基の NMR 配向解析
NMR analysis of the sphingolipid headgroups in bilayer membrane

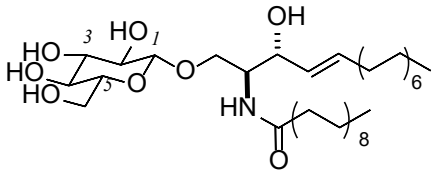
○花島 慎弥、村田 道雄（阪大院理）
○Shinya Hanashima, Michio Murata (Osaka Univ. Dept. Sci.)

細胞膜上に存在する機能ドメインとしての脂質ラフトは、スフィンゴ脂質とコレステロール(Cho)のようなラフト脂質と、GPI アンカー型タンパク質や Src ファミリーキナーゼのようなラフト局在性のタンパク質からなる一過性のドメインと考えられてきた。このようなドメイン中のスフィンゴミエリン（SM）やスフィンゴ糖脂質は、コレラ毒素やライセニンのような細胞毒性を示すタンパク質と頭部基を介して結合することが知られている。Cho は脂質ラフト中でスフィンゴ脂質と相互作用することで[1]、脂質分子の密度と頭部基の構造や配向を制御して脂質頭部とタンパク質間の相互作用を制御していると考えられるが、その詳細は不明な点が多く残されている。今回発表者らは、各種重水素化脂質分子を合成して、頭部基の異なる二つのスフィンゴ脂質、SM とグルコシルセラミド(GlcCer)の構造と配向を固体 NMR を用いて解析したので報告する。

SM 頭部のコリン Cα, Cβ, Cγ 位の水素を位置選択的に重水素化した標識体を合成して、SM 単独または SM/Cho (1:1)でリポソーム膜を作成して重水素固体 NMR を測定した。その結果、Cho 存在下では Cβ と Cγ 位のシグナルが大きく変化したことから、Cho との相互作用がコリン先端部の構造変化を引き起こすことが示唆された[2]。一方、GlcCer に関してはグルコース 1 位重水素化標識体を合成して、ジミリストイルホスファチジルコリン(DMPC)との混合膜、または GlcCer/DMPC/Cho 膜を作成して固体 NMR を測定した。その結果、Cho による頭部基の配向変化に帰着するようなシグナル変化は観測されなかった。このことは、頭部基の構造により Cho の効果が異なることを示している。



Sphingomyelin (SM)



Glucosylceramide (GlcCer)

［文献］

[1] Y. Yano, S. Hanashima, T. Yasuda, H. Tsuchikawa, N. Matsumori, M. Kinoshita, Md. A. Al Sazzad, J. P. Slotte, M. Murata. *Biophys. J.* **2018**, *115*, 1530-1540.
[2] S. Hanashima et al., submitted.

sphingolipid, cholesterol, NMR

発表責任者：花島慎弥（hanashimas13@chem.sci.osaka-u.ac.jp）

講演番号：1E4a10
講演日時：3 月 24 日 10:49～ 1 号館 E4 会場

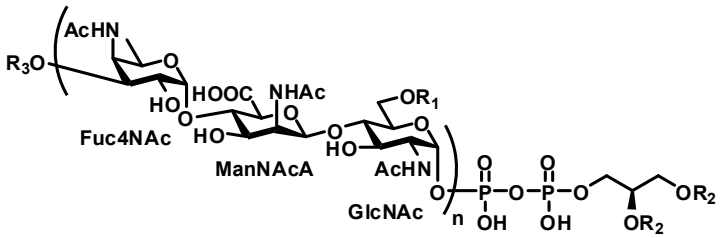
大腸菌の膜タンパク質膜挿入機構解明を目指した蛍光標識 MPIase 類縁体の合成

Synthesis of fluorescently labeled MPIase derivatives for elucidation of the membrane protein integration mechanism in *E.coli*

○藤川 紘樹[1]、梅川 雄一[1]、鈴木 苑実[2]、西山 賢一[2]、島本 啓子[1] ([1](公財)サントリー生命科学財団、[2]岩手大農)
○ Kohki FUJIKAWA[1], Yuichi UMEGAWA[1], Sonomi SUZUKI[2], Ken-ichi NISHIYAMA[2], Keiko SHIMAMOTO[1] ([1]Suntory Foundation for Life Sciences, [2]Iwate Univ. of Agric.)

【目的】膜タンパク質は、細胞内外の情報伝達や代謝物の輸送などに関与し、全ての生物に存在している。これまでに、我々は大腸菌の膜タンパク質膜挿入に必須な糖脂質MPIase (Membrane Protein Integrase)を発見し[(1, 2)]、その作用機構解明に向けて、MPIaseの最小構成単位である3糖ピロリン脂質(mini-MPIase-3)の化学合成を報告してきた[(3)]。本発表では、膜上でのMPIaseの挙動観察やMPIaseと基質タンパク質、トランスロコン、膜シャペロンなどとの相互作用解析に有用な蛍光標識化された3糖ピロリン脂質(FL-mini-MPIase-3)の合成を行ったので報告する。

【方法及び結果】これまでに報告したmini-MPIase-3の合成戦略を基に、蛍光標識化や糖鎖伸長に対応した新戦略を立案した。蛍光官能基は、活性に重要な官能基を持たないフコサミンの3位水酸基を足がかりに導入する事とし、フコサミンの3位水酸基に選択的な脱保護が可能なアリル基をもったフコサミンドナーを設計した。またグルコサミンアクセプターは、今後のαグルコサミニド結合の構築を見据えてS.-C. Hungらの報告[(4)]を参考に、グルコサミンの2位にアジド基、3位にブロモベンジル基、6位にTBDPS基をもったユニットを設計した。新しい単糖ユニットを用いた3糖骨格の構築、アジド基のアセトアミド基への変換、フコサミン3位水酸基へのリンカーの導入、ピロリン脂質の導入、脱保護、蛍光官能基の導入を検討する事で、蛍光標識化された3糖ピロリン脂質(FL-mini-MPIase-3)の合成を達成した。



MPIase : n=9-11, R_1=Ac or H, R_2=C16:1, C16:0, C18:1, C18:0 etc., R_3=H
mini-MPIase-3 : n=1, R_1=Ac, R_2=C14:0, R_3=H
FL-mini-MPIase-3 : n=1, R_1=Ac, R_2=C14:0, R_3= linker with Fluorescent group

【参考文献】

(1) Nishiyama K. et al. *J. Biol. Chem.*, **2006**, *281*, 35667-35676. (2) Nishiyama K. and Shimamoto K. et al. *Nat Commun*, **2012**, *3*, 1260. (3) Fujikawa K. and Shimamoto K. et al. *ACS Chem. Biol.*, **2018**, *13*, 2719-2727. (4) Zulueta M. M. L. and Hung S.-C. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 8988-8995.

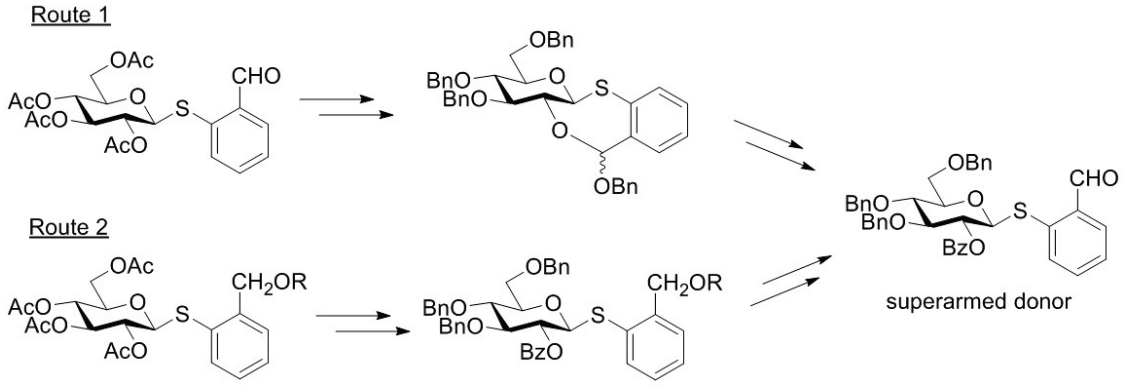
glycolipid, membrane protein integration, fluorescent label

講演番号：1E4a11
講演日時：3 月 24 日 11:10～ 1 号館 E4 会場

o-ホルミルフェニルチオグリコシド用いたグリコシル化法の改善
Improved glycosylation method using *o*-formylphenyl thioglycosides
○大野 勇次[1]、小室 晴香[1]、西田 芳弘[1,2]、土肥 博史[1,2] ([1]千葉大院園芸、[2]千葉大分子キラリティー研究センター)
○Yuji OHNO[1], Haruka KOMURO[1], Yoshihiro NISHIDA[1,2], Hirofumi DOHI[1,2] ([1]Chiba Univ., [2]Chiba Univ. MCRC)

チオグリコシドは高い安定性を持ち化学選択的に活性化できることから、オルソゴナルグリコシル化法や連続的グリコシル化などに幅広く用いられている。ゆえに従来のチオグリコシドに影響を与えずに活性化可能なチオグリコシドは連続グリコシル化における有望な糖ユニットである。我々は、*o*-ホルミルフェニルチオグリコシドが従来のチオグリコシドに対して不活性である無水トリフルオロメタンスルホン酸により活性化されグリコシル化が進行することを見出した。しかし、副反応として糖受容体の水酸基のトリフルオロメタンスルホニル化によって反応収率が低下することと、使用可能な保護基が限定されることが問題であった。本研究では、上記問題点を解決して *o*-ホルミルフェニルチオグリコシドの糖鎖合成における利便性および適用範囲を拡大し、これを用いて生理活性糖鎖を合成することを目的とした。

グルコースおよびマンノース型 *o*-ホルミルフェニルチオグリコシドを新たに調製し、これらを様々な保護基を導入した糖受容体とともにグリコシル化反応に供した。その結果、糖受容体に電子求引性基を導入することによって副反応が抑制され、反応収率が飛躍的に向上することを見出した。続いて、*o*-ホルミルフェニル基をあらかじめ遊離してから糖の保護基を変換する方法を検討した結果、水酸基のベンジル化の際に 2 位の水酸基のみベンジル化されずにホルミル基とアセタールを形成することがわかった。この反応を利用して、2-*O*-アシル型 superarmed 糖供与体を簡便に合成することに成功した。さらに、チオサリチルアルコールの水酸基をアリル基あるいは *p*-メトキシベンジル基で保護した化合物を用いてチオグリコシドとし、保護基の変換を完了してから *o*-ホルミルフェニル基を温和な条件で化学選択的に遊離する手法についても検討した。



Oligosaccharide, Glycosylation, Thioglycoside

発表責任者：土肥　博史（hdohi@faculty.chiba-u.jp）

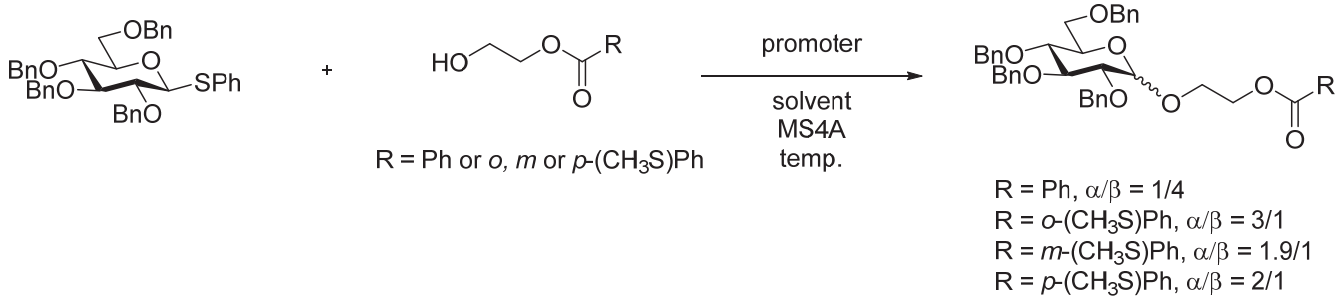
講演番号：1E4a12
講演日時：3 月 24 日 11:21～ 1 号館 E4 会場

チオエーテル基を用いた 1,2-*cis* 選択的グリコシル化の反応機構の解明と糖鎖合成への応用
Mechanistic study of thioether-assisted 1,2-*cis* glycosylation and its application for oligosaccharide synthesis

○須田 栞[1]、前川 丈武[1]、西田 芳弘[1,2]、土肥 博史[1,2] ([1]千葉大学、[2]千葉大学分子キラリティー研究センター)
○Shori SUDA[1], Hiromu MAEGAWA[1], Yoshihiro NISHIDA[1,2], Hirofumi DOHI[1,2] ([1]Chiba Univ., [2]Chiba univ. MCRC)

近年のグリコシル化法の発展により様々なグリコシド結合の形成が可能となったが、天然の糖鎖に多く見られる 1,2-*cis* 型グリコシドの形成は依然として困難を伴う。我々は糖受容体の反応点近傍にメチルチオアセチル基や 2-(メチルチオ)ベンゾイル基などのチオエーテルをもつ保護基を導入することによって、グリコシル化における 1,2-*cis* 選択性が大幅に向上することを報告した。しかし、その選択性が発現する詳細なメカニズムは未だ不明である。本研究では、チオエーテル基による 1,2-*cis* 選択的グリコシル化の反応メカニズムの解明および糖鎖合成への展開を目的として、メチルチオエーテル型保護基を反応点近傍に導入した様々な構造を持つ糖受容体を用いてグルコシル化における立体選択性を評価した。

単純な構造を持つエチレングリコールの一つのアルコールにベンゾイル基、*o,m* もしくは *p* 位にメチルチオ基を持つベンゾイル基をそれぞれ導入したものを糖受容体をとして、per-*O*-ベンジルチオフェニルグリコシドとグリコシドとグリコシル化反応を行った。その結果、ベンゾイル基を導入したものに比べて(α/β=1/4)、チオエーテル基を有するすべての糖受容体において 1,2-*cis* 選択性が向上し、特に *o*-（メチルチオ）ベンゾイル基を導入した場合に高い 1,2-*cis* 選択性を示した(α/β=3/1)。しかし、その選択性は糖誘導体を糖受容体として用いた場合に比べて低かったため、環構造内にチオエーテル基とアルコールが配置されることでより高い立体選択性を示すことが示唆された。続いて、α もしくは β 型のフェニルチオグリコシドを糖供与体、3 位にチオエーテル基を有する保護基を導入した GlcNAc 誘導体を糖受容体としてグルコシル化反応を行った。その結果、α 型、β 型のどちらを用いた場合でも立体選択性が変わらなかったことから、本反応は S_N1 で進行していることがわかった。また、本法を *Shigella flexneri*1a の細胞表層由来 O 抗原型多糖の 5 糖ユニットの化学合成に応用した。



Oligosshariide, Glycosylation, Stereoselective synthesis

発表責任者：土肥　博史（hdohi@faculty.chiba-u.jp）

講演番号：1E4a13
講演日時：3 月 24 日 11:32～ 1 号館 E4 会場

前方光散乱瞬時測定による糖鎖－レクチン架橋反応のリアルタイム観察

Real-time observation of carbohydrate-lectin cross-linking reaction by *in situ* measuring forward light scattering

○尾形 慎[1]、小野田 崇司[1]、若松 孝[1,2] ([1]福島高専・化学バイオ、[2]茨城高専・電気電子系)
○Makoto OGATA[1], Takashi ONODA[1], Takashi WAKAMATSU[1,2] ([1]NIT, Fukushima College, [2]NIT, Ibaraki College)

従来より多価性糖鎖と糖認識タンパク質（レクチン）間における架橋形成が数多く報告されている。これは、生体内において多くのレクチンが分岐鎖を有するオリゴ糖鎖や糖ペプチド、糖タンパク質と架橋複合体を形成可能であることを示しており、このような現象は様々な生物学的プロセスにも深く関与している。我々も、ニホンニワトコに含まれるシアル酸認識レクチン（SSA）をモデルタンパク質に用いることで、レクチンを選択的かつ強力に架橋可能なシアロ型多価糖鎖配位体の設計及びその合成に成功し、糖鎖リガンドとレクチン間における架橋複合体形成メカニズムに関する検証を報告している[1)]。しかしながら、これら糖鎖リガンドとレクチンとの架橋形成に伴う形態変化の評価は、複合体形成前と形成後の可溶性又は不溶性の凝集体の断片的な観察によるものであり、従来、架橋形成反応の初期から終期までの形態変化をリアルタイムで観察することは困難であった。

最近、我々は、タンパク質凝集体に対して高感度である前方静的光散乱（F−SLS）を瞬時に計測できる凝集体分析装置を開発し、塩添加に伴うニワトリ卵白リゾチーム凝集体の形成過程をリアルタイムで観察することに成功している[2)]。本研究では、開発の F−SLS 瞬時測定装置を用いて、溶液中におけるシアロ型多価糖鎖配位体と SSA との架橋反応をリアルタイムで観察・評価した。すなわち、一分子中に Neu5Acα2,6LacNAc 構造を 4 個有するシアロ型糖鎖配位体と SSA を 10 mM PBS（pH 7.4）中に溶解し、開発分析装置で混合直後から F−SLS パターンの経時変化を時間的に追跡した。その結果、シアロ型糖鎖配位体と SSA の架橋反応による凝集体の形成プロセスをリアルタイムで捉えることに初めて成功した。F−SLS の解析から、液中で架橋反応により単に凝集体のサイズや数が増加するだけでなく、それらの構造がより密に変化して、架橋反応が平衡状態に至ることが分かった。なお、一分子中に SSA との親和性を示さない LacNAc 構造を 4 個有するアシアロ型糖鎖配位体を用いた場合、F−SLS の時間的変化は見られなかった。

【参考文献】

1) M. Ogata, M. Yano, S. Umemura, T. Murata, E.Y. Park, Y. Kobayashi, T. Asai, N. Oku, N. Nakamura, I. Matsuo, T. Usui. ***Bioconjugate Chem.***, *23*, 97-105 (2012).
2) T. Wakamatsu, T. Onoda, M. Ogata. ***Jpn. J. Appl. Phys.***, *57*, 058003 (2018).

carbohydrate, lectin, cross-linking reaction

発表責任者：尾形慎（ogata@fukushima-nct.ac.jp）

講演番号：1E4p02
講演日時：3 月 24 日 14:01～ 1 号館 E4 会場

野生エゾジカ(*Cervus nippon yesoensis*)の内臓と軟骨組織に含まれるコンドロイチン硫酸/デルマタン硫酸の組成分析
Analytical study of chondroitin sulfate / dermatan sulfate in cartilage tissue and internal organs of wild Hokkaido sika deer (*Cervus nippon yesoensis*)
○武田-奥田 尚子、田村 純一 (鳥取大農)
○Naoko TAKEDA-OKUDA, Jun-ichi TAMURA (Fac. Agric. Tottori Univ.)

［目的］
近年、本州では野生ニホンジカの急増よる山林や農耕地における農作物への食害などが問題となっている。北海道でも野生エゾジカによる同様の被害が報告されている。野生のニホンジカやエゾジカは捕獲した後、皮や肉を積極的に利用するなどの対策が講じられているが、ツノや内臓、骨などは十分に利用されておらず、これらの未利用部位の有効活用が課題となっている。これまで我々の研究グループは、野生ニホンジカの気管や肩甲軟骨などの軟骨組織と、胃や腸などの消化管に含まれるコンドロイチン硫酸（CS）やデルマタン硫酸（DS)、ヒアルロン酸（HA）の組成分析を行ってきた。その結果、消化管の CS や DS はＡ型の割合が高いことや、部位によって HA の含有濃度が異なることを明らかにした。また、軟骨組織では脱脂乾燥物 100 g 中に 1 g 以上の高濃度で CS と DS が含まれていることも明らかにした。本研究では、野生エゾジカの消化管と軟骨組織に注目した。ニホンジカの亜種であるエゾジカの消化管と軟骨組織の CS と DS の硫酸化パターンや、CS、DS、HA の含有濃度を分析することで、種による糖鎖の微細構造の違いを明確にできると考えた。

［方法・結果］
野生エゾジカ(*Cervus nippon yesoensis*)の軟骨組織と消化管を部位ごとに細断し、エタノールで脱脂後、減圧乾燥し、脱脂乾燥物を得た。得られた脱脂乾燥物をプロテアーゼで処理後、透析を行い、エタノールを用いて糖鎖を沈殿させた。得られた糖鎖はコンドロイチナーゼ ABC またはコンドロイチナーゼ ACI で二糖単位にまで分解し、HPLC 分析を行った。その結果、使用した消化管の部位によって CS や DS の硫酸化パターンや CS、DS、HA の含有濃度が異なることが判明した。一方、軟骨組織には脱脂乾燥物 100 g 中に 1 g 以上の CS と DS が含まれていた。そのため、軟骨組織は CS や DS の原料として有用であると考えられる。

Chondroitin sulfate, Dermatan sulfate, Deer

講演番号：1E4p03
講演日時：3 月 24 日 14:12～ 1 号館 E4 会場

Analytical study on chondroitin sulfate in the internal organs of wild deer, *Cervus Nippon*

○Su-Jung YEON, Naoko TAKEDA-OKUDA, Jun-ichi TAMURA (Fac. Agric., Tottori Univ.)

[Purpose]

Traditionally, velvet antler has been used as medicine for anti-fatigue, improvement of blood circulation, muscle strength, and restoration in Korea and China for centuries. However, little has been used in Japan. There are many bioactive components such as essential amino acids, hyaluronan (HA), collagen, and glycosaminoglycan in velvet antler.

In recent, the number of wild deer (*Cervus nippon*) has been increasing in many parts of Japan. The increased wild deer damages farm and forest. Moreover, environmental problem would be worried because of increased amount of discarded part of the eliminated deer.

In this study, we investigated the amount of chondroitin sulfate (CS) in discarded part of deer. CS is one of the members of the glycosaminoglycan, of which biological activities have recently been revealed.

[Method and Results]

Several parts of the internal organs removed from wild Japanese deer were finely cut, each of which was defatted by submerging in ethanol. Then, it was dried *in vaccuo*. The protease (PROTIN®) was used for 7 days at 55℃ for the dry defatted sample. After the dialysis for 7 days, precipitation (glycans) was obtained from ethanol. Chondroitinase ABC was added to it for degradation of the glycans. CS and HA are digested into the corresponding disaccharides, which were analyzed by HPLC. CS in the internal organs of deer showed characteristic sulfation pattern. The concentrations of CS were extremely different in each tissue.

Chondroitin sulfate, HPLC analysis, Wild deer

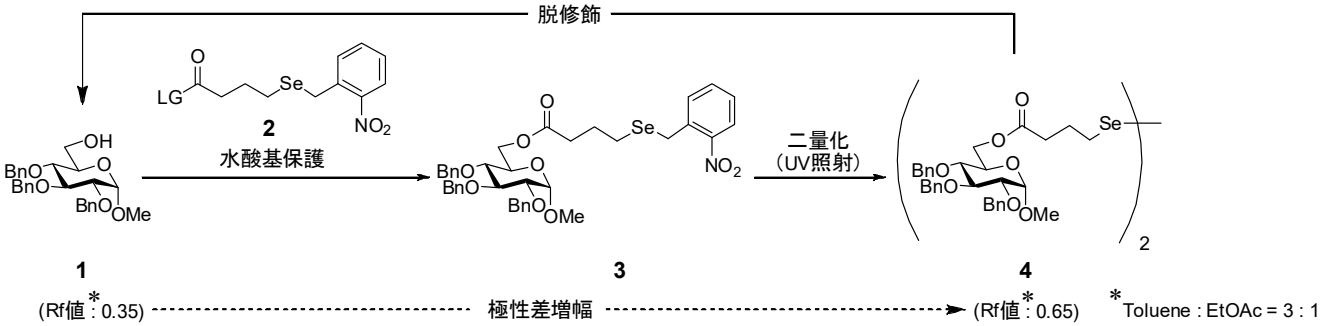
講演番号：1E4p04
講演日時：3 月 24 日 14:23～ 1 号館 E4 会場

糖鎖合成での単離精製の効率化を実現する極性差増幅法の開発

Development of a method for increasing polarity difference to improve purification efficiency in oligosaccharide synthesis

○土屋 優大[1]、八神 なほ子[2]、田中 秀則[2]、今村 彰宏[1]、石田 秀治[1,2]、安藤 弘宗[2]（[1]岐阜大・応用生物、[2]岐阜大・G-CHAIN）
○Masahiro TSUCHIYA[1], Nahoko YAGAMI[2], Hidenori TANAKA[2], Akihiro IMAMURA[1], Hideharu ISHIDA[1,2], Hiromune ANDO[2] ([1]Gifu Univ., [2]G-CHAIN)

【背景・目的】糖鎖合成は、糖と糖をつなぐグリコシル化反応を繰り返すことで糖鎖を伸長し、目的の構造を構築する。しかしながら、糖鎖構造が複雑になるにつれて糖受容体の反応性が低下する傾向があることに加え、グリコシル化成績体と糖受容体との極性差も僅少となるため、簡便に効率よく糖鎖を合成することは未だに困難である。特に、多くの時間と労力が必要なグリコシル化成績体の単離精製は、糖鎖合成の効率化におけるボトルネックであり、その簡便化は非常に重要な課題の一つである。そこで本研究では、「生成物間の僅少な極性差の拡張」によるグリコシル化成績体の単離精製の簡便化に向けて、極性操作可能な置換基を活用した「極性差増幅法」を開発する。具体的には、グリコシル化反応後、残存する糖受容体の水酸基に温和な条件で二量体化可能なセレン含有保護基を導入し、二量体化により糖受容体由来化合物の極性を大きく低下させることで、グリコシル化成績体との極性差を増幅させる。これにより、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで容易にグリコシル化成績体を単離精製できる。
【方法・結果】本研究では、モデル実験としてまず、グルコース 1 を基質とし、6 位水酸基への光反応性官能基を有するセレン含有保護基の導入を行った。新たに開発した保護試薬 2 を用いることで、一段階での効率的な保護基導入が可能になり、定量的に化合物 3 へ誘導できた。続いて、UV 照射によるジセレニド結合形成を経た 3 の二量化反応を試みたところ、副反応を伴うことなく円滑に進行し、高収率で二量体 4 に変換することに成功した。得られた 4 は原料である 1 と比較して極性が大きく低下したため、本手法による「極性差増幅」が可能であることが強く示唆された。現在、本手法が糖鎖合成に適応可能であるかを明らかにするため、分岐糖鎖構造を構築するグリコシル化反応での検証を行っている。



oligosaccharide synthesis, improvement in purification efficiency, selenium containing protective group

講演番号：1E4p05
講演日時：3 月 24 日 14:34～ 1 号館 E4 会場

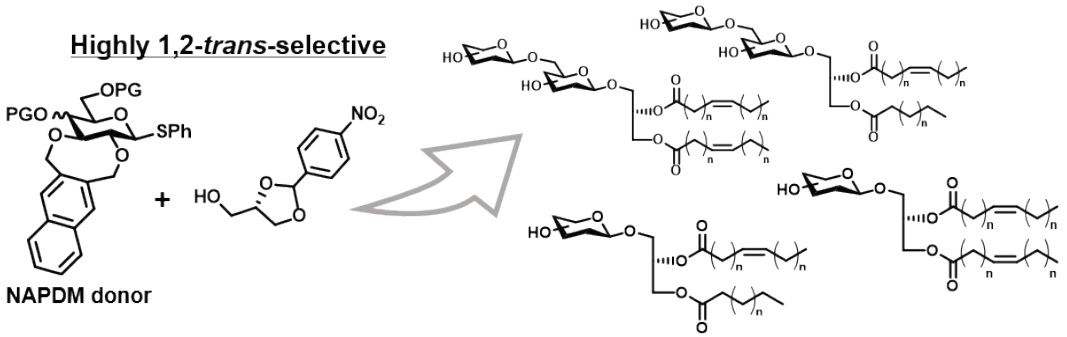
2,3-環状保護糖供与体を利用したβ-グリセロ糖脂質の効率合成

Efficient synthesis of ß-glyceroglycolipids using 2,3-bicyclic glycosyl donors

八神 なほ子[1]、○田中 秀則[1]、今村 彰宏[2]、石田 秀治[1,2]、安藤 弘宗[1] ([1]岐阜大・G-CHAIN、[2]岐阜大・応用生物)
Nahoko YAGAMI[1], ○Hidenori TANAKA[1], Akihiro IMAMURA[2], Hideharu ISHIDA[1,2], Hiromune ANDO[1] ([1]G-CHAIN, [2]Gifu Univ.)

【背景・目的】β-グリセロ糖脂質合成において、グリコシル化の 1,2-*trans*-選択性を得るためには、一般的に隣接基効果が用いられている。しかし、グリセロ糖脂質は脂質部位に脂肪酸エステルを有するため、合成途中でのアシル系保護基の変換が必要となる場合がある。また、不飽和脂肪酸エステルを有するグリセロ糖脂質を合成する際は、接触水素添加法を用いることが出来ないため、ベンジル基を最終の保護基として利用することにも困難が伴う。従って、効率的なグリセロ糖脂質の合成には、隣接基効果に依らない立体制御法の利用が望ましい。近年、我々はグルコース誘導体の 2,3 位水酸基に環状保護基を導入した糖供与体を用いた 1,2-*trans*-選択的グリコシル化反応を報告し[1]、更に酸性条件下で除去可能な環状保護基として、ナフタレンジメチル(NAPDM)基の有用性を見出した。そこで本研究では、2,3-NAPDM 保護糖供与体を利用し、不飽和脂肪酸エステルを有する β-グリセロ糖脂質の効率合成を試みることとした。
【方法・結果】まず、酸性のグリコシル化反応において安定な 1,2-*p*-ニトロベンジリデン-*sn*-グリセロール受容体を新規に合成し、糖供与体とのグリコシル化反応を行った。その結果、2,3-NAPDM 保護グルコース及びガラクトース供与体を用いた場合ともに 1,2-*trans*-選択的にグリコシル化が進行することが明らかとなった。更に、続く二糖構築時においても、高い 1,2-*trans*-選択性にて目的の二糖骨格を構築することにも成功した。最後に、酸性条件下にて NAPDM 基の除去を行い、目的とする β-グリセロ糖脂質へと導いた。本研究にて開発した 2,3-NAPDM 保護糖供与体は、飽和及び不飽和脂肪酸エステルを脂質部位に有する様々なグリセロ糖脂質の合成に有用であることが示された。

[1] N. Yagami, H. Tamai, T. Udagawa, A. Ueki, M. Konishi, A. Imamura, H. Ishida, M. Kiso, H. Ando, *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, 4778-4785.



Glycosylation, Cyclic protecting group, Glyceroglycolipid

発表責任者：安藤弘宗（hando@gifu-u.ac.jp）

講演番号：1E4p06
講演日時：3 月 24 日 14:55～ 1 号館 E4 会場

セレン原子の性質を利用した多糖ミミックの構築研究

Study on the construction of polysaccharide mimic utilizing the properties of selenium atom

○野崎 竜平[1]、田中 秀則[2]、今村 彰宏[1]、石田 秀治[1,2]、安藤 弘宗[2]([1]岐阜大・応用生物、[2]岐阜大・G-CHAIN)
○Ryuhei NOZAKI[1], Hidenori TANAKA[2], Akihiro IMAMURA[1], Hideharu ISHIDA[1,2], Hiromune ANDO[2] ([1]Gifu Univ., [2]G-CHAIN)

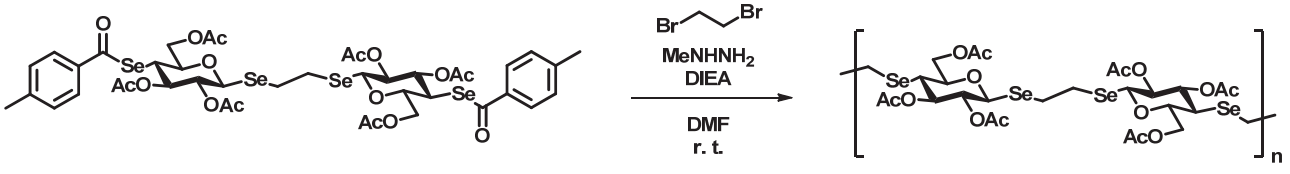
【研究背景・目的】

単糖が多数重合した「多糖」は様々な機能性を有することが知られている。中でも生体内に存在し、様々な生理活性を示すグリコサミノグリカンや、植物由来のセルロースナノファイバーが機能性多糖材料として近年注目を集めている。しかし、複雑な構造を有する多糖の化学合成は困難であり、また、天然物由来の多糖の化学修飾の制御も同様に容易ではない。そこで本研究では、高官能基修飾が可能で、尚且つ簡便に合成することができる新規機能性多糖ミミックの創出を目指すこととした。

【実験方法・結果】

セレン原子の特性に着目し、多糖ミミックの構築を検討した。セレンは、セレン原子同士のジセレニド結合の形成が容易であることや、セレノラートアニオンの求核性が高いといった特性をもつことが知られている。そこで、分子内に反応点としてセレン原子を有する糖ユニットを合成し、これらの特性を利用した反応を行うことにより、複数の糖ユニットが多数重合した多糖ミミックを一挙に構築するという方法を立案した。

まず、糖ユニットをジセレニド結合でつなげていく方法による多糖ミミックの構築の検討を行ったが、セレノラートアニオンによりジセレニド結合が切断され、重合反応が困難であることが明らかとなった。次に、セレノラートアニオンの求核性の高さを利用し、1,2-Dibromoethane などの求電子部位を 2 か所もつハロアルカンと反応させることで、糖ユニットをアルキル鎖で架橋していく方法による多糖ミミック構築の検討を行った。この方法でアノマー位に導入したセレン原子の活性化による重合反応と、4 位に導入したセレン原子の活性化による重合反応の二つの手法を試みた結果、どちらも重合反応は進行し、最大で糖がアルキル鎖で 20 残基つながった多糖ミミックの生成を確認することができた。



selenium, polysaccharide, mimic

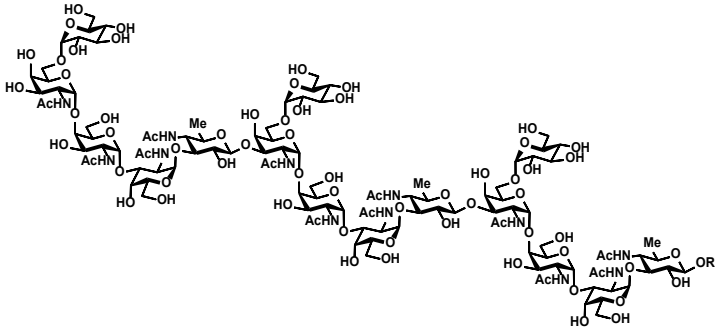
講演番号：1E4p07
講演日時：3 月 24 日 15:06～ 1 号館 E4 会場

稀少アミノ糖 4-アミノキノボースを含有する *Acinetobacter baumannii* 由来 O 抗原糖鎖の合成研究
Synthetic study on O-antigen from *Acinetobacter baumannii* containing a rare amino sugar, 4-aminoquinobose

○須藤 成美[1]、中田 えりな[1]、田中 秀則[2]、今村 彰宏[1]、石田 秀治[1,2]、安藤 弘宗[2]（[1]岐阜大・応用生物、[2]岐阜大・G-CHAIN）
○ Narumi SUTO[1], Erina NAKADA[1], Hidenori TANAKA[2], Akihiro IMAMURA[1], Hideharu ISHIDA[1,2], Hiromune ANDO[2] ([1]Gifu Univ., [2]G-CHAIN)

【背景・目的】日和見感染症の主要な原因菌である *Acinetobacter baumannii* には多剤耐性菌の出現が確認されており、抗生物質に依らない感染治療対策が求められている。本研究では、グラム陰性菌細胞外膜を構成する一部で、オリゴ糖の繰り返し構造をもつ O 抗原糖鎖に着目した。O 抗原糖鎖はその構造が細菌の抗原性を担うことから、ワクチン及び抗体医薬の有力な標的分子となり得るが、研究試料として十分量を確保するためには精密有機合成が不可欠である。以上より、本研究では *A. baumannii* の O 抗原糖鎖の内、ヒトの細胞表面には存在しない稀少アミノ糖である 4-アミノキノボース（Qui4N）を含む strain 9[1)]の化学合成を目的とした。

【方法・結果】合成に当たり、繰り返し単位である五糖 Glcα(1,6)[GalNα(1,4)GalNα(1,3)GalNα(1,3)]Qui4N をビルディングブロックとし、五糖共通中間体を供与体、受容体へと誘導した後に、縮合反応を行う収束的合成法を立案した。また、稀少アミノ糖である Qui4N の有機化学合成は単糖での報告が数例あるのみで、有機化学的にも興味深い化合物である。そこで、本研究では多糖合成に適した Qui4N 受容体を合成するために、D-Gal を出発原料として、4，6 位水酸基が遊離の状態から脱離基の導入、6 位の還元、4 位のアジド化を経る合成経路を設定した。結果、Qui4N 受容体は全十四段階にて各種保護基が導入された構造の構築を達成した。また、五糖共通中間体を構成する四つのαグリコシド結合において、GalN 供与体を用いた縮合反応の際には、GalN の 4、6 位に DTBS 基[2)]を導入することで高収率かつ α 選択的に二糖、三糖、四糖の目的骨格を得ることに成功した。Glc 供与体を用いた縮合反応ではエーテル溶媒効果を利用して α 選択的に構築しようと試みたが、充分な選択性は得られなかった。そこで、α 選択性が得られると報告されている種々の保護基や脱離基、反応条件を利用して検討を行い、最適条件を模索した。最終的には五糖共通中間体を供与体、受容体へと変換した後、縮合反応を行うことで繰り返し単位が三回の目的化合物を得る予定である。



合成の標的構造（三回繰り返し構造）

1) S. R. Haseley, *et al. Eur. J. Biochem.* **1998**, *251*, 189-194.
2) A. Imamura, *et al*. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 6725-6728.

O-antigen, rare amino sugar, chemical synthesis

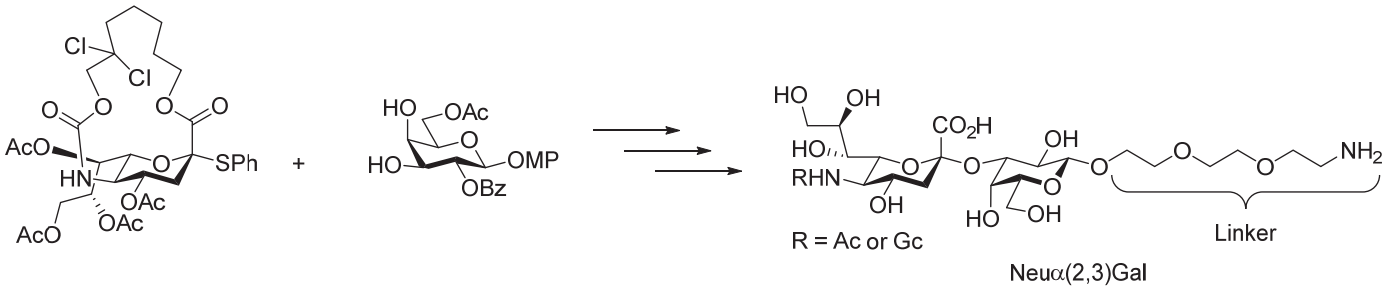
講演番号：1E4p08
講演日時：3 月 24 日 15:17～ 1 号館 E4 会場

トキソプラズマの感染機構解明に向けたシアロ糖鎖の合成

Syntheses of sialo-glycans for the elucidation of Toxoplasma infection mechanism

○小川 明日香[1]、須藤 成美[1]、河村 奈緒子[2]、田中 秀則[2]、今村 彰宏[1]、石田 秀治[1,2]、安藤 弘宗[2]（[1]岐阜大・応用生物、[2]岐阜大・G-CHAIN）
○Asuka OGAWA[1], Narumi SUTO[1], Naoko KOMURA[2], Hidenori TANAKA[2], Akihiro IMAMURA[1], Hideharu ISHIDA[1,2], Hiromune ANDO[2] ([1]Gifu Univ., [2]G-CHAIN)

【目的】トキソプラズマは、ほぼすべての恒温動物に感染可能な人獣共通感染寄生虫である。健常者への感染は、無徴候あるいは軽度の感染症状のみであるが、免疫の低下した感染者には重篤な症状を引き起こし、特に妊婦への感染は胎児に悪影響を及ぼす。しかし現在まで、有効な治療法は開発されていない。その一つの要因は、糖鎖が関与するとされる感染機構の詳細が未解明なことである。これまでに、トキソプラズマの MIC（microneme proteins）が宿主細胞表面の特定のシアロ糖鎖に結合することで感染が起きる[1]と報告されている。この知見をもとにシアロ糖鎖の結合特異性や感染への関与が検証されているが、試験方法によって異なる評価結果を与えているのが現状である。本研究では、構造均一な糖鎖分子を用いたトキソプラズマの糖鎖結合性の評価を目的とし、MIC との結合性が高いと考えられている Neuα(2,3)Gal 類縁体を有機化学的に合成することとした。
【方法・結果】合成標的として、シアル酸 C5 位の修飾が異なる二種類の Neuα(2,3) Gal（*N*-Ac 型並びに *N*-Gc 型）を選択した。そこで、当研究室で開発した二環性シアル酸供与体を利用した、これら二種類の系統的な合成法を立案した。二環性シアル酸供与体はグリコシル化反応において完全な立体選択性を示すだけでなく、架橋部のジクロロ置換構造により C5 位選択的開裂が可能であるため、共通二糖中間体の合成、さらには C5 位の変換が効率的に達成できると考えた。初めに二環性供与体とガラクトース受容体のグリコシド化反応を CH_2Cl_2 中で行い、二糖を高収率にて合成した。得られた二糖を三段階で供与体へと変換した後、MIC 結合評価に向けて末端がアミノ基のリンカーを導入した。その後、Zn/AcOH 条件で架橋部の開裂反応を行い、C5 位アミノ基の修飾（Ac、Gc）を行った。最後に、アシル系保護基の除去により標的化合物の合成を達成した。さらに、シアル酸の結合位置の影響を調べるため、同様の方法で Neuα(2,6)Gal も合成した。



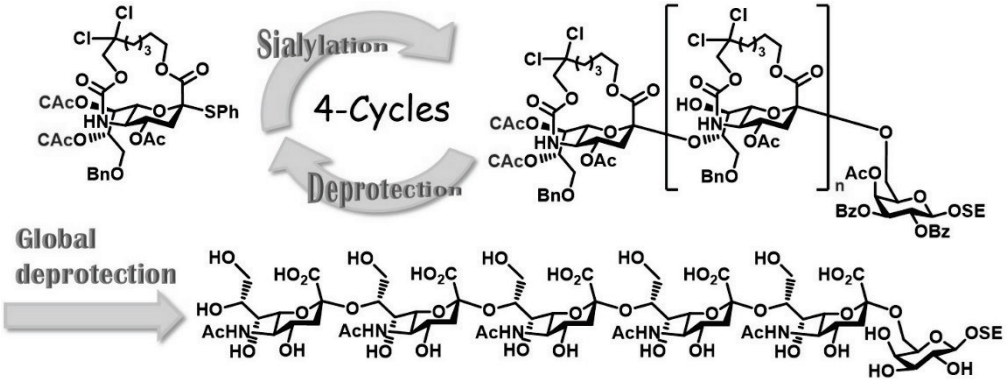
［1］a) J. A. Garnett, *et al*. *Protein Sci*., **2009**, *18*, 1935; b) J. Marchant, *et al*. *J. Biol. Chem.*, **2012**, *287*, 16720.

Toxoplasma gondii, Sialic acid, α-sialylation

講演番号：1E4p09
講演日時：3 月 24 日 15:28～ 1 号館 E4 会場

二環性シアル酸を利用したα(2,8)オリゴシアル酸の合成
Synthesis of α(2,8) oligosialic acid by using bicyclic sialic acid
○河村 奈緒子[1]、田中 秀則[1]、今村 彰宏[2]、石田 秀治[1,2]、安藤 弘宗[1]([1]岐阜大・G-CHAIN、[2]岐阜大・応用生物)
○Naoko KOMURA[1], Hidenori TANAKA[1], Akihiro IMAMURA[2], Hideharu ISHIDA[1,2], Hiromune ANDO[1] ([1]G-CHAIN, [2]Gifu Univ.)

【目的】細胞表面のシアロ糖鎖は、ウィルス感染、がん化、免疫応答などの生命現象に深く関与する。シアロ糖鎖を効率的に化学合成するためには、シアル酸のグリコシド化反応時の立体制御が課題とされる。昨年度の本大会において、シアル酸の C1 位と C5 位をアルキル鎖で架橋した大環状二環性供与体を用いることで、α-グリコシドのみを高収率にて構築可能であることを報告した。シアロ糖鎖の中でも、α(2,8)結合のオリゴシアル酸は、その生物学的役割の重要性から化学合成による標品の安定供給が望まれているが、シアル酸 8 位水酸基の低反応性により、最難関の合成標的とされる。本研究では、側鎖修飾型の二環性シアル酸を供与体及び受容体として繰り返し用いる合成アプローチにより、オリゴシアル酸の効率的合成を目指し、二環性シアル酸の利用拡充を図った。
【方法及び結果】従来法の 1,5-ラクタム型受容体[1]は、5 位アミド基との水素結合解消により 8 位水酸基の求核性が高いと考えられている。これに基づき、二環性シアル酸受容体を設計し、8 位水酸基の反応性を検証した。まず、側鎖の 7,8 位水酸基をクロロアセチル基で保護した新規二環性供与体を開発することで、7,8 位水酸基が遊離の受容体へ変換可能とした。この供与体とガラクトース受容体のグリコシド化後、クロロアセチル基を除去して受容体とし、二環性供与体とのグリコシド化反応を試みた。その結果、シアル酸二量体を完全な立体選択性かつ高収率にて得ることに成功し、二環性シアル酸の 8 位水酸基の高反応性が示された。この一連の反応を繰り返すことで、シアル酸五量体の合成を達成した。さらに Zn/AcOH による架橋部の C5 位選択的開裂、保護基の除去を行い、極めて高収率にて最終化合物への誘導が可能であることを確認した。



[1] H. Ando *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6759-6763.

sialic acid, α-sialylation, oligosialic acid

発表責任者：安藤弘宗（hando@gifu-u.ac.jp）

講演番号：1E4p10
講演日時：3 月 24 日 15:39～ 1 号館 E4 会場

哺乳類 CMP-シアル酸合成酵素の細胞内動態および細胞外分泌の分子機構の解明

Dynamic change of intracellular localization of the vertebrate CMP-sialic acid synthetase

○荒川 広夢[1,2]、呉 迪[1,2]、藤田 明子[1,2]、佐藤 ちひろ[1,2]、北島 健[1,2]（[1]名大・生物機能セ、[2]名大院・生命農）
○Hiromu ARAKAWA[1,2], Di Wu[1,2], Akiko FUJITA[1,2], Chihiro SATO[1,2], Ken KITAJIMA[1,2] ([1]Biosci. Biotech. Center, Nagoya Univ., [2]Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ.)

シアル酸は細胞表面のタンパク質や脂質を修飾する糖鎖の非還元末端に存在し、細胞認識や細胞間相互作用に関与している。シアル酸残基はシアル酸転移酵素により糖タンパク質、糖脂質上の糖鎖に付加される。その際、CMP-シアル酸が供与体として用いられ、CMP-シアル酸は CMP-シアル酸合成酵素（CSS）によって合成される。多くの糖ヌクレオチド合成酵素が基質として UTP や GTP を利用しているのに対し、CSS は CTP を利用している。また、脊椎動物において糖ヌクレオチド合成酵素はサイトゾルに局在するのに対し、CSS は主として核に局在している。このように、CSS は糖ヌクレオチド合成酵素の中でも特異な性質を持つ。我々は、これまでに脊椎動物 CSS が核移行シグナル（NLS）と核外移行シグナル（NES）を持ち、核とサイトゾルを往来していることを明らかにしている。本研究では、脊椎動物 CSS の細胞内動態の分子機構を解明することを目的として、マウス CSS（mCSS）に着目し、その細胞内動態の詳細な解析と細胞外分泌の検証を行った。

mCSS は触媒活性を担う N 末端領域と機能未知の C 末端領域から構成されている。細胞内動態の制御機構を明らかにするために、mCSS 変異体を NIH-3T3 細胞に発現させて、その細胞内動態を詳細に解析した。野生型の mCSS は約 6 割が核局在を示すのに対して、N 末端 38 アミノ酸残基を除いた変異体（39-432aa-mCSS）では約 2 割が、C 末端領域を除いた変異体（ΔCmCSS）では約 8 割が核局在であった。このことより、mCSS の細胞内動態は、同定された NLS や NES のみに制御されているわけではないことが示唆された。次に、CHO 細胞に mCSS を発現させ、細胞内と培地中の酵素を定量したところ、発現された mCSS の約 50%が培地に存在した。すなわち、mCSS は細胞外にも分泌されるという新たな知見が得られた。興味深いことに、39-432aa-mCSS ではその約 9 割が分泌されたことから、mCSS の N 末端近傍の配列が分泌を抑制することが示唆される。また、分泌型 mCSS は、そのアミノ酸配列中にシグナルペプチドを持たないこと、ER-ゴルジ経路の分泌阻害剤 Brefeldin A によって分泌阻害を受けないこと、その C 末端領域に存在する *N*-型糖鎖付加可能部位は糖鎖修飾されていないことが明らかになった。これらのことより、mCSS は典型的な ER-ゴルジ経路ではなく、非典型的な分泌経路によって細胞外に分泌されることが明らかになった。分泌型 mCSS は、CMP-シアル酸合成活性を保持していたことから、細胞外シアル酸修飾過程に関与していることが示唆される。

CMP-sialic acid synthetase, protein secretion, intracellular localization

発表責任者：荒川　広夢（arakawa.hiromu@i.mbox.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：1E4p11
講演日時：3 月 24 日 16:00～ 1 号館 E4 会場

糖鎖合成への応用を指向した溶解性向上のための保護基の有用性検証
Study on protective groups useful for improving the solubility of carbohydrate synthetic units for the synthesis of glycans

○浅野 早知[1]、田中 秀則[2]、今村 彰宏[1]、石田 秀治[1,2]、安藤 弘宗[2]([1]岐阜大・応用生物、[2]岐阜大・G-CHAIN)
○Sachi ASANO[1], Hidenori TANAKA[2], Akihiro IMAMURA[1], Hideharu ISHIDA[1,2], Hiromune ANDO[2] ([1]Gifu Univ., [2]G-CHAIN)

【研究背景・目的】有機合成における保護基は一般に、反応点以外の官能基を一時的に塞ぐ為に用いられる。糖鎖合成においても、反応性制御[1]や立体制御 (eg. 隣接基関与による 1,2-*trans* グリコシド化) において重要な役割を果たし、着脱過程で影響を受けない保護基の選択や合成戦略の立案が必須である。しかし、糖鎖伸長を繰り返し多糖を構築する上で、高い凝集性による糖誘導体の反応性低下や、高い結晶性による単離精製の困難化が著しい問題として生じる。即ち、有機溶媒に対する溶解性を向上させれば、多糖構築の問題点の解決に多大な貢献が出来ると期待される。このような観点でも、保護基は重要な役割を有していると考えられる。特に芳香族系の保護基 (eg. ベンゾイル (Bz) 基, ベンジル (Bn) 基, ベンジリデン (Bzld) 基)は、糖鎖合成においても汎用性が高く安定な保護基として利用されるが、π-π 及び CH-π スタッキング相互作用に由来するパッキングが生じ、化合物の溶解性低下をもたらすことが知られている。本研究では、芳香族系保護基に着目し、糖鎖合成における化合物の難溶性の課題に着手することとした。

【方法・結果・展望】まず、難溶性化合物のモデルとして 4,6 位を Bzld 基で保護したガラクトサミン (GalN) 供与体[2]を選択した。スタッキング相互作用の解消を狙い、Bzld 基の *p* 位に *tert*-butyl 基を導入したところ、溶解性が飛躍的に向上することを見出した。また、得られた新規 GalN 供与体は高い反応効率を示し、Bzld 基と同様の除去・環開裂条件も適用可能であることを見出した。続いて、*p* 位 *tert*-butyl 基修飾の有用性を確かめる為、糖誘導体の中でも特に難溶性[3]である *N*-アセチルグルコサミンをモデルとして用い、Bzld 基に加え、他の芳香族系保護基 (フェニルチオ (SPh) 基、Bz 基、Bn 基) の *p* 位 *tert*-butyl 基修飾も溶解性の向上に有用であることを示した。その後、低温下での凝集性が著しい、グルコシルセラミド受容体[2]をモデルとし、*p*-*tert*-butyl 修飾型 Bz 基を導入したところ、低温下 (-40 ˚C) でも比較的容易に溶解し、高収率でのグリコシル化にも成功した。低温条件といった穏和な条件下での反応は、副反応の抑制や、エーテルやニトリルを用いた溶媒効果の促進に重要である。本研究で見出した、極めて単純な芳香族修飾法を多糖合成に適用することにより、化合物の難溶性がもたらす有機反応の制約を打破出来ることが期待される。

【参考文献】 [1] Mydock, L. K.; Demchenko, A. V. *Org*. *Lett*. **2008**, *10*, 2103-2106. [2] Imamura, A. *et al*. *J*. *Org*. *Chem*. **2009**, *74*, 3009-3023. [3] Li, L.; Hsieh, Y-L. *Carbohydr*. *Res*. **2006**, *341*, 374-381.

protective group, solubility, organic glycan synthesis

発表責任者：安藤　弘宗（hando@gifu-u.ac.jp）

講演番号：1E4p12
講演日時：3 月 24 日 16:11～ 1 号館 E4 会場

ペクチンラムノガラクツロナン II の生合成に関与するアピオース転移酵素の活性検出
Assay for apiosyltransferase involved in biosynthesis of pectin rhamnogalacturonan II
○豊田 智優[1]、藤森 多恵[1]、梶浦 裕之[1]、竹中 悠人[1]、三輪 京子[2]、石水 毅[1] ([1]立命館大・生命、[2]北海道大院・環境)
○Chiyu TOYOTA[1], Tae FUJIMORI[1], Hiroyuki KAJIURA[1], Yuto TAKENAKA[1], Kyoko MIWA[2], Takeshi ISHIMIZU[1] ([1]Ritsumeikan Univ., [2]Hokkaido Univ.)

植物細胞壁成分ペクチンは複雑な構造をした多糖である。ペクチン生合成には約 30 種類の糖転移酵素が関与しているとされるが、多くの糖転移酵素遺伝子は未同定である。ペクチン主要成分の一つ、ラムノガラクツロナン II（RG-II）はα1-4 結合したガラクツロン酸から構成される主鎖と 6 つの側鎖を持つ。そのうち 2 つの側鎖の根元に結合するアピオース残基はホウ素とジエステル結合し、RG-II の二量体に関わっている。その結合の形成に関わる RG-II アピオース転移酵素遺伝子は未同定である。そこで、本研究では RG-II アピオース転移酵素遺伝子を同定することを目指し、本酵素の活性を検出する方法を構築した。

アピオース転移酵素はアクセプター基質としてオリゴガラクツロン酸（OGA）、ドナー基質として UDP-アピオース（UDP-Api）を利用して反応すると予想された。アクセプター基質である OGA は、市販のポリガラクツロン酸を部分加水分解することで調製した。得られた OGA 混合物をピリジルアミノ化（PA 化）により蛍光標識し、陰イオン交換クロマトグラフィーで長さ別に 3 糖から 16 糖（OGA3-PA~OGA16-PA）を分画し、精製した。

ドナー基質である UDP-Api は非常に不安定で、基質としての利用が困難であった。そこで、当研究室では UDP-Api を安定に保つ方法を確立した。UDP-Api の酵素合成の際にトリエチルアミンを利用し、嵩高いカウンターイオンを配向させることで分解を防ぐことができた。また、保存の際は pH6.0 と中性付近に保つことで、従来よりも長期の保存が可能となった。

次に、酵素の抽出を行なった。酵素源としてタバコ培養細胞 BY-2 を用いた。抽出した BY-2 細胞ミクロソームを可溶化し、ドナー基質である UDP-Api、アクセプター基質である OGA12-PA、反応緩衝液と反応させた。反応溶液をアルカリ処理した後、陰イオン交換クロマトグラフィーで解析を行った。BY-2 細胞ミクロソームを酵素源として反応させると、アクセプター基質である OGA12-PA 溶出位置の前に新規生成物を検出した。現在、この新規生成物が RG-II アピオース転移酵素の反応産物であると考え、質量分析による構造解析を行っている。

pectin, glycosyltransfesase, cell wall

発表責任者：石水毅（ishimizu@fc.ritsumei.ac.jp）

講演番号：1E4p13
講演日時：3 月 24 日 16:22～ 1 号館 E4 会場

マンゴー由来β1,3-ガラクトース転移酵素遺伝子の同定・機能解析

Molecular cloning and characterization of novel ß1,3-galactosyltransferase genes from *Mangifera indica* L.

○岡田 貴裕、池田 義孝（佐賀大医）
○Takahiro OKADA, Yoshitaka IKEDA (Saga Univ.)

植物タンパク質に結合したアスパラギン結合型糖鎖（*N*-glycan）は多様な成熟バリエーションを持ち、その大部分は免疫原性の高いβ1,2-キシロース/α1,3-フコース残基を有するかたちで生合成される。一方で、一部の *N*-glycan には免疫原性の低減化にはたらく Le^a 構造：Galβ1,3(Fucα1,4)GlcNAc も修飾されることから、これらの糖修飾のバランスがタンパク質のアレルゲン性の決定要因になりうることが注目を集めてきた。しかしながら、私たちが日常的に摂取する野菜・果物のほとんどは関連遺伝子が未同定なままであり、糖修飾プロセスとアレルギーリスクとの関連性にはいまだに不明な点が多く残されている。

発表者はこのような背景をもとに、食物アレルギーへの関与が指摘されているマンゴーをモデルとし、果実における *N*-glycan の生化学的基盤を調査することにした。本演題では、Le^a 構造の関連遺伝子のひとつであるβ1,3-ガラクトース転移酵素遺伝子について調査した結果を報告する。

アーウィン種マンゴーの果皮組織より得た mRNA を用いて RT-PCR、5'および 3'RACE を行い、候補遺伝子の配列情報を得た。さらに、これらの結果をもとに RT-PCR を行うことで、相同な II 型膜タンパク質をコードする二種類の候補遺伝子 *MiGALT1A*、*MiGALT1B* の完全長 cDNA を得た。これらにコードされるタンパク質の機能は次のような手法で検討した。

バキュロウイルス-昆虫細胞による異種発現系を用い、組換え MiGALT1A、MiGALT1B を調製した。受容体基質にバイアンテナ型 *N*-glycan を用いた検討により、いずれの組換えタンパク質も I 型構造：Galβ1,3GlcNAc の伸長反応を触媒することを確認した。また、反応条件を検討した結果、最適 pH はおおよそ 7.0 であり、触媒活性にマンガンイオンを必要とすることが明らかとなった。

以上の検討により、*MiGALT1A*、*MiGALT1B* は機能的なβ1,3-ガラクトース転移酵素遺伝子であることが明らかとなった。また、我々が見出したルイス型α1,3/α1,4-フコース転移酵素遺伝子：*MiFUT13*（Okada *et al.*, 2017）と協調し、果実においてタンパク質成分の免疫原性の低減化にはたらく可能性が示唆された。今後は、マンゴー果実におけるこれらの遺伝子群の発現・転写制御機構を調査し、アレルギーリスクとの相関について具体的な知見を獲得していきたいと考えている。

【謝辞】本課題は公益財団法人ニッポンハム食の未来財団「平成29年度公募型研究助成事業」による財政的支援のもとに実施しました。

Mangifera indica L., Lewis a, Protein glycosylation

発表責任者：岡田 貴裕（e7316@cc.saga-u.ac.jp）

講演番号：1E5a01
講演日時：3 月 24 日 09:00～ 1 号館 E5 会場

細胞接着活性配列を有するラッソペプチドの異宿主生産

Heterologous production of lasso peptide with cell adhesive sequence

○小谷 真也[1]、不破 啓貴[1]、逸見 光[2]([1]静大院農、[2]農研機構食品研究部門)
○Shinya KODANI[1], Hiroki FUWA[1], Hikaru HEMMI[2] ([1]Shizuoka Univ. of Agric., [2]NFRI)

ラッソペプチドは N 末端にマクロラクタム環を含む投げ縄構造をとり、C 末端のテールが N 末端の環状部分を貫通した三次元構造を有するユニークな化合物である。ラッソペプチドは一般的に抗菌剤、受容体阻害剤、酵素阻害剤としての開発が期待されているが、通常の培養条件ではラッソペプチドは生産されることが少ない。これまでに、発表者は *Sphingomonas* 属で、遺伝子発現用シャトルベクターを構築し、ゲノムマイニングによって発見された新規ラッソペプチドを *S. subterranea* を宿主として発現生産する系を構築している(Kodani et al. J. Ind. Microbiol. Biotech. 2018)。ゲノムマイニングの結果、土壌細菌 *S. koreensis* のゲノム情報において、配列に細胞接着阻害活性を示すと考えられる KGD および DGR アミノ酸配列モチーフを含むラッソペプチドの生合成遺伝子クラスターを発見した。そこで土壌細菌 *Sphingomonas koreensis* NBRC16723 の新規ラッソペプチドの生合成遺伝子クラスターを PCR で増幅した。この遺伝子クラスターには構造遺伝子と修飾酵素を含む。この遺伝子クラスターの全域を大腸菌-*Sphingomonas* のシャトルベクターpHSG396Sp に組み込み、大腸菌へ形質転換することで pHSG396Sp-16723L を得た。大腸菌でクローニング後、この pHSG396Sp-16723L をエレクトロポレーション法で *S. subterranea* NBRC16086 に形質転換した。そして形質転換体を MBM 液体培地で培養し、培養物をメタノールで抽出した。得られた抽出液を HPLC と ESI-MS を用いて分析したところ、16723 のラッソペプチド遺伝子クラスターにみられるラッソペプチド (koreencin) を発現生産したことを確認した。以上のように、ゲノムマイニングによって発見した新規ラッソペプチドを、シャトルベクターを用いて *Sphingomonas* 属細菌で生産させることに成功した。また、遺伝子クラスターの前駆体遺伝子の遺伝子組み換えを行い、二種類の組み換え体の生産にも成功した。

heterologous production, peptide, cell adhesion

発表責任者：小谷真也（kodani.shinya@shizuoka.ac.jp）

講演番号：1E5a02
講演日時：3 月 24 日 09:11～ 1 号館 E5 会場

ヒト脱アセチル化酵素 SIRT2 の脱アセチル化・脱アシル化制御機構

Mechanism of protein deacylation by human protein deacetylase SIRT2

○工藤 紀雄[1]、新 真由美[1]、中田 明子[1]、堀江 由美[1]、大貫 哲男[1]、伊藤 昭博[2,3]、吉田 稔[1,2,4] ([1]理研 CSRS・創薬シード、[2]理研 CSRS・ケミカルゲノミクス、[3]東薬大・生命科学部、[4]東大院農・応生工)

○Norio Kudo[1], Mayumi Arata[1], Akiko Nakata[1], Yumi Horie[1], Tetsuo Ohnuki[1], Akihiro Ito[2,3], Minoru Yoshida[1,2,4] ([1]Drug Discovery Seed Compunds Exploratory Unit, RIKEN CSRS, [2]Chem. Genomics Res. Gr., RIKEN CSRS, [3]Tokyo Univ. Pharm. Life Sci., [4]Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo)

タンパク質翻訳後修飾の 1 つにリジン残基のアセチル化があり、遺伝子発現やエネルギー代謝を制御している。この制御を行う脱アセチル化酵素に sirtuin ファミリーがあり、我々はヒト sirtuin の SIRT2 について、生化学的・結晶学的解析[1]や脱アセチル化阻害剤開発[2]を行ってきた。

最近、SIRT2 は脱アセチル化だけでなく、長鎖アシル化リジンを脱アシル化する活性を持つことが明らかとなってきた。今回、SIRT2 は、そのダイナミックな構造変化を通じて脱アセチル化反応と脱アシル化反応との間で酵素活性の変換が起きることを見出したので報告する。

基質である長鎖アシル化リジンと SIRT2 の結晶構造を決定したところ、酵素内部に疎水ポケットが形成され、アシル基がその空間に入り込んでいることが明らかとなった。以前、我々の見出した SIRT2 脱アセチル化阻害剤も、この同じ疎水ポケットに結合していることが結晶解析から明らかになっている[2]。興味深いことに、この脱アセチル化阻害剤は、SIRT2 の脱アシル化活性を阻害できない。つまり、基質である長鎖アシル化リジンによって、阻害剤がこの疎水空間から排除されていると考えた（阻害剤のキックアウト）。そこで、SIRT2 に阻害剤を混合した後に、基質となる長鎖アシル化リジンを加えて結晶化したところ、SIRT2・長鎖アシル化リジン複合体の結晶構造が得られ、つまり、阻害剤が排除された構造であった。さらに補酵素 NAD＋を加え結晶化を行ったところ、脱アシル化反応が進行し、反応生成物アシル ADP リボースと SIRT2 の複合体の結晶構造が得られた。また、蛍光基質を用いた実験からも、阻害剤がキックアウトされることを示唆する結果が得られている。

さらに、SIRT2 は脱アシル化反応を行うと、脱アセチル化活性を失うことを見出した。これは、脱アシル化反応生成物・アシル ADP リボースが SIRT2 と強く結合し、脱アセチル化反応の阻害剤として働いているため、と考えられる。脱アシル化反応が進行するのは、長鎖アシル化リジン基質によって、アシル ADP リボースが排除されるため、と考えられる（アシル ADP リボースのキックアウト）。つまり、アシル ADP リボースは内在性脱アセチル化阻害剤であると考えられ、SIRT2 脱アセチル化活性は、細胞内のアシル化レベルによって制御されている可能性がある。現在、蛍光基質を用いて、アシル ADP リボースのキックアウトを観察する実験を行っている。

発表論文[1] Biochemistry (2015) Feldman, *et, al.*, [2] Phil Trans B. (2018) Kudo, *et, al.*

sirtuin, deacylation, crystal structure

講演番号：1E5a03
講演日時：3 月 24 日 09:22～ 1 号館 E5 会場

大腸菌で生産された超好熱アーキア *Sulfolobus tokodaii* 由来リコンビナント低活性アルコール脱水素酵素の構造解析

Structural analysis of the low activity form recombinant alcohol dehydrogenase from *Sulfolobus tokodaii* produced in *Escherichia coli*

○郷田 秀一郎、髙嶋 翔、梶山 晃成、永野 結花、内田 拓郎、海野 英昭、畠山 智充 (長崎大院工)
○Shuichiro GODA, Sho TAKASHIMA, Kosei KAJIYAMA, Yuka NAGANO, Takuro Uchida, Hideaki UNNO, Tomomitsu HATAKEYAMA (Nagasaki Univ.)

超好熱菌・好熱菌由来酵素を組換えタンパク質として大腸菌を宿主に用いて生産させると、しばしば活性をほとんど示さない、もしくは低下している不活性型として生産される現象が報告されている。それらの報告は主にグルタミン酸脱水素酵素に関するものであり、加熱によって天然由来の酵素と同等の活性を示すまでに活性化されることが多い。そのことから生産される環境の違いからタンパク質が異なる構造を形成していることが考えられ、加熱後及び不活性もしくは低活性しか示さない酵素の立体構造解析は、その生産機構の解明に大きく寄与することが期待される。本研究では組換え酵素として生産されると低い酵素活性しか示さない超好熱アーキア *Sulfolobus tokodaii* 由来アルコール脱水素酵素(StADH)の酵素科学的諸性質、加熱による構造・活性変化、低活性型及び活性型の立体構造を X 線結晶構造解析にて明らかとしたので報告する。

StADH は大腸菌を宿主に用いて生産し、疎水性、陰イオン交換、ゲルろ過クロマトグラフィーによって SDS-PAGE で単一のバンドを示すまで精製した。酵素活性は基質にエタノール、補酵素に NAD を用いて 50℃で測定した。その結果、比活性は 90℃、30 分間の加熱によって 0.28 から 1.31 U/mg へと約 5 倍上昇した。また、ミカエリス定数(*K*m)は、基質に対しては加熱の有無によって大きな変化はなかったが、補酵素に対しては加熱によって減少が見られた。構造及び酵素活性の加熱による経時変化は、低活性型酵素を 90℃で各時間加熱したものを冷却して用いた。X 線小角散乱測定によって分子の回転半径であるギニエ半径(*Rg*)を測定したところ、*Rg* 値は 15 秒の加熱で活性型ほどのサイズに変化した。一方、酵素活性は 45 秒加熱することによって最大値を示し、StADH の熱活性化は、分子全体の構造が変化した後で、微細な構造変化が起こることによって完全な酵素活性を示すと考えられた。低活性型及び活性型の立体構造は X 線結晶構造解析によって明らかとした。その結果、全体の構造に大きな違いは見られなかったが、他の菌由来酵素でも見られる二価金属イオンは活性型では 2 分子の亜鉛が観察されたが、低活性型では、そのうち 1 分子がマグネシウムとなっていた。マグネシウムは立体構造では補酵素の近傍に位置しており、加熱によって補酵素に対する *K*m 値の低下が見られていることからも、二価金属イオンの違いが補酵素近傍の立体構造に影響を与え、補酵素と基質の親和性の低下から、酵素活性が低下したものと考えられた。

activation, alcohol dehydrogenase, Escherichia coli

発表責任者：郷田秀一郎（sgoda@nagasaki-u.ac.jp）

講演番号：1E5a04
講演日時：3 月 24 日 09:33～ 1 号館 E5 会場

Structural basis for the pH-dependent ferric ion coordination modes and conformations of the periplasmic iron binding protein FbpA from *Thermus thermophilus* HB8

○Peng LU[1], Yoshitaka Moriwaki[1], Yukie Katayama[1], Yi Lu[1], Ken Okamoto[1], Tohru Terada[1], Kentaro Shimizu[1], Mengyao Wang[1], Takehiro Kamiya[1], Toru Fujiwara[1], Michio Suzuki[1], Etsuro Yoshimura[2], Koji Nagata[1] ([1]The University of Tokyo, [2]The Open University of Japan)

Iron is one of the vital elements in living organisms. While humans obtain iron primarily through the food they eat, bacteria have developed diverse mechanisms to obtain iron from different sources depending on their living environments: free ion (Fe^{2+} or Fe^{3+}), complex with a chelator (Fe^{3+}-siderophore), complex with a protein (e.g. Fe-transferrin, Fe-lactoferrin and Fe-hemoglobin). Therefore, specific receptors and transport systems are required to transport iron from the environment to the inside of cell.

In Thermus thermophilus HB8, a Gram-negative bacterium, an ATP-binding cassette (ABC) transport systems, TTHA1628-1629-1630, is annotated to be involved in iron uptake and has been validated functionally. This typical iron-uptake ABC transporter consists of three subunits, namely the iron-binding subunit TtFbpA (TTHA1628) in the periplasm, the transmembrane subunit TtFbpB (TTHA1629) in the inner membrane bilayer and the nucleotide-binding subunit TtFbpC (TTHA1630) in the cytoplasm. As an importer, TtFbpB and TtFbpC subunits are highly conserved among other ABC transporters, however, TtFbpA subunit is exclusively conserved in Gram-negative bacteria and of great interests.

Previously, two iron coordination modes, six- and five-coordinated, have been observed in the crystal structures of TtFbpA (PDB: 3WAE and 4ELR) at pH 5.5 and 7.5, respectively. To assess the biological significance of the two coordination modes, six possibilities of Fe^{3+} coordination modes were analyzed by quantum mechanical calculation. The results showed that four out of six coordination modes were converged in vacuo. However, only the two coordination patterns that are observed in the reported crystal structures are feasible, when considering the real pH and solution. Meanwhile, TtFbpA were purified and prepared at pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 and 9.0. The gel filtration chromatography along with the ICP-MS results showed that the bound Fe^{3+} is easily released at pH 5.0 and 6.0. This was further explained by Isothermal titration calorimetry (ITC) that the binding affinity of TtFbpA to Fe^{3+} was lower in pH 5.5 than in pH 7.5. Based on the pH-dependent conformational change of TtFbpA and bicarbonate-carbonate equilibrium, TtFbpA implements the six-coordinated form at pH 5.5. But the above data suggest that the six-coordinated form is much more vulnerable than the five-coordinated form at pH 7.5. The structural basis for the pH-dependent changes in Fe^{3+} coordination and conformational change of TtFbpA will give rise to a new concept in the molecular design of drugs that inhibit the growth of Gram negative bacteria.

ABC transporter, ferric ion binding protein, pH-dependent structural change

講演番号：1E5a05
講演日時：3 月 24 日 09:44～ 1 号館 E5 会場

Microbacterium hydrocarbonoxydans 由来 ABC トランスポーター基質結合サブユニットの結晶構造解析による基質認識機構の解明
Elucidation of substrate recognition mechanism by crystal structure analysis of ABC transporter substrate binding subunit derived from *Microbacterium hydrocarbonoxydans*
○島村 香穂[1]、秋山 友了[1]、竹野谷 美穂子[2]、伊藤 晋作[2]、佐々木 康幸[2]、矢嶋 俊介[2] ([1]東農大院バイオ、[2]東農大生命バイオ)
○Kaho SHIMAMURA[1], Tomonori Akiyama[1], Mihoko Takenoya[2], Shinsaku Ito[2], Yasuyuki Sasaki[2], Shunsuke Yajima[2] ([1]Tokyo Univ Grad. of Bio, [2]Tokyo Univ. of Bio)

【背景･目的】
ヒドラジド化合物は天然にはほとんど存在しないため、多くの生物は代謝する機構を持たないと考えられている。ゆえに生体内での代謝、生合成機構等は未解明な部分が多い。近年、ヒドラジド化合物を代謝可能な *Microbacterium hydrocarbonoxydans* が単離され、それに対する分解活性を有する hydrazidase が同定された。Hydrazidase 遺伝子の前後には、センサー型転写因子と ABC トランスポーターがコードされていた。トランスポーター構成因子の 1 つである基質結合サブユニット(Substrate Binding Subunit: SBS)はトランスポーターの基質特異性を決めるという重要な役割を担っている。そこで、SBS の基質認機構の解明を目的として、hydrazidase の基質のひとつであるヒドラジド化合物 4-hydroxy benzoic acid hydrazide との複合体の立体構造解析を行った。
【方法】
M. hydrocarbonoxydans 由来 SBS（Mi-SBS：515 アミノ酸）の N 末端のアミノ酸のうち、シグナル配列を除き、N 末端に His-tag をつけた遺伝子を pET28b(+)に組み込み、これを大腸菌 B834(DE3)に導入した株を用いた。精製タンパク質を濃縮し、ハンギングドロップ蒸気拡散法により 20 °C で結晶化を行った。約 5 日ほどで、1.0 mm 長の棒状結晶が得られた。X 線照射実験は Photon Factory の BL1A にて行った。また、ヒドラジド化合物との複合体の取得は、化合物をソーキングすることにより得た。我々はすでに基質非結合型 SBS の立体構造を報告している。しかしその構造をもとにした分子置換法では解が得られなかったため、Se-Met 置換結晶を用い、SAD 法により位相決定を行った。位相決定、自動モデリングは CRANK2、ARP/wARP を用い、最終的に 2.2 Å 分解能で構造を得ることに成功した。
【結果】
得られた構造は基質非結合型の構造と比べ、リガンドと結合するための広いキャビティが閉じていることが観察できた。これは、配列の相同性からも予測された構造既知のオリゴペプチドトランスポーターの SBS (OppA) と同様のコンフォーメーション変化であった。しかし、リガンドとの結合様式を比べてみると Mi-SBS と OppA では違いが観察された。

ABCtransporter, structure, hydrazide

講演番号：1E5a06
講演日時：3 月 24 日 10:05～ 1 号館 E5 会場

特異性を改変した制限酵素・DNA・二価カチオン複合体の X 線結晶構造解析
X-ray crystal structure analysis of restriction endonuclease with altered specificity in complex with its cognate DNA and divalent cations
○出口 賢児[1]、坂 直樹[2]、三上 文三[2]、喜多 恵子[2] ([1]京大農、[2]京大院農)
○Kengo DEGUCHI[1], Naoki SAKA[2], Bunzo MIKAMI[2], Keiko KITA[2] ([1]Kyoto Univ., [2]Graduate School. Kyoto Univ.)

【目的】
制限酵素は、二本鎖DNAの4～8塩基対の特定の塩基配列を認識してホスホジエステル結合を加水分解する酵素で、補因子としてMg^{2+}を要求する。大過剰量の酵素を添加した場合や高グリセロール濃度では特異性が低下し、通常の認識配列とは異なる配列を認識して切断するスター活性を示すことが知られている。我々は、(A/G)G↓GNCC(C/T) を認識して切断するEcoO109IのDNA複合体の結晶構造を基にアミノ酸を置換した結果、スター活性が抑制された変異酵素（K74R）を創製することに成功している。この変異酵素の生化学的解析を行った結果、8とおりの認識配列に対する切断活性が野生型とは異なることを明らかにした(1)。特異性が変化したメカニズムを酵素の立体構造から明らかにするため、変異酵素とDNA複合体のX線結晶構造解析を行い、タンパク質とDNAの分子間相互作用を野生型と比較した。
【方法と結果】
ヒスチジンタグを付加した変異酵素を、ニッケルアフィニティーカラムとゲル濾過カラムを用いて精製した。EcoO109Iの認識配列をもつ13bpのDNAを用いて複合体の結晶化条件を検討し、得られた結晶の回折データはSPring-8 BL26B1で収集した。AGGCCCT配列をもつDNAとの複合体について結晶化を行った結果、格子定数が僅かに異なる2種類の$P2_12_12_1$の空間群に属する結晶AとBが得られ、それぞれ、1.99Åと2.35Åの分解能で構造の精密化を行った。それぞれの結晶で、本酵素は野生型複合体と同様にコンパクトな構造をとっており、二量体を形成した酵素に対しDNAが1分子結合し、DNAのコンホメーションも野生型複合体と同様の変形が観察された。結晶AではDNA鎖が切断されており、切断位置の近傍にはMg^{2+}と推測される電子密度が観察された。一方、結晶BではDNA鎖は切断されておらず、切断位置の近傍にはCa^{2+}と推測される電子密度が観察された。現在分子モデルの更なる精密化を行っており、変異を導入したアミノ酸側鎖とDNAとの相互作用に加え、活性中心の構造ならびにDNAの構造パラメータなどを明らかにする予定である。
(1) 第 41 回日本分子生物学会大会講演要旨集

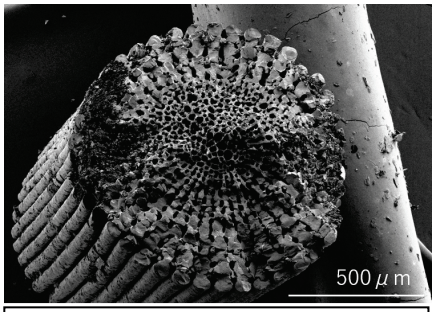
Restriction endonuclease, Structure analysis, X-ray crystallography

講演番号：1E5a07
講演日時：3 月 24 日 10:16～ 1 号館 E5 会場

炭酸カルシウム中のマグネシウム含量を調節する因子の探索
Search for key factors increasing the content of magnesium in calcium carbonate
○山口 瞭[1]、山下 達也[2]、鈴木 道生[2]、川野 潤[3] ([1]東大農、[2]東大院農、[3]北大院理)
○Ryo YAMAGUCHI[1], Tatsuya YAMASHITA[2], Michio SUZUKI[2], Jun KAWANO[3] ([1]UTokyo, [2]UTokyo., [3]Hokkaido Univ.)

１．背景、目的

生物は主に有機質で構成されているが、微量の無機元素も同様に生体内においてその維持に大きく貢献している。無機物の多くはイオンの状態で生体内に存在し、浸透圧の調整や神経伝達、シグナル伝達など多くの役割を担っている。しかしそれとは別に、多くの生物が無機物質を硬組織として利用している。生物の形成した硬組織をバイオミネラルといい、生物がバイオミネラルを形成する現象をバイオミネラリゼーションという。硬い酸であるカルシウムイオンは、硬い塩基である炭酸イオンと強く静電結合し、容易に沈殿を形成することから無脊椎動物の多くが炭酸カルシウムの殻をバイオミネラルとして生体防御や体の保持に利用している。バイオミネラルは非常に複雑な微細構造や制御された結晶多形、方位、特徴的な微量元素組成を有しているが、その制御メカニズムの多くが不明である。特に海水中には多量のマグネシウムイオンが含まれるが、炭酸カルシウム中のマグネシウム含量の制御メカニズムは分かっていない。そこで本研究では、様々な有機高分子を用いてマグネシウムイオンの水和状態を制御するメカニズムを明らかにし、炭酸カルシウムに混入するマグネシウム量を制御する技術を開発することを目的とした。この研究により、食品添加物として有用な炭酸カルシウムの開発、製紙やプラスチックへの塗布に利用する新たな炭酸カルシウム材料の改良などの工業分野への応用が期待される。



ウニの棘の断面図

２．方法、結果

マグネシウムイオンの水和状態を評価する方法として、様々な条件において炭酸マグネシウムが沈殿する挙動を調べた。濃度や pH を変化させて、炭酸マグネシウムの沈殿量をＸＢ－Ｉを用いて、測定を行った。炭酸マグネシウムが沈殿しない限界の濃度と pH の条件の溶液に、様々な合成高分子（ポリビニルアルコール、ポリアクリル酸、ポリグルタミン酸等）を、濃度を変化させて pH を調整し、加えることで、沈殿を促進するか阻害するのか確認を行った。その結果、ポリビニルアルコールが最も炭酸マグネシウムの沈殿を促進し、マグネシウムイオンの水和を解除できることが判明した。さらにマグネシウムが多量に含まれる炭酸カルシウムを形成することが知られているウニの殻からも上記の実験を行うことにより、マグネシウムの含量を制御する因子の探索も行っている。

calcium carbonate, magnesium, *Heliocidaris crassispina*

発表責任者：鈴木道生（amichiwo@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：1E5a08
講演日時：3 月 24 日 10:27～ 1 号館 E5 会場

抗真菌性ディフェンシンにおけるターゲット分子の探索
Search for target molecules of antifungal defensin
○落合 秋人[1]、福田 美南海[1]、小川 広大[1]、鈴木 雅規[1]、提箸 祥幸[2]、田中 孝明[1]、谷口 正之[1] ([1]新潟大・自然研、[2]農研機構・北農研)
○ Akihito OCHIAI[1], Minami FUKUDA[1], Kodai OGAWA[1], Masami SUZUKI[1], Yoshiyuki SAGEHASHI[2], Takaaki TANAKA[1], Masayuki TANIGUCHI[1] ([1]Grad. Sch. of Sci. Technol., Niigata Univ., [2]NARO Hokkaido Agr. Res. Cent.)

【目的】ディフェンシンは、先天性免疫系において機能する抗菌タンパク質の一種である。我々は、これまでの研究において、長い食経験を持つイネからヒト病原性真菌 *Candida albicans* に対して強力な抗真菌活性を発揮するディフェンシン OsAFP1 を見出した。また、断片ペプチドを用いた解析により、OsAFP1 の N 末端と C 末端に近いそれぞれ 10 個程度のアミノ酸残基(Region 1 および 7)が抗真菌活性に関わる可能性を示し、さらにターゲット細胞においてアポトーシスを誘導することを明らかにした。本研究では、部位特異的変異体を設計して OsAFP1 の抗真菌活性に関わる活性部位を同定した。また、OsAFP1 抗体を用いた免疫染色実験および膜脂質成分との相互作用解析により、*C. albicans* 細胞におけるターゲット分子の同定を試みた。
【方法と結果】まず、OsAFP1 の Region 1 および 7 を構成する合計 12 個のアミノ酸残基を選択し、アラニンに置換した変異体 R1A, H2A, L4A, Q6A, H8A, R9A, F10A, K35A, H37A, L39A, K41A, R42A を設計した。PCR を用いた部位特異的変異導入により各変異体の発現プラスミドを作製し、得られたプラスミドを大腸菌宿主に組み込んで大量発現系を構築した。発現させた OsAFP1 の各変異体は、2 段階の精製ステップにより高純度に精製した。濁度法を用いて *C. albicans* に対する各変異体の抗真菌活性を解析した結果、野生型 OsAFP1 と比較して、Q6A および H8A を除く全ての変異体において活性が低下した。この結果から、これらの残基、特に Region 7 を構成する Lys-35, His-37, Leu-39, Lys-41, Arg-42 が抗真菌活性に重要であることが明らかになった。次に、OsAFP1 を処理した *C. albicans* 細胞と抗 OsAFP1 抗体を用いて免疫染色を行った。その結果、細胞壁(膜)周辺に OsAFP1 の局在が観察されたことから、OsAFP1 は細胞壁周辺に含まれる成分をターゲットとすることが示唆された。そこで、様々な膜脂質成分を固定化させたニトロセルロース膜を用いて OsAFP1 との特異的な結合を観察した結果、OsAFP1 は 1～3 個のリン酸化されたフォスファチジルイノシトールに強く結合した。これらの結果から、OsAFP1 は *C. albicans* 細胞壁に含まれるフォスファチジルイノシトールに結合してストレスを与え、最終的にアポトーシスを誘導することにより抗真菌作用を発揮する可能性を示した。

1) A. Ochiai *et al.*, *Scientific Reports*, 8, 11434 (2018)

defensin, *Candida albicans*, antifungal

発表責任者：落合 秋人（ottie@eng.niigata-u.ac.jp）

講演番号：1E5a09
講演日時：3 月 24 日 10:38～ 1 号館 E5 会場

ダイズ由来ペプチド、ルナシンの抗がん作用機構の解析
Molecular mechanism analysis of lunasin, a soybean peptide

○飯田 季里子[1]、鈴木 友璃葉[2]、張 迷敏[2]、片山 幸江[2]、盧 翌[2]、岡本 研[2]、鈴木 道生[2]、名倉 敬仁[2]、西 宏起[2]、伯野 史彦[2]、片岡 直行[2]、高橋 伸一郎[2]、川上 浩[1]、永田 宏次[2]([1]共立女子大院、[2]東大院農生科)
○Kilico Iida[1], yuriha Suzuki[2], Mimin Zhang[2], Yukie Katayama[2], Yi Lu[2], Ken Okamoto[2], Mitio Suzuki[2], Takahito Nakura[2], Hiroki Nishi[2], Humihiko Hakuno[2], Naoyuki Kataoka[2], Takahashi Takahashi[2], Hiroshi Kawakami[1], Koji Nagata[2] ([1]KWU, [2]GSALS, The Univ. of Tokyo)

ダイズ摂取量の多さとがんの発症・死亡率の低さには相関が認められており、イソフラボンなど、大豆に含まれる物質のいくつかで抗がん作用が報告されている。

ダイズのペプチドであるルナシンは、貯蔵タンパク質２Ｓアルブミンの小サブユニットで、４４アミノ酸残基からなり、２個のシステイン残基、クロマチン結合タンパク質と相同性が高くαヘリックス構造と推測される領域、細胞接着モチーフＲＧＤ、９個の連続したアスパラギン酸残基を有している。肝がん、前立腺がん、大腸がん、乳がん、肺がん、皮膚がんなど複数種のがんに対する予防・治療効果が認められており、正常細胞には影響しないことも示されている。ダイズ自体が問題なく食されていることからも、がん予防や副作用のない抗がん剤としての利用が期待されている。

ルナシンの抗がん作用機構については、ルナシン分子が細胞外から細胞質内あるいは核内に移行し、各種がん遺伝子の発現調節や、ヒストンＨ３・Ｈ４のアセチル化を阻害することで有糸細胞分裂を阻害して最終的に細胞死誘導を引き起こすことが提唱されているが、具体的な作用機序は未だ不明な点も多い。そこで本研究では、ルナシンの抗がん作用の分子機構の解明を目的として、以下の実験を行った。

まず、ルナシンが細胞外から細胞質内、さらに核内へ移行するという報告の検証を兼ねて、ルナシン分子のどの領域がこの移行過程に重要なのか調べた。乳がん・肝がん・膀胱がん由来細胞において、全長ルナシンと部分配列ルナシンのどちらも、細胞質内への移行が観察されたが、核内への移行はほとんど認められなかった。さらに、等温滴定熱測定でルナシンとヒストンＨ３・Ｈ４テトラマーとの相互作用を、ゲルシフトアッセイでルナシンとヌクレオソームとの相互作用を調べたが、いずれも相互作用は認められなかった。これらの結果は、従来より提唱されている、ルナシンが核内に移行してヒストンＨ３・Ｈ４に結合することでそのアセチル化を阻害するという作用機構を支持しないものだった。

lunasin, anticancer, histone

発表責任者：飯田季里子（18k301ki@kyoritsu-wu.ac.jp）

講演番号：1E5a10
講演日時：3 月 24 日 10:49～ 1 号館 E5 会場

プラスミド免疫法による狂犬病ウイルス核タンパク質に特異的な IgY 抗体の調製

Preparation of specific IgY to rabies N protein by plasmid immunization

○久保 七彩[1]、井上 智[2]、野口 章[2]、志和 望[3]、朴 天鎬[3]、八田 一[1] ([1]京都女子大学、[2]感染研、[3]北里大学)
○Nanase Kubo[1], Satoshi Inoue[2], Akira Noguchi[2], Nozomi Shiwa[3], Chon-ho Paku[3], Hazime Hatta[1] ([1]Kyoto Women's Univ., [2]National Institute of Infectious Diseases, [3]Kitasato Univ.)

【目的】狂犬病は「顧みられない熱帯病」(Neglected tropical diseases, NTDs)の一つに指定されており、東南アジアやアフリカなどの狂犬病流布地域では動物を対象とした狂犬病ウイルス（Rabies virus：RV)の検査や疫学調査が行われている。直接蛍光抗体法による狂犬病検査が WHO と OIE（国際獣疫事務局）に推奨された方法として世界的に行われているが、診断用の抗体試薬は高価であり流通量が限られている。本研究では、プラスミド免疫法によって rabies virus の核タンパク質（RV-N）に対する特異的 IgY 抗体を鶏卵卵黄内に効率よくかつ安全に産生させる方法を検討した。

【方法】RV-N を発現する組換えプラスミド pcDNA-N（pcDNA3.1、Thermo Fisher Scientific）を産卵鶏６羽の翼下筋に針なし圧力注射器（ツインジェクターEZⅡ)を用いて 2 週毎に計 8 回免疫注射を行った。その内 4 羽（2 羽／群）に対しては免疫注射直後、その周囲に起炎剤（FCA や λ-カラギーナン）を注射し、アジュバンドの併用効果を調べた。起炎剤併用の免疫注射は合計５−６回（４から１４週）に行った。採卵した卵黄の 4,000 倍希釈液を用い、狂犬病 TC ワクチン（化血研）を固相化して ELISA を行い、最も抗体価が高い期間の卵黄から λ-カラギーナン法を用いて IgY を精製した。精製 IgY の特異的な反応性は RV HEP 株感染マウス神経芽腫（MNA）細胞または TC ワクチンの SDS-PAGE に対するウエスタンブロット（WB）および ELISA で確認した。

【結果・考察】希釈卵黄を用いた ELISA の結果、pcDNA-N のみを注射した対照群の IgY 力価は、2 羽中 1 羽で上昇し、IgY 産生能には鶏の個体差があることが示唆された。一方、起炎剤を用いた各群では４羽全ての鶏で IgY 力価の上昇が見られ、プラスミド免疫法でも FCA や λ-カラギーナンのアジュバンド効果が確認された。FCA ではアジュバンド併用免疫後速やかに、λ-カラギーナンでは緩やかに抗体力価が上昇する傾向が見られた。なお、ELISA 値の最大値は λ-カラギーナン併用群の免疫鶏で得られた。狂犬病 TC ワクチン固相化 ELISA 値のピーク時の各群卵黄から IgY を精製し、WB の一次抗体として用いた結果、いずれの群の特異的抗体 IgY でも RV-N の検出が可能であることが示された。しかし、アジュバンド群では MNA 細胞由来タンパク質との非特異的反応が検出された。本研究により初めて、産卵鶏へのプラスミド免疫によりその鶏卵卵黄から狂犬病ウイルス核タンパク質特異的 IgY 抗体の調製に成功した。これにより、本プラスミド免疫法が他の微生物やウイルス等の検出用 IgY 試薬の簡易かつ安全な調製にも利用できる可能性が示された。

IgY, Rabies virus, Plasmid

講演番号：1E5a11
講演日時：3 月 24 日 11:10～ 1 号館 E5 会場

TNF-α結合活性を持つ SUMO2 変異体クローンの親和性および特異性の改良
Improving binding affinity and specificity of human SUMO2 mutants against TNF-alpha

○牧野 祥嗣、植前 光基、伊藤 伸哉（富山県大工）
○Yoshihide MAKINO, Mitsuki Uemae, Nobuya Itoh (Fac. Eng., Toyama Pref. Univ.)

【目的】レミケードなどの腫瘍壊死因子-α(TNF-α)に高親和な抗体医薬は、関節リウマチに対し劇的な治療効果を発揮する。しかし薬価が高く、患者および医療財政への負担となる。そこで、抗体ではないがその機能を代替可能な蛋白質を創出し、微生物を用いて安価に生産し利用する試みが進められている。我々は、大腸菌を発現系として生産可能な、TNF-α への結合活性を代替する非抗体タンパク質の創出を目指して研究を進めている。ここでは、骨格タンパク質の表面に導入した 5 アミノ酸変異により創出した TNF-α への親和性クローンの、親和性および特異性改良の試みについて報告する。
【方法】我々は既に、SUMO2（small ubiquitin-related modifier 2）の分子表面上の 5 アミノ酸残基について、そのランダムアミノ酸置換体を提示するファージディスプレーライブラリを構築して利用している。これまでに、親和性選択実験および次世代シーケンサーを利用した配列ベースの選択手順により、TNF-α への親和性と選択性を示すクローンを 5 種取得した。本研究では、この 5 配列に見いだされたアミノ酸置換について、任意の 2 アミノ酸の組み合わせを網羅的にランダマイズした混合ファージディスプレーライブラリを構築し、同様の親和性選択実験と次世代シーケンサー解析の手順で配列選択を行った。選択された遺伝子配列を発現プラスミド上に再構築して組換えタンパク質を精製し、親和性および特異性を ELISA、Biacore によって解析した。
【結果】構築したライブラリサイズは 6.6×10^7 であった。TNF-α に対する親和性選択は 3 回行い、それぞれの選択ラウンドにおいて、親ライブラリまたは前回の選択により得られたサブライブラリを、TNF-α あり、なしそれぞれの条件で選択した。その後、すべての親和性選択により得られたサブライブラリに含まれる遺伝子配列を網羅的に解析した。得られた配列を親和性選択条件間で比較し、TNF-α ありの条件で有意に観察された 11 配列を抽出した。これらの遺伝子を再構成し、精製タンパク質を調製して ELISA で試験したところ、親クローンと比較して特異性が増加したクローンが見いだされた。また、Biacore を用いて親和性解析を行ったところ、多くのクローンで一桁程度結合平衡定数が増加していた。これらのことから、少数のアミノ酸残基のランダマイズによって、親和性と特異性を創出し改良できたことが明らかとなった。

phage display, TNF-alpha, hSUMO2

発表責任者：牧野　祥嗣（makino@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：1E5a12
講演日時：3 月 24 日 11:21～ 1 号館 E5 会場

L-glucose を基質としうる scyllo-inositol dehydrogenase の 結晶構造解析
Crystal structure analysis of *scyllo*-inositol dehydrogenase derived from *Paracoccus laeviglucosivorans*which could also use L-glucose as a substrate
○鈴木 麻佑[1]、小澤 国生[1]、深野 和紘[1]、伊藤 晋作[1]、佐々木 康幸[2]、中村 顕[3]、矢嶋 俊介[2]([1]東農大院バイオ、[2]東農大生命バイオ、[3]筑波大生命環境)
○Mayu SUZUKI[1], Kunio OZAWA[1], KAZUHIRO FUKANO[1], Shinsaku ITOU[1], Yasuyuki SASAKI[2], Akira Nakamura[3], Shunnsuke YAJIMA[2] ([1]Tokyo Univ. of Agric., [2]Tokyo Univ. of Agric, [3]Tsukuba Univ.)

【背景･目的】
L−グルコースは生命の主要なエネルギー源である D-グルコースの鏡像異性体である。L-グルコースは D-グルコースとは対照的に天然にはほとんど存在しないため、それを資化する生物はいないと考えられていた。しかし近年、L-グルコースを資化可能な微生物が複数単離され、その中の一つである *Paracoccus laeviglucosivorans* から、NAD^+依存的に L-グルコースを酸化する活性を有する *scyllo*-inositol dehydrogenase (Pl-sIDH)が単離された。生物が栄養源とすることが無いとされていた L-グルコースと反応することから、その反応の仕組みを解明することで、糖と酵素の反応における新たな知見が得られると考えられた。我々は既に、野生型 Pl-sIDH の NAD^+が結合していない apo 型および補酵素と基質が結合した 3 者複合体の立体構造を報告している。その結果から、活性部位の入り口付近にある 178 番目のアルギニン残基が基質結合に重要な役割を果たしていることが予想された。そこで今回、そのアルギニン残基の役割を明らかにすることを目的とし、そのアラニン置換変異体を作成し、立体構造解析を行った。また基質となることが既に明らかとなっている *scyllo*/*myo*-inostol、L-glucose などの糖との活性測定を試み、比較を行った。
【方法】
P. laeviglucosivorans 株由来の *lgdA* 遺伝子に C 末端に 6xHis-tag をつけた遺伝子を pET21a(+)に組み込み、 *Escherichia coli* BL21(DE3)に導入した株を用いた。精製タンパクを濃縮し、ハンギング・ドロップ蒸気拡散法により 20°C で結晶を得た。約 5 日で 250 μm ほどの菱形の結晶が得られた。X 線照射実験は Photon Factory の BL5A にておこなった。空間群は野生型と同様の $P2_12_12_1$ であった。その後のモデリングおよび構造精密化には、ArpWarp, Refmac5, Coot を用い、最終的に 2.1Å 分解能で構造を得ることに成功した。酵素活性測定は、生成する NADH の量の変化を波長 340 nm にて吸光度を計測することによって行った。
【結果】
得られた構造は、非対称単位に 4 つのサブユニットが含まれており、R178A 変異体と野生型との間で大きな構造の変化は見られなかった。蓋のようにして働いていたアルギニン残基がなくなり基質結合部位に広がりが見られ、これが野生型と R178A 変異体との間で酵素活性測定の結果の違いを引き起こしていると考えられた。

L-glucose, *scyllo*-inositol, Crystal structure analysis

講演番号：1E5a13
講演日時：3 月 24 日 11:32～ 1 号館 E5 会場

超好熱性アーキア由来クランプ PCNA 上で働く DNA 複製タンパク質の生化学および構造の解析
Biochemical and structural analyses of the complex of PCNA and replication proteins in hyperthermophilic archaea

○石野 園子[1]、真柳 浩太[1]、白井 剛[2]、清成 信一[1]、今井 奈美子[1]、大山 拓次[3]、山上 健[1]、石野 良純[1] ([1]九州大、[2]長浜バイオ大、[3]山梨大)
○Sonoko ISHINO[1], Kouta Mayanagi[1], Tsuyoshi Shirai[2], Shinichi Kiyonari[1], Namiko Imai[1], Takuji Oyama[3], Takeshi Yamagami[1], Yoshizumi Ishino[1] ([1]Kyushu Univ., [2]Nagahama Inst., [3]Yamanashi Univ.)

フラップエンドヌクレアーゼ 1（FEN）は 5'-フラップ DNA 構造に特異的なエンドヌクレアーゼ活性を有し、その活性は真核生物およびアーキアにおける岡崎フラグメントの終結に必須であると考えられており、アーキア FEN の多くの構造および生化学的解析がこれまでに報告されている。 FEN を含む多くの DNA 複製タンパク質が、クランプ分子である Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)と相互作用して連続的な反応を効率よく進めることはよく知られている。われわれは超好熱性アーキア *Pyrococcus furiosus* 由来の DNA リガーゼ（Lig）、DNA ポリメラーゼ B（PolB）、および PCNA を用いて、Lig-PCNA-DNA [1]および PolB-PCNA-DNA [3]の複合体構造を解析してきた。本発表では FEN-PCNA-DNA 複合体の構造解析の結果を報告する。 まず *P. furiosus* の FEN と PCNA 間の相互作用を表面プラズモン共鳴を用いて解析した。 FEN のフラップ DNA 切断活性は PCNA により促進され、FEN の C 末端残基の変異により PCNA との相互作用がなくなり、この促進は見られなくなった。また、電子顕微鏡（EM）単粒子解析により FEN-PCNA-DNA の三次構造を観察し機能的な複合体の構造をとらえることができた。さらに FEN-Lig-PCNA-DNA 複合体の EM 構造を決定した。この構造は二つのタンパク質による連続した反応の中間状態に対応すると推定された。つまり FEN が DNA フラップを除去した後のニック DNA を、Lig が連結する前の構造と考えている。実際に *in vitro* において FEN および Lig の連続的な反応が PCNA により促進されることが認められた。これらの結果より超好熱性アーキアにおける岡崎フラグメント終結の分子機構について詳細な知見が得られた。

DNA replication, Archaea, electron microscopy

発表責任者：石野園子（sonoko@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：1E5a14
講演日時：3 月 24 日 11:43～ 1 号館 E5 会場

コリネ型細菌由来アシル CoA カルボキシラーゼ ε サブユニットの機能解析

Functional analyses of Acyl-CoA Carboxylase epsilon subunit derived from *Corynebacterium glutamicum*

○川内 優輝、川崎 寿、夏目 亮（東電大院・工・物質工）
○Yuki KAWAUCHI, Hisashi KAWASAKI, Ryo NATSUME (Grad. sch. of eng.)

＜背景・目的＞

コリネ型細菌 *Corynebacterium glutamicum* は、特定のストレスに応答してグルタミン酸を過剰生産する特性を有している。ストレスに応答してグルタミン酸を過剰生産するように代謝 flux が変換するには、アシル CoA カルボキシラーゼ（ACC）の活性低下が重要だと考えられる。コリネ型細菌や結核菌、放線菌などの ACC には Accα、Accβ、Accε の 3 種類のサブユニットからなる特徴がある。Accα は Biotin carboxylase サブユニット、Accβ は carboxyl transferase サブユニットとして機能する一方で、Accε は生理学的/生化学的機能が不明な短鎖サブユニットである。本研究では、Accε の生理学的/生化学的機能を明らかにすることで ACC の活性調節の仕組みについて理解を深め、グルタミン酸過剰生産機構の解明の手がかりを得ようとしている。本発表では、研究の過程で見出した代謝工学的に応用可能な現象を紹介する。

＜実験方法および結果＞

Accε 遺伝子破壊株は最小培地上での生育が不安定だったが、最小培地に Tween80 を加えたところ野生株と同等の生育を示した。Accε 遺伝子相補株は最小培地上で野生株と同等の生育を示した。

C 末端 His-tag 融合型 Accε 発現株を構築し培養試験を行ったところ、ストレス非存在下において、生育低下とグルタミン酸生産が認められた。C 末端領域は機能上重要であることが示唆されたため、C 末端を欠損させた Accε 発現株を複数構築し培養試験を行った。その結果、特定の領域を欠損させることで、非ストレス存在下においてもグルタミン酸を過剰生産するようになることが判明した。

機能領域を *in vitro* で確かめるために、組換え Accε Full length および C 末端を欠損させた組換え Accε をベイト、組換え Accα あるいは組換え Accβ をプレイとした pull down assay を用いて、各サブユニット間の相互作用を解析した。その結果、Accε の C 末端領域は Accα との相互作用には寄与していない一方で、Accβ との相互作用には寄与することが示唆された。

Corynebacterium glutamicum, Acyl-CoA Carboxylase, Metabolic engineering

発表責任者：夏目 亮（natsume@mail.dendai.ac.jp）

講演番号：1E5a15
講演日時：3 月 24 日 11:54～ 1 号館 E5 会場

土壌細菌由来新規糖化産物応答性転写調節因子
A novel glycated product-responsive transcriptional regulator from soil bacterium

○三上 あかね[1]、アリ ヤニ ファオザニ[2,3] ([1]東京工科大医療、[2]東京工科大院バイオ、[3]インドネシア国立オイルガス技術研究開発センター)
○Akane Mikami[1], Yani Faozani Alli[2,3] ([1]Toyo Univ. of Technol., [2]Grad. Sch. of Bionics, Toyo Univ. of Technol., [3]R&D Centre for Oil & Gas Technol.)

【目的】糖化反応は，還元糖とアミンの間で起こる非酵素的な一連の化学反応であり，生体内外や細胞内において普遍的に起こり，糖尿病合併症を始め，老化や多くの疾病の進行に関与する。糖化反応によって形成される糖化産物 (Glycated products, GPs)は，糖化関連疾病の指標として有用であり，これまでに GPsセンシング用 GPs認識素子が多く報告されている。一方，細胞内 GPs センシング技術は，GPs の疾病進行への関与機構，及び細胞内における GPs 形成機構の解明に寄与すると期待されるが，細胞内 GPs モニタリングを可能とする認識素子の報告はない。

これまでに細胞内標的物質に応答する細菌由来転写調節因子及び対応するオペレーター領域を融合したレポーター遺伝子を用いることで，レポーター発現量を指標とした細胞内標的物質のセンシングが可能であることが示されている。

一方，SocR は，*Agrobacterium tumefaciens* 由来 GPs 異化オペロン(*soc* オペロン)の上流にコードされる大腸菌由来転写調節因子 LacI 様タンパク質である。*soc* オペロンにコードされる基質結合蛋白質並びに酸化酵素が GPs である α-フルクトシルアミノ酸(α-FA)に特異的であり，α-FA によって発現誘導されることから，SocR は FA 応答性の転写調節因子であると期待される。

そこで本研究では，細胞内 GPs センシング用の GPs 応答性転写調節因子として SocR に着目し，SocR の転写調節因子としての機能の評価を試みた。

【方法及び結果】SocR 遺伝子をクローニングし，組換え生産および精製後，SocR のリガンド添加に伴う自家蛍光強度変化を測定した結果，SocR が FA に特異的に結合することが示された。またレポーターアッセイを用いた特性検討の結果，本タンパク質が，FA に依存して遺伝子の発現を制御する新規糖化物応答性転写調節因子であることが示された。

Glycation, glycated product recognition molecule, glycated product-responisve transcriptional regulator

発表責任者：三上 あかね（amikami@stf.teu.ac.jp）

講演番号：1E5p01
講演日時：3 月 24 日 13:50～ 1 号館 E5 会場

日本脳炎ウイルス様粒子を利用した薬剤送達技術の開発

Development of drug delivery system utilizing Japanese encephalitis virus-like particle

○永盛 優浩、曽宮 正晴、黒田 俊一（大阪大 産研）
○Masahiro NAGAMORI, Masaharu SOMIYA, Syun'ichi KURODA (ISIR, Osaka Univ.)

近年、体内の様々な部位に対する薬物送達(drug delivery system; DDS)ナノキャリアの研究開発が盛んに行われている。その中で、中枢神経系に対する DDS ナノキャリアの開発は、血中と脳内の物質輸送を厳密に制御する血液脳関門(blood-brain barrier；BBB)が障害となり、未だ困難を極めている。これまでに BBB 透過性ペプチドなどを利用した DDS ナノキャリアの開発が行われているが、未だ完全な中枢神経系指向性 DDS ナノキャリアの開発は成功していない。

本研究では、BBB を透過する DDS ナノキャリアの開発を目指して、脳感染性ウイルスである日本脳炎ウイルス(Japanese encephalitis virus：JEV)に着目した。JEV は BBB を透過して脳内で感染を成立させる RNA ウイルスである。JEV の BBB を透過する性質を利用した DDS ナノキャリアの開発のため、JEV の中枢神経系指向性を担うと考えられるエンベロープタンパク質で構成され、かつ JEV の RNA ゲノムを含まないウイルス様粒子(virus-like particle; VLP)の発現・精製を行い、DDS ナノキャリアとしての効果を評価した。

JEV の細胞内侵入に寄与するエンベロープタンパク質である prM･E タンパク質を CMV プロモーター下で発現するプラスミドを HEK293T 細胞にトランスフェクションした。90 時間後に培養上清を回収し、抗 JEV 抗体を用いるサンドイッチ ELISA による定量の結果、最大で培養上清 1 L あたり約 100 μg の VLP の発現が確認できた。培養上清中の VLP を、硫酸セルファイン樹脂を用いてアフィニティー精製を行った。続いて、精製 VLP を蛍光色素 PKH67GL により標識し、JEV ビリオンに感染することが知られているシリアンハムスター腎臓由来 BHK-21 細胞及びアフリカミドリザル腎臓由来 Vero 細胞に PKH67GL 標識 JEV(VLP)を添加し、24 時間後に共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、両細胞において VLP の細胞内侵入が観察できた。

以上の結果より、prM・E タンパク質のみで構成された JEV の VLP が細胞内侵入能を保持していることが判明した。今後は同 VLP 内部に薬剤を封入し、マウス等を用いた動物実験を行うことで、中枢神経系指向性 DDS の新たなプラットフォームとしての可能性を示したい。

drug delivery system, blood-brain barrier, Japanese encephalitis virus

発表責任者：永盛優浩（nagamori44@sanken.osaka-u.ac.jp）

講演番号：1E5p02
講演日時：3 月 24 日 14:01～ 1 号館 E5 会場

蛍光染色された一本鎖抗体提示ファージによる酸化型 LDL の蛍光検出

Fluorescence detection of oxidized LDL by a fluorescent stained phage displaying single chain antibody

○島田 武典[1]、佐藤 麻里奈[2]、前田 勇[1,2]（[1]宇都宮大院農、[2]宇都宮大農）
○Takenori SHIMADA[1], Marina SATO[2], Isamu MAEDA[1,2]（[1]Grad. Sch. of Agric., Utsunomiya Univ., [2]College of Agric., Utsunomiya Univ.）

バクテリオファージは細菌感染するウイルスで、25～200 nm の粒子を形成する。粒子の殻（キャプシド）を形成するキャプシドタンパク質と融合させることで外来タンパク質やペプチドを粒子表層に提示するファージディスプレイ法は、バイオマーカー計測の有用なツールと考えられる。本研究では、バイオマーカーとして酸化型の低比重リポタンパク質（LDL）を選択し、酸化型 LDL に親和性を有する一本鎖抗体（scFv）を表層提示した組換えファージ（scFv ファージ）を作成することとした。その上で、キャプシドに内包される DNA をインターカレーターである SYBR Green で蛍光染色することが可能か否かを検討した。scFv ファージを SYBR Green で蛍光染色しファージを基盤とした蛍光ナノ粒子を構築することで臨床検査薬の開発を目指した。

ファージは T7 を用い、T7Select10-3 Cloning Kit（メルク・ミリポア）によりヒト酸化型 LDL との親和性を有する一本鎖抗体遺伝子をファージ DNA 中のキャプシドタンパク質 gp10 の遺伝子と連結することで、一本鎖抗体を表層提示した組換えファージを作成した。大腸菌培養液中で増殖させたファージは、ポリエチレングリコールで沈殿させた後、塩化セシウム密度勾配超遠心分離法により精製した。精製後のファージ懸濁液と SYBR Green I（タカラバイオ）を混合し、一定時間経過後の液の蛍光強度を蛍光マイクロプレートリーダーにより測定した。

scFv ファージを変性させた後に、SDS-PAGE 電気泳動によりファージ粒子を構成するタンパク質の分離を行ったところ、scFv と gp10 が結合した大きさに相当する位置に、表層提示がないファージ（ネガティブファージ）には認められないタンパク質のバンドが確認された。また、マイクロプレートウェルにヒト酸化型 LDL を固定し scFv ファージを反応させウェル表面に結合したファージ粒子をプラーク形成により計数したところ、ネガティブファージと比較し親和性の増加が確認された。これらの結果はヒト酸化型 LDL と親和性のある scFv ファージが調製されたことを示す。また、ファージ粒子の SYBR Green I による染色では、時間経過とともに蛍光強度が増加し、5 時間後にはプラトーに到達した。蛍光強度の増加速度は反応温度が 37°C で高く 4°C では著しく低下することから、取り込みにはファージの生物学的活性が関与することが示唆された。これらの結果は、蛍光染色された scFv ファージによるヒト酸化型 LDL の蛍光検出の可能性を示唆するものである。

bacteriophage, single chain antibody, SYBR Green

発表責任者：前田勇（i-maeda@cc.utsunomiya-u.ac.jp）

講演番号：1E5p03
講演日時：3 月 24 日 14:12～ 1 号館 E5 会場

神経伝導測定における電位固定法および電流固定法の問題点
Problems with the measurement of nerve conduction using the voltage and current-clamp methods
加地 麻衣子、○白井 理、北隅 優希、加納 健司（京大院農）
Maiko KAJI, ○Osamu SHIRAI, Yuki KITAZUMI, Kenji KANO (Kyoto Univ.)

【目的】
神経細胞では、K^+ チャネル及び Na^+ チャネルの働きによる局所的な膜電位変化 (活動電位) が軸索上を末端方向へ伝播する。平常時の膜電位は細胞内外の K^+ 濃度比によって決定されており、静止電位と呼ばれている。外部刺激を受けるとシナプス上のチャネル型受容体 (Na^+ チャネル) が開き、細胞内外の Na^+ 濃度比に起因する活動電位に変化する。活動電位が軸索まで伝わると軸索上の電位依存性 Na^+ チャネルが開き、活動電位が軸索上を伝播する。軸索上の活動電位の伝播挙動は一般的に電位固定法と呼ばれる手法により解析されてきた。本研究では、各チャネルの機能を模倣した液膜型セルを複数個並列に設置した神経モデル系を構築し、ある部位で発生した活動電位の他の部位への伝播機構を解明する。さらに、軸索内外に設置した膜電位固定用電極が膜電位変化の伝播に与える影響及び電流固定法を用いた場合に膜電位変化の伝播挙動に与える影響について議論する。
【方法】
ニトロベンゼンを含浸させた四弗化エチレンポリマー製多孔質フィルターを有機液膜として用いた水相 (W1)｜膜相 (M)｜水相 (W2) からなる有機液膜型セルを用意した。各セルにおいて、W1 を細胞外液、W2 を細胞内液、M を細胞膜と見立て、K^+ チャネル及び Na^+ チャネルの機能を模擬する目的で各相のイオン組成を調整した。それらのセルを並列に設置したものを複数組並列に接続することで軸索の一部を模擬した。軸索上の各部位間、膜電位固定用の電極と細胞膜間の液抵抗を考慮して、回路上に抵抗を設置した。W1－W2 間の電位差を固定して、スイッチあるいは外部電気刺激によって軸索上のある部位に相当するセル系 (組) の膜電位を静止電位から活動電位へ変化させて、全てのセルの膜電位と膜電流の変化を記録した。また、電流固定系 (ゼロ電流を含む) における膜電位変化の伝播挙動についても同様にして検討した。
【結果と考察】
電位固定法では、発信部位を活動電位に切り替えると、回路上に環電流が発生し、各セルにおいて膜電位変化が観察された。このとき、膜電位を固定するための電極系にも電流が流れた。この電流の大きさは電極と膜間の抵抗に依存し、電流値が大きいほど活動電位の伝播が促進された。これより、電位固定しない系と比較すると電位固定法では活動電位の伝播が促進されることが判明し、同法による解析には改良が必要であることが判った。電流固定法でもゼロ電流以外の条件では影響が現れた。

Nerve conduction, Membrane potential, Voltage clamp method

発表責任者：白井　理（shiraio@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：1E5p04
講演日時：3 月 24 日 14:23～ 1 号館 E5 会場

有用嫌気性菌の遺伝子導入・破壊の効率的検出システム構築
Development of effective detection system for recombination of useful anaerobic bacteria
○深谷 愛衣[1]、水口 千穂[1,2]、岡田 憲典[1]、井上 謙吾[3]、野尻 秀昭[1,2]([1]東大・生物工学セ、[2]東大・微生物連携機構、[3]宮崎大・農・応生科)
○Ai Fukaya[1], Chiho Suzuki-Minakuchi[1,2], Kazunori Okada[1], Kengo Inoue[3], Hideaki Nojiri[1,2] ([1]BRC, UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Dept. Appl. Biol., Fac. Agric., Univ. Miyazaki)

【背景と目的】近年、生物に有害な物質が土壌や地下水から高頻度で検出され問題となっている。このような環境中の有害物質を除去する方法として、微生物の汚染物質分解能力を活用したバイオレメディエーション技術が注目され、地下水や土壌の汚染浄化において重要な役割を果たす嫌気性細菌の遺伝子レベルでの機能解析が求められている。しかし多くの嫌気性細菌はコロニーの単離や培養に多大な時間と労力を要し、解析に必要な遺伝子導入・破壊系といった遺伝子工学ツール開発が進んでいない場合が多い。そこで我々は遺伝子工学ツールとして、酸素のない状況でも発光できる蛍光タンパク質 evoglow と一細胞レベルで細胞を分取できるフローサイトメーター (FCM) を用いた遺伝子組換え体取得という方法を考案した。この方法ではエレクトロポレーション法などで遺伝子組換え実験を行なった後、遺伝子導入の有無を蛍光タンパク質の発光を指標に判断し、FCM により組換えの起こった細胞のみを分取する。これにより、遺伝子組換え体が得られているかわからない状態でコロニー形成を長い時間待つ必要がなくなり、効率的に組換え体が取得できると考えている。本研究では、このシステムが遺伝子工学ツールとして機能することを嫌気性細菌をモデルとして検証することを目的とした。
【方法と結果】広く研究に使用されている通性嫌気性細菌の大腸菌 DH5α株と、遺伝子導入・破壊系開発の報告がある偏性嫌気性細菌 *Geobacter sulfurreducens* PCA 株 をモデルとした。まず偏性嫌気性細菌において可能な限り死滅させることなく蛍光を測定するため、FCM の周辺をビニールで覆い嫌気環境にすることを試みた結果、酸素濃度を 0.8% まで下げることに成功した。次に FCM で evoglow の蛍光がどう測定できるか確認するため、*evoglow* 遺伝子配列を持つプラスミドを導入した大腸菌を好気条件下の LB 培地で培養し、緩衝液で洗浄した細胞を好気または上述の嫌気条件下の FCM で蛍光を測定したところ、どちらの条件でも 3 種類ある evoglow (evoglow-Bs1, evoglow-Bs2, evoglow-Pp1) の内 evoglow-Pp1 は蛍光の有無により細胞を分画できる程度に発現していたが、他 2 種類では発現が見られなかった。これを受けて、*G. sulfurreducens* PCA では 3 種類の *evoglow* 遺伝子配列それぞれとその上流にこの株の高発現プロモーターとして報告されている *ompJ* プロモーターを持つプラスミドを作製した。現在、これらのプラスミドをエレクトロポレーション法により導入した株（遺伝子導入株）を作製し、その培養液を用いて好気または嫌気条件下の FCM で evoglow 発現量の評価を試みている。

anaerobes, bioremediation, flow cytometry

発表責任者：野尻　秀昭（anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：1E5p05
講演日時：3 月 24 日 14:34～ 1 号館 E5 会場

安定同位体標識ラマンイメージングを用いた糸状菌の代謝ダイナミクスの可視化
Visualizing metabolic dynamics in a filamentous fungus using stable isotope-labeled Raman imaging
○安田 充[1]、竹下 典男[2]、重藤 真介[1] ([1]関西学院大理工、[2]筑波大生命環境)
○Mitsuru YASUDA[1], Norio TAKESHITA[2], Shinsuke SHIGETO[1] ([1]Kwansei Gakuin Univ., [2]Univ. of Tsukuba)

【背景・目的】カビである糸状菌は菌糸の先端を伸長することで生長する。菌糸の先端生長機構を調べるため，本研究ではタンパク質や脂質をはじめとする様々な細胞内分子の空間分布情報をもたらすラマンイメージングに着目した。この技術に安定同位体標識法を融合することで，安定同位体標識化合物の取り込みや代謝に伴って変化する細胞内分子のダイナミクスを可視化できるようになり，菌糸の先端生長機構に関する新たな知見を獲得できると考えた。そこで本研究では，安定同位体標識ラマンイメージングを用いた糸状菌の代謝ダイナミクスの可視化を目的とした。

【実験】糸状菌として *Aspergillus nidulans* を使用した。安定同位体標識化合物には C-H 結合部の H を D (重水素) で，または ^{12}C を ^{13}C で置換した 2 種類のグルコースを使用した。まず安定同位体を含まない通常の液体培地で 1–2 日間，*A. nidulans* を培養した。つぎに，その培地を除去し，安定同位体標識グルコースを含む液体培地を添加して培養した。*A. nidulans* の 532 nm 励起ラマンイメージングを共焦点レーザー顕微ラマン分光イメージングシステム (XploRA Nano，HORIBA) で行った。

【結果・考察】最初に，*A. nidulans* を構成する主な成分を把握するため，通常の液体培地で培養した *A. nidulans* のラマンイメージングデータを，多変量解析の一種である非負値行列因子分解を用いて解析した。その結果，*A. nidulans* のラマンスペクトルは主にシトクロム，その他のタンパク質，脂質，多糖類の 4 成分で構成されることが明らかとなった。つぎに，この解析結果を基に，D 標識グルコースの取り込みのダイナミクスについて調べた。培養時間の経過に伴い，炭素と重水素の結合に由来する C-D 伸縮振動ラマンバンドの出現が観測された。これは *A. nidulans* が D 標識グルコースを取り込んだことを裏付ける。そこで，主要構成成分を含む様々なラマンバンドの強度を用いて分子の空間分布像を解析した。興味深いことに，C-D 結合をもつ分子は菌糸先端の縁に沿って分布していた。これは D 標識グルコースが菌糸先端から選択的に取り込まれたこと，あるいは菌糸先端の代謝活性が高いことを示唆する。そこで今度は，^{13}C 標識グルコースを含む液体培地で培養した *A. nidulans* の代謝ダイナミクスの追跡を試みた。培養初期は ^{12}C に由来するラマンバンドしか観測されなかったが，時間の経過に伴い，^{13}C に由来するバンドが観測された。これは様々な生化学反応を経て ^{13}C をもつ分子が合成されたことを意味している。このように，我々は糸状菌代謝を可視化することに成功した。

filamentous fungus, Raman imaging, stable isotope

発表責任者：重藤真介（shigeto@kwansei.ac.jp）

講演番号：1E5p06
講演日時：3 月 24 日 14:55～ 1 号館 E5 会場

チロシナーゼを用いたテアフラビン 3'-ガレート合成反応の収率向上

Improvement of tyrosinase-catalyzed synthesis of theaflavin 3'-gallate

○奈良井 朝子[1]、内田 有香[1]、川島 彩[1]、中山 勉[2]([1]日獣大　応生科、[2]東京農大　応生科)
○Asako NARAI[1], Yuuka UCHIDA[1], Aya KAWASHIMA[1], Tsutomu NAKAYAMA[2] ([1]Nippon Veterinary and Life Sci. Univ., [2]Tokyo Univ. of Agric.)

【背景・目的】

紅茶葉に含まれる赤橙色色素であるテアフラビン（TF）類は、紅茶製造中の発酵工程において茶葉中のカテキン類が茶葉由来のポリフェノール酸化酵素（PPO）によって酸化的に縮合した二量体である。TF 類には galloyl 基のない TF1, monogallate の TF2A と TF2B, digallate の TF3 の 4 種類が存在し、これらは選択的なカテキン（EC, EGC, ECg, EGCg）の組み合わせによって合成される。TF 類、さらにその酸化重合物のテアルビジンは様々な生理機能を有することが知られており、特に構造が特定されている TF 類を用いた基礎的な研究成果が求められているものの、紅茶葉から抽出精製される TF 類の量は少なく、研究の進展が妨げられている。そこで演者らは、TF 類の安定供給を目指して PPO のモデル酵素として知られるマッシュルーム由来のチロシナーゼとカテキン類の反応から TF 類を合成することを試みてきた。これまでに、本反応の速度論的解析[1)]をおこなった他、基質と生成物の分配係数を基に 1-オクタノール／緩衝液二相系で TF2A の収量を増加できることを見出した[2)]。本大会では、チロシナーゼの自殺不活化現象に着目し、TF2B(theaflavin 3’-gallate)の収量を増加できる反応条件を見出したので、これについて発表する。

【方法と結果】

カテキン類のインキュベーション中に H_2O_2 が生成すること、一方で、チロシナーゼは H_2O_2 を消去するカタラーゼ活性を有するが H_2O_2 により不活化されることが既に報告されていたため、まず、単独のカテキン類にチロシナーゼを添加した反応液中の H_2O_2 を FOX アッセイで定量した。その結果、EGC は非酵素的な自動酸化による H_2O_2 の生成が著しく、ECg は酵素反応を介して H_2O_2 を生成することが認められた。また、H_2O_2 で前処理したチロシナーゼをカテキン類に作用させて RP-HPLC でカテキン類を分析したところ、いずれのカテキン類も減少速度が低下していたことから、反応中に生成した H_2O_2 はチロシナーゼを不活化し、TF 類の合成反応を抑制すると考えた。H_2O_2 の生成が顕著であった ECg と EGC を混合してチロシナーゼと反応させると TF2B が合成されるが、この反応にウシ肝臓由来カタラーゼを共存させて H_2O_2 を消去したところ、対照の反応系に比べて TF2B の生成速度、収量ともに増加することが明らかになった。

1) J. Mol. Catal. B Enzym. 2016, 133, S452-S458. DOI: 10.1016/j.molcatb.2017.03.009
2) J. Agric. Food Chem., DOI: 10.1021/acs.jafc.8b05971 (in press)

tyrosinase, theaflavin, enzymatic synthesis

発表責任者：奈良井 朝子（a-narai@nvlu.ac.jp）

講演番号：1E5p07
講演日時：3 月 24 日 15:06～ 1 号館 E5 会場

超音波処理による低分子化 Schizophyllan の抗アレルギー作用

Anti-allergy effect of low-molecule Schizophyllan under ultrasonic treatment

○湯浅 凌我[1]、高野 真希[2]、星野 一宏[2] ([1]富山大工、[2]富山大院理工)
○ Ryoga YUASA[1], Maki TAKANO[2], Kazuhiro HOSHINO[2] ([1]Fac.Aeng.Univ.Toyama, [2]Grad.Sch.Sci.Eng.Univ.Toyama)

【緒言】担子菌 *Schizophyllum commune* が生産する Schizophyllan (SPG)は、10^6-10^7 の分子量を有するβ1-3, 1-6 glucan であり、抗がん剤や手術前の免疫増強剤として使用されていた。しかし、SPG は水溶液中で三重螺旋構造をとることから難溶性であり、用途開発が難しいことが指摘されてきた。近年では、生理活性を有する低分子化多糖類が注目されている。そこで、溶解性の改善・新規生理活性の探索を目的として低分子化 SPG (LSPG)に着目した。本研究では、本研究室で見出した SPG 高生産菌 *S. commune* により生産した SPG を原料とし、超音波処理を行うことにより LSPG を生成することを検討した。さらに、この生成物である LSPG の抗アレルギー作用を検討した。

【方法】*S. commune* NBRC 6503 を SPG 高生産菌として使用した。SPG 生産は培養体積 150 mL、37°C で 8 日間、150 rpm で好気振とう培養により行った。培養液中の SPG はメタ沈により回収した。SPG の低分子化は 0.4% (w/v)の SPG 水溶液に対して超音波処理(0-60 min, 170 W, 20 kHz, 氷中)することで行った。SPG の低分子化は HPLC を用いた GFC および、還元糖定量により評価した。次に、抗アレルギー作用は RBL-2H3 細胞(ラット好塩基球由来株)を肥満細胞モデルとし、β-hexosaminidase (β-hex)放出抑制を見ることにより評価した。LSPG 溶液添加時の β-hex 放出抑制を見ることで I 型アレルギーの発現抑制を評価した。RBL-2H3 細胞に対して IgE 抗体で感作させた後、LSPG を添加し β-hex の放出量を比較した。

【結果】*S. commune* NBRC6503 を好気振とう培養した結果、8 日目に SPG を 3.7 g/L (MW: 7×10^6)生産できた。この SPG に対して超音波処理を行った結果、処理時間の増加に伴い粘性は低下し、30 分で平均分子量は 1×10^6 となった。次に、この LSPG をメタ沈 (10-50%)によりさらに分画した。10-30%メタノールでは回収できなかったが、40%メタノールでは全 LSPG 中の約 78% (MWav.: 1.9×10^5)、50%メタノールでは約 15% (MWav.: 1.2×10^5)が回収できた。これらの LSPG および未処理 SPG について RBL-2H3 細胞を用いた β-hex 放出試験を行った結果、未処理 SPG には放出抑制効果が認められなかった。一方、40%メタ沈分画 LSPG には若干、50%分画には約 48%の放出抑制効果が確認できた。現在、この LSPG による抗アレルギー作用に関しての IL-4、IL-13 などの発現について検討中である。

Schizophyllan, ultrasonic treatment, anti-allergy

発表責任者：星野一宏（khoshino@sus.u-toyama.ac.jp）

講演番号：1E5p08
講演日時：3 月 24 日 15:17～ 1 号館 E5 会場

カイコでの単一 BmNPV バクミドによる *Neospora caninum* 抗原タンパク質提示ウイルス様粒子発現

Expression of *Neospora caninum* antigen protein-presenting virus-like particle by single BmNPV bacmid in silkworm

○町田 佑樹[1]、平松 利輝人[1]、徐 剣[2]、加藤 竜也[1,2]、朴 龍洙[1,2]（[1]静大院・総合農、[2]静大グリーン研）
○Yuki Machida[1], Rikito Hiramatsu[1], Jian Xu[2], Tatsuya Kato[1,2], Enoch.Y park[1,2] ([1]Faculty of agric Shizuoka Univ., [2]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

【目的】ネオスポラ症は世界的に感染が確認されており、家畜であるウシに感染することで大きな問題となっている。そのネオスポラ症に対するワクチン開発の基盤を構築するために、本研究は単一の遺伝子発現ベクターによる、バクミド-カイコ発現系を用いたネオスポラ抗原タンパク質提示ウイルス様粒子（VLP）発現を目的とした。ネオスポラ抗原タンパク質として Surface antigen 1 (NcSAG1)、SAG1-related sequence 2 (NcSRS2) を用い、ラウス肉腫ウイルス（RSV）の VLP (RS-VLP) に提示させた。
【方法】NcSAG1、NcSRS2 および RSV 由来の group antigen protein (gag) をコードした遺伝子の発現カセットを、単一の *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) バクミドに挿入し、カイコ幼虫で発現させた。得られた rBmNPV をカイコに感染させ、各組換えタンパク質の共発現の確認をした後、RS-VLP をショ糖密度勾配超遠心法により部分精製し、それぞれの抗原タンパク質の提示を確認した。また、アフィニティクロマトグラフィーによりさらに精製を行い、抗原提示している VLP の確認を行った。
【結果・考察】単一の組換え BmNPV により、カイコ幼虫体内での各タンパク質の発現を確認した。ショ糖密度勾配超遠心法で部分精製した RS-VLP 画分で各抗原タンパク質が確認されたことから、表面に提示されていることが示唆された。抗原タンパク質に付加した精製タグを利用したアフィニティクロマトグラフィーにより、抗原タンパク質と共に Gag タンパク質が確認された。またその溶出画分には RS-VLP の粒子が確認された。この結果から、抗原タンパクを提示した RS-VLP がカイコ体液で発現していることが示され、さらに NcSRS2 に比べ NcSAG1 の提示量が多いことが明らかになった。

Virus like particles, Silkworm, *Neospora caninum*

発表責任者：朴龍洙（park.enoch@shizuoka.ac.jp）

講演番号：1E5p09
講演日時：3 月 24 日 15:28～ 1 号館 E5 会場

植物の生育における最適な土壌金属量の解析

Analysis of optimal amount of soil mineral in plant growth

○朴 暁鎮[1]、嶋岡 邦彦[1]、荒木 希和子[2]、久保 幹[2] ([1]立命大院生命、[2]立命大生命)
○Hyojin PARK[1], Kunihiko SHIMAOKA[1], Kiwako ARAKI[2], Motoki KUBO[2] ([1]Ritsumeikan Grad., [2]Ritsumeikan Univ.)

【背景と目的】現代、化学肥料や農薬を用いる農業が主流であり、慣行農法と呼ばれている。化学肥料は、多量要素を中心に構成されており、長年にわたり化学肥料のみを使用し続けると土壌の金属含有量が減少することや、植物体の金属が不足することが報告されている。土壌中の金属量が少ないと、植物は葉の黄化、根毛の未発達などの生育阻害を引き起こす。土壌中の金属の欠乏を回復させるためには、土壌環境に金属を投入する必要がある。しかし、金属が土壌中に過剰に存在すると、植物の生育は悪影響を受ける場合がある。金属がリン酸と結合し、植物は成長に必要であるリン酸を吸収することができなくなることが一因である。また、金属は土壌 pH にも影響を与える。このことから、植物にとって適した土壌中の金属条件についてさらなる研究が求められている。本研究では、土壌環境における植物の適切な金属量を明らかにすることを目的とした。
【方法】バーミキュライト、山土、ピートモス、黒土を 5:3:1:1 の割合 (v/v)で混合したものをベース土壌とした。ベース土壌に有機資材（牛糞 5%、油かす 0.25%、大豆かす 0.25%、骨粉 0.05%を重量比で混合したもの）を投入したものを有機土壌とした。また、木質、山土、黒土を 6:3:1 の割合 (v/v)で混合したものに有機資材を投入した土壌を木質有機土壌とした。これらの土壌に金属含有資材（鉄鉱スラグ、天然資材）を土壌の重量で調整して投入した。有機土壌と木質有機土壌にコマツナの苗を定植し、植物育成室で 4 週間の栽培を行った。栽培前、栽培 2 週目、栽培 4 週目の土壌の細菌数（slow stirring 法）、pH、金属量及び、リン循環活性評価値（基質としてフィチン酸を加え、微生物の分解能を見る分析）を測定した。また、栽培実験後、コマツナの重量（地上部、地下部）やその金属成分（Ca、Fe、Mg、Zn、Mn）、SPAD 値等を測定した。
【結果・考察】金属含有資材の投入により微生物数はほとんど変わらなかった。鉄鉱スラグを添加する量が増加するにつれ、土壌 pH が増加し、物質循環に活性が見られた。また、金属資材の濃度によってコマツナ地上部の金属量は変化した。金属資材を過剰量である 2%添加した条件においても無添加と比べ、大きな差は見られなかったため、金属資材を土壌中に過剰投入してもコマツナの成長に悪影響を与えないことが分かった。金属資材を添加することにより、植物体で金属量が増加する傾向が見られた。これらの結果から、土壌中の金属含有資材の最適な量を報告する予定である。

Mineral, plant growth, soil environment

講演番号：1E5p10
講演日時：3 月 24 日 15:39～ 1 号館 E5 会場

有機資材の土壌環境に対する影響の解析

Analysis of influence organic materials on soil environment

○前田 憲慶[1]、荒木 希和子[2]、久保 幹[2] ([1]立命館大院生命、[2]立命館大生命)
○Kazuyoshi MAEDA[1], Kiwako S. Araki[2], Motoki Kubo[2] ([1]Ritumeikan Grad., [2]Ritumeikan Univ.)

【背景・目的】植物の栽培方法には主に化学栽培と有機栽培の 2 通りがある。植物に対する限られた無機成分を化学肥料により施肥している農地では、土壌微生物の栄養源である有機物量が少なくなり、微生物の数や種多様性が低くなる。一方、様々な成分を含む有機肥料を施肥した場合、微生物の生育源となる有機物が土壌中に供給されるため、微生物の代謝や増殖が促進され、数や多様性が高くなる。一般的に化学栽培では、土壌に施肥をする化学肥料の量は明確であり、栽培ごとの作物の再現性は高くなるが、有機栽培では、施肥する肥料の種類や量は、勘や経験に頼ることが多く、栽培ごとで作物の再現性を得るのが難しかった。当研究室では、土壌肥沃度指標（SOFIX）を構築し、土壌の有機物量と微生物数が密接に関わることを見出した。土壌に添加する資材によっては、微生物の種数を増加させ、微生物を活性化することができると考えられた。土壌微生物の量や種数の増加は、植物病原菌に対する拮抗菌の増加につながり、植物病害の抑制につながると考えられる。本研究では、有機物量の異なる土壌を作製し、資材の添加による土壌微生物の活性化をみることを目的とした。
【方法・結果】バーミキュライト、山土、黒土、ピートモス、木質チップを混合したものをベース土壌とし、有機肥料（牛糞堆肥、大豆粕、油粕、骨粉）の施肥および、化学肥料（硫酸アンモニウム、過リン酸石灰、硫酸カリウム）の施肥を行い、有機土壌（炭素量が多い土壌）および化学土壌（炭素量が少ない土壌）を作製した。作製した 2 種類の土壌に、5 種類の有機資材（ミネラル資材、大豆ペプチド、バチルス資材、乳酸菌資材、木酢液）をそれぞれ添加した土壌を作製した。有機資材を未添加の土壌と、添加した土壌を含水率 30%に調節し、室温で 1 週間静置した。資材未添加の土壌と資材添加土壌について、細菌数（slow stirring 法）および細菌叢（PCR-DGGE 法）を測定した。菌叢解析には Bio-rad 社の Dcode を使用した。その結果、有機資材未添加の土壌については、化学土壌の総細菌数は検出限界（6.6×10^6 cells/g-soil）以下であったのに対し、有機土壌では、いずれの菌数も 6.0×10^8 cells/g-soil 以上となっており、有機土壌の方が明らかに高く、菌叢にも違いがみられた。有機資材を添加した土壌において、有機土壌では大きな菌叢変化は認められなかったが、化学土壌では明らかな菌叢変化がみられた。有機土壌では、菌数や菌種が豊富であったため、資材ごとに菌叢の違いがみられなかったが、化学土壌では、菌種が少なかったため、資材ごとに増大する菌種が異なっていることがわかった。菌叢解析の結果についてクラスター解析を行い、資材ごとの菌叢変化の程度を報告する予定である。

Bacterial microflora, Organic cultivation, Soil environment

講演番号：1E5p11
講演日時：3 月 24 日 16:00～ 1 号館 E5 会場

琵琶湖水系におけるセタシジミの生息環境解析

Habitat analysis of *Corbicula sandai* in Lake Biwa

○庄司 知広、荒木 希和子、久保 幹（立命館大生命）
○Tomohiro SHOJI, Kiwako S. ARAKI, Motoki KUBO (Ritsumeikan Univ.)

【背景・目的】琵琶湖は約 440 万年の歴史をもつ世界有数の古代湖であり、炭素やリン、地磯など豊富な栄養塩が存在しており、多くの固有種が存在している。しかし富栄養化による水草の大量繁茂により、枯死して沈殿した水草が微生物に分解され、湖底が低酸素化する現象が見られている。酸素の少ない湖底では底質が泥化し、微生物や他の底生生物が生息しにくい環境となる。底生生物の 1 つに琵琶湖の固有種であるセタシジミがある。セタシジミは水産資源として、古くから琵琶湖で利用されてきたが、シジミの漁獲量は 1957 年の 6,072 t をピークに減少し、現在では環境省レッドリストの絶滅危惧Ⅱ種に指定された。セタシジミは湖内でも底質が砂地で浅瀬のところに多く生息している。水中の酸素や砂、懸濁物を同時に吸い込み、懸濁物をエラによりろ過して栄養塩を摂取すると同時に浄化された水を排出する。滋賀県ではシジミの増加を目指して、養成や放流に加え、砂地の造成、水草の除去、底質の泥化防止のための耕運作業による生育環境の改善を行っているが、個体数は漁獲量ピーク時には程遠い状況である。本研究では、琵琶湖水系の瀬田川において水質及び底質とセタシジミの個体数を調査し、この種に適した生息環境を解明することを目的とした。
【方法】2018 年 4～12 月に瀬田川において 8 ヶ所（上流から下流）から月に 1 回サンプリングを行い、シジミの個体数、底質の地質状況及び水の全炭素量（TC）、全有機態炭素量（TOC）、全窒素量（TN）など全 8 項目を測定した。また、底質の TC、TN、総細菌数など全 9 項目を測定した。
【結果】セタシジミの個体数は中流、上流、下流の順で多かった。瀬田川上流では、地質が泥質で、総細菌数が夏にかけて増加し、秋に減少した。中流では砂地が多く、総細菌数は一定であった。下流の地質状況は泥質で、総細菌数が減少傾向であった。底質の TC は春から秋にかけて一定であり、TN は減少傾向を示した。また上流から下流にかけて TC 及び TN の値が高かった。一方、水中に含まれる TOC 及び TN は 6 月まで減少傾向であったが、夏にかけて急激に増加した。以上のことから、春から夏にかけて気温上昇に伴って生物が活発化し炭素や窒素を取り込んだことで、底質中及び 6 月まで水中の炭素や窒素が減少したと考えられる。また水中の TOC や TN は藻類が大発生などにより、夏にかけて急激に増加したと考えられている。瀬田川中流の砂地では、底質の総細菌数が一定で TC が他地点と比べ過多でなかったことから、適度に微生物による有機物の分解があるためヘドロが溜まりにくい環境であると推測される。ゆえに、このような環境がシジミの生息に適している環境であると示唆される。

Corbicula sandai, habitat analysis, sediment

講演番号：1E5p12
講演日時：3 月 24 日 16:11～ 1 号館 E5 会場

珪藻殻への有用タンパク質提示発現による機能性材料開発

Development of functional material by displaying useful proteins to frustules of a marine diatom.

○大西 菜月、中島 健介、辻 敬典、松田 祐介（関西学院大院・理工・生命）
○Natsuki ONISHI, Kensuke NAKAJIMA, Yoshinori TSUJI, Yusuke MATSUDA (Dept.Biosci., Grad.Sch.Sci.Tech., Kwansei Gakuin Univ.,)

珪藻細胞は、ナノメートルオーダーの微細フラクタル構造を持つ珪酸質の被殻（frustule）に覆われている。珪藻の被殻形成には、silica affinity protein（Silaffin）ペプチドが関与し、Silaffin の N 末端移行シグナルを任意のタンパク質に付加することで、そのタンパク質を被殻に提示発現させることが可能である。珪藻殻を担体とする酵素固定化法は、生体内の温和な条件下での固定化が可能であるだけではなく、光合成により海水と光で自己増殖するため環境に対する負荷も低いという利点がある。本研究では、海洋性珪藻 *Thalassiosira pseudonana* を用い、抗菌作用を有する Protamine および有機リン農薬を分解する Phosphotriesterase（PTE）の珪藻被殻への提示・固定を試みた。

有用タンパク質を被殻に提示させるために、Silaffin 由来の被殻移行シグナル（TpSil3）を用い、TpSil3 の下流に FLAG タグを介して GFP を付加した有用タンパク質を珪藻細胞で発現させた。まず、TpSil3: FLAG の C 末端側に Protamine:GFP を連結した融合タンパク質（TpSil3:FLAG:Protamine:EGFP）を *T. pseudonana* で発現させたところ、GFP 蛍光は被殻ではなく細胞質に局在した。一方、Protamine と GFP の順番を入れ替えた融合タンパク質（TpSil3:FLAG:EGFP:Protamine）を発現させた細胞では、GFP 蛍光は被殻に局在した。この結果から、被殻移行シグナル TpSil3 の C 末端側近傍に Protamine が存在することでタンパク質の被殻への移行が阻害され、TpSil3 と Protamine の間に GFP を挿入して距離をとることで移行シグナルが正常に機能しタンパク質が被殻に提示されることが分かった。被殻移行シグナル TpSil3 には、Lys を多く含むペンタリジルクラスターが存在し、本クラスターの Lys 残基が被殻へのタンパク質輸送に重要であると考えられている。Protamine は Arg が連続する配列を複数持っており極端に塩基性であるため（pI=約 13.3）、Protemine を被殻移行シグナルの近傍に連結すると、Protamine 自身の正電荷がペンタリジルクラスター機能に何らかの形で干渉し、被殻への移行が阻害されたものと推測される。PTE の被殻提示発現も並行して進めており、効果的な提示発現に必要な融合タンパク質の条件を検討している。

diatom, silica, immobilization

講演番号：1E5p13
講演日時：3 月 24 日 16:22～ 1 号館 E5 会場

電気化学バイオセンサーによる E 型肝炎ウイルス様粒子の高感度かつ迅速な検出法の開発

Development of high sensitive and rapid electrochemical sensing platform for Hepatitis E virus-like particles

○竹村 謙信[1]、ダッタ　チョードリ アンカン[2]、李 天成[3]、鈴木 哲郎[4]、朴 龍洙[1,2]([1]静岡大院・自科教・バイオサイエンス、[2]静大グリーン科技研、[3]ウイルス第 2 部・国立感染研、[4]浜医大・医・医学科)

○Kenshin Takemura[1], Ankan Dutta Chowdhury[2], Tian-Cheng Li[3], Tetsuro Suzuki[4], Enoch. Y Park[1,2] ([1]Dept. Biosci., Grad. Sch. Sci. Technol., Shizuoka Univ., [2]Res. Inst. Green Sci. Technol. Shizuoka Univ., [3]Dept. Virol. II, Nat' l Inst. Infect. Dis., Japan., [4]Dept. Infect. Dis, Hamamatsu Univ. Sch. Med.)

【背景・目的】E 型肝炎ウイルス（HEV）は E 型肝炎の原因ウイルスであり、臨床症状は A 型肝炎に似通るが、重症である場合致死率は 1%～2%とおよそ 10 倍の値を示す。国内においてはブタ・イノシシの未加熱肉摂食により感染が確認され、2018 年度 47 週現在の全国感染報告数は 407 例と現在においても非常に感染者の多い危険なウイルスである。その検出法は PCR 法及び ELISA 法がスタンダードとなっており前者は設備と技術、後者は時間を要し、ウイルス拡散防止の為の高感度かつ迅速な抗原検出法は未だ存在していない。本研究では HEV 特異的抗体結合グラフェン量子ドット（Ab-GQD）及び金ナノ粒子-ポリアニリン（Au-PAni）複合体を電極上に形成することで、迅速かつ高感度に HEV 構造蛋白を検出可能な電気化学を原理とする検出法を構築した。

【方法】Au-PAni は水層と有機層を用いた界面重合法により合成された。また、窒素および硫黄でドープされたグラフェン量子ドット（N、S-GQD）は、チオ尿素とクエン酸との標準的な水熱法によって調製した。GQD への抗体修飾は抗体上の炭素分子と GQD 上にドープされた N を化学的に架橋することで達成している。Au-PAni は Ab-GQD 上にドープされた S 分子と Au が保持する S への親和性により結合し、Ab-GQD-Au-PAni 複合体を形成する。GQD と Au-PAni の間に生じる相乗効果は電極上においてナノスケールの表面積増加及び導電性の増加を誘起する。センサーとウイルスは Ab－GQD 上に修飾された抗体により特異的に結合する。この抗原抗体反応の段階では更に外部電気パルスを導入し、ウイルス粒子表面積を拡大することでセンサー部位との結合効率を増加させた。ウイルス粒子の電極上への結合による検出は電気化学インピーダンス分光法（EIS）によってセンサー上の電荷移動抵抗値を測定することで行われる。本研究ではターゲットウイルスサンプルとして E 型肝炎ウイルス様粒子（HEV-LPs）を用いている。

【結果】Ab-GQD-Au-Pni を用いた電気化学センサーは 1 fg から 100 pg/ml までの広い線形範囲の HEV-LP 検出を可能とし、その検出限界 0.8 fg/ml であった。検出に要する時間はウイルス添加からおよそ 10 分程であり、非常に迅速である。また、ヒト血清中に HEV-LPs を懸濁した条件下であってもその検出安定性は十分なレベルを保ち、これらの結果は本研究が迅速かつ高感度な HEV 検出法としての有用であることを示している。

GQD, Au-PAni, Electrochemical

発表責任者：竹村　謙信（takemura.kenshin.16@shizuoka.ac.jp）

講演番号：1E5p14
講演日時：3 月 24 日 16:33～ 1 号館 E5 会場

A fluorometric biosensor for serotype specific Dengue detection

○Ankan Dutta Chowdhury[1], Takemura Kenshin[2], Fahmida Nasrin[2], Indra M Khorish[3], Enoch Y. Park[1,2,3] ([1]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, [2]Department of Bioscience, Graduate School of Science and Technology, [3]College of Agriculture, Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka University)

Early diagnosis is the most crucial step to decrease the fatality rate for virus infection like Dengue. Due to the absence of suitable rapid, reliable and inexpensive method available for the identification of Dengue serotypes, there is an utmost need in biosensor development. In search of a new methodology, we have developed a simple fluorometric way of Dengue serotype identification by using a new class of LSPR based methodology using gold nanoparticles (AuNP) and fluorometric CdSe QDs. The distance dependent fluorescence properties of QDs has been tuned in this system, controlling the adjacent AuNP position using single stranded complementary structured hairpin DNA based nanoprobe. We have designed the two types of nanoprobe assemblies with the analyte Dengue DNA, creating desired distance for successive quenching as well as fluorescence enhancement. Results obtained in this study, clearly demonstrate that the developed system can efficiently detect the four serotypes of Dengue DNA individually in the concentration range of 10^{-15} M to 10^{-9} M without any modification of the analyte DNA prior to analysis which is the strong advantage over other PCR based methodologies. To confirm its applicability in complex DNA system, the sensor was also applied to the clinically isolated 10^{-12} M Dengue samples successfully which can lead for the development of sensitive and robust sensing probes for biomedical applications in future.

Biosensor, Dengue, Detection

発表責任者：Enoch Y. Park（park.enoch@shizuoka.ac.jp）

講演番号：1E5p15
講演日時：3 月 24 日 16:44～ 1 号館 E5 会場

Detection of Influenza virus by controlling the distance of fluorescent quantum dots and adjacent gold nanoparticles

○FAHMIDA NASRIN[1], Ankan Dutta Chowdhury[2], Kenshin Takemura[1], Hiroyuki Honda[3], Enoch Y. Park[1,2] ([1]Lab. of Biotech., Grad. Sch. of Sci. Technol., Shizuoka Univ., [2]Lab. of Biotech., Res. Inst. of Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., [3]Dept. of Biomol. Engineering, Grad. Schl of Engineering, Nagoya Univ.)

Localized surface plasmon resonance (LSPR) has emerged as an efficient tool in last decade among other label-free biosensing techniques. It offers rapid, sensitive and low level of detection of biomolecule. Conventional LSPR-based biosensing strategies utilize the sensitivity of the plasmon frequency to change its local impact on the nanoparticle surface. The plasmon effects are highly dependent on the size, shape and distance between the donor and acceptor duos. Here, in this work, we have used a surface functionalized fluorescent CdSeZnS quantum dots as an optical probe and different chain length of peptide conjugated AuNP as the SPR donor for the detection of influenza virus. Monoclonal antibody is conjugated with different sized of particularly designed peptide linked AuNP and then optimized their role in LSPR with its adjacent CdSeZnS QDs. The mostly suitable peptide of AcO-CGGGGGDGGGGDGGGGGK (18 mer) with the length of ~8.5 nm has been optimized to get best result for LSPR enhancement in the interaction between 5–6 nm of CdSeZnS QDs and 25–30 nm AuNPs. The whole system has performed for the application of Influenza A(H1N1) virus detection. The attached virus on the antibody-conjugated peptide between the QDs and AuNPs induces the steric hindrance property and hence creates the fluorescence quenching of QDs in proportion with the virus concentration. The superiority of this current work is found in its femtomolar detectability which can be used for the development of high performance and robust sensing probes for future biomedical applications.

Localized surface plasmon resonance, Biosensor, Influenza virus

発表責任者：Enoch Y. Park（park.enoch@shizuoka.ac.jp）

講演番号：1E6a02
講演日時：3 月 24 日 09:11～ 1 号館 E6 会場

複機能性物質カリキンの受容体阻害剤探索とその応用に関する研究

Development of receptor inhibitors of multifunctional substance "karrikin"

○酒井 寿彦、姜 凱、喜久里 貢、徐 玉群、高橋 郁夫、太田 鋼、宮川 拓也、田之倉 優、中村 英光、浅見 忠男（東大院・農生科・応生化）
○Toshihiko SAKAI, Kai Jiang, Ko Kikuzato, Yuqun Xu, Ikuo Takahashi, Tsuyoshi Ota, Takuya Miyakawa, Masaru Tanokura, Hidemitsu Nakamura, Tadao Asami (Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. of Tokyo)

【背景・目的】 Karrikin（KARs）は山火事などにより植物が燃焼すると生じる煙中の成分である。KAI2 は KARs を受容することによって種子の発芽を促進するための情報伝達因子であり、焼け野原となった大地に再び植物を繁茂させるといった、重要な役割を果たしていると考えられている。KAI2 はコケ植物から種子植物まで様々な植物が持っており、胚軸伸長の抑制といった光形態形成や、アーバスキュラー菌根菌との共生、乾燥耐性の付与などにも関わっていることが知られている。しかし、植物内在性の KAI2 タンパク質のリガンドは未だ明らかになっていない。KAI2 の真のリガンドが不明な状況にも関わらず、KARs の発見により様々な KAI2 タンパク質の機能の追究が可能になった。この事実はアゴニストの発見と利用がタンパク質の機能解明に有効であったことを示している。同様に KAI2 受容体阻害剤の創製と応用により、未解明な多様な植物における KAI2 機能の追究が可能になると期待できる。そこで KAI2 阻害剤の探索を行った。

【方法・結果】 KAI2 はストリゴラクトン（SL）受容体である D14 と同様にα/β加水分解酵素ファミリーに属し、リガンドの受容機構やシグナル伝達機構に多くの共通点を有していることから、D14 アンタゴニストとしての特性をもたせた KAI2 アンタゴニストの創製が可能になると考えた。そこで当研究室で開発された SL アンタゴニスト探索のために構築された化合物ライブラリーを対象として KAI2 アンタゴニストのスクリーニングを行った。KARs は植物の胚軸伸長を抑制することが知られているため、シロイヌナズナの胚軸伸長抑制の阻害を指標とした。その結果、KAI2 阻害剤候補化合物として２種類の化合物を選抜した。

胚軸伸長抑制にはストリゴラクトン（SL）-D14 系も関わっているため、上記２つの化合物について KAI2 のみでなく D14 に対するアンタゴニスト活性を評価した。シロイヌナズナ *kai2* 変異体に上記化合物を投与し、SL による胚軸伸長抑制の回復を観察したところ、胚軸伸長抑制の回復は見られなかったため、これら化合物は選択的に KAI2 を阻害している可能性が示唆された。さらに、等温滴定カロリメトリーを用いた KAI2 タンパク質と化合物の親和性の測定では、２つの候補化合物のうち１つの化合物について、KAR1 よりも高い親和性を観察することができた。加えて、RT-PCR により KAI2 の下流に位置する *DLK2* の発現を観察したところ、これらの化合物を処理することにより発現量が有意に変化していることが確認された。現在、さらなる生化学的な解析によるこれらの化合物の KAI2 阻害剤としての特性の評価を行っている。

karrikin, KAI2, inhibitor

発表責任者：酒井寿彦（life.baske.life@gmai.com）

講演番号：1E6a03
講演日時：3 月 24 日 09:22～ 1 号館 E6 会場

ストリゴラクトンシグナルがシロイヌナズナの病害抵抗性に及ぼす影響の解析
Effects of strigolactone signaling　on disease resistance in Arabidopsis
○草島 美幸[1,2]、米山 弘一[3]、秋山 康紀[4]、野村 崇人[3]、仲下 英雄[1]、浅見 忠男[2]([1]福井県大生資、[2]東大院応生化、[3]宇大バイオ、[4]阪府大院生命環境)
○Miyuki KUSAJIMA[1,2], Koichi YONEYAMA[3], Kohki AKIYAMA[4], Takahito NOMURA[3], Hideo NAKASHITA[1], Tadao ASAMI[2] ([1]Fukui Pref. Univ., [2]Univ. of Tokyo, [3]Utsunomiya Univ., [4]Osaka Pref. Univ.)

様々な植物ホルモンのクロストークが植物の多様な生理現象を調整することが明らかになってきている。近年、植物ホルモンとして同定されたストリゴラクトン（SL）が病害抵抗性に及ぼす影響の詳細は明らかになっていない。これまでにイネやトマト、シロイヌナズナにおいて SL アナログ（4BD）の処理は全身獲得抵抗性（SAR）の誘導に影響を及ぼさないことを明らかにしている。しかし、シロイヌナズナの SL 関連変異株では野生株と比較して病害抵抗性が弱い傾向が観察された。また、イネの SL 受容体 D14 の過剰発現株は病害抵抗性が増強されることも示されている。本研究ではシロイヌナズナを用い、SL シグナルの活性化が病害抵抗性に及ぼす影響を解析した。

植物への SL 処理は、培養土で 2 週間栽培したシロイヌナズナ野生株（Col-0）および SAR 誘導欠損株（*npr1-2*）に SL アナログ（GR24）を灌注処理することにより行った。病害抵抗性の評価は、GR24 処理 3 日後に植物病原細菌 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 を接種し、病原菌の増殖を解析することにより行った。また、GR24 処理後の植物での病害抵抗性関連遺伝子の発現についても解析を行った。

無処理と比較して GR24 処理区では、病害抵抗性の増強効果が認められたが、その効果は SAR 誘導剤を処理した場合と比較すると弱い効果であった。また、SAR が誘導されない *npr1-2* 欠損株においても GR24 処理は病害抵抗性を誘導した。遺伝子発現解析を行った結果、GR24 を灌注処理した場合においても、SL 応答性遺伝子の発現誘導が確認された。一方、SAR マーカー遺伝子の発現誘導は見られなかったことから、サリチル酸を介した SAR とは異なるメカニズムによって SL は病害抵抗性を誘導することが示唆された。

strigolactone, arabidopsis, disease resistance

発表責任者：草島美幸（m12kusajima@gmail.com）

講演番号：1E6a04
講演日時：3 月 24 日 09:33～ 1 号館 E6 会場

ストリゴラクトンシグナルに関わる転写因子 NF-YC の機能解析
Functional relationship between strigolactone and Nuclear Factor YC
○石川 尭彦[1]、池上 佳菜子[1]、長江 未有[1]、増口 潔[2]、高橋 郁夫[1]、中村 英光[1]、浅見 忠男[1]([1]東大院・農生科・応生化、[2]東北大院・生命科学)
○Takahiko ISHIKAWA[1], Kanako IKEGAMI[1], Miyu NAGAE[1], Kiyoshi MASHIGUCHI[2], Ikuo TAKAHASHI[1], Hidemitsu NAKAMURA[1], Tadao ASAMI[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. of Tokyo, [2]Grad. School of Life Sci., Tohoku Univ.)

【背景と目的】
ストリゴラクトン(SL)は分げつへの抑制、栄養欠乏耐性の付加といった農業上有用な形質を制御する植物ホルモンである。その研究は近年急激に発展しているが、そのシグナル伝達機構には不明な点が多い。我々は前年度大会で、SL シグナルの伝達因子と相互作用する転写因子 NF-YC における、シロイヌナズナでの過剰発現株の形態を報告した。NF-YC は真核生物に広く保存されており、動物では分化やガンに関連する因子として研究が進んでいる。一方で、植物においては複数のホモログが存在し機能重複が見られるため、それぞれの機能については未解明な点が多く残されている。これら *NF-YC* のシロイヌナズナ過剰発現株(*NF-YC*ox)のいくつかでは、花茎数の減少や発芽の促進などの形態が見られた。今回、これら変異株を用いて NF-YC と SL シグナルの関連性を追究し、一方で NF-YC と SL シグナル伝達因子間の相互作用が果たす役割を探索した。
【方法と結果】
*NF-YC*ox において SL シグナル伝達因子を欠損させたところ、花茎数の減少は見られなくなった。このことから、NF-YC と SL シグナルが関連している可能性があると考え、*NF-YC*ox の根元部分より抽出した RNA を用いた qRT-PCR を行った。その結果、SL シグナル応答遺伝子の発現量増加が見られた。また、SL が関連する形質である糖ストレス応答や高温種子発芽の促進でも、*NF-YC*ox は SL シグナルに対し正の挙動を示した。これにより *NF-YC* 過剰発現が SL シグナルを亢進すると考えられた。SL 生合成遺伝子の発現量を調べると、*NF-YC*ox では野生株よりも SL 生合成遺伝子の発現量が増加していることが判明した。これらの結果と、一般に NF-YC は他の転写因子と結合しその転写因子と協調して機能することが多いことを踏まえ、NF-YC は SL シグナルに含まれる、ある転写因子の機能を促進させているという仮説を立てた。
それを受けて、NF-YC が SL シグナル伝達因子と結合するドメイン探索を、酵母 two-hybrid 法により行った。すると NF-YC は HFD という転写活性に必須のドメインにおいて、SL シグナル伝達因子と結合することが判明した。また SL シグナル伝達因子を欠損させた *NF-YC*ox では SL 生合成遺伝子の発現変動に変化が見られた。このことから SL シグナル伝達因子は SL シグナルを促進させる NF-YC の機能を相互作用により制御している可能性があると考えられた。

Strigolactone, Nuclear Factor YC, Transcription Factor

講演番号：1E6a05
講演日時：3 月 24 日 09:44～ 1 号館 E6 会場

ストリゴラクトンとブラシノステロイドによる光形態形成制御における PIF と *STH7* の関係の解析
Analysis of the relationship between PIF and *STH7* in photomorphogenesis control by strigolactone and brassinosteroid

○岡本 光紗[1]、タッサグンパニト ジュティポーン[1]、永井 優子[1]、中野 雄司[2]、中村 英光[1]、浅見 忠男[1] ([1]東大院・農生科・応生化、[2]理研・CSRS)
○ Misa OKAMOTO[1], Jutiporn THUSSAGUNPANIT[1], Yuko NAGAI[1], Takeshi NAKANO[2], Hidemitsu NAKAMURA[1], Tadao ASAMI[1] ([1]Dept. App. Biol. Univ. of Tokyo, [2]RIKEN・CSRS)

【背景と目的】植物が光照射を受けると胚軸伸長の抑制など光形態形成が促進される。光形態形成を制御する因子のひとつに植物ホルモンがあり、ストリゴラクトン（SL）は胚軸伸長を抑制しブラシノステロイド（BR）は反対に促進することが知られている。この 2 つのホルモンは B-box 転写因子である STH7 を介して胚軸長を制御していることが我々を含めた先行研究にて解明されている。
点変異により BR シグナルを正に制御する転写因子 BIL1/BZR1 機能が恒常的に発現する変異体 *bil1-1D* と、STH7 を過剰発現させた変異体 *STH7ox* と発現抑制した *STH7-SRDX* の二重変異体を使用した解析によって、BR は BIL1 を介して *STH7* の発現を抑制していることが明らかになっている。一方、フィトクロム相互作用因子（PIF）は光形態形成を抑制する転写因子である。BIL1 は PIF と相互作用をすることが知られており、BIL1 は PIF と相互作用することで光形態形成遺伝子発現を抑制することが知られている。このことから我々は PIF が SL と BR の *STH7* を介した光形態形成の制御フローに関与しているという仮説を立て作用機序の解析を進めている。
【方法と結果】SL, BR による光形態形成の制御に PIF が関与している可能性の検証のため、シロイヌナズナ *pif* 欠損変異体 *pif1, pif3, pif4, pif5, pifq*（*pif1, pif3, pif4, pif5* 四重変異体）を使用した。合成 SL アゴニストである GR24、活性型 BR であるブラシノライド（BL）、BR 生合成阻害剤 Brz を加えた培地で *pif* 変異体を 4 日間生育させて胚軸長を観察し、その後 qRT-PCR で *STH7* の発現量を測った。その結果 *pif* 変異体では GR24、BL、Brz の有無に関係なく胚軸長が短くなっており、*STH7* 発現量も増加していた。また、GR24、BL、Brz の胚軸伸長への効果は *pif* 変異体でも見られたことから、SL や BR による光形態形成制御は PIF を介さない経路が存在することが示唆された。一方、*pif* 変異体においては、野生型と比較しての GR24 による促進効果が顕著に増強されていた。すなわち PIF は SL による光形態形成を抑制していることが示唆された。この機構を精査するため、*ELIP2* や *CHI* 等の、*STH7* の下流にある遺伝子の発現量を測った。この結果 *STH7* 同様、これらの遺伝子の発現も SL シグナルによる促進効果が PIF により抑制されていた。
　これらの結果から、光形態形成の制御に置いて PIF と SL、BR シグナルは一部ではクロストークしながらそれぞれ独立に作用しているという、複雑な制御機構が存在することが示唆された。現在、*ELIP1* や *FLS1* 等他の STH7 に制御される遺伝子や *TCH4*、*SAUR-AC1*、*EXP1* 等の胚軸伸長の制御に関与する遺伝子の発現量を解析している。

Strigolactone, Brassinosteroid, Photomorphogenesis

講演番号：1E6a06
講演日時：3 月 24 日 10:05～ 1 号館 E6 会場

ヒマワリにおける ε -カーラクトンのヘリオラクトンへの変換

Conversion of ε-carlactone to heliolactone in sunflower

○留河 愛梨[1]、謝 肖男[2]、米山 弘一[2]、秋山 康紀[1] ([1]阪府大院・生命環境、[2]宇都宮大・バイオ)
○Airi Tomekawa[1], Xiaonan Xie[2], Koichi Yoneyama[2], Kohki Akiyama[1] ([1]Grad. Sch. Life & Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Ctr. for Biosci. Res. & Educ., Utsunomiya Univ.)

【目的】ストリゴラクトン(strigolactone, SL) は植物が生産するアポカロテノイドであり、根寄生植物や AM 菌に対する根圏情報物質、植物地上部の枝分かれを抑制する内生ホルモンとして働く。SL は all-*trans*-β-carotene から生産されるカーラクトン (carlactone, CL)を中間体として生合成される。ヒマワリが生産する SL であるヘリオラクトン (heliolactone)は、A 環に ε 環を持つ天然 SL である。β 環を有する CL がヘリオラクトンの生合成中間体であるならば、3 位の酸化に加えて二重結合の転位が必要となる。これまでにイネの DWARF27 が all-*trans*-α-carotene の ε 環側の 9'-10'位の異性化を触媒すること、シロイヌナズナの CCD7 が ε 環を持つ 9-*cis*-lutein の酸化的開裂を触媒することが報告されている。これらのことから、ヘリオラクトンが all-*trans*-α-carotene などの ε 環を持つカロテノイドを出発基質として生合成される可能性が示唆されており、その中間体として ε 環を持つ ε-CL が候補として挙げられている。最近、ヒマワリ根への投与実験により、CL からヘリオラクトンが生成することが報告されたが、ε-CL を中間体とする生合成経路についてはこれまでに調べられていない。そこで本研究では、安定同位体標識 ε-CL の合成法を新規に開発し、ヒマワリ根による変換産物の解析を行うことにより、ヘリオラクトンが ε-CL を中間体として生合成される可能性を検証した。

【方法・結果】2-Methyl-3-buten-2-ol を出発物質、CD_3MgI を標識試薬として、11 段階の反応を経て [18-D_3]-ε-CL を合成した。この重水素標識 ε-CL をヒマワリ根へ投与したところ、ヘリオラクトンへの変換が見られた。このことからヘリオラクトンの生合成経路において、ε-CL を中間体とする経路が存在することが示唆された。現在、ε-CL がヒマワリにおいて内生物質として存在するかどうかについて調べている。

Heliolactone, ε-Carlactone, Strigolactone

発表責任者：秋山　康紀（akiyama@biochem.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：1E6a07
講演日時：3 月 24 日 10:16～ 1 号館 E6 会場

インドール３酢酸が海藻組成に及ぼす影響

Effects of indole-3-acetic acid on algal components

○垣田 浩孝[1]、小比賀 秀樹[2] ([1]日大文理、[2]産総研健康工学)
○Hirotaka KAKITA[1], Hideki OBIKA[2] ([1]College of Humanities and Sciences, Nihon Univ., [2]Health Research Institute, AIST)

【諸言】海藻は水圏の中で近傍の付着共存微生物とお互いに影響を及ぼし合いながら棲息していると考えられている。ある種の海藻が分泌する排出物を付着共存微生物が増殖に活用し、海藻付着共存微生物由来の有機物、ビタミンや植物ホルモンを海藻は成長のために活用している。すでに緑藻類海藻には特有の付着微生物があることが報告されている。演者らは紅藻類オゴノリ科海藻の付着共存微生物が天然海域ではビブリオが優先であるが、無菌海水中で室内連続培養を行うと、ビブリオの数が検出限界以下まで減少し、フラボバクテリアーサイトファーガが優勢になることを見出した。フラボバクテリアーサイトファーガは黄色系色素産生微生物であり、インドール生産能があることで知られている。また演者らは付着共存微生物あるいはインドールー３ー酢酸（ＩＡＡ）を添加した海水培地でオゴノリ科海藻の成長が促進することを見出した。植物成長促進物質としてオーキシンやサイトカインが知られている。オーキシンであるＩＡＡは植物ホルモンとも呼ばれており、植物細胞の伸長や分化を誘導することが報告されている。ＩＡＡが植物の代謝に影響を及ぼしていることが報告されている。特に、光合成の一次代謝産物である糖類やカロテノイド等の代謝変動へのＩＡＡの影響は強いことが予想されている。一方、ＩＡＡが日本産紅藻類オゴノリ科海藻の成分にどのような影響を及ぼしているかに関しての報告はほとんどない。そこで本研究ではオゴノリ科海藻の代謝へのＩＡＡの影響を調べるために、ＩＡＡが海藻組成にどのような影響を与えているかを解明することを目的とした。【材料・方法】オゴノリ科海藻の成熟藻体を徳島県で採取し、実験室内で胞子を放出させた。放出させた胞子を滅菌海水中で静置培養し培養藻体を得た。培養藻体を継続的に培養して得た増殖培養藻体から切り出した海藻切片を実験に使用した。各種濃度のＩＡＡ含有海水を調製し、海藻培地として使用した。海藻頂端の５ｍｍ長切片を各種ＩＡＡ含有培地で培養し、培養で得られた海藻藻体の成長量、糖・タンパク質・カロテノイド含有量を測定した。海藻培養は水温１８℃、光強度６０～８０μｍｏｌ／ｍ２・ｓ、日長時間１４時間明期／１０時間暗期の条件下で振とう培養を行った。糖総含有量とタンパク質総含有量は比色法により行った。海藻抽出液中の遊離還元糖はＨＰＬＣで分析した。ＨＰＬＣで各種糖に分離後、発蛍光誘導体試薬とカラム溶出液を混合し、蛍光誘導体として蛍光検出器で検出した。【結果・考察】ＩＡＡはオゴノリ科海藻の成長を促進し、糖・カロテノイド含有量に影響を与えることが明らかとなった。

seaweed, indole-3-acetic acid, growth

発表責任者：垣田浩孝（kakita.hirotaka@nihon-u.ac.jp）

講演番号：1E6a08
講演日時：3 月 24 日 10:27～ 1 号館 E6 会場

レイシの花に含まれるオーキシン関連化合物の分析

Analysis of Auxin-Related Compounds in Lychee Flowers

○金 倫熙、西野 雄人、宮川 恒、宮下 正弘、大迫 祐太朗、山根 久代、田尾 龍太郎（京大院農）
○Ryunhee KIM, Yuto NISHINO, Hisashi MIYAGAWA, Masahiro MIYASHITA, Yutaro OSAKO, Hisayo YAMANE, Ryutaro TAO (Grad.Sch.Agr.,Kyoto Univ.)

【目的】レイシ(*Litchi chinensis* Sonn.)は甘さと酸味のバランスに特徴のある果物で、世界のさまざまな国で食されている。レイシは雄花と雌花を形成し、果実の効率的な栽培には雌花の形成比率を高めることが重要であるが、その性決定の機構は不明である。本研究はレイシ果実収量の向上をめざし、性決定に果たす植物ホルモンオーキシンの関与を検討した。検討にあたっては、雄花と雌花に含まれる遊離のインドール-3-酢酸（IAA）に加えて各種代謝物を分析対象とし、その総和による組織中のオーキシン合成量の評価を試みた。
【方法】2017 年の春に収穫し-70℃で保存したレイシ 3 品種(‘Yu Her Pau’[YHP] ‘Chakrapat’[Ch], ‘Hawaiian Seedless Strain’[HSS])の花を液体窒素で破砕した後、80%アセトン水溶液で抽出した。抽出液を濃縮し、C18 固相カートリッジを用いて精製を行った後、再度濃縮し、LC-ESI-MS/MS (Shimadzu LCMS-8030)を用いて IAA とその酸化代謝物ならびにアミノ酸抱合体を検出、定量した。組織内濃度は抽出の際に所定量加えたそれぞれの代謝物の同位体標識体との比に基づいて計算した。
【結果】品種 Ch および HSS の花には IAA に加えて 7 種類の代謝物（OxIAA, DioxIAA, IAA-Asp, IAA-Glu, OxIAA-Asp, DioxIAA-Asp、 DioxIAA-Glu）が検出された。品種 YHP の代謝物組成もほぼ同様であったが、OxIAA-Asp が検出されなかった。Ch および HSS において雌花の IAA 含量は雄花より少なかったが、雌花中には DiOxIAA が高い濃度で含まれており、IAA 関連化合物の総量としては、雄花より雌花のほうが高かった。雌花における IAA の合成活性そのものは高いが速やかに代謝されるものと考えられる。これに対し YHP では遊離 IAA,関連化合物総量ともに雄花と雌花の差が認められなかった。YHP は CH,HSS に比べて花および子房が大きく、形態の品種間差がオーキシン合成活性の性差を見えにくくしているのではないかと考えられた。

Litchi chinensis, Auxin, IAA(Indole-3-acetic acid)

講演番号：1E6a09
講演日時：3 月 24 日 10:38～ 1 号館 E6 会場

イネにおけるインドール-3-酪酸の代謝およびインドール-3-酢酸との相互変換の分析
Analysis of the metabolism of indole-3-butyric acid and its conversion to IAA in rice

○西野 雄人、宮下 正弘、宮川 恒（京大院農）
○Yuuto NISHINO, Masahiro MIYASHITA, Hisashi MIYAGAWA (Grad. Sch. of Agri., Kyoto Univ.)

【目的】オーキシンは植物の成長や発達に不可欠な植物ホルモンであり，主要なものとしてインドール-3-酢酸(IAA)が知られている。インドール-3-酪酸(IBA)はオーキシンの一種であるが，シロイヌナズナにおいて IAA と相互変換することが報告されており、IBA は IAA の貯蔵形態とも考えられている。植物中で IAA 濃度を調節する機構には生合成や輸送とともに代謝があり、IAA は酸化，アミノ酸抱合，糖抱合といった様々な代謝を受ける。一方，IBA に関しては代謝の知見が少なく、特に主要な作物であるイネではほとんど情報がない。そこで本研究ではイネにおける IBA と代謝物の定量分析および IBA の IAA との相互変換に関する分析を行った。
【方法・結果】イネ種子および発芽後 2 週の幼苗植物体を破砕し，80%アセトン水溶液で抽出した。この抽出液を固相カートリッジで部分精製し，LC-ESI-MS/MS 分析に供し、MRM 検出法を用いて IBA 代謝物の定量を行った。種子では IBA は検出されたが、代謝物は見られなかった。一方、幼苗では IBA とその酸化体 OxIBA が検出された。また、幼苗の根部に IBA を投与したのちに分析すると、アミノ酸抱合体である IBA-Asp、糖抱合体の IBA-*O*-Glc、IBA-*N*-Glc が検出され、イネでは IBA は IAA と同様に酸化、アミノ酸抱合、糖抱合の代謝を受けることが分かった。次に IBA と IAA との間の相互変換を調べた。まず発芽後 2 週のイネ幼苗に $^{13}C_6$-IAA を葉もしくは根に投与し、24 時間後に分析したところ、いずれの場合も $^{13}C_6$-IBA は検出されなかった。一方、根部に ^{13}C-IBA を投与した際には 24 時間後に ^{13}C-IAA が検出され、IBA から IAA への変換が確認された。この結果、IBA はイネ幼苗において IAA の濃度調節に寄与することが示唆された。

Indole-3-butyric acid, Indole-3-acetic acid, LC-MS/MS

講演番号：1E6a10
講演日時：3 月 24 日 10:49～ 1 号館 E6 会場

オーキシン・ブラシノステロイド信号伝達同時制御剤耐性株の解析
Analysis of a mutant of Arabidopsis thaliana that shows low-sensitivity to an auxin/brassinosteroid signal transduction inhibitor NJ15
○TANAKA-JAROENSANTI Naiyanate[1]、宮崎 翔[1]、富田 憲司[1]、細井 昂人[2]、田中 啓介[3]、伊藤 晋作[2]、井内 聖[4]、中野 雄司[5]、小林 正智[4]、中嶋 正敏[1]、浅見 忠男[1]([1]東大院・農生科・応生化、[2]東京農大・バイオ、[3]東農大ゲノムセ、[4]理研・BRC、[5]理研・CSRS)
○Naiyanate TANAKA-JAROENSANTI[1], Sho Miyazaki[1], Kenji Tomita[1], Akito Hosoi[2], Keisuke Tanaka[3], Shinsaku Ito[2], Satoshi Iuchi[4], Takeshi Nakano[5], Masatomo Kobayashi[4], Masatoshi Nakajima[1], Tadao Asami[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. of Tokyo., [2]Dept. Bioscience, Tokyo Univ. Agric., [3]NGRC, Tokyo Univ. of Agric., [4]RIKEN BRC, [5]RIKEN CSRS)

植物に生じる様々な生理現象の多くは、複数の植物ホルモンの相互作用によって制御されている。各ホルモンの信号伝達過程が作用発現に近づくほど複雑に統合・分岐するため、相互作用の仕組みを分子レベルで解明することは困難である。本研究ではブラシノステロイドおよびオーキシン両信号伝達における相互作用の解明を最終目的として、両ホルモンの信号伝達過程のいずれに対しても影響を与える化学ツールの選抜とその遺伝学への応用を試みた。具体的にはシロイヌナズナ FOX ラインの中から化学ツールとして得られた NJ15 化合物に対する耐性株の選抜を実施した。本発表では、その耐性株の一つ *f127* の NJ15 耐性機構の解析結果について報告する。

NJ15 耐性株の選抜には、ブラシノステロイドの信号伝達が大きく寄与する暗所における胚軸の伸長応答性と、オーキシンの信号伝達が大きく寄与する胚軸の重力応答性の両方を評価して行った。その結果、変異体プール中の 1 種 *f127* に顕著な耐性傾向を認めた。*f127* の NJ15 耐性の原因はクチクラ形成に関わる *Defective in Cuticular Ridges* (*DCR*) 遺伝子がベクター挿入に伴い機能的に欠損したによるものと判明した。クチクラ形成異常を検出する目的で *o*-トルイジンブルー染色を行った結果、*f127* の胚軸は *o*-トルイジンブルーに強く染まった。一方、野生型に NJ15 を処理した場合、クチクラ層の変化に伴う *o*-トルイジンブルー染色が観察されなかったものの、NJ15 は植物の全脂肪酸組成に影響を及ぼすことが判明した。現在、*dcr* 欠損と NJ15 耐性がどのように関係しているか解析しており、その結果について報告したい。

Auxin, Brassinosteroid, cuticle

発表責任者：Tanaka Naiyanate Jaroensanti（naiyanatetanaka@gmail.com）

講演番号：1E6a11
講演日時：3 月 24 日 11:10～ 1 号館 E6 会場

ブラシノステロイド類と受容体との結合自由エネルギー計算およびそれをもとにした分子設計
Calculation of ligand-receptor binding energy of brassinosteroids and molecular design of brassinnosteroid-like compounds

松尾 美登理[1]、青木 孝憲[1]、幌岩 真理[1]、瀧本 征佑[1]、山上 あゆみ[2]、中野 雄司[2]、○中川 好秋[1]、宮川 恒[1] ([1]京大院農、[2]理研 CSRS)
Midori MATSUO[1], Takanori AOKI[1], Shinri HOROIWA[1], Seisuke TAKIMOTO[1], Ayumi YAMAGAMI[2], Takeshi NAKANO[2], ○ Yoshiaki NAKAGAWA[1], Hisashi MIYAGAWA[1] ([1]Kyoto University, [2]RIKEN CSRS)

【目的】ブラシノライド（BL）を代表とするブラシノステロイド（BR）は，極微量で伸長成長や細胞分裂の促進などの活性を示すことから，植物生長促進剤としての農業利用が期待できる．しかし BR のステロイド構造に由来する高い合成コストが利用の障壁となっている．一方で，昆虫やほ乳類のステロイドホルモンにおいては，それぞれの非ステロイド型アゴニストが農薬，医薬として実用化されており，BR についても非ステロイド化による応用の可能性が期待される．これに関してわれわれは，インシリコスクリーニングによって非ステロイド型アゴニストを探索し，弱いながらも BL 様活性を示す NSBR1（図 1）を発見することに成功している[1]．そこで，本研究においては，さらに活性の高い BL アゴニストを探索するため，NSBR1 をリード化合物として構造展開し，それらの活性を評価した．
【方法】OpenEye 社のドッキングソフト FRED を用いて，BL 受容体 (PDB:4LSX)と BL 類縁体および NSBR1 類縁体との複合体ファイルをそれぞれ作成した．これらの複合体に対し，AMBER16 に含まれる MD シミュレーションと MM/PBSA 法を用いた計算を行い，それぞれのリガンドに対して受容体との結合自由エネルギー（ΔG）を算出した．すでに，BL 類縁体に関してはΔGと活性の間に線形関係を見出しているが[2]，今回，誘電率の設定を変えることによって，相関関係に上昇がみられた．この結果をもとに新規の化合物を設計し，その合成を行った．活性はイネの第二葉身屈曲試験とシロイヌナズナの胚軸形態観察により評価した．
【結果および考察】BL-D 環 17-位のヒドロキシアルキル側鎖に相当するリード化合物 NSBR1 の butyryl 基の構造展開を行ったところ，NSBR1 よりもΔGの値が低下することがわかった．そこで，これらの化合物を合成し，活性を測定したところ，BL 様活性を見出すことができた．

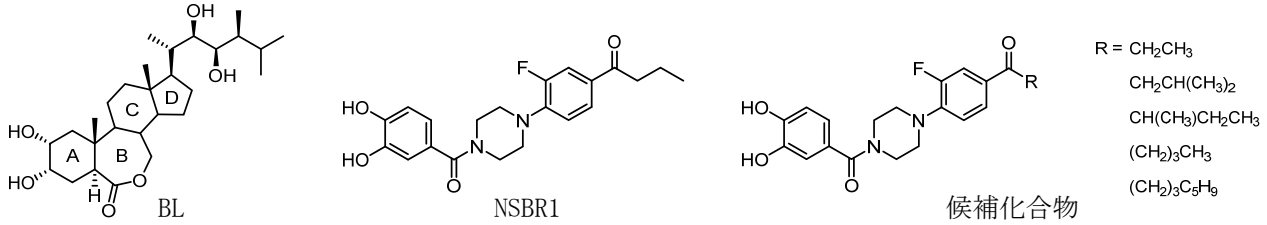


図１．ブラシノライド（BL）と非ステロイド型アゴニストの構造

[1] Sugiura, *et al.*, *J. Pestic. Sci.*, **42**, 105-111 (2017).
[2] Watanabe, *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **25**, 4566-4578 (2017).

Brassinosteroid, Arabidopsis, binding energy

発表責任者：中川好秋（naka@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：1E6a12
講演日時：3 月 24 日 11:21～ 1 号館 E6 会場

ソムレ 1 号による作物の増産及び絶滅危惧植物の回復

SOMRE#1 increases food production of crops and saves endangered plant

○染井 秀、染井 和子、染井 正徳（ソメイヤッコ研究所）
○Hiizu SOMEI, Kazuko SOMEI, Masanori SOMEI (SOMEIYAKKO Kenkyusho)

我々は食料増産、乾燥地の緑化に役立つ新規有機化合物、ソムレ 1 号（2－ブロモインドール―3－アルデヒド）の開発に成功している。ソムレ 1 号は、マウス、メダカ、山羊、人間、魚に対し毒性を示さぬ安全な物質である。ソムレ 1 号を各種植物に適用・検討した結果について報告する。

現時点までに検討した主な植物は、以下のとおりである。種苗店で購入できる、野菜のほぼ全てがソムレ 1 号水溶液により良く育ち、少なくとも 110～150%の増収が出来た。優れた成長促進、最高収穫量を与えるソムレの水溶液濃度は植物の種類、品種により、異なることがわかった。



例えば、ハーブのバジルは、対照に比べ 0.001ppm で発根率は 100%であり対照の 73%より良く、根長は対照の 148 倍伸長した。パクチーの発根率は、1.0ppm で対照の 3.5 倍良く、根長は 460%, 0.01ppm では 223%を示した。トウモロコシの根の平均長は、品種により 0.01～0.00001 ppm で最長になった。ジャガイモは、ソムレ 1 号水溶液に種イモの芽を 1 時間浸漬した後切り分け、切断面に草木灰をまぶした後、畑に植えつける通常の方法を採用した。収穫量はソムレ濃度により変動したが、いずれの場合にも、対照より向上した。品種に限らず 0.1 ppm 濃度のソムレ使用時が最も良い結果を与えた。

黒松の種子の発根試験では、ソムレ 0.001 ppm で 100%発芽・発根し、苗木生産が可能である。

千葉県では、五葉松が最重要保護生物に選定され、保護・回復事業が行われている。五葉松保存サポーターとして、苗木の根をソムレ 1.0ppm 水溶液に 1 時間浸漬後植林した。松は元気に成長して当初樹高 38cm から 2 年半後 139cm に成長している。【結論】ソムレ 1 号は、植物全般の成育を助け、食料増産、苗木の生産、絶滅危惧植物の回復、生物多様性の維持、地球環境改善に貢献できる。

Roots elongation agent, Food plants, Endangered plant

発表責任者：染井　秀（someimeso@hotmail.com）

講演番号：1E6a13
講演日時：3 月 24 日 11:32～ 1 号館 E6 会場

食料増産、環境改善を目的とするソムレ 1 号のインドへの展開

Expansion of SOMRE#1 to India aiming at increased food production and environmental improvement

○粟野 亮二[1]、ミシュラ スネハシ[2]、染井 正徳[3] ([1]グローバル・マーケティング・アソシエーション株式会社、[2]KIIT 大学、[3]ソメイヤッコ研究所)
○Ryoji AWANO[1], Snehasish Mishra[2], Masanori Somei[3] ([1]Global Marketing Association Co., Ltd., [2]KIIT Univ. of India, [3]SOMEIYAKKO Kenkyusho)

我々は、食料増産、乾燥地の緑化を目的として、植物種子の発根率を通常よりも向上させ、根や塊茎の成長を促進させる有機化合物、ソムレ 1 号を開発し、日本の各種野菜の増収に成功している。

インドでは、砂漠化による環境の悪化、食料難が急速に進展しつつある。これらの問題を解決する為、ソムレ 1 号のインド、オディシャ州への展開を検討した。2013 年、KIIT 大学（Kalinga Institute of Industrial Technology）の Dr. Snehasish Mishra（以下、Dr. Mishra）また OUAT 大学（Orissa University of Agriculture and Technology）の協力を得て、ソムレ 1 号のインドの野菜及び穀物に関する効果を詳細に検討した。その結果、インドの主な野菜、米の根の伸長効果が、日本の結果と同様に、対照に比べ著しく良いことが判明した。

これらの Dr. Mishra 及び粟野の 4 年間の基礎実験成果に基づき、2015 年インドの農業研究者、農家の協力の基に実施したインド米の平均収穫高は以下の通りであった。



第85回National Academy of Science, India (NASI,2016)の学会で、Dr. Mishraらが発表。

日本の優れた農業技術により日本米の生産高は、6.0ton/1ha で、インドの通常米の 5.1ton を上回っている。しかしソムレ 1 号 0.1 ppm 水溶液処理すれば、インド米の生産高は 6.8 ton/1 ha に向上した。

【結論】他の作物でも高い収穫が得られたことから、ソムレ 1 号を使うことで、インドの食料事情を改善し、乾燥地緑化、環境改善にも役立つ可能性が示された。現在、インドの大手肥料メーカーと共にフィールドテストに着手。またバングラディッシュでも実験を開始する予定。

【謝辞】ご協力いただいた Dr. Mishra をはじめとするインドの KIIT 大学の研究者、OUAT 大学の農業研究者、そして農家の皆々様に感謝する。

Roots elongation agent, Food and environmental improvement in India, Application of SOMRE#1 to India

発表責任者：粟野亮二（awano@global-marketing.co.jp）

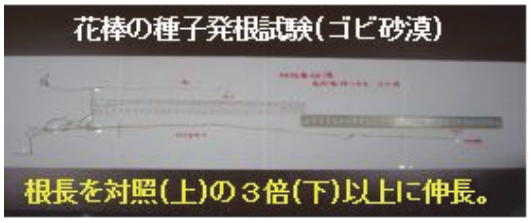
講演番号：1E6a14
講演日時：3 月 24 日 11:43～ 1 号館 E6 会場

地球温暖化阻止を念頭においたソムレ 1 号による中国ゴビ砂漠の緑化

Greening Gobi desert utilizing SOMRE#1 aiming at stopping global warming

○染井 正徳、染井 秀、染井 和子（ソメイヤッコ研究所）
○Masanori SOMEI, Hiizu SOMEI, Kazuko SOMEI (SOMEIYAKKO Kenkyusho)

我々は食料増産、砂漠緑化による地球温暖化阻止を可能とするソムレ（SOMRE, 甦群列）と命名した有機化合物を創造した。ソムレ 1 号は、2-bromoindole-3-carbaldehyde であり、植物根に対する効果は、ゴビ砂漠での花棒の発根比較（左写真）から明らかなように、対照（19 cm）と比べ 3 倍（53 cm）も伸長した。ソムレ 1 号は、日本及び海外（インド）の各種の植物に期待通りの効果を示したが、その結果については、共同研究者が本日発表する。



ここでは、砂漠化が激しく進行し、黄砂（PM2.5）の発生源である中国内蒙古阿拉善盟のゴビ砂漠で、砂漠緑化を試みた結果を報告する。緑化には現地自生の植物のみを用い、主に花棒及び沙枴棗を用いた。種子及び苗の根をソムレ 1 号の 1.0 ppm 水溶液に 1 時間浸漬後砂漠地に撒き或いは植林すると、年間降雨量 150～200 mm という雨量でも、対照と比べ発根率、活着率は有意に向上した。この成果に基づき、2,700 本の苗木の根を浸漬後、流動砂丘に植林したところ、雨のみを水資源として、1 年 7 ヶ月後 89%の活着率で緑化に成功した(右写真)。生態系の回復は早く、ウサギや昆虫などが戻った。同様に種子を浸漬後、流動砂丘に歩きながら放り投げる方法を実施したところ、活着率 0.1%で花棒及び沙枴棗が活着した（これまでに中国の政府、関係者の方法では０%）。さらにソムレ浸漬種子を粘土団子に加工したところ、活着率は 0.5%に向上した。これらの成果を基に、地方政府、軍、日本からのボランティアなどの協力により、ソムレ浸漬種子を飛行機を使って砂漠に空中散布した。本法を繰り返し実施すれば砂漠は緑に変えられる。**【地球を救う方法】**降雨が期待される日に、「ソムレ浸漬種子を飛行機から砂漠に散布する方法」が、砂漠を緑化し地球温暖化を止める唯一無二の解決策であると信じている。**【受賞】**これらの活動により「平成 29 年度地球温暖化防止活動環境大臣表彰」を受賞。**【謝辞】**内蒙古阿拉善の政府、関係者、砂漠を緑で包む会の皆様、多くの協力者に感謝します。



Roots elongation agent, Greening of desert, The method for stopping global warming

発表責任者：染井正徳（someiyakko@smail.plala.or.jp）

講演番号：1E6p02
講演日時：3 月 24 日 14:01～ 1 号館 E6 会場

立体選択的なストリゴラクトン生産に関与するソルガム LGS1 酵素の機能解析

Biochemical characterization of LGS1 involved in stereoselective biosynthesis of strigolactones in sorghum

○依田 彬義[1]、森 愛美[2]、齋藤 睦美[1]、菊地 麻祐[3]、神林 瑛瑠[3]、謝 肖男[1,4]、米山 香織[5]、秋山 康紀[2]、米山 弘一[4]、野村 崇人[1,4] ([1]宇都宮大院・農、[2]大阪府立大院・生命環境、[3]宇都宮大・農、[4]宇都宮大・バイオ、[5]愛媛大・農)

○Akiyoshi Yoda[1], Narumi Mori[2], Mutsumi Saito[1], Mayu Kikuchi[3], Eru Kanbayashi[3], Xiaonan Xie[1,4], Kaori Yoneyama[5], Kohki Akiyama[2], Koichi Yoneyama[4], Takahito Nomura[1,4] ([1]Grad. Sch. of Agri., Utsunomiya Univ., [2]Grad. Sch. of Life & Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [3]Fuc. of Agri., Utsunomiya Univ., [4]Ctr. for Biosci. Res. & Educ., Utsunomiya Univ., [5]Fuc. Of Agri., Ehime Univ.)

【目的】

ストリゴラクトン（SL）はストライガなどの根寄生植物の種子発芽刺激物質である。典型的な SL の化学構造は 3 環性ラクトン（ABC 環）とブテノライド（D 環）がエノールエーテル結合したものであり、C 環の立体化学の違いにより α 配位のオロバンコール型（O 型）と β 配位のストリゴール型（S 型）の二つに分けることができる。ソルガムはアフリカ諸国において主要なイネ科穀物だが、ストライガの主要な宿主であるため甚大な被害を受けている。昨年、ストライガ耐性品種として作出されたソルガムから、その耐性を付与した原因遺伝子 *LOW GERMINATION STIMULANT 1* (*LGS1*) が同定された（Gobena et al., PNAS, 2017）。興味深いことに、正常なソルガムが生産する主要な SL は S 型の 5-デオキシストリゴール（5DS）であるが、*lgs1* 変異体では O 型のオロバンコール（Oro）に替わっていた。ストライガ種子に対する発芽刺激活性は 5DS よりも Oro の方が低いことが、ストライガ耐性になった理由と考えられている。*LGS1* 遺伝子がコードするタンパク質は硫酸基転移酵素に類似しているが、SL 生合成における LGS1 酵素の機能は解明されていない。本研究では、立体特異的な SL の環化に関わると考えられる LGS1 タンパク質の酵素機能の解析を行った。

【方法・結果】

まず、ソルガムの *lgs1* 変異体及び正常種の根浸出液に含まれる SL 関連物質を LC-MS/MS を用いて分析し、*lgs1* 変異体で蓄積している可能性がある LGS1 酵素の基質の探索を行った。その結果、*lgs1* 変異体の根浸出液にのみに検出される SL 関連物質を発見した。次に、ソルガムから *LGS1* cDNA をクローニングし、大腸菌およびベンサミアナタバコを用いてタンパク質の発現を行った。それらの組換え LGS1 タンパク質を用いて *lgs1* 変異体において検出された SL 関連物質の代謝実験を行なったところ、硫酸基供与体依存的に代謝物が検出された。

strigolactone, biosynthesis, enzyme

講演番号：1E6p03
講演日時：3 月 24 日 14:12～ 1 号館 E6 会場

ソルガムのストリゴラクトン生合成経路におけるソルゴモール合成酵素の同定

Identification of sorgomol synthase in sorghum strigolactone biosynthesis

○若林 孝俊[1,2]、支田 香澄[1]、石輪 俊典[1]、水谷 正治[1]、杉本 幸裕[1,2]（[1]神戸大院・農・生命機能科学、[2]JST/JICA・SATREPS）
○Takatoshi WAKABAYASHI[1,2], Kasumi SHIDA[1], Shunsuke ISHIWA[1], Masaharu MIZUTANI[1], Yukihiro SUGIMOTO[1,2] ([1]Grad. School of Agric. Sci., Kobe Univ., [2]JST/JICA・SATREPS)

【目的】

ストリゴラクトン (SL) は、植物地上部の枝分かれを制御する植物ホルモンであり、根圏では根寄生雑草の種子発芽や AM 菌の菌糸分岐を誘導している。SL の生合成経路は、まず最初に β-カロテンから生合成中間体であるカーラクトン (CL) が生成され、その後、シトクローム P450 である MAX1 によってカーラクトン酸 (CLA) に変換される。ABC-環を有する canonical SL では、CLA の閉環反応に続いて、A、B-環が様々な化学的修飾を受けて多様な SL 構造が生じると考えられる。Canonical SL の内、オロバンコール型 SL である 4-deoxyorobanchol (4DO) の水酸化はイネにおいて MAX1 ホモログが触媒することが明らかとなったが、ストリゴール型 SL である 5-deoxystrigol (5DS) の水酸化反応を担う酵素は不明でった。そこで本研究では、sorgomol を生産するソルガム (*Sorghum* bicolor) を実験材料として、5DS の 9 位に水酸基を導入する sorgomol 合成酵素の同定を試みた。

【方法・結果】

ソルガムの MAX1 ホモログは CL を CLA へ変換する機能は有していたものの、5DS を基質とした反応は触媒しなかった。ソルガム根から抽出したミクロソーム画分を用いた in vitro 酵素アッセイを行ったところ、5DS が sorgomol へ変換され、さらにこの反応はシトクローム P450 阻害剤によって阻害された。そこで、ソルガム根の遺伝子共発現解析を行い、既知の SL 生合成遺伝子と共発現するシトクローム P450 遺伝子を選抜し、大腸菌で発現させ酵素機能を解析した。その結果、in vitro において 5DS から sorgomol への変換を触媒する sorgomol 合成酵素を見出した。この酵素は 5DS 立体異性体の内、5DS と 2’-*epi*-5DS のみを基質とし、この結果はソルガム植物体への 5DS 立体異性体投与実験の結果と一致していた。さらに、sorgomol 合成酵素遺伝子を過剰発現させたミヤコグサ毛状根では、内在性 5DS を基質として sorogomol が生産された。これらの結果から、本研究で見出したシトクローム P450 が sorgomol 合成酵素であると結論付けた。

Strigolactone, Sorgomol, Sorghum

講演番号：1E6p04
講演日時：3 月 24 日 14:23～ 1 号館 E6 会場

ストリゴラクトン受容体 D14 の過剰発現による病害抵抗性誘導機構の解明

Studies on the mechanisms of induced resistance in rice overexpressing *OsD14*

○伊藤 瑛子[1]、山野 博之[1]、前田 哲[2]、森 昌樹[2]、中村 英光[1]、浅見 忠男[1] ([1]東京大学 農生科 応生化、[2]農研機構 生物機能利用研究部門)
○Akiko Ito[1], Hiroyuki Yamano[1], Satoru Maeda[2], Masaki Mori[2], Hidemitsu Nakamura[1], Tadao Asami[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. of Tokyo, [2]NIAS)

【背景と目的】
今回、我々は、イネのストリゴラクトン受容体 D14 の過剰発現体(*OsD14*ox)が葉身に疑似病斑を形成すること、さらにいもち病への抵抗性が向上していることを見出した。本研究では、植物病害抵抗性とストリゴラクトンシグナル伝達との関係性を明らかにすることを目的とし、*OsD14*ox を含むストリゴラクトン関連遺伝子変異体において、いもち病菌接種試験、病害抵抗性関連遺伝子の発現量解析、ROS やファイトアレキシンの測定を行った。
【方法と結果】
トウモロコシ *Ubq* プロモーターの下流でイネ *D14* 遺伝子を高発現させるプラスミドを野生型イネ（シオカリ）に導入し、*OsD14*ox を作出した。*OsD14*ox は擬似病斑を形成していたことから、続いていもち病抵抗性試験を行ったところ、野生型イネと比較して高い病害抵抗性を示すことが明らかとなった。さらに、*d14* 変異体は野生型イネよりも有意にいもち病菌に対して高感受性を示し、病害抵抗性における D14 の関与が示唆された。一方、野生株に SL アナログである GR24 を処理すると処理区では抵抗性が上がる傾向があったものの有意差は見られなかった。そのため、D14 過剰発現体の病害抵抗性が D14 タンパク質そのものの影響なのか、SL シグナル増強の影響なのかは不確かであり、*OsD14*ox、 *d14* に加えストリゴラクトン生合成遺伝子欠損体も用いて現在研究を進めている。
ストリゴラクトンシグナルと病害抵抗性の関係を明らかにすべく、*OsD14*ox においてサリチル酸マーカー遺伝子である *OsPR1a*、ジャスモン酸マーカー遺伝子である *OsMYB108* の発現量解析を行った。すると、*OsD14* と *OsPR1a*、*OsMYB108* の発現量の間に相関は見られず、*OsD14*ox において恒常的なサリチル酸シグナルやジャスモン酸シグナルの亢進は起きていないことが示唆された。一方、*OsD14*ox では ROS が発生していること、*OsD14*ox では野生型イネと比べファイトアレキシンが増加し、*d14* では減少していることを確認した。
現在は、イネ D14 のストリゴラクトン加水分解に関する変異体を用いた各種試験、病原菌やエリシター処理時における *OsD14*ox、*d14* の ROS 定量や遺伝子発現解析などを行っている。

rice, strigolactone, D14

講演番号：1E6p05
講演日時：3 月 24 日 14:34～ 1 号館 E6 会場

ジャスモン酸経路を活性化する新規植物免疫活性化剤候補化合物の選抜と作用機構の解析
Screening and analyses of the mode of action of novel putative plant defense activators that activate jasmonic acid pathway

○北畑 信隆[1,2]、斉藤 優歩[1]、中野 正貴[1]、石賀 康博[3]、来須 孝光[4]、浅見 忠男[5]、朽津 和幸[1,2]（[1]東京理大理工、[2]東京理大 IFC、[3]諏訪東京理科大工、[4]筑波大生命環境、[5]東大院農生科）
○Nobutaka KITAHATA[1,2], Yuho SAITO[1], Masataka NAKANO[1], Yasuhiro ISHIGA[3], Takamitsu KURUSU[4], Tadao ASAMI[5], Kazuyuki KUCHITSU[1,2] ([1]Tokyo Univ. of Sci., [2]Tokyo Univ. of Sci., IFC, [3]Suwa Univ. of Sci., [4]Univ. of Tsukuba, [5]Tokyo Univ.)

植物免疫活性化剤は、化合物自身に殺菌作用はないが、植物自身の免疫を亢進する作用を持つ化合物である。植物免疫活性化剤は、殺菌剤・殺虫剤が持つ問題を回避可能であるため、次世代型の農薬として注目されている。植物の主要な免疫経路には、バイオトロフに対して有効なサリチル酸経路とネクロトロフや食害に対して有効なジャスモン酸経路があるが、現在農薬登録されている植物免疫活性化剤は、いずれもサリチル酸経路を活性化してバイオトロフに対する耐病性を高める薬剤で、ジャスモン酸経路を活性化する化合物は実用化されていない。我々はこれまでにタバコ培養細胞 BY-2 を用いたスクリーニング系（特許第 5885268 号）を構築し、市販の化合物ライブラリーから 56 種の新規植物免疫活性化剤候補化合物を選抜している。

候補化合物の中から、ジャスモン酸経路のマーカー遺伝子 *PDF1.2* の発現量を指標にジャスモン酸経路を活性化する化合物を絞り込んだ結果、シロイヌナズナに処理後 48 時間で、*PDF1.2* の発現量が数千倍に増加する化合物 CY8 を選抜した。この化合物のジャスモン酸の内生量への効果を調べたところ、処理後 24 時間で数百倍に増加させたことから、CY8 はジャスモン酸の蓄積を誘導する化合物であることがわかった。次に CY8 によるジャスモン酸蓄積のタイムコースを調べたところ、ジャスモン酸は 6 時間まで誘導されない一方で、24 時間から 48 時間にかけて増加し続けた。このことから、CY8 は植物内で代謝されて活性物質に変わり、ジャスモン酸の蓄積を誘導している可能性がある。CY8 によるジャスモン酸の蓄積に、ジャスモン酸生合成遺伝子の発現量が関わっているか調べた結果、ジャスモン酸生合成遺伝子の発現量が数十倍に増加していたことから、CY8 によるジャスモン酸蓄積には、少なくとも部分的にジャスモン酸の生合成を介している可能性が示された。

一方、トマト斑葉細菌病菌（*Pst* DC3000）に対する耐病性向上効果を指標として化合物を絞り込んだ結果、3 種の化合物を選抜した。これらの化合物は微生物分子パターン flg22 により誘導される ROS 生成や防御応答遺伝子の発現などの感染防御応答を亢進したが、細菌の増殖に影響は見られなかったことから、植物の基礎的抵抗性を増強することにより耐病性を向上させることが示唆された。一方、処理するだけで防御応答を誘導する既存剤とは異なり、化合物を単独で処理しても ROS 生成や *PR1* 発現を誘導しなかった。また、サリチル酸経路を介して作用する既存剤とは異なり、サリチル酸シグナル伝達系に欠損を持つ *npr1* 変異体に処理しても flg22 誘導性の ROS 生成を亢進した。これらの結果から、化合物は既存剤とは異なる経路で、植物の基礎的抵抗性を亢進している可能性が示唆された。

jasmonic acid, plant defense activator

発表責任者：北畑　信隆（nobkitahata@gmail.com）

講演番号：1E6p06
講演日時：3 月 24 日 14:55～ 1 号館 E6 会場

Evaluation of positive feedback system for jasmonic acid biosynthesis using deuterium-labelled jasmonic acid

○ Rishni MASIMBULA, Katsunari OKI, Norio KONDO, Hideyuki MATSUURA, Kosaku TAKAHASHI (Rec. Fac. Agr., Hokkaido Univ)

Jasmonic acid (JA) plays important roles in stress adaptation. The accumulation of JA is perceived as a response to adverse environmental conditions involving both biotic and abiotic stresses in plants. Wounding activates the octadecanoid pathway, resulting in the accumulation of 12-oxo-phytodienoci acid (OPDA), JA, and jasmonoyl isoleucine (JA-Ile) in plants, and moreover JA induces the expression of genes encoding JA biosynthetic enzymes. Therefore, a positive feedback system for JA biosynthesis is considered to exist in plants. Although it has been only studied from the viewpoint of gene expressions, JA positive feedback system has not been examined from the perspective of JA accumulation in plants. On the other hand, there are microorganisms to produce JA, however, the presence of a positive feedback system for JA biosynthesis in microorganisms has not been examined.

To investigate a positive feedback system for JA biosynthesis in plants from the perspective of JA accumulation, we applied 25 μM JA-d_3 to plants and JA amounts in plants subjected to JA-d_3 were analyzed by UPLC-MS/MS with MRM mode. The UPLC-MS/MS data showed that JA-d_3 induced OPDA, 12-OH-JA and 12-*O*-glc-JA in plants. In contrast, application of JA-d_3 suppressed accumulation of JA and JA-Ile in plants. These results suggested that treatment of 25 μM JA-d_3 stimulated OPDA biosynthesis, and further metabolism of JA that caused to inactivate JA biological activity.

To examine whether JA positive feedback system is present in microorganisms, *Fusarium commune*, a JA producer, was treated with airborne methyl jasmonate-d_5. As a result, JA in *F. commune* treated with methyl jasmonate-d_5 was accumulated more than that in *B. cinerea* without the treatment. This was first report to show the presence of a positive feedback system of JA biosynthesis in a microorganism.

Jasmonic acid, Deuterium-labelled jasmonic acid, Positive feedback system

発表責任者：Kosaku TAKAHASHI（kosaku@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：1E6p07
講演日時：3 月 24 日 15:06～ 1 号館 E6 会場

酢酸処理が植物ホルモンの生合成による防御応答に及ぼす影響

External application of acetic acid induces the hormone synthesis for plant stress responses

○原田 惠理[1]、小堀 富広[1]、松原 晶[1]、肥塚 崇男[2]、松井 健二[2] ([1]アース製薬（株)、[2]山口大院創成科学（農））
○Eri HARADA[1], Tomihiro KOBORI[1], Akira MATSUBARA[1], Takao KOEDUKA[2], Kenji MATSUI[2] ([1]Earth Chemical Co.,Ltd., [2]Yamaguchi Univ.)

植物は環境ストレスに対し化学的に応答する。この応答は植物ホルモンであるサリチル酸（SA）やジャスモン酸（JA）等が支配しており、個々のストレスに対し特異的な応答を誘導する。近年、シロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* に酢酸を処理すると、JA 合成が誘導され乾燥耐性が強化される例が報告された。SA シグナル経路と JA シグナル経路は拮抗関係にあることが知られているが、本研究ではキャベツ *Brassica oleracea* において酢酸処理により SA 合成が誘導されることを確認した。また、ストレスを受けた後の SA 合成は一般的には数時間から数日しか維持しないことが報告されているが、本研究により、酢酸を断続的に処理することで処理中だけでなく処理停止後も、一定量の SA 合成が数日から数週間維持されることが示唆された。

アブラムシは主要な農業害虫の一つである。アブラムシは体長数ミリの小型昆虫であるが、繁殖力が極めて高いため短期間で急激に増殖し薬剤抵抗性が発達しやすい。よって、アブラムシによる排泄物の被害やウィルス病の媒介は、作物収量の減少及び品質の低下を容易に引き起こし農産業に甚大な影響を与える。アブラムシはその生態の特異性から、作物への定着後に根絶させることが困難である。そのため、作物への定着自体を予防することが、理想的な防除方法と考えられている。従来、酢酸を主成分とする食酢は特定防除資材として広く使用されており、酢酸処理の農業害虫に対する忌避作用が提唱されてきた。しかし、そのメカニズムは未だ明らかにされていない。本研究において、モモアカアブラムシ *Myzus persicae* に対する酢酸処理の忌避作用を確認したところ、酢酸処理による SA 合成の誘導と忌避作用の関連性が示唆された。また、酢酸処理は病害に対しても防除効果があることが知られている。本研究では、酢酸処理による SA 合成の誘導が病害に対する防除効果にも影響を与えている可能性を見出した。本研究により、植物のストレス抵抗性を強化することで病虫害を予防する「植物防御活性剤」としての酢酸の提案が可能になると考えられる。発表では、酢酸処理による SA 合成の誘導と害虫忌避効果及び病害防除効果の関連性についても詳しく言及したい。

acetic acid, phytohormon, stress response

講演番号：1E6p08
講演日時：3 月 24 日 15:17～ 1 号館 E6 会場

アブシジン酸誘導性の気孔閉鎖における光合成電子伝達系の重要性
Guard cell photosynthesis is crucial in abscisic acid-induced stomatal closure

○山田 直隆[1]、岩井 純夫[2,3]、緒方 翔[2]、新北 大樹[1]、遠城 道雄[3]、園池 公毅[4]、島崎 研一郎[5] ([1]九大農、[2]鹿大農、[3]鹿大農場、[4]早大院教育・総合科学、[5]九大理)
○Naotaka Yamada[1], Iwai Sumio[2,3], Sho Ogata[2], Daiki Shinboku[1], Michio Onjo[3], Kintake Sonoike[4], Ken-ichiro Shimazaki[5] ([1]Agric. Kyushu Univ., [2]Agric. Kagoshima Univ., [3]Experi. Farm Kagoshima Univ., [4]Waseda Univ., [5]Sci., Kyushu Univ.)

【目的】アブシジン酸 (ABA) は気孔閉鎖を引き起こすが、この時、誘導生成される活性酸素種 (ROS) が重要なシグナル伝達分子であることが知られている。これまで、アブシジン酸誘導性の ROS は、細胞膜局在型の NADPH オキシゲナーゼによって産出されると考えられていた。一方で、光条件下での植物細胞における ROS の発生源は主に葉緑体であること、孔辺細胞の葉緑体は光合成炭素同化活性を有し、気孔開口に必要な ATP を生成していることから、ABA 誘導性の ROS が孔辺細胞の葉緑体でも発生している可能性を示す報告もあった。そこで本研究では、光合成電子伝達系 (PET) に着目し、アブシジン酸誘導性の気孔閉鎖における ROS 生成について調べた。
【方法】23℃で 3 週間以上育てたソラマメあるいはシロイヌナズナ葉から剥離した表皮を KCl（50 mM）、$CaCl_2$（0.1 mM）を含む 10 mM MES-KOH (pH 6.15) 緩衝液に、23℃明期条件で 3 時間浮遊させ気孔を開口させた後、ABA 処理を行い開口度の変化を顕微鏡観察にて測定した。孔辺細胞の過酸化水素（H_2O_2）の発生は、蛍光プローブ H_2-DCFDA を用いて、顕微鏡下で蛍光観察を行い確認した。
【結果】光条件下でシロイヌナズナおよびソラマメの葉に ABA 処理 (10 μM) により生じる気孔閉鎖は、PET 阻害剤の DCMU (10 μM) あるいは DBMIB (0.2 μM) 処理により打ち消され、気孔の開口度は無処理区とほとんど同じであった。次に、シロイヌナズナ孔辺細胞内の H_2O_2 発生量を測定したところ、ABA 処理 5 分後で H_2O_2 量は無処理区の 2.5-2.8 倍に増加していたが、DCMU を同時処理した場合では、H_2O_2 量の増加はほとんど見られなかった。ABA を処理した場合の孔辺細胞では、葉緑体で特に強い H_2-DCFDA 蛍光シグナルが観察され、葉緑体での H_2O_2 の発生が明らかとなった。また、暗下で ABA 処理した孔辺細胞の H_2O_2 発生量は、光条件下無処理時とほぼ同じであり、ABA による孔辺細胞葉緑体での ROS の発生には、PET の活動が不可欠であった。一方、NADPH オキシダーゼ阻害剤 DPI は、シロイヌナズナでの ABA 誘導性の気孔閉鎖を抑制したが、その効果は部分的であり完全に阻害しなかった。以上の事から、ABA 誘導性の気孔閉鎖では、NADPH オキシゲナーゼ由来の ROS だけでなく、孔辺細胞の葉緑体で誘導される H_2O_2 がシグナル伝達物質として機能していることが明らかになった。

Abscisic acid, guard cell, reactive oxygen species

発表責任者：山田直隆（n-yamada@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：1E6p09
講演日時：3 月 24 日 15:28～ 1 号館 E6 会場

光合成細菌由来 LPS はシロイヌナズナの根の生長を促す

LPS from photosynthetic bacteria promotes the growth of Arabidopsis thaliana root

○岩本 康成、岩下 彰吾、平川 夕貴、林 修平、山本 進二郎、宮坂 均（崇城大応用生命）
○Yasunari Iwamoto, Shogo Iwashita, Yuki Hirakawa, Shuhei Hayashi, Shinjiro Yamamoto, Hitoshi Miyasaka (Sojo Univ.)

【目的】光合成細菌（紅色非硫黄細菌）には植物の生長を促進する効果があり、農業で利用されている。我々のこれまでの研究で、光合成細菌は死菌（超音波処理）でも生菌と同等以上の植物成長促進効果を示すことがわかっている。このことは、光合成細菌の菌体成分が植物の成長を促進していることを示している。そこで、光合成細菌破砕物を遠心分離で上清（可溶性画分）とペレット（不溶性画分）に別けて植物に投与し、それぞれの成分の植物の生長に及ぼす影響を検討したところ、上清は高濃度で成長促進効果を示し、ペレットは低濃度で成長促進、高濃度では成長抑制効果を示した。上清に含まれる物質では、インドール-3-酢酸（IAA）や 5-アミノレブリン酸（ALA）などが植物の成長促進物質として報告されている。しかし、ペレット（不溶性画分）の成長促進および成長抑制物質に関する報告はこれまでにない。今回、我々はこのペレット中の成長促進物質をリポ多糖（Lipopolysaccharide: LPS）と予測し、光合成細菌 LPS がシロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）の生長に及ぼす影響を検討した。
【方法及び結果】光合成細菌は市販されている *Rhodobacter sphaeroides* を用いた。光合成細菌からの LPS の抽出は LPS Extraction Kit（iNtRON Biotechnology）を用いて行った。シロイヌナズナは Col-0 系統を用いた。シロイヌナズナの無菌栽培は、0.5%スクロースおよび 0.2～0.4%ゲランガムを添加した Murashige & Skoog（MS）培地を使用して行った。滅菌した種子を播種し、播種後 8 日目に根長を測定した。根長測定の画像解析は ImageJ で行った。さまざまな LPS 濃度で検討した結果、対照区の平均根長が 2.4 cm に対し、1×10^{-1} cfu 相当/mL の低濃度 LPS 投与群では 3.3 cm と有意な成長促進効果が確認できた（$P\leqq0.01$）。また、*R. sphaeroides* 由来の市販されている標準品 LPS を用いて実験を行ったところ、1 ng/mL の低濃度で有意な成長促進効果が確認できた（$P\leqq0.01$）。
【考察】LPS は植物において活性酸素種（Reactive Oxygen Species: ROS）の発生や抗菌ペプチド生産を促し、自然免疫の活性化が起こることが報告されている。また、ROS の発生による微弱な酸化ストレスが光合成生物の増殖を促すことや、ROS の蓄積が根の生長を促進するなどの報告がされている。これらの報告から、LPS により ROS の発生が促進され、微弱な酸化ストレスにより根の生長を促進したと考えられる。LPS によるシロイヌナズナの成長促進効果が示されたのは今回が初めてである。今回の結果より、光合成細菌の植物の成長促進メカニズムの一つが、LPS である可能性が示された。

LPS, plant, growth

発表責任者：宮坂 均（miyasaka@life.sojo-u.ac.jp）

講演番号：1E6p10
講演日時：3 月 24 日 15:39～ 1 号館 E6 会場

エチレン受容体の全長とリガンド結合領域の組換えタンパク質の発現

Expression of recombinant protein of full length and ligand binding domain of etylene receptor

○長谷川 恵一、陸 鵬、高橋 郁夫、片山 幸江、盧 翌、岡本 研、鈴木 道生、中村 英光、中嶋 正敏、浅見 忠男、永田 宏次（東大農）
○Keiichi Hasegawa, Peng Lu, Ikuo Takahashi, Yukie Katayama, Yi Lu, Ken Okamoto, Michio Suzuki, Hidemitsu Nakamura, Masatoshi Nakajima, Tadao Asami, Koji Nagata (The University of Tokyo)

植物ホルモンの一つであるエチレンは ETR1, ERS1, ETR2, ERS2, EIN4 の 5 つによって受容される。これらのエチレン受容体は微生物における二成分情報伝達系を構成するタンパク質に類似したヒスチジンキナーゼドメインおよびレシーバードメインを有していることが報告されている[1]。この中でも最もよく研究されている ETR1 は小胞体膜に存在し、銅(Ⅰ)が配位することにより、エチレンに結合可能となることが示唆されている[2]。

しかし、エチレンとの結合に関与する N 末端膜貫通領域の立体構造はいまだ解かれておらず、エチレン受容体によるリガンド認識機構は不明である。そこで本研究では N 末端膜貫通領域の立体構造を明らかにし、エチレン受容体がエチレンをどのように認識するか、原子レベルで解明することを目的とした。

シロイヌナズナのエチレン受容体（AtETR1）全長の C 末端側に蛍光タンパク質 sfGFP を付加したものを大腸菌にて発現させ、SDS-PAGE ゲルを蛍光観察したところ AtETR1 中の数か所で分解が生じることが明らかになった。この部分分解物の切断部位の解析から、大腸菌で AtETR1 エチレン結合ドメインを発現させる際に、N 末端からどこまでを発現させるのが最適か検討を進めており、その結果を報告する。

[1] Voet-van-Vormizeele J and Groth G. (2008). Ethylene controls autophosphorylation of the histidine kinase domain in ethylene receptor ETR1. Mol. Plant 1, 380-387.
[2] Rodríguez FI et al. (1999). A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from Arabidopsis. Science 283, 996-998.

Plant hormone, Signal Transduction, Etylene receptor

発表責任者：hasegawa.k.999@gmail.com（hasegawa.k.999@gmail.com）

講演番号：1E6p11
講演日時：3 月 24 日 16:00～ 1 号館 E6 会場

高等植物シロイヌナズナの二次肥厚を活性化するサイトカイニン情報伝達経路の解明
Regulatory mechanism of cytokinin signaling underlying radial thickening in *Arabidopsis thaliana*
○島田 由里菜、今村 美友、權部 晃一、山篠 貴史（名古屋大生命農）
○Yurina SHIMADA, Miyu IMAMURA, Koichi GOMBU, Takafumi YAMASHINO (Nagoya Univ.)

草本・木本の違いに関わらず多くの双子葉植物の栄養成長期の根・胚軸などの軸性器官においては、器官形成後に中心柱細胞の増加に起因する肥厚成長（二次成長ともよばれる）が観察されることが知られている。すなわち、最初に器官の放射パターンが確立し、その結果生じた前形成層および内鞘に由来する細胞が分裂能を獲得して側方分裂組織として機能することにより中央–周辺軸方向へ肥厚する。二次成長は自身の形態を支える体軸強度を担保しつつ、器官内および器官間の高次の維管束ネットワークを構築し、生涯を通じて維持するために重要な役割を果たしている。したがって、二次成長における細胞分裂活性の調節と分化運命の決定機構は、植物の体制構築・構造制御に密接に関連していると考えられる。サイトカイニンは、他のホルモンとともに細胞の分裂と分化の維持・調節に関与することが知られている。サイトカイニンに非感受性となる *arr1 arr10 arr12* 三重変異体では二次成長の誘導が観察されない。したがって、サイトカイニン情報伝達は側方分裂組織の活性維持に必須の役割を果たしていると考えられる。そこで、本研究ではシロイヌナズナの二次成長をモデルとしてサイトカイニンによる細胞分裂活性の制御機構を理解することを目的とした。

まず、サイトカイニンに応答して細胞分裂が活性化する細胞をチミジンアナログ EdU で標識した根を組織学的に解析することにより同定した。また、サイトカイニン情報伝達系の下流に位置する *LBD* ファミリーに属する複数の転写制御因子が、*CYCD3;1* や *WOX4*、*ANT* といった既知の肥厚成長関連遺伝子の発現誘導に関与し、肥厚成長を活性化することを明らかにした。LBD タンパク質の転写因子としての細胞内局在、二量体形成、転写調節活性に関する性質を、蛍光タンパク質融合体を用いた BiFC 解析やルシフェラーゼレポーターアッセイにより解析した。さらに、サイトカイニン情報伝達系の下流で機能する bHLH 型転写因子について、細胞内局在、軸性器官における発現部位、変異体の表現型を解析することにより、根、胚軸だけでなく花茎の二次成長を制御する生理的機能を有する可能性を見出した。興味深いことに、シロイヌナズナの根や胚軸においては皮層に分化した細胞は分裂活性を有しないが、花茎の皮層細胞は分裂能を有しており、二次肥厚において重要な役割を果たしている。そこで、EdU 標識後の *bhlh* 変異体を組織学的に解析することにより、花茎においてサイトカイニンに応答して細胞分裂活性が誘起される細胞を同定するとともに、この応答においてサイトカイニン誘導性の bHLH 型転写因子群が如何なる役割を果たすかを明らかにしようと試みた。本発表では以上の解析に基づいて、軸性器官の細胞分裂を活性化するサイトカイニン情報伝達経路について議論したい。

radial thickening, cytokinin, cell division

発表責任者：山篠貴史（yamasino@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：1E6p12
講演日時：3 月 24 日 16:11～ 1 号館 E6 会場

タデアイ由来化合物が植物及び植物病原性真菌の生育に及ぼす影響
The effects of the compounds derived from *Polygonum tinctoria* on growth of plants and plant pathogenic fungi

○平山 遼太[1]、佐々木 健郎[2]、中野 雄司[3]、浅見 忠男[1]([1]東大院・農生科・応生化、[2]東北医科薬科大・薬、[3]理研・CSRS)
○Ryota HIRAYAMA[1], Kenro SASAKI[2], Takeshi NAKANO[3], Tadao ASAMI[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Tohoku med. and pharm. univ., [3]RIKEN CSRS)

タデアイ（*Polygonum tinctoria*）はタデ科の一年生植物であり，天然物を利用した古来の染色法である藍染の原料として用いられている．近年，この染色法を利用して得られた藍染物が抗菌活性を持つとして注目を集めている．タデアイに由来する化合物のうち，藍色を呈する化合物であるインジゴと同様にインドール環を有する化合物であるトリプタンスリンが，ある種の細菌や真菌に対して抗菌活性を有するという報告があり，藍染物の持つ抗菌活性の原因物質の 1 つとされている．タデアイの生産に注力する青森県では，さらに視野を広めてその産業的利用に関する検討が進められており，その一環としてタデアイの抽出液を農作物に散布する試験が行われた．この試験の中で，抽出液を散布した農作物が通常と比較して速く生育し，植物病に冒されにくくなるという傾向が観察された．そこで本研究室では，タデアイの抽出液が実際に植物の生育や病害抵抗性に及ぼす影響について調査することとした．

植物の生育に関して，タデアイの抽出液を培地に混合してイネとシロイヌナズナを生育させたところ，高濃度では著しい生育阻害効果が表れた．ところが，低濃度では逆に生育を促進する傾向が見られ，特に生育初期のイネにおいては種子根の伸長を有意に促進するという結果が得られた．一方シロイヌナズナでは，トリプタンスリンを処理することによって抽薹が促進される，即ち生育が速まる様子が観察された．

植物の病害抵抗性に関しては，藍染物の持つ抗菌活性に着目し，タデアイの抽出液に含まれる化合物が植物病原菌の生育を阻害することによって実現されるという仮説の下，検証を行った．炭疽病菌に対する抗菌活性試験の結果，タデアイの抽出液は活性を示したが，トリプタンスリンは活性を示さなかった．このことから，既知の抗菌活性物質であるトリプタンスリンの他に活性本体が存在することが示唆された．また，カンキツ緑かび病菌に対しても，タデアイの抽出液がその胞子の発芽を抑制する活性があることが判明した．

以上より，タデアイの抽出液が植物及び炭疽病菌の生育に対して一定の生理活性を有し，その利用が農業上有益である可能性が示された．今後の試験では，他種の植物や植物病原菌に対する活性の有無の確認や，各種分析機器を用いた活性本体の探索を行うことを検討している．

tryptanthrin, plant growth, plant pathogenic fungi

講演番号：1E6p13
講演日時：3 月 24 日 16:22～ 1 号館 E6 会場

低分子化合物を利用した花成関連転写因子の機能制御

Functional regulation of a transcription factor for flowering by low-molecular-weight compounds

○坂井 優生[1]、川本 望[2]、TANAKA-JAROENSANTI Naiyanate[3]、深澤 壽太郎[4]、荒木 崇[2]、中嶋 正敏[3]、浅見 忠男[3]、三橋 渉[1]、加藤 修雄[5]、豊増 知伸[1]([1]山形大・農、[2]京大院・生命科学、[3]東大院・農生科・応生化、[4]広島大院・理、[5]阪大・産研)

○ Yu SAKAI[1], Nozomi KAWAMOTO[2], Naiyanate TANAKA-JAROENSANTI[3], Jutaro FUKAZAWA[4], Takashi ARAKI[2], Masatoshi NAKAJIMA[3], Tadao ASAMI[3], Wataru MITSUHASHI[1], Nobuo KATO[5], Tomonobu TOYOMASU[1] ([1]Fac. of Agric., Yamagata Univ., [2]Grad. Sch. of Bio., Kyoyo Univ., [3]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. of Tokyo., [4]Grad. Sch. of Sci., Hiroshima Univ., [5]The Inst. of Sci. and Ind. Res., Osaka Univ.)

14-3-3 タンパク質は真核細胞全般に存在する制御タンパク質である。14-3-3 は、それ自身で特有の機能を有するわけではなく、標的タンパク質とリン酸化依存で相互作用することで標的タンパク質の機能を制御する重要なアダプタータンパク質である。シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）において 14-3-3 はフロリゲン（FT）の受容体であり、花成関連 bZIP 転写因子 FD と三者複合体を形成することで花成誘導遺伝子が発現することが知られている。一方、糸状菌が生産する二次代謝ジテルペノイド配糖体であるフシコクシン（FC）は、植物原形質膜上の H^+-ATPase の C 末端の mode 3 配列と 14-3-3 との結合部に直接はまり込み、その相互作用を安定化させることでオーキシン様活性を示すことが知られている。演者らの研究グループは FD において C 末端の mode 1 配列 RSSpTAPF-COOH と 14-3-3 のリン酸化依存の相互作用は FC 処理によって安定化されないことを示し、FD を H^+-ATPase の mode 3 配列を参考に改変し、FC 依存的に 14-3-3 相互作用が安定化する改変型 FD を創製した（2014 年度農芸化学会大会で発表）。本研究においては、fd 機能喪失突然変異体に FD プロモーター配下で改変型 FD を発現させる組換え体を調製し、その花成に及ぼす FC の影響を調べることを目的とした。組み込む改変型 FD については、結合モチーフ内 T のリン酸化模倣 E 置換体（RSSEV-COOH）の場合、リン酸化体（RSSpTV-COOH）の場合と比べ、14-3-3 結合力はさらに弱まり、14-3-3 相互作用において FC 依存性が高かったことから E 置換体を用いることにした。この組換え体を用いて花成アッセイを行ったところ、FC 処理により有意に花成は早まらなかった。原因として FC が植物体内で分解・不活性化される可能性などが考えられた。そこで、FC に代わり、植物体内においても改変型 FD と 14-3-3 の相互作用を安定化する低分子化合物を探索することにし、酵母ツーハイブリッド法を用いた化合物ライブラリースクリーニングを試みているので、その結果についても報告する。

14-3-3 protein, protein-protein interaction, fusicoccin

講演番号：1E6p14
講演日時：3 月 24 日 16:33～ 1 号館 E6 会場

植物の抽だい抑制化合物の構造活性相関研究
Structure-activity relationships of anti bolting compounds in plant
○志鎌 駿平、荻原 毅、松浦 秀幸、高橋 公咲 (北大院農)
○ Shunpei SHIKAMA, Tsuyoshi OGIHARA, Hideyuki MATSUURA, Kousaku TAKAHASHI (Hokkaido Univ)

背景・目的）ダイコン（*Raphanus sativus*）などの冬一年生植物の多くは，冬季の低温条件と春季の長日条件により花芽を形成する．この生物現象は抽だいと呼称されており，誘導因子として植物ホルモンである(GA)が報告されている．冬一年生植物を春の早い時期に播種をすると発芽後に寒の戻りによって低温条件に曝されることがあり，再び春の暖かい長日条件に戻ると植物体が冬を越して春になったと誤認識し、十分に成長しないまま抽台をしてしまう。これは不時抽だいと呼称され、農業上問題となっている。一方，この抽だいを抑制する化合物として(2S)-2,3dihydroxypropyl (7Z,10Z,13Z)-hexadeca-7,10,13-trienoate（1）がダイコン葉から単離・同定されており，この化合物は抽だい率が上がるにつれて内生量が減少すること，1 mM においてダイコンの茎の成長をコントロールと比較して 62%阻害すること，シロイヌナズナの根の伸長阻害活性を持つことが明らかとなっている[1]．しかしながら化合物 1 の詳細な作用機構は明らかにされていない．本研究では 1 の構造類似化合物を合成し，シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）の根の伸長阻害活性と GA 代謝関連遺伝子発現を比較することによってその制御機構を明らかにすることを目的とした．
方法）種々合成したエステル体 12 種（50 μM, 25 μM）をそれぞれ混合した 1/2 MS 培地を用いて，シロイヌナズナ（*A. thaliana*）の根の伸長阻害活性試験を行った．また，根部から mRNA を抽出した後 cDNA を合成し，qRT-PCR 解析に供した．
結果）脂肪酸エステル体では不飽和脂肪酸エステルにおいて根の伸長阻害活性を有することが示され，*cis-trans* 体における差異はなく，少なくとも 1 つの炭素-炭素二重結合を持つことが生物活性に必要であると示唆された．また，GA 不活化酵素をコードする遺伝子(*GA2ox1*, *GA2ox2*)の発現量が活性のある化合物では有意に増加し，活性のないものでは有意な差はみられないことが示されたことから，活性型ジベレリンを不活化させることが抽だいを抑制するために重要であることが示唆された．

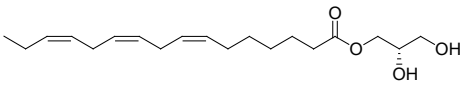


図 1. (2*S*)-2,3-dihydroxypropyl(7*Z*,10*Z*,13*Z*)-hexadeca-7,10,13-trienoate の構造

1【Yoshida et al. *Plant & Cell Physiology* 2010】

bolting, gibberellin, structure-activity relationships

発表責任者：志鎌駿平（shunpei@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：1E7a07
講演日時：3 月 24 日 10:16～ 1 号館 E7 会場

水耕栽培におけるリン酸イオン、カリウムイオン及び硝酸イオンの自動濃度管理システムの構築
Construction of an Automatic Nutrient Solution Management System of Nutrient Solution for Hydroponics

○徐 克彬、阿黒 達也、北隅 優希、加納 健司、白井 理（京大院農）
○Kebin XU, Tatsuya Aguro, Yuki Kitazumi, Kenji Kano, Osamu Shirai (Kyoto Univ. of Agric.)

気候や気象条件に左右されず、虫害や病原菌の影響を受けにくい水耕栽培は、野菜の安定供給を念頭に置いた植物工場の基盤技術として期待されている。現在、品質の向上や栽培期間の短縮化をめざして、温度、湿度、照射光の波長や照射時間の制御、肥料成分の濃度管理など培養条件の最適化が検討されている。特に成長段階に応じた培養液中の各肥料成分の濃度制御は重要であり、注目されている技術である。肥料濃度を制御するには、培養溶液中の各栄養成分濃度のモニタリングに基づいた肥料供給が必要となる。その際、安価で使用に際して複雑な専門技能を必要とせず、長時間の連続測定が可能であるイオン選択性電極を用いた電気化学的モニタリングは、培養液中のリン酸、窒素、カリウムの各栄養成分の濃度管理に最適であると思われる。しかし、カリウム以外のイオン選択性電極は安定性などの問題から、これまで長期間のモニタリングではほとんど利用されてこなかった。

本研究では、リン酸イオン選択性電極としてコバルトの表面にリン酸化合物 $[Co_3(PO_4)_2{\cdot}8H_2O]$ を電析によって固定化した電極を使用した。硝酸イオン選択性電極とカリウムイオン選択性電極には液膜型のイオンセンサーを使用し，硝酸イオン感応膜として、tetraheptylammonium nitrate ($[THpA^+][NO_3^-]$) 及び nitrophenyl octyl ether (NPOE) を含む polyvinyl chloride (PVC) 薄膜を，カリウムイオン感応膜としては、カリウムを含む疎水性塩とイオノフォアであるバリノマイシンおよび NPOE を含む PVC 薄膜を用いた。作製した全てのイオン選択性電極は、10^{-5} ~ 10^{-1} M の濃度領域で各イオン濃度の対数に対して線型に応答した。応答時間は数秒以内であり、共存イオンに対する選択性や安定性もよいことを確認した。

作製した各イオン選択性電極を利用して培養液中の各イオン (K^+、NO_3^-、$H_2PO_4^-$) 濃度のモニタリングシステムを構築し、小松菜を培養に使用して各イオンの植物による吸収を確認した。さらに、自動的に栄養成分濃度を一定に保持する植物肥料管理システム (イオンスタット) の構築も試みた。イオンスタットは、作製したイオン選択性電極の電位応答から濃度変動をモニタリングし、濃度が設定した閾値以下になると各イオンを高濃度に含む水溶液を一定量自動的に添加するように設計した。実際に植物の吸収により培養液中の各栄養成分の濃度が閾値まで下がると、肥料溶液が添加され、培養液中の栄養成分濃度をほぼ一定値に制御できることを確認した。

hydroponics, nutrient solution, automatical management system

発表責任者：徐　克彬（xu.kebin.74s@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：1E7a08
講演日時：3 月 24 日 10:27～ 1 号館 E7 会場

微生物資材の金属吸収に対する作用機作

Study on the Effect of microbial materials on mineral uptake

○内山 優里恵[1]、中谷 笑鈴[1]、李 克[2]、西片 百合[1]、長谷川 雄大[2]、藤原 徹[2]、安保 充[1]([1]明大農、[2]東大院農)
○ Yurie UCHIYAMA[1], EMIRI NAKATANI[1], KE LI[2], YURI NISIKATA[1], TAKAHIRO HASEGAWA[2], TORU FUJIWARA[2], MITSURU ABO[1] ([1]Meiji Univ., [2]Univ. of Tokyo)

【背景目的】 本研究では微生物資材の効果を植物体への作用機作の観点から解明することを目的とした。本研究で用いた微生物資材は，チシャおよびシロイヌナズナにおいて地上部湿重量の増加と地上部中 Mo 量の顕著な増加が確認されている[1,2]。今回は，微生物資材の無機成分吸収への作用に着目して実験を行った。

【方法・結果】 微生物資材として，紅色非硫黄細菌を主体とする光合成肥料であるバクテリアン（ワタナベ産業）を用いた。植物サンプルとして，シロイヌナズナ Col-0 株および必要に応じて L*er* 株を用いた。生育は，人工気象器内で温度 20℃，湿度 60%に設定し，培地濃度が薄い方が資材の効果が現れやすいことから 1/10MS 寒天培地で 10 日間生育させた後，生育条件の異なる培地に株を移植し，さらに 10 日間生育した。生育条件は，Control（資材なし），B（資材あり）に設定した。地上部および根部の硝酸分解を行い，ICP-MS (Perkin Elmer，NexION® 300D)を用いて Mo および Mo 蓄積に関連する可能性のある必須微量元素[3]を測定した。結果として，微生物資材施肥により地上部湿重量の増加，地上部，根中の Mo 含量の増加が確認された。その他の金属については Mo のように有意差をもって増加する結果は得られなかった。なお，微生物資材は培地に添加する際に 1000 倍希釈して使用するため，生育に使用している 1/10MS 培地に比べると，無機成分の供給の意味では影響が無視できる。(Mo の場合，微生物資材は 1/10MS 培地の 1/2500 しか含んでいない。)

次に Mo 量増加にモリブデントランスポーターが関与していると仮定し，*MOT1*，*MOT2* の mRNA 発現量を Quantitative RT-PCR により測定した。試料は液体窒素で凍結後，ホモジナイズし，常法に従って RNA を抽出，cDNA を作製し，RT-PCR にかけた。その結果，*MOT1*，*MOT2* の mRNA 発現量増加は見られなかった。このことから，Mo 量の顕著な増加はモリブデントランスポーター遺伝子(*MOT1, MOT2*)以外の要因である可能性が示唆された。さらに，Mo 蓄積に対する *MOT1* の寄与の有無を確認するため，*MOT1* 欠損株である L*er* 株を用いた実験結果を含めて考察する。

【参考文献】

1）西片ら：日本農芸化学会 2017 年度大会要旨集 P1886
2）内山ら：日本農芸化学会関東支部大会 2018 年要旨集 P72
3）Maillard *et al., J. Exp. Bot.*, 64, 5631, 2016.

microbial materials, essential micro-element uptake

講演番号：1E7a09
講演日時：3 月 24 日 10:38～ 1 号館 E7 会場

石灰岩土壌がアブラナ科植物の無機栄養吸収に及ぼす影響

Absorption of mineral nutrients in Brassicaceae plants growing in calcareous soil

○原田 英美子、藤村 麻由、大塚 萌生、中川 沙耶、飯村 康夫 (滋賀県大環境)
○Emiko HARADA, Mayu FUJIMURA, Megumi OTSUKA, Saya NAKAGAWA, Yasuo IIMURA (The Univ. of Shiga Pref.)

ハクサンハタザオ（*Arabidopsis halleri* ssp. *gemmifera*)は、日本に生育するシロイヌナズナ属野生種の一つで、Zn/Cd 集積植物のモデル種 *A. halleri* ssp. *halleri* の類縁種である。*A. halleri* は、生育地の環境にかかわらず、地上部に高濃度の金属を蓄積するとされている。しかし、筆者らはこれまでに、伊吹山（滋賀県／岐阜県）の石灰岩土壌で採取されたハクサンハタザオでは Zn の含有量が非常に低いことを見出している（Kosugi *et al.*, 2015)。石灰岩土壌に生育する植物の特殊性を明らかにするため、土壌を採集し化学分析を行った。

伊吹山で採取した石灰岩土壌は pH7 から 8 程度のアルカリ性であった。土壌からの金属の溶出性を調べるために、塩酸などで酸可溶性画分を調製し分析する方法が広く用いられているが、石灰岩土壌ではこの方法は不適当であることがわかった。そこで、逐次抽出法を用いて、土壌中に含まれる Zn を１）水溶態　２）交換態　３）炭酸塩結合態　４）マンガン酸化物結合態　５）有機物結合態　６）非結晶質鉄酸化物結合態　７）結晶質鉄酸化物結合態　に分別し、ICP-OES（ICP 発光分光分析装置）を用いて化学形態別の含有量の分析を行った。その結果、植物が利用できる形態である水溶態および交換態の比率が通常の培養土よりも著しく低いことが明らかになった。土壌の CEC（陽イオン交換容量）の測定からも、イオン交換が起こりにくい土であることが示された。石灰岩中では、植物が利用できる形の Zn の比率が少ないと考えられた。

炭素含有量と窒素含有量も、通常の培養土壌より低かった。伊吹山で採取したハクサンハタザオを水耕栽培で生育させて重金属処理し、地上部の重金属含有量を測定したところ、重金属集積植物の基準値を超える金属濃度が検出された。以上の結果から、伊吹山の伊吹山に生育しているハクサンハタザオは潜在的に重金属を集積する能力を持っているものの、生育地の石灰岩土壌の性質のため重金属集積量が低いと考えられた。

さらに、本調査から得られた結果が、他のアブラナ科植物にも当てはまるかどうかを検討している。石灰岩土壌で生育させたダイコン（*Raphanus sativus* var. *longipinnatus*）の金属含有量に関しても併せて報告する。

文献：Kosugi A, Tamaru J, Gotou K, Furihata HY, Shimizu A, Kawabe A, Harada E (2015) Metal accumulation by *Arabidopsis halleri* subsp. *gemmifera* at a limestone mining site. Australian Journal of Botany 63: 134-140.

calcareous soil, hyperaccumulator, heavy metal

発表責任者：原田英美子（harada.e@ses.usp.ac.jp）

講演番号：1E7a10
講演日時：3 月 24 日 10:49～ 1 号館 E7 会場

珪藻由来光化学系 II アンテナタンパク質 FCP 超複合体のクライオ単粒子構造解析

Single particle analysis of Photosystem II-FCP supercomplex from diatom

○秋田 総理[1,2]、長尾 遼[1]、加藤 公児[1]、宮崎 直幸[3]、沈 建仁[1] ([1]岡大異分野、[2]JST さきがけ、[3]阪大蛋白研)
○Fusamichi AKITA[1,2], Ryo NAGAO[1], Koji KATO[1], Naoyuki MIYAZAKI[3], Jian-Ren SHEN[1] ([1]RIIS, Okayama Univ., [2]PRESTO, JST, [3]IPR, Osaka Univ.)

背景　珪藻は不等毛植物門に属する単細胞性の真核藻類であり、珪酸質の固い被殻を有する。海水域、汽水域、淡水域を問わず、全水圏に生息し、現在の地球上の一次生産量のおよそ 20 %を担っているとされる、非常に重要な光合成生物である。特に珪藻で働いているアンテナ色素には、クロロフィル *c* とフコキサンチンが結合しており、緑色植物が利用できない青～緑色の光を高効率で利用できるのに加え、絶えず大きく変化する光環境に適応した高い光保護能力を備えている。本研究では、珪藻から光化学系 II-フコキサンチンクロロフィル *a*/*c* タンパク質超複合体（PSII-FCPII）を単離し、その原子構造をクライオ電子顕微鏡単粒子構造解析法によって決定した。その構造を基に、複合体中の色素の配置や結合様式、タンパク質サブユニット間の相互作用、エネルギー伝達様式を解析した。更に、既に報告されている緑色植物由来の光化学系 II-集光タンパク質超複合体(PSII-LHCII)と比較した。
方法　人工気象器を用いて珪藻 *Chaetoceros gracilis* を培養し、回収した細胞をガラスビーズで破砕した後、遠心分離でチラコイド膜を回収した。回収したチラコイド膜から界面活性剤を用いて PSII-FCPII を可溶化し、ショ糖密度勾配遠心分離法によって精製した。ネガティブ染色試料の電顕観察によって、構造解析に適した PSII-FCPII の均一な粒子が観察された。このサンプルを用いてクライオグリッドを作成し、最先端クライオ電顕 FEI Titan Krios で合計 12,739 枚のイメージを撮影した。収集したイメージからタンパク質粒子像をピックアップし、3 次元再構築を行なった。得られた 3 次元密度分布図に原子モデルを当てはめ、精密化を行なった。
結果　98,936 粒子を用いて 3 次元再構築を行ない 3.8Å分解能の PSII-FCPII の電子顕微鏡マップが得られた。このマップを用いて、珪藻特有の PsbQ’を含む PSII の 21 サブユニット、新規の 3 サブユニット及び FCP の 22 サブユニットのモデルを構築出来た。PSII の色素や電子伝達体の位置はシアノバクテリア由来の PSII 二量体とほぼ同じであった。PSII-FCPII の全体構造は PSII 二量体の両側に 2 つの FCP 四量体と 3 つの FCP 単量体が結合した $C_2S_2M_2$ タイプであった。緑色植物由来の PSII-LHCII では PSII 二量体の両側に LHCII の三量体が結合しており、赤色系統と緑色系統の光合成生物では、異なる場所で生育し、異なる波長を吸収するために、異なる進化を遂げてきたのではないかと推察される。また、PSII-FCPII のクロロフィルやカロテノイドの配置から、珪藻は様々な環境に適応するために効率的に光エネルギーを PSII に伝達する一方で、より効率的に余剰のエネルギーを排出していることが明らかになった。

Photosynthesis, Structural Biology, Cryo-Electron Microscopy

発表責任者：秋田総理（fusamichi_a@okayama-u.ac.jp）

講演番号：1E7a11
講演日時：3 月 24 日 11:10～ 1 号館 E7 会場

フィトクロム B を介した赤色光シグナルのリン栄養獲得における役割
A phytochrome B-mediated regulatory mechanism of phosphorus acquisition
○桜庭 康仁[1]、馬渕 敦士[2]、門田 慧奈[2]、菅野 里美[1]、射場 厚[2]、柳澤 修一[1]([1]東大生セ、[2]九大院理)
○Yasuhito SAKURABA[1], Atsushi Mabuchi[2], Keina Monda[2], Satomi Kanno[1], Ko Iba[2], Shuichi Yanagisawa[1] ([1]Dept. Biol., Fac. Sci., Kyushu Univ., [2]Biotech. Res. Center, Univ. Tokyo)

植物は外部環境に合わせて効率よく、バランスよく必要な無機栄養素を吸収して生長する。リンは植物の多量必須元素の１つであり、リン酸イオンの供給量の不足がしばしば植物の生長を制限することもある。一方で、光も植物の生長調節に重要な外部要因であり、植物の様々な生長プロセスに影響を及ぼす。

本研究ではまず、自然突然変異に由来する遺伝的多様性に基づいてリン酸イオンの吸収能力に違いがあるかを調べるために、放射性同位体(^{33}P)を用いたイメージング技法によって約 200 系統のシロイヌナズナの野生系統（エコタイプ）のリン酸イオンの吸収能力を評価した。その結果、Lm-2 と CSHL-5 という 2 系統のエコタイプでリン酸イオンの吸収が著しく低下していることがわかった。これら 2 系統のエコタイプは赤色光に対する感受性が低く，赤色光受容体 phyB の変異株に表現型が類似していることから phyB がリン栄養の獲得に関わっていることが考えられた。そこで、phyB 変異株のリン酸イオンの吸収能力を調べたところ、実際に低下していることが確認された。さらに、phyB を介した赤色光応答の負の制御因子である PIF4 と PIF5、正の制御因子 HY5 がリン酸獲得機構の制御に重要な役割を果たしていることが、それぞれの変異株のリン酸取り込み能力の解析から示唆された。さらに、クロマチン免疫沈降アッセイにより、PIF4, PIF5, HY5 がリン酸トランスポーターPHT1;1 の発現を直接制御することが明らかになったことから、phyB が複数の転写制御ネットワークを利用してリン酸イオンの獲得を促進させていることが示唆された[1]。

[1] Sakuraba *et al.*, Nat. Plants, doi.org/10.1038/s41477-018-0294-7

Light signaling, Plant nutrient, Phosphorus

発表責任者：櫻庭康仁（sakuraba0425@gmail.com）

講演番号：1E7a12
講演日時：3 月 24 日 11:21～ 1 号館 E7 会場

イネケイ酸輸送体 Lsi1 の極性分布に関する解析

Mechanism for the polar localization of Si transporter, Lsi1

○小西 範幸、馬 建鋒（岡山大　植物研）
○Noriyuki KONISHI, Jian Feng Ma (IPSR. Okayama Univ.)

イネはケイ素を高集積する。葉の表面にシリカとして蓄積したケイ素は、生物的・非生物的なストレスに対する物理的な防御壁となる。ケイ素を蓄積できないイネの変異体では、圃場における収量が激減することから、ケイ素はイネの生産性を左右する重要な因子であるといえる。これまでに、イネの根に発現する NIP タイプのアクアポリン、Lsi1 が土壌からのケイ素吸収に中心的な役割を担うことが分かっている。Lsi1 は根の外皮と内皮で発現し、細胞の遠心側のみに極性分布する。数理モデル解析から、イネ根の高効率なケイ素吸収に Lsi1 の極性が重要であると示されているが、Lsi1 の極性を制御する分子メカニズムは分かっていない。

本研究では、Lsi1 の N、または、C 末端領域の欠失解析によって、Lsi1 の極性制御に関わる領域の同定を試みた。まず、*Lsi1* プロモーターと Flag タグを Lsi1 の N、または、C 末端領域を欠失させた cds と結合させたコンストラクト (Lsi1dN, Lsi1dC) を *lsi1* 変異体に導入した。この形質転換体の根の Lsi1dN または Lsi1dC の細胞内局在を抗 Flag タグ抗体による免疫染色で評価した。Lsi1dN は内在の Lsi1 と同様の遠心側の極性を示したのに対し、Lsi1dC は遠心側だけでなく向心側にもドット状のシグナルを呈した。この結果から、Lsi1 の C 末端領域がその極性に必要であることが示された。次に、Lsi1 の C 末端領域と極性を持たないアクアポリン NIP1;1 の C 末端領域を交換したキメラタンパク質 (Lsi1dC-NIP1;1C, NIP1;1dC-Lsi1C) を *lsi1* 変異体で発現させた。Lsi1dC-NIP1;1C は、極性を示さず、遠心側と向心側の両方の細胞膜に局在したのに対し、NIP1;1dC-Lsi1 は遠心側の細胞膜にのみ極性分布した。これらの結果は、Lsi1 の C 末端領域がその極性分布の制御に必要十分であることを示した。

本発表では、さらに詳細な Lsi1C 末端領域の欠失解析の結果を合わせて、Lsi1 の極性分布の制御に関わるアミノ酸モチーフについて報告する。

Polar localization, Silicon transporter, Rice

講演番号：1E7a13
講演日時：3 月 24 日 11:32～ 1 号館 E7 会場

アメリカネムノキの就眠運動に関与する K⁺チャネル SPORK2 の活性制御機構解析

Analysis of activation regulation mechanism of outward K⁺ channel SPORK2 isolated from *S. saman*

○竹内 優輔[1]、石丸 泰寛[1]、及川 貴也[1]、浜本 晋[2]、魚住 信之[3]、上田 実[1,4]（[1]東北大院理、[2]東大生物工学セ、[3]東北大院工、[4]東北大院生命）

○Yusuke TAKEUCHI[1], Yasuhiro ISHIMARU[1], Takaya OIKAWA[1], Shin HAMAMOTO[2], Nobuyuki UOZUMI[3], Minoru UEDA[1,4] ([1]Grad. Sch. of Science, Tohoku Univ., [2]BRC, Univ. of Tokyo, [3]Grad. Sch. of Engineering, Tohoku Univ., [4]4Grad. Sch. of Life Sciences, Tohoku Univ.)

マメ科植物は朝方に葉を開き、夜になると葉を閉じる就眠運動を行う。我々は、アメリカネムノキ（*S. saman*）の朝方葉を開く運動は、外向き整流性 K⁺チャネル SPORK2 によって制御されていることを報告した（*Curr. Biol.* **2018**, *28*, 2230.）。また SPORK2 は、シロイヌナズナ（*A. thaliana*）の気孔閉口を制御する K⁺チャネル GORK と比べて、K⁺輸送活性化速度は遅く、K⁺輸送量は少ないという 2 つの特性をもつ。しかし、これらのユニークな K⁺輸送特性が就眠運動に与える影響は明らかではない。今回我々はこれらの特性が他のマメ科植物の外向き K⁺チャネルにも保存されていることを確認し、さらに、これらのユニークな K⁺輸送特性の原因となるアミノ酸残基の同定を試みた。

まず、他のマメ科植物のダイズ（*G. max*）およびタルウマゴヤシ（*M. truncatula*）の全ゲノム配列から、SPORK2 と最も相同性の高い外向き K⁺チャネルを 1 つずつ単離した。これらの外向き K⁺チャネルをアフリカツメガエル（*X. laevis*）卵母細胞に異種発現し、二電極膜電位固定法で解析したところ、これらの外向き K⁺チャネルは SPORK2 と同様に K⁺輸送活性化速度は遅く、K⁺輸送量は少ないという特性を示した。次に、これらの特性の原因となるアミノ酸を特定するため、SPORK2 と GORK のアミノ酸配列を比較した。N 末端領域は 16%相同、電位センサードメイン（S1-S4）内の S3 から S4 前までの領域（TM3）は 64%相同と、他の領域の 85%相同と比べて低かった。SPORK2 の N 末端領域を GORK の N 末端領域に交換した変異型の K⁺輸送特性は、野生型と同じだった。続いて、SPORK2 の TM3 を GORK の TM3 に交換した変異型（SPGOSP）の K⁺輸送特性を調べた。その結果、SPORK2 と SPGOSP の間には K⁺輸送活性化速度に大きな差はなかったが、SPGOSP の K⁺輸送量は SPORK2 と比較して 4 倍増加した（図 1）。このように、SPORK2 の TM3 は K⁺輸送量を低く抑える役割を果たすことを明らかにした。さらに、マメ科植物と他科の植物の外向き K⁺チャネルの TM3 のアミノ酸配列を詳細に比較したところ、その中にマメ科植物特異的に保存されているアミノ酸が 1 残基存在したことから、今後このアミノ酸が SPORK2 の K⁺輸送量を制御するか検討を行う。また、もう 1 つの特性である遅い K⁺輸送活性化速度の原因となるアミノ酸残基の探索も併せて報告する。

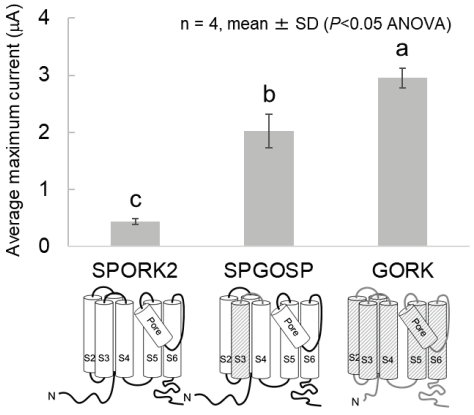


図 1. SPORK2, SPGOSP, GORK,の K⁺輸送量

nyctinasty, *Samanea saman*, potassium channel

発表責任者：上田実（minoru.ueda.d2@tohoku.ac.jp）

講演番号：1E7p01
講演日時：3 月 24 日 13:50～ 1 号館 E7 会場

ザゼンソウ植物体のにおい成分の同定
Identification of odor-active compounds released from damaged plant of Asian skunk cabbage *Symplocarpus renifolius*
○坂巻 憲佐[1]、小栗 秀[2]、勝見 優子[1]、大久保 康隆[1]、小林 宗隆[1] ([1]長谷川香料（株）、[2]東農大生物産業・北方圏農学)
○Kensuke SAKAMAKI[1], Suguru OGURI[2], Yuko KATSUMI[1], Yasutaka OHKUBO[1], Munetaka KOBAYASHI[1] ([1]T. Hasegawa Co., Ltd., [2]Tokyo Univ. of Agric.)

【目的】
ザゼンソウ（*Symplocarpus renifolius*）はサトイモ科ザゼンソウ属の多年草であり、植物体が傷ついた時には強烈なにおいを発生することから「スカンクキャベツ」とも呼ばれる。ザゼンソウの香気に関する研究としては、宮澤らにより、SPME 法を用いた肉穂花序部の香気物質の解析[1)]、および葉部、茎部から得られた揮発性油の香気特性[1,2,3)]について報告されているが、植物体が傷ついた時に発生する特徴的なにおいについては解明されていない。そこで本研究では、ザゼンソウの植物体が傷ついた時に発生するにおいを解明する目的で展開葉、葉柄および地下茎の分析を行った。
【方法及び結果】
各部位を刻んだときのにおいを確認した結果、展開葉はリーフィーグリーンな香りに加え、ややガーリック様の香気、葉柄と地下茎はやや腐敗臭を伴う強いガーリック様の刺激臭が感じられた。この腐敗臭を伴う強いガーリック様の刺激臭が「スカンクキャベツ」の名の由来となっていると思われた。揮発性成分の捕集はダイナミックヘッドスペース（DHS）法により行った。試料となるザゼンソウの各部位（地下茎、葉柄および展開葉）6.3 g を細かく刻み、それぞれ 100 mL 二口フラスコに入れ、窒素を毎分 200 mL 流して 10 分間、Tenax TA に揮発性成分を捕集した。捕集した揮発性成分を加熱脱着装置を用い GC-MS/O により分析した結果、香気を有する含硫化合物 15 成分を *S. renifolius* からはじめて同定または推定した。また、この 15 成分のうち 2 成分は天然からはじめて同定された methyl dithioformate および methylthiomethyl dithioformate であった。これら 15 種類の含硫化合物はそれぞれガーリック様香気、腐敗臭または硫黄様香気を有しており、傷ついたザゼンソウから発生する特徴的なにおいの要因と考えられた。今回、検出された含硫化合物のほとんどは炭素－炭素結合を持たない化合物であった。すなわち、炭素原子と炭素原子の間には必ず硫黄原子がある構造となっていた。このことは、傷ついたザゼンソウから発生する含硫化合物の特徴と考えられた。
【参考文献】
1）正中、内海、宮澤　第 53 回 TEAC 講演要旨集 p53-54, (2009)
2）吉井、宇佐見、本岡、宮澤　第 58 回 TEAC 講演要旨集 p7-9, (2014)
3）M. Miyazawa *et al.*, *J. Oleo Sci.* **2015**, *64*, 1329-1336.

skunk cabbage, plant parts, headspace

講演番号：1E7p02
講演日時：3 月 24 日 14:01～ 1 号館 E7 会場

ザゼンソウの花の匂い成分の解明
Floral scent chemistry in Asian skunk cabbage (*Symplocarpus renifolius*)
○小栗 秀[1]、坂巻 憲佐[2]、神津 直樹[1]、山本 崇勝[1]、坂本 光[1]([1]東農大生物産業・北方圏農学、[2]長谷川香料（株））
○Suguru OGURI[1], Kensuke SAKAMAKI[2], Naoki KOUDU[1], Takakatsu YAMAMOTO[1], Hikaru SAKAMOTO[1] ([1]Tokyo Univ. of Agric., [2]T Hasegawa Co. Ltd.)

【目的】ザゼンソウ（*S. renifolius*）は、北海道では低地の林床に自生し冬季は積雪下に越冬する。４月上旬に複数の花の集合した肉穂花序と仏炎苞が葉の伸長に先立って冬芽から展開する。花は雌性先熟の両性花であり、雌期・両性期・雄期の順に成熟する。ザゼンソウの花序の匂いは「腐臭」と評されるが、植物体を傷つけた時に発生する臭気との区別は明確ではなく、その成分はこれまで未解明だった。我々は、花序の発達三期（雌期・両性期・雄期）における花序の揮発性成分の組成変化と、匂いに寄与する成分を明らかにした。また匂い成分と訪花昆虫との関係を考察した。
【方法】揮発性成分の捕集はダイナミックヘッドスペース法により行った。北海道網走市に自生するザゼンソウ６個体について、花序をテドラーバッグで注意深く覆い、揮発性成分を Tenax TA に捕集した。花序の揮発性成分は、同一個体についてそれぞれ雌期・両性期・雄期の三期にわたって捕集した。捕集した成分は加熱脱着装置を用い GC-MS/O 測定に供した。
【結果と考察】１．自生する 11 個体を用いた予備試験において、両性期に移行する 2 日前の全ての個体の雌期花序から生臭さを伴った落花生様の香気を感じた。この香気を発する個体は両性期では減少し、雄期では生臭さを伴ったオイリーな臭気または甘い香りを感じた。２．開花三期の揮発成分から約 160 種類の成分を検出し､含硫化合物 8 種を含む 28 成分を香気に寄与する成分として同定した。ザゼンソウ花序の主要揮発成分は、3-methylbutyl 3-methylbutanoate、dimethyl disulfide、1,8-cineole、sabinene であり、上記 4 化合物の合計が全体の 52-54%を占めていた。開花三期を通してこれらの組成に大きな変化は見られなかった。methyl dithioformate（ガーリック様香気)、methional（ポテト様香気)、dimethyl disulfide（オニオン様香気)は、GC-MS/O 分析において各期に共通して高い強度で感知されたことから、これらの含硫化合物が花序の生臭いにおいに寄与すると考えられた。雌期に特徴的な落花生様の香気は 2-isopropyl-3-methoxypyrazine が寄与しており、その組成比は雌期で最も高く、両性期と雄期では顕著に低下した。一方、雄期に組成比が高くなる花序揮発性成分として 2,3-butanedione（バター様香気）が同定された。３．雄期のザゼンソウ花序に小型のハエが飛来することに気づいた。雄期のザゼンソウの苞開口部に設置した粘着紙にノミバエ類、トゲハネバエ類などのハエが捕獲され、その一部にはザゼンソウの花粉が付着していた。これらのハエは腐敗した食品に集まるとされ、ザゼンソウ花序の揮発性成分による誘引効果が考えられた。ザゼンソウ花序由来の揮発性成分が受粉昆虫に対して誘引活性を示すものかは未解明であり、今後の課題である。

Symplocarpus, odor, Araceae

発表責任者：小栗　秀（s-oguri@nodai.ac.jp）

講演番号：1E7p03
講演日時：3 月 24 日 14:12～ 1 号館 E7 会場

みどりの香りバーストを駆動するリポキシゲナーゼ活性化機構

Activation of lipoxygenase provokes green leaf volatile burst

○松井 健二、望月 智史（山口大創成科学）
○Kenji Matsui, Satoshi Mochizuki (Yamaguchi Univ.)

みどりの香り（GLV）は植物特有の香気成分群で植物組織が細胞破砕を伴うようなストレスを受けると一過的に生成、放散される。ダイズ種子では食品加工時での生成が不可避で、「戻り臭」「豆臭」として嫌われ、その生成を抑制する工夫が開発されてきた。一方トマト果実などではトマトらしさをもたらすフレーバー因子としてトマト果実香気に寄与していることが知られている。植物にとって GLV 生成はストレス応答と関連していると考えられており、食害や病害などを受けた際に侵略者を忌避する直接防衛能力や植食者の天敵を誘引する間接防衛、さらには近隣の植物に危険を知らせる立ち聞き防衛に寄与している。こうした防衛能力を効率的に発揮するために植物は無傷な状態では GLV をほとんど生成しない一方､障害/傷害を被った時は即時に GLV を生成し放散する仕組みを持っている。こうした急激な GLV 生成は植物にストレスを与えて数秒以内で検出できるほど素早い。私たちはこの現象を「GLV バースト」と名付け、このバーストがどのような仕組みで達成されるのかを明らかにしようとしている。

GLV 生成は脂質/脂肪酸へのリポキシゲナーゼ（LOX）による酸素添加反応で始まり、LOX が GLV 生合成をコントロールする鍵因子と考えられる。シロイヌナズナに存在する 6 つの LOX 遺伝子それぞれを破壊したノックアウト株で検討した結果、葉緑体型の LOX2 が欠損したノックアウト体で GLV バースト能力がほぼ完全に失われていた。LOX2 は傷害応答性ジャスモン酸生合成にも関与することが知られているので LOX2 は GLV とジャスモン酸の両方の生成を制御する LOX であることが明らかになった。この時、LOX2 はもっぱらチラコイド膜ガラクト糖脂質のアシル基に酸素添加し、ガラクト糖脂質ヒドロペルオキシドを生成することで GLV とジャスモン酸の生成に寄与していた。LOX2 は葉緑体ストロマに局在し、葉緑体にはチラコイド膜が豊富に存在する。そのため、無傷な植物組織内で LOX2 は活性を示さない潜在的な状態で保持され、組織破砕刺激に伴って迅速に活性化されるはずだ。ほ乳動物ロイコトリエン生合成が Ca^{2+}で制御を受けることをヒントにシロイヌナズナ葉をカルシウムキレート剤存在下で破砕すると GLV バーストが抑制された。ガラクト糖脂質ヒドロペルオキシドの定量からこの抑制が LOX 活性の抑制に基づくことが明らかとなった。こうしたことから無傷組織内で潜在状態の LOX が組織破砕に伴う Ca^{2+}流入によって活性化され、おそらくはチラコイド膜に移行して結合することでガラクト糖脂質への酸素添加を開始することが示唆される。こうした Ca^{2+}による酵素の構造変化が GLV バーストの担い手と考えられた。

green leaf volatile, lipoxygenase, calcium

発表責任者：松井健二（matsui@yamaguchi-u.ac.jp）

講演番号：1E7p04
講演日時：3 月 24 日 14:23～ 1 号館 E7 会場

植物における匂い受容体候補の発見
A transcriptional regulator as an odorant receptor in plants

○永嶌 鮎美[1,2,3]、檜垣 匠[4,5]、肥塚 崇男[6]、石神 健[1,7]、細川 聡子[1]、渡邉 秀典[1]、松井 健二[6]、馳澤 盛一郎[4]、東原 和成[1,2,8] ([1]東大院・農生科・応生化、[2]ERATO 東原化学感覚シグナルプロジェクト、[3]東工大・バイオ研究基盤支援総合センター、[4]東大院・新領域・先端生命、[5]熊本大・国際先端科学技術研究機構、[6]山口大院・創成科学、[7]東農大・生命科学、[8]東大ニューロインテリジェンス国際研究機構)
○Ayumi NAGASHIMA[1,2,3], Takumi HIGAKI[4,5], Takao KOEDUKA[6], Ken ISHIGAMI[1,7], Satoko HOSOKAWA[1], Hidenori WATANABE[1], Kenji MATSUI[6], Seiichiro HASEZAWA[4], Kazushige TOUHARA[1,2,8] ([1]Agr. and Life Sci., The Univ. of Tokyo, [2]ERATO Touhara Chemosensory Signal Project, JST, [3]Tokyo Tech, [4]Frontier Sci., The Univ. of Tokyo, [5]Kumamoto Univ., [6]Yamaguchi Univ., [7]Tokyo Univ. of Agric., [8]WPI-IRCN, The Univ. of Tokyo)

自然環境下において、食害を受けた植物の周辺に生育している植物の食害抵抗性が上昇することが報告されている。近年、食害を受けた植物から放出される匂い物質によって、周囲の無傷な植物の抵抗性が誘導されることが明らかになってきた。しかし、植物においては、どのようにして匂い物質が受容されてその情報が伝達され、抵抗性応答が引き起こされるか、メカニズムは未だ不明である。我々はタバコ培養細胞 BY-2 を用いて、植物から放散されることが知られている匂い物質による、抵抗性遺伝子誘導活性を検討した。その結果、セスキテルペンの一種である(*E*)-ß-caryophyllene とその構造類似体の匂い物質が、特異的に、*NtOsmotin* 遺伝子の発現を 3-6 時間で誘導することを見出した。さらに、タバコ植物体においても、(*E*)-ß-caryophyllene は *NtOsmotin* の発現を、曝露開始から 8 時間で誘導することが示された。これらの結果は、植物が匂い物質を感知していることを強く示唆することから、タバコをモデルシステムとして、caryophyllene 構造類似体の分子構造を認識する「匂い受容体」を探索することとした。そこで、(*E*)-ß-caryophyllene 誘導体を固定化したビーズを作製してプルダウンアッセイを行ったところ、120 kDa のタンパク質 (P-120)が特異的に結合することが確認された。LC/MS/MS 解析により、このタンパク質は転写制御因子の 1 つであることが明らかになった。Caryophyllene 構造類似体依存的な *NtOsmotin* 発現誘導に、P-120 が及ぼす影響を調べるため、GFP 融合 P-120 を恒常性プロモーター下で発現する BY-2 細胞株を作出した。Caryophyllene 構造類似体による *NtOsmotin* 発現誘導を、野生型の BY-2 細胞と比較すると、GFP 融合 P-120 導入 BY-2 細胞で誘導が抑制される傾向にあった。さらに、GFP 融合 P-120 を恒常性プロモーター下で発現するタバコ植物体を作出し、Caryophyllene 構造類似体による *NtOsmotin* 発現誘導を野生型のタバコ植物体と比較した。その結果、BY-2 細胞での実験と同様に、GFP 融合 P-120 導入株で誘導が抑制される傾向にあった。以上の結果から、タバコにおいて P-120 は caryophyllene 構造類似体を認識して、*NtOsmotin* の遺伝子発現誘導に関わっていることが示唆された。本研究の結果は、植物においては、動物がもつ嗅覚受容体とは異なり、転写制御因子が匂い物質を感知する「匂い受容体」として機能している可能性を示唆している。

odor, volatile organic compounds, transcriptional regulation

講演番号：1E7p05
講演日時：3 月 24 日 14:34～ 1 号館 E7 会場

酸化ストレスを受けたシロイヌナズナ葉からのオキシリピン類の分析

Analysis of oxylipins from *Arabidopsis thaliana* leaves subjected to oxidative stress

○西家 弘真、清水 文一（東洋大院生命）
○Hiromasa NISHIKA, BUN-ICHI SHIMIZU (Toyo Univ. Life Sci.)

【背景】

植物中において多価不飽和脂肪酸の酸化物であるオキシリピンはさまざまな生物活性を示し、一般的には傷害や病害といった外部からのストレスに対する応答で誘導される。一方、ビピリジニウム系除草剤であるジクワットおよびパラコートはそれぞれ植物に対して酸化ストレスを与えることで枯死させる。本研究ではジクワットパラコートの混合除草剤プリグロックス L(OAT アグリオ株式会社)を用いてシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana* Columbia-0)に酸化ストレスを与えた。この酸化ストレス下の生体内のリノール酸およびα–リノレン酸から生じる酸化物 9-HODE、13-HODE、9-HOTrE、13-HOTrE および 13-HOTrEγ(図 1)の内生量を質量分析計(LC-ESI-MS)にて測定した。また、質量分析計でのオキシリピン類の分析感度の上昇を目的として、分析条件についても同時に検討を行った。

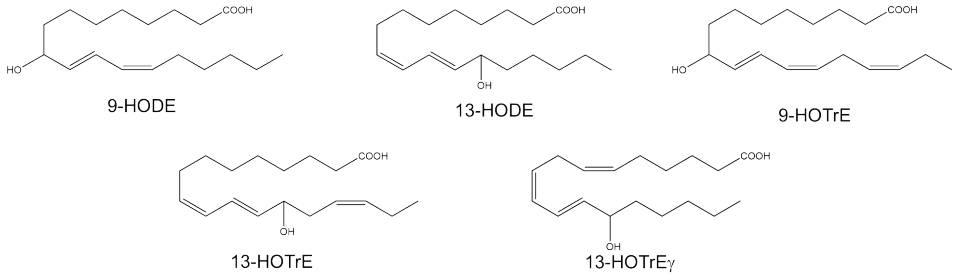


図 1: 分析したオキシリピン類

【方法・結果】

シロイヌナズナを GM 培地上で 3 週間無菌的に栽培した。この葉に対しプリグロックス 8×10^5 倍希釈液 5µl による薬剤処理を行い、明所で 2 日間栽培を続けた。黄化が確認された葉(約 0.1 g 新鮮重)から、クロロホルム:メタノール(2:1)混合溶媒にて脂質の抽出を行った。この脂質抽出物を乾固後、ブタ膵臓抽出物リパーゼ処理し、分解物を固相抽出前処理し分析サンプルとした。これらを超高速液体クロマトグラフィーで分離後、質量分析(ESI-Q-TOF、ネガティブモード)を行った。また、対照区として薬剤処理をしていないシロイヌナズナ葉についても同様の方法で分析を行い、比較を行った。その結果、薬剤処理により 9-HODE、13-HODE、9-HOTrE、13-HOTrE の 4 化合物について、薬剤処理をしていない葉と比較して、約 2 倍の蓄積が見られた。

oxylipins, oxidative stress, *Arabidopsis thaliana*

講演番号：1E7p06
講演日時：3 月 24 日 14:55～ 1 号館 E7 会場

ズッキーニにおいて同定された汚染物質輸送因子の病原抵抗性への関与
Involvement of a transporting factor for pollutants identified from zucchini toward pathogen resistance

○藤田 健太郎[1]、乾 秀之[1,2] ([1]神戸大院農、[2]神戸大バイオ)
○Kentaro FUJITA[1], Hideyuki INUI[1,2] ([1]Grad. Sch. of Agri. Sci., Kobe Univ., [2]Biosignal Res. Ctr., Kobe Univ.)

【背景】
ダイオキシン類を始めとする残留性有機汚染物質(POPs)は現在もなお、土壌を広く汚染している。ウリ科植物の果実において POPs が高濃度で蓄積することが知られており、この現象には、Major latex-like protein(MLP)が関与している。土壌から根細胞に取り込まれた POPs は MLP と結合した後、MLP-POPs 複合体として導管に移行することで果実に輸送される。しかし、このように汚染物質輸送因子として機能する MLP の生理的機能の解明は進んでいない。そこで、本研究ではウリ科植物ズッキーニ(*Cucurbita pepo*)の MLP(CpMLP)を用いて、これが感染時特異的タンパク質クラス 10(PR-10)と同じタンパク質ファミリーに属することに着目し、MLP の病原抵抗性への関与を明らかにすることを目的とした。
【方法】
ズッキーニから 2 種の *CpMLP* 遺伝子(*MLP-PG1* 遺伝子、*MLP-GR3* 遺伝子)を取得し、*CpMLP* 遺伝子を過剰発現させた形質転換タバコを作出し、*NtPR* 遺伝子の発現解析を行った。また、*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* を形質転換タバコの葉に接種し、葉に形成された病斑面積の測定、コロニー数の計測から *CpMLP* 遺伝子の発現と病原抵抗性の関係を評価した。
【結果と考察】
CpMLP 遺伝子を過剰発現させた形質転換タバコにおいて、発現が変化する *NtPR* 遺伝子が存在した。また、*P. syringae* の感染による病斑面積、コロニー数の有意な低下が確認された。したがって、*CpMLP* 遺伝子の発現は *NtPR* 遺伝子の発現を制御することで、病原抵抗性に関与すると考えられる。これまでに、CpMLP は抗菌活性を持たないことが報告されており、また、ワタの MLP はある種の転写因子と相互作用して病原抵抗性を向上させることが報告されている。以上より、CpMLP は直接的に病原抵抗性に関与せず、転写因子との相互作用などにより、病原応答遺伝子の発現を制御することで間接的に病原抵抗性に関与していると考えられる。

Major latex-like protein, zucchini, pathogen resistance

発表責任者：乾秀之（hinui@kobe-u.ac.jp）

講演番号：1E7p07
講演日時：3 月 24 日 15:06～ 1 号館 E7 会場

陸棲藍藻 *Nostoc* sp. HK-01 の休眠細胞の耐性限界温度
Temperature limit of dry heat tolerance in akinetes of a terrestrial cyanobacterium, *Nostoc* sp. HK-01
○木村 駿太[1,2]、富田-横谷 香織[1] ([1]筑波大・生命環境、[2]学振)
○Shunta KIMURA[1,2], Kaori Tomita-Yokotani[1] ([1]Univ. Tsukuba, [2]JSPS)

【背景・目的】
陸棲の藍藻（シアノバクテリア）は、乾燥耐性、光合成能、窒素固定能を備えていることから生物肥料や食資源として期待されている。乾燥耐性を指標に兵庫県の土壌から単離された陸棲藍藻の一種 *Nostoc* sp. HK-01 は、乾燥状態で真空、放射線および幅広い温度に対する優れた耐性が確認されていることから、将来の月や火星における物質循環への貢献が期待され、国際宇宙ステーションにおける宇宙曝露実験により、宇宙空間における生存が検証されている[1-3)]。我々は *Nostoc* sp. HK-01 の複数の細胞形態からなる詳細な生活環を明らかにし、akinete と呼ばれる休眠細胞のみが 100℃の乾熱に対する耐性を備えていることを明らかにしてきた[4-6)]。しかし、休眠細胞が乾燥状態で耐えうる限界温度は示されていない。本発表は、*Nostoc* sp. HK-01 の休眠細胞が蘇生可能な限界温度を明らかにすることを目的とした。
【方法・結果および考察】
液体培養後の *Nostoc* sp. HK-01 を、重量が安定するまで室温で乾燥させた後、藻体を電器炉に備えて 100-200℃の熱を 1-10 時間曝露した。液体培地を加えて 20 μmol・m^{-2}・s^{-1} の常光下で 2 日間静置した後、FDA (Fluorescein diacetate) を加え、蛍光顕微鏡で観察した。FDA は生存細胞のエステラーゼによって加水分解され、励起光（488 nm）によって蛍光（530 nm）を発する。撮影した画像から無作為に視野を選択し、蛍光細胞 / 全細胞 × 100 = 生存率（%）として算出した。我々は、120 から 160℃を超える乾熱曝露後の細胞から確かな蛍光を新規に見出した。光合成生物である藍藻が 160℃を超える乾熱に曝された後に蘇生する現象は極めて新規性が高いことから、今後耐性機能に関わる分子の全容解明が強く求められる。
【参考文献】
1) Katoh *et al.*, *Microbes and environments*, **18**, 2003.
2) Tomita-Yokotani *et al.*, The International Astrobiology Workshop 2013, 2013.
3) Cottin et al., *Space Sci. Rev.*, **209**, 2017.
4) Kimura *et al.*, *Biological Sciences in Space*, **28**, 2015.
5) Kimura *et al.*, *Biological Sciences in Space*, **31**, 2017.
6) Kimura et al., *American Journal of Plant Sciences*, **8**, 2017.

Akinete, Dry heat tolerance, Terrestrial cyanobacteria

発表責任者：富田-横谷香織（yokotani.kaori.fn@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：1E7p08
講演日時：3 月 24 日 15:17～ 1 号館 E7 会場

光ストレス順応における葉緑体型アスコルビン酸ペルオキシダーゼの生理学的重要性
Physiological significance of chloroplastic ascorbate peroxidases in light acclimation
岡安 嵩也、三冨 弦、亀岡 峰志、菊樂 香奈、岩上 拓己、小川 貴央、石川 孝博、○丸田 隆典（島根大・生資科）
Takaya OKAYASU, GEN MITOMI, Takashi KAMEOKA, Kana KIKURAKU, Takumi IWAGAMI, Takahisa OGAWA, Takahiro ISHIKAWA, ○Takanori MARUTA (Fac. Life Environ. Sci., Shimane Univ.)

光合成能力を上回る強度の光エネルギー存在下では、電子伝達系の過還元状態が起こり、活性酸素種（ROS）の生成が促進される。ROS は防御応答を活性化するシグナルとして機能しうるが、強い酸化力をもつため、その過剰蓄積は細胞障害および細胞死を引き起こす。したがって、光合成による ROS の生成と消去のバランスの調節は光ストレス応答・耐性に極めて重要である。長らく、ストロマおよびチラコイド膜上に局在するアスコルビン酸ペルオキシダーゼ（それぞれ sAPX および tAPX）が葉緑体抗酸化システムの鍵酵素であると信じられてきたが、両酵素の二重変異株でさえ野生株レベルの光ストレス耐性能力を保持することが明らかになってきた。これは他の防御機構による相補の結果であると考えられるが、その詳細や APX の生理学的重要性は未解明である。そこで本研究では、光ストレス順応に重要である循環的電子伝達因子 PGR5（Proton Gradient Regulation 5）に着目し、葉緑体型 APX と PGR5 の多重変異株を作出して解析した。

sapx tapx 二重変異株と *pgr5* 変異株を交配させ、*sapx pgr5*、*tapx pgr5* および *sapx tapx pgr5* を作出した。これらの多重変異株の強光ストレス（1,500 µmol photons/m^2/s）に対する感受性を野生株および親株と比較した。これまでの研究結果と一致して、野生株および *sapx tapx* 二重変異株では強光照射 48 時間後においても視覚的なダメージが観察されなかったが、*pgr5* では若干の葉の退色が見られた。*sapx pgr5* および *tapx pgr5* の表現型はほとんど *pgr5* 変異株と同程度であったが、*sapx tapx pgr5* では強光照射 12 時間ごろから葉の著しいブリーチングが起こり始め、もっとも強烈な細胞死の表現型を示した。これらの結果から、光合成電子伝達系の過還元が起こりやすい *pgr5* バックグラウンドでは葉緑体型 APX は抗酸化酵素として重要であること、sAPX と tAPX は互いに相補的に機能することが明らかになった。また興味深い結果として、*pgr5* 変異株でみられるキサントフィルサイクル活性（光エネルギーの熱放散系）の低下が *sapx tapx pgr5* で回復することがわかってきており、葉緑体型 APX によるキサントフィルサイクル調節の可能性が示唆された。

また、別のアプローチとして光ストレスに高感受性のカタラーゼ欠損株（*cat2*）と *sapx tapx* を組み合わせた解析も進めており、三重変異株は *cat2* よりも強光ストレスに感受性であることが示されつつある。これらの結果から、葉緑体型 APX は他の防御機構のバックアップシステムとして機能することが明らかになった。現在、葉緑体型 APX がメインで機能する環境条件のスクリーニングを行なっている。

Light acclimation, Ascorbate peroxidase, Reactive oxygen species

講演番号：1E7p09
講演日時：3 月 24 日 15:28～ 1 号館 E7 会場

シロイヌナズナデハイドリンの non-K セグメントの酵素凍結保護活性における役割

A role of non-Ksegment of *Arabidopsis* dehydrin in cryoprotective activity for enzyme.

○大久保 智博[1]、神谷 慶太[1]、亀山 阿由子[1]、原 正和[1,2]([1]静岡大院、[2]静岡大グリーン研)
○Tomohiro OHKUBO[1], Keita KAMIYA[1], Ayuko KAMEYAMA[1], Masakazu HARA[1,2] ([1]Shizuoka Univ., [2]Shizuoka Univ. RIGST)

【背景】デハイドリンは種子形成後期に発現する代表的な LEA（late embryogenesis abundant）蛋白質であり、低温や乾燥ストレスによっても発現する天然変性蛋白質である。デハイドリンは高い酵素凍結保護活性を有する。これまでの研究で、我々は、本活性がデハイドリンの保存配列 K セグメント（リジンを含む 15 アミノ酸配列 EKKGIMEKIKEKLPG）の疎水性アミノ酸に依拠することを示した。さらに、シロイヌナズナの 10 デハイドリンのうちでアミノ酸配列が最も長い COR47 において、K セグメント以外の領域に同様の活性があることを示した。そこで、本研究では、COR47 の活性領域のアミノ酸配列と酵素凍結保護活性との関係を調査した。

【結果・考察】COR47 の K セグメント以外の領域（220 アミノ酸）を、15 アミノ酸ずつに切り分け、14 カ所の非 K セグメント、つまり Non-K セグメント（以下 NK とする）を設計した（NK1～NK14)。低温に敏感な乳酸脱水素酵素(LDH)の凍結保護活性を調査したところ､NK3 に最も高い活性が見られた。次に、NK3 の配列を改変し、活性に影響を与える配列要因を調べた。NK3 の疎水性アミノ酸全てを、親水性の非電荷アミノ酸（スレオニン)、塩基性アミノ酸（リジン)、酸性アミノ酸（グルタミン酸）に、それぞれ置換したところ、全ての変異ペプチドの LDH 凍結保護活性は完全に失われた。一方、NK3 の塩基性アミノ酸（リジンとアルギニン)、又は酸性アミノ酸（グルタミン酸とアスパラギン酸）を、それぞれスレオニンに置換した場合、活性は維持された。さらに、NK3 の疎水性アミノ酸を保持し、それ以外の配列をグリシンに置換したペプチドは活性を示したが、塩基性アミノ酸や酸性アミノ酸を保持し、それ以外の配列をグリシンに置換したペプチドには活性はなかった。次に、各ペプチドの二次構造を調べるため、円偏光二色性（CD）分析を行った。すべてのペプチドは、水溶液中において無秩序な構造をとっていたが、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）を添加すると、その濃度上昇に伴い、α-ヘリックスが増加するものがあった。こうした構造変化を起こすペプチドは、LDH 凍結保護活性を示した。

以上より、COR47 には、非 K セグメントにおいても酵素凍結保護活性を示す配列が存在し、疎水性アミノ酸が重要であることが判明した。さらに、本活性を有するペプチドにおいて、疎水性環境下では無秩序な構造から一定の構造をとることが判明した。したがって、凍結融解により酵素表面に疎水部が露出し始めると、デハイドリンは一定の構造に変化し、酵素を保護する可能性が高まった。

dehydrin, cryoprotection, hydrophobicity

講演番号：1E7p10
講演日時：3 月 24 日 15:39～ 1 号館 E7 会場

鉄取り込みを負に制御するシロイヌナズナ bHLH11 の転写機構の解析

Analysis of transcriptional mechanism of *Arabidopsis* bHLH11 involved in negative regulation of iron uptake

○野沢 昂太郎[1]、田辺 記章[2]、田茂井 政宏[1]、重岡 成[1] ([1]近畿大・農・バイオ、[2]NAIST)
○Kotaro NOZAWA[1], Noriaki TANABE[2], Masahiro TAMOI[1], Shigeru SHIGEOKA[1] ([1]Kindai Univ. of Agric, [2]NAIST)

【目的】鉄は植物の生育に必須な微量元素の一つであるが、過剰な鉄の取り込みは細胞内に活性酸素種が蓄積する原因となる。そのため、鉄恒常性の維持は植物にとって重要である。鉄欠乏条件において、シロイヌナズナにおける鉄取り込み促進機構には、FIT を中心とした多数の basic helix-loop helix (bHLH) 型転写因子が関わることが報告されている。一方で、鉄の取り込みを抑制する機構についてはほとんど明らかにされていない。これまでに、Clade IVb に属する *bHLH11* の発現が鉄過剰条件で増加することを見出し、FIT 依存的な鉄取り込み機構の抑制因子であることを明らかにした (Tanabe et al., in press)。bHLH はタンパク質相互作用を介してダイマーを形成することで鉄取り込み因子の発現を制御することが知られている。そこで、本研究では bHLH11 の転写制御機構を解明するために、相互作用因子の同定を試みた。
【方法・結果】酵母 two-hybrid 法により、bHLH11 を bait タンパク質とし、シロイヌナズナ cDNA ライブラリーより相互作用因子の探索を行った。その結果、4 つの陽性コロニーを単離した。これらコロニーが持つシロイヌナズナ cDNA の配列を解析した結果、その中に鉄取り込みの促進に関与することが報告されている Clade IVc に属する bHLH104 が含まれていた。bHLH ファミリーは Clade 内で機能相補することが知られていることから、bHLH11 は他の CladeIVc である bHLH34、bHLH105 および bHLH115 とも相互作用することが示唆された。そこで、酵母 two-hybrid 法により、bHLH11 はこれら bHLH Clade IVc タンパク質と *in vitro* で相互作用することを確認した。次に、*in vivo* での相互作用を確認するために、シロイヌナズナ葉肉細胞より調製したプロトプラスト内で、bHLH11 と Clade IVc bHLH を一過性発現させ BiFC 法を行った。その結果、bHLH11 と全ての Clade IVc bHLH の相互作用を示す蛍光は核画分で認められた。さらに現在、bHLH11 と Clade IVc bHLH を一過性発現させ、標的遺伝子である *FIT* の発現に及ぼす影響をデュアルルシフェラーゼレポーターアッセイにより解析している。

bhlh, iron homeostasis, transcription factor

講演番号：1E7p11
講演日時：3 月 24 日 16:00～ 1 号館 E7 会場

熱ショック蛋白質 70 阻害剤によるシロイヌナズナの熱ショック応答の誘導
Induction of the heat shock response in Arabidopsis by heat shock protein 70 inhibitor

松岡 恵里奈[2]、○原 正和[1,2] ([1]静岡大グリーン研、[2]静岡大院)
Erina Matsuoka[2], ○Masakazu Hara[1,2] ([1]Shizuoka Univ. RIGST, [2]Shizuoka Univ.)

【はじめに】気候変動による夏季の異常高温は、農業に悪影響を及ぼしている。植物の高温障害を緩和すべく、環境制御型施設園芸や暑熱性育種が行われているが、コストや育種効率の点で課題が残る。一方、これらの補完技術として、熱耐性向上物質（heat tolerance enhancers, HTLEs）が研究されている。HTLEs の中には、植物の熱ショック蛋白質（HSP）の発現を誘導するものがある。シロイヌナズナの熱ショック応答（HSR）を誘発するゲルダナマイシンは、HSP90 の特異的阻害剤であり、また、様々な HSP90 阻害剤が HSR を誘導したことから、HSP90 等のシャペロンの阻害が HSR を誘導すると考えられる。しかし、HSP90 以外のシャペロンの阻害と HSR との関連を研究した例はない。近年、HSP70 阻害剤が複数開発された。そこで、本研究では、HSP70 阻害剤がシロイヌナズナの HSR を誘導するか否かを検証した。合わせて、既存の熱耐性向上剤であるサンギナリンが HSP70 活性に及ぼす影響を調査した。

【方法】既存の HTLEs によって顕著に発現が誘導する *HSP17.6C-CI* 遺伝子のプロモーターを使い、シロイヌナズナの GUS レポーターアッセイ系を構築した。HSP70 阻害剤には、作用点が異なる 4 種の物質（VER-155008、YM-08、pifithrin-μ、116-9e）を用いた。熱耐性の向上は、熱処理後に栽培した後の新鮮重量とクロロフィル含量によって評価した。シャペロン阻害活性は、コムギ胚芽抽出物とヒト HSP70 を使用した。

【結果と考察】4 種の HSP70 阻害剤のうち、VER-155008 のみが *HSP17.6C-CI* 遺伝子プロモーターを活性化した。作用濃度は 50-1,000 μM であった。VER-155008 は、シロイヌナズナにおいて、HSP17.6C-CI のほか、HSP70、HSP90 の発現を蛋白質レベルで増加させた。あらかじめシロイヌナズナに VER-155008 を与えたところ、熱処理によるクロロフィル含量の減少が抑制された。VER-155008 は、コムギ胚芽抽出物のシャペロン活性とヒトの HSP70 活性を阻害した。過去の研究で、コムギ胚芽抽出物のシャペロン活性を阻害したサンギナリンは、ヒト HSP70 活性もまた阻害した。以上の結果、植物の HSP70 を阻害すると HSR が起こる可能性が示唆された。さらに、サンギナリンは、植物のシャペロンを阻害するが、そのターゲットは HSP70 であると考えられた。最後に、VER-155008 の作用機構について考察する。

heat shock response, heat shock protein 70 inhibitor, Arabidopsis

講演番号：1E7p12
講演日時：3 月 24 日 16:11～ 1 号館 E7 会場

1,4-ナフトキノン誘導体によるシロイヌナズナの熱ショック応答誘導

Induction of the heat shock response in Arabidopsis by 1,4-naphthoquinone derivatives

○加藤 直樹[1,2]、松岡 恵里奈[3]、橋本 佳尚[3]、原 正和[1,4] ([1]静岡大創造、[2]株式会社メニコン、[3]静岡大、[4]静岡大グリーン研)
○Naoki KATO[1,2], Erina MATSUOKA[3], Yoshihisa HASHIMOTO[3], Masakazu HARA[1,4] ([1]Shizuoka Univ. GSST, [2]Menicon Co., Ltd., [3]Shizuoka Univ., [4]Shizuoka Univ. RIGST)

【はじめに】
近年、地球温暖化が原因と考えられる熱波が国内外で頻発し、農作物の収量と品質を低下させている。国内では、イネの白未熟粒、果実の色落ち、野菜の葉枯れなどが問題となっている。当研究室では、熱ショック応答を指標とし植物熱耐性向上剤のスクリーニングを行ってきた。その結果、1,4-ナフトキノンとその誘導体が熱ショック応答を誘導することを発見した。

【結果と考察】
熱応答性熱ショックタンパク質プロモーターの下流にレポーター遺伝子（β-グルクロニダーゼ,GUS）を導入した形質転換シロイヌナズナを使用して 1,4-ナフトキノンとその誘導体（9 種）の熱ショック応答誘導活性を調べた。その結果、1,4-ナフトキノンは陽性対照であるゲルダナマイシンと同等の誘導活性であった。また、塩化 1,4-ナフトキノン、すなわち 2,3-ジクロロ-1,4-ナフトキノンと 2,3-ジクロロ-5,8-ジヒドロキシ-1,4-ナフトキノンは、1,4-ナフトキノンの 5～6 倍の誘導活性を有することが分かった。
2,3-ジクロロ-5,8-ジヒドロキシ-1,4-ナフトキノンをシロイヌナズナに作用させると、HSP17.6C-CI および HSP90.1 の遺伝子発現が高まるとともにタンパク質生成もまた増加した。さらに、シロイヌナズナに 2,3-ジクロロ-5,8-ジヒドロキシ-1,4-ナフトキノンを作用させて熱処理を行うと、新鮮重量およびクロロフィル含量の減少を有意に改善した。これらの結果は、塩化 1,4-ナフトキノンが、植物の耐熱性を高めることができる強力な熱ショック応答誘導物質であることを示唆している。

heat shock response, 1,4-naphthoquinone

講演番号：1E7p13
講演日時：3 月 24 日 16:22～ 1 号館 E7 会場

好熱菌発酵産物を施用した人参の機能性と生産性に関わる根圏微生物群集のオミクス解析
Omics analyses of the rhizobacteria with relation to the fecundity and function of carrot amended with thermophile-fermented compost.

○松浦 真紀子[1,2]、守屋 繁春[3]、坪井 亜里沙[2,3]、青野 昌彦[4]、富永 直樹[4]、西郡 湧人[4]、志茂 恵理子[4]、石井 千歳[2]、中熊 照乃[2]、児玉 浩明[1]、澤田 有司[3]、平井 優美[3]、宮本 浩邦[1,2,5]、茂田 勝美[4]([1]千葉大園芸、[2]（株）サーマス、[3]理研 CSRS、[4]タキイ種苗（株）、[5]理研 IMS)
○Makiko MATSUURA[1,2], Shigeharu MORIYA[3], Arisa TSUBOI[2,3], Masahiko AONO[4], Naoki TOMINAGA[4], Wakito NISHIGORI[4], Eriko SHIMO[4], Chitose ISHII[2], Teruno NAKAGUMA[2], Hiroaki KODAMA[1], Yuji SAWADA[3], Yumi HIRAI[3], Hirokuni MIYAMOTO[1,2,5], Katsumi SHIGETA[4] ([1]Hort., Chiba Univ., [2]Sermas Co., Ltd., [3]RIKEN,CSRS, [4]Takii seed Co., Ltd., [5]RIKEN,IMS)

好熱菌*Bacillaceae*によって海産資源を高温発酵した産物を栽培土壌に添加すると、土壌の微生物叢が変化し、葉菜類の植物体内の窒素化合物の代謝、並びに生体防御関連遺伝子の発現を制御する傾向がある（*Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97:1349-1359, 2013、日本農芸化学会報告等)。昨年の本学会では、根菜類のモデルとして抗酸化活性の高い機能性ニンジン(タキイ種苗ファイトリッチシリーズ・京くれない)を用いて、当該発酵産物が生産性と機能性に与える影響について報告した。慣行区に対して試験区では、収穫根重の増加傾向が確認され、相関ネットワーク解析などによって一部のアミノ酸、カロテノイド、並びにポリフェノールの一種であるフラボノイドの増加傾向が明らかになった。次世代シーケンサーによる土壌微生物群の菌叢解析の結果、存在比率として5%以上の門レベルで比較すると、ProteobacteriaとFirmicutesにおいてそれぞれ顕著な変化が確認された（$p<0.05$;$p<0.1$）。Proteobacteriaでは、特にAlphaproteobacteriaとBetaproteobacteriaにおいて減少傾向が確認され($p<0.1$;$p=0.12$)、他のProteobacteriaの変化は少なかったが、種レベルでは、Gammaproteobacteria目の*Candidatus Thiobios zoothamnicoli*の近縁種(identity=87.3%)、並びに*Panacagrimonas perspica*の近縁種(identity=98.9%)で増加傾向が確認された($p<0.05$)。また、Firmicutes門の*Paenibacillus*属にも増加傾向があり($p<0.1$)、多様性も同時に認められ、*P. curdlanolyticus*の近縁種や*P. kobensis*の近縁種などが検出された。以上の結果から、好熱菌発酵産物は、ニンジンに対しても根圏微生物群集を変動した上で、作物の生産性と機能性を制御する可能性があることが示唆された。

compost, carrot, omics analysis

発表責任者：松浦真紀子（m-matsuura@sermas.co.jp）

講演番号：1E7p14
講演日時：3 月 24 日 16:33～ 1 号館 E7 会場

土壌肥沃度指標(SOFIX)に基づく薬用植物栽培土壌の環境解析

Environmental analysis of medicinal plants cultivated soil on SOFIX

○森谷 政孝[1]、原田 栞[1]、荒木 希和子[2]、久保 幹[2] ([1]立命大院生命、[2]立命大生命)
○Masataka MORIYA[1], Shiori HARADA[1], Kiwako ARAKI[2], Motoki KUBO[2] ([1]Ritsumeikan Univ., [2]Ritsumeikan Univ.of life science)

【背景・目的】　連作とは同じ作物を同じ耕地に繰り返し栽培することであり、連作により生育や収量が次第に低下する連作障害の発生がしばしば見られる。特に地下部を生薬など薬として利用する薬用植物では、経年栽培によって生育不良が見られる。これは、薬用植物の栄養吸収による土壌成分の偏りや、根から漏出する薬効成分によって土壌の菌叢変化が生じることにより、連作障害が生じていると言われている。

本研究では、土壌肥沃度指標 SOFIX に基づいて、土壌中の環境を分析し、土壌の物理性、化学性のほかに生物性を評価することで、薬用植物栽培による土壌環境の変化を調べた。薬用植物の栽培に伴う細菌叢の変化が連作障害を助長させると考え、土壌中の総細菌数および細菌叢についても着目した。さらに、土壌細菌の挙動は土壌成分の影響を受けるため、施肥条件による土壌中の土壌成分、細菌数の変化の違いおよび細菌叢変化による植物へ影響を明らかにすることを目的とした。

【方法】トウキを栽培した連作 1 年目、連作障害が生じた 3 年目の栽培土壌の 2 圃場から土壌を採取し、総細菌数の測定と PCR-DGGE 分析を行った。また、栽培条件によるトウキの生育の違いを見るために、有機施肥、化学施肥、2 つの混合施肥の土壌条件(3 つ)及び、連作年数 4 年、6 年目の 8 つの土壌を 4 月～12 月まで 2 か月に 1 度サンプリングを行い SOFIX に基づき分析を行った。

【結果・考察】　トウキ栽培土壌の総細菌数は、連作障害の有無によって違いが見られた。また PCR-DGGE 分析の結果を比較した際に、バンドパターンに違いが確認された。連作障害が生じた土壌では、特徴的なバンドが認められた。この事から、連作障害の発生の原因がこのような菌叢の偏りによるものだと考えられた。また、栽培条件によって、植物の生育に違いが生じていた。連作年数 6 年目の土壌では、有機肥料と化学肥料を加えた混合施肥の系で特に葉の成長が見られた。一方で、連作年数 4 年目の土壌では、化学肥料のみの系で葉の生育が劣り、その他の系では同様の生育が見られた。すべての条件で生育をするごとに土壌の有機物量は減少し、土壌中の総細菌数は減少する傾向を確認することができた。このことから、化学施肥を行った土壌では、連作年数が少なくても生育不良が生じやすいことが考えられた。

soil bacteria, medicinal plant, Continuous cropping

講演番号：3B1a01
講演日時：3 月 26 日 09:00～ 1 号館 B1 会場

メタボローム解析を用いた活性ベース代謝物プロファイリング法の構築及びトマトに含まれるアディポネクチン様活性化合物の探索

The construction of Activity-Based Metabolite Profiling using metabolomics and screening for adiponectin-like compounds in tomato.

○毛利 晋輔[1]、高橋 春弥[1]、坂井 麻衣子[1]、高橋 慎吾[2]、脇 尚子[2]、相澤 宏一[2]、菅沼 大行[2]、荒武[1]、松村 康生[1]、柴田 大輔[1]、後藤 剛[1]、河田 照雄[1] ([1]京大院農、[2]カゴメ・イノベーション本部)
○Shinsuke Mohri[1], Haruya Takahashi[1], Maiko Sakai[1], Shingo Takahashi[2], Naoko Waki[2], Koichi Aizawa[2], Hiroyuki Suganuma[2], Takeshi Ara[1], Yasuki Matsumura[1], Daisuke Shibata[1], Tsuyoshi Goto[1], Teruo Kawada[1] ([1]Agric., Kyoto Univ., [2]Innovation Division, KAGOME CO., LTD.,)

【目的】アディポネクチンは、アディポネクチン受容体 (AdipoR) を介した AMPK リン酸化の亢進等により、血糖値の改善に寄与するアディポサイトカインであるが、肥満に伴う血中濃度の低下が報告されている。そのため、アディポネクチン様活性化合物として機能し得る食品成分の探索は、肥満に関連する糖代謝異常改善の一助となることが期待される。一方、メタボローム解析は、一度の分析で高精度・高感度に、サンプルに含まれる成分の網羅的な分析が可能な手法である。近年、本手法は、病態に関連するバイオマーカーの探索を中心に、様々な分野で応用されている。しかしながら、これまでの研究では、サンプル間の差分解析による量的変動を指標とした、間接的な活性推定から目的化合物を探索することが主流であった。本研究では、量的変動に依存せず、メタボローム解析で得られた網羅的な成分の活性を直接見積もることが可能な新規研究法の構築とその利用を試みた。構築した研究法を、活性ベース代謝物プロファイリング (Activity-Based Metabolite Profiling, ABMP) と命名し、当該方法を用いて、世界で最も消費量の多い野菜であるトマトに含まれる成分の網羅的な機能評価及びアディポネクチン様活性化合物の探索・同定を行った。

【方法】トマト抽出物のメタボローム解析により、含有される成分の網羅的解析を行った。メタボローム解析と同一の分析条件下、トマト抽出物の HPLC 精製を行い、取得した画分における AMPK リン酸化レベルを評価した。AMPK リン酸化の亢進が認められた画分において、*AdipoR1* siRNA による AMPK リン酸化レベルの抑制を評価し、アディポネクチン様活性について検討した。得られた網羅的な成分情報と画分の活性について、溶出時間を基準とした紐づけを行い、トマトに含まれる成分の網羅的な機能評価を試みた。また、含有成分の機能全体像解明とともに、特に有望なアディポネクチン様活性化合物を探索・同定し、同定化合物における AdipoR 下流シグナルについて詳細に検討した。

【結果】ABMP の利用により、トマトに含まれる成分の機能全体像を解明するとともに、アディポネクチン様活性化合物として複数のカロテノイドを同定した。同定カロテノイドは、AdipoR 下流シグナルとして AMPK のリン酸化レベルを亢進し、この亢進は *AdipoR1* siRNA 処理、Ca^{2+}キレート及び CaMKK 阻害剤処理により抑制された。また、ACC, p38 リン酸化レベル及び糖取り込み能も亢進させた。ABMP の構築は、量的変動に依らず活性をベースとして、成分の網羅的な機能評価を可能とした。

metabolomics, tomato, adiponectin

講演番号：3B1a02
講演日時：3 月 26 日 09:11～ 1 号館 B1 会場

Bifidobacterium animalis subsp. *lactis* GCL2505 株は短鎖脂肪酸受容体 GPR43 を介して宿主のエネルギー代謝を調節する
Bifidobacterium animalis subsp. *lactis* GCL2505 controls host energy metabolism via the short-chain fatty acid receptor GPR43
○堀内 寛子[1]、上門 弘平[1]、青木 亮[1]、菅沼 名津季[1]、西嶋 智彦[1]、中谷 明穂[2]、木村 郁夫[2]([1]江崎グリコ（株）健康科学研究所、[2]東京農工大学農学研究院)
○Hiroko HORIUCHI[1], Kohei KAMIKADO[1], Ryo AOKI[1], Natsuki SUGANUMA[1], Tomohiko NISHIJIMA[1], Akiho NAKATANI[2], Ikuo KIMURA[2] ([1]Ezaki Glico Co., Ltd. Institute of Health Sciences, [2]Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

【目的】我々はこれまで、腸管増殖性を有するビフィズス菌株*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* GCL2505株（GCL2505）が高脂肪食負荷型肥満マウスにおいて盲腸内短鎖脂肪酸量を増加させ、肥満および耐糖能を改善することを明らかにした。短鎖脂肪酸の一つである酢酸は体内のエネルギー恒常性の維持に働くGタンパク質共役受容体（GPR）43を活性化することが知られている。本研究では、GPR43ノックアウトマウスを用いて、GCL2505による宿主エネルギー代謝調節および抗メタボリックシンドローム作用へのGPR43の関与を検討した。

【方法】5週齢の雄性C57BL/6JSlc野生型（Wt）とGPR43ノックアウト（GPR43KO）マウスに対し、高脂肪食（HFD: 45kcal% Fat）を負荷して肥満を誘導した。HFD負荷開始2週間後より、生理食塩水に懸濁したGCL2505（10^9 CFU/day）を8週間連日経口投与した（GCL2505群）。同量の生理食塩水を投与した群をControl群とした。経口糖負荷試験、インスリン負荷試験、腹部CTスキャンによる脂肪蓄積量測定、^{13}C標識脂肪酸呼気ガス試験による脂肪酸代謝評価を実施した。さらに、インスリン腹腔内投与5分後に精巣上体周囲脂肪、筋肉、肝臓を採取し、Aktリン酸化レベルを評価した。（実施機関の動物実験委員会審議と同機関の長の承認を得て2015-17年度に実施）

【結果と考察】Wtマウスにおいて、Wt-Control群と比較してWt-GCL2505群で体重増加量の減少、耐糖能とインスリン抵抗性の改善がみられた。また、Wt-GCL2505群の脂肪組織でインスリン誘導性のAktリン酸化がWt-Control群と比較して抑制された一方で、筋肉では促進された。さらに、Wt-GCL2505群はWt-Control群と比較して、皮下・内臓脂肪蓄積量の減少と、呼気ガス試験における脂肪酸代謝の亢進が見られた。一方、GPR43KOマウスでは、KO-Control群とKO-GCL2505群との間の上記の差は見られなかった。なお、盲腸内酢酸濃度と*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*菌数、および、血中酢酸濃度は、WtおよびGPR43KOどちらにおいてもControl群と比較してGCL2505群で有意に高かった。以上の結果から、GCL2505の抗メタボリックシンドローム作用は酢酸をリガンドするGPR43を介した作用であることが明らかになった。GCL2505は、脂肪組織および筋肉のインスリンシグナルを調節することで、宿主のエネルギー代謝機能（糖代謝や脂肪酸代謝）を調整し、最終的に内臓脂肪の蓄積抑制作用を示すと考えられた。

bifidobacteria, short-chain fatty acids, GPR43

講演番号：3B1a03
講演日時：3 月 26 日 09:22～ 1 号館 B1 会場

フルクトースは皮下脂肪組織の脂肪分化を抑制するが炎症を惹起する
Fructose inhibits adipogenic differentiation of subcutaneous adipose tissue but causes inflammation
○山口 貴史、江藤 望、服部 秀美（宮崎大院農）
○Takafumi YAMAGUCHI, Nozomu ETO, Hidemi HATTORI (Miyazaki Univ.)

【目的】フルクトースは果糖ブドウ糖液糖として清涼飲料水や加工食品中に多く含まれており、その過剰摂取と生活習慣病との関係性について問題になっている。フルクトースは内臓脂肪の蓄積を促進し、慢性炎症や肥満、糖尿病を誘発すると報告されている。しかし、内臓脂肪だけでなく皮下脂肪も糖尿病の発症に関与するといわれているものの、皮下脂肪組織に対するフルクトースの影響についての研究報告は少ない。さらに、2 型糖尿病患者は血中のグルコース濃度だけでなく血中フルクトースの濃度も高いことが報告されている。そこで本研究は、マウスの皮下脂肪組織由来間質細胞(ASCs)を用いて、フルクトースによる脂肪分化及び炎症に対する影響を高濃度のグルコース存在下で検討した。
【材料および方法】C57BL/6N マウスの鼠径部にある皮下脂肪組織から単離した ASCs を、フルクトースの濃度が異なる高濃度のグルコース含有脂肪細胞分化誘導培地を用いて分化させた。分化誘導 7 日目の脂肪分化マーカー(*LPL, C/EBPα, PPARγ2, adiponectin*)とグルコーストランスポーター(*GLUT1, 4*)の mRNA 発現量を RT-qPCR により測定した。さらに、異なるフルクトース濃度の条件下で ASCs と脂肪細胞の ^{14}C-グルコースの取り込み量を液体シンチレーションカウンターにより定量した。また、培養上清中のケモカイン(CCL2, CXCL1)の量を ELISA により測定した。
【結果】ASCs の脂肪分化への影響を mRNA 発現レベルで調べたところ、フルクトースの存在下において、脂肪分化マーカーである *LPL, C/EBPα, PPARγ2, adiponectin* の発現量が減少した。また、糖の取り込み能の影響を調べるために、*GLUTs* の mRNA 発現量及び ^{14}C-グルコースの取り込み量を比較した。その結果、フルクトースの存在下において、グルコース輸送を行う *GLUT4* の発現量が減少したが、ASCs と脂肪細胞のグルコースの取り込み量には変化が見られなかった。さらに、フルクトースと炎症との関連性を明らかにするためにケモカインの分泌能を測定したところ、フルクトースの存在によって CCL2, CXCL1 の分泌量が増加した。
【考察】フルクトースは皮下の ASCs に対して脂肪分化を促進させる作用はなく、逆に抑制作用を有することが明らかとなった。この抑制作用は、グルコースの細胞内への輸送量が低下したことによるものでなく、細胞内に取り込まれたフルクトースが、脂肪分化のプロセスを阻害したからではないかと考えられた。また、フルクトースが炎症を惹起させる可能性があることから、2 型糖尿病患者にとってフルクトースの過剰摂取は、皮下脂肪組織を肥大しないものの慢性炎症誘発の原因になっているのではないかと示唆された。

Fructose, Subcutaneous adipose tissue-derived stromal cells, Type 2 diabetes

発表責任者：服部秀美（h-hattori@cc.miyazaki-u.ac.jp）

講演番号：3B1a04
講演日時：3 月 26 日 09:33～ 1 号館 B1 会場

α-グルコシルヘスペリジンによる褐色脂肪細胞化誘導と体脂肪蓄積抑制
Induction of brown-like adipocyte formation and increase in white adipose tissue temperature by α-glucosyl hesperidin

○兵頭 拓真[1]、西川 翔[1]、長尾 つばさ[1]、中西 章仁[2]、タンジャ マハマドゥ[2]、津田 孝範[1]([1]中部大学・応生、[2]東洋精糖（株））
○ Takuma HYODO[1], Syou NISHIKAWA[1], Tsubasa NAGAO[1], Yasuhito NAKANISHI[2], Mahamadou TANDIA[2], Takanori TSUDA[1] ([1]Chubu Univ., [2]Toyo Sugar Refining Co., Ltd.)

【目的】寒冷刺激などの種々の環境条件により白色脂肪組織において「誘導型」褐色脂肪細胞が増加し（褐色脂肪細胞化）、熱産生によるエネルギー消費が増加することで体脂肪蓄積が抑制することが明らかになっている。これまでに演者らは、褐色脂肪細胞化を誘導する食品由来因子とその作用機序を解明し報告している [1, 2]。ヘスペリジン（HES）は柑橘類に含まれるフラボノイドであるが、水に難溶で生体内吸収性が低い。このため、HES にグルコースを転移させて水溶解性と生体内吸収性を高めた α－グルコシルヘスペリジン（αGH）が開発され活用されつつある。本研究では、αGH の新たな機能として褐色脂肪細胞化の誘導と脂肪組織での組織温の上昇を検証することを目的とした。

【方法】C57BL/6J マウスに αGH を添加した飼料を 4 週間摂取させ、鼠蹊部白色脂肪組織、精巣上体白色脂肪組織、肩甲骨間褐色脂肪組織を採取した。これらの組織について褐色脂肪細胞化に伴う形態変化を H&E 染色で観察し、褐色脂肪細胞化マーカーである UCP1 タンパク質発現をウェスタンブロッティング及び免疫染色により評価した。また、この時の直腸温及び脂肪組織（褐色脂肪組織，鼠蹊部白色脂肪組織）の組織温をデジタル温度計と温度プローブを用いて経時的に測定した。

【結果】αGH 摂取群ではコントロール群と比較して白色脂肪組織重量は有意に低下した。鼠蹊部白色脂肪組織において褐色脂肪細胞化で観察される多房化形成や UCP1 陽性の細胞が認められ、UCP1 タンパク質の発現量は有意に上昇した。しかし精巣上体白色脂肪組織では αGH による褐色脂肪細胞化誘導は認められず、肩甲骨間褐色脂肪組織においても染色像や UCP1 タンパク質発現量に差は認められなかった。一方 HES の摂取は褐色脂肪細胞化を誘導しなかった。さらに、αGH 摂取群では直腸温及び褐色脂肪組織温度に有意な変化は見られないが、褐色脂肪細胞化が誘導された鼠径部白色脂肪組織において有意な組織温の上昇が認められた。現在、引き続き褐色脂肪細胞化誘導の認められた白色脂肪組織での組織温上昇のメカニズムについて検討している。

1. *PLoS ONE* (2016) 11: e0162512.
2. *Mol. Nutr. Food Res.* (2018) 62:1700731.

α-glucosyl hesperidin, brown-like adipocyte, UCP1

講演番号：3B1a05
講演日時：3 月 26 日 09:44～ 1 号館 B1 会場

プロポリス成分による褐色脂肪細胞化と組織温度上昇機構の解明

Propolis-derived component induces the formation of brown-like adipocyte and thermogenesis in inguinal adipose tissue of mice

○西川 翔[1]、兵頭 拓真[1]、青山 広樹[1]、神谷 美沙[1]、宮田 椋[2]、吉村 一輝[2]、熊澤 茂則[2]、津田 孝範[1] ([1]中部大・応生、[2]静岡県大・食品栄養)
○Sho NISHIKAWA[1], Takuma HYODO[1], Hiroki AOYAMA[1], Misa KAMIYA[1], Ryo MIYATA[2], Kazuki YOSHIMURA[2], Shigenori KUMAZAWA[2], Takanori TSUDA[1] ([1]Chubu Univ., [2]Univ. of Shizuoka)

【目的】

白色脂肪組織における「誘導型」褐色脂肪細胞の増加（褐色脂肪細胞化の誘導）は、熱産生によるエネルギー消費を亢進し体脂肪を減少させることが明らかにされている。これまでに演者らは、褐色脂肪細胞化を誘導する食品由来因子とその作用機構を検討し、高水分散性・高生体内吸収性クルクミンの作用を報告した[1)]。クルクミン以外の成分としては、ブラジル産プロポリスの主要成分である Artepillin C（ArtC）についても同様の検討を行っている。これまでの結果から、ArtC は褐色脂肪細胞化を誘導すること、その誘導機構には、ArtC が PPARγのアゴニストとして作用し、褐色脂肪細胞化誘導に必須の因子である PRDM16 タンパク質の分解抑制が関与することを明らかにしている[2)]。この成果を踏まえて本研究では、ArtC 投与による褐色脂肪細胞化の誘導時における組織温上昇とその機構を明らかにすることを目的とした。

【方法】

C57BL/6J マウスに ArtC を①単回経口投与、②持続的に経口投与（4 週間）し、直腸及び脂肪組織（褐色脂肪組織，鼠蹊部白色脂肪組織）温度をデジタル温度計と温度プローブを用いて投与 1 時間後まで継続的に測定した。さらに②において、組織温上昇の機構として、Beige 脂肪細胞で認められる creatine futile cycle を介した組織温上昇の関与を検討した。

【結果】

マウスに ArtC を単回経口投与した場合は、直腸及びいずれの脂肪組織温度にも温度変化は認められなかった。一方、ArtC の持続的な投与では、褐色脂肪細胞化誘導が認められた鼠蹊部白色脂肪組織において有意な組織温度の上昇が認められた。さらに、ArtC を持続投与したマウスにおいては、creatine futile cycle の阻害により鼠径部白色脂肪組織での温度上昇が有意に抑制された。以上のことから、ArtC 投与による褐色脂肪細胞化誘導は白色脂肪組織温度の上昇を伴い、creatine futile cycle の関与が考えられた。現在、引き続き詳細な検討を進めている。

1) *Mol. Nutr. Food Res.* (2018) 62:1700731.
2) *PLoS ONE* (2016) 11: e0162512.

Propolis, Brown-like adipocyte formation, Thermogenesis

講演番号：3B1a06
講演日時：3 月 26 日 10:05～ 1 号館 B1 会場

肝細胞の脂肪蓄積抑制作用を有する脂肪酸アミド化合物のスクリーニングとその作用機構の解明
Screening of fatty acid amides for prevention of lipid accumulation in hepatocytes

○上久保 綾祐[1]、板倉 正典[1]、佐々木 栄太[1]、柴田 貴広[2]、赤川 貢[3]、内田 浩二[1] ([1]東大院・農生科、[2]名大院・生命農、[3]阪府大院・生環科)
○Ryosuke KAMIKUBO[1], Masanori ITAKURA[1], Eita SASAKI[1], Takahiro SHIBATA[2], Mitsugu AKAGAWA[3], Koji UCHIDA[1] ([1]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., The Univ. of Tokyo, [2]Grad. Sch. of Bioagric. Sci., Nagoya Univ., [3]Grad. Sch. of Life and Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)

【背景・目的】

肥満やメタボリックシンドロームの増加が先進諸国において深刻な問題となるとともに、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) と呼ばれるアルコール常飲歴のない脂肪肝患者も増加している。NAFLD は自覚症状がなく、酸化ストレスなどの影響によって非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) や、肝硬変、肝癌へと増悪する可能性があるものの、現在までに NAFLD に対する有効な治療法は確立されておらず、食事の改善や運動によって肥満を解消することが唯一かつ根本的な治療法である。一方で、香辛料の一種であるクローブに多く含まれる β-カリオフィレンは、カンナビノイド受容体２ (CB2) を介して、培養肝細胞の脂肪蓄積を抑制することをこれまでに報告した (Kamikubo *et al.*, *Mol. Nutr. Food Res.*, 2016) 。本研究では、カンナビノイド受容体の内因性リガンドの多くが脂肪酸アミド化合物であることに着想し、肝細胞の脂肪蓄積を抑制する脂肪酸アミド化合物をスクリーニングし、その作用機序を解明することを目的とした。

【方法・結果】

ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 細胞を 0.5 mM パルミチン酸含有 DMEM 及び脂肪酸アミド化合物 (終濃度 10 μM) で 24 時間培養後、蓄積した脂肪を Oil Red O で染色し、その定量を行った。その結果、CB1 受容体のアゴニストとして知られるオレアミドが脂肪蓄積抑制効果を有し、その効果は濃度依存的であることが判明した。そこで、CB1 受容体をはじめとするオレアミドの既知受容体の阻害剤を用い、各受容体の関与を検討した。しかし、オレアミドによる脂肪蓄積抑制効果は、阻害剤の存在下でも打ち消されなかったことから、オレアミドは新規作用点に作用して脂肪蓄積を抑制することが示唆された。一方で、肝細胞で脂質代謝を司る AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) のリン酸化はオレアミド処理では亢進せず、CB2 受容体のアンタゴニストである AM630 との共処理でも脂肪蓄積抑制効果が打ち消されなかったことから、オレアミドは CB2/AMPK 以外の経路で脂肪蓄積抑制効果を発揮することが判明した。また、オレアミドを単独で処理した場合では、細胞内の脂肪蓄積量に変化は認められなかったことから、オレアミドは中性脂肪の分解の促進や合成の抑制ではなく、脂肪酸の細胞内取り込みを抑制する可能性が示された。現在は、長鎖脂肪酸の細胞内取り込みに関与する脂肪酸転移酵素に着目して研究を進めている。

NAFLD, oleamide, lipid accumulation

発表責任者：内田浩二（a-uchida@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3B1a07
講演日時：3 月 26 日 10:16～ 1 号館 B1 会場

ユズ果皮エタノール抽出物がクロレトン誘発肝障害モデルラットに与える影響

Effects of ethanol extract from citrus-yuzu peel on hepatopathy induced by chloretone

○平川 えりか[1]、鈴木 絢子[2]、信岡 かおる[1,2]、望月 聡[3]、石川 雄一[1,2] ([1]大分大院工、[2]大分大理工、[3]大分大教育)
○ Erika HIRAKAWA[1], Ayako SUZUKI[2], Kaoru NOBUOKA[1,2], Satoshi MOCHIZUKI[3], Yuichi ISHIKAWA[1,2] ([1]Grad. Sch. Eng., Oita Univ., [2]Sci. Tech., Oita Univ., [3]Edu., Oita Univ)

我々は、ユズ果皮エタノール抽出物が、高ショ糖食誘発脂肪肝モデルラットにおいて、脂肪肝抑制作用を示すことを明らかにし、その抑制成分の一つとして *myo*-イノシトールを見出した。非アルコール性脂肪肝の発症には様々な要因があり、ショ糖の過剰摂取のほか、生体異物による代謝変動によって、脂肪肝やさらに進行した状態である肝炎を引き起こす。そこで本研究では、生体異物の一種であるクロレトン(1,1,1-Trichloro-2-methyl-2-propanol)を添加した飼料を与えたクロレトン誘発肝障害モデルラットを用いて、ユズ果皮エタノール抽出物中に含まれる非アルコール性肝障害を抑制する新たな機能性化合物を探索することを目的として実験を行った。

５週齢の Wistar 系雄性ラットに、クロレトンを添加した飼料およびクロレトンとともに種々の画分を添加した飼料を 14 日間自由摂取させた。飼育最終日に血液と肝臓を採取し、血清生化学検査と脂質の分析を行った。

ユズ果皮エタノール抽出物を２wt%添加した飼料を与えたところ、肝障害の抑制作用が認められ、クロレトン誘発性肝障害においても、ユズ果皮中に有効成分が存在することが示唆された。そこで、ユズ果皮エタノール抽出物を水とクロロホルムで分画し、それらの効果を比較検討した。ユズ果皮エタノール抽出物２wt%相当の水溶性画分を添加した飼料の投与により肝障害抑制作用が認められた。一方、$CHCl_3$抽出画分においては、２wt%ユズ果皮エタノール抽出物相当量が水溶性画分の１／10 程度の量にも関わらず、肝障害抑制傾向が認められた。そこで $CHCl_3$ 抽出画分に着目し、投与量を増加することで効果の程度を検討した。その結果、ユズ果皮エタノール抽出物２wt%相当量の５倍量の $CHCl_3$ 抽出画分の投与によって、有意な肝障害抑制作用が認められた。$CHCl_3$画分を、トルエンに溶解する疎水性画分と、メタノールに溶解する両親媒性画分に分画し、更に検討を行った。その結果、$CHCl_3$画分５倍量中の両親媒性画分の投与によって、肝障害抑制作用が認められた。これらの結果から、両親媒性画分にクロレトン誘発肝障害を抑制する成分が含まれることが考えられた。既知成分である *myo*-イノシトールの各画分中含有量を定量したところ、$CHCl_3$および両親媒性画分の抑制作用に、*myo*-イノシトールは関与していないものと考えられた。現在、両親媒性画分中に存在する有効成分の成分分析を試みている。また、GC-MS/MS によるラットの肝臓代謝物測定により、抑制経路の解明に取り組んでいる。

hepatopathy, citrus-yuzu peel extract, functional ingredients

講演番号：3B1a08
講演日時：3 月 26 日 10:27～ 1 号館 B1 会場

クルクミンが Trp-NAD 経路における鍵酵素 ACMSD に及ぼす影響
Effects of curcumin on α-amino-β-carboxymuconate-ε-semialdehyde decarboxylase, a key enzyme in the tryptophan-NAD pathway
○髙橋 彩夏[1]、松田 寛子[1,2]、坂田 菜摘[1]、松本 奈々[3]、江頭 祐嘉合[3]([1]東京海洋大サラダサイエンス、[2]日本獣医生命科学大応生、[3]千葉大応生)
○Ayaka TAKAHASHI[1], Hiroko MATSUDA[1,2], Natsumi SAKATA[1], Nana MATSUMOTO[3], Yukari EGASHIRA[3] ([1]Tokyo Univ. of Marine Science and Technology, [2]Nippon Veterinary and Life Science Univ., [3]Chiba Univ.)

【背景・目的】
疎水性ポリフェノールの一種であるクルクミン（Cur）は、ウコン根茎に存在する黄色色素であり、多くの機能性が報告されている。
一方、α-アミノ-β-カルボキシムコン酸-ε-セミアルデヒドデカルボキシラーゼ（ACMSD）は、肝臓のトリプトファン（Trp）-ナイアシン（NAD）経路おける NAD 生成に対する鍵酵素である。その活性調節機構には未だ不明な点が多いが、既往の研究から、Cur の影響を受ける AMP 活性化キナーゼ(AMPK)やペルオキシソーム増殖剤応答性受容体-α（PPARα）さらにはプロテインキナーゼ B（AKT）が関与している可能性は高いと考えられる。
そこで本研究では、Cur が Trp-NAD 経路における ACMSD 活性に与える影響と、その作用機序の解明を目的とし、マウスおよび初代肝実質培養細胞を用いて検討した。
【方法】
6 週齢 ICR 雄マウスを 3 日間環境順化させた後、コントロール食群（C 群）、0.05% Cur 食群（L 群）、0.15% Cur 食群（H 群）の 3 群（*n*=6）に分け、各飼料を 6 日間自由摂取させた。飼育終了後は、肝臓と腎臓さらには血液から血漿を得た。その後、組織においては ACMSD 活性およびタンパク質・mRNA 発現を解析した。また、ACMSD 活性調節への関連因子として、AMPK・AKT・PPARα などの活性についても解析した。さらには、血漿中のクエン酸濃度を測定した。
35～40g の ICR 雄マウスからコラゲナーゼ灌流法にて、初代肝実質細胞を単離した。5 時間 20%FBS 含有 DMEM で前培養し、FBE Free DMEM に Cur 0.1～5uM となるような培地に換え、24 時間本培養した。その後、肝細胞を回収し、各因子のタンパク質・mRNA 発現を解析した。
【結果・考察】
Cur 摂食により、肝臓中 ACMSD の活性は有意に抑制されたが、タンパク質は上昇傾向にあり、さらに mRNA 発現は変化しなかった。一方、Cur 添加による肝実質細胞中の ACMSD タンパク発現は、*in vivo* の検討と同様に上昇傾向を示した。これにより、Cur は ACMSD タンパク質の発現を上昇させる一方で、何らかの作用機序により ACMSD 活性を抑制することが示唆された。その詳しい機構は現在検討中である。

curcumin, tryptophan-NAD pathway, ACMSD

発表責任者：松田寛子（h-matsuda@nvlu.ac.jp）

講演番号：3B1a09
講演日時：3 月 26 日 10:38～ 1 号館 B1 会場

アオコ由来毒素ミクロシスチン-LR の低濃度投与はラット肝臓コレステロール値を上昇させる

Administration of low concentration cyanobacteria-derived toxin microcystin-LR increases the hepatic cholesterol level in rats

○清水 英寿[1]、河原 秀明[2]、蔵田 航一[2]、湯浅 佳奈[3]、渡辺 優太[3]、堀 将太[4]、石塚 敏[4]、岡野 邦宏[5]、吉清 恵介[1]、山本 達之[1]、西村 浩二[1]、地阪 光生[1]、横田 一成[1]、杉浦 則夫[6]、清水 和哉[6]（[1]島根大・生資、[2]島根大院・生資、[3]島根大院・自然、[4]北大院・農、[5]秋田県大・生資、[6]筑波大・生環系）

○HIDEHISA SHIMIZU[1], Hideaki Kawahara[2], Koichi Kurata[2], Kana Yuasa[3], Yuta Watanabe[3], Shota Hori[4], Satoshi Ishizuka[4], Kunihiro Okano[5], Keisuke Yoshikiyo[1], Tatsuyuki Yamamoto[1], Kohji Nishimura[1], Mitsuo Jisaka[1], Kazushige Yokota[1], Norio Sugiura[6], Kazuya Shimizu[6] ([1]Fac. Life Environ. Sci., Shimane Univ., [2]Grad. Life Environ. Sci., Shimane Univ., [3]Grad. Nat. Sci. Tech, Shimane Univ., [4]Hokkaido Univ., [5]Akita prefectural Univ., [6]Univ. of Tsukuba.)

【背景および目的】　湖沼や内湾等の閉鎖性水域に栄養塩類を含んだ生活排水や工業排水が流れ込むと、富栄養化状態となる。これによって発生するアオコは、ミクロシスチンと呼ばれる毒素を産生する。WHO（World Health Organization: 世界保健機関）が暫定的に規定した飲料水中のミクロシスチン濃度は 1 μg/L (1 nM) 以下であるが、特に浄水処理が未発達の発展途上国ではこの基準を満たせず、ミクロシスチンで汚染された湖沼由来の水を飲料水とする事で、健康被害が引き起こされているとの報告がある。また、発展途上国におけるティラピアやナマズ等の淡水魚介類の筋肉中からもミクロシスチンの蓄積が認められている。ティラピアやナマズは安価で美味な重要なタンパク源として、アジアのみならず欧米等でも食され、「食のグローバル化」の進展に伴い、我が国にも今年から輸入されている。よって、 飲料水のみならず、対策が施されていない淡水魚介類を食す事で、ミクロシスチンを人体に取り込む可能性は否定できない。ミクロシスチン研究におけるこれまでの健康評価は、急性中毒を想定した高濃度のミクロシスチン曝露に対する解析が主であり、低濃度曝露による慢性中毒に焦点を当てた報告は稀である。そこで本研究では、毒性の最も強いミクロシスチン-LR を用いて、低濃度曝露によるラット個体に対する影響を解析する事を目的とした。

【実験方法】　近交系である WKAH/HkmSlc ラット（5 週齢・雄）について 1 週間の予備飼育を行った後、通常水を飲水させた「コントロール群」とミクロシスチン-LR（10 μg/L）添加水を飲水させた「ミクロシスチン群」の 2 群に分け、両群共に標準精製飼料である AIN93G で 7 週間の飼育を行った。飼育期間中、体重および摂食量を確かめた。解剖後、腹部大動脈から採血を行った後、肝臓、腎臓、副睾丸脂肪の各組織重量を調べた。さらに盲腸内 pH、糞中各種胆汁酸濃度と組成についても確認を行った。腹部大動脈血から得た血漿から、AST/ALT、血糖値、トリアシルグリセロール、総コレステロール、遊離脂肪酸の濃度を測定した。肝臓中のトリアシルグリセロール量と総コレステロール量に関しても検証を行った。

【結果および考察】　コントロール群と比較してミクロシスチン群で、AST は減少傾向、ALT は優位に減少していた。一方、ミクロシスチン群で、肝臓中の総コレステロール量は有意に増加していた。その他の項目に関しては、両群の間で大きな違いは認められなかった。以上の結果から、慢性的なミクロシスチンの低濃度曝露は、コレステロール代謝の破綻を起因とした脂質代謝異常を惹起する事が示唆された。現在、コレステロール代謝に関与する遺伝子群の発現変化について解析を行っている。

Cyanobacteria, Microcystin, Cholesterol

発表責任者：清水英寿（hideshmz@life.shimane-u.ac.jp）

講演番号：3B1a10
講演日時：3 月 26 日 10:49～ 1 号館 B1 会場

プロポリス成分による非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）に対する予防効果の検討

Study on preventive effect against non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) by propolis

○小川 智弘、貞清 悠太、山口 雅貴、谷 海人、寺田 拓実（近大工）
○Tomohiro OGAWA, Yuuta Sadakiyo, Masaki Yamaguchi, Kaito Tani, Takumi Terada (Kindai Univ. of Eng.)

【諸言】肝臓に脂肪が蓄積した脂肪肝は放置していると脂肪性肝炎を発症し、やがて肝硬変や肝癌へと進行することもある。肝硬変や肝癌は不可逆的であり、その治療は困難であるため、その予防が重要視されている。プロポリス (PP) には天然化合物が数百種類含まれており、これらの肝疾患 (NAFLD) を予防する効果が期待される。本研究では肝疾患モデルマウスや肝臓由来細胞株を使って肝臓の脂肪蓄積や炎症、線維化に対する PP 成分の効果を検証した。
【実験方法】マウスに高脂肪食やメチオニン・コリン欠乏食を投与することで脂肪肝や炎症、線維化を誘発する肝疾患モデルマウスを作製した。これらのモデルに対して PP を同時投与することで病態への影響を解析した。各群から採取した肝臓の組織学的解析及び遺伝子の発現解析、血清の生化学的解析を行った。次に、肝癌細胞株 HepG2 に遊離脂肪酸（FFA）を添加することで細胞の脂肪蓄積や障害を与えた。PP 成分の同時添加による影響を細胞増殖試験及び脂肪染色、小胞体ストレスに関連した遺伝子発現解析により調べた。
【結果と考察】メチオニン・コリン欠乏食を投与したマウスに PP を同時投与することにより肝障害マーカーである ALT 値の上昇が抑えられ、肝臓の脂肪化が抑制された。肝臓の脂質代謝や炎症、線維化に関連する遺伝子発現を調べた結果、肝臓の炎症や線維化に関連した遺伝子の発現が有意に抑制された。これらの結果はプロポリス成分がどのように肝臓細胞の脂質代謝や線維化に影響を与えているか非常に興味深い結果であった。そこで、HepG2 に FFA を添加することで細胞障害を与え、そこに PP を同時添加することで細胞障害が抑制できることを見出した。さらに、PP 中からより顕著に抑制効果がある成分の同定に成功した。HepG2 に対して FFA 添加による小胞体ストレス介したアポトーシスが誘導されるが、PP 添加によってストレス応答に関連した CHOP や Hmox1 などの遺伝子発現を顕著に抑制することを明らかにした。結果として、PP による NAFLD の予防効果を詳細に示すことができた。

Propolis, NAFLD, Liver

発表責任者：t-ogawa@hiro.kindai.ac.jp（t-ogawa@hiro.kindai.ac.jp）

講演番号：3B1a11
講演日時：3 月 26 日 11:10～ 1 号館 B1 会場

(−)-Epigallocatechin-3-*O*-gallate の胃粘膜細胞に対するレプチン分泌刺激作用の機構解析
Analysis of the mechanism underlying leptin secretion from gastric mucosa by (−)-epigallocatechin-3-*O*-gallate.

○佐々木 知里[1]、太田 裕基[2]、石井 剛志[3]、向井 克之[4]、松山 彰収[4]、赤川 貢[2] ([1]大阪府大・生命環境、[2]大阪府大院・生命環境、[3]神戸学院大・栄養、[4](株)ダイセル)
○Chisato SASAKI[1], Hiroki OTA[2], Takeshi ISHII[3], Katsuyuki MUKAI[4], Akinobu MATSUYAMA[4], Mitsugu AKAGAWA[2] ([1]Fac. of Life & environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Grad. Sch. of Life & environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [3]Fac. of Nutr., Kobe Gakuin Univ., [4]Daicel Corporation)

【背景と目的】肥満人口は全世界で増加の一途を辿っており、2015 年には世界人口の約 3 分の 1 が肥満や過体重であると報告されている。レプチンは視床下部に作用し、食欲の抑制やエネルギー消費増大をもたらす抗肥満ホルモンであり、主に脂肪細胞から分泌されるが、胃粘膜細胞からも分泌されることが近年明らかにされている。胃粘膜細胞のレプチン分泌は摂食によって刺激されることが示唆されているものの、分泌を刺激する食品因子は未解明のままであった。このような背景から我々は、培養胃粘膜細胞に対してレプチンの分泌を刺激する抗肥満食品因子の探索を行い、主要な緑茶カテキンである (−)-epigallocatechin-3-*O*-gallate (EGCG) が強いレプチン分泌刺激活性を持つことを見出している。本研究は、EGCG の胃粘膜細胞に対するレプチン分泌刺激作用の分子機構の解明を目的として行った。
【方法と結果】 本研究では、ラット由来正常胃粘膜細胞 RGM1 を用いてレプチン分泌刺激機構の解析を行った。RGM1 細胞に EGCG (0~50 μM) を暴露し、レプチン分泌量をサンドイッチ ELISA によって、また細胞内レプチン量をウェスタンブロットによって測定した。その結果、5 分間の曝露時間でレプチンの分泌が刺激され、細胞内レプチン量の減少も認められた。また、RGM1 細胞に EGCG を暴露し、細胞内 Ca^{2+}濃度の変化を蛍光プローブである Fluo-8 AM を用いて測定したところ、EGCG 添加直後に細胞内 Ca^{2+}濃度の急激な上昇が認められた。次に、小胞体 Ca^{2+}を枯渇させる thapsigargin を前処理し EGCG のレプチン分泌刺激を解析した。その結果、thapsigargin 処理によって EGCG による細胞内 Ca^{2+}濃度の上昇とレプチン分泌刺激が顕著に減弱した。また、小胞体からの Ca^{2+}放出を惹起させる inositol trisphosphate の生成を触媒する phospholipase C の阻害剤である U-73122 を処理した場合にも同様の結果が得られた。以上の結果から EGCG は、小胞体 Ca^{2+}の放出を介してレプチン分泌を誘導することが明らかになった。また、緑茶カテキン受容体として知られる 67 kDa laminin receptor (67LR) のレプチン分泌刺激への関与を検討した。抗 67LR 抗体を前処理して EGCG のレプチン分泌刺激作用を評価したところ、抗 67LR 抗体処理によりレプチン分泌量が有意に減少した。さらに、67LR をノックダウンして評価した結果、EGCG のレプチン分泌刺激作用が 67LR のノックダウンによって顕著に抑制された。したがって、EGCG は 67LR を介してレプチン分泌を刺激することが明らかとなった。
【結論】 本研究によって、EGCG は 67LR への結合によって小胞体からの Ca^{2+}放出を誘導し、胃粘膜細胞のレプチン分泌を刺激する分子機構が推定された。

(-)-epigallocatechin-3-*O*-gallate, anti-obesity, leptin

発表責任者：赤川貢（akagawa@biochem.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：3B1a12
講演日時：3 月 26 日 11:21～ 1 号館 B1 会場

食後血糖値の予測を目的とした食品の試験管内糖化速度測定法（GR 法）の開発

Development of an in vitro method to measure the glucose releasing rates of foods and meals (GR method) aimed to predict postprandial glycemic response

○陶山 達矢[1]、橋本 和彦[1]、村上 隆之[1]、西川 佳子[2]、阿部 準[2]、中西 由季子[3]、佐々木 一[4]、木村 修一[5] ([1]山崎製パン(株)中央研究所、[2]一般財団法人日本食品分析センター栄養科学部生化学分析課、[3]人間総合科学大学人間科学部、[4]神奈川工科大学栄養生命科学科、[5]NPO 法人国際生命科学研究機構（ILSI Japan））

○ TATSUYA SUYAMA[1], KAZUHIKO HASHIMOTO[1], TAKAYUKI MURAKAMI[1], KEIKO NISHIKAWA[2], JUN ABE[2], YUKIKO NAKANISHI[3], HAJIME SASAKI[4], SHUICHI KIMURA[5] ([1]Yamazaki Baking Co.,ltd., [2]Japan Food Research Laboratories, [3]University of human arts and sciences, [4]Kanagawa institute of technology, [5]International life sciences institute Japan)

【背景および目的】食後高血糖は糖尿病などの生活習慣病や血管内皮細胞障害の進行を促すと報告されており、健康管理上重要な指標である。食後の血糖値を予測する手法として、ヒト試験による食品の血糖応答性（グリセミックインデックス、GI）測定が知られている（ISO26642)。GI 測定はヒトの生理的反応として測定できる反面、個人差などの測定誤差が大きく、採血による被験者へのストレスなど課題も多い。特定非営利活動法人国際生命科学研究機構（ILSI Japan）では新たな手法として、ヒト体内の物理的破砕および生化学的消化プロセスをモデル化し、試験管レベルで食品からの糖化速度を測定する GR（Glucose Releasing Rate）法の開発を進めており、各プロセスについて測定条件の最適化と分析法の妥当性確認を行った。

【方法】ヒトの消化吸収過程を①咀嚼：ミートグラインダーで破砕、②胃内消化：ペプシン溶液で反応、③膵液消化：パンクレアチン抽出液で反応、④腸内消化：ラット小腸アセトンパウダー抽出液で反応の 4 工程にモデル化した。糖化速度の測定には③膵液消化において反応初期（反応時間 20 分）と反応終点（反応時間 16 時間）で遊離したグルコース濃度を測定し、その比率を算出し GR 値とした。食品の糖化に重要な③膵液消化について、パンクレアチンの最適 pH 測定および防腐剤の選定より、溶液条件の最適化を行った。また、分析法の妥当性確認として、検体にジャネフ大腸内視鏡専用検査食クリアスルーNC・夕食（チキンクリームシチュー、クラッカー）および、やわらかプリン計 3 品および、その混合品を用い、室内精度（n=4、4 日間）および室間再現精度（n=4、4 日間、3 施設）の確認を行った。

【結果および考察】パンクレアチンの最適 pH は 7.0 であり、③膵液消化の溶液条件は 0.039Mリン酸三ナトリウム、0.1M塩化ナトリウム溶液（pH7.0）とし、防腐剤には 1%ソルビン酸カリウム溶液を使用することに決定した。その条件にて測定を行った結果、GR 値はチキンクリームシチュー83、クラッカー61、やわらかプリン 99、3 品を混合した場合は 77 であった。3 品の GR 値を炭水化物量で加重平均すると 77 となり GR 法では食事を構成する食品から食事の GR 値を算出することができた。その他の食品についても測定を実施したところ、GR 値は GI など既知の食品の血糖応答性と相関のある結果が得られた。分析法の妥当性について、3 品を混合した同一検体での GR 値の相対標準偏差を算出した結果、室内精度 2.8%、室間再現精度 6.0%と AOAC Int.ガイドラインの許容範囲内にあった。今後、10 施設程度による室間共同試験を実施し、妥当性の検証を継続する予定である。

glucose releasing rate, postprandial glycemic response, GR method

発表責任者：陶山達矢（tatsuya.suyama@yamazakipan.co.jp）

講演番号：3B1a13
講演日時：3 月 26 日 11:32～ 1 号館 B1 会場

脱脂ごまパウダーを用いた *in vivo* 脂肪吸収抑制試験
Suppressive effect of defatted sesame powder on lipid absorption: an *in vivo* study
○古賀 啓太、山田 裕晃、ウォン カールーン、山津 敦史、金 武祚 (株式会社ファーマフーズ)
○Keita KOGA, Hiroaki YAMADA, Kah Loon WONG, Atsushi YAMATSU, Mujo KIM (Pharma Foods International Co., Ltd.)

【目的】食生活や生活習慣の変化などにともない肥満人口は年々増加している。肥満は糖尿病、高血圧、がんなど様々な健康リスクを増加させるリスク因子であり、年間 340 万人が肥満に起因する疾患で死亡しているといわれている。現在、肥満に対する治療薬としては中枢神経系に作用するものと、脂肪分解酵素のリパーゼを阻害するものの 2 種類が販売されているが、いずれも副作用の問題から重篤な肥満患者に対してしか使用されていない。

我々は、身近な食品素材を用いてリパーゼ阻害成分の探索を行い、ゴマ種子中に強力なリパーゼ阻害成分が含まれることを見出した。ゴマは日本で年間 15 万トン以上消費されている食材であり、その脂肪吸収抑制作用を活用できれば安全で安価な肥満予防食の開発が期待できる。本研究では、ゴマ種子から脂質を除去して粉砕した脱脂ごまパウダーを用い、*in vivo* での脂肪吸収抑制作用の検証と、長期摂取による抗肥満効果についての検討を行った。

【方法】

脂質負荷試験　7 週齢の雄 Wistar ラットを実験動物として用いた。サンプル投与前採血の後、120 mg/kg の脱脂ごまパウダーを経口投与して 10 分後、水とコーン油を等量混合し、コール酸とコレステロールオリエートで乳化させたものを 1 mL 経口投与し、投与後 1.5 時間おきに採血を行った。採取した血液から血漿を分離し、トリグリセリド量を定量した。

長期投与試験　5 週齢の雄 C57BL/6 マウスを実験動物として用いた。高脂肪食として HFD-60（オリエンタル酵母社）を用い、重量比で 0.1%の脱脂ごまパウダーを添加したものを自由摂取させながら 1 週間おきに体重を測定した。高脂肪食開始 30 日間後に解剖し、組織重量を測定した。

【結果】

ラットを用いた脂質負荷試験の結果、脱脂ごまパウダー投与群で、コントロールのサンプル未投与群と比較して血中トリグリセリド量の有意な低下が認められた。

また、マウスを用いた 1 か月の長期投与試験においては高脂肪食に脱脂ごまパウダーを 0.1%混餌した群において、コントロールのサンプル未投与群と比較して有意な体重減少が確認できた。以上の結果から、脱脂ごまパウダーは、実際に生体内で腸管上皮のリパーゼ活性を阻害することで脂肪の吸収を抑制し、脂肪の過剰摂取による体重増加を抑制できることが示唆された。

sesame, lipase inhibitor, lipid metabolism

発表責任者：古賀啓太（k-koga@pharmafoods.co.jp）

講演番号：3B1a14
講演日時：3 月 26 日 11:43～ 1 号館 B1 会場

高たんぱく質ヨーグルト摂取によるたんぱく質吸収への影響

The effects of high-protein yogurt on protein absorption

○永渕 真也、北村 隆也、伊澤 佳久平、川島 昭浩（（株）明治　研究本部）
○Shinya NAGAFUCHI, Takaya Kitamura, Kakuhei Isawa, Akihiro Kawashima (Meiji Co., Ltd. R&D Division)

[背景･目的]
高たんぱく質ヨーグルトは、原材料ミックスを乳酸菌発酵させた後、セパレーターを用いた濃縮（ホエイ分離）によりたんぱく質含量を高めている。本試験では、高たんぱく質ヨーグルト摂取後の血中アミノ酸濃度への影響を、原材料ミックスを用いた乳飲料と比較した。
[方法]
20 歳以上 30 歳未満の男性 12 名を対象に、2 種類の試験食品を単回摂取した後の血中アミノ酸濃度への影響について、ランダム化クロスオーバー試験を実施した。試験食品は、高たんぱく質ヨーグルト 100 ｇおよび対照として原材料ミックスを用いた乳飲料 200 ｇ（ともに 10.2 ｇのたんぱく質を含有）を用いた。摂取前、摂取後 15 分、30 分、45 分、60 分、90 分、120 分および 180 分に採血し、摂取開始前に対する摂取後の血中アミノ酸濃度の変化量から求めた最高血中アミノ酸濃度（ΔCmax)、および血中アミノ酸濃度の曲線下面積（ΔAUC_{0-180}）を比較した。
[結果]
高たんぱく質ヨーグルト摂取時の血中必須アミノ酸濃度の変化量から求めたΔAUC_{0-180}は、対照に比較して高値になる傾向が認められ（$p<0.1$)、ΔCmax は有意に高くなった（$p<0.05$)。また、血中分岐鎖アミノ酸（BCAA）濃度とロイシン濃度の変化量についても、高たんぱく質ヨーグルト摂取時でΔAUC_{0-180}とΔCmax が有意に高い値を示した（ともに、$p<0.05$)。
[考察と結論]
成人男性による高たんぱく質ヨーグルト摂取は、対照と比較して、摂取後の BCAA とロイシンを含めた血中必須アミノ酸濃度をより高く上昇させることが明らかとなった。高たんぱく質ヨーグルトは、発酵および濃縮工程を経ることで、同量のたんぱく質を含有した乳飲料よりたんぱく質が吸収されやすいことを示唆するものである。また、ロイシンは骨格筋合成に重要なアミノ酸であることを考慮すると、高たんぱく質ヨーグルト摂取により骨格筋合成が促進される可能性が考えられた。

yogurt, amino acid, protein absorption

講演番号：3B1a15
講演日時：3 月 26 日 11:54～ 1 号館 B1 会場

乳由来タンパク素材の人工消化によって生成されるペプチドに関する研究

Research of peptides produced by artificial digestion of milk protein materials

○梅原 将洋、織谷 幸太、伊藤 良一、内田 裕子、守田 稔（森永製菓株式会社）
○Masahiro UMEHARA, Yukihiro ORITANI, Ryouichi ITO, Hiroko MARUKI-UCHIDA, Minoru MORITA (Morinaga & CO., LTD.)

【背景・目的】

乳タンパク質は分岐鎖アミノ酸を豊富に含むなど、優れた食品素材である。また、乳タンパク質は消化管で分解された後、アミノ酸やペプチドとなり、体内に吸収されて栄養素となるばかりでなく、血圧降下作用や血糖値降下作用など、様々な機能性を発揮することが報告されている。これらの機能性には、タンパク質が酵素により分解されて生成したペプチドが関与しており、体内に吸収されて機能性を発揮するかどうかは、そのペプチド自身が機能性を発揮することと同時に、消化により体内で生成されるかどうかや、消化酵素に対する耐性をもっているかどうかが重要である。そこで本研究では、乳タンパク質素材に関して、ヒト消化管内を模した人工消化の系を *in vitro* で構築し、消化後に特徴的なペプチドの推定と機能性を評価することを目的とした。

【方法】

in vitro と *in vivo* の相関性を検討するために、いくつかのサンプルに対して酵素としてペプシン、パンクレアチンを用いた人工消化処理により生成するアミノ酸量と *in vivo* 試験により吸収されたアミノ酸量を比較した。また、人工消化処理により得られた各ホエイペプチドの消化産物に関して、LC-MS/MS による分析を行い、得られたペプチドのフラグメント情報よりアミノ酸配列を推定した後、合成した標準品を用いて構造の同定を行った。

【結果】

今回の *in vitro* のアミノ酸生成量と *in vivo* のアミノ酸吸収量を比較したところ、その値に相関が見られ、今回の人工消化の系は、ある程度 *in vivo* の結果を反映するものと考えられた。また、上記方法によって人工消化処理に供した乳タンパク質素材から、いくつかのペプチドの構造を推定・同定し、そのうち Leu-Asp-Ile ペプチドは消化後に特徴的なペプチドであることが分かった。また、このトリペプチドの前駆体を探索したところ、そのうちの一つが Leu-Asp-Ile-Gln であることが分かり、構造検索を行った結果、このテトラペプチドはこれまでに報告がないペプチドである可能性が示された。さらに、これらのペプチドの熱安定性を検討したところ、環状ペプチドと考えられるピークが生じることが明らかとなった。現在、これらペプチドの生理活性評価を行っているので併せて報告する。

milk protein, artificial digestion, peptide

講演番号：3B1p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ 1 号館 B1 会場

抱合体の違いによる胆汁酸輸送機構の解明

The mechanism of bile acid transport depends on the conjugation types

○宮脇 里奈[1]、石川 和樹[1]、石井 剛志[2]、小林 彰子[1] ([1]東大院農、[2]神戸学院栄)
○Rina MIYAWAKI[1], Kazuki ISHIKAWA[1], Takeshi ISHII[2], Shoko KOBAYASHI[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Kobe Gakuin Univ.)

【目的】

食後胆管を通じて腸管に排出される胆汁酸の 95%は、小腸下部に発現する胆汁酸トランスポーター(ASBT: Apical sodium-dependent bile acid transporter)から再吸収され、肝臓へと運ばれ、再び腸管へ分泌される（腸肝循環）。胆汁酸トランスポーターの研究においては、胆汁酸の一種であるコール酸のタウリン抱合体であるタウロコール酸(TCA: Taurocholic acid) が基質として代表的に用いられてきた。一方で、ヒト胆汁酸の中で含有率が高いのはグリココール酸(GCA: Glycocholic acid)をはじめとするグリシン抱合体であるにも関わらず、既存の胆汁酸の腸管吸収性に関する研究では、抱合体の違いに着目しているものはほとんど存在しない。そこで我々は、TCA および GCA の腸管における吸収特性を明らかにすることを目的とした。

【方法】

1 週間培養させたヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞に [^{3}H] TCA 及び [^{3}H] GCA を添加し、一定時間後に細胞内に取り込まれた量を液体シンチレーションカウンターで測定した。0～150 μM での濃度依存性取り込み試験により、速度論的パラメーターを算出した。ASBT は Na^+依存型トランスポーターであることから、バッファー中の Na^+の有無による吸収の違いを調べた。また、ASBT 以外の胆汁酸トランスポーターとして OATP2B1(Organic anion transporting polypeptide 2B1)が知られていることから、ASBT と OATP2B1 の強制発現細胞を作製し、GCA と TCA の吸収特性を比較した。

【結果・考察】

Caco-2 細胞による取り込み試験では、TCA の吸収量が GCA よりも有意に高く、抱合体の構造の違いによってトランスポーターによる認識が異なる可能性が考えられた。また、濃度依存性取り込み試験の速度論的解析により、TCA 及び GCA が 2 種類のトランスポーターによって吸収されていることが示された。Na^+の有無による吸収の違いを調べたところ、TCA は Na^+存在下でのみ高い吸収性を示した一方、GCA は Na^+の有無に大きな影響を受けなかった。現在、ASBT および OATP2B1 を強制発現させたアフリカミドリザル腎由来 COS-7 細胞における吸収の違いを検討中である。

本研究の一部は、総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」の助成によって実施された。

ASBT, OATP, Bile acid

講演番号：3B1p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ 1 号館 B1 会場

食品成分の消化管における認識機構の解明

Establishment of intravital imaging method to evaluate the sensing mechanism in the gastrointestinal tract of food factors

○福田 陽大[1]、越阪部 奈緒美[1]、安達 貴弘[2] ([1]芝浦工業大学、[2]東京医科歯科大学)

○Yota FUKUDA[1], Naomi OSAKABE[1], Takahiro ADACHI[2] ([1]Shibaura Institute of Technology, [2]Tokyo Medical and Dental University)

［背景・目的］唐辛子に含まれる辛味成分の capsaicin は、消化管知覚神経末に存在する Transient Receptor Potential Vaniloid (TRPV)1 と呼ばれるカルシウムチャネルに結合し、神経細胞への細胞内カルシウム流入を伴う活動電位を発生させることが知られている。またこの反応が、感覚神経を通じて中枢に伝わり、交感神経活動を亢進させた結果、エネルギー代謝を上昇させることが報告されている。capsaicin と TRPV1 の相互作用について、一般的には *in vitro* での評価が行われており、*in vivo* で評価した例は極めて少ない。Ca^{2+}バイオセンサー Yellow Cameleon (YC) 3.60 は、細胞内カルシウムイオン濃度をモニターすることができるため、本実験では YC3.60 トランスジェニックマウスを用い、capsaicin 投与後の腸管におけるカルシウムイオン流入の生体イメージング法の開発を目的とした。

［実験方法］YC3.60 トランスジェニックマウスを麻酔下で開腹後、小腸を露出させカバーグラスで固定して観察を行った。1%エタノール含有 PBS を vehicle として用い、capsaicin は最終濃度 1 mM になるよう希釈し、小腸に投与した。また、capsaicin 受容体 TRPV1 は DRG(脊髄後根神経節)で発現しているため、YC3.60 トランスジェニックマウスの DRG を摘出し、1 mM capsaicin を滴下して細胞内カルシウムイオン濃度をモニターした。観察は Nikon 社製共焦点顕微鏡システム A1 を用い、解析には Nis element を用いた。

［結果・今後の展望］capsaicin 群においては、細胞内カルシウムイオン濃度の持続した上昇が観察された。一方、vehicle 群ではこのような変化は観察されなかった。また、capsaicin の受容体である TRPV1 の KO マウスや、ブロッカーである capsazepine で処理したマウスでは、細胞内カルシウムイオン濃度変化は観察されなかった。さらに、神経特異的に YC3.60 を発現する nestin-Cre/YC3.60 トランスジェニックマウスでは、腸管上皮神経細胞で capsaicin による一過的な細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を観察した。

以上のように、消化管において capsaicin が TRPV1 に結合し、Ca^{2+}が細胞内に流入する現象を生体イメージングで観察することが可能となった。この系を用いて食品成分による腸管のセンシングを *in vivo* で可視化でき、その機序解明に有力なツールとなることが期待される。

capsaicin, *in vivo* imaging, small intestine

発表責任者：福田陽大（mf18069@shibaura-it.ac.jp）

講演番号：3B1p05
講演日時：3 月 26 日 14:34～ 1 号館 B1 会場

腸管を作用場とする機能性ポリフェノールの吸収・代謝挙動の可視化

In situ visualization of intestinal absorption and metabolism of bioactive polyphenols by MALDI-MS imaging

○田中 充、グエン フナイ、李 宝瑞、松井 利郎（九大院農）
○Mitsuru TANAKA, Huu-Nghi Nguyen, Baorui Li, Toshiro Matsui (Kyushu Univ. of Agric.)

【目的】当研究室ではこれまでに、紅茶等の発酵茶に含まれる重合ポリフェノールの一種であるテアフラビンが、非吸収性成分であるにもかかわらず腸管を作用場としてペプチド吸収抑制等の生理作用を発現することを明らかにしてきた [1)]。そこで本研究では、抗体等の成分特異的な標識技術を使用することなく、生体組織中の目的成分の局在を多成分同時に可視化することが可能な MALDI-MS イメージング法を用いて、当該機能性ポリフェノールの腸管での吸収・代謝挙動を一斉可視化することを目的とした。

【方法】本研究では、非吸収性の機能性ポリフェノールである theaflavin-3'-*O*-gallate (TF3'G)および、そのモノマー構成単位であり腸管吸収可能な epicatechin-3-*O*-gallate (ECG)を用いた。9 週齢雄性 Sprague-Dawley ラットを 16 時間絶食後、空腸を摘出し、Ussing chamber を用いて腸管透過試験を実施した。透過試験後の小腸組織を用いて凍結切片を作製し、ITO スライドガラス上にマウントし、マトリックスとして nifedipine[2)]を噴霧した後、negative mode にて MALDI-MS イメージング分析に供した。

【結果】透過試験後の小腸組織切片の MALDI-MS イメージング分析を実施した結果、腸管吸収可能な ECG は頂膜側から側基底膜側にかけて全体に分布していることが確認された。さらに、非吸収性の TF'3G においては、頂膜側での局在が可視化された。このことは、非吸収性の TF'3G が腸管組織内へ取り込まれることを初めて示すものであると考えられた。そこで、阻害剤を用いて腸管組織への取り込み経路の可視化を試みたところ、TF3'G は、モノカルボン酸トランスポーター（阻害剤 phloretin）および有機アニオントランスポーター（阻害剤 : estron-3-sulfate）を介して腸管へ取り込まれることが可視化された。さらに、排出系の ATP-binding cassette トランスポーター（阻害剤 : cyclosporine A）により頂膜側に排出されることが初めて可視化された。また、代謝物解析の結果、ECG のメチル化、硫酸化およびその両方の抱合体化を受けた代謝物が腸管組織において可視化された一方、TF3'G の代謝物は可視化されなかった。したがって、TF3'G は腸管組織内において安定に存在すると考えられた。

1) Park et al. ***Biosci Biotechnol Biochem***. 79, 130-137, 2015
2) Nguyen et al. ***J.Mass. Spectrom***. 51, 938-46, 2016

intestinal absorption, MALDI-MS imaging, polyphenols

講演番号：3B1p06
講演日時：3 月 26 日 14:55～ 1 号館 B1 会場

ラットにおけるフィトスフィンゴシンのリンパ吸収動態
Lymphatic absorption of phytosphingosine in lymph-cannulated rats
○西向 めぐみ[1]、田村 和樹[1]、光武 進[2]、北垣 浩志[2] ([1]岩大農、[2]佐賀大農)
○Megumi NISHIMUKAI[1], Kazuki TAMURA[1], Susumu MITSUTAKE[2], Hiroshi KITAGAKI[2] ([1]Iwate Univ. of Agric, [2]Saga Univ. of Agric)

【目的】日本食には多くの発酵食品が利用されており、その代表として麹が挙げられる。近年の研究成果により、麹にはグルコシルセラミドのようなスフィンゴ脂質が多く含まれることが明らかになっている。スフィンゴ脂質はスフィンゴイド塩基と呼ばれる長鎖アミノアルコールを骨格に持つ脂質の総称である。また、スフィンゴイド塩基のアミノ基に脂肪酸がアミド結合したものをセラミド、セラミドの極性基にリン酸とコリンが結合したものをスフィンゴミエリンと呼ぶ。スフィンゴ脂質に関する研究は近年進められているが、吸収動態やその機能については解明されていない点が多い。そこで、まず、脂質吸収への影響を検討するために、リンパカニュレーションを施したラットにスフィンゴイド塩基の一種であるフィトスフィンゴシン(PHS)を含む脂質エマルジョンを経腸投与した。その結果、共存するトリグリセライド(TG)やコレステロール(CHO)のリンパ放出を抑制する効果があることを示した。

今回は、同時に与えた PHS の吸収動態を、リンパへ放出されたスフィンゴ脂質の分子種を LC-MS/MS で解析することで評価した。

【方法】9～10週齢の Wistar/ST 系の雄ラットを、AIN93-G に準拠した基本食で予備飼育後、胸管リンパ管(リンパ液採取用)および十二指腸(経腸投与用)にカテーテルを留置し、一晩回復後、PHS を含む脂質エマルジョン1ml を経腸投与した。7.5%大豆油 + 2.5%コレステロールエステル + 1%タウロコール酸ナトリウムのエマルジョンを基本組成(Control 群)とし、試験群には PHS を 0.5%、1%、1.5%追加で添加した。エマルジョン投与開始から 6 時間、経時的にリンパ液を全量採取した。TG および CHO の吸収の最も高かった 2～3 時間および脂質投与前のリンパ液の脂質抽出を行い、LC-MS/MS を用いて PHS を含めたスフィンゴ脂質の分子種分析を行った。

【結果および考察】各 PHS 添加群において、スフィンゴイド塩基として PHS を含むセラミドおよびスフィンゴミエリンが有意に増加した。PHS 自体も検出されたが微量であった。この結果より、投与した PHS は小腸吸収上皮細胞へ吸収された後、スフィンゴイド塩基のアミド基に脂肪酸が結合したセラミドおよびセラミドの極性基にリン酸とコリンが結合したスフィンゴミエリンの構造へ変換されて体内へ吸収されることが示された。

また、PHS に比べると量は少ないが、PHS 以外のスフィンゴイド塩基(スフィンゴシンやジヒドロスフィンゴシン)を持つ、セラミドおよびスフィンゴミエリンが PHS 群において増加した。この結果より、PHS はそのままの構造で吸収されるだけでなく、小腸吸収上皮細胞においてその他のスフィンゴ脂質代謝を変化させる可能性が示唆された。

phytosphingosine, lymphatic absorption, lymph-cannulated rats

発表責任者：西向めぐみ（nmegumi@iwate-u.ac.jp）

講演番号：3B1p07
講演日時：3 月 26 日 15:06～ 1 号館 B1 会場

マウス反転腸管における糖吸収に及ぼす梅加工品の影響

Effects of processed products of Ume on glucose absorption in mice intestinal everted sac.

○廣瀬 仁志、本間 知夫（前工大工）
○Hitoshi HIROSE, Tomoo HOMMA (Maebashi Inst. of Tech.)

【目的】

我々は青梅果実をホワイトリカー(以下 WL と表記)に浸して得られた抽出液(梅リカー抽出液、以下 UL と表記)の美白効果に関する研究を進めているが、UL 摂取による生体機能性についても検討すべく、マウス反転腸管における糖吸収に対する UL の影響を調べ始めている。本研究では UL、さらには市販の梅ジュース、梅肉エキスなどの梅加工品の糖吸収に対する影響を調べることを目的としている。

【方法】

＜材料＞群馬県産青梅果実を、1)WL に 3 ヶ月間漬けて得られた液(酸性)を pH 7.0 に調整したもの(UL)、2)イオン交換水(IEW)に 3 日間漬けて得られた液 (UI)、3)市販の梅ジュース及び梅肉エキス(赤城フーズ)(株)提供)、をサンプルとした。

＜輸送電位の測定＞マウス(ddY, ♂, 5 週齢以降)より摘出した小腸上部 2/3 を 6 等分し、各部位を反転させて内側(漿膜側)に Krebs 液を入れて反転腸管標本とし、37℃一定、混合ガス(95%O_2-5%CO_2)を通気した Krebs 液に浸した。外側(粘膜側)を基準(マイナス極)として漿膜側の電位(プラス極)を測定し、粘膜側にグルコース(作用濃度 5 mM、以下 Glu と表記)を投与した時に発生する電位(Glu 輸送電位)を記録した。Glu 輸送電位は繰り返し得られるが、1 回目と 2 回目以降では電位の大きさが異なるため、2 回目以降に試験を実施した。

＜反転腸管における Glu 吸収量の測定＞反転腸管標本における実際の Glu 吸収量を測定する際は、反転させた漿膜側にはグルコースを含まない Ringer 液(Glu-free Ringer)を入れた。反転腸管標本を 37℃一定、混合ガスを通気した Ringer 液(5 mM Glu を含む)に 20 分間浸した後、粘膜側および漿膜側の各液中の Glu 吸収量を測定した。

＜梅加工品の影響＞輸送電位あるいはグルコース吸収量に対する各梅加工品投与の影響を調べた。

【結果】2 回目の Glu 輸送電位の大きさを 100%とし、UL、WL、UI 存在下、さらに腸管洗浄後の各 Glu 輸送電位の大きさを相対的に表して UL、WL、UI の影響を調べたところ、UL 投与は Glu 吸収を抑制した。ただし WL 投与でも Glu 輸送電位の大きさは減少し、WL に含まれるアルコールの影響と思われた。しかし、アルコールを含まない UI 投与でも Glu 輸送電位の大きさは減少し、梅由来成分が腸管における糖吸収を抑制することが示された。反転腸管における Glu 吸収量の変化、その他梅加工品（梅ジュース、梅肉エキス等）投与の結果についても報告する。

Prunus mume, Glucose absorption, Transport potential

発表責任者：本間 知夫（thomma@maebashi-it.ac.jp）

講演番号：3B1p08
講演日時：3 月 26 日 15:17～ 1 号館 B1 会場

ムラサキイモ濃縮エキスによるマウス摘出腸管におけるアルコール吸収抑制について

Inhibitory effects of purple sweet potato extracts on alcohol absorption in mice isolated intestines

○鍛治 諒太郎[1]、鈴木 優香[2]、古我 匠[2]、本間 知夫[1]([1]前工大工、[2]日農化学工業(株))
○Ryotaro KAJI[1], Yuka SUZUKI[2], Takumi KOGA[2], Tomoo HOMMA[1] ([1]Maebashi Inst. Tech., [2]Nichino Kagaku Kogyo Co.,Ltd.)

【目的】
ムラサキイモ濃縮エキス(Purple Sweet Potato Extracts，以下 PSPE と表記，日農化学工業(株)製)を飲酒前に服用すると，呼気中アルコール濃度のピーク値低下や低下速度促進が確認され，PSPE が飲酒時のアルコール吸収・代謝に作用することが示唆されたが，そのメカニズムは不明である。本研究では，PSPE による腸管レベルでのアルコール吸収抑制を示唆する結果が得られたので報告する。
【方法】
＜PSPE サンプル＞PSPE サンプルは次の２通りの方法で調製して使用した。１）リンガー液(pH7.4)で重量比 250 倍あるいは 100 倍に希釈した。２）0.1 M McIlvaine 緩衝液(pH3.0)で重量比 50 倍あるいは 20 倍に希釈した後，pH を 7.4 に調整した。
＜エタノール吸収量の測定＞マウス摘出小腸は次の２通りの方法で標本を作製し，エタノール吸収量についてそれぞれ調べた。1)摘出した小腸口腔側 2/3 を 5 等分し，それぞれ腸管を反転させて内部(漿膜側)にリンガー液を加えた反転腸管標本を作製し，37℃一定で混合ガス(95%O_2-5%CO_2)を通気した PSPE(最終濃度 250 倍あるいは 100 倍希釈)を加えた５％エタノール入りリンガー液に浸した(コントロール：PSPE 無し)。15 分後に反転腸管標本を取り出し，腸管内部に吸収されたエタノール濃度を F-キット エタノール(JK インターナショナル)で測定した。2) 摘出した小腸を反転させずそのまま 3 等分し，それぞれ片側を結紮して腸管内部(粘膜側)に PSPE サンプル 100μL を入れ(コントロール：リンガー液のみ)，37℃一定で混合ガスを通気したリンガー液に腸管標本を浸した。2 分後に腸管標本を取り出して腸管内部にさらに 5%エタノールを含むリンガー液を 100～1200μL 入れ(個体・腸管部位により入れられる量は異なった)，その腸管標本を再びリンガー液に浸して 15 分後に腸管標本を取り出し，内部の液を回収してエタノール濃度を測定した。
【結果および考察】
腸管各部位で吸収されるエタノール量は腸管の長さにより異なるため，腸管１g あたりの吸収量に換算し，最終的には全腸管におけるエタノール吸収量を算出した。反転腸管標本による予備実験では，PSPE 投与はエタノール吸収量を抑制する傾向が見られたが，反転腸管標本がうまく出来ないことがあり，反転させない腸管標本の実験を実施した。しかしエタノール吸収量が反転腸管標本に較べて少なく，PSPE の抑制効果も不明瞭だったため，再び反転腸管標本の実験を実施しているところである。

Purple sweet potato extracts, Ethanol, Small intestine

発表責任者：本間 知夫（thomma@maebashi-it.ac.jp）

講演番号：3B1p09
講演日時：3 月 26 日 15:28～ 1 号館 B1 会場

熱殺菌 *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 327 の経口投与は BALB/c マウスのロペラミド誘発性便秘症状を改善する

Oral administration of heat-killed *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 327 improves loperamide-induced constipation in BALB/c mice

○三原 敏敬[1]、志田 ちひろ[2]、長谷川 芽衣[2]、熊谷 武久[1]、城 斗志夫[2]、原 崇[2] ([1]亀田製菓、[2]新潟大農)
○Toshihiro MIHARA[1], Chihiro SHIDA[2], Mei HASEGAWA[2], Takehisa KUMAGAI[1], Toshio JOH[2], Takashi HARA[2] ([1]Kameda Seika Co., Ltd., [2]Fac. Agric., Niigata Univ.)

【目的】*Lactobacillus casei* subsp. *casei* 327 (LC327) は玄米から単離された乳酸菌である。ヒト試験において、熱殺菌した LC327 の摂取による排便頻度と排便日数、排便量の有意な増加が確認されている [1)]。また、熱殺菌 LC327 をマウスに経口投与すると、大腸におけるセロトニン産生が有意に亢進すると同時に、大腸内容物排出運動が促進する結果が得られた [2)]。本研究では、止瀉薬として使用されているロペラミドの経口投与により便秘を誘発させたマウスを用い、熱殺菌 LC327 の便通改善効果について検討した。

【方法】BALB/c マウス(♂, 8 週齢)をコンベンショナル環境で飼育し、熱殺菌 LC327(乾燥粉末)を、摂取量が 10 mg/day/mouse となるように混餌し、17 日間自由摂食させた。飼育 15～17 日目の期間(3 日間)に、ロペラミド(0.3 mg/kg)をゾンデにより毎日1回胃内投与し、便秘を誘発させた。対照群には、15～17 日目の期間に PBS を胃内投与した。定期的に糞便を回収し、糞便ペレットサイズ、排便量、糞便の水分含量を測定した。また、カルミン(赤色色素)を含有するメチルセルロース溶液を胃内投与し、消化管通過時間を評価した。

【結果】ロペラミド投与により、糞便ペレットのサイズが顕著に縮小し、糞便重量および便水分量が低下した。また、ロペラミド投与により、腸管通過時間が有意に延長した。一方、熱殺菌 LC327 の経口投与により、ロペラミドによる糞便ペレットサイズの縮小、糞便重量および便水分量の低下が抑制された。さらに、熱殺菌 LC327 の経口投与により、ロペラミドによる腸管通過時間の延長が抑制され、対照群と同程度の腸管通過時間を示した。以上より、LC327 の熱殺菌菌体は、マウスのロペラミド誘発性便秘に対し、瀉下効果を示すことが確認された。

1) Y. Saito et al., Biosci Microbiota Food Health., 37(3), 59-65, 2018.
2) T. Hara et al., J. Funct Foods., 47, 585-589, 2018.

Lactobacillus casei subsp. *casei* 327, loperamide-induced constipation, bowel movements

講演番号：3B1p10
講演日時：3 月 26 日 15:39～ 1 号館 B1 会場

ニンニク成分アリシンによるラット腸管起電性イオン輸送制御および腸管蠕動運動との関連性の検討

Effects of allicin on electrogenic ion transports and its correlation with peristalsis in the rat intestine

○土谷 庸[1]、川俣 幸一[2] ([1]東北女子大家政学部、[2]東北生活文化大家政学部)
○Yo Tsuchiya[1], Kouichi Kawamata[2] ([1]Tohoku Women's College, [2]Tohoku Seikatsu Bunka Univ.)

【目的】
ニンニクの主要成分であるアリシンには、疲労回復、癌細胞成長抑制、殺菌効果、整腸作用など様々な生理的効果があることが報告されている。本実験ではアリシンの整腸作用効果に着目した。これまでアリシンによる腸管蠕動運動調節作用は報告されているが、腸管イオン輸送に対する効果は不明であった。腸管でのイオン輸送は体液保持や効率的な栄養素吸収に寄与し、また腸管蠕動運動と同期して起こる事で腸管内容物移動促進にも寄与している。本研究では、アリシンがラット回腸起電性イオン輸送に及ぼす効果を検討した。また、その効果がアリシン誘発性腸管蠕動運動亢進と機能的に関連しているかの検討を、回腸管腔内のプラスチック製模型糞便（以下ペレット）移動速度測定法にて行った。

【実験方法】
回腸イオン輸送測定実験においては、ラット回腸を摘出後シート状にした回腸標本を Ussing チャンバーにセットし、カルメル電極を通じて高感度 DC 記録計に接続して経時的に回腸膜電位差を記録した。ペレット移動速度測定においては、ラット回腸を約 5 cm 摘出し、口腔側から直径 4 mm のペレットを挿入し、培養液中にアリシン投与の際の標本肛門側へ達する速度をビデオ撮影画像にて解析比較を行った。またアリシン誘発重炭酸イオン分泌亢進が蠕動運動に及ぼす効果を検討するため、培養液から重炭酸イオンを除いた HEPES 溶液下においてアリシン投与によるペレット移動速度測定を行った。

【結果および考察】
アリシン 100 μM の回腸血管側投与により回腸膜電位の上昇が確認された。培養液から重炭酸イオンを除いた条件下ではこの効果は完全に抑制されたが、クロライドイオン除去の条件下では有意に抑制されなかった。以上の結果から、回腸部ではアリシンは主に起電性重炭酸イオン分泌を亢進することが示唆された。また 30 μM アリシン投与後約 75 秒後に回腸内ペレット移動速度の増大が見られ、ペレット移動速度は毎秒 2.1 mm であった。一方、重炭酸イオン除去した培養条件下では、アリシン投与後の回腸内ペレット移動速度は通常リンゲル溶液培養下と比較して低下し、ペレット移動開始時間も遅延する傾向が見られた。以上の結果より、アリシン誘発回腸蠕動運動亢進は少なくとも細胞外重炭酸イオンに依存していることが示唆された。

allicin, ion transport, intestinal peristalsis

発表責任者：土谷庸（ytsuchiya@tojo.ac.jp）

講演番号：3B1p11
講演日時：3 月 26 日 16:00～ 1 号館 B1 会場

コラーゲン由来 X-Hyp-Gly 型トリペプチドのアンジオテンシン変換酵素阻害活性―プロリン水酸化による活性増強

Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of collagen-derived X-Hyp-Gly-type tripeptides: enhancement of the inhibitory activity by prolyl hydroxylation

○多賀 祐喜、林田 治、楠畑 雅、後藤 希代子、服部 俊治（ニッピ・バイオマトリックス研究所）
○ YUKI TAGA, OSAMU HAYASHIDA, MASASHI KUSUBATA, KIYOKO OGAWA-GOTO, SHUNJI HATTORI (Nippi Res. Inst. of Biomatrix)

【目的】
コラーゲンはプロリン（Pro）を高含有するタンパク質であり、[グリシン（Gly）－アミノ酸 X－アミノ酸 Y] 繰り返し配列の Y に位置する Pro は、ほぼ全てがヒドロキシプロリン（Hyp）へと水酸化される。我々はこれまでに、生姜根茎に含まれるプロテアーゼを用いて新たなコラーゲン加水分解物を開発し、その経口摂取によって Hyp 含有トリペプチド X-Hyp-Gly が効率的に血中へと吸収されることを報告している（Taga et al., J. Agric. Food Chem., 2016）。本研究では、X-Hyp-Gly のアンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害活性に注目し、その活性への Hyp の寄与を明らかにするため X-Pro-Gly も加えて解析を行った。また、X-Hyp-Gly はペプチダーゼ分解に対する高い耐性を持っており、Pro 水酸化がそのペプチド安定性に関与していると考えられたため、マウス血漿を使って評価を行った。
【方法】
ブタ腎臓由来 ACE を用い Bz-Gly-His-Leu を基質とした測定系に、各種合成ペプチドを阻害剤として添加し、生成した Bz-Gly を LC-MS で測定することでその ACE 阻害活性を算出した。また、合成ペプチドをマウス血漿と 37℃で 90 分間反応させ、LC-MS によって各ペプチドの残存率を測定した。
【結果】
様々な X-Hyp-Gly 型トリペプチドに ACE 阻害活性が確認された。特に、分岐鎖アミノ酸を N 末端に持つペプチドが高い阻害活性を示し、最も活性の強い Leu-Hyp-Gly の IC_{50} 値は 5.5 μM だった。興味深いことに、Hyp を Pro に置換すると全てのペプチドで ACE 阻害活性が減少し、例えば Leu-Pro-Gly の阻害活性は Leu-Hyp-Gly に比べ 1/70 にまで低下した。つまり、Pro への水酸基 1 個の付加がペプチドの ACE 阻害活性を大きく増強したと言える。この詳細なメカニズムは不明であるが、別の種類の Hyp 含有トリペプチドではこの効果が見られなかったことから、X-Hyp-Gly に特有のものである可能性がある。また、マウス血漿と反応させると X-Pro-Gly は 90 分時点で全て分解された一方、X-Hyp-Gly では反応後のペプチド残存率が大幅に向上した（Ala-Hyp-Gly：100%、Leu-Hyp-Gly：>60%）。
【結語】
以上の結果より、コラーゲン特異的な Pro 水酸化は X-Hyp-Gly 型トリペプチドにおいて、ACE 阻害活性およびペプチダーゼ分解耐性に大きく寄与することが明らかとなり、これら未分解のまま血中へと高濃度で移行する ACE 阻害ペプチドには血圧降下作用が期待される。

collagen, hydroxyproline, angiotensin-converting enzyme

発表責任者：多賀祐喜（y-taga@nippi-inc.co.jp）

講演番号：3B1p12
講演日時：3 月 26 日 16:11～ 1 号館 B1 会場

アピオス塊茎由来アンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害物質及び阻害ペプチドの探索に関する研究
The study about angiotensin-converting enzyme(ACE) inhibitor and inhibitory peptides from *Apios americana* Medikus

○JIANG Wenqian[1]、上妻 由章[2] ([1]茨城大院農、[2]茨城大農)
○Wenqian JIANG[1], Yoshiaki KOUZUMA[2] ([1]Grad. Sch. Ibaraki Univ. Col. of Agric., [2]Ibaraki Univ. Col. of Agric.)

（目的）アピオス（*Apios americana* Medikus）は北米原産の多年草マメ科ツル性植物で、塊茎が食用とされ、他のイモ類と比較してタンパク質を多く含んでいる。以前、本研究室はアピオス塊茎中に低分子量のアンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害物質が含まれていることを見出した。そこで、本研究ではアピオスの健康食品素材としての高付加価値化を目指して、アピオス中の ACE 阻害物質の分離を試みるとともに、アピオス塊茎由来タンパク質をタンパク質分解酵素により加水分解を行い、生じたペプチドの ACE 阻害活性とその血圧低下作用について調査した。
（方法）ACE 阻害物質は、アピオス塊茎を粉砕後、水で抽出し、抽出液を熱処理または透析（分画分子量 1000）により分画した。ACE 阻害物質の分離精製には、Q Sepharose FF カラム及び Super Q-5PW カラムを用いた。また、アピオスタンパク質の分解酵素として、papain、pepsin、trypsin、chymotrypsin、pancreatin および subtilisin を用い、37℃で 6～24 h 消化した。血圧低下作用の調査には、高血圧自然発症ラット（SHR）を用いて、試料を単回投与し、tail-cuff 法にて血圧を測定した。
（結果）透析等によって分画した ACE 阻害物質の ACE 阻害活性は、二回目の透析外液画分が最も高く（IC_{50}：2.69 mg/mL）、ついで一回目の透析外液画分（同 4.30 mg/mL）、熱処理上清画分（同 4.39 mg/mL）の順であった。Q Sepharose FF と Super Q-5PW による分離により、ACE 阻害物質は紫外部に吸収を持たない物質であることが示唆された。一方、アピオスタンパク質の酵素消化物の ACE 阻害活性を調べた結果、papain または pepsin による加水分解物の ACE 阻害活性が非常に高かった（同 papain 6 h：0.356 mg/mL、papain 24 h：0.644 mg/mL、pepsin 6 h：0.474 mg/mL、pepsin 24 h：0.332 mg/mL）。また、pepsin 6 h 消化物を trypsin 又は chymotrypsin により消化した結果、chymotrypsin 消化では時間経過とともに ACE 阻害活性は低下したのに対し、trypsin 消化では低下はほとんど見られなかった。透析によって得られた ACE 阻害物質及びアピオスタンパク質酵素消化物を SHR に投与したところ、いずれの場合も 2 g/kg 体重の投与で、収縮期血圧が有意に減少し、特に二回目の透析外液画分では投与後 8 h で 28 mmHg、papain 6 h 消化物では投与後 8 h で 42 mmHg 下がった。現在、ACE 阻害ペプチドの分離と同定を行っている。

ACE inhibitor, *Apios*, SHR

発表責任者：JIANG　Wenqian（17am211r@vc.ibaraki.ac.jp）

講演番号：3B1p13
講演日時：3 月 26 日 16:22～ 1 号館 B1 会場

血管内皮細胞に対するカシスアントシアニンのフィトエストロゲン作用

Phytoestrogenic activity of blackcurrant anthocyanins on human umbilical vein endothelial cells

○西山 広亮[1]、七島 直樹[2]、堀江 香代[2]、前多 隼人[1] ([1]弘大院農、[2]弘大院保健)
○Kosuke NISHIYAMA[1], Naoki NANASHIMA[2], Kayo HORIE[2], Hayato MAEDA[1] ([1]Hirodai Univ. of Agric., [2]Hirodai Univ. of Health.)

【目的】カシス(*Ribes nigrum*)には抗酸化作用、抗炎症作用などの生理機能が報告されているアントシアニンが豊富に含まれる。主要なアントシアニンは Delphinidin-3-glucoside(D3G)、Delphinidin-3-rutinoside(D3R)、Cyanidin-3-glucoside(C3G)、Cyanidin-3-rutinoside(C3R)の 4 種類である。また、他の果実と異なり D3R、C3R の含有量が高い特徴を持つ。これまでの研究で更年期モデルラットにカシス抽出物(BCE)を投与したところフィトエストロゲン作用を介した抗動脈硬化作用が示唆された[(1)]。そこで、本研究では BCE 及び含有アントシアニンによるフィトエストロゲン作用について、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を用いた in vitro での評価をおこなった。
【方法】HUVEC 細胞を 24 ウェルプレートに播種し、BCE(0.5、1 μg/ml 又は 2、5 μg/ml)、D3G、D3R、C3G、C3R(10 μM)、及び比較対照としてエストラジオール(10 nM)を添加した。添加 24、48 時間後に細胞を回収し、eNOS(endothelial nitric oxide synthase)、Elastin、ER(estrogen receptor)、ERRα(estrogen-related receptor alpha)の mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR 法で、eNOS のタンパク質発現量をウエスタンブロッティング法で評価した。
【結果】 BCE を 1 μg/ml 添加した細胞では、血管の拡張に関与する eNOS の mRNA 発現量が有意に上昇した。また、添加 48 時間後には血管の柔軟性に関与する Elastin の mRNA 発現量も上昇した。更に BCE を 2、5 μg/ml 添加した細胞では、eNOS タンパク質発現量の増加が確認された。次に主要な含有アントシアニンを細胞に添加し、同様の試験をおこなった。その結果、D3G、D3R、C3G、C3R 添加細胞で eNOS タンパク質発現量の増加が確認された。また、D3R、C3G、C3R 添加 48 時間後の細胞では、ER と同様にエストロゲンの作用に関与するとされる ERRα の mRNA 発現量が上昇した。これらのことから BCE は in vivo の報告と同様に血管内皮細胞に直接作用し、フィトエストロゲン作用による動脈硬化の改善作用を示すことが示唆された。また、含有アントシアニンにも BCE と同様の効果を示す傾向が示された。

[(1)]Nanashima et al. Blackcurrant anthocyanins increase the levels of collagen, elastin, and hyaluronic acid in human skin fibroblasts and ovariectomized rats. Nutrients, 10,495, 2018.

anthocyanin, blackcurrant, phytoestrogenic activity

発表責任者：前多隼人（hayatosp@hirosaki-u.ac.jp）

講演番号：3B1p14
講演日時：3 月 26 日 16:33～ 1 号館 B1 会場

日本酒由来の血栓溶解関連物質

Thrombolytic-related substances derived from sake

○大杉 忠則、高橋 千里、皆川 拓也、馬越 美帆（倉敷芸術科学大学）
○ TADANORI OHSUGI, SENRI TAKAHASHI, TAKUYA MINAGAWA, MIHO UMAKOSHI (Kurashiki Univ. of Sci. and the Arts)

目的

酒は百薬の長などとも言われ、J カーブでも表されるように適量の飲酒は健康維持に役立つことが報告されてきた。機能性食品としての利用も期待され、血圧降下、抗酸化作用、整肌効果、保湿など、その効果は多岐にわたるが、心筋梗塞や脳梗塞予防に繋がる血栓溶解酵素についての研究は少ない。今回の研究では、自然界から我々の研究室で分離した S-41 酵母を用いてから清酒を試験醸造し、イオン交換樹脂として IRC76(弱酸性陽イオン交換樹脂)、IR120BH(強酸性陽イオン交換樹脂)、P-8(弱塩基性陰イオン交換樹脂)を用いたイオン交換クロマトグラフィーにより清酒成分の分画を行い HeLa 細胞が生産する血栓溶解酵素である t-PA に与える影響について調べたので報告する。

方法

分離した酵母を用いて総米 200g、20 日間の小仕込み試験を行い清酒を得た。得られた清酒をイオン交換樹クロマトグラフィーにより分画、pH7.0 に調整し凍結乾燥後、イオン交換水に再溶解し塩基アミノ酸区分、中性および酸性アミノ酸区分、有機酸区分、糖区分の濃縮液を得、試料とした。
24 ウェルプレートでコンフルエント状態にした HeLa 細胞に添加し、37℃、5%CO_2 条件下で 24 時間培養し、t-PA 活性を合成基質 H-D-Ile-Pro-Arg-pNA、mRNA 発現量を RT-PCR により測定した。

結果および考察

清酒原液を 1.0 とした場合の相対で値終濃度 0.69 の中性および酸性アミノ酸区分の添加により、非添加のコントロールに比べ 100 万細胞あたりの t-PA 活性は約 1.4 倍に増加した。4 種類の協会酵母を同様に用いて醸造した清酒、３種類の市販清酒より同様の区分を作成し比較したところ S-41 酵母を使った清酒が最も高い活性を示した。リアルタイム RT-PCR により t-PAmRNA 発現量の変化を調べたところコントロールに比べ約 2.7 倍高まっており、t-PA 活性の上昇は発現量の増加であることが確認された。これまで酒類のアルコールおよび香気成分が血のめぐりに与える影響について報告されてきたが、アミノ酸、低分子ペプチドによる t-PA 合成の亢進作用が認められ、ノンアルコール分野での利用も期待できると考えられる。

sake, fibrinolysis, t-PA

講演番号：3B2a01
講演日時：3 月 26 日 09:00～ 1 号館 B2 会場

キシロースの存在下でタンパク質の酸加水分解により形成される新規メイラード色素フルペンチアジネートの構造解析

Structural Analysis of a Novel Maillard Pigment, Furpenthiazinate, Formed by Acid-hydrolysis of Protein in the Presence of Xylose

○野田 響子[1]、増崎 瑠里子[1]、寺内 優花[1]、山田 眞二[2]、村田 容常[1] ([1]お茶大食物、[2]お茶大化学)
○ Kyoko NODA[1], Ruriko MASUZAKI[1], Yuka TERAUCHI[1], Shinji YAMADA[2], Masatsune MURATA[1] ([1]Department of Nutrition and Food Science, Ochanomizu Univ., [2]Department of Chemistry, Ochanomizu Univ.)

【背景・目的】 タンパク質と糖のメイラード反応について調べるため、大豆タンンパク質とキシロースを加熱した反応溶液を、2 N HCl で酸加水分解し、DAD-HPLC (カラム、ODS; 溶離液、MeOH・0.1% TFA 水溶液系; 検出、220-500 nm) で分析したところ、400 nm に極大吸収を示す未知のピーク SX1 を確認した。昨年度の本大会において、SX1 は、キシロースを酸性条件で加熱することにより生成する主要化合物であるフルフラールと、システインを強酸性条件下で加熱することによっても生成することを明らかにし、予想構造式を報告した。本研究は、昨年度の続報として、システインとフルフラールの反応液より SX1 を再度精製したものを還元して単離し、還元体を構造解析することにより SX1 の構造式を決定し、フルペンチアジネート (furpenthiazinate) と命名したため、これを報告する。

【方法】 フルフラールとシステインをそれぞれ 1.3%、0.1%となるように 2 N HCl (500 mL) に溶解し、2 時間還流加熱した反応溶液を合成吸着樹脂 (ダイヤイオン HP20; 溶離液、水・MeOH 系)、ODS (溶離液、水・MeOH 系) を用いたクロマトグラフィーにより単離し、SX1 の粉末約 60 mg を得た。SX1 6 mg を 5 mL の蒸留水に溶解して $NaBH_4$ を 1 mg 添加し、1 時間室温で放置することで、SX1 を還元した。合成吸着樹脂を用いたクロマトグラフィー、分取用 ODS-HPLC (溶離液、MeOH:0.1% ギ酸水溶液=1:3) により還元 SX1 を単離し、約 1 mg の粉末を得、MS、NMR に供した。また、還元 SX1 を少量の MeOH に溶解し、室温に放置することで還元 SX1 の結晶を得たため、これを X 線結晶構造解析に供した。

【結果】 SX1 の質量分析の結果、分子式を $C_{12}H_{11}NO_3S$ と予測した。NMR スペクトル解析した結果、11 個の炭素が認められ、フラン環とシステイン由来の部分構造とイミンを持つことが示された。質量分析により予想される炭素数と、NMR で観測される炭素数が異なることと、イミンを持つことが予測されたことから、SX1 は互変異性によりプロトン交換性の重溶媒では観測し難い炭素や水素を持つ可能性が考えられた。そこで、SX1 を $NaBH_4$ により還元し、MS、NMR、X 線結晶構造解析に供した結果、還元 SX1 の構造式を 7-(2-furanyl)-2,3,4,4a,5,6-hexahydrocyclopenta[*b*][1,4]thiazin-4-ium-3-carboxylate と決定した。これにより、SX1 の構造式を 7-(2-furanyl)-2,3,5,6-tetrahydrocyclopenta[*b*][1,4]thiazin-3-carboxylic acid と決定した。本化合物はフリル基とカルボキシル基を有する新規シクロペンタチアジン誘導体であることから、フルペンチアジネートと命名した。

Maillard reaction, cysteine, soy protein

講演番号：3B2a02
講演日時：3 月 26 日 09:11～ 1 号館 B2 会場

カルノシンとキシロースのメイラード反応で形成される低分子黄色色素の同定

Identification of low molecular weight yellow pigments formed from the Maillard reaction of carnosine and xylose

○能見 祐理、山崎 健人、佐藤 眞治、松本 均（新潟薬大・応用生命）
○Yuri NOMI, Kento YAMAZAKI, Shinji SATO, Hitoshi MATSUMOTO (Niigata Univ. of Pharm. and Appl. life sci.)

【目的】
メイラード反応は食品の加工・調理、貯蔵中に起こる非酵素的褐変反応であり、pH や温度など反応条件の違いによって多種多様な生成物が形成されることが知られている。メイラード反応による褐変は、低分子呈色化合物がタンパク質側鎖のアミノ基に多数形成されることにより高分子呈色構造が形成されている可能性が指摘されていることから、塩基性アミノ酸由来の低分子呈色化合物に関する研究が盛んに行われてきた。しかしながら、ジペプチド由来のメイラード反応生成物の化学構造に関する報告はまだ少ないのが現状である。本研究では、畜肉食品に多く含まれているイミダゾールジペプチドのカルノシンに着目し、各種反応条件下における低分子色素の探索と同定を行った。
【方法】
カルノシン(Car)とグルコース(Glc)またはキシロース(Xyl) (各 30 mM)を 200 mM リン酸(pH 7.0)または酢酸(pH 5.0)緩衝液に溶解し、95℃で 1-5 時間加熱した。これら加熱試料を HPLC-DAD で分析し、反応生成物の解析を行ったところ、Car-Xyl 溶液(pH 5.0)にて、400 nm に吸収を示す黄色呈色ピークを複数検出したため、これら化合物の単離を試みた。Car と Xyl (各 45 mM)を 85℃で 6 時間加熱した試料溶液を 3 L 調製し、ODS カラムクロマトグラフィ、分取 HPLC による分画、単離を行った。単離できた黄色色素について MS、NMR による構造解析を行った。
【結果】
HPLC-DAD 分析の結果、Car-Xyl 加熱溶液(pH 5.0)にて 450 nm に極大吸収を示す 4 つのピークを検出した。さらに、分取 HPLC による単離の結果、2 つの色素(Peak 2, 3)を単離することができた。構造解析の結果、peak 3 は Car 2 分子のアミノ基に pyrrolyl-methylidene-pyrrolone 環が形成された構造をしていた。また、peak 2 は peak 3 に hydroxymethyl 基が付加した構造であることが示唆された。同様の chromophore 構造を有する dipyrrolone(DPL)類はリジンと五炭糖の反応により特異的に形成される黄色色素として報告されており [1]、その形成にはリジンの ε-アミノ基が必須であると考えられていたが、カルノシン単独でも形成されることが明らかとなった。

[1] Sakamoto J, Takenaka M, Ono H, and Murata M, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 73, 2065-2069 (2009).

carnosine, Maillard reaction, pigments

発表責任者：能見祐理（ynomi@nupals.ac.jp）

講演番号：3B2a03
講演日時：3 月 26 日 09:22～ 1 号館 B2 会場

オービトラップ LC/MS による合成系色素 69 種の一斉分析法の検討

69 types artifitial color　analysis by orbitrap LC/MS

○大城 沙織、箕川 剛、平岡 佑理、浜崎 孝治、西山 浩司、中島 光一（三栄源エフ・エフ・アイ株式会社）
○Saori OHKI, Tsuyoshi MIKAWA, Yuri HIRAOKA, Kouji HAMASAKI, Kouji NISHIYAMA, Kouitchi NAKASHIMA (San-Ei　Gen F.F.I.,Inc.)

【目的】　1990 年以降、消費者の健康志向に伴い、食用色素は天然系色素の需要が増加してきた。合成系色素は高安定性で安価だが、天然系色素は色素成分の混合物のため天然物ならではのバラツキが生じる。色素メーカーは製品化の過程でバラツキを補正し、品質管理するための天然系色素はコスト高となる。こういった背景から、色素メーカーは安価な原料の調達を図るが、海外の安価原料には合成系色素が混入したものが散見される。そこで演者らは、自社での原料品質管理を目的にオービトラップ LC/MS を用いて食用および食用指定外の合成系色素 69 種の一斉分析法を検討した。

【方法】

1.試薬

食用および指定外合成系色素標準品:東京化成工業社品および自社管理品。

2.オービトラップ LC/MS 測定条件

カラム:Inertsil ODS-4 (2.1mm i.d.×150mm 3μm)。移動相: 0.1%ギ酸アンモニウム水溶液/MeCN。流速:0.2mL/min。イオン化法:ESI スプレー電圧:3.0kV、キャピラリー温度:300℃。分解能 140000、Isolation Window:0.4m/z。

3.紅花花弁中の合成系色素の検出の検討

中国産の紅花花弁 1g に赤色 102 号（1ppm 相当）水溶液をスプレーして添加し、乾燥後に水 10mL で抽出して紅花色素の合成系色素混入モデル液とした。

【結果】

オービトラップ LC/MS での分析実績がある合成系色素の文献情報を集約し、合成系色素 69 種の定性ターゲットイオンリストを作成した。その実用性について、入手可能であった標準品 36 種を実測して評価した結果、標準品 36 種全てが、作成したリストの定性ターゲットイオンリストで検出、定性できた。紅花花弁への合成系色素赤色 102 号の添加回収試験の結果、紅花花弁中の赤色 102 号が検出でき、検出限界は 10ng/mL であった。今後はより多くの標準品で文献値との照合を進めて定性イオンリストを拡張し、バリデーションを進めていく。

orbitrap LC/MS, natural food color, quality control

発表責任者：箕川　剛（tsuyoshi-mikawa@saneigenffi.co.jp）

講演番号：3B2a04
講演日時：3 月 26 日 09:33～ 1 号館 B2 会場

Orbitrap-LC/MS による紫サツマイモアントシアニン成分の網羅的分析法の検討

Study of Orbitrap-LC / MS AIF analysis method for purple sweet potato anthocyanin

○箕川 剛、石橋 諒、大城 沙織、浜崎 孝治、西野 雅之（三栄源エフ・エフ・アイ）
○Tsuyoshi MIKAWA, Ryo ISHIBASHI, Saori OKI, Kohji HAMASAKI, Masayuki NISHINO (San-Ei Gen F.F.I. Inc.)

【目的】 アントシアニンに代表される天然色素成分は、複数の類縁化合物の集合体で、その組成は原料植物の品種や生育期間によって異なる。そのため、成分個別に標準品をもって定量することが難しい。演者らは、標準品がないアントシアニン成分個別に、簡便、迅速に同定・定量する分析法構築を目指した。
具体的には、Orbitrap-LC/MS に紫サツマイモアントシアニン試料を供し、All Ion Fragmentation（AIF）モードの MS/MS 測定上で得られる各色素成分のアグリコンフラグメントイオンのピーク面積に対して、同測定で得た市販アグリコン成分標準品の同イオンピーク面積から作成した検量線が定量性を付与できるか検討したので報告する。
【方法】1. 試料・試薬
アヤムラサキ品種の紫サツマイモアントシアニンを試料とした。アグリコンのペオニジン（Pn）、シアニジン（Cy）と、それぞれの配糖体標準品（Pn-3-glc、Cy-3-glc）は、和光純薬工業社製を用いた。
2. AIF 測定条件の最適化
試料及び Pn-3-glc、Cy-3-glc を HCD10 から 100 まで個別に設定した AIF 測定条件に供し、それぞれから得られる Pn、Cy イオンのピーク面積値を求めた。
3. Orbitrap-LC/MS 条件
装置：Thermo Scinetific 社製 Q-Exactive HPLC システム、カラム：GL サイエンス社製 InertsilODS-4（2.1mm i.d.×150mm、3μm）、移動相：0.1%ギ酸水（A）/MeCN（B）、グラジエント条件：B 5%（0 分）→18%（15 分）→70%（40-42 分）、流量：0.2mL/分。イオン化法：ESI positive、Scan m/z 150-2000、HCD energy：Stepped NCE20/40/60、測定イオン：Pn（m/z 301.0699）、Cy（m/z 287.0537）。
【結果】 HCD40 での検出感度が最も高く、AIF 測定設定値（Stepped NCE）は 20/40/60 が最適であった。本条件で、Pn、Cy 標準品の同イオンピーク面積値を検量線に試料を AIF 測定した結果、紫サツマイモアントシアニン成分について同定すると共に定量性を付与できる可能性が示唆された。

Orbitrap-LC/MS, All ion fragmentation, purple sweet potato anthocyanin

発表責任者：箕川 剛（tsuyoshi-mikawa@saneigenffi.co.jp）

講演番号：3B2a05
講演日時：3 月 26 日 09:44～ 1 号館 B2 会場

Orbitrap-LCMS によるクチナシ黄色素成分の網羅的分析法の検討

Study of Orbitrap-LCMS AIF analysis method for Gardenia Yellow

○石橋 諒、箕川 剛、大城 沙織、中島 光一、西野 雅之（三栄源エフ・エフ・アイ株式会社）
○Ryo ISHIBASHI, Tsuyoshi MIKAWA, Saori OHKI, Kouichi NAKASHIMA, Masayuki NISHINO (San-Ei Gen F.F.I.,Inc.)

【目的】 クロシンに代表される天然色素成分は、複数の類縁化合物の集合体で、その組成は原料植物の品種や生産国によって異なる。そのため、成分個別に標準品をもって定量することが難しい。演者らは、標準品がないクロシン類縁成分を個別に、簡便、迅速に同定・定量する分析法構築を目指した。

具体的には、Orbitrap-LC/MS にクチナシ果実由来のクロセチン及びその配糖体を供し、All Ion Fragmentation（AIF）モードの MS/MS 測定上で得られる各色素成分のアグリコンフラグメントイオンのピーク面積に対して、同測定で得た市販アグリコン成分標準品の同イオンピーク面積から作成した検量線が定量性を付与できるか検討したので報告する。

【方法】1.試料・試薬

クチナシ果実の水抽出液を試料とした。アグリコンのクロセチンと、その配糖体であるクロシンの標準品は、和光純薬工業社製を用いた。

2. AIF 測定条件の最適化

試料及びクロシンを HCD10 から 100 まで個別に設定した AIF 測定条件に供し、それぞれから得られるクロセチンイオンのピーク面積値を求めた。

3. Orbitrap-LC/MS 条件

装置: Thermo Fisher Scinetific 社製 Q-Exactive HPLC システム、カラム: GL サイエンス社製 InertsilODS-4（2.1mm i.d.×150mm、3μm）、移動相:0.1%ギ酸水（A）/MeCN（B）、グラジエント条件:B 0%(0 分)→10%(10 分)→30%(30 分)→100%(60 分)→100%(70 分)、流量:0.2mL/分。イオン化法:ESI negative、Scan m/z 100-1000、HCD energy: Stepped NCE10/20/30、測定イオン:クロセチン（m/z 327.1620）。

【結果】 HCD20 での検出感度が最も高く、AIF 測定設定値（Stepped NCE）は 10/20/30 が最適であった。本条件でクロセチン標準品の同イオンピーク面積値を検量線に試料を AIF 測定した結果、クチナシ果実由来クロセチン、及びその配糖体について同定すると共に定量性を付与できる可能性が示唆された。

Orbitrap-LCMS, Gardenia Yellow, All Ion Fragmentation

発表責任者：石橋諒（ryo-ishibashi@saneigenffi.co.jp）

講演番号：3B2a06
講演日時：3 月 26 日 10:05～ 1 号館 B2 会場

ショ糖及びゲル化剤添加によるバラシロップの退色抑制方法の検討

Inhibitory effect of sucrose and gelling agents on discoloration of rose syrup

○中西 未佳、勝野 那嘉子、西津 貴久 (岐阜大学)
○Mika NAKANISHI, Nakako KATSUNO, Takahisa NISHIZU (Gifu Univ.)

【目的】 バラシロップは，バラ花弁からバラそのものの色や香りを抽出した商品である。鮮やかな赤色を呈しているが，常温で保存した場合，時間の経過と共に退色することが問題となっている。先行研究により，バラ色素の主成分はシアニジン-3,5-ジグルコシドであり，その色素の退色抑制方法として，バラシロップに非還元糖を添加すると，色素が安定化することが明らかとなっている[1)]。しかし，ショ糖濃度と色素安定性との関係や，多糖などのゲル化剤の添加による退色抑制については検討していなかった。そこで本研究では，ショ糖の濃度やゲル化剤の種類が，アントシアニンの安定性に及ぼす影響を明らかにし，バラシロップの効果的な退色抑制方法を見出すことを目的とした。

【実験方法】 バラ抽出液，及びシアニジン-3-グルコシドクロリド溶液を使用し，ショ糖濃度が 0～60 %のシロップを作製した。各シロップを 40 ℃の恒温器中で 1 ヶ月間加速試験を行い，シアニジン配糖体含量を HPLC 分析にて定量した。

バラ抽出液を使用し，ゲル化剤として 9 種類のゼラチン，3 種類のペクチンをそれぞれ添加した 12 種類のゲルを作製した。ゲル化剤を添加せず，ショ糖のみを添加したものをコントロールとした。これらの試料を 25 ℃，約 30,000 lx の蛍光灯照射下で 6 ヶ月間保存した。保存後の試料は 1 %塩酸メタノールにより色素を抽出し，HPLC 分析に供した。次に，シアニジン-3-グルコシドクロリドを使用し，ゲル化剤の濃度を変えて作製したゲルを試料として，同様に 2 ヶ月間保存試験を行い，シアニジン-3-グルコシド含量の変化を分析した。

【結果及び考察】 ショ糖濃度がバラ抽出液の色素安定性に及ぼす影響を検討したところ，ショ糖濃度が高いほど，抽出液中のシアニジン配糖体の退色抑制効果を示した。一方で，色素としてシアニジン-3-グルコシドのみを含む溶液においては，ショ糖添加により退色が促進された。

次に，ゲル化剤の添加がバラ抽出液の退色挙動に及ぼす影響を検討したところ，ゼラチンの中では酸処理でゲル強度が大きなものがより退色抑制効果を示した。また，ペクチンの中では低メトキシペクチンが退色抑制効果を示した。一方で，色素としてシアニジン-3-グルコシドのみを含むゲルにおいては，ゲル化剤添加により退色が促進された。これらの結果から，バラシロップについては，高濃度のショ糖添加やゲル化剤の添加が退色抑制に有効であり，色素の安定化には，バラ抽出液に含まれる色素以外の成分も重要であることが示唆された。

1)佐藤玲菜ら，日本食品科学工学会第 64 回大会 講演要旨集 2017 年

anthocyanin, rose syrup, discoloration

講演番号：3B2a07
講演日時：3 月 26 日 10:16～ 1 号館 B2 会場

核酸によるアントシアニンの深色および安定化効果の検証-細菌由来の核酸について-

Verification of bathochromic shift and stabilization effect of anthocyanin by nucleic acid - nucleic acid extracted from bacteria-

○渡辺 つかさ[1]、内野 昌孝[2]、野口 治子[3]、高野 克己[4]([1]東京農大院農・農化、[2]東京農大生命・微生物、[3]東京農大農・デザイン、[4]東京農大応生・農化)
○ Tsukasa WATANABE[1], Masataka UCHINO[2], Haruko NOGUCHI[3], Katsumi TAKANO[4] ([1]Agrichem.,Agr.,Grad.Sch.,Tokyo Univ.Agric., [2]Dept.Microbiol.,Fac.Lifesci.,Tokyo Univ.Agric., [3]Dept.Agriinnov.,Fac.Agric., Tokyo Univ.Agric., [4]Dept.Agrichem.,Fac.Biosci.,Tokyo Univ.Agric.)

【目的】

アントシアニン（AN）は植物に普遍的に存在する赤色や赤紫色の水溶性色素成分で、その鮮やかな色調のため広く加工食品にも利用されている。AN の色調は不安定で、光、熱、酸化物など様々な要因で分解退色することが報告されている。これまでの研究において、AN に酵母エキスを添加することで AN の色調を鮮やかにし、安定性を向上させる効果があることを発見した。さらに、酵母エキス中の核酸化合物が発色効果の主体であることを確認しているが、他の生物種由来の核酸でも同様の発色効果が存在するのかは不明である。そこで本発表では、酵母エキスより調製した核酸および、他の生物種としてグラム陰性菌の核酸を用いて、その色調改善効果について報告する。

【方法】

AN はパッションフルーツ果皮より水にて抽出し Sep-Pak C18 にて精製し、試験に供した。酵母エキスは興人ライフサイエンス社製のアジレックス NH を使用し、核酸はフェノール・クロロホルム法にて抽出した。他の生物種としてグラム陰性菌である大腸菌（E）とシュードモナス（P）を利用した。培養した各菌体を、超音波破砕または SDS の 2 種類の方法で処理し、酵母エキスと同様、フェノール・クロロホルム法にて核酸を抽出した。また、それぞれの核酸分子サイズを確認するために、アガロースゲル電気泳動を行った。各抽出核酸を、AN 溶液に終濃度 114.0μg/ml の核酸を添加した。色調は吸光スペクトル（400-600nm）および色差（CIE L*a*b*法）にて測定した。

【結果】

核酸の電気泳動において、酵母エキスの核酸では 500bp 以下にスメアなバンド、E および P の超音波破砕処理抽出核酸は 4500bp 以下にスメアなバンド、SDS 処理抽出核酸は E で 100bp 以下にスメアなバンド、P では 1000～2000bp 付近のバンドが薄くなり、100bp 以下にスメアなバンドを確認した。AN の色調は全ての核酸で発色を示し、吸光度の上昇は、酵母エキスの核酸と P-SDS 処理核酸で 501-600nm、E および P-超音波処理核酸で 510-600nm、E-SDS 処理核酸で 400-600nm にて確認した。また全ての核酸添加において最大吸収波長が長波長側へ移行し、特に超音波処理核酸にて大きな傾向を示した。色差は全ての核酸添加において a*値の上昇および b*値の低下がみられ、特に超音波処理核酸では a*値の上昇よりも b*値の低下が大きく、酵母エキスの核酸よりも b*値の変化が顕著であった。

anthocyanin, nucleic acid, discoloration

講演番号：3B2a08
講演日時：3 月 26 日 10:27～ 1 号館 B2 会場

乳化剤によるクロロフィルの光退色抑制作用

Suppression effect of emulsifiers on light-discoloration of chlorophyll

○安田 みどり[1]、田端 正明[2]、澁谷 茉希[1]、城下 友花[1] ([1]西九大健栄、[2]佐賀大理工)
○Midori YASUDA[1], Masaaki TABATA[2], Maki SHIBUTANI[1], Yuka SHIROSHITA[1] ([1]Nishikyushu Univ., [2]Saga Univ.)

【目的】緑色色素であるクロロフィルは、野菜や緑茶の新鮮さや美味しさの重要な要素となっている。しかし、食品中のクロロフィルは光に弱く、退色されやすいことが知られている。これまでの研究では、水-アルコール系でクロロフィルの光退色について調べた結果、水の割合が多い場合にクロロフィルの光退色を抑えることができることがわかった[1)]。そして、これはクロロフィルが小さな凝集体を形成するためであることも明らかにした。本研究では、これを食品に応用するために、食品添加物の乳化剤を用いることにより、クロロフィルの退色を防ぐことができるのかについて検討を行った。
【方法】クロロフィルは、クロロフィル-a を用い、エタノールに溶解した。乳化剤は、ショ糖脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、キラヤサポニンを用いた。乳化剤は、0.01M Tris-HCl 緩衝溶液（pH 7.5）に溶解し、異なる乳化剤の濃度のクロロフィル溶液（クロロフィル濃度：1×10^{-5} M、エタノール濃度：0.5%）を調製した。乳化剤の濃度は、表面張力の測定により決定した。サンプル溶液は、調製後、それぞれメンブランフィルター（800 μm）にてろ過を行い、ポリエチレンテレフタレート（PET）製の透明容器に入れた。クロロフィルの光退色試験は、サンプル溶液に UV（波長：336 nm、強度：0.7-0.8 mW/cm^2）を照射し、時間毎にそれぞれ色差、UV-Vis スペクトルの測定を行った。なお、光照射試験では、比較として、クロロフィルのエタノール溶液（1×10^{-5} M）を用いた。
【結果】乳化剤の表面張力を測定した結果、ショ糖脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、キラヤサポニンの臨界ミセル濃度（CMC）はそれぞれ、0.002、0.0025、0.005%となったことから、乳化剤の濃度は、この前後の濃度とした。色差の測定の結果、ソルビタン脂肪酸エステルは、光照射時間とともに-a*値が減少し、18 時間後に 0 に近くなった。これは、エタノール溶液と同様の結果であった。一方、ショ糖脂肪酸エステルとキラヤサポニンは、エタノール溶液と比べてクロロフィルの退色を抑制した。特に、キラヤサポニンでは 24 時間後であっても、約半分の-a*値を示し、著しい抑制効果が認められた。UV-Vis スペクトルを測定した結果、エタノール溶液では 665 nm にシャープなピークが認められたが、乳化剤を用いた場合は、ピークがより高波長側にシフトした。特に、キラヤサポニンではそれが顕著で、710 nm 付近にショルダーのピークもみられた。これは、クロロフィルの凝集体の形成によるものと考えられる。以上のことから、乳化剤はクロロフィルの凝集体を形成して、光退色を防ぐことが明らかになった。

1) Yasuda, M., *et al.*, Food Chem., **277**, 463-470 (2019)

chlorophyll, light-discoloration, emulsifier

発表責任者：安田みどり（midori@nisikyu-u.ac.jp）

講演番号：3B2a09
講演日時：3 月 26 日 10:38～ 1 号館 B2 会場

アラビカ種コーヒーの特徴香とその形成要因

Characterization of the unique aroma of *Coffea arabica* and its formation

○馬場 良子、大和 礼奈、樋口 可南子、松田 知子、熊沢 賢二 (小川香料(株))
○Ryoko BABA, Reina YAMATO, Kanako HIGUCHI, Tomoko MATSUDA, Kenji KUMAZAWA (Ogawa & Co., Ltd.)

【目的】香りは、コーヒーのおいしさを決定づける重要な要素のひとつである。コーヒーの香りは、品種によって大きく異なり、特有の芳醇な香りを有するアラビカ種が日本や欧米を中心に好まれている。このように魅力的なアラビカ種の香りを解明するため、これまでに数多くの研究が行われ、既に多数の香気成分が明らかにされている。しかし、アラビカ種に特有の芳醇な香り（品種特徴香）と成分の関係、さらに、品種特徴香の形成要因は、未だ明確になっていない。そこで、本研究では、ロブスタ種を比較対照として、アラビカ種の特徴香とその香りに寄与する成分の解明を試みた。さらに、明らかにした寄与成分の生成に関わる成分量をロブスタ種と比較し、アラビカ種の特徴香の形成要因を検討した。
【方法】アラビカ種はコロンビアスプレモ、ロブスタ種はベトナムロブスタ G1 のコーヒー豆を実験試料とした。粉砕直後のコーヒー豆（L 値=18）香気を、QDA 法による官能評価および Dynamic Headspace 法にて捕集した香気濃縮物の Aroma Extract Dilution Analysis（AEDA）にて比較した。さらに、コーヒー豆（焙煎豆と生豆）に含まれる香気成分と遊離糖（ショ糖）を、それぞれ SPME 法による GC-MS と HPLC にて比較した。
【結果】アラビカ種とロブスタ種を官能評価で比較した結果、サワー、フローラル、フルーティーな香調がアラビカ種の特徴香であることが明らかになった。一方、AEDA の比較では、キャッティーな香調を有する 3-mercapto-3-methylbutyl formate（MMBF）がアラビカ種で特異的に高い FD ファクターを示したが、この成分の香調は官能評価での特徴香とは一致しなかった。そこで、ロブスタ種のコーヒー豆に MMBF を添加したところ、サワー、フルーティーな香調が増強されたことから、アラビカ種の特徴香は、MMBF が他のコーヒー香気成分と相互作用することで形成されることを推察した。コーヒーの MMBF は、3-methyl-2-buten-1-ol（prenol）から 3-mercapto-3-methylbutanol（MMB）、さらに、ギ酸とのエステル化を経て焙煎中に生じる可能性が指摘されている [1)]。そこで、これらの反応中間体（prenol、MMB）とギ酸の前駆体であるショ糖 [2)]含量を両品種で比較した結果、いずれの成分もアラビカ種はロブスタ種よりも多く含むことが明らかになった。以上の結果は、アラビカ種における特徴香の形成が、焙煎により生じる MMBF を多く含むこと、すなわち、MMBF 生成に関与する成分を多く含むことに起因する可能性を示すものである。

1) Holscher, W. *et al.*：*J. Agric. Food Chem.*, 40, 655-658 (1992)
2) 中林敏郎：*日食工誌*, 25, 257-261 (1978)

coffee, aroma, flavor

講演番号：3B2a10
講演日時：3 月 26 日 10:49～ 1 号館 B2 会場

乳化剤がパンケーキの香気成分リリースに及ぼす影響
Influence of emulsifiers on release of aroma components of pancake
○恩田 佳奈、勝野 那嘉子、西津 貴久（岐阜大学）
○Kana ONDA, Nakako KATSUNO, Takahisa NISHIZU (Gifu Univ.)

【目的】
パンケーキには香料としてバニラパウダーが添加されている。老化抑制や起泡性の補助などを目的としてパンケーキに乳化剤を添加すると，パンケーキから放出されるバニラパウダー由来の甘い香りが弱くなることが経験的に知られている。しかし，乳化剤添加による香気成分リリースの低下についての詳細は明らかになっていない。そこで本研究では，乳化剤がパンケーキの香気成分リリースに及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。
【実験方法】
乳化剤を添加していないパンケーキと乳化剤を添加したパンケーキを作製した。これらのパンケーキの製造中の生地または焼成後のパンケーキを各工程で抜き取り，試料とした。香料の主成分であるバニリンは，ジエチルエーテルを用いた溶剤抽出法によりパンケーキ及びその生地から抽出した。ヘッドスペース中のバニリンは SPME 法（使用ファイバー：65μm PDMS/DVB, Stableflex）により抽出した。抽出したバニリンは GC-FID を用いて分析した。次に，材料から卵または牛乳のみ抜いたパンケーキ及び卵と牛乳の両方を抜いたパンケーキを作製し，それらのパンケーキ中に残存するバニリンを同様の方法で抽出し，GC-FID にて分析した。
【結果及び考察】
乳化剤を添加したパンケーキの方が乳化剤無添加のパンケーキよりもバニリンのリリース量が多いことが明らかになった。また，製造工程のどの段階でも乳化剤を添加した方がバニリンのリリース量が多く，特にミキシング工程で乳化剤を添加した時にバニリンが多くリリースしていた。次に，バニリンのリリースにおいて乳化剤の影響を受ける材料を特定するために，卵や牛乳を抜いたパンケーキを用いて分析を行った。その結果，卵のみ抜いたパンケーキは，牛乳のみ抜いたパンケーキや卵と牛乳の両方を抜いたパンケーキよりバニリンの残存量が多かったことから，パンケーキ中のバニリンは牛乳成分に取り込まれていることが示唆された。また，牛乳のみ抜いたパンケーキや卵と牛乳の両方を抜いたパンケーキにおいては，乳化剤の有無による有意差は認められなかったが，卵のみ抜いたパンケーキにおいては，乳化剤を添加した方がバニリンの残存量が少なかった。この結果から，バニリンのリリースにおいて乳化剤の影響をより受けやすい材料は牛乳であると推定された。

pancake, aroma release, emulsifier

講演番号：3B2a11
講演日時：3 月 26 日 11:10～ 1 号館 B2 会場

増粘剤が鼻腔内到達香気成分量に及ぼす影響

The effect of thickener on orthonasal and retronasal odorant transport

○中田 勇二、北田 亮、林 和寛（味の素株式会社）
○Yuji NAKADA, Ryo KITADA, Kazuhiro HAYASHI (AJINOMOTO.CO.,INC.)

【目的】増粘剤を用いると食感のみならず、呈味や香気の強度や質に変化が生じたように感じられる。香気成分は、試料を口に含む前は容器上の気相（ヘッドスペース）に放散され、鼻孔からオルソネーザル経路で鼻腔内に到達し、試料を口に含んだ後は口腔内の気相に放散され、呼気とともにレトロネーザル経路で鼻腔内に到達し、それぞれ、鼻腔内の嗅上皮に結合する。演者らは、香気成分固有の水－空気分配係数（LogPwa）の高い成分は、オルソネーザル経路に対してレトロネーザル経路で鼻腔内に到達する成分量比率が相対的に高いことを確認した。[1)] そこで本研究では、LogPwa の異なる香気成分水溶液を用いて、両経路における鼻腔内到達成分量へ及ぼす増粘剤の添加効果に違いがあるか把握することを目的にした。

【方法】香気成分は、Limonene、Nonanal、Ethylbenzoate、Benzaldehyde、2−Methylpyrazine、増粘剤は、Pectin 及び Xanthan を用いた。香気成分及び増粘剤を水に溶解させ試料とした。まず、試料を入れ平衡化させた密閉容器中のヘッドスペースに放散された香気成分量を測定した。次に、試料 10ml を口に含みアダプターを鼻孔に装着し、約 20 秒口に保持した後に 1 回で嚥下し、3 秒に一回の呼吸サイクルで約 1 分間の呼気中香気成分量を測定した。測定には、Micromass 社製 APCI-MS（Atmospheric Pressure Chemical Ionization - Mass Spectrometer）を用いた。

【結果】ヘッドスペースに放散される香気成分量は、測定開始後瞬時に最大値を示し、その後頭打ちとなった。呼気中に含まれる香気成分量は、口に含み嚥下した直後に最大値を示し、その後減少した。何れの試料においても呼気中香気成分量は、ヘッドスペース香気成分量より低値であった。増粘剤添加によるヘッドスペース香気成分量は、Limonene と Nonanal が抑制効果を、Ethylbenzoate、Benzaldehyde、2−Methylpyrazine が増強効果を示した。増粘剤添加による呼気中香気成分量は、Limonene と Nonanal の増強効果が顕著であるのに対し、Ethylbenzoate、Benzaldehyde、2−Methylpyrazine の増強効果は僅かであった。本検討から、香気成分の種類により増粘剤のオルソネーザル経路及びレトロネーザル経路で鼻腔に到達する成分量への効果が異なることが明らかとなり、増粘剤添加によるオルソネーザル香及びレトロネーザル香の強度や質の変化を理解する手掛りになる可能性が示された。

１）中田勇二ほか、日本食品科学工学会第 65 回大会講演集、3Aa7

thickener, aroma release, retronasal odorant transport

発表責任者：中田　勇二（yuuji_nakada@ajinomoto.com）

講演番号：3B2a12
講演日時：3 月 26 日 11:21～ 1 号館 B2 会場

醸造用ブドウの成熟期における香気成分蓄積への栽培地の影響
Influence of climatic conditions in the growing site on the accumulation of flavor compounds in the ripening berries of wine grapes

○小山 和哉[1]、ガリド シャロン - マリエ[1]、大浜 友子[1]、前島 勤[2]、根本 学[3]、齋藤 浩[4]、後藤（山本） 奈美[1]（[1]酒総研、[2]長野果樹試、[3]北農研、[4]山梨県ワイン酒造組合）
○ Kazuya KOYAMA[1], Sharon-Marie GARRIDO[1], Tomoko OHAMA[1], Tsutomu MAEJIMA[2], Manabu NEMOTO[3], Hiroshi SAITO[4], Nami GOTO-YAMAMOTO[1] ([1]National Research Institute of Brewing, [2]Nagano Fruit Tree Experiment Station, [3]NARO Hokkaido Agricultural Research Center, [4]The Yamanashi Prefecture Wine Manufacturers' Association)

【目的】醸造用ブドウは，種々の香気成分の前駆体を果実中に蓄積し，特に白ワイン用ブドウの品質にとって重要なファクターである。栽培地の気象条件は，香気成分前駆体の蓄積，さらにワインの品質へ大きな影響をもつことが知られている。しかし，日本の各ワイン産地で栽培されるブドウの香気成分前駆体の蓄積に関するデータは限られている。そこで，全国のワイン産地でワイン用ブドウ果実中の香気成分の蓄積を調査し，圃場間の違いを明らかとするとともに，栽培地の気象条件が熟期の香気成分前駆体の蓄積に及ぼす影響について明らかとすることを目的とした。
【方法】平成 28 年度から 30 年度までの 3 年間、北海道，長野，山梨，広島の約 30 か所の気象観測装置を設置したブドウ圃場の協力を得て，代表的な白ワイン用ブドウであるソーヴィニヨンブラン，及びケルナーの果粒を成熟期に 1 週間毎に収穫期後までサンプリングを行った。ブドウ果実中の香気成分（結合型，遊離型）の網羅的分析には凍結した果粒を破砕して用いた。固相抽出カラムを用いて分画した結合型香気成分画分は，酵素及び熱処理によって分解し，遊離した香気成分を SBSE-GCMS 法によって分析した。また，微量香気成分として，果汁中に含まれる 3MH (3 メルカプトヘキサノール)前駆体（グルタチオン，システイン抱合体）は, LCMSMS (Waters)を用いて MRM モードにて定量を行った（60%搾汁果汁を使用)。ソーヴィニヨンブラン中のメトキシピラジンは，凍結果粒を使用し，SPME-GCMS/MS 法により分析を行った。気象データは、気象センサー（ウェザーバケット、（株）エスイーシー）を使用して気温、降水量、湿度、日射量、風速等のデータの取得を行った。
【結果と考察】3 か年にわたるソーヴィニヨンブラン果実中の香気成分（結合型，遊離型）の網羅的解析によって，圃場間の香気成分組成の違いが顕著にみられることが明らかになった。また，寒冷地である北海道のサンプルでは，香気成分の組成に特徴がみられた。これらの特徴的な成分の蓄積と各種気象要因との関連を OPLS 解析によって調べたところ、成熟期の平均気温による影響が大きいことが示唆された。同様の傾向はケルナーにおいても観察され、共通する成分の変動が確認された。品種特性香であるチオール化合物の前駆体の解析では、圃場間による蓄積に違いがみられ、この傾向については 3 か年で共通していることが明らかとなった。また、ソーヴィニヨンブラン果実中のメトキシピラジン含有量は寒冷な地域で高い傾向が認められた。従って、気象条件等の違いが各栽培地のブドウの品質特性に影響をおよぼしていることが明らかとなった。本研究は生研支援センター「革新的技術開発・緊急展開事業（うち地域戦略プロジェクト)」の支援を受けて行った。

Flavor precursor, Terroir, Wine grape

発表責任者：小山和哉（koyama@nrib.go.jp）

講演番号：3B2a13
講演日時：3 月 26 日 11:32～ 1 号館 B2 会場

亜臨界水処理による和種薄荷の主要芳香成分に対する熱安定性の検討

Examination of t hermal stability of main aroma compounds of Japanese mint by subcritical water treatment

○野村 詩織[1]、邱 泰瑛[1]、渡邊 大吾[1]、永田 裕一[2,3]、齋藤 徹[1] ([1]北見工大、[2]北見ハッカ通商、[3]北見ハッカ研究所)
○Shiori NOMURA[1], Tai-Ying CHIOU[1], Daigo WATANABE[1], Yuichi NAGATA[2,3], Tohru SAITOH[1] ([1]Kitami Tech., [2]Kitami Mint Tsusho, [3]Kitami Mint Lab.)

[目的]薄荷は精油の原料として利用される植物の一種である。ハッカ油の主な成分はメントール、メントン、ピペリトンといった芳香成分である。これらの成分は熱への耐性が低く高温では分解してしまうと考えられている。そのため現在は精油を得る方法としてコスト的にも手軽であまり高温にはならない水蒸気蒸留法が使われている。しかし、以前までの研究で亜臨界水という高温高圧の水を用いて抽出を行った際 180-200℃まではあまり分解しないことが分かった。そこでこれらの成分の熱分解性を調べるためアンプルビンを用いた亜臨界水による芳香成分の小分け処理を提案し GC と標準試薬を用いて熱分解性の検討を行った。また、実際に薄荷葉の抽出時間を変えて薄荷葉の抽出を行い GC で芳香成分量を分析・比較した。
[方法]サンプルビンに薄荷主要芳香成分のメントール、メントン、ピペリトン、メンチルアセテートを等量とりわけ混合した。混合した試薬と蒸留水をアンプルビンに入れ口を閉めエタノール水溶液を入れた耐圧容器に入れた。容器を締めマントルヒーターを用いて目的の温度まで加熱し所定時間維持した。温度は 180-240℃の 4 点、時間は 5-60 分の 4 点とした。処理後、室温で容器を徐々に冷却した。アンプルビンを耐圧容器から取り出して口を開け、中に 2%フェノール溶液(アセトン中)を入れて撹拌した。その後 GC で分析しピークを比較した。次に乾燥させた薄荷葉 5 g と蒸留水 100 mL を耐圧容器に入れ容器を締めた。マントルヒーターを用いて 180℃まで加熱し一定時間維持し抽出した。時間は 5-65 分の 4 点とした。抽出後水で容器を速やかに冷却した。抽出した溶液をろ過し抽出液を得た。クロロホルムと抽出液を 1:10 の割合で撹拌し微量な芳香成分を濃縮し GC で分析しピークを比較した。
[結果]標準試薬の小分け処理ではメントンとピペリトンは処理温度が高いほど、処理時間が長くなるほど分解し量が減るという結果となった。一方、メンチルアセテートとメントールは温度でも時間でもあまり差が現れず安定しているという結果となった。薄荷葉抽出液では処理時間を長くしてもメントン、ピペリトンはほとんど変化が見られなかった。メントールは 25 分まではあまり変化が無くそれより長い時間では減少した。反対にメンチルアセテートは 15 分までは変化が少なくそこから 65 分まで上昇傾向となった。以上の結果から、薄荷に含まれる主要芳香成分 4 種は熱への耐性が比較的高いと考えられる。更に、180℃の亜臨界水を用いた薄荷葉抽出液はメントールを多く得るなら 25 分まで、メンチルアセテートを多く得るなら 25 分より長い時間で抽出をするのが良いという結果となった。

mint aroma compounds, subcritical water, thermal stability

発表責任者：邱 泰瑛（tkyuu@mail.kitami-it.ac.jp）

講演番号：3B2a14
講演日時：3 月 26 日 11:43～ 1 号館 B2 会場

リノール酸由来異臭成分の抑制効果に対するα-トコフェロールと抗酸化物の相乗効果の検証
Analysis of the synergistic effect of alpha-tocopherol and the antioxidant on the generation of oxidative odor from linoleic acid
○太田 香穂、石川 洋哉、小林 弘司、南 育子（福岡女子大院人栄）
○ Kaho OHTA, Hiroya ISHIKAWA, HIROSHI KOBAYASHI, IKUKO MINAMI（Fukuoka Women's Univ. Health）

【目的】脂質過酸化反応による異臭成分の生成は、食品品質に重大な影響を与える。食品の酸化防止を目的として各種抗酸化物が使用されているが、当研究室では超高速 GC（電子嗅覚ノーズ Heracles Ⅱ）を用いた一連の研究により、各種抗酸化物によるリノール酸由来異臭成分の生成抑制挙動が一律でないことを明らかにした。さらに、単一抗酸化物だけでなく、2 種の抗酸化物の併用を試み、におい嗅ぎ GC-MS 分析によって異臭成分として同定した Hexanal 等 6 成分に対する相乗的抑制効果を確認してきた。本研究では、リノール酸過酸化反応におけるα-トコフェロールと各種抗酸化物の異臭成分抑制挙動の違いをさらに詳細に検討するとともに、α-トコフェロールとの 2 成分併用時の異臭抑制挙動と抗酸化物の相乗効果との関係性を検討した。
【試料及び方法】抗酸化物として、α-トコフェロール、カテキン類、フラボノール類などの化合物を用いた。各抗酸化物を単一およびα-トコフェロールを基準とした 2 成分存在下で、リノール酸エマルジョンに対して AAPH を添加し、37℃・5 時間反応させた。脂質過酸化物に対する抑制効果はロダン鉄法により評価した。生成した揮発性成分は固相マイクロ抽出法（SPME）法により捕集し、超高速 GC に供した。超高速 GC では MXT-5・MXT-WAX カラム（並列配置）を用いた。2 成分の相互作用解析（相乗効果）は median effect analysis を用いて行った。
【結果】まずα-トコフェロールと各種抗酸化物の異臭成分抑制挙動を比較した結果、α-トコフェロールでは脂質過酸化物阻害効果に対する Hexanal の生成抑制効果が弱かった（脂質過酸化物阻害率にする Hexanal 生成阻害率の傾きが 0.53）のに対して、ケンフェロール等フラボノール類およびカテキン類では Hexanal に対する抑制効果が強い（傾き 1 前後）ことが判明した。また、1-octen-3-one では、α-トコフェロールの阻害効果が極めて弱いのに対してケンフェロール及びカテキン類では濃度依存的に顕著な阻害効果が認められた。(E)-2-heptenal, (E)-2-octenal 等においても同様の傾向が認められた。続いて、α-トコフェロールとの 2 成分併用効果を検証した結果、α-トコフェロール単独では抑制効果が弱かった異臭成分に対しても、併用時には効率的に抑制可能であることが示された。一方、相乗効果の検証の結果、ケルセチンや EGCg などでは、いずれの条件下でも異臭成分の抑制効果において高い相乗効果が認められたのに対して、ケンフェロールなどでは、異臭成分抑制効果における相互作用（相乗・相殺効果）が大きく変化することが確認され、用いる抗酸化物によっては添加濃度の設定が極めて重要であることが示唆された。

antioxidant, off-flavor, GCMS

発表責任者：石川洋哉（ishikawa@fwu.ac.jp）

講演番号：3B2a15
講演日時：3 月 26 日 11:54～ 1 号館 B2 会場

複合臭に対するマウス嗅覚受容体の応答　～香りの相互作用の解明に向けて～
The responses of mouse olfactory receptors to complex odors
○安永 元樹[1]、高井 英司[1]、葛西 賢造[1]、末田 麗華[1]、高垣 仁志[1]、山崎 智子[2]、立松 健司[3]、黒田 俊一[3] ([1]曽田香料株式会社、[2]株式会社香味醗酵、[3]大阪大学)
○ Motoki YASUNAGA[1], Eiji TAKAI[1], Kenzo KASAI[1], Reika SUEDA[1], Hitoshi TAKAGAKI[1], Tomoko YAMAZAKI[2], Kenji TATEMATSU[3], Shun'ichi KURODA[3] ([1]SODA AROMATIC Co., Ltd., [2]Komi Hakko Corp., [3]Osaka Univ.)

【目的】
ヒトが感じる香りはほとんどの場合、単一成分ではなく複合成分(複合臭)であることから、我々は独自の複合臭評価技術 AROMATCH®を活用して香りの相互作用の評価に取り組んでいる。これによりバニラの香調プロファイルを作成し、なかでも重要な要素であるラミー感(ラム酒調)のエンハンス効果に寄与する香気成分を同定した。我々は上記のエンハンス効果確認に官能による主観的評価に加え、客観的評価として嗅覚受容体応答が活用可能であると考えた。そこで、複合臭に対するマウス嗅覚受容体の応答を測定することで、香りの相互作用の解明に繋げられるか検証することとした。
【方法】
GC 導入試料にマダガスカル産バニラの香気濃縮物を、雰囲気香にバニラ香気を用い、AROMATCH®による複合臭評価を行った。AROMATCH®によりバニラのラミー感エンハンス効果が確認された 3-nonen-2-one 単体(グリーン香)、一般的なバニラフレーバー、そのバニラフレーバーに 3-nonen-2-one を添加したフレーバーの 3 点を嗅覚受容体応答測定の試料とした。嗅覚受容体応答測定では、まずマウスより単離した嗅細胞をアレイ化して人工嗅上皮を作製した。そこに上記試料を添加したリンゲル液を流し、香気成分が嗅覚受容体に結合することで変化するカルシウムイオン濃度のリアルタイム測定を行った。カルシウムイオンのモニターにはカルシウム応答性蛍光試薬である Fluo4 を用いた。
【結果】
本研究により、3-nonen-2-one 単体およびバニラフレーバーに対して応答しなかった嗅覚受容体が 3-nonen-2-one を添加したバニラフレーバーに対して応答したり、それとは逆に 3-nonen-2-one 単体またはバニラフレーバーに対して応答した嗅覚受容体が 3-nonen-2-one を添加したバニラフレーバーに対して応答しなかったりと、様々な嗅覚受容体応答に関する現象が確認された。このような嗅覚受容体応答の増強や抑制を測定することで、複合臭中における香りの相互作用を嗅覚受容体応答パターンとして“見える化”することが可能であると示唆された。
今回は単離したマウス嗅細胞を用いた測定であったため、網羅的な嗅覚受容体応答測定が困難であったが、複合臭に対する嗅覚受容体応答測定の有用性を見出すことができた。そこで、今後はヒト嗅覚受容体を発現させた培養細胞を用いて、約 400 種類あるヒト嗅覚受容体の網羅的測定を進め、複合臭中で起こっている香りの相互作用の解明を目指す。

olfactory receptors, odor interaction, vanilla

発表責任者：安永　元樹（Motoki_Yasunaga@soda.toray.co.jp）

講演番号：3B2p01
講演日時：3 月 26 日 13:50～ 1 号館 B2 会場

麹甘酒の長期摂取による安全性評価
A study for evaluating the safety of long-term intake of *koji amazake*
○中村 彩奈[1]、倉橋 敦[1]、米井 嘉一[2] ([1]八海醸造・研究開発、[2]同志社大院・生命医科学)
○Ayana NAKAMURA[1], Atsushi KURAHASHI[1], Yoshikazu YONEI[2] ([1]Hakkaisan Brewery Co. LTD., R&D Dept., [2]Doshisha Univ., Grad. Life Med. Sci.)

【序論】我が国の伝統的米発酵飲料である麹甘酒は、その類似性から「飲む点滴」と言われており、その機能性を検討する上で含有成分の把握や基盤的知見の蓄積は重要である。我々は、これまでに麹甘酒に含まれる成分の網羅的同定[1)]や糖化工程中の糖挙動[2)]について報告してきた。同時に安全性についても重要視しており、過剰摂取試験による安全性評価を行い、健常人において 1 日あたり 118 g 程度の飲用は体重や血糖値への影響がないことを確認した[3)]。本報告では、空腹時血糖値が正常高値もしくは境界域型の健常成人を対象として麹甘酒を長期摂取させたときの安全性について、過剰摂取試験に続いて無作為化二重盲検法・プラセボ対照並行群間比較試験にて評価した。
【方法】本試験はオリエンタル上野健診センター倫理審査委員会の承認の下に実施した。事前検査によって選抜した空腹時血糖が正常高値（100 mg/dL 以上 110 mg/dL 未満）もしくは境界域（110 mg/dL 以上 126 mg/dL 未満）の 20 歳以上 65 歳以下の男女計 44 名のうち 22 名に麹甘酒 118 g（八海醸造製）を、22 名に麹甘酒と同量のグルコースを含むように調製した米糖化液 118 g（プラセボ食品）を 1 日あたり 1 本、12 週間連続摂取させた。摂取前、摂取 4 週後、摂取 8 週後、摂取 12 週後の血圧/脈拍、体重/体脂肪率/BMI、血液生化学的検査、尿一般検査、抗加齢 QOL 共通問診等を行い、医師による問診を含めて安全性の判定を行った。
【結論】全被験者において、副作用の発現はなく、また麹甘酒によると考えられる有害事象も確認されなかったことから、過剰摂取試験に続いて本試験からも麹甘酒を 1 日あたり 118 g 摂取することの安全性が確認できた。糖代謝指標についてプラセボ群との群間比較から、麹甘酒摂取 12 週後でインスリンの増加とペントシジンの減少を認めた。ペントシジンは糖化反応後期生成物(AGEs)であり、心臓や脳血管へのイベントリスクとの関連性は、AGEs ＞ アマドリ化合物(HbA1c) ＞ 空腹時血糖値と考えらえれ、ペントシジンは少ない方が良い。麹甘酒中の何らかの成分が被験者のインスリン分泌量を回復させた結果、ペントシジンが減少したと考えられる。また、抗加齢 QOL 共通問診票から、麹甘酒の摂取 8 週後で自覚症状の「だるい」「耳鳴り」「ど忘れをする」、8 週及び 12 週後で「めまい」「関節痛」のスコア改善が認められたが、これら事象の関与物質と作用機序はさらなる検討が必要である。

1) Oguro *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, 124, 178-183 (2017).
2) Oguro *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, (2018) (in press).
3) 倉橋 敦, 米井 嘉一: 第 70 回日本生物工学会大会講演要旨集 (2Cp11), 177p.

koji amazake, AGEs, Pentosidine

発表責任者：倉橋 敦（a.kurahashi@hakkaisan.jp）

講演番号：3B2p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ 1 号館 B2 会場

山田錦の酒造適性の要因の解明

Solution of Yamadanishiki about aptitude of Japanese Sake

○矢嶋 雄貴[1]、辻井 良政[2]、数岡 孝幸[3]、高野 克己[2] ([1]東農大院農・農化、[2]東農大応生・農化、[3]東農大応生・醸造)
○ Yuki YAJIMA[1], YOSHIMASA TSUJII[2], TAKAYUKI KAZUOKA[3], KATSUMI TAKANO[2] ([1]Agrichem.,Agr.,Grad.Sch.,Tokyo Univ. of Agric., [2]Dept.Agrichem.,Fac.Biosci.,Tokyo Univ. of Agric, [3]Dept.Ferm.,Fac.Biosci.,Tokyo Univ. of Agric)

【目的】

酒造好適品種は、コシヒカリなどの主食用米と比較して、高度精米に耐えられるよう粒が大きい、心白発現率が高く、麹が米の内部に入り込みやすい澱粉構造をしているなど酒造に適した特徴を持っている。酒造好適品種の中でも山田錦は酒造米生産量の 3 割を占めるなどトップブランドになっている。山田錦が選ばれる理由として、良い麹ができる、醪の調整がしやすいなどいわれるが、その科学的な要因の解明は遅れている。今回、山田錦、五百万石、吟のさと、渡船の理化学的特性およびこれらの蒸米を用いた醸造用酵素剤の作用試験を実施し、若干の知見が得られたので報告する。

【方法】

試料には 2017 年度茨城県産の山田錦、五百万石、吟のさとおよび渡船を用いた。それらの蒸米を調製し、物性測定器（テンシプレッサー、タケトモ電機）により物性を測定した。モデル分解試験として、蒸米に醸造用酵素剤（グルク吟、天野エンザイム社）を 429U（α－アミラーゼ活性量として）/g（蒸米）に添加し、反応開始から 8 時間まで 2 時間ごとに分解溶液をサンプリングした。その溶液の溶出全糖量および溶出還元糖測定を行った。

【結果】

山田錦の蒸米物性が 4164gw/㎝^{2}と五百万石についで高く 4 品種の中で硬い傾向であった。また、表面の硬さ/全体の硬さの比が、0.045 となり、同様に五百万石についで高く 4 品種の中で高い傾向であった。モデル分解性試験では、2 時間後の溶出全糖量において山田錦が最も少なく 1115ug/mL、渡舟が 6937ug/mL と最も多く、酵素の作用性が 6 倍ほど異なることが分かった。しかし、8 時間後においては 4 品種ともに約 8000ug/mL と差異は小さくなった。蒸米の物性値と 2 時間後の溶出全糖量の間には負の相関がみられ($r=-0.935$、$p < 0.05$)、蒸米の硬さが酵素の作用性に影響を及ぼすことが示唆された。

Japnanese sake, rice, enzyme

講演番号：3B2p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ 1 号館 B2 会場

日本水稲品種における炊飯特性値形質のゲノムワイドアソシエーション解析

Genome-wide association study for cooking properties of cooked rice grains in Japanese rice cultivars.

○望月 賢太[1]、辻井 良政[2]、堀 清純[3]、高野 克己[2] ([1]東京農大院農・農化、[2]東京農大応生・農化、[3]農研機構作物開発センター)
○ Kenta MOCHIZUKI[1], Yoshimasa TSUJII[2], Kiyosumi HORI[3], Katsumi TAKANO[2] ([1]Agrichem.,Agr.,Grad.Sch.,Tokyo Univ.Agric., [2]Dept.Agrichem.,Fac.Biosci.Tokyo Univ.Agric., [3]NICS)

【目的】
米飯の食味は、日本の稲の育種における選抜要因の一つであり、市場価格や消費者の評価を決定する重要な形質である。国および地方の試験場における水稲品種の育種は 100 年以上の歴史があり、食味、品質および特性などが異なる様々な品種が育種されてきた。本研究では、在来種からこれら育種選抜されてきた品種について、米飯食味特性に関係する遺伝子座の探索を目的とした。今回は、米飯特性評価の一つである炊飯特性試験の理化学的特性値を評価し、ゲノムワイドアソシエーション解析を行った。

【方法】
茨城県つくば市の農研機構次世代作物開発研究センターの試験圃場で栽培した在来品種 36 種と育成品種 139 種の計 175 種を用いた。在来品種は、国内各地から収集した約 2000 品種の遺伝資源の中から遺伝的変異を幅広く網羅する品種を選定した。また、育成品種は、コシヒカリの系譜上の祖先品種や後代品種を中心に選定した。これらの品種について、炊飯特性試験の改法により、米飯粒の加熱吸水率、膨張率および炊飯外液の全糖量、還元糖量およびヨウ素呈色度を測定した。それぞれの測定項目に関して、3,256 個のゲノムワイド SNP マーカーによる遺伝子型を用いて，R package rrBLUP により遺伝子座を検出した。

【結果】
炊飯特性の形質において、-logP 値が 3.0 以上の遺伝子座を合計 27 ヶ所検出した。第 6 染色体短腕に最も数多くの遺伝子座が検出され、溶出還元糖に関連する遺伝子座が、第 1 染色体短腕、第 5 染色体長椀、第 6 染色体、第 8 染色体短腕、第 10 染色体長腕に計 7 ヶ所検出された。また、ヨウ素呈色度に関連する遺伝子座が、第 5 染色体短腕、第 6 染色体、第 8 染色体短腕、第 9 染色体長椀に計 13 か所検出された。これらの遺伝子座が，日本水稲品種における炊飯特性の差異に関与していると考えられる。これらの品種を用途ごとに分類し、検出された遺伝子座近傍の DNA マーカーのパターンを確認したところ、酒造好適米や寿司米において、コシヒカリとは異なるマーカー型が共通してみられ、これらの DNA マーカー付近に用途別を決定づける遺伝子が存在する可能性が示唆された。

Rice, Cooking properties, Genome-wide association study

講演番号：3B2p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ 1 号館 B2 会場

乳酸菌のラクトース資化性とチーズの貯蔵褐変
Effect of Lactose Utilization of Lactic Acid Bacteria on the Browning of Cheese during Storage
○新井 彩佳[1]、井上 葵[1]、井越 明日香[1]、筒浦 さとみ[2]、村田 容常[1]([1]お茶大食物、[2]新潟大 超域)
○Ayaka ARAI[1], Aoi INOUE[1], Asuka IGOSHI[1], Satomi TSUTSUURA[2], Masatsune MURATA[1]
([1]Department of Nutrition and Food Science Ochanomizu Univ., [2]Institute for Reserch Promotion Niigata Univ.)

【目的】チーズは貯蔵中に褐変しこれにはメイラード反応が関与していると考えられているが、褐変の進みやすさや程度はチーズによって異なる。市販チーズを貯蔵し褐変と糖減少量の関係を調べたところ、⊿L*値と糖減少量に相関が見られ、糖がチーズの褐変に関与することが示唆された(1)。 そこで本研究では、チーズ製造の際にスターターとして用いられる乳酸菌の液体培地およびチーズ中での糖資化性と乳酸菌を添加したチーズの貯蔵褐変の関係について調べた。
【方法】供試菌株として本研究室においてぬか漬けより単離、同定した乳酸菌 5 株（*Lactobacillus sakei* CN-3, CN-28, *L. plantarum* CN-21, *L. pentosus* CN-70）および *L. plantarum* NBRC3070 を用いた。試料として、液体培地における検討では MRS 培地に含まれるグルコースをラクトース（Lac）に変更した Lac 培地を用いた。チーズにおける検討では、牛乳にレンネットおよび乳酸を添加して作成した自作チーズを用いた。各菌株は前培養をした後、それぞれ初発菌数が 10^7 CFU/mL, g になるように PBS で調整して植菌した。Lac 培地とチーズは 37℃で 72 時間培養し、pH および糖濃度（ラクトース、グルコース（Glc)、ガラクトース（Gal)）を測定した。糖濃度は蒸発光散乱検出器を装着した HPLC により分析した。チーズについては 37℃での培養後、褐変の評価のために 60℃で 12 日間の貯蔵を行った。各試料の貯蔵前後の L*, a*, b*値を色差計によって測定し、⊿L*, ⊿a*, ⊿b*, ⊿E を算出し褐変の指標とした。
【結果】Lac 培地では、*L. plantarum* 2 株は 24 時間で 10 mg/mL 程度の Lac を資化したが、他の 4 株では 0～1 mg/mL 程度しか資化せず、菌株間で Lac の資化性に差が見られた。いずれの株においても Glc および Gal はほとんど放出されていなかった（0.5 mg/mL 以下程度)。チーズでも、*L. plantarum* 2 株で高い Lac 資化性が示され、貯蔵後にチーズ中に残存する Lac 量が少なくなった。またこの 2 株を添加したチーズは、Lac 資化性の低い他の 4 株を添加したチーズおよび乳酸菌を添加していないコントロールチーズと比較して⊿E が小さくなった。Lac 資化性の高い 2 株はチーズの褐変を抑制したと言える。
(1) *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **63**, 412 (2017)

cheese, browning, lactic acid bacteria

講演番号：3B2p05
講演日時：3 月 26 日 14:34～ 1 号館 B2 会場

発酵種由来の乳酸菌がパンの官能特性に与える影響

Additive effect of lactic acid bacteria isolated from sourdough on bread

○山田 彬史、伊藤 惠介、成島 典子、森田 亜紀、藤本 章人（MC フードスペシャリティーズ（株）製品開発研究所）
○Akifumi YAMADA, Keisuke ITOU, Noriko NARUSHIMA, Aki MORITA, Akihito FUJIMOTO (MC Food Specialties Inc. New Product Development Laboratory)

【目的】発酵種とは、小麦粉やライ麦粉などの穀物またはブドウやリンゴなどの果実を主要な原料とした、乳酸菌と酵母から成る発酵食品であり、パンの原料として使用した場合、風味の増強、食感の改良、生地物性の改善、棚持ちの向上などの効果がある。これまでに、リテールベーカリーに由来する発酵種の菌叢解析を行った結果、発酵種の菌叢は乳酸菌と酵母を中心として多種多様であり、発酵種の機能を決める重要な要素であるとわかってきた。そこで本研究では、発酵種中の乳酸菌種に着目し、単菌の乳酸菌株の違いがパンの官能特性に与える影響を評価した。

【方法】リテールベーカリーの発酵種から単離した 20 菌株を 1 菌株ずつ純粋培養して発酵種を調製し、添加したパンの官能特性の違いについて評価した。官能評価はＱＤＡ法（定量的記述分析法）に基づいて評価用語を設定し、香り・食感・味の 3 回に分けて実施した。続いて、乳酸菌間の類似性を明確にするために、主成分分析およびクラスター分析によりグループ分けとマッピングを行った。また、発酵種の成分を網羅的に測定するために、各種分析を行った。

【結果】パンの官能特性について、香りの質では 20 菌株が 8 グループ（酢酸強めの本格サワー香・フルーティーなサワー香・華やかなサワー香・バター様のまったり甘い香り・乳の香り、小麦の甘香ばしさ・粉臭・蒸れ臭）に分かれた。食感や味の官能特性も考慮すると、乳酸菌種はもちろん、乳酸菌株間でも異なる官能特性を付与することがわかった。発酵種の成分分析では、有機酸類が 18 種、遊離アミノ酸類が 25 種、糖類が 18 種、糖アルコールが 12 種、その他が(脂肪酸や塩基など)15 種検出された。遊離アミノ酸量では、最も多かった *Lactobacillus sakei* と最も少なかった *Lactobacillus brevis* では約 1.7 倍も異なっており、特にアラニン、アルギニン、ロイシン、アスパラギン、グルタミン酸がアミノ酸組成に大きな影響を与えていた。アミノ酸量が多い乳酸菌を使用した場合は、アミノ酸量が少ない発酵種を使用した場合に比べて、パンの官能特性では素材由来の雑味やカドのある酸味が低減される傾向にあり、発酵種成分とパンの官能特性との関連を調べることで、高品質な発酵種を作ることができると考えられた。

sourdough, lactic acid bacteria, fermented food

発表責任者：山田　彬史（Akifumi_Yamada@mc-foodspecialties.com）

講演番号：3B2p06
講演日時：3 月 26 日 14:55～ 1 号館 B2 会場

全粒粉の品質に与える小麦粒の部位的要因の解明

Analysis of partial factors of wheat grain on the quality of whole wheat flour

○松田 里菜[1]、野口 智弘[2]、高野 克己[3] ([1]東京農大院・農化、[2]東京農大応生・食加技セ、[3]東京農大応生・農化)
○Rina MATSUDA[1], Tomohiro NOGUCHI[2], Katsumi TAKANO[3] ([1]Agrichem., Agr., Grad. Sch., Tokyo Univ. Agric., [2]FPC, Fac. Biosci., Tokyo Univ. Agric., [3]Dept. Agrichem., Fac.Biosci., Tokyo Univ. Agric.)

【目的】

小麦全粒粉のパンに対する志向が高まっている。全粒粉はふすま部分を含むことから食物繊維、ビタミン、ミネラルなどを通常の小麦粉に比べ多く含み近年の健康志向にマッチすると共に小麦本来の風味を示す。しかし、小麦粒のふすまには脂質や酵素を多く含むことから、製粉後の品質の変化が大きく、品質の安定化が問題となる。本研究では、品質の安定な高品質全粒粉の提供を目指し、製粉条件や保存条件などの検討を行っている。本報告では、小麦粒の部位的な品質評価を行うため、小麦粒の外層を部分的に研磨し各部位の一般成分や酵素性状を測定することで、全粒粉の品質に与える部位別要因を解析した。

【方法】

試料の小麦には「ユメシホウ」（平成 30 年・神奈川県産）用いた。製粉は、試料の小麦粒をピーリング装置に２度供し、表層を研磨後、石臼製粉機にて製粉を行った。なお、試験には未研磨、１度研磨、２度研磨の小麦粒および研磨時に取り除かれたそれぞれのふすま２種も石臼製粉小麦粉とともに用いた。また、小麦粒はミルにて粉砕し試料とした。小麦粒の研磨割合は、各小麦粒の千粒重を測定し歩留まりを求めた。また、各試料は水分含量、タンパク質量、各種酵素活性量（α， β-アミラーゼ、α，β-ガラクトシダーゼ、α，β-グルカナーゼ、パーオキシダーゼ）および各試料より抽出した脂質の過酸化物価とカルボニル価を測定した。

【結果】

小麦粒の研磨歩留まりを算出したところ、一回および二回のピーリング歩留まりは、それぞれ 96.4%、89.1%であった。タンパク質量は各小麦粒および小麦粉ではいずれも約 14%であったが、ふすまでは、一回研磨ふすまは 9.8%、二回研磨ふすまで 16.4%と差異がみられた。脂質量は小麦粒および小麦粉で 1.4～2.0%を示し、ふすまではそれぞれ 1.8%、3.2%であった。各種酵素の活性はα-アミラーゼ、α-ガラクトシダーゼ、α，β-グルカナーゼはふすまで高く、その他に差異はなかった。また、β-アミラーゼ、β-ガラクトシダーゼは部位ごとの差異はなく、パーオキシダーゼは内部に行くほど増加した。脂質の酸化度合を示す過酸化物価、カルボニル価ともにふすまで高く、内部に行くほど低い値を示した。

whole wheat flour, enzyme activity, lipid peroxide

講演番号：3B2p07
講演日時：3 月 26 日 15:06～ 1 号館 B2 会場

ビール保存時に生成する新規苦味成分群の HPLC 分離と結晶スポンジ法の組合せによる網羅的な迅速構造解析

Comprehensive and Rapid Structural Elucidation of a Series of Novel Bitter Compounds Occurring during Beer Aging by the Crystalline Sponge Method Hyphenated with HPLC

○谷口 慈将[1]、菊池 貴[2]、藤田 誠[3,4] ([1]キリン基盤研、[2]リガク応技センター、[3]東大院工、[4]分子研)
○Yoshimasa TANIGUCHI[1], Takashi KIKUCHI[2], Makoto FUJITA[3,4] ([1]Cent. Lab. for Key Tech., Kirin Co., Ltd., [2]App. Lab. Rigaku Co, [3]Grad. Sch. Eng., The Univ. of Tokyo, [4]IMS)

【背景・目的】ビールに含まれる *cis*-および *trans*-iso-α酸はビール苦味の主たる寄与成分で、泡持ち作用や抗菌性も有する重要な化合物である。一方、iso-α酸、特に *trans* 体はビール保存中に変化し、品質に影響を与えることが知られているが、変化物の詳細は長い間分かっていない。Intelmann らはビール保存中に *trans*-iso-α酸が複数の成分に変化することを報告したが、単離された化合物は一部だけであり、それら構造も複雑で相対および絶対立体構造の確定までは至っていない [1)]。変化物の構造を正確に決定することは、iso-α酸の化学変化やそのメカニズムを明らかにするうえで必須であり、ビールの品質向上技術確立に繋がると期待される。そこで、*trans*-iso-α酸変化物の HPLC 分離と微量で絶対立体構造の決定まで可能な分子構造解析手法である結晶スポンジ法 [2)]を組み合わせることで、*trans*-iso-α酸変化物の網羅的構造解析を試みた。
【方法】*Trans*-iso-α酸を 5% EtOH 含有 pH 4.0 クエン酸バッファーに溶解し､40 °C で 4 週間保存した。得られた変化物を HPLC で分離精製し、13 種化合物を単離した。$ZnCl_2$ と 2,4,6-tri(pyridine-4-yl)-1,3,5-triazine (tpt)から作成した結晶スポンジ$[(ZnCl_2)_3(tpt)_2 \cdot (solvent)_x]_n$ に単離化合物の溶液を添加した（40 μg/20 μL）。50 °C で 1～3 日静置した後、化合物を包接させた結晶スポンジを取り出し単結晶 X 線回折装置で分析した。
【結果】HPLC で単離した 13 種全ての化合物について、わずか 40 μg のサンプル量で絶対立体構造を明らかにすることができた。8 種化合物は新規であり、残り 5 種は先行研究で単離された化合物 [1)]と一致し、絶対立体配置を確定することができた。いずれの化合物も分子内に連続する第 4 級炭素や複数の不斉炭素を有する複雑な分子骨格を有する上に互変異性化する性質から、NMR による解析のみでは構造決定とりわけ立体配置決定が極めて困難なものばかりであったが、結晶スポンジ法により迅速な構造決定を達成できた。13 種化合物の構造情報からビール中での *trans*-iso-α酸の化学反応経路を推定した。中でも初発反応である *trans*-iso-α酸の側鎖アシル基のカルボニル炭素と隣接するプレニル基が関与する酸触媒環状化反応がキーステップとなっていると考えられた。
【参考文献】
(1) Intelmann, D. et al., *Chem. - Eur. J.* **2009**, *15*, 13047-13058.
(2) Inokuma, Y. et. al., *Nature* **2013**, *495*, 461-466.

crystalline sponge method, iso-α-acid, beer

発表責任者：谷口慈将（Yoshimasa_Taniguchi@kirin.co.jp）

講演番号：3B2p08
講演日時：3 月 26 日 15:17～ 1 号館 B2 会場

豆乳ヨーグルトの「まろやかさ」の解析と製品開発への応用
Analysis of “the mellowness” of Soymilk Yogurt and application to product development
○丸山 一樹[1]、西沢 啓雄[2]、浅井 麻佑子[2]、井上 孝司[1]、風見 由香利[3]、蔦 瑞樹[3]、早川 文代[3] ([1]サッポロホールディングス（株）、[2]ポッカサッポロフード＆ビバレッジ（株）、[3]農研機構・食研)
○ Kazuki MARUYAMA[1], Hiroo NISHIZAWA[2], Mayuko ASAI[2], Takashi INOUE[1], Yukari KAZAMI[3], Mizuki TSUTA[3], Fumiyo HAYAKAWA[3] ([1]SAPPORO HOLDINGS LTD., [2]POKKA SAPPORO FOOD & BEVERAGE LTD., [3]NFRI, NARO)

【背景・目的】
近年、消費者の健康志向の高まりや、多様な商品の広がりにより、大豆を原料とする豆乳市場は拡大している。豆乳は大豆たんぱく質やイソフラボン等による健康イメージが定着しているが、当グループでは豆乳を発酵した乳酸菌も摂取できる豆乳ヨーグルト商品を展開している。豆乳ヨーグルトについて消費者調査を実施したところ、おいしさには「まろやかさ」が重要であることが示唆されているが、複合的でやや抽象的な特性であるため、直接、製品設計に反映することが難しい。そこで本研究では、官能評価（QDA）により「まろやかさ」の重要因子を解析し、製品開発に応用することを目的とした。
【方法】
農研機構に所属する官能評価パネル 10 名により、豆乳ヨーグルト試作品および牛乳由来を含めた市販ヨーグルトを用いて用語収集し、評価用語・用語の定義を設定した。設定した 20 項目および「まろやかさ」について官能評価を行い、PLS 回帰により「まろやかさ」の重要因子を解析した。解析した重要因子を基に、配合原料や発酵条件を検討し、改良した試作品について官能評価により「まろやかさ」について検証した。
【結果】
PLS 回帰により「酸味」「苦味」「甘い風味」「不均一感」等が重要因子として抽出された。これらの重要因子から開発目標を設定し、配合原料や発酵条件を検討したことで、改良品では「苦味」「甘い風味」「不均一感」等が改善され、「まろやかさ」が向上した。以上より、複合的な官能特性を整理することで、豆乳ヨーグルトの戦略的な製品設計が可能であることが示された。

Soymilk Yogurt, QDA, PLSR

発表責任者：丸山一樹（Kazuki.Maruyama@sapporoholdings.co.jp）

講演番号：3B2p09
講演日時：3 月 26 日 15:28～ 1 号館 B2 会場

DART-MS を用いた O/W エマルションのフレーバーリリースの測定とその解析
Measurement and analysis of aroma release behavior from O/W emulsion using DART-MS
○田丸 峻次[1]、野田 智子[2]、金田 弘挙[3]、井倉 則之[1]、下田 満哉[1] ([1]九州大学院農、[2]九州大学農、[3]九州産業大学生命科学部)
○ Shunji TAMARU[1], Tomoko NODA[2], Hirotaka KANEDA[3], Noriyuki IGURA[1], Mitsuya SHIMODA[1] ([1]Kyushu Graduate School of Agric., [2]Kyushu Univ. of Agric., [3]Kyushu Sangyo Univ. of Life Science)

【目的】Oil in Water (O/W) エマルションは水中に油滴を分散させた系であり、多くの加工食品に用いられている。そのため、O/W エマルションからの香気成分放出挙動を香気成分の物理化学的性質によって体系化することは、開発する食品の風味の予測を可能にし、食品産業の発展につながると考えられる。当研究室では、これまで、O/W エマルションからの香気成分の放出濃度や放出速度をパージアンドトラップ法により測定し、それらが分配係数と高い相関を有することを見出してきた（Shunji Tamaru et al., *Food Chemistry*, 2018; *Food Research international*, 2018）。しかし、実際に食品を摂取する際には、香気成分は食品から放出され続ける。そのため、本研究では、Direct analysis in real time (DART)-MS を用いて O/W エマルションから生じる香気成分を連続的に測定し、その挙動と物理化学的性質との関係を調査した。
【方法】O/W エマルションは、分散相をココナッツ油、連続相を 4.0 wt% Tween80 水溶液とし、分散相含有率 20 vol%、平均液滴径 2 μm として調製した。香気成分は、Benzaldehyde, Ethyl benzoate, Benzyl alcohol, α-Terpineol, Ethyl hexanoate (logPow : 1.1~3.28)の 5 種類を用い、終濃度 100 ppm として調製後のエマルションに添加した。香気成分を平衡化後、エマルション 5 mL を 40 mL バイアルに移し、36℃恒温槽内で揮発性成分分析デバイス Volatimeship（バイオクロマト製）に装着し、各香気成分のプロダクトイオンを 15 分間経時的に DART-MS で検出した。
【結果および考察】15 分間検出した各香気成分をアブラミの式($V = [1 - \exp(-kt^n)]$, V: TIC の割合、t: 時間)で近似し、各香気成分の速度定数 k およびアブラミ指数 n を求めた。これらの定数と、各香気成分の水-空気分配係数 (logPwa) およびオクタノール-空気分配係数 (logPoa) の相関をそれぞれ求めた。その結果、logPwa と速度定数 k、アブラミ指数 n の間にそれぞれ正、負の傾きを持つ高い相関が認められた。速度定数 k は揮発初期の放出速度に影響し、アブラミ指数 n は測定中の濃度の増加量に影響する定数であることから、揮発の初期段階では logPwa の大きい香気成分が先に放出され、時間が経つと、logPwa の小さい香気成分が多く放出されていくことが示された。
以上の結果から、DART-MS を用いて、O/W エマルションから生じる香気成分を経時的に測定したところ、香気成分の logPwa の値によって、その初期放出速度および経時的な増加の程度を予測できることが示唆された。

DART-MS, aroma release, emulsion

発表責任者：田丸　峻次（mos1486so25873@gmail.com）

講演番号：3B2p10
講演日時：3 月 26 日 15:39～ 1 号館 B2 会場

食品ペプチド中の結合態 D-アミノ酸の分析

Analysis of D-amino acids bound in food peptides

○梶山 敬至、大森 勇門、大島 敏久（大阪工大工）
○Takashi KAJIYAMA, Taketo OHMORI, Toshihisa OHSHIMA (Osaka Institute. of Technology)

[目的]グリシンを除くタンパク質を構成する 19 種類のα–アミノ酸は、不斉炭素を有しており、エナンチオマーである L 体と D 体が存在する。タンパク質は通常 L-アミノ酸のみで構成されているため、長年生物は L-アミノ酸のみを選択的に利用し、D-アミノ酸は生理機能を示さないと考えられてきた。しかし近年、分析技術の発達に伴い D-アミノ酸を高感度に分離分析できるようになり、遊離 D-アミノ酸がヒトを含む様々な生物の生体内に存在し、なおかつ重要な生理機能を有していることが明らかになってきた。また、結合態 D-アミノ酸の研究も進められており、白内障などの疾患との関連も指摘されている。しかし、食品に関する結合態 D-アミノ酸の研究は少なく、結合態 D-アミノ酸の存在が食品にどのような影響を及ぼすのかは明らかになっていない。本研究では食品タンパク質に着目し、どのようなタンパク質に結合態 D-アミノ酸が存在しているのか、また加工処理がどのような影響を及ぼすのか明らかにすることを目的としている。そこで、食品タンパク質・ペプチドを対象に結合態 D-アミノ酸の存在を、超高速液体クロマトグラフィー(UPLC)を用いて分析し、また食品ペプチドの製造工程における結合態 D-アミノ酸の動態について解析した。
[方法]食品タンパク質・ペプチド試料(10 mg/ml)を調製し、PICO-TAG を用いて 1%フェノールを含む 6 M 塩酸気相中, 6 h-110℃で酸加水分解を行った。酸加水分解後、*N*-アセチル-L-システインと *o*-フタルアルデヒドでアミノ酸のジアステレオマー誘導体化を行った。この誘導体化した試料を、ODS カラムを備えた UPLC に供してアミノ酸の DL 分離分析を行った。
[結果と考察]ホエータンパク質を 6 h 酸加水分解したものからは、Asp, Ala, Val, Leu の D 体が検出されたが、それぞれの D/D+L 比は 2.2%, 0.6%, 0.3%, 1.2%と低い値を示すことから、酸加水分解中に生じた D 体であることが予想された。一方、ある食品ペプチドにおいては、ホエータンパク質と同様に Asp, Ala, Val, Leu の D 体が検出されたが、それらの D/D+L 比はそれぞれ 3.9%, 1.1%, 16.9%, 0.9%であり、特に Val が高い値を示した。Val がこのように高い D/D+L 比を示す事例はこれまでに報告されておらず、本試料には結合態 D- Val が高い割合で存在している可能性が示唆された。また本試料の各製造段階の試料を解析したところ、プロテアーゼ処理工程以降で、Val の D/D+L 比が 20%以上と非常に高い値を示した。この結果より、プロテアーゼ処理の工程に結合態 D-アミノ酸の生成を促進する要因があることが判明した。今後この要因の詳細について解析を進める予定にしている。

Bound-form D-amino acids, Food peptides, Food proteins

講演番号：3B2p11
講演日時：3 月 26 日 16:00～ 1 号館 B2 会場

マヌカ蜂蜜に特徴的なケミカルマーカーの加熱に伴う変化

Change in profile of chemical markers specific to manuka honey by heating

○加藤 陽二[1,2]、岡野 やや子[1]、河合 翔太[1]、菅 尚子[1] ([1]兵庫県大環、[2]兵庫県大先端食セ)
○Yoji Kato[1,2], Yayako Okano[1], Shota Kawai[1], Naoko Suga[1] ([1]SHSE, Univ. of Hyogo, [2]RIFNS, Univ. of Hyogo)

【背景・目的】マヌカ蜂蜜はメチルグリオキサール（MGO）に由来する高い抗菌活性を有するプレミアムな蜂蜜であり、例えば飴やグミなどとして様々に加工、販売もされている。2017 年に、New Zealand 第一次産業省（MPI）は、特徴的かつ安定な４つの化学物質（2'-methoxyacetophenone (MAP), 2-methoxybenzoic acid, 4-hydroxyphenyllactic acid, 3-phenyllactic acid）の含有量及びマヌカ（*Leptospermum scoparium*）の花蜜に由来する DNA 検査に合格したもののみがマヌカ蜂蜜と表示できるとする規則を発表し、現在施行されている。本研究では、マヌカ蜂蜜に含まれる特徴的な配糖体レプトスペリン、そのアグリコンであるメチルシリンゲート（MSYR）、抗菌物質 MGO とその前駆体ジヒドロキシアセトン（DHA）、加熱により生成するヒドロキシメチルフルフラール（HMF）、及び、MPI により発表された 4 つの化学物質に着目し、処理温度の違いによる成分量の変化や、マヌカ蜂蜜のグレード（UMF 認証）の違いによる成分変化の比較を行った。
【方法】マヌカ蜂蜜（UMF10+）をマイクロチューブに入れ、36、60、90℃で 1 時間加熱した。また、グレードを変え、UMF 認証なし、UMF5+、10+、15+のマヌカ蜂蜜を 90℃で 1 時間加熱した。フルクトースなどの糖を水に溶かして作製した人工蜂蜜に試薬として MGO あるいは MAP を混ぜたものも調製し、90℃で 1 時間加熱を行った。いずれも加熱後に水に溶かし、成分量の変化を調べた。レプトスペリン及び MSYR は超高速液体クロマトグラフィー（UHPLC）により、また、４つの MPI 認証マーカーは四重極型タンデム質量分析器（LC-MS/MS）により定量した。MGO、DHA、HMF については誘導体化して UHPLC により定量した。
【結果】レプトスペリンは温度別、グレード別ともに大きな変化は認められず安定であったが、MSYR、DHA は加熱によりわずかに成分の減少傾向が認められた。抗菌物質 MGO と MPI 認証マーカーの一つである MAP は、加熱により大きく減少した。他の３種の MPI 認証マーカーはほとんど変化しなかった。グレード別の比較では、特にグレードの高い UMF15+に大きな成分減少率が認められた。HMF は加熱に伴い増加した。MGO と MAP 減少の機構を調べるため、現在、人工蜂蜜に MGO あるいは MAP を添加し、加熱に伴う変化を調べている。

manuka honey, thermal stability, leptosperin

発表責任者：加藤陽二（yojikato@shse.u-hyogo.ac.jp）

講演番号：3B2p12
講演日時：3 月 26 日 16:11～ 1 号館 B2 会場

安定同位体比による食品中のグルタミン酸由来判別法の開発

Development of a method for determining the origin of glutamic acid in foods based on stable isotope ratio

○八津川 洋一、田中 政春、松田 高博、田辺 創一、小林 和浩、田中 充（日清食品ホールディングス株式会社）
○Yoichi YATSUKAWA, Masaharu TANAKA, Takahiro MATSUDA, Soichi TANABE, Kazuhiro KOBAYASHI, Mitsuru TANAKA (Nissin Foods Holdings Co., Ltd.)

グルタミン酸ナトリウム（MSG）は、グルタミン酸のナトリウム塩であり、代表的な旨味調味料として世界中で使用されている。グルタミン酸は昆布、トマト、チーズなどを始めとする様々な食材に含まれているが、調味料として使用される MSG の多くはサトウキビなどの糖蜜やタピオカでんぷんなどを発酵させることにより工業的に製造されている。近年、食に関して天然志向が高まっており、調味料として添加される MSG の摂取をできるだけ敬遠したいという消費者が少なからず存在する。実際にアメリカなどでは“No MSG”や“MSG free”などと表示された加工食品が数多く流通している。このような状況の下、消費者が口にする食品に含まれるのが「食材に元々含まれるグルタミン酸」と「調味料 MSG」のいずれであるかを客観的に判別する技術の開発は消費者への透明性の高い情報提供にもつながり、非常に有意義であると考えられる。

「食材に元々含まれるグルタミン酸」と「調味料 MSG」は、定量分析などで一般的に用いられる光学検出器や質量分析計などを備えた測定機器で区別することは困難であり、通常は同一のものとして測定される。そこで本研究では食品の産地判別や原材料証明などに応用されている安定同位体比に着目して、両者の区別を試みた。グルタミン酸分子を構成する 4 種類の元素のうち、炭素及び窒素を対象とし、それぞれの安定同位体比（$\delta^{13}C$ 及び $\delta^{15}N$）の分析法の検討を行った。$\delta^{13}C$ については食品から分取 HPLC を用いてグルタミン酸を単離後、元素分析-安定同位体比質量分析計（EA/IRMS）で、$\delta^{15}N$ については誘導体化後、ガスクロマトグラフ-安定同位体質量分析計（GC/C/IRMS）でそれぞれ測定し、分析操作の途中で同位体分別が起こらない分析法を確立した。

これらの分析法を用い、由来の明らかな様々な食材（野菜、豆類、穀類、昆布、魚介類、畜産物及びきのこ類、計 53 試料）に元々含まれるグルタミン酸及び調味料 MSG（計 37 試料）の $\delta^{13}C$ 及び $\delta^{15}N$ 値を求めた。これらの結果を用い、統計解析手法の 1 つである判別分析により「食材に元々含まれるグルタミン酸」及び「調味料 MSG」を判別するためのモデル系を構築した。この場合の正答率は 98.9%であった。さらに、構築したモデル系を調味料 MSG 添加または無添加の即席麺、即席スープ、ポテトチップス、レトルトカレー等様々な加工食品に適用し、含有するグルタミン酸が「食材に元々含まれるグルタミン酸」と「調味料 MSG」のどちらに由来するか、つまりは加工食品に調味料 MSG が使用されているかどうか判定を試みた。その結果、正答率は 96.2%となり、非常に高い精度で判定することが可能であった。

glutamic acid, MSG, stable isotope ratio

発表責任者：八津川　洋一（yoichi.yatsukawa@nissin.com）

講演番号：3B2p13
講演日時：3 月 26 日 16:22～ 1 号館 B2 会場

カラシナにおける調理加工時の GABA 含量の変動

Studies on the change of γ- aminobutyric acid content in leaf mustard during cooking

○石川 千秋[1]、澤井 祐典[1]、西場 洋一[1]、棚原 尚哉[2] ([1]農研機構・九沖農研、[2]沖縄農研)
○Chiaki ISHIKAWA[1], Yusuke SAWAI[1], Yoichi NISHIBA[1], Naoya TANAHARA[2] ([1]NARO KARC, [2]OPARC)

【背景・目的】γ-アミノ酪酸（GABA）は神経伝達物質として機能する遊離アミノ酸であり、また血圧降下作用等も報告されている。近年では各種機能性の関与成分として GABA を多く含む食品が創出されている。
カラシナ（*Brassica juncea*）は、沖縄県での消費量が多いアブラナ科野菜の一種である。カラシナと同じアブラナ科植物のケールについては、すでに GABA を含む機能性表示食品が上市されており、カラシナもケールと同様に GABA を含有する食材として期待されている。
水溶性である GABA は、調理加工に伴う溶出等により含量の変化が予測されるが、アブラナ科野菜の中でもカラシナの GABA に関して調理加工時の成分含量の変動などを報告した事例は少ない。
そこで本研究では、カラシナ中の機能性成分含量を維持した加工食品の開発のため、収穫時期、部位および調理加工処理が GABA 含量に対して及ぼす影響について検討した。
【方法】沖縄県産カラシナ（沖縄農研栽培および市販）の生鮮品、または加熱調理品（90 秒間の蒸し加熱、60、90、120 秒間の茹で加熱等）を凍結乾燥し、粉砕したものを試料とした。熱水によりアミノ酸抽出を行い、試料中の GABA を含むアミノ酸の含量を比較した。
GABA を含むアミノ酸含量についてはオルトフタルアルデヒドによるプレカラム誘導体蛍光検出法を用いた逆相 HPLC により定量分析を行った。
【結果】収穫時期別の GABA 含量を比較すると、夏期、特に 8 月に高くなる傾向が見られ、その際の最高値は 27.0 mg/新鮮重 100 g であった。カラシナ中のアミノ酸組成はグルタミン、アスパラギン、グルタミン酸、アスパラギン酸などの比率が高かった。
カラシナの部位別の含量比較では、葉柄部よりも葉身部で GABA が高かった。
調理加工時における GABA 含量については非加熱で生鮮そのままの状態が最も高く、蒸し、茹での順に小さくなる傾向が見られた。
茹で加熱に関しては、時間が長くなるにしたがって GABA 含量が減少する傾向が確認された。GABA は水溶性成分であるため、茹で加熱時には茹で汁中に溶出する可能性が示唆された。

本研究は農林水産省委託プロジェクト「地域の農林水産物・食品の機能性発掘のための研究開発」の補助を受けて実施した。

γ-aminobutyric acid, leaf mustard, free amino acid

講演番号：3B2p14
講演日時：3 月 26 日 16:33～ 1 号館 B2 会場

カプシノイドを含有する新品種とその栽培、応用の検討(1)

A newly developed capsinoid containing pepper cultivar,'12A-7' and its cultivated study.

○関 哲也[1]、太田 雅文[1]、杉山 立志[2]、三原 隆一[1]、織壁 宏[1] ([1]味の素株式会社、[2]味の素株式会社(現.名古屋文理大学))
○ Tetsuya Seki[1], Masasfumi Oota[1], Ryuji Sugiyama[2], Ryuichi Mihara[1], Hiroshi Orikabe[1] ([1]Ajinomoto Co.,Inc., [2]Ajinomoto Co.,Inc.(Nagoya Bunri University))

トウガラシは、辛味品種は香辛料として、辛味の少ない品種は野菜として広く利用されている。トウガラシ品種'CH-19 甘'でその存在が初めて報告されたカプシノイドは、カプサイシノイドの 1/1000 程度しか辛味を示さないが、エネルギー代謝促進作用、脂質代謝促進作用等の生理作用が認められている。'CH-19 甘'はカプサイシノイドの生合成にかかわる *pAMT*(putative aminotransferase)遺伝子に一塩基が付加されて機能欠損したために、カプシノイドを産生することがこれまでの研究で示唆されている。現在も、カプシノイドを含有する'CH-19 甘'は、本成分を主成分とする健康食品の原料として利用されているが、製造のコストダウンのために、果実中のカプシノイドの高含有化、収量の上昇が望まれていた。

我々は'CH-19 甘'と様々なトウガラシを交配することで、カプシノイド含量が安定し、収穫量が上昇した F1 品種 TC4 と、固定品種 12A-7 を選抜することに成功した。更に TC4 と 12A-7 の圃場テストをタイ、及びインドで行い、いずれの品種も CH19 甘と比較して高いカプシノイド含量で、多収であることを確認した。今後はトウガラシの品種改良を更に進展させ、サプリメント原料としてのみでなく、カプシノイドを含むトウガラシそのものも普及できないか検討しており、加工や販売を加速化するため社内外と連携して研究開発を実施中である。

capsinoid, Capsicum, flavor

発表責任者：関哲也（tetsuya_seki@ajinomoto.com）

講演番号：3B3a01
講演日時：3 月 26 日 09:00～ 1 号館 B3 会場

大豆アレルゲンと小麦アレルゲンを含まない醤油風味調味料の製造方法の確立

Establishment of manufacturing method for soy sauce flavor seasoning not containing soy allergen and wheat allergen

○堀井 悠一郎[1]、小林 和也[2]、羽田 知由[3]、廣井 伸行[3]、大坪 研一[4]、中村 澄子[4]、西脇 俊和[1]([1]新潟農総研・食研セ、[2]新潟県農林水産部農業総務課、[3]山崎醸造、[4]新潟薬大・応生科)
○Yuichiro HORII[1], Kazuya KOBAYASHI[2], Tomoyoshi HANEDA[3], Nobuyuki HIROI[3], Kenichi OHTSUBO[4], Sumiko NAKAMURA[4], Toshikazu NISHIWAKI[1] ([1]Food Res. center, Niigata Agric. Res. Inst., [2]Agric. affairs div., Niigata pref., [3]Yamazaki-Jyouzou Co., Ltd., [4]Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci.)

【目的】
日本では推定 20 万人の大豆・小麦アレルギー症状の方々が潜在する。しかし、市販のアレルゲンフリーの醤油風調味料は、色や味が薄く、熟成期間に比例し製造コストが高くなる。そこで、タンパク質を多く含む酒粕に着目し、醤油に替わる醤油風調味料の製造方法を検討した。
【方法】
醤油風調味料の試醸条件は、酒粕：米麹を１：２、塩分 13.6%、30℃で３ヶ月間発酵・熟成、圧搾・濾過する製法を標準とした。酒粕の色調は分光測色計で計測した。試醸品の全窒素（TN)、ホルモール窒素（FN)、色番はしょうゆ試験法に準じて、遊離アミノ酸はニンヒドリン法で、Brix は屈折法で測定した。また、ポリフェノール含量はフォーリン・チオカルト法で、抗酸化能（H-ORAC 及び L-ORAC）は Fluorescein を用いて測定した。官能評価は専門パネル５名で実施した。
【結果】
１）醤油風調味料の色調改善の検討：酒粕の熟成（以後、後工程の熟成と区別するため「踏込」と表記）期間が長くなると酒粕の明度が低下した。また、明度が低い酒粕ほど試醸品の色番も低下し、塩カドが目立たなくなった。このことから、醤油らしい色調と味のバランスを再現するためには踏込が有効であった。
２）適正な麹歩合の検討：米麹の割合を増加させると、試醸品の色番が低下し、官能評価では味がまろやかになる特徴があった。また、ポリフェノール含量と抗酸化能が高くなる傾向であることから、醤油風調味料の日持ち向上が期待できる。
３）醤油らしさの増強の検討：仕込み時に塩水の一部を醤油へと代替する手法である再仕込み技術を適用すると、試醸品の色番がさらに低下し、遊離アミノ酸と TN と FN と Brix が増加傾向となった。官能評価では旨味と発酵香やコクが強く感じられる特徴があったことから、風味、うま味、コクなどの付加には再仕込み技術の有効性が確認できた。
【結論】
酒粕の踏込と適正配合の検討、再仕込み技術を適用することによって、米由来原料でありながら醤油の代替品として優れた品質を持つ醤油風調味料を製造できる方法が提案でき、製品化に結びつけることができた。

rice, fermentation, seasoning

発表責任者：堀井 悠一郎（yhorii@ari.pref.niigata.jp）

講演番号：3B3a02
講演日時：3 月 26 日 09:11～ 1 号館 B3 会場

γ-アミノ酪酸生産菌の添加が発酵乳の官能特性に及ぼす影響
Effects of gamma-aminobutylic acid producive lactic acid bacteria on sensory characteristics of fermented milk

○佐々木 啓介[1]、萩 達朗[1]、成田 卓美[1]、青沼 達也[2]、渡邊 源哉[1]、本山 三知代[1]、小林 美穂[1]、中島 郁世[1]、野村 将[1] ([1]農研機構畜産研究部門、[2]宮城畜試)
○Keisuke Sasaki[1], Tatsuro Hagi[1], Takumi Natira[1], Tatsuya Aonuma[2], Genya Watanabe[1], Michiyo Motoyama[1], Miho Kobayashi[1], Ikuyo Nakajima[1], Masaru Nomura[1] ([1]Inst. of Livestock and Grassland Sci., NARO, [2]Miyagi Pref. Anim. Exp. Sta.)

【緒言】これまでに、γ-アミノ酪酸（以下 GABA）生成力の強い乳酸菌株として *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 01-7 株（以下 01-7 株）が見いだされ、発酵乳製品の高付加価値化への活用が期待されている。発酵乳の高付加価値化に当該菌株を活用するためには、01-7 株の添加が発酵乳の官能特性に及ぼす影響を示す必要がある。そこで今回、01-7 株を添加したスターターで製造した発酵乳の官能特性について、分析型官能評価パネルを用いた Rate-All-That-Apply（RATA）法による用語選択と特性評価を行ったので報告する。**【方法】**GABA 非生産菌 *L. lactis* subsp. *cremoris* 01-1 株 (以下 01-1 株)と *Lactobacillus helveticus* B-1 株(以下 B-1 株)、および 01-7 株をスキムミルク培地で 30℃、48 時間培養した。これら前培養液を殺菌乳に 1%(v/v)接種して約 9」0g ずつカップに分注し、30℃、48 時間培養後、カップをシールして 4℃で冷蔵した。乳酸菌スターターの組み合わせは A) 01-1 株、B) 01-1 株+ 01-7 株、C) B-1 株、D) B-1+01-7 株の 4 通りとし、それぞれ冷蔵庫から出した直後に官能評価に供した。官能評価は、農研機構畜産部門で確立した 14 名からなる分析型パネルを用いた。評価は、乳製品の官能評価用語を示した国際規格 ISO22935-2:2009 に収載されている用語を日本語訳した味 5 語、食感 9 語、匂い 33 語の用語集から各サンプルに当てはまる用語を選択するとともに、その強度を 3 段階で評価させる RATA 法によった。評価は被験者あたり 2 セッション行い、各サンプルについて 1 セッション内で 2 回反復した。結果はセッションをブロック効果、スターター菌（01-1 株もしくは B-1 株）、01-7 株添加の有無、およびセッション内の評価順序を主効果とした一般化線型混合モデルにより解析し、リンク関数は累積ロジット関数とした。**【結果】**一般化線形混合モデル分析の結果、スターター菌および 01-7 株により選択される度合いおよびその強度が異なった用語は味として「塩味」「酸味」「甘味」「刺激」、食感として「水分の多い」「濃厚な」、匂いとして「チーズ臭」「クリーム臭」「バター臭」の計 9 語であった。このうち、01-7 株添加は「濃厚な」の強度を有意に（$P<0.05$）高めた。また、スターター菌の違いと 01-7 株添加の有無は「塩味」「チーズ臭」「バター臭」に有意な（$P<0.05$）相互作用を及ぼした。GABA 生成力の強い 01-7 株の添加は発酵乳の「濃厚さ」を高め、他のスターター菌との相互作用によっては味や匂いにも影響を及ぼすものと考えられた。**【謝辞】**本研究の一部は、内閣府の戦略的イノベーション創造プログラム（SIP）「次世代農林水産業創造技術」（管理法人：農研機構生研支援センター）により実施した。

gamma-aminobutylic acid, lactic acid bacteria, sensory evaluation

発表責任者：佐々木啓介（ksuk@affrc.go.jp）

講演番号：3B3a03
講演日時：3 月 26 日 09:22～ 1 号館 B3 会場

通電処理によるシカ肉の調理加工性

Cooking and Processing of the Venison by Use of Electrical Stimulation

○小木曽 加奈[1]、古田 一匡[2] ([1]長野県大健康発達、[2]富士通株式会社)
○Kana KOGISO[1], Kazumasa FURUTA[2] ([1]Univ. of Nagano, [2]Fujitsu Limited)

【目的】

近年、日本における鳥獣被害が深刻な状況にある。シカを食糧資源として利用を比較的推進している長野県でも 4.5%程度にとどまり、まだまだ活用の動きは鈍い。美味しく食べられる方法を確立することによって、市場や利用者も拡大していくのではないかと考えられる。我々はこれまでシカ肉をより一層おいしく食肉加工するための方法として通電処理方法を検討してきた。今回はシカ肉の発色性について知見を得たため報告を行う。

【方法】

シカ肉（背ロース）は長野県内で採取されたものを-80℃で保存し、使用前に冷蔵庫内で解凍して使用した。通電処理の方法として電力調整器を主部品とした自作装置を用いた。通電処理は 1 分間とし、電力調整器で調整を行った。また電圧は家庭電圧で一般的な 100V とした。シカ肉の肉塊を半分に切り、通電処理を行うことで試料とし、残りの半分（非通電処理）を比較対象とした。2 ㎝×3cm×1cm にスライスしたものやミンチにしたものを、一日冷蔵庫で保管後、色差計 X-liteRM200QC を用いて Hunter 表色系の Lab、⊿E 値と白色度（W）を求めた。またそれぞれ焼いたものについても同様に測定を行った。

【結果・考察】

測定の結果、通電処理後の肉は通電しないものに比べ、肉の色は明るい赤色となった。焼いたものについてはあまり変わらなかった。一方、ミンチにしたものについては生についても焼いたものについても差が見られた。

以上のことから通電処理を行うことによって、将来的に発色剤を使わなくても食肉の加工方法の一助となる可能性が示唆された。

なお、本研究は科研費（17K00841）の助成を受けたものである。

Venison, Electrical Stimulation, a color former

発表責任者：小木曽加奈（kogiso.kana@u-nagano.ac.jp）

講演番号：3B3a04
講演日時：3 月 26 日 09:33～ 1 号館 B3 会場

The influence of tea leave particle size on catechin extraction and green tea sensory acceptance

○DONGYANG LI[1,2], RITSUKO TAMURA[1,2], TOSHIRO NAKAJIMA[3], SABINE GOURAUD[2], JULIEN TRIPETTE[2], NAMI FUKOTOME[4], YUKO CABALLERO[1,2] ([1]The Graduate School of Humanities and Sciences, Ochanomizu University, [2]Program for Leading Graduate Schools, Ochanomizu University, [3]Tohoen, Tokyo, [4]Faculty of Core Research, Ocha Univ.)

Objective: The taste of green tea depends on many factors including its content in catechins, a powerful antioxidant component. The catechin content in green tea extract is partly determined by the size of tea leave particles. However, the high content of catechins in tea is often associated with bitterness. Therefore, it is hypothesized that a blend of tea particles of various sizes would result in a good balance between catechin content and an appreciable taste of the tea extract.

Method: Blend tea samples have been prepared with a 3:2 ratio of 5mm and 120~130μm long tea particles. One common Japanese green tea product, i.e. made of 6-10mm long tea particles, has been used to make control samples. The tea extract samples were prepared by brewing 3g of leaves in 95℃ hot water for 3 minutes (n=3). The concentrations of gallocatechin, epicatechin, epigallocatechin, epicatechin gallate epigallocatechin gallate, and caffeine were determined by high performance liquid chromatography. A sensory test has been conducted. This test consisted in rating aroma, color, flavor, sweetness, bitterness of each sample, as well as the overall preference (n=105). A chi-square test was used to compare the scores obtained for the two types of tea.

Results: The overall concentration of catechins was significantly higher in blend tea compared to the one in common tea (63.0 vs. 54.4mg/g). The concentration of epicatechin, epicatechin gallate and epigallocatechin gallate were 12.1%, 28.3%, and 19.8% higher in blend tea extract compared to common tea. The caffeine concentration did not show any significant difference between the blend and common tea extracts.

The sensory test did not reveal any difference between the two types of tea extracts. However, the blend tea (i.e. having both short and long particles) has been rated as being less bitter than common tea (long particles only).

Discussion: This study demonstrated that tea extracts prepared from a blend of various particle sizes (i.e. both 120~130μm and 5mm long) of tea leaves contain more catechins than the one usually found on the market. Moreover, the higher antioxidant content did not alter the overall acceptation of the tea taste. It is therefore suggested to recalibrate the size of tea leave particles to smaller lengths in order to favor the extraction of the antioxidant properties in commercial tea products.

blend tea, sensory test, catechin concentration

発表責任者：Li Dongyang（g1670612@edu.cc.ocha.ac.jp）

講演番号：3B3a05
講演日時：3 月 26 日 09:44～ 1 号館 B3 会場

牛肉パテの冷凍による品質低下に対する大豆ホエーの効果の検証

Effect of soybean whey on quality degradation of beef putty upon freezing

○平田 芳信[1]、風見 真千子[2]、野口 治子[2]、岡 大貴[3]、高野 克己[3]([1]東京農大院農・農化、[2]東京農大農学・デザイン、[3]東京農大応生・農化)
○Yoshinobu HIRATA[1], MACHIKO KAZAMI[2], HARUKO NOGUCHI[2], DAIKI OKA[3], KATSUMI TAKANO[3] ([1]Agrichem.,Agr.,Grad.Sch.,TokyoUniv.Agric., [2]Dept.Agriinnov.Fac.Agric.TokyoUniv.Agric., [3]Dept.Agrichem.Fac.Biosci.TokyoUniv.Agric.)

【目的】

大豆ホエーは脱脂大豆から分離大豆タンパク質を製造する際に副生され、タンパク質、多糖類およびミネラルなどを含有するが、利用されず廃棄されている。当研究室では未利用資源である大豆ホエーの有効利用について検討を行い、大豆ホエーによる水産練り製品の物性改良効果、タンパク質系食品の加熱収縮抑制効果および冷凍保護効果があることを見出した。

一方で、牛肉パテは、凍結融解により保水性の低下および物性が変化することが問題となっている。そこで今回は、大豆ホエーによる牛肉パテの物性改良効果および冷凍による品質低下抑制効果について検証した。

【方法】

脱脂大豆粉(ソーヤフラワーA、日清オイリオ社製)を純水に溶解し、遠心分離した上澄液を 6M 塩酸溶液にて酸沈殿させた後、上澄液を pH 7.0 に調整し大豆ホエーを得た。牛挽き肉 100g に食塩 0.7g、大豆ホエー22ml を加え、フードプロセッサーで 40 秒間処理し、直径 3.4cm、高さ 1.1cm の型につめて重量 9.5ｇになるようにパテを成型した。これらを真空パックした後、-30℃で 1 日および 14 日保存した。室温で２時間解凍後、沸騰水浴にて 3 分加熱し離水量および重量を測定した。また、圧縮型物性測定器(直径 21mm プランジャー、プランジャースピード 1 mm/sec)にてパテの 67%圧縮時の荷重を硬さとして評価を行った。

【結果】

大豆ホエーを添加したパテは、無添加パテに比べ重量の減少が抑制され、硬さは柔らかくなり、離水量は約 10%有意に減少した。また、冷凍後においても、無添加パテと比較し重量の減少が抑制され、柔らかさが維持し、離水も抑えられた。さらに、14 日間冷凍保存しても重量の減少が抑制され、柔らかさが維持し、離水量は約 16%有意に減少した。以上の結果から、大豆ホエーは牛肉パテの焼き縮の抑制効果および凍結融解による品質低下を抑制する効果があると示唆された。

cryoprotection, by-product, improvement of physical

講演番号：3B3a06
講演日時：3 月 26 日 10:05～ 1 号館 B3 会場

製麺におけるグルテン性状がデンプンの糊化に与える影響

The effects of gluten properties on the starch gelatinization in making noodles

○牧野 萌弥[1]、西堀 史也[2]、岡 大貴[3]、野口 智弘[2]、高野 克己[3]([1]東京農大院・農化、[2]東京農大応生・食加技セ、[3]東京農大応生・化学)
○ Megumi MAKINO[1], Humiya NISHIBORI[2], Daiki OKA[3], Tomohiro NOGUCHI[2], Katsumi TAKANO[3] ([1]Agrichem., Agr., Grad. Sch., Tokyo Univ. Agric., [2]FPC, Fac. Biosci., Tokyo Univ. Agric., [3]Dept. Agrichem., Fac.Biosci., Tokyo Univ. Agric.)

【目的】日本国内には様々な特徴を持つうどんが存在する。これはうどんの製造方法の差異に起因するだけではなく、各地域でそれぞれ栽培された小麦粉を用いるため、各小麦品種特有の性質が深く関与する。一般的に小麦粉の加工特性はグルテンの量や質が影響するとされ、多くの研究において製パンを中心にグルテンの評価が重要とされている。一方、麺類は大量の湯中で茹でることから、デンプン粒の膨潤・崩壊が大きく、茹で麺の性状に対してデンプンの性状や状態が大きく影響するとされている。これらのことから、グルテンおよびデンプンそれぞれに着目して多くの研究が行われてきた。しかし、これらの取り組みは対象品種の小麦粉の製麺性に対し、グルテンもしくはデンプンの性状を評価し検討を行っているものであり、生地形成に対するグルテンとデンプンとの相互的な関係性についてそれぞれの特徴を解析した事例は少ない。本研究では、麺中におけるデンプンの糊化はグルテンの影響を受けると考え、グルテンの差異がデンプンの糊化および麺物性に与える影響を明らかにするため、小麦粉から調製したデンプンに異なるグルテンを混合して製麺した再構成麺における物性の差異を検討した。
【方法】デンプンの調製は、小麦粉に外国産中力粉の ASW を用い、小麦粉に水を加えて生地を形成後、多量の水でデンプンを洗い出した。得られたデンプン懸濁液を遠心分離し、沈殿をエタノールで脱水後、乾燥させ試料デンプンとした。グルテンはカナダ産およびオーストラリア産小麦由来のバイタルグルテン 2 種を用いた。製麺は、小麦デンプンにタンパク質量が同一になるように各グルテンを混合し、食塩および水をそれぞれ対粉 2.5 および 44%を加えて混捏、複合、熟成後、幅 3.0mm、厚さ 2.8mm に切り出しし、グルテン・デンプン再構成麺を調製し、沸騰水浴中で 7 分間茹でて茹で麺を調製した。麺の物性は圧縮型物性測定機（Instron 社製）を用い、生麺は引張試験にて引張伸び（mm）と引張強度（N）を測定した。茹で麺では 90%圧縮試験にて最大荷重（N）を測定した。また、茹で麺の糊化度を FT- IR（Agilent 社製）を用いて測定した。
【結果】再構成麺の物性は、生麺の引張伸びにおいてオーストラリア産のグルテンを用いた麺が大きく、引張強度は小さくなる傾向を示し、カナダ産では伸びは小さく強度が大きくなる傾向を示した。また、茹で麺の硬さはオーストラリア産を用いた麺が小さく、カナダ産では大きくなる傾向を示した。また、茹で麺の糊化度を測定したところ、オーストラリア産を用いた麺が高くなる傾向を示し、同一のデンプンにおいてもグルテンの差異で茹で麺中での糊化度に変化がみられた。

noodle, flour, wheat starch

講演番号：3B3a07
講演日時：3 月 26 日 10:16～ 1 号館 B3 会場

麺物性に対する小麦タンパク質の影響
Effect of Wheat Protein on Noodle Properties
○西堀 史也[1]、牧野 萌弥[2]、岡 大貴[3]、野口 智弘[1]、高野 克己[3]([1]東京農大応生・食加技セ、[2]東京農大院・農化、[3]東京農大応生・化学)
○ Fumiya NISHIBORI[1], Megumi MAKINO[2], Daiki OKA[3], Tomohiro NOGUCHI[1], Katsumi TAKANO[3] ([1]FPC, Fac. Biosci., Tokyo Univ. Agric., [2]Agrichem., Agr., Grad. Sch., Tokyo Univ. Agric., [3]Dept. Agrichem., Fac.Biosci., Tokyo Univ. Agric.)

【目的】
うどんの品質評価において、茹で麺の色調および食感が重要で、麺の食感は硬さやコシ、滑らかさなどから総合的に評価され、コシ(粘弾性)が最も大きな影響を及ぼす。麺類は大量の湯中で茹でることから、デンプン粒の膨潤・崩壊が大きく、茹で麺の性状にデンプンの性状および状態が大きく影響するとされている。一方、麺の形成に不可欠なグルテンについては小麦粉のタンパク質含量と茹で麺の硬さが相関し、同一の小麦粉でも機械打ち麺と手打ち麺では大きく食感に差が生じることが経験的に知られている。このことからタンパク質の「量」と共にグルテンの「質」が食感に影響していることは確かであるが、詳細な解析が行われていないのが現状である。そこで本研究では、小麦生地のタンパク質性状が麺物性に与える影響を明らかにすることを目的とした。
【方法】
小麦粉には国内産の中力粉のきたほなみ(Kt)、さとのそら(St)、外国産中力粉の手打讃歌(Tu, 日清製粉社製)を用いた。製麺は小麦粉に対し、食塩および水をそれぞれ 2.5 および 35%加え 10 分間混捏後、ロール式製麺機を用いて麺帯を調製し、20℃で 1 時間熟成した。その後、麺帯を圧延し、厚さ 2.8㎜、幅 3.0㎜に切り出した麺線を生麺とした。また、生麺を沸騰水浴中にて 7 分間茹で、水で 30 秒間冷却したものを茹で麺とした。麺の物性は圧縮型物性測定機(インストロン社製)を用い、生麺は引張試験にて最大荷重(N)と最大荷重時の伸長度(㎜)を測定した。茹で麺では 90%圧縮試験にて最大荷重(N)を測定し、硬さとコシを算出した。生麺におけるタンパク質性状を解析するため、タンパク質を抽出し、DTNB 法により SH 基量を測定した。
【結果】
St、Kt および Tu のタンパク質量は各々5.8、9.5 および 9.2%、デンプン量は各々78.7、71.4 および 70.3%、アミロース組成値は各々31.3、28.5 および 31.4%であり、Kt と Tu はタンパク質量とデンプン量が、St と Tu はアミロース組成値がほぼ同様であった。生麺の伸長度は St が最も小さく、Tu は約 2.4 倍、Kt が約 3 倍、最大荷重は St が最も小さく、Kt が約 2 倍、Tu が約 2.7 倍であった。茹で麺の硬さは Tu が最も大きく、次いで Kt、St が最も小さかった。コシは Kt が最も大きく、St、Tu は約 2/3 を示した。麺生地のタンパク質を分画抽出した結果、EtOH、SDS および SDS-DTT 画分では Kt および Tu が St に比べて高い値を示し、SS 結合は Kt では EtOH 画分、Tu では SDS 画分が高い値を示した。

wheat protein, noodle property, SS bond formation

発表責任者：西堀史也（fn204724@nodai.ac.jp）

講演番号：3B3a08
講演日時：3 月 26 日 10:27～ 1 号館 B3 会場

パン生地の伸展性に関わるグリアジン分子種の役割

Role of gliadin molecular species on extensibility of that dough

○岡 大貴[1]、西堀 史也[2]、野口 智弘[2]、高野 克己[1]([1]東京農大応生農化、[2]東京農大応生食加技セ)
○ Daiki OKA[1], Fumiya NISHIBORI[2], Tomohiro NOGUCHI[2], Katsumi TAKANO[1] ([1]Dept. Agrichem., Fac.Biosci. Tokyo Univ. Agric., [2]FPC., Fac.Biosci. Tokyo Univ. Agric.)

【目的】

小麦貯蔵タンパク質であるグリアジンは小麦粉生地の伸展性に関与し、製パン性や製麺性に大きな影響を及ぼすことが知られている。しかし、グリアジンの生地への伸展性の付与に関する詳細な機序は未だ不明である。我々は、グリアジン分子種（α/β，γ，ω）それぞれの役割ついて検討し、グリアジンの粘性に ω-グリアジンが関与することを明らかにした[1)]。また、ω-グリアジン比率の多いグリアジンをうどん生地に添加するとデンプンを覆うようにグルテン膜が形成され、うどんの茹で伸び防止効果を付与することを見出した[2)]。製パン性においてはω-グリアジン比率とパン比容積に正の相関があることを報告した[3)]。本報告では、パンの比容積に関わるパン生地の伸展性と各グリアジン分子種の関係性について検討を行った。

【方法】

小麦粉 7 品種から 70%エタノールにてグリアジンを抽出し、噴霧乾燥にてグリアジン粉末を得た。各グリアジン分子種の比率は RP-HPLC (Inertsil WP300 C8) にて求めた。各グリアジン 30mg に水 35µl を加え水和したグリアジンの表面の粘性をテンシプレッサー（タケトモ電器）の多重バイト法にて付着力（ge/cm²）および付着伸び（mm）を測定した。強力粉（カメリア, 日清製粉）に対しグリアジンを 1.0% 添加しドウグラフ（ATTO）にてパン生地を調製後、モルダーにて厚さ 3mm に圧延し縦 40mm 幅 5mm になるよう切断した。その後、引張試験（インストロン）にて破断時の伸長度（mm）を測定した。

【結果】

グリアジンの付着力においてはα/β-グリアジン比率と負の相関があり、付着伸びにおいてはω-グリアジン比率と強い正の相関を示した。また、グリアジンを添加したパン生地の伸長度においてはα/β-グリアジン比率と負の相関を示し、ω-グリアジン比率と正の相関を示した。さらに、グリアジンの付着力および付着伸びともにパン生地の伸長度と強い正の相関が得られた。

1）日本食品科学工学会第 65 回大会（2018）3Ia12
2）日本農芸化学会 2018 年度大会, 3B08a05
3）日本農芸化学会 2016 年度大会, 3E044

gliadin, bread, dough

講演番号：3B3a09
講演日時：3 月 26 日 10:38～ 1 号館 B3 会場

高アミロース米を利用したゲルの澱粉消化性に及ぼす加工条件の影響

Effects of processing conditions on starch digestibility of gels prepared from high-amylose rice

○佐々木 朋子、松木 順子、徳安 健（農研機構）
○Tomoko Sasaki, Junko Matsuki, Ken Tokuyasu (NARO)

【目的】炊飯米に撹拌せん断処理を行うことによって、多様な物性を示す食品素材としてのゲル（米ゲル）を調製できる技術が見出され[1)]、米の新たな利用法として期待されている。一方で、糖尿病の患者数が年々増加しているため、食後血糖値の上昇抑制効果を期待して、澱粉を多く含む穀類加工食品については澱粉消化性を制御する加工技術の開発が重要な課題となる。本課題では、高アミロース米から米ゲルおよび米粉ゲルを調製し、加工条件がゲルの澱粉消化性に及ぼす影響を解析した。
【方法】高アミロース米 5 品種の精白米について、米の重量に対して 3 倍の水を加えて、約 100℃で 30 分間加熱することによって炊き上げた炊飯米を調製した。炊飯米は 25℃および 75℃の恒温槽に 30 分間静置した後、エクセルオートホモジナイザー（日本精機株式会社）を用いて撹拌せん断処理を行った。撹拌せん断処理を行った試料は成型した後、4℃で 1 日および 5 日間保存した。一方で、米ゲルを調製した 5 品種の高アミロース米を製粉し、試料として用いた。米粉の重量に対して 3 倍加水した後に 100℃で 30 分間加熱を行い、米粉ゲルを調製し、4℃で 1 日および 5 日間保存した。これらの試料に人工消化液を作用させ、一定反応時間での澱粉分解率の測定を行った。併せてゲルの素材となる炊飯米と米粉に対しても澱粉の酵素分解率を測定した。
【結果】米ゲルの消化酵素による澱粉分解率には顕著な品種間差が認められた。さらに、75℃に保持した炊飯米から調製したゲルは、炊飯後 25℃に冷却した米から調製したゲルよりも、すべての品種において、澱粉分解率が低くなる傾向が認められた。走査型電子顕微鏡による内部組織の観察により、75℃に保持した炊飯米から調製したゲルは気泡が小さく、密な網目構造をもつ傾向が観察されたためゲルの構造特性が消化酵素の浸透性に関与している可能性が示唆された。また同品種の米から調製した米ゲルと米粉ゲルについて消化酵素による澱粉分解率を比較した結果、米粉から調製したゲルの方が炊飯米から調製した米ゲルよりも澱粉分解率が高くなる傾向が見られた。一方で、米ゲルの素材となる炊飯米の澱粉分解率の品種間差と米ゲルの澱粉分解率の品種間差は必ずしも同じ傾向を示さないことが明らかになり、米ゲルの澱粉消化性の品種間差には素材特性に加えて加工条件の差に起因する物理的要因が関与していることが考えられた。

１）杉山純一ら、特開 2013-70663

starch digestibility, gel, rice

発表責任者：佐々木朋子（tomokos@affrc.go.jp）

講演番号：3B3a10
講演日時：3 月 26 日 10:49～ 1 号館 B3 会場

冷凍米飯の品種別老化特性について
Varietal differences in freeze-thaw deterioration of cooked rice
○國枝 美沙[1]、橋本 朋子[2]、野口 由里香[2]、勝野 那嘉子[1]、西津 貴久[1]([1]岐阜大学、[2]日本水産株式会社 中央研究所 水産食品研究室)
○Misa KUNIEDA[1], Tomoko HASHIMOTO[2], Yurika NOGUCHI[2], Nakako KATSUNO[1], Takahisa NISHIZU[1] ([1]Gifu Univ., [2]Nippon Suisan Kaisha, Ltd. of The Central Research Laboratory of The Fishery Products Foods Research Group)

【目的】
近年，冷凍米飯の需要が高まり，市場拡大が期待されている。急速冷凍により品質が保持され，いつでも手軽に美味しいものを食べられる点が消費者に受け入れられている一方で，冷凍期間が長くなると氷結晶の形成，澱粉の老化，冷凍焼けなどにより食品の外観や風味等を保ちにくいことが問題視されている。これまで，アミロース/アミロペクチン比と常温もしくはチルド米飯の老化特性との関係は報告されているが，冷凍米飯の老化特性を品種別に検討した事例は少ない。そこで，本研究ではアミロース含量の異なる日本産のうるち米 4 品種を用い，冷凍米飯の品種別老化特性と精白米中の成分との関係について検討した。

【方法】
供試試料として平成 29 年度産の日本産粳米 4 品種（まっしぐら，はえぬき，コシヒカリ，ゆめぴりか）を用いた。炊飯後，複数の条件で冷凍または冷蔵し，X 線回折図から各試料の老化度を決定した。
精白米全体のアミロース含有率，アミロペクチン短鎖割合，水分含量，そして米粒表面付近のタンパク質含量分布を測定し，老化特性との関係を検討した。また，炊飯過程で生じる老化特性の変化要因を明らかにするため，内在性酵素活性，炊飯による米の吸水率をそれぞれ測定した。

【結果】
4 品種のアミロース含有率は，はえぬき，まっしぐら，コシヒカリ，ゆめぴりかの順に高かった。一方で X 線回折図より，まっしぐらは他品種よりも老化耐性があることが明らかとなった。また，アミロース含有率が高い品種ほど精白米表層部のタンパク質含量が高く，中でもまっしぐらが最も高い値を示した。これまでの研究報告の結果もあわせて考えると，表層部のタンパク質の加熱変性が米粒内部の保水性を向上させ，老化速度の抑制に寄与するものと推察した。また，内在性酵素活性はまっしぐらが他品種よりも比較的高く，炊飯時の吸水率では品種間に差がみられた。よって，炊飯過程が老化特性を変化させる一つの要因であることが示唆された。

rice, retrogradation, component

講演番号：3B3a11
講演日時：3 月 26 日 11:10～ 1 号館 B3 会場

中高圧処理によって胚乳部へ移行する糠成分について

Transfer of rice bran constituents into the endosperm by high-hydrostatic pressure treatment

○田中 愼太郎[1]、佐藤 翼[1]、森下 雄太[2]、筒井 歩[1,2]、藤田 智之[1,2] ([1]信州大院総合理工、[2]信州大農)
○ Shintaro TANAKA[1], Tsubasa SATO[1], Yuta MORISHITA[2], Ayumi TSUTSUI[1,2], Tomoyuki FUJITA[1,2] ([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Shinshu Univ., [2]Shinshu Univ.)

【目的】

米に含まれる栄養・機能性成分の多くは、米糠（種皮および胚芽）部分に存在する。そのため糠を除去した精白米では玄米よりも含有する栄養価が低下する。そこで筆者らは玄米に中高圧下で加水、加温などの加工処理を施すことで、米糠の成分を胚乳に浸透移行させ、精白米中の栄養・機能性成分を増加させる技術を確立した。これまで米糠中のフェノール酸類は糖や脂肪酸と結合したエステル型で存在していることが知られており、アルカリ加水分解後の抽出物をフェノール酸類の定量に用いていた。しかしながら、移行による機能性成分の増加量と加水分解後に遊離する成分組成が異なり、その主たる成分は不明である。本研究では中高圧加工処理により浸透移行する成分およびその挙動を明らかにすることを目的として、米糠中にエステル型で存在するフェノール酸誘導体を検索した。

【方法】

米糠 400 g（平成 29 年度産コシヒカリ）に 80%エタノール溶液 2.0 L を加えて撹拌後、暗所にて室温で 24 時間静置し、浸漬した。抽出液を吸引濾過し、減圧濃縮後、凍結乾燥して抽出物を得た。抽出物をダイヤイオン HP20 を担体としたカラムクロマトグラフィー（水/アセトン, 20% stepwise）で分画した。各画分の一部を採取し、アルカリ加水分解後した。有機溶媒で抽出後、各画分の HPLC 分析を行い、フェノール酸類を含有する画分をさらに精製した。

【結果】

HPLC 分析の結果、米糠抽出物の画分（Fr.1~Fr.6）のうち、40%アセトン溶出画分（Fr.3）にエステル型のフェルラ酸誘導体および複数のフェノール酸誘導体の存在を確認した。Fr.3 を Wakogel 50C18、次いでシリカゲル 60 を担体とするフラッシュカラムクロマトグラフィーにて分画し、6′-*O*-feruloylsucrose を得た。異性体の存在が示唆されたため、HPLC 分取を行い、6′-*O*-(*E*)-feruloylsucrose および 6′-*O*-(*Z*)-feruloylsucrose を単離し、両化合物を同定した。これらの結果から、中高圧処理による精白米中のフェルラ酸量の増加には、6′-*O*-feruloylsucrose を含めたエステル型の誘導体が寄与していると結論づけた。

現在、その他のフェノール酸誘導体を単離中であり、中高圧処理によって糠層から胚乳部へ移行する化合物の定量を行う予定である。

rice bran, high-hydrostatic pressure, phenolic compound

発表責任者：藤田智之（tfujita@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3B3a12
講演日時：3 月 26 日 11:21～ 1 号館 B3 会場

木材を直接発酵して造る、香り豊かなアルコール

Direct alcohol fermentation of wood for flavorful alcohols.

○大塚 祐一郎、野尻 昌信、ナバロ ロナルド、楠本 倫久、橋田 光（森林総研）
○Yuichiro OTSUKA, Masanobu NOJIRI, Ronald Navarro, Norihisa KUSUMOTO, Koh HASHIDA (FFPRI)

木材を原料とした燃料用のアルコール（バイオエタノール）を製造する技術は、いくつかの手法が既に開発されている。しかし燃料用アルコールの製造は、効率追求のために原料を熱処理したり薬剤処理したりすることが一般的で、生産されるアルコールを燃料用途以外に使用することは困難であった。森林総研では以前に「湿式ミリング処理」という、木材を水中で 1/1000㎜ 以下に微粉砕することにより細胞壁に埋め込まれたセルロース・ヘミセルロースを露出させることで、直接発酵を可能にする技術を開発していた。我々はこの技術を用いて木材を主原料としてメタン発酵によりメタンガスを製造するシステムなどを構築し、実証試験も行っている。今回は木材を熱処理や薬剤処理することなく、水と食品用の酵素と酵母のみを添加してアルコール発酵できる技術を開発し、これにより初めて木から製造されるアルコールを飲用として利用できる道筋をつけることができたので報告する。

森林総研構内（茨城県つくば市）にて伐採したスギ材、サクラ（染井吉野）材および北海道内で伐採されたシラカンバ材の樹皮を除き、それぞれチッパーとハンマーミルで粗粉砕した。この粗粉砕木粉とミネラルウォーターを混合して、食品加工にも用いられるビーズミルにより湿式ミリング処理を行い、クリーム状のスラリーを得た。このスラリーに食品添加用のセルラーゼと醸造用の酵母を混合し、並行複発酵を行った。発酵終了後、発酵液を遠心分離により上清を回収してアルコール濃度 1-2%の発酵液を得た。次に、この発酵液を減圧蒸留法により蒸留し、アルコール度数 20-30%の蒸留物を得ることができた。

スギの発酵液からはスギ材特有の香りを含む発酵液を得ることができた。またスギの蒸留物においてもスギ材特有の香りが豊富に含まれることがわかった。サクラ（染井吉野）材の発酵液においては、桜（桜餅）を連想させる香りを含む発酵液を得ることができた。また蒸留物においても同様に桜（桜餅）を連想させる香りが含まれていた。シラカンバ材から得られた発酵液においては、白ワインを連想させる酸味のある華やかな香りが含まれており、蒸留物においては発酵液と異なり甘く熟した果実のような香りが含まれていた。以上のことから、スギ、サクラ、シラカンバからそれぞれ製造したアルコール発酵液および蒸留物には、それぞれの樹種特有の香りが含まれることが明らかとなった。また HPLC 分析により、それぞれの発酵液、蒸留物には毒性のあるメチルアルコールは含まれていないことも明らかとなった。現在スギ、サクラ、シラカンバから製造した発酵液および蒸留液の香り成分の分析を進めており、合わせて報告する予定である。

lignocellulose, alcohol, food grade

発表責任者：大塚　祐一郎（yotuka@ffpri.affrc.go.jp）

講演番号：3B3a13
講演日時：3 月 26 日 11:32～ 1 号館 B3 会場

清酒醸造での焼酎麹変異株によるα-EG 生産研究
Study of α-EG production by *Aspergillus luchuensis* mutant in sake brewing
○三井 雅貴[1]、宮腰 祐佳[2]、北野 利奈[2]、山下 秀行[3]、尾関 健二[4]([1]金工大院、[2]金工大・バイオ・化学、[3]樋口松之介商店、[4]金工大・ゲノム研)
○Masaki Mitsui[1], Yuka Miyakoshi[2], Rina Kitano[2], Hideyuki Yamashita[3], Kenji Ozeki[4] ([1]Grad. Sch. Eng., Kanazawa Inst. Technol., [2]Dept. Appl. Biosci., Kanazawa Inst. Technol., [3]Higuchi Matsunosuke Shoten Co., Ltd., [4]Genome Biotechnol. Lab., Kanazawa Inst. Technol.)

【背景・目的】エチル-α-D-グルコシド（α-EG）は、清酒中にエタノール、グルコースに次いで高含有される配糖体であり、α-EG がヒトでの飲用および塗布でコラーゲン密度を高めることが報告した。清酒醸造工程では、α-EG は澱粉由来のマルトース、マルトオリゴ糖類を麹菌のα-グルコシダーゼ（AG）がエタノールをアクセプターとしてトランスグルコシル化させることにより生産される。したがって、α-EG を高生産するためには麹菌の生産する AG の活性を高めることが重要である。これまでに、我々は UV 変異処理した麹菌を、C 源を *p*-ニトロフェニル-α-D-グルコピラノシド（*p*-NPG）とした最小培地で培養することでその親株よりも高 AG 活性の株を取得できる技術を開発した。そこで、本研究ではこのスクリーニング技術を用いた麹菌の育種とその株を用いた小仕込みを行いα-EG 生産の評価を行った。
【方法】親株として黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* HM34 を用いた。親株を PDA 培地で 30℃7 日間静置培養後、0.1%Triton にて約 1.0×10^8 spores/ml の胞子懸濁液を調整した。ペトリデッシュにこの胞子懸濁液を滅菌水で希釈したものを 2.0 ml 分注した（1.0×10^6 spores/ml）。この胞子懸濁液に対して 254 nm の紫外線をペトリデッシュから約 20 cm の距離で 3 分間照射した（生存率 0.33%）。これを 0.3%（w/v）の p-NPG を含む最小培地にプレートあたり 10^5 spores となるように塗布し、30℃で 7 日間静置培養した。培養後、生育が早く黄変したコロニーを形成した株を変異株として分離した。取得した株を用いて、製麹、小仕込みを行い HPLC でα-EG の定量を行った。
【結果・考察】最小培地から 62 株の変異株を選抜し、製麹、小仕込でα-EG 生産の評価を行った。その結果、親株のα-EG 生産量が 1.3%であったのに対し、最大で 1.8%の変異株を取得した。これまでの我々の研究成果から、麹菌種の中で HM34 株がα-EG 生産に適した株であることが判明しており、本スクリーニングではよりα-EG 生産に適した優良株を取得することが出来たと考えている。また、多くの変異株で親株よりもα-EG 生産が大きかったことから、本研究で行ったスクリーニング手法はα-EG を高生産させる麹菌の育種に有効であると考えられる。α-EG 生産には、α-アミラーゼ（AA）、グルコアミラーゼ（GA）、AG の 3 種の酵素バランスが重要であり、現在、各麹のアミラーゼ系酵素の酵素活性値およびクエン酸生産能について検討中である。

α-EG, *Aspergillus luchuensis*, sake brewing

発表責任者：尾関健二（ozeki@neptune.kanazawa-it.ac.jp）

講演番号：3B3a14
講演日時：3 月 26 日 11:43～ 1 号館 B3 会場

卵黄およびそのマヨネーズ様乳化物の流動特性に及ぼす加熱の影響

Effect of heating on flow behavior of egg yolk and its mayonnaise-like emulsion

○下山田 真[1]、小川 夏誉[1]、増田 勇人[1]、餅田 浩基[2] ([1]静県大食栄、[2](株)鈴与総研)
○Makoto SHIMOYAMADA[1], Kaho OGAWA[1], Hayato MASUDA[1], Hiroki MOCHIDA[2] ([1]Univ. of Shizuoka, [2]Res. Inst. Suzuyo)

［目的］卵黄をマヨネーズなどに加工する際には加熱殺菌工程が必須となっている。この 60℃前後の加熱によって卵黄の乳化力は上昇することが知られている。本課題ではさらに加熱卵黄やそのマヨネーズ様乳化物の流動特性を解析することにより加熱殺菌卵黄の利用について考察し、マヨネーズの品質改善のための基礎的知見を得ることを目的とした。
［方法］鶏卵を割卵し、卵黄のみを取り出し、各温度に設定した恒温水槽にて 10 分間加熱処理を行った。得られた卵黄（16.2 g）に対して食塩（4.6 g)、上白糖（3.3 g)、辛子粉（0.8 g)、10%高酸度酢（4.9 g)、水（19 g）をよく混合したのちにミキサーに入れ、激しく撹拌しながら、食用油を滴下して乳化操作を行った。
加熱卵黄や乳化物は回転粘度計（RheolabQC, Anton Paar）にて、ずり速度 1-1000 s^{-1} の範囲でずり応力を測定し、流動特性の解析を行った。一方で加熱卵黄の一部に 1 %食塩水を添加し、上清と沈殿に分画し、それぞれを電気泳動にて組成分析を行った。
マヨネーズ様乳化物の安定性として 10 日間冷蔵後に 2700 *g*、20 分間遠心分離したのちに水と油の分離状態を観察した。
［結果と考察］加熱卵黄の粘度を測定した結果、63℃以上の加熱によって粘度は上昇した。一方で、加熱卵黄を用いたマヨネーズ様乳化物の粘度は大きな変化はなかったものの 65℃以上でヒステリシスがみられた。この変化についてはゲル的な性質による滑りの可能性も考えられたが、いずれにしても乳化物の構造変化が関係しているものと予想された。遠心分離を行って乳化物の安定性を見たところ、流動曲線に変化のあった 65℃以上で安定性が増し、関連が考えられた。電気泳動にて加熱によって沈殿したタンパク質を分析した結果、SDS、還元剤存在下においても凝集体を形成している成分が 63℃以上で顕著に増加した。

egg yolk, heating, viscosity

発表責任者：下山田　真（shimoyam@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：3B3a15
講演日時：3 月 26 日 11:54～ 1 号館 B3 会場

イサダオイルの乳化特性と粉末化

Emulsifying properties and powder formation of Isada (krill) oil

フェルミン アントニオ[1]、高重 至成[1]、ヘルマワン アリヤント[1]、安達 修二[2]、○吉井 英文[1] ([1]香大農、[2]京都学園大)
Antonio Fermin[1], Shisei Takashige[1], Dwi. Ariyanto Hermawan[1], Shuji Adachi[2], ○Hidefumi Yoshii[1] ([1]Kagawa Univ., [2]Kyoto Gauen Univ.)

【目的】イサダオイルは、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸などの高度不飽和脂肪酸に加え、リン脂質、アスタキサンチンを含有し、その生理活性が注目されている。油脂の粉末化に関する研究が多いが、機能性が期待できるイサダオイルの粉末化を目的とした乳化特性や粉末化条件に関する研究が行われていない。そこで本研究では、マルトデキストリン（MD ; DE=19）とイサダオイルのみ、または各種油脂との混合油について、乳化剤（アラビアガム、カゼインナトリウム、ホエイ蛋白質加水分解物（エマルアップ、森永乳業）、オクテニルコハク酸修飾澱粉（PURITY GUM®、イングレディオン・ジャパン）、キラヤニンなど）を添加して乳化し、乳化液中の油滴径を測定した。また、噴霧乾燥により調製した粉末の表面油率および粉末を水で溶解した液中の油滴径（再構成油滴径）についても測定した。とくに、キラヤニンを添加した系について詳細な検討を行った。
【方法】賦形剤MD（固形分中52～54wt%）、乳化剤（固形分中0～6wt%）、キラヤニン（0～2wt%）を含む水溶液にイサダオイルまたは他の油脂との混合油（固形分中40wt%）を添加し、機械的乳化機（ポリトロンホモゲナイザーPT6100；１次乳化）および高圧乳化機（スターバーストミニ、スギノマシン；２次乳化）を用いて乳化した。レーザ回折式粒度分布測定装置（SALD-7100、 島津）を用い、作製した乳化液中の油滴径を測定した。一部の試料については、噴霧乾燥法により粉末化したのち、表面油率の測定、電顕による観察とともに、再構成油滴径を測定した。
【結果】イサダオイルは、リン脂質を約18wt%含有するため、蛋白性乳化剤であるアラビアガム、カゼインナトリウム、ホエイ蛋白質加水分解物を用いた場合には、均一なエマルションを作製できず、澱が発生した。しかし、乳化剤としてキラヤニンを用いると、澱がまったく発生せず、均一なエマルションを調製できた。とくに、イサダオイルにエゴマ油、亜麻仁油または米油を等量添加すると、１次および２次乳化後の油滴径はそれぞれ約1 μmと0.3 μmと微細な油滴径の乳化液が得られた。とくに、pH調整（pH=*ca*. 7）を行うと、２次乳化後の油滴径は約0.1 μmと微細化できた。また、噴霧乾燥法により調製した粉末の表面油率は1%以下と低い値が達成できた。粉末を水で溶解した後の再構成油滴径は約0.3 μmと増加したが、サブミクロンのオーダーであった。また、ホエイ蛋白質加水分解物、キラヤニンを組み合わせることにより微細な粉末を調製する条件をさらに検討中である。
【謝辞】本研究は、農研機構（生研支援センター）の「革新的技術開発・緊急展開事業（うち経営体強化プロジェクト）」の一部として実施した。

Krill oil, Emulsion, Powder

講演番号：3B3p01
講演日時：3 月 26 日 13:50～ 1 号館 B3 会場

変性β―グルカンによる難水溶性物質の可溶化（１）―包接複合体の粉末化―
Solubilization of poorly water-soluble molecules in aqueous media using renatured beta-1,3-1,6-glucan (1) - Solidification of inclusion complex -
○甲元 一也、児玉 歩夢（甲南大 FIRST）
○Kazuya KOUMOTO, Ayumu KODAMA (Konan Univ. FIRST)

［研究背景］
食品、化粧品、医薬品の有効成分には水溶性に乏しいものも多く、このような難水溶性物質を水に高濃度で可溶化する技術は年々その必要性を増している。我々の研究室では、難水溶性物質を包接可溶化できる変性β－１，３－１，６－グルカン（ｒ―グルカン）による簡便な可溶化技術を開発し、以前の年次大会において報告した。この方法は、β－１，３－１，６－グルカンをアルカリ変性後、中和することで部分的に一本鎖や二重鎖の不完全構造を有するグルカンナノ粒子を形成させることを特徴とし、中性水溶液中で水溶性有機溶剤に溶解させた難水溶性物質を１％混合するという簡単な操作で、その包接複合体を形成させることができる。包接複合体の安定性はシクロデキストリンよりも高く、有用な包接方であったが、混入する１％の有機溶剤の残存がその医薬品、食品、化粧品への応用を妨げる要因となっていた。本講演では、有機溶媒の除去、長期保存を目的に、この包接複合体の粉末化について検討を行い、得られた粉末の物性や安定性について評価した結果を報告する。
［研究結果］
β－１，３－１，６－グルカンとして黒酵母由来のβ－１，３－１，６－グルカンを、難水溶性物質としてクルクミンを用いた。ｒ―グルカンを調製し、５０ｍMの濃度でアセトンに溶解させたクルクミンを混合し、室温で３時間静置後、未包接のクルクミンを遠心分離操作により除去し、ｒ―グルカン／クルクミン包接複合体を調製した。得られた包接複合体溶液を凍結乾燥後、ミルミキサーで固体を処理することで粉末化した。得られた粉末は水と室温で混合、撹拌するだけで、加熱することなく、速やかに水に溶解した。変性前のグルカンが水に対してわずか０．０２５％の飽和溶解度であったのに対し、この包接複合体は４．５％（１８０倍）も溶解した。さらに、その包接複合体で水中に可溶化したクルクミン濃度を粉末化前と比較したところ、クルクミン濃度が１０５倍も上昇していることが明らかとなった。また、この包接複合体の安定性は、３７℃における半減期で比較すると、γ―シクロデキストリンによる複合体が２時間であったのに対し、従来の１％有機溶剤を含む包接複合体で９時間、粉末化した包接複合体で７６時間と、粉末化処理を施すことで飛躍的にその安定性が増すことが示された。以上、本検討によって、有機溶剤を含まず、長期保存可能な粉末として、難水溶性であるクルクミンを６mM という高濃度で安定に水に可溶化できるグルカン粉末の調製に成功した。本研究で得られた成果は、医薬品、食品、化粧品の高濃度可溶化へ応用できるものと期待される。

beta-1,3-1,6-glucan, inclusion complex, curcumin

発表責任者：甲元一也（koumoto@konan-u.ac.jp）

講演番号：3B3p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ 1 号館 B3 会場

変性β―グルカンによる難水溶性物質の可溶化（２）―食品、化粧品、医薬品有効成分の包接複合化―
Solubilization of poorly water-soluble molecules in aqueous media using renatured beta-1,3-1,6-glucan (2) - Complexation of renatured glucan with various poorly water-soluble food, cosmetic and pharmaceutical molecules -
○桜井 遥、児玉 歩夢、甲元 一也（甲南大 FIRST）
○Haruka SAKURAI, Ayumu KODAMA, Kazuya KOUMOTO (Konan Univ. FIRST)

［研究背景］
食品、化粧品、医薬品の有効成分には水溶性に乏しいものも多く、このような難水溶性物質を水に高濃度で可溶化する技術は年々その必要性を増している。我々の研究室では、難水溶性物質を包接可溶化できる変性β－１，３－１，６－グルカン（ｒ―グルカン）による簡便な可溶化技術を開発し、以前の年次大会において報告した。前講者が報告したように、新しくクルクミンとｒ―グルカンの包接複合体を凍結乾燥によって固化させると、有機溶媒を含まず、長期保存可能な粉末とでき、加えて、その粉末は室温で攪拌するだけで、高濃度で溶解することが明らかとなった。本講演では、食品、化粧品、医薬品に配合される様々な難水溶性有効成分に対して包接実験を行い、複合体への取り込みの有無、及び、その構造や物性に関する特徴についての検討を行ったので報告する。
［実験方法］
難水溶性の食品、化粧品、医薬品有効成分として、［食品］クルクミン、レスベラトロール、イソフラボン、フラバノン、タンニン酸など、［化粧品］けい皮酸メチル、ヒドロキノン、ナフトキノン、レチノイン酸など、［医薬品］リドカイン、インドメタシン、ジピリダモール、スルピリドなどを用い、それらの１０―５０mMの水溶性有機溶剤溶液（アセトン、ＤＭＦ）を調製し、複合体の調製を行なった。
［研究結果］
ｒ―グルカンと水溶性有機溶剤に溶解させた難水溶性物質を混合し、室温で３時間静置後、未包接の難水溶性物質を遠心分離操作により除去し、ｒ―グルカン／難水溶性物質複合体を調製した。得られた複合体溶液を凍結乾燥し、粉末化後、室温で水に再溶解させ、吸収スペクトル測定を行なった。グルカン非存在下でも同様の操作を行い、コントロールとした。実験に用いた食品、化粧品、医薬品有効成分のうち、水溶性のタンニン酸を除くすべてにおいて、包接に伴う吸光度の上昇が確認された。つまり、ｒ―グルカンによる包接は、対象となるゲスト分子の化学構造に依存することは少なく、ゲスト分子の疎水性が影響していることが示唆された。また、レチノイン酸やリドカインなどは水にほとんど溶解性を示さず、吸収ピークが確認することができないが、包接複合体とすることで有意な濃度で溶解させることができ、その生理機能の発現や摂取量の低減など、ｒ―グルカンによってその実用性の向上も期待される。講演では一連の解析結果や相関解析等についても発表する。

beta-1,3-1,6-glucan, inclusion complex, poorly water-soluble molecules

発表責任者：甲元一也（koumoto@konan-u.ac.jp）

講演番号：3B3p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ 1 号館 B3 会場

高脂質ゲルにおける油脂の種類の影響

Effect of the kind of lipid on the high lipid containing gel

○松本 拓矩、中島 聡史、秋山 亜希子、増田 麻衣、崎谷 宣孝、渡邉 裕一、上田 佳宏（ソマール株式会社）
○Takunori MATSUMOTO, Satoshi NAKAJIMA, Akiko AKIYAMA, MAI MASUDA, Nobutaka SAKIYA, Yuichi WATANABE, Yoshihiro UEDA (SOMAR Corp.)

【目的】油脂を含有するエマルションは食品・医薬品・化粧品等様々な分野に用いられる。一例として少量で必要とするエネルギー量を効率よく摂取する高エネルギーゼリー状食品（高脂質ゲル）などが挙げられる。水溶性多糖類ゲル化剤を用いて油脂を高濃度に含有する高脂質ゲルの報告は少なく、前年度の本大会において液体油脂の中でも MCT オイル：中鎖脂肪酸油を最大 85%含有する高脂質ゲルについて、多糖類ゲル化剤の選択と基本的な物理的特性について報告した。

高脂質ゲルに影響する要素としては多糖類ゲル化剤、油脂、乳化剤、作製方法が挙げられ、前回大会ではゲル化剤の選択に注力して報告した。高脂質ゲル特性の更なる解明が今後の高脂質ゲル応用に必要であり、本研究では高脂質ゲルにおける油脂種類の影響を主に評価し、高脂質ゲルの特性を明らかにした。

【方法】本研究においては高脂質ゲルにおける油脂種類の影響の評価を目的とし、数種類の液体油脂（MCT オイル：中鎖脂肪酸油、大豆油、キャノーラ油など）と数種類の固体油脂（パーム油、ラード、バターなど）を用いて高脂質ゲルを作製した。物理的特性は①圧縮試験による大変形に対する物理的特性と②動的粘弾性測定による微小変形に対するレオロジー特性の 2 点を評価した。①圧縮試験ではクリープメーター（山電株式会社製）により高脂質ゲルの硬さ・凝集性・付着性などを評価し、②動的粘弾性測定では回転型レオメーター（Malvern 社製）により温度変化に対する貯蔵弾性率変化などを評価した。

【結果】高脂質ゲルの物理的特性を評価したところ、液体油脂および固体油脂ともに油脂の種類により物理的特性に差が確認された。よって高脂質ゲルの物理的特性は油脂の性状および含有する油脂の分子量などが影響を与えることが示唆される。また固体油脂による高脂質ゲルの温度に対する粘弾性挙動は固体油脂やゲル化剤の温度に対する粘弾性挙動とは異なることが確認され、ゲル化剤を含む水相が固体脂に影響を与えることが示唆される。

food, emulsion, gel

発表責任者：上田　佳宏（ueda.yoshihiro.42@somar.co.jp）

講演番号：3B3p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ 1 号館 B3 会場

γ-シクロデキストリンによる還元型コエンザイム Q10 の特性改善

Improvement of reduced form of coenzyme Q10 by γ-cyclodextrin

○上梶 友記子、寺尾 啓二 (シクロケムバイオ)
○Yukiko UEKAJI, Keiji TERAO (CycloChem Bio)

【背景・目的】
コエンザイム Q10 (CoQ10) には酸化型のユビキノンと還元型のユビキノールが存在し、これらはミトコンドリアでエネルギーを産生するための補酵素として働いている。これまでに我々は酸化型 CoQ10 を γ-シクロデキストリン (γ-CD) で包接することによって、生体吸収性が飛躍的に向上することを報告している。還元型 CoQ10 は生体内で強い抗酸化作用を発揮するが、空気酸化を受けやすい非常に不安定な物質であり、酸化型 CoQ10 同様に生体吸収性が低いことも問題とされる。そこで本研究では、γ-CD 包接が還元型 CoQ10 の酸化安定性や溶解性に及ぼす影響について検討した。
【方法】
固形分重量あたりの還元型 CoQ10 含量が 5, 10, 15, 20, 25 % になるよう、還元型 CoQ10 に γ-CD と精製水を加え、窒素雰囲気下で攪拌した。この乳化液を凍結乾燥し、還元型 CoQ10-γ-CD 包接体の粉末を作製した。得られた包接体中の酸化型 CoQ10 と還元型 CoQ10 を足した総 CoQ10 含量、および総 CoQ10 に対する還元型 CoQ10 の比率は高速液体クロマトグラフを用いて測定した。包接体の形成は示差走査熱量計を用いて評価した。また、室温・空気中に静置した際の酸化安定性、および生体吸収性の指標となる人工腸液への溶解性について、還元型 CoQ10 原末と還元型 CoQ10-γ-CD 包接体との比較を行った。
【結果・考察】
いずれの還元型 CoQ10 含量で作製した試料も還元型 CoQ10 の比率は 97 % 以上の高値を示し、乳化・乾燥工程中も還元型 CoQ10 がほとんど酸化されずに還元体の状態を維持していることが確認された。熱分析では還元型 CoQ10 含量が 15 % 以下 (還元型 CoQ10 に対する γ-CD のモル比が 3 以上) の試料で CoQ10 由来の融解熱ピークが完全に消失し、還元型 CoQ10-γ-CD 包接体を形成していることが示唆された。空気酸化に対する安定性試験では、還元型 CoQ10 含量が高いほど安定性が高い傾向を示した。また、人工腸液への溶解性試験では、いずれの γ-CD 包接体も還元型 CoQ10 原末と比較して高い溶解性を示し、還元型 CoQ10 含量が高いほど顕著に上昇した。これより γ-CD 包接による還元型 CoQ10 の生体吸収性の向上が期待された。

cyclodextrin, stabilization, solubilization

発表責任者：上梶友記子（yukiko.uekaji@cyclochem.com）

講演番号：3B3p05
講演日時：3 月 26 日 14:34～ 1 号館 B3 会場

DIUTHAME へのブロッティングを用いたイメージング質量分析法によるイチゴ果実中の糖、有機酸、およびアントシアニンの可視化
Visualization of sugars, organic acids, and anthocyanins in strawberry fruits using blotting onto DIUTHAME in imaging mass spectrometry

○榎元 廣文[1,2]、山根 久和[1]、八田 一[3]、瀧本 未羽[4]、小谷 政弘[4]、大村 孝幸[4]([1]帝京大理工、[2]帝京大先端機器分析センター、[3]京女大家政、[4]浜松ホトニクス(株))
○Hirofumi ENOMOTO[1,2], Hisakazu YAMANE[1], Hazime HATTA[3], Miu TAKIMOTO[4], Masahiro KOTANI[4], Takayuki OHMURA[4] ([1]Teikyo Univ., [2]Analysis Center of Teikyo Univ., [3]Kyoto woman Univ., [4]Hamamatsu Photonics K.K.)

【目的】これまでの研究で私たちは、マトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)-イメージング質量分析(IMS)法を用いて、イチゴ果実全体の主な糖類、有機酸類、およびアントシアニン類を可視化することが出来た[1)]。しかし、果実のサイズは S～L のものであり、2L サイズ以上の大果系の果実全体については、切片化が困難なため測定出来ていない。試料成分を基板上へブロッティング後の IMS では、試料の切片化が必要無く、様々なサイズの試料の IMS が可能だが、これまで実用的な基板が無かった。浜松ホトニクス社製のイオン化支援基板 DIUTHAME(ジュテーム)は組織切片上に置くだけで、MALDI におけるマトリックスの代わりとなってイオン化を支援することが可能である。そこで本研究では、DIUTHAME をブロッティング用の基板として用いることで、IMS によるイチゴ果実中の糖類、有機酸類、およびアントシアニン類の可視化が可能かどうか検討を行った。
【方法】イチゴ果実のメタノール抽出液を調製し、DIUTHAME 上に滴下後、酸化インジウム(ITO)コートスライドガラス上に接着させた。次に、MALDI-time of flight(TOF)/TOF タイプの ultrafleXtreme (Bruker)を用いて、ポジティブイオンモード、*m/z* 100-1000 の範囲で測定を行った。また、室温下でカットしたイチゴ断面上に DIUTHAME を置いて成分をブロッティング後、ITO コートスライドガラス上に接着させ、ultrafleXtreme を用いて 200μm 間隔で測定を行った。なお、比較のため、クライオスタットを用いてイチゴの凍結切片を作成し、ITO コートスライドガラス上に接着後、エアブラシを用いて 2,5-ジヒドロキシ安息香酸を塗布し、ultrafleXtreme を用いて測定を行った。各成分のイオンイメージは、flexImaging ソフトウェア(Bruker)を用いて作成した。
【結果】DIUTHAME を用いてイチゴ抽出液を測定したところ、糖類であるヘキソースとスクロース、および有機酸類であるクエン酸が$[M+K]^+$イオンとして検出された。また、アントシアニンの一種であるペラルゴニジンは$[M]^+$イオンとして検出された。DIUTHAME にブロッティング後の IMS では、糖類であるヘキソースは果実全体に分布するのに対し、スクロースは主に先端側の皮層と髄に分布することが示された。また、クエン酸は主に果実の先端側とヘタ側の皮層に分布しており、ペラルゴニジンは果実の皮、皮層、および髄に分布することが確認された。これらの結果は、凍結切片の MALDI-IMS の結果と一致していた。以上の結果より、DIUTHAME へのブロッティングを用いた IMS は、イチゴ果実中の糖類、有機酸類、およびアントシアニン類の可視化に有効な手法であることが示唆された。

1) Enomoto et al., *J. Agric. Food Chem.*, 66, 4958-4965, 2018.

Blotting onto　DIUTHAME, Imaging mass spectrometry, Strawberry fruits

発表責任者：榎元　廣文（enomoto@nasu.bio.teikyo-u.ac.jp）

講演番号：3B3p06
講演日時：3 月 26 日 14:55～ 1 号館 B3 会場

Effect of 1-methylcyclopropene concentration on tomato treatment during storage time

○HERMAWAN DWI ARIYANTO[1,2], MATHILDE NAEVA BERCIS[3], HIDEFUMI YOSHII[1,2]
([1]Kagawa Univ. of Agric., [2]Ehime Univ. of UGAS, [3]Agrosup Dijon, France)

【**Purpose**】Ethylene is plant growth hormone that responsible and promote the ripening and senescence processes in fruit and vegetable. Moreover, ethylene plays a key role in development the physiological and biochemical change of fruit and vegetable during ripening process. To control ripening rate in fruit and vegetables, ethylene inhibitor was develop for post-harvest processing. 1-Methylcyclopropene or well known as 1-MCP is ethylene inhibitor agent for post-harvest processing of fruits and vegetables. In this research, the effect of 1-MCP concentration was examined on tomato treatment during storage time at room temperature. The main quality parameters of tomato such as color change, firmness and sugar content were analyzed.

【**Materials and Methods**】1-MCP inclusion complex was produced in the laboratory by synthesis reaction using 25 g of phenyllithium solution in dibutyl ether and 5.9 mL of 3-chloro-2-methylpropene (98%). Fourteen tomatoes were placed in the closed polystyrene box (45 cm x 14.5 cm x 27.5 cm) and treated with 5, 15 and 30 mg of 1-MCP inclusion complex powder for 24 h, respectively. After finished the treatment, tomatoes were transferred to the polystyrene box with holes (54 holes in each box with diameter of hole 2 mm) for storage time at 25°C. The main quality parameters of tomato were measured after 6, 12 and 18-days storage.

【**Results and Discussion**】Color change in tomato was measured by a handy spectrophotometer (NF 333, Nippon Denshoku Industries, Co., Ltd., Tokyo, Japan) with a^* value as parameter of red ($a^*>0$) and green ($a^*<0$) colors. The color of tomato with untreated 1-MCP changed significantly compare with tomato under treatment of 1-MCP. The increasing a^* value indicates the development of color change of tomato during storage time. The flesh hardness analysis of tomato represented the softening process of tomato during storage time. The initial flesh hardness of tomato was approximately 7 kg and decreased after storage time. The higher concentration of 1-MCP given to the sample, the less decreasing of tomato flesh hardness. Overall, 1-MCP treatment have not effect on the sugar content of tomato during storage time. These results show that 1-MCP was effective to preserve and maintain the quality of tomato during storage time at 25°C.

1-methylcyclopropene, preservation, tomato

発表責任者：Yoshii Hidefumi（foodeng.yoshii@ag.kagawa-u.ac.jp）

講演番号：3B3p07
講演日時：3 月 26 日 15:06～ 1 号館 B3 会場

ニラの冷凍保存による鮮度評価について

Evaluation of freshness on storage of frozen Chinese chive

○新山 聡之、端川 繭、清野 晃之（函館高専）
○Toshiyuki NIIYAMA, Mayu HATAKAWA, Teruyuki SEINO (NIT, Hakodate College)

【はじめに】

最近、料理レシピ検索サイトで“ニラは冷凍できる野菜で約一カ月間冷凍保存可能”と紹介されている。しかしながら、冷凍保存の方法によっては細胞壁が損傷し、臭いや鮮度に影響を与えることから、保存期間はより短くなることが予想される。本研究では、一般家庭で使用されている冷凍庫を想定し、様々な方法で冷凍したニラを用いて、細胞内に含まれる臭いの前駆体物質であるメチインとアリイン）量の変化や臭いを分析することで、冷凍ニラの鮮度を評価することを目的としている。

【実験】

市販のニラをそのままの状態で 15g 用意し冷凍保存した。具体的には新聞紙のみで包んだもの、アルミやラップで包んだ上に新聞紙で包んでものなどを用意した。その後、冷凍期間を 1～4 週間に設定し冷凍保存による変化をそれぞれ比較した。臭いは臭気センサー(XP-329ⅢR)の測定数値と感応評価（鼻）で評価した。鮮度は鮮度アシスト（FC-3117－11A）の測定数値で評価した。メチインとアリインの分析は高速液体クロマトグラフィー（LC-20AD）を用い、定量は標準物質を用いて検量線を作成することで分析した。

【結果と考察】

各保存方法において冷凍前のニラと比較したところ、すべての条件において保存期間が長くなるにつれて、臭気度や鮮度が低下することが確認された。一方、HPLC でのメチインとアリインの分析では、新聞紙のみの条件が他の方法とは違う傾向を示すことがわかった。このことは、細胞壁のダメージを受けやすい保存条件ではないかと考えられる。また、どの保存方法が鮮度を保持できているのかを考察した結果、アルミで包んだ上に新聞紙で包んだ条件が鮮度を保持できていると評価した。アルミで包むことで、ニラの冷凍温度を急速に下げることが可能となるため、細胞内の水分が大きな氷となるのを防ぐことで、細胞壁の損傷を低減することに繋がったと考えられる。現在、継続的に評価を繰り返し、メチインとアリインの数値から鮮度を間接的に評価できるかどうかを検証している。

Chinese chive, Methiin, Alliin

講演番号：3B3p08
講演日時：3 月 26 日 15:17～ 1 号館 B3 会場

糊化したコーンスターチおよび米粉ゲルの冷蔵保存中における老化度の評価および添加物による老化抑制

Evaluation of retrogradation of gelatinized corn starch and rice-flour gel during cold storage and suppression of retrogradation by additives

○藤澤 望[1]、大川 陽[1]、浅崎 晶[1]、島田 雪那[1]、脇 枝里子[2]、深石 光男[2]、小澤 希望[3]、二宮 和美[3]、山口 勇将[1]、赤尾 真[1]、熊谷 仁[3]、熊谷 日登美[1] ([1]日大・生資科、[2]大塚薬品工業（株)、[3]共立女子・家政)

○Nozomi FUJISAWA[1], Yo OKAWA[1], Akira ASAZAKI[1], Yukina SHIMADA[1], Eriko WAKI[2], Mitsuo FUKAISHI[2], Nozomi OZAWA[3], Kazumi NINOMIYA[3], Yusuke YAMAGUCHI[1], Makoto AKAO[1], Hitoshi KUMAGAI[3], Hitomi KUMAGAI[1] ([1]Nihon Univ., [2]OHTSUKA-CI CO., LTD., [3]Kyoritsu Women's Univ.)

【目的】糊化デンプンは，冷蔵保存中に結晶化し硬くなる（老化する）ことが知られている。近年，食生活の変化により，炊飯し冷蔵保存された米飯を食す機会が多くなってきており，保存中の老化を抑制する方法の確立が求められている。しかし，デンプンの老化度評価法自体が十分確立しているとは言えず，また，生デンプンの種類，炊飯条件や添加物が老化におよぼす影響は明らかではない。本研究では，米飯の老化のメカニズムおよび老化抑制法を検討する第一歩として，コーンスターチおよび米粉を用いて，老化度の評価および添加物が冷蔵保存中のデンプンの老化度におよぼす影響に関して検討した。

【方法】試料として，粉状デンプンであるコーンスターチ（CS）および湿式粉砕により得られた米粉（WRF）を用いた。老化度の評価法としては，デンプンへの加水分解酵素の作用のしやすさから糊化度を算出するβ-アミラーゼ・プルラナーゼ法（BAP 法），および結晶融解のエンタルピー変化（ΔH）から老化度を評価する示差走査熱量測定（DSC）を用いた。BAP 法での糊化度の測定では，CS では固形分 30%，WRF に関しては固形分 45%の懸濁液を用いた。これらの懸濁液をオートクレーブで 121℃，15 分加熱し，糊化させた後，4℃で冷蔵保存し，BAP 法による測定に用いた。DSC の測定では銀製 pan を用い，pan の内部で CS あるいは WRF と純水を混合し，密閉後，105℃まで昇温して糊化させた。室温まで冷却した後，4℃で冷蔵保存し，再度，105℃まで昇温し，結晶融解に伴うエンタルピー変化から，デンプンの結晶化度を評価した。純水の代わりに酢酸，クエン酸，乳酸等の有機酸溶液やトレハロース等の糖を用いて同様の操作を行い，添加物によるデンプンの老化抑制作用についての評価も行った。

【結果】無添加の CS 溶液および WRF 溶液に関しては，冷蔵保存により，BAP 法から求められる糊化度の低下，DSC から得られる結晶融解エンタルピーの上昇が確認された。これらの測定結果には相関があり，糊化 CS と WRF の冷蔵保存に伴う老化の進行の程度は，BAP 法と DSC のいずれでも評価しうることが示された。また，酢酸，クエン酸およびトレハロースは，デンプンの老化を抑制した。このことから BAP 法および DSC により，デンプンの老化進行速度の評価が，BAP 法および DSC で評価可能であり，有機酸や糖の添加で，コーンスターチや米粉等の粉状試料から作製した糊化デンプンの老化の進行が抑制されることが示された。

Starch retrogradation, Beta-Amylase-Pullulanase (BAP) method, Differential Scanning Calorimetry (DSC)

発表責任者：熊谷日登美（kumagai@brs.nihon-u.ac.jp）

講演番号：3B3p09
講演日時：3 月 26 日 15:28～ 1 号館 B3 会場

有機酸を中心とした食品添加物の併用効果によるバイオフィルムの制御

Control of biofilms by a combined effect of organic acids with other food additives

○塚谷 忠之、坂田 文彦（福岡県工技セ）
○Tadayuki TSUKATANI, Fumihiko SAKATA (Fukuoka Industrial Technology Center)

【目的】微生物が産生するバイオフィルムは、食品の腐敗や食中毒の大きな要因となっている。食品の保存性・安全性を高めるために、保存料や日持向上剤などの食品添加物が使用されているが、バイオフィルムに対する食品添加物の殺菌効果の検討例は少ない。そこで、本研究では、水溶性テトラゾリウム塩を用いた微生物検出法と 96 ピン付きマイクロプレート蓋へのバイオフィルム形成法を組み合わせたバイオフィルム殺菌活性測定法を用いて、黄色ブドウ球菌及び大腸菌のバイオフィルムに対して殺菌活性を有する食品添加物の探索・選抜を行った。さらに、選抜した複数の食品添加物を併用することで、幅広い菌種のバイオフィルムの制御を試みた。
【方法】(1)検出試薬：電子メディエータ 2-methyl-1,4-naphthoquinone(NQ)と水溶性テトラゾリウム塩 WST-8 を 10%DMSO 水溶液に溶解し、検出試薬とした。
(2)バイオフィルム形成法：96ウェルマイクロプレートへ最適な培地で調製した微生物懸濁液を分注し、これに96ピン付きマイクロプレート蓋を被せて35～37℃で一定時間インキュベーションすることでピン表面へバイオフィルムを形成させた。
(3)バイオフィルム殺菌活性測定法：ミュラーヒントンブロス(MHB)培地で調製した食品添加物の試料液（0.0125～1.6%）200μlを分注した96ウェルマイクロプレートへ、バイオフィルムを形成させた96ピン付きマイクロプレート蓋を被せ、30分間あるいは24時間インキュベーションした。次に、96ピン付きマイクロプレート蓋を滅菌生理食塩水で3回洗浄し、検出試薬含有MHB培地へ移して一定時間反応後、マイクロプレートリーダを用いて吸光度測定(460nm)を行った。殺菌率はコントロールの吸光度に対するサンプルの吸光度の比から求めた。殺菌率99%以上を最小バイオフィルム撲滅（殺菌）濃度 MBEC（Minimum Biofilm Eradication Concentration）とした。
【結果】食品添加物 58 種類をバイオフィルム殺菌活性測定法へ供したところ、フマル酸が *S. aureus* と *E. coli* のバイオフィルム両方に対して高い殺菌活性を示した。フマル酸の MBEC は 30 分処理で 0.8%、24 時間処理で 0.4%であった。さらに、フマル酸を中心に複数の食品添加物を組み合わせることによる併用効果を検討したところ、フマル酸、乳酸、フェルラ酸の組み合わせが、幅広い菌種（*S. aureus, L. brevis, E. coli, P. aeruginosa, S. marcescens*）のバイオフィルムの制御に相乗的・相加的効果を示すことが明らかとなった。酸味料（フマル酸、乳酸）と酸化防止剤（フェルラ酸）の組み合わせは、従来の保存料を使用しないバイオフィルム制御剤としての利用が期待できる。

biofilm, organic acid, food additive

講演番号：3B3p10
講演日時：3 月 26 日 15:39～ 1 号館 B3 会場

細菌由来揮発性成分による細菌スクリーニング法の開発

Development of Bacteria Screening Method by Using Microbial Volatile Compounds (MVCs)

○小林 弘司、阿部 萌瑛、太田 香穂、南 育子、石川 洋哉（福岡女子大学）
○Hiroshi KOBAYASHI, Moe ABE, Kaho OHTA, Ikuko MINAMI, Hiroya ISHIKAWA (Fukuoka Women's Univ.)

【目的】食品の細菌検査は，増菌培養液の菌体を検出対象として簡易・迅速・高感度化が図られてきた．一方，細菌は特有の揮発性成分（MVCs）生産し，培養液は独特のにおいを呈するが，培養液の MVCs やにおいに着目した細菌検出法は確立されていない．近年，ガスクロマトグラフィー（GC）技術の発達により，揮発性成分の高感度かつ特異的な検出が可能となっている．本研究は，高速 GC を基盤とした電子嗅覚システムの細菌スクリーニング検査への応用を目的としている．
【方法】種々の腸内細菌科属細菌を液体培地に接種し 37°C にて一晩培養した。培養液の MVCs は固相マイクロ抽出（SPME）法により捕集し，超高速 GC システム（電子嗅覚ノーズ Heracles Ⅱ）に供した．超高速 GC では MXT-5・MXT-WAX カラム（並列配置）を用いた．なお，高速 GC では，40℃から 250℃まで 1.5℃/s で昇温分析を行った．
【結果･考察】まず，細菌培養に用いる増菌培地を検討した．Tryptic Soy Broth (TSB)，Nutrient Broth No.2 (NB)，Mueller-Hinton Broth (MHB) の 3 種類の培地の揮発性成分を測定した結果，揮発性成分の種類は TSB，MHB，NB の順に多かった。このため，培地からの揮発性成分が少ない NB が増菌培地として最適だと考えられた。しかし，それぞれの大腸菌培養液の MVCs を測定した結果，NB では大腸菌由来の MVCs の種類も少なく，本法による細菌スクリーニングの増菌培地には適さないと判断した。一方，TSB は培地自体の揮発性成分の種類も多かったが，大腸菌由来の MVCs の種類も多く，MVCs を特徴付けやすいと判断し，TSB を基礎培地とすることとした。次に，TSB で培養した種々の腸内細菌科属細菌培養液の MVCs を超高速 GC に供し，識別性が高かったピークの主成分分析を行った結果，細菌属ごとにクラスターを形成することが明らかとなった。このうち，非病原性大腸菌 3 株と病原大腸菌（腸管出血性大腸菌 O157:H7，O157) 1 株ではクラスターが異なったため，これらのクロマトグラムの違いを詳しく解析した．その結果，非病原性大腸菌と O157 ではインドールや 1-ドデカノールといったメジャーピークの面積値に有意な差はなかったが，O157 で有意に高い複数のマイナーピークが確認された．さらに，これらのピークは菌数依存的増加したため，非病原大腸菌と O157 を判別する指標となる MVCs であると示唆された．以上，本法は純粋培養系においては属や病原性の有無の判別に応用できることが期待された．今後は，混合培養系や検体培養液での検討を行い，本法の応用可能な範囲を明らかにする必要がある．

Microbial volatile compounds, Bacteria screening, High-speed GC

発表責任者：小林弘司（kobayashih@fwu.ac.jp）

講演番号：3B3p11
講演日時：3 月 26 日 16:00～ 1 号館 B3 会場

玄米における貯穀害虫発生マーカーの探索 ～プレノールとイソプレノール

Prenols: volatile markers for early detection of insects in stored brown rice

○田中 福代[1]、宮ノ下 明大[2]、曲山 幸生[2]([1]農研機構中央農研、[2]農研機構食品部門)
○Fukuyo TANAKA[1], Akihiro MIYANOSHITA[2], Yukio MAGARIYAMA[2] ([1]CARC, NARO, [2]Food Res. Institute, NARO)

貯穀害虫に対するポストハーベスト農薬の使用を減少させるカギは害虫発生の早期検知にある。しかし、現在はその発生を成虫のトラップでモニタリングするため、検知できるのは増殖後となる。発生初期に有効な防除対策を可能とするため、より早期に害虫を検知する方法が求められている。その手段として、幼虫の存在を揮発性成分により検知することを目的に、マーカー成分の探索を行った。

【方法】

1. 試料の調製 密閉容器（ガラス製 500ml）にコシヒカリ玄米（100g）と 7 種の貯穀害虫の卵(約 200 個)を個別に入れて 25℃の実験室内に静置した。ふた(PP 製)に 2 個のセプタムを設置し、注射針を刺して通気口とした。害虫はノシメマダラメイガ、スジマダラメイガ、スジコナマダラメイガ、チャマダラメイガ、ガイマイツヅリガ、コクヌストモドキ、コクゾウムシとし、各虫種 2 反復で行った。

2. 揮発性成分の分析 Tenax チューブ(ゲステル社、注射針に接続)に、容器内のガスを大気吸引ポンプにより通気し揮発性成分を捕集し、13C6 ベンゼンを内標として添加後、加熱脱着（TD）/GC/MS により分析を行った。実験開始直後から 2 か月間経時的に分析を行った。

3. データ解析 データは MassHunter(アジレント・テクノロジー)により deconvolution し、MPP(同)により alignment 後、ピーク面積を積算した。対照に対して発生量が増大するピークを虫種ごとに抽出し、着目成分について各種ライブラリで検索後、標品を用いて同定し、積算強度（内標比）により経時変化を追跡した。

【結果と考察】

玄米に貯穀害虫を放飼すると、いずれの虫種も経時的に対照とは異なる揮発性成分プロファイルを示し、その特徴や変化の速度は虫種によって異なった。その中で、対照からは検出されず、放飼区のみから共通して検出される複数の成分を見出した。最も典型的な成分として、プレノールとイソプレノール（MW=86 の構造異性体）の少なくとも一方がすべての虫種から検出された。特に、ガイマイツヅリガでは開始から 3 日以内、ノシメマダラメイガ、スジコナマダラメイガ、スジマダラメイガでも 1 週間以内に検出された。また、コクゾウムシ放飼では数種の含硫化合物が 3 週頃から増加した。

以上から、プレノール類などを中心に室内空気の揮発性有機化合物（VOC）をモニターすることにより、貯穀害虫の早期検知が期待できる。今後、実用化に向けて選択性の高い迅速分析法の確立や連続モニター可能なセンサーの開発が必要である。(特願 2018-101937)

prenols, grain-storage insect, biomarker exploration

発表責任者：田中福代（fukuyot@affrc.go.jp）

講演番号：3B3p12
講演日時：3 月 26 日 16:11～ 1 号館 B3 会場

Evaluation of different postharvest treatment in mangosteen (Garcinia mangostana) using metabolomics approach

○ANJARITHA AULIA RIZKY PARIJADI[1], Sobir Ridwani[2], Fenny Martha Dwivany[3], Sastia Prama Putri[1,3], Eiichiro Fukusaki[1] ([1]Osaka Univ., [2]Bogor Agriculture Univ., [3]Sch. of Life Sci. and Tech., Inst. Tech. Bandung)

The postharvest technology development process is one of the processes which greatly affects the food quality. Several postharvest technologies (low temperature, edible coating) have been extensively developed to reach the most-favorable condition either for quality improvement or shelf-life improvement, including mangosteen. Mangosteen is a tropical fruit with a high market value but a relatively short shelf-life. However, there is no study to evaluate the effect of postharvest treatment using metabolomics approach in mangosteen. In order to better evaluate the effect of mangosteen postharvest treatment on the metabolic response, metabolomics was performed on several treatments in mangosteen. The metabolome data obtained from Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry (GC-MS) were analyzed by multivariate analysis, including HCA, PCA, and PLS analysis. Low-temperature treatment (LT; 12.3 ± 1.4 °C) is shown as the most efficient treatment of all postharvest treatment in mangosteen. Several top metabolites (xylose, galactose, galacturonic acid, glucoronate, glycine, and rhamnose) were decreased after treatment in the peels part. However, low-temperature treatment did not show any significant differences compared to a room temperature treatment in the flesh part. To our knowledge, this is the first study that evaluates the effect of postharvest treatment in mangosteen using a metabolomics approach.

Garcinia mangostana, postharvest treatment, metabolomics

発表責任者：Sastia Prama Putri（sastia_putri@bio.eng.osaka-u.ac.jp）

講演番号：3B3p13
講演日時：3 月 26 日 16:22～ 1 号館 B3 会場

水中短波帯加熱による果実の高速ブランチング

High speed branching of cut fruit by radio frequency heating in water

○植村 邦彦、高橋 千栄子、小林 功 (農研機構)
○Kunihiko UEMURA, Chieko TAKAHASHI, Isao KOBAYASHI (NARO)

【目的】リンゴのカットフルーツは、切断面の褐変や、微生物汚染のため、保存期間を長くとることができない。果実を水とともに加熱するブランチングと呼ばれる処理を行うことにより、保存期間を長くすることが可能である。ただし、従来のブランチング処理では、果実の中心部の温度が十分に高くならなかった場合、殺菌や酵素失活が十分に実現されないことが問題となる。本研究では、果実を水に浸したものを真空包装し、短波帯加熱で均一迅速加熱を行う。これにより、従来の加熱に比べて短時間で果実の中心部を昇温できるため、果実の酵素失活および殺菌に必要な加熱時間を短縮できることから、過加熱による熱劣化を抑制した高品質な果実加工品を製造することが可能となる。
【方法】リンゴ（青森県産、フジ）を剥皮し、八等分にしたもの、ブドウ（長野県産、巨峰）をそれぞれ 150g および同量の糖液または水に浸し、果実の中心部および液部に光ファイバー温度計プローブを挿入し、真空包装したものをサンプルとした。サンプルを 150x150x30mm の平行平板電極間にサンプルを配置し、周囲を満たした水道水の循環系に熱交換器で加熱した。27MHz3kW の短波帯交流を電極間に印加し、サンプル外の水、サンプル内の液体およびサンプルを短波帯加熱する。サンプルの中心温度が所定の温度に達するまで加熱し、90℃の温度になったときに、サンプルを取り出して、氷水に浸して冷却した。処理したサンプルの色、破断強度、ポリフェノールオキシダーゼ活性を測定した。比較とした従来加熱は、サンプルを 80℃の温浴に 30 分間浸して加熱した。
【結果】短波帯交流を印加し、ブドウおよびリンゴの中心温度が 90℃に達するまでにそれぞれ 70 秒、90 秒要した。加熱後の外観は、ブドウは変化が認められなかったが、リンゴは中心まで透き通った状態に変化した。また、加熱処理したリンゴのポリフェノールオキシダーゼ活性は、短波帯加熱はほぼ失活したのに対して、従来加熱は活性が残った。破断強度の結果も、短波帯加熱のほうが従来加熱よりも低い値となった。この結果は、従来加熱で 30 分間加熱したものには、中心部が透き通らず、十分に温度が上昇しなかったためだと考えられた。

本成果は、農研機構生研支援センターの革新的技術開発・緊急展開事業（うち先導プロジェクト）の支援を受けて実施したものである。

radio freqeuncy heating, apple, grape

発表責任者：植村邦彦（uemura@affrc.go.jp）

講演番号：3B3p14
講演日時：3 月 26 日 16:33～ 1 号館 B3 会場

高分子電解質膜による水電気分解反応を利用した新規エチレン分解システムの開発
Novel Ethylene Destruction System Using Polymer Electrolyte Membrane

○木村 太郎[1]、浦川 稔寛[1]、塚崎 守啓[2]([1]福岡工技セ、[2]福岡農林試)
○Taro KIMURA[1], Toshihiro URAKAWA[1], Morihiro TSUKAZAKI[2] ([1]Fukuoka Ind. Tech. Center, [2]Fukuoka Agr. For. Res. Center)

【緒言】

エチレンは青果物の成熟・老化を促す植物ホルモンとしての作用があり、農作物の鮮度を落とし商品価値を下げる要因となることが知られている。特に近年は高級青果物の海外輸出が盛んとなっており、輸送中のエチレン除去が品質向上・高収益化の観点から重要な課題となっている。発表者らは、電解質膜の両面に白金触媒、電極を接合したシート状装置（以下「電解装置」と記載）を試作し、これに通電することでエチレンを分解することが出来ることを見出した。発表者らは、この電解装置によるエチレン分解の原理、分解効率についての検討を行った。また、実際に青果物の成熟に及ぼす効果についても検討を行った。

【結果・考察】

エチレンを注入したチャンバー内に試作した電解装置を入れ、通電することでエチレン濃度の推移を観察した。その結果、装置に通電するとエチレン濃度は徐々に低下し 3～7 時間程度でほぼ消失することが明らかとなった。また、チャンバー内湿度の影響について検討を行ったところ、湿度の増加に伴いエチレン分解速度が増加することが明らかとなった。このことから、エチレン分解には水の電気分解反応が関わっていることが示唆された。また、電解装置の除湿側、放湿側それぞれについてエチレン分解挙動を観察したところ、除湿面（陽極）においてのみエチレンが分解されることが明らかとなった。そこで、HPF 試薬を用いてヒドロキシラジカルの検出実験を行ったところ、電解装置の放湿側からはほとんどヒドロキシラジカルの発生が認められないのに対し、除湿側からはヒドロキシラジカルの発生が確認されることが明らかとなった。以上の結果より、電解装置において水が電気分解される過程において副次的に発生したヒドロキシルラジカルがエチレンを分解していると推測された。

また、発表者らは実際に電解装置が青果物の保存に有効であるかを検証した。エチレンを発生するリンゴとエチレン感受性の高いカキをチャンバー内に入れ、電解装置の有無について比較検討を行った。その結果、電解装置がない場合は、チャンバー内のエチレン濃度は上昇しカキの成熟も進行したのに対し、電解装置がある場合は、エチレン濃度が抑制されカキの成熟も抑制されることが明らかとなった。

Ethylene, Hydroxyl Radical, Polymer Electrolyte Membrane

発表責任者：木村太郎（taro@fitc.pref.fukuoka.jp）

講演番号：3B4a01
講演日時：3 月 26 日 09:00～ 1 号館 B4 会場

低亜鉛食給餌ラットにおける食塩嗜好上昇と脳中代謝物のメタボローム解析に関する研究

Study on elevation of salt preference and metabolome analysis of brain in the rats fed Low-Zinc diet

○袖山 尚紘[1]、酒井 久美子[2]、後藤 知子[3]、白川 仁[1]、駒井 三千夫[1] ([1]東北大院農、[2]大分大医、[3]宮城学院女子大生活科学)

○Naohiro Sodeyama[1], Kumiko Sakai[2], Tomoko Goto[3], Hitoshi Shirakawa[1], Michio Komai[1] ([1]Tohoku Univ. of Agric, [2]Oita Univ. of Med, [3]Miyagi Gakuin Univ. of Human Life Sci)

【背景・目的】

亜鉛は必須微量元素の 1 つであり、300 種以上の亜鉛酵素の活性中心としての役割や Zinc-finger タンパク質等の機能性分子の成分として生体内における多くの機能に関与している。亜鉛が欠乏すると、成長遅延や性腺機能低下、味覚異常などが起こるが、ラットでは食塩嗜好の上昇も見られることが報告されている。ラットを用いた研究では、亜鉛欠乏食給餌約 4 日後という短期の亜鉛不足シグナルで食塩水（150 mM NaCl）嗜好率が上昇したが、その機構は未だに解明されていない。そこで本研究では中枢神経系に焦点を当て、低亜鉛食給餌ラットにおける食塩嗜好変化と、脳中代謝物の変化との関連性について解析した。

【方法】

＜実験 1＞実験動物は、4 週齢の SD 系雄ラットを用いた。実験群は、低亜鉛食（Low-Zn, Zn：2.2 ppm）群、亜鉛添加食（Zn-Suf, Zn: 33.9 ppm）群、Pair-fed 群の 3 群とした。実験食給餌 0～4 日後において、脳脊髄液（CSF; Cerebrospinal fluid）を大槽から穿刺針を用いて採取し、亜鉛、ナトリウム、カリウム濃度を測定した。

＜実験 2＞ラットを上述の低亜鉛食群、亜鉛添加食群、Pair-fed 群の 3 群に分け、実験食給餌 0, 2, 4 日目において視床下部組織を採取した。視床下部サンプルをメタボローム解析に供するため、水溶性画分をトリメチルシリル（TMS）化、およびメトキシム化の誘導体化前処理後、酒井らの方法に従って四重極型ガスクロマトグラフ質量分析計（SHIMADZU GCMS-TQ8040）を用いて MRM モードで代謝物の分離同定を行い、SIMCA Ver.13（Umetrics）によって多変量解析を行った。

【結果・考察】

＜実験 1＞食塩水嗜好率の上昇が見られ始めた 3 日目および 4 日目の CSF ナトリウム濃度は群間で変化が見られなかったが、CSF 亜鉛濃度は Low-Zn 群が低値傾向を示した。

＜実験 2＞多変量解析（S-plot）の 2 群間比較を行ったところ、特に実験食給餌 4 日目において変動代謝物が多く検出された。それらの変動代謝物について、MetaboAnalyst の MSEA を用いてエンリッチメント解析を行ったところ、Low－Zn 群ではトリアシルグリセロール生合成や NADPH 産生の促進、並びにグリシン、セリン、アラニン、メチオニン代謝の抑制が示された。

血漿亜鉛濃度は低亜鉛食給餌から 2 日後には低下する一方で、CSF 亜鉛濃度は 3 日目から低下しており、4 日目から観察された食塩嗜好上昇との関連が示唆された。さらに、視床下部組織のメタボローム解析の結果より、Low－Zn 群では脂肪合成の亢進やアミノ酸代謝の変化が起きていることが推測されたことから、空腹シグナルが正常に機能しておらずグレリンなどの食欲促進物質が低値となっていると考えられた。これらの結果から、短期の低亜鉛食給餌ラットでは、脳脊髄液亜鉛濃度の低下が引き金となり、グレリンのような食塩水摂取抑制作用を有する因子が低値となることで抑制が外れて、摂食量の低下とともに食塩嗜好上昇が引き起こされていることが示唆された。

salt preference, zinc, metabolome analysis

講演番号：3B4a02
講演日時：3 月 26 日 09:11～ 1 号館 B4 会場

ヒト型 PXR マウスを用いたビタミン K2 による PXR 標的遺伝子の発現調節の解析

Regulation of gene expression by vitamin K2 in humanized PXR mice

○渡邉 きみか、Sultana Halima、白川 仁、駒井 三千夫（東北大院農）
○Kimika Watanabe, Halima Sultana, Hitoshi Shirakawa, Michio Komai (Tohoku Univ. of Agric.)

【目的】核内受容体 PXR (Pregnane X receptor) は薬物・糖質・胆汁酸代謝に関与する多くの代謝酵素や輸送体の遺伝子発現を転写レベルで制御している。PXR は種間で異なるリガンド選択性を持つことが示されており、このことはげっ歯類を使用したヒト PXR (hPXR) リガンドの動物試験を行うにあたって重要な問題とされ、マウス Pxr のリガンド結合領域 (LBD) を hPXR の LBD と置換した、hPXR ノックイン (KI) マウスが開発されている。また PXR はリガンド特異性が低く、医薬品の他にビタミンなどもリガンドとなることが知られているが、ビタミン K2 の一種であるメナキノン-4 (MK-4) が、hPXR のリガンドとなることが示されている。日常的に摂取しているビタミン K (VK) は、生体内で MK-4 に変換されることから、PXR の活性化を介した MK-4 の機能解明は、重要なテーマである。本研究では KI マウスを用いて、MK-4 による hPXR を介した PXR 標的遺伝子の発現変化を解析した。
【方法】(実験 1) 野生型 (WT)、および KI マウス (14 週齢、雄) に、コントロール食 (VK1：0.75 mg/kg 飼料) と、VK 無添加食を 28 日間給餌した。6 時間の絶食後、屠殺し、肝臓、小腸、腎臓、肺、胃、精巣を採取して、PXR 標的遺伝子の mRNA 量を定量 RT-PCR により測定した。また、臓器中の VK 量を蛍光 HPLC 法で測定した。(実験 2) WT、および KI マウス (12~13 週齢、雄) を 14 時間絶食させた後、MK-4 を経口投与 (100 mg/kg 体重) し、6 時間後に屠殺、実験 1 と同様の解析を行った。
【結果・考察】KI マウスに VK 無添加食を給餌した場合、腎臓において、薬物代謝関連遺伝子である *Mdr1* mRNA 量が有意に減少した。また肝臓において、*Mdr1* mRNA 量と胆汁酸代謝関連遺伝子である *Cyp7a1* mRNA 量が有意に減少した。臓器中の VK1, MK-4 濃度は、VK 無添加食給餌により、腎臓、肝臓ともに低下していて、検出されなかった。以上の結果から、飼料中の VK1 により腎臓、肝臓中の hPXR が潜在的に活性化し、標的遺伝子の発現量を変化させている可能性があるが、その効果は臓器や遺伝子によって特異性があることが示唆された。KI マウスに MK-4 を経口投与した場合、腎臓 *Mdr1* mRNA 量が有意に上昇したが、肝臓においては変化が見られなかった。また WT マウスにおいては、VK 無添加食給餌、MK-4 経口投与ともに腎臓、肝臓における遺伝子発現の変化は見られなかった。腎臓の MK-4 濃度は WT と KI マウスで差が無かったことから、MK-4 は腎臓で hPXR を活性化し、標的遺伝子の発現量を変化させることが示唆された。

vitamin K2, PXR, gene regulation

講演番号：3B4a03
講演日時：3 月 26 日 09:22～ 1 号館 B4 会場

ピロロキノリンキノン（PQQ）の LC-MS/MS 分析：牛乳およびヒト母乳の測定

LC-MS/MS analysis of pyrroloquinoline quinone（PQQ）：Measurement of milk and human breast milk

○加藤 主税[1]、河合 笑子[1]、小林 俊二郎[2]、伊藤 隼哉[1]、永塚 貴弘[1]、仲川 清隆[1]（[1]東北大院農・機能分子解析、[2]雪印ビーンスターク（株））
○Chikara KATO[1], Emiko KAWAI[1], Syunjirou KOBAYASHI[2], Junya ITO[1], Takahiro EITSUKA[1], Kiyotaka NAKAGAWA[1]（[1]Tohoku Univ., [2]Bean Stalk Snow Co.,Ltd.）

【背景】ピロロキノリンキノン（PQQ）は、バクテリア由来の補酵素として知られる水溶性キノン物質であり、マウスを用いた試験で PQQ 欠乏症状（成長障害や出生率の低下）や PQQ を補酵素とする酵素の存在が報告されたことから、新規ビタミン B 様物質と考えられるようになった。さらに、PQQ が牛乳やヒト母乳に少なからず含まれていることが報告され、その生理的意義に注目が集まっている。但し、牛乳や母乳の PQQ 分析例は未だ数法に限られ、抽出法や測定原理が異なることから、定量的な議論は難しい状態にある。加えて、PQQ と各種アミノ酸の付加体（IPQ-R: R=アミノ酸側鎖）については、ヒト母乳中の存在が示唆されているが、牛乳の解析例はない。そこで、本研究では内部標準物質を用いた抽出法と、高感度かつ高選択的な LC-MS/MS 法を組み合わせて、PQQ と IPQ-R の定量法を構築し、牛乳およびヒト母乳を分析して PQQ や IPQ-R の存在有無や量を明らかにしようとした。
【方法・結果】PQQ2Na 標品および IPQ（PQQ2Na と各種アミノ酸の混合物をインキュベートして調製[1)]）をリファレンス化合物として、MS/MS のイオン化条件を最適化した。MS/MS に LC を付し、イオンペア剤を使用した逆相系で分離を行い、選択的分析が可能な Multiple Reaction Monitoring（MRM）モードで検出を行った。その結果、PQQ と IPQ-R（Cys、Pro、Trp 由来の IPQ を除く 17 種）の検出に成功し、外部標準法による ng/mL レベルの PQQ 定量、および IPQ-R の定性分析が可能となった。本法で PQQ を確実に含むサンプル（PQQ 生産菌培地上清; 三菱ガス化学から恵与）を分析したところ、PQQ と数種類の IPQ-R のピークを検出でき、本法の有用性が確認された。そこで、製造工程の異なる数種類の牛乳、および泌乳期 1 カ月目のヒト母乳の分析に取り組むこととした。これら試料に内部標準物質[U-^{13}]C-PQQ（三菱ガス化学）を添加して Oasis WAX に供し、得られた溶出物を強酸性条件下で酢酸エチル/アセトニトリル抽出して、LC-MS/MS 分析に供した。結果、牛乳中の PQQ や IPQ-R はほとんど検出限界以下であり、他方、ヒト母乳には PQQ が含まれ、その濃度は 1-3 ng/mL であった。さらに、少なからずグリシン由来の IPQ を含むヒト母乳も確認された。以上の結果から、牛乳にはほとんど含まれない PQQ がヒト母乳にはあり、かつその一部は IPQ として存在していると推測される。今後は PQQ と IPQ-R の一斉定量とともに、これらのヒト母乳中での意義の解明に向けて泌乳期の異なる様々なヒト母乳の分析を実施する予定である。

1) A. Ando et al., *Vitamins*, **88**, 601–609 (2014)

Pyrroloquinoline quinone, LC-MS/MS, Human breast milk

発表責任者：仲川清隆（nkgw@m.tohoku.ac.jp）

講演番号：3B4a04
講演日時：3 月 26 日 09:33～ 1 号館 B4 会場

食品添加物が食品中のビタミン B_{12} に及ぼす影響
Effects of Food Additives on Vitamin B_{12} in Foods

○岡本 奈穂[1]、日裏 七海[2]、山本 彩夏[2]、美藤 友博[2]、藪田 行哲[1,2]、渡邉 文雄[1,2] ([1]鳥取大院連合農学、[2]鳥取大農)
○ Naho OKAMOTO[1], Nanami HIURA[2], Ayaka YAMAMOTO[2], Tomohiro BITO[2], Yukinori YABUTA[1,2], Fumio WATANABE[1,2] ([1]Tottori Univ. United. Grad. Sch. of Agric. Sci., [2]Tottori Univ. of Agric.)

【背景・目的】ビタミン B_{12}（B_{12}）はコリン環と称されるテトラピロール様骨格の中央にコバルト原子が配位した構造を有する赤色の水溶性化合物である．B_{12} は一部の細菌でのみ生合成された後，食物連鎖により種々の動物の体内に吸収・蓄積されるため，主として動物性食品に多く含有される．これまでの研究において，B_{12} が有機塩素系殺菌剤クロラミン T と反応することによって生成する B_{12} [*c*-lactone]が一部の乾燥キノコから検出された[1,2]．そこで，我が国の指定添加物リスト（日本食品化学研究振興財団）に記載されている 449 種から香料と着色料，脂溶性ビタミンを除外し，動物性食品に使用されている添加物 11 種を選別して標準 B_{12} と混和した結果，次亜塩素酸水，ピロ亜硫酸ナトリウム，亜硫酸ナトリウムで顕著な反応性が認められた．本研究ではこれらの食品添加物が B_{12} に及ぼす影響を詳細に解析すると共に，食品中の B_{12} 含量に及ぼす影響を検討した．
【方法】次亜塩素酸水は塩素濃度を 30 ppm（使用基準有効塩素濃度 10～80 ppm），ピロ亜硫酸ナトリウム及び亜硫酸ナトリウムは規定されている使用量限度に従い 0.01%（w/v）に調製し，B_{12}（終濃度 10 μM シアノコバラミン）と混合し，反応液を TLC および HPLC を用いて分析した．市販の赤エビに各食品添加物を処理した後，処理前後での B_{12} 含量の変化を *Lactobacillus delbrueckii* ATCC7830 を用いた微生物学的定量法によって測定した．
【結果】各食品添加物と B_{12} を試験管内で反応させた結果，次亜塩素酸水は速やかに B_{12} と反応し，B_{12} に特有な 361 nm および 550 nm の吸収を消失させた．一方，ピロ亜硫酸ナトリウムと亜硫酸ナトリウムにおいては著しい吸収スペクトルの変化は観察されなかったが，TLC および HPLC 分析において反応生成物が検出され，またそれに伴い B_{12} の減少が確認された．実際に食品（赤エビ）中の B_{12} 含量に及ぼす影響を検討した結果，各食品添加物処理で B_{12} 含量の減少傾向が示されたが，標準 B_{12} と直接反応させた場合よりも B_{12} への影響は小さかった．この理由として，遊離型である標準の B_{12} とは異なり，食品中の B_{12} はタンパク質と結合して存在しているため，食品添加物による影響が緩和されたものと推察される．

1. Teng *et al.*, J. Agric. Food Chem., 62, 1726-1732 (2014)
2. Bito *et al.*, Mycoscience, 55, 462-468 (2014)

vitamin B_{12}, food additive

発表責任者：渡邉文雄（watanabe@tottori-u.ac.jp）

講演番号：3B4a05
講演日時：3 月 26 日 09:44～ 1 号館 B4 会場

ビタミン B_{12} 欠乏が線虫(*Caenorhabditis elegans*)の中性脂質代謝に及ぼす影響
Effect of vitamin B_{12} deficiency on triglyceride metabolism in *Caenorhabditis elegans*
○美藤 友博[1]、後井 俊哉[1]、岡本 奈穂[2]、藪田 行哲[1]、河野 強[1]、渡邉 文雄[1]([1]鳥取大農、[2]鳥取大院連合農)
○Tomohiro BITO[1], Shunya GOI[1], Naho OKAMOTO[2], Yukinori YABUTA[1], Tsuyoshi KAWANO[1], Fumio WATANABE[1] ([1]Tottori Univ. Agric., [2]Tottori Univ. Agric. Sci.)

【目的】生体内において、ビタミン B_{12} (B_{12}) は奇数鎖脂肪酸の異化代謝に関与するメチルマロニル CoA ムターゼならびにリン脂質合成に重要な *S*-アデノシルメチオニンの生成に関与するメチオニンシンターゼの補酵素として機能するため、B_{12} と脂質関連代謝系は密接な関連性を示す。これまでの予備的検討において、B_{12} 欠乏線虫 (*Caenorhabditis elegans*) は B_{12} 供給 (コントロール) 線虫と比較し、顕著な中性脂質の蓄積を示した。そこで、本研究ではヒトのモデル生物である線虫を用いて、B_{12} 欠乏が線虫の中性脂質代謝に及ぼす影響を詳細に検討した。
【方法】コントロール線虫と B_{12} 欠乏線虫はそれぞれ B_{12} 添加および B_{12} 無添加培地で 5 世代間生育させ調製した。Folch 法により線虫の全脂質を抽出し、Sep-Pak Silica Cartridge を用いて、全脂質から中性脂質の分画を行った。全脂質および中性脂質 (トリアシルグリセリド) 含量は重量法または酵素法を用いて測定した。線虫の脂質は BODIPY FL C12 を用いて蛍光染色した。また、B_{12} 欠乏が線虫の脂質代謝に関与する遺伝子の発現に及ぼす影響を qPCR 法で分析した。
【結果・考察】線虫の全脂質および中性脂質含量を測定した結果、B_{12} 欠乏線虫ではコントロール線虫と比較し、全脂質と中性脂質含量が約 1.4 倍の蓄積を示した。線虫の脂質の蛍光染色の結果、部位特異的な脂質の蓄積は見られなかったが、B_{12} 欠乏線虫ではコントロール線虫よりも肥大化した脂肪滴が数多く観察された。B_{12} 欠乏により中性脂質が蓄積するメカニズムを解明するために、中性脂質代謝に関与する遺伝子の発現を評価した結果、B_{12} 欠乏線虫はコントロール線虫と比較して、トリアシルグリセリドの合成に寄与するジアシルグリセロール *O*-アシルトランスフェラーゼ 2 (*dgat-2*) の遺伝子発現が約 3 倍に上昇した。また、脂肪細胞トリアシルグリセリドリパーゼ活性化因子 (*cgi-58*) の遺伝子の発現が著しく低下していた。これらの結果より、B_{12} 欠乏線虫の中性脂質の蓄積はトリアシルグリセリドの合成促進ならびに分解抑制により引き起こされていることが推察された。また、B_{12} 欠乏線虫の脂肪滴の肥大化は、環境の悪化などによりエネルギーの貯蔵システムが亢進されることにより引き起こされていることが推定された。

vitamin B_{12}, *Caenorhabditis elegans*, triglyceride

講演番号：3B4a06
講演日時：3 月 26 日 10:05～ 1 号館 B4 会場

JNK シグナルへの作用を介したロスマリン酸のアルツハイマー病予防機構
The preventive effect of Rosmarinic acid on Alzheimer's disease by modulating JNK signaling
○山本 宗[1]、篠原 もえ子[2]、濱口 毅[2]、山田 正仁[2]、小林 彰子[1]([1]東大院農、[2]金沢大医)
○So YAMAMOTO[1], Moeko SHINOHARA[2], Tsuyoshi HAMAGUCHI[2], Masahito YAMADA[2], Shoko KOBAYASHI[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Kanazawa Univ.)

【背景・目的】アルツハイマー病（AD）には根本治療薬が存在せず、食事などを通した予防法の確立が期待されている。シソ科植物に含まれるポリフェノールであるロスマリン酸（RA）は、AD の原因物質とされるアミロイド β（Aβ）に対して高い凝集抑制能を示す（Hamaguchi et al., 2009)。さらに我々は、AD モデルマウス（Tg2576）に対して、発症前から RA 含有飼料を摂食させることで認知機能の低下が抑制される可能性を見出した。AD の病理学的特徴として、Aβ の他にリン酸化タウタンパク（p-Tau）の蓄積が有名であるが、RA のタウタンパクへの作用については検討例が少ない。本研究では、Aβ と p-Tau の病理をともに観察することができるモデルマウスを用いて、RA 摂取によるタウタンパクへの作用を検討するとともに、AD 予防機構の解明を試みた。

【方法】2 か月齢の AD モデルマウス（3×Tg）17 匹を対照群と RA 群に分け、対照群には通常の粉末飼料（AIN-93G）を、RA 群には 0.5%RA を含む飼料を与えた。10 か月齢時に認知行動試験（Y 字迷路試験・新奇物体認識試験）を実施し、その後解剖にて脳、血液、その他の臓器を採取した。免疫組織染色により、脳内における Aβ および p-Tau 病理を観察した。また、海馬の DNA マイクロアレイ解析により変動が示唆されたタウのリン酸化酵素 JNK の発現および活性変動を調べた。加えて、JNK の活性化因子となり得る炎症性メディエーターの遺伝子発現変動を中枢および末梢組織を用いて解析した。

【結果・考察】認知行動試験の結果、対照群に対して RA 群で認知機能の低下抑制が認められた。免疫組織染色では、部位特異的に Aβ および p-Tau の蓄積抑制が確認された。また、RA の摂取により海馬における JNK 活性が抑制される可能性が見出され、これが RA による AD 予防機構の一端であると推定された。この作用は、RA による抗炎症効果が末梢を通じて中枢に伝達されることで発揮される可能性が示唆された。

本研究の一部は、内閣府戦略的イノベーション創造プログラム（SIP）「次世代農林水産業創造技術」および国立研究開発法人 日本医療研究開発機構（AMED）の課題番号 18dk0207021h0003 の支援を受け実施された。

Alzheimer's disease, Rosmarinic acid, JNK

講演番号：3B4a07
講演日時：3 月 26 日 10:16～ 1 号館 B4 会場

大豆タンパク質由来ジペプチド投与による脳内 BDNF 産生促進効果

Effects of administration with soy protein-derived dipeptide on BDNF enhancement

○小出 佳奈[1]、清水 綾乃[1]、三谷 塁一[1]、前渕 元宏[2]、中村 宗一郎[1]、片山 茂[1]（[1]信州大農、[2]不二製油（株））
○Kana KOIDE[1], Ayano SHIMIZU[1], Takakazu MITANI[1], Motohiro MAEBUCHI[2], Souichirou NAKAMURA[1], Shigeru KATAYAMA[1] ([1]Shinshu Univ., [2]Fuji Oil Co., Ltd.)

【目的】本研究室ではこれまでに、大豆タンパク質加水分解物（SPH）の長期摂取試験において、老化促進モデルマウス SAMP8 の空間認知記憶学習能力が改善することを明らかとした。また、SPH は脳内での神経栄養因子 BDNF 及び NT-3 の発現を増加させることも見出した。さらに、初代培養アストロサイトを用いた in vitro 試験により、β-conglycinin 配列由来のジペプチド Gly-Arg（GR）が神経栄養因子に対する産生促進効果を有することを明らかにした。そこで本研究では、SPH と GR ジペプチドを用いて、経口投与及び腹腔内投与による in vivo での BDNF 産生促進効果及び神経新生作用について検討した。
【方法】6 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを用いて、経口投与及び腹腔内投与試験を行った。コントロール群には PBS を投与し、試料群には、SPH（100 mg/kg/day）、GR（15 または 100 mg/kg/day）、および Gly と Arg のアミノ酸混合物（15 mg/kg/day）を最大で 14 日間投与した。脳海馬及び大脳皮質における BDNF 発現量をウェスタンブロッティング法により解析した。さらにパラフィン包埋切片を作製し、組織蛍光免疫染色法により脳内における BDNF 発現と神経細胞の局在を解析した。
【結果】マウスへの投与試験の結果、GR の経口投与（100 mg/kg/day）により、海馬にて未成熟型及び成熟型 BDNF 量が増加する傾向が示された。さらに大脳皮質では未成熟型 BDNF 量が有意に増加することが示された。一方、SPH の経口投与では、海馬と大脳皮質ともに顕著な BDNF 発現増加は認められなかった。次に、腹腔内投与試験を行った結果、GR 投与により、海馬と大脳皮質の両方において成熟型 BDNF 発現量が顕著に増加した。未成熟型 BDNF においては、海馬で増加傾向を示し、大脳皮質で有意な増加が認められた。SPH の投与では、大脳皮質において未成熟型および成熟型 BDNF の有意な増加が認められた。GR 腹腔内投与後の海馬歯状回では、成熟ニューロンのマーカーである NeuN の顕著な増加が認められた。一方、Gly と Arg の混合物では、海馬と大脳皮質のいずれにおいても BDNF 発現の増加は認められず、NeuN の増加も観察されなかった。以上の結果より、ジペプチド GR は BDNF 産生を介して脳内の神経新生の促進に寄与することが示唆された。

dipeptide, BDNF, neurogenesis

発表責任者：片山茂（skata@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3B4a08
講演日時：3 月 26 日 10:27～ 1 号館 B4 会場

線虫 C.elegans における細胞透過性フェルラ酸誘導体の神経保護効果

Neuroprotective effects of ferulic acid derivatives with enhanced cell permeability in C.elegans

○松本 果楠子[1]、三谷 塁一[1]、Park Hyun Young[2]、Vattem A. Dhiraj[2]、中村 宗一郎[1]、片山 茂[1]([1]信州大院農、[2]オハイオ大)
○ Kanako MATSUMOTO[1], Takakazu MITANI[1], Hyun Young PARK[2], Dhiraj VATTEM A.[2], Souichiro NAKAMURA[1], Shigeru KATAYAMA[1] ([1]Shinshu Univ., [2]Ohio Univ.)

【目的】本研究室ではこれまでに、酵素合成法を用いて糖鎖または脂肪鎖を導入したフェルラ酸（FA）誘導体の神経保護作用について報告してきた。一例として、フェルラ酸ルチノシド（FAR）は BDNF 産生促進作用を示すこと、フェルラ酸ブチルエステル（FA4）はアミロイド凝集抑制作用を示すことを明らかにした。これらのフェルラ酸誘導体が神経保護効果を発揮するには、腸管上皮細胞での優れた透過性が求められる。そこで本研究では、各種フェルラ酸誘導体の Caco-2 単層膜透過性を評価するとともに、線虫 C. elegans における神経保護効果について検討した。
【方法】FAR は、ダッタンソバ由来ルチナーゼの逆反応、FA4 はリパーゼの逆反応を用いて合成した。Caco-2 単層膜を用いた透過性試験では、トランズウェルで 21 日間の培養により得た Caco-2 単層膜を使用した。各試料添加 3 時間後、HPLC により定量分析を行い、透過係数を算出した。線虫 C. elegans を用いた試験では、ヒト型 Aβ42 遺伝子を導入した温度感受性線虫 CL4176、分子様シャペロンとして知られる ABU-1 遺伝子のプロモーターに GFP 遺伝子を連結し導入した SJ4063、および野生型 N2 を使用した。パーキンソン病モデルとして、ドーパミンニューロンの選択的細胞死を招く MPP^+を使用した。同調培養した各種線虫に供試試料の存在下でインキュベーションし、生存率または GFP 蛍光強度を測定した。
【結果】Caco-2 透過性試験の結果、FAR で最も高い透過係数が得られ、次いで FA4、FA の順になった。FAR においては少量ではあるが、アグリコンである FA が下層に検出された。続いて、CL4176 を用いて Aβ42 毒性の抑制効果を検討した。その結果、FA、FAR、及び FA4 とすべての試料において、寿命延伸効果が認められた。CL4176 は培養温度を 16℃から 25℃にシフトアップすることにより Aβ が過剰発現し、その毒性により麻痺を起こし死滅する。そこで、上記の寿命延伸効果における分子シャペロンの関与を明らかにするために、ABU-1 の発現解析を行った。その結果、FAR において、有意な ABU-1 発現増加が認められた。次に、MPP^+毒性に対する保護効果を検討したところ、FAR において効果的に生存率の低下を抑制することが示された。以上の結果より、フェルラ酸ルチノシドはフェルラ酸よりも優れた腸管上皮細胞透過性を有するとともに、アルツハイマー病及びパーキンソン病の線虫モデルにおいて神経保護効果を発揮することが示された。

Ferulic acid, Neuroprotection, C.elegans

発表責任者：片山茂（skata@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3B4a09
講演日時：3 月 26 日 10:38～ 1 号館 B4 会場

高カルシウム食は記憶・運動障害を誘発する

High calcium diet induces memory and motor disorder

○杉浦 亜美、井上 達郎、北村 美彩、長谷川 靖（室工大院）
○Ami SUGIURA, Tatsuro INOUE, Misa KITAMURA, Yasushi HASEGAWA (Muroran institute of technology graduate school)

【目的】カルシウムは体内に最も多く含まれる必須微量元素であり，血中カルシウム濃度は常に一定に保たれている．カルシウムの代謝異常は骨粗しょう症，アルツハイマー病，高血圧等の病気とも深く関わっている．しかし，カルシウム摂取量と代謝異常の関係についての研究は少なく，未だその作用機構等については明らかになっていない．我々はこれまでに Y 字迷路試験，新奇物体認識試験を用い炭酸カルシウム食を含む餌を継続摂取したマウスは短期記憶，記憶保持能力が有意に低下すること，さらにこの記憶低下はカルシウムチャンネルブロッカーであるニモジピンによって改善されることを報告してきた．本研究では炭酸カルシウムの継続摂取により，記憶能力以外の機能に異常が生じているか行動薬理試験により明らかにすることを目的とした．

【方法】食品添加物やサプリメントとして使用されている炭酸カルシウムを餌に添加し，カルシウム含量の異なる餌を作製した．ICR マウス (4-6 週齢) に①コントロール食，②0.6 %炭酸カルシウム含有食，③1.0 %炭酸カルシウム含有食 (コントロール食の 2.3, 3.1 倍量のカルシウム) をそれぞれ 2 ヵ月間食餌させた．その後，運動機能を評価するカタレプシーテスト，ポールテスト，オープンフィールド試験，ビームテスト，歩行評価試験を行った．試験終了後，脳を摘出し，神経伝達物質量の定量及び蛍光免疫染色を行った．

【結果】カタレプシーテストの結果，炭酸カルシウム食を含む餌を食餌したマウスでカタレプシー持続時間が増加し (図 1)，ポールテストにおいても運動緩徐の傾向が見られた．しかしその他の評価では有意な差はみられなかった．また，線条体における神経伝達物質量を定量したところ，パーキンソン病患者特有のドーパミン濃度の減少が見られた．また，チロシンヒドロキシラーゼ発現量の減少も見られた．

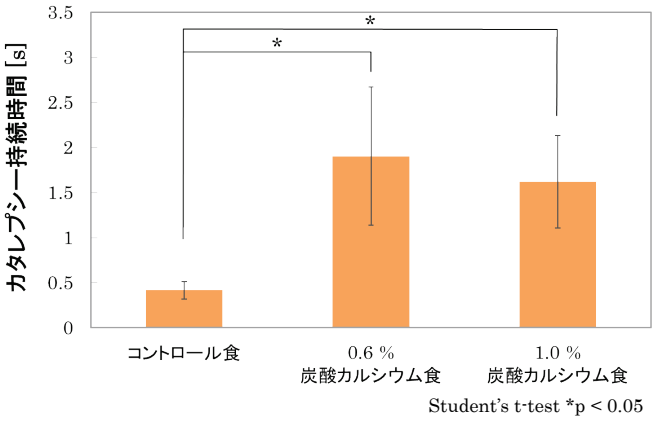


図 1　カタレプシーテスト

【考察】炭酸カルシウムを含む餌の継続摂取によって誘発された記憶能力低下，運動機能異常をもつマウスが新規のパーキンソン病のモデルマウスとして有効かどうか調べるため，今後さらなる検討を行う予定である．

calcium, memory, motor function

講演番号：3B4a10
講演日時：3 月 26 日 10:49～ 1 号館 B4 会場

ジペプチドライブラリーを用いたグレリン分泌調節ペプチドの包括的探索とその生理作用
Comprehensive analysis of a dipeptide library to identify ghrelin release-modulating peptides
○中戸 絢也[1]、青木 隼人[1]、徳山 雄基[1]、山本 雄大[1]、岩倉 浩[2]、松村 成暢[1]、井上 和生[1]、大日向 耕作[1] ([1]京大院・農・食品生物、[2]和歌山県立医科大学・内科学第一講座)
○Junya NAKATO[1], Hayato AOKI[1], Yuki TOKUYAMA[1], Yuta YAMAMOTO[1], Hiroshi IWAKURA[2], Shigenobu MATSUMURA[1], Kazuo INOUE[1], Kousaku OHINATA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Wakayama Medical University)

【目的】グレリンは摂食促進作用を有する消化管ホルモンである。これまでに我々は、マウス胃由来グレリン分泌細胞株を用いた検討により、大豆由来グレリン分泌促進ペプチド soy-ghretropin ならびに牛乳由来グレリン分泌抑制ペプチド lacto-ghrestatin を見出した[1,2]。しかし、グレリン分泌におけるペプチド構造上のルールは不明である。そこで本研究では、ジペプチドライブラリーを用いてグレリン分泌に及ぼす影響を網羅的に検討した。さらに、顕著にグレリン分泌を促進または抑制したジペプチドについて、*in vivo* でのグレリン分泌調節作用および摂食調節作用を検討した。
【方法】336 種類のジペプチドをグレリン分泌細胞株 MGN3-1[3]に添加し、培養液中の活性型グレリンを ELISA により定量した。最もグレリン分泌を促進または抑制したジペプチドを雄性 ddY マウスに経口投与し、血中グレリン濃度および摂食量を測定した。
【結果および考察】ジペプチドライブラリーの約 9 割がグレリン分泌抑制作用を示した一方で、N 末端に Ser 残基を含むジペプチドの多くがグレリン分泌促進作用を示した。ジペプチドの活性は C 末端ではなく N 末端のアミノ酸の種類に大きく左右されたことから、N 末端の構造が重要であると考えられた。グレリン分泌を最も抑制したジペプチドは Leu-Ile で、最も促進したジペプチドは Ser-Val であった。Leu および Ile とその混合物ならびに、Ser および Val とその混合物は活性を示さなかったことから、ジペプチドの構造が必須であると判明した。次に、Leu-Ile の細胞内シグナリングを検討したところ、forskolin 刺激による cAMP 合成亢進を Leu-Ile は阻害したことから、G_i 経路を活性化する可能性が示唆された。一方、Ser-Val は細胞内 Ca^{2+}及び cAMP シグナリングに影響を及ぼさなかったことから、従来と異なる新規な経路を介して作用すると考えられた。血中グレリン濃度が高値を示す絶食条件下のマウスに Leu-Ile を経口投与した結果、血中グレリン濃度が低下し、摂食量も減少した。また、非絶食条件下のマウスに Ser-Val を経口投与した結果、血中グレリン濃度が上昇し、摂食量も増加した。以上より、Leu-Ile および Ser-Val は *in vivo* でもグレリン分泌調節作用を示すことが判明した。
【結論】ジペプチドライブラリーを用いた網羅的検討により、新たにグレリン分泌抑制ペプチド Leu-Ile およびグレリン分泌促進ペプチド Ser-Val を見出した。

[1] Nakato J *et al. FEBS Lett.* 2016;590(16):2681-9.
[2] Aoki H, Nakato J *et al. FEBS Lett.* 2016;591(14):2121-30.
[3] Iwakura H *et al. Endocrinology.* 2010;151(6):2940-5.

ghrelin, structure-activity relationship, dipeptide library

講演番号：3B4a11
講演日時：3 月 26 日 11:10～ 1 号館 B4 会場

ラットの幼若期における咀嚼刺激が海馬の遺伝子発現と記憶能力に与える影響
Effects of mastication on hippocampal gene expression and memory in juvenile rat
○宮口 一勢[1]、永井 俊匡[2]、斉藤 芳和[1]、安岡 顕人[1,3]、阿部 啓子[1,3]、朝倉 富子[1]([1]東大院農生科、[2]高崎健大・栄養、[3]神奈川県立産業技術総合研究所)
○Hitonari MIYAGUCHI[1], Toshitada NAGAI[2], Yoshikazu SAITO[1], Akihito YASUOKA[1,3], Keiko ABE[1,3], Tomiko ASAKURA[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Takasaki Univ. of Health and Welfare, [3]Kanagawa Institute of Industrial Science and Tecnology)

【背景・目的】ヒトの幼若期においては、咀嚼が脳の血流量を増加させ脳機能の成長を促進することが知られている。また、成熟・老年期においては、記憶能力の維持に働くという報告がなされている。げっ歯類モデルを用いた研究では、咀嚼が海馬における神経細胞数の増加や空間記憶能力の向上をもたらすことが報告されている。以上のようなヒトやモデル動物における研究は成熟後に注目した知見が多く、幼若期ラットについての研究は少ない。さらに、行動学や現象論に基づく報告が多く、分子レベルでの解析例は少ない。本研究では、幼若期における咀嚼が記憶機能向上に与える効果とそのメカニズムを分子レベルで解明することを目的とした。

【方法・結果】離乳直後(3 週齢)の Wistar 系雄ラットに粉末(P)飼料餌あるいは固形(C)餌与え、8 日間飼育した(P 群と C 群)。飼育期間中の体重は両群で有意差は見られなかった。飼育後に新奇物体認識試験と Y 字迷路試験を行ったところ、両試験共に C 群において記憶能力が向上していることが示唆された。この原因を探るため、記憶を司る部位である海馬に注目した。海馬 CA1 領域の Golgi-Cox 染色を行い、樹状突起の長さ、複雑さ、spine 密度についての形態観察を行った。その結果、複雑さ、spine 密度が固形飼料群で有意に増加していることが確認された。空間認知能力の向上と神経形態の発達は正の相関を示すことが知られている。そこで、神経形態が変化した原因を分子レベルで追求するために、DNA マイクロアレイによる海馬のトランスクリプトーム解析を行った。その結果、P 群、C 群の間で有意に発現変動した遺伝子が合計 746 個抽出された(C>P:623 ， C<P:123)。樹状突起の複雑に影響を与えることが知られているシグナル因子について調べたところ、Rho シグナルや CaMKII シグナルに関連する遺伝子が有意に発現変動していた。以上のことから、離乳直後の幼若期に咀嚼刺激が入力されることで海馬 CA1 領域の樹状突起の複雑さが増し、そのことが空間記憶能力の向上につながっていることが示唆された。

【謝辞】本研究は、総合科学技術・イノベーション会議の SIP(戦略イノベーション創造プログラム)「次世代農林水産業創造技術」によって実施されました。

mastication, memory, hippocampus

発表責任者：宮口一勢（issey5717@gmail.com）

講演番号：3B4a12
講演日時：3 月 26 日 11:21～ 1 号館 B4 会場

長期間の咀嚼による小脳の遺伝子発現変動

Altering the gene expression in rat cerebellum by long-term mastication

○永井 俊匡[1]、浅野 実久[1]、齊藤 美佳[2]、齋藤 芳和[3]、阿部 啓子[3,4]、朝倉 富子[3] ([1]高崎健大・栄養、[2]東京家政大・栄養、[3]東大農・応生化、[4]神奈川県立産業技術総合研究所)
○Toshitada NAGAI[1], Miku ASANO[1], Mika SAITO[2], Yoshikazu SAITO[3], Keiko ABE[3,4], Tomiko ASAKURA[3] ([1]Takasaki Univ. of Health & Welfare, [2]Tokyo Kasei Univ., [3]The Univ. of Tokyo, [4]KISTEC)

【目的】咀嚼は単なる機械的消化作用だけではなく、様々な生理作用を持つことが明らかにされている。これまで我々は、咀嚼の脳機能に対する効果のメカニズムを解明するため、粉末飼料および固形飼料で飼育したラットの脳内発現遺伝子を比較した。その結果、視床において咀嚼による離乳直後の神経ネットワークの制御（*BBRC*, 2018, **498**, 621)、視床下部において長期飼育時の視床下部-下垂体-副腎系による血圧制御が示唆された(農芸化学会 2017 年度大会)。

運動機能への咀嚼の効果については、全身持久力の向上が知られているが、それ以外の効果に関する報告は無い。そこで本研究では、小脳の発現遺伝子を DNA マイクロアレイデ解析に供し、小脳の機能変化を推測した。

【方法】3 週齢 Wistar 系雄ラットに固形または粉末飼料を与えて 15 週間飼育し、小脳で発現する遺伝子を、GeneChip Rat Genome 230 2.0 Array (Affymetrix)を用いて解析した。データを GCRMA 法で正規化した後、Rank Products 法で 2 群間比較して、発現変動遺伝子(differentially expressed genes, DEGs)を抽出した (False Discovery Rate < 0.05)。DEGs を機能的に分類するために、ウェブツール DAVID を用いて、$p < 0.01$ の Gene Ontology (GO)Term を抽出し、QuickGO で階層化した。さらに Ingenuity Pathway Analysis (IPA)ソフトウェア(Qiagen)を用いて、|Z-score|≧2 かつ $p < 0.05$ の Upstream Regulator を抽出し、発現を制御する上流因子を探索した。

【結果と考察】最下層 GO Term は、神経細胞機能、遺伝子発現の調節、細胞応答、その他の 4 つに分類された。また、DEGs は属する Term によってグループ A-D に分類された。グループ A では、軸索や樹状突起形態形成に関わる 5 つの DEGs が固形飼料群で発現上昇したことから、軸索や樹状突起の形態形成が促進されることが示唆された。グループ B では、細胞増殖に関与する DEGs が固形飼料群で発現上昇し、またこれらの DEGs は「regulation of neurogenesis」に含まれることから、咀嚼は神経細胞を新生するうえで重要な役割を果たしていると考えられる。

これら DEGs を制御する Upstream Regulator が、IPA による解析から 4 個予想された。そのうち Z-score が最も高いフォルスコリンは、cAMP を介してアデニル酸シクラーゼを活性化し、長期増強をもたらす。よって長期間の咀嚼によって小脳細胞の cAMP 濃度が上昇することが判明した。

【謝辞】本研究は、総合科学技術・イノベーション会議の SIP(戦略的イノベーション創造プログラム)「次世代農林水産業創造技術」によって実施されました。

mastication, cerebellum, DNA microarray

発表責任者：朝倉富子（asakura@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3B4a13
講演日時：3 月 26 日 11:32～ 1 号館 B4 会場

脳幹で甘味を伝達する神経の特定
Genetic identification of sweet taste neurons in the mouse brainstem
○中島 健一朗[1]、傅 欧[2]、岩井 優[2]、近藤 邦生[1]、箕越 靖彦[1]、三坂 巧[2] ([1]生理学研究所、[2]東大院農生科・応生化)
○Kenichiro NAKAJIMA[1], Ou FU[2], Yuu IWAI[2], Kunio KONDOH[1], Yasuhiko MINOKOSHI[1], Takumi MISAKA[2] ([1]NIPS, [2]The Univ. of Tokyo)

味覚は舌を起点として脳内に味情報が伝達される事で認識される。近年の味覚受容体遺伝子の同定とその機能解析は、末梢における味覚受容機構の詳細を明らかにしてきた。その一方、脳内における味覚伝達機構の実体は不明な点が多い。その大きな要因は、味覚伝達神経を未だ遺伝学的に特定できないことである。

本研究ではマウスをモデルに味覚情報伝達の重要な中継点の１つとして知られる後脳の橋結合腕傍核における味覚受容神経の探索と同定を行った。

過去の電気生理学実験および組織学的解析をもとに、橋結合腕傍核において転写因子 SatB2 を発現する神経が味覚伝達神経である可能性が示唆された。そこで、この神経特異的に Cre リコンビナーゼを発現する SatB2-Cre マウスに様々なアデノ随伴ウイルス(AAV)を導入する事で、この神経の機能を検証した。

まず、ジフテリアトキシン A 鎖を導入し、この神経を選択的に欠損した動物の味覚感受性を評価した。興味深い事に、このマウスは甘味をほとんど感じられないのに対し、他の味の感受性は正常のままであった。

次に、蛍光カルシウムセンサーである GCaMP6 を導入し、味溶液を味わっている際の SatB2 発現神経の活動を *in vivo* カルシウムイメージング法で測定した。その結果、甘味溶液を味わっている際にこの神経は応答するものの他の味を摂取している際には応答しない事が明らかになった。

最後に、この神経に光応答性のイオンチャネルであるチャネルロドプシンを導入し、その活動を人工的に活性化させたところ、無味である水にもかかわらず溶液をなめる回数が増加した。

以上の結果から、橋結合腕傍核の SatB2 発現神経は甘味情報を選択的に伝達する味神経である事が示された。

通常、味覚受容体分子の機能解析では特定の味質の強度の測定はできるものの、複数の味同士の影響の評価は困難である。本研究における脳内の甘味神経そのものの活動測定は、他の味が甘味に与える修飾効果や美味しさを定量的に評価するうえでも役立つと考えられる。

Taste, Brain, calcium imaging

発表責任者：中島　健一朗（knakaj@nips.ac.jp）

講演番号：3B4a14
講演日時：3 月 26 日 11:43～ 1 号館 B4 会場

食脂肪の嗜好性における海馬 PI3K/Akt-mTOR シグナル伝達経路の関与
Possible involvement of PI3K/Akt-mTOR signaling pathway in the hippocampus in the regulation of preference for fat

○小林 賢斗[1]、安達 真一[2]、近藤 真司[2]、佐藤 祐介[3]、吉澤 史昭[3]([1]宇都宮大院・農、[2]宇都宮大・バイオ、[3]宇都宮大・学術院)
○ Kento KOBAYASHI[1], Shin-ichi ADACHI[2], Shinji KONDO[2], Yusuke SATO[3], Fumiaki YOSHIZAWA[3] ([1]Utsunomiya Univ., Grad. Sch. of Agri., [2]Utsunomiya Univ., C-Bio., [3]Utsunomiya Univ., Academic Association)

【背景・目的】げっ歯類が食脂肪を摂取した際に、モルヒネやコカインなどの薬物と同様に繰り返し摂取したいという欲求が惹起されることが明らかとなっている。また、薬物に対する執着には脳の海馬が重要な役割を果たすことが知られており、特に海馬神経細胞における PI3K（phosphatidylinositol 3-kinase）とその下流因子である Akt-mTOR（mammalian target of Rapamycin）-p70S6K（70-kDa ribosomal S6 kinase）シグナル伝達経路は、薬物に対する執着に関与していることが報告されている。一方で、食脂肪に対する執着行動における PI3K/Akt-mTOR 経路の関与については未だ不明な点が多い。本研究では、食脂肪嗜好性の形成や維持に海馬 PI3K/Akt-mTOR 経路が関与しているか、また食脂肪摂取時にどのようなメカニズムで同経路が活性化されるかについて動物行動学的および生化学的手法を用いて明らかにすることを目的とした。
【方法】9 週齢の雄性 ICR マウスに食脂肪として乳化油脂（10%大豆油溶液）を 4 日間連続で短時間呈示し、摂取量を測定した。最終日の油脂呈示終了後すぐに脳から海馬を採取し、Akt および mTOR のリン酸化状態をウェスタンブロット法により解析した。次に、海馬 PI3K/Akt-mTOR 経路を阻害した際に油脂摂取時に見られる嗜好性の増加に変化が見られるのかを調べるために、両側海馬に PI3K 阻害剤 LY294002 を微量投与し油脂摂取量を測定した。さらに、オピオイド受容体が油脂摂取時に見られる PI3K/Akt-mTOR 経路の活性化に関与しているのかを調べるために、非選択的オピオイド受容体アンタゴニスト Naltrexone を腹腔内投与し、Akt および mTOR のリン酸化状態をウェスタンブロット法により解析した。
【結果・考察】食脂肪摂取の摂取量の経日的な増加に伴い、海馬のAktおよびmTORの活性化が見られた。PI3K阻害剤投与によって、脂肪溶液の摂取量の増加が見られなくなった。また、オピオイド受容体アンタゴニスト投与により、食脂肪の摂取時に見られた海馬PI3K/Akt-mTOR経路の活性化が見られなくなった。以上より、食脂肪の摂取行動に海馬PI3K/Akt-mTOR経路が関与し、その経路の活性化はオピオイド受容体を介していることが示唆された。

fat, palatability, PI3K/Akt-mTOR signaling pathway

講演番号：3B4a15
講演日時：3 月 26 日 11:54～ 1 号館 B4 会場

ローヤルゼリーの慢性軽度ストレス負荷抑うつ様モデルにおける効果

Effect of royal jelly on depression-like behavior of chronic mild stress model

○家垣 典幸[1]、成田 幸夫[1]、服部 徳子[1]、平田 洋子[2]、市原 賢二[1] ([1]アピ（株）長良川リサーチセンター、[2]岐阜大院・連合創薬)
○Noriyuki IEGAKI[1], Yukio NARITA[1], Noriko HATTORI[1], Yoko HIRATA[2], Kenji ICHIHARA[1] ([1]Nagaragawa Research Center, API Co., Ltd., [2]Gifu Univ.)

【目的】ローヤルゼリー（RJ）は、働き蜂が女王蜂を育てるために分泌する物質である。ヒトにおいては、滋養強壮や更年期障害の改善など様々な用途に用いられている。近年、健常高齢者を対象としたプラセボ対照比較試験において、RJ の 6 ヵ月間摂取により「心の健康」が改善されることが報告された[1)]。我々は、基礎研究にてヒトで見られた RJ の効果を検証し、作用機序を解明することを目指している。本研究では、軽度のストレスをランダムに負荷する予測不可能な慢性軽度ストレス（UCMS）モデルマウスを用いて、RJ の抗うつ様効果を確認し、作用メカニズムを解明するため、ストレス応答に関わる組織として副腎の網羅的な遺伝子発現解析を実施した。
【方法】7 週齢 BALB/c 雄性マウスを使用し、無処理（Control）群、軽度なストレスをランダムに 3 週間負荷した（UCMS）群および UCMS を負荷し凍結乾燥 RJ を 4%含有した飼料を与えた（FDRJ）群の計 3 群を設けた。UCMS を 3 週間負荷した後、尾懸垂試験における不動時間を抑うつ様行動として測定し、その翌日に副腎を採取した。各試験群から代表的な 3 個体を選び、それらの副腎から total RNA を抽出後、SurePrint G3 Mouse GE マイクロアレイキット 8x60K v2（アジレント社）を用いて、網羅的な遺伝子発現解析を行った。統計的に有意かつ 1.5 倍以上の発現差を示したプローブを発現変動候補遺伝子とし、アノテーションデータベース DAVID を用いたジーンオントロジー（GO）解析を実施した。データ解析の結果より見出された変動候補遺伝子の発現を定量的 RT-PCR 法を用いて評価した。
【結果・考察】尾懸垂試験の結果、Control 群と比較して、UCMS 群で不動時間の延長が見られたが、FDRJ 群では見られなかったことから、RJ 摂取によりストレス誘発うつ様行動が抑制されることが示唆された。副腎における網羅的な遺伝子発現解析の結果、FDRJ 群では、コルチコステロン合成に必要とされるコレステロールの輸送や合成に関わる遺伝子発現が抑制されていた。以上の結果より、ヒト試験の効果を裏付ける試験として行った UCMS 負荷動物モデルにおいて、RJ は UCMS 負荷によるうつ様行動を改善した。この抗うつ様作用のメカニズムの一部として、RJ が副腎においてミトコンドリアへのコレステロール輸送を抑制することにより、ストレス負荷によるコルチコステロン生成の増加を抑制することが示唆された。

1) *Nutrition Journal* 2012 Sep 21;11(1):77.

Royal jelly, Depression, Stress

発表責任者：市原 賢二（ichihara-kenji@api3838.co.jp）

講演番号：3B4p01
講演日時：3 月 26 日 13:50～ 1 号館 B4 会場

ヒト甘味受容体安定発現細胞を用いた高濃度糖溶液の甘味評価法の改良
Evaluation of low-intensity sweeteners using a stable cell line expressing the human sweet taste receptor.
○井手 美里、竹谷 千晶、三坂 巧（東大院農生科・応生化）
○Misato IDE, Chiaki TAKETANI, Takumi MISAKA (Dept.Appl.Biol.Chem.,The Univ.Tokyo)

【背景･目的】 ヒトは五基本味を含む様々な味を識別することができるが、中でも甘味は嗜好性が強く、食行動決定において重要である。甘味物質は、T1R2 と T1R3 のヘテロダイマーである甘味受容体を介して認識されることが知られている。当研究室では T1R2、T1R3、およびキメラ G タンパク質を安定発現させた、応答性の高いヒト甘味受容体安定発現細胞株の構築にすでに成功している（Imada *et al.*, ***BBRC***, 2010)。人工甘味料であるスクラロースなど、様々な甘味料について、この細胞株の細胞応答を指標に客観的な甘味強度を呈示することが可能となっている。

一方、スクロースやグルコースなどの糖類は、様々な食品中に含有され日常的に摂取されている甘味物質であるが、比較的弱い甘味しか示さない。したがって、甘味受容体発現細胞において十分な細胞応答を取得しようとすると、100-300 mM を超えるような高濃度の糖溶液をリガンドとして用いる必要がある。しかしながら、高濃度糖溶液を投与すると細胞外液が高浸透圧条件となり、細胞応答が顕著に阻害されるため、正確な甘味強度の評価がこれまで行えていなかった。そこで、リガンド調製に用いるアッセイバッファーの組成を変更し、リガンド溶液の浸透圧調整を行うことで、低甘味度甘味料の甘味強度が正しく評価できるかようになるかについて、検討を行った。

【方法・結果】 従来法ではリガンド調整を行う際に、糖類などのリガンドを、等張液であるアッセイバッファー（130 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM HEPES（pH7.4）などを含む）に溶解していた。しかしその方法では高濃度のリガンド溶液ほど、結果的には高浸透圧となってしまう。そこで本研究では、糖類を溶解することにより増加する浸透圧の分だけ NaCl を減少させた、従来より浸透圧の低いアッセイバッファーを準備し、そこに糖類を溶解することで、リガンド溶液の最終的な浸透圧が等張液になるよう、リガンド調製に工夫を加えた。
ヒト甘味受容体安定発現細胞株に蛍光カルシウム指示薬を負荷後、準備した等張液のリガンド溶液をそれぞれ添加し、リガンド投与時の蛍光強度の増加を計測することで、甘味受容体活性化能について評価した。その結果、従来法では正しく評価できなかった低甘味度甘味料の甘味強度の評価が可能となった。現在、投与条件の精査を行っており、リガンドの種類及び濃度幅のさらなる拡大を目指している。

sweetener, taste receptor, sugar

講演番号：3B4p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ 1 号館 B4 会場

ヒト甘味受容体発現細胞の応答強度向上のための培養条件検討
Exploration of cultural factors to improve the responsiveness of cells expressing the human sweet taste receptor.
○竹谷 千晶[1]、松谷 拓弥[1]、中北 智哉[2]、三坂 巧[1] ([1]東大院・農生科・応生化、[2]京大院・医)
○ Chiaki TAKETANI[1], Takumi MATSUYA[1], Tomoya NAKAGITA[2], Takumi MISAKA[1] ([1]Dept.Appl.Biol.Chem.,The Univ.Tokyo, [2]Grad.Sch.Med.,Kyoto Univ.)

【背景・目的】
Class C GPCR に属する T1R2 及び T1R3 は、ヘテロダイマーを形成し、甘味受容体として機能する。我々はこれまでに、一つのベクター中に 2 つの受容体サブユニットおよびキメラ G タンパク質をタンデムに組み込んだ発現プラスミドを構築し、それを培養細胞のゲノム中に 1 コピー導入するといった方法によって、ヒト甘味受容体安定発現細胞株の作出を行った。これにより、一過性発現細胞と比較して応答が顕著に大きく、簡便なヒト甘味アッセイ系の構築に成功した。(Imada *et al.*, **BBRC**, 2010)
本大会における昨年度の発表では、発現コンストラクト中のプロモーターを変更するという方針で、新規のヒト甘味受容体安定発現細胞株を複数種類作出したところ、既存のものよりも応答性の高い細胞株が得られたことを報告した（昨年度本大会要旨)。この成果は、受容体遺伝子・タンパク質の発現量を最適化することで、より高い応答性を獲得できる可能性を提示するものと考えられた。そこで本研究では、甘味受容体発現細胞の培養条件を変更することにより細胞応答強度が増強できるかどうかについて、検討を実施することとした。

【方法・結果】
ヒト甘味受容体安定発現細胞株を測定前日に 96 well プレートに播種した。測定前に洗浄後、蛍光カルシウム指示薬を負荷し、リガンド溶液投与時の蛍光強度変化を計測することにより、甘味受容体活性化能を評価した。測定前日からの前培養時に培地中に甘味受容体活性調節物質などの化合物を共存させることで、リガンド添加時の応答強度が変化するかどうかについて、検討を行った。
様々な物質を前培養時に添加するというスクリーニングを行ったところ、前培養時に添加することでリガンドに対する応答向上効果が認められる化合物が複数、同定された。この手法を用いることにより、ヒト甘味受容体安定発現細胞の応答感度は維持したまま応答強度が向上することが判明した。これら物質による応答増強効果は、甘味受容体を一過的に発現させた細胞においても再現されたことから、広範な甘味受容体応答増強手法として利用しうる可能性が提示された。現在、その作用メカニズムについての検討を実施している。

taste receptor, sweetener, cell culture

講演番号：3B4p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ 1 号館 B4 会場

抗炎症剤イブプロフェンの甘味受容体に対する阻害剤としての作用機構解析
The analysis of the interaction mechanism of a nonsteroidal anti-inflammatory drug, ibuprofen as an inhibitor against a sweet taste receptor

○中北 智哉[1,2]、竹谷 千晶[1]、成川 真隆[1]、小林 拓也[2]、三坂 巧[1]（[1]東大院・農生科・応生化、[2]京大院・医）
○Tomoya NAKAGITA[1,2], Chiaki TAKETANI[1], Masataka NARUKAWA[1], Takuya KOBAYASHI[2], Takumi MISAKA[1]（[1]Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. Tokyo, [2]Grad. Sch. Med., Kyoto Univ.）

[背景・目的]甘味受容体は T1R2、T1R3 がヘテロダイマーを形成することにより機能することが明らかにされている。T1R ファミリーは class C GPCR に分類される G タンパク質共役型受容体(GPCR)であり、複数のリガンド受容サイトが存在することが知られている。中でも、T1R3 の膜貫通領域(TMD)にはラクチゾール及びその誘導体 2,4-DP、ギムネマ酸といった甘味阻害剤が作用することが明らかとなっている。

一方、イブプロフェンは cyclooxygenase (COX)の活性阻害剤として作用し(IC_{50} = 7 μM)、頭痛や発熱といった症状を緩和する抗炎症剤として広く知られている。イブプロフェンはラクチゾールと類似骨格を有していることから T1R3-TMD へ作用することが推測された。そこで本研究では甘味受容体に対する阻害活性を調べるとともに作用モデルを構築し、その機構を考察した。

[方法]甘味受容体及びキメラ G タンパク質を安定に発現する細胞株、及びいくつかの甘味受容体変異体株を用いて Ca^{2+}蛍光指示薬を用いたシグナルアッセイにより作用部位を同定したのちに、ドッキングシミュレーションを実施した。ドッキングには Maesto、Glide (Schrödinger)を用い OPLS3 力場の下、SP モードで実施した。

[結果] イブプロフェンの甘味受容体に対する IC_{50} 値は 12 μM であり、この値は COX に対する IC_{50} 値とほぼ同等であった。またこれは既知の甘味阻害剤の中では 2,4-DP と並び、強い阻害剤であることが明らかとなった。また、変異体解析からラクチゾールや 2,4-DP と同様 T1R3-TMD に作用することが示唆された。この結果を元にドッキングモデルを作製したところ、イブプロフェンの *p* 位イソブチル基は T1R3-TMD のリガンドポケット深部に達しており、これにより強力な阻害活性を獲得していると考えられた。

本研究の一部は総合科学技術・イノベーション会議の SIP(戦略的イノベーション創造プログラム)「次世代農林水産業創造技術」よって実施された。

sweet taste receptor, ibuprofen, sweet taste inhibitor

発表責任者：中北　智哉（t.nakagita@mfour.med.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3B4p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ 1 号館 B4 会場

コイ味覚受容体の発現解析

Expression analysis of taste receptors in *Cyprinus Carpio*

○久保園 峻[1]、戸田 安香[1,2]、石丸 喜朗[1,2] ([1]明治大農、[2]農芸化学会)
○Takashi KUBOZONO[1], Yasuka TODA[1,2], Yoshiro ISHIMARU[1,2] ([1]Meiji Univ. of Agric., [2]Dept. Agric. Chem.)

【背景・目的】

ゲノム解析の発展によって、味覚受容体を含む味覚関連遺伝子の類似性から生物の分子進化をたどることが可能となり、魚類にも哺乳類と一部共通した細胞内シグナル伝達の仕組みが存在することが明らかになった。哺乳類において、T1R1/3 と T1R2/3 はそれぞれアミノ酸・核酸と甘味物質を受容する。一方、ゼブラフィッシュとメダカでは、T1Rs は様々なアミノ酸を受容し、甘味物質を受容しないことが示された(Hideaki Oike et al., The Journal of Neuroscience, 2007)。特に、T1R2 は魚類では複数の遺伝子が存在し、哺乳類 T1R2 のオルソログではないことが示唆された。本研究対象とするコイ(*Cyprinus Carpio*)はゼブラフィッシュやメダカより 1 回多い 4 回の全ゲノム重複を経験している(Xu et al., Nature Genetics, 2014)。最近、コイが他の硬骨魚よりも多くの味覚受容体遺伝子を持つことや、RT-PCR を用いた味覚受容体の組織レベルでの発現が示された(Kong et al., Gene, 2018)。しかし、細胞レベルでの発現は未だに解明されていない。そこで、我々は、コイにおける細胞レベルでの味覚受容体の発現を明らかにする目的で、*in situ* hybridization 法を用いて発現解析を行った。

【方法と結果】

ゲノムデータベースを用いた相同性検索により、コイの 12 種の T1R(全長や断片を含む)、6 種の T2R 遺伝子配列が得られた。コイの口腔を含む組織から全 RNA を抽出し、RT-PCR を行ったところ、4 種の T1R と 6 種の T2R のクローニングに成功した。味細胞内シグナル伝達に関与する陽イオンチャネル Trpm5 及び４種の T1R と６種の T2R の DIG-RNA プローブを作製した。コイの上顎(ヒゲを含む)と下顎の凍結切片をクリオスタットを用いて作製し、*in situ* hybridization を行った。その結果、Trpm5 プローブによって味蕾が存在する場所が確認できた。また、T1R は４種全て、T2R は３種のみシグナルが観察された。シグナルが検出されなかった T2R については、上顎や下顎に発現していない、また、発現量が低いためと考えている。

【今後の展望】

今回は単染色を行ったが、今後は二重染色を行うことで、それぞれの味覚受容体の発現相関を調べる。また、機能解析も進めていく予定であり、コイがヒトと類似したリガンドを受容するのか、あるいは、独自のリガンドを受容するのかを解明する予定である。

taste, fish, *in situ* hybridization

講演番号：3B4p05
講演日時：3 月 26 日 14:34～ 1 号館 B4 会場

霊長類 T1R1/T1R3 におけるグルタミン酸受容能獲得の分子基盤：クモザルに注目した検討
Gain of glutamate sensitivity of T1R1/T1R3 in primates revealed by focusing on spider monkey

○戸田 安香[1]、早川 卓志[2,3]、中北 智哉[4]、河村 正二[5]、今井 啓雄[6]、石丸 喜朗[1]、三坂 巧[7] ([1]明大農・農芸化、[2]京大霊長類研・ワイルドライフサイエンス、[3]日本モンキーセンター、[4]京大院・医、[5]東大院新領域・先端生命、[6]京大霊長類研・ゲノム細胞、[7]東大院農生科・応生化)
○YASUKA TODA[1], TAKASHI HAYAKAWA[2,3], TOMOYA NAKAGITA[4], SHOJI KAWAMURA[5], HIROO IMAI[6], YOSHIRO ISHIMARU[1], TAKUMI MISAKA[7] ([1]Dept. Agric. Chem., Meiji Univ., [2]Dept. Wildlife Sci., Kyoto Univ., [3]Japan Monkey Centre, [4]Grad. Sch. Med., Kyoto Univ., [5]Dept. Integrated Biosci., The Univ. Tokyo, [6]Dept. Cellular Mol. Biol., Kyoto Univ., [7]Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. Tokyo)

【背景と目的】ヒトはグルタミン酸ナトリウム（MSG）に強い旨味を感じる。これに一致して、口腔内に発現する旨味受容体 T1R1/T1R3 は、ヒトではグルタミン酸に対して強く応答する。一方、マウスや魚類の T1R1/T1R3 はグルタミン酸にはほとんど応答しない。これまで当研究グループはヒトやマウスの T1R1/T1R3 の解析から、ヒト T1R1/T1R3 のグルタミン酸受容能獲得にリガンド結合部位に存在する 2 ヶ所のアミノ酸残基（T1R1-170 および 320）の正電荷の消失が大きく寄与していることを明らかにした。更に、ヒトと同じ狭鼻小目に属する霊長類であるアカゲザルやマントヒヒの T1R1/T1R3 もこの 2 ヶ所のアミノ酸残基が正電荷を持たず、グルタミン酸に強く応答することを明らかにした。一方、先行研究による行動実験で広鼻小目に属する新世界ザルであるリスザルでは MSG に対する嗜好性が低いことが示されていたため、T1R1/T1R3 の解析を行ったところ、リスザル T1R1/T1R3 は片方のアミノ酸残基が酸性アミノ酸残基であり、グルタミン酸にほとんど応答しなかった。しかし、リスザルと同じ新世界ザルに属するクモザルは、ヒトと同程度の閾値で MSG を嗜好すると報告されていた。そこで本研究では、クモザル T1R1/T1R3 の遺伝子配列解析と機能解析を行い、クモザルにおける行動実験の結果と T1R1/T1R3 の機能が一致するかを検証した。
【方法】ゲノム DNA 試料から、ジェフロイクモザル（*Ateles geoffroyi*）の旨味受容体遺伝子（*Tas1r1*, *Tas1r3*）をクローニングし、培養細胞発現用プラスミドの構築を行った。HEK293T 細胞に、旨味受容体（T1R1 および T1R3）、キメラ G タンパク質、発光タンパク質を一過的に発現させ、味物質添加時の発光値の変化をマルチウェルプレートリーダーにて検出した。
【結果】遺伝子配列解析の結果、クモザル T1R1-170, 302 がヒトと同様にアラニン残基をコードしており、正電荷を持たないことが確かめられた。更に、機能解析によってクモザル T1R1/T1R3 が高いグルタミン酸活性を有することが明らかになった。点変異体解析により、ヒトを含む狭鼻小目霊長類と同様、クモザル T1R1/T1R3 の高グルタミン酸活性の獲得に T1R1-170, 302 における正電荷の消失が強く関与していることが確かめられた。
【考察と展望】本研究成果は、進化の過程でヒトを含む一部の霊長類において T1R1/T1R3 のリガンド結合部位に存在する 2 ヶ所のアミノ酸残基の正電荷が消失し、グルタミン酸活性の上昇が起こった可能性を示すものである。今後、多くの種類の霊長類の T1R1/T1R3 を解析することで食性との関連を明らかにしたい。

taste, umami, GPCR

講演番号：3B4p06
講演日時：3 月 26 日 14:55～ 1 号館 B4 会場

加齢依存的な味感受性変化における味修飾因子の関与の検討

Involvement of taste-modulating factors in the age-dependent change of taste sensitivity.

○上吉原 絢、成川 真隆、三坂 巧（東大院農生科・応生化）
○Aya KAMIYOSHIHARA, Masataka NARUKAWA, Takumi MISAKA (The Univ. Tokyo)

【背景と目的】
超高齢社会に突入した現代、高齢者の健康を維持することは社会的に大きな関心事である。年を取ると味覚は衰え、食は細くなる。そのため、味覚機能を維持することで健康的な食生活を送ることは重要な意味をもつ。しかし、味覚機能が加齢によりなぜ変化するのか、その詳細はよく分かっていない。これまでに我々は加齢による味感受性変化の要因を検討し、味シグナルを検出する味蕾機能は加齢により大きく変わらない可能性を見出している。つまり、加齢による味感受性の変化には味蕾以外の要因が関与する可能性が考えられた。一方近年、ホルモンなどある種の血中因子が、味蕾細胞に存在する受容体を介し、味覚応答を修飾する可能性が報告されている。加齢により生理状態は著しく変化することから、生理状態の変化を反映したそのような味修飾因子が味感受性に影響を及ぼしている可能性が考えられた。そこで本研究では、加齢による血中の味修飾因子の濃度と味蕾細胞におけるそれら受容体の発現量変化について検討を行った。
【方法】
実験動物として、老化促進系統である SAMP1 マウス（雄）を用いた。若齢群として 18-20 週齢、高齢群として 79-81 週齢の雄性 SAMP1 マウスを使用した。血中の味修飾因子の濃度は ELISA 法を用いて測定した。味修飾因子としては、甘味応答に関与するレプチンと、主に塩味応答を修飾するアンギオテンシンⅡを対象とした。一方、味修飾作用を持つ代表的なホルモン受容体の発現量は、リアルタイム PCR 法により有郭乳頭における mRNA 発現量を測定した。
【結果】
血中レプチン濃度は高齢群で有意に変化した一方で、アンギオテンシンⅡ濃度に若齢群と高齢群で有意な差は認められなかった。高齢の SAMP1 マウスにおいては甘味感受性が変化していたことから、この要因の一つとして、加齢によるレプチン濃度の変化が関与する可能性が考えられた。味蕾における各ホルモン受容体の発現に関しては現在検討を進めている。
本研究の一部は総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」によって実施された。

SAMP1, age-dependent, taste sensitivity

講演番号：3B4p07
講演日時：3 月 26 日 15:06～ 1 号館 B4 会場

免疫不全モデルマウスにおける味感受性評価

Evaluation of taste sensitivity in an immunodeficient mouse model

○高橋 涼佳、成川 真隆、三坂 巧（東大院農生科）
○Suzuka TAKAHASHI, Masataka NARUKAWA, Takumi MISAKA (The Univ. Tokyo)

【背景と目的】動物において味に対する感受性は常に一定ではなく、比較的容易に変化する。特に、栄養状態や加齢などの生理状態の変化は味感受性に強い影響を与えることが知られている。例えば、亜鉛欠乏ラットでは塩味に対する感受性が著しく増加する一方で、高齢マウスでは塩味や苦味に対する感受性が有意に変化する。しかしながら、生理状態がどのように味感受性に影響を及ぼすのか、その分子メカニズムはよく分かっていない。これまでに我々は生理状態に依存した味感受性変化の発生要因を明らかにするべく検討を行い、免疫機能の変化をその共通した因子として見出した。そこで本研究では、免疫機能が味感受性に与える影響を検討するために、免疫不全モデルマウスにおける味感受性を評価した。
【方法】免疫不全モデルとして、BALB/c-*nu/nu*(Nude)マウス（♂、8-19 週齢）を使用した。Nude マウスは胸腺が欠損し、T 細胞を産生できないため、免疫不全様の表現型を示す。コントロールとして、Nude マウスの背景系統である BALB/c マウスを使用した。味感受性は 5 秒間に味溶液をなめた回数から嗜好性を算出するリッキング法と、水と味溶液を 48 時間提示し、各々の飲水量の比率から嗜好性を算出する 48 時間二瓶選択法によって評価した。味溶液として基本五味を使用した。また、味蕾中の味関連分子の mRNA 発現量とタンパク質発現をリアルタイム PCR もしくは免疫染色法により解析した。
【結果】Nude マウスにおいて一部味質に対する感受性の変化が観察された。しかし、その変化はわずかであった。一方、味関連分子の発現において、Nude マウスでの発現量が増加する分子がかんさつされたものの、感受性の変化が観察された味質とは関係のない分子であった。これら結果は免疫機能の変化が味感受性に影響しない可能性を示唆する。

本研究の一部は総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」によって実施された。

taste preference, immunodeficiency, nude mouse

発表責任者：高橋涼佳（suzu1happy315@outlook.com）

講演番号：3B4p08
講演日時：3 月 26 日 15:17～ 1 号館 B4 会場

味刺激により生じる嗜好性変化に関与する脳領域の解析
Brain regions related to taste preference changes due to taste stimulation
○山口 雅裕、成川 真隆、三坂 巧（東大院農・農生科）
○Masahiro YAMAGUCHI, Masataka NARUKAWA, Takumi MISAKA (The Univ. Tokyo)

【背景・目的】食に対する好みには個人差があり、この個人差が生じる要因としては生理状態や環境、経験などの様々な影響が示唆されているが、その詳細はいまだ不明である。そこで、我々は過去に何を食べたかという食経験に着目し、過去の経験に伴う味嗜好性変化とその発生要因を検討してきた。これまでに実験動物を用いた評価系において、以前に経験した強い呈味刺激がその後の食嗜好性を変化させうること、さらにその変化には口腔内の味検出系が関与しない可能性を見出した。口腔内で検出された味シグナルは中枢で情報処理されることから、食経験に伴う味嗜好性の変化には末梢ではなく中枢の機構の関与が考えられる。そこで、本研究では食経験により味嗜好性が変化する分子機構を明らかにすることを目指し、食経験に伴う味嗜好性変化に関与する脳領域の同定を試みた。さらに、味刺激に対して活性化する神経細胞の種類が食経験によりどのように変化するのかを解析した。
【方法】実験には C57BL/6J マウスを使用した。発達期のマウスに強い甘味刺激を経験させた甘味経験群と、水のみを提示したコントロール群の 2 群を設けた。これらマウスを一定期間飼育した後、甘味溶液(1 M Sucrose)を 90 分間摂取させ、その際の神経活動の程度を c-Fos 発現を指標とし評価した。甘味溶液摂取後、直ちに麻酔を投与し、PFA で還流固定を行った。摘出した脳から薄切切片を作製し、c-Fos 抗体を用いて抗体染色を行った。本研究では、報酬系を構成する扁桃体、側座核、腹側淡蒼球、腹側被蓋野、視床下部を解析の対象とした。各領域における c-Fos 陽性細胞数を計数し、コントロール群と甘味経験群で比較した。また、味刺激に対して活性化する神経細胞種の変化を推定するために、興奮性神経細胞マーカー（グルタミン酸トランスポーター）と抑制性神経細胞マーカー（グルタミン酸脱炭酸酵素）に対する抗体を用いて c-Fos 抗体との二重染色を行った。c-Fos と共発現するマーカー分子の割合が食経験によりどのように変化するのかを観察した。
【結果】甘味経験群ではコントロール群と比較して、甘味刺激により扁桃体および視床下部において c-Fos 陽性細胞数の有意な増加が観察されたが、その他の領域で陽性細胞数の顕著な差は認められなかった。したがって、食経験による嗜好性の変化にはこれらの領域が関与する可能性が考えられた。現在、扁桃体及び視床下部において、神経細胞マーカーを用いた解析を進めている。

本研究の一部は総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」によって実施された。

taste, taste preference, c-fos

講演番号：3B4p09
講演日時：3 月 26 日 15:28～ 1 号館 B4 会場

希少糖 D-Allulose の GLP-1 分泌促進作用と求心性迷走神経を介した摂食・糖代謝調節作用

Rare sugar D-Allulose releases GLP-1 and regulates food intake and glucose metabolism via vagal afferent nerves

○岩崎 有作[1,2]、仙度 光麻[2]、出崎 克也[2]、比良 徹[3]、中田 正範[2,4]、原 博[3]、Daniel J. Drucker[5]、山田 祐一郎[6]、徳田 雅明[7]、矢田 俊彦[2,8]（[1]京都府大生命環境、[2]自治医大、[3]北大農、[4]和歌山県医大、[5]ルーネンフェルト・タネンバウム研究所、[6]秋田大医、[7]香川大医、[8]関電病院医学研究所）
○Yusaku IWASAKI[1,2], Mio SENDO[2], Katsuya DEZAKI[2], Tohru HIRA[3], Masanori NAKATA[2,4], Hiroshi HARA[3], Drucker Daniel J.[5], Yuichiro Yamada[6], Masaaki TOKUDA[7], Toshihiko YADA[2,8]（[1]Kyoto Pref. Univ., [2]Jichi Med. Univ., [3]Hokkaido Univ., [4]Wakayama Med. Univ., [5]Lunenfeld-Tanenbaum Res. Ins., [6]Akita Univ., [7]Kagawa Univ., [8]Kansai Electric Power Med. Res. Ins.）

【背景・目的】
希少糖の一種である D-Allulose（Allu）は、D-fructose の C-3 epimer であり、グルコースと同程度の甘味を有するが生体では代謝されないため「ゼロカロリー甘味料」として注目されている。Allu の機能として抗肥満作用や抗糖尿病作用が報告されているが、その作用機序は不明であった。本研究では、抗肥満・糖尿病作用を有する腸ホルモン glucagon-like peptide-1（GLP-1）に注目し、Allu の GLP-1 分泌促進作用と求心性迷走神経を介した摂食・糖代謝調節について検討した。
【方法・結果】
Allu（1 g/kg）を雄性 C57BL/6J マウスへ単回経口投与し、門脈中の消化管ホルモン濃度を測定した。Allu の経口投与は門脈中の GLP-1 を上昇させ、その他消化管ホルモン（CCK、PYY、GIP）の濃度には変化がなかった。Allu の単回経口投与は、嫌悪行動を惹起させずに摂食量を低下させ、さらに耐糖能を向上させた。これら摂食・糖代謝調節作用は、GLP-1R 阻害剤や GLP-1 受容体全身欠損マウスで減弱/消失し、GLP-1 受容体を介した作用であることが明らかとなった。内因性 GLP-1 の生理作用には内臓感覚神経である求心性迷走神経が重要な役割を担っていることが示唆されている。アルロースの摂食抑制作用と耐糖能向上作用は、迷走神経切断及び求心性迷走神経特異的ノックダウンによって消失した。高脂肪食負荷肥満（DIO）マウスは、過食と食リズム異常（明期の過食）を呈している。DIO マウスに、1 日 1 回 10 日間、明期開始時に Allu を経口投与すると、投与初日からの明期及び 1 日摂食量を減少させ、肥満と糖尿病を改善した。一方、暗期開始時の Allu の投与ではこれら改善作用はみられず、Allu の投与依存的・時間治療学的な効果が示された。
【結論】
本研究では、ゼロカロリー甘味料の Allu を新規 GLP-1 分泌促進成分（GLP-1 リリーサー）として同定し、GLP-1 分泌→求心性迷走神経→脳作用を介した摂食抑制作用及び糖代謝向上作用を明らかとした。さらに、アルロースの長期投与により過食、食リズム異常、肥満、糖尿病を改善することを明らかとした。

D-allulose, GLP-1, food intake

発表責任者：岩崎有作（ysk-iwasaki@kpu.ac.jp）

講演番号：3B4p10
講演日時：3 月 26 日 15:39～ 1 号館 B4 会場

ニワトリにおける甘味物質の嗜好性と T1R 非依存的な甘味受容機構の解明

Preferences of sweeteners and T1R-independent sweet taste pathway in chickens

○川端 二功[1]、東田 桃子[2]、川端 由子[3]、松井 優希[2]、西村 正太郎[2]、田畑 正志[2]([1]弘前大農生、[2]九大院農、[3]九大院歯)

○Fuminori KAWABATA[1], MOMOKO HIGASHIDA[2], YUKO KAWABATA[3], YUKI MATSUI[2], SHOTARO NISHIMURA[2], SHOJI TABATA[2] ([1]Fac. of Agric. and Lif. Sci. Hirosaki Univ., [2]Fac. of Agric., Kyushu Univ., [3]Grad. Sch. of Dent., Kyushu Univ.)

【緒言】甘味は基本五味の一つであり、糖質の摂取に欠かせない味である。哺乳類では主たる甘味受容体として T1R2/T1R3 が知られているが、鳥類では *T1R2* 遺伝子が欠失しているため T1R2/T1R3 が存在しない。従って、ニワトリは T1R2/T1R3 以外の甘味受容機構により甘味を受容している可能性が考えられる。近年、哺乳類において T1R 非依存的な甘味受容機構が報告されており、甘味受容機構の多様性が明らかになりつつある。ニワトリにおいては T1R 非依存的な経路が主たる甘味受容機構ではないかとの仮説を立て、それらを検証することを目的とした。
【材料と方法】ロードアイランドレッド種のニワトリヒナを 23 時間 30 分絶水後、30 分間水または甘味溶液を与える一皿摂取試験を行った。また、甘味受容体候補分子と糖質分解酵素の口腔組織での発現を RT-PCR で検討した。
【結果と考察】ニワトリヒナはグルコース、ガラクトース マルトース、及びスクロース等の甘味物質に嗜好性を示した。RT-PCR により甘味受容体候補分子 GLUT2、GLUT8、GLUT9、 SGLT1、K_{ATP} チャネル、並びに糖質分解酵素であるアミラーゼ、マルターゼ、スクラーゼ等の mRNA がニワトリ口腔組織に発現していることが明らかとなった。さらに、SGLTs の阻害剤であるフロリジンによりガラクトースの嗜好性が抑制されたことから、ニワトリは SGLTs を介してガラクトースの甘味を受容していると推察された。以上の結果より、ニワトリは口腔組織において糖質分解酵素及び T1R 非依存的な甘味受容機構を用いて甘味を感じている可能性が考えられた。

taste sense, chicken, sweet taste

発表責任者：川端二功（kawabata@hirosaki-u.ac.jp）

講演番号：3B4p11
講演日時：3 月 26 日 16:00～ 1 号館 B4 会場

紫キャベツ食餌負荷による血糖コントロールの影響

Effect of a red-cabbage-rich diet on blood glucose control

○渡邉 理江、曽田 一美、高橋 友梨、吉里 優海、中村 奎史、黄 詩琦、大城 璃紗、西川 愛、若月 ふゆみ (美作大学)
○Rie WATANABE, Hitomi SOTA, Yuri TAKAHASHI, Yuumi YOSHIZATO, Keishi NAKAMURA, Shiqi OOI, Risa OOSHIRO, Ai NISHIKAWA, Fuyumi WAKATSUKI (Mimasaka Univ.)

【背景・目的】酸化ストレスとは、活性酸素種（reactive oxygen species: ROS）が産生され障害作用を発現する生体応答とその活性酸素種の消去や障害修復の生体内防御機構との間で均衡が崩れた状態のことである。過剰に発生した活性酸素種により種々の臓器機能障害が惹起され、糖尿病など様々な疾患発症や進展・老化などの一因へと繋がる。この過剰な活性酸素種を体内消去するには、多くの活性酸素消去酵素や抗酸化剤のような低分子抗酸化物が関与することが明らかとなってきている。体内の抗酸化剤に加え、日常的な食品中にも抗酸化剤を含むものは数多くあり、食事からも抗酸化剤は補われている。酸化還元電位が非常に低いチオレドキシン-1 は、全ての生物に存在する抗炎症作用・抗酸化ストレス作用を持つ低分子抗酸化物であり、多くの疾患モデルマウス（免疫性疾患・糖尿病・消化管疾患など）で血中長期投与・遺伝子改変によりその病態の改善傾向が示されている。また、一般的食材としてアブラナ科野菜(キャベツ・ブロッコリー・大根など)に多く含まれるスルフォラファンがチオレドキシン発現を誘導することも報告されている。食事由来のチオレドキシン-1 効果としては、糖尿病モデルマウスによるチオレドキシン-1 高発現レタス含有食の摂取による影響を昨年報告したが、本発表ではアブラナ科野菜である紫キャベツ含有食よる血糖コントロール・消化器系組織への影響の検討を行った。

【方法・結果】

紫キャベツおよび対照としてヤングコーン・アントシアニンを含む紫キャベツ色素、のそれぞれ乾燥粉末を含む食餌 3 種類を作製し、8 週齢 C57BL/6 マウスに対し長期食餌経口負荷実験を行った。各群、飲水量・糞量・尿量に大きな変化は認められず、マウスの外見的特徴にも変化はみられなかった。しかしながら、紫キャベツ食餌摂取群において HbA1c 値は、昨年発表した遺伝子組換えレタス同様に低下する結果が得られた。また、腸管に存在する分泌細胞数も変化しており、この結果についても併せて報告したい。

Diabetes, Red cabbage

発表責任者：渡邉理江（watanabe-rie@mimasaka.ac.jp）

講演番号：3B4p12
講演日時：3 月 26 日 16:11～ 1 号館 B4 会場

アピオス食餌負荷による血糖コントロールの影響

Effect of an apios-rich diet on blood glucose control

○中村 奎史[1]、吉里 優海[1]、高橋 友梨[1]、曽田 一美[1]、松永 祐輔[2]、渡邊 理江[1]([1]美作大学、[2]（株）津山工業原料)
○ Keisi NAKAMURA[1], Yuumi YOSHIZATO[1], Yuri TAKAHASHI[1], Hitomi SOTA[1], Yusuke MATSUNAGA[2], Rie WATANABE[1] ([1]Mimasaka Univ, [2]Tsuyama Kogyo Genryo Co., Ltd.)

【背景・目的】
アピオス(Apios americana Medikus)は、北アメリカ北西部が原産地とされるマメ科のつる性多年草で、栄養価が高く、糖尿病や高血圧など生活習慣病予防に良いといわれる野菜である。また、抗酸化物質であるゲニステインや抗酸化作用/SOD 様活性を持つ DDMP サポニンを含んでいることが知られている。アピオスは、ヤーコン・キクイモとともに三大健康野菜として知られているものの、知名度が高くはなく商品流通も少なく、日常的な食品としての有効性は不明な点が多い。そこで本研究では、フリーズドライ製法にて作製した乾燥アピオス高含有食餌を作成し、マウスへの長期的な経口食餌負荷実験を行い、体調変化に対する観察や血糖コントロールへの影響を検討した。

【方法・結果】
津山市内で収穫されたアピオスを一般的な乾燥食品同様にフリーズドライ製法にて加工し、ミルミキサーにて粉砕後、通常食餌 CE-2 に混合させて経口負荷実験用食餌を作成した。同様に、ジャガイモ、大豆含有食餌を作製し、8 週齢 C57BL/6 マウスに対し長期食餌経口負荷実験を行った。15 週齢時点で、各群、摂食量・飲水量・糞量・尿量に大きな変化はみられず、マウスの外見的特徴にも変化は認められなかった。しかしながら、HbA1c 値はアピオス食餌群で低下していた。26 週齢時点では、アピオス食餌群でやや体重が高くなる傾向も認められた。更に長期的な計測・分析結果についても報告したい。また、今回使用されたアピオス成分分析結果についても併せて報告したい。

Apios, Diabetes

発表責任者：渡邉理江（watanabe-rie@mimasaka.ac.jp）

講演番号：3B4p13
講演日時：3 月 26 日 16:22～ 1 号館 B4 会場

ブドウ種子抽出物における抗糖化機能および抗酸化機能の解析とその関係性
Analysis and relationship of anti-glycation and anti-oxidaition in grape seed extract

○浅野 卓也[1,3]、松田 萌花[2]、榎元 廣文[4]、川崎 靖子[1]、淺野 悠輔[1]、八田 一[2,3]([1]クレオ・インターナショナル株式会社、[2]京女大家政、[3]京女大院家政、[4]帝京大院理工)
○Takuya Asano[1,3], Moeka Matsuda[2], Hirofumi Enomoto[4], Yasuko Kawasaki[1], Yusuke Asano[1], Hajime Hatta[2,3] ([1]CREO International Corp., Japan, [2]Kyoto Women's Univ., [3]Graduate School of Kyoto Women's Univ., [4]Div. Integr. Sci. Eng., Teikyo Univ.)

【目的】近年、アンチエイジングの指標として抗酸化機能とともに、食品の抗糖化機能が注目されている。糖化反応は体内において、食品由来の糖と組織中のタンパク質の反応に由来し、その最終産物が AGEs と呼ばれ、これらが長い期間をかけて蓄積することで動脈硬化や、骨粗しょう症などの危険因子となる。このことより糖化を抑制する食品は注目され、特にブドウや茶などのポリフェノール類を多く含む食品が抗糖化機能性食品として期待されている。今回、ブドウ種子抽出物を中心に市販のポリフェノール類の抗糖化活性を評価することを目的として、その構成成分や抗酸化機能との関係性を詳細に調べた。
【方法】試料はブドウ種子抽出物であるクレオアクティブ S-2（クレオ・インターナショナル株式会社)、グラヴィノール SE（キッコーマンバイオケミファ株式会社)、サンフェノン 90S（太陽化学株式会社）およびピクノジェノール®（PG）を用いた。抗糖化活性の測定は 0.1M リン酸緩衝液（pH7.4）にヒトまたは牛血清アルブミン（HSA または BSA）0.1mM とグルコース 0.2mM、各種濃度に希釈した試料をそれぞれ溶解し、この溶液を 60℃で 40 時間反応させた後、蛍光性 AGEs の蛍光強度（励起波長 370nm 蛍光波長 440nm）を測定し、各試料濃度の AGEs 生成阻害率から IC50 値(mg/mL)を算出した。なお、抗糖化機能の陽性対照として塩酸アミノグアニジン（AG）を用いた。抗酸化活性は活性酸素消去能を ORAC 法で、一重項酸素消去能を SOAC 法で評価し、抗糖化と抗酸化の関係を調べた。また、各種試料中のカテキン類やプロシアニジン類の含有量は LC/MS で定量した。
【結果】抗糖化活性（IC50 値：mg/mL）は、HSA に対して AG が 0.08、S-2 が 0.02 以下と最も強く、BSA に対しては AG が 0.07、90S が 0.03 で最も強い活性を示した。抗酸化活性の ORAC 値は S-2 が最大で 9.60μmole TEq/mg、次いで SE、90S、PG と高値を示した。一方、SOAC 値は PG が最も高く 13.3μmole αTocEq /mg で、90S、SE、S-2 はほとんど活性がなかった。なお、AG の抗酸化活性はなかった。最後に、LC/MS による試料中のカテキン類（カテキン、エピカテキン、エピガロカテキン、エピガロカテキンガレート）の定量値から、各単量体カテキン類を用いた再構成試料を調製し、HSA に対する抗糖化活性および ORAC 法による抗酸化活性を測定した。その結果、再構成試料の抗酸化活性は対応する試料の数倍の ORAC 値を示したが、再構成試料の抗糖化活性はほとんど得られなかった。すなわち、今回のブドウ種子や茶や松皮由来のポリフェノール試料において、抗糖化活性には二量体以上の水溶性プロシアニジン類が活性に寄与していることが示唆された。

anti-glycation, anti-oxidation, polyphenol

講演番号：3B4p14
講演日時：3 月 26 日 16:33～ 1 号館 B4 会場

各種植物性食品素材の抗糖化作用および抗酸化作用

Anti-oxidation effect and Anti-glycation effect of various plant food materials

○瀬戸山 央、橋本 知子、廣川 隆彦（（地独）神奈川県立産技総研）
○Ou Setoyama, Tomoko Hashimoto, Takahiko Hirokawa (Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology)

【目的】
食品素材の抗酸化活性および抗糖化活性評価は、機能性食品開発における材料選定の重要な指標となっている。食品素材の抗酸化活性についてはこれまでに数多く報告されているが、抗糖化活性についての報告は多くない。本研究では植物性食品素材について、抗酸化活性および抗糖化活性評価を行い、両活性の関係性および活性に関与する成分を明らかにすることを目的とした。

【方法】
約 30 種類の野菜・ハーブ・果物を植物性食品素材として選定した。各種素材は細断後、70%メタノール抽出を行い測定試料液を得た。各測定溶液の抗酸化活性評価は、DPPH ラジカル消去活性測定にて行った。また抗糖化活性評価は、蛍光性 AGEs 生成抑制作用測定および LC-MS/MS を用いた CML（カルボキシメチルリジン）生成抑制作用測定を行った。両活性に関与する成分の分析として総ポリフェノール定量測定を行った。

【結果】
測定した各種植物性食品素材の抽出液について、抗酸化活性と総ポリフェノール量との間には強い正の相関が認められた。また抗糖化活性のうち蛍光性 AGEs 生成抑制作用と総ポリフェノール量との間にも強い正の相関が認められた。一方、CML 生成抑制作用と総ポリフェノール量および抗酸化活性との間には弱い正の相関が認められた。
以上のことから、抗酸化活性には素材中のポリフェノール類が大きく関与していることが示唆された。同様に、抗糖化活性のうち蛍光性 AGEs 生成抑制作用には、素材中のポリフェノール類が大きく関与していることが示唆された。一方、抗糖化活性のうち CML 生成抑制作用は、素材中のポリフェノール類の関与が認められるものの、それ以外の成分の関与が示唆された。

Anti-oxidation, Anti-glycation, Functionalfood

発表責任者：瀬戸山央（setoyama@kanagawa-iri.jp）

講演番号：3B4p15
講演日時：3 月 26 日 16:44～ 1 号館 B4 会場

ビタミン B_1 の酸化生成物に関する解析
Analysis of vitamin B_1 oxidation products
○笹月 仁詞[1]、吉武 淳[2]、内田 浩二[3]、柴田 貴広[1] ([1]名大院生命農、[2]名大未来社会、[3]東大院農生科)
○Hitoshi SASATSUKI[1], Jun YOSHITAKE[2], Koji UCHIDA[3], Takahiro SHIBATA[1] ([1]Grad. Sch. of Bioagric. Sci. Nagoya Univ., [2]Institute of Innovation for Future Society, Nagoya Univ., [3]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., The Univ. of Tokyo)

【背景・目的】代謝において重要な働きをするビタミンは、生体内で合成することができない有機化合物である。最初に同定されたビタミンであるチアミン (ビタミン B_1) はサイトゾルで主にチアミンピロリン酸に変換され、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体やトランスケトラーゼなどの補酵素として働くことが知られている。また、チアミンは一重項酸素のスカベンジャーとしての機能 (Natera J. et al. *Photochem Photobiol*, 2011) や脂質の酸化抑制効果 (Lukienko P.I. et al. *Bull Exp Bio Med*, 2000) など、抗酸化作用を有することが報告されている。しかしながら、活性酸素種 (ROS) によるチアミンの酸化生成物に関しては、チオクロムやチアミンジスルフィド、オキソジヒドロチオクロムが報告されているのみで、その他のチアミン由来の酸化生成物に関する報告はない。そこで本研究では、チアミン酸化生成物の探索および生理機能解析を目的とした。
【方法・結果】リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中でチアミンと各種 ROS 発生試薬を 24 時間反応させた後、LC-MS/MS に供して酸化生成物を検出した結果、HOCl を添加した系において、複数の生成物が確認された。そこで HPLC により反応生成物を精製し構造解析を行ったところ、formylaminopyrimidine (FAP)、thiamine sulfinic ester (TSE) および thiamine sulfone acid (TSA) の 3 つを同定した。これら酸化生成物を安定同位体希釈法により定量解析を行ったところ、チアミンの減少に伴って濃度依存的、また経時的に形成されることが認められた。次に、生体内において形成されることを想定し、HOCl の産生に関与するミエロペルオキシダーゼ (MPO) を多く発現している好中球で検討を行うこととした。好中球様に分化させたヒト骨髄性白血病細胞株 HL60 を用いて行った結果、活性化 HL60 細胞においてチアミン酸化生成物の形成が認められた。これまでに FAP の細菌における非酵素的な生成、また TSE や TSA の有機合成研究について報告されているものの、ROS による酸化過程で生成されることはまだ知られていない。現在、チアミン酸化生成物の生理機能解析を試みている。

vitamin B_1, reactive oxygen species, mass spectrometry

発表責任者：笹月　仁詞（sasatsuki.hitoshi@h.mbox.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3B5a01
講演日時：3 月 26 日 09:00～ 1 号館 B5 会場

ポリフェノールオキシダーゼによる自然抗体エピトープの生成

Formation of natural antibody epitope by polyphenol oxidase

○今堀 夏奈美[1]、李 相美[1]、柴田 貴広[1]、内田 浩二[2]([1]名大院・生命農、[2]東大院・農学生命)
○Kanami Imaori[1], Sangmi Lee[1], Takahiro Shibata[1], Koji Uchida[2] ([1]Grad. Sch. of Bioagric. Sci., Nagoya Univ, [2]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., The Univ. of Tokyo)

[背景・目的]

自然抗体が関与する自然免疫系の適度な活性化は疾病予防に寄与するものと考えられる。当研究室ではこれまでに、紅茶などの発酵茶がヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）に高い自然抗体リガンド活性を付与することを明らかにしてきた。また、ＨＳＡに抗体リガンド活性を与えなかったエピカテキンガレート（ＥＣＧ） は、茶葉に含まれる酸化酵素であるポリフェノールオキシダーゼ（ＰＰＯ）と反応することでＨＳＡに抗体リガンド活性を付与することを明らかにしてきた。このことから、ＥＣＧの酸化重合体であるテアフラベートＡと紅茶に含まれるテアフラビン類の共通骨格であるベンゾトロポロン骨格がＩｇM抗体認識において重要であることが示唆された。そこで本研究ではベンゾトロポロン骨格に着目し、その自然抗体リガンド付与活性を評価するとともに、抗原認識メカニズムを明らかにすることを目的とした。

[方法・結果]

ピロガロール単位を含む化合物とカテコール単位を含む化合物をＰＰＯによって酸化カップリングさせてベンゾトロポロン骨格を有する様々な化合物を作成し、ＩｇM抗体へのリガンド付与活性を評価した。その結果、ベンゾトロポロン骨格を有すると予想される生成物はいずれもＨＳＡに自然抗体リガンド活性を付与した。このことから、ＨＳＡへのＩｇM抗体リガンド付与においてベンゾトロポロン骨格が重要であることが示唆された。次に、没食子酸とカテコールを酸化カップリングさせることにより、ベンゾトロポロン骨格を有する縮合体（ＧＡＣａ）を作製した。さらに、ＨＳＡのリガンド結合部位のひとつであるサイトⅡに特異的に結合する化合物により、ＧＡＣａのリガンド付与能が抑制されることが明らかとなった。従って、ＧＡＣａはＨＳＡの結合サイトⅡと相互作用することでＨＳＡにＩｇMリガンドを付与していることが示唆された。

catechin, polyphenol oxidase, IgM

講演番号：3B5a02
講演日時：3 月 26 日 09:11～ 1 号館 B5 会場

アクロレイン修飾タンパク質による IgM 抗体産生機構の解析

The analysis of IgM producing mechanism induced by acrolein-modified protein.

○遠藤 龍之助[1]、板倉 正典[1]、佐々木 栄太[1]、安達 貴弘[2]、内田 浩二[1] ([1]東大院・農生科、[2]東京医科歯科大学・難治疾患研)
○Ryunosuke ENDO[1], Masanori ITAKURA[1], Eita SASAKI[1], Takahiro ADACHI[2], Koji UCHIDA[1] ([1]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., The Univ. of Tokyo, [2]Tokyo Medical and Dental Univ.)

【目的】アクロレインは脂質過酸化、ポリアミンの酸化、スレオニンの酸化によって生じる反応性の高い親電子性物質である。免疫細胞について、B 細胞は B1 細胞と B2 細胞に分けられる。このうち B1 細胞は胸腔や腹腔に多く存在し、T 細胞非依存的に増殖をし、抗体を産生することが知られている。本研究では脂質過酸化物修飾 BSA を用いたスクリーニングの結果から、IgM 抗体産生を促進するアクロレイン修飾タンパク質に注目し、これを B 細胞が認識し IgM 抗体を産生する機構について解析を行った。

【方法】野生型 BALB/c マウスから腹腔細胞を調製し、MACS 法により単離した $B220^{+}$細胞を腹腔 B 細胞として用いた。アクロレインと BSA、また N-アセチルリジン(NAK)などのアミノ酸を 24 h, 37℃で反応させた後、細胞に添加し培養した。培養後の上清中 IgM 量を ELISA 法により定量した。また培養後の細胞について、フローサイトメトリーにより B 細胞分化の解析を行った。HPLC を用いてアクロレインと NAK の反応溶液から、生成物のピーク画分を分取し、凍結乾燥後に定量した。これを腹腔細胞に添加し、培養後の上清中 IgM 量を ELISA 法により定量した。

【結果】腹腔細胞および腹腔 B 細胞単独の培養において、アクロレイン修飾 BSA 添加のとき IgM 産生量が有意に増加した。またアクロレイン修飾 NAK の添加によっても IgM 産生量の増加が認められた。さらに、アクロレインと NAK による主な生成物である N-アセチル FDP-Lys を腹腔細胞に添加することによって IgM 産生量が有意に増加した。フローサイトメトリーによる解析の結果、腹腔細胞にアクロレインと NAK の反応溶液を添加したとき、抗体産生細胞に分化した B 細胞の割合が有意に増加した。以上から、T 細胞非依存的に抗体産生をする B1 細胞がアクロレイン修飾タンパク質によって IgM 抗体を産生すること、また B 細胞による認識にはアクロレイン修飾を受けたリジン残基が重要であることが示唆された。そしてアクロレインの修飾タンパク質が抗体産生細胞への分化を促進することで、IgM 産生を誘導する可能性が示唆された。

acrolein, lipid peroxidation, IgM

講演番号：3B5a03
講演日時：3 月 26 日 09:22～ 1 号館 B5 会場

腸管上皮細胞が分泌するエクソソームによる炎症制御

Anti inflammatory activity of food components mediated by intestinal exosome

○長谷川 加奈[1]、桑田 啓子[2]、吉武 淳[3]、内田 浩二[4]、柴田 貴広[1]([1]名大院・生命農、[2]名大・ITbM、[3]名大・未来社会、[4]東大院・農生科)
○Kana HASEGAWA[1], Keiko KUWATA[2], Jun YOSHITAKE[3], Koji UCHIDA[4], Takahiro SHIBATA[1]([1]Grad. Sch. of Bioagric. Sci. Nagoya Univ., [2]ITbM, Nagoya Univ., [3]Institute of Innovation for Future Society, Nagoya Univ., [4]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., The Univ. of Tokyo)

【背景・目的】

生体内のほぼすべての細胞は、脂質二重膜に包まれた細胞外小胞を分泌している。細胞外小胞の一種であるエクソソームは脂質やタンパク質、mRNA、miRNA 等を内包する 30 - 200 nm の小胞である。エクソソームは標的細胞に膜融合することで内容物を運び、遺伝子発現等を制御することから、細胞間コミュニケーションの媒介物質としてその機能が注目されている。

様々な臓器が出すエクソソームの中でも、腸管由来エクソソームは免疫抑制的な作用があることが近年明らかとなった(Jiang et al., (2016), *Nat Com.*)。このように、腸管由来エクソソームが抗炎症活性を持つことが示唆されている一方で、腸管にやってくる食品成分によってその機能がどのように変化するのかについてはまだあまり研究がなされていない。これらの背景から、腸管上皮細胞由来エクソソームの抗炎症活性を変化させるような食品成分を探索し、食品成分の新たな機能性を明らかにすることとした。

【方法・結果】

腸管上皮細胞由来エクソソームの抗炎症活性が食品成分処理によって変化するか検討を行った。Caco-2 細胞にレスベラトロール、EGCG など 9 種類の食品成分を投与し、その後放出されるエクソソームを超遠心およびホスファチジルセリンアフィニティービーズにより単離・精製した。その後、各エクソソームをマウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 に投与し、Lipopolysaccharide(LPS)により炎症を誘導した。RAW264.7 細胞から放出される炎症性サイトカインを ELISA によって定量することで、エクソソームによる抗炎症活性を評価した。その結果、カフェ酸、レスベラトロール処理を行った Caco-2 由来エクソソームは炎症誘導時の RAW264.7 細胞に対し TNF-α や IL-6 産生を最も強く抑制した。さらに、カフェ酸処理エクソソームは濃度依存的・経時的に TNF-α 産生を抑制することも確認した。このことから、腸管上皮細胞が分泌するエクソソームによる抗炎症活性は食品成分の影響を受ける可能性が示唆された。現在、最も抗炎症活性を示したカフェ酸処理 Caco-2 細胞由来エクソソームに含まれる成分について、質量分析装置などを用いて詳細に解析している。

Intestinal epitherial cell, Exosome, Anti inflammation

講演番号：3B5a04
講演日時：3 月 26 日 09:33～ 1 号館 B5 会場

緑茶カテキン EGCG の血管内皮細胞由来エキソソームマイクロ RNA 発現調節とその機能

The effects of green tea polyphenol EGCG are involved in exosome microRNAs derived from endothelial cells

○冨岡 玲乃、両角 麻衣、熊添 基文、藤村 由紀、立花 宏文 (九大院農院・生機科)
○Reno Tomioka, Mai Morozumi, Motofumi Kumazoe, Yoshinori Fujimura, Hirofumi Tachibana (Kyushu Univ.)

【目的】緑茶カテキンの主成分である（−)-epigallocatechin-3-*O*-gallate（EGCG）は抗がん作用や抗炎症作用など様々な生体調節作用を発揮する。また、EGCG の受容体である 67 kDa Laminin Receptor (67LR)は、内皮細胞で高発現することが知られている。一方、細胞外分泌小胞であるエキソソームは血中を循環し、標的組織に取り込まれることで生体調節作用を発揮し、その生理作用にはエキソソームに内包されたマイクロ RNA（miRNA）が深く関与することが報告されている。本研究では、EGCG の生体調節作用に内皮細胞由来エキソソーム中の miRNA が関与しているのではないかと考え、EGCG で処理した血管内皮細胞が分泌するエキソソーム内の miRNA 発現およびその機能の解析を行った。

【方法および結果】EGCG がヒト臍帯内皮細胞 HUVEC の miRNA 発現調節作用に与える影響を評価するため、EGCG 処理した HUVEC の細胞内および培養上清由来エキソソームにおける miRNA 発現をマイクロアレイ（3D-Gene® Mouse miRNA Oligo chip）にて解析した。その結果、EGCG 処理により HUVEC の細胞内で miRNA の発現上昇ならびに発現低下が見られた。一方、EGCG 処理した HUVEC 由来エキソソームにおいては発現上昇する miRNA のみが認められ、発現が低下する miRNA は観察されなかった。また、EGCG 処理により HUVEC のエキソソーム中で発現上昇した miRNA には IL-1βと相補性が高いものが多いことが示された。さらに、蛍光染色した HUVEC 由来エキソソームを C57BL/6 マウスに尾静脈投与し、臓器指向性を生体イメージング装置にて解析したところ、HUVEC 由来エキソソームは肺に多く取り込まれた。そこで、EGCG 処理した HUVEC 由来エキソソームを LPS 誘導性急性肺傷害モデルマウスに尾静脈投与し、肺における炎症関連遺伝子の発現を測定した結果、IL-1βの発現が有意に低下した。

【結論】EGCG はヒト臍帯内皮細胞 HUVEC の細胞内およびエキソソームにおける miRNA の発現を調節することが示された。また、EGCG の抗炎症作用には血管内皮細胞由来のエキソソームにおける抗炎症性 miRNA が関与している可能性が示された。

EGCG, exosome, microRNA

講演番号：3B5a05
講演日時：3 月 26 日 09:44～ 1 号館 B5 会場

緑茶カテキン EGCG の経口摂取はマイクロ RNA Let-7b を介してマクロファージの極性を調節する
Green tea polyphenol EGCG modulates macrophage polarization via microRNA Let-7b

○福富 拓哉、山田 脩平、牧尾 彰子、村田 京介、立花 宏文（九大院農院・生機科）
○ Takuya FUKUTOMI, Shuhei YAMADA, Akiko MAKIO, Kyosuke MURATA, Hirohumi TACHIBANA (Kyushu Univ.)

【目的】マクロファージは炎症を促進する M1 型と炎症を抑制する M2 型の 2 種類に大別され、組織微小環境に応じて可逆的に極性を変化させる。マクロファージの過剰な炎症応答はインスリン抵抗性やアルツハイマー病といった疾患の原因となる。一方、緑茶に特徴的に含まれるポリフェノールである(−)-Epigallocatechin-3-*O*-gallate (EGCG)は抗炎症作用、脂質代謝調節作用、抗がん作用など多彩な生体調節作用を有する。また、約 20 塩基からなる機能性ノンコーディング RNA であるマイクロ RNA がマクロファージの極性を制御することで炎症応答に関与することが報告されている。そこで本研究では、EGCG がマクロファージの極性に与える影響ならびにマイクロ RNA の関与を明らかにすることを目的とした。
【方法および結果】EGCG を経口投与したマウスから腹腔マクロファージを採取し、マクロファージ極性マーカー遺伝子発現量をリアルタイム PCR 法により測定することで、マクロファージの極性に対する EGCG の影響を検討した。EGCG の経口投与により、M2 マーカー遺伝子である Arginase1 (Arg1), Found in inflammatory zone (Fizz1) の発現量が有意に高値を示した。次に、腹腔マクロファージにおいて EGCG が発現量を変動させるマイクロ RNA をマイクロアレイ (3D-Gene®Mouse miRNA Oligo chip) により網羅的に解析したところ、EGCG が Let-7b の発現量を増加させることを見出した。そこで、マクロファージの極性に対する Let-7b の影響を検討したところ、Let-7b の過剰発現により M2 マーカー遺伝子の発現量が増加すること、Let-7b の機能を阻害した条件では、EGCG の M2 マーカー遺伝子発現増強作用が減弱することを見出した。
【結論】EGCG の経口摂取はマクロファージの極性を炎症抑制型である M2 型へ分極させること、また、EGCG は Let-7b の発現を促進することで、その極性を調節することを明らかにした。

macrophage, egcg, microrna

講演番号：3B5a06
講演日時：3 月 26 日 10:05～ 1 号館 B5 会場

牛乳由来エクソソームの精製方法の比較検討

Comparison of isolating method for obtaining extracellular vesicles from cow's milk

○両角 麻衣、和泉 裕久、津田 宗哉、清水 隆司、武田 安弘（森永乳業株式会社 研究本部 健康栄養科学研究所）
○Mai MOROZUMI, Hirohisa IZUMI, Muneya TSUDA, Takashi SHIMIZU, Yasuhiro TAKEDA (Wellness & Nutrition Science Institute, Morinaga Milk Industry Co.,Ltd.)

【背景・目的】

牛乳をはじめとする一部の食品には、microRNA (miRNA) と呼ばれる 20 塩基程度の 1 本鎖ノンコーディング RNA が含まれており、近年、食品中の miRNA が食事によって体内に取り込まれ、機能を発揮する可能性が示されている。牛乳は、大別して乳清とカゼインに分けることができるが、牛乳由来の miRNA の多くは 20～200 nm の細胞外膜小胞であるエクソソームに内包されることで、乳清中に存在すると考えられている。牛乳由来 miRNA あるはエクソソームの機能に関する研究は少なく、役割や機能を明らかにするためには、さらなる検討が必要であるが、牛乳由来 miRNA を内包するエクソソームの回収方法は未だ確立していない。そこで本研究では、牛乳由来エクソソームの回収方法について比較検討を行った。

【方法】

牛乳からエクソソームを回収する際、その純度を低下させる因子として、牛乳中に含まれるカゼインの混入が考えられる。そこで、脱脂乳から、遠心法、酸沈殿法、EDTA 沈殿法を用いて、カゼインの除去操作を行い乳清を調製した。各調製法により分離した乳清から、超遠心法、exoEasy Maxi Kit による遠心分離法、qEV によるカラム分離法、EVSecondL70 によるカラム分離法を用いて、エクソソームを回収した。回収したエクソソームの粒子数を、ナノトラッキング粒子径測定装置を用いて測定した。

【結果】

カゼインの除去操作では、酸沈殿法が最も効果的であると考えられたが、その後の精製操作との組み合わせでは、EDTA 沈殿法と qEV の組み合わせが、最も多くエクソソームを回収できた。カゼイン除去後のエクソソーム回収方法では、カラムによる精製が最も効率的にエクソソームを回収できた。

以上の結果から、精製後に用いる研究内容によって精製方法を考慮する必要があると考えられた。

exosome, extracellular vesicles, milk

講演番号：3B5a07
講演日時：3 月 26 日 10:16～ 1 号館 B5 会場

Mechanism for the intrinsic allergenicity of Ara h 1, a major peanut allergen, excerting activation of human primary macrophages

○Masako Toda[1,2], Maren Krause[2], Peter Crauwels[2], Martin Globisch[3], Thomas Henle[3], Ger van Zandbergen[2], Stefan Vieths[2], Stephan Scheurer[2] ([1]Tohoku University, [2]Paul-Ehrlich-Institut, [3]Technical University Dresden)

Background: Ara h 1 is a major peanut allergen, which potentially contributes to peanut-induced anaphylactic reactions. Dendritic cell-specific ICAM-grabbing nonintegrin (DC-SIGN) is described as a receptor for Ara h 1 to activate human dendritic cells (Shreffler et al., J. Immunol. 2006), whereas Ara h 1-mediated activation of macrophages is less investigated. Since evidence has accumulated that not only dendritic cells but also macrophages play a crucial role in development and maintenance of food allergy, we aimed to investigate interaction of Ara h 1 with human macrophages.

Materials and Methods: Macrophages were generated by culturing peripheral blood derived CD14 positive cells (monocytes) from healthy donors in the presence of recombinant human macrophage colony-stimulating factor for 6-8 days. Natural Ara h 1 was isolated from unroasted peanuts. Activation of macrophages by natural Ara h 1 was evaluated by measuring cytokine concentrations in cell culture supernatant by ELISA. The uptake mechanisms of macrophages for natural Ara h 1 were investigated using small interfering RNA knockdown (siRNA) and inhibitors of putative cell surface receptors.

Results: Upon stimulation with natural Ara h 1, macrophages produced high levels of pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF-α. Natural Ara h 1, but not recombinant Ara h 1, was taken up by macrophages, suggesting that the natural carbohydrate residues are the component to interact with macrophages. Treatment of macrophages with siRNA knockdown or inhibitor to reduce DC-SIGN expression or function did not suppress the uptake of natural Ara h 1 and subsequent pro-inflammatory cytokine production in the cells. However, inhibitors for macrophage scavenger receptor class A (SR-A), e.g. polyinosinic acid or acetylated Low-density lipoprotein, suppressed macrophage-mediated uptake of natural Ara h 1.

Conclusion: Our result suggests that SR-A, but not DC-SIGN, mediates interaction of Ara h 1 with macrophages, and exerts the intrinsic allergenicity of this major peanut allergen. Such activation of inflammatory innate immunity by food allergens could be involved in the development of food allergies.

Food allergen, macrophage, Allergenicity

発表責任者：戸田雅子（masako.toda.a7@tohoku.ac.jp）

講演番号：3B5a08
講演日時：3 月 26 日 10:27～ 1 号館 B5 会場

魚類寄生性甲殻類におけるエビアレルゲン交叉性タンパク質の分離同定

Purification and identification of shrimp allergen cross-reactive protein in fish parasitic crustacean

○臼井 将勝[1]、出水 聡之[1]、窪田 暉[1]、杉浦 義正[1]、河邉 真也[1]、近藤 昌和[2]、宮﨑 泰幸[1]([1]水大校・食品科学、[2]水大校・生物生産)
○ Masakatsu USUI[1], Satoshi IZUMI[1], Hikari KUBOTA[1], Yoshimasa SUGIURA[1], Shinya KAWABE[1], Masakazu KONDO[2], Taiko MIYASAKI[1] ([1]Fisheries Univ. food science, [2]Fisheries Univ. aquabiology)

【目的】本研究グループではこれまでに、ウオノエ科甲殻類（ウオノエ類）に寄生された魚類の摂食によってエビアレルギーを発症する可能性について報告してきた。本件においても主要リスク因子はエビ・カニ類と同様にトロポミオシンであることが予想されているが、その確証は得られていない。そこで、本研究では、ウオノエ類からのエビトロポミオシンと交叉反応を示すタンパク質を分離精製し，その同定を試みた。

【方法】キダイ（Dentex tumifrons）口腔内から採取したウオノエ類（Ceratothoa sp.）を実験に供した。ウオノエ類の重量に対して 3 倍のイオン交換水を加えて 100°C で 10 分加熱した後に，凍結乾燥させて粉砕した。その後，１５倍容の 1 M KCl および 10 mM 2-ME を含む 20 mM Tris-HCl buffer（pH 8.0）を加えて 4°C で一晩攪拌して塩溶性タンパク質を抽出した。この抽出液をもとにウサギ由来の抗エビトロポミオシンポリクローナル IgG と結合するタンパク質をウエスタンブロット解析にてモニターしながら，硫安分画および陰イオン交換クロマトグラフィーにて分離精製した。精製したタンパク質のエビアレルギー患者血清中 IgE との結合はウエスタンブロット解析にて行い（n = 3, CAP = >80 kU/L），同タンパク質の同定は N 末端ブロック確認およびピログルタミルペプチダーゼによるデブロック処理を行った後に N 末端アミノ酸配列解析にて試みた。

【結果】ウオノエ類の粉砕物から抽出された塩溶性タンパク質画分において，抗エビトロポミオシンポリクローナル IgG と結合する約 37 kDa のタンパク質が検出された。分離精製された 37 kDa タンパク質は，エビアレルギー患者血清中 IgE との結合性を示した。N 末端アミノ酸配列解析の結果，この 37 kDa タンパク質の N 末端はピログルタミル基以外で修飾されていることが示唆され，アミノ酸配列は決定できなかった。同タンパク質がウオノエ類のトロポミオシンであると予想し，現在 LC－MS/MS 分析による同定を試みている。

shrimp allergen, parasitic crustacean, cross-reactivity

発表責任者：臼井将勝（usuim@fish-u.ac.jp）

講演番号：3B5a09
講演日時：3 月 26 日 10:38～ 1 号館 B5 会場

Flavonifractor plautii の経口投与による Th2 免疫応答の抑制効果
Oral administration of *Flavonifractor plautii* inhibits Th2 immune responses

○荻田 佑[1]、山本 祥也[2]、深澤 知夏[3]、三上 彩音[3]、下里 剛士[1,3,4] ([1]信州大バイオメディカル研、[2]広島大院生物圏、[3]信州大農、[4]信州大菌類微生物セ)
○ TASUKU OGITA[1], YOSHINARI YAMAMOTO[2], CHIKA FUKASAWA[3], AYANE MIKAMI[3], TAKESHI SHIMOSATO[1,3,4] ([1]IBS., Shinshu Univ., [2]Graduate School of Biosphere Sci., Hiroshima Univ., [3]Agr., Shinshu Univ., [4]CFMD., Shinshu Univ.)

【背景・目的】

我々の研究グループでは、緑茶摂取により腸内で増加する腸細菌 *Flavonifractor plautii* (FP) 株を発見し、その生体調節作用について究明している。これまで緑茶摂取による抗アレルギー効果は多く報告されており、その有効成分として緑茶カテキンの機能が指摘されているが、FP 株に関する知見はない。そこで本研究では、卵白アルブミン（OVA）感作マウスを用いて、FP 株による免疫調節作用として、Th2 免疫応答の抑制効果について検証した。

【方法】

in vitro 試験：OVA 感作マウスは、6 及び 7 週齢目に BALB/c 雌性マウスへ OVA（50 μg）と水酸化アルミニウムゲルアジュバント（1 mg/mouse）を腹腔内投与することで作出した。8 週齢の解剖において脾臓を採取し、脾細胞を調製した。脾細胞に FP 株（1×10^6 あるいは 1×10^8 cfu/mL）と OVA 50 μg/mL を添加し、72 時間培養後、IL-4 および IFN-γ の遺伝子発現量を定量的 PCR 法により解析した。
in vivo 試験：OVA 感作マウスに対して、5-8 週齢まで毎日 FP 株を 1×10^6 cfu/mouse 経口投与した。8 週齢の解剖において脾臓を採取し、脾細胞を調製した。脾細胞に OVA 50 μg/mL を添加し、72 時間培養後、IL-4 および IFN-γ の mRNA 発現量を定量的 PCR 法により解析した。さらに血清中の OVA 特異的 IgE 量について ELISA 法により測定した。

【結果】

in vitro 試験の結果、FP 株（10^6 及び 10^8 cfu/mL）添加により、FP 株非添加と比較して IL-4 mRNA 発現は有意に減少した。一方、IFN-γ mRNA 発現量は FP 株 1×10^6 cfu/mL で FP 株非添加と比較して有意に増加した。*in vivo* 試験の結果、IL-4 および IFN-γ mRNA 発現は FP 株投与群で FP 株非投与群と比較して有意に減少した。また、血清中の OVA 特異的 IgE は FP 株投与群で FP 株非投与群と比較して有意に減少した。すなわち FP 株の経口投与は、Th2 免疫応答を強く抑制することを見出した。

Flavonifractor plautii, OVA sensitized mice, Th2 immune response

発表責任者：下里剛士（shimot@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3B5a10
講演日時：3 月 26 日 10:49～ 1 号館 B5 会場

Flavonifractor plautii の経口投与による肥満脂肪組織における抗炎症作用
Anti-inflammatory effect in obese adipose tissue by oral administration of *Flavonifractor plautii*
○三上 彩音[1]、荻田 佑[2]、深澤 知夏[1]、下里 剛士[1,2,3]（[1]信州大農、[2]信州大バイオメディカル研、[3]信州大菌類微生物セ）
○AYANE MIKAMI[1], TASUKU OGITA[2], CHIKA FUKASAWA[1], TAKESHI SHIMOSATO[1,2,3] ([1]Agr., Shinshu Univ., [2]IBS., Shinshu Univ., [3]CFMD., Shinshu Univ.）

【背景・目的】
高脂肪食の定期的な摂取は、脂肪組織に炎症反応を引き起こす。結果として全身性の慢性炎症が誘導されることで、生活習慣病の罹患リスクが高まることが指摘されている。近年、肥満者における緑茶摂取により腸内で増加する腸細菌 *Flavonifractor plautii*（FP）株に関する研究が報告され、糞便中の FP 株の占有率が、肥満者では痩身者と比較して少ないことが示された。そこで本研究では、肥満モデルマウスに対して FP 株を経口投与し、強制的に FP 株占有率を高めた際の肥満誘導性炎症に与える影響について調査を行った。

【方法】
肥満モデルマウスは、C57BL/6 雄性マウス（5 週齢）に高脂肪飼料（60 kcal%）を 10 週間給餌することで作出した。なお、コントロール飼料（10 kcal%）を給餌したマウスを対照群とした。続いて 10-12 週目まで毎日、FP 株 を 1×10^8 cfu/mouse で経口投与した。飼育 12 週目に解剖し、脂肪組織を採取し、その重量を測定した。加えて、脂肪組織における炎症性サイトカイン（TNF-α）mRNA の発現量について定量的 PCR 法により解析した。

【結果】
肥満マウスでは FP 株投与により、非投与群と比較して精巣上体脂肪組織における TNF-α mRNA 発現が有意に減少することを見出した。一方、腸間膜脂肪組織および皮下脂肪組織においては、FP 株投与群と非投与群の間で有意差はなく、精巣上体脂肪組織、腸間膜脂肪組織および皮下脂肪組織の重量についても、FP 株投与群と非投与群の間に有意差は認められなかった。以上の結果から、肥満モデルマウスに対して、FP 株を一定期間経口投与することで、精巣上体脂肪組織における炎症反応が抑制されることが示された。

Flavonifractor plautii, Obese mouse, Anti-inflammatory effect

発表責任者：下里剛士（shimot@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3B5a11
講演日時：3 月 26 日 11:10～ 1 号館 B5 会場

血中 TGF-β 産生を促す *Lactobacillus plantarum* 22A-3 による抗アレルギー効果
Lactobacillus plantarum 22A-3 exerts anti-allergic activity through TGF-β secretion in blood
○藤井 美凪[1]、大戸 信明[2]、桑原 浩誠[2]、水野 雅史[1] ([1]神戸大学大学院農学研究科、[2]丸善製薬株式会社)
○Minagi FUJII[1], Nobuaki OHTO[2], Hiroshige KUWAHARA[2], Masashi MIZUNO[1] ([1]Graduate School of Agricaltual Science, Kobe University, [2]MARUZEN PHARMACEUTICALS, CO., LTD.)

【背景・目的】乳酸菌による腸内細菌叢の改善を伴ったアレルギーの抑制作用が注目されている。本研究室ではこれまでに、植物由来の乳酸菌である *Lactobacillus plantarum* 22A-3 (LP22A-3) による腸炎抑制作用を明らかにしてきたが、今回新たに抗アレルギー効果を見出した。本研究で用いた菌は死菌であり、プロバイオティクス効果によるアレルギー抑制効果は期待できない。そこで本研究では LP22A-3 によるアレルギー抑制作用のメカニズム解析を目的とした。
【方法】BALC/c マウスに LP22A-3 (1.0×10^8 cfu/匹/日) を 10 日間連続経口投与した。10 日目にマウス耳介に anti-DNP-IgE を皮下注射して感作させ、その 24 時間後にエバンスブルー含有 DNP-BSA を尾静脈注射して受動皮膚アナフィラキシー (Passive cutaneous anaphylaxis : PCA) 反応を誘導した。エバンスブルーを抽出し、吸光度を測定することで耳介に滲出したエバンスブルー量を測定した。また 10 日間の経口投与後、マウスの血液を回収し血中 TGF-β 値を ELISA で測定した。さらに、anti-DNP-IgE で感作させたラット好塩基球様細胞 RBL-2H3 細胞に LP22A-3 を直接添加した後、DNP-BSA を処理して脱顆粒を誘導し、上清に放出された β-hexosaminidase 活性を測定した。またトランズウェルのインサートにヒト結腸癌由来細胞 Caco-2 を播種して分化させ、バソラテラル側に RBL-2H3 を播種した腸管モデル共培養系を用いて、上記と同様に β-hexosaminidase 活性を測定した。
【結果・考察】PCA 反応においては、LP22A-3 経口投与によってエバンスブルー量は有意に低下した。また、LP22A-3 を 10 回連続投与して最終日の投与 6 時間後に全採血をおこない TGF-β 量を測定すると、投与区では対照区に比べて約 2.7 倍上昇していた。このことから LP22A-3 投与によって上昇した血中 TGF-β が直接関与しているかを確かめるために、リコンビナント TGF-β を腹腔内投与すると抗アレルギー効果は認められたが、TGF-β 投与 24 間後の血中 TGF-β 量に変化は認められなかった。一方、Caco2/RBL-2H3 共培養系においては、基底膜側からの LP22A-3 添加によって β-hexosaminidase 活性は有意に抑制されたが、RBL-2H3 に直接処理した場合は活性の変化は認められなかった。また RBL-2H3 細胞に TGF-β を 6 時間前処理した後、抗原抗体反応による脱顆粒を誘導すると β-hexosaminidase 活性は抑制された。これらのことから、LP22A-3 摂取によって産生される TGF-β は間接的に肥満細胞に作用して、アレルギー発症を抑制していることが明らかとなった。現在は TGF-β による RBL-2H3 への影響を検討中である。

Lactobacillus plantarum, anti-allergy, TGF-β

講演番号：3B5a12
講演日時：3 月 26 日 11:21～ 1 号館 B5 会場

食物アレルギーモデル培養評価系における酢酸菌の IL-4 産生抑制作用

Suppression of IL-4 production by acetic acid bacteria in food allergy model culture evaluation system

○中西 春霞、足立(中嶋) はるよ、芝原 恭子、八村 敏志（東大院農生科・食の安全研セ）
○ Haruka NAKANISHI, Haruyo NAKAJIMA-ADACHI, Kyoko SHIBAHARA, Satoshi HACHIMURA (Res. Cent. Food Safety, Univ. Tokyo)

【目的】近年、生体に有益な影響を及ぼす微生物が注目され、免疫系への作用が多く報告されている。食酢醸造に用いられる酢酸菌は、グラム陰性菌の一種であり、構成成分として LPS を有する。酢酸菌の LPS は自然免疫を穏やかに活性化することやアレルギー抑制作用をもつことが報告されている。一方、アレルギーの制御には Th2 の抑制や、制御性 T 細胞(Treg)による過剰な免疫反応の抑制が重要である。当研究グループでは食物アレルギーの研究に、卵白アルブミン(OVA)特異的 T 細胞レセプター遺伝子を導入したトランスジェニックマウスであり、卵白食投与でアレルギーを発症する OVA23-3 マウスおよび Rag2 欠損 OVA23-3(Rag23-3)マウスを用いている。これらのマウスの主要なアレルギー発症機構として、卵白食投与により T 細胞が過剰に IL-4 を産生すること、その結果 Treg の誘導能が低下することを報告している。そこで本研究では、本モデルマウスの T 細胞の IL-4 産生を指標として酢酸菌(*Gluconacetobacter hansenii*)のアレルギー抑制作用を評価した。さらに in vitro の Treg 誘導評価系を作製し、酢酸菌の効果を検討した。
【方法】OVA23-3 マウスの脾臓細胞を OVA および酢酸菌サンプルの存在下で培養した。酢酸菌サンプルとして加熱殺菌したサンプル(①)、加熱殺菌後に熱水抽出を行ったサンプル(②)、加熱殺菌と熱水抽出後に超音波破砕を行ったサンプル(③)を用いた。培養後、培養上清中の IL-4 産生量を ELISA 法で測定した。また、卵白食もしくはコントロール食を 7 日間投与した Rag23-3 マウスの腸間膜リンパ節細胞を Treg 誘導条件である TGF-β、レチノイン酸、rIL-2 存在下で、OVA とサンプル②とともに培養した。培養後、Treg のマスターレギュレーターである転写因子 Foxp3 の T 細胞における発現レベルをフローサイトメトリーで解析した。
【結果】IL-4 産生が酢酸菌サンプルの添加により有意に抑制された。特に②を用いた場合に顕著な抑制が観察され、活性成分が熱水抽出画分中に溶出されていることが示唆された。また、過剰な IL-4 産生は Treg 誘導を抑制することから、酢酸菌の IL-4 抑制作用により Treg が誘導できるか、卵白食を投与した Rag23-3 マウスを用いた評価系を作製し検証した。その結果、酢酸菌サンプル②の添加により Treg の割合の有意な増加が観察された。本研究により、酢酸菌(*G. hansenii*)の IL-4 産生抑制能と Treg 誘導能が示され、アレルギーの改善作用の可能性が示された。

food allergy, acetic acid bacteria, regulatory T cell

発表責任者：八村 敏志（ahachi@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3B5a13
講演日時：3 月 26 日 11:32～ 1 号館 B5 会場

マウスアレルギーモデルにおけるエルゴステロールのヒスタミン遊離抑制作用

Suppression of histamine release by ergosterol in a mouse model of allergy

○川井 絢矢[1]、森 光一郎[1]、平澤 典保[2] ([1]ホクト（株)、[2]東北大院薬)
○Junya Kawai[1], Koichiro Mori[1], Noriyasu Hirasawa[2] ([1]Hokuto Corp., [2]Grad. Sch. Pharm. Sci., Tohoku Univ.)

【背景・目的】菌類に広く含まれるステロールであるエルゴステロールは抗炎症作用を発現することが知られている。我々はその抗アレルギー作用について解析しこれまで、*in vitro* において抗原刺激による高親和性 IgE 受容体の凝集を抑制することでマスト細胞の脱顆粒を抑制すること（1)、さらに *in vivo* では、能動的皮膚アナフィラキシー反応による血管透過性亢進を抑制することを報告している（2)。そこで本研究では、*in vivo* においても、エルゴステロールが抗原刺激によるマスト細胞の脱顆粒を抑制するか評価した。
【方法】ICR マウスに作製した空気嚢において、抗原卵白アルブミン(OVA)による I 型アレルギーを誘発した。エルゴステロールは抗原刺激 1 時間前に 200 mg/kg 経口投与し、抗原刺激 30 分後の空気嚢内ヒスタミン遊離量を測定することで、マスト細胞の脱顆粒反応に対する効果を評価した。
【結果および考察】抗原刺激により、空気嚢内液中のヒスタミン量が増大し、これはエルゴステロールの経口投与により有意に抑制された。本研究結果により、*in vivo* においてもマスト細胞の脱顆粒を抑制する作用を発現することが明らかになった。今後はエルゴステロールの体内動態およびヒトでの抗アレルギー作用を検討したいと考えている。
(1) Kawai J. et al., *Biosci Biotechnol Biochem.*, 2018:82(10):1803-1811
(2) 日本農芸化学会 2017 年度大会「マイタケとその成分エルゴステロールの抗アレルギー作用」

allergy, ergosterol, histamine

発表責任者：川井　絢矢（junya.kawai@hokto-kinoko.co.jp）

講演番号：3B5a14
講演日時：3 月 26 日 11:43～ 1 号館 B5 会場

骨量減少を併発する食物アレルギー性小腸炎モデルマウスにおける免疫器官のサイトカイン産生パターンの解析

Analysis of Cytokine Production Pattern of Immune Organs in Food Allergic Enteropathy Model Mice Accompanying Bone Loss

○宇野 智[1]、大町 愛子[2]、山田 悟[1]、曽我 皓平[1]、高野 智弘[1]、清野 宏[3]、八村 敏志[1]、足立（中嶋） はるよ[1] ([1]東大院農生科・食の安全研セ、[2]雪印メグミルク（現・雪印ビーンスターク）、[3]東大医科研)

○Satoru Uno[1], Aiko Omachi[2], Satoki Yamada[1], Kohei Soga[1], Tomohiro Takano[1], Hiroshi Kiyono[3], Satoshi Hachimura[1], Haruyo Nakajima-Adachi[1] ([1]Res. Cent. Food Safety, Univ. Tokyo, [2]Milk Science Research Institute, Megmilk Snow Brand Co., Ltd., [3]Inst. Med. Sci, Univ. Tokyo)

【目的】関節リウマチ、炎症性腸疾患などの自己免疫疾患において、活性化した T 細胞が産生するサイトカイン、特に IL-17 などの影響により骨量減少が起こることが知られている。我々は、卵白食（EW）を投与した食物アレルギー性小腸炎モデルマウス（OVA23-3 マウス）が、骨量減少を併発すること、腸間膜リンパ節（MLN）由来 $CD44^{hi}CD62L^{lo}CD4^{+}$T 細胞が破骨細胞の分化誘導・骨吸収促進能を持つことを既に報告した。一方で、MLN から移動する $CD44^{hi}CD62L^{lo}CD4^{+}$T 細胞が骨量減少を引き起こす分子機構は明らかになっていない。本研究では腸炎と骨量減少を併発した OVA23-3 マウスの各免疫器官及び構成細胞のサイトカイン環境を解析する目的で以下の実験を行った。

【方法】OVA23-3 マウスの EW 群について、腸炎急性期の 9~10 日間または寛解期までの 28 日間卵白食を投与した。対照としてカゼイン食を投与する CN 群を設定した。餌を摂取させたマウスから MLN 細胞、骨髄(BM)細胞、骨を得た。また、MACS 法により MLN 細胞から $CD4^{+}$T 細胞を精製した。さらに餌を 28 日間投与したマウスの MLN $CD4^{+}$T 細胞をソーティングにより分画し、EW 群から $RANKL^{posi/nega}CD44^{hi}CD62L^{lo}CD4^{+}$T 細胞・$RANKL^{nega}CD44^{int}CD4^{+}$ T 細胞、CN 群より $RANKL^{nega}CD44^{int}CD4^{+}$T 細胞を得た。得られた細胞と組織の各種サイトカイン（IL-4, IL-17, IL-1β, IFN-γ, IL-10, TNF-α, IL-6）の mRNA 発現量を qPCR 法で解析した。骨量の指標としてマウス脛骨を μCT にて解析した。

【結果】骨量減少は卵白食の投与期間の経過に応じて悪化した。卵白食を 28 日間投与した EW 群の MLN $CD44^{hi}CD62L^{lo}$ 細胞において、他の分画細胞と比べて IL-4, IL-17, IFN-γ, IL-10 の mRNA 発現量が上昇していた。卵白食 9 日または 10 日間投与群について、MLN$CD4^{+}$ T 細胞では IL-4, IL-1βの mRNA 発現量が CN 群と比べて増加した。MLN whole 細胞についても EW 群において IL-1βの mRNA 発現量が増加したが、IL-4 については変化が認められなかった。BM whole 細胞においては、IL-4 と IL-1βの mRNA 発現量が EW 群で増加した。また骨において IL-1βの発現量が増加する傾向にあった。

【結論】EW 群の主な免疫器官及び細胞において、IL-17 だけが炎症形成に積極的に関与する可能性は低いと思われた。IL-4, IL-1βの mRNA 発現量が増加しており、これらのサイトカインが食物アレルギー小腸炎における骨量減少の原因の一端となっている可能性がある。

Food Allergy, Cytokine, Bone Loss

発表責任者：八村敏志（ahachi@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3B5a15
講演日時：3 月 26 日 11:54～ 1 号館 B5 会場

食物アレルギー性下痢に対する抑制効果を示すユズ果皮抽出物成分の解析

Analysis of *Citrus junos* peel extract components with inhibitory effect on food allergic diarrhea

○松岡 歩実、謝 肖男、粟野 峻史、千野 晶、東 徳洋、山田 潔（宇都宮大農）
○AMI MATSUOKA, XIAONAN XIE, TAKAFUMI AWANO, SHO CHINO, NORIHIRO AZUMA, KIYOSHI YAMADA (School of agriculture, Utsunomiya University)

【目的】近年、特に先進国で問題となっている食物アレルギーの完全な治療法は未だ確立されていない。食物アレルギー患者は原因食品の除去により発症を回避しているが、除去食は栄養学的に望ましいものではない。また、誤食により重篤な症状を引き起こす危険性もある。これまでに我々は、卵白アルブミン（OVA）を用いた食物アレルギーマウスモデルを用いて、ユズ果皮抽出物を経口投与することにより食物アレルギーの症状が抑制されることを報告してきた。しかし、ユズ果皮抽出物の成分組成および、どの成分が食物アレルギーの制効果を示すのかについては不明である。そこで、本研究では、ユズ果皮抽出物の成分組成を解析し、食物アレルギーの抑制効果を示す成分の特定を試みた。

【方法】BALB/cAJcl マウスに 1 週間ごとに 2 回 OVA 50 μg を Alum アジュバントとともに腹腔に免疫をした。2 回目の免疫の 1 週間後から、OVA 50 mg の経口投与を 1 日おきに 7 回行った。OVA 投与の 30 分後に下痢症状、60 分後にアレルギー症状の評価を行った。OVA 投与後 60 分に採血を行い、血中総 IgE 濃度、OVA 特異的 IgG1 濃度、mMCP-1 (mouse Mast Cell Protease-1) 濃度を ELISA 法により測定した。

ユズ果皮抽出物中の GC/MS 解析で検出された成分の主要なものは（+）-リモネン、γ-テルピネンであること分かったので、免疫前から最後の OVA 投与までの期間中、リモネン、テルピネン等を経口投与する 4 群を設定した。コントロール群は 0.3%キサンタンガム（XG）溶液を、ユズ群はユズ果皮抽出物を 0.3%XG 溶液に分散させたものを、リモネン群は（+）-リモネンを 0.3%XG 溶液に分散させたものを、テルピネン群はγ-テルピネンを 0.3%XG 溶液に分散させたものを経口投与した。

【結果】下痢スコアはコントロール群と比較してユズ群、リモネン群で有意に抑制された。消化管に存在する粘膜型マスト細胞から脱顆粒により放出される mMCP-1 の血中濃度はコントロール群と比較してユズ群、リモネン群で抑制される傾向が認められた。これらのことからリモネン摂取により食物アレルギーに起因する下痢症状が改善することが示唆された。一方、血中総 IgE 濃度、OVA 特異的 IgG1 濃度はいずれの群においても差が認められなかった。このことから、ユズ果皮抽出物、リモネンは、I 型アレルギーに関連する抗体の産生を低下させることによって下痢症状を抑制しているわけではない可能性が考えられる。

以上の結果から、ユズ果皮抽出物中に含まれるリモネンには、アレルギー性下痢症状を抑制する作用があることが示唆された。

food allergy, *Citrus junos*, diarrhea

講演番号：3B5p01
講演日時：3 月 26 日 13:50～ 1 号館 B5 会場

柑橘ジャバラ果皮末のスギ花粉症予防効果の検討
Preventive effect of *Citrus jabara* fruit peels on Japanese cedar pollinosis

○村上 能庸[1]、吾妻 正章[1,2]、内藤 雅人[1,3]、松村 人志[1]、松村 靖夫[1]、赤坂 隆志[4]、佐藤 隆[4]、吾妻 英子[2]、馬場 きみ江[1]、谷口 雅彦[1] ([1]大阪薬大、[2]（株）ジャバラボラトリー、[3]済生会兵庫県病院、[4]フマキラー（株））
○Yoshinobu MURAKAMI[1], Seisho AZUMA[1,2], Masahito NAITO[1,3], Hitoshi MATSUMURA[1], Yasuo MATSUMURA[1], Takashi AKASAKA[4], Takashi SATO[4], Eiko AZUMA[2], Kimiye BABA[1], Masahiko TANIGUCHI[1] ([1]Osaka Univ. of Pharm. Sci., [2]Jabara Laboratory Co., Ltd., [3]Prefecture Hyogo Saiseikai Hospital, [4]Fumakilla Ltd.)

【目的】和歌山県東牟婁郡北山村固有の柑橘ジャバラ（*Citrus jabara*）は、花粉症に効果があるとされているが、*in vitro* 評価試験でのヒスタミン遊離抑制作用や、小人数を対象としたアンケート調査での花粉症に対する症状と QOL の改善などの報告だけであった。今回、ジャバラの花粉症に対する効果の精査を目的として、果皮中フラボノイド類の単離・同定と、得られた化合物の *in vitro* 評価系での抗炎症活性、ジャバラ果皮末摂取によるスギ花粉症予防効果について検討した。
【方法】11 月 3 日に和歌山県で採取したジャバラ乾燥果皮 1 kg を、ヘキサン、酢酸エチル、アセトンの順に超音波抽出し、各溶媒の抽出物からフラボノイド類を単離した。*in vitro* での抗炎症活性試験では、リポ多糖（LPS）刺激 RAW264 細胞の炎症関連因子の産生阻害を、炎症関連酵素阻害評価では、内在性抗炎症物質エポキシエイコサトリエン酸の分解酵素である可溶性エポキシドヒドラーゼ（sEH）の阻害を、それぞれ評価した。花粉症予防効果の検討では、大阪薬科大学の倫理委員会承認を得て、毎年医薬品の服用を必要とする程度のスギ花粉症を発症する 227 名を対象とし、1:1 の比率で無作為にジャバラ群(S：113 名)またはプラセボ群(C：114 名)に割り付け、被験もしくは対照タブレットを 1 日 1 回、スギ花粉飛散開始前から最大 60 日間経口投与した。タブレットは 1,000 mg で、ジャバラ群での 1 日当たりジャバラ果皮末摂取量は 200 mg とした。スギ花粉症発症日の定義は、アレルギーに対する医薬品を 3 日連続で服用した日とした。スギ花粉症の症状が出現するまでの期間を主要評価項目とし、COX モデルにて解析した。
【結果と考察】成分研究の結果、ジャバラ果皮中のフラボノイド類の 99%はナリルチンであることが明らかになった。*in vitro* の抗炎症評価試験では、ナリルチンよりも、その生体内代謝物（アグリコン）であるナリンゲニンに、一酸化窒素（NO）および IL-6 の高い産生阻害作用、および sEH の高い酵素阻害作用が認められた。これらのことから、ジャバラ果皮末摂取時の生体内では、ナリンゲニンが炎症物質の産生抑制と内在性抗炎症物質の維持の双方で働くと考えられた。花粉症予防効果の検討では、症状発生までの中央値は、S 群 42 日、C 群 44 日で有意な改善は見られなかった(HR = 0.97)が、事前に規定されたサブグループ解析の結果、年齢は花粉症症状に関する予後因子だけでなく(C 群 $_{50\text{歳以上}}$：HR = 0.71)、ジャバラの効果予測因子になる可能性が示唆された(S 群 $_{50\text{歳以上}}$：HR = 0.38)。このことから、ジャバラ果皮末の摂取によるスギ花粉症予防の可能性が考えられ、今後の 50 歳以上を対象とした前向き研究の実施が期待される。

Citrus jabara, Japanese cedar pollinosis, intervention study

発表責任者：村上　能庸（murakami@gly.oups.ac.jp）

講演番号：3B5p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ 1 号館 B5 会場

テンペ摂食によるアトピー性皮膚炎の改善効果
Improvement effect of atopic dermatitis by eating tempeh.
○中馬 俊祐[1]、居場 嘉教[1]、青木 秀之[2]、渡辺 睦行[3]、尾山 廣[1]([1]摂南大理工、[2]池田食研、[3]昭和女子大生活科学)
○Shunsuke CHUMA[1], Yoshinori IBA[1], Hideyuki AOKI[2], Nakamichi WATANABE[3], Hiroshi OYAMA[1] ([1]Setsunan Univ., [2]Ikeda Food Research Co., Ltd, [3]Showa Women's Univ.)

【背景・目的】テンペ(tempeh)はインドネシアの伝統的な大豆発酵食品であり、タンパク質、脂質、食物繊維、ビタミン、ミネラル、ポリフェノール、イソフラボンなどが豊富に含まれており、コレステロール低下作用、血栓溶解作用、抗酸化作用など報告されている。本研究では、テンペ摂取によるアトピー性皮膚炎の改善効果を検討した。アトピー性皮膚炎は瘙痒のある湿疹を主病変とする皮膚炎であり、大豆イソフラボンの Genistein は、サイトカイン産生を抑制してアトピー様皮膚炎を改善する。テンペの発酵過程では、Genistein 量が増加するが、テンペを用いた抗アレルギー作用に関する研究はほとんど行われていない。今回は、アトピー性皮膚炎モデルマウスを用いて、病態のスコア評価及び酸化ストレス測定や IgE の濃度変化などに基づきテンペ摂食による改善効果を検討した。
【方法】NC/Nga マウス(10 週齢)の耳介部と背部にダニアレルゲン(ビオスタ)を週 2 回(4 週間計 7 回)塗布してアトピー様皮膚炎を誘発させた。その後、テンペ摂食(RS) 群とカゼイン摂食(Ctrl)群(各 10 匹)に分けて、テンペ飼料を 15 日間給餌した(約 10g/匹/日)。病態スコア評価では、①発赤・出血、②痂疲形成・乾燥、③浮腫、④擦傷・組織欠損を 4 段階で評価し、その総計を使用した。IgE 濃度は ELISA 法、酸化ストレス測定は dROMs テスト及び耳介部の組織解析を行った。給餌期間中は、週 2 回のスコア評価、週 1 回の尾静脈採血及び飼料摂食量測定を毎日行った。
【結果と考察】RS 群の病態のスコア評価と血漿中の IgE 濃度は、Ctrl 群のそれらに比べて大幅な減少が確認され、スコア評価及び IgE 濃度の推移における T 検定の P 値は $P<0.05$、$P<0.01$ となり、明らかな有意差が見られた。一方、血漿中の酸化ストレス測定では、酸化ストレスの抑制は認められなかった。また、耳介部病変の組織解析でも有意な差は見られなかった。テンペ摂食により NC/Nga マウスの病態は改善され、血漿 IgE 濃度もその変化に伴って有意な減少が確認され、皮膚炎症の寛解進度について背部よりも掻破しやすい耳介部のスコア評価の差が顕著であったことから、掻痒の減少や掻痒に関与するサイトカインの産生抑制があったものと推察された。テンペにはプロバイオティクス効果があり、*Lactobacillus* などの腸内細菌を増殖させ、Th1/Th2 バランスを改善することが示されている。以上より、テンペ摂食によるアトピー性皮膚炎の改善には、ポリフェノールの IgE 産生抑制効果と Genistein のサイトカイン抑制効果に加えて、プロバイオティクス効果の相乗作用が期待できるものと思われる。

fermented food, soy bean, probiotics

発表責任者：中馬　俊祐（15v049cs@edu.setsunan.ac.jp）

講演番号：3B5p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ 1 号館 B5 会場

大型海藻由来の抗アレルギー成分

Antiallergic costituents from seaweeds

○有本 清也[1]、垣田 浩孝[2] ([1]日本大学大学院　総合基礎科学研究科、[2]日大文理)
○Seiya ARIMOTO[1], Hirotaka KAKITA[2] ([1]Graduate School of Integrated Basic Sciences, Nihon University, [2]College of Humanities and Sciences, Nihon Univ.)

【諸言】アレルギー症状を呈する人の割合は近年増加しており、現在は国民の２人に１人が何らかのアレルギーに罹患していることが知られている。アレルギーとは生体内で異物に対して過剰な免疫反応が起こることである。投薬によるアレルギー症状の治療には患者に大きな経済的負担と身体的負担がかかることが国民規模での問題となってきている。最近食品成分にも抗アレルギー作用があることが見出され、中には柑橘由来のポリフェノールなどサプリメントとして活用されている成分も出てきている。食品から抗アレルギー成分を摂取することでアレルギー症状の予防や緩和が可能になれば、患者の精神的、経済的負担が軽減できることから非常に価値が大きいといわれている。ポリフェノールは植物成分で、抗アレルギー作用以外にも抗酸化作用、血圧上昇抑制、脂質代謝改善などの機能が知られている。そこで本研究では海藻、中でも食歴のある海藻、に着目し、褐藻類大型海藻ノコギリモクとクロメを材料に選び、海藻由来ポリフェノールの抗アレルギー活性を評価することを目的とした。【材料・方法】瀬戸内海で採取した褐藻類ノコギリモクとクロメを洗浄後、凍結乾燥した。凍結海藻を液体窒素で冷却しながら細かくすりつぶして海藻粉末を得た。海藻粉末２５ｇにエタノール３７５ｍＬを添加し、5時間攪拌抽出後、吸引ろ過して不溶物を除去した後、ロータリーエバポレーターで蒸発乾固し、海藻抽出物を得た。海藻抽出物をエタノールで再溶解し、固相抽出カラムでポリフェノールを濃縮した。得られたポリフェノール分画についてヒアルロニダーゼ阻害活性を測定した。ヒアルロニダーゼ阻害活性はヒアルロン酸、コンパウンド４８／８０、ｐ－ジメチルベンズアルデヒドを用いて０．１M酢酸緩衝液中で行った。陽性コントロールとしてタンニンを用いた。ポリフェノール定量はフォーリン・チオカルト法を用いた。標準物質として没食子酸を用いた。【結果・考察】ノコギリモクに関しては８０％エタノール抽出物よりも１００％エタノール抽出物の方がポリフェノール量が多く、ヒアルロニダーゼ阻害活性が高かった。固相抽出実験においてカラム上に複数のバンドが観測されたため、抽出物中のポリフェノールを細分画して活性を比較する予定である。

Seaweed, Antiallergic, Food

発表責任者：垣田　浩孝（Kakita.hirotaka@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3B5p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ 1 号館 B5 会場

鰹節酵素分解物残渣の抗アレルギー効果に関する研究

Studies on anti-allergy effect of enzyme-treated dried residue extract

○河野 美帆[1]、石田 萌子[1]、西 甲介[1]、土居 幹治[2]、松本 淳一[2]、菅原 卓也[1]([1]愛媛大学院農、[2]マルトモ(株))
○Miho KAWANO[1], Momoko ISHIDA[1], Kosuke NISHI[1], Mikiharu DOI[2], Junichi MATSUMOTO[2], Takuya SUGAHARA[1] ([1]Ehime Univ. of Agric., [2]Marutomo Corporation)

【目的】鰹節は、カツオを煮熟、焙乾した後、かび付けにより発酵させた日本の伝統的保存食品で、日本食の味の基本である。鰹節にはイノシン酸やアンセリンなど、様々な成分が含まれ、それぞれ新陳代謝の向上や疲労回復効果などの生理機能を持つことが報告されている。また、鰹節酵素分解物は魚臭、食塩に対してマスキング効果のある素材として活用されている。一方、鰹節を酵素処理した際に排出される難消化性残渣成分に関しては、血中コレステロール低下作用が報告されているものの、多くが廃棄されており、その有効利用が期待されている。我々は、鰹節の酵素処理後の難消化性残渣の熱水抽出成分に、好塩基球の脱顆粒を抑制する効果を見出した。そこで本研究では、鰹節難消化性残渣熱水抽出物の抗アレルギー効果の詳細を明らかにすることを目的とした。
【方法】鰹節酵素分解物残渣乾燥粉末(EDBR)を蒸留水に懸濁し、120℃(2 気圧)で 20 分間熱水抽出を行った。遠心分離により不溶物を除去した後、分画分子量 500 の透析膜を用いて脱塩を行い、pH を 7.4、濃度を 0.01 g/mL に調製したものを、EDBR 熱水抽出物として実験に使用した。ラット好塩基球細胞株である RBL-2H3 細胞を用い、ヒスタミンとともに顆粒中に存在するβ-ヘキソサミニダーゼの放出率を指標として脱顆粒を評価した。細胞毒性の評価には WST-8 法、シグナル伝達因子への影響は、ウエスタンブロット法を用いて検討した。また、微小管形成に及ぼす影響を蛍光免疫染色によって評価した。生体内での効果を検討するため、受動皮膚アナフィラキシー（PCA）応答に及ぼす EDBR 熱水抽出物の経口投与の影響を評価した。
【結果】EDBR 熱水抽出物は、RBL-2H3 細胞の抗原誘導性脱顆粒を、細胞傷害性を伴わずに濃度依存的に有意に抑制した。EDBR 熱水抽出物は、抗原刺激により好塩基球に誘発される細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を阻害した。FcεRI に結合した IgE を介した抗原刺激により誘導されるシグナル伝達経路において、EDBR 熱水抽出物は、Syk、PI3K、PLCγ1 および Akt といったシグナル分子のリン酸化による活性化を抑制することが明らかになった。さらに、EDBR 熱水抽出物は、抗原刺激によって誘導される微小管形成を抑制した。
EDBR 熱水抽出物の経口投与により、BALB/c マウスにおける PCA 反応が有意に抑制されたことから、生体内においても脱顆粒応答を抑制することが明らかになった。
【結論】鰹節酵素分解物残渣には、抗アレルギー作用を有する物質が含まれていることが明らかとなり、抗アレルギー作用を持つ機能性食品素材として期待できる。

Enzyme dry bonito residue, Anti-allergy, Degranulation

講演番号：3B5p05
講演日時：3 月 26 日 14:34～ 1 号館 B5 会場

西ノ島町産 褐藻ノコギリモクの抽出物による抗炎症効果の検討

The demonstration of anti-inflammatory effect of extract from Sargassum macrocarpum, a brown alga, harvested in Nishinoshima town.

○杉浦 義正[1]、木下 陽一[2]、山谷 裕昭[3]、中西 正美[4]、平田 文久[4]、林 裕一[5]、村瀬 昇[1]([1]水産機構水大校、[2]西ノ島町、[3]ノア隠岐、[4]JF しまね、[5]岡部（株）海洋事業部)
○Yoshimasa SUGIURA[1], Youichi Kinoshita[2], Hiroaki Yamatani[3], Masami Nakanishi[4], Fumihisa Hirata[4], Yuichi Hayashi[5], Noboru Murase[1] ([1]Natl Fish Univ, [2]Nishinoshima Town, [3]Noah Oki, [4]JF Shimane, [5]Okabe Co., Ltd.)

【目的】近年、磯焼けなどの現象により、沿岸生物資源の保護・育成の場である海藻類の群落（藻場）が減少している。そのため、藻場生態系の資源管理の重要性だけでなく、藻場を構成する大型海藻類の生理活性を評価し、藻場の付加価値を向上させる必要がある。その中で我々は、藻場構成種の一つである多年生の褐藻ノコギリモクが未利用資源であることに着目し、ノコギリモク含有成分の生理活性について検討を試みた。本研究では、特にアレルギー性抗炎症に対する抑制効果を確認した。また、ノコギリモクが生育する水深の違いによる有効性の違いについても検討した。

【方法】採取したノコギリモク（水深 1 m, 5 m, 10 m, 15 m, 20 m, 25 m）を完全乾燥し、粉砕機で微粉末を作製した。微粉末に対して 80%メタノール（80M）で成分抽出し、濃縮・乾固した後、100%メタノール可溶成分を試料として回収した。得られた抽出物を 80M 抽出物とした。抽出物中の有効成分の分析として、フォーリン・デニス法によるポリフェノール含量の測定を行った。また、抗炎症効果については、炎症関連酵素 3 種（ホスホリパーゼ A_2、リポキシゲナーゼ、ヒアルロニダーゼ）の活性阻害、マウス耳介浮腫の抑制により、それぞれ評価した。

【結果】ノコギリモク乾燥粉末 2 g より、全ての水深で 130～270 mg の範囲で抽出固形分が得られた。ポリフェノール含量は 0.4～1.6 %（重量：8～31 mg/2 g）であった。ポリフェノール重量濃度で抗炎症効果を確認したところ、いずれの水深の 80M 抽出物も濃度依存的（10～1000 μg/mL）に炎症関連酵素 3 種の活性を抑制した。また、マウス耳介浮腫による炎症に対しても、全ての水深で投与量 0.1 mg/mouse（経皮投与）において有効性が認められた。なお、水深と有効性に相関は認められなかった。現在、シクロオキシゲナーゼ-2 活性に対する阻害、および、肥満細胞モデル RBL-2H3 の脱顆粒抑制について検討中である。

unused resources, *Sargassum macrocarpum*, anti-inflammation

発表責任者：杉浦義正（ysugiura@fish-u.ac.jp）

講演番号：3B5p06
講演日時：3 月 26 日 14:55～ 1 号館 B5 会場

米ぬか由来繊維は腸内細菌叢の調節を介して大腸炎を抑制する

Rice bran-derived fibers ameliorate colonic inflammation via gut microbiota modulation and fermentation

○田中 一己[1,2,3]、アウ ワンピン[1,2]、鈴木 健大[4]、尾花 望[8]、楊 佳約[1,2]、木村 彰宏[7]、冨田 勝[1,2]、福田 真嗣[1,2,3,5,6,8] ([1]慶大・先端生命研、[2]慶大・院・政策・メディア、[3]神奈川産技総研、[4]環境研・生態環境セ、[5]JST・さきがけ、[6]メタジェン、[7]国立国際医療研究センター、[8]筑波大学)
○Kazuki TANAKA[1,2,3], Wanping Aw[1,2], Kenta Suzuki[4], Nozomu Obana[8], Jiayue Yang[1,2], Kimura Akihiro[7], Msasaru Tomita[1,2], Shinji Fukuda[1,2,3,5,6,8] ([1]Inst. Adv. Biosci., Keio Univ., [2]Grad. Sch. Media and Governance, [3]KISTEC-KAST, [4]NIES, [5]JST PRESTO, [6]Metabologenomics, Inc., [7]NCGM, [8]University of Tsukuba)

日本料理や、納豆や抹茶などの伝統的な食品の一部は健康促進効果が知られており、世界中から注目されている。これらの食品のいくつかは、腸内環境を改善するプレバイオティクスやプロバイオティクス効果として作用することが知られており、宿主の健康維持に寄与している。米の胚乳の外側にあたる米ぬかを摂取すると大腸炎が抑制されることが以前より報告されているが、その詳細は未だ明らかにされていない。近年、日本を含む先進国では大腸炎患者数が増加しており、大腸がん発症にも繋がることから大腸炎予防法の確立が求められている。そこで本研究では、デキストラン硫酸ナトリウム水溶液(DSS)誘導性大腸炎モデルマウスを用いて、米ぬか摂取による大腸炎抑制効果の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。8 週齢の雄 C57BL/6 マウスへ米ぬかを与えたところ、濃度依存的に大腸炎が抑制されることを明らかにした。次世代シークエンサーを用いた便中細菌叢の網羅的解析から、*Clostridium* spp. が米ぬか摂取によって有意に増加することを明らかにした。また、大腸断面の蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションによって、*Clostridium* cluster XIVa が米ぬか由来食物繊維の近傍に局在していることも明らかにした。米ぬか成分を分画してマウスに投与したところ、食物繊維が含まれる画分を摂取したマウスで大腸炎が有意に抑制されることが明らかとなった。このことから、米ぬか由来成分の発酵代謝により産生される何らかの物質が大腸炎を抑制する可能性が示唆された。事実、米ぬか摂取マウスの便中細菌叢を無菌マウス腸内に移植させたところ、通常食摂取マウスの便中細菌叢を移植したマウスより DSS 誘導性大腸炎が軽減されたため、キャピラリー電気泳動–質量分析計を用いたメタボローム解析を実施した。その結果、米ぬか摂取マウス腸内において、トリプトファン代謝物質群が米ぬかの濃度依存的に増加することを明らかにした。さらに、Clostridiales 目細菌群だけを定着させたノトバイオートマウスの腸管では、トリプトファン代謝物質群の産生量が有意に多いことを見出した。トリプトファン代謝物質群の一部は芳香族炭化水素受容体 (AhR)を介して大腸炎を抑制することが報告されていたことから、AhR 強制発現培養細胞株へ Clostridiales 目細菌群由来のトリプトファン代謝物質群を添加したところ、そのシグナル因子である *Cyp1a1* の発現が誘導されたことから、AhR リガンドとして機能することが明らかとなった（特願 2018-224169)。従って、米ぬか摂取による大腸炎抑制効果は、Clostridiales 目細菌群による発酵代謝により腸内で産生されたトリプトファン代謝物質群が、腸管上皮細胞の AhR を介してその恒常性維持に寄与していることが示唆された。本研究成果は、食を介した新たな大腸炎予防法の確立に繋がると考えられる。

rice bran, gut microbiota, metabolome

講演番号：3B5p07
講演日時：3 月 26 日 15:06～ 1 号館 B5 会場

麹菌摂取による宿主の腸内細菌叢の変化と大腸炎緩和効果
Administration of A. oryzae spores affects gut microbiota and colitis in mice
○都築 翔[1]、山田 和広[1]、榊原 舞[1]、長澤 麻央[1]、林 利哉[1]、兒島 孝明[2]、中野 秀雄[2]、志水 元亨[1]、加藤 雅士[1] ([1]名城大学院・農、[2]名大院・農)
○ Sho Tsuzuki[1], Kazuhiro Yamada[1], Mai Sakakibara[1], Mao Nagasawa[1], Toshiya Hayashi[1], Takaaki Kojima[2], Hideo Nakano[2], Motoyuki Shimizu[1], Masashi Kato[1] ([1]Meijo Univ, [2]Nagoya Univ)

日本人は古くから、味噌、醤油、清酒などを醸造し豊かな食文化を形成してきた。発酵食品に含まれる様々な成分が我々の健康に寄与していることが多数報告されている。このような発酵食品の製造には、麹菌が使用されることが多いため、それらを食すことで我々は直接麹菌を摂取していることになる。本研究では、麹菌そのものの摂取が宿主や宿主の腸内細菌叢に与える影響について検討した。

麹菌の摂取が腸内細菌叢に及ぼす影響を評価するために、麹菌の胞子 5.0×10^4 個を ICR マウスに経口投与した。(1) 生きた麹菌の胞子 (生菌) 、(2) 100℃、2 時間で滅菌した麹菌の胞子 (死菌)、および (3) コントロールとして生理食塩水のみをそれぞれ 2 週間、毎日マウスに与えた 3 群を用意した。3 群の腸内細菌叢をメタゲノム解析した結果、生菌、死菌に関わらず、麹菌の胞子を与えた 2 群で Firmicutes 門の細菌の割合が減少し、Actinobacteria 門 (*Bifidobacterium* 属) の細菌の割合が増加した。また、生菌を与えた場合のみ、ある種の *Clostridium* 属細菌の割合が増加した。

近年、*Bifidobacterium* 属細菌が生産する短鎖脂肪酸 (乳酸、酢酸、酪酸など) が大腸炎を緩和するという報告がある。生菌、死菌に関わらず麹菌を摂取することで腸内の *Bifidobacterium* 属細菌の割合が増加したことから、麹菌の摂取が宿主の大腸炎を緩和する可能性が考えられた。一方、食物繊維そのものが直接的に大腸炎を緩和することも知られている。麹菌の細胞壁には様々な多糖成分が含まれていることから、食物繊維と同様にそれらによって大腸炎が緩和される可能性も考えられた。そこで、麹菌の投与が大腸炎を誘発させたマウスに及ぼす影響について検討した。デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を与えて大腸炎を誘発させたマウスを用いて同様に検討したところ、麹菌の胞子を与えた 2 群で大腸炎による体重低下や大腸の委縮が緩和された。麹菌に含まれる成分が大腸炎の緩和に関与する可能性を考え、投与した麹菌に含まれる主要多糖成分であるキチン (0.02 mg)、ラミナリン (0.01 mg) とほぼ同量をマウスに投与することで、大腸炎が緩和されるのか検討した。その結果、投与したキチン、ラミナリンの量では大腸炎が緩和されなかった。以上の結果から、摂取させた麹菌に含まれるキチン、ラミナリンが直接大腸炎の緩和に寄与しているわけではなく、麹菌の摂取によって増加した *Bifidobacterium* 属細菌の働きにより大腸炎が緩和されていると結論した。

以上のことから、生菌、死菌に関わらず麹菌の摂取によって腸内の *Bifidobacterium* 属細菌の割合が増加すること、大腸炎が緩和されることが明らかになった。

A. oryzae, metagenome, colitis

講演番号：3B5p08
講演日時：3 月 26 日 15:17～ 1 号館 B5 会場

クワの実凍結乾燥粉末は、大腸粘膜の状態を維持することによってデキストラン硫酸誘発性大腸炎の症状を緩和する

Mulberry juice freeze-dried powder mitigates the disease severity by the maintaining of colon mucosa in mice with DSS-induced acute colitis.

○畑生 俊光、王 洋（岡山大農）
○Toshimitsu HATABU, Yang Wang (Okayama Univ. of Agric.)

【背　景】クワの実は、ポリフェノールを豊富に含有するため、抗炎症等の生物学的活性を有する。演者らは、過去の研究において非ステロイド性抗炎症薬の副作用で生じる胃粘膜潰瘍形成に対するクワの実凍結乾燥粉末（MFP）による発症抑制・粘膜保護効果について発表してきた。本研究は、MFP の持つ粘膜保護効果に着目し、MFP 含有飼料摂取による潰瘍性大腸炎の症状緩和効果とその機構について検討した。
【材料と方法】供試動物は、Balb/c 雄マウス 7 週齢を用いた。マウスは 1 週間の馴化飼育期間の後、MFP 含有飼料で 3 週間飼育した。3 週間後、急性大腸炎を誘発させるため、5% (w/v)デキストラン硫酸塩（DSS）含有飲水で 1 週間飼育した。この実験飼育期間中、体重変化、糞便の状態および飼料摂取量を毎日測定・観察した。実験飼育終了時に、マウスから大腸を採取・大腸長を測定後、大腸を前部・中部・後末端部に区分けし、前部をサイトカイン等の遺伝子発現解析のために凍結保存、組織学的観察のために中・後末端部を 10%ホルマリンで固定した。ホルマリン固定した組織は、HE 染色の後病理組織学的観察・解析を行った。また、腸内細菌叢解析のために、採取した糞便から DNA を回収後、定量的 PCR 法にて解析を行った。炎症性サイトカインおよびインフラマソーム (NLRP3 および NLRP6) 遺伝子発現は、定量的 RT-PCR 法にて解析を行った。
【結果と考察】MFP 摂取マウス群では、DSS 投与による体重減少が DSS のみ投与マウス群と比較して 2 日遅れて始まるとともに重篤な体重減少は認められなかった。また 大腸炎活動指数は MFP 摂取マウス群において DSS のみ投与マウス群と比較して有意に低下した。病理組織学的解析では、MFP 摂取マウス群で、炎症性細胞浸潤は DSS 投与マウス群と比較して明らかに少なく、杯細胞数は有意に多く維持されていた。腸内細菌叢解析の結果、ビフィバクテリウム属細菌とウエルシュ菌類は、MFP 摂取マウス群と比較して DSS のみ投与マウス群で有意に低下した。NLRP6 遺伝子発現は、MFP 摂取マウスと比較して DSS の未投与マウス群にて有意に低下した。本研究の結果は、MFP が腸内細菌叢を変化させ、大腸粘膜の状態を改善維持することで大腸炎の症状を緩和することを示唆した。

Mulberry, DSS colitis, NLRP6

発表責任者：畑生俊光（hatabu@okayama-u.ac.jp）

講演番号：3B5p09
講演日時：3 月 26 日 15:28～ 1 号館 B5 会場

植物発酵エキスに含まれる潰瘍性大腸炎抑制成分の評価
Effects of ingredients in fermented plant-based extract on colitis induced by dextran sulfate sodium in mice.

○藤田 佳那[1]、脇坂 むつみ[1]、村上 允唯[2]、中川 泰輔[2]、本多 奈保子[1]、渡辺 敏郎[1]([1]園田学園女大・食栄、[2]機能性食品開発研究所)
○ Kana FUJITA[1], Mutsumi WAKIZAKA[1], Nobutada MURAKAMI[2], Taisuke NAKAGAWA[2], Naoko HONDA[1], Toshiro WATANABE[1] ([1]Sonoda Women's Univ., [2]Functional Food Creation Research Inst.)

【目的】我々はこれまで、DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルマウスに植物発酵エキスを与えると潰瘍性大腸炎の発症が抑制されることを明らかにしてきた(1,2)。本研究では、植物発酵エキスに含まれる潰瘍性大腸炎抑制成分について解析したので報告する。

【方法】植物発酵エキスは、製品「陽命源 GOLD」(㈱機能性食品開発研究所）を用い、これをシリカゲル 60 プレートの TLC にて展開した。展開溶媒は、トルエン：ギ酸エチル：ギ酸＝5：4：1 を用いた。展開後、0.06% 2,2-ジフェニル-1-ピクリルヒドラジル（DPPH）エタノール溶液を吹き付け、青色が抜けたスポットの Rf 値から成分を同定した。5 週齢の雄性 BALB/c マウスを 1 群 8 匹となるよう陰性対照群（Ncon）、陽性対照群（Pcon）、植物発酵エキス群（FPE）、プロトカテキュ酸群（PC）の 4 群に分けて自由摂取により評価した。DSS 水は、3%（w/w）濃度とし、7 日間自由飲水させ、体重と飼料摂取量は毎日測定した。また糞便を観察し、その性状をスコア化した。イソフルランにて麻酔後、断頭採血し、解剖は各種臓器を摘出後、重量を測定し、大腸の長さを測定した。炎症性サイトカイン（IL-6・TNF-α）および抗炎症性サイトカイン（IL-10・TGF-β1）は ELISA 法により定量した。データは平均値±標準誤差で示し、群間での有意差は統計ソフト「IBM SPSS Statistics 20」を用いて Bonferroni の多重比較検定をおこない、$p<0.05$ を統計学的に有意と判定した。

【結果および考察】TLC の結果、植物発酵エキスにはプロトカテキュ酸が含まれていることがわかった。解剖後の大腸の長さでは、Ncon 群は 7.88±0.13 cm であったが、Pcon 群は 5.34±0.23 cm と有意に委縮した。FPE 群は 7.29±0.24 cm、PC 群は 7.23±0.20 cm と Pcon 群と比べて有意に委縮を抑制した。炎症性サイトカイン（IL-6・TNF-α）は Pcon 群と比べ FPE 群と PC 群で有意（$p<0.05$）に抑制した。また抗炎症性サイトカイン（IL-10・TGF-β1）は Pcon 群と Ncon 群に有意（$p<0.05$）な差がみられたが、FPE 群および PC 群においては有意差が認められなかった。
以上の結果から、植物発酵エキスはプロトカテキュ酸を含み、植物発酵エキスの潰瘍性大腸炎抑制効果を示す 1 成分である可能性が示唆された。

（1）山本美菜ほか：日本農芸化学会 2017 年度大会（京都）
（2）山本美菜ほか：日本農芸化学会 2018 年度大会（名古屋）

inflammation, fermentation, dextran sulfate sodium

発表責任者：藤田　佳那（kfujita@sonoda-u.ac.jp）

講演番号：3B5p10
講演日時：3 月 26 日 15:39～ 1 号館 B5 会場

イチジク茶に含まれるフロクマリンの低減・除去方法の検討

Study on reduction and removal methods of furocoumarin contained in fig tea

○橋本 ゆかり、阿部 竜也、西村 耕作 ((公財)東洋食品研究所)
○Yukari HASHIMOTO, Tatsuya ABE, Kosaku NISHIMURA (Toyo Institute of Food Technology)

【目的】

イチジク葉を緑茶と同様に加工した「イチジク茶」がⅠ型アレルギー抑制効果を示すことを培養細胞実験および動物実験により明らかにしている。しかし、イチジク茶を常温以上で保存するとアレルギー（脱顆粒）抑制効果が減弱することを確認しており、その原因物質として保存中に増加するフロクマリン（プソラレン、ベルガプテン）が考えられた。また、フロクマリンは光毒性皮膚炎や医薬品との相互作用を引き起こすことが報告されていることから、機能性飲料として利用する際には低減・除去することが望ましい。そこで本研究では、フロクマリンが脱顆粒抑制効果に与える影響とイチジク茶中フロクマリンの低減・除去方法について検討した。

【方法】

脱顆粒抑制効果は、ラット好塩基球性白血病細胞株 RBL-2H3 を用いて、β-ヘキソサミニダーゼ（β-Hex）放出量を指標として評価した。フロクマリン低減方法の検討では、茶葉 0.5 g/水 50 mL を種々の温度条件（0.1～80℃）で浸出し、浸出液に含まれるフロクマリン量を測定した。フロクマリン除去方法の検討では、従来の浸出条件（茶葉 0.5 g/水 50 mL、80℃、3min）で浸出した茶液を、種々の固相抽出カートリッジに通液し、各画分に含まれるフロクマリン量を測定した。なお、各試験のフロクマリン含量の測定は LC-Q-ToF/MS を用いて行った。

【結果および考察】

フロクマリンが脱顆粒に及ぼす影響では、高濃度のプソラレンはβ-Hex 放出量を増加させた。したがって、高濃度のプソラレンは脱顆粒を昂進することで、イチジク茶の脱顆粒抑制効果を見かけ上減弱させることが示唆された。

フロクマリン低減方法では、0.1℃/120min で浸出した場合、従来（80℃/3min）よりフロクマリン含量が約 40%減少した。除去方法では、シリカゲルと C18 カートリッジで良好な結果が得られ、それぞれ 80%、95%以上フロクマリンを除去することができた。

現在、フロクマリンを低減・除去した茶液の脱顆粒抑制効果と保存時における成分変動を調査中である。

furocoumarin, fig, allergy

講演番号：3B5p11
講演日時：3 月 26 日 16:00～ 1 号館 B5 会場

Lactobacillus paracasei KW3110 の加齢に伴う腸の炎症抑制と網膜神経節細胞死の抑制効果
Intake of *Lactobacillus paracasei* KW3110 prevents age-related chronic inflammation and retinal cell loss

○森田 悠治[1]、城内 健太[2]、坂本 明彦[3]、金内 理[1]、丸山 光生[3,4] ([1]キリン株式会社、[2]小岩井乳業株式会社、[3]国立長寿医療研究センター、[4]名古屋大学　医学系研究科)
○Yuji Morita[1], Kenta Jounai[2], Akihiko Sakamoto[3], Osamu Kanauchi[1], Mitsuo Maruyama[3,4] ([1]Kirin Company, Ltd., [2]Koiwai Dairy Products Co Ltd., [3]National Center for Geriatrics and Gerontology, [4]Nagoya University Graduate School of Medicine)

【目的】老化に伴って様々な臓器において炎症が誘導・蓄積される。このような炎症反応は、体全体に多様な影響を及ぼし高齢者の生活の質の低下を引き起こす要因の一つと考えられることから、高齢化が進む今日における大きな社会問題と言える。一方、近年、炎症を抑制する食品因子についての報告はあるものの、老化に伴う目の炎症に対する腸を介した炎症抑制効果については報告がなかった。そこで本研究では、我々がこれまでに抗炎症効果を有する乳酸菌として見出している *Lactobacillus paracasei* KW3110 を自然加齢マウスに長期間摂取させた際の、加齢に伴う腸の炎症、および目の炎症・老化に対する抑制効果を評価することを目的とした。
【方法】10 ヶ月、16 ヶ月齢の C57BL/6 自然加齢（高齢）マウスに通常食、または *L. paracasei* KW3110 含有食（1 mg/day）を 6 ヶ月間給餌後、腸内細菌叢の変化、腸管における免疫細胞の変化、および血中炎症性サイトカインを評価した。さらに、目の網膜に存在する免疫細胞の炎症状態、および網膜神経節細胞死などの組織学的解析を行った。
【結果】*L. paracasei* KW3110 摂取群では、加齢に伴う腸内細菌叢の変化が抑制された。特に *Bifidobacteriaceae* family について、通常食群と比較して加齢による減少が有意に抑制された。また、小腸粘膜固有層において、加齢によって増加する IFN-γ陽性 CD4 陽性 T 細胞の割合が、*L. paracasei* KW3110 摂取群では通常食群と比べて有意に低く、若齢マウス群と同程度であった。以上より、*L. paracasei* KW3110 摂取によって加齢に伴う腸の炎症が抑制されることが示唆された。
次に、血中の炎症性サイトカイン濃度も、高齢マウスの *L. paracasei* KW3110 摂取群では通常食群と比較して有意に低く、若齢の通常食群と同程度であったことから、小腸における IFN-γ陽性 CD4 陽性 T 細胞の減少と同様に、加齢による血中の炎症状態も抑制されることが示唆された。
さらに、網膜において IFN-γ等の炎症性サイトカインを発現するマクロファージの割合が高齢マウス間において通常食群と比較して、*L. paracasei* KW3110 摂取群では有意に少なく、網膜機能を司る網膜神経節細胞等の加齢による細胞死も有意に抑制されることが分かった。
以上の結果から、*L. paracasei* KW3110 は腸内細菌叢を調節し、腸管の免疫応答・炎症制御を介して、老化に伴う網膜の炎症および網膜神経節細胞死を顕著に抑制することが示唆された。腸内環境の変化を介して目の老化を抑制する乳酸菌を初めて明らかにした。

Lactobacillus paracasei KW3110, age-related inflammation, retina

講演番号：3B5p12
講演日時：3 月 26 日 16:11～ 1 号館 B5 会場

麹甘酒及び乳酸発酵甘酒によるラットデキストラン硫酸ナトリウム誘発性大腸炎に対する予防効果の検討

Protective effects of *koji* amazake and its lactic acid fermentation products on dextran sulfate sodium-induced colitis in rats

○櫻井 美仁[1]、久保田 真敏[1]、井口 晃徳[1]、重松 亨[1]、山口 利男[1]、倉橋 敦[2]、小黒 芳史[2]、西脇 俊和[3]、相原 浩太郎[3]、佐藤 眞治[1]([1]新潟薬大、[2]八海醸造(株)、[3]新潟農総研食研セ)

○Misato SAKURAI[1], Masatoshi KUBOTA[1], Akinori IGUCHI[1], Toru SHIGEMATSU[1], Toshio YAMAGUCHI[1], Atsushi KURAHASHI[2], Yoshihumi OGURO[2], Toshikazu NISHIWAKI[3], Kotaro AIHARA[3], Shinji SATO[1] ([1]NUPALS, [2]Hakkaisan Brewery Co., LTD., [3]Food Res. center, Niigata Agric. Res. Inst.)

【目的】近年の研究から、腸内環境と様々な疾病には因果関係がある事が明らかになっており、腸内環境の改善が疾病の予防に繋がるという研究もなされている。この腸内環境は主に腸内細菌群の働きによって維持されており、腸内細菌叢の変化が腸内環境に影響することが知られている。一方、麹甘酒は栄養価が高い飲料であるため古くから滋養剤として親しまれており、近年では整腸効果や美肌効果、抗酸化活性を有するという報告がなされている。また最近では、麹甘酒の機能性を向上や風味の改善を目的として乳酸発酵を行った『乳酸発酵甘酒』も市販されている。そこで本研究では麹甘酒と乳酸菌による整腸効果に着目し、麹甘酒と乳酸発酵甘酒の大腸炎に対する予防効果をデキストラン硫酸ナトリウム（DSS）誘発性大腸炎モデルを用いて検討を行うことを目的とした。

【方法】試験試料として、麹甘酒、*Lactobacillus sakei* Uonuma(ウオヌマ株)で乳酸発酵を行った乳酸発酵甘酒、及びウオヌマ株(殺菌)を用意し、それぞれ凍結乾燥を行ったものを AIN-93M 飼料に混餌した。供試動物として Wistar 系雄性ラット(8 週齢)を用い、1 週間の馴化後、試験飼料を 4 週間摂餌させ、飲水を 2.0% DSS 含有蒸留水に切り替えさらに 14 日間飼養した後に解剖を行った。

【結果】摂餌量及び飲水量は全期間において各群有意な差は認められなかった。しかし、DAI (Disease Activity Index) スコアは DSS 群で非 DSS 投与(Normal)群と比較して有意に増加した一方、麹甘酒(A)群、乳酸発酵甘酒(LA)群及びウオヌマ株(L)群では有意な増加が認められなかった。血液パラメータでは A 群及び LA 群で赤血球数及びヘマトクリット値が DSS 群と比較して有意に増加しており、麹甘酒及び乳酸発酵甘酒の継続的な摂取が大腸炎に伴う出血を抑制することが示唆された。さらに、大腸長を測定したところ、DSS 摂取による萎縮を抑制する傾向が A 群及び LA 群において認められた。

【考察】DSS により誘発された大腸炎に対し、麹甘酒、乳酸発酵甘酒及びウオヌマ株の継続的な摂取により症状悪化を抑制する傾向が認められたが、乳酸発酵甘酒においてその傾向が最も顕著であった。このことから、麹甘酒の成分やウオヌマ株菌体そのものよりも、ウオヌマ株による発酵産物が大腸炎の抑制に大きく寄与しているものと考えられる。

koji amazake, *Lactobacillus sakei* Uonuma, colitis

発表責任者：櫻井美仁（sakurai@nupals.ac.jp）

講演番号：3B5p13
講演日時：3 月 26 日 16:22～ 1 号館 B5 会場

マウス dectin-1 のユーグレナ・グラシリス EOD-1 由来パラミロンに対する反応性

Reactivity of mouse dectin-1 to paramylon from Euglena gracilis EOD-1

○石橋 健一[1]、西岡 満智子[2]、大中 信輝[2]、西田 典永[2]、高橋 円[2]、山中 大輔[1]、安達 禎之[1]、大野 尚仁[1] ([1]東京薬大薬、[2]神鋼環境ソリューション)
○Ken-ichi ISHIBASHI[1], Machiko NISHIOKA[2], Nobuyuki OHNAKA[2], Norinaga NISHIDA[2], Madoka TAKAHASHI[2], Daisuke YAMANAKA[1], Yoshiyuki ADACHI[1], Naohito OHNO[1] ([1]Tokyo Univ. Pharm and Life Sciences, [2]KOBELCO ECO-SOLUTIONS Co.,Ltd)

【目的】ユーグレナ・グラシリスは微細藻類の 1 種であり、近年、その機能性が注目されている。ユーグレナ・グラシリス EOD-1 株は，主要β-1,3-グルカンであるパラミロン（PM）を 70～80%の高い割合で含有する．我々はこれまでに，ヒト血中および唾液中に PM と反応性を示す抗体が存在すること，それらはユーグレナ・グラシリス EOD-1 株の乾燥物を摂取することにより，力価が上昇することを報告した．よって，ユーグレナ・グラシリス EOD-1 株由来 PM（EOD1PM）の免疫系への作用が示唆されている．本研究では，EOD1PM のβ-グルカン受容体である dectin-1 に対する反応性について検討した．
【方法･結果】EOD1PM 懸濁液をブロッキング後，マウス dectin-1-Fc 融合タンパク質（m-dectin-1-Fc）を添加した．その後，フローサイトメトリーを用いて m-dectin-1-Fc の結合性について検討した．m-dectin-1-Fc の添加により，懸濁液の蛍光強度は上昇し，dectin-1 が EOD1PM に結合することが示唆された．また，結合特異性について，可溶性抗原添加による競合的な反応によって検討した．その結合は可溶化 EOD1PM または *Candida* 細胞壁可溶性β-グルカンの添加により阻害された．
【考察】これらの結果から dectin-1 は，EOD1PM のβ-グルカン構造を認識し，結合することが示唆された．dectin-1 はβ-グルカン受容体として白血球などに発現し，様々な生物活性の発現に関与していることが報告されていることから、EOD1PM の生物活性に dectin-1 経路の関与している可能性が示唆された．

Euglena gracilis, paramylon, dectin-1

講演番号：3B5p14
講演日時：3 月 26 日 16:33～ 1 号館 B5 会場

Euglena gracils（ミドリムシ）と野菜の同時摂取は、マウスの腸内細菌叢を変化させ抗炎症効果と内臓脂肪蓄積抑制作用を増強する

Simultaneous intake of Euglena gracils and vegetables synergistically exert inhibitory effect of the visceral fat accumulation and the chronic inflammation via gut microbiota in mice

○都築 毅[1]、坂之井 悠人[1]、鄂 爽[1]、山本 和史[1]、太田 稔邦[2]、関 健太朗[2]、今井 真由美[2]、太田 隆貴[2]、朝山 雄太[3]、中島 綾香[3]、鈴木 健吾[3]（[1]東北大院・農、[2]武田コンシューマーヘルスケア、[3]ユーグレナ）

○Tsuyoshi TSUDUKI[1], Yuto SAKANOI[1], Shuang E[1], Kazushi YAMAMOTO[1], Toshikuni OTA[2], Kentarou SEKI[2], Mayumi IMAI[2], Ryuki OTA[2], Yuta ASAYAMA[3], Ayaka NAKASHIMA[3], Kengo SUZUKI[3] ([1]Tohoku Univ., [2]Takeda Consumer Healthcare, [3]euglena)

【目的】近年、食の欧米化が急速に進んでいる日本では、肥満などの生活習慣病の発症リスクが増加している。欧米化された食事の特徴の 1 つに、栄養素の偏りがある。よって、様々な栄養素を摂取することは生活習慣病の予防に重要だと考えられ、これは過去の日本食研究からも明らかとなっている。近年、豊富なビタミンやミネラル、食物繊維などの多くの栄養素が含まれる微細藻類 *Euglena gracilis*（Euglena; ミドリムシ）は新たな健康補助食品として注目を集めている。Euglena に含まれる特徴的な成分である不溶性食物繊維のパラミロンは、直鎖の β-1,3-グルカンにより構成される三重螺旋状の高分子体であり、肥満や糖尿病を予防する効果が知られている。Euglena に含まれる食物繊維はほとんど不溶性であり、腸内細菌の発酵により様々な有益な効果を持つ短鎖脂肪酸の産生を促す水溶性食物繊維と同時に摂取することで、その健康効果が増強できると考えられた。本研究では、不溶性食物繊維の豊富な Euglena の付加価値向上を目指し、水溶性食物繊維の豊富な野菜と同時に摂取することにより更なる有益性が得られるかを明らかにすることを目的とした。

【方法】C57BL/6J マウス（9 週齢、雄性）を 1 週間の予備飼育後に、通常飼育食、0.3%パラミロンを含む通常飼育食、1.0%Euglena を含む通常飼育食、1.0%Euglena と 0.3%野菜（オオムギ若葉、ケール、アシタバ）を含む通常飼育食を与える 4 群に分けた。 マウスは試験食を 8 週間摂取させ、18 週齢にて解剖し、各種分析に供した。

【結果】Euglena の摂取によりマウスの内臓脂肪が有意に減少し、野菜と同時摂取によりその効果は増強された。そのため白色脂肪組織の組織学的観察と脂質代謝関連遺伝子の発現解析を行ったところ、Euglena と野菜の同時摂取により脂肪細胞面積の減少、脂肪酸合成関連遺伝子の発現抑制、脂肪細胞増殖や脂肪分解関連遺伝子の発現増加が見られた。また、血清の炎症パラメーターの減少も認められた。これらのメカニズムの探索のため腸内細菌叢への影響を調べたところ、短鎖脂肪酸を産生する有益菌の増加や炎症を引き起こす有害菌の減少が認められ、短鎖脂肪酸の産生量も増加していた。

【結論】Euglena と野菜の同時摂取より Euglena の内臓脂肪蓄積抑制効果や抗炎症効果が増強されることが認められ、このメカニズムの 1 つに腸内細菌叢の変化が関与していることが示唆された [1]。

[1] Sakanoi Y, E S, Yamamoto K, Ota T, Seki K, Imai M, Ota R, Asayama Y, Nakashima A, Suzuki K, Tsuduki T. Simultaneous intake of *Euglena gracilis* and vegetables synergistically exerts an anti-inflammatory effect and attenuates visceral fat accumulation by affecting gut microbiota in mice. *Nutrients* 2018; 10(10). pii: E1417. doi: 10.3390/nu10101417.

Euglena gracilis, inflammation, gut microbiota

講演番号：3B5p15
講演日時：3 月 26 日 16:44～ 1 号館 B5 会場

Effect of dietary ethanolamine plasmalogen on 1,2-DMH-induced colon ACF formation in mice

○EPHANTUS BERNARD[1], Yuki TOMINAGA[1], Shinji YAMASHITA[1], Takashi NAKATOMI[2,3], Kiyotaka NAKAGAWA[2], Teruo MIYAZAWA[2], Mikio KINOSHITA[1] ([1]Obihiro Univ., [2]Tohoku Univ., [3]Yaizu Suisankagaku Ind.)

Introduction: Ethanolamine plasmalogen (Pls), a sub-group of ethanolamine glycerophospholipids (PE) has high sensitivity to reactive oxygen species due to alkenyl (vinyl ether) linkage at the *sn*-1 position while at the *sn*-2 position it is enriched with polyunsaturated fatty acids (PUFA). On the other hand, fish oil is a well-known rich source of low ω-6/ω-3 PUFA. PUFA available in the cell membrane are synthesized into different types of eicosanoids and docosanoids, which modulates pro and anti-inflammatory processes, respectively. In the colon, Pls makes-up 10% of total phospholipids however, its biological role and molecular mechanisms, especially in colon mucosa pathophysiological state remains unknown. The present study was carried out to determine the effect of dietary Pls on 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-induce colon cancer in mice.

Material and methods: BALB/c mice were randomly grouped (n=8) into blank, control, liver PE and ascidian PE. Subsequent to test diet acclimation for 7 days, each mouse was administrated i.p. 1,2-DMH-HCl once a week for 10 wks. Experimental diets for mice were based on AIN-76 supplemented with 1% fish oil from skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) to form the basal diet. PEs were obtained from ascidian muscle (*Halocynthia roretzi*) and porcine liver and added to the diets (0.1%). Finally, the colons were collected and stained with methylene blue. Aberrant crypt foci (ACF) were counted depending on crypt multiplicity; aberrant crypt(s) (AC) 1, AC 2 and AC 3 under a light microscope. The colons were further stained with the high-iron diamine Alcine blue (HID-AB) procedure to evaluate mucin depleted foci (MDF). Semi-quantitative analysis of cytokine levels in colon mucosa was done using cytokine array kit.

Results: Ascidian muscle PE mainly contained EPA (37%) and DHA (9%), and had a high Pls purity (82%). Porcine liver PE had a low Pls purity (7%) with prominent fatty acids being 18:0 (37%) and AA (28%). Fish oil contained 32% DHA and 7% EPA while ratio of ω-6 to ω-3 in the basal, liver PE and ascidian PE diets was 4.19, 4.22, and 3.96, respectively. Ascidian and liver PE groups showed significantly lower AC 1 score than the control group. Furthermore, ascidian PE group showed significantly lower AC 1 score than liver PE group. The total ACF score varied significantly with ascidian PE and liver PE groups showing 3-fold and 2-fold suppression respectively, compared to control. Overall, our results show the potential of Pls in the prevention of colon cancer.

＊本研究は生研支援センター「「知」の集積と活用の場による研究開発モデル事業」の支援を受けて行った。

Plasmalogen, Colon cancer, Aberrant crypt foci

発表責任者：YAMASHITA, Shinji（syamashita@obihiro.ac.jp）

講演番号：3C1a01
講演日時：3 月 26 日 09:00～ 1 号館 C1 会場

分裂酵母における長寿命変異株の特性解析と全ゲノム解析によるその責任遺伝子の同定

Characterization of a chronologically long-lived mutant of fission yeast and identification of the responsible gene by a whole genome sequencing analysis.

○唐澤 健太、山﨑 渉、高久 洋暁、山崎 晴丈（新潟薬大・応生科）
○Kenta KARASAWA, Wataru YAMAZAKI, Hiroaki TAKAKU, Harutake YAMAZAKI (Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci.)

誰もが健康で長生きしたいと考えており、寿命や老化への人々の関心は高い。寿命に関する研究は生物の老化機構を明らかにすることに繋がり、近年急速に問題になっている高齢化社会における健康寿命の増進にも寄与する。これまで寿命研究は、ヒト、サル、マウスなどの哺乳類だけでなく、それよりも下等な線虫、ハエ、酵母などでも研究が行われてきた。その中でも酵母を対象とした寿命研究は、ヒト、サルなどと比べ寿命が非常に短いので世代サイクルを早く回せるという利点がある。酵母の寿命研究は大別して、分裂寿命と経時寿命の研究に分けられる。分裂寿命は、細胞が分裂出来る回数で測定されるが、経時寿命は栄養飢餓状態での分裂しない細胞の生存期間で測定される。分裂寿命の研究は母細胞と娘細胞の区別が容易な出芽酵母で盛んに行われている。一方で、経時寿命の研究は出芽酵母や均等分裂する分裂酵母の双方で行われている。これらの寿命研究により、酵母と他の生物に共通して，カロリー制限によって寿命が延長される効果があることが明らかとなり、その機構や制御因子について解明されつつある。本研究では、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* を用いて、未解明な寿命制御因子、寿命延長機構を明らかにすることを目的とした。

ナショナルバイオリソースプロジェクトから購入したロイシン要求性株の栄養要求性を相補する株 KK268 株を作製し、分裂酵母 *S. pombe* の野生型株である 972 株との比較培養を行った。培養には、2%YE 培地（2% グルコース、0.5% Yeast extract）と 12%YE 培地（12% グルコース、0.5% Yeast extract）を用いた。サンプリング時に、コロニー形成数を測定することに加え、死菌を染色するエリスロシン B を用いた顕微鏡観察を行い、生菌率を算出した。培養の結果、KK268 株は野生型株と比較し、上記した 2 種類の培地条件で共に寿命延長が見られた。2%グルコース培養と 12%グルコース培養を比較して、寿命延長効果に大きな差は見られなかった。このことから、 KK268 株の寿命延長効果はカロリー制限とは別の機構に起因する可能性が考えられた。そこで、KK268 株の全ゲノム配列を読み、野生型株である 972 株とのゲノム比較解析を行ったところ、KK268 株では蛋白質のアミノ酸置換を伴う SNP が 45 か所、InDel が 23 か所で存在することが明らかとなった。現在、それらの変異点の解析から、KK268 株が長寿命となる原因遺伝子の同定を行っている。

chronological life span, fission yeast

発表責任者：山崎晴丈（hyamazaki@nupals.ac.jp）

講演番号：3C1a02
講演日時：3 月 26 日 09:11～ 1 号館 C1 会場

出芽酵母 Dhog1 株の浸透圧感受性抑圧変異株を用いた新規寿命制御機構の解析
Analysis of novel lifespan mechanism using suppressor mutants of osmo-sensitivity of Dhog1 strain in yeast
○舟木 知穂、松上 紗千、米北 久美子、久米 一規、水沼 正樹（広島大院先端研）
○ CHIHO FUNAKI, SACHI MATSUKAMI, KUMIKO YONEKITA, KAZUNORI KUME, MASAKI MIZUNUMA (Hiroshima Univ. of. Adsm.)

老化は遺伝的・時間的・環境因子など様々な要因が関係しており多様複雑であると考えられてきたため、科学的理解は不十分であった。ところが、カロリー制限に代表されるように食餌制限が老化・寿命制御の一要因として見出され、サーチュインなど関連するシグナル伝達経路が同定され、老化・寿命におけるカロリー制限の効果は世界中で最も解析・理解が進んでいる。特に、酵母 (単細胞モデル系)は寿命制御研究の発展に大きく貢献した。 これまでに我々は、Ca^{2+}シグナルの生理的機能の解明のため、*Δhog1* 株の示す Ca^{2+}感受性を抑圧する変異株 *sgh*（**s**uppressor of Ca^{2+}-induced **g**rowth arrest of **h**og1）を取得した。*sgh3~6* 変異は*Δhog1* 株の示す浸透圧感受性も抑圧した。これまでに高浸透圧シグナルは複製的寿命(ある一つの母細胞が娘細胞を産生できる数)を延長することが報告されている。一方、経時的寿命(定常期以降の栄養が制限された状態で生存できる期間)についてはまだ報告がない。そこで、高浸透圧の経時的寿命における影響を調べた結果、野生株の経時的寿命を延長したが、*Δhog1* 株に対しては短命にした。この事から、*Δhog1* 株の浸透圧感受性を抑圧した *sgh3~6* 変異は*Δhog1* 株が示す短寿命も抑圧することが予想された。そこで本研究では、*sgh3~6* 変異株の解析を通して、浸透圧シグナルが関わる新規寿命制御機構の解明を目的とした。

まず高浸透圧の経時的寿命における影響を調べるために、浸透圧として培地に Sorbitol を添加し、高浸透圧条件下における野生株の経時的寿命を測定した。その結果、高浸透圧に曝された野生株の寿命が 2 倍程度延長した。さらに、*sgh3~6* 変異株を用いて高浸透圧非存在下における経時的寿命を測定したところ、*Δhog1* 株は野生株よりも短寿命となり、*sgh3~6* と*Δhog1* との二重変異株は*Δhog1* 株の短寿命を抑圧した。このことから *sgh3~6* 変異が寿命延長に関わることが示唆された。次に *sgh* 単独破壊株の経時的寿命を測定すると野生株と比べて長寿命となった。複製的寿命においては、高浸透圧条件下でグリセロール合成の活性が寿命延長に重要であると報告されている。そこで *sgh* 単独破壊株の経時的寿命延長におけるグリセロール合成の関与を調べた。その結果、*Δsko1*（*sgh5*）株はグリセロール合成に関わる遺伝子を同時に破壊すると寿命延長は抑圧されたが、一方、*Δwhi3*（*sgh4*）株の長寿命にはグリセロール合成は関与しなかった。*WHI3* は細胞周期 G1 期において G1 サイクリンである *CLN3* を負に制御することが知られている。現在、細胞周期と寿命延長との関連について解析中である。

Yeast, osmotic stress, lifespan

講演番号：3C1a03
講演日時：3 月 26 日 09:22～ 1 号館 C1 会場

分裂酵母 *pka1* 欠損株の TBZ 感受性を抑圧する転写関連因子の解析
Genetic analysis of the transcriptional related factor, which is the suppressor for the TBZ-sensitive phenotype of the *pka1* mutant.

竹中 航平[1]、田部 卓磨[1]、川向 誠[1,2]、○松尾 安浩[1,2] ([1]島根大・生物資源、[2]島根大・農生命)
Kouhei TAKENAKA[1], Takuma TANABE[1], Makoto KAWAMUKAI[1,2], ○Yasuhiro MATSUO[1,2] ([1]Fac. of Life and Environ. Sci., Shimane Univ., [2]Inst. of Agricul. and Life Sci., Shimane Univ.)

分裂酵母において，プロテインキナーゼ A(PKA)は，調節サブユニットである Cgs1 と触媒サブユニットである Pka1 からなるヘテロ 4 量体である。炭素源が豊富な条件下では，Cgs1 から Pka1 が解離して核内に移行することで下流因子をリン酸化制御している。PKA 経路は，多くの生物種でグルコース応答経路として知られている。分裂酵母では，糖新生，減数分裂過程への移行の制御，塩ストレスへの応答，経時的寿命の延長に関与することが明らかになっている。我々は，*pka1* 遺伝子欠損株を用いて，薬剤やストレス感受性を解析したところ，新たに微小管重合阻害剤(TBZ)に対して感受性を示すことを見出した。これまでに *pka1* 欠損株の TBZ 感受性の表現型は報告されていないため，下流因子を明らかにする目的で，転写関連因子に焦点をおいて，関係因子の単離と解析を目的とした。

Pka1 の下流に位置する転写関連因子を単離するために，非必須遺伝子破壊株ライブラリーから転写関連因子欠損株 90 株と *pka1* 欠損株を掛け合わせ，二重欠損株を作製した。それら株を用いて TBZ 感受性を解析したところ，*pka1* 欠損株の TBZ 感受性を抑圧する 3 つの転写関連因子欠損株を取得した。その中でも特に TBZ 感受性の抑圧が強い Tfs1（転写伸長因子 TFIIS）に着目した。*tfs*1 欠損株と *pka1 tfs1* 二重欠損株を用いて，*pka1* 欠損株の塩ストレスや薬剤感受性を解析したところ，TBZ 感受性を抑圧し、塩化カルシウムでは *pka1* 欠損株よりもさらに感受性が増す結果を示した。また，TBZ 存在下では，*pka1* 欠損株が示す染色体分配の異常を *tfs1* 欠損が抑圧する結果も得られた。Tfs1 の細胞内局在を解析したところ，野生株では核と細胞質に局在がみられたが，*pka1* 欠損株では核にだけ局在がみられ，Pka1 によって Tfs1 の細胞内局在が制御されていることが示唆された。減数分裂過程や糖新生においては, Pka1 の下流に転写因子 Rst2 があり, 通常 Pka1 によるリン酸化で負に制御されている。そのため，減数分裂過程への移行や糖新生においては，*pka1* 欠損株の表現型を *rst2* 欠損株が抑圧することが報告されている。そこで、Pka1，Rst2 および Tfs1 が，微小管重合阻害剤の存在下で関係性があるかを遺伝学的に解析した。その結果, *pka1* 欠損株の TBZ 感受性を *rst2* 欠損株は部分的に抑圧し，*pka1 rst2 tfs1* 三重欠損株では野生株と同等まで感受性が抑圧されたため，Pka1 の下流で Rst2 と Tfs1 がパラレルに機能していることが示唆された。以上のことから，転写伸長因子である Tfs1 が cAMP/PKA 経路によって制御され，塩ストレス応答や細胞周期での染色体分配に関与していることが示唆された。

Pka1, transcription elongation factor, chromosome segregation

発表責任者：松尾安浩（ymatsuo@life.shimane-u.ac.jp）

講演番号：3C1a04
講演日時：3 月 26 日 09:33～ 1 号館 C1 会場

分裂酵母 *pka1* 欠損株で高発現する Mug14 の解析
Mug14, adducin, is regulated by the cAMP/PKA pathway in fission yeast

○稲村 真一[1]、田部 卓磨[1]、松尾 安浩[1,2]、川向 誠[1,2] ([1]島根大・生資・生命科学、[2]島根大・農生命系)
○Shinichi Inamura[1], Yasuhiro Matsuo[1], Yasuhiro Matsuo[1,2], Makoto Kawamukai[1,2] ([1]Dept. of Life Sci, Fac. of Life and Environ Sci. Univ. of Shimane, [2]Graduate School of Nat. Sci. and Tech.,Univ. of Shimane)

分裂酵母において，プロテインキナーゼ A(PKA)は，細胞外の豊富な炭素源に応答して触媒サブユニットが活性化し，様々な生体内反応を調節することが報告されている。分裂酵母 *pka1* 欠損株は，いくつかのストレスに感受性を示すが，その詳細なメカニズムは明らかになっていない。そこで本研究では，網羅的解析によって，*pka1* 欠損株でタンパク質発現が増加しているものを同定し，その詳細な制御機構と細胞内での影響を明らかにすることを目的とした。

Pka1 経路の下流因子を同定するために，野生株と *pka1* 欠損株からタンパク質を抽出し，ナノ LC-MS/MS 解析によって発現量の変化を解析した。その結果，いくつかのタンパク質発現が野生株に比べ，*pka1* 欠損株で増加していた。その中で，顕著に発現が増加していた Mug14 に焦点を置き，解析を行った。Mug14 の細胞内機能を解明するために，Mug14-GFP 株を作製し，局在解析を行ったところ、野生株に比べ *pka1* 欠損株で核、細胞質共に強い蛍光を示した。そこで，タンパク質発現の解析をしたところ，*pka1* 欠損株でタンパク質発現が増加していた。また，mRNA の発現もタンパク質発現と同様に *pka1* 欠損株で増加していた。Pka1 の下流には，転写因子 Rst2 があるため，*pka1,rst2* 二重欠損株を用いて解析したところ，*pka1* 欠損株で増加していた *mug14* mRNA の発現は，*rst2* 欠損によって発現抑制されていることが明らかになった。これらのことから Mug14 は Pka1 経路を介して転写因子 Rst2 によって発現制御されていることが示唆された。

次に，*pka1* 欠損株における Mug14 の高発現がどのような影響を及ぼしているのかを解析した。*pka1* 欠損株は塩ストレスである塩化カリウムや塩化カルシウムに感受性を示すが、*pka1 mug14* 二重欠損株ではそれらの感受性が抑圧されていた。したがって、Mug14 の高発現が *pka1* 欠損株の塩ストレス感受性に影響している可能性が示唆される。また、Mug14 は野生株においても，低グルコース，窒素源枯渇および有性生殖過程の誘導条件によって発現量が増大することが明らかになった。Pka1 もこれまでに低グルコースや有性生殖過程への進行に関与することが報告されているため，現在これらの関係性の解析を行っている。

PKA, Rst2, stress

発表責任者：松尾安浩（ymatsuo@life.shimane-u.ac.jp）

講演番号：3C1a05
講演日時：3 月 26 日 09:44～ 1 号館 C1 会場

グルコース制限はスピンドルチェックポイント因子である Mad1 の機能低下を引き起こす

Molecular function of Mad1 is regulated by glucose-limitation in fission yeast

○田部 卓磨[1]、松尾 安浩[1,2]、川向 誠[1,2] ([1]島根大・生資・生命科学、[2]島根大・農生命系)
○Takuma Tanabe[1], Yasuhiro Matsuo[1,2], Makoto Kawamukai[1,2] ([1]Dept of Life Sci., Fac. of Life and Environ. Sci., Univ. of Shimane, [2]Graduate School of Nat. Sci. and Tech., Univ. of Shimane)

炭素源は生物において必要不可欠な栄養素であり，単細胞生物である分裂酵母は，細胞外環境の栄養状態を素早く認識し，応答する必要がある。近年我々は，培地の炭素源であるグルコースを通常用いられることが多い 3%からグルコース制限として用いられる 0.1%にまで濃度を下げた際，有糸分裂期進行を阻害する微小管重合阻害剤への感受性が増加することを見出した。そこで、我々は有糸分裂期のスピンドルチェックポイント(SAC)に着目した。SAC は有糸分裂期で姉妹染色体分配を監視するシステムである。我々は，グルコース制限下における SAC の制御系が存在すると考え，その関連性を明らかにする解析を行なっている。

グルコース制限下で，SAC 因子のタンパク質発現を解析した結果，Mad1 のタンパク質発現が特異的に低下していた。グルコースに応答する経路として，cAMP/PKA 経路が存在する。cAMP/PKA 経路は，受容体タンパク質である Git3 がグルコースを認識し，下流へとシグナルが伝達する。それにより PKA 複合体の触媒サブユニットである Pka1 が活性化され，グルコース濃度に依存して様々な調節をしている。そこで，我々は， *pka1* 欠損株での Mad1 のタンパク質量を解析した。その結果，通常状態でもグルコース制限下と同様に Mad1 のタンパク質発現量が低下していた。また，*pka1* 欠損株では，微小管重合阻害剤感受性や染色体分配異常などの Mad1 の発現低下によって引き起こされたと思われる表現型が見られた。また、これらの表現型は Pka1 が制御する転写因子 Rst2 によって抑圧されることがわかった。

転写因子 Rst2 が Mad1 のタンパク質発現に関与することが示唆されたため，転写レベルの制御を受けている可能性が示唆された。そこで，qPCR による解析を行った結果、野生株と *pka1* 欠損株において *mad1* mRNA の変化は見られなかった。そこで、ユビキチン-プロテアソーム系機能欠損型変異体を用いて Mad1 のタンパク質量を調べると，Mad1 のタンパク質蓄積が観察されることがわかった。このことから、Mad1 は分解制御を受けている可能性が示唆された。

以上の結果から、cAMP/PKA 経路が，Mad1 のタンパク質量調節に関与し，その制御はユビキチン-プロテアソーム依存的に引き起こされている可能性が示唆された。

Glucose, Spindle assembly checkpoint, PKA

発表責任者：松尾安浩（ymatsuo@life.shimane-u.ac.jp）

講演番号：3C1a06
講演日時：3 月 26 日 10:05～ 1 号館 C1 会場

Phytophthora infestans 遊走子放出阻害物質の同定及びその作用解析
Identification and characterization of macrotetrolides as a zoospore release inhibitor in *Phytophthora infestans*

○今村 翼、甲斐 建次、谷 修治、炭谷 順一、川口 剛司（阪府大院・生環科）
○Tsubasa IMAMURA, Kenji KAI, Shuji TANI, Jun-ichi SUMITANI, Takashi KAWAGUCHI (Grad. Sch. Life and Env. Sci., Osaka Pref. Univ.)

【目的】*Phytophthora infestans* はトマトやジャガイモに感染して疫病を引き起こす植物病原卵菌である。*P. infestans* が無性世代において形成する遊走子嚢は，20℃では直接発芽し，菌糸を伸長して新たな遊走子嚢を形成する。一方 10℃では，遊走子嚢から放出された複数の遊走子が拡散し，植物表層でシストを形成する。さらにシストから伸びた発芽管の先端に付着器を形成することで植物に感染する。従って，低温に応答した形態変化を伴う植物感染経路が *P. infestans* によるジャガイモ疫病蔓延の主要感染経路である。そこで我々は，温度に応答した形態分化の初期段階である遊走子放出の分子機構を解明する事を最終目的として，本研究ではまず，放線菌の二次代謝産物をターゲットとして遊走子放出を阻害する化合物を同定し，その作用を解析したので報告する。
【方法・結果】まず土壌から単離した放線菌培養抽出サンプルから，10℃で起きる遊走子放出を阻害しつつ，20℃で起きる遊走子嚢からの直接発芽を阻害しないサンプルを探索し，*Streptomyces*. sp no. 403 株が選抜された。本菌の培養上清 55 L から酢酸エチルで抽出，Wako gel C-200，Inertsil ODS-3 によって阻害物質を精製し，最終的に遊走子放出阻害活性を示す化合物 FrB と FrC をそれぞれ 24，8 mg 取得した。LC-MS，^{1}H-NMR，^{13}C-NMR による解析の結果，FrB と FrC はそれぞれ Macrotetrolide 類の Monactin と Dinactin の ^{1}H-，^{13}C-NMR スペクトルと有意に一致した。
現在は FrB，FrC，市販 Dinactin 標品を用いて *P. infestans* 遊走子嚢分化における作用を解析している。これまでに FrB，Dinactin はそれぞれ低温での遊走子放出を IC_{50}=624 μg/ L，1.20 mg/ L で阻害し，高温での直接発芽率には遊走子放出を完全に阻害した濃度でも 20%以下の阻害しか示さなかった。さらにシストからの発芽や付着器形成に対して阻害はみられなかった。また，遊走子嚢懸濁液にサンプルを添加し 30 min 経過後に遊走子嚢を洗浄し，10℃で分化させたところ，遊走子を放出したことから化合物が殺菌的ではなく静菌的に作用していることが示唆された。Macrotetrolide 類は卵菌類において遊走子の運動性や遊走子放出を阻害することが報告されているが，作用機序は未解明である。今回の研究は *P. infestans* 遊走子嚢分化における新たな報告となったが，今後はこの卵菌類に共通した Macrotetrolide の作用機序解明に繋げていく予定である。

zoospore, macrotetrolides, sporangium development

講演番号：3C1a07
講演日時：3 月 26 日 10:16～ 1 号館 C1 会場

人為的な発芽不能胞子は正常胞子の助けで発芽できるのか
Can artificial non-germinating spores germinate with the help of normal spores?
○坂元 仁[1]、古田 雅一[1,2,3]、土戸 哲明[1] ([1]大阪府大微制研、[2]大阪府大放研セ、[3]大阪府大院工量子)
○Jin Sakamoto[1], Masakazu Furuta[1,2,3], Tetsuaki Tsuchido[1] ([1]Res. Ctr. Microorganism Ctl., Osaka Pref. Univ., [2]Res. Ctr. Rad. Osaka Pref. Univ., [3]Dept. Quantum, Grad. Sch. Eng., Osaka Pref. Univ.)

〔背景〕代謝も増殖もできない細胞は、死細胞と定義される。枯草菌は飢餓条件下で芽胞を形成するが、この芽胞は代謝も増殖もできないが、発芽誘発物質を受容すると発芽を開始し、発芽後生長を経て栄養細胞に分化して増殖する。このため芽胞は死細胞ではなく、休眠細胞とされる。枯草菌芽胞を加熱処理したとき、発芽機能を損壊したために生菌数測定での寒天培地での培養条件によっては死細胞として判定される現象を見出した。実際の食品においては固形食品だけでなく、液状食品もあり、正常芽胞の発芽に関わる因子との相互作用による発芽の可能性もある。そこで本研究では正常芽胞との共存が、発芽機能欠失芽胞の発芽および発芽後生長を促すのかどうかを調査した。
〔方法と結果〕我々は、発芽に関与するとされる機能遺伝子を全て欠損させた遺伝子破壊株として、*Bacillus subtilis* 168 株を親株として、コルテックス分解酵素ホモログ *cwlJ sleB ydhD yaaH* の 4 重欠損、L-アラニン発芽に関与する GerA 系（*gerAA gerAB gerAC*）と AGFK（L-アスパラギン、グルコース、フルクトース、KCl）発芽に関与するとされる GerB 系（*gerBA gerBB gerBC*）と GerK 系（*gerKA gerKC gerKB*）の 3 オペロンの三重セット欠損、さらにペプチドグリカンの分解物による発芽誘発に関与する *prkC* 遺伝子を欠損させた多重遺伝子破壊株シリーズを構築した。特にこれらの遺伝子の全欠損株で芽胞に分化した細胞は、発芽できずに永久に眠り続ける人為的に作られた疑似死細胞である。しかしながら、外部からの干渉で生細胞として蘇生可能な死細胞である可能性もある。現実の殺菌処理に曝された芽胞においても発芽機能の損壊により死細胞として判定されている場合や、共存する正常な芽胞がその機能を補ってくれるならば、生細胞として判定されている場合があるのかもしれない。そこで Schaeffer 培地で培養し、芽胞を調製した。親株では光学密度の低下とコルテックス分解までは進行し、増殖する。一方、多重遺伝子破壊株では、発芽における光学密度の低下やコルテックス分解など初期から最終反応も含めて起こらず、見かけ上は発芽も増殖もできず疑似死細胞のままである。これらの正常芽胞と発芽機能欠失芽胞の共存状態で、発芽機能欠失芽胞の発芽が可能になるのかを調査中である。

Bacillus subtilis, germination, spore

発表責任者：坂元仁（sakamoto.jj@gmail.com）

講演番号：3C1a08
講演日時：3 月 26 日 10:27～ 1 号館 C1 会場

花と訪花昆虫に生息する嫌気性細菌の生態的意義に関する研究

Ecological research of anaerobes living in flower and flower-visiting insects.

○山本 安里沙[1]、鈴木 大貴[1]、田中 愛里[1]、西村 拓海[1]、森 達則[1]、佐藤 拓海[2]、川崎 信治[1,2] ([1]東農大バイオ、[2]東農大微生物)
○Arisa YAMAMOTO[1], Daiki SUZUKI[1], Airi TANAKA[1], Takumi NISHIMURA[1], Tatsunori MORI[1], Takumi SATO[2], Shinji KAWASAKI[1,2] ([1]TUA Bio, [2]TUA Microbiol)

【目的】

酸素に弱い嫌気性細菌であるビフィズス菌の多くは動物腸管内に生息するが、例外としてミツバチの腸管からO_2耐性能の高いビフィズス菌が単離された報告がある。そこで我々はミツバチの腸内細菌が花由来であると推定した。糖源として蜜が豊富な花には特有の微生物叢の存在が推定されることから、2006年から花に生息する嫌気性細菌の探索を行っている。その結果、全国各地の花から乳酸など酸を生成する嫌気性細菌のコロニーが多く検出され、花に特有の嫌気微生物叢の存在が強く推定された。その過程で動物からは単離報告例のない新種の嫌気性乳酸菌が花から単離され、*Lactobacillus floricola*、*Lactobacillus ozensis*と命名した。両菌は主に花蜜に豊富なグルコース、フルクトースのみを資化する非常に狭い糖資化能を有している。本学会では両菌の宿主の調査と宿主への共生メカニズムの関係について知見が得られたので報告する。

【方法】

試料は 2006 年から 2018 年にかけて、湿地帯や草原を中心に環境省などの許可を得て日本全国で採取した。周辺環境の調査として、訪花昆虫や蕾、葉、茎、土なども併せて採取した。採取した試料は、個体あるいは部位ごとに解剖後、16S rRNA 遺伝子解析を行った。また次世代シーケンサーを用いてメタ 16S rRNA 遺伝子による微生物叢解析を行い、培養法との相関性を解析した。

【結果】

国立公園など自然豊かな地域で採取した花からは *Lactobacillus* 属の両新種を始めとして、*Lactococcus* 属、*Leuconostoc* 属などの乳酸菌が主に単離され、多いもので花 1 輪あたり 10^4～10^8 のコロニーが得られた。メタ 16S rRNA 遺伝子解析の結果、花の微生物叢としてグラム陰性細菌や、乳酸菌以外のグラム陽性細菌、好気性細菌なども検出されたが、培養法にて単離された嫌気性乳酸菌の検出頻度は他の菌属種に比べて高く、培養法との相関性が得られた。また、花と接触性があるハナアブ類やハナバチ類の細菌叢解析を行った結果、花の細菌叢と類似する結果が得られた。特に、ハナアブ類とキク科の花には両菌の共生関係が示唆され、全国のハナアブ類とキク科の花から共通して *L. floricola* と *L. ozensis* が検出された。このことから両菌は花とハナアブ類に特異的な細菌として、両者に微生物相互作用の存在が示唆された。花と訪花昆虫に特異的に生息する嫌気性細菌の生態的な意義は不明であり、単離菌株の生理学的な特性の解析を進めている。

flower microbiome, insect microbiome, lactic acid bacteria

講演番号：3C1a09
講演日時：3 月 26 日 10:38～ 1 号館 C1 会場

継代に伴うサワードウの成熟と乳酸菌叢変化の関係
Relationship between sourdough maturation and community dynamics of lactic acid bacteria in backslopped sourdough

○大城 麦人[1,2]、田中 優[1]、善藤 威史[1]、中山 二郎[1] ([1]九大院・農、[2]山崎製パン・中央研)
○Mugihito OSHIRO[1,2], Masaru TANAKA[1], Takeshi ZENDO[1], Jiro NAKAYAMA[1] ([1]Fac. Agric., Kyushu Univ., [2]Central Laboratory, Yamazaki Baking CO., LTD.)

【背景】サワードウ（Sourdough）とは小麦粉やライ麦粉と水を混ぜ合わせたものが乳酸菌や酵母によって自然発酵したパン種であり、世界各地のサワードウから 70 菌種以上の乳酸菌が見つかっている。サワードウは、前日のサワードウに小麦粉と水を新たに加えて発酵させる継代の過程で、乳酸菌叢が規則性を持って変化することが明らかとなっている。すなわち、前半型の *Lactococcus* 属・*Enterococcus* 属・*Leuconostoc* 属・*Weissella* 属、次に中間型の *Pediococcus* 属・*Lactobacillus curvatus*、最終的には後半型の *Lactobacillus* 属の特定菌種(*Lactobacillus plantarum*・*Lactobacillus brevis*・*Lactobacillus sanfranciscensis* 等)から成る乳酸菌叢が形成されて安定する。しかしながら、サワードウの乳酸菌叢がなぜこのような規則性を持って変化するのか、そのメカニズムは明らかとなっていない。本研究では、サワードウの乳酸菌叢形成メカニズムの理解を深めることを目的として、サワードウをベーカリーにおける方法で継代した場合（以下ベーカリー法）と、フラスコ液体培地で継代した場合（以下培地法）の乳酸菌叢の変化を比較した。
【方法】9 種類のサワードウから異なる継代数で採取した計 150 の冷凍保管サワードウサンプルを混合し、乳酸菌叢を意図的に多様化させた。この混合サワードウを、ベーカリー法は小麦粉と水、培地法は Wheat Sourdough Simulation Medium で 10 回以上継代し、pH 測定、滴定酸度、培養法による乳酸菌数測定、分離乳酸菌株の菌種同定、MiSeq を用いた 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンシングを行った。加えて、分離乳酸菌株を pH3.5～6 に調製したマルトース MRS 寒天培地で 9～10 日培養し、各 pH における生育能をコロニー数により評価した。
【結果と考察】両法において、継代開始時に前半・中間・後半型の乳酸菌に最近縁な OTU が共通して検出された。乳酸菌数は継代 3 回目に 10^9 程度まで増加し、その後維持された。ベーカリー法は継代に伴い pH が 4.0 未満に下がり、優占種が中間型の *Pediococcus pentosaceus* から後半型の *Lactobacillus sanfranciscensis* に変化したことから、サワードウの乳酸菌集団は小麦粉と水で継代する環境に適応し、乳酸菌叢が成熟したと考えられた。一方、培地法はベーカリー法よりも高い滴定酸度を示したが、pH が 4.0 を上回り、*Enterococcus* 属・*Weissella* 属・*Pediococcus pentosaceus* 等の前半・中間型を主体とする乳酸菌叢が維持され、乳酸菌叢の成熟は進まなかった。pH と乳酸菌叢との関連性を考察するため、前半・中間・後半型の分離乳酸菌株について各 pH における生育能を調べている。

sourdough, lactic acid bacteria, food fermentation

発表責任者：中山二郎（nakayama@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3C1a10
講演日時：3 月 26 日 10:49～ 1 号館 C1 会場

ジェランガム培地上での種々の微生物のコロニー性状
Colony characteristics of various microorganisms grown on gellan gum plate media
○細井 知弘、佐藤 万里（東京都立食技セ）
○Tomohiro HOSOI, Mari SATO (Tokyo Metro. Food Tech. Res. Center)

【目的】 多糖類ジェランガム gellan gum は，培地のゲル化剤として，微生物の分離・培養，植物の組織培養等に利用されている。我々は，農芸化学会 2018 年度大会にて，食品微生物検査における，同一液体基礎培地を用いた寒天培地とジェランガム培地の比較を目的として，1）両培地により得られる菌数，2）ジェランガム濃度とコロニー径，3）ジェランガム製品に依存した *Staphylococcus* 属細菌の生育支持能の差異および *Aspergillus* 属糸状菌の生育・胞子着色への影響等について報告した。本大会では，同様に両培地を用いて，1）約 20 株の細菌・酵母・糸状菌のコロニー性状，2）枯草菌・納豆菌のコロニー性状，3）市販調味料・野菜等の菌数および 55℃培養による好熱性細菌の検出等について検討した結果を報告する。
【方法】液体基礎培地として BBL Trypticase Soy Broth, Difco YM Broth, ジェランガムとして Phytagel, Gelrite，寒天として Bacto Agar を用いた。また，対照の既製寒天培地として，Plate Count Agar（Eiken Chemical），Difco Nutrient Agar，および BBL Trypticase Soy Agar を用いた。細菌・酵母・糸状菌・納豆菌の菌株については，菌株保存機関の分譲菌株および独自保存菌株を用いた。また，市販の調味料・野菜・食品について，複数の培地を用いての 35℃および 55℃培養による菌数検査を行った。
【結果】
1. およそ 20 種類の細菌・酵母・糸状菌菌株について，寒天培地およびジェランガム培地を用いて平板塗抹培養を行った結果，一部の菌株にて，寒天培地と比較して，ジェランガム培地の方がコロニー径が小さい，あるいは，産生される色素量が少なく培地の着色が遅れる，という現象が認められた。また，酵母にて，特定の培地においてのみ，ムコイド状を呈するケースが存在した。
2. 枯草菌・納豆菌を平板塗抹培養した際のコロニー性状（皺）については，Plate Count Agar，Nutrient Agar, Trypticase Soy Agar 間では，同一株でも差異が認められるケースが多いものの，Trypticase Soy Broth を基礎培地とする寒天培地とジェランガム培地間では，大部分の株においてコロニー性状に大きな差異は認められなかった。
3. 市販のワサビ粉末，バジル粉末，ヨモギ粉末，長ネギ等について，複数の寒天培地・ジェランガム培地を用いて，35℃での培養により菌数検査を行ったところ，10^6～10^8/g レベルの高い菌数を示す試料が存在した。また，ジェランガム培地を用いた 55℃での培養により，一部の試料から好熱性細菌の検出が可能であった。

gellan gum plate medium, microbial analysis of food, agar plate medium

講演番号：3C1a11
講演日時：3 月 26 日 11:10～ 1 号館 C1 会場

Anaeromyxobacter 属細菌 PSR-1 株 における異化的ヒ酸還元メカニズムの解明

Investigation of the mechanisms of dissimilatory As(V) reduction in Anaeromyxobacter sp. strain PSR-1

○村松 郁香[1]、殿村 美森[1]、山田 樹奈[1]、笠原 康弘[2]、天知 誠吾[1] ([1] 千葉大園芸、[2] 北大低温研)
○Fumika Muramatsu[1], Mimori Tonomura[1], Mikina Yamada[1], Yasuhiro Kasahara[2], Seigo Amachi[1] ([1]Fac. Horticul., Chiba Univ., [2]Inst. Low Temperature Sci., Hokkaido Univ.)

Anaeromyxobacter sp. strain PSR-1 はヒ素汚染土壌より単離された異化的ヒ酸還元細菌で、*A. dehalogenans* 2CP-1 と 16S rRNA 遺伝子の塩基配列が 99.7%一致する。*Anaeromyxobacter* 属細菌は鉄、硝酸、塩素化化合物、ウラン等の多様な物質を電子受容体として利用可能なことから、バイオレメディエーションへの応用が期待されているが、ヒ酸還元能の存在は PSR-1 株以外には知られていない。そこで、本研究は PSR-1 株の異化的ヒ酸還元メカニズムの解明を目的として、酵素活性測定、ドラフトゲノム解析、転写発現解析及びプロテオーム解析を行った。嫌気セルを用いて電子供与体にメチルビオロゲン、電子受容体にヒ酸を添加する条件で活性測定を行った。菌体を超音波破砕して得られた粗酵素溶液を用いた結果、ヒ酸生育菌体では 27.8 U/mg、フマル酸生育菌体では 1.43 U/mg の活性となり、19.5 倍活性が高くなることが確認された。また、ヒ酸生育菌体をリゾチーム処理し得られたペリプラズム画分及びスフェロプラスト画分を用いて同様に活性測定を行った結果、粗酵素溶液を使用した時と比較して、それぞれ 88.7%、2.92%の活性が得られた。これらの結果より、PSR-1 株はヒ酸に暴露されるとヒ酸還元活性が誘導されること、PSR-1 株の異化的ヒ酸還元酵素はペリプラズムに局在していることが示唆された。ドラフトゲノム解析を行いヒ素代謝遺伝子の探索を行ったところ、異化的ヒ酸還元酵素遺伝子（*arrAB*）は認められなかった。一方、DMSO reductase family に属する tetrathionate 還元酵素遺伝子（*ttr*）群が確認され、それに隣接した位置及び他 2 ヶ所に解毒的ヒ酸還元酵素遺伝子（*arr*）群が存在した。そこで、それらの遺伝子について転写解析を行ったところ、フマル酸生育時と比較してヒ酸生育時に発現の上昇していた。特に、*ttrA* の発現は 5 倍上昇していることが確認された。また、プロテオーム解析でも、*ttrA* にコードされるたんぱく TtrA の発現は 26 倍上昇していた。これらの結果より、PSR-1 株において TtrA が異化的ヒ酸還元を行っているのではないかと推察された。現在、それを直接的に証明するため、NativePAGE、活性染色を試みている。

arsenate reduction, Anaeromyxobacter, proteome analysis

発表責任者：天知誠吾（amachi@faculty.chiba-u.jp）

講演番号：3C1a12
講演日時：3 月 26 日 11:21～ 1 号館 C1 会場

ヨウ素酸呼吸細菌 *Pseudomonas* sp. SCT 株の新規ヨウ素酸還元酵素の同定と呼吸メカニズムの推定
Identification of a novel iodate reductase from an iodate-respiring bacterium *Pseudomonas* sp. strain SCT

○山崎 千尋[1]、笠原 康裕[2]、天知 誠吾[1] ([1]千葉大院園芸、[2]北大低温研)
○Chihiro YAMAZAKI[1], Yasuhiro KASAHARA[2], Seigo AMACHI[1] ([1]Chiba univ., [2]Inst. Low Temp. sci.)

当研究室では、相模湾の海底堆積物からヨウ素酸(IO_3^-)還元細菌 *Pseudomonas* sp. SCT 株の単離に成功している。本菌は酢酸を電子供与体、ヨウ素酸を最終電子受容体として生育できる。SCT 株の生育はヨウ素酸濃度に比例し、ヨウ素酸が無い条件では生育しない。これは SCT 株のヨウ素酸還元が呼吸によるためと推察される。これまでに塩素酸(ClO_3^-)呼吸細菌が単離された例は多く、そのメカニズムが詳細に解明されている。これに対し、臭素酸(BrO_3^-)やヨウ素酸で呼吸する微生物は今まで知られておらず、微生物が環境中でこれらの物質循環に与える影響は不明な点が多い。

本研究では、SCT 株のヨウ素酸還元酵素の同定およびヨウ素酸呼吸メカニズムの解明を目的として、硝酸またはヨウ素酸呼吸条件で生育した菌体からタンパクを抽出し、ヨウ素酸還元酵素活性の測定、Native-PAGE による活性染色、さらにプロテオーム解析により発現タンパクの網羅的解析を行った。ヨウ素酸還元酵素は無細胞抽出液に確認された全活性のうち 85%がペリプラズムに局在し、比活性はヨウ素酸呼吸条件で 19 倍に増加したが、硝酸還元酵素活性は約 1/4 に減少した。プロテオーム解析では、ヨウ素酸呼吸菌体で新規 DMSO reductase (Iodate reductase ; IdrA)と予想されるタンパクが硝酸呼吸時の 162 倍発現上昇することがわかった。Mo 補因子の生合成系や、cytochrome *d* ubiquinol oxidase、cytochrome c_{551} peroxidase、cytochrome *c* oxidase も顕著に発現上昇することがわかった。以上の結果より、SCT 株によるヨウ素酸呼吸では過酸化水素と酸素が発生すると推測された。次に菌体のペリプラズム画分を Native-PAGE で分離し、methyl viologen を電子供与体とした活性染色を行ったところ、ヨウ素酸に特異的なバンドが明瞭に確認された。この活性バンドに含まれるタンパクを LC-MS/MS で同定したところ、IdrA と cytochrome c_{551} peroxidase(Ccp)が検出されたことから、Idr と Ccp が複合体を形成していることが示唆された。現在、プロテオーム解析でヨウ素酸呼吸菌体特異的に高発現が確認されたタンパクに注目し、転写解析を行っている。

Iodate respiration, *Pseudomonas*, DMSO reductase

講演番号：3C1a13
講演日時：3 月 26 日 11:32～ 1 号館 C1 会場

海洋窒素循環を駆動させる触媒分子の機能を解き明かす
To unravel the function of catalytic molecule that drives marine nitrogen cycle
○永井 孔明[1]、押木 守[1]、荒木 信夫[1]、増間 智郎[3]、山口 隆司[2]、岡部 聡[4] ([1]長岡高専、[2]長岡技科大、[3]豊橋技科大、[4]北海道大)
○ Komei NAGAI[1], Mamoru OSHIKI[1], Nobuo ARAKI[1], Tomoro MASUMA[3], Takashi YAMAGUCHI[2], Satoshi OKABE[4] ([1]NIT, Nagaoka Col., [2]Nagaoka Univ. of Tech., [3]Toyohashi Univ. of Tech., [4]Hokkaido Univ.)

海洋性 anammox（嫌気性アンモニア酸化）細菌は，海洋から発生する N_2 ガス生成の最大 67%を担っているとされている．しかし，海洋性 anammox 細菌は淡水性 anammox 細菌と比べてその生理機能は殆ど解明されていない．本研究では，海洋性 anammox 細菌“*Candidatus* Scalindua japonica”からタンパク質（酵素）を精製・同定し，生理機能を明らかにすることを最終目標とした．“*Ca*. S. japonica”を培養するために 30 L スケールの膜分離型リアクター（MBR）を運転した．MBR 立ち上げ時には本研究室で運転する小型 MBR から引き抜いた“*Ca*. S. japonica”培養液 3 L を植種した．亜硝酸・アンモニア濃度は 0.2 mM から徐々に引き上げ，最終的に 2.5 mM とした．MBR は温度 22℃，pH 7.5-7.7 で運転し，N_2:CO_2 混合ガスを 0.45 mL/min で供給させることで嫌気状態を保った．また，フロー式の水位センサーを用いて水位を 30 L に保った．水理学的滞留時間（HRT）は 1 日に設定した．窒素負荷は 5.6 g-N・m^{-3}・day^{-1} から 70 g-N・m^{-3}・day^{-1} まで引き上げて運転を行った．MBR 内の亜硝酸濃度はナフチルエチレンジアミン法で測定した．これまでに 328 日運転を行った．7～90 日目において，窒素負荷を 28～5.6 g-N・m^{-3}・day^{-1} で運転を行ったが流出および流入水の亜硝酸濃度に差が認められなかった．この原因は流入基質の亜硝酸濃度が低い（0.2 mM）ために菌体の活性が増加しなかったためだと考え，90 日目以降から窒素負荷を 11.2 g-N・m^{-3}・day^{-1} に引き上げて運転を行った．その結果，130～150 日目において，流出水の亜硝酸濃度が低下し，菌体活性が上昇した．そこで 170 日目から窒素負荷 42 g-N・m^{-3}・day^{-1} で運転を開始したが，流出水中の亜硝酸濃度が増加し，安定して運転を行うことができなかった．180 日目以降から亜硝酸消費が停滞した原因として，リアクター内における攪拌の不備が挙げられる．180 日目以降から槽内を攪拌するためのマグネットスターラーが度々停止してしまう現象が起き，流入した培地や pH 調整溶液が攪拌されずに濃度が局所的に高い箇所が生じてしまった．このため，高濃度の基質・NaOH 溶液に菌体が耐えきれずに死滅してしまい亜硝酸が消費されなかったと考える．この問題を解決するために，槽内を攪拌羽で攪拌する方式に変更し改造を行った．改造を行った直後（280 日目）から亜硝酸濃度の低下が見られたため，290 日目から窒素負荷を 56 g-N・m^{-3}・day^{-1} に引き上げて運転を行い，100 mL/day の条件で菌体の引き抜きを開始した．流出水の亜硝酸濃度は依然として低濃度だったため，300 日目からは窒素負荷を 70 g-N・m^{-3}・day^{-1} に引き上げた．また，318 日目からは引き抜き速度を 300 mL/day に引き上げて運転を行っている．今後は引き抜き速度 500 mL/day まで引き上げて菌体の回収効率を上げ，タンパク質精製・同定を行う．

Anammox, *Candidatus* Scalindua, protein purification and identification

発表責任者：永井孔明（ci26195r@st.nagaoka-ct.ac.jp）

講演番号：3C1a14
講演日時：3 月 26 日 11:43～ 1 号館 C1 会場

アルコールデヒドロゲナーゼ AdhX 遺伝子依存的貧栄養環境適応機構の普遍性

Generality of alcohol dehydrogenase AdhX gene-dependent oligotrophic growth phenotype

○酒井 洋範、稲葉 慎之介、加藤 広海、大坪 嘉行、津田 雅孝、永田 裕二（東北大院生命科）
○Hironori SAKAI, Shinnosuke INABA, Hiromi KATO, Yoshiyuki OTSUBO, Masataka TSUDA, Yuji NAGATA (Tohoku Univ.)

【背景・目的】従属栄養細菌にとって自然環境の多くは栄養枯渇状態であり、貧栄養環境への適応は環境中での生存に重要である。貧栄養環境への適応機構として、胞子形成や休眠状態への移行など、増殖を制限して「耐え忍ぶ」機構の存在が広く知られているが、当該環境での適応進化には、積極的な増殖も必要である。実際、栄養源が極めて限られた環境下でも増殖する従属栄養細菌の存在が知られている。我々は、好気性従属栄養細菌で *Alphaproteobacteria* に属する *Sphingobium japonicum* UT26 株が、Zn-dependent alcohol dehydrogenase (ADH) 遺伝子 (*adhX*) の高発現により、有機炭素源非添加の無機固体培地上で CO_2 固定を伴ってコロニー形成する現象（oligotrophic growth (OG) 表現型）を見出し、その機構解明を進めている。本研究では、*adhX* 関与の OG 表現型の普遍性を検討した。
【方法・結果および考察】細菌における AdhX ホモログ遺伝子の分布を検討した。UT26 由来の *adhX* と 99%以上の identity を示すほぼ同一の遺伝子が複数の sphingomonads 近縁株で見出され、これらの多くはプラスミド上に存在することから、*adhX* 遺伝子の近縁株間での水平伝播の可能性が示唆された。さらに、60%以上の identity を示すものは *Alphaproteobacteria* に属する細菌のみならず、*Betaproteobacteria* や *Gammaproteobacteria* に属するグラム陰性細菌や、グラム陽性細菌にも広く保存されていた。これらを含む多様な AdhX ホモログ遺伝子の中から、identity のレベルが異なる 7 種類の遺伝子を、発現ベクターを用いて UT26 株由来の *adhX* 遺伝子欠失株に導入したところ、グラム陽性細菌由来のものを導入した株を除いて OG 表現型を示した。また、OG 表現型の程度は、ほぼ identity の程度と相関していたが、同レベルの identity でも OG 表現型に顕著な差がある場合もあった。今後、これら AdhX ホモログのアミノ酸配列や酵素的性質と OG 表現型との関係性を明らかにすることで、OG 表現型に重要な AdhX の性質が明らかになると期待できる。一方、上記の結果は、sphingomonads 細菌群以外でも同様の OG 表現型が広く機能している可能性を示唆する。実際、以前の解析で、UT26 株由来の *adhX* を高発現させると OG 表現型を示す *Betaproteobacteria* 株の存在を見出している。現在、*adhX* ホモログを有する他細菌株の当該遺伝子欠損株を作製し、OG 表現型への影響について検討している。

oligotroph, carbon fixation, alcohol dehydrogenase

発表責任者：酒井洋範（h.sakai@ige.tohoku.com）

講演番号：3C1a15
講演日時：3 月 26 日 11:54～ 1 号館 C1 会場

緑膿菌の嫌気脱窒条件下での DNA 合成に及ぼす *cbb*$_3$ 型末端酸化酵素の影響

Influence of *cbb*$_3$-type cytochrome oxidase on DNA biosynthesis under denitrification conditions in *Pseudomonas aeruginosa*

○堀 遥花、亀谷 将史、石井 正治、新井 博之（東大院・農生科）
○Haruka HORI, Masafumi KAMEYA, Masaharu ISHII, Hiroyuki ARAI (The Univ. of Tokyo)

【背景と目的】緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）は土壌、水圏、動植物体内などに幅広く生育しているグラム陰性細菌であり、日和見感染を引き起こす病原菌として知られている。感染宿主体内には嫌気的環境が多く、緑膿菌は、嫌気呼吸の一種である脱窒（硝酸呼吸）によりエネルギーを獲得している。脱窒過程では、中間産物として一酸化窒素（NO）が生成される。NO はシグナル分子として、嫌気条件下での様々な代謝制御に関与している。本研究では、嫌気条件下での DNA 合成機構に着目した。DNA の合成には、DNA 前駆体リボヌクレオチド中のリボースを還元するリボヌクレオチドレダクターゼ（RNR）が関与している。緑膿菌では、class II、III の 2 つの RNR が嫌気条件下で発現し、class II RNR はビタミン B_{12} 依存的に活性を示す。しかし、嫌気脱窒条件下でのビタミン B_{12} 生合成が NO により阻害されるため、class II RNR の寄与は小さく、class III RNR が主要な酵素として機能すると考えられている。class III RNR をコードする遺伝子 *nrdDG* は、NO を感知するレギュレーターDnr によって正に制御されている。

緑膿菌 PAO1 株において、好気呼吸鎖末端酸化酵素である *cbb*$_3$ 型酵素を欠損した株（Δ*cbb*$_3$）では、嫌気脱窒条件下の生育が野生株に比べ改善することが報告されている。そこで、本研究では、Δ*cbb*$_3$ における *nrdD* プロモーターの転写活性（P*nrdD* 活性）を測定することにより、*cbb*$_3$ 型酵素の嫌気脱窒条件下での生育への関与について調べることを目的とした。

【方法と結果】嫌気脱窒条件における P*nrdD* 活性を β-ガラクトシダーゼアッセイによって測定した。ビタミン B_{12} 添加により、野生株、Δ*cbb*$_3$ ともに P*nrdD* 活性が減少した。ビタミン B_{12} が十分に存在する場合、嫌気脱窒条件下においても class II RNR を優先的に利用し、P*nrdD* 活性を抑制する制御系が存在することが示唆された。Δ*cbb*$_3$ では、ビタミン B_{12} 非添加でも野生株に比べて P*nrdD* 活性が減少した。この原因として、酸素高親和性 *cbb*$_3$ 型酵素の欠損により、残存酸素量が増加し、酸素を利用したビタミン B_{12} 生合成が行われた、または NO 蓄積量の減少により、ビタミン B_{12} 生合成の阻害が低減した可能性等が考えられた。本発表では、これらの可能性を検証した結果について報告する。

Pseudomonas aeruginosa, denitrification, ribonucleotide reductase

講演番号：3C1p01
講演日時：3 月 26 日 13:50～ 1 号館 C1 会場

遺伝子発現解析による油脂酵母の油脂高蓄積重要遺伝子の同定
Identification of genes encoding key enzymes in lipid biosynthesis by gene expression analysis
○風間 春香[1]、小林 鈴花[1]、荒 学志[1]、山崎 晴丈[1]、志田 洋介[2]、小笠原 渉[2]、矢追 克郎[3]、森 一樹[4]、油谷 幸代[4]、荒木 秀雄[5]、高久 洋暁[1]([1]新潟薬大・応生科、[2]長岡技科大・工、[3]産総研・生物プロセス、[4]産総研・CBBD-OIL、[5]不二製油グループ本社)
○Haruka KAZAMA[1], Suzuka KOBAYASHI[1], Satoshi ARA[1], Harutake YAMAZAKI[1], Yousuke SHIDA[2], Wataru OGASAWARA[2], Katsurou YAOI[3], Kazuki MORI[4], Sachiyo ABURATANI[4], Hideo ARAKI[5], Hiroaki TAKAKU[1] ([1]Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., [2]Nagaoka Univ. Tech., [3]AIST, [4]Natl. Inst. Adv. Ind. Sci. & Tech., [5]FUJI OIL HOLDINGS INC.)

近年、世界人口の増加や食生活の変化、バイオ燃料の使用増加に伴い、油脂の需要が増え続けているが、日本の油脂自給率は主要先進国と比較して極めて低く、国内への油脂の安定供給のためには日本独自の生産システムの構築が必要である。そこで本研究では、様々な糖を資化し、細胞内に油脂を蓄積する油脂酵母に注目した。油脂酵母が生産する油脂は、トリアシルグリセロール（TAG）が大半を占め、その脂肪酸組成が植物油と類似していることから代替品としても有望である。本研究室では、油脂酵母の中でも *Lipomyces starkeyi* と *Rhodosporidium toruloides* を取り上げて研究を行っている。両酵母とも細胞内に 70%以上の油脂を蓄積することが可能なユニークな酵母であるが、産業利用には油脂生産性の向上が必須であり、その油脂蓄積メカニズムの詳細は分かっていない。そこで、本研究では、2 つの酵母の油脂高蓄積変異株の遺伝子発現解析を行うことで、油脂蓄積に関与する重要遺伝子の同定を目的とした。

本研究室ではこれまでに、*L. starkeyi* 及び *R. toruloides* の油脂蓄積能が向上した油脂蓄積変異株を複数株取得している。*L. starkeyi* 油脂高蓄積変異株では、細胞あたりの TAG 量が野生株と比較して約 1.4～2.4 倍、*R. toruloides* 油脂高蓄積変異株では約 1.5 倍の油脂高蓄積性を示した。さらに *L. starkeyi* においては、高蓄積株を親株としてさらに変異導入した油脂超高蓄積変異株も取得し、これは野生株の約 4.6～7.1 倍の油脂蓄積性を示した。これら油脂高蓄積変異株と野生株について、リアルタイム PCR を用いた油脂蓄積関連遺伝子の発現解析を実施した。解析には、①アシル CoA 合成経路、②中性脂質合成経路、③TAG 分解経路の 3 つに重点を置き、重要遺伝子の探索を行った。アシル CoA 合成経路の遺伝子については、両酵母の高蓄積変異株に共通して、油脂蓄積期に *ACL1*、*ACC1*、*FAS1*、*FAS2* の高発現が見られ、これら 4 遺伝子の高発現によるアシル CoA 量の増加が油脂の高蓄積を引き起こした原因の一つであることが示唆された。一方で、中性脂質合成経路の遺伝子及び TAG 分解経路の遺伝子の発現量は、*L. starkeyi* 高蓄積変異株では中性脂質合成経路の遺伝子の高発現、TAG 分解経路の低発現が見られたが、*R. toruloides* 油脂高蓄積変異株では、中性脂質合成経路の遺伝子は野生株と同程度、TAG 分解経路の遺伝子は野生株とほぼ同程度、あるいは高発現しており、各酵母で異なる挙動を示した。挙げられた各遺伝子の高発現株の油脂生産性検証を行うことで、油脂高蓄積遺伝子の同定に繋がると考えられる。

本研究は NEDO「植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発」の支援を受けて行われた。

oleaginous yeast, gene expression, lipid

発表責任者：高久洋暁（htakaku@nupals.ac.jp）

講演番号：3C1p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ 1 号館 C1 会場

油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* のアシル CoA 合成酵素の高発現による油脂生産性の向上
Overexpression of acyl-CoA synthesis enzymes of oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* for enhanced production of lipid

○小林 鈴花[1]、荒 学志[1]、山崎 晴丈[1]、吉田 崇伸[2]、志田 洋介[3]、小笠原 渉[3]、矢追 克郎[4]、荒木 秀雄[5]、蓮沼 誠久[2]、高久 洋暁[1] ([1]新潟薬大・応生科、[2]神戸大院・科技イノベ、[3]長岡技科大・工、[4]産総研・生物プロセス、[5]不二製油グループ本社)
○Suzuka KOBAYASHI[1], Satoshi ARA[1], Harutake YAMAZAKI[1], Takanobu YOSHIDA[2], Yousuke SHIDA[3], Wataru OGASAWARA[3], Katsurou YAOI[4], Hideo ARAKI[5], Tomohisa HASUNUMA[2], Hiroaki TAKAKU[1] ([1]Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., [2]Kobe Univ., Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., [3]Nagaoka Univ. Tech., [4]Natl. Inst. Adv. Ind. Sci. Tech., [5]FUJI OIL HOLDINGS INC.)

我々の生活において重要な役割を担っている油脂の需要は、近年のエネルギー問題、急激な人口増加、食の欧米化などの理由から増加している。しかし、我が国の食用油脂自給率は先進国の中でも非常に低く、わずか 13%程度である。それゆえ国内に流通している食用油脂は、世界情勢の変化や気候変動による価格変動のリスクにさらされており、日本の油脂自給率の向上は急務である。本研究で扱っている油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* は、様々な糖を資化し、菌体内に脂肪球の形で油脂を蓄積するため、現在国内で大量に廃棄されている食品残さの糖化液からの持続的な油脂生産への貢献が期待できる。また、*L. starkeyi* の生産する油脂の主成分であるトリアシルグリセロール（TAG）の脂肪酸組成は植物油脂のものと類似しているため、食用油脂として代替可能であり、我が国の油脂自給率向上への貢献が期待できる。しかし、この酵母の産業利用を考えた場合、油脂生産性に課題があるため、育種や遺伝子工学的技術を用いた油脂生産性の向上が必須であるが、*L. starkeyi* の油脂生産機構は未だ不明な点が多い。そこで本研究では、野生株及び油脂高蓄積変異株の遺伝子発現及びメタボロームの比較解析から、油脂生産性に大きく寄与する遺伝子群を同定・解析し、油脂生産機構に関する知見を得ることを目的とした。

L. starkeyi において、野生株と油脂高蓄積変異株の遺伝子発現比較解析を行った結果、油脂高蓄積変異株は野生株と比較して、酢酸を経由する経路に関与する遺伝子の発現量は低く、クエン酸を経由する経路の遺伝子の発現量が高いことが明らかとなった。さらに解糖系、TCA 回路、アシル CoA 合成経路の一部、中性脂質合成経路の一部のメタボロームの比較解析の結果、油脂高蓄積変異株は野生株と比較して、クエン酸の量が低下し、その代わりアセチル CoA、マロニル CoA の量が増加していた。すなわち、アシル CoA 合成経路に関する遺伝子は油脂生産性に大きく寄与する遺伝子群であることが示唆された。クエン酸をアセチル CoA とオキサロ酢酸に変換する酵素をコードする *ACL1*、*ACL2*、その下流に位置し、アセチル CoA をマロニル CoA に変換する酵素をコードする *ACC1* の同時高発現株は、野生株と比較して、油脂生産性が大きく向上していた。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において Acc1p は、Snf1p によりリン酸化による活性制御を受けていることが報告されている。そこで *ACL1*、*ACL2* 同時高発現株に Acc1p のリン酸化制御部位と考えられる 639 番目と 1146 番目のセリンをアラニンに置換した酵素をコードする遺伝子を導入した株を作製し、その油脂生産性を評価したところ、上記の *ACL1*、*ACL2*、*ACC1* の同時高発現株よりもさらに油脂生産性が向上していた。すなわち、アシル CoA 合成経路の油脂生産への重要性が明らかとなった。

本研究は NEDO「植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発」の支援を受けて行われた。

oleaginous yeast, *Lipomyces starkeyi*, lipid

発表責任者：高久 洋暁（htakaku@nupals.ac.jp）

講演番号：3C1p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ 1 号館 C1 会場

油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の中性脂質合成酵素の高発現による油脂生産性の向上
Overexpression of neutral lipid synthesis enzymes of oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* for enhanced production of lipid

○小林 彩子[1]、小林 鈴花[1]、荒 学志[1]、山崎 晴丈[1]、吉田 崇伸[2]、志田 洋介[3]、小笠原 渉[3]、矢追 克郎[4]、荒木 秀雄[5]、蓮沼 誠久[2]、高久 洋暁[1] ([1]新潟薬大・応生科、[2]神戸大院・科技イノベ、[3]長岡技科大・工、[4]産総研・生物プロセス、[5]不二製油グループ本社)
○Ayako KOBAYASHI[1], Suzuka KOBAYASHI[1], Satoshi ARA[1], Harutake YAMAZAKI[1], Takanobu YOSHIDA[2], Yousuke SHIDA[3], Wataru OGASAWARA[3], Katsurou YAOI[4], Hideo ARAKI[5], Tomohisa HASUNUMA[2], Hiroaki TAKAKU[1] ([1]Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., [2]Kobe Univ., Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., [3]Nagaoka Univ. Tech., [4]Natl. Inst. Adv. Ind. Sci. Tech., [5]FUJI OIL HOLDINGS INC.)

油脂は様々な製品に加工され、我々の生活の中で多岐に渡って利用されており、近年、人口増加や生活様式の変化などにより、油脂需要はますます増加すると考えられる。しかし、日本における油脂の自給率はわずか約 13%で、油脂の殆どを輸入に依存しているため、世界の油脂市場が抱える環境、国策、相場によって油脂供給は大きく左右される。従って、日本における油脂の安定した確保は急務課題であり、国内における油脂の自給率を高めることが重要である。本研究室で取り扱っている油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* は様々な糖を資化し、油脂を脂肪球の形で細胞内に蓄積することができるユニークな産業価値の高い酵母である。しかし、実利用のためには、油脂生産速度や油脂生産量の向上の課題が残されている。課題解決のためには、油脂合成・分解・蓄積機構を明らかにし、その知見を活用した油脂酵母の遺伝子工学的な改変は 1 つの手段である。そこで本研究では、本研究室で取得した油脂高蓄積変異株と野生株の遺伝子発現解析、メタボローム解析結果を比較検討し、*L. starkeyi* の油脂生産に関与する重要な経路を見出し、その経路を強化することにより、油脂生産性を向上させること目的とした。

L. starkeyi の野生株と油脂高蓄積変異株の油脂合成・分解経路の遺伝子発現及び解糖系、TCA 回路、アシル CoA 合成経路の一部、中性脂質合成経路の一部のメタボロームの比較解析を行った。その結果、中性脂質合成経路の初発物質であるグリセロール-3 リン酸が蓄積している可能性が見出された。そこでグリセロール-3 リン酸をリゾフホスファチジン酸へ変換する酵素をコードする *SCT1*、さらに中性脂質合成経路を構成し、リゾフホスファチジン酸をホスファチジン酸へ変換する酵素をコードする *SLC1*、ホスファチジン酸をジアシルグリセロールへ変換する酵素をコードする *PAH1*、ジアシルグリセロールをトリアシルグリセロールへ変換する酵素をコードする *DGA1* をそれぞれ高発現させた *L. starkeyi* 株を作製し、その油脂生産性を調査した。その結果、*SCT1*、*DGA1* 遺伝子を高発現させた株は、野生株と比較して約 1.5 倍の油脂を蓄積していた。さらに、*DGA1* を高発現させた株は、対糖油脂変換率も向上していた。現在、油脂生産性向上効果の高かった *SCT1* 遺伝子と *DGA1* 遺伝子の同時高発現株を作製し、油脂生産性の評価を行っている。

本研究は NEDO「植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発」の支援を受けて行われた。

oleaginous yeast, *Lipomyces starkeyi*, lipid

発表責任者：高久洋暁（htakaku@nupals.ac.jp）

講演番号：3C1p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ 1 号館 C1 会場

Acetobacter aceti におけるクエン酸合成酵素遺伝子の高発現による酢酸代謝への影響
Effect of overexpressed gene encoding citrate synthase on acetate metabolism in *Acetobacter aceti*

○中村 匡、亀谷 将史、石井 正治、新井 博之（東大院・農生科）
○Takeru NAKAMURA, Masafumi KAMEYA, Masaharu ISHII, Hiroyuki ARAI (The Univ. of Tokyo)

【目的】酢酸菌 *Acetobacter aceti* はエタノールの不完全酸化により酢酸を高濃度に培地中に蓄積する能力を持ち、これは食酢醸造に利用されている。一方で、エタノールを全て消費した後には、TCA 回路を用いて酢酸を消費し始める。この現象は酢酸過酸化と呼ばれ、食酢醸造において好ましくない。この酢酸蓄積と過酸化の代謝切り替え機構の詳細は未だ明らかになっていない。先行研究では、マイクロアレイ解析により、炭素源としてエタノールが存在する場合、炭素源がグルコースである場合と比較して *A. aceti* の TCA 回路関連酵素遺伝子の転写量が低下することが示されている。そこで本研究では TCA 回路関連酵素遺伝子のうち、酢酸耐性に関わることが知られている、citrate synthase(AarA)と succinyl-CoA:acetate CoA transferase(AarC)に着目し、これらの遺伝子を過剰発現することで、両遺伝子と酢酸蓄積、過酸化との関連性を調査した。
【方法】*lac* プロモーター下流に *aarA*、あるいは *aarC* を挿入したプラスミドを *A. aceti* に導入し、これを *aarA* 過剰発現株、あるいは *aarC* 過剰発現株とした。この菌株をグルコース&エタノール混合培地(Yeast extract 1%:Glucose 0.2 M:Ethanol 0.2 M)、あるいはエタノール培地(Yeast extract 1%:Etanol 0.2 M)にて振盪培養し、種々のパラメータの測定を行った。
【結果】*aarA* 過剰発現株において *aarA* の転写量の増大が認められ、*aarC* 過剰発現株において *aarC* の転写量の増大が認められ、これらの組み換え遺伝子の発現が確認された。また *aarA* 過剰発現株においては、グルコースの有無によらず生育の亢進と酢酸生成能の増強が確認された。酢酸生成能増強の原因を探索するために、各種酵素活性の変化、qRT-PCR による各種遺伝子発現量の変化について解析を行った。本発表では、これらの解析から明らかになった *aarA* 過剰発現によるエタノール、酢酸代謝への影響について報告する。

Acetobacter aceti, acetic acid fermentation, citrate synthase

講演番号：3C1p05
講演日時：3 月 26 日 14:34～ 1 号館 C1 会場

乳酸菌の好気的流加培養による乳酸生産抑制

Suppression of lactic acid production by aerobic fed-batch culture of lactic acid bacteria

○一瀬 涼[1]、垣本 智美[2]、山崎 思乃[2]、片倉 啓雄[2] ([1]関西大院理工、[2]関西大化生工)
○Ryo ICHINOSE[1], Satomi KAKIMOTO[2], Shino YAMASAKI-YASHIKI[2], Yoshio KATAKURA[2] ([1]Kansai Univ. of Grad. Sch. Sci. Eng., [2]Kansai Univ. of Fac. Chem. Mater. Bioeng.)

【背景と目的】

乳酸菌は様々な発酵食品に利用される他、近年ではプロバイオティクスとしても注目されている。しかし、乳酸菌はその名の通り著量の乳酸を生産し、例えアルカリを添加して pH を維持しても乳酸自体の蓄積により増殖が停止するため、高密度培養や高効率の物質生産は難しい。

乳酸菌が乳酸を生産するのは解糖系で消費した NAD^+を乳酸脱水素酵素(LDH)で再生するためである。そこで、*Lactococcus lactis* MG1363 株をモデルとし、流加培養によって解糖系のフラックスを制限し、かつ膜呼吸による NAD^+再生を LDH の代替経路とすることで乳酸生成の抑制を試みた。

【方法】

MRS 培地 100 mL に MG1363 株を植菌し、30℃で 18 時間静置して前培養した。回分培養では、MRS 培地 100 mL を含む 500 mL 容バッフルフラスコに OD_{660}=0.2 となるように植菌し 150 rpm で旋回培養した。流加培養では、まず、グルコースを含まない MRS 培地 100 mL を含む 250 mL 容メディウム瓶に乾燥菌体量として 0.01 g を植菌した。0.2 L min^{-1} で通気しつつスターラーで攪拌(500 rpm)し、グルコース 5 g L^{-1} を含む MRS 培地を $F = \mu^* V_0 X_0 \exp(\mu^* t) / (S_F Y_{X/S})$ に従って指数流加した。ただし V_0 は初期液量(=0.1 L)、X_0 は初期菌体濃度(=0.1 g-cell L^{-1})、μ^*は比増殖速度で 0.1～0.4 h^{-1} に設定し、菌体収率 $Y_{X/S}$ は 0.5 g-cell g-glucose^{-1} と仮定した。t は時間(h)であり、流加速度 F (L h^{-1})は 1 時間毎に調整した。

【結果】

回分培養では最大の比増殖速度が 0.68±0.06 h^{-1}、その間の乳酸の比生産速度 ρ は 3.6±0.2 g g-cell^{-1} h^{-1} であり、増殖菌体あたりの乳酸生産量 $Y_{L/X}$ は 5.2±0.4 g g-cell^{-1}、菌体収率 $Y_{X/S}$ は 0.08 g-cell g-glucose^{-1} であった。これに対して、流加培養では比較的高い比増殖速度に設定した場合であっても、μ =0.46±0.19 h^{-1} の時、ρ は 0.5±0.1 g g-cell^{-1} h^{-1} にとどまり、$Y_{L/X}$ は 1.0±0.5 g g-cell^{-1} に低下し、$Y_{X/S}$ は 0.42 ±0.22 g-cell g-glucose^{-1} に向上した。流加培養では回分培養に比べて、菌体収率が向上するとともに、菌体あたりの乳酸生産量はこの場合、回分培養の約 5 分の 1 に低下した。これは、乳酸菌の増殖停止が乳酸の蓄積が原因であると仮定すれば、回分培養の 5 倍の菌体濃度まで到達し得ることを意味している。ただし、実際に菌体を高濃度まで培養するには、不足する栄養素を補う必要があるため、現在、合成培地を用いて不足しやすい基質を調べ、それらを補うことで高密度培養を目指している。

lactic acid bacteria, suppression of lactic acid production, fed-batch

発表責任者：片倉啓雄（katakura@kansai-u.ac.jp）

講演番号：3C1p06
講演日時：3 月 26 日 14:55～ 1 号館 C1 会場

代謝改変酵母における転写コリプレッサーTup1-Cyc8 とアルギン酸由来モノウロン酸 DEH の代謝
Transcriptional corepressor Tup1-Cyc8 and the metabolism of a monouronate DEH from alginate in the engineered budding yeast

松岡 史也[1]、柏原 貴幸[1]、中田 翔太[1]、村田 幸作[2]、橋本 渉[1]、○河井 重幸[3] ([1]京大院農、[2]摂南大、[3]石川県立大)
Fumiya MATSUOKA[1], Takayuki KASHIHARA[1], Shota NAKATA[1], Kousaku MURATA[2], Wataru HASHIMOTO[1], ○Shigeyuki KAWAI[3] ([1]Kyoto Univ. Grad. Sch. Agric., [2]Setsunan Univ., [3]Ishikawa Pref. Univ.)

【背景】

大型褐藻 (コンブやワカメなど) は再生可能なバイオマスとして有望であり、これらの主要糖質であるアルギン酸やマンニトール (Mtl) を原料としたバイオリファイナリー技術は重要である。しかし、バイオリファイナリーの宿主として優れた出芽酵母 (パン酵母) は、アルギン酸およびMtlを資化しない。我々はこれまでに、出芽酵母BY4742株およびD452-2株にDEH (アルギン酸をアルギン酸リアーゼにより分解することで得られるモノウロン酸) およびMtlの資化能を付与し、2 株のDEH+株を構築している[1)]。さらに、両DEH+株をDEH培地において適応進化させることによりDEH資化能の向上した代謝改変酵母株 (DEH++株) を育種している[1)]。また、出芽酵母へのMtl資化能の付与には、Mtl資化遺伝子を強制発現させる方法[2)]と、転写コリプレッサーTup1-Cyc8遺伝子の自然変異による方法 (我々が明らかにした方法)[3)]がある。DEH+株の構築には種々の理由により前者を用いた[1)]が、後者には遺伝子組換えによらずにMtl資化能を付与できるという長所がある。ただし、代謝改変酵母におけるTup1-Cyc8とDEHの代謝との関連は明らかとなっていない。

【方法と結果】

BY4742株およびD452-2株にDEH資化能のみを付与した株 (Mtlを資化しない) をMtl培地で長期間培養することにより、Mtl資化能を獲得した株を育種した。これらの株の*TUP1*および*CYC8*の変異部位を特定するとともに、DEH培地における生育性を調べた。また、BY4742株由来のDEH++株をDEH培地およびグルコース培地でそれぞれ培養した際の遺伝子の発現量をCAGE (Cap Analysis of Gene Expression) 解析により網羅的に定量して比較した結果についても紹介する。

【参考文献】

1) Matsuoka *et al. Sci. Rep.* 2017. 7(1), 4206.
2) Enquist-Newman *et al. Nature*. 2014. 505(7482), 239-243.
3) Chujo *et al. Appl. Environ. Microbiol.* 2015. 81(1), 9-16.

yeast, alginate, mannitol

発表責任者：河井重幸（kawais@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：3C1p07
講演日時：3 月 26 日 15:06～ 1 号館 C1 会場

グルコース濃度及び cAMP/PKA 経路が分裂酵母におけるコエンザイム Q_{10} の生産性に与える影響
CoQ_{10} production in *Schizosaccharomyces pombe* is affected by glucose concentration and cAMP/PKA pathway

○西田 郁久、横見 和誠、細野 耕司、林 和弘、松尾 安浩、戒能 智宏、川向 誠（島根大生資科）
○ Ikuhisa NISHIDA, Kazumasa YOKOMI, Kouji HOSONO, Kazuhiro HAYASHI, Yasuhiro MATSUO, Tomohiro KAINO, Makoto KAWAMUKAI (Fac. Life Env. Sci. Shimane Univ.)

コエンザイム Q（CoQ）は、真核生物のミトコンドリアにおける呼吸鎖電子伝達系の必須成分としてエネルギー産生に関与する。CoQ はキノン骨格とイソプレノイド側鎖から構成され、ヒトや分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* ではその側鎖長が 10 である CoQ_{10} を生合成する [1)]。CoQ_{10} はエネルギー産生を更新させ、抗酸化物質として働くことから、食品サプリメントとして広く利用されている [2)]。CoQ_{10} のより効率的な微生物生産を行うためには、その生合成とその調節機構を知ることは重要である。*S. pombe* は遺伝子工学的な手法が使え、CoQ_{10} を合成する微生物の中では最もその生合成経路が理解されている [3)]。当研究室では少なくとも 10 種の遺伝子が CoQ_{10} の生合成に関与していることをこれまでに明らかにしており、新しい CoQ_{10} 生合成関連遺伝子の機能解析を進めている。しかしながら、酵母に限らず真核生物における CoQ の生合成経路の全貌やその制御機構に関しては明らかになっていない。そこで本研究では、*S. pombe* の CoQ_{10} の生産性に影響を及ぼす因子の探索や培養条件の検討を行った。

まず、増殖過程における CoQ_{10} の生産性を評価したところ、対数増殖期と比較して、定常期や死滅期において CoQ_{10} 量が増加した。また、低濃度のグルコースを含む培地では増殖の停止が早まり、それに伴い細胞内の CoQ_{10} 量が増加した。一方、高濃度のグルコースを含む培地では、CoQ_{10} 量が減少した。*S. pombe* における CoQ_{10} の生合成はグルコース応答により制御されていることが示唆されたため、その主要経路である cAMP/PKA 経路に着目した。3%のグルコースを含む YES 完全培地で Δ*cgs1*、Δ*cyr1*、Δ*git3*、Δ*gpa2*、Δ*pka1* の各遺伝子単独破壊株の CoQ_{10} 量を測定したところ、Δ*cyr1*、Δ*git3*、Δ*gpa2*、Δ*pka1* の CoQ_{10} 量は野生株の約 1.5～2 倍に増加した。一方、Δ*cgs1* は野生株の約 0.7 倍に CoQ_{10} 量が減少した。この結果はグルコース濃度依存的に CoQ_{10} 量が変化する結果と一致する。また、*pka1* を破壊すると、グリセロール・エタノールを炭素源とする非発酵性炭素源培地において生育が向上し、野生株と比較して CoQ_{10} 量も増加した。分裂酵母において CoQ_{10} の生合成やグリセロール代謝は PKA 経路によって負に制御されていることを示唆している。

1) Kawamukai M. *Biosci*. *Biotechnol*. *Biochem*. **80**: 23-33 (2016)
2) Kawamukai M. *Biosci*. *Biotechnol*. *Biochem*. **82**: 1031-1042 (2018)
3) Hayashi K. *et al*. *PLOS ONE* **9**(6): e99038 (2014)

Coenzyme Q, protein kinase, fission yeast

発表責任者：西田郁久（i-nishida@life.shimane-u.ac.jp）

講演番号：3C1p08
講演日時：3 月 26 日 15:17～ 1 号館 C1 会場

細菌における高濃度メチオニン存在下でのリグニン由来芳香族化合物の代謝阻害
Inhibition of bacterial catabolism of lignin-derived aromatics in the presence of high concentration of methionine

○保里 明日香、荒木 拓馬、新沼 皐、上村 直史、政井 英司（長岡技科大・生物）
○Asuka HORI, Takuma ARAKI, Ko NIINUMA, Naofumi KAMIMURA, Eiji MASAI (Nagaoka Univ. Tech.)

【背景・目的】
Sphingobium sp. SYK-6 株は、様々なリグニン由来芳香族化合物を炭素源・エネルギー源として生育するグラム陰性菌であり、これら化合物をバニリン酸 (VA) 又はシリンガ酸 (SA) に集約して代謝する。その代謝システムに関する知見は、リグニンの化学処理で得られる低分子芳香族化合物から有用物質を生産する微生物を開発する上で有益である。SYK-6 株において VA と SA は、テトラヒドロ葉酸(THF)依存性の *O*-デメチラーゼ LigM と DesA により脱メチルを受け、芳香環開裂を経て代謝される。VA・SA 代謝系遺伝子の転写は MarR 型制御因子の DesR により負に制御されており、VA・SA が誘導物質として働き転写抑制が解除される。VA・SA の脱メチルで生成する 5-メチル-THF は、メチオニン(Met)リサイクル及び C1 代謝につながっており、SYK-6 株は VA・SA の脱メチルを経由せずに代謝される基質での生育時に Met 要求性を示す。一方で、300 μM 以上の高濃度 Met 存在下においては、本株の VA・SA での生育が大きく遅延することを見出している (保里ら, 第 59 回新潟生化学懇話会, 2018)。本研究では、高濃度 Met 存在下における VA・SA での生育阻害メカニズムの解明を目的とし、生育阻害の要因について解析を進めた。
【方法・結果・考察】
SYK-6 株を高濃度 Met 存在下又は非存在下で VA を炭素源として培養した時に VA・SA 代謝系遺伝子、Met リサイクル系遺伝子、C1 代謝系遺伝子の転写量に変動があるかを解析した。SYK-6 株を 5 mM VA で培養し、対数増殖初期に 500 μM Met を添加 (または非添加)してさらに 2 時間培養した。培養後の菌体から total RNA を単離し、逆転写 (RT)反応により cDNA を調製した。得られた cDNA を用いて上記の代謝系に加え、VA・SA 代謝とは独立した解糖系の酵素遺伝子の転写量を定量的 RT-PCR 解析により測定した。その結果、VA・SA 代謝系遺伝子 (*ligM*, *desA*, *desB*)及び *ligM* とオペロンを構成する一部の C1 代謝系遺伝子の転写量は、高濃度 Met 添加区において顕著に減少 (非添加区の 6-36%)した。また、一部の Met リサイクル系遺伝子においても転写量の減少 (非添加区の 30-69%)が観察された。一方、解糖系酵素遺伝子の転写量には変化が見られなかった。以上の結果から、SYK-6 株の高濃度 Met 存在下における VA・SA での生育阻害は、VA・SA 代謝系遺伝子及び 5-メチル-THF 代謝に関与する遺伝子の転写が抑制されることが主な要因であると推察された。

transcriptional regulation, metabolic inhibition, methionine

講演番号：3C1p09
講演日時：3 月 26 日 15:28～ 1 号館 C1 会場

酵母 Saccharomyces cerevisiae におけるプロリン資化抑制機構の理解とその応用

Understanding and Application of the Regulation Mechanism of Proline Assimilation in Yeast

○谷川 翼、渡辺 大輔、高木 博史（奈良先端大バイオ）
○Tsubasa TANIKAWA, DAISUKE WATANABE, HIROSHI TAKAGI (NAIST. of Biol. Sci.)

＜背景および目的＞

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、環境中の栄養を感知して選択的に資化する機構を持つ。プロリンは、NH_3やグルタミン酸などの利用しやすい窒素源が存在すると、窒素源カタボライト抑制（NCR）と呼ばれる機構によってその資化が抑制される。NCR は、（１）プロリンの輸送体および酸化酵素をコードする遺伝子の発現抑制、（２）プロリンの輸送体および酸化酵素の分解促進という２つの機構に起因することが知られているが、窒素シグナルの伝達経路などの詳細は未解明である。NCR はワインやビールなどの酒類の醸造において問題となる。醸造環境では NH_3 やグルタミン酸が豊富に存在し、プロリンの資化が抑制されるため、ほとんどが原料中に残存する。プロリンの残存は、窒素源が効率的に利用されていないだけでなく、苦味の増加や酸味の低下を引き起こし、酒類の味を低下させる可能性がある。本研究では、NCR によるプロリン資化抑制機構の解明を目的としている。また、プロリンを効率的に資化する菌株を育種し、醸造酒の発酵特性、味・風味などに及ぼす影響を評価する。

＜結果および今後の展望＞

◎プロリン要求性株を用いた NCR 条件の検討

S. cerevisiae 実験室株（X2180-1A 株）のプロリン生合成に関与する酵素遺伝子（*PRO1*, *CAR2*）を破壊し、プロリン要求性株を作製した。親株とプロリン要求性株の生育を比較し、NCR が起こる培地条件を検討した。その結果、これまでの報告と異なり、窒素源として NH_3 とプロリンのみを含む最少培地（SD+Pro 培地）、グルタミン酸とプロリンのみを含む最少培地（SD-N+Glu+Pro 培地）では、両株の生育に差は見られず、NCR は確認されなかった。一方、富栄養培地（YPD 培地）では NCR が起こり、プロリン要求性株の生育が抑制された。現在、YPD 培地中に含まれるプロリン資化抑制因子の特定およびその因子による抑制機構の解明に取組んでいる。

◎YPD 培地におけるプロリン輸送体遺伝子の発現

X2180-1A 株を SD-N+Pro 培地および YPD 培地でそれぞれ生育させ、プロリン輸送体遺伝子（*GAP1*, *PUT4*）の発現量を比較した。その結果、*GAP1* の発現は YPD 培地で培養した場合に抑制されたが、*PUT4* の発現は YPD で培養した場合も高いレベルで維持されていた。YPD 培地において *PUT4* が発現するという結果は、YPD 培地でプロリン要求性株が生育しないという結果と異なっている。現在、その理由について、YPD 培地で Put4 が機能的に発現しているかどうかを含めて詳細に検討している。

Proline assimilation, Nitrogen catabolite repression, Wine fermentation

発表責任者：谷川 翼（tanikawa.tsubasa.to3@bs.naist.jp）

講演番号：3C1p10
講演日時：3 月 26 日 15:39～ 1 号館 C1 会場

Vibrio parahaemolyticus のキチン由来ヘテロ 2 糖によるキチン代謝酵素の遺伝子発現
Gene expression of chitin metabolic enzymes by heterodisaccharide produced by chitin on *Vibrio parahaemolyticus*

○津田 紘伸[1]、平野 貴子[1,2]、大久保 学[1]、袴田 航[1,2]、西尾 俊幸[1,2]（[1]日大院生資科、[2]日大生資科・生命化）
○Hironobu TSUDA[1], Takako HIRANO[1,2], Manabu OKUBO[1], Wataru HAKAMATA[1,2], Toshiyuki NISHIO[1,2] ([1]Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon Univ., [2]Chem. and Life Sci., College of Bioresource Sciences, Nihon Univ.)

一般的に海洋細菌は、キチナーゼを分泌して海底土壌中に散在しているキチンを *N,N'*-diacetylchitobiose［$(GlcNAc)_2$］などのホモオリゴ糖に分解して資化している。しかし、一部の細菌はキチンオリゴ糖脱アセチル化酵素（COD, EC 3.5.1.105）も分泌し、$(GlcNAc)_2$ の還元性末端側の GlcNAc残基を脱アセチル化し、β-*N*-acetyl-D-glucosaminyl-(1,4)-D-glucosamine（GlcNAc-GlcN）を生産する[1)]。CODを生産する細菌は*Vibrio*属細菌と*Shewanella*属細菌について報告があり、いずれのCODもGlcNAcには作用せず$(GlcNAc)_2$ に最も高い活性を示し、長鎖のGlcNAcオリゴマーには作用しない。我々はGlcNAc-GlcNの微生物機能性について調べており、これまで本ヘテロ 2 糖は一部のCOD生産性細菌にとってキチナーゼ生産誘導因子であることを報告した[2-4)]。さらに、COD生産性の*Vibrio*属細菌を用いた実験ではGlcNAc-GlcNにより遊走性が誘起される傾向も見られている[5)]。従って、GlcNAc-GlcNはいくつかの細菌の生態において重要な生理活性物質と言える。GlcNAc-GlcNの機能性についてさらに調べたところ、*Vibrio parahaemolyticus*では本ヘテロ 2 糖によりキチナーゼ以外のキチン代謝関連タンパク質の生産も誘導される傾向がみられた[6)]。以前よりキチン由来糖により*Vibrio*属細菌のキチン代謝関連タンパク質の生産が誘導されることは知られていたが、GlcNAc-GlcNに関する報告はない。そこで本研究では、GlcNAc-GlcNのキチン分解代謝系での役割をより詳細に調べるために、*V. parahaemolyticus* RIMD2210633 を用いて本菌が生産するキチン由来 2 糖によるキチン代謝関連酵素の生産誘導について調べることにした。

RIMD2210633 株を$(GlcNAc)_2$ またはGlcNAc-GlcNを含む培地で一定時間培養し、全RNAを抽出した。そして逆転写反応によりcDNAを合成し、リアルタイム定量PCRによりキチン代謝に関わる可溶性酵素の遺伝子発現量を解析した。糖添加後 2 時間の条件でキチン代謝関連酵素の遺伝子発現量を比較した結果、多くの酵素について$(GlcNAc)_2$ よりもGlcNAc-GlcNで遺伝子発現量が増加した。以上より、GlcNAc-GlcNはキチン代謝に関わる複数のタンパク質の発現を誘導することが分かった。

1) Kadokura, K. *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol*.,**75**, 357-365 (2007) / 2) Hirano, T. *et al.*, *Glycobioligy*, **19**, 1046-1053 (2009) / 3) 池嶋ら，日本農芸化学会 2016 年度大会, 2F195 / 4) 横山ら，日本農芸化学会 2016 年度大会, 3A08a15 / 5) Hirano, T. *et al*., *Lett. Appl. Microbiol*. **53**, 161-166 (2011) / 6) 大久保ら，日本農芸化学会 2016 年度大会, 2C26a10

Gene expression, Chitin metabolism, *Vibrio*

発表責任者：平野　貴子（hirano.takako@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3C1p11
講演日時：3 月 26 日 16:00～ 1 号館 C1 会場

好塩性アーキアにおける glycolaldehyde 代謝酵素の同定
Identification of an enzyme involved in glycolaldehyde metabolism in halophilic archaea
○平田 晃右、南 瞭子、佐藤 喬章、跡見 晴幸（京大院工）
○Kosuke HIRATA, Ryoko MINAMI, Takaaki SATO, Haruyuki ATOMI (Kyoto Univ.)

【背景】
高塩濃度環境下に生育している好塩性アーキアの一部では以下に示す新規ヌクレオシド分解経路を有していることが当研究室での研究により示唆されている。この経路ではヌクレオシドを過リン酸分解した後に、糖部分のリン酸化、異性化、脱リン酸化、開裂により glycolaldehyde と dihydroxyacetone phosphate (DHAP)に代謝する（nucleoside→ribose 1-phosphate [R1P]→ribose 1,5-bisphosphate [R15P]→ribulose 1,5-bisphosphate [RuBP]→ribulose 1-phosphate [Ru1P]→glycolaldehyde + DHAP）。DHAP に関しては中央糖代謝経路において代謝されうるが glycolaldehyde がどのように代謝されるのかは不明であった。そこで、本研究では好塩性アーキアにおける glycolaldehyde 代謝酵素の同定を目的とした。

【方法・結果】
ゲノム情報を基に glycolaldehyde 代謝酵素をコードする遺伝子の候補を探索した。上記のヌクレオシド代謝経路を有する好塩性アーキア *Halobacterium salinarum* において、本代謝経路を構成する遺伝子とオペロンを形成している遺伝子を候補として見出した。この遺伝子を発現させた大腸菌の無細胞抽出液中の活性を解析したところ、その発現産物は glycolaldehyde を NADH 存在下で還元する活性を示すことが示唆された。しかし、大腸菌での発現量が低く、精製も困難であったため、*H. salinarum* の無細胞抽出液中から、glycolaldehyde reductase 活性を示すタンパク質の精製を試みることにした。まず本菌の無細胞抽出液中の活性を測定したところ、40 nmol min^{-1} mg^{-1} 程度の活性が検出され、さらに培地にヌクレオシドを添加するとその活性は約 1.5 倍になった。そこでヌクレオシド添加培地で培養した菌体の無細胞抽出液から、ハイドロキシアパタイトカラムとゲルろ過カラムを用いたカラムクロマトグラフィーによる精製を行ったところ、本活性を示すタンパク質をほぼ単一となるまで精製することができた。この精製酵素は 550 nmol min^{-1} mg^{-1} 程度の活性を示した。このタンパク質の分子量は大腸菌で調製したタンパク質の分子量とほぼ一致しており、両酵素が同一であることが示唆された。現在、精製酵素の酵素学的解析およびそれをコードする遺伝子の発現制御様式の解析を進めており、その結果についても報告する。

haloarchaea, glycolaldehyde, metabolism

講演番号：3C1p12
講演日時：3 月 26 日 16:11～ 1 号館 C1 会場

超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* におけるアーキア特異的な新規 dephospho-CoA kinase の同定および解析

Identification and characterization of novel dephospho-CoA kinase in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*

○下坂 天洋[1,2]、MAKAROVA Kira S[3]、KOONIN Eugene V[3]、跡見 晴幸[1] ([1]京大院・工、[2]日本学術振興会、[3]NCBI, NLM, NIH)
○Takahiro SHIMOSAKA[1,2], Kira S MAKAROVA[3], Eugene V KOONIN[3], Haruyuki ATOMI[1] ([1]Kyoto University, [2]JSPS, [3]NCBI, NLM, NIH)

Coenzyme A (CoA) は生体内において様々な代謝経路に関与し、生物にとって必須の補酵素である。真核生物やバクテリアにおいて CoA 生合成に関与する酵素は全て同定されている。一方アーキアにおいても CoA 生合成に関与するほとんどの酵素が同定されてきており、未同定の酵素は dephospho-CoA kinase (DPCK) のみである。DPCK は CoA 生合成の最終段階である dephospho-CoA のリン酸化を触媒する酵素である。

超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* は二つの推定 DPCK 遺伝子 (TK1334、TK2192) を有している。生化学的解析からこれらの組換え型タンパク質は DPCK 活性を有さないことが明らかとなり、*T. kodakarensis* が新規の DPCK を有することが示唆された。

海洋性サンプルのメタゲノム解析により、アーキア由来の配列において arCOG04076 遺伝子と phosphopantetheine adenylyltransferase (PPAT) 遺伝子の融合が認められた。PPAT は CoA 生合成経路において DPCK が触媒する反応の一段階前の反応を触媒する酵素である。このことから arCOG04076 遺伝子がアーキアにおける新規の DPCK 遺伝子である可能性が示唆された。

そこで、*T. kodakarensis* において arCOG04076 に属する遺伝子である TK1697 遺伝子を大腸菌において発現し、組換え型タンパク質を精製し生化学的解析をおこなった。組換え型 TK1697 タンパク質は DPCK 活性を示し、リン酸基供与体として GTP を好むことが明らかとなった。これは真核生物やバクテリア由来の DPCK が ATP をリン酸基供与体として用いる点で異なる。次に TK1697 遺伝子破壊株を作製し、増殖特性の解析をおこなった。遺伝子破壊株は CoA 要求性を示したことから、TK1697 が CoA 生合成に寄与することが示唆された。TK1697 遺伝子ホモログは真核生物やバクテリアには存在せず、アーキアに広く分布していることから TK1697 はアーキアにおける新規 DPCK であると考えられる。

先行研究において *T. kodakarensis* では CoA 生合成の最初の 4 反応を触媒する酵素が既に解析済みであり、残る phosphopantothenoylcysteine synthetase (PPCS)、phosphopantothenoylcysteine decarboxylase (PPCDC) 、phosphopantetheine adenylyltransferase (PPAT) の解析をおこなうために推定 PPCS/PPCDC (TK0517) 遺伝子と推定 PPAT (TK2128) 遺伝子の各破壊株を作製し、増殖特性の解析をおこなった。各遺伝子破壊株は共に CoA 要求性を示し、TK0517 と TK2128 が CoA 生合成に寄与することが示唆された。以前の研究結果と合わせて *T. kodakarensis* における CoA 生合成の全容が解明された。

Coenzyme A, Archaea, Hyperthermophile

講演番号：3C1p13
講演日時：3 月 26 日 16:22～ 1 号館 C1 会場

ランダムトランスポゾン変異導入によるアルドキシムアナログ代謝経路の解析
Analysis of microbial degradation of a nitrile-analog compound by transposon random mutation.
○岸 克洋、橋本 義輝、石上 佳奈、熊野 匠人、小林 達彦（筑波大院・生命環境）
○Katsuhiro KISHI, Yoshiteru HASHIMOTO, Kana ISHIGAMI, Takuto KUMANO, Michihiko KOBAYASHI (Grad. School of Life and Environ. Sci., the Univ. of Tsukuba)

［背景・目的］
ニトリル化合物は化学工業における重要な中間原料であり、溶媒、アクリル繊維、ナイロン 6,6 の製造原料、ニトリル系除草剤などとその用途は多岐にわたっている。我々はニトリル化合物の微生物代謝に関する研究を行っており、その過程で、炭素・窒素二重結合(C=N)をもつアルドキシムを脱水しニトリルを合成するアルドキシムデヒドラターゼの構造および反応機構を解明した(1)。C=N 化合物代謝に関する報告は非常に限られている。そこで、これまで報告されていない C=N 化合物微生物代謝経路とその酵素の探索を目的とし、実験を行った。まず、これまで基質としての報告例がないアルドキシムアナログを分解・代謝できる微生物のスクリーニングを行った。微生物の同定を行うとともに、いくつかの反応中間産物の同定を行い、新規なアルドキシムアナログ代謝経路を発見した。しかし、その代謝に関わる初発酵素は精製の途中で活性が消失しまう問題が生じた。本研究では、接合伝達を用いたトランスポゾンによるランダム遺伝子破壊株ライブラリーの作製法を確立し、作製した変異株を用いて本アルドキシムアナログ化合物代謝に関する遺伝子の特定を試みた。

［方法・結果］
初めに、新規なアルドキシムアナログ代謝経路をもつ複数の微生物について、各種抗生物質試験、形質転換頻度、最小培地での生育などを比較し、遺伝子破壊株ライブラリー作製に適した微生物を選抜した。本菌を受容株、抗生物質耐性遺伝子とトランスポゾン遺伝子を含むプラスミドをもつ *E. coli* β2163 株を供与株として接合伝達を行い、10,500 株の（トランスポゾンランダム挿入による）遺伝子破壊株ライブラリーを作成することに成功した。プレートアッセイなど数次のスクリーニングを行い、ライブラリーの中からアルドキシムアナログ代謝能が変化した変異株を 17 株獲得した。続いて、これら変異株のトランスポゾン挿入部位を決定することで、アルドキシムアナログ代謝経路に関わると示唆される遺伝子座を同定した。

(1) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 2810-2815 (2013)

screening, transposon, mutant library

講演番号：3C1p14
講演日時：3 月 26 日 16:33～ 1 号館 C1 会場

Characterization of cross-stress tolerance and stress responses in a thermotolerant L1-1 isolated from oleaginous yeast *Rhodosporidium toruloides* DMKU3-TK16

○Chih chan WU[1], Takao OHASHI[1], Ryo MISAKI[1], Savitree LIMTONG[2], Kazuhito FUJIYAMA[1]
([1]Osaka Univ., [2]Kasetsart Univ.)

Oleaginous yeasts are considered as alternative platforms for producing a large number of neutral lipids (triacylglycerols) to biofuel industry instead of conventional plant resources due to their fast-growing features and excellent lipid producing abilities. *Rhodosporidium toruloides* yeasts are drawing much attention because of its outstanding lipid producing (> 70% of dry biomass) among oleaginous yeasts. In order to improve the stress-tolerant ability of *R. toruloides* for industrial applications, we isolated a thermotolerant strain L1-1 from *R. toruloides* DMKU3-TK16 by adaptive breeding. The thermotolerant L1-1 was found to have enhanced lipid productivity and growth at 37°C. In the studies of *S. cerevisiae*, cross-stress resistance cases have been reported on some thermotolerant strains. In present study, growth tests were conducted to examine the cross-tolerance of the isolated thermotolerant strain under various stress conditions (3% (*v*/*v*) ethanol, 1.5 mM H_2O_2, 3 g/L (*w*/*v*) acetic acid, 25% (*w*/*w*) glucose, 18% (*w*/*w*) sorbitol, 6% (*w*/*w*) NaCl, 2 μg/mL Zeocin and 4% (*w*/*w*) DMSO). The thermotolerant L1-1 exhibited greater growth under the oxidative stresses (ethanol, H_2O_2, and acetic acid), high osmotic stress (glucose) and stresses induced by DNA damage (Zeocin) and cell- disrupting agent (DMSO). The results indicated the thermotolerant L1-1 exhibited improved cross-tolerances comparing to original strain. Remodeling cell wall structure and maintaining redox homeostasis are vital mechanisms in yeast cells to overcome cell stresses. Examining the cell wall integrity of the thermotolerant L1-1 growing under different stress conditions demonstrated that the thermotolerant L1-1 has a more rigid cell wall structure. Additionally, the ROS levels of the thermotolerant L1-1 were lower than original strain growing in the nutrient medium. Taken together, the thermotolerant L1-1 displayed improved cross-tolerance and also showed better cell wall remodeling ability while growing under stress environments. The lower ROS levels in the thermotolerant L1-1 implied the strain has an efficient redox homeostasis in cells.

Rhodosporidium toruloides, thermotolerant, cross-stress resistance

発表責任者：Kazuhito Fujiyama（fujiyama@icb.osaka-u.ac.jp）

講演番号：3C1p15
講演日時：3 月 26 日 16:44～ 1 号館 C1 会場

高温育種酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* TH-3 の細胞表層及びアミノ酸代謝と耐熱化機構
Thermotolerant mechanism in experimentally evolved *Acetobacter pasteurianus* TH-3: relation with the cell surface and amino acid metabolism

上利 浩輝[1]、中西 里菜[2]、松本 奈実[2]、片岡 尚也[1,2,3]、藥師 寿治[1,2,3]、○松下 一信[1,2,3]（[1]山口大農、[2]山口大院創成科学、[3]山口大中高温微セ）
Hiroki Agari[1], Rina Nakanishi[2], Nami Matsumoto[2], Naoya Kataoka[1,2,3], Toshiharu Yakushi[1,2,3], ○Kazunobu Matsushita[1,2,3] ([1]Fac. Agr. Yamaguchi Univ., [2]Grad. Sch. Yamaguchi Univ., [3]RCTMR Yamaguchi Univ.)

【背景・目的】耐熱性微生物を用いる高温発酵は，省エネ型の安定な発酵技術として期待されている。私たちは，酢酸菌を用いた実験室進化により耐熱化株を取得するとともに，その耐熱化機構の解明に取り組んでいる[1]。*Acetobacter pasteurianus* SKU1108 を酢酸発酵条件下で高温適応育種し得られた耐熱化株 TH-3 は，生育限界温度が 3°C 高くなるだけでなく，SKU1108 株が良好に生育できる 37°C においても，より高い増殖速度と酢酸発酵能を示す[2]。この耐熱化株のゲノム中には，11 の遺伝子変異が存在するが，その内のアミノ酸輸送体，C_4-ジカルボン酸輸送体，ウリジリル転移酵素 PII（N 飢餓応答制御因子）をコードする遺伝子の変異が耐熱化に寄与していること[3]，培地中にある種のアミノ酸や有機酸を添加することで親株 SKU1108 の高温生育が促進されること[4]，も明らかになっている。本研究では，耐熱化株 TH-3 でみられる高温耐性・高生産能と N 飢餓応答の関係を調べるために，細胞表層及び細胞内アミノ酸代謝について解析した。
【方法】*A. pasteurianus* SKU1108 及び TH-3 株を酢酸発酵条件（YPGD+4%Ethanol）37°C で培養し mid-log 期（酸度 1%）に集菌し，その菌体，さらには菌体をトリス緩衝液で洗浄しフレンチプレスによる細胞破砕後の上清，あるいは超遠心上清及び細胞膜画分を分離し，それらを用いて解析を行った。
【結果】① SKU1108 株と TH-3 株の 37°C での増殖能の違いを明らかにするため，それらの濁度，生菌数，乾燥重量を調べたところ，両菌はほぼ同等の濁度を示すのにもかかわらず，乾燥重量で約 1.4 倍，生菌数で 6.2 倍ほど，TH-3 株で高いことが明らかになった。② 酢酸発酵条件で培養した *A. pasteurianus* は，フレンチプレスによる細胞破砕が困難である。私たちは，比較的高濃度のトリス緩衝液で菌体を洗浄することでこの問題を克服してきたが，TH-3 株は SKU1108 株に比べ，その洗浄度合いが少なくてよいことが明らかとなった。③ 両株の細胞破砕後，上清を TCA にて除タンパクし，その上清を用いてアミノ酸分析を行ったところ，TH-3 株では相対的にアミノ酸濃度が上昇しており，特に Glutamate (Glu)，さらには Phe, Val, Ile, Leu の増加が顕著であった。④ 両株の細胞破砕後，細胞質画分を用いて N 飢餓に応答した Glu 生成に関与すると思われる Glutamine synthetase 活性を調べたが，両株の活性に大きな違いは見られなかった。
現在，その他の Glu 代謝酵素活性，細胞表層の（電子）顕微鏡観察を進めており，これらの解析と併せて，TH-3 株の耐熱化機構について考察する。

本研究は JST-ALCA 事業（JPMJAL1106）の一環として行われた。

[1] Matsushita K et al., *Biosci Biotechnol Biochem*, 80, 655 (2016), [2] Matsutani M et al., *J Biotechnol*, 165, 109 (2013), [3] 谷本ら，農化 2015 年度大会（2A21p13），[4] 中西ら，農化支部合同大会（府立大, 2017）

acetic acid bacteria, adaptation, thermotolerance

発表責任者：松下一信（kazunobu@yamaguchi-u.ac.jp）

講演番号：3C2a06
講演日時：3 月 26 日 10:05～ 1 号館 C2 会場

G-body が AMPK 経路を介して酵母の代謝に果たす役割
The role of G-body in regulating yeast metabolism via the AMPK pathway

○吉村 柚紀[1]、平山 伶奈[1]、大谷 優太[2]、内海 亮太郎[1]、三浦 夏子[1]、植田 充美[2]、片岡 道彦[1] ([1]阪府大院・生命環境、[2]京大院・農・応用生命)
○Yuki YOSHIMURA[1], Reina HIRAYAMA[1], Yuta OHTANI[2], Ryotaro UTSUMI[1], Natsuko MIURA[1], Mitsuyoshi UEDA[2], Michihiko KATAOKA[1] ([1]Grad. Sch. Life & Environm. Sci., Osaka Prefecture Univ., [2]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【背景と目的】
細胞内におけるタンパク質の集合体形成は、様々な生物種で代謝経路の調節に寄与することが明らかとなりつつある。我々は以前の研究で、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 細胞質内において解糖系酵素等が低酸素条件下で集合体を形成することを見出した(1)。さらに、集合体形成が SNF1/AMPK ノックアウト株で阻害されることを初めて明らかにした(1)。近年、同様の現象は他の酵母種でも再確認され、この集合体（G-body）の形成が、低酸素条件下における細胞の生存に重要であることが示唆された(2)。一方で、G-body の形成及び代謝調節機構は現在不明である。本研究では低酸素条件下における G-body の役割解明を目指して、G-body の形成を制御する薬剤の評価および、G-body により調節される代謝経路の解明を目的とした。

【方法と結果】
まず、薬剤による評価を効率的に行うために、培養系の小スケール化を行った。複数の低酸素培養法を検討したところ、従来に比べて 50 分の 1 以下の液量(2 ml)を用いた場合でも、以前と同程度の G-body 形成率が得られた。また、低酸素培養中の酸素濃度を検証するため、各スケールで培養を行ったときの酸素濃度を測定した。また、G-body 形成を制御する薬剤候補として AMPK 阻害剤の添加による影響を検証した。低酸素培養開始時に薬剤を添加したところ、G-body 形成率が減少した。さらに、G-body 形成株および形成阻害株の経時的代謝物解析を行った。G-body 保有株で特異的に生産量が変化する代謝物群を抽出し、低酸素条件下で AMPK 経路及び G-body が酵母の代謝に果たす役割を考察したので、まとめて報告する。

(1) Miura *et al.* 2013 Eukaryot. Cell.
(2) Jin *et al.* 2017 Cell Rep.

G-body, metabolism, hypoxia

発表責任者：吉村柚紀（szc02101@edu.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：3C2a07
講演日時：3 月 26 日 10:16～ 1 号館 C2 会場

Eisososme に局在する Sur7 family と Pil1 は協調的に形質膜ストレス応答に関与する
Eisosome located proteins p-Sur7 family and p-Pil1 are cooperatively involved in plasma membrane stress response

○坂田 健太郎[1]、橋井 圭介[1]、田原 悠平[2]、宮田 真人[2]、田中 直孝[1]、田淵 光昭[1]([1]香川大・農・応用生物、[2]大阪市立大・院理・生物地球系)
○ Ken-taro SAKATA[1], Keisuke HASHII[1], Youhei TAHARA[2], Makoto MIYATA[2], Naotaka TANAKA[1], Mitsuaki TABUCHI[1] ([1]Kagawa Univ.of Agric., [2]Osaka City Univ. of Science.)

出芽酵母は 3 つの互いに重なり合うことのない膜ドメインを有しており、それぞれに存在するタンパク質によって MCC (Membrane Compartment occupied by Can1), MCT (Membrane Compartment occupied by TORC2), MCP (Membrane Compartment occupied by Pma1)と呼ばれている。その中でも、MCC にはエイソソームと呼ばれる細胞膜が内側に貫入した裏打ち構造が存在する。近年の報告によると、分裂酵母のエイソソームは低浸透圧時の膜の膨張に対する膜のリザーバーとして機能することで細胞破裂を防いでいることが報告されたが、出芽酵母エイソソームの機能については報告が少ない。また動物細胞において類似するマイクロドメインとしてカベオラが報告されているが、ストレス応答においてどのような役割を果たしているかは未だ明らかになっていない。

出芽酵母エイソソームには、合計 23 種類の膜結合タンパク質、輸送体、4 回膜貫通タンパク質が局在することが知られており、これらは正常なエイソソーム構造の形成や機能維持に貢献していると考えられている。また、エイソソームには 6 種類の 4 回膜貫通タンパク質が存在し、それらは Sur7 family と Nce102 family に分けられる。それぞれのファミリータンパク質はそれぞれ非常に高い相同性を有しており(>61%)、重複した機能を持つことが推測されるが、これらの機能についても多くが明らかになっていない。また、同様にエイソソームに存在している Slm1 は定常状態ではエイソソームに局在しているが、スフィンゴ脂質量の低下などの細胞膜ストレス下ではその局在を異なる膜ドメインである MCT に変え､AGC キナーゼである Ypk1 を介したスフィンゴ脂質代謝やアクチン細胞骨格、Rho1-Pkc1 MAPK カスケードを介した CWI (Cell Wall Integrity)経路を制御していると考えられている。高温・高食塩ストレス条件下で Pil1 欠損株・各ファミリータンパク質の欠損株・Pil1 との多重欠損株の生育阻害を観察したところ、Pil1 と Sur7 family の五重欠損株のみ顕著に生育阻害が確認された。このことから、Pil1 と Sur7family は協調的に働き、エイソソームを介したストレス適応に機能していることが考えられた。

本研究では Pil1 と Sur7 family の五重欠損株(*pil1*Δ*sur7 family*Δ 株)を使用し、CWI (Cell Wall Integrity)経路において機能する Slt2,Hog1 の発現量やリン酸化の解析を実施した。高温や高食塩のストレス応答には、CWI 経路が大きく関与していると予想されたが、野生株と *pil1*Δ*sur7 family*Δ 株のどちらにおいても Slt2,Hog1 の発現量・リン酸化は同程度であった。現在、ストレス時に酵母細胞内で上昇する ROS(活性酸素種)の定量を試みている。

stress responce, eisosome, Cell Wall Integrity

発表責任者：坂田健太郎（s18g629@stu.kagawa-u.ac.jp）

講演番号：3C2a08
講演日時：3 月 26 日 10:27～ 1 号館 C2 会場

酵母における転写制御を介したスフィンゴ脂質代謝のファインチューニングシステム

The fine-tuning system of sphingolipid metabolism by transcriptional regulation in yeast

石野 裕子[1]、有田 頌彬[2]、谷 元洋[2]、小松 楠於[1]、上野 俊哉[1]、田中 直孝[1]、○田淵 光昭[1]([1]香川大農、[2]九州大院理)
Yuko ISHINO[1], Nobuaki ARITA[2], Motohiro TANI[2], Nao KOMATSU[1], Toshiya UENO[1], Naotaka TANAKA[1], ○Mitsuaki TABUCHI[1] ([1]Kagawa Univ., [2]Kyusyu Univ.)

生体膜はグリセロリン脂質、スフィンゴ脂質、コレステロールなどの多様な脂質により構成されており、個々の脂質分子種の構成比は生物種や細胞の種類により違いはあるがそれぞれの細胞において定常状態において一定に保たれている。細胞には脂質レベルを感知し、定常状態では脂質レベルを一定に保つ一方で、環境変化に対しては適切に脂質合成量を変化させるというファインチューニングシステムが備わっていることが知られている。

酵母におけるスフィンゴ脂質代謝制御については、Tor-kinase complex 2(TORC2)-Ypk1-Orm1/Orm2 経路によるスフィンゴ脂質合成の律速酵素であるセリンパルミトイル転移酵素（SPT）活性制御機構が知られている。すなわち、形質膜スフィンゴ脂質量の低下は膜ストレスとして TORC2 の活性化とそれに続く Ypk1 の活性化を引き起こし、Ypk1 は SPT の負の制御因子である Orm1/Orm2 をリン酸化することで負に制御し、結果として SPT の活性上昇を引き起こす。我々は、酵母スフィンゴ質代謝制御機構を解析する過程で機能未知な C2H2 タイプ転写因子 Mlm2 (Multi-copy suppressor for *lip1-1*-myriosin sensitivity 2)が、転写レベルでスフィンゴ脂質代謝を制御することを見出した。*MLM2* 欠損株(*mlm2 Δ*)は、SPT の阻害剤である Myriocin に感受性を示した。興味深いことに Mlm2 の過剰発現は、*YPK1* 温度感受性変異株の高温感受性および Myriocin 感受性を部分的に抑圧した。しかし、Mlm2 の過剰発現は、*ypk1 Δ*株の Myriocin 感受性を抑圧しなかった。一方で Ypk1 の過剰発現は、*MLM2* 欠損株(*mlm2 Δ*)の Myriocin 感受性を抑圧した。これらの結果から、Mlm2 は、Ypk1 の上流において機能することが推測された。Ypk1 のプロモーター領域には Mlm2 の結合エレメントが存在し、Mlm2 を過剰発現した酵母では Ypk1 の発現上昇が見られた。また、Mlm2 の発現は、Myriocin 処理により上昇したことより、Mlm2 はスフィンゴ脂質量の低下に伴い発現が上昇し、結果として Ypk1 の発現上昇を誘導することで TORC2-Ypk1-Orm1/Orm2 経路を強化する役割が考えられた。

Mlm2 は、高度にリン酸化されておりそのアミノ酸配列中には複数の Ypk1 を含む AGC キナーゼの推定リン酸化部位が存在する。しかし、Mlm2 のリン酸化は Ypk1 には依存せず、Myriocin 依存的な発現上昇についても Ypk1 非依存的であった。これより、酵母には未知のスフィンゴ脂質量を感知するシステムが存在し、Mlm2 の発現を介してスフィンゴ脂質代謝をファインチューニングすることが示唆された。

sphingolipid metablism, budding yeast, Ypk1

発表責任者：田淵光昭（mtabuchi@ag.kagawa-u.ac.jp）

講演番号：3C2a09
講演日時：3 月 26 日 10:38～ 1 号館 C2 会場

高温培養時における耐熱性酵母の抗酸化因子の機能

Function of antioxidative factor of thermotolerant yeast in the high temperature culture

○高橋 諒[1]、東崎 愛生[1]、ビチャイ リーラバッチャラマス[2]、岸田 正夫[1] ([1]阪府大院・生環科・応生科、[2]コンケーン大・工・発酵)
○Ryo TAKAHASHI[1], Manami HIGASHIZAKI[1], Leeravatcharamas Vichai[2], Masao KISHIDA[1] ([1]Div. Appl. Life Sci, Grad. Sch. Life and Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Dept. Ferment. Tech. Fac. Tech, Khonkaen Univ.)

【目的】近年，地球温暖化による気候変動や化石燃料の枯渇が懸念されており， 環境に優しく再生可能なバイオ燃料（バイオエタノール）に注目が集まっている．バイオエタノールは，主に糖化・発酵・蒸留の三工程を経て生産されており，それぞれ 90～100℃，25～30℃，80℃の温度を保持する必要があるため，各工程間における冷却や加温にかかる多大なコストがバイオエタノールの価格上昇の一因となっている．そこで耐熱性酵母を利用し，発酵工程に要する温度を 40℃以上に設定することが可能となれば，冷却や加温にかかるコストの大幅な削減が見込める．現在， 高温環境で生育可能な耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus*（以下 Km）について様々な研究が行われているが，Km が耐熱性を獲得するメカニズムに関する研究報告は少ない．先行研究において，Km は高温培養に伴う酸化ストレスに応答して，抗酸化因子を活性化させ，耐熱性を獲得していることが示唆された．その因子の 1 つにカタラーゼが挙げられる．酵母では高温培養時に H_2O_2 が生じるとされ，カタラーゼはそれを H_2O と O_2 に分解し，酸化ストレスを減少させると考えられている．そこで本研究では Km 由来のカタラーゼと *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 株（以下 BY）由来のカタラーゼを比較することにより，Km の高温培養時における生育特性の解明を目的とした．
【方法・結果】BY 由来のカタラーゼ A，カタラーゼ T をコードする BY *CTA1*，BY *CTT1* 遺伝子と Km 由来のカタラーゼ A，カタラーゼ T をコードする Km *CTA1*，Km *CTT1* 遺伝子をそれぞれクローニングし，カタラーゼ過剰発現ベクター（pGK426_BY *CTA1*，pGK426_BY *CTT1*，pGK426_Km *CTA1*，pGK426_Km *CTT1*）を構築をした．得られた過剰発現ベクターを BY に導入し，BY 由来のカタラーゼ過剰発現株と Km 由来のカタラーゼ過剰発現株を作製した．耐熱性への影響を調べるために，それらの株を用いて生育度，生菌数を測定した．その結果，Km 由来のカタラーゼ過剰発現株において最も強い耐熱性を示し，Km 由来のカタラーゼを導入することで耐熱性が向上することが示唆された．また，カタラーゼ A と T を比較すると，BY，Km ともにカタラーゼ A で高い生育度，生菌数を示した．次に各株のエタノール生産性を解析した結果，いずれの過剰発現株も野生株と比較して有意な差は認められなかった．さらに各株の対数増殖期と定常期のカタラーゼ活性を測定した結果，いずれの過剰発現株も野生株と比較して高いカタラーゼ活性を示し，定常期においてより高い値を示した．現在，先行研究で耐熱性に関与すると示唆された他の抗酸化因子の過剰発現株を育種し，その性質解析を行うことによって，更なる耐熱性を有した株の獲得に向けて研究を進めている．

antioxidative factor, thermotolerant yeast, high temperature

講演番号：3C2a10
講演日時：3 月 26 日 10:49～ 1 号館 C2 会場

出芽酵母の圧力適応に重要な細胞内シグナル伝達経路の探索
Exploration of high-pressure adaptation signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*
○望月 貴博、波多野 絵梨、藤山 未奈、阿部 文快（青山学院大理工）
○Takahiro MOCHIZUKI, Eri HATANO, Mina FUJIYAMA, Fumiyoshi ABE (Aoyama Gakuin Univ.)

【目的】 ヒトの身体は血圧や脳圧など常に様々な圧力にさらされており、細胞レベルで圧力に適応することで恒常性を維持している。しかし、細胞における圧力適応メカニズムについてはあまり理解されていない。我々は出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて、高水圧が細胞に及ぼす影響について調べてきた。これまでに、酵母のトリプトファン非要求性株が高圧条件下 (25 MPa; 約 250 気圧) で増殖可能であることや、高圧増殖を可能にする 84 個の遺伝子を同定してきた。また最近、酵母において熱や浸透圧を感知するセンサータンパク質 Wsc1 の欠損株が高圧感受性を示すことを見いだし、Wsc1 が圧力を感知する圧力センサーである可能性を示唆した。そこで本研究では、酵母が圧力に対してどのような応答を示しているのか、圧力適応に重要なシグナル経路の探索を行なった。

【方法】 圧力適応に重要なシグナル経路を調べるため、Wsc1 の下流で機能する遺伝子の欠損株を高圧条件下 (25 MPa で 48 時間) で培養し高圧増殖能を比較した。また、圧力依存的に Mitogen-Activated Protein kinase (MAPK) 経路が活性化するのか検証するため、野生株 BY4742 から全細胞抽出物を調製し、ウエスタンブロッティングを行なった。

【結果】 Wsc1 の下流で機能する低分子量 G タンパク質 Rho1 の GEF である Rom2 やプロテインキナーゼ Pkc1 の欠損株を高圧下で培養したところ、いずれも著しい高圧感受性を示した。このことから、圧力下では Rom2 や Rho1 を介して Pkc1 を活性化している可能性が考えられた。そこで恒常的活性型変異 (R398P) を導入した変異型 Pkc1 発現プラスミドを作製し、*rom2*Δ株の高圧感受性を相補できるのか検証した。その結果、高圧下においても *rom2*Δ株が増殖したことから、Rom2 や Rho1 を介して Pkc1 が活性化することが高圧増殖に重要であることがわかった。次に Pkc1 の下流で働く MAP キナーゼ Slt2 が活性化しているか調べるため、細胞を様々な圧力下 (0.1, 5, 10, 15, 20, 25 と 30 MPa)で 3 時間培養後、ウエスタンブロッティングを行なった。その結果、圧力依存的に Slt2 がリン酸化されることがわかった。このことは、Wsc1 が圧力の増大を感知することで MAPK 経路が活性化することを示唆している。現在、圧力適応に不可欠な遺伝子の同定を行なうため、Slt2 の下流で働く転写因子の欠損株を用いた高圧増殖試験を行なっている。

Saccharomyces cerevisiae, high-pressure, Mitogen-Activated Protein kinase

発表責任者：望月貴博（mochizuki@chem.aoyama.ac.jp）

講演番号：3C2a11
講演日時：3 月 26 日 11:10～ 1 号館 C2 会場

各種化学物質および病原性細菌の同時暴露がそれぞれの毒性変化に及ぼす影響

Effects simultaneous exposure to chemicals and pathogenic bacteria on the changes of their respective toxicity

○油井 拓哉、内海 未央、島村 裕子、増田 修一（静岡県大院・薬食生命）
○Takuya YUI, Mio UTSUMI, Yuko SHIMAMURA, Shuichi MASUDA (Pharm. Nutr. Sci., Univ. Shizuoka)

【背景・目的】食環境中に存在するリスク因子には、有害化学物質などの化学的リスク因子および病原性細菌などの生物学的リスク因子がある。遺伝毒性を誘導する有害化学物質は、がんや免疫機能障害等の遺伝子の異常が原因で発症する疾患を誘導する。また、黄色ブドウ球菌等の病原微生物は、毒素等の病原因子を産生し、食中毒、皮膚炎等の様々な疾病を引き起こす。食環境中には、これら両リスク因子が共存していることから、両者が共存した際のリスクを評価する必要がある。しかし、両者の同時暴露による各毒性発現の変動については明らかになっていない。そこで、本研究では、各種化学物質および病原性細菌の同時暴露による、化学的および生物学的毒性の変動・影響について解析した。

【方法】C57BL6/J マウスから脾臓細胞を採取し、黄色ブドウ球菌が産生する毒素である staphylococcal enterotoxin A (SEA) と発がん性・遺伝毒性を有する化学物質であるアクリルアミド (AA) を同時暴露した。18 時間培養後、AA の遺伝毒性に及ぼす SEA の同時暴露の影響をコメットアッセイ法にて評価した。また、同時暴露による遺伝毒性の変動メカニズムを明らかにするために、マウス脾臓細胞に SEA を暴露した際の炎症性サイトカイン (IFN-γ) の発現量をリアルタイム RT-PCR を用いて調べた。さらに、SEA 産生株 (*S. aureus* C-29 株) を、各種化学物質を添加した Brain Heart Infusion (BHI) 培地およびウシ胎児血清 (FBS) 中で 37°C、18 時間培養し、黄色ブドウ球菌の病原因子発現量および発現変動タンパク質について、リアルタイム RT-PCR および SDS-PAGE を用いて解析した。

【結果・考察】コメットアッセイ法により、AA の遺伝毒性に及ぼす SEA の同時暴露の影響を検討したところ、単独暴露時と比較して、同時暴露時において、AA の遺伝毒性が増強した。また、SEA 暴露により、マウス脾臓細胞中の IFN-γ の発現量が増加した。これらの結果より、炎症が誘導された細胞に化学物質が暴露されることにより、化学物質の遺伝毒性が増強する可能性が示唆された。さらに、FBS 中で *S. aureus* C-29 株を培養したところ、BHI 培地で培養した菌体と比較して、いくつかのタンパク質の発現量が増加し、また、黄色ブドウ球菌の病原因子の調節因子として機能する small RNA である RNAIII の発現量が有意に増加した。これらの結果より、黄色ブドウ球菌が宿主に感染した際の環境 (生体中) と培地では成分が大きく異なることから、化学物質による病原因子の発現性も培地中での評価とは異なる可能性が示唆された。現在、各種化学物質を添加した FBS 中の黄色ブドウ球菌の病原因子発現の変動について解析している。

toxicity, mutagen, *Staphylococcus aureus*

講演番号：3C2a12
講演日時：3 月 26 日 11:21～ 1 号館 C2 会場

Bacillus subtilis ABCF resistance factor VmlR directly protects the ribosome from antibiotics tiamulin, streptogramin A and virginiamycin M

○Hiraku TAKADA[1,2], Gemma Atkinson[2], Vasili Hauryliuk[1,2] ([1]Laboratory for Molecular Infection Medicine Sweden (MIMS), [2]Department of Molecular Biology, Umea University)

B. subtilis antibiotic resistance factor VmlR belongs to the F family of the ABC ATPase protein superfamily. Since resistance factors belonging to the ABC family commonly act as molecular pumps excreting antibiotics out of the cell, VmlR, despite lacking the intermembrane domains, was previously also classified as a pump. Using a combination of genetics, molecular biology and cryo-electron microscopy, we show that VlmR is, in fact, a ribosomal protection protein which allosterically dissociates antibiotics from the ribosomal peptidyltransferase center. Our results provide crucial insights into the molecular mechanism of antibiotic resistance conferred by closely related and highly clinically relevant Enterococcal (OptrA) and Staphylococcal (Vga, Lsa and Sal) ABCF ATPases.

References:

1. Murina V, Kasari M, Takada H, Hinnu M, Saha CK, Grimshaw JW, Seki T, Reith M, Putrinš M, Tenson T, Strahl H, Hauryliuk V, Atkinson GC (2017) ABCF ATPases involved in protein synthesis, ribosome assembly and antibiotic resistance: structural and functional diversification across the tree of life. bioRxiv 220046

2. Murina V, Kasari M, Hauryliuk V, Atkinson GC (2018) Antibiotic resistance ABCF proteins reset the peptidyl transferase center of the ribosome to counter translational arrest. Nucleic Acids Research, 46(7):3753-3763

3. Crowe-McAuliffe C, Graf M, Huter P, Takada H, Abdelshahid M, Nováček J, Murina M, Atkinson GC, Hauryliuk V, Wilson DN (2018) Structural basis for antibiotic resistance mediated by the *Bacillus subtilis* ABCF ATPase VmlR. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, doi/10.1073/pnas.1808535115

Bacillus subtilis, antibiotics, ABC-F

発表責任者：Hiraku Takada（hiraku.takada@umu.se）

講演番号：3C2a13
講演日時：3 月 26 日 11:32～ 1 号館 C2 会場

Paenibacillus 属細菌の芽胞形成とバイオフィルム形成が相互に与える影響
Correlation between sporulation and biofilm formation in *Paenibacillus* spp.
○加藤 寛子[1]、有田 佳奈[2]、尾花 望[3,4]、久保田 浩美[5]、八城 勢造[2]、永井 智[2]、野村 暢彦[4,6]([1]筑波大学大学院・生命環境科学研究科、[2]花王株式会社・安全性科学研究所、[3]筑波大学・医学医療系・トランスボーダー医学研究センター、[4]筑波大学・微生物サステイナビリティ研究センター、[5]花王株式会社・スキンケア研究所、[6]筑波大学・生命環境系)
○Hiroko KATO[1], Kana ARITA[2], Nozomu OBANA[3,4], Hiromi KUBOTA[5], Seizou YASHIRO[2], Satoshi NAGAI[2], Nobuhiko NOMURA[4,6] ([1]Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, [2]Safety Science Research Laboratories, Kao Corporation, [3]Transborder Medical Research Center, Faculty of Medicine, University of Tsukuba, [4]Microbiology Research Center for Sustainability, University of Tsukuba, [5]Skin Care Products Research Laboratories, Kao Corporation, [6]Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba)

【背景・目的】一部の微生物は栄養飢餓等を感知し、休眠状態の細胞である芽胞を形成することが知られている。芽胞は栄養細胞に比べて薬剤および熱耐性が飛躍的に向上するため、食品製造環境においてその制御に向けた努力がなされている。特に *Paenibacillus* 属細菌が形成する芽胞は、芽胞殺菌剤として用いられる過酢酸に対して耐久性を有することから、飲料や乳製品等食品の微生物汚染の要因として問題視されている。当研究室先行研究より、本属菌はバイオフィルム形成能を有し、その内部に芽胞を形成することが明らかとなった。バイオフィルム（BF）とは細胞外マトリクスに覆われた微生物の集合体であり、本属菌は実環境中において BF を形成して生育していると予想される。そこで、本研究では芽胞形成と BF 形成の関係性を明らかとすることを目的とした。

【結果・考察】高い BF 形成能を有する *Paenibacillus* 属細菌環境単離株 3 種（*P. polymyxa*、*P. glucanolyticus* および *Paenibaillus* sp.）を用いて BF 由来芽胞と浮遊菌由来芽胞の形態を比較した結果、いずれの株においても BF 由来芽胞の方が長径が長いことが明らかとなった。さらに、*P. polymyxa* と *Paenibaillus* sp. において、BF 由来芽胞の方が浮遊菌由来芽胞よりも過酢酸耐性が高いことも明らかとなった。*P. polymyxa* の BF 由来芽胞と浮遊菌由来芽胞の RNA-seq を行ったところ、複数の芽胞関連遺伝子発現が変動していたことから、BF 中の環境では浮遊条件とは異なる遺伝子発現が誘導され、性質の異なる芽胞が形成されることが示唆された。

次に、共焦点レーザー顕微鏡を用いて BF の成熟課程とその内部における芽胞形成を経時的に観察した。画像解析の結果、培養 3 日から 5 日の間に、forespore が成熟芽胞に変化すると同時に BF 形成量の著しい増加が観察された。BF は立体的な構造を示し、BF 底面部に多くの成熟芽胞が存在していた。また、芽胞形成に必須の σ 因子をコードする *sigF* の欠損株を用いて BF を形成させたところ、立体的な BF 形成が阻害された。以上より、BF 内部における芽胞形成が BF 形成の促進に寄与することが示唆された。

BF 内部は栄養や酸素、代謝産物の濃度勾配が生じており、浮遊状態とは異なる微小環境が形成されている。本研究より、芽胞の形態や耐性に影響を与えており、また芽胞形成は BF 構造の成熟化を促進することが示唆された。つまり、*Paenibacillus* 属細菌は、芽胞形成と BF 形成が相互に助長することによって、様々な環境に対する耐性を獲得していることが考えられた。

spore, biofilm, *Paenibacillus*

講演番号：3C2a14
講演日時：3 月 26 日 11:43～ 1 号館 C2 会場

海洋細菌 FT01 が生産する EPS が金属腐食性バイオフィルムに与える影響
Influence of EPS on metal corrosive biofilm produced by marine isolate FT01

○伊藤 菜々子[1]、渡辺 宏紀[2]、稲葉 知大[3]、尾花 望[4,5]、宮野 泰征[6]、野村 暢彦[5,7]（[1]筑波大・生命環境、[2]筑波大院・生命環境、[3]産総研・環境管理、[4]筑波大・医学医療系・TMRC、[5]筑波大・MiCS、[6]秋田大院・理工、[7]筑波大・生命環境系）
○ Nanako ITO[1], Hiroki WATANABE[2], Tomohiro INABA[3], Nozomu OBANA[4,5], Yasuyuki MIYANO[6], Nobuhiko NOMURA[5,7] ([1]Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [3]EMRI, AIST, [4]TMRC, Fac. Medicine, Univ. Tsukuba, [5]MiCS, Univ. Tsukuba, [6]Grad. Eng. Sci., Akita Univ., [7]Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

微生物が関与する金属腐食（Microbiologically influenced corrosion: MIC）は通常腐食が生じにくいとされる常温・中性環境においても速やかに腐食が進行することが知られている。MIC にはバイオフィルム（BF）形成とそれに伴う細菌活性の変化が関与することが予想されている。当研究室の先行研究において、ステンレス鋼に対して高い BF 形成能を有し、迅速な金属腐食を引き起こす *Aestuariibacter* sp. FT01 株が同定された。本属菌は海洋から頻繁に検出される細菌であるが、これまでに本属菌による金属腐食の報告はない。このことから FT01 は新規金属腐食細菌であることが予想され、当研究では FT01 の金属腐食機構の解明を目的とした。

FT01 をステンレス鋼片と共に海水模倣培地中で培養し、ステンレス鋼表面を共焦点レーザー顕微鏡によって観察したところ、局所的で立体的な BF の形成とその下部に腐食孔の形成が観察された。また、鉄イオン濃度の定量結果より、BF 形成に伴ってステンレス片からの鉄イオン溶出が促されることが明らかとなった。これらは鉄枯渇条件下のみで観察され、培地中に鉄イオンが十分に存在する条件下では抑制された。さらに培養を経ると、培地中の鉄イオン濃度上昇に伴って BF が崩壊し、細胞は浮遊菌へと脱離した。また、BF 形成後、培地中に鉄イオンを添加すると速やかに BF の脱離が誘導された。鉄枯渇が立体的な BF 及び金属腐食に必須であること、および、鉄イオン濃度の上昇が脱離を引き起こしたことから、FT01 は周囲の鉄イオン濃度に応答し、生育様式（浮遊または BF）を変化させていることが明らかとなった。また、鉄枯渇条件における FT01 の生育にはステンレス片が必須であったことから、FT01 は金属腐食によって生育に必須な金属イオンを獲得していると考えられる。

BF 構造形成には細菌自身が生産する細胞外マトリクス（EPS）が重要な役割を担う。海水模倣培地中に各種 EPS 成分の分解酵素を添加し、ステンレス鋼上の BF 形態の観察を行った。その結果、タンパク質分解酵素によって凝集体形成およびステンレス鋼表面への付着が抑えられ、また、多糖分解酵素によって BF の脱離が生じた。以上より、FT01 において、細胞外タンパク質が菌体どうしの付着およびステンレス鋼表面への付着に関与し、細胞外多糖が BF の立体構造の維持に寄与することが示唆された。FT01 は外界の鉄イオン濃度に応答し、EPS の生産や分解を制御していると考えられる。

Biofilm, Microbiologically influenced corrosion, Iron starvation response

発表責任者：伊藤菜々子（ito.nanako.su@alumni.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3C2a15
講演日時：3 月 26 日 11:54～ 1 号館 C2 会場

Lactobacillus agilis における走化性の解析
Analysis on chemotactic ability of *Lactobacillus agilis* BKN88
○鈴木 駿也[1]、近藤 和穂[1]、横田 健治[2]、五十君 静信[2]、梶川 揚申[2]([1]東農大院・農化、[2]東農大・農化)
○ Shunnya SUZUKI[1], Kazuho KONDO[1], Kenji YOKOTA[2], Shizunobu IGIMI[2], Akinobu KAJIKAWA[2] ([1]Grad. Sch. Agr. Chem, Tokyo Univ. Agr., [2]Sch. Agr. Chem, Tokyo Univ. Agr.)

【背景・目的】
Lactobacillus 属細菌は一般的に非運動性だが、一部はべん毛を有し運動性を示す。有べん毛 *Lactobacillus* 属細菌は環境中での生存に運動性を活用していると考えられるが、過去の研究例は少なくべん毛を保持し運動性を示す意義は明らかになっていない。運動性細菌の生態には走化性が大きく関わり、腸管由来の運動性細菌では粘膜や細胞への浸潤などに寄与することが知られている。以上のことから走化性が有べん毛 *Lactobacillus* 属細菌の生態においても重要な役割を果たすことが考えられる。そこで本研究では、ニワトリ消化管由来の *Lactobacillus agilis* BKN88 を供試菌として、走化性に関与する物質の探索と対応する受容体の同定を目的とした。
【方法・結果】
動物腸管内に存在すると考えられる物質を 13 種選抜し、Capillary 法による走化性試験を行った。その結果、*L. agilis* BKN88 は乳酸・酢酸・酪酸、デオキシコール酸ナトリウムから忌避し、N-アセチル-D-グルコサミンおよび N-アセチル-D-ガラクトサミンに誘引された。また、試験物質存在下での菌体の挙動を動画撮影し、軌道追跡ソフトにより軌跡を解析した。その結果、乳酸・酢酸・酪酸、デオキシコール酸ナトリウム存在下では菌体の方向転換頻度が上昇し、N-アセチル-D-グルコサミン存在下では直線的な軌跡が観察された。これは Capillary 法による走化性試験の結果を支持していた。*L. agilis* BKN88 において走化性受容体遺伝子は 5 つ存在し、RT-PCR により全ての発現が確認された。温度感受性プラスミド pGhost5 を用いた二重相同組換えにより、5 つの走化性受容体遺伝子をそれぞれ欠失した走化性受容体欠損株を作出した。現在、受容体の同定に向けた走化性受容体欠損株の走化性試験を行っている。
【考察】
L. agilis BKN88 は腸内細菌が産生する有機酸から忌避することで、競合する腸内細菌から逃れている可能性が考えられる。また、毒性の強い二次胆汁酸であるデオキシコール酸からの逃避は自己の生存性を向上させている可能性がある。N-アセチル-D-グルコサミンおよび N-アセチル-D-ガラクトサミンはムチンの構成糖であり、これらに対する集積は腸管粘液層への定着に関与している可能性が考えられる。これらのことより、*L. agilis* BKN88 は動物腸管由来の物質に対して走化性を示し、生育環境に適応した走化性を保持することで、生存性や定着性を向上させている可能性が考えられる。

Lactobacillus, motility, chemotaxis

講演番号：3C2p01
講演日時：3 月 26 日 13:50～ 1 号館 C2 会場

消毒薬の効力に対するアデノウイルスの血清型の違いについて

in vitro efficacy of external disinfectant against various serotypes of Adenoviruses

○鈴木 潤一[1,2]、松村 有里子[1]、梶浦 工[1,2]、岩澤 篤郎[1]（[1]東京医療保健大学大学院、[2]吉田製薬株式会社）
○Junichi SUZUKI[1,2], Yuriko MATSUMURA[1], Takumi KAJIURA[1,2], Atsuo IWASAWA[1]（[1]Tokyo Healthcare University, [2]Yoshida Pharmaceutical CO., LTD）

〔目的〕

アデノウイルスは 51 種の血清型と 52 型以降の遺伝型に分類され、臨床上の病態と分離されたウイルスの血清型との間には関連性が見られる。特に眼科領域でアウトブレイク事例の報告がある流行性角結膜炎（EKC）では、8 型や 19 型等が分離されている。一方、消毒薬の抗アデノウイルス効果には 3 型や 5 型等一部のアデノウイルスを用いた不活化効果が示されているが、様々なウイルス型に対してはほとんど示されていない。また、ノンエンベロープウイルスに対する有効性を高めるために、消毒用エタノールに有機酸が添加された消毒薬も販売されている。今回は、アデノウイルスの血清型と消毒薬の抗アデノウイルス効果との関係に着目し、ヨウ素を有効成分とするポビドンヨード(PVP-I)および種々の有機酸を添加した消毒用エタノールを用いて *in vitro* 試験系で不活化効果を検討し、市販品とも比較した。

〔方法〕

供試アデノウイルスは計 10 株（2、3、4、5、7、8、11、19、37、41 型)、感受性細胞は A549 細胞とした。供試薬には原末の PVP-I および種々の有機酸を添加した 80%エタノール（EtOH）を用い、市販品は 10%PVP-I 製剤と PVA 点眼薬、消毒用 EtOH 製剤、改良型 80%EtOH 製剤を用いた。薬液とウイルス液を 9:1 の割合で混合し、10 秒および 60 秒間作用させて薬液作用を停止した後、感受性細胞に添加・培養して細胞変性効果からウイルス感染価を算出した。

〔結果および考察〕

1～10%の濃度 PVP-I は、検討した全ての型に対して 60 秒間作用させても不活化効果は見られなかったが、0.1%では他濃度群より高い効果が認められた。これは、PVP-I の特性として、0.1%のとき最も遊離ヨウ素濃度が高くなるためと考えられる。市販の PVP-I 製剤を用いても同様の結果となった。また、PVP-I の抗アデノウイルス効果に血清型による差異は認められなかった。一方、PVA 点眼薬は、60 秒間作用時において 8 型に対する効果が低く、ウイルス株間に差異が認められた。消毒用エタノールを用いると、10 秒間の作用で検出限界以下となるウイルス型がある一方で、わずかに効果があるか全く効果の認められないウイルス型があった。特に、1 分間の作用でも 8 型では抗アデノウイルス効果が認められなかった。有機酸として、リン酸または乳酸を添加すると、わずかに効果が増強された。また、市販の改良型 80%EtOH 製剤は 8 型に対して高い抗アデノウイルス効果が認められた。発表では、その他の有機酸を用いた結果についても報告する。

Adenovirus, Epidemic keratoconjunctivitis:EKC, Hypervariable region:HVRs

発表責任者：鈴木潤一（hg217003@thcu.ac.jp）

講演番号：3C2p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ 1 号館 C2 会場

病原細菌における tail-to-tail 遺伝子プロファイリング解析

Developing a method for tail-to-tail gene profiling in *Salmonella enterica*

北田 泰平[1]、谷川 敦也[1]、兼崎 友[2]、吉川 博文[2]、GROISMAN Eduardo[3]、○加藤 明宣[1]（[1]近大農、[2]東農大農、[3]Yale Univ.）
Taihei KITADA[1], Atsuya TANIGAWA[1], Yu KANESAKI[2], Hirofumi YOSHIKAWA[2], Eduardo GROISMAN[3], ○Akinori KATO[1]（[1]Kindai Univ., [2]Tokyo Univ. of Agric., [3]Yale Univ.）

【背景・目的】

細菌ゲノムでは、整然･密な ”オペロン群” の傍で、逆向きに隣接した tail-to-tail 遺伝子配座領域も頻繁に認められる。これは単に遺伝子のオペロン整列化と細菌ゲノムの小型効率化の副産物なのか。我々は、サルモネラ菌においてその解明に向けた tail-to-tail 遺伝子プロファイリング法（dsRNA 依存的リボゾームプロファイリング法）の開発を行っている。

サルモネラ菌において PmrA/PmrB 二成分制御系は、低 Mg^{2+}と Fe^{3+}に応答し、鉄およびポリミキシンへの耐性を付与する情報伝達機構である(1-3)。センサーPmrB は Fe^{3+}を感知すると PmrA を介し 29 aa ペプチド PmrR 等の発現を誘導する（4）。*pmrR* は *pmrCAB* と逆向きの tail-to-tail に配座する故 *pmrB* に対し直接的なフィードバック機能も示す可能性が考えられた。実際、*pmrR* promoter 変異株にて PmrB 量の上昇と、リボゾームレスキュー系(tmRNA)変異株で *pmrR* の転写に依存的な PmrB 新生鎖断片を検出した。本研究では、このフィードバック調節機構の解明とゲノムワイドな普遍化を目的とする。

【結果】

これまでの tail-to-tail 遺伝子プロファイリング法開発にて ver. 2 データでは、全リード中、帰属されたリードの割合は極めて低かったものの有意な結果を得た。ver. 3 では、発現量の極めて低い膜タンパク質の PmrB の mRNA 上で初めて顕著な数のリボゾーム Footprint が検出された。また興味深いことに、*pmrR* mRNA からは PmrR と共に *pmrB* のアンチセンス側でも相当数の Footprint が検出された（この翻訳領域をサテライト ORFs と名付ける）。サテライト ORFs の翻訳が *pmrB* に対し波の干渉の様なパターンを示した。他の tail-to-tail 配座遺伝子の一部でも同様な ORF 及び特定のアミノ酸配列等がリボゾームの停滞に関与していることが示唆された。これらの結果に基づき、特に *pmrB* の *pmrR* によるもう一つのフィードバック調節機構として『1.内在性翻訳停滞→ 2. Polysome-gaps jamming → 3.リボゾームレスキューと新生鎖断片の分解』という、連続的なモデルを暫定的に提唱する。

1. Kato A, Groisman EA. Genes Dev., 18 2302-2313, (2004).
2. Kato A, Mitrophanov AV, Groisman EA. Proc Natl Acad Sci U S A., 104 12063-12068, (2007).
3. Kato A, Latifi T, Groisman EA. Proc Natl Acad Sci U S A., 100 4706-4711, (2003).
4. Kato A, Chen HD, Latify T, Groisman EA. Mol Cell., 47:897-908, (2012).

ribosome profiling, two-component system, feedback regulation

発表責任者：加藤明宣（kato_a@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：3C2p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ 1 号館 C2 会場

大腸菌のアデニル酸シクラーゼ遺伝子変異株の解析
Analysis of adenylate cyclase gene mutant in *E.coli*

○木村 茉実[1]、菅原 慶太[1]、佐藤 緋奈子[1]、早坂 俊亮[1]、小林 弘[2]、齋藤 浩美[2,4]、井原 邦夫[3]、浜本 晋[1,5]、魚住 信之[1]([1]東北大・院工、[2]千葉大・院薬、[3]名大・遺伝子実験施設、[4]現 帝京平成大・薬、[5]現 東大・生物工学セ)
○ Mami KIMURA[1], Keita SUGAWARA[1], Hinako SATO[1], Shunsuke HAYASAKA[1], Hiroshi KOBAYASHI[2], Hiromi SAITO[2,4], Kunio IHARA[3], Shin HAMAMOTO[1,5], Nobuyuki UOZUMI[1] ([1]Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., [2]Grad. Sch. Pharm., Chiba Univ., [3]Gene. Nagoya Univ., [4]Pres. Addr. Teikyo Heisei Univ., [5]Pres. Addr. BRC., Univ. Tokyo)

目的 高浸透圧・高塩環境耐性に関わる生体分子や情報伝達系に関する多くの研究報告がなされているが，未だにその全容は不明である．本研究グループにより，大腸菌におけるストレス適応機構の知見の獲得をめざして大腸菌変異株のスクリーニングを行ったところ、フロック形成の制御にかかわる細胞壁合成に関連した遺伝子と機械受容性チャネル遺伝子を同定した（日本農芸化学会 2017 年度大会，論文投稿中）．さらに変異株の検討をすすめたところ，情報伝達の上流で機能するセカンドメッセンジャーの cAMP の合成酵素遺伝子の変異株を新たに取得した．今回，この変異株の性質について検討を行った．

実験結果・考察 大腸菌株 Ymel をニトロソグアニジンで処理を行い，変異株の中から高濃度の塩化物イオン(Cl^-)条件下で生育が抑制された Cl^-感受性変異株 E10 を単離した．次世代 DNA シーケンサーを用いて，Ymel および E10 の全ゲノム配列の解析・比較を行ったところ，アミノ酸置換を生じる点変異が 56 個の遺伝子内で確認された．56 個の遺伝子の単一欠損株を用いて高濃度の Cl^-，Glu，Mannitol をそれぞれ含む培地で生育試験を行った結果，アデニル酸シクラーゼ合成遺伝子の欠損株である Δ*cyaA* ではいずれの条件下でも顕著に生育が抑制された．Δ*cyaA* をアミロイド線維やセルロースの染色試薬であるコンゴーレッドを含む培地で培養したところ，野生株とは異なり赤色の呈色は観察されなかったことから，*cyaA* が大腸菌のアミロイド線維形成を制御する可能性が示唆された．そこで，大腸菌の 4432 個の遺伝子のプラスミドライブラリーを用いて，塩ストレス条件下とアミロイド線維誘導的な条件下で，Δ*cyaA* のアミロイド線維形成能を相補する候補遺伝子の単離を試みた．その結果，*ΔcyaA* を赤色に相補させる遺伝子を複数個単離したため，アミロイド線維の主要サブユニットである CsgA を検出する CsgA 抗体を用いたウェスタンブロット法と走査型電子顕微鏡を用いたアミロイド線維の観察を行なったが，いずれの実験においてもアミロイド線維は観察されなかった。このことから，本実験において単離した候補遺伝子はアミロイド線維形成不全となる性質を相補することができないことが明らかになった．また，コンゴーレッドがアミロイド線維以外の生体分子を非特異的に染色することが示唆された．本実験で単離した遺伝子の中には，Δ*cyaA* に導入することで大腸菌の形態が球形になるものが SEM 観察によって見出された．これらの遺伝子を導入した野生株や各遺伝子の欠損株の形態は正常であったが，Δ*cyaA* への導入により形態異常が見られた．したがって，*cyaA* が大腸菌の形態も制御していることが示唆された．

E.coli, adenylate cyclase, amyloid

発表責任者：魚住信之（uozumi@biophy.che.tohoku.ac.jp）

講演番号：3C2p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ 1 号館 C2 会場

好気性光合成細菌 *Roseobacter denitrificans* における光合成制御と呼吸鎖の関係
Relationship between regulation of photosynthesis and respiratory chain in *Roseobacter denitrificans*

○山本 麻衣子、亀谷 将史、石井 正治、新井 博之（東大院農生科・応生工）
○Maiko YAMAMOTO, Masafumi KAMEYA, Masaharu ISHII, Hiroyuki ARAI (Tokyo Univ.)

【背景・目的】*Roseobacter denitrificans* OCh114 株は紅色非硫黄細菌の一種で、好気条件で酸素非発生型光合成を行う。近年、好気性光合成細菌は海洋表層微生物の最優占種であることが明らかとなり、地球規模の物質循環において重要な役割を果たしていることが示唆されている。好気性光合成細菌の環境中での優占化には、光合成や好気呼吸、脱窒などの多様なエネルギー代謝系を様々な環境の変化に応じて使い分けていることが重要であると考えられる。OCh114 株は光独立栄養的には生育できないことが知られており、本菌の生育には呼吸鎖による還元力の消費が必須である。そのため、本菌では光が当たると光合成と呼吸が同時に起こる複雑な電子伝達系が形成されていると考えられ、これら各種エネルギー代謝系がどのように関わり制御されているのかは興味深い。また、好気性光合成細菌の光合成関連遺伝子の発現は光により抑制されるというユニークな特徴をもつ。そこで、本研究では OCh114 株における呼吸鎖と光合成制御との関係を明らかにすることを目的として、(1)呼吸鎖阻害剤や脱共役剤の添加による光合成関連遺伝子の転写レベルの変動及び、(2)好気条件と嫌気条件での光照射による光合成関連遺伝子の転写レベルの変化を調べた。
【方法】(1) OCh114 株を好気・暗条件で対数増殖期まで培養し、末端酸化酵素の阻害剤である NaN_3 または脱共役剤である 2,4-ジニトロフェノール（DNP）を添加し、さらに 1 時間培養した。添加前と 1 時間後にそれぞれサンプリングを行い、total RNA を抽出し、qRT-PCR により光合成関連遺伝子の一つである *bchC* の転写レベルを測定した。(2) OCh114 株を好気・暗条件で対数増殖期まで培養し、その培養液をアルゴン置換した密封バイアル瓶と蓋を開放したバイアル瓶にそれぞれ移し、スターラーで撹拌しながら、30 分間青色光を照射しサンプリングした。
【結果】(1) NaN_3 を添加することで、*bchC* の転写レベルは 1.7～7.5 倍上昇した。一方、DNP の添加では *bchC* 転写レベルに変化は見られなかった。NaN_3 が光合成関連遺伝子のリプレッサーである PpsR に直接作用する可能性が考えられたため、ゲルシフトアッセイにより PpsR の DNA 結合能が NaN_3 によって阻害されるか確認した。NaN_3 を添加しても PpsR の DNA 結合能に変化は見られず、NaN_3 は PpsR に直接作用したのではないと考えられる。(2) 好気条件で青色光を照射したときは、*bchC* 転写レベルが 10 分の 1 以下に減少したのに対して、嫌気条件では照射前と同程度の転写レベルのままであった。DNP 添加では転写レベルに変化が見られず、NaN_3 添加や嫌気条件で変化が見られるという実験結果から、細胞の酸化還元状態が光合成制御に関わっていることが示唆された。

aerobic phototrophic bacteria, respiratory chain, photosynthesis

講演番号：3C2p05
講演日時：3 月 26 日 14:34～ 1 号館 C2 会場

炭素源飢餓における *Roseateles depolymerans* の光合成器官誘導と遺伝子転写産物量の変化
Changes in the *Roseateles depolymerans* transcriptome and induction of the photosynthetic apparatus under carbon-starvation

○陶山 哲志[1]、菅野 菜々子[2,4]、花田 智[2]、千原 康太郎[1,3]、松倉 智子[1]、野田 尚宏[1,3]（[1]産総研・バイオメディカル、[2]首都大・院・理、[3]早稲田大学・理工学術院、[4]中央水産研究所）
○Tetsushi SUYAMA[1], Nanako KANNO[2,4], Satoshi HANADA[2], Kotaro CHIHARA[1,3], Satoko MATSUKURA[1], Naohiro NODA[1,3] ([1]BRI, AIST, [2]Grad. Sch. Sci., Tokyo Met. Univ., [3]Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [4]NRIFS)

環境中で飢餓に陥ったとき別の方法でエネルギーを得られるならば、それは生残にとても有利に働くであろう。淡水環境に生息する絶対好気性細菌 *Roseateles depolymerans* は呼吸基質が欠乏すると増殖を止め光合成装置の de novo 合成を開始する[1]。紅色細菌の光合成関連遺伝子の発現制御に関しては *Rhodobacter capsulatus* の嫌気条件における RegA, RegB を介した転写促進や、好気条件における CrtJ による転写抑制、光に反応した HvrA による転写調節、*Rhodobacter sphaeroides* の AppA, PpsR を介した光・酸素のセンシングなどが知られているが、呼吸基質の濃度に反応する発現制御系に関してはほどんど知見が無い。そこで *R. depolymerans* の光合成関連遺伝子発現制御系に着目して炭素源飢餓に応答するメカニズムを明らかにすることを目的に研究を始めた。*R. depolymerans* が表現型としてバクテリオクロロフィル *a* やカロテノイド色素の蓄積を開始するのは呼吸基質を除いた培地に移してから 24 時間以降のことになるが、遺伝子発現の切り換えはもっと早い時期に起こると予想できた。本研究では呼吸基質を欠く培地に移して 30 分、1、3、6、および 24 時間後の各時点で回収した *R. depolymerans* の細胞から全 RNA を抽出し、トランスクリプトームの変化を解析した。
R. depolymerans の飢餓応答による転写産物の変化は速く、呼吸基質除去後 30 分の時点ですでに最も多様な転写産物の出現が見られた。発現割合の変化が大きかった遺伝子に着目すると、飢餓条件にさらす前と呼吸基質除去後 30 分の時点で観察されその後減少に転じた遺伝子転写産物の多くがリボゾーム蛋白や呼吸代謝に関わる酵素遺伝子、物質輸送系に関する遺伝子だったのに対し、*puf, puh, bch, crt* 等光合成関連遺伝子の転写産物が観察できるのは 6 および 24 時間後のことであった。また、飢餓条件により転写割合が増加した遺伝子のほとんどがこうした光合成関連遺伝子であった。*R. depolymerans* はゲノム上に 12 個の σ 因子と推定される遺伝子を持つが、これらの転写産物量も個々に異なる変化を示した。飢餓条件にさらす前と呼吸基質除去 30 分後には RpoD や σ 54 ファミリーの σ 因子の遺伝子転写産物が多く見られるが、呼吸基質除去 1 時間後以降に多く見られるのは RpoS, FliA 等をはじめとするそれ以前には見られない σ 因子遺伝子の転写産物であった。
今後はこれら σ 因子や飢餓応答への関与が推定される調節因子の遺伝子をノックアウトする実験を進めるとともに、各遺伝子オペロンの転写開始点を明らかにし、飢餓応答のキーになる因子を洗い出したいと考えている。

[1] Suyama T., et al. Appl. Environ. Microbiol. 68: 1665 -73.

starvation, transcriptome, photosynthesis

発表責任者：陶山哲志（t.suyama@aist.go.jp）

講演番号：3C2p06
講演日時：3 月 26 日 14:55～ 1 号館 C2 会場

真核微細藻類で同定された新規な水溶性アスタキサンチン結合タンパク質

A novel astaxanthin-binding aqueous carotenoprotein identified in eukaryotic microalgae.

○山崎 敬太[1]、宮田 彩実[1]、佐治 のどか[1]、豊島 拓樹[1]、川崎 信治[1,2] ([1]東農大バイオ、[2]東農大微生物)
○Keita YAMAZAKI[1], Ami MIYATA[1], Nodoka SAJI[1], Hiroki TOYOSHIMA[1], Shinji KAWASAKI[1,2] ([1]TUA bio., [2]TUA microbiol.)

【目的】光合成生物は、強光、高温、高塩濃度などの様々な環境ストレスが存在する過酷な環境下では、光酸化ストレスが発生するため生育が困難である。当研究グループでは、強光が伴う過酷な環境下から光合成微生物を単離し、新規なストレス耐性機構の発見を目指して研究を行ってきた。真夏のアスファルトから単離された真核微細藻類 *Coelastrella* sp. Ki-4 株は、強光を伴う過酷な環境ストレス下で菌体を赤色化させ、長期間生存する。この赤色化に着目し研究が行われ、光合成生物で類例のない水溶性カロテノイド結合タンパク質が精製され、アスタキサンチンを結合することから AstaP と命名された[1)]。本タンパク質は光酸化ストレスにより大量に発現誘導される塩基性の糖タンパク質であり、細胞表層のペリプラズムに局在し、一重項酸素消去活性をもつ。一方、現在までに Ki-4 株以外における類似タンパク質の報告例はない。前回の大会では真核微細藻類における AstaP ホモログの分布調査の結果を報告した。本学会では、AstaP に類似するタンパク質の分布が推定された微細藻類の単離株から、その同定と機能解析を行ったので報告する。

【方法・結果】系統解析から、Ki-4 株は *Scenedesmus* 属や *Coelastrella* 属と近縁であることが判明した。これらの近縁種や当研究グループにて過酷な生育環境から単離した真核の微細藻類を供試菌として用い、AstaP 類似タンパク質の探索と分布調査を行った。その結果、当研究室で単離した微細藻類株から類似するタンパク質の検出に成功し、完全精製に成功した。精製した水溶性カロテノイド結合タンパク質を PMF 解析に供し、cDNA ライブラリーに照合して一次配列の取得に成功した。精製タンパク質の諸性質を解析した結果、アスタキサンチンを結合し、かつ一次構造は類似するが、顕著に異なるタンパク質科学的な性質をもつことが判明した。

1）Kawasaki et al. Plant Cell Physiology,54(7) 1027-1040(2013).
2）宮田ら、日本農芸化学会(2017)

carotenoprotein, astaxanthin, singlet oxygen

講演番号：3C2p07
講演日時：3 月 26 日 15:06～ 1 号館 C2 会場

過酷な環境から単離された微細藻類の新規な光酸化ストレス防御機構の解析
A unique strategy for protecting against photooxidative stress in green microalgae isolated from severe growth environments.
○豊島 拓樹[1]、吉田 梨沙子[1]、佐保 好亮[1]、本多 秀行[1]、吉田 嵩史[1]、石毛 太一郎[2]、久保田 恵理[2]、高市 真一[3]、川崎 信治[1,3] ([1]東農大バイオ、[2]東農大ゲノム解析セ、[3]東農大微生物)
○Hiroki TOYOSHIMA[1], Risako Yoshida[1], Yoshiaki Saho[1], Hideyuki Honda[1], Takashi Yoshida[1], Taichiro Ishige[2], Eri Kubota[2], Shinichi Takaichi[3], Shinji Kawasaki[1,3] ([1]TUA Bio., [2]TUA Genome, [3]TUA Microbiol.)

【目的】一般の光合成生物は、強光を伴う高塩濃度や乾燥、低温などの環境ストレス下において、光酸化ストレスが発生し生育が困難になる。当研究チームでは過酷な環境に生息する光合成生物に新規な生命応答の存在を推定し、優れたストレス耐性能を有する微細藻類の単離を行ってきた。単離株の中で真夏のアスファルト表面から単離されたイカダモ科に属する真核微細藻類の *Coelastrella* sp. Ki-4 株は、強光が付随する環境ストレス下で藻体を赤色化し長期間生存した。この赤色化に着目して研究を進めた結果、真核光合成生物から初めて水溶性カロテノイド結合タンパク質が精製され、アスタキサンチンを結合することから AstaP と命名した[1)]。本タンパク質は原核生物のシアノバクテリアに分布するチラコイド膜表在性の水溶性カロテノイド結合タンパク質(OCP)とは異なり細胞表層に局在し、大量に存在することから、光合成生物では報告例のない強光防御機構への関与が推定された。一方、本タンパク質の発現は 24 時間以降に検出されることから、24 時間以内のストレス初期には本タンパク質に依存しない未同定の光酸化ストレス防御機構の存在が推定された。本学会ではストレス初期の光酸化ストレス防御機構について解析を行ったので報告する。
【方法・結果】光酸化ストレス条件下での生理解析を行った結果、Ki-4 株はストレス付与直後に低下する光合成活性を速やかに回復し、一週間にわたり光合成活性を維持しながら肥大化し、最終的には休眠細胞を形成する様子が観察された。ストレス応答初期の遺伝子発現変動を RNA-seq にて解析した結果、ストレス付与 3 時間後に *astaP* を含む遺伝子の協奏的な発現変動が開始され、発現が誘導される遺伝子群には機能未知遺伝子が多く含まれていた。一方、ストレス付与直後から 3 時間までの光合成活性の回復機構は未知であり、光合成解析とメタボローム解析を行うことで知見の獲得を行った。

1) Kawasaki et al. Plant Cell Physiology,54(7) 1027-1040(2013).
2) 豊島ら、2018 年度　日本農芸化学会

photooxidative stress, orange carotenoid protein, astaxanthin

講演番号：3C2p08
講演日時：3 月 26 日 15:17～ 1 号館 C2 会場

バクテリアに分布する水溶性アスタキサンチン結合タンパク質（AstaP）ホモログの機能解析
Characterization of water-soluble astaxanthin binding protein (AstaP) homologs found in bacteria
○大島 一輝[1]、加藤 聖子[1]、本間 薫[1]、内田 聖人[1]、久保田 恵理[3]、石毛 太一郎[3]、川崎 信治[1,2]([1]東農大バイオ、[2]東農大微生物、[3]東農大ゲノム解析セ)
○Kazuki OSHIMA[1], Shoko KATO[1], Kaoru HOMMA[1], Kiyoto UTIDA[1], Eri KUBOTA[3], Taitirou ISHIGE[3], Shinji KAWASAKI[1,2] ([1]TUA bio., [2]TUA microbiol., [3]TUA genome.)

【目的】光合成生物は、強光が付随する環境ストレス下において光酸化ストレスを発生し、生育が困難となる。我々は光合成生物の生育が困難と思われる真夏のアスファルトから、高い環境ストレス耐性能を有する真核微細藻類（*Coelastrella* sp. Ki-4 株）を単離した。Ki-4 株は強光が付随する環境ストレス付与時に、光合成生物では初めてとなる水溶性のカロテノイド結合タンパク質を同定し、アスタキサンチンを結合することからAstaP と命名した[1)]。本タンパク質の一次構造は、N 末端部分に細胞外輸送シグナルを有し、かつ Fasciclin ドメインを保持していた。データベース解析の結果、AstaP に高い相同性を持つホモログは全て機能未知タンパク質に分類され、真核の微細藻類に限らず、原核微生物の好熱菌やラン藻を中心に幅広く分布していた。ゲノム上に AstaP ホモログを保持する生物は全てカロテノイド合成能を保持することが観察され、原核微生物に分布する AstaP ホモログはカロテノイド代謝に関与することが強く推定された。そこで本学会では、原核生物に分布する機能未知の AstaP ホモログについて機能解析を行ったので報告する。

【方法・結果】AstaP ホモログの分布が観察された好熱菌 *Meiothermus ruber* やラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 株を初めとする供試菌に強光ストレスを付与したところ、いくつかの菌株で AstaP ホモログの顕著な発現誘導が観察された。また RNAseq 解析を行ったところ、全転写産物の中でも特に強く強光に誘導される光応答遺伝子であることが判明した。好熱菌の *M. ruber* が保持する AstaP ホモログの未知機能を解明するために AstaP ホモログ欠損株を作製した。また強光誘導メカニズムの解明を目的としてカロテノイド合成遺伝子群の強光誘導に関与する転写因子（LitR）の欠損株を作製した。現在、両遺伝子欠損株の生理解析を行い、機能解明を行っている。

1) Kawasaki et al. Plant Cell Physiology,54(7) 1027-1040(2013).

carotenoid, light response, gene expression

講演番号：3C2p09
講演日時：3 月 26 日 15:28～ 1 号館 C2 会場

紅藻ガルデリアの新規単離株と変異株の従属栄養応答の解析
Study on the responses to heterotrophic conditions in a unicellular red alga Galdieria.
○兼崎 友[1]、宮澤 和己[2]、向井 瑞梨[2]、重信 直人[2]、渡辺 智[2] ([1]静岡大グリーン研、[2]東農大生命)
○ Yu KANESAKI[1], Kazuki MIYAZAWA[2], Mizuna MUKAI[2], Naoto SHIGENOBU[2], Satoru WATANABE[2] ([1]Shizuoka Univ., [2]Tokyo Univ. of Agric.)

単細胞紅藻イデユコゴメ綱はシゾン、シアニジウム、ガルデリアの 3 属から成り、硫酸酸性温泉などの高温、強酸性、重金属イオン存在下という環境中に棲息する。しかし、細胞形態、ゲノム配列、分裂様式、栄養的分類など多くの点で、この 3 属は性質を異にしている。特にガルデリアは、グルコースを始めとする多様な糖や糖アルコールを資化することが可能で、糖存在下では従属栄養増殖を優先するが、その際に葉緑体が白化、縮退することが知られている。このような葉緑体の脱分化のメカニズムがどのように誕生したのかは未だ不明であるが、真核植物の系統樹の根元に近い生物群である紅藻は、こうした研究をおこなう上で良いモデル生物であると考えられる。

我々は、高温酸性温泉から新規単離した *Galdieria sulphuraria* SG 株について、従属栄養培養の可否などを調べた。一般的なガルデリアと同様に、SG 株もグルコースの添加により光照射下でも従属栄養増殖を優先し、かつ数日間で葉緑体が白化しクロロフィル含量が低下することを確認した。また一度白化した細胞は、グルコース消費後も 2 週間程度は白化状態を維持していた。RNA-seq 解析や RT-PCR により遺伝子発現レベルでの影響を調べたところ、グルコース添加後 3 時間でも色素体関連遺伝子の転写産物量が減少していた。このことはガルデリアの葉緑体の白化は、グルコース添加後の従属栄養応答として早急かつ積極的に始まることを示している。

さらに、我々はガルデリアのプレート培養中にグルコースを添加しても緑色を維持する突然変異株を単離した。野生株(SG 株)はグルコース消費後も長期間白化状態を保つが、この変異株ではグルコース添加後にクロロフィル量の一時的な減少は起こるが、グルコース消費後すぐに回復するため、葉緑体の脱分化は見られないことが分かった。この表現型の違いは電子顕微鏡解析からも確認できた。これら結果から野生株と変異株はグルコース消費後の細胞応答に違いがあると予想されたため、グルコース消費時点での遺伝子発現変化を RNA-seq 解析と RT-PCR により比較した。その結果、糖トランスポーターや糖代謝酵素などの転写産物において、野生株と変異株の表現型に対応した違いが見られた。また顕微鏡観察やメンブレンフィルターを用いた実験により、野生株と変異株では培養上清中の有機物の資化能に違いがあり、これが葉緑体の白化と密接に関わることを明らかにした。

これらの結果から、ガルデリアが資化可能な有機物あるいは糖代謝と関連する何らかの因子を検知して積極的かつフレキシブルに葉緑体の成熟レベルを制御していることが示された。

red algae, Galdieria, heterotrophic growth

発表責任者：兼崎友（kaneski.yuh@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3C2p10
講演日時：3 月 26 日 15:39～ 1 号館 C2 会場

遺伝子組み換えにより従属栄養増殖を可能にした単細胞紅藻シゾンの解析
Analysis of unicellular red algae *Cyanidioschyzon merolae* which enabled heterotrophic growth by transformation.
○向井 瑞梨[1]、兼崎 友[2]、宮澤 和己[1]、島田 尚弥[4]、池内 昌彦[4]、藤原 崇之[3]、宮城島 進也[3]、渡辺 智[1] ([1]東京農大、[2]静岡大・グリーン研、[3]遺伝研、[4]東京大学)
○ Mizuna MUKAI[1], Yu KANESAKI[2], Kazuki MIYAZAWA[1], Naoya SHIMADA[4], Masahiko IKEUCHI[4], Takayuki FUJIWARA[3], Shin-ya MIYAGISHIMA[3], Satoru WATANABE[1] ([1]Tokyo Univ. of Agric., [2]Shizuoka Univ. Research Institute og Green Science and Technology, [3]National Institute of Genetics, [4]Tokyo Univ.)

紅藻イデユコゴメ綱に属するガルデリア、シアニジウム、シゾンは単細胞性で、類似した環境中に棲息するが、細胞の形態・ゲノム配列の特徴・分裂形式・栄養学的分類など多くの点で異なっている。特にガルデリアは糖添加により従属栄養性を示し、その際に葉緑体が一週間程度で原色素体レベルまで脱分化することが知られている。一方、近縁属のシゾン、シアニジウムは完全光独立栄養性とされてきたが、近年シゾンでも高濃度のグリセロール添加で従属栄養増殖が可能なことが示された(Moriyama *et al.*, *Photosyn. Res.*, 2018)。シゾンではこのような条件下でクロロフィル量の減衰は起こるものの、葉緑体の白化や脱分化といった現象は確認されていない。この栄養的分類と葉緑体の分化能力の違いは、単に外来糖の取り込みができるか否かによるのか、それとも進化的に異なるのだろうか。シゾンの野生型では糖の取り込みによる葉緑体分化の観察が難しいため、我々はガルデリアで糖の取り込みに関わるトランスポーターSPT1 (Schilling and Oesterhelt, *Biochem. J.*, 2007)をシゾンに導入したSPT1 株を作製し研究をおこなった。

その結果、SPT1 株は低濃度のグルコースで従属栄養培養が可能であり植え継ぎも可能であることが明らかになった。また SPT1 株は暗所でグルコースなど数種類の糖で従属栄養性を示し、やはりクロロフィル量の減衰は見られたものの、葉緑体の白化や脱分化は観察されなかった。暗所でのグルコース添加暗所培養の初期にはフィコビリソームが高蓄積するが、植え継ぎをせずグルコースを追添加しながら暗所で培養を続けると徐々にフィコビリソームも減少していくことから、培地中の窒素がなくなった段階で蓄積したフィコビリソームを N 源として使用していると考えられる。グルコース添加/非添加、暗所での比較トランスクリプトーム解析の結果、グルコース添加時は暗所にもかかわらず光合成関連遺伝子の発現が増加することが明らかになった。また、グルコース添加・暗所培養 18 日の低温蛍光スペクトルを測定すると、明所培養時と比較して光化学系 I 由来の蛍光が減少していたが、光を受け取らない状態でも光合成能を完全には失っていないことが示唆された。このことから、シゾンの従属栄養応答はガルデリアのそれとは全く異なっており、短期間で葉緑体を脱分化するような機構は存在しない可能性が高いが、少なくとも糖を検知し応答する機構は存在すると示唆された。

environmental response, cell growth, cell differentiation

発表責任者：向井瑞梨（vx.starry@gmail.com）

講演番号：3C2p11
講演日時：3 月 26 日 16:00～ 1 号館 C2 会場

シアノバクテリア Synechocystis sp PCC 6803 における複製開始機構の解析
Analysis of replication initiation mechanism in Synechocystis sp PCC 6803
○山崎 脩平[1]、青柳 智大[1]、大林 龍胆[2]、松根 かおり[1]、兼崎 友[3]、渡辺 智[1] ([1]東農大農、[2]遺伝研、[3]静大グリーン研)
○ Shuhei YAMAZAKI[1], Tomohiro AOYAGI[1], Ryudo OHBAYASHI[2], Kaori MATSUNE[1], Yu KANESAKI[3], Satoru WATANABE[1] ([1]Tokyo Univ. of Agric., [2]National Institute of Genetics, [3]Reseach Institute of Green Science and Technology)

トランスポゾンやプラスミドは DNA 間、細胞間を移動する可動性遺伝因子（MGEs）である。MGEs は宿主に抗生物質耐性や病原性などの副次的な機能付与に関与する一方で、宿主の生存に必須な役割を担う例も報告されている。DnaA はバクテリアの DNA 複製開始に必須であるが、大腸菌において DnaA を欠損すると内在性プラスミドやファージが染色体にインテグレーションし、複製開始機能を代替する(Lindahl et al., 1971; Louarn et al., 1982)。

淡水性のシアノバクテリアは細胞あたり複数コピーの染色体を有している。これまでの研究からシアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942（以下、S.7942）においても DnaA は大腸菌同様に必須であること、DnaA 欠損株では内在性プラスミドが染色体にインテグレーションし複製開始を代替することが示された（Ohbayashi et al., 2016)。その一方で別種のシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803（以下、S. 6803）では DnaA は必須ではなく、S. 6803 の複製開始機構は未解明であった。

S.6803 の複製開始機構の解明を目的とし、S.6803 における複製活性を S. 7942 と比較した。複製活性はチミジンアナログである 5-bromo-2'-deoxyiridin（BrdU）を用い、抗 BrdU 抗体を用いたイムノブロットにより複製活性を評価した。その結果、転写阻害剤である Rifampicin（Rif)を添加した際に S.7942 と S.6803 の複製活性に大きな違いが確認された。S.7942 は Rif 添加で複製活性が減少する一方で S.6803 における複製活性は Rif 添加により増加した。この結果より、S.7942 の複製開始には新規の遺伝子発現が必須であるが、S.6803 では新規遺伝子発現は必要がないことが分かった。さらに S.6803 染色体の複製開始点の同定を試みた。S.6803 において BrdU ラベル DNA を免疫沈降により分離し NGS でシーケンスを行った。得られた配列を S.6803 のゲノム配列にマッピングした結果、S.6803 ゲノム上の 40 以上の領域から BrdU 陽性シグナルが検出された。また BrdU 陽性シグナルが検出された領域のほぼ全てにトランスポゾン遺伝子（*tnp*）が存在した。S.6803 は主染色体のほかに 4 つの巨大プラスミドを持ち、この主染色体とプラスミドの至るとことに 120 コピーのトランスポゾン遺伝子（tnp）が散在する。興味深いことに BrdU 陽性シグナルを示す領域において、*tnp* を介した染色体―プラスミド間の融合が起こっていることが示された。本発表ではこれらの結果と共に、S.6803 の複製開始メカニズムについて考察する。

DNA replication, transposon, plasmid integration

講演番号：3C2p12
講演日時：3 月 26 日 16:11～ 1 号館 C2 会場

シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 における RecA タンパク質の機能解析
Functional analysis of RecA protein in cyanobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803
○青柳 智大[1]、山崎 脩平[1]、栗原 亜実[1]、大林 龍胆[2]、兼崎 友[3]、渡辺 智[1] ([1]東京農大、[2]遺伝研、[3]静岡大・グリーン研)
○ Tomohiro AOYAGI[1], Syuhei YAMAZAKI[1], Ami KURIHARA[1], Ryudo OHBAYASHI[2], Yu KANESAKI[3], Satoru WATANABE[1] ([1]Tokyo University of Agric, [2]National Institute of Genetics, [3]Shizuoka Univ. Research Institute of Green Science and Technology)

RecA は ATP 依存的に DNA の相同組換えを行うタンパク質であり、損傷した DNA の修復において主要な役割を担っている。RecA ファミリーは原核生物において高度に保存されており、大腸菌において *recA* を始めとする SOS 応答遺伝子の発現は LexA リプレッサーによって厳密に制御される。UV 照射やマイトマイシン C (MMC)により DNA 損傷が引き起こされると RecA は LexA リプレッサーを分解し SOS 応答のレギュロンを誘導する。

酸素発生型の光合成を行う原核藻類であるシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803（以下、*S.* 6803）は細胞あたり複数コピーの染色体を有し、シングルコピー生物である大腸菌に比べ高い UV ストレス耐性を示す（Domain et al. 2004）。しかし、S. 6803 では UV 照射による *lexA*、*recA* の発現誘導は起こらず（Domain et al. 2004、Patterson-Fortin et al. 2006）、*lexA* を欠損させても SOS 遺伝子の発現には影響しないことが報告されている(Kizawa et al. 2017)。これらの知見からシアノバクテリア RecA は大腸菌とは異なる発現制御や役割をもつと考えられる。我々はシアノバクテリアにおける RecA の特異的な機能の解明、およびその応用を目指して研究を進めている。

まず *S.*6803 における RecA タンパク質の発現量について解析した結果、通常培養条件下においても RecA は高発現しており、これは光合成タンパク質である PsbB と同レベルであることが示された。また DNA 損傷を引き起こす MMC や H_2O_2 を添加した際の発現レベルを比較したところ、RecA の発現量は通常培養時と変わらず一定であった。*lexA* 部分破壊株においても RecA タンパク質量は変わらないことから *S.*6803 *recA* の制御は大腸菌とは異なることが示された。次に *recA* 遺伝子の破壊株を取得し、その生育を比較したところ、弱光条件では野生株と同程度であるのに対し、通常光条件では野生株に比べ生育が遅延した。RNA-seq 解析を行った結果、*recA* 破壊株は野生株と比較して酸化ストレス関連遺伝子の発現量が顕著に増加した。また、細胞内タンパク質の酸化度を示すカルボニル化を比較したところ、*recA* 破壊株は野生株に比べカルボニル化シグナルが強く検出された。光合成を行うシアノバクテリアの細胞内は Reactive Oxygen Species（ROS）が発生しやすく、シアノバクテリアは常に酸化ストレスに曝されている。シアノバクテリアは酸化ストレスや、それにより引き起こされる DNA 損傷から細胞を保護するために常に RecA の発現を高レベルに維持していると考えられる。

DNA repair, Stress response, DNA replication

発表責任者：青柳　智大（aoyagibaito@gmail.com）

講演番号：3C2p13
講演日時：3 月 26 日 16:22～ 1 号館 C2 会場

ヒト腸内細菌によるスクロースアナログ二糖の資化
Assimilation of sucrose analog disaccharides by enterobacteria.
○保坂 浩貴[1]、川村 茉唯[2]、平野 貴子[1,2]、袴田 航[1,2]、西尾 俊幸[1,2]([1]日大院生資科、[2]日大生資科・生命化)
○Hiroki HOSAKA[1], Mai KAWAMURA[2], Takako HIRANO[1,2], Wataru HAKAMATA[1,2], Toshiyuki NISHIO[1,2] ([1]Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon Univ., [2]Chem. and Life Sci., College of Bioresource Sciences. Nihon Univ.)

【目的】近年、様々な機能性を有するオリゴ糖が開発されており、それらは機能性オリゴ糖と呼ばれている。その殆どがグルコース、ガラクトース、フルクトースの 3 種類の単糖の組合せから構成されている。我々はこれらの単糖以外の糖を構成糖に有する機能性オリゴ糖の開発を目的とし研究を行っている。当研究室では、甘味料として利用されている食用オリゴ糖の一つであるスクロース(Fig.1A, Suc)のグルコース残基が様々な単糖へと置き換わったスクロース類似構造を有するオリゴ糖の合成と、それらのプレバイオティクス機能の評価を行っている。我々はこれまでに、*Aspergillus oryzae* や *Microbacterium saccharophilum* が生産する β-フルクトフラノシダーゼの糖転移作用を利用して、スクロースのグルコース残基がグルコサミン、*N*-アセチルグルコサミン、グルクロン酸、およびグルクロン酸アミドに置き換わったスクロサミン(Fig.1B, SucN)、*N*-アセチルスクロサミン(Fig.1C, SucNAc)、スクロン酸(Fig.1D, SucA)、およびスクロン酸アミド(Fig.1E, SucAm)の合成に成功した。現在、これら 4 種類のスクロースアナログ二糖の腸内細菌に対する増殖効果を評価している。本発表では、これまでに得られた結果について報告する。

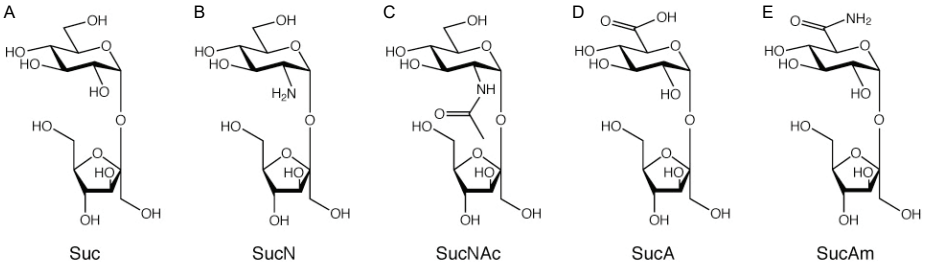


Fig.1 スクロースと酵素反応を利用したスクロース構造類似二糖

【方法・結果】ヒト腸内由来の各種の *Bifidobacterium* 属および *Lactobacillus* 属の細菌を培養後、96 ウェルプレートを用い、各オリゴ糖の終濃度が 30 mM になるように調節した MRS 培地にこれら菌を添加し培養を行った。菌体の増殖は、マルチプレートリーダーを用いて OD_{655} における培養液の濁度を測定し評価した。その結果、*Bifidobacterium* 属と *Lactobacillus* 属細菌は、全般的に各オリゴ糖に対する資化性はスクロースと比較して低かった。しかし、*B. pseudocatenulatum* は SucNAc で増殖し、*B. adolescentis* では SucAm で特異的に増殖していることが確認できた。また、*B. longum* subsp. *infantis* では、合成した全てのスクロースアナログ二糖を良く資化できることが確認できた。さらに、SucA に関しては乳酸菌を特異的に増殖させることが確認できた。このことから、オリゴ糖の資化には種による特異性があることが示唆された。また、従来のプレバイオテクスオリゴ糖にこのような選択的な資化能を有しているか確認したところ、このような特異性は確認できなかった。そのため、スクロースアナログ二糖には従来のプレバイオティクスとは異なる特徴を有していると考えられる。現在は、純粋培養ではなく混合培養での資化性試験を検討している。

Enterobacteria, Sucrose analog disaccharides, Growth effect

発表責任者：西尾　俊幸（nishio.toshiyuki@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3C2p14
講演日時：3 月 26 日 16:33～ 1 号館 C2 会場

次世代プロバイオティクス *Bacteroides* 属細菌による動物宿主由来粘液物質の資化と腸内優占性
Assimilation of animal host mucus by next-generation probiotics *Bacteroides* and its formation of dominant species in the gut

○佐藤 賢宏[1]、久門 知也[1]、梶川 幹太[2]、村田 幸作[3]、橋本 渉[1,2]（[1]京大院農、[2]京大農、[3]摂南大理工）
○ Masahiro SATO[1], Tomoya KUMON[1], Kanta KAJIKAWA[2], Kousaku MURATA[3], Wataru HASHIMOTO[1,2] ([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Fac. Agric., Kyoto Univ., [3]Fac. Sci. Eng., Sestunan Univ.)

【背景と目的】ある種の細菌は、動物宿主と相互作用する際、宿主細胞から分泌される粘液物質（グリコサミノグリカン（GAG）やムチン）を定着や分解のための標的とする。細菌による粘液物質の分解に関わる酵素はよく研究されており、当研究室でも常在細菌や病原細菌を対象に、GAG の断片化（多糖リアーゼ）、輸送（フォスフォトランスフェラーゼ系と ATP 結合カセットトランスポーター）、分解（不飽和グルクロニルヒドロラーゼ（UGL））、及び代謝（イソメラーゼとレダクターゼ）に機能する分子機構を明らかにしている。最近、メタゲノム解析により、腸内優占種である *Bacteroides* 属細菌由来 UGL 遺伝子を腸内細菌叢から高頻度に検出した[1)]。食事に依存せず、恒常的に宿主細胞から分泌される粘液物質は常在細菌の優れた栄養素であり、その資化性が常在細菌の優占性に関与すると考えられる。本研究では、一部の種で粘液物質資化性が示されている *Bacteroides* 属細菌を対象に、GAG とムチンに対する分解性と資化性を網羅的に評価し、本細菌群の腸内優占性の解明を目指した。
【方法と結果】*Bacteroides* 属細菌（30 種）は、理化学研究所バイオリソースセンターより購入した。粘液物質として、各種 GAG（ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、またはヘパリン）或いはブタ胃由来ムチンを用いた。GAG 分解性は、牛血清アルブミンと寒天培地を用いたハローアッセイにより評価した。各種 GAG やムチン資化性は、粘液物質を主要な炭素源とする最少培地での生育により決定した。その結果、30 種の *Bacteroides* 属細菌の過半数は、1-3 グリコシド結合を含むヒアルロン酸とコンドロイチン硫酸を良好に分解した。また、1-4 グリコシド結合のみからなるヘパリンに対して、約 8 種が分解性を示した。一方で、GAG 分解性がみられなかった細菌種でも GAG 資化性が認められ、19 種以上の *Bacteroides* 属細菌が GAG を資化した。また、ムチンに対しても過半数の *Bacteroides* 属細菌が資化性を示した。今回の解析で、GAG またはムチンに対して資化性を示す *Bacteroides* 属細菌種（*B. clarus* や *B. faecis* など 10 種以上）を新たに見出した。
【考察】本研究により、多種の *Bacteroides* 属細菌が動物宿主から分泌される粘液物質を栄養素として増殖することがわかり、この資化性が腸内に優占種として存在する要因の一つとして考えられる。このことは、多種の *Bacteroides* 属細菌のゲノムに GAG 断片化酵素（多糖リアーゼ）や分解酵素（UGL）、及びムチン糖鎖分解酵素がコードされていることからも支持される。最近、*Bacteroides* 属細菌の一部が次世代のプロバイオティクスとして評価されつつある。そのため、現在、メタゲノム解析と粘液物質最少培地での培養濾液の成分分析を進めている。

[1)] Kawai *et al. Sci. Rep.*, **8(1)**, 10674 (2018).

Bacteroides, glycosaminoglycan, mucin

発表責任者：橋本　渉（whasimot@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3C2p15
講演日時：3 月 26 日 16:44～ 1 号館 C2 会場

組織透明化法を用いたムーンライティングタンパク質の腸管付着因子としての解析方法の確立

A new approach for analyzing adhesive moonlighting proteins in the gastrointestinal tract using optical tissue clearing

○西山 啓太[1]、杉山 真言[2]、向井 孝夫[2]、岡田 信彦[1]([1]北里大薬、[2]北里大獣医)
○Keita NISHIYAMA[1], Makoto SUGIYAMA[2], Takao Mukai[2], Nobuhiko OKADA[1] ([1]Kitasato Univ., Sch. of Pharm., [2]Kitasato Univ., Sch. of Vet. Med.)

Moonlighting protein（ムーンライティングタンパク質）は，複数の役割をもつタンパク質の総称であり，腸内細菌の宿主共生において様々な役割をもつ。その多くは，細胞内で何らかの機能をもつ因子であるが，細胞外へと分泌され，宿主に対して相互作用することから，付着因子としての役割が注目されている。しかし，これらのタンパク質は，細菌の生育に必須であることが多く，腸管での付着過程においてどのような挙動を示すか，その実体は十分に明らかにされていない。このような背景のもと，本研究では，細菌の大きさを模した蛍光ビーズにムーンライティングタンパク質を固定し，マウス腸管におけるビーズの局在をフルクトースを用いた組織透明化法 SeeDB[1)]により形態的に評価する実験系を確立することを目的とした。

乳酸菌のムチン付着因子である Elongation factor Tu (EF-Tu)[2)]を大腸菌発現系により His-tag 融合タンパク質として精製した。次に，緑色蛍光ビーズ（直径 1.5 μm）のカルボキシ基を利用して，アミンカップリングにより EF-Tu を粒子表面に固定した。*In vitro* 評価系として，Caco-2 細胞に付着したビーズを，蛍光顕微鏡および走査型電子顕微鏡により観察した。また，*In vivo* 評価系として，C57BL/6 マウスにビーズを経口投与し継時的に腸管を採材した。続いて，全腸管を透明化処理した後，蛍光顕微鏡によりビーズの局在を観察した。

Caco-2 細胞に対する蛍光ビーズの付着性は，EF-Tu 固定化により顕著に増加した。次に，マウス腸管における蛍光ビーズの局在を観察したところ，投与後 1 時間では主に小腸に局在し，3 時間では大腸まで到達し腸全体に拡散した。そこで，投与後 1，3，24 時間の蛍光ビーズの局在を評価した結果，いずれの投与時間においても EF-Tu 固定化蛍光ビーズの強いシグナルが検出された。特に，投与後 24 時間では，腸管全体における EF-Tu 固定化ビーズの蛍光シグナルおよび粒子数は，未固定ビーズと比較し顕著に高いことから，EF-Tu の腸管付着因子としての役割が強く推察された。一方，ビーズの局在は，必ずしも腸粘膜だけではなく，腸内容物と共に移行する様子も明らかとなった。

以上より，マウス腸管を可視化し，ムーンライティングタンパク質を固定した蛍光ビーズの腸管での動態が評価可能な実験系を確立した。

[1)] Ke et al., *Nat. Neurosci.*, 16:1154-1161 (2013).
[2)] Nishiyama et al., PLoS One, 8:e83703 (2013).

colonization, moonlighting protein, optical tissue clearing

発表責任者：西山啓太（nishiyamkt@gmail.com）

講演番号：3C3a04
講演日時：3 月 26 日 09:33～ 1 号館 C3 会場

アザミサンゴ *Galaxea fascicularis* から単離した *Ruegeria* 属細菌の解析

Characterization of *Ruegeria* sp. isolated from the reef-building coral *Galaxea fascicularis*

○三浦 夏子[1]、岡田 圭以子[1]、元根 啓佑[2,3]、北村 瑠璃子[1]、高木 俊幸[4]、植田 充美[2]、片岡 道彦[1]
([1]阪府大院・生命環境、[2]京大院・農・応用生命、[3]日本学術振興会特別研究員、[4]東大大気海洋研)
○ Natsuko MIURA[1], Keiko OKADA[1], Keisuke MOTONE[2,3], Ruriko KITAMURA[1], Toshiyuki TAKAGI[4], Mitsuyoshi UEDA[2], Michihiko KATAOKA[1] ([1]Grad. Sch. Life & Environm. Sci., Osaka Prefecture Univ., [2]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [3]JSPS, [4]AORI, Univ. Tokyo)

【背景と目的】

グラム陰性細菌*Vibrio coralliilyticus*は、幅広いサンゴ種において温度依存的に強力な病原性を発揮することが知られている。近年、サンゴに共在する微生物の中に、サンゴの保護に資する微生物の存在が示唆された[1]。我々の先行研究においても、アザミサンゴ*Galaxea fascicularis*共在微生物のスクリーニングにより、*V. coralliilyticus*の生育阻止活性をもつ微生物（*Ruegeria* 属細菌）を単離・培養することに成功した[2]。本研究では、サンゴから単離した*Ruegeria*属細菌をプロバイオティクスとして用いることを目指して、① *V. coralliilyticus*の生育阻止活性をもつ物質の同定、②*Ruegeria*属細菌のサンゴ生態系における役割、の二点について明らかにすることを目的としている。

【方法と結果】

生理活性物質の単離に向けて、まず単離菌培養液の粗分画・活性測定を行ったところ、*Ruegeria* 属細菌の生産する生理活性物質は 10 kDa 以上の高分子物質であることが示唆された。生育阻止活性をもつ *Ruegeria* sp. TOK22 について、生理活性物質の精製を試みた。陰イオン交換カラム・ゲル濾過カラム等各種カラムを用いたクロマトグラフィーにより、生育阻止活性を示す画分の精製を行った。その結果、280 nm に吸光を示す目的の生理活性物質と思われる画分を得ることができた。そこで、生理活性物質の分子情報の取得を目指して、さらに大量の当該物質を精製するための検討を行った。また、既に公開されている *Ruegeria* 属細菌のゲノム情報をもとに、サンゴ共在細菌叢における *Ruegeria* 属細菌の生態について考察したので、結果をまとめて報告する。

[1] Bourne et al, *Annu Rev Microbiol* 2016:70:317-340. [2] Miura and Motone et al, *Marine Biotechnol* 2018 in press.

Coral-associated bacteria, *Vibrio coralliilyticus*, *Ruegeria* sp.

発表責任者：三浦夏子（miura.natsuko@biochem.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：3C3a05
講演日時：3 月 26 日 09:44～ 1 号館 C3 会場

サンゴに共在する *Ruegeria* 属細菌の分布調査を目的とした新規プライマーの設計

Design of novel primers aimed at investigating the distribution of coral-associated *Ruegeria* sp.

○北村 瑠璃子[1]、三浦 夏子[1]、岡田 圭以子[1]、元根 啓佑[2,3]、高木 俊幸[4]、植田 充美[2]、片岡 道彦[1] ([1]阪府大院・生命環境、[2]京大院・農・応用生命、[3]日本学術振興会特別研究員、[4]東大大気海洋研)
○Ruriko KITAMURA[1], Natsuko MIURA[1], Keiko OKADA[1], Keisuke MOTONE[2,3], Toshiyuki TAKAGI[4], Mitsuyoshi UEDA[2], Michihiko KATAOKA[1] ([1]Grad. Sch. Life & Environm. Sci., Osaka Prefecture Univ., [2]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [3]JSPS, [4]AORI, Univ. Tokyo)

【背景と目的】

海洋細菌 *Vibrio coralliilyticus* はサンゴの細菌性白化などの様々な病気を引き起こす日和見感染菌である。近年我々は、*V. coralliilyticus* に対して生育阻止活性をもつ *Ruegeria* 属細菌をアザミサンゴから単離した(1)。*Ruegeria* 属細菌は種内の多様性が大きく、いまだ詳細な分類がなされていない。また、*Ruegeria* 属細菌は海洋に広く分布していることが知られているが、具体的な分布状況は解明されていない。本研究では環境 DNA を用いて *Ruegeria* 属細菌の分布を調べることを目的としている。

【方法と結果】

まず、サンゴ病原菌である *V. coralliilyticus* に対して生育阻止活性をもつ *Ruegeria* 属細菌および、その他非標的海洋微生物の 16SrDNA 配列を取得した。GENETYX を用いてそれらの配列を比較し、相同性の低い領域をターゲットとして、*Ruegeria* 属細菌特異的プライマーを 362 セット設計した。次に、設計したプライマーについて *in sillico* PCR を行うことで、*Ruegeria* 属細菌のみに働くプライマーを 3 セット選択した。また、環境 DNA 内の菌体の有無を検証するために、16S universal プライマーを設計した。設計したこれらのプライマーの機能性を確認するために、*Escherichia coli*、*V. coralliilyticus*、*Ruegeria* 属細菌それぞれ 1 株ずつに対して PCR およびリアルタイム PCR を行ったところ、3 つの株は新しく設計した 16S universal プライマーで検出できた。また、*Ruegeria* 属細菌に対して設計したプライマーは、本菌株に特異的であることが示唆された。さらに、リアルタイム PCR を用いて設計した *Ruegeria* 属細菌特異的プライマーの検出限界を確認した。これらのプライマーを用いて、実際に採水した環境試料中に含まれる DNA の検出を試みたので、結果をまとめて報告する。

(1) Miura and Motone et al. *Marine Biotechnol.* in press.

Coral associated bacteria, *Ruegeria*, Environmental DNA

発表責任者：北村瑠璃子（szc02022@edu.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：3C3a06
講演日時：3 月 26 日 10:05～ 1 号館 C3 会場

森林土壌における樹木根分解に関与する真菌群集構造の解析
Analysis of fungal community structure related to tree root decomposition in forest soil
○石山 菜々子[1]、堀沢 栄[1]、酒井 佳美[2] ([1]高知工科大、[2]森林総研九州支所)
○Nanako ISHIYAMA[1], Sakae HORISAWA[1], Yoshimi SAKAI[2] ([1]Kochi Univ. of Tech., [2]Forest and Forest Product Res. Inst.)

立木の 2～3 割程度の体積を占めるとされる樹木根には、炭素養分の貯蔵機能や、根の支持力による山腹崩壊および土壌流出防止機能が期待されている。土壌に伸長した樹木根は枯死後も分解されるまではこれらの森林の多面的機能を持続する。しかし、これらの機能の持続期間や分解の環境要因などを示す研究成果はほとんどない。本研究では、土壌の深さ方向での樹木根の分解過程の解明の一端として、森林土壌での樹木根分解における土壌深さ別の真菌群集構造の探索を行った。

試料としてスギ（*Cryptomeria japonica*）を用い、直径幅 3cm、長さ 20cm の四割材と、加速試験として分解抵抗性の低いとみられる擬似材（粉体化木粉を成形）を使用した。これらの試料は全国 5 箇所（茨城：茨城県筑波山協同試験地、群馬：日本大学水上演習林、京都：京都大学フィールドセンター芦生研究林、熊本：森林総合研究所九州支所実験林、鹿児島：鹿児島大学高隈演習林）の地表（深さ 0cm)、地下（5-10cm、20-30cm）に 1 年間設置され、その後試料として引き上げられた。これらの試料をハンマーミルで粉砕し、ISOPLANTⅡ（ニッポンジーン）または QIAGEN Genomic-tip 20/G (QIAGEN) を用いて木材内部に存在する微生物体の DNA を抽出した。その後、MightyAmp DNA Polymerase (TaKaRa) を用い、真菌の検出のために、NS7-NL2 のプライマーペアで増幅し、その PCR 産物を鋳型として ITS1-ITS2 のプライマーペアで目的配列を増幅した。得られた PCR 産物を Miseq (ilumina)でシークエンスし塩基配列を決定し、BLAST データベースと照合することによって木材腐朽菌を同定した。

decomposition of tree roots, fungal community, wood rotting fungi

発表責任者：堀沢　栄（horisawa.sakae@kochi-tech.ac.jp）

講演番号：3C3a07
講演日時：3 月 26 日 10:16～ 1 号館 C3 会場

異なる土壌環境における根圏微生物叢の解析

Analysis of the rhizosphere microbiome in different soil environment

○浅見 綾香[1]、荒木 希和子[2]、久保 幹[2] ([1]立命館大学大学院、[2]立命館大学)
○Ayaka ASAMI[1], Kiwako S. ARAKI[2], Motoki KUBO[2] ([1]Rituemiakan Grad., [2]Ritsumei Univ.)

【背景・目的】 植物の生育は土壌環境と深く関連している。植物は根から養分や水を吸収して成長するため、植物の成長や生存は土壌環境の影響を大きく受ける。一方、植物は土壌環境に影響を与え、植物の根やその周辺には特有の微生物環境が形成される。植物の生育する土壌環境は、根内、根圏、非根圏土壌に分けられ、それぞれは異なる特徴を持っている。非根圏土壌と比較すると、根圏と根内の微生物の多様度は低く、特異的な微生物が集約している。特に、根圏微生物叢は植物から離脱した細胞や根からの分泌物などの影響、また植物の種類や遺伝子型に影響を受け、特定の菌種で構成されていることが明らかとなっている。しかし、植物の生育によって根圏に形成される微生物叢が、土質や施肥に伴う環境の違いにより、どのように影響を受ける解明されていない。本研究では、植物栽培土壌の微生物叢を階層的に解析することで、土壌環境や植物種による根圏微生物叢の変化が、植物成長に与える影響を明らかにすることを目的とした。
【方法】 土壌微生物叢を解析するために、有機肥料を施肥した土壌と化学土壌を施肥した土壌をワグネルポットに入れ、コマツナ、シュンギク、モロヘイヤを植物栽培室で 4 週間栽培した。植物の主根から 1～2 cm の範囲の土壌を植物栽培土壌、根に付着した土壌を水中分画法で分離したものを根圏土壌とした。根圏を取り除いた根は表面殺菌を行った。これらから DNA を抽出し、16S rRNA を標的とした PCR-DGGE 分析を行い、それぞれの菌叢を解析した。また、PCR-DGGE 分析によって分離したバンドの中で特徴的なバンドを切り出し、シークエンス解析を行い、栽培土壌、根圏、根内で特異的に存在する菌種を特定した。
【結果・考察】 植物栽培土壌について、総細菌数を測定した結果、有機土壌では高い総細菌数（4.3×10^8 cells/g-soil）を示したが、化学土壌では検出限界（6.0×10^6 cells/g-soil）以下であった。PCR-DGGE 分析を行った結果、有機施肥を行った植物栽培土壌は、化学土壌と比較すると細菌の種数が多かった。一方、根圏土壌や根内では土壌環境により細菌の種数は異なったものの、栽培土壌と比較するとその差は小さかった。PCR-DGGE 分析のバンドパターンを比較すると、植物栽培土壌の菌叢は土壌環境によって大きく異なることが分かった。植物の生育には土壌環境によって違いが見られ、そのパターンは植物種によって異なった。それぞれの土壌環境における特定の菌種を特定し、植物成長と菌叢に対する土壌環境の影響について解析を進める予定である。

rhizosphere, microbiome, soil bacteria

講演番号：3C3a08
講演日時：3 月 26 日 10:27～ 1 号館 C3 会場

異なる土壌間における微生物集団の移植実験
Transplantation of microbiome between different soils
○加藤 広海、津田 雅孝、永田 裕二（東北大院生命）
○Hiromi KATO, Masataka Tsuda, Yuji Nagata (Tohoku Univ.)

【背景・目的】土壌は地球上で最も微生物多様性に富んだ環境であり、それら微生物菌叢は土壌機能の根幹を支えている。しかし、それら土壌菌叢の形成原理は、時空間的に唯一つしか存在しない自然環境サンプルでは解析しづらい。我々はこれまでに、土壌微生物集団を無菌土壌へと移植・定着させることで様々な集団レベルの解析を可能にする技術（土壌ノトバイオロジー）を畑土壌（褐色森林土）で検討し、(1)移植された微生物集団は、移植直後に大きな変動が起きるものの、約半年で元の土壌の菌叢構造に回復することがわかった。(2)この移植実験を並列して複数サンプル用意した結果、それら並列サンプル間では、移植直後の大きな変動においても、半年以降の安定型においても、極めて高い再現性を示した。これらの結果は、土壌のような複雑系であっても、物理・化学的因子（移植先の土壌環境）と生物学的因子（移植する微生物集団）が同一である限りは、菌叢形成プロセスは予想以上に determinative（決定論的）な現象であることを意味し、土壌においてもノトバイオロジー技術が充分に可能であることを示している。そこで本研究では、土壌ノトバイオロジー技術を土性の異なる他土壌へ適用し、土壌間において微生物群集と土壌環境をそれぞれ入れ替えて移植することにより、菌叢形成プロセスを規定する物理・化学的因子および生物学的因子を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果および考察】国内の代表的な土壌タイプである褐色森林土および黒ボク土は、腐植質やリン酸吸収係数、保水力、粒径分布等が大きく異なっている。さらに両土壌を連続的に繋ぐ環境を創出するために段階的な混合滅菌土壌を作成した。それぞれの滅菌土壌に、褐色森林土または黒ボク土から抽出した微生物集団を移植することで、新たに定着する微生物集団の生育や菌叢構造にどのような変化が起きるのかを経時的に観察した。その結果、両土壌ならびにその全ての混合土壌において、移植された微生物集団は良好に増殖し、半年以上菌密度を維持した。培養依存的解析では、黒ボク土の含有率が高いサンプルほど高い菌密度を示し、放線菌の占める割合が高くなる傾向が見られた。また、これらの傾向は移植する微生物集団には依らないことがわかった。さらに黒ボク土の滅菌土壌に移植された微生物集団は長期間経過しても、滅菌処理をしない生の黒ボク土の細菌叢構造を再構成できていないことが明らかとなり、黒ボク土細菌叢の復元には何らかの要素が必要である可能性が示された。現在、これらの細菌叢を次世代シーケンサーを用いた培養非依存的な方法で解析中である。

Soil, Microbiome, Transplantation

発表責任者：加藤広海（katee@ige.tohoku.ac.jp）

講演番号：3C3a09
講演日時：3 月 26 日 10:38～ 1 号館 C3 会場

エマルションドロップレットを用いた土壌微生物の培養

Culture of micro-organisms by emulsion droplet

○川島 万凜、村井 雄大、金 相元、森田 直樹、久原 哲、田代 康介（九大農）
○Marin Kawashima, Yuta Murai, Sangwan Kim, Naoki Morita, Satoru Kuhara, Kosuke Tashiro (Kyushu Univ. of Agric.)

地球上には膨大な数の微生物が存在し、物質循環など地球の生命環境調節において非常に重要な役割を担っている。しかし、我々が人工的に培養できる菌種は 1%以下と考えられており、大半の微生物は未知のままである。そこで、我々はエマルションドロップを用いた微生物培養法を構築してきた。エマルションドロップとは界面活性剤を用いて油中に微細な水滴を形成させたものであり、各ドロップレットが個々の培養系となる。我々はドロップレット培養を用いて土壌環境微生物を培養し、菌叢の比較を行うことで、ドロップレット培養の特性を検討した。

Droplet Generator (On-Chip Biotechnologies)を用いて、エマルションドロップを作成し、大腸菌や酵母などの様々な菌株、及び土壌から採取した土壌細菌の培養を行った。一定期間培養後、DNA を抽出し、16SrDNA 領域を対象として次世代シーケンサーのよって分析し、菌叢を解析した。

ドロップレット培養と従来の培養法において DNA の増加量を比較すると、従来の培養法では 48 時間後に急激に増加したが、ドロップレット培養では 7 日間を通して緩やかに増加した。また、従来の培養法では菌叢が大きく変化していたが、ドロップレット培養においては土壌の菌叢が比較的保存されていることが分かった。それぞれの OTU 数を比較すると、ドロップレット培養は従来の方法の約 2 倍であり、今まで培養できなかった菌種も培養できる可能性が示唆された。また、異なる培地で培養したサンプルを比較すると、異なる菌種が増殖することが判明し、現在様々な培養条件において、ドロップレットで培養される菌叢の違いを検討している。エマルションドロップを用いた培養法は様々な微生物を培養するのに有用であると考えられるが、ドロップレット内で菌を培養し続けると、培地成分が不足してくると推定され、長期間培養においては解決すべき課題である。

Droplet, Soil micro-organism, 16SrDNA

講演番号：3C3a10
講演日時：3 月 26 日 10:49～ 1 号館 C3 会場

難培養性細菌の培養における細胞外多糖の重要性

Effect of exopolysaccharide of culturable bacteria on growth of microbial dark matter

○高橋 紳八[1]、加藤 広海[1]、永田 裕二[1]、大塚 重人[2]、大坪 嘉行[1]、津田 雅孝[1] ([1]東北大学大学院生命科学研究科、[2]東京大学大学院農学生命科学研究科)
○Shinya TAKAHASHI[1], Hiromi KATO[1], Yuji NAGATA[1], Shigeto OTSUKA[2], Yoshiyuki OTSUBO[1], Masataka TSUDA[1] ([1]Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, [2]Graduate School of Agricultural and Life Sciences, Tokyo University)

【背景・目的】土壌中には 1 g あたり 10 の 9 乗以上の細菌が棲息しているが、この中で容易に培養可能な細菌は 1%にも満たないとされている。そのため土壌には未開拓の遺伝資源が多く眠っており、それらを得るために難培養性微生物の培養法の確立が求められている。我々はこれまでに、土壌から抽出した細菌叢を滅菌土壌に移植して細菌叢が再構成されているプロセスを、次世代シーケンサーによる長期間の菌叢モニタリングで明らかにしてきた。それにより、移植直後に増殖する易培養性細菌群とその後に増殖する難培養性細菌に一定の関係性を見出した。そこでこれら細菌間の相互作用に着目し、前期増殖グループの *Burkholderia* 属細菌株の細胞外多糖類を無機塩固体培地に添加することにより難培養性細菌株の分離に成功した。さらに 16S rRNA 遺伝子の解析により、本株が培養例が極めて少ないグループである *Verrucomicrobia* 門に属することが明らかとなった。興味深いことに、*Verrucomicrobia* 門細菌株は滅菌土壌に単独で接種した場合はその菌密度を維持できなかったが、*Burkholderia* 属細菌株と共培養することで増殖が可能になった。そこで本研究では、*Burkholderia* 属細菌株の細胞外多糖類が *Verrucomicrobia* 門細菌株の生育にどのような影響を与えるのかを調べた。
【方法・結果および考察】Biolog を用いた *Verrucomicrobia* 門細菌株の炭素源利用試験を行った結果、極めて不安定な活性ではあるものの、種々の単糖や二糖、三糖、多糖に対して利用能を示した。また当該株の無機塩液体培養の際に、*Burkholderia* 属細菌株から粗精製した細胞外多糖類を唯一の炭素源として添加すると、細胞増殖をサポートできることが明らかとなった。これらの結果は当該株が易培養性細菌の細胞外多糖類を炭素源とし増殖する可能性が示された。
また *Burkholderia* 属細菌株の細胞外多糖類の産生に関与する遺伝子を破壊したところ、産生能力が大幅に低下した株が取得できた。本破壊株を *Verrucomicrobia* 門細菌株と混合して土壌共培養を行った結果、*Verrucomicrobia* 門細菌株の増殖促進強度は、野生株として比較して有意差は得られなかったものの、1/10 程度にまで低下した。これらの結果より、易培養性の細胞外多糖類は、土壌環境で複雑な細菌間ネットワークが形成される際の重要な要素になり得ると考えられる。

Exopolysaccharide, Microbial dark matter, soil

発表責任者：高橋紳八（sinnyauv@ige.tohoku.ac.jp）

講演番号：3C3a11
講演日時：3 月 26 日 11:10～ 1 号館 C3 会場

細菌間の接近と拡散が有機塩素系殺虫剤の分解コミュニティに与える影響
Effect of directional swarming activity of non-degrading bacteria on an organochlorine pesticide-degrading community
○羽賀 千晃、加藤 広海、大坪 嘉行、津田 雅孝、永田 裕二（東北大学大学院生命科学研究科）
○Chiaki HAGA, Hiromi KATO, Yoshiyuki OTSUBO, Masataka TSUDA, Yuji NAGATA (Tohoku Univ. of Life sciences)

【背景・目的】有機塩素系殺虫剤γ-hexachlorocyclohexane (HCH)は難分解性の人工化合物であり、環境中での残留性が問題となっている。これまで HCH 分解細菌の研究は、分解能を有する単離菌の純粋培養を対象とした研究がほとんどであり、実際の汚染環境において分解細菌が他の細菌とどのように関わり合いながら分解能力を発揮するのかはわかっていない。我々は、これまでに HCH の分解菌 *Sphingobium* sp. TKS 株を純粋分離する過程で得られた分解細菌コミュニティに着目し、共在する非分解菌との関係性を調べてきた。その結果、固体培地表面において非分解菌 *Cupriavidus* sp. TKC 株が TKS 株のコロニーに向かって swarming する現象が見出され、非分解菌が積極的に分解菌とコミュニティを形成する可能性が示された。本研究では、当該 HCH 分解コミュニティの菌叢構造の安定性や、非分解菌の swarming が分解菌にどのような影響を与えるかを調べることを目的とした。
【方法・結果および考察】本コミュニティを HCH を唯一の炭素源とした培地で計 5 回の継代培養を行ったところ、HCH 分解速度は 3 倍程度上昇した。次世代シーケンサーによる菌叢解析の結果、継代による分解菌 TKS 株の優占化は 30%前後に止まり、安定して非分解菌が存在し続けることがわかった。また、TKS 株の HCH 分解関連遺伝子について、純粋培養状態とコミュニティ培養状態でのコピー数を比較した。その結果、TKS 株の HCH 初発代謝を担う脱塩化水素酵素 LinA 遺伝子保持率は、純粋培養状態よりもコミュニティ状態の方が高いことが示唆された。集団全体としての HCH 代謝活性強度の調節に非分解菌の存在が寄与している可能性が考えられる。一方、非分解菌の方向性 swarming 活性は、移動性に乏しい分解菌の棲息範囲の拡大に寄与する可能性がある。そこで TKC 株よりも高い swarming 活性を示す細菌株を土壌環境より分離し、分解菌 TKS 株と混合して HCH を含む寒天培地に接種した。その結果、培地表面上における TKS 株の生育範囲を 50 倍程度まで拡大し、HCH 分解によるクリアゾーンの拡大にも寄与した。以上の結果は、非分解菌の存在が汚染環境下におけるバイオレメディエーションの効率化を考える上で重要なファクターになり得ることを示している。

approach, community, swarming

発表責任者：羽賀 千晃（c.haga@ige.tohoku.ac.jp）

講演番号：3C3a12
講演日時：3 月 26 日 11:21～ 1 号館 C3 会場

空間的・代謝的な相互作用を介した細菌と真菌の新たな相利共生戦略
Bacterial-fungal mutualistic growth strategy via spatial and metabolic interactions

○久知良 桃花[1]、Gayan Abeysinghe[1]、桝尾 俊介[2,3]、萩原 大祐[2,3]、高谷 直樹[2,3]、野村 暢彦[2,3]、尾花 望[3,4]、竹下 典男[2,3] ([1]筑波大学大学院・生命環境科学研究科、[2]筑波大学・生命環境系、[3]筑波大学・微生物サステイナビリティ研究センター、[4]筑波大学・医学医療系・トランスボーダー医学研究センター)
○Momoka KUCHIRA[1], Gayan ABEYSINGHE[1], Shunsuke MASUO[2,3], Daisuke HAGIWARA[2,3], Naoki TAKAYA[2,3], Nobuhiko NOMURA[2,3], Nozomu OBANA[3,4], Norio TAKESHITA[2,3] ([1]Grad. Sch. of Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [3]MiCS, Univ. Tsukuba, [4]Transborder Medical Research Center, Fac. of Medicine, Univ. Tsukuba)

健康・食糧・環境に深く関わっている微生物複合体の理解と制御のため、同種・異種の微生物間の相互作用についての研究が注目を集めている。しかし、環境中の主要な微生物である糸状菌と細菌の相互作用に関する知見は限定的である。本研究では、糸状菌及びグラム陽性細菌のモデル生物である *Aspergillus nidulans* と *Bacillus subtilis* との共培養を対象に、糸状菌と細菌の物理的・化学的な相互作用について解析を行った。

両者を共培養することにより、それぞれの生育様式・遺伝子発現に与える影響について解析した。糸状菌用の固体最少培地上で共培養を行い、蛍光顕微鏡で観察を行ったところ、*B. subtilis* が *A. nidulans* の菌糸に沿って移動する様子が観察され、菌糸の伸長に伴って *B. subtilis* が存在空間を拡大していることが明らかとなった。*B. subtilis* のべん毛を欠損させた株を用いた実験では、そのような移動や増殖は観察されなかった。また、RNA-seq でのトランスクリプトーム解析により、共培養とそれぞれの単独培養における遺伝子発現を比較したところ、ビタミンの一種であるチアミンの生合成に関わる遺伝子群の発現が *B. subtilis* では上昇し、*A. nidulans* では低下していた。*A. nidulans* のチアミン合成欠損株（Δ *thiA*）は、チアミンを含まない培地で著しい生育阻害を示すが、*B. subtilis* との共培養によって *A. nidulans* Δ *thiA* の生育が回復した。*A. nidulans* Δ *thiA* の生育阻害は *B. subtilis* のチアミン合成欠損株との共培養によっては回復しなかった。このことは、*B. subtilis* が *A. nidulans* にチアミンを供給することを示している。*A. nidulans* Δ *thiA* の生育阻害は、*B. subtilis* べん毛欠損株との共培養によっても回復しなかった。

以上のことより、*B. subtilis* がべん毛を用いて *A. nidulans* の菌糸に沿って移動・増殖するという空間的相互作用と、*B. subtilis* が *A. nidulans* にチアミンを供給するという代謝的相互作用の両者によって、細菌・糸状菌複合体が生存空間と栄養を獲得するための新しい相利共生を生み出すことが明らかとなった。

bacterial-fungal interactions, mutualistic strategy, spatial niche and nutrient

講演番号：3C3a13
講演日時：3 月 26 日 11:32～ 1 号館 C3 会場

プラスミド NAH7 上の接合伝達における受容菌選択性決定因子の探索
Novel genetic elements regulating conjugation selectivity of plasmid NAH7 in multiple recipient candidates

○作田 郁子[1]、水口 千穂[1,2]、岸田 康平[3]、津田 雅孝[3]、岡田 憲典[1]、野尻 秀昭[1,2]（[1]東大・生物工学セ、[2]東大・微生物連携機構、[3]東北大院生命）
○Ayako SAKUDA[1], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1,2], Kouhei KISHIDA[3], Masataka TSUDA[3], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1,2] ([1]BRC, UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Tohoku Univ.)

【背景・目的】プラスミドの接合伝達は、受容菌に新規形質を付与するという特徴を持ち、その利用や制御の場としての実環境中のプラスミドの接合伝達様式を知ることは重要である。我々はこれまでに種々の細菌が混在する実環境中での接合伝達を想定し、異なる不和合性（incompatibility; Inc）群に属するプラスミドを用いて供与菌 1 種に対し受容菌が 2 種同時に存在する接合（1:2 接合）を行い、第 2 の受容菌候補の存在がプラスミドの接合伝達に及ぼす影響の評価を行ってきた。その過程で、IncP-9 群に属するプラスミド NAH7 について、*Pseudomonas putida* KT2440 株および *Pseudomonas resinovorans* CA10dm4 株を宿主とした 1:2 接合時に、同種への接合伝達が優先される現象を明らかにした（図左）[Sakuda et al., mSphere, in press]。本研究では、本現象を引き起こす原因因子の探索および同定を試みた。

【方法・結果】本現象の原因因子は供与菌、受容菌、プラスミド上のいずれにも存在し得るが、本研究ではプラスミド由来の因子について、トランスポゾン（Tn）挿入変異株ライブラリーのスクリーニングにより探索を行った。NAH7 上でランダムに Tn が挿入された 260 株より、1:2 接合条件下で *P. putida* から *P. resinovorans* へ高頻度で接合伝達した NAH7::Tn 保持株を 8 株取得し、Tn の挿入位置を決定した。その結果、それぞれプラスミドの分配に関与する遺伝子やナフタレン分解遺伝子など、異なる領域に Tn が挿入されており、複数の領域の関与の可能性が示唆された。次に、NAH7 と同じ IncP-9 群に属し、同様の複製・分配の機構を有するプラスミド pWW0 を用いた接合実験を行った。1:1 接合および 1:2 接合条件下での 2 種の受容菌への接合伝達頻度（接合伝達体数／供与菌数）を比較した。その結果、NAH7 とは異なり、pWW0 は 1:2 接合条件下でも *P. putida* から 2 種の受容菌へ 1:1 接合時と同程度の割合で接合伝達した（図右）。NAH7 と pWW0 で挙動が異なることから、本現象は IncP-9 群プラスミドに共通して保存されている因子に起因するものではなく、NAH7 特異的な因子に由来する現象である可能性が示唆された。現在、NAH7 上の各 Tn 挿入領域の本現象への関与の有無を明らかにし、NAH7 に特異的な作用領域の絞り込みを行うため、NAH7 の破壊誘導体を用いた解析を行っている。

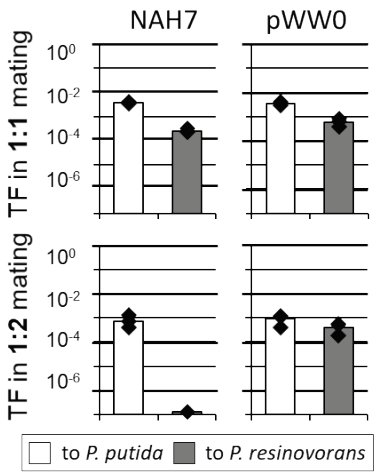


図. 各プラスミドの接合伝達頻度
P. putida を供与菌宿主として用いた。*P. putida* への接合伝達頻度を白、*P. resinovorans* への接合伝達頻度をグレーで示した。縦軸は接合伝達頻度 (Transfer frequency: TF) を表す。

horizontal gene transfer, plasmid, conjugation

発表責任者：野尻秀昭（anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3C3a14
講演日時：3 月 26 日 11:43～ 1 号館 C3 会場

Methylobacterium sp. ME121 株と *Kaistia* sp. 32K 株の共培養環境でのバイオフィルム形成に与える影響

Effect of biofilm formation of *Methylobacterium* sp. ME121 in co-culture with *Kaistia* sp. 32K

○薄井 祥明[1]、若林 佑[1]、清水 哲[2]、中村 顕[2]、伊藤 政博[1]([1]東洋大院 生命科学、[2]筑波大 生命環境)

○Yoshiaki USUI[1], Yuu WAKABAYASI[1], Tetsu SHIMIZU[2], Akira NAKAMURA[2], Masahiro ITO[1] ([1]Toyo Univ. Graduate School of Life Sciences, [2]Tsukuba Univ. Faculty of Life and Environmental Sciences)

【背景・目的】

自然界では微生物同士が互いに影響しあい生息していることが考えられる。本研究では、同一土壌サンプルから単離された *Methylobacterium* sp. ME121 株（ME121 株、運動性あり）と、*Kaistia* sp. 32K 株（32K 株、運動性なし）を使用してバイオフィルム形成について研究を行った。バイオフィルムとは微生物が形成する高次構造体のことを指す。これまでの研究成果から、ME121 株と 32K 株との共培養時と 32K 株を合成培地で培養して取得した 32K 株培養上清において、ME121 株の遊泳速度の向上が観察された。ME121 株の運動性向上には、32K 株培養上清中に含まれる 32K 株が生産する菌体外多糖類（Extracellular polysaccharide, EPS）が関係していると推察された。EPS はバイオフィルムの主成分であることから、本研究では ME121 株と 32K 株との共培養時や、他の細菌との共培養時のバイオフィルム形成への影響を調べることを目的とした。

【方法】

菌株は ME121 株、32K 株のほかに、コントロールとして *Methylobacterium radiotolerans*（Mr 株）と *Kaistia adipata*（Ka 株）を使用し、様々な組み合わせで共培養を行った。バイオフィルムは菌を 24 穴マイクロプレート中で培養することで形成させた。24 穴マイクロプレートの各ウェル内に入れた合成培地及び 32K 株培養上清に、前培養液を初期 OD_{600}＝0.01 となるよう植菌し、28℃、静置、48 時間の条件で培養した。バイオフィルム形成量はクリスタルバイオレット染色法を用いて評価した。

【結果・考察】

合成培地において、ME121 株はバイオフィルムを形成しないが、32K 株はバイオフィルムを形成した。ME121 株と 32K 株の共培養時には、バイオフィルム形成量の有意な増加が観察された。合成培地ではなく、32K 株の培養上清を用いて同様の実験を行った。32K 株培養上清を用いると合成培地ではバイオフィルムを形成しなかった ME121 株がバイオフィルムを形成した。これらの結果から、32K 株培養上清に含まれる生産物質によって ME121 株のバイオフィルム形成が促進され、共培養時にはより多量のバイオフィルムを形成しあうことが推察された。ME121 株と Ka 株の共培養時には各細菌の単独培養時と比較して有意なバイオフィルム形成量の増加が確認された。Mr 株と 32K 株の共培養時においてはバイオフィルム形成量の増加は観察されなかった。今後は共培養時に形成したバイオフィルム内の各菌体数の比率や形成メカニズムを、蛍光タンパク質を発現させることで明らかにする予定である。

Biofilm, Symbiosis, Co-culture

発表責任者：薄井 祥明（ysak4415@gmail.com）

講演番号：3C3a15
講演日時：3 月 26 日 11:54～ 1 号館 C3 会場

義歯表面ヌメリに関する細菌叢解析とヌメリ再構成の試み

Composition analysis of denture-surface bacterial community and the trial for reconstruction of denture biofilm

隅田 紗織[1]、濱田 昌子[2]、前田 晋吾[2]、五味 満裕[2]、柴田 健一郎[3]、○森川 正章[1]([1]北海道大・院環境、[2]小林製薬(株)中央研究所、[3]北海道大・院歯学)
Saori SUMITA[1], Masako HAMADA[2], Shingo MAEDA[2], Mitsuhiro GOMI[2], Ken-Ichiro SHIBATA[3], ○Masaaki MORIKAWA[1] ([1]Grad. Sch. Environ. Sci., Hokkaido Univ., [2]Central R&D Lab., Kobayashi Pharmaceutical Co., Ltd., [3]Grad. Sch. Dent. Med., Hokkaido Univ.)

【研究の背景と目的】高齢化が急速に進んでいる現代において、健康長寿は日本の安定な社会基盤のために重要な課題である。口腔内の健全な環境形成も健康維持のために貢献する技術の一つであり、高齢化に伴い年々増加傾向にある義歯装着患者に向けた清潔な義歯のケア方法が求められている。これまでに口腔細菌、特にう蝕や歯垢形成に関与する細菌群に対する研究報告例は多いが、義歯表面のヌメリを対象とした細菌群に関する情報はまだ十分に整備されていない。そこで本研究では、義歯表面ヌメリの菌叢解析とその主要構成菌群の諸特性解析およびヌメリ再構成の可能性について検討することを目的とした。
【方法と結果】歯科医院の協力を得て 10 名の上顎全部床義歯患者より、患者合意のもとで個人非特定検体試料（義歯の口蓋側および粘膜側ヌメリ）を ESwab（COPAN Diagnostics Inc.）により採取し、培養依存法と培養非依存法によって菌叢解析を行った。16S rRNA 遺伝子 V3/V4 領域の PCR 増幅断片に対する、網羅的 DNA 塩基配列解析データに基づいた培養非依存的菌叢解析からは、*Streptococcus* 属、*Veillonella* 属、*Actinomyces* 属、*Rothia* 属細菌群で全菌叢の６０％以上を占有していることが明らかとなった。また、口蓋側と粘膜側ヌメリには細菌群の構成に大きな違いは見られなかったことから、いずれもほぼ同様の嫌気的な環境になっていることが示唆された。さらに、これら 4 属の細菌群について種レベルで詳細解析を行った結果、歯垢を形成する細菌群とは異なる独自の種構成であることが分った。具体的には、*S. salivarius* と *S. sinensis*、*V. dispar* と *V. atypica*、*A. meyeri* と *A. graevenitzii*、*R. mucilaginosa* と *R. dentocariosa* がそれぞれの属の７０％程度以上（*Streptococcus* 属を除く）を占める主要細菌種であった。
一方、主要細菌種を対象とした各種平板培養を駆使した培養依存法からは、*S. salivarius*、*R. mucilaginosa* は単離に成功したが、偏性嫌気性細菌の２種 *V. dispar* および *A. meyeri* については単離できなかった。また、ヌメリを構成する真菌としては *Candica albicans* および *Candida krusei* を単離した。
以上の結果をもとに、義歯表面ヌメリの主要構成微生物として *S. salivarius*, *V. dispar*, *A. meyeri*, *R. mucilaginosa*, *C. albicans* を選定し、単独および複合ヌメリ形成能について評価を進めている。

denture biofilm, bacterial community, *Streptococcus salivarius*

発表責任者：森川正章（morikawa@ees.hokudai.ac.jp）

講演番号：3C3p01
講演日時：3 月 26 日 13:50～ 1 号館 C3 会場

トンボ糞由来細菌が産生する新規 C30 カロテノイド
Novel C30 carotenoid produced by fecal bacteria derived from dragonflies
○小柳 喬[1]、眞岡 孝至[2]、越野 雅人[1]、持永 彩花[1]、長尾 美帆[1]、新藤 一敏[3]、三沢 典彦[1]([1]石川県大、[2]生産開発研、[3]日本女子大・家政)
○Takashi KOYANAGI[1], Takashi MAOKA[2], Masato KOSHINO[1], Ayaka MOCHINAGA[1], Miho NAGAO[1], Kazutoshi SHINDO[3], Norihiko MISAWA[1] ([1]Ishikawa Pref. Univ., [2]Res. Inst. Prod. Dev., [3]Japan Women. Univ.)

＜目的＞
カロテノイドは動物、植物、微生物に広く分布し、その中でも Firmicutes 門に属するグラム陽性細菌においては、炭素数 30 の基本骨格を持つ C30 カロテノイドを合成する株が存在する。一般的な C40 カロテノイドが 700 種以上単離されているのに対して、C30 カロテノイドに関する報告数は乏しい。本研究ではこれまで発酵食品およびトンボの糞といったユニークな環境から分離した Firmicutes 門細菌群において新規な C30 カロテノイド産生株を複数見出している。本発表では、アキアカネ（赤とんぼ）糞に由来する *Kurthia* 属細菌が産生する新規カロテノイドの構造について報告する。
＜方法＞
アキアカネ（赤とんぼ）糞より分離した *Kurthia gibsonii* について計 170 L の大量培養を行い、得られた菌体からカロテノイドを抽出、UPLC、^{1}H-NMR、および質量分析による解析を実施した。また、ウスバキトンボ糞からも 6 種類の寒天培地 (ポテトデキストロース寒天、de Man, Rogosa, and Sharpe 寒天、Gifu Anaerobe Medium 寒天、トリプトソイ寒天、普通寒天、および標準寒天) を用いてカロテノイド産生株の分離を試みた。分離の際は、トンボより採取した糞を滅菌生理食塩水にて希釈のうえ、各寒天培地に塗抹し 30℃にて 3～5 日間培養、黄・赤変した集落を形成した株を純粋分離した。分離株について 16S リボソーム RNA 遺伝子 (16S rDNA) 塩基配列解析により菌種を同定した。また、アキアカネおよびウスバキトンボ糞について Illumina MiSeq によるメタ 16S 細菌叢解析を実施した。
＜結果および考察＞
アキアカネ糞由来 *K. gibsonii* T10 株について、紫外可視吸収スペクトル解析により 426, 453, 486 nm に吸収ピークを有する分子量の異なる 3 種類の化合物を産生していることを昨年度の本大会で報告した。本物質の構造決定を進めたところ、同一のカロテノイド骨格 (5,6-dihydro-4,4'-diapolycopene-5-ol) の 5 位にグルコースが結合し、さらにグルコースの 6'' 位に 3 種の鎖長の異なる脂肪酸がエステル結合した新規 C30 カロテノイドであることが判明した。また、アキアカネのみならずウスバキトンボの糞からも顕著な黄変集落を示した株として *K. gibsonii* が分離されたことから、本菌種がトンボ糞中に普遍的に存在する可能性が示唆された。一方、Illumina MiSeq による 16S rDNA 細菌叢解析においては、アキアカネおよびウスバキトンボ糞中において *Kurthia* 属細菌は主要菌種としては検出されなかった。

C30 carotenoid, Firmicutes, Kurthia

発表責任者：小柳喬（koyataka@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：3C3p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ 1 号館 C3 会場

地表下から分離した放線菌の特性解析

Physiological characterization of actinomycetes isolated from subsurface soils.

○北川 輝弥[1]、内田 牧歩[1]、濱渦 亮子[2]、保坂 毅[1,2] ([1]信州大農、[2]信州大バイオメディカル研)
○Teruya KITAGAWA[1], Makiho UCHIDA[1], Ryoko HAMAUZU[2], Takeshi HOSAKA[1,2] ([1]Fac. Agric., Shinshu Univ., [2]IBS-ICCER, Shinshu Univ.)

【背景】

地表下に棲む放線菌を分離し、それらの性質を調べたところ、地表よりも地表下の土壌から高い頻度で抗菌物質生産性の放線菌を取得できる新たな可能性を見出した。本発表では、その検討結果を詳しく報告する。

【方法】

信州大学農学部構内を含む計 6 地点において、地表及び地表下（最大で深さ 1 m）の土壌を採取した。風乾（室温で 2, 3 日間）及び熱処理（100℃, 30 分間）後、各土壌 10 mg をシクロヘキシミド（100 μg/mL）とナリジクス酸（15 μg/mL）を含む HV 寒天培地に移し、定法に従い土壌中の放線菌を出現させた*。可能な限りその全てを分離し、黄色ブドウ球菌と大腸菌を検定菌とした抗菌性試験に供することで、それら放線菌の抗菌物質生産能を評価した。

【結果・考察】

黄色ブドウ球菌と大腸菌のいずれかに効く抗菌物質を生産する放線菌が、地表よりも地表下 20 cm の土壌から多く分離されることを、検討した全 6 地点で確認できた。取得した抗菌物質生産性放線菌を延べ数で比較すると、地表土壌由来放線菌は 1371 菌株中 419 菌株（30.6%）であるのに対し、地表下 20 cm 土壌由来放線菌では 1156 菌株中 667 菌株（57.7%）であった。この傾向は黄色ブドウ球菌を検定菌とした抗菌性試験で顕著に認められたが、大腸菌のみに強い効果を示す抗菌物質を生産する特異な放線菌も地表下 20 cm の土壌から分離できた。なお、地表下 20 cm よりも深い土壌、例えば、地表下 50 cm や 1 m の土壌からは、抗菌物質生産性放線菌の分離数が激減することも判明した。

以上のように、抗菌物質の生産性を示す放線菌が地表下 20 cm の土壌中に多く存在し得ることを実験的に確認できた。今後は、多地点からの地表下土壌由来放線菌を、検定菌の種類を豊富にした抗菌性試験で評価し、そのことの真実性の実証と生物学的意義の解明を目指す。一方、今回の検討で大腸菌にのみ強い効果を示す放線菌を地表下 20 cm から分離できた。グラム陰性細菌に特異な抗菌物質の発見数は少ないとされている。地表下 20 cm の土壌がそのような抗菌物質を生産する放線菌の有用な探索源となり得るか否かも検証する予定である。

* 乙黒美彩. 生物工学会誌, 90(8):493-489 (2012).

actinomycetes, subsurface soils, antibacterial compounds

発表責任者：保坂 毅（thosaka@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3C3p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ 1 号館 C3 会場

Isolation and characterization of *Geobacter* species, potential drivers of reductive nitrogen transformation in paddy soils

○Zhenxing XU[1], Yoko Masuda[1], Hideomi Itoh[2], Keishi Senoo[1,3] ([1]The University of Tokyo, [2]AIST Hokkaido, [3]Collaborative Research Institute for Innovative Microbiology)

Paddy soil represents a unique ecosystem compared with other environmental conditions, because waterlogging and drainage revolved during rice cultivation. Reductive nitrogen transformation (nitrogen fixation, dissimilatory nitrate reduction to ammonia (DNRA), and denitrification) in paddy soil, driven by microorganisms, is important for sustainable rice production and environmental conservation. In our previous metatranscriptomic study of paddy soil in Japan, we found that most of gene transcripts involved in reductive nitrogen transformation (nitrogen fixation, dissimilatory nitrate reduction to ammonia (DNRA), and denitrification) were derived from the order *Deltaproteobacteria*, especially the genera *Geobacter* and *Anaeromyxobacter*, known as iron reducing bacteria. However, there has been no valid publication of *Geobacter* species isolated from paddy soil, and their ability of nitrogen transformations also has not been reported.

In this study, we successfully isolated 54 *Geobacter* strains from paddy soils collected in different fields in Japan using enrichment culture combined with spread plate method. Based on the 16S rRNA sequence similarities and phylogenetic analysis, the 54 *Geobacter* strains are separated into 4 groups, every group represents a novel species in the genus *Geobacter*. With the polyphasic taxonomy analysis, the 4 type strains were characterized as Gram-strain negative, strictly anaerobic, chemoheterotrophic and motile with peritrichous. Growth occurred in the range of temperature: 16-42 °C, pH: 5.5-8.5, NaCl concentration: 0-0.4%. Genome annotation indicated all of 4 type strains contain functional genes involved in nitrogen fixation (*nif*), DNRA (*nar, nrf*) and partial denitrification (*nar, nor*). In laboratory cultivation studies, the paddy soil-derived *Geobacter* strains showed nitrogen fixing activity and DNRA activity. These results indicate that the *Geobacter* strains could be drivers of nitrogen fixation and DNRA in paddy soils.

Characterization, *Geobacter*, Paddy soil

発表責任者：増田曜子（ygigico@gmail.com）

講演番号：3C3p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ 1 号館 C3 会場

淡水域底泥中からの新規硫酸還元磁性細菌の分離・培養

Isolation of novel sulfate-reducing magnetotactic bacteria from sediment of freshwater environment

○下重 裕一[1]、小林 英城[2]、島村 繁[2]、水木 徹[1]、井上 明[1]、前川 透[1]（[1]東洋大、[2]海洋研究開発機構）
○Hirokazu SHIMOSHIGE[1], Hideki KOBAYASHI[2], Shigeru SHIMAMURA[2], Toru MIZUKI[1], Akira INOUE[1], Toru MAEKAWA[1] ([1]Toyo Univ., [2]JAMSTEC)

磁性細菌は、鉄イオンを菌体内に取り込み、種特異的な形状のマグネタイト（Fe_3O_4）またはグレイガイド（Fe_3S_4）から成る磁性ナノ粒子を合成する。現在までに未培養を含む既知の磁性細菌は、アルファプロテオバクテリア綱、ガンマプロテオバクテリア綱、デルタプロテオバクテリア綱のプロテオバクテリア門、ニトロスピラ門および OP3 門に属することが報告されている。それらの微生物種の中でも、デルタプロテオバクテリア綱に属する磁性細菌は、特異的な形状の Fe_3O_4 ナノ粒子および Fe_3S_4 ナノ粒子を形成することで知られており、多種多様な菌種が確認されている。また、これらの菌種の多くは、嫌気条件下で有機酸等を電子供与体として利用し、硫酸還元で生育を行う。本研究では、淡水域の底泥から新規硫酸還元磁性細菌の培養および単離株の取得を試みた。

分離源は、主に埼玉県内の池、沼、湖および農業用水路等の淡水を含む底泥を用いた。硫酸還元で生じる硫化水素によって培地に含まれる鉄イオンの硫化鉄形成を抑えるために、電子供与体として低濃度の有機物を培地に添加して菌体濃度を減少させ、磁性粒子形成を促した。0.1 g/L フマル酸、ギ酸およびカザミノ酸をそれぞれ含む液体培地を 100%窒素ガスで置換して培養に用いた。淡水を含む底泥から磁気回収操作で濃縮した磁性細菌を各培地に植菌し、28℃、暗所で約 2 週間培養を行った。培養後、光学顕微鏡下でフェライト磁石を用いて走磁性反応を調べ、磁性細菌の生育の有無を確認した。単離操作は、磁気回収装置を用いて磁性細菌を濃縮し、限界希釈法で行った。

埼玉県内の池および沼から硫酸還元磁性細菌 FSS-1 株、FSO-1 株、FSO-2 株および FSO-3 株の取得に成功した。FSO-1 株、FSO-2 株および FSO-3 株は、ギ酸存在下で生育および磁性粒子形成が確認され、また FSS-1 株は、カザミノ酸存在下で生育および磁性粒子形成が確認された。16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく系統解析から、FSS-1 株、FSO-1 株および FSO-2 株は、最も近縁な *Desulfovibrio putealis* と 96.7%の相同性を示した。また FSO-3 株は、最も近縁な *D. magneticus* と 99.5%の相同性を示した。従って、FSS-1 株、FSO-1 株および FSO-2 株は、*Desulfovibrio* 属の新種であることが示唆され、FSO-3 株は、*D. magneticus* の別株であることが示唆された。*Desulfovibrio* 属の新種と推定された FSS-1 株においては、0.1 g/L カザミノ酸を含む液体培地で生育させたところ最終菌体濃度は約 2.5×10^5 cells/mL だったが、ほぼ全ての菌体で磁性粒子形成を確認できた。また同様の培養条件で生育させた FSS-1 株は、約 54 nm の Bullet 状 Fe_3O_4 ナノ粒子を菌体内に形成することが確認できた。

Sulfate-reducing magnetotactic bacteria, Bullet-shaped magnetite nanoparticles, Magnetotactic Deltaproteobacteria

発表責任者：下重裕一（shimoshige552@toyo.jp）

講演番号：3C3p05
講演日時：3 月 26 日 14:34～ 1 号館 C3 会場

Aureispira marina に見出されたセラミド様脂質の化学的性状
Chemical characterization of ceramide-like lipid found in *Aureispira marina*
○川原 一芳、大井 菜々子、吉浜 紘悠、飯田 博一（関東学院大）
○Kazuyoshi KAWAHARA, Nanako OI, Hiroyuki YOSHIHAMA, Hirokazu Iida (Kanto Gakuin Univ.)

【目的】*Aureispira marina* はタイ国の海から分離されたグラム陰性細菌で、滑走性を有し、菌体のリン脂質にアラキドン酸を含むという特徴を持っている [1)]。本菌はグラム陰性にもかかわらず、リポ多糖の特徴的脂肪酸である 3-ヒドロキシ脂肪酸をほとんど持たず、その代わりに大量の 2-ヒドロキシ脂肪酸（2-OH-$C_{17:0}$ および 2-OH-$C_{17:1}$、いずれも分岐鎖脂肪酸と推定）を有していることが我々の研究で明らかになった [2)]。これまでの研究で、この 2-ヒドロキシ脂肪酸を含む脂質はセラミド様脂質であることが推定されていたが、スフィンゴシンに相当する部分の構造が不明であった。そこで本研究ではこの脂質の化学的性状について検討した。
【実験方法】*A. marina* IAM 15389^T（JCM 23197^T）を人工海水培地で培養し、得られた菌体に含まれるセラミド様脂質をクロロホルム/メタノール混液で抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。脂質は ^{1}H-NMR、ガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリー（GC-MS）、および MALDI-TOF マススペクトロメトリー（MS）で分析した。二重結合への水素添加は触媒に白金黒を用いた接触還元法で行った。
【結果】セラミド様脂質を、他の細菌由来セラミドの分解に適した 1 M HCl/メタノール、100°C、5 hr の条件でメタノリシスしたところ、分解物が不均一となり構造が不明であった。一方、^{1}H-NMR の結果から、スフィンゴシン部分に二重結合の存在が示唆された。そこで、安定した分解物を得るために水素添加を行った。その結果、分子量が 6 あるいは 8 mu 増加したため、スフィンゴシン部分には二重結合が 3 つ存在すると推定された。水素添加後のメタノリシスで得られた脂質を MALDI-TOF MS で分析したところ、主要ピーク（m/z 316）とそれよりも 14 mu 小さい微弱なピークが検出された。この微弱なピークは市販の C_{18} ジヒドロスフィンゴシンの分析結果と一致した。これらの脂質を完全アセチル化し GC-MS 分析したところ、やはり主要ピークと微弱なピークが得られ、微弱なピークは完全アセチル化ジヒドロスフィンゴシンと、保持時間および EI マススペクトルが一致した。以上の結果から、メタノリシスで得られた脂質はそれぞれ C_{18} および C_{19} のジヒドロスフィンゴシンであると推定された。分岐鎖の有無と、元の脂質の二重結合の位置については今後検討する予定である。
1) Hosoya, S., et al., Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 56, 2931-2935, (2006)
2) 川原一芳、日本細菌学雑誌、69(1), 221, (2014)（第 87 回日本細菌学会総会演題要旨）

ceramide, sphingosine, *Aureispira marina*

発表責任者：川原一芳（kawahara@kanto-gakuin.ac.jp）

講演番号：3C3p06
講演日時：3 月 26 日 14:55～ 1 号館 C3 会場

ADACHI 酵母の単離と特性評価

Isolation and Characterization of ADACHI yeast

○榛葉 雄一、恩田 亘、野垣 祐子、夏目 亮（東京電機大学）
○Yuichi SHINBA, Wataru ONDA, yuko NOGAKI, Ryo NATSUME (Tokyo Denki Univ.)

＜背景・目的＞我々は、東京電機大学千住キャンパスが立地する足立区からオリジナルの酵母を単離すること、それを用いて食品を開発/製造することを目標として活動している。これまでに、足立区の自然環境からエタノール発酵性を示す酵母菌株を 18 株選択的に単離している。その内 4 株が *Saccharomyces cerevisiae* であった。今回は、*S. cerevisiae* の取得に至ったスクリーニングと現在取り組んでいる各株の特性解析について発表する。
＜方法・結果＞足立区内で草花や川水を採取し、試料に付着/含有している微生物をラフィノース液体培地で培養した。まず出芽酵母様形態の菌体が生育した試料を選別し、ラフィノース固体培地で菌株を単離した。続いてエタノール発酵に伴う二酸化炭素発生の有無とエタノールに対する耐性を検定して菌株を選別した。これら 3 段階のスクリーニングによって、候補株が 18 株得られた。26S rRNA gene の配列解析の結果、18 株すべてが発酵性を有する酵母であること、その内 4 株が *S. cerevisiae* であることが判った。その 4 株のうち、単離が先行していた S64 株, S362 株, S364 株の 3 株と市販酵母株の計 4 株について、エタノール存在下での増殖能力を検定した。エタノール濃度を 1 %ずつ高めたグルコース液体培地を用いた培養試験の結果、6 %まではどの菌株も良好な生育が認められた一方で、7 %では S64 株のみ生育が認められた。またこの 4 株を、グルコース、フルクトース、マルトースそれぞれを炭素源とした 3 種類の液体培地に植菌し、発酵が始まるまでの時間を比較した。その結果、S64 株、S364 株はグルコース培地での発酵開始が最も早かった。市販株、S362 株はフルクトース培地での発酵開始が最も早かった。いずれの株も、マルトース培地での発酵開始に最も時間がかかった。最も短時間に発酵が開始したのは、グルコース培地での S64 株であった。次に、上記 4 株と後から単離した S418 株の計 5 株について、グルコース液体培地で 1 週間培養し、24 h ごとに培養上清中のエタノール濃度とグルコース濃度を分析して、各菌株のエタノール発酵効率を比較した。グルコース 9 %培地においては全菌株が市販株と同等のエタノール発酵効率を示し、グルコース 10 %培地では、S64 株, S362 株が市販株と同等のエタノール発酵効率を示した。結果を総合すると、得られた 4 株のうち S64 株が最も優れた性能を有していると考えられる。今後は選別した菌株からキラー毒素非生産株を選別して発酵試験を行い、それらの菌株が生産する有機酸とアミノ酸の分析を行う計画である。将来的には、ビールやワインなどのアルコール飲料の製造や、パンなどの食品製造に活用したい。

yeast, Saccharomyces cerevisiae, brewing

発表責任者：夏目　亮（natsume@mail.dendai.ac.jp）

講演番号：3C3p07
講演日時：3 月 26 日 15:06～ 1 号館 C3 会場

乳酸菌におけるカフェインの影響

Isolation of caffeine tolerant lactic acid bacteria

○齊藤 可剛[1]、大野 恵理[1]、関 文巳[1]、水木 徹[3]、三浦 健[1,2] ([1]東洋大学・生命科学、[2]東洋大学・ライフイノベーション研究所、[3]東洋大学・バイオナノエレクトロニクス研究センター)
○Yoritaka SAITO[1], Eri ONO[1], Ayami SEKI[1], Toru MIZUKI[3], Takeshi MIURA[1,2] ([1]Faculty of Life Sciences, Toyo University, [2]Institute of Life Innovation Studies, Toyo University, [3]Bio-Nano Electronics Research Centre, Toyo University)

【背景・目的】

カフェインは様々な植物に存在し、それを原材料とするコーヒーや茶、チョコレートのような食品などに含まれる。過去の知見において、このカフェインには、大腸菌やその他病原菌に対して抗菌活性があることが示されている。一方で、乳酸菌などのヒトにとって有用な微生物に対しても、抗菌活性を有し、カフェインが含まれる食品を摂取することで、腸内細菌叢のバランスが崩れる恐れが考えられる。そこで、本研究は、乳酸菌（分譲菌）におけるカフェインの影響の観察、さらにカフェインに対して耐性を有する乳酸菌を単離し、その菌株におけるカフェインの影響を観察することを目的とした。

【結果】

まず、乳酸菌を、1.0%カフェイン含有 MRS 寒天培地に植菌し、その生育を観察したところ、ほとんどの乳酸菌は生育しにくくなった。次に、カフェインおよび炭酸カルシウム含有 MRS 寒天培地を用いてスクリーニングしたところ、ハローが生じたコロニーを 2 株獲得した。この 2 株は、*Lactobacillus paracasei* と同定された。実際に、単離菌株は、標準菌株 *L. paracasei* NBRC 15889 と比較したところ、カフェイン存在下でも明らかに生育が良く、カフェイン 2.0%の存在下でも生育した。また、蛍光色素である DAPI と PI を用いて菌体を染色し、フローサイトメーターにより測定した。その結果、取得したカフェイン耐性乳酸菌は、標準菌株に比べて、PI による染色が少なかった。

【考察】

乳酸菌において、カフェイン存在下では、生育が低下することが示された。一方自然界から、カフェイン耐性の乳酸菌を取得し、同定したところ、*L. paracasei* であった。このカフェイン耐性菌株は、標準菌株と比較して、カフェイン存在下でも生育が良かった。さらに、DAPI と PI で染色した場合、標準菌株は、カフェイン耐性菌株に比べて、PI で染色されていた。PI は損傷を受けた細胞膜を通過し、DNA に結合する染色物質である。PI でより染色されていた標準菌株のその細胞膜は、カフェイン耐性菌株に比べて、カフェインによる影響をより受けていたことが示唆された。このことから、カフェイン耐性乳酸菌株のカフェイン耐性は、標準菌株との菌体表面の違いにより生じていると考えられる。今後、細胞膜の脂質やタンパク質に注目し解析を行い、カフェイン耐性菌株のカフェインへの耐性機構を解明している。

Lactic acid bacteria, Caffeine, Isolation

発表責任者：齊藤　可剛（drosophila.melanogaster3413@gmail.com）

講演番号：3C3p08
講演日時：3 月 26 日 15:17～ 1 号館 C3 会場

国内産生乳から分離された *Lactobacillus delbrueckii* の遺伝的多様性の解析
Genetic diversity of *Lactobacillus delbrueckii* isolated from raw milk in Japan
○土橋 英恵、市川 愛弓、小泉 明子、竹田 麻理子、溝口 智奈弥、石田 達也、木村 勝紀（株式会社 明治 乳酸菌研究所）
○ Hanae TSUCHIHASHI, Ayumi ICHIKAWA, Akiko Koizumi, Mariko TAKEDA, Chinami MIZOGUCHI, Tatsuya ISHIDA, Katsunori KIMURA (Meiji Co., Ltd. Food Microbiology Research Laboratories)

【背景と目的】
欧州のチーズといった伝統的発酵乳において生乳由来の非スターター性乳酸菌（Non Starter Lactic Acid Bacteria）が発酵乳の製造および風味醸成に寄与することが知られている。特にチーズ製造においては、コマーシャルスターターを用いた製品の風味改良を目的に NSLAB がアジャンクトスターターとして用いられている[1)]。
日本には様々な伝統的発酵食品が存在するが、乳を用いたものは我々が知る限り存在しない。そのため、海外に比べて生乳から分離される乳酸菌の分類学的特徴についてほとんど研究されていない。
本研究では国内産生乳から様々な培地を用いて乳酸菌を分離・同定するとともに、発酵乳製造に多用される *Lactobacillus delbrueckii* について分類学的検討を行った結果について報告する。

【方法】
2009 年から 2015 年にかけて北海道産生乳から複数の培地を用いて乳酸菌およびその関連菌種を分離し、16S rRNA 遺伝子のシークエンスにより同定した。*L. delbrueckii* の亜種は Multilocus Sequence Typing 法[2)]を用いて同定した。

【結果】
北海道産生乳から 1495 株の乳酸菌およびその関連菌種を収集した。*Lactobacillus* 属は 968 株を占め、*L. delbrueckii* は 226 株分離された。*L. delbrueckii* の亜種を決定するため MLST 解析を行った結果、既報[2)]のとおり、大きく 5 つのクラスターに分かれ、生乳由来 *L. delbrueckii* sp. は *L. delbrueckii* subsp. *lactis* 基準株および *L. delbrueckii* subsp. *jakobsenii* 基準株が属するクラスターI に最も多く分類された。当該クラスターはさらにいくつかのサブクラスターに分かれ、そのうち、特定のサブクラスターに属する菌群は国内産生乳由来株の最優勢菌群である可能性が示唆された。

1）土橋英恵、ポスター発表、日本酪農科学シンポジウム、2014
2）Tanigawa K. *et al.* 2011

Lactic acid bacteria, *Lactobacillus delbrueckii*, raw milk

発表責任者：土橋英恵（hanae.tsuchihashi@meiji.com）

講演番号：3C3p09
講演日時：3 月 26 日 15:28～ 1 号館 C3 会場

Leuconostocaceae 科乳酸菌の進化学的研究
Genomics and evolution of the family *Leuconostocaceae*

○前野 慎太朗[1]、谷澤 靖洋[2]、有田 正規[2,3]、遠藤 明仁[1] ([1]東京農業大学 食香粧化学科、[2]国立遺伝学研究所 DDBJ 研究センター、[3]理化学研究所 環境資源科学研究センター)
○ SHINTARO MAENO[1], YASUHIRO TANIZAWA[2], MASANORI ARITA[2,3], AKIHITO ENDO[1] ([1]Department of Food, Aroma and Cosmetic Chemistry, Tokyo University of Agriculture, [2]Center for Information Biology, National Institute of Genetics, [3]Center for Sustainable Resource Science, Riken)

【背景と目的】

乳酸菌はサイレージや動物・昆虫の消化管、発酵乳などの乳製品といった様々な環境から見出される細菌であり、現在 *Lactobacillales* 目に分類される 6 科に属する全ての細菌が乳酸菌であると定義されている。その一群である *Leuconostocaceae* 科は現在 *Leuconostoc* 属、*Fructobacillus* 属、*Oenococcus* 属、*Weissella* 属、*Convivina* 属の 5 属に分類される。本科に属する細菌は多様な生理学的特徴を持つだけでなく、生息域もヒト腸内や植物環境をはじめとする様々な環境から見出されている。これまでに我々は、*Fructobacillus* 属と *Leuconostoc* 属の比較ゲノム解析により、*Fructobacillus* 属は糖代謝関連を中心とした代謝系をシンプルにすることで、フルクトース豊富な環境に適応する進化を行ってきたことを明らかにしてきた。その一方で、*Leuconostocaceae* 科全体で属単位の比較解析はされておらず、中でも *Oenococcus* 属はこれまでいくつかの単一の遺伝子レベルで進化のスピードについて論じられてきたが、ゲノム全体を用いた研究はなされてこなかった。そこで、本研究では比較ゲノム解析の手法から *Oenococcus* 属をはじめとする *Leuconostocaceae* 科に分類される乳酸菌が、ゲノムレベルでどのような進化を行ってきたのかを明らかにすることを目的とした。

【結果と考察】

本研究では、公開されている *Fructobacillus* 属 5 菌種、*Leuconostoc* 属 8 菌種、*Weissella* 属 13 菌種、*Oenococcus* 属 2 菌種、*Convivina* 属 1 菌種の合計 29 菌株のゲノムデータを取得し、比較解析を行った。まず、各属の特徴を遺伝子の機能に着目して解析したところ、*Convivina* 属は *Fructobacillus* 属と同様に糖代謝関連遺伝子を大きく欠損させていた。*Convivina* 属細菌は *Fructobacillus* 属と同様にハチ腸内から分離されており、この結果は *Fructobacillus* 属と似た環境適応を遂げた可能性を示唆している。次に、*Leuconostocaceae* 科における各属の特徴を見出すためにコアゲノム 362 個を決定し、それらを用いた系統樹の作成と各属の特異的遺伝子を決定した。その結果、*Leuconostocaceae* 科は 3 グループに分かれており、*Leuconostoc* 属と *Fructobacillus* 属、*Convivina* 属からなる *Leuconostoc* clade と *Weissella* 属からなる *Weissella* clade 及び *Oenococcus* 属のみからなる *Oenococcus* clade に分かれることが分かり、これら 3 つの clade に属する細菌は異なる方向に進化をしてきたことが示唆された。さらに clade 特異的遺伝子を詳細に解析したところ、*Oenococcus* clade は特異的遺伝子を 108 個有している一方で、47 個の特異的欠損遺伝子も見いだされた。この結果から、 *Oenococcus* clade は遺伝子の獲得・欠落の面からも、他の 2 つの clade とは異なる独自の進化を遂げていることが考えられた。

lactic acid bacteria, genomics, evolution

発表責任者：前野 慎太朗（47617002@nodai.ac.jp）

講演番号：3C3p10
講演日時：3 月 26 日 15:39～ 1 号館 C3 会場

Lactobacillus acetotolerans の菌体脂肪酸組成に対する培地酢酸濃度の影響

Effect of acetic acid concentration in cultivation media to the cellular fatty acid composition of *Lactobacillus acetotolerans*

○柴野 麻由、平塚 功尚、中山 俊一、門倉 利守、鈴木 健一朗 (東農大醸造)
○Mayu SHIBANO, Noritaka HIRATSUKA, Shunichi NAKAYAMA, Toshimori KADOKURA, Kenichiro SUZUKI (Dept. Ferment. Sci. , Tokyo Univ. of Agric.)

【目的】細菌の菌体脂肪酸は細胞膜の構成成分として細胞の構造と機能に重要な役割を果たしており、分子種の多様性から化学分類学的指標としても有効である。しかし、その機能の維持のため、培養条件による変動も知られている。*Lactobacillus acetotolerans* は、食酢醸造における有害乳酸菌であり、強い酢酸耐性を示す。しかし、そのストレス応答についての具体的な議論は少なく、要因や機構は明らかにされていない。そこで、一定量の酢酸塩を含む培地で培養した当該乳酸菌の菌体脂肪酸の組成変化に着目した。通常の MRS 培地で培養すると C16:0,C18:1, ΔC19:0 を主成分とする典型的な乳酸菌の菌体脂肪酸組成を示すが、5%酢酸塩を含む培地ではガスクロマトグラフィー(GC)分析において著量の未知のピークが現れることが分かった。本研究では、この未知ピークの物質の同定と、未知ピークが現れる条件について調べることを目的とした。

【方法】本手法は、MRS 培地および GYP 培地に 3,5,7%の酢酸塩を添加し、30℃で 14 日間静置培養した *L. acetotolerans* NRIC 0322^{T} を凍結乾燥し、MIDI 法にて菌体脂肪酸メチルエステルを調製した。これを GC で分析し、その組成を比較した。未知ピークの同定については、ガスクロマトグラフィー質量分析計(GC-MS)を用いた。また、薄層クロマトグラフィー(TLC)を用いて極性脂肪酸の存在を確認した。

【結果】MRS 培地では、3%以上の酢酸塩を添加すると未知のピークが全菌体脂肪酸の 53%を占めていた。GYP 培地では、酢酸塩を添加してもこの未知ピークは出現しないことが分かり、これらの培地成分に注目した。二つの培地成分の大きな違いは Tween 80 の濃度であったため、GYP 培地に MRS 培地と同濃度の 0.1% Tween 80 を添加して培養したところ、酢酸塩添加による未知のピークが確認された。このことから、酢酸塩による菌体脂肪酸の変動は Tween 80 の濃度が大きく影響していることが明らかになった。一方未知ピークの物質同定については、GC-MS のスペクトルのデータベース検索では 10-ヒドロキシヘキサデカン酸が近いとされ、GC での保持時間では 10-ヒドロキシオクタデカン酸と 12-ヒドロキシオクタデカン酸が最も近く、TLC 分析における極性を示すスポットの位置もそれを支持していた。このことから未知ピークはヒドロキシオクタデカン酸である可能性が高いと考えられた。

Lactobacillus acetotolerans, acetate tolerance, cellular fatty acid

講演番号：3C3p11
講演日時：3 月 26 日 16:00～ 1 号館 C3 会場

Isolation of Bacterial Strains From Compost with Biocontrol Ability Against *Burkholderia glumae* Infection in Rice

○ABINUBLI MAWARID, ZHENG YU, YASUTERU SAKAI, SUGIHIRO ANDO, HIDEKI TAKAHASHI, AKIRA YOKOTA, KEIETSU ABE, SHUHEI YABE (Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

[Objectives · Methods]

Burkholderia glumae causes seedling rot of rice, an increasingly prominent disease problem in global rice production. Our recent experiment showed adding 10% (w/w) of three types of compost from different raw materials produced by Hazaka system[1] on the soil in separate experiments for each could suppress the emergence of *B. glumae* infection on the rice seed significantly. There were possibilities that bacteria in these three types of compost can act as a biocontrol agent to protect the rice from the *B. glumae* infection. Herein, we isolated 30 bacterial strains from the three composts. Subsequently, we conducted *in vivo* assessment of biocontrol activity using *B. glumae* infected rice seeds; *in vitro* assessment for antimicrobial activity against *B. glumae*; and followed by performing quorum sensing inhibitory activity assessment using the isolated strains. Strains with high biocontrol activity were further subjected to 16S rRNA phylogenetic classification and their abundance in different stage of composting process was investigated by MiSeq sequencing.

[Results · Discussion]

As a result of the *in vivo* biocontrol experiment using *B. glumae* infected rice seeds, 7 out of the 30 (23.3%) isolated strains were confirmed to show strong biocontrol ability. However, *in vitro* assessment showed none of the 30 isolated strains were antimicrobial positive against *B. glumae*, whereas 11 strains were showing quorum sensing inhibitory positives that might prevent the *B. glumae* from produced virulence factor on rice seed. Further, strain Oono 8-d1 that was selected from the 11 quorum sensing inhibitory positive strains was related to *Chryseobacterium vietnamese* at 98.41% by 16S rRNA gene sequence analysis – indicating it as a novel species belonging to the genus *Chryseobacterium*. MiSeq analysis showed that genus *Chryseobacterium* was found as minor bacteria in the early stage (0%), middle stage (0.04%), and final stage (0.57%) of the composting process. This result suggested that the compost ability to suppress *B. glumae* infection on rice did not solely depend on *Chryseobacterium* activity but also on another bacterial strain in compost and it is further necessary to investigate the unidentified bacteria.

[Reference]

1. Pedro et al., JBB. 2001; 91: 159-165

Biocontrol, *Burkholderia glumae*, Compost

発表責任者：Shuhei Yabe（shuhei.yabe.b2@tohoku.ac.jp）

講演番号：3C3p12
講演日時：3 月 26 日 16:11～ 1 号館 C3 会場

日本国内で分離された野菜類病原性 *Pseudomonas* 属細菌における Quorum Sensing の多様性解析

Diversity of quorum-sensing system in vegetable pathogenic *Pseudomonas* species in Japan

○諸星 知広[1]、伊藤 雄大[1]、小笠原 祐斗[1]、謝 肖男[2]、染谷 信孝[3] ([1]宇大院工、[2]宇大バイオ、[3]農研機構)
○Tomohiro Morohoshi[1], Yudai Ito[1], Yuto Ogasawara[1], Xiaonan Xie[2], Nobutaka Someya[3] ([1]Grad. Sch. Eng., Utsunomiya Univ., [2]Bio. Sci. Cent., Utsunomiya Univ., [3]NARO)

【緒言】植物病原性グラム陰性細菌の多くは、アシル化ホモセリンラクトン（AHL）をシグナル物質とした Quorum Sensing により、病原性に関連する様々な遺伝子発現を制御することが報告されている。これらの病原菌の Quorum Sensing を阻害すると、病原性発現を効果的に抑制することが可能なことから、Quorum Sensing 阻害は新しい植物病防除技術への応用が期待されている。一般的な植物病原菌として知られる *Pseudomonas* 属細菌の多くは AHL を生産することが知られているが、*Pseudomonas* 属細菌は分類上も多種多様であるため、微生物株保存機関に登録された膨大な植物病原性 *Pseudomonas* 属細菌株における Quorum Sensing 機構の全体像は明らかになっていない。本研究では、農業生物資源ジーンバンクに保管されている日本国内で分離された野菜類病原性 *Pseudomonas* 属細菌株に着目し、AHL 生産を伴う Quorum Sensing の多様性を明らかにすることを目的とした。
【方法】農業生物資源ジーンバンクから野菜類に対する病原菌として登録されている *Pseudomonas* 属細菌を合計 488 株入手し、AHL レポーター株である *Chromobacterium violaceum* CV026 株及び VIR07 株とクロスストリークさせることにより AHL 生産を調査した。AHL 生産を示した菌株の培養上清から酢酸エチルにより AHL を抽出し、LC-MS/MS 解析により AHL の構造と生産比を決定した。AHL 合成遺伝子は特異的プライマーを用いた PCR により増幅し、塩基配列を決定して系統解析を行った。
【結果及び考察】*Pseudomonas cichorii*、*Pseudomonas marginalis*、*Pseudomonas viridiflava* を試験したところ、AHL 生産株は確認されなかったが、トマト茎壊疽細菌病菌 *Pseudomonas corrugata* として登録された全 21 株と *Pseudomonas syringae* の一部の菌株が AHL を生産することが明らかとなった。トマト茎壊疽細菌病菌が生産する AHL は、C6-HSL、C8-HSL、3-oxo-C6-HSL の 3 種類で構成され、C6-HSL が 80%以上を占めていた。また、AHL 合成遺伝子の塩基配列を決定し、翻訳後のアミノ酸配列を基に系統解析を行ったところ、3 つのサブグループに分類できることが明らかとなった。*P. syringae* の AHL 生産株はすべて病原型が pv. *lachrymans*、pv. *mellea*、pv. *tabaci* に分類される株であり、C6-HSL と 3-oxo-C6-HSL で 90%以上の割合を占めていた。また、病原型が pv. *maculicola*、pv. *solidagae*、pv. *tomato* に分類される一部の株は AHL レポーター株が検出可能な AHL 生産を示さなかったものの、AHL 合成遺伝子の相同配列を有していることが明らかになった。

quorum sensing, *N*-acylhomoserine lactone, *Pseudomonas*

講演番号：3C3p13
講演日時：3 月 26 日 16:22～ 1 号館 C3 会場

細胞性粘菌と植物寄生性線虫の化学コミュニケーションの解析

Chemical communication between the cellular slime molds and plant parasitic nematodes

○崔 智源[1]、齊藤 佑美子[2]、永松 ゆきこ[3]、齊藤 玉緒[1] ([1]上智大学・理工、[2]上智大院・理工、[3]パネフリ工業株式会社)
○Jiwon CHOI[1], Yumiko Saito[2], Yukiko Nagamatsu[3], Tamao Saito[1] ([1]Faculty of Science and Technology, Sophia Univ., [2]Graduate School of Science and Technology, Sophia Univ., [3]Panefri industrial co., Ltd)

【背景・目的】細胞性粘菌とは土壌中に広く生息している微生物であり、増殖期には単細胞状態で大腸菌などを餌として分裂をくり返している。しかし、周りに餌がなくなると集合を開始し、約 10 万個の単細胞アメーバからなる集合体を形成する。集合体はやがて移動体の形態を経て、柄と胞子の２種類の細胞からなる子実体を形成する。1996 年には線虫と細胞性粘菌は生態学的な関連があることが示されており(1)、実際、野外から細胞性粘菌を単離すると必ず線虫の混入がみられる。植物寄生性線虫も細胞性粘菌と同様に土壌中に生息し、植物の根に寄生することによって、毎年農作物に甚大な被害を与えている。我々は線虫の中でも植物寄生性線虫に着目し、細胞性粘菌とどのような相互作用を示すかを解析している。これまでの研究から植物寄生性線虫が細胞性粘菌の子実体そのものだけでなく子実体抽出物に対しても忌避行動を示したことから、細胞性粘菌由来の化学物質を用いて線虫と土壌中で生物間コミュニケーションをとっていることを明らかにした(2)。本研究では、忌避成分が発生のどの時期に作り出されているかについて検討を行っている。

【結果・考察】単細胞の細胞性粘菌を飢餓処理し、有機溶媒を用いて細胞から忌避活性を有する細胞抽出物を回収する。得られた抽出物を濾紙に染み込ませて風乾したのち、6 cm ゲルプレート上の端に置き、そこから 1.2 cm 離れた地点に線虫を播種した。16 時間後に線虫の歩いた跡を定量化し、忌避側と誘引側の足跡の量を割合で示した。先行研究により細胞性粘菌の子実体抽出物がネコブセンチュウに対して忌避行動を引き起こすことがわかっている。現在、子実体を形成するまでのどの段階において忌避成分をつくり始めるのかについての検討を行っている。これまでの研究から、忌避成分は当初予想していた子実体期よりもやや早い時期に忌避成分を作っていることが考えられた。

【引用文献】

1) Kessin RH *et al*., PNAS, 93(10):4857-61(1996)
2) Saito *et al*., PLOS ONE, 13(9):e0204671

Dictyostelium, plant parasitic nematodes, chemical communication

講演番号：3C3p14
講演日時：3 月 26 日 16:33～ 1 号館 C3 会場

細胞性粘菌と様々な植物寄生性線虫の相互作用の比較

Comparison of the interactions between cellular slime molds and various plant parasitic nematodes

梅山 拓也[1]、○鄭 明燮[2]、田川 拓哉[2]、齊藤 佑美子[2]、宮崎 早紀[2]、永松 ゆきこ[3]、齊藤 玉緒[1]([1]上智大院・理工、[2]上智大・理工、[3]パネフリ工業株式会社)

Takuya UMEYAMA[1], ○ Meyoungsep JUNG[2], Takuya TAGAWA[2], Yumiko SAITO[2], Saki MIYAZAKI[2], Yukiko NAGAMATSU[3], Tamao SAITO[1] ([1]Graduate School of Science and Technology, Sophia Univ., [2]Faculty of Science and Technology, Sophia Univ., [3]Panefri industrial co., Ltd)

【背景・目的】

土壌中に広く存在する微生物の一つである細胞性粘菌は通常単細胞アメーバとして生息し、餌のない飢餓状態になると単細胞が集合した多細胞体で柄と胞子からなる子実体を形成する。細胞性粘菌はこのような過程の中で様々な物質を分泌し、周辺の生物と共生し多様な生物間コミュニケーションをとっていることが知られている。細胞性粘菌と線虫の間には何らかのコミュニケーションがあることが想定されていた。本研究では、多様な土壌生物の中でも日本及び世界的に莫大な被害を与えている植物寄生性線を中心に細胞性粘菌とどのように生物間コミュニケーションをとっているかを解析した。

【方法】

細胞性粘菌の抽出物を染み込ませたあと溶媒を乾かした濾紙を直径が 6 cm のゲルプレートの末端に置き、濾紙から 1.2 cm 離れた場所に各線虫を乗せた。16 時間後のプレート上に残った線虫の足跡を画像解析プログラムで定量化し、各線虫が抽出物に対して誘引、忌避もしくはランダムに行動しているかの解析を行った。

【結果・考察】

細胞性粘菌の子実体を回収し抽出した細胞抽出物と各線虫を播種したプレートに残った痕跡を解析した結果、比較対象であった自活性線虫では抽出物の近くに行く誘引行動が引き起こされた。これは自活性線虫が細胞性粘菌の胞子の拡散の運び屋として働いていることを支持していると考えられる。一方、植物寄生性線虫に対しては、最重要種であるサツマイモネコブセンチュウ、キタネコブセンチュウなどでは抽出物を避ける忌避行動を引き起された。これまでのところ、検証した全ての植物寄生性線虫に対して必ずしも同じ行動を起こすといった結果は出なかった。このことはそれぞれの線虫は細胞性粘菌の細胞抽出物に対して異なった反応を示すということであり、忌避／誘引行動については種特異性を持っていることが示された。

Dictyostelium discoideum, Plant parasitic nematodes, Chemical communication

発表責任者：齊藤　玉緒（tasaito@sophia.ac.jp）

講演番号：3C4a02
講演日時：3 月 26 日 09:11～ 1 号館 C4 会場

NGS を用いた生菌微生物の検出方法の開発とその評価
Method for detecting viable bacteria in environment using NGS
○西山 依里、臼井 敦子、松平 崇弘、布藤 聡（株式会社ファスマック）
○Eri NISHIYAMA, Atsuko USUI, takahiro MATSUDAIRA, Satoshi FUTO (FASMAC Co., Ltd.)

これまでの微生物群集構造解析はNGS を利用した 16Sr RNA アンプリコン解析による環境中での微生物群集構造を明らかにする手法が主流となっている。しかしながら、これは生菌と死菌の両方が混合した群集構造解析であり、実際に生きている菌のみを捉えた解析ではない。近年、生菌を検出する手法が食品や医療の分野で大きく注目されている。本研究では生菌解析の手法として報告されている 2 つの手法（1. EMA および 2. cDNA 用いた方法）を用いて評価を行った。1. EMA による手法は修飾された死菌由来の DNA が PCR 増幅できない状態となることを利用して、生菌由来 DNA を選択的に検出する方法であり、主に定量 PCR の解析で使われているが、本手法が NGS に適用可能かどうか検証した。まず、大腸菌が優占した環境サンプルを作成し、このサンプルに対して熱処理して殺菌したサンプルと処理しない (生菌) サンプルを調整し、EMA 処理を行った。その後、各サンプルに対して、DNA 抽出を行い、16Sr RNA 遺伝子をターゲットしたアンプリコン解析を行った。これらの結果、EMA 処理をしていないサンプルに関してはライブラリーの DNA 濃度及び群集構造の両方の結果に差異が見られなかった。一方で EMA 処理したサンプルについては殺菌したサンプルのライブラリーの DNA 濃度は PCR 増幅が阻害をうけ、非常に低く、さらに群集構造解析では殺菌したサンプルでは大腸菌はほとんど検出されなかった。これは EMA によって死菌由来 DNA が不活性化され PCR の増幅が阻害されたことによるものであると考えられた。このことから EMA を用いた手法は生菌群集を解析することが可能であることが示された。2. cDNA 用いた方法は環境サンプル中の cDNA を解析することにより、活動している微生物を特定する方法であるが、ライブラリー作成の時に問題となるゲノム DNA のコンタミネーションなど RNA の品質に関して議論されている論文はほとんどない。そこで本研究では環境サンプルから RNA 抽出、精製処理、逆転写反応を行い、その操作過程で DNA および RNA 測定を行うことにより品質についても検証すると同時に逆転写を行っていないサンプルをネガティブコントロールとし、16Sr RNA 遺伝子を用いたアンプコンライブラリーの解析を行った。これらの結果、多くのサンプルに関して、精製処理を繰り返すことによって非常に良好な値となり、高品質な RNA の抽出及びライブラリーを調製することができた。また N.C.に関してはライブラリー濃度が検出限界以下となったことから、このターゲットの増幅がサンプル DNA の由来ではなく RNA の群集構造であること示された。本研究での検証により、これら両手法は DNA 群集構造解析では得られない実際の環境の生菌群集構造アプローチするための有効な方法であることが明らかとなった。

environmental microbiology, viable bacteria, NGS

発表責任者：西山依里（enishiyama@fasmac.co.jp）

講演番号：3C4a03
講演日時：3 月 26 日 09:22～ 1 号館 C4 会場

MutS 非依存型新規ミスマッチ修復機構の解析
Bacterial EndoMS/NucS acts as a clamp-mediated mismatch endonuclease to prevent asymmetric accumulation of replication errors

○竹本 訓彦[1]、沼田 格[2]、末次 正幸[2]、秋山 徹[1] ([1]国立国際医療研究センター、[2]立教大)
○Norihiko Takemoto[1], Itaru Numata[2], Masayuki Su'etsugu[2], Tohru Miyoshi-Akiyama[1] ([1]NCGM, [2]Rikkyo Univ.)

生物は、遺伝情報を次世代に忠実に伝達するため、DNA を複製し、維持する必要がある。このため、生物は正確な DNA 複製システムに加え、損傷 DNA やミスマッチなど、様々な DNA 異常認識・修復機構を備えている。DNA ミスマッチ修復は DNA 複製時の誤った塩基の取込みに起因するミスマッチを複製直後に修復する。ミスマッチ修復の中心的役割を担う *mutS*、*mutL* は大腸菌からヒトに至るまで広く保存されている。*mutS*、*mutL* 遺伝子機能欠損によるミスマッチ修復機構の破綻は、変異率の大幅な上昇を引き起こし、がん細胞の発生や細菌であれば薬剤耐性菌の発生につながる。一方で、一部の古細菌や放線菌門に属する細菌ではゲノム上に *mutS* の相同遺伝子が存在しない。にもかかわらず、放線菌門に属する細菌の変異率は MutS に依存したミスマッチ修復機構を備えた大腸菌と同程度に抑えられている。私たちは、これらの生物が *mutS*、*mutL* 依存的(従来型)ミスマッチ修復機構に代わる何らかの変異抑制システムを備えていると考え、研究を開始した。

放線菌門細菌において比較的よく保存されている遺伝子を探索し、*Corynebacterium glutamicum* を用いた解析から、*endoMS*/*nucS* 遺伝子が変異抑制に関わる事、ミスマッチ特異的 endonuclease(EndoMS)をコードする事を明らかにした。さらなる解析から、EndoMS が DNA polymerase の β-clamp と相互作用し、DNA 複製エラー修復に寄与する事を見出した。endoMS は mutS、mutL をゲノム上に持たない生物のほとんどに保存されている事から、EndoMS 依存的複製エラー修復機構が従来型ミスマッチ修復に代わる変異抑制システムであると考えられる。

EndoMS は切断できるミスマッチが限られており、その特異性は *endoMS* 遺伝子破壊により増加する変異の種類とうまくマッチしていた。従来型システムにおいて変異の認識を行う MutS は transition 変異の原因となる G/T, C/A のミスマッチの両方を認識し、修復へ導くのに対し、EndoMS は G/T のみを切断する。このことから、細胞内では G/T ミスマッチの発生頻度が高く、ミスマッチ修復の意義が G/T ミスマッチ除去なのではないかと考えている。このように、本研究では、マイナーな生物種が持つ新規ミスマッチ修復機構の解析から、ミスマッチ修復機構自体の生理的意義に迫る仮説を提唱することが出来た。

更に興味深いことに、EndoMS は *in vitro* ではミスマッチを含む二本鎖 DNA の両鎖を切断した。細胞内においても二本鎖切断を引き起こすのであれば、複製エラーによるミスマッチ→二本鎖切断→相同組換え修復という新たな経路が予想される。現在、この可能性について検証を進めている。

Actinobacteria, mismatch, mutation

発表責任者：竹本訓彦（ntakemoto@ri.ncgm.go.jp）

講演番号：3C4a04
講演日時：3 月 26 日 09:33～ 1 号館 C4 会場

大腸菌 DsbA のレドックスチューニングと構造機能解析

Redox-tuning of E. coli DsbA and Molecular Dynamic Simulation

○田村 隆、周藤 慎也、黒川 美保子、根本 理子、稲垣 賢二（岡山大院・環境生命）
○Takashi Tamura, Shinya Sutoh, Mihoko Kurokawa, Michiko Nemoto, Kenji Inagaki (Okayama Univ.)

【目的】細菌の運動性や付着に関わる鞭毛や繊毛，または遺伝子の水平伝播に関わる接合装置の構築には，細胞外に分泌したタンパク質に正確にジスルフィド架橋を形成する過程が必須である。大腸菌ペリプラズム空間で蛋白質にジスルフィド架橋を導入する DsbA は，活性中心に Cys-Pro-His-Cys の配列を持つ。DsbA は，強い酸化力を持つために高頻度に誤ったジスルフィド架橋を導入する。その修正にはマイルドな酸化能を持つジスルフィド異性化酵素 DsbC を必要とする。この酸化力の違いは，高度に保存された活性中心配列[CXXC]が決定すると考えられている。そこで，酸化還元電位のチューニングを目的として DsbA の XX ジペプチド配列にランダム変異を導入したライブラリを構築した。DsbA は F ピリ形成に必須なので M13 ファージ感染によるプラーク数を利用して DsbA[CXXC]変異ライブラリをスクリーニング評価した。【方法・結果】[CXXC]コンビナトリアル変異により 23 種類の変異遺伝子が得られた。これを *E. coli* JCB472(*F', dsbA*)に形質転換して力価 200 pfu の M13 を感染させてプラーク形成を定量した結果，野生型 DsbA よりも 40 倍以上多くのプラークを形成する DsbA[CDIC]が同定された。その酸化還元電位は-172 mV であり野生型 DsbA(-122 mV)よりもむしろ弱い酸化力を示した。しかし，これと同じ電位をもつ DsbA[CRIC]の活性は弱く，野生株よりも低いプラーク形成能を示した。他の変異型 DsbA[CXXC]も解析した結果，酸化還元電位と DsbA 細胞機能とは相関がないことが示された。酸化還元電位は低分子 L-Cys/L-シスチンとの平衡定数から算出されるのに対して，細胞内機能は高分子であるタンパク質をフォールディングする機能である点に着目して，変性 RNase を基質とする *in vitro* 活性を測定した結果，DsbA[CDIC]は，同じ電位を持つ DsbA[CRIC]や野生型 DsbA[CPHC]より高い触媒活性を示した。同じ酸化力を持つ DsbA[CDIC]/[CRIC]がなぜタンパク質に作用する際に，触媒能に差が発生するのか。ホモロジーモデリングと分子動力学計算による活性中心周辺の動的構造をシミュレーションした結果，DsbA[CDIC]では基質が結合する疎水的なキャビティ(=溝)構造が野生型や CRIC 型よりも容積，表面積ともに拡大しており，タンパク質に結合する疎水的なキャビティ空間が 2 倍程度向上していた。DsbA に導入した CXXC 変異は活性中心の酸化還元電位をチューニングする効果だけで無く，その周辺構造も変化させて基質となるタンパク質との相互作用にも影響することが示唆された。

DsbA, disulfide isomerase, redox potential

発表責任者：田村　隆（tktamura@okayama-u.ac.jp）

講演番号：3C4a05
講演日時：3 月 26 日 09:44～ 1 号館 C4 会場

放線菌 *Streptomyces vietnamensis* の生産するグラナチシンも有機触媒である
Granaticin produced by *Streptomyces vietnamensis* is also an organocatalyst.
○西山 辰也、榎本 成美、長安 伶奈、髙野 英晃、上田 賢志（日大生資科）
○Tatsuya NISHIYAMA, Narumi ENOMOTO, Reina NAGAYASU, Hideaki TAKANO, Kenji UEDA (Nihon Univ. College of Bioresource Sciences)

【背景・目的】
我々は、先行研究において放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2)の培養上清に L-アスコルビン酸および L-システインを酸化する触媒活性があることを発見した。さらに、本触媒活性は酵素ではなく本菌が分泌する二次代謝産物であるアクチノロージン(ACT)によるものであることを解明し、ACT が有機触媒（触媒作用を有する金属非含有の低分子有機化合物）としての活性を有することを証明した。
本研究は、他の放線菌の代謝産物の中にも有機触媒としての活性をもつものが存在することを明らかにすることを目的とする。特に、ACT がその生合成遺伝子クラスター中にコードされる分泌性のタンパク質と結合する性質を示すことに基づいて、ゲノムが解読されている放線菌の中からその遺伝子情報を基に探索を行った。

【方法・結果】
昨年度大会において、ACT と細胞外タンパク質とが相互作用することを、カラムクロマト並びに表面プラズモン共鳴装置を用いた解析結果をもとに発表した。そこで、本タンパクのホモログをコードする遺伝子を含むような抗生物質生合成遺伝子クラスターが他に存在しないかを検索したところ、複数の放線菌にその存在が見いだされた。そのうち、*Streptomyces vietnamensis* においては、グラナチシン（GRA)生合成遺伝子群として同定されているクラスター中に同ホモログ遺伝子が含まれていた。GRA は抗生物質として知られ、ACT と同様にキノン構造を有することから、酸化反応を触媒する活性を示す可能性が考えられた。そこで、*S. vietnamensis* を Bennett's/Maltose 液体培地で培養し、紫色を呈した植菌後 1 日の培養液の上清から HPLC 等で GRA を精製した。精製した GRA について、酸素電極や元素吸光光度計を用いた解析を行い、ACT 同様の酸化反応触媒活性を有するか、金属原子を含まないか検証した。その結果、単離精製した GRA は ACT と同程度の L-アスコルビン酸に対する酸化触媒活性を示すことが判明し、また金属原子が含まれていないことも判明した。これら一連の分析の結果から、GRA は微生物が生産する有機触媒分子の二例目であることが強く示唆された。

granaticin, organocatalyst

発表責任者：西山　辰也（nishiyama.tatsuya@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3C4a06
講演日時：3 月 26 日 10:05～ 1 号館 C4 会場

De novo メタトランスクリプトーム解析とメタボローム解析の併用による捕食性細菌群の代謝戦略の解明

Unique metabolic strategies of predatory bacteria revealed by combination of *de novo* metatranscriptomics and metabolomics

○佐藤 由也、稲葉 知大、堀 知行、羽部 浩 (産総研環境管理)
○Yuya SATO, Tomohiro INABA, Tomoyuki HORI, Hiroshi HABE (AIST EMRI)

【背景・目的】 捕食-被食関係は最も重要で普遍的な生物間相互作用であり、その作用が生態系の構造に大きく影響することが知られている。捕食者というと肉食動物等が一般的だが、細菌の中にも他の微生物を捕食するいわゆるプレデターが存在する。これまでに数十種類の捕食性細菌が見出され、被食細胞内部からの侵食など特徴的な捕食様式が明らかにされてきた。しかしそれら一連の研究は純粋培養された細菌を用いたものであり、彼ら捕食性細菌が環境中でどのように振る舞うのか―特にその代謝レベルでの生存戦略―は多くが未解明である。本研究では多様な微生物種を含む水処理微生物コミュニティ（活性汚泥）をモデル生態系として用い、参照ゲノム配列を用いない *de novo* メタトランスクリプトーム解析（RNA-seq)、メタボローム解析、微生物群集構造解析等のオミクス解析を駆使することで、複雑な微生物コミュニティにおける捕食性細菌群の代謝戦略の解明に挑んだ。

【結果・考察】 活性汚泥を栄養源非添加の飢餓条件で培養すると、微生物濃度が 12 日間で 22%減少し、微生物間捕食が活性化していることが示唆された。この期間に微生物群集構造解析を行ったところ、*Lysobacter* 属、*Myxococcales* 目、*Sphingobacteriales* 目の捕食性細菌および近縁種が優占化することが示された。RNA-seq では約 35 万種もの発現遺伝子が検出されたが、発現量を指標とする従来の評価手法によっては対象遺伝子が多すぎるために有効な解釈が得られなかった。そこで本研究では各遺伝子が「何種類の微生物によって発現されているか」という新しい指標による評価を試みた。これは、ある生態系で重要な代謝系は多くの微生物によって利用されているという想定に基づくものである。その結果、核酸、脂肪酸、タンパク質などの生体高分子の分解酵素や、その分解物を用いて TCA 回路等の中央代謝を駆動する代謝系が高活性化していることが示された。興味深いことに種々のアミノ酸の中でもグルタミン酸代謝酵素が特に高頻度に発現しており、グルタミン酸から TCA 回路構成物質である 2-オキソグルタル酸と呼吸基質である NADH を生成する経路が活性化していることがわかった。さらに、この代謝特性はメタボローム解析結果からも支持されており、栄養添加条件（対照区）では検出されない 2-オキソグルタル酸が、飢餓条件では細胞内に蓄積されることが示された。メタボロームデータによると、飢餓条件では核酸を分解することで糖（リボース）を獲得・利用していたことも示唆された。RNA-seq の結果も統合すると、飢餓条件では転写・翻訳・増殖等の活性を落とす一方、生体高分子を分解・資化する代謝系が高活性化しており、菌体や細胞残渣等の限られた基質を有効利用する、捕食性細菌の巧みな代謝戦略が明らかになった。

metatranscriptomics, predatory bacteria, microbial community

講演番号：3C4a07
講演日時：3 月 26 日 10:16～ 1 号館 C4 会場

Microbiological characterizations of kefir grown in cow milk and soy milk by high-throughput DNA sequencing

○Raul Ricardo GAMBA, Takashi Koyanagi, Toshiki Enomoto (Dep. Food Science, Ishikawa Prefectural Univ.)

Kefir is fermented beverage originated from Caucasus region. This beverage is produced by using kefir grains, which are constituted of lactic acid and acetic acid bacteria and yeasts. The aim of this work was to study the bacterial diversity of Argentinian kefir and its grains developed in cow milk and soy milk by a next generation sequencing approach.
Kefir grains were cultivated in cow or soy milk at 25° C for 24 h. Seven consecutive fermentations were performed with each grain. Metagenomic DNA extraction of drinks and grains was performed with NucleoSpin® tissue kit, according to manufacturer instructions. Libraries of 16S rDNA PCR were generated using locus specific primers targeting V4-V5 hypervariable regions of 16S rRNA gene. Following amplicon purification, a subsequent PCR, for indexing, was performed by using the Nextera XT index kit. The products obtained were then sequenced on Illumina MiSeq platform.
Milk kefir grains showed less diversity than those of soy milk. However, milk kefir were more bacterial diverse than soy milk. Firmicutes and Proteobacteria were the main phyla, being Firmicutes the most abundant. Actinobacteria and Bacteroidetes were only detected in some samples of kefir from both beverages. Firmicutes were >99% in both grains and its prevalence slightly changed in soy milk kefir, but Firmicutes decreased to ≈64-84% in favor of Proteobacteria in milk kefir. *Lactobacillus kefiranofaciens* was the most abundant in milk grains, but it was partially replaced by *Lactococcus lactis* and *Acetobacter lovaniensis* in milk kefir. In soy milk grains were dominated by *Lactobacillus harbinensis* (49%) and *Lactobacillus hilgardii/diolivorans* (40%), whereas *L. lactis* represented >90% of bacteria in soymilk kefir. Here, *Lactobacillus pobuzihii*, *Lactobacillus acidipiscis*, *Lactobacillus farciminis/heilongjiangensis*, and *Pseudomonas migulae* were identified for the first time in kefir.
The knowledge about kefir populations may be useful to obtain or design different functional products. To improve this knowledge, studies about fungal populations of kefir are also required.

Kefir, Cow and soy milk, Next-generation sequencing

発表責任者：Gamba, Raul Ricardo（raulgamba@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：3C4a08
講演日時：3 月 26 日 10:27～ 1 号館 C4 会場

健康的日本食とヒトの腸内フローラの関係解析

Analysis of relationship between healthy Japanese diet and human gut microbiota

○串田 衛、浅野 将希、山本 和史、都築 毅（東北大院農）
○Mamoru KUSHIDA, Masaki Asano, Kazushi Yamamoto, Tsuyoshi Tsuduki (Grad. Sch. of Agric. Sci., Tohoku Univ.)

【背景・目的】日本食は日本人の長寿の要因の一つとして考えられている。以前我々は、様々な年代（1960 年、1975 年、1990 年、2005 年）の日本食をマウスに与え、その健康有益性を比較した結果、1975 年日本食に肥満や糖尿病などの生活習慣病の発症リスクの軽減や、寿命の延伸といった健康に有益な効果を見出した [1]。さらに、この知見をもとに行ったヒト介入試験においても、対象食として用意した現代食と比べ、1975 年日本食の特徴を有した食事（1975 年型日本食）は BMI や LDL コレステロールの低下などの有益な効果を示した。1975 年日本食の特徴を検討したところ、現代食に比べ味噌、醤油、納豆などの発酵食品の摂取の多さ、多様な食材を使用することよる食物繊維量の多さが特徴として挙げられた。これらの特徴は近年、腸管関連疾患だけでなく、肥満や糖尿病など腸以外の様々な疾患に深く関係しているとされている腸内フローラに良い影響を与えることが報告されている。以上を踏まえ本研究では、1975 年型日本食が腸内フローラにどのような影響を与えるかを検討し、その健康有益性に腸内フローラが関係しているかを、1975 年型日本食と現代食を摂取したヒトの腸内フローラ解析を行うことで明らかにしようと試みた。
【方法・結果】20 歳以上 70 歳未満の軽度肥満者 60 名を 30 名ずつ 2 群に分け、1975 年型日本食および現代食を 1 日 3 食 4 週間摂取させた。試験食摂取前後の被験者の糞便サンプルを採取し、得られたサンプルをメタ 16S 解析に供し、両群の被験者の腸内フローラの比較をした。その結果、門レベルにおいては 1975 年型日本食を摂取した群で Bacteroidetes 門の割合が増え、Firmicutes 門の割合が減った。一方、現代食を摂取した群では Bacteroidetes 門の割合が減り、Firmicutes 門の割合が増えた。次により詳しい腸内フローラの変化を調べるため属レベルでの解析を行ったところ、*Streptococcus* 属において、1975 年型日本食を摂取した群で有意に発現が抑制され、*Acidaminococcus* 属、*Anaerostipes* 属、*Phascolarctobacterium* 属の 3 つにおいて 1975 年型日本食を摂取した群で有意な増加がみられた。また、腸内細菌の代謝物を測定するため、血清のメタボローム解析を行ったところ、1975 年型日本食を摂取した群では健康有益性が示唆されている短鎖脂肪酸の増加がみられた。さらに、1975 年型日本食の効果を強く受けた被験者の腸内フローラを解析したところ、*Prevotella* 属の元々の占有率が有意に高いことが明らかとなった。以上のことから、1975 年型日本食の健康有益性に腸内フローラおよびその代謝物が関係していることが示唆された。

[1] K. Yamamoto, T. Tsuduki, et al., Nutrition, 2016.

Japanese diet, gut microbiota, Meta-analysis

講演番号：3C4a09
講演日時：3 月 26 日 10:38～ 1 号館 C4 会場

微生物シングルセルゲノミクスを用いたイヌリン摂食マウスの腸内菌叢変動解析

Single-cell genomic analysis of effects of dietary fiber inulin on mice gut microbiota.

○千々岩 樹佳[1,2]、小川 雅人[1,2]、西川 洋平[1,2]、高橋 海[1]、細川 正人[3,4]、竹山 春子[1,2] ([1]早大・先進理工・生医、[2]産総研・早大 CBBD-OIL、[3]早大・理工総研、[4]JST・さきがけ)
○Rieka CHIJIIWA[1,2], Masato KOGAWA[1,2], Yohei NISHIKAWA[1,2], Kai TAKAHASHI[1], Masahito HOSOKAWA[3,4], Haruko TAKEYAMA[1,2] ([1]Dept. Life Sci. Med. Biosci., Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]CBBD-OIL, AIST, [3]Res. Inst. Sci. & Eng., Waseda Univ., [4]PRESTO, JST)

【背景・目的】腸内環境の制御因子の一つとして食事があり、食事によって腸内細菌の菌叢組成や機能活性が変化することが知られている。また、食事は体内時計の制御にも関わっているため、時間栄養学的視点も含めた腸内細菌叢解析が近年注目されている。しかし、現行の細菌叢解析法の主流であるメタ 16SrRNA 遺伝子解析では、菌叢組成の変化を捉えることができるが、得られる情報が 16S rRNA 遺伝子の部分配列のみであるため、変動した特定の細菌叢の機能情報は
得られない。そこで本研究では、全ゲノム情報を細胞 1 個から決定するシングルセルゲノム解析技術 (Sci. Rep. (2018)) を用いて、食事に伴う菌叢変動のメカニズムを捉えることを目的とした。対象として、腸内細菌の発酵基質として知られるイヌリンを用い、マウス腸内細菌叢に与える影響までを評価した。
【方法】明暗サイクル（明期開始時刻= 8 AM、暗期開始時刻= 8 PM）の条件下でマウス（BALB/c、6 週齢、雄）を飼育した。イヌリン食（AIN93M に 5%イヌリン添加）の給餌試験を 2 週間行い、給餌前後で糞便中腸内細菌叢組成と盲腸内容物の短鎖脂肪酸情報の取得を行った。給餌は、朝夕食、朝食のみ、夕食のみの 3 群を設けた。腸内細菌叢組成は、糞便からの DNA を抽出後、Miseq を用いた 16S アンプリコンシークエンシングにより配列情報を取得し、それらの菌叢解析を行った。また、盲腸内容物に含まれる短鎖脂肪酸情報を GC-MS を用いて取得した。最終的に、イヌリン給餌による変動が見られた細菌のゲノム情報を、シングルセルゲノミクス技術により取得した。
【結果・考察】腸内細菌叢組成の解析から、イヌリン給餌群における *Bacteroides* 属の細菌の有意な増加が確認された。また、短鎖脂肪酸の解析から、イヌリンの朝食群において、コハク酸と酪酸の有意な産生増加が認められた。これらの結果から、*Bacteroides* の増加が短鎖脂肪酸の産生と関連することが示唆された。また、給餌時間により短鎖脂肪酸量も異なることが観察された。次に、給餌試験前後の糞便サンプルからシングルセルゲノムを 400 個程度解析し、複数の優占細菌種のゲノム取得を行った。比較ゲノム解析の結果、イヌリン給餌により有意に増加した *Bacteroides* ゲノム上にのみ、イヌリン分解能を有する遺伝子クラスター(Polysaccharide Utilization Loci)が確認された。これらの *Bacteroides* ゲノムにはコハク酸産性に関わる遺伝子パスウェイの存在も確認でき、イヌリン摂食マウスで短鎖脂肪酸産生量が増加する結果とも合致した。このように、シングルセルゲノム解析により、従来では推定にとどまっていた菌叢変動メカニズムの解明に繋がる知見を得ることができた。

Inulin, Gut Microbiota, Single-cell Analysis

発表責任者：千々岩樹佳（rieca.chijiiwa@asagi.waseda.jp）

講演番号：3C4a10
講演日時：3 月 26 日 10:49～ 1 号館 C4 会場

生後 1 年間における乳幼児の腸内真菌叢形成と出産・育児環境因子の関連性解析
Associations between development of gut fungal mycobiota and environmental factors over the first year of life

○三島 梨子[1]、實藤 雅文[2]、諸隈 誠一[2,3]、田中 優[1]、百田 理恵[1]、園元 謙二[1]、小川 昌宣[2]、加藤 聖子[2,3]、中山 二郎[1] ([1]九大院農、[2]九大環境発達医学研究センター、[3]九大院医)
○Riko MISHIMA[1], Masafumi SANEFUJI[2], Seiichi MOROKUMA[2,3], Masaru TANAKA[1], RIE MOMODA[1], Kenji SONOMOTO[1], Masanobu OGAWA[2], Kiyoko KATOU[2,3], Jiro NAKAYAMA[1] ([1]Kyushu Univ. of Agric, [2]Kyushu Univ. of Research center for environment and developmental medical sciences, [3]Kyushu Univ. of Medicin)

【背景】ヒト腸内では出生後まもなくして細菌、真菌、ウィルス等からなる腸内微生物叢（腸内フローラ）の形成が始まる。乳幼児腸内フローラは出産方法、授乳方法、抗生物質といった出産・育児環境因子の影響を受けながら大きく変動していくのと同時に宿主の健康的な成長に様々な作用をもたらす。しかしながら、これらの研究は腸内細菌を対象にしたものがほとんどであり、腸内フローラの一員である真菌については未知の部分が多い。特に様々な環境因子が腸内真菌叢形成に与える影響についての報告例はほとんどない。そこで、我々は環境省の実施する「子どもの健康と環境に関する全国調査（エコチル調査）」に参加している乳幼児 96 名（福岡市）を対象に生後 1 年間の腸内真菌叢に影響を与える環境因子を調査した。
【方法】本研究では、エコチル調査に参加している乳幼児 96 名を対象とし、生後 1 ヶ月時（n = 83）および生後 1 年時（n = 87）の糞便試料と質問票調査から出生・育児環境についての情報を使用した。糞便試料から抽出した DNA を鋳型に真菌リボソーマル RNA 遺伝子 ITS1 領域を網羅的に増幅させ、Illmina 社 MiSeq によるペアエンドシーケンスを行った。得られた配列データから Uparse/Usearch を用いて OTU を作成し、系統解析を行うことで各被験者の腸内真菌叢を決定した。この腸内真菌叢データと出生・育児環境調査の結果をもとに統計解析を行い環境因子が与える腸内真菌叢への影響を調査した。
【結果と考察】授乳期にあたる生後 1 ヶ月時の乳幼児腸内真菌叢では皮膚常在真菌である *Malassezia*（45%）が最も多く、生後 1 年時に比べ生活環境中の真菌が多い傾向があった。離乳期にあたる生後 1 年時になるとヒト腸内常在真菌である *Saccharomyces*（25%）が最優勢の真菌叢へと変化し、食事内容の変化が真菌叢構成に影響を与えることが推測された。また、生後 1 ヶ月では自然分娩児に比べ帝王切開児で *Eupenicillium* ($p = 0.02$, Mann Whitney U-test) や *Aspergillus* ($p = 0.01$) など生活環境中の真菌が多い傾向が見られた。生後 1 ヶ月での授乳方法については母乳栄養児に *Malassezia* ($p = 0.002$)、混合乳栄養児に *Saccharomyces* ($p = 0.01$) が有意に多い結果となったが、生後 1 年時ではこれらの有意差は喪失した。以上のことから、分娩様式および授乳法は生後 1 年に至るまでの真菌叢形成に影響することが示唆された。

gut mycobiota, infant, gut microbiota

発表責任者：中山　二郎（nakayama@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3C4a11
講演日時：3 月 26 日 11:10～ 1 号館 C4 会場

qTnSeq 法の開発と PCB 分解細菌への適用
Development of qantitative TnSeq and application to a PCB degrader

○大坪 嘉行、永田 裕二、津田 雅孝（東北大院生命）
○Yoshiyuki Ohtsubo, Yuji Nagata, Masataka Tsuda (Tohoku Univ.)

トランスポゾン変異導入法は古典的かつ強力な研究手法である。近年ではいわゆる次世代シーケンサーを利用してトランスポゾン導入部位を一括して同定可能な TnSeq 法が用いられている。しかしながら従来の TnSeq 法には定量性についての問題がある。すなわちシーケンスライブラリーの調製において PCR 増幅を行うために、厳密な定量性を得ることができない。例えば、ゲノム中のある挿入位置に由来するリードが複数取得されたとしても、ライブラリー中にその変異株が多数存在していたのか、1 つの細胞由来の DNA が複数回シーケンスされたのかを区別することができない。このことから、たとえば特定の条件下で、完全に淘汰されてしまうような変異は同定できるが、ある特定の環境での適応度が向上したような変異株は得ることができない。
我々が考案した qTnSeq 法では、PCR 増幅前にランダムな配列よりなる固有識別タグを連結する。NGS により得られたリードについて、同じ固有識別タグを有するリードはもともと同じ DNA 鋳型分子に由来すると考えて処理すれば、リードの重複カウントを防ぐことができる。
ランダムな識別タグ配列を効率良く連結するため、我々は新しい方法を開発した。この方法の開発にあたり、我々はマロニーマウス白血病ウィルス由来の逆転写酵素が、平滑 DNA の 3’末端に強い塩基付加活性を有することを見いだし、また付加の促進剤を発見した。これにより G であれば 4 塩基程度の突出を形成することができるようになった。またさらには、G 突出末端に、3’端が連続する C であるような一本鎖 DNA を作用させ、当該酵素を働かせると一本鎖 DNA の相補鎖が高効率で合成される（CIS 反応と命名）ことを見いだした。これらにより NGS 解析に必要なアダプター配列を簡便に付加できる。なお一本鎖 DNA の一部分を連続するミックス塩基としておくと、この部分が固有識別タグ配列となる。
これまでに、qTnSeq 法の有効性を検討し、実験系として洗練させることを目的に、PCB/ビフェニル分解細菌 *Acidovorax* sp. KKS102 株をもとにトランスポゾン変異株ライブラリーを構築した。変異株ライブラリーをビフェニル存在下および非存在下で継代培養した後、全 DNA を抽出してシーケンスライブラリーの調製を行ない、現在解析を行なっている。

TnSeq, Tn mutagenesis, PCB degrader

発表責任者：大坪嘉行（yohtsubo@ige.tohoku.ac.jp）

講演番号：3C4a12
講演日時：3 月 26 日 11:21～ 1 号館 C4 会場

ナノポアシーケンサを用いた遺伝子組換え麹菌のゲノミクスおよびトランスクリプトミクス

Genomics and transcriptomics of genetically engineered Aspergillus oryzae using Nanopore Sequencer

○若井 暁[1]、張 斯来[1]、荻野 千秋[2]、堤 浩子[3]、秦 洋二[3]、近藤 昭彦[1]（[1]神戸大院・イノベ、[2]神戸大院・工、[3]月桂冠・総研）

○Satoshi WAKAI[1], Silai Zhang[1], Chiaki Ogino[2], Hiroko Tsutsumi[3], Yoji Hata[3], Akihiko Kondo[1]
([1]Grad. Sch. Sci. Tech. Innov., Kobe Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Kobe Univ., [3]Res. Inst., Gekkeikan)

近年、ロングリード DNA 解析が可能なナノポアシーケンサの解析事例が増えつつある。ロングリード解析の利点は、従来型の次世代シーケンサ（超並列型ショートリード解析）では難しいゲノム構造やスプライシングバリアント等の解析が容易な点にある。

我々は、日本の食文化において長い歴史を持つ麹菌 *Aspergillus oryzae* を用いて、様々な物質生産について検討を進めてきた。その過程で、染色体上にマルチコピー遺伝子導入を行ったマルチセルラーゼ高発現麹菌やピルビン酸代謝改変により乳酸などの高効率生産が可能になった麹菌などを創出してきた。前者の場合、ゲノム上のどの場所にどのような形で導入されているのかが不明であったり、後者では物質生産能のみならずグルコース消費速度の増加など細胞内代謝が劇的に変わったりと麹菌の健全性を確認する必要性も生じている。これらを検証するために、本研究では、ナノポアシーケンサを用いて遺伝子組み換え麹菌の DNA および RNA 解析を実施した。

麹菌では、マーカープラスミドとは別に線状化した DNA 断片を染色体上に同時に取り込ませる co-transformation という手法により、マルチコピーで遺伝子断片を導入することが可能である。本研究では既に構築済みの三つのセルラーゼ遺伝子をタンデムに並べた 10 kb の DNA 断片を導入した NS1-3 株と三つのセルラーゼ遺伝子をバラバラにして導入した NSPlD1-8 株について、MinION を用いてゲノム解析を行った。それぞれ、5-10 Gb と 150 万リード以上の解析量を得ることができ、マッピングおよび *de novo* アセンブルに十分な解析量を得た。当初、ゲノム上の様々な位置に導入されている形態を予想していたが、NS1-3 株では第 7 染色体に、NSPlD1-8 株では第 8 染色体に、集約してタンデムに導入されていた。全長はいずれも 50 kb を超える大きなものであり、この様なロングタンデムリピート構造の解析は、ショートリード解析では困難を極めたと考えられる。

また、乳酸生産麹菌として代謝改変が施された麹菌株二株については、direct RNA 解析を実施し、それぞれ約 1.5 Gb、約 150 万リードの解析量を得た。TPM（Transcripts Per Million）としての転写量解析とマッピングによるスプライシング状況の確認の結果、代謝改変を支持する転写量が得られた。一方で、ゲノム上の非アノテーション領域に対するマッピングが複数観察され、*A. oryzae* RIB40 ゲノムの未アノテーション領域については改善の余地があると思われる。

本研究でのナノポアシーケンス解析により、遺伝子組換え麹菌のゲノム構造やトランスクリプトームを明らかにすることができ、その健全性についてもゲノムワイドに検証できた。

nanopore sequencer, Aspergillus oryzae, MinION

発表責任者：若井暁（wakaists@pegasus.kobe-u.ac.jp）

講演番号：3C4a13
講演日時：3 月 26 日 11:32～ 1 号館 C4 会場

人工代謝経路を実現する DNA 配列提案技術の開発

Development of DNA Sequence Recommendation Technique to Realize Artificial Metabolic Pathways

○田邉 麻衣子[1]、伊藤 潔人[1]、今一 修[1]、武田 志津[1]、柘植 謙爾[2]、荒木 通啓[3]（[1]日立研開、[2]神戸大院・イノベ、[3]京大院・医）
○Maiko TANABE[1], Kiyoto ITO[1], Osamu IMAICHI[1], Shizu TAKEDA[1], Kenji TSUGE[2], Michihiro ARAKI[3] ([1]Hitachi, Ltd., [2]Kobe Univ., [3]Kyoto Univ.)

持続可能な社会の実現を目指し，化石資源に依存した高エネルギー消費を伴う有用物質生産から，バイオテクノロジーを活用した省エネルギー型の有用物質生産へ転換する試みが進められている。このようなバイオによる有用物質生産を実現するために，微生物や植物（細胞），動物（細胞），藻類を宿主として，有用物質生産のために人工的に設計された代謝経路（人工代謝経路）を宿主内で機能させることで，同物質を生産できるように改良された生物を用いる手法（合成バイオ技術）が注目されている。

宿主内で人工代謝経路を機能させるためには，人工代謝経路に関係する複数の遺伝子配列と，これらの遺伝子を宿主の中で機能させるために必要な配列（プロモータ配列やターミネータ配列，以下機能性配列と記載）から構成される DNA 配列を設計し，宿主へ導入する必要がある。ここで用いる機能性配列は，生物が生命活動を維持する上で用いる配列ではなく，導入 DNA 配列が機能するように人為的に最適化された配列（以下人工機能性配列と記載）を選択することが望ましい。人工機能性配列は，導入する遺伝子配列及びその組み合わせ，導入する宿主によって，所望の人工代謝経路を実現し得る配列が異なる。そのため，多数存在する人工機能性配列候補の中から，目的に則した配列を適切に選択することが課題となる。現状，上述した DNA 配列の設計，特に人工機能性配列の選択は，研究者の経験や知識に基づいて実施されている。このような方法では，数多くの人工機能性配列から最適な配列を一度目の設計で選択することは難しい。そのため，機能性配列を選択して DNA 配列を設計し，実際に宿主へ導入して実験により機能発現を検証する工程を，導入する遺伝子の数だけ繰り返し実施している。従って，人工代謝経路の実現のために，多数の遺伝子を導入する場合，同工程を膨大な回数繰り返すこととなり，効率的に有用物質を生産する生物を作製する上でのボトルネックとなっている。

我々は上記課題を解決するために，微生物へ導入する複数の遺伝子配列に対して最適な人工機能性配列を，特許・文献・実験データが蓄積されたデータベースより自動的に選択し，微生物へ導入するための DNA 配列を提示する DNA 配列提案技術を開発している。本技術を用いることで，過去の知見より目的に則した人工機能性配列を選択し，宿主へ導入するための最適 DNA 配列を提示することが可能となり，有用物質を生産する生物の作製工程を効率化できる。本発表では DNA 配列提案技術の開発成果に関して報告する。

本研究は，NEDO 委託事業『植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発』の一部として実施した。

Synthetic biology, DNA design, Artificial metabolic pathway

講演番号：3C4a14
講演日時：3 月 26 日 11:43～ 1 号館 C4 会場

ゲノム解析による *Aspergilllus luchuensis* 変異株の遺伝子変異の検出
Detection of genetic variation of *Aspergillus luchuensis* mutant strain by genome analysis
○山本 希[1]、渡来 直生[1]、小谷野 仁[1]、澤田 和典[2]、山田 拓司[1] ([1]東工大生命理工学院、[2]（株）ぐるなび)
○Nozomi YAMAMOTO[1], Naoki WATARAI[1], Hitoshi KOYANO[1], Kazunori SAWADA[2], Takuji YAMADA[1] ([1]Tokyo Tech, [2]Gurunavi, Inc.)

麹菌（*Aspergillus* 属）は日本の伝統的な発酵食品には欠かせない微生物である。産業利用される実用株は、国内少数の種麹メーカーにより育種、改良されている。従来麹菌には有性世代がないと考えられてきたため、株の改良は突然変異や人為的な変異導入によって行われてきた。これら各変異株の全ゲノム解析は、代謝特性に関わる特定の遺伝子だけでなく、複数遺伝子が関係する代謝プロセスを全体的に評価できるほか、改良目標以外の新奇な特徴の発見につながると考えられるため、有効な手段と言える。これまで *Aspergillus oryzae* では株間の変異について報告があったが、黒麹 *A. luchuensis* とその変異株である白麹については知見がない。とくに白麹には突然変異株 *A. kawachii* のほか、人為突然変異株があるが、白麹株に共通して存在する黒麹株との明確な変異点や代謝の共通性、育種による影響などは明らかになっていない。そこで実用菌株として用いられている黒麹 4 株、白麹 4 株を illumina 社 Hiseq を用いてゲノム解析し、遺伝子の変異とその種類を明らかにした。また培養実験により、遺伝子変異による代謝への影響を評価した。

ゲノム解析で得られた遺伝子配列を、配列相同性でグループ化したところ、1 株単独で作られるグループは少ないことが分かった。また複数の遺伝子を用いて系統解析を行ったところ、黒麹と白麹の育種株はクラスターが明確に分離したが、突然変異株 *A. kawachii* IF04308 株は白麹の育種株のクラスターとは別の、黒麹株と系統学的に近い位置にあった。このため、株の差異は遺伝子の有無ではなく変異によるものであること、また育種により白麹株で変異する遺伝子の存在が示された。

全株に共通して存在する遺伝子のアミノ酸配列を調査したところ、白麹株で変異している遺伝子が既報の色素合成遺伝子の他にも 7 遺伝子存在した。これらの遺伝子活性や発現が黒麹株と異なっているかは不明だが、黒麹の白色化に伴う変異遺伝子として定義できる可能性がある。また、155 遺伝子は IF04308 株では黒麹株と同一配列だったが、白麹の育種株全てで同じ変異が確認された。これらの遺伝子機能は多岐に渡っており、育種による選択圧が影響していると考えられる。とくに 3 遺伝子についてはアミノ酸配列の欠失を伴う変異があり、遺伝子活性や発現に影響している可能性が高いことが示された。共通の遺伝子変異が、白麹育種株の生化学的特徴に関わっていると思われる。

本研究により、黒麹から白麹への変異の際に共通して変異する 8 遺伝子を検出することができた。また、育種による選択圧により、変異の種類に関わらず発酵に直接関連しない遺伝子にも共通する変異があることが示された。

Aspergillus luchuensis, genome, albino mutant

発表責任者：山本　希（nozomy@bio.titech.ac.jp）

講演番号：3C4a15
講演日時：3 月 26 日 11:54～ 1 号館 C4 会場

Rhodococcus erythropolis を用いた遺伝子配列改変によるタンパク質発現調節法の開発
Development of protein expression regulation method by gene sequence modification using *Rhodococcus erythropolis*

○田島 直幸[1]、北川 航[2]、齋藤 裕[1]、西宮 佳志[2]、玉野 孝一[2]、安武 義晃[2]、田村 具博[2]、亀田 倫史[1] ([1]産総研 AIRC、[2]産総研生物プロセス)
○Naoyuki TAJIMA[1], Wataru KITAGAWA[2], Yutaka SAITO[1], Yoshiyuki NISHIMIYA[2], Kouichi TAMANO[2], Yoshiaki YASUTAKE[2], Tomohiro TAMURA[2], Tomoshi KAMEDA[1] ([1]AIST AIRC, [2]AIST BRI)

タンパク質遺伝子内の塩基配列は、翻訳効率に影響を与えることが知られている。翻訳効率を配列改変により調節することで、目的とする酵素や抗体など機能性タンパク質の生産量を増加させることや、より効率的に流れる代謝経路の作成が可能となる。最新の翻訳制御研究によると、コドン使用頻度や mRNA の二次構造形成度、翻訳に使われる tRNA の種類など様々な配列特徴量が翻訳量に寄与することが分かってきた。
翻訳効率を調節する配列設計法を開発するため、放線菌ロドコッカス属(*Rhodococcus erythropolis*)を宿主とするタンパク質発現データと配列特徴量の関係を解析した。同一のベクター系を用いた 204 遺伝子の発現データと配列特徴量の関係を解析した結果、転写開始点から遺伝子の N 末端側 11 コドンまでの mRNA 二次構造形成傾向が特に発現量と関係することが明らかになった。遺伝子配列改変による発現調節の効果を確かめるため、12 種類の遺伝子について、それぞれ N 末端側 11 コドン分の取りうる全ての同義置換配列を生成し、それぞれの二次構造形成傾向を計算した。最も形成傾向が低いと予想された配列を実際に *R. erythropolis* に導入し、発現量を調べた結果、天然の遺伝子配列の場合と比べて 7 遺伝子で発現量が増加した。さらに、コドン頻度の値やレアコドンの有無を考慮した配列を設計したところ、コドン頻度が一定以上高く、レアコドンを含まない条件で最も形成傾向が低いと予想された配列では、9 遺伝子で天然の遺伝子配列の場合よりも発現量が増加した。特に、今回の配列設計法を用いることで、天然の遺伝子配列では発現量がほとんどない、もしくは発現量が少ない遺伝子は、すべて発現量を向上させることができ、本手法の有用性が示された。

protein expression regulation method, gene sequence modification, *Rhodococcus erythropolis*

発表責任者：田島直幸（naot507@gmail.com）

講演番号：3C4p01
講演日時：3 月 26 日 13:50～ 1 号館 C4 会場

枯草菌糖脂質合成酵素遺伝子 *ugtP* の発現制御機構の解析
Regulation of gene expression of *ugtP* encoding a glucolipid synthase in *Bacillus subtilis*
○松岡 聡[1]、篠原 嵩人[1]、朝井 計[2]、戸澤 譲[1] ([1]埼玉大院・理工研、[2]東農大・生命科学)
○Satoshi MATSUOKA[1], Takahito HINOHARA[1], Kei ASAI[2], Yuzuru TOZAWA[1] ([1]Saitama Univ., [2]Tokyo Univ. of Agric.)

枯草菌において膜脂質の約 10%を占める糖脂質は、前駆体のジアシルグリセロールに UDP-Glc から Glc がモノ(M)、ジ(Di)、トリ(Tri)と段階的に付加することによって合成される。この反応を触媒するのがグリコシルトランスフェラーゼ UgtP である。*ugtP* 破壊株は、細胞が太く短く湾曲した形態となり、細胞表層の恒常性に関与する extracytoplasmic function(ECF)シグマ因子のうち、SigM、SigV、SigX の脱抑制が見られた(Matsuoka et al., 2011)。*ugtP* を破壊することにより、細胞に様々な影響が見られることから、糖脂質は枯草菌で重要な役割をしていると示唆される。本研究では、未解明の枯草菌 *ugtP* の発現制御機構を明らかにすることを目的とした。*ugtP* は自身のプロモーターの他、上流の *metA* とオペロンを形成しており、このオペロンの転写は *ugtP* 破壊で上昇することがわかった。本大会では、*ugtP* 破壊における *metA-ugtP* 転写上昇に関与する ECF シグマ因子を同定するために、*ugtP* 破壊で脱抑制された ECF シグマ因子の破壊株を用いて *metA* プロモーター(P_{metA})の転写解析を行った。P_{metA} には、枯草菌ハウスキーピング σ^A 認識プロモーターと推定 ECF シグマ因子認識プロモーターが存在するため、それぞれのプロモーター領域と *lacZ* の転写融合を作製して、転写活性を測定した。その結果、推定 ECF シグマ因子認識プロモーターは、*ugtP* 破壊で転写活性が上昇し、SigM、SigX の破壊の導入で、*ugtP* 破壊における転写活性上昇が低下した。更に SigM・SigX 二重破壊で、プロモーター活性は大きく低下したことから、*ugtP* 破壊株における *metA-ugtP* オペロンの転写上昇は SigM と SigX によって引き起こされたことがわかった。次に、*ugtP* と各 ECF シグマ因子二重破壊株の形態観察をしたところ、*ugtP・sigM* と *ugtP・sigX* 二重破壊株が、高塩濃度（3% NaCl）で球状となり、NaCl 感受性になったことから、生理学的に *ugtP* の発現制御と SigM・SigX には関連があることが示唆された。そこで、対数増殖初期の枯草菌野生株を、SigM 活性化条件のひとつである高 NaCl(3%)環境下に移して 60 分培養し、糖脂質組成を調べたところ、糖脂質モノグルコシルジアシルグリセロール(MGlcDG)が減少し、UgtP 量は増加した。枯草菌 *ugtP* 破壊株に異種細菌由来の MGlcDG 合成酵素遺伝子を導入すると脱抑制された SigM、SigX が再び抑制される(Matsuoka et al., 2016)ことから、塩ストレスにより UgtP 酵素活性が変化して MGlcDG が減少し、その結果 SigM の活性化が引き起こされたと考えられる。以上から、枯草菌 *ugtP* の発現は糖脂質量の変化による ECF シグマ因子の活性化を介した制御を受けていると示唆された。

Glucolipid, ECF sigma factor, Bacillus subtilis

発表責任者：松岡　聡（matsuoka@mail.saitama-u.ac.jp）

講演番号：3C4p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ 1 号館 C4 会場

ヒト腸内細菌 *Prevotella copri* のキシラナーゼ遺伝子の発現解析
Expression analysis of xylanase gene from human gut bacteria *Prevotella copri*.
○高木 千尋[1]、林 秀謙[1,2] ([1]前工大院工、[2]前工大工)
○Chihiro Takagi[1], Hidenori Hayashi[1,2] ([1]Grad. Maebashi institute of technology., [2]Maebashi institute of technology.)

【目的】ヒトが摂取した食物繊維は腸内細菌の糖質加水分解酵素により分解され、短鎖脂肪酸に変換される。短鎖脂肪酸は大腸の収縮運動、脂肪蓄積の抑制等に重要な役割を果たしている。ヒト腸内より分離した *Prevotella copri* は主要な腸内細菌の一つであり、そのゲノム DNA 上には糖質加水分解酵素遺伝子が多数存在する。キシランを使用した活性染色により解析を行ったところ、分子量 40 kDa と 80 kDa の二つのキシラナーゼが発現していることが判明した。ゲノム DNA を解析したところ、40 kDa と 80 kDa に相当する *xyn10A* と *xyn10B* 遺伝子が存在し、*xyn10A* 遺伝子の上流には、エステラーゼ遺伝子及びキシローストランスポーター遺伝子(*xynT*)が、下流にキシロシダーゼ遺伝子(*xyl43A*)が存在していた。本研究は、*xyn10A* と *xyn10B* および、*xyn10A* の周辺の遺伝子の発現解析を RT-PCR と Real-Tmie PCR、タンパク質の発現を活性染色より解析を行ったので、報告する。
【方法】Oat-spelt xylan(OSX)、Beechwood xylan(BWX)、キシロース、グルコースおよびセロビオースで培養した。培養後、菌体より RNA を抽出し、RT-PCR、Real-time PCR により mRNA の発現量を測定した。同様に 5 つの炭素源で培養した菌体を回収し、キシランを使用した活性染色を行った。
【結果及び考察】*xyn10A*、*xyn10B* と *xyn10A* の周辺の遺伝子について RT-PCR を行ったところ、*xyn10A* は OSX、BWX 培養時に発現量が高かった。一方、*xyn10B* は OSX、BWX に加え、セロビオース培養時に発現量が高かった。また、グルコース培養時に *xyn10A* と *xyn10B* どちらにおいても発現量が低下した。*xyn10A* の周辺の遺伝子および、それらの遺伝子間領域の増幅も認められ、発現パターンが類似していた事から、*xyn10A* とその周辺の遺伝子はポリシストロニックである事が考えられる。Real-time PCR 解析を行ったところ、RT-PCR と類似しており、*xyn10A* は OSX、BWX 培養時に発現量が高く、*xyn10B* は OSX、BWX、セロビオース培養時に発現量が高かった。セロビオース培養時の *xyn10B* の発現量は *xyn10A* の約 5 倍高かった。グルコース培養時では発現量がどちらも低かった。活性染色を行ったところ、OSX、BWX 培養時に組換え Xyn10A と同じ、40 kDa の強い活性のあるバンドが検出され、OSX、BWX、セロビオース培養時に組換え Xyn10B と同じ、80 kDa の強い活性のあるバンドが検出された。グルコース培養においては Xyn10A、Xyn10B どちらにおいてもバンドは検出されなかった。これらの結果から、*P. copri* においてキシラン培養時に発現が促進され、グルコース培養時には発現が抑制されると考えられる。セロビオース培養時は、*xyn10A* と *xyn10B* は異なった発現制御が働いている事が考えられる。

Prevotella copri, xylanase, Expression analysis

発表責任者：高木　千尋（m1866008@maebashi-it.ac.jp）

講演番号：3C4p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ 1 号館 C4 会場

Burkholderia 属細菌における鉄硫黄クラスター生合成系の転写制御機構の解析

Analysis of Transcriptional regulation involved in iron-sulfur cluster biosynthesis machinery in *Burkholderia* species

○野々山 翔太、岸田 康平、永田 裕二、大坪 嘉行、津田 雅孝（東北大・院生命科）
○Shouta NONOYAMA, Kouhei KISHIDA, Yuji NAGATA, Yoshiyuki OHTSUBO, Masataka TSUDA (Tohoku Univ.)

鉄硫黄クラスターは様々なタンパク質のコファクターとして利用され、本クラスターを含んだタンパク質は多種多様な代謝や遺伝子の発現制御等、生命活動の根幹を担っている。主に大腸菌を用いた解析から、鉄硫黄クラスターを合成する機構に複数のタンパク質が関与し、これらをコードする遺伝子のオペロン形成が判明している。本研究に用いた *Burkholderia multivorans* ATCC 17616 株(以下 ATCC 17616 株)は多種多様な芳香族系化合物分解能を示す土壌細菌であり、推定鉄硫黄クラスター生合成オペロン(*isc* オペロン)を一つ有している。我々のこれまでの解析で、ATCC 17616 株の *isc* オペロンは外部の鉄濃度の変化に応答して転写変動し、この転写変動には *isc* オペロン先頭にコードされている制御因子 IscR が関与すること、また、IscR の生化学的解析により、IscR は *isc* オペロン上流領域へ特異的に結合すること、そして、IscR-3CA(IscR に存在する鉄硫黄クラスターとの結合に利用されると予想される３つのシステイン残基をアラニンに置換したもの) は転写抑制活性を示さないにもかかわらず、*isc* オペロン上流領域へ特異的に結合すること等を示してきた(表 1)。これらの結果より、IscR は鉄硫黄クラスターと結合し、*isc* オペロンの転写抑制を行うこと、そして、鉄硫黄クラスターと非結合の IscR も *isc* オペロン上流に結合することが示唆された。そのため、鉄硫黄クラスターと非結合の IscR の機能解明を目的とした解析を行った。

表 1　これまでの IscR 及び IscR-3CA の解析結果

	IscR	IscR-3CA
鉄濃度上昇時の転写抑制	○	×
鉄硫黄クラスター非存在下の転写抑制	×	×
*isc*オペロン上流への結合	○	○

鉄濃度を減少させた前後における継時的な qRT-PCR 解析を行った。その結果、鉄濃度減少に伴い、野生株では *isc* オペロンの転写量が増加したが、*iscR* 破壊株ではそのような転写変動は見られなかった。また、大腸菌を用いた系で IscR 及び IscR-3CA をそれぞれ発現させ、好気的条件(鉄硫黄クラスターが酸素によって破壊される条件)で精製した各タンパク質及び *isc* オペロン上流領域、大腸菌由来 RNA ポリメラーゼを用いた *in vitro* transcription assay を行った。その結果、IscR タンパク質及び IscR-3CA タンパク質のいずれも、*isc* オペロン上流プロモーターからの転写を活性化した。これらの結果を総合して、鉄硫黄クラスターと非結合の IscR は *isc* オペロンの転写活性化因子として機能すると結論づけた。しかし、IscR の転写抑制活性については、*isc* オペロンに対して直接的に転写を抑制しているのか、直接的であるならば転写活性化因子として作用する場合と結合配列は異なるかが不明であるため、このような点の解明を目指したさらなる解析を進めている。

Iron-sulfur cluster, Ferric uptake regulator (Fur), Transcriptional regulation

講演番号：3C4p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ 1 号館 C4 会場

放線菌 *Streptomyces coelicolor* における内在性 NO による形態分化制御機構

Endogenous nitric oxide regulates morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor*

○本間 颯太、伊藤 晋作、矢嶋 俊介、佐々木 康幸（東農大バイオ）
○Sota Honma, Shinsaku Ito, Shunsuke Yajima, Yasuyuki Sasaki (Tokyo Univ. of Agric.)

近年、我々の研究チームは放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2) M145 において、有機体窒素→硝酸→亜硝酸→NO→硝酸を循環する窒素代謝経路を見いだした。また、本経路により生産される NO は抗生物質生産及び形態分化を制御するシグナル分子であることが示唆された。しかし、NO による形態分化制御機構は多くが未だ不明である。そこで NO による形態分化制御機構の解明を目的とした。

興味深いことに、NO 低生産変異株において胞子成熟の遅延が確認され、NO 発生剤の添加により胞子の成熟速度が回復した。また、この変異株における胞子成熟に関与する遺伝子の継時的な発現量は野生株（M145 株）と比べて低いままであることが明らかになった。

一方、本菌にはNOを感知するセンサータンパク質及びそのレスポンスレギュレーターから成る二成分制御系が存在する。今までの研究結果から本二成分制御系が窒素酸化物代謝関連酵素の発現を制御することが明らかになっており、本菌のNO恒常性維持において主要な役割を果たすことが示唆されている。胞子形成を行わない変異株において、本二成分制御系を構成するレスポンスレギュレーターの欠損は胞子形成を復帰させることが明らかになった。

これらの結果はNOが本菌の形態分化を制御することを示唆し、形態分化に関与する機能未知であるタンパク質について新たな知見をもたらす。

Nitric oxide, Streptomyces coelicolor, morphological differentiation

講演番号：3C4p05
講演日時：3 月 26 日 14:34～ 1 号館 C4 会場

希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* における胞子嚢形成を制御する σ^{FliA} ファミリーのシグマ因子群の機能解析

Functional analysis of FliA-family sigma factors which control gene expression for sporangium formation in *Actinoplanes missouriensis*

○橋口 優一朗[1]、手塚 武揚[1,2]、大西 康夫[1,2] ([1]東大院・農生科、[2]東大・微生物イノベ連携機構)
○Yuichiro HASHIGUCHI[1], Takeaki TEZUKA[1,2], Yasuo OHNISHI[1,2] ([1]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., Univ. of Tokyo., [2]CRIIM., Univ. of Tokyo.)

【背景・目的】希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* は栄養飢餓状態に陥ると多数の胞子嚢を形成する。胞子嚢は水に触れることで開裂し、内包されていた胞子が水中に放出される。放出された胞子はべん毛を有しており、水中を遊泳する遊走子となる。細菌べん毛に関して多方面から研究されているサルモネラ菌では、σ^{FliA} によって一部のべん毛遺伝子の転写が制御されることが知られているが、*A. missouriensis* のべん毛遺伝子の多くの転写単位のプロモーター領域にはサルモネラ菌において決定された σ^{FliA} 認識配列と似た配列が保存されていた。また、胞子嚢形成時や胞子嚢開裂時に転写が活性化される遺伝子の多くが同様のプロモーター配列を有しており、*A. missouriensis* において、σ^{FliA} ホモログが、べん毛合成および胞子嚢形成や胞子嚢開裂に関わる多くの遺伝子の発現を制御していると予想された。そこで本研究では、*A. missouriensis* における σ^{FliA} の機能の解明を目指した。
【方法・結果】サルモネラ菌の σ^{FliA} をクエリーとして、*A. missouriensis* のゲノム上から相同性の高いタンパク質をコードする遺伝子を探索したところ、*fliA1*、*fliA2*、*fliA3*、*fliA4* の 4 つが見出された。各 *fliA* の転写量を qRT-PCR で解析したところ、*fliA1*、*fliA2*、*fliA3* は胞子嚢の形成と開裂の過程で転写が活性化されていたのに対し、*fliA4* はほとんど転写が活性化されていなかった。また *fliA1*、*fliA2*、*fliA3* の転写開始点を決定したところ、胞子嚢形成遺伝子群をグローバルに活性化する転写制御因子 TcrA の結合配列がプロモーター上流に見出され、TcrA が *fliA1*、*fliA2*、*fliA3* の上流領域に結合することが EMSA によって示された。さらに *fliA1*、*fliA2*、*fliA3* の転写量はΔ*tcrA* 株で大幅に減少していた。そこで、各 *fliA* の破壊株を構築したところ、Δ*fliA2* 株では遊走子の遊泳速度が低下し、べん毛合成やべん毛運動に異常が生じたことが示唆された。さらにΔ*fliA1*Δ*fliA2* 株では、遊走子のべん毛が一切観察されず、胞子嚢形成にも異常が生じた。野生株、Δ*fliA1* 株、Δ*fliA2* 株、Δ*fliA1*Δ*fliA2* 株のトランスクリプトームを RNA-seq で解析したところ、各 *fliA* 破壊株では、多くのべん毛遺伝子および走化性やシグナル伝達等に関与すると予想される様々な遺伝子の転写量が低下していた。σ^{FliA1} と σ^{FliA2} が制御すると思われる遺伝子の多くが重複しており、σ^{FliA1} と σ^{FliA2} は共通のプロモーター配列を認識すると考えられたが、これは *fliA2* プロモーター下に配置すれば、*fliA1* と *fliA2* のどちらでも、Δ*fliA1*Δ*fliA2* 株の異常な表現型を回復させることができたことからも支持された。また *fliA1* プロモーター下に配置した *fliA1* と *fliA2* のΔ*fliA1*Δ*fliA2* 株への導入および転写解析により、*fliA1* プロモーターが σ^{FliA1} の制御下にあることが示唆された。

rare actinomycete, sporangium, sigma factor

講演番号：3C4p06
講演日時：3 月 26 日 14:55～ 1 号館 C4 会場

酢酸菌ゲノムから切り出されて環状化する DNA 領域の解析
Analysis of circularized DNA region excised from genome of acetic acid bacteria
○布川 渓[1]、上田 賢志[2]、髙野 英晃[2] ([1]日大院生資科・生命研、[2]日大生資科・生命研)
○Kei NUNOKAWA[1], Kenji UEDA[2], Hideaki TAKANO[2] ([1]Grad. Sch. of Bioresour. Sci., Nihon Univ., [2]Coll. of Bioresour. Sci., Nihon Univ.)

【経緯と目的】酢酸菌は伝統的な食酢製造を担う発酵細菌である。我々はこれまでに酢酸菌の溶原性ファージの存在とその感染能について報告した。インテグラーゼ(Int)は宿主染色体に対する溶原性ファージゲノムの組み込みと切り出し反応に必須であり、*Acetobacter pasteurianus* IFO 3283 株には 22 個コードされているが、それらの役割は明らかになっていない。本研究では *A. pasteurianus* IFO 3283 株において *int* 遺伝子の働きによって染色体から切り出され環状化する領域の探索およびその役割解明を目的とした。
【結果と考察】*int* 遺伝子の周辺領域を対象としてプロファージ同定ツール PHAST(PHAge Search Tool)を用いて解析した結果、22 領域のうち 12 領域でダイレクトリピート配列に挟まれた介在配列の存在が予想された。PCR による解析の結果、*int* 遺伝子 *APA01_08270* を含む領域において切り出しと環状化が確認された。また、Int 認識配列である *att* 配列と予想される 5’-AAAATGGTGGAGGGAGTT-3’が *APA01_08270* 遺伝子上流領域、約 33Kbp 下流の $tRNA^{Tyr}$ 遺伝子および切り出された環状 DNA 分子に共通して確認されたことから、本配列が *att* であると考えられる。介在配列にはトランスポゼース、DNA/RNA ヘリカーゼおよび多くの機能未知タンパク質に加えて、HicA-HicB から成るトキシン－アンチトキシン(TA)システムがコードされていた。類似の *int* と介在配列は酢酸菌ゲノムの多くから見つかり、*A. persici* JCM25330 、 *Gluconobacter oxydans* DSM3504 、 *G. diazotrophicus* PA1 5(Brazil) 、 *Komagataeibacter medellinensis* NBRC3288、*K. maltaceti* NBRC14815 においても本領域の切り出しと環状化が確認された。また、*A. pasteurianus* 386B の介在配列には接合伝達に関わる DNA リラクゼース Mob が見つかることから、可動性遺伝因子 ICE(integrative and conjugative element)として種間を水平伝播する可能性がある。さらに、*A. pomorum* BDGP5b 株では介在配列にファージ多重感染免疫タンパク質がコードされ、また隣接領域に CRISPR-Cas システムが見つかる。TA システムもプラスミドの安定保持に加えて、外来 DNA に対する防御への関与が報告されていることから、本領域が外来ファージに対する防御システムとして働く可能性が考えられる。本研究によって酢酸菌群に高く保存される切り出し・環状化するゲノム領域を同定することに成功した。また、本研究で見出した環状 DNA 分子は細胞集団の一部においてのみの存在が予想されていることから、環状 DNA 分子をもつ特定の細胞がある種のストレスに適応応答して機能分化した可能性が考えられる。

acetic acid bacteria, integrase, toxin-antitoxin system

発表責任者：高野　英晃（takano.hideaki@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3C4p07
講演日時：3 月 26 日 15:06～ 1 号館 C4 会場

納豆菌におけるγ-ポリグルタミン酸生産の光抑制メカニズムの解析

Analysis of light-inhibitory mechanism of poly-γ-glutamic acid production in *Bacillus subtilis* natto

○秋山 るしあ[1]、岡添 孝章[2]、見世 光[1]、相澤 朋子[3]、浦井 誠[4]、上田 賢志[2]、髙野 英晃[2]([1]日大院生資科・生命研、[2]日大生資科・生命研、[3]日大生資科・くらし、[4]東農大・生命)
○Lucia AKIYAMA[1], Takaaki OKAZOE[2], Kou MISE[1], Tomoko AIZAWA[3], Makoto URAI[4], Kenji UEDA[2], Hideaki TAKANO[2] ([1]Life Sci. Res. Center, Grad. Sch. of Bioresour. Sci., Nihon Univ., [2]Life Sci. Res. Center, Coll. of Bioresour. Sci., Nihon Univ., [3]Coll. of Bioresour. Sci., Nihon Univ., [4]Tokyo Univ. of Agric.)

【目的】納豆菌 *Bacillus subtilis natto* は、日本古来の発酵食品である納豆の製造に使われる有用細菌である。我々は、*Bacillus megaterium* における光誘導的なカロテノイド生産の研究をしている過程で、細胞外粘性物質の生産量が光照射により抑制される現象を見出した。同様の現象は納豆菌においても観察されたことから、*Bacillus* 属細菌には細胞外粘性物質の生産を光依存的に抑制する機構が広く備わっていることが予想された。本研究では、納豆菌における粘性物質生産の光抑制メカニズムを解明することを目的とした。
【結果・考察】納豆菌が生産する粘性物質は、グルタミン酸の重合体であるγ-ポリグルタミン酸(γ-PGA)とフルクトースの重合体であるレバンから成る。納豆菌を明・暗条件下で液体培養した菌体から γ-PGA とレバンを抽出し、それぞれを定量した。その結果、明暗による増殖の違いとレバンの生産量に顕著な違いは認められなかったが、γ-PGA 生産量は青色光の照射により強く抑制されていることが判明した。また、固体培地を用いた実験においても同様の結果が認められた。このことから、光照射は γ-PGA 生産を特異的に抑制すると考えられた。次に、光の波長帯と強度の γ-PGA 生産に対する影響を調べた結果、緑色や赤色光の照射によっても γ-PGA 生産の抑制が認められた。また、強度が 9.60 μmol/m^2 sec per μA の青色光によってγ-PGA 生産の光抑制が認められた。これらのことから、光照射によって生じる酸化ストレスが γ-PGA の生産抑制に関与している可能性が考えられた。
納豆菌による γ-PGA 合成は、*ywsC-ywtABCD* 遺伝子群にコードされる酵素群によって進行する。そこで、本合成酵素群の活性に対する光の影響を調査するために、大腸菌を宿主として納豆菌由来の γ-PGA 合成遺伝子群を発現させ、γ-PGA 生産量を測定した。ベクターのみ導入した大腸菌株では γ-PGA 量はわずかにしか検出されなかった。一方、T7 プロモーターの下流に γ-PGA 合成遺伝子群を導入した株では、暗条件で γ-PGA の生産が認められ、光照射下でその生産は低下した。この大腸菌株の増殖は光照射に影響されなかった。T7 プロモーターの活性は明暗で影響を受けないことから、観察された光抑制には転写後の調節機構が関与していることが強く示唆された。
次に、実際の納豆製造における光の影響を調査することを目的として、大豆の発酵に対する光照射の影響を調査した。発酵後、攪拌前の見た目では光の影響は観察されなかったが、攪拌すると光照射下で調製した納豆では粘性が顕著に低下していることが認められた。このことから、納豆の発酵過程において光による粘性物質の生産抑制が起きることが判明した。

poly (γ-glutamic acid), *Bacillus subtilis* natto, light response

発表責任者：高野　英晃（takano.hideaki@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3C4p08
講演日時：3 月 26 日 15:17～ 1 号館 C4 会場

Pseudomonas 属細菌のクラス II LitR を介した光応答メカニズム
Light-response mechanism controlled by Class II LitR in *Pseudomonas* spp.
丸山 貴史[1]、小林 暢[1]、角 悟[1]、高野（白鳥） 初美[1]、兼崎 友[2]、吉川 博文[2,3]、上田 賢志[1]、○高野 英晃[1] ([1]日大生資科・生命研、[2]東農大・生物資源ゲノム解析セ、[3]東農大・生命科)
Takafumi MARUYAMA[1], Mitsuru KOBAYASHI[1], Satoru SUMI[1], Hatsumi TAKANO(SHIRATORI)[1], Yu KANESAKI[2], Hirofumi YOSHIKAWA[2,3], Kenji UEDA[1], ○Hideaki TAKANO[1] ([1]Coll. of Bioresour. Sci., Nihon Univ., [2]Genome Res. Center, Tokyo Univ. of Agric., [3]Dept. of Biosci., Tokyo Univ. of Agric.)

［経緯と目的］LitR/CarH ファミリーはビタミン B_{12} を利用する光センサー型転写調節タンパク質であり、主に光依存的なカロテノイド生産の光スイッチとして働く。バクテリアゲノムに広く分布する本ファミリーは少なくとも 5 クラスに分類され、その光感知機構は多様であることが予想されている。我々はこれまでにグラム陰性細菌 *Pseudomonas mendocina* における 2 つのクラス II LitR 遺伝子（*pmlR1-2*）とフラビンをクロモフォアとする青色光受容体 LOV 遺伝子（*pmSB-LOV*）の解析を行い、PmlR2 と PmSB-LOV が光依存的に相互作用することを明らかにした。本研究では PmlR2 のリプレッサー機能および PmSB-LOV のアンチリプレッサー機能を明らかにし、クラス II LitR を介した青色光受容メカニズムの全容解明を目的とした。
［結果と考察］*P. mendocina* における光誘導性遺伝子の同定を目的として、暗条件および青色光照射条件で培養した菌体から精製したトータル RNA を用いて、RNAseq 解析を行った。その結果、暗条件と比べて青色光照射条件において、*pmlR1* や *pmlR2* 近傍の光回復酵素遺伝子、脂肪酸合成遺伝子、葉酸合成遺伝子などを含む 24 個の遺伝子群が 4.2 から 14.3 倍ほど高い発現レベルを示した。このことから本菌には *pmlR* を介した光誘導システムが備わっていることが示唆された。次に、大腸菌を宿主として PmlR2 と PmSB-LOV の組み換えタンパク質を大量発現させた後に、各種カラムクロマトグラフィーを用いて高純度に精製した。ビアコア解析によって、PmlR2 は光誘導性プロモーターに特異的に結合することが確認された。また、暗条件において PmlR2 の DNA 結合は PmSB-LOV の存在下においても認められた。その一方で、明条件においては PmlR2 の DNA 結合能は PmSB-LOV の添加によって阻害された。さらに、最小コンポーネントを用いた *In vitro* ランオフ転写アッセイ法によって mRNA 合成の光誘導性を再現した。RNA ポリメラーゼによる mRNA 合成は PmlR2 の添加によって阻害された。その mRNA 合成阻害は暗状態の PmSB-LOV 添加によって解除されなかった一方で、明状態の PmSB-LOV 添加によって阻害が解除された。以上の結果より本制御システムは次のように予想された。暗条件においては PmlR2 が機能するため転写は低レベルである一方、明条件においては PmSB-LOV が PmlR2 に対するアンチリプレッサーとして働くことで、標的遺伝子群の転写がオンになる。本研究成果は、short LOV のエフェクタータンパク質として MerR タイプレギュレーターが同定された初めての例である。

LitR, *Pseudomonas*, light response

発表責任者：高野英晃（takano.hideaki@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3C4p09
講演日時：3 月 26 日 15:28～ 1 号館 C4 会場

コリネ型細菌での pHM1519 由来シャトルベクターの高コピー数変異体の取得とその解析

High copy number mutation in pHM1519-derived shuttle vector for *Corynebacterium glutamicum*

○羽城 周平、安枝 寿 (味の素・イノベ研)
○Shuhei HASHIRO, Hisashi YASUEDA (AJINOMOTO CO., INC.)

【背景と目的】コリネ型細菌を宿主とした有用物質生産において、目的の遺伝子数(gene dosage)を増やし、その効果を調べることは一般化しており、高いコピー数を維持する高コピー数ベクターは有用であると考えられる。本研究では、pCG1 と近縁である pHM1519 について、その高コピー数化変異体を取得し、それを解析した結果について報告する。
【方法と結果】宿主とした *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869 株はクロラムフェニコール(Cm)に対する感受性が高いため、Cm 耐性遺伝子をもつ大腸菌プラスミドと pHM1519 とのシャトルベクター pPC4 を構築し、それを保持する *C. glutamicum* に、より高い濃度の Cm 耐性を与える変異プラスミドを自然突然変異にてスクリーニングした。その結果、高コピー数変異プラスミドを 1 クローン得て、pPC4H1 と命名した。この高コピー数化を与える変異点(*cop1*)は、複製開始タンパク質(Rep)と想定される ORF 内の一塩基置換であり、Rep の 429 番目の Gly-429 を Glu へと置換する変異であった(1)。また、選択マーカー遺伝子をカナマイシン(Km)遺伝子に変更した同様なシャトルベクターpPK4 に対して *cop1* 変異を導入したベクター(pPK4H1 と命名)を構築したところ、pPC4H1 と同様に高コピー数化した。qPCR 法によりプラスミドのコピー数を評価したところ、pPK4 は染色体あたり約 50 コピーであるのに対し pPK4H1 は約 800 コピーと非常に高く、コピー数は約 16 倍に増加していた。更に pPK4 の *cop1* 部位での各種変異体として、Gly-429 を Ala(疎水性)あるいは Lys(塩基性)、Asp(酸性)、Pro(剛性)、Gln(極性)になるよう各変異を導入したところ、いずれの変異体でも、元の pPK4 と比較してコピー数の増加が確認された(コピー数増大の程度は、E>K>Q=D>A=P>G-429)。Rep タンパク質の二次構造予測から、Gly-429 は Rep の C 末端側にある Helix-Turn-Helix の Turn 部位に位置していることから、この部位の変化は、Rep の DNA への結合特性を変化させるものと推測された。pHM1519 と同系列な pCG1-family プラスミドにおいては、*rep* 遺伝子上流での、プラスミド複製を負に制御するアンチセンス RNA(asRNA)の転写量抑制により、コピー数が増加することが報告(2)されているが、それらの変化に比べ、本報告の *cop1* 変異によるコピー数の増加は大きいものであった。以上より、これらの高コピー数プラスミドは、各種酵素やタンパク質など、コリネ型細菌を宿主とした有用物質生産や代謝解析をするうえでの有用なプラスミドベクターの一つとなりうる。

(1)Hashiro S. and Yasueda H., *Biosci.Biotechnol.Biochem.*, 82, 2212 (2018)
(2)Okibe N., Suzuki N. and Inui M., *et al.*, *Microbiology*, 156, 3609 (2010)

Corynebacterium glutamicum, high copy number mutation, pHM1519

講演番号：3C4p10
講演日時：3 月 26 日 15:39～ 1 号館 C4 会場

CRISPR/dCas9 システムを用いた IS 256Bsu1 trasposase の枯草菌 168 株への影響の解析
Analysis of effect of IS 256Bsu1 trasposase on Bacillus subtilis 168 using CRISPR/dCas9
○片野 亘、徳山 麻里、吉川 博文、朝井 計（東農大農）
○Wataru KATANO, Mari TOKUYAMA, Hirohumi YOSIKAWA, Kei ASAI (Tokyo Univ. of Agric.)

【背景・目的】

トランスポゾンや挿入配列（IS）の転移により、ゲノムは改変され、それに伴う変異により宿主に負の作用をもたらすが、一方でゲノムに多様性を生み出すことにより、生物の進化を引き起こす因子の１つであるとも考えられている。近年、ゲノム解析技術の進歩によって、様々なバクテリアゲノム配列が決定され、多種多様な IS がほとんどの真正細菌に普遍的に存在することが明らかとなった。枯草菌 168 株には IS が存在しないが、同種である納豆菌には複数の IS が存在することが分かった。私はその差が生じた理由を解析し、トランスポゾンの宿主に与える未解明な影響を解き明かしたいため、自分の研究目的とした。過去の実験で、枯草菌 168 株に納豆菌の IS（IS256Bsu1）を導入して解析を行った結果、枯草菌 168 株が transposase に高い感受性を示すため、IS を持たないように適応したのではないかということが示唆された。しかし、現在使用している転移頻度測定系を用いる際に問題点がある。IPTG 誘導性の Phyper-spank での transposase 遺伝子の転写が非誘導化で完全に抑制できず、常に過剰に transposase が発現している可能性があり、それにより transposase に高い感受性を持っていることも考えられた。そこで、transposase の発現量に応じた枯草菌 168 株への影響を観察するために、xylose 誘導型 CRISPR/dCas9 システムを用いた transposase 遺伝子転写抑制系の開発を試みた。

【方法・結果】

本実験では、IS256Bsu1 の transposase の誘導発現により、IS に挟まれたプロモーターを持たない cat 遺伝子（Mini IS-SDcat）が転移し、転移先で cat が転写されることで、クロラムフェニコール（Cm）耐性株として間接的に IS の転移をモニターできる株を用いた。非選択培地（LB）のコロニー数を母数団に対する選択培地（Cm）のコロニー数を転移頻度とした。この転移頻度を transposase の活性量として測定した。CRISPRi により xylose の添加量に応じて trasposase の発現量を調節することが可能な株を作製し、非転写誘導時と比較して、転移頻度を最大、約 120 倍まで抑制することに成功した。また CRISPRi で抑制できるのは対数増殖期までで、遷移期以降は徐々に抑制が効かないことも分かった。現在、この新たな転移頻度測定系を用いて、transposase の枯草菌 168 株への影響を再解析している。

trasposase, CRISPR/dCas9, Bacillus subtilis 168

発表責任者：片野　亘（40515036@nodai.ac.jp）

講演番号：3C4p11
講演日時：3 月 26 日 16:00～ 1 号館 C4 会場

大腸菌における CsrD による small RNA CsrB の分解制御と Csr システムの利用

Regulation of CsrB small RNA decay by CsrD and application of Csr system in *Escherichia coli*

山田 竣太[1]、石黒 志実[2]、坂井 航[1]、杉本 華幸[1,2]、○鈴木 一史[1,2]（[1]新潟大院・自然科学、[2]新潟大・農・応生化）
Shunta YAMADA[1], Nozomi ISHIGURO[2], Wataru SAKAI[1], Hayuki SUGIMOTO[1,2], ○Kazushi SUZUKI[1,2] ([1]Grad. Sch. Sci. & Tech., Niigata Univ., [2]Dept. Appl. Biol. Chem., Facul. Agric., Niigata Univ.)

Csr (carbon storage regulator)システムは、細菌のバイオフィルム形成、運動性、解糖系、病原性等、様々な遺伝子の発現調節に関わり、多くの真正細菌に存在する。大腸菌 Csr システムは２つのタンパク質と２つの small RNA から構成されている。RNA 結合タンパク質 CsrA は Csr システムの活性の中心となっており、ターゲットとなる mRNA に結合し、翻訳や mRNA 安定性を変化させることで転写後の遺伝子発現を調節し、糖新生、グリコーゲン生合成、バイオフィルム形成などを抑制し、解糖系や酢酸代謝、運動性を促進させる。２つの small RNA・CsrB 及び CsrC は複数の CsrA 結合部位を含むステムループ構造からなり、CsrA を捕捉することで、CsrA の mRNA への結合を阻害し、その働きを調節する。もう一方のタンパク質 CsrD は GGDEF-EAL ドメイン・タンパク質であるが、c-di-GMP の合成・分解には関与せず、CsrB/C RNA の RNase E (Degradosome) 依存的な分解を調節することで CsrA の細胞内での働きを制御している。近年、CsrD がグルコース特異的 PTS システムの $EIIA^{Glc}$ の結合を介して活性化されることが明らかとなった。

$EIIA^{G1c}$ による CsrD 活性化とそれに伴う CsrB 分解機構を明らかにするため、コハク酸含有最少培地で大腸菌 MG1655 株を対数増殖期または定常期まで培養し、リファンピシン添加後、種々の濃度のグルコースを添加した後に RNA を抽出し、ノーザンブロッティングによって CsrB を検出してその半減期を測定した。さらに、フルクトース、マンノース、マンニトール等を同様に添加し、CsrB の半減期を測定した。その結果、終濃度 0.1 mM のグルコース添加で、CsrB の半減期は迅速に低下したが、グルコース以外の PTS 糖による半減期の低下はグルコースより少ない傾向にあった。また *csrD* 欠損株ではグルコース添加による CsrB 半減期の低下は認められなかった。よって、CsrD の活性が $EIIA^{G1c}$ を介して迅速に調節され、それにより CsrA 活性が制御されていると考えられた。

大腸菌バイオフィルムの主要な構成多糖である poly-β-1,6-GlcNAc（PNAG）を大量生産するため、PNAG 合成酵素をコードする *pgaABCD* オペロンの発現を制御している Csr システムを利用した。大腸菌 MG1655 株に *csrB*、*csrC*、*csrD* 欠損を導入した変異株を構築し、さらに、*wza* 欠損を導入してコラン酸非産生株とした。この株を *csrB* をクローン化した pBAD で形質転換し、*csrB* をアラビノースで誘導発現できるようにした。得られた株を振盪培養し、十分な菌体数となった時点でアラビノースを添加して *csrB* を発現させたところ、大量のバイオフィルムが形成された。よって、Csr システムの制御による新たな遺伝子発現系利用の可能性が示された。

small RNA, Csr system, biofilm

発表責任者：鈴木一史（ksuzuki@agr.niigata-u.ac.jp）

講演番号：3C4p12
講演日時：3 月 26 日 16:11～ 1 号館 C4 会場

腸内細菌科細菌の中心炭素代謝オペロン mRNA の制御カスケード

Regulatory cascade of operon mRNAs for central metabolic pathways

○宮腰 昌利 (筑波大医学医療系)
○Masatoshi MIYAKOSHI (Univ. Tsukuba)

TCA サイクルの酵素複合体をコードする *sdhCDAB-sucABCD* mRNA の 3’UTR は大腸菌やサルモネラで高く保存され、Hfq と結合することが知られている。*sucD* mRNA 3’UTR からのプロセシングによって生成する small RNA（sRNA）SdhX は酢酸キナーゼをコードする *ackA* mRNA 5’UTR と塩基対形成して翻訳を抑制することをこれまでに明らかにした（Miyakoshi et al., 2018 Nucleic Acid Res.）。*sdhCDAB-sucABCD* mRNA は ArcA/ArcB、Crp、RpoS などの複数の因子によって転写レベルで制御されているだけでなく、複数の sRNA によって制御されることがこれまでに報告されている。オペロン mRNA の様々な位置で sRNA が塩基対形成して転写後調節を受けることによって、各シストロンの発現量をタンパク質のストイキオメトリを変化させる。本発表では、サルモネラにおいてグルタミン合成酵素をコードする *glnA* mRNA の 3’UTR からプロセシングされる sRNA STnc800 が *sucA* mRNA の 5’UTR と塩基対を形成して発現を抑制することを報告する。*glnA* mRNA は窒素飢餓によって誘導されることから、C/N バランスの調節に RNA による転写後調節が貢献していることが示唆される。

TCA cycle, post-transcriptional regulation, small RNA

発表責任者：宮腰昌利（mmiyakoshi@md.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3C4p13
講演日時：3 月 26 日 16:22～ 1 号館 C4 会場

ビブリオ菌の新生ポリペプチド鎖を介した発現制御における mRNA 二次構造の役割
Critical roles of the mRNA secondary structure of the vemP-secD2 intergenic region in nascent chain-mediated regulation of SecD2 expression in *Vibrio aliginolyticus*
○石井 英治、秋山 芳展、森 博幸（京大・ウイルス・再生研）
○Eiji ISHII, Yoshinori AKIYAMA, Hiroyuki MORI (Inst. for Front. Life and Medic. Sci., Kyoto University)

【背景・目的】
細菌のタンパク質膜透過反応において、SecYEG トランスロコン、駆動モータ因子 SecA ATPase、並びに膜透過促進因子 SecDF 複合体が中心的な役割を果たす。近年我々は、海洋性ビブリオ菌において駆動イオンが異なる二つの SecDF パラログが巧みに使い分けられていること、これには新たに見出した分泌タンパク質 VemP (Vibrio protein export monitoring polypeptide)の翻訳途上鎖（新生ポリペプチド鎖）が必須の役割を担っていることを明らかにした(Ishii *et al*. 2015)。VemP は、*vemP-secD2-secF2* オペロンの先頭にコードされる分泌タンパク質で、VemP の分泌が損なわれた場合、VemP ポリペプチドの翻訳伸長はアミノ酸配列依存的にその C 末端付近で停止(翻訳アレスト)し、その結果 SecDF2（SecD2/SecF2 複合体）の合成が促進される。我々は *vemP-secD2* 遺伝子間領域（166 塩基）に形成される mRNA 二次構造が、この翻訳アレストと共役した SecDF2 合成促進の分子基盤を理解するうえで重要であると考えている。計算による mRNA 二次構造予測からこの領域は、*secD2* のシャイン・ダルガーノ（Shine-Dalgarno, SD）配列をステム構造内に含んでおり、*secD2* の翻訳開始を抑制していることが推測される。このステム構造は、*vemP* の翻訳アレストサイト近傍に位置することからリボソームの停滞により SD を含む mRNA 二次構造が不安定化され、*secD2* の SD 配列を翻訳に利用できる状態に促すことを想起させる。また、この領域は 9 つのステムと 7 つのループからなる複雑な二次構造を形成することが予測されている。しかしながら、この領域が予測された二次構造を形成しているという実験的な証拠はなくこのモデルは推測の域を出ない。そこで本研究では、下流遺伝子発現制御における遺伝子間領域の役割を明らかにするため、遺伝学的・生化学的手法を用いた解析を行った。
【方法・結果】
遺伝子間領域が形成する二次構造を明らかにするため *in vitro* SHAPE 法 (**s**elective 2'-**h**ydroxyl **a**cylation analyzed by **p**rimer **e**xtension)を用いて検証した。SHAPE 実験の結果は、計算により予測された二次構造と非常によく似た構造を取っていることを強く支持した。更に、遺伝子間領域の欠損やそれぞれのステムループの塩基対形成を損なう変異の導入は、翻訳アレストに依存しない SecD2 発現を誘起した。この結果は、SD 配列を含むステムだけでなく他のステムも翻訳アレストと共役した SecD2 発現に関与する可能性が示唆された。現在、各ステムループの翻訳アレスト時の動態を明らかにするため、翻訳中の mRNA 二次構造を SHAPE 法により決定しようと試みている。

nascent polypeptide, RNA secondary structure, translation arrest

講演番号：3C4p14
講演日時：3 月 26 日 16:33～ 1 号館 C4 会場

シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 における RNase E の発現制御機構
Expression regulation of RNase E in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803.
○大竹 祥太[1]、Claudia Steglich[2]、朝山 宗彦[3]、Wolfgang Hess[2]、渡辺 智[1] ([1]東京農大院・バイオ、[2]フライブルク大学、[3]茨城大学・農)
○Shota Otake[1], Steglich Claudia[2], Munehiko Asayama[3], Hess Wolfgang[2], Satoru Watanabe[1] ([1]Dept. of Bioscience, Tokyo Univ. of Agriculture, [2]Institute of Biology, Freiburg University, [3]College of Agriculture, Ibaraki University)

細胞は環境条件に応じてタンパク質レベルを適切に調整するため、さまざまな遺伝子発現制御機構を備えている。RNAの転写後制御もその一つであり、原核生物ではRNaseが主要な役割を果たす。シアノバクテリア*Synechocystis* sp. PCC 6803（Syn6803）は酸素発生型の光合成を行う原核藻類であり、大腸菌に比べて高いUV耐性を示す（Domain et al., Mol. Microbiol., 2004）。当研究グループにおけるトランスクリプトーム解析から、Syn6803ではUV照射1時間後からRNase Eをコードする遺伝子*rne*の発現が顕著に増加することが示された。RNase Eは主に大腸菌で研究されている主要なエンドリボヌクレアーゼであり、RNAのプロセシング及びmRNA分解に関与する。また大腸菌ではRNase E量を一定に維持するために、*rne* 転写産物の安定性をRNase E自身が制御する（Schuck et al. , Mol. Microbiol., 2009）。シアノバクテリアSyn6803においてもUV照射後に同様の制御が存在すると仮説を立てて、これを検証した。UV照射の有無に関わらずRNase Eタンパク質量は一定であったが、RNase Eの安定性を比較するとUV照射後にRNase Eの分解が促進されることが分かった。一方、*rne*の転写産物量はUV照射後に顕著に増加し、*rne* 転写産物5’側非翻訳領域（5’-UTR）における制御がUV照射後の発現誘導に関与することが示唆された。*rne* 5’-UTRに特異的に結合するタンパク質を解析した結果、Rbp3との相互作用が示唆された。Rbp3はシアノバクテリアのみならず光合成生物全般で保存されているRNA結合タンパクである。*rbp3*破壊株におけるRNase Eの発現量は顕著に減少しており、*rne* 5’-UTRを介してRNase Eの発現を制御すると考えられた。現在、Rbp3のホモログであるRbp1, Rbp2の破壊株を構築しており、RNase Eの転写後制御における機能の解明を目指している。

RNase, RNA binding protein, Cyanobacteria

発表責任者：大竹祥太（44218005@nodai.ac.jp）

講演番号：3C4p15
講演日時：3 月 26 日 16:44～ 1 号館 C4 会場

5'UTR ステムループを介した環境に適応するための枯草菌 *rpoA* 発現制御機構の解析

Regulation of expression of *rpoA* via 5'UTR stem-loop for adapting the environment in *Bacillus. subtilis*.

○蟹谷 美有、大坂 夏木、朝井 計（東農大農）
○Miari KANITANI, natuki osaka, kei asai (Tokyo Univ. of Agric)

【背景・目的】細菌は環境変化に応じて、多様に遺伝子の発現を変化させる。特に枯草菌をはじめとするグラム陽性細菌ではアミノ酸飢餓などの環境変化に適応する為に、警告物質 ppGpp が ATP/GTP レベルを制御することで rRNA,リボソーム関連遺伝子の発現を抑制する一方、アミノ酸生合成遺伝子、胞子形成関連遺伝子の発現を促進するといったように、RNA ポリメラーゼによる転写レベルで遺伝子発現を変化させることが知られている。しかし、転写装置である RNA ポリメラーゼ自身の発現がどのように確保されているのかはあまり理解されていない。

RNA ポリメラーゼコア酵素はα, β, β’サブユニットから構成されており、*rpoA* にコードされるαサブユニットのみ 2 分子存在する。*rpoA* はほぼ全ての細菌において、リボソームタンパクをコードする遺伝子とオペロンを形成している（αオペロン）。枯草菌αオペロンにおいては *rpoA* は上流に約 200bp の 2 つのステムループが並んだ特徴的な構造をとりうる非翻訳領域(5’UTR)を持つ。これまで、*rpoA* 5’UTR のステムループを欠損させた株(Nc-del 株)は LB 培地において生育遅延を、最少培地においては一部のアミノ酸(Val, Leu, Phe)の要求性に起因する生育阻害を示すことが明らかとなった。これらの表現型は *rpoA* 過剰発現によって回復することから、5’UTR が栄養状態に適応するための *rpoA* の発現量調節に関与していることが考えられた。本研究では、栄養状態に応じた RNA ポリメラーゼの発現制御機構の解明を目的として、5’UTR のステムループが *rpoA* の発現にどのように関与しているのかを解析することにした。

【方法・結果】まず 5’UTR のステムループの欠失が *rpoA* の転写活性に与える影響を、lacZ レポーターを用いた転写解析により検証した。まず、Nc-del 株が生育遅延を示した LB 培地において解析を行ったところ、5’UTR の有無による転写活性値に有意な差は見られなかった。さらに、Nc-del が要求性を示した Val による影響を調べるために、20 種アミノ酸添加培地をコントロールとして、Val のみを抜いたアミノ酸添加培地において同様の実験を行った。解析の結果、両培地において Val の有無による転写活性値の差は見られなかったものの、Nc-del 株の転写活性値は WT と比較して顕著に低下した。以上の結果より、最少培地において、5’UTR のステムループが *rpoA* の転写レベルでの発現に影響している可能性が示唆された。また、最少培地における Nc-del 株の生育阻害を抑圧する変異株を多数取得しており、内複数の株においてにαオペロン内のリボソームタンパクコード遺伝子に変異が同定された。現在これらの遺伝子とステムを介した rpoA 発現との関連性の解析も進めている。

Bacillus. subtilis, *rpoA*, stem-loop

講演番号：3C5a01
講演日時：3 月 26 日 09:00～ 1 号館 C5 会場

プラスミドベクターpBBR1MCS の広宿主域性に関する研究

Study of broad host range in plasmid vector pBBR1MCS

○岸田 康平、永田 裕二、大坪 嘉行、津田 雅孝（東北大学院生命）
○Kouhei Kishida, Yuji Nagata, Yoshiyuki Ohtsubo, Masataka Tsuda (Tohoku Univ. life science)

【背景・目的】

プラスミドは遺伝子の水平伝播を担い、生物の進化や多様性の理解に重要な研究対象である。また、遺伝学ツールとして欠かせず、応用微生物学分野においても研究の発展を支えている。プラスミドは多種にわたり、宿主域(プラスミドが複製保持可能な範囲)はそれぞれで大きく異なる。宿主域を理解することは遺伝子の水平伝播の理解や新たなプラスミドベクター系の構築に重要であるが、その宿主域を規定する機構は不明である。そこで本研究は、プラスミドの宿主域を規定する機構の解明を目的とした。

【材料】

研究対象とした pBBR1MCS ベクターシリーズ(以下、pBBR1MCS)は幅広い細菌種(α, β, γ–プロテオバクテリア)で複製保持可能な広宿主域性プラスミドであり、最も普及しているプラスミドベクターのひとつである。pBBR1MCS は *Bordetella* 属細菌由来の pBBR1 を元に構築された。pBBR1 は、複製保持に関与する *rep* 遺伝子と接合伝達に関与する *mob* 遺伝子を有し、pBBR1MCS はこの pBBR1 に種々の薬剤マーカーと MCS を付与したプラスミドである。

【結果】

我々は、宿主域や複製保持に無関係であると考えられた *mob* 遺伝子を欠失したプラスミド(pBBR1MCSΔ*mob*)を構築した。推定と反し、pBBR1MCSΔ*mob* はγ–プロテオバクテリアの大腸菌や *Pseudomonas* では複製保持可能であったが、β–プロテオバクテリアの *Burkholderia* や *Acidovorax* では pBBR1MCSΔ*mob* の形質転換体が得られず、*mob* 遺伝子欠失により pBBRMCS1 宿主域の縮小が認められた。我々の実験結果は、接合伝達のみに関与すると考えられていた *mob* 遺伝子が、宿主域を規定するという新規な機構の存在を支持している。現在、我々は Mob タンパク質が接合伝達時に nick を導入する接合伝達開始配列が DNA 複製時にも関与すると仮説を立て、実験を行っており、新規な宿主域規定機構を解明しつつある。

plasmid, host range, replication

発表責任者：岸田　康平（kishida@ige.tohoku.ac.jp）

講演番号：3C5a02
講演日時：3 月 26 日 09:11～ 1 号館 C5 会場

Protein-protein binding affinities of H-NS family proteins encoded on the chromosome of Pseudomonas putida KT2440 and IncP-7 plasmid pCAR1

○Yue SUN[1], Zongping Sun[1], Delyana Vasileva[1], Chiho Suzuki-Minakuchi[1], Kazunori Okada[1], Hideaki Nojiri[1,2] ([1]BRC, UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

[Background & Objectives] Nucleoid-associated proteins (NAPs) mediate compaction of chromosomal DNA and act as global regulators of gene expression. Histone-like protein H1 (H-NS) family proteins, one of the best characterized NAPs, have been implicated in repression of genes acquired through horizontal gene transfer and higher-order oligomerization is essential for their function as repressors. TurA and TurB encoded on the chromosome of *Pseudomonas putida* KT2440 and Pmr encoded on the carbazole-degradative plasmid pCAR1 belong to H-NS family proteins. The three homologs commonly have an N-terminal oligomerization domain composed of a central and a terminal dimerization sites. Previously, we demonstrated that TurA, TurB and Pmr can form homo- and hetero-oligomers composed of homo- and hetero-dimers, and act cooperatively to regulate the transcriptional networks in plasmid-harbouring cells. To gain better understanding of the hetero-oligomer formation manners of the three homologs, we aimed at examining their heteromeric complex formation capacities at the central and terminal dimerization sites independently. Binding affinities at the central dimerization site have been determined by performing protein-protein cross-linking experiments with protein variants inactivated at the terminal dimerization site. The results suggested stronger affinities between the central dimerization sites of the chromosomally encoded TurA and TurB than between either of them and the pCAR1 encoded Pmr. In this work, we focused on evaluation of the binding affinities at the terminal dimerization site among the three H-NS family proteins.

[Method & Results] We evaluated the interaction between a truncated TurB variant (TurB_nt_{50}) containing only a functional terminal dimerization site and full-length TurA, TurB and Pmr using protein-protein cross-linking experiments followed by Tricine-SDS-PAGE. The results suggested that TurB exhibited higher affinities for oligomer formation with TurB itself and TurA, but not the pCAR1 encoded Pmr. TurA_nt_{50} and Pmr_nt_{50} were recovered only in the insoluble fraction and attempts to optimize the expression conditions were unsuccessful. Therefore, we constructed shorter variants: TurA_nt_{42}, TurA_nt_{47} and Pmr_nt_{42} and confirmed they have a functional terminal dimerization site. In order to evaluate the interaction between variants and full-length proteins at the terminal dimerization sites of TurA and Pmr, we are currently performing cross-linking experiments in a similar fashion as for TurB.

H-NS, nucleoid-associated protein, Pseudomonas

発表責任者：野尻秀昭（anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3C5a03
講演日時：3 月 26 日 09:22～ 1 号館 C5 会場

核様体タンパク質の一種 NdpA ホモログの多量体形成能の解析

Multimerization of NdpA homologs, one of the nucleoid-associated proteins found in Gram (-) strains

○佐道 陽弘[1]、水口 千穂[1,2]、岡田 憲典[1]、野尻 秀昭[1,2] ([1]東大・生物工学セ、[2]東大・微生物連携機構)
○Akihiro SADOH[1], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1,2], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1,2] ([1]BRC, UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

【背景・目的】核様体タンパク質 (nucleoid-associated proteins; NAPs) は、細菌細胞内で DNA を曲げる、架橋する、巻き付けるなどすることで核様体構造の形成・変化に関与するタンパク質である。NAPs の結合による核様体構造の変化の結果、ゲノム上の遺伝子の転写は変化することが知られている。NAPs の一種である NdpA ホモログは多くのグラム陰性細菌に保存されている一方で、既知のドメイン構造やモチーフ構造が認められない。大腸菌染色体にコードされるホモログである YejK については 1999 年に単離され [Murphy et al., 1999, *JB*, 181:3842-44]、その後 DNA 結合能を持つこと、多量体を形成すること、DNA gyrase 及びトポイソメラーゼ IV と相互作用すること、*yejK* の破壊株と野生型株の間には目立った表現型の差がないことが報告されている [Lee et al., 2013, *JBC*, 288:31503-16]。しかし、他の NdpA ホモログに関しては世界的にみてもほとんど研究が進んでいない。本研究では、NdpA ホモログの基本性質を解明すると共に、各種の NdpA ホモログの機能を比較するために *Pseudomonas putida* KT2440 株染色体にコードされている NdpA とプラスミド pCAR1 にコードされている NdpA ホモログである Pnd を対象として、それぞれの多量体形成能を評価した。

【方法・結果】His タグを付加した NdpA 及び Pnd を大腸菌 BL21(DE3)株を宿主として発現させた後 His タグアフィニティー精製に供した。得られた精製タンパク質溶液を用いてクロスリンク法及びゲルろ過クロマトグラフィーによって多量体形成能を評価した。NdpA, Pnd どちらについても、クロスリンク法では 2 量体及び 4 量体由来のバンドを確認することができ、またゲルろ過クロマトグラフィーでは単量体の約 3 倍の分子量に対応する溶出体積にピークが確認された。これらの結果より、どちらのタンパク質も多量体を形成することが示唆された。

次に多量体化に関与する領域を推定することを目的として、NdpA の一部分のみを発現させた NdpA の派生体を用いてクロスリンク法を行った。本実験では、NdpA (335 aa) の C 末端 67, 134, 201, 268 残基を発現させたタンパク質 (NdpA_ct_67, 134, 201, 268) を用いている (Fig. 1)。これまでに、発現精製に成功した NdpA_ct_67 をクロスリンク法に供した結果、2 量体由来のバンドが確認された一方で、4 量体由来のバンドは確認されなかった。このことから NdpA の C 末端 67 残基は多量体形成に重要な領域ではあるが他にもそのような領域が存在する可能性が示唆された。

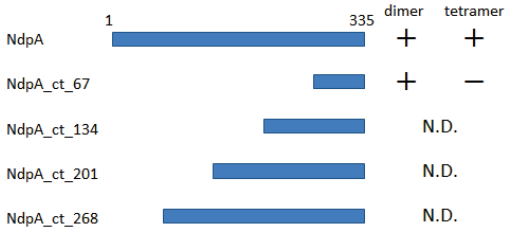


Fig. 1. 本実験で用いている NdpA の派生体

nucleoid-associated proteins, multimerization, *Pseudomonas*

発表責任者：野尻秀昭（anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3C5a04
講演日時：3 月 26 日 09:33～ 1 号館 C5 会場

Thermus oshimai JL-2: A model organism to study evolution of aromatic hydrocarbon degradation pathways in thermophiles

○Joydeep CHAKRABORTY[1], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1,2], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1,2] ([1]Biotechnology Research Center, The Univ. of Tokyo, [2]Collaborative Research Institute for Innovative Microbiology, The Univ. of Tokyo)

[Objective] Extraction of fermentable sugars from lignocellulose is the key to develop efficient methods generating bio-based 'second generation' fuels. However, aromatic compounds released from lignin depolymerization during the process are often toxic in nature (Beckham et al., Curr. Opin. Biotechnol., 2016). Though much emphasis has been given on lignin biodegradation to obtain industrially important valued commodities, relatively few studies have dealt with transformation of lignin-derived mono-aromatic compounds (de Gonzalo et al., J. Biotechnol., 2016). Because lignocellulose degradation and subsequent steps are often performed at higher temperatures, thermostable enzymes are the most desired tools to carry on the processes. Till now, very few studies have addressed the role of thermophiles in processing lignin derived arenes, but there is absolutely no information on the degradation pathways present in thermophiles. A unique oxidoreductase gene cluster was identified in one of the plasmids of strain JL-2 based on a previous study (Chakraborty et al., AMB Exp., 2017). The present study is aimed at exploring a novel catabolic pathway involved in degradation of *p*-hydroxybenzoate (PHB), one of the components of lignin monomers, by *Thermus oshimai* strain JL-2 and gain insights into the genesis and evolution of the said pathway in the organism.
[Methods] Prediction of gene function and catabolic pathway mapping were done using Conserved domain (CD) database, MetaCyc and KEGG pathway database. Utilization of substrates by growing or resting-cell cultures of strain JL-2 was monitored by reverse-phase HPLC analysis of culture extracts. The cell-free extracts of JL-2 cells incubated in absence (control) or presence of substrates were assayed for enzymatic transformation of catechol and protocatechuate using UV-visible spectrophotometer. Six different putative genes in the catabolic cluster have been targeted for homologous recombination-based deletion using a thermostable kanamycin (*htk*) cassette. **[Results]** Degradation studies were performed based on catabolic pathway mapping and prediction of substrates, which showed that the strain can degrade PHB which also acts as an inducer of the operon. We have also detected the involvement of thermostable catechol 2,3-dioxygenase and a protocatechuate decarboxylase in the process through spectrophotometric studies, which suggests that the degradation proceeds via protocatechuate and catechol. Gene disruption and phenotype assay of the deletion mutants are underway to confirm the role of individual gene.
[Conclusions] It is known that catabolic pathways in bacteria often progress through 'vertical expansion' whereby, new peripheral routes are acquired that channel newly encountered substrates into existing degradative pathways. This often occurs by recruitment of entire operon or discrete genes encoding iso-functional enzymes. The catabolic gene cluster under study in strain JL-2 is unique in its genetic structure, conserved among few Thermales and shows evidence of gene recruitment from taxonomically diverse class of bacteria. Also, degradation of PHB proceeds via decarboxylation of protocatechuate (and not via its usually observed ring cleavage), which has industrial implication as well. All these observations make the strain an ideal subject to study the evolution and regulation of aromatic hydrocarbon degradation pathways in thermophiles.

Lignin-derived aromatics, Thermophile, Pathway evolution

発表責任者：NOJIRI Hideaki（anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3C5a05
講演日時：3 月 26 日 09:44～ 1 号館 C5 会場

Experimental evolution of haloalkane dehalogenases toward degradation of an organochlorine pesticide

○Nannan CHEN, Yoshiyuki Otsubo, Masataka Tsuda, Yuji Nagata (Tohoku University)

【**Background and Purpose**】Haloalkane dehalogenases (HLDs) convert halogenated compounds to corresponding alcohols by simple hydrolytic mechanism. It has been revealed that many bacterial strains possess HLD homologues. Such potential HLDs are promising materials for the development of new biocatalysts, since HLDs generally have a broad range of substrate specificities. LinB is one of prototypical and well-studied HLDs and was originally identified as an enzyme that catalyzes the second step for the utilization of a man-made chlorinated pesticide γ-hexachlorocyclohexane (γ-HCH) in *Sphingobium japonicum* UT26. Other various γ-HCH degraders have been isolated from HCH-isomers-contaminated sites around the world, and they also have identical or almost identical LinBs. In other words, no γ-HCH degrader has been isolated that uses other HLDs besides LinB for the γ-HCH utilization. To gain an insight into the functional evolution of HLDs toward the γ-HCH utilization, we constructed experimental evolution systems.

【**Methods**】UT26-derivatives, in which the *linB* gene was deleted or replaced by other HLD genes, were constructed. γ-HCH degradation and utilization abilities of the resultant strains were assayed by gas chromatography with electron capture detector and growth on solid minimal salt medium supplied γ-HCH as a sole carbon source (γ-HCH plate), respectively. As *in vivo* evolution system, such strains having various HLD genes were incubated on the γ-HCH plate, and evolved strains that grow well on the plated were screened. On the other hand, as *in vitro* evolution system, random mutations were introduced into the HLD genes by error-prone PCR, and the mutant gene libraries were introduced into the *linB*-deletion strain. Among the resultant transformants, clones that grow well on the γ-HCH plate were screened.

【**Results and Discussion**】Among the constructed UT26-derivatives having various HLD genes, some strains showed weak LinB activity, indicating that some HLDs besides LinB can potentially be involved in the γ-HCH utilization. These engineered strains are good starting materials for tracking the evolution process of HLDs toward the optimized γ-HCH utilization. By using the *in vivo* and *in vitro* evolution systems, some candidate clones that grow well on the γ-HCH plate were obtained, suggesting that our systems worked. Their analyses including the sequencing of their HLD genes are in progress.

evolution, pesticide, dehalogenase

講演番号：3C5a06
講演日時：3 月 26 日 10:05～ 1 号館 C5 会場

大腸菌リジン脱アセチル化酵素 CobB の N 末端配列の機能解析
Functional analysis of the N-terminal sequence of Lysine deacetylase CobB from E. coli
○楳原 琢哉 [1]、西山 真 [1,2]、古園 さおり [1,2,3] ([1] 東大・生物工学セ、[2] 東大・微生物連携機構、[3] 理研 CSRS)
○Takuya UMEHARA[1], Makoto NISHIYAMA[1,2], Saori KOSONO[1,2,3] ([1]BRC, UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]RIKEN-CSRS)

近年、真正細菌においても多くのタンパク質中のリジンがアセチル化修飾を受けることが明らかにされ、注目されている。大腸菌におけるアセチル化はアセチル基転移酵素により酵素的に、あるいはアセチルリン酸により非酵素的に導入され、脱アセチル化酵素 CobB によって除去される。特異性の低い非酵素的なアセチル化は様々なタンパク質の構造や機能に影響を及ぼすと推測されるため、正常な生命活動の維持には脱アセチル化酵素の役割が極めて重要であると考えられる。我々は大腸菌において、*cobB* 遺伝子から N 末端の長さが異なるアイソフォーム CobB-L と CobB-S が発現することを最近報告した（Umehara et al, *Genes* 2018）。CobB-S の翻訳は CobB-L と同じ読み枠の 2 番目のメチオニンから開始されるため、CobB-L は CobB-S よりも 37 アミノ酸長い N 末端配列をもつ。この末端配列は塩基性と疎水性アミノ酸で構成されたユニークな配列をしており、腸内細菌科で保存されている。従って、何らかの意味をもつと考えられるが、その役割は分かっていない。そこで本研究では CobB-L の N 末端配列の機能を明らかにすることを目的とした。

N 末端配列の機能を解析するため、His-tag を融合した CobB-L を取得した。CobB-L の大腸菌での発現に成功したが、溶出画分に多量のリボソーム RNA の混入が見られた。このことから我々は CobB-L はリボソームと相互作用していると考え、His-tag 融合リボソームによるプルダウンアッセイを行った。溶出したリボソーム画分には CobB-L のみが含まれ、CobB-S は含まれなかった。また、CobB-L はリボソームの大サブユニットと相互作用していることが分かった。更に、CobB-L の N 末端配列を eGFP の N 末端側に融合すると、この eGFP はリボソームと相互作用した。N 末端配列が相互作用するリボソーム上の部位を同定するため、遺伝暗号拡張法を用いて CobB-L の N 末端配列に *p*-ベンゾイルフェニルアラニンを導入して、UV クロスリンク実験を行なった。クロスリンクされたタンパク質分子の質量分析を行った結果、リボソームタンパク質 L4 が同定された。

以上の結果から、CobB-L の N 末端配列はリボソームに局在するシグナル配列であることを明らかにした。相互作用が見出されたリボソームタンパク質 L4 はリボソームのイグジットトンネル近傍にあることから、CobB-L はタンパク質翻訳の制御に関わっていることが示唆された。

Lysine acetylation, Escherichia coli, Ribosome

発表責任者：楳原 琢哉（utumehara@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3C5a07
講演日時：3 月 26 日 10:16～ 1 号館 C5 会場

Corynebacterium glutamicum 由来 PDH-ODH 超複合体の性状解析
Characterization of the PDH-ODH supercomplex from *Corynebacterium glutamicum*
○衣川 寛知[1]、小峰（阿部）理乃[1]、西山 真[1,2]、古園 さおり[1,2,3]（[1]東大・生物工学セ、[2]東大・微生物連携機構、[3]理研 CSRS）
○Hirokazu KINUGAWA[1], Ayano KOMINE-ABE[1], Makoto NISHIYAMA[1,2], Saori KOSONO[1,2,3]
([1]BRC, UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]RIKEN-CSRS)

《背景》

ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体 (PDHc)及び 2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ複合体(ODHc)は 3 つのサブユニット (E1、E2、E3)で構成される巨大な酵素複合体であり、凝集した E2 サブユニットをコアとしてその周囲に複数の E1・E3 サブユニットが結合している。*Corynebacterium glutamicum* のグルタミン酸生産では PDH や ODH の活性調節が重要と言われており、これらの酵素はタンパク質リジンアセチル化やスクシニル化の基質の供給においても重要である。一般に、PDHc と ODHc は共通した E3 サブユニットを持ち、E1・E2 についてはそれぞれ固有のサブユニットを持つが、*C. glutamicum* は E2 サブユニットをコードする遺伝子を１つしか持っておらず、PDHc と ODHc が E2 コアを介して超複合体を形成するユニークな特徴を持つ。我々は、超複合体におけるサブユニット組成の変化により PDH, ODH 活性が調節されるメカニズムの可能性を考え、未知の部分が多い PDH-ODH 超複合体の解析を進めている。

《方法および結果》

PDH-E1 サブユニット (E1p)または ODH-E1 サブユニット (E1o)をアフィニティータグで標識した株を用いて超遠心分画とウェスタンブロットを行い、PDH-ODH サブユニットの動態を調べた。*C. glutamicum* 由来 PDH-ODH 複合体は、大腸菌由来 PDHc や ODHc と比べて小さい分子サイズを持つと考えられた。また、E2 を含まない高分子量フラクションに E1p および E1o が検出され、E1p と E1o が未知のタンパク質と複合体を形成していることが示唆された。

大腸菌組換えタンパク質を用いて PDHc および ODHc の *in vitro* 再構成を試みた。E3 サブユニットをアフィニティータグで標識した共発現系を用いて、E2-E3 サブユニットを共精製した。E2-E3 精製画分に精製 E1p または E1o サブユニットを添加することにより PDH および ODH 活性を検出することができた。E1p と E1o の両方を添加したところ、各サブユニット単独よりも各活性の抑制が見られ、両サブユニットが E2-E3 に対して競合する傾向が認められた。*In vitro* で混合したサンプルをゲルろ過クロマトグラフィーで分析したところ、ODH 活性を示すフラクションを分離することができた。以上の結果より、PDH-ODH 複合体の *in vitro* 再構成ができつつあると考えている。今後は、再構成できた複合体における各サブユニット組成比の算出や活性との相関、アシル化修飾がサブユニット組成比に与える影響を調べて行きたいと考えている。

Pyruvate dehydrogenase, 2-Oxoglutarate dehydrogenase, Corynebacterium glutamicum

講演番号：3C5a08
講演日時：3 月 26 日 10:27～ 1 号館 C5 会場

枯草菌芽胞の発芽過程における DNA 結合タンパク質と核様体の構造変化に関する解析

Analysis on the structural change of DNA binding proteins and nucleoid during the germination of Bacillus subtilis spores

○桑名 利津子、大島 裕也、山澤 龍治、伊藤 潔、高松 宏治 (摂南大薬)
○ RITSUKO KUWANA, OSHIMA YUYA, RYUJI YAMAZAWA, KIYOSHI ITO, HIROMU TAKAMATSU (Setsunan Univ.)

枯草菌は栄養源の乏しい環境下におかれると耐熱性と長期休眠能を備えた芽胞（胞子, endospore）を形成する．栄養細胞と芽胞の細胞内に含まれる物質の組成や核様体の構造は大きく異なる．芽胞の細胞質はコアと呼ばれ，極度な脱水状態で大量のジピコリン酸カルシウムを含み，染色体 DNA に低分子酸可溶性タンパク質（以下 SASPs，small acid-soluble spore proteins）が結合している．コア内では細胞機能の維持に必要な核酸やタンパク質などの生体分子が不活化されていることから，芽胞は代謝活性を示さず，長期間休眠できる．発芽反応が始まると，コア内に水が浸潤することにより，芽胞の休眠状態が解除される．発芽過程において，コア内に含まれる核酸やタンパク質などの *de novo* synthesis がどのようにして始まるかは明らかになっていない．本研究では，抗生物質などを用いて細胞機能を阻害することにより，発芽反応開始後の核様体の構造変化に関与する因子について明らかにすることを目的とした．

発芽開始後，発芽過程においてコア内に水が浸潤することにより，GPR（germination protease）が活性化され，芽胞の染色体 DNA に結合した SASPs の多くは GPR により分解されることが報告されている．枯草菌 168 株と SASPs の 1 つである SspB タンパク質に GFP を融合させた遺伝子組換え体 SSPB8G 株を用いて精製芽胞を調製し，発芽及び発芽後成長過程における核様体の構造変化と SspB-GFP タンパク質の局在部位の解析を行った．

蛍光顕微鏡を用いた SspB-GFP の蛍光観察結果から，薬剤無処理の芽胞では，発芽から発芽後成長への移行に伴い核様体の凝集が解除され，SspB-GFP タンパク質の分解が観察された．各種薬剤存在下で発芽反応は阻害されなかったが，発芽後成長が阻害された．クロラムフェニコール，レボフロキサシン，リファンピシン，ヘキスト存在下においては，芽胞の発芽過程において SspB-GFP タンパク質の分解が阻害された．一方で，レボフロキサシンまたはヘキスト存在下で発芽させた芽胞では，部分的に凝集した核様体が観察された．これらの結果から，発芽後成長における転写阻害，タンパク質合成阻害，DNA トポイソメラーゼ阻害，および DNA インターカレーションにより GPR または何らかのプロテアーゼの活性化が阻害されることが示唆された．核様体の構造変化と SASPs の分解には，発芽後成長への移行段階で *de novo* synthesis が必要であることが示唆された．

spore, nucleoid, germination

講演番号：3C5a09
講演日時：3 月 26 日 10:38～ 1 号館 C5 会場

枯草菌における機能改変した RecA による非相同遺伝子間の相同組換えの解析

Analysis of homologous recombination between heterologous genes by RecA proteins of altered function in Bacillus subtilis.

○田中 竣平、朝井 計（東農大バイオ）
○SHUMPEI TANAKA, KEI ASAI (Tokyo Univ.of Agric.)

水平伝播はバクテリアにおいて薬剤耐性能や大腸菌 o-157 のような毒素生産能の獲得の原因とされ、進化の原動力である。外来遺伝子の獲得のうち相同領域を足場に自らの染色体にモザイク的に遺伝子を挿入する染色体形質転換においてはほぼすべてのバクテリアに保存されている RecA による相同組換えに依存しているが、染色体と外来遺伝子の相同性が低い(宿主と遠縁の)場合には相同組換えが非常に起こりにくいことが知られている。そもそも RecA は細胞内の ssDNA 上に重合し、宿主のゲノムの中から相同配列を認識して ATP 依存的に相同組換えを行うが、相同配列認識の詳細なメカニズムが解明されていない。

RecA の機能を改変し、従来効率的に組換えることができなかった相同性の低い遠縁バクテリアゲノムをモザイク的にでも宿主ゲノムに組み込むことで RecA の相同配列認識機構の解明だけでなく試験管内において自然界で起こりえた時間のかかった水平伝播的な進化実験を効率的に行うことが可能になると考え実験を行った。

形質転換能が高いモデル細菌である枯草菌 168 株(trpC-)を宿主に、相同性の異なる trpC 遺伝子をもつ 2 種類の枯草菌に近縁のバクテリアのゲノム(trpC+)を供与 DNA にし、トリプトファン非要求性への形質転換実験を RecA の機能評価系とした。RecA の機能改変として、PCR によるランダム変異誘発で相同配列認識が曖昧な変異 RecA の取得を試みた。また、短い相同配列で組換えがおこる大腸菌 RecA や、光による DNA 傷害の修復のために高発現しているシアノバクテリア RecA は枯草菌 RecA と性質が異なると考え、機能改変 RecA の候補とし、枯草菌内で発現誘導できるようにゲノムへ導入した。(それぞれ EcRecA, SyRecA)。

PCR ランダム変異による変異 RecA に関しては、誘導することにより定常期に入れなくなる変異 RecA を作出した。枯草菌 recA 破壊株において各異種 RecA の相補性を確認したところ、EcRecA は形質転換能について相補性が見られたのに対して SyRecA では相補性が見られなかった。それぞれの RecA の発現をウエスタンブロッティングで確認したところシアノバクテリア RecA の発現が微量であることが分かった。

recombination, horizontal gene transfer, *Bacillus subtilis*

講演番号：3C5a10
講演日時：3 月 26 日 10:49～ 1 号館 C5 会場

好酸性従属栄養細菌への外来遺伝子組換え発現系の開発
Heterologous expression in the acidophilic heterotrophic bacteria.
○金尾 忠芳、藤原 孝太、上村 一雄（岡山大院・環境生命）
○Tadayoshi Kanao, Kota Fujiwara, Kazuo Kamimura (Grad. School of Environ. & Life Sci., Okayama Univ.)

【背景】鉄硫黄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* は、生育至適 pH が２～３の好酸性化学合成独立栄養細菌である。本菌は、２価鉄や還元型無機硫黄化合物を酸化し、得られた還元力とエネルギーによって炭酸同化を行うことが大きな特徴である。この２価鉄や硫黄化合物のエネルギー代謝は、主に外膜、ペリプラズム空間と内膜に局在するタンパク質（酵素）によって行われていることが報告されている。そしてこれらのタンパク質（酵素）は、本菌やそれに類似する好酸性の硫黄酸化微生物においてのみ発見されている特徴的なものも少なくない。これらを研究するにあたって十分量の酵素タンパク質を確保することは必要不可欠であるが、本菌は独立栄養細菌であり大量培養は困難である。そこで大腸菌などを宿主として用いた遺伝子組換え発現が強力なツールとして用いられているが、現在利用されている組換え発現の宿主は中性の微生物である。我々は *A. ferrooxidans* の硫黄代謝に関わる極めてユニークな酵素：テトラチオン酸ハイドロラーゼの遺伝子（*Af-tth*）を同定し、これを大腸菌内で組換え発現させることができた。しかしながら得られた組換えタンパク質（*Af*-Tth）は不溶性の封入体を形成し本酵素活性は検出できなかったが、この封入体を酸性条件下で refolding 処理することで活性型酵素の獲得に成功した。以上のことから、*Af*-Tth のように好酸性細菌の酸性条件下で機能するタンパク質は、大腸菌のように中性の微生物を宿主として組換え体を獲得することには限界があることが判明した。そこで我々は、好酸性菌由来の酵素を遺伝子組換えにより大量に獲得するため、組換え発現の宿主として酸性条件下で増殖力の優れた好酸性従属栄養細菌を利用した外来遺伝子導入方法の開発に取り組んだ。
【方法と結果】遺伝子組換えの宿主として好酸性従属栄養細菌の一種、*Acidiphilium cryptum* JF-5 株を用いた。種々の炭素源にて培養した JF-5 株の全菌体タンパク質を SDS-PAGE により解析した結果、グリセロールを C 源とした際にグリセロールキナーゼ遺伝子が特異的に強く発現することを明らかにした。そこでグリセロールキナーゼ近辺の遺伝子解析をデータベースから行い、候補となるプロモーター領域を３箇所特定した。これら３つの推定されるプロモーター領域を緑色蛍光タンパク質 GFP 遺伝子に結合した発現ベクターを作成、エレクトロポレーション法により JF-5 株に導入した。その結果、グリセロール培地において緑色蛍光を放つコロニーの取得に成功した。現在、GFP 遺伝子を *Af-tth* に置換した発現ベクターの構築を行っており、好酸性従属栄養細菌を宿主とした *Af-tth* の組換え発現と活性型酵素の直接的獲得を目指している。

recombinant expression, acidophiles, *Acidiphilium cryptum*

発表責任者：金尾忠芳（tkanao@okayama-u.ac.jp）

講演番号：3C5a11
講演日時：3 月 26 日 11:10～ 1 号館 C5 会場

デアミナーゼ及びハロアルカンデハロゲナーゼドメインから成る新規融合タンパク質の酵素学的研究

Enzymological study on a novel fusion protein consisting of deaminase and haloalkane dehalogenase domains

○中鉢 千尋、佐藤 優花里、大坪 嘉行、津田 雅孝、永田 裕二（東北大院生命科）
○Chihiro CHUBACHI, Yukari SATO, Yoshiyuki OHTSUBO, Masataka TSUDA, Yuji NAGATA (Tohoku Univ.)

【背景・目的】
ハロアルカンデハロゲナーゼ（HLD）は、加水分解反応により基質のハロゲン基を水酸基に置換し、一般に基質特異性が広く様々な有機ハロゲン化合物を基質とすることから、様々なハロゲン化合物による環境汚染浄化や有用物質合成の生体触媒としての応用が期待されている。我々は、PCB/biphenyl 分解細菌 *Acidovorax* sp. KKS102 株ゲノムより N 末端側に大腸菌の tRNA 修飾酵素（TadA: tRNA adenosine deaminase A）と有意な相同性を示す DAM ドメインが融合した HLD をコードする遺伝子（*dahX*）を見出した。さらに、大腸菌の *tadA* が必須遺伝子であるのに対して、*dahX*（特に DAM ドメインをコードする部分）は KKS102 株で必須ではないが、生育に重要であることを明らかにしている。また、DAM-HLD 融合型遺伝子は *Betaproteobacteria* に属する *Acidovorax* 類縁株に広く保存されており、融合型タンパク質として存在することに何らかの意義があると推測される。本研究では、DahX および HLD と DAM の各ドメインの酵素学的特性を検討し、融合型タンパク質の生物学的意義を明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】
C 末端に His タグを付与した DahX および HLD と DAM の各ドメインを大腸菌で大量発現・精製した。DAM ドメインと最も高い相同性を示す大腸菌の TadA は $tRNA^{Arg}_A_{34}CG$ の 34 位のアデニンを脱アミノ化してイノシンに変換する。DahX は脱アミノ化に必須なアミノ酸残基が保存されていることから TadA と同様の活性を有すると考えられた。そこで、KKS102 株の $tRNA^{Arg}_A_{34}CG$ を *in vitro* 転写系で合成し、DahX の本基質に対する脱アミノ化活性を検討した。アデニンがイノシンに変換されると、イノシンはシトシンと塩基対を形成するため、塩基配列解析でグアニンとして検出される。$tRNA^{Arg}_A_{34}CG$ と DahX を反応させたところ、当該部位にグアニンのピークが検出されたため、DahX は TadA 同様の脱アミノ化活性を有し、本活性は DAM ドメインに起因すると示唆された。また、TadA はホモ二量体を形成して tRNA に結合する。ゲル濾過クロマトグラフィーにより DahX の溶液中での分子量を解析したところ、90%以上が二量体として存在していた。一方、DahX および HLD ドメインの HLD 活性の基質特異性についても、現在検討を行っている。

dehalogenase, deaminase, fusion protein

講演番号：3C5a12
講演日時：3 月 26 日 11:21～ 1 号館 C5 会場

枯草菌 2-オキソグルタル酸脱水素酵素複合体の遷移期における機能解析
Functional analysis of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex in *Bacillus subtilis* during transition state
○山口 将司、吉川 博文、朝井 計（東農大 バイオ）
○Masashi YAMAGUCHI, Hirofumi YOSIKAWA, Kei ASAI (Tokyo Univ. of Agric.)

【目的】
枯草菌の胞子形成期には、TCA 回路が活性化し、酸化的リン酸化によって大量の ATP が生産され、胞子形成に必要なエネルギーを供給すると言われているが、その詳細なメカニズムは分かっていない。TCA 回路の破壊株の解析をしたところ、枯草菌の TCA 回路における 2-オキソグルタル酸脱水素酵素複合体（ODHc）をコードする遺伝子（*odhA,odhB*、*pdhD*）を欠損させた株では、LB 培地の増殖で定常期以降急激に溶菌し、胞子形成培地では急激な溶菌は起らないものの胞子を全く形成しなかった。このことから、ODHc がどのように胞子形成と TCA 回路に関わっているかを明らかにすることを目的としている。
【方法・結果】
まず、OdhB 欠損株において、胞子形成のどの過程が阻害されているのかを検証するために、胞子形成開始のマスターレギュレーターである *spo0A* の活性を LacZ を用いたレポーターアッセイで測定した。すると、OdhB 欠損株における胞子形成開始期（T0）において *spo0A* の活性は上がらなかった。このことから、OdhB 破壊株では胞子形成過程の初期段階で異常が起きていることが分かった。
次に、OdhB の C 末端に GFP をつけ、顕微鏡観察を行うと、対数期は細胞内全体に散在しているが、T0 になると凝集することが分かった。また、胞子形成培地である 2×SG 培地で経時的にサンプリングし、OdhB の発現量をみると、T0 期において、OdhB の発現量が最大となり、以降分解されていた。このことから、OdhB は胞子形成開始期に量的、質的制御をしていることが示唆された。
さらに、OdhB に胞子形成に特異的な機能があるかを検証するために、非胞子形成細菌である大腸菌の ODHc を枯草菌の ODHc に置換し、機能相補できるかを検証した。OdhB を大腸菌の SucB に置換した株では、溶菌の抑圧、及び WT と同レベルまでの胞子形成能が回復した。更に、OdhAB を SucAB に置換した株の作製を行なったところ、SucAB 置換株では溶菌現象、及び胞子形成不全は回復しなかった。これは OdhA に胞子形成に特異的な関与があるのではないかと考えている。
現在、解糖系のピルビン酸脱水素酵素複合体と TCA の 2-オキソグルタル酸脱水素酵素複合体の両方で働く PdhD に着目し、OdhB 破壊が与える影響を解析している。

TCA cycle, OdhB

発表責任者：山口将司（familybox.111@gmail.com）

講演番号：3C5a13
講演日時：3 月 26 日 11:32～ 1 号館 C5 会場

枯草菌を用いた分子シャペロンによる変異緩衝作用についての検証

Analysis of buffering action of mutations by molecular chaperone in Bacillus subtilis

○加納 啓吾、北村 夏美、法花津 匠、大塚 まみ、武井 若紗、小菅 是子、朝井 計、吉川 博文（東京農大・院・バイオ）
○Keigo KANOU, Natsumi KITAMURA, Takumi HOKKETSU, Mami OHTSUKA, Wakasa TAKEI, Naoko KOSUGE, Kei ASAI, Hirofumi YOSHIKAWA (Tokyo Univ. of Agric)

【背景・目的】

分子シャペロンには変異による影響を緩衝し、変異を蓄積する機能がある事がいくつかの生物で報告されている。我々はグラム陽性菌のモデル生物である枯草菌を用い、*rpoB* 変異によるリファンピシン耐性を表現系の指標として、Hsp60 である GroEL とそのコシャペロンである GroES をマルチコピープラスミドによる過剰発現下で *rpoB* 変異頻度を算出したところ出現頻度が減少した。GroES/L の発現量が 2 コピー株では緩衝作用が見えなかったが、GroES/L に変異を緩衝する機能がある事が示唆された。さらに、変異の種類と表現型の関係性について解析した結果、リファンピシン耐性の変異点によって緩衝作用の強度に差が見られることが分かった。ここで見られた緩衝作用が分子シャペロン普遍的な現象か検証するため Hsp70 である DnaK とそのコシャペロンである DnaJ,GrpE に着目し検証を試みた。

【方法・結果】

Hsp70 である DnaK とそのコシャペロンである DnaJ,GrpE（EKJ）を用いて同様の解析を行った。増殖に必須な GroES/L と異なり、EKJ は破壊可能であるので、EKJ 誘導発現株を構築し破壊株と比較することとした。作製した株では、EKJ 破壊による高温での増殖阻害が、転写誘導によって相補され、導入した誘導系が機能していることを確認した。次に GroES/L と同様にリファンピシン耐性を表現型の指標として、EKJ による変異緩衝作用の検証を試みた。リファンピシンに対する耐性菌の出現頻度をもとめたところ、EKJ 誘導発現下で出現頻度に差は見られなかった。しかし耐性菌の表現型に差が見られ、EKJ 誘導発現下で耐性菌のコロニーサイズが大きくなる変化が多く見られた。しかしこれは EKJ の発現に関連した GroES/L の発現量の変化による現象だと結論づけた。

rpoB に加え uracil phosphoribosyltransferase をコードする遺伝子、*upp* に着目し検証を進めた。5-FU を添加する事で 5-FU が *upp* によって代謝経路に組み込まれ、細胞死が引き起こされる。また *upp* に変異を持つ事で 5-FU に耐性を持つ事が知られている。そのため耐性菌を取得しシャペロンを誘導発現させた際に、シャペロンの緩衝作用により酵素活性が戻り、細胞死が誘導されるかどうかの系を構築した。始めに GroES/L ダブルコピーの株を用いて検証を行った。その結果 GroES/L の誘導、非誘導と比べてコロニーが生えてこなかった株が得られた。*rpoB* の時と違い GroES/L ダブルコピーの株でも緩衝作用が見られ、緩衝作用が働く発現量はターゲットにより異なると考えた。

Bacillus subtitles, Molecular chaperone, mutational buffering

講演番号：3C5a14
講演日時：3 月 26 日 11:43～ 1 号館 C5 会場

リボソームタンパク質 S14 置換による枯草菌キメラリボソームの作製と解析
Construction and analysis of the chimera ribosomes that contain S14 ortholog in *Bacillus subtilis*
○赤沼 元気[1]、河村 富士夫[1]、渡辺 智[2]、渡辺 正樹[2]、大川 典哉[2]、吉川 博文[2]、千葉櫻 拓[2]、朝井 計[2]、山田 康之[1] ([1]立教大生命、[2]東農大生命)
○Genki AKANUMA[1], Fujio KAWAMURA[1], Satoru WATANABE[2], Masaki WATANABE[2], Noriya OHKAWA[2], Hirofumi YOSHIKAWA[2], Taku THIBAZAKURA[2], Kei ASAI[2], Yasuyuki YAMADA[1] ([1]Rikkyo Univ., [2]Tokyo Univ. of Agric)

【背景と目的】 30S リボソームサブユニットを構成するリボソームタンパク質 S14 はリボソームタンパク質 S2 及び S3 の 30S への結合にも必須であるため、S14 を欠損すると翻訳活性を持つ 70S リボソームが構築されず、細胞は増殖できない。枯草菌には S14 が 2 種存在する。一方は亜鉛が結合するメジャーな S14（S14Bs）であり、もう一方は細胞内亜鉛濃度が低下した際に発現する亜鉛非結合型の S14（YhzA）である。YhzA は亜鉛濃度が低下した際に RpsN のバックアップとして機能する。バクテリアの種によって亜鉛結合型・非結合型 S14 の両方を有するものや、片方のみを持つものなど様々だが、亜鉛非結合型 S14 は亜鉛結合型 S14 よりも一様にサイズが大きいことから、S14 は亜鉛に依存するタイプから亜鉛に依存しないタイプへと進化してきたと我々は考えている。従って 30S サブユニットの S14 が結合する領域は両タイプの S14 が結合できるように比較的フレキシブルな構造を持つと考えられる。そこで上記の仮定を証明するための一助として、両タイプの S14 を使い分ける枯草菌が、S14Bs と比較して 40 残基程度サイズが大きく、亜鉛非結合型の大腸菌 S14（S14Ec）およびシアノバクテリア S14（S14Se）を利用することが可能なのかを検証するとともに、S14 を置換したリボソームの特性を理解することを目的とした。
【結果と考察】 S14Ec 及び S14Se をコードする遺伝子を枯草菌に導入し、それぞれの S14 の発現を誘導した条件で S14Bs 遺伝子の欠失に成功した。なお、YhzA によるバックアップ機能を無効にするため、これらの株ではあらかじめ *yhzA* 遺伝子を欠失させている。S14Ec と S14Se はそれぞれ枯草菌 70S リボソーム中に検出されたことから、S14Ec、S14Se はともに枯草菌 30S サブユニットに結合可能であり、S14Bs の機能を相補可能であると言える。しかしながら 70S リボソーム形成量は S14Bs > YhzA > S14Ec >> S14Se の順に低下し、細胞増殖速度もこれと相関を持って低下していたことから、その相補効率には大きな差があることが分った。また、YhzA 相補株では野生株に近い胞子形成能を示したが、S14Ec 及び S14Se 相補株の胞子形成能は著しく低下した。これらの株では不等隔壁の形成と染色体の凝集が観察されなかったことから、胞子形成開始期に異常が生じていると考えられる。本会では、S14Ec 及び S14Se が結合したリボソームの翻訳活性と、それぞれの S14 の枯草菌 30S サブユニットへの結合親和性を解析した結果についても併せて報告する。

ribosome, ribosomal protein S14, Bacillus subtilis

発表責任者：赤沼元気（akanuma@rikkyo.ac.jp）

講演番号：3C5a15
講演日時：3 月 26 日 11:54～ 1 号館 C5 会場

ビフィズス菌のトランスポゾン変異株を用いたα-グルコシダーゼ遺伝子の機能解明

Characterization of an α-glucosidase gene using a bifidobacterial transposon mutant

○阪中 幹祥[1,2,3]、中川路 伸吾[4]、中島 森[4]、阿部 光紗[4]、佐分利 亘[4]、森 春英[4]、横田 篤[4]、吹谷 智[4] ([1]デンマーク工大食品、[2]石川県大生資環、[3]日本学術振興会海外特別研究員、[4]北大院農)
○Mikiyasu Sakanaka[1,2,3], Shingo Nakakawaji[4], Shin Nakajima[4], Arisa Abe[4], Wataru Saburi[4], Haruhide Mori[4], Atsushi Yokota[4], Satoru Fukiya[4] ([1]Technical Univ. of Denmark, [2]Ishikawa Prefectural Univ., [3]JSPS Overseas Research Fellow, [4]Hokkaido Univ.)

【背景・目的】

ビフィズス菌はヒトや動物などの腸管内に生息する細菌であり、宿主に有用な効果を示すことが知られている。ビフィズス菌が腸管内で定着・増殖するためには、本菌による糖質の利用が鍵となると考えられているが、その分子機構は十分に明らかとなっていない。このような経緯を踏まえ、最近、我々はビフィズス菌において、挿入配列 IS*Blo11* 由来のトランスポゾンを用いたランダム変異導入系を開発した。本系を用いてビフィズス菌の変異株ライブラリーを構築する過程で、α-グルコシダーゼ遺伝子変異株を取得することができた。本研究では、この変異株の性状解析を行い、ビフィズス菌の糖質利用における α-グルコシダーゼ遺伝子の機能・役割を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

Bifidobacterium longum subsp. *longum* 105-A 株の α-グルコシダーゼ遺伝子 BL105A_1883 にトランスポゾンが挿入された変異株を供試菌株として用いた。はじめに、BL105A_1883 のトランスポゾン挿入変異は約 50 世代の培養でも安定であることが、継代培養試験とサザンブロッティング解析により示された。その後、野生株と BL105A_1883 変異株から無細胞抽出液をそれぞれ調製し、トレハロース（Glcα1-1αGlc）、イソマルツロース（Glcα1-6Fru）およびイソマルトース（Glcα1-6Glc）に対する α-グルコシダーゼ活性（グルコースの遊離速度）を測定した。その結果、変異株の α-グルコシダーゼ活性は野生株よりも有意に低く、BL105A_1883 はこれらのオリゴ糖の分解を担うことが示唆された。続いて、ビフィズス菌の糖質資化における BL105A_1883 の役割を明らかとするために、グルコース、トレハロース、イソマルツロースおよびイソマルトース存在下での野生株と BL105A_1883 変異株の生育試験を行った。グルコースやイソマルトース存在下では野生株と変異株間で生育能に差がなかったが、トレハロース存在下では変異株は全く生育できなかった。イソマルツロース存在下では変異株は生育できたものの、その生育能は野生株と比較して有意に低かった。以上より、BL105A_1883 はトレハロースおよびイソマルツロースの資化に寄与する α-グルコシダーゼ遺伝子であることが明らかとなった。この知見は、ビフィズス菌の腸管内定着および増殖の解明に大きく貢献すると考えられる（Sakanaka *et al.*, 2018, *Appl. Environ. Microbiol.*, **84**:e00824-18）。

bifidobacteria, carbohydrate, gut bacteria

発表責任者：吹谷 智（s-fukiya@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：3C5p01
講演日時：3 月 26 日 13:50～ 1 号館 C5 会場

Aspergillus luchuensis が生産する細胞壁多糖ニゲランの合成システムの解明
Elucidation of nigeran synthetic system of *Aspergillus luchuensis*
○上地 敬子、渡嘉敷 直杏、平良 東紀、水谷 治（琉球大農）
○Keiko UECHI, Jikian TOKASHIKI, Toki TAIRA, Osamu MIZUTANI (Ryukyu Univ. of Agric.)

【背景】

一部の *Aspergillus* 属や *Penicillium* 属糸状菌は，グルコース残基が交互に α-1,3 結合と α-1,4 結合を繰返すニゲランという細胞壁多糖を生産する。これまでに窒素飢餓条件下でニゲランの生産が活性化されると報告がなされているが，ニゲランの生理学的な役割やその生合成メカニズムについては不明な点が多い。近年，糸状菌の細胞壁は細胞骨格の維持以外に，環境ストレス応答や宿主への感染性等に関与することが明らかとなってきており，ニゲランも何らかの役割を担っていると推測される。我々は，泡盛醸造に利用される黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* を供試菌として世界で初めてニゲラン合成酵素遺伝子の同定に成功し，ニゲラン合成酵素遺伝子と隣接する 2 つの遺伝子の破壊株を作製し，細胞壁構成糖への影響や各種ストレス条件下での表現型への影響について検討したので報告する。

【方法と結果】

A. luchuensis NBRC4314 株を窒素源を含む（あるいは含まない）条件下で培養した菌糸体から Total RNA を抽出し，次世代シーケンサーMiSeq を用いてトランスクリプトーム解析を実施した。窒素飢餓条件下で発現量が優位に増加する推定 α-グルカン合成酵素遺伝子（*geneX*）を見出した。また，本遺伝子に隣接する 2 つの遺伝子（*geneY*, および *geneZ*）も *geneX* と同様の発現挙動を示した。上記遺伝子群がニゲラン合成に関与しているか調べるために，*A. luchuensis* Δ*ligD*::*ptrA* 株を親株としてアグロバクテリウム法によって形質転換を行い，各種遺伝子破壊株を得た。各遺伝子破壊株を窒素飢餓条件下で培養し，ニゲランを調製した結果，Δ*geneX* 株のニゲラン生産能がほぼ完全に失われた。また，Δ*geneY* 株と Δ*geneZ* 株はそれぞれ親株の 32%, 39%までニゲラン生産量が低下した。以上の結果より，*A. luchuensis geneX* は，*geneY*, *geneZ*, とクラスターを形成し，ニゲラン合成に関与していることが示唆された。さらに親株と比較してニゲラン合成関連遺伝子破壊株では，α-1,3-グルカンを主とするアルカリ可溶性画分量が減少し，一方でキチンや β-1,3-グルカンを多く含むアルカリ不溶性画分量が増加する傾向が確認された。現在，遺伝子相補実験と各種ストレス条件下での表現型解析を実施している。

nigeran, α-glucan synthesis, *Aspergillus luchuensis*

発表責任者：上地敬子（k-uechi@agr.u-ryukyu.ac.jp）

講演番号：3C5p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ 1 号館 C5 会場

麹菌 *A. oryzae* における有性生殖器官形成の誘導条件の探索
Analysis of conditions for inducing formation of sexual reproduction structures in *Aspergillus oryzae*

○菅原 由香[1]、片山 琢也[1,2]、丸山 潤一[1,2] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]東大・微生物連携機構)
○Yuka SUGAWARA[1], Takuya KATAYAMA[1,2], Jun-ichi MARUYAMA[1,2] ([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

【目的】

麹菌 *Aspergillus oryzae* において有性世代は発見されていないが、株によって異なる接合型遺伝子 *MAT1-1* あるいは *MAT1-2* をもつことから、ヘテロタリックな有性生殖を行う可能性が示唆されている [1)]。*A. oryzae* で有性生殖が発見されれば、異なる株の優良な形質を併せもつ菌株の育種に役立つと期待される。菌核は気中菌糸が凝集して無性的に形成される耐久構造であり、*A. oryzae* と近縁な *A. flavus* では菌核のなかに有性生殖器官、さらにその内部に有性胞子が形成されることが報告されている。我々は以前、*A. oryzae* の MAT1-1 型株と MAT1-2 型株にそれぞれアデニン要求性とウリジン・ウラシル要求性を付与した株間の対峙培養によってコロニー境界線上に菌核を形成させた。その菌核内部には有性生殖器官様構造および *A. flavus* の有性胞子と類似した特徴を持つ胞子様構造が観察された [2)]。今回は、栄養要求性と培養条件のさらなる検討を行い、*A. oryzae* の菌核内部の有性生殖器官様構造の形成が効率化するかどうか解析した。

【方法と結果】

以前の我々の実験では、*A. oryzae* のアデニン要求性株とウリジン・ウラシル要求性株間の対峙培養にて菌核内に有性胞子様構造が形成されたが、その形成効率は低く、また、アデニン要求性株は菌核の形成効率が低下していた。これらの現象はアデニン要求性株とウリジン・ウラシル要求性株から成る栄養要求性の組み合わせに問題があると考え、今回はアデニン要求性の代わりにピリドキシン要求性株を作製した。ピリドキシン要求性株において菌核の形成効率の低下は見られなかったため、ウリジン・ウラシル要求性の MAT1-1 型株とピリドキシン要求性の MAT1-2 型株を作製し、対峙培養にて境界線上に菌核を形成させた。これとは別に菌核を効率的に形成させるために、上記の 2 株間でプロトプラスト融合を行ってヘテロカリオン（異核共存体）を形成させ、これを寒天培地に画線植菌することで多数の菌核を取得した。それぞれの培養条件で得られた菌核の内部構造を走査型電子顕微鏡で観察したところ、間質様の構造が多数積み重なっている像が見られた。さらに破砕してみると、菌核内部に胞子様構造が多数含まれていた。今後は胞子様構造の詳細な構造解析、導入した遺伝子マーカーを指標とした有性生殖の検討を行う予定である。

1) Wada *et al*. (2012) *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 2819-2829.
2) 田中勇気ら、2014 年日本農芸化学会大会講演要旨 4A10a13

Aspergillus oryzae, sexual reproduction, sclerotia

発表責任者：丸山潤一（amarujun@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3C5p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ 1 号館 C5 会場

麹菌 *Aspergillus oryzae* の菌核形成に必要な新規転写因子の制御機構の解析
Analysis of the regulatory mechanism of novel transcription factors required for sclerotia formation in *Aspergillus oryzae*

○遠藤 章仁[1]、藤井 陽平[1]、中村 英淳[1]、片山 琢也[1,2]、小川 真弘[3]、小山 泰二[3]、北本 勝ひこ[4]、丸山 潤一[1,2] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]東大・微生物連携機構、[3]野田産研、[4]日薬大・薬)
○Akihito ENDO[1], Yohei FUJII[1], Hidetoshi NAKAMURA[1], Takuya KATAYAMA[1,2], Masahiro OGAWA[3], Yasuji KOYAMA[3], Katsuhiko KITAMOTO[4], Jun-ichi MARUYAMA[1,2] ([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Noda Inst. Sci. Res., [4]Nihon Pharmaceutical Univ.)

【目的】

菌核は菌糸が凝集して形成される耐久性の休眠構造であり、麹菌 *Aspergillus oryzae* と近縁な *Aspergillus flavus* においては、菌核の内部に有性生殖器官が形成されることが報告されている。一方、*A. oryzae* では有性世代は発見されておらず、菌核形成能は低下あるいは消失している。そこで我々は、*A. oryzae* において有性生殖を誘導するうえで、菌核形成の誘導が必要であると考え、その制御機構の解析を行ってきた。我々はこれまでに、転写因子遺伝子破壊株ライブラリーを用いたスクリーニングを行い、菌核形成に関与する転写因子を多数見出した [1)]。さらに、その中でも菌核が全く形成されなかった転写因子の遺伝子破壊株を用いた転写解析により、それらの転写因子による発現制御を受け、菌核形成を制御していると考えられる転写因子が見出された [2)]。本研究ではこれらの転写因子の、菌核形成における機能及び制御関係の解明を目的とした。

【結果】

以前行われた転写因子遺伝子破壊株ライブラリーを用いたスクリーニングにおいて、新規転写因子 TrsA 及び TrsB の遺伝子破壊株では、菌核の形成が見られなかった [2)]。さらに、*trsA* 破壊株及び *trsB* 破壊株を用いたマイクロアレイ解析では、転写産物量が顕著に低下している遺伝子として、*nosA* と新規転写因子をコードする AO090701000019 が見出された。*nosA* 破壊株及び AO090701000019 破壊株では、転写因子破壊株ライブラリーを用いたスクリーニングにおいて、菌核は形成されていなかった。そこで、これら 4 つの転写因子が菌核形成において重要な役割をもつと考え、その制御関係を解析するため、*trsA*, *trsB*, *nosA* それぞれの遺伝子の破壊株を用いて qRT-PCR を行った。その結果、いずれの遺伝子破壊株においても、AO090701000019 の転写産物量が顕著に減少した。また、AO090701000019 破壊株における qRT-PCR を行ったところ、*trsA*, *nosA* の転写産物量が減少し、*trsB* の転写産物量が増加した。これらの結果から、TrsA, TrsB, NosA と AO090701000019 が互いの発現に影響を及ぼし合っていることが示唆された。さらにこれらの転写因子の制御関係の解析を進めるため、遺伝子高発現株を用いた解析や、より詳細な形態学的観察を予定している。

1) 中村英淳ら 第 67 回日本生物工学会大会要旨集 p.89(2015)
2) 藤井陽平ら 日本農芸化学会 2018 年度大会 2A05a02

Aspergillus oryzae, sclerotia formation, transcription factor

発表責任者：丸山 潤一（amarujun@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3C5p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ 1 号館 C5 会場

麹菌 *Aspergillus oryzae* のもつ HET ドメイン遺伝子の不和合性における機能解析
Functional analysis of HET domain genes in heterokaryon incompatibility in *Aspergillus oryzae*
○森 法子[1]、片山 琢也[1,2]、齊藤 亮太[3]、岩下 和裕[3]、丸山 潤一[1,2] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]東大・微生物連携機構、[3]酒総研)
○ Noriko MORI[1], Takuya KATAYAMA[1,2], Ryota SAITO[3], Kazuhiro IWASHITA[3], Jun-ichi MARUYAMA[1,2] ([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM. UTokyo, [3]NRIB)

【背景】
糸状菌では一部の株間で細胞融合を行った際に、異核共存体が生育できない不和合性という性質が知られている。一般に特定の遺伝子の配列多型が不和合性の原因となり、なかでも HET ドメイン(PF06985)をもつタンパク質をコードする遺伝子（HET ドメイン遺伝子）が不和合性に関与する例が複数報告されている。麹菌 *Aspergillus oryzae* では、食品醸造をはじめ様々な用途に多くの実用株が用いられており、最近になり我々は実用株において不和合となる株の組み合わせが存在することを発見した [1)]。産業上の有用性から様々な株を使用した交配育種の実現が望まれるが、このためには不和合性のメカニズムの解明が必要であると考えられる。そこで、我々は *A. oryzae* の不和合性の原因遺伝子の同定を目的とし、配列多型な HET ドメイン遺伝子に着目し、互いに不和合である野生株 RIB40 と日本酒製造用株 RIB128 の 2 株間で異株発現することにより生育阻害を引き起こす遺伝子を探索してきた [2)]。本研究ではさらなる HET ドメイン遺伝子の異株発現による探索と、その生育阻害の原因となる配列多型の同定および不和合性との関連性の解明を目的とした。
【結果】
これまでに、RIB128 株由来の配列多型な 36 個の HET ドメイン遺伝子を RIB40 株において異株発現させた結果、生育阻害を引き起こす AO090001000078 (*Ao078*)および AO090011000558 (*Ao558*)を見いだし、株特異的な生育阻害を生じる *Ao078* 遺伝子についてはその原因となる塩基置換を同定した [2)]。今回新たに RIB40 株由来の HET ドメイン遺伝子についても RIB128 株において異株発現させた。その結果、RIB128 株由来の遺伝子の異株発現では変化が認められなかったが、RIB40 株由来の遺伝子の異株発現により強い生育阻害を示す AO090701000404 (*Ao404*) および AO090701000370 (*Ao370*) を見いだした。自身のもつ HET ドメイン遺伝子の過剰発現と異株発現の結果を比較したところ、*Ao404* 遺伝子については RIB40 株由来の遺伝子が両株において生育阻害を引き起こしたのに対し、RIB128 株由来の遺伝子は生育阻害を生じなかった。一方、*Ao370* 遺伝子は RIB40 株由来の遺伝子が RIB128 株において発現した場合にのみ生育阻害を引き起こし、他の組み合わせでは生育阻害を生じないことが明らかになった。さらに、これらの HET ドメイン遺伝子に関して生育阻害の特異性の原因となる塩基置換を特定した。以上で見いだした生育阻害を引き起こす 4 つの HET ドメイン遺伝子について、現在、破壊株の取得により不和合性への関与の検討を行っている。
1) Okabe *et al., Sci Rep.* 2018. 8: 2922
2) 森ら、2017 年度日本農芸化学会大会講演要旨 2A05a03

Aspergillus oryzae, incompatibility, heterokaryon

発表責任者：丸山潤一（amarujun@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3C5p05
講演日時：3 月 26 日 14:34～ 1 号館 C5 会場

麹菌 *Aspergillus oryzae* の持つ 2 つの分泌型ホスホリパーゼ A_1 の機能解析
Analysis of two secretory phospholipases A_1 in *Aspergillus oryzae*
○中川原 千咲[1]、菊間 隆志[2]、吉田 稔[1,3,4]、有岡 学[1,3]（[1]東大院・農生科・応生工、[2]立命館大・生命科・生物工、[3]東大・微生物連携機構、[4]理研環境資源セ）
○ Chisaki Nakagawara[1], Takashi Kikuma[2], Minoru Yoshida[1,3,4], Manabu Arioka[1,3] ([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]Dept. of Biotechnol., Ritsumeikan Univ., [3]CRIIM, UTokyo, [4]RIKEN CSRS)

【目的】ホスホリパーゼはグリセロリン脂質を加水分解する酵素であり、その分解産物は細胞間やオルガネラ間のシグナル伝達において重要な役割を果たすことが知られている。ホスホリパーゼ A_1（PLA_1）はその中でもグリセロリン脂質の *sn*-1 位のエステル結合を加水分解し脂肪酸と 2-アシルリゾリン脂質を生じる酵素であり、幅広い生物がこの酵素を持っている。麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来の分泌型 PLA_1（$sPLA_1$）はすでに産業的にも利用されている酵素であるが、PLA_1 活性を持つことや基本的な酵素学的性質についての報告がなされているのみであり、それ以上の詳しい性質や生理学的な役割については分かっていない。我々はこの酵素を PLA1-1 と命名し、またそれとアミノ酸配列レベルで 50%程度の最も高い相同性を示すタンパク質を PLA1-2 と命名した。類似の配列は他の糸状菌のゲノム中にも見出されることから、糸状菌において一群のリパーゼファミリーを形成していると考えられる。本研究では麹菌における $sPLA_1$ の機能の解明を目的として、これらの酵素の酵素学的性質の解析や、破壊株の表現型の観察を行った。
【結果】PLA1-1 と PLA1-2 は共にリパーゼのコンセンサス配列（GXSXG）およびシグナル配列を有すると予測されている。また catalytic triad を構成する残基やシステイン残基の位置もよく保存されていた。両遺伝子をクローニングし麹菌において高発現させたところ、PLA1-1 は細胞外への分泌が確認されたが、PLA1-2 は分泌されず菌体内に認められた。一方 EGFP 融合タンパク質の顕微鏡観察では両者に顕著な違いは観察されなかった。麹菌高発現株から PLA1-1 を精製し、[^{3}H]オレイン酸標識した大腸菌膜画分を基質とした活性測定を行ったところ、PLA1-1 はホスホリパーゼ活性を有し、その活性は Ca^{2+}非依存的であることが分かった。また、合成リン脂質を基質とした活性測定により、PLA1-1 がホスファチジルコリン（PC）とエタノールアミン（PE）のいずれの基質に対しても PLA_1 活性を示し、またホスファチジルセリン（PS）、イノシトール（PI）、グリセロール（PG）、ホスファチジン酸（PA）、カルジオリピン（CL）を分解できることが明らかとなった。一方、PLA1-2 については MBP タグを付加し大腸菌による生産および精製を行った。基質特異性を調べたところ、MBP-PLA1-2 は上記のうち PG に対してのみ特異的な PLA_1 活性を持つことが示唆された。次に PLA1-1 および PLA1-2 をコードする遺伝子の破壊株を作製した。生育への影響は認められなかったが、PLA1-1 破壊株では培養上清中のホスホリパーゼ活性の低下が認められた。現在これらの遺伝子の二重破壊株がどのような表現型を示すか検討中である。

Aspergillus oryzae, phospholipid, phospholipase

発表責任者：有岡　学（arioka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3C5p06
講演日時：3 月 26 日 14:55～ 1 号館 C5 会場

海洋性フラボバクテリアにおけるミクソール生合成遺伝子クラスターの単離と機能解析

Identification of the myxol biosynthesis gene cluster in marine flavobacteria

○中澤 慶翼[1]、高市 真一[2]、吉澤 晋[3]、山田 昌治[1]、杉山 健二郎[1]([1]工学院大先進工、[2]東農大分子微生物、[3]東京大大気海洋研)
○Keisuke NAKAZAWA[1], Shinichi TAKAICHI[2], Susumu YOSHIZAWA[3], Masaharu YAMADA[1], Kenjiro SUGIYAMA[1] ([1]Kogakuin Univ. Adv. Eng., [2]Tokyo Univ. of Agric., [3]Univ. Tokyo)

カロテノイドは、自然界に最も広く存在する色素で、現在までに 800 種類近くのカロテノイドが天然から単離されている。単環式カロテノイドの一つであるミクソールは、海洋性フラボバクテリアやシアノバクテリアなど限られた生物種にしか存在しておらず、その生合成経路の理解も十分とは言えない。まず海洋性フラボバクテリア *Nonlabens spongiae* JCM 13191^T の主要なカロテノイドを HPLC 溶出時間、吸収スペクトル、精製物の MS、NMR、CD スペクトルからミクソールと同定した。次にミクソール生合成遺伝子クラスターの同定を目指し、*Nonlabens spongiae* JCM 13191^T のゲノムデータを解析した結果、8 遺伝子からなる約 9.3kb のクラスターが見出された。本クラスター内には、MerR ファミリーに属する転写因子、フィトエン合成酵素（CrtB）、フィトエン不飽和化酵素（CrtI）、リコペン β 環化酵素（CrtYm）、γ-カロテン水酸化酵素（CrtZ）、カロテノイド-1,2-水添加酵素（CruF）、γ-カロテン-3’,4’-不飽和化酵素（CrtD）、およびカロテノイド-2’-水酸化酵素（CrtA-OH）をコードすると推定される遺伝子が存在した。本クラスターのミクソール生合成への関与を確認するため、前駆体となるゲラニルゲラニルピロリン酸（GGPP）を産生するように改良した大腸菌を宿主として、*N. spongiae* から単離した本クラスターを導入し、得られた形質転換株のカロテノイドをミクソールと同定した。その結果、本クラスターを導入した形質転換株において、ミクソールの産生が確認されたことから、本クラスターがミクソール生合成に関与することが強く示唆された。

carotenoid, myxol, flavobacteria

発表責任者：杉山健二郎（bt13171@ns.kogakuin.ac.jp）

講演番号：3C5p07
講演日時：3 月 26 日 15:06～ 1 号館 C5 会場

超好熱性アーキア *Pyrococcus chitonophagus* におけるキチナーゼ遺伝子破壊株の作製
Constrction of chitinase gene disruptants of the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus chitonophagus*
○金井 保、山田 将大、中田 菜月、ASLAM Mehwish、堀内 あゆみ、跡見 晴幸（京大院工）
○ Tamotsu KANAI, Masahiro YAMADA, Natsuki NAKATA, Mehwish ASLAM, Ayumi HORIUCHI, Haruyuki ATOMI (Kyoto Univ.)

キチンはセルロースに並ぶ未利用バイオマスであるにもかかわらず、その有効活用に関する研究例は少ない。我々は超好熱菌を利用した、キチンの有用物質変換系の構築を目指している。*Pyrococcus chitonophagus*（以前の名称は *Thermococcus chitonophagus*）はキチンを主有機物源とした培地により単離された超好熱性アーキアである。本菌のゲノム上には、３つのキチナーゼ遺伝子（*chiA*, *chiC*, *chiD*）が存在する(1)。中でも ChiD は、近縁生物種には見られない新規なキチナーゼであり、キチン鎖の還元末端を認識して２糖ずつ切断する活性をもつ(1)。本研究では、*P. chitonophagus* のキチン分解過程において、各キチナーゼが果たす役割の解明を目的として、本菌における遺伝子組換え系の構築とそれを用いた各キチナーゼ遺伝子破壊株の作製を進めた。

P. chitonophagus 野生株に対し、*pyrE* 破壊ベクターを添加して、5-fluoroorotic acid (5-FOA)に対する耐性を指標に *pyrE* 破壊株を単離した（CHU1 株）。本菌が、5-FOA 耐性と共にウラシル要求性を示すことを確認した。また形質転換効率の向上を目的として、CHU1 株を親株としてさらに制限修飾系（Type Ⅰ）遺伝子群を破壊した株を作製した（CRU1 株）。

得られた CRU1 株をホスト株として、各キチナーゼ遺伝子破壊株の作製を進めた。遺伝子破壊ベクターによる形質転換操作により、シングルクロスオーバー相同組換えによって *pyrE* を含む遺伝子破壊ベクターの全長が導入された株を作製し、その後の 5-FOA 添加培地での培養により *pyrE* が除去された株の単離を進め、得られた候補株よりキチナーゼ遺伝子破壊株である CRDA1 株(CRU1: Δ*chiA*)、CRDC1 株(CRU1: Δ*chiC*)、CRDD1 株(CRU1: Δ*chiD*)をそれぞれ単離した。

これらのキチナーゼ遺伝子破壊株を用いて、swollen chitin（酸膨潤キチン）の分解試験を行ったところ、CRDA1 株では、ホスト株や他の遺伝子破壊株と比べて、swollen chitin の分解量が有意に減少することを確認した。このことから *P. chitonophagus* のキチン分解において、ChiA が主要な役割を果たしていることを確認した。

1) Horiuchi A, Aslam M, Kanai T, Atomi H. 2016. A structurally novel chitinase from the chitin-degrading hyperthermophilic archaeon *Thermococcus chitonophagus*. Appl Environ Microbiol 82: 3554 –3562

chitinase, Archaea, hyperthermophile

発表責任者：金井保（kanai@sbchem.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3C5p08
講演日時：3 月 26 日 15:17～ 1 号館 C5 会場

二員培養系で共生パートナーのアカマツ実生苗を枯らすマツタケ変異体の作出
A mutant of the ectomycorrhizal fungus *Tricholoma matsutake* that confers wilting on its symbiotic partner *Pinus densiflora* in vitro
○村田 仁[1]、仲野 翔太[1]、山中 高史[1]、下川 知子[1]、阿部 知子[2]、市田 裕之[2]、林 依子[2]、田原 恒[1]、太田 明[3] ([1]森林総研、[2]理研、[3]琵琶湖環セ)
○Hitoshi MURATA[1], Shota NAKANO[1], Takashi YAMANAKA[1], Tomoko SHIMOKAWA[1], Tomoko ABE[2], Hiroyuki ICHIDA[2], Yoriko HAYASHI[2], Ko TAHARA[1], Akira OHTA[3] ([1]Forest. Forest Prod. Res. Inst., [2]RIKEN, [3]Lake Biwa Environ. Res. Inst.)

マツタケはマツ科樹種の根に菌根を形成し共生する。本研究では，マツタケの共生機構を解明するため，γ線と重粒子線（アルゴンイオン）をマツタケ NBRC 33136 株に照射し，複数の形質が変化した変異体を作出し，その特性を解析した。γ線で作出した G1 株と重粒子線で作出した Ar 59 株は，野生株と異なる菌叢を寒天培地で形成した。また，両変異体は，セルラーゼやアミラーゼの活性が高いなど性質が互いに似る。しかし，これらの変異体をアカマツ実生苗に接種し，4 ヶ月間培養したところ，G1 は側根の発達を阻害し，植物を枯らした。一方，Ar 59 を接種した実生苗では，野生株ほど顕著ではないものの，共生が成立し根圏での菌糸伸長とともに植物は良好に育った。いずれの変異体も外生菌根の特徴である Hartig net を根組織に形成したが，G1 は野生株や Ar 59 と異なり，菌糸の束が細胞間隙に広がって侵入していた。G1 と Ar 59 が NBRC 33136 株に由来する変異体であることは，複数の rRNA 関連遺伝子マーカーの塩基配列が一致したことで確認した。本結果から，マツタケがこれら複数の形質を制御し，植物の成長の「促進／抑制」を切り替えさせる調節領域をゲノム上に有すると考察した。

Tricholoma matsutake, Mycorrhizal symbiosis, Irradiation mutagenesis

講演番号：3C5p09
講演日時：3 月 26 日 15:28～ 1 号館 C5 会場

大規模ゲノム再編誘発酵素の直接導入による実用酵母の育種

An improved breeding method toward industrial yeast via direct protein transfection with large-scale genome rearrangement-inducing endonuclease *Taq*I

中村 隆宏[2]、○安川 泰史[1]、井村 誠[1]、増尾 直久[1]、小田 有沙[2]、太田 邦史[2]([1]興人ライフサイエンス株式会社、[2]東大院総合文化)
Takahiro NAKAMURA[2], ○Taishi YASUKAWA[1], Makoto IMURA[1], Naohisa MASUO[1], Arisa ODA[2], Kunihiro OHTA[2] ([1]KOHJIN Life Sciences Co., Ltd., [2]Grad. Sch. of Arts and Sci., The Univ. of Tokyo)

【背景・目的】タンパク質トランスフェクションは、活性タンパク質を生細胞内に直接移入させる技術で、細胞機能の人工的な制御を実現する。組換え DNA 技術の課題となる外来 DNA 移入が無く、宿主と組換えタンパク質発現系の相性も問わない。またイオン性担体を介在させることで物理的穿孔処理無く低侵襲的に送致することが可能である。近年は主に動物細胞やプロトプラスト化した植物での事例が集積されてきたが、真核生物の代表的モデルである酵母に同技術を適用した報告は無い。

当社は産業用酵母であるトルラ酵母（*Candida utilis*）を用いてバイオ医薬品を製造・販売している。*C.utilis* は有性生殖様式が未発見であり、加えて高次倍数性を有していることから組換え DNA 技術の適用は困難である。そこで、東大太田研が開発した TAQing システム（Muramoto N., *et al., Nat Commun*, **9** :1-15, 2018）を、トルラ酵母でタンパク質トランスフェクションによって駆動させ、量的形質に基づく有価物質の発酵生産を目的として、本研究を実施した。TAQing システムとは、耐熱性制限酵素 *Taq*I でゲノムを同時多発的に切断し、大規模ゲノム再編させることで、多数の遺伝子が関わる量的形質を高速で改良する技術である。

【方法・結果・考察】まず *S. cerevisiae* S288c 及び *C.utilis* NBRC0988 を用い、β-galactosidase（β-gal）活性を指標にタンパク質の導入有無を検証した。市販の膜透過性ペプチド導入系を用いて、両酵母ともにプロトプラスト化することなく、効率的に β-gal が生細胞内に送致されることを見出した。引続き細胞壁未溶解の *C.utilis* で β-gal の最適導入条件を検討した結果、YPD 培地で培養した対数増殖初期の細胞を MES 緩衝液 (pH 6.0)中で混合することで、導入効率が標準手順書記載条件時と比べて 4 倍、*S.cerevisiae* と比べると 14 倍向上した。次に N 末端に His-tag と核移行シグナル（NLS）を融合した *Taq*I を大腸菌発現系と TALON コバルトアフィニティーカラムで調製した。上記最適条件で *C.utilis* に *Taq*I を移入させ、YPD 培地で 30℃、30 分間復帰培養した後、細胞を 38℃で 90 分間保持して *Taq*I 活性を低く一過的に発現させた。YPD 寒天培地上の生育コロニー数を計測した結果、*Taq*I 添加で生存率が有意に低下したことから、*Taq*I が細胞内で機能していることが示唆された。生育コロニーでサイズが小さい 38 株を顕微鏡観察したところ 6 株で凝集性が見られ、5 回継代培養しても 2 株で凝集形質が維持されていた。両変異体の染色体 PFGE パターンは *C.utilis* 野生型のそれと互いに異なっていたことから、*Taq*I 機能をトリガーとしたゲノム再編が起こっている可能性が強く示された。現在変異体ゲノムのリシーケンスから変異箇所の同定を試みている。

genome rearrangement, protein transfection, industrial yeast

発表責任者：安川泰史（taishi.yasukawa@kohjinls.com）

講演番号：3C5p10
講演日時：3 月 26 日 15:39～ 1 号館 C5 会場

分裂酵母胞子表層タンパク質 Isp3 を用いた未知の分泌メカニズムの解明

Elucidation of novel secretion mechanism of the fission yeast spore surface protein Isp3

○吉川 佳里奈、酒井 崇史、中村 太郎（大阪市大・院理）
○Karina YOSHIKAWA, Takafumi SAKAI, Taro NAKAMURA (Osaka City Univ.)

【背景と目的】

分裂酵母の胞子は、様々なストレスに耐性を持つ休眠細胞である。我々はこれまでに、分裂酵母の胞子壁最外層が Isp3 と呼ばれるタンパク質で構成されており（Isp3 層）、この層が熱やアルコールなどの環境ストレスに対する胞子の耐性に重要な役割を果たすことを明らかにしている [(1)]。Isp3 は、*S. pombe* に特異的に見られるタンパク質で、プロリンが 5 つ連続する領域、酸性アミノ酸・塩基性アミノ酸に富む領域、そして C 末端にはアラニンに富む領域など、非常に特徴的な配列を有している。Isp3 は、胞子形成時に特異的に発現し、いったん形成中の胞子の中に蓄積した後、胞子の外（子のうの細胞質）にその局在を変化させる。Isp3 が胞子の外に輸送されるためには、胞子細胞膜を通過する必要がある。しかしながら、Isp3 にはシグナル配列がみられないため、未知のメカニズムで輸送をされている可能性が考えられる。本研究は、Isp3 をモデルとして新しいタンパク質の細胞外輸送のメカニズムを明らかにすることを目的とする。

【結果】

さまざまな Isp3 の部分的欠失変異遺伝子を作製し、その局在を観察した。その結果、N 末端側の 45 アミノ酸を欠失した Isp3 では胞子の中に蓄積しているものが多くみられた。したがって、N 末端領域が輸送に必要な可能性が示唆された。この領域には上記のような特徴的な配列は確認できなかった。輸送に必要な領域を特定するため、現在さらなる欠失変異およびアミノ酸を置換した変異株を作製している。また、胞子形成時に発現が上昇する *meu, mug* 遺伝子欠損株[(2, 3)]を用いて、Isp3 の輸送に関わる遺伝子の取得を試みている。

1. Fukunishi et al., Mol. Biol. Cell 25: 1549-1559 (2014)
2. Martin-Castellanos et al., Curr Biol. 15: 2056-2062 (2005)
3. Kim et al., Nat Biotechnol. 28: 617-23 (2010)

yeast, cell wall, export

講演番号：3C5p11
講演日時：3 月 26 日 16:00～ 1 号館 C5 会場

人工汚染化土壌からの有機塩素殺虫剤分解酵素遺伝子取得の試み
An attempt to capture genes for organochlorine pesticide degradation from an artificially polluted soil

○蘇 立俊、加藤 広海、大坪 嘉行、津田 雅孝、永田 裕二（東北大・院生命科学）
○Lijun Su, Hiromi Kato, Yoshiyuki Ohtsubo, Masataka Tsuda, Yuji Nagata (Tohoku Univ. Graduate School of Life Sciences)

【背景・目的】有機塩素系殺虫剤 γ-hexachlorocyclohexane (HCH) は人工の化学物質であり、深刻な環境汚染を引き起こしている。HCH 分解細菌は、人類が HCH を環境に放出した後に誕生したと考えられ、実際、*Sphingobium japonicum* UT26 株を代表とする HCH 分解資化細菌は外因性と推定される「特殊性の高い」（当該機能に特化しており進化的起源が不明な）遺伝子を代謝に利用する。しかし、このような遺伝子をどこから、どのように獲得し、利用するのか未解明である。この一連の過程を明らかにすれば、微生物の未開拓な遺伝子資源の有効利用が可能になると考えられる。
【方法・結果および考察】HCH 分解資化に必要な酵素遺伝子の中で、特に *linA* と *linB* は特殊性が高く、また、これらは応用的にも有用な脱ハロゲン酵素をコードしていることから、当該機能を有する遺伝子の環境試料からのキャプチャリングを試みた。遺伝子受容菌株として UT26 派生株を用い、HCH を唯一の炭素源として含む無機固体培地 (HCH プレート) での生育を指標として遺伝子獲得のスクリーニングを行った。なお、(i) UT26 株はある種のアルコールデヒドロゲナーゼをコードする *adhX* 遺伝子の高発現により炭素源非添加無機固体培地での生育が可能となり、本突然変異は比較的高頻度で起こること、(ii) 試料中での遺伝子受容菌株の挙動を追跡しやすくすること、を考慮し、UT26 株由来の *linA* 自然欠失株 YO5 株と *linB* 完全除去株 UTDB2 株の *adhX* を破壊し、さらに、*dsRed* 遺伝子もしくは *zsGreen* 遺伝子で標識した YO5DAXR 株及び UTDB2DAXG 株を作製し、これらを遺伝子受容菌株として用いた。一方、遺伝子ソースとしては、実験室環境下で HCH で汚染化した土壌（非汚染土壌に HCH を添加し、2 年以上静置したもの）を用いた。遺伝子受容菌株を試料土壌に接種して 20 日後に、蛍光顕微鏡により試料を観察したが、蛍光標識株は検出されなかった。しかし、HCH プレート上で生育し、周囲に clear zone を形成するコロニーが複数取得された。これらは、複数回 HCH プレートに植え継いでも、コロニーの周りに clear zone を形成した。16S rRNA 遺伝子解析の結果から、これらコロニーに接種した受容菌株は含まれておらず、また、*linA* や *linB* 遺伝子も PCR で検出されなかった。すなわち、得られたコロニーは目的の遺伝子獲得株ではないが、HCH 分解に関与する新規遺伝子を有している可能性が示唆された。現在、これらコロニー由来株の γ-HCH 分解代謝能の検討を行っている。

gene capture, organochlorine pesticide, polluted soil

発表責任者：蘇　立俊（soritsushun@ige.tohoku.ac.jp）

講演番号：3C5p12
講演日時：3 月 26 日 16:11～ 1 号館 C5 会場

有機リン系殺虫剤分解細菌 Sphingopyxis wildii 株の有機塩素系殺虫剤分解能に関する研究

Organochlorine pesticide-degrading activity of organophosphates-degrading Sphingopyxis wildii strain

○鄧 文昊[1]、サガリ アナポリ ラクシマ[2]、陳 楠楠[1]、加藤 広海[1]、大坪 嘉行[1]、津田 雅孝[1]、シダヴァタム ダヤナンダ[2]、永田 裕二[1]([1]東北大学・大学院生命科学研究科（院生命科）、[2]University of Hyderabad, India)
○ Wenhao Deng[1], Annapoorni Lakshman Sagar[2], Nannan Chen[1], Hiromi kato[1], Yoshiyuki Otsubo[1], Masataka Tsuda[1], Dayanannda Siddavattam[2], Yuji Nagata[1] ([1]Tohoku Univ., [2]University of Hyderabad, India)

【背景・目的】インドで単離された有機リン系殺虫剤 (organophosphates: OP) 分解細菌 *Sphingopyxis wildii* 株 (Sw 株) は全ゲノム配列の解読の結果、OP 以外にも多彩な環境汚染物質を分解代謝する潜在能力を有することが示唆され、多重汚染環境のバイオレメディエーションに有用な株として期待されている (Genome Biol Evol **9**: 77-81, 2017)。本研究では、ゲノム解析から示唆された Sw 株の有機塩素系殺虫剤 γ-hexachlorocyclohexane (HCH) 分解能力、および本菌が潜在的に有する脱ハロゲン酵素について検討を行った。
【方法・結果および考察】Sw 株の HCH 資化能を、HCH を含む各種培地での生育を指標に検討したが、既存の HCH 分解資化細菌のような明確な資化能を示す結果は得られなかった。また、栄養培地で生育させた本株細胞の HCH 分解活性を ECD 検出器付のガスクロ、および遊離塩素イオン濃度測定で検討したが、現在までに明確な分解活性は得られていない。ただし、若干の分解活性が検出される場合があり、また、本株を HCH を含む栄養培地で生育させた際にコロニーの周りにクリアゾーンを形成する場合も見られたため、本株は未知条件により発現する潜在的 HCH 分解活性を有している可能性が考えられた。Sw 株ゲノムには、HCH 代謝に関与する dehydrochlorinase LinA やハロアルカンデハロゲナーゼ (HLD) LinB と高い identity を示すタンパク質をコードする遺伝子は存在しないが、LinA と低い identity を示し、立体構造は保存されていると推定されるタンパク質をコードする遺伝子が 5 種と、LinB と低い identity を示し、新規性の高い HLD と推定されるタンパク質をコードする遺伝子が 2 種存在している。そこで、これら 7 種の遺伝子を PCR 増幅、クローニングし、これらタンパク質に His タグを付与したものを大腸菌で発現させ、精製タンパク質のデハロゲナーゼ活性を検討した。5 種の LinA ホモログは高収率での大量発現・精製が可能であったが、これら精製タンパク質を用いた ECD 検出器付のガスクロ、および遊離塩素イオン濃度測定による活性測定で明確な HCH 分解活性は検出されなかった。一方、2 種の LinB ホモログは不安定で収率は悪いものの精製は可能であり、HLD の一般的基質である 1,3-dibromopropane に対して脱ハロゲン活性を示したため、それぞれ DswA, DswB (dehalogenase A and B from *Sphingopyxis wildii*) と命名した。

dehalogenase, organophosphate, sphingomonads

講演番号：3C5p13
講演日時：3 月 26 日 16:22～ 1 号館 C5 会場

PCB 分解細菌 *Acidovorax* sp. KKS102 株のカタボライト調節に関与する二成分調節因子 BphPQ の機能調節の解析

Analysis of post-translational regulation of BphPQ, two-component regulatory proteins, involved in the catabolite control in PCB-degrader *Acidovorax* sp. KKS102.

○酒井 啓一郎、佐々木 春菜、永田 裕二、津田 雅孝、大坪 嘉行（東北大）
○Keiichiro SAKAI, Haruna SASAKI, Yuji NAGATA, Masataka TSUDA, Yoshiyuki OHTSUBO (Tohoku Univ.)

【目的】*Acidovorax* sp. KKS102 株は PCB/Biphenyl 分解酵素群をコードする *bph* オペロンを有している。我々は、これまでにオペロン直上流の pE プロモーターは二成分調節系因子 BphPQ 依存的に活性化されること、またコハク酸などの抑制炭素源が存在すると pE プロモーターが活性化されないこと、すなわち、カタボライト調節されることを報告している。カタボライト調節は様々な炭素源により見られることから、各種の炭素源から共通のシグナルが生じ、これを BphPQ が感知していると考えられるがその詳細は不明である。本研究では、KKS102 株のカタボライト調節機構の解明を目的に、レスポンスレギュレーターである BphQ に着目して解析を行った。

【結果と考察】KKS102 株由来の GZ512Qhis 株は pE プロモーターに *gfp-lacZ* を連結したコンストラクトを持ち、また、C 末端に Hisx6 タグが付加された BphQ を発現する株である。GZ512Qhis 株を 1/3LB 培地で培養し、対数増殖期中期でコハク酸を添加すると、非添加サンプルと比較して pE プロモーターからの転写産物量の低下が見られる一方、*bphQ* の転写量および翻訳量には大きな違いは見られなかった。つまり、カタボライト調節には BphQ の存在量は関与しておらず、BphQ 機能の翻訳後調節がなされていると考えられた。また BphPQ は二成分調節系因子であり、リン酸化による調節が可能性として考えられたが、GZ512Δ*bphPQ* 株に BphQ のみを発現させてもカタボライト調節が観察されることから、リン酸化以外の翻訳後修飾の関与が推測された。近年、原核生物においてもタンパク質のアセチル化がタンパク質の機能調節に重要な役割を果たすことが報告されてきていることから、BphQ のアセチル化を検討した。大腸菌で発現させ精製した BphQ をアセチルリン酸で処理すると抗アセチルリジン抗体を用いたウエスタンブロッティングで検出されること、また、アセチルリン酸で処理した BphQ を MALDI/TOFMS で解析したところ、BphQ ホモログ間でよく保存されており、推定 3 次元モデル上 BphQ の推定リン酸化部位 D58 の近傍に位置する K108 残基がアセチル化されることが明らかとなった。リジン残基をグルタミン残基で置換すると、疑似的なアセチル化状態になると考えられている。K108 残基をグルタミンへ置換した BphQ は、野生型 BphQ と比較して pE プロモーター活性化能が低下することが大腸菌を用いた実験系により確認された。すなわち、BphQ の K108 残基がアセチル化されることで BphQ の機能が低下することが示唆された。現在、GZ512Qhis 株細胞内で実際に BphQ がアセチル化されているかに関して解析を進めているところである。

catabolite control, two-component regulatory system, PCB-degrader

講演番号：3C5p14
講演日時：3 月 26 日 16:33～ 1 号館 C5 会場

PCB/ビフェニル分解資化遺伝子群を有する ICE_{KKS102}*4677* の水平伝播宿主域の解析
Host range of conjugative transferability of ICE_{KKS102}*4677*, an integrative and conjugative element carrying PCB/biphenyl-degrading gene cluster
○川原 昌太郎、岸田 康平、永田 裕二、大坪 嘉行、津田 雅孝（東北大学院生命）
○Shotarou KAWAHARA, Kohei KISHIDA, Yuji NAGATA, Yoshiyuki OHTSUBO, Masataka TSUDA (Tohoku Univ.)

【背景と目的】
遺伝子の水平伝播を担う可動性遺伝因子の一つに ICE（Integrative and conjugative element）がある。ICE はプラスミドと同様に接合伝達によって細菌間を水平伝播するが、プラスミドとは異なり、基本的にゲノムに組み込まれた状態で存在している。ICE の水平伝播宿主域は各 ICE によって様々であるものの、宿主域を決定づける因子は明らかになっておらず、本因子の同定は ICE の水平伝播様式の更なる理解に繋がることが期待できる。当研究室では、*Acidovorax* sp. KKS102 株の PCB/ビフェニル分解資化遺伝子群を有する ICE_{KKS102}*4677*（以下 ICE_{KKS}）の研究を進めてきており、ICE_{KKS} は *Sphingobium* 属や *Burkholderia* 属、*Pseudomonas* 属の細菌株に水平伝播可能であることが判明している。本研究では、受容菌として大腸菌を用いることで ICE の水平伝播宿主域を規定する因子を明らかにすることを目的とした。
【結果と考察】
大腸菌を受容菌とした ICE_{KKS} の KKS102 株からの水平伝播を検討したところ、他属の受容菌株に比べ水平伝播頻度が著しく低かったことから、大腸菌への水平伝播頻度が低い原因の明示は ICE の水平伝播規定因子同定につながると考えられた。はじめに、ICE の水平伝播過程を、「接合伝達」と「受容菌染色体への組込み」の二段階に分け、そのうちの接合伝達過程を評価した。KKS102 株と大腸菌の双方で複製可能なベクターに ICE_{KKS} の *oriT* をクローニングしたプラスミドを用いた接合伝達試験を行ったところ、本プラスミドの大腸菌への水平伝播は、他属細菌株を受容菌とした場合と同様の頻度で認められた。したがって、ICE_{KKS} の大腸菌への水平伝播頻度が低い原因は接合伝達過程ではなく、大腸菌染色体への組込み過程であることが示唆された。
次に、大腸菌染色体上に組み込まれた ICE_{KKS} の挿入位置を同定した。先行研究で ICE_{KKS} は、特定の 9 bp 塩基配列を認識して染色体に組込まれることが他属細菌株の研究で判明しており、大腸菌においても推定アミノ酸デヒドロゲナーゼをコードする *ykgF* 遺伝子内の同様 9 bp 配列に ICE_{KKS} が挿入されていた。この 9 bp 配列は、大腸菌染色体上に 35 ヶ所と比較的多く存在していたにもかかわらず、*ykgF* 遺伝子内部の 9 bp 配列への組込みしか確認されていない。従って、*ykgF* 遺伝子が ICE_{KKS} の組込みや安定性に関与している可能性が考えられ、現在 *ykgF* 遺伝子について破壊株を用いた解析を実施している。

horizontal gene transfer, integrative and conjugative elements, host range

発表責任者：川原昌太郎（s.kawahara@ige.tohoku.ac.jp）

講演番号：3C5p15
講演日時：3 月 26 日 16:44～ 1 号館 C5 会場

シュードモナス属菌のマンデル酸経路に依存しないベンゾイルぎ酸の分解に関与する遺伝子の同定

Identification of the genes involved in benzoylformate degradation that is indpendent of mandelate pathway in *Pseudomonas*

○廣瀬 遵、月俣 隆世、宮武 宗利、横井 春比古（宮崎大・工）
○Jun HIROSE, Ryusei TSUKIMATA, Munetoshi MIYATAKE, Haruhiko YOKOI (Faculty Eng. Univ. Miyazaki)

【目的】リグニン由来低分子化合物分解性細菌 *Pseudomonas* sp. LLC-1 株(NBRC 111237)は、種々の芳香族カルボン酸を分解する能力を有する。ベンゾイルぎ酸は、*Pseudomonas putida* のマンデル酸経路(図１)の中間体であることが知られているがそれ以外のベンゾイルぎ酸の分解経路は未知である。本講演では、LLC-1 株のベンゾイルぎ酸の分解特性および同化合物の分解に関わる遺伝子を同定した結果について報告する。

【方法および結果】LLC-1 株は、マンデル酸を唯一の炭素源として含む培地中で生育しなかったが、ベンゾイルぎ酸ならびにその代謝中間体と推定されるベンズアルデヒドと安息香酸を唯一の炭素源として利用できた。ベンゾイルぎ酸を炭素源として生育した菌体のベンゾイルぎ酸代謝酵素活性は、ピルビン酸を唯一の炭素源として生育した対照と比較して高く、ベンゾイルぎ酸により同化合物の代謝酵素が誘導されていることが確認された。LLC-1 株のドラフトゲノム配列からベンゾイルぎ酸脱炭酸酵素(*bzfA*)、アルデヒド脱水素酵素(*bzfC*)、転写制御因子(*bzfR*)ならびに２つの膜輸送体(*bzfB*, *bzfD*)をコードすると推定される遺伝子群を見いだした。*bzfA* 遺伝子と *bzfC* 遺伝子は、既知の *P. putida* のマンデル酸経路をコードする *mdlC* 遺伝子および *mdlD* 遺伝子と相同性を示したが、*bzf* 遺伝子群にはマンデル酸ラセマーゼをコードする *mdlA* 遺伝子と(*S*)-マンデル酸脱水素酵素をコードする *mdlB* 遺伝子のホモローグが存在しなかった。*bzfRABCD* 遺伝子をコードする 8.5 kb の領域を発現ベクターに連結した組換えプラスミドを保有する大腸菌はベンゾイルぎ酸を安息香酸に変換した。さらにクローン化した DNA 断片のサブクロ―ニングによってベンゾイルぎ酸をベンジルアルコールに変換する組換え体を取得した。以上の結果から、LLC-1 株はンデル酸経路を経由しない代謝経路でベンゾイルぎ酸を分解していることが示唆された。

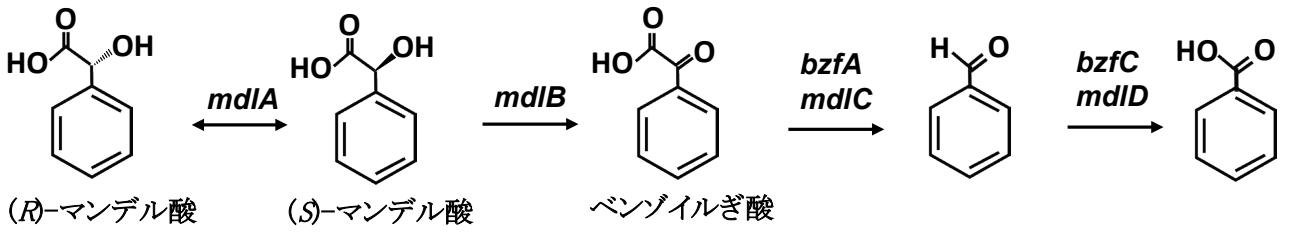


図１　*Pseudomonas putida* のマンデル酸経路

benzoylformic acid, mandelic acid, *Pseudomonas*

講演番号：3C7a02
講演日時：3 月 26 日 09:11～ 1 号館 C7 会場

電解反応におけるリグニンの効率的分解反応の開発

Development of efficient decomposition of lignin with organic electrolytic method

○山田 知宏[1]、渡邊 隆司[2]、前川 博史[3]、粳間 由幸[1] ([1]米子高専物質、[2]京大生存圏、[3]長岡技大物質)

○ Tomohiro YAMADA[1], Takashi WATANABE[2], Hirofumi MAEKAWA[3], Yoshiyuki URUMA[1] ([1]Depertmant of Materials Science, NIT, Yonago college, [2]RISH, Kyoto University, [3]Depertment of Materials Science and Technology, Nagaoka University of Technology)

現代社会は石油資源の大量消費に伴い生じる環境汚染問題やエネルギー問題を抱えている。その対策として石油資源による工業生産「オイルリファイナリー」から再生可能なバイオマス資源を利用した工業生産「バイオリファイナリー」への移行が求められる。エネルギーを海外からの化石燃料の輸入に依存している日本においては、化石燃料に変わるエネルギー資源が特に求められている。その中で注目されているのは木質バイオマスである。木質バイオマスは木の細胞壁を構成するセルロース，ヘミセルロース，リグニンの有機性資源である。木質バイオマスは，バイオリファイナリー構築の鍵となる資源として期待される。一方でリグニンの難分解性で複雑な構造のために有効的な利用法がないといった問題がある。今後，木質バイオマスの利用を促進するためには効率的なリグニン分解法の開発が必要である。本研究はリグニンの効率的な除去，分解法を開発し，木質バイオマスを石油資源の代替品として利用することを目的としている。我々は、リグニンに特徴的な *β*-[O]-4 の結合に注目し、有機電解法による効率的なリグニン分解反応の開発を目指した。電解条件は，*β*-[O]-4 構造を有し，構造が簡易で合成が容易である，2-(2-methoxyphenyl)oxy-1-phenethanol による電解実験によって検討し，リグニンモデル仕込み量 0.2g，電解質にテトラエチルアンモニウム *p*-トルエンスルホナート，溶媒には 5%MeOH-MeCN 溶液 30 mL を用いることとした。

β-[O]-4 型の二量体リグニンモデルには，1-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-(2-mehoxyphenoxy)-1,3-propanediol を用いた。*β*-[O]-4 型の二量体リグニンモデル 0.2g テトラエチルアンモニウム p-トルエンスルホナート 1g を 5%MeOH-MeCN 溶液 30 mL に溶解させ，直流電源，電極（炭素または白金），マグネチックスターラー，温度計，塩化カルシウム脱気管より構成される電解装置により 0.2A の定電流電解を行った。薄層クロマトグラフィー(TLC)では酢酸エチル/ヘキサン=2:1 の展開溶媒において 1-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-(2-mehoxyphenoxy)-1,3-propanediol のスポットは R_f 値 0.28 に確認できた。電解により本スポットは原点付近まで下がる。通電時間に従い，出発原料の 1-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-(2-mehoxyphenoxy)-1,3-propanediol は減少し，約 2 時間 30 分で原料の消失が確認できた。

電解物は酢酸エチルで抽出後 NMR, GC-MS の分析機器で分析を行った。有機電解反応の結果、有機電解のリグニン分解応用への可能性を見出した。有機電解法は室温で反応が進行し，環境汚染を引き起こす恐れのある触媒等も使用しないためグリーンケミストリーの観点からも注目される。したがってリグニン分解への応用が実現すれば大変意義のあることである。

biomass, β-O-4 lignin model, electrolytic method

講演番号：3C7a03
講演日時：3 月 26 日 09:22～ 1 号館 C7 会場

孟宗竹ヘミセルロース加水分解物中の生理活性成分の分離と精製

Separation and purification of physiologically active compounds from hemicellulose hydrolyzate of Moso bamboo

○矢田堀 裕聖[1]、関本 智登[2]、布施 有里奈[2]、藤田 誠史[2]、平本 茂[2]、椎葉 究[1,2] ([1]東京電機大学理工学部、[2]東京電機大学理工学研究科)
○ Yuuki YATABORI[1], Tomotaka SEKIMOTO[2], Yurina FUSE[2], Seiji FUJITA[2], Shigeru HIRAMOTO[2], Kiwamu SHIIBA[1,2] ([1]Tokyo Denki Univ., [2]Tokyo Denki Univ. of graduate course)

[目的]

孟宗竹は、西日本を中心に大量繁茂し、竹害という環境問題を引き起こしている。このように日本国内に豊富に存在するバイオ資源であり、成長が早く木質と比較してセルロースやヘミセルロースが豊富でリグニンが少ない点から注目されている。当研究室では孟宗竹のこれらの特徴に着目し、孟宗竹の総合利用に関する研究を行なってきた。これまでに孟宗竹から高温高圧処理と酵素処理により調製した竹粗抽出物が、in vitro での強い抗酸化活性や、血しょうコレステロール上昇抑制効果等を有することを明らかにしてきた。

さらに、竹粗抽出物中の生理活性を有する成分の組成や化学構造を探索し生理活性との関連性を研究している。

しかし、その探索中の生理活性成分が細胞の免疫賦活作用や抗炎症作用に対してどのような効果を有するのかについては判明してないので RAW264.7 細胞を用いてそれらの作用に生理活性成分がどのような影響を及ぼすのかについて調べるのが目的である。

[方法]

・孟宗竹のチップに蒸留水を加え、蒸圧処理を行なった後、細胞壁崩壊酵素により処理し、そのろ液を竹粗抽出物(Bamboo oligo-saccharides:以下BOS)として回収し、凍結乾燥を行ない粉末状にした。
・BOS 中成分の分画を, Cellufine MAX Phenyl(JNC 株式会社製)を担体として用いたカラムクロマトグラフィー法により分画した。分画の溶離液として、MilliQ 水を用いて疎水性相互作用によって親水性の画分と疎水性の画分に分画した。
・各画分と BOS を凍結乾燥させた粉末を 1mg/ml、0.1mg/ml、0.01mg/ml で 5%FBS/DMEM 液体培地に溶解して各濃度における免疫賦活と抗炎症をマウスマクロファージ株 RAW264.7 細胞の NO 産生を指標として評価を行なった。

[結果および考察]

①Cellufineにより分画した各画分の免疫賦活作用のNO活性(LPS(-))は沈殿の画分で最も高い値を示した。(沈殿 1mg/ml：13.7μmol/l)
②抗炎症作用の NO 活性(LPS(+))は BOS で最も抗炎症作用があった。(BOS0.01mg：49.3μmol/l)

biorefinery, bamboo, physiological activity

講演番号：3C7a04
講演日時：3 月 26 日 09:33～ 1 号館 C7 会場

高リグニン含有植物性バイオマス：ラカンカ残渣の堆肥化が植物の生育に及ぼす影響

Effects of a growth of plants by manure composting of *Siraitia grosvenorii* residue (High lignin-containing botanical biomass)

○伊藤 雄太、池 桂花、村田 雄司（サラヤ株式会社）
○Yuta ITO, Guihua CHI, Yuji MURATA (Saraya Co., Ltd.)

【背景・目的】

ラカンカ（*Siraitia grosvenorii*（Swingle））は中国原産のウリ科植物である。その果実にはモグロシドというトリテルペン配糖体を含み、強い甘味を持つため主に甘味料として利用されている。この天然の甘味成分は血糖値に影響しないため、肥満・糖尿病が気になる人を中心に世界中で需要が高まっている。しかしながら、甘味成分抽出後の残渣（ラカンカ残渣）が年間 8,000 トン以上排出され、廃棄物として処理されている課題がある。

我々はラカンカ残渣を未利用資源として有効活用し、持続可能な循環型の社会システムの構築を目的に鋭意工夫した結果、ラカンカ残渣に土壌改良効果があることを明らかにした。そこで本研究では、ラカンカ栽培にラカンカ残渣を用いる循環型農業を実施し、栽培条件に違いによる収穫量や甘味成分の含有量について検討した。

【方法・結果】

初めに甘味成分抽出後のラカンカ残渣の栄養成分について検討した結果、約 80%が繊維質であり、リグニンが最も多く含有していた。また、排出後のラカンカ残渣は腐敗する傾向にあったため、チップ状に加工して米ぬかなどの副資材と混合して発酵させた。チップ状への加工度合いや副資材の種類や割合、発酵期間について最適条件を検討した。この発酵させたものをラカンカ残渣堆肥として各栽培試験に用いた。栽培試験は、抽出工場の近くに圃場を整備して露地栽培で行った。圃場においてはラカンカ栽培で使用する化学肥料および有機肥料を施肥し、その上からラカンカ残渣堆肥の施術量を変えて条件ごとに 32 ㎡の区画に 8 株のラカンカを定植させて栽培試験を行った結果、ラカンカ残渣堆肥無施術と比べて施術量の増加に伴い、収穫量が約 2 倍に増加した。また、ラカンカの品質において重要な指標となる甘味成分の含有量については、収穫量が増加した条件で無施術と比べて低い値を示した。

【考察・結論】

これらの結果からラカンカ栽培においてラカンカ残渣堆肥の使用により、果実当たりの甘味成分の含有量は減少するが収穫量の増加により、単位面積当たりで得られるラカンカ甘味成分量が増加することを明らかにした。これらの結果から未利用資源であるラカンカ残渣を有効利用することにより、持続可能な循環型の社会システムの実現が期待される。

Monk fruit, Compost, Lignin

発表責任者：村田雄司（murata@saraya.com）

講演番号：3C7a05
講演日時：3 月 26 日 09:44～ 1 号館 C7 会場

二次細胞壁形成に関わる WRKY 転写因子欠損変異イネの作出とそのリグノセルロース性状解析
Characterization of lignocellulose from rice deficient in WRKY transcription factor involved in secondary cell wall formation

○宮本 託志[1]、高田 理江[1]、飛松 裕基[1]、鈴木 史朗[1]、山村 正臣[1]、刑部 敬史[2]、刑部 祐里子[2]、坂本 正弘[3]、梅澤 俊明[1,4] ([1]京大生存研、[2]徳大生物資源、[3]京大農、[4]京大グローバル生存基盤)
○ Takuji MIYAMOTO[1], Rie TAKADA[1], Yuki TOBIMATSU[1], Shiro SUZUKI[1], Masaomi YAMAMURA[1], Keishi OSAKABE[2], Yuriko OSAKABE[2], Masahiro SAKAMOTO[3], Toshiaki UMEZAWA[1,4] ([1]RISH, Kyoto Univ., [2]FBB, Tokushima Univ., [3]GSA, Kyoto Univ., [4]RUDGS, Kyoto Univ.)

【背景と目的】非樹木系リグノセルロースバイオマスの年間産出量は、樹木系リグノセルロースバイオマスの年間消費量の約 1.8 倍であり、イネ科植物由来のバイオマスがその約 9 割を占める。特に、エリアンサス（*Erianthus* spp.）やソルガム（*Sorghum* spp.）などの大型イネ科植物は、樹木と比べて数倍の年間乾物生産量を示すことから、リグノセルロース系バイオマス資源として期待されている。リグノセルロースの主要成分の一つであるリグニンは、有用芳香族化合物の原料となり得、また多糖成分よりも高い発熱量を示す。したがって、リグニン高含量の大型イネ科植物を育種することは、植物バイオマス由来の芳香族化学製品や固形燃料の生産において有益である。

シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）において同定された WRKY 転写因子 AtWRKY12[1)]は、リグニン生合成を含む二次細胞壁形成を抑制的に制御することが明らかとなっており、植物のリグニン含量改変のための有力な分子育種ターゲットと考えられる。本研究では、リグニンに富む高発熱型イネ科バイオマス植物の作出を目的とし、イネ科植物のモデルであるイネ（*Oryza sativa* ）を用いて、AtWRKY12 と高い相同性を示す WRKY 転写因子の欠損変異体を CRISPR/Cas9 により作出し、そのリグノセルロースの性状解析を行った。

【方法、結果及び考察】データベース検索により、AtWRKY12 と高い相同性を示す二つのイネ WRKY 型転写因子を見出した。それらの遺伝子をターゲットとする single guide RNA と *Cas9* 遺伝子を組み込んだ発現コンストラクトを構築し、イネ（品種：日本晴）に導入した[2,3)]。変異導入の有無は、植物体葉身から抽出した DNA をシーケンシング解析に供することで調べた。変異導入が確認された形質転換イネ株（WRKY 変異株）を登熟まで土耕栽培したところ、WRKY 変異株の草丈が野生型イネのそれと同程度であった一方で、WRKY 変異株の茎の乾物重量は野生型イネのそれと比べて有意に減少した。次に、茎組織から調製した細胞壁試料をチオグリコール酸リグニン定量分析[4)]に供したところ、WRKY 変異株の細胞壁試料あたりのリグニン含量は、野生型イネのそれよりも有意に高かった。即ち、本研究でターゲットとした二つの WRKY 転写因子はイネの茎組織においてリグニン生合成を負に制御しており、リグニンに富む高発熱型イネ科植物の作出に有効なターゲットであることが示唆された。現在、これらの WRKY 変異株のさらなる特性解析と、これら二つの WRKY 転写因子の両方を欠損させた二重変異株の作出を進めている。

【謝辞】本研究は「地球規模課題対応国際科学技術協力プログラム（SATREPS)」の支援のもとに行った。

【文献】1) Wang H et al. 2010, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 107: 22338. 2) Osakabe Y and Osakabe K 2015, Plant Cell Physiol., 56: 389. 3) Mikami M et al. 2015, Plant Mol. Biol. 88: 561. 4) Suzuki S et al. 2009, Plant Biotechnol. 26: 337.

Lignin, WRKY, rice

発表責任者：梅澤俊明（tumezawa@rish.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3C7a06
講演日時：3 月 26 日 10:05～ 1 号館 C7 会場

セルラーゼ超高生産 *Trichoderma reesei* 変異株の獲得

Acquirement of a cellulase Hyper-Producing mutant strain of *Trichoderma reesei*.

○加川 雄介、齋藤 悠香、平松 紳吾、山田 勝成（東レ(株) 先端融合研）
○ Yusuke KAGAWA, Haruka SAITO, Shingo HIRAMATSU, Katsushige YAMADA (TORAY INDUSTRIES, INC.)

【研究背景・目的】
当社では、食糧と競合しないセルロース系バイオマスを原料とした糖製造と、糖を用いた微生物変換によるポリマー原料など各種汎用化学品製造の研究に取り組んでいる。その最初のステップであるセルロース系バイオマスからの糖製造において、糖を安く製造するためには、糖化酵素であるセルラーゼのコストを低下させる必要がある。そこでオンサイトでのセルラーゼ低コスト生産を目指し、セルラーゼ生産能や分泌能が高い*Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ　ｒｅｅｓｅｉ*　ＱＭ９４１４標準株から、非遺伝子組換えでのセルラーゼ高生産変異株の獲得に挑戦した。
【研究成果】
育種を繰り返し重ねた結果、セルラーゼ超高生産変異株である*T.　ｒｅｅｓｅｉ*　Ｔ１２８１株の獲得に成功した。Ｔ１２８１株が生産するセルラーゼの蓄積量は、ＱＭ９４１４標準株の１８倍以上、公知の高生産株として知られる*T.　ｒｅｅｓｅｉ*　ＰＣ－３－７株の２倍以上である。さらに各酵素の活性については、セルロースを単糖まで分解する上で律速となっているβ－グルコシダーゼ（ＢＧＬ）の全タンパク質に対する比活性が、ＱＭ９４１４標準株の１０倍以上、ＰＣ－３－７株の４倍以上に向上した。また、培養液の粘度も標準株と比較して大幅に改善された。本大会では、①セルラーゼ蓄積量、②セルラーゼ活性、③スケールアップ適性に優れた当社独自のセルラーゼ超高生産変異株Ｔ１２８１株について発表する。

Trichoderma, Cellulase, Biomass

発表責任者：加川雄介（Yusuke_Kagawa@nts.toray.co.jp）

講演番号：3C7a07
講演日時：3 月 26 日 10:16～ 1 号館 C7 会場

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* へのセルラーゼ生産能の付与
Breeding of cellulase-producing *Saccharomyces cerevisiae*
○松崎 浩明、渡邉 翔介、秦野 琢之（福山大生命工）
○Hiroaki MATSUZAKI, Syosuke WATANABE, Takushi HATANO (Fukuyama Univ.)

近年、エネルギー消費量の増大により化石燃料の枯渇が危惧されている。そこで、バイオマス資源を利用したエネルギー生産が注目されている。しかし、サトウキビやトウモロコシなど食糧となる糖・デンプン系バイオマスの利用は、食糧不足や食糧の価格高騰を招く。本研究では、アルコール発酵酵母 *Saccharomyces cerevisiae* への遺伝子導入によるセルラーゼ生産能の付与により、セルロース系バイオマスからのバイオエタノールの生産を目指している。当研究室の過去の研究で *Cryptococcus flavus* 由来のカルボキシメチル(CM)-セルラーゼ(CMC1)や *Saccharomycopsis fibuligera* 由来のβ-グルコシダーゼ(BGL1)の生産能を付与したが、セルロースからのエタノール生産量は十分ではなかった。エンド型とエキソ型など種々のセルラーゼの生産によりセルロース分解効率を高めることが重要であると考えた。そこで、BGL1 および細菌 *Cellulomonas fimi* 由来のエンド型セルラーゼ(cenA)とエキソ型セルラーゼ(cex)の 3 種のセルラーゼ生産能の付与を検討した。まず *cenA* 遺伝子と *cex* 遺伝子を *GAP* プロモーター、*MEL1* 分泌シグナル配列と *GAP* ターミネーターとの間に連結した *S. cerevisiae* 分泌発現型 *cenA* と *cex* を持つ YEp 型プラスミド pHM1061 を構築した。また、*BGL1* 遺伝子を *GAP* プロモーター下流に連結した分泌発現型プラスミド pHM1062 を構築した(分泌シグナル配列は *BGL1* の配列を使用)。pHM1061 と pHM1062 を導入した二重形質転換体は、コンゴレッド染色と *p*-NPG 活性によりセルラーゼとβ-グルコシダーゼを分泌生産していることが確認できた。しかし、セルラーゼ活性は低いと考えられた。さらに、*CMC1* 遺伝子を *GAP* プロモーター下流に連結した分泌発現型プラスミド pSC7(分泌シグナル配列は *CMC1* の配列を使用)を導入した三重形質転換体はコンゴレッド染色により二重形質転換体よりもセルラーゼ活性が高いと考えられた。この形質転換体は紙片を形が崩れるぐらいまで分解した。

cellulase, *Saccharomyces cerevisiae*, ethanol fermentation

発表責任者：松崎浩明（matsuzak@bt.fubt.fukuyama-u.ac.jp）

講演番号：3C7a08
講演日時：3 月 26 日 10:27～ 1 号館 C7 会場

Aspergillus aculeatus 由来 β-glucosidase 1 の植物バイオマス糖化残渣への吸着が緩和された変異酵素の獲得

Reduction of irreversible adsorption of *Aspergillus aculeatus* ß-glucosidase 1 to alkaline-pretreated bagasse during saccharification by site-directed mutagenesis

○若宮 汐里[1]、馬場 祐太朗[1]、谷 修治[1]、柴田 望[2]、炭谷 順一[1]、川口 剛司[1]([1]阪府大院・生環科、[2]花王・生科研)

○Shiori WAKAMIYA[1], Yutaro BABA[1], Shuji TANI[1], Nozomu SHIBATA[2], Jun-ichi SUMITANI[1], Takashi KAWAGUCHI[1] ([1]Grad. Sch. Life and Env. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Biol. Sci. Res., Kao Corp.)

【背景と目的】セルロース系バイオマスの実用的な糖化酵素として，*Trichoderma reesei* 由来のセルラーゼ剤が世界中で広く利用されている。当研究室で単離された *Aspergillus aculeatus* No. F-50 株由来 β-glucosidase 1（BGL1）は単糖生成力に優れており，*T. reesei* 由来のセルラーゼ剤に対して高い添加効果を示すことが明らかとなっている。しかし，BGL1 は植物バイオマス糖化残渣へ吸着し機能する BGL1 量が減少することによって，バイオマスの糖化効率低下を引き起こすことが問題となっている。そこで本研究では，部位特異的に変異を導入することによって，植物バイオマス糖化残渣への吸着が緩和された変異酵素を獲得することを目的とした。

【方法と結果】C 末端領域に存在する fibronectin type III 様ドメイン（FnIII）がリグニンへの吸着に関与している可能性があるという知見を基に，リグニンと BGL1 の相互作用を阻害することを目指して，2 つの観点から FnIII 中のアミノ酸残基を選抜して変異導入を試みた。1 つ目は，リグニンの芳香環との cation-π 相互作用が低減するように, FnIII に存在する表面露出度の高い Arg 残基を選抜し，Ser 残基に置換した。2 つ目は，糖鎖の少ない FnIII の分子表面を被覆するために，N 結合型糖鎖を導入するようなアミノ酸置換を部位特異的に行った。以上の 2 通りのアプローチ方法によってそれぞれ 7 種類と 19 種類の変異酵素を設計し, まず *A. oryzae* 形質転換体の培養上清で活性の有無について評価を行った。野生型と同程度もしくはそれ以上の活性が確認できた 11 種類の変異酵素に関して電気泳動的に均一になるまで精製し，*T. reesei* PC-3-7 株由来のセルラーゼ剤で糖化処理したバイオマスへの吸着試験を行った。その結果，吸着が緩和された変異酵素 K806N を獲得した。野生型の吸着率は約 50% であるのに対し，獲得した変異酵素 K806N の吸着率は約 30% にまで低下していることが明らかとなった。次に, K806N のセロビオースおよび *p*-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside に対する kinetic parameter を測定したところ，野生型酵素と同程度の値が得られアミノ酸置換が活性に影響を及ぼさないことを確認した。また，K806N は糖鎖導入を目指して獲得された変異酵素であるので，実際にこのアミノ酸置換によって BGL1 に糖鎖が導入されているかどうかを調べた。プロテアーゼ処理を行い SDS-PAGE によって分離後，切断されたバンドシフトを野生型と比較することで確認したが，新たな糖鎖付加の有無は確認できなかった。K806N がバイオマスへの吸着が緩和されたのは，糖鎖導入によるものかアミノ酸置換によるものかは明らかにならなかった。

Aspergillus aculeatus, ß-glucosidase, biomass

講演番号：3C7a09
講演日時：3 月 26 日 10:38～ 1 号館 C7 会場

Clostridium beijerinckii を宿主とした *Clostridium cellulovoransi* 由来 Endoglucanase O の発現
Expression of endoglucanase O from *Clostridium cellulovoransi* in *Clostridium beijerinckii*
須江 夏希、平松 愛子、矢田 百絵、○三宅 英雄（三重大院・生資）
Natsuki SUE, AIKO HIRAMATSU, Momoe YADA, ○Hideo MIYAKE (Grad. Sch. Bioresour., Mie Univ.)

【背景と目的】
ブタノールはエタノールより燃焼効率が高く、既存のガソリン流通インフラをそのまま使えるなどメリットが多いアルコールである。*Clostridium beijerinckii* は、中温性の嫌気性細菌であり高いブタノール生産量を示すブタノール生産菌である。これまで *C. beijerinckii* を宿主とした異種タンパク質発現についていくつか報告はあるが、いずれも発現量が少なく、目的遺伝子によって発現量も異なるためプロモーターの選択は重要である。*Clostridium cellulovorans* も中温性の嫌気性細菌であり、セルロソームをはじめ様々なセルラーゼやヘミセルラーゼを生産する。特に分泌型のセルラーゼである Endoglucanase O (EngO) は、セルロースからセロビオースを生成し、これまでのオミックス解析でセルロース分解において重要な働きを示している。本研究では、*C. beijerinckii* を宿主とした EngO の発現系を構築することを目的とした。
【方法・結果】
プロモーターおよびターミネーターの検討として、*C. cellulovorans* 由来の *cellulose binding protein* A (*cbpA*) 遺伝子、*Clostridium acetobutylicum* 由来の *thiolase* 遺伝子、*C. beijerinckii* 由来の *amylase* 遺伝子、*Clostridium saccharobutylicum* 由来の *endoglucanase A* 遺伝子のプロモーターとターミネーター領域をそれぞれクローニングした。プロモーターの下流にレポーター遺伝子として *engO* 遺伝子を連結し、*E. coli–Clostridium* のシャトルベクターである pMTL500E に導入することで様々な *engO* 発現プラスミドを構築した。これらのプラスミドを嫌気条件下において、エレクトロポレーション法を用いて *C. beijerinckii* に形質転換した。得られた形質転換体を 1 %カルボキシメチルセルロースを含む寒天培地に植菌し、嫌気条件下で培養した。その後、コンゴーレッド染色を行った結果、*thiolase* プロモーター以外の形質転換体でセルラーゼ活性が観測された。さらに培養上清の EngO 活性を定量的に解析したところ、*cbpA* 遺伝子のプロモーターを用いた形質転換体が最も高い EngO の生産を示した。現在、このプロモーターを中心に *C. beijerinckii* を宿主とした様々なタンパク質発現系を構築している。

Clostridium, cellulase, protein expression

発表責任者：三宅英雄（miyake@bio.mie-u.ac.jp）

講演番号：3C7a10
講演日時：3 月 26 日 10:49～ 1 号館 C7 会場

ホテイアオイを原料とするバイオエタノール生産における木材腐朽菌による糖化および発酵

Saccharification and fermentation by wood-rotting fungi in bioethanol production from water hyacinth

○山中 優花、井上 瑛絵、堀沢 栄 (高知工科大)
○Yuka YAMANAKA, Akie INOUE, Sakae HORISAWA (Kochi Univ. of Tech)

近年、地球温暖化防止や二酸化炭素削減などという観点から、カーボンニュートラルであるバイオエタノールが液体燃料として見直され、その中でも食料と競合しないセルロース系原料からのエタノール生産が注目を集めている。現在セルロース系原料を用いたエタノール生産では、脱リグニンを含む前処理は主に物理・化学的処理が行われているが、それらは設備の高コスト、消費エネルギーが大きいこと、発酵阻害物質の生成などが問題となっている。そこで、脱リグニンや糖化を酵素や微生物によって行う生物的処理法も検討されているが、処理時間の長さ、酵素の高コストなどが課題である。本研究では、バイオエタノール生産の各工程において木材腐朽菌を用いる方法を検討した。木材腐朽菌は、植物細胞壁の主成分であるリグニン、セルロース、ヘミセルロースを分解することができるので、脱リグニン、糖化、発酵の全ての工程に関与できると考えられ、工程を一貫して行うことが可能である。本研究では、セルロース・セミヘルロースに対する分解能をもつとされる褐色腐朽菌である、オオウズラタケ(*Fomitopsis palustris* NBRC30339)を用いた。また原料として、増殖速度が大きく、過剰繁殖による水路閉鎖などの問題を抱えるホオテイアオイ(*Eichhornia crassipes*)の利用を検討した。

我々はこれまでに発酵性の高い木材腐朽菌株であるスエヒロタケ(*Schizophyllum commune* NBRC4928)を選抜し、イナワラ、ダンチク(*Arundo donax*)など比較的リグニン含有量の少ないソフトバイオマスを原料とした場合、エタノール生産量が大きいということがわかっている。そこで本研究ではまず、ホテイアオイの茎部分の主要成分分析を行った。そしてスギのリグニン含有率が 31.4%なのに対し、ホテイアオイは 10.4%と比較的低い値を示し、糖源となるホロセルロースは 57.4%であったため、バイオエタノール生産の原料として適していると考えられた。次にオオウズラタケ NBRC30339 のグルコースからのエタノール発酵性を検討した。オオウズラタケは理論収率の 78.9%に達するために 28 日要するものの、スエヒロタケ NBRC4928 と同程度のエタノール回収率であった。以上より、ホテイアオイはリグニン含有量が比較的少なく、脱リグニンを含む資源変換に適していること、オオウズラタケが高い発酵性能を有することが示された。このことから、オオウズラタケを用いたホテイアオイからのエタノール生産は検討に値するものであると考えられる。現在は、ホテイアオイを原料としたオオウズラタケによるエタノール発酵実験を行っている。

bioethanol, wood rotting fungi, cellulosic material

講演番号：3C7a11
講演日時：3 月 26 日 11:10～ 1 号館 C7 会場

アルギン酸を単一炭素源とするポリヒドロキシアルカン酸合成菌の探索
Isolation and screening of microorganisms for polyhydroxyalkanoate production from alginate as a sole carbon source
○森谷 大樹[1]、佐藤 文吉[2]、佐々木 義己[2]、下飯 仁[1]、山田 美和[1]([1]岩手大・院総合科学、[2]三陸バイオ)
○Hiroki MORIYA[1], Bunkichi SATO[2], Yoshimi SASAKI[2], Hitoshi SHIMOI[1], Miwa YAMADA[1] ([1]Iwate Univ, [2]Sanriku bio)

【目的】
ポリヒドロキシアルカン酸（PHA）は、バイオマスを原料として微生物によって合成され、生分解性を有することから、低環境負荷型の素材として注目されている。本研究では、廃棄海藻の成分を原料とした微生物による PHA 合成を目指している。これまでに当研究室では、海藻を構成する糖の一つであるマンニトールからポリヒドロキシブタン酸[P(3HB)]を合成する *Burkholderia* sp. M5M02 を見出した[1]。本研究では、多様な海藻に多く含まれるアルギン酸を単一炭素源として利用可能な PHA 合成菌の取得を目指し、自然界からスクリーニングを行った。
【方法・結果】
岩手県大船渡市から海藻や海水をスクリーニング源として採取し、pH 5.0、7.0、9.0 の ZoBell 2216E 海水培地で培養した。その後、希釈した各培養液を海水平板培地に植菌し、コロニーを形成させることで形態および色の異なる株を単離した（311 株）。続いて、アルギン酸を単一炭素源とする Nile red 含有 PHA 合成平板培地に植菌し、赤く呈色したコロニーを PHA 合成候補株として選抜した（171 株）。選抜した PHA 合成候補株を PHA 合成用液体培地で培養し、得られた菌体を凍結乾燥した。凍結乾燥菌体にクロロホルムを添加して 2 日間 70℃でインキュベートし、ポリマー抽出を行った。抽出したポリマーをエタノリシス処理し、GC-MS 分析に供した。その結果、14 株から P(3HB)合成が示唆された。それらの株を用いてスケールアップ培養を行い、抽出したポリマーを ^{1}H-NMR 分析に供した結果、13 株で P(3HB)合成が確認された。13 株のうち、P(3HB)蓄積率が安定して高い株を選抜し、16S rDNA 塩基配列を決定した。BLAST による 16S rDNA 塩基配列の相同性検索を行った結果、*Cobetia* 属細菌と 99%の相同性を示した。これまでにアルギン酸を単一炭素源として PHA を合成する菌の報告はなく、本研究では新規の性質を有する有用な微生物を見出したと考えられる。
【参考文献】
[1] Yamada M, et al., *Fisheries Science* (2018) 84:405-412

polyhydroxyalkanoate, seaweed, alginate

発表責任者：山田美和（myamada@iwate-u.ac.jp）

講演番号：3C7a13
講演日時：3 月 26 日 11:32～ 1 号館 C7 会場

ルビスコ経路を利用した組換え大腸菌におけるグリコール酸ポリマー生合成系の構築
Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxidase (RubisCO)-mediated de novo synthesis of glycolate-based polyhydroxyalkanoate in Escherichia coli

永田 暁洋[1]、齋藤 樹理[1]、横尾 俊憲[1]、工藤 悠希[1]、堀 千明[1]、大井 俊彦[1]、田口 精一[2]、○松本謙一郎[1,3] ([1]北大院工、[2]東農大生命科学、[3]ALCA-JST)
Akihiro Nagata[1], Juri Saito[1], Toshinori Yokoo[1], Yuki Kudo[1], Chiaki Hori[1], Toshihiko Ooi[1], Seiichi Taguchi[2], ○Ken'ichiro MATSUMOTO[1,3] ([1]Eng. Hokudai, [2]Tokyo Univ. of Agric., [3]ALCA-JST)

植物や藍藻などの炭酸固定経路(CBB サイクル)の鍵酵素である Ribulose 1,5-bisphosphate (RuBP) carboxylase/oxygenase (RubisCO) は、酸化反応により 2-phosphoglycolate (2PG) を生成することが知られる。2PG は脱リン酸化によりグリコール酸(GL)へと変換された後、光呼吸経路を経てリサイクルされる。一方我々は、微生物産生ポリエステルであるポリヒドロキシアルカン酸の改変型重合酵素を用いることにより、GL ユニットをポリマー中に取り込んだ共重合体の合成に成功している。これらの知見から、CBB サイクルを GL ポリマーのモノマー供給系として利用できる可能が示された。そこで本研究では、RubisCO および関連酵素を大腸菌内で発現させることにより、RubisCO 経路が GL 供給系として作動するかどうかを検証した。

宿主として GL 酸化酵素欠損株（Δ*glcD*）*Escherichia coli* JW2946 株を用いた。本代謝経路の構築には、酸化反応に対する基質特異性が高い酵素の方が適していると考えられたため、CO_2/O_2 基質特異性が比較的低い光合成細菌由来の RubisCO を用いた。合わせて、RuBP を供給する酵素 (PrkA)、2PG 脱リン酸化酵素 (PGPase) 遺伝子を導入し、2 % xylose を含むミネラル培地で培養した。組換え大腸菌の細胞内に RuBP や GL の蓄積が見られたことから、導入遺伝子群が機能的に発現していることが確認された。そこで、これらの遺伝子に加えて、GL-CoA・3-ヒドロキシブチリル (3HB) CoA 供給酵素群および重合酵素の遺伝子を導入した。本組換え株を培養して得られたポリマーをガスクロマトグラフィーおよび ^{1}H-NMR によって解析した結果、合成されたポリマーは GL を約 10 mol%含む poly(GL-*co*-3HB)であることが確認された。これらの結果から、RubisCO 経路を利用した GL ポリマーの合成が可能であることが示された。

polyhydroxyalkanoate, RubisCO, glycolate

発表責任者：松本謙一郎（mken@eng.hokudai.ac.jp）

講演番号：3C7a14
講演日時：3 月 26 日 11:43～ 1 号館 C7 会場

Pseudomonas sp. 61-3 のポリヒドロキシアルカン酸生合成におけるモノマー供給系酵素遺伝子のクローニングおよび共重合ポリエステル生合成

Cloning of the genes encoding monomer supplying enzymes for polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Pseudomonas* sp. 61-3 and biosynthesis of copolymer

○西上 明花[1]、森 恵美[1]、橋本 真奈[2]、後藤 早希[1]、阿部 英喜[3]、松崎 弘美[1,2]（[1]熊県大院環境共生、[2]熊県大環境共生、[3]理研-CSRS）

○Haruka NISHIGAMI[1], Megumi MORI[1], Mana HASHIMOTO[2], Saki GOTO[1], Hideki ABE[3], Hiromi MATSUSAKI[1,2] ([1]Grad. Sch. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [2]Fac. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [3]RIKEN-CSRS)

【背景および目的】微生物が菌体内に合成・蓄積するポリヒドロキシアルカン酸（PHA）は、化学合成プラスチックに代わる環境調和型の生分解性プラスチックとして期待されている。PHA の一つであるポリ-3-ヒドロキシブタン酸［P(3HB)］は多くの PHA 生産菌によって合成されるが、硬くて脆く、実用的な材料とは言えない。しかし、これに炭素数 6~12 の中鎖長 3-ヒドロキシアルカン酸（3HA）ユニットを導入した P(3HB-*co*-3HA)共重合ポリエステルは丈夫でしなやかな物性を有する。中鎖長 3HA ユニットを供給する経路として、脂肪酸合成経路および脂肪酸のβ酸化経路が知られている。そこで、本研究では、*Pseudomonas* sp. 61-3 より、脂肪酸合成経路から PHA 重合酵素の基質である(*R*)-3-ヒドロキシアシル CoA（(*R*)-3HA-CoA）を生成する (*R*)-3HA-CoA リガーゼ遺伝子、そして、β酸化経路から(*R*)-3HA-CoA を生成する (*R*)体特異的エノイル CoA ヒドラターゼ遺伝子（*phaJ*）をクローニングおよび同定し、これらの遺伝子を導入した組換え株による P(3HB-*co*-3HA)の合成を行うことを目的とした。

【方法および結果】(*R*)-3HA-CoA リガーゼ活性を有する *Pseudomonas putida* KT2440 の PP0763 および *Pseudomonas aeruginosa* PAO の PA3924 の翻訳産物と相同性を示すタンパク質の保存領域を基にプライマーを設計し、*Pseudomonas* sp. 61-3 のゲノム DNA を鋳型とした degenerate PCR を行った。その後、nested PCR を行って、3.5 kb *Sal*I-*Eco*RI 領域の全塩基配列を決定した。推定(*R*)-3HA-CoA リガーゼ遺伝子を、(*R*)-3-ヒドロキシアシル ACP チオエステラーゼ遺伝子（*phaG*$_{Ps}$）および低基質特異性 PHA 重合酵素遺伝子（*phaC1*$_{Ps}$）とともに *Cupriavidus necator*（旧名 *Ralstonia eutropha*） H16 の PHA 重合酵素遺伝子破壊株（H16dC）に導入し、フルクトースを唯一の炭素源として培養を行った。その結果、中鎖長 3HA ユニットを 5.4 mol%取り込んだ P(3HB-*co*-3HA)を 7.6 wt%合成した。これは、PA3924 を導入した組換え株が合成した PHA と同様のモノマー組成および蓄積率であった。このことは、クローニングした *Pseudomonas* sp. 61-3 の推定(*R*)-3HA-CoA リガーゼ遺伝子の翻訳産物が(*R*)-3HA-CoA リガーゼ活性を有することを示している。現在、脂肪酸のβ酸化経路から中鎖長(*R*)-3HA-CoA を供給する(*R*)体特異的エノイル CoA ヒドラターゼ遺伝子（*phaJ*$_{Ps}$）のクローニングと解析を進めている。

biodegradable plastic, polyhydroxyalkanoate, PHA

講演番号：3C7p01
講演日時：3 月 26 日 13:50～ 1 号館 C7 会場

上面ビール酵母の New Flo 型凝集遺伝子解析

Analysis for New-Flo type flocculation genes of top-fermenting yeast

○大竹 麟[1]、竹内 駿[1]、中村 建介[2]、尾形 智夫[1] ([1]前橋工科大生物工、[2]前橋工科大生命情)
○Akira OOTAKE[1], Syun TAKEUCHI[1], Kensuke NAKAMURA[2], Tomoo OGATA[1] ([1]Maebashi Institute of Technology, Biotechnology, [2]Maebashi Institute of Technology, Life Science and Informatics)

【目的】酵母凝集性は、酵母細胞表面上のレクチン様タンパク質と糖鎖が結合し、酵母が大きな細胞塊となって培養液や発酵タンク底に沈む性質である。凝集性には 2 種類の凝集阻害型あり、マンノースの存在下でのみ凝集阻害を示す Flo1 型と、マンノースの他にグルコースやマルトースの存在下でも凝集阻害を示す New Flo 型が存在する。ビールを醸造する場合、原料である麦汁の主成分マルトースによって凝集阻害の起こる New Flo 型が望ましい。New Flo 型凝集性を示す酵母の代表的な遺伝子に *Lg-FLO1* 遺伝子が存在するが、この遺伝子は下面ビール酵母でのみ確認されている遺伝子であり、上面ビール酵母では New Flo 型凝集性を示す遺伝子は確認されていない。そこで本研究では上面ビール酵母ゲノムの New Flo 型凝集性遺伝子と、その関連ドメインの解析を行った。
【方法】実験菌株は非凝集性上面ビール酵母株 *Saccharomyces cerevisiae* Y6 からの胞子分離によって得た、New Flo 型凝集性胞子分離体 Y7 株を用いた。凝集性の測定はカルシウムイオン存在下での凝集による菌液の吸光度の変化により測定した。New Flo 型凝集遺伝子の解析は、Y7 株ゲノムを次世代シークエンサーHiseq2500 で解析し、得られたリードを、アセンブリソフトウェア Platanus を用いてアセンブリし、Scaffold を作成した。作成した Scaffold と実験室酵母株 S288C の凝集関連遺伝子で相同性の高い配列を選択した。選択した配列よりプライマーを作成し、PCR を行った。
【結果】Y7 株ゲノムの次世代シークエンス解析データと実験室酵母株 *S. cerevisiae* S288C 株ゲノムデータとの BLAST 解析の結果、凝集関連遺伝子 *FLO* の N 末端側非翻訳領域の相同性から、Y7 株ゲノムには第 I 染色体右腕末端に *FL01* 遺伝子ホモログ、左腕末端に *FL09* 遺伝子ホモログが存在すると推定された。第 VIII 染色体右腕末端には *FL05* 遺伝子ホモログと *Lg-FL01* 遺伝子ホモログの両方が存在することが次世代シークエンス解析データと PCR により確認された。このことから Y7 株ゲノムの第 VIII 染色体の右腕末端領域は heterozygous な構造であると考えられる。*FL05* 遺伝子ホモログと *Lg-FL01* 遺伝子ホモログの C 末端側非翻訳領域は S288C 株第 I 染色体左腕末端の配列が存在していると推定される。また *FL01* 遺伝子ホモログは ORF 内上流に終止コドンがコードされており、実際には凝集性に関与していないと考えられる。これらのことから上面ビール酵母ゲノムの染色体末端領域は、S288C 株の染色体と構造が大きく異なり、酵母の表現型に大きく影響していると推察される。

本研究の一部は、公益財団法人発酵研究所 2015 年度一般研究助成を受けて実施した。

yeast flocculation, brewing, flocculation gene

発表責任者：尾形智夫（tomoo.ogata@maebashi-it.ac.jp）

講演番号：3C7p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ 1 号館 C7 会場

国酒酵母の系統学的検討
Phylogenetic analysis of kokushu yeast
○森谷 千星[1]、門倉 利守[1]、中山 俊一[1]、田中 尚人[2]、藤田 信之[2]、鈴木 健一朗[1] ([1]東農大醸造、[2]東農大微生物)
○Chise MORIYA[1], Toshimori KADOKURA[1], Shunichi NAKAYAMA[1], Naoto TANAKA[2], Nobuyuki FUJITA[2], Kenichiro SUZUKI[1] ([1]Dept. Ferment. Sci., Tokyo Univ. of Agric., [2]Dept. Mol. Microbiol., Tokyo Univ. of Agric.)

【目的】The yeasts a taxonomic study において、清酒酵母の数株が *Saccharomyces cerevisiae* の synonym に記載されて以来、国酒酵母は全て *S. cerevisiae* として扱われている。しかし、*S. cerevisiae* は自然界から産業界までの広範囲の株の complex であることから、実際の国酒醸造の実用株は、清酒酵母、泡盛酵母、焼酎酵母とそれぞれの醸造に適した酵母に区別して利用している。そのため、国酒酵母は *S. cerevisiae* とは異なる表現型を多く有することが報告されている。演者らはこれまで、The yeasts 5th の key to species に従っても、国酒酵母は *S. cerevisiae* とは異なる性質の株が群レベルで存在することを明らかにした。現在、酵母の主な分類基準は特定遺伝子による分子系統学的解析であるが、多くの国酒酵母の菌株を用いては未だなされていない。そこで本報告では、The yeasts 5th にて系統分類に採用されている 5 遺伝子(mtSSU rRNA、*COX2*、EF1-α、LSU rRNAD1/D2、ITS)の連結配列を用いて多遺伝子系統解析を行い、特異性を有する国酒酵母の群の系統学的な特性を検討した。
【方法】供試菌株として、国酒酵母の清酒酵母 43 株(1950～1960 年代竹田分離 10 株、協会清酒酵母 11 株)、泡盛酵母 19 株(1964 年竹田分離株 13 株)、焼酎酵母 38 株(1964 年竹田分離株 28 株)を用いた。また対照として、The yeasts 5th の *Saccharomyces* 属の 8 種、及び *S. eubayanus*、*S. uvarum* の基準株のデータベース上に公開されている各配列を用いた。遺伝子解析方法として、5 遺伝子それぞれをコロニーPCR 法で増幅し、塩基配列を決定した。各遺伝子の配列を全て連結させた後、ClustalW にてアライメントを行い、NJ 法による系統樹を構築した。
【結果】5 遺伝子の連結配列による系統樹において、国酒酵母は全て *S. cerevisiae* と同じクレードに含まれた。しかし、*S. cerevisiae* と比較して、*COX2* に 3 塩基、EF1-α に 1 塩基、ITS に 1 塩基の置換による差異が共通に存在したことから、*S. cerevisiae* クレードの中でも国酒酵母が群として分岐した。これは、生理学的特性だけでなく分子系統学的な面においても、国酒酵母が特異的な要素を有することを示唆しているものと考えられる。しかし、異種である *S. bayanus* 及び *S. pastorianus* が同一のクレードを形成したことから、限定された領域による系統解析のみでは区別が困難であることも示唆された。そのため、今後は *Saccharomyces* 属における国酒酵母の系統学的な位置付けを明確にするために、全ゲノムレベルでの系統解析も必要であると考えられる。

kokushu yeast, *Saccharomyces*, Taxonomy

発表責任者：門倉　利守（kadokura@nodai.ac.jp）

講演番号：3C7p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ 1 号館 C7 会場

酵母の染色体異数性が清酒醸造に与える影響
Effect of yeast chromosomal aneuploidy on sake brewing
○堀田 夏紀[1]、小高 敦史[1]、松村 憲吾[1]、杉山 峰崇[2]、笹野 佑[3]、原島 俊[3]、秦 洋二[1]([1]月桂冠・総研、[2]阪大院・工、[3]崇城大・生物生命)
○Natsuki HOTTA[1], Atsushi KOTAKA[1], Kengo MATSUMURA[1], Minetaka SUGIYAMA[2], Yu SASANO[3], Satoshi HARASHIMA[3], Yoji HATA[1] ([1]Res. Inst., Gekkeikan Sake Co., Ltd., [2]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [3]Fac. Biotechnol. Life Sci., Sojo Univ.)

【背景・目的】交配育種は遺伝的に多様な株を得ることができるが、清酒酵母は胞子形成能が低く、あまり行われていない。当研究所では、接合型を指標として一倍体を取得したが、清酒酵母では減数分裂時に染色体不分離が起こりやすく、異数体となりやすいこと、また、得られた異数体株は醸造特性が異なっていることを昨年度の本大会で報告した[1)]。この結果から、染色体の異数性は清酒醸造に影響を与えるのではないかと考えた。

一方、近年、微生物育種技術としてゲノム工学技術の注目が高まっている。ゲノム工学技術は、個々の遺伝子に着目し組換え操作を繰り返す従来の遺伝子工学による育種技術とは異なり、ゲノムスケールで多数の遺伝子を一挙に操作することが可能である。このような背景のもと開発された染色体操作技術のひとつに、任意の染色体領域を重複できる PCR-mediated chromosome duplication (PCDup) 法がある[2)]。遺伝子に変異はなくても、染色体の異数性や部分異数性によってそのコピー数のバランスが異常になると表現型が変化することが知られていることから、PCDup 法により作製された菌株を用いて部分異数性と有用形質の関係について研究が進められている。

そこで今回、異数性が清酒醸造にどのような影響を与えるのか明らかにするため、PCDup 法により作製された染色体部分重複株を用いた清酒醸造試験を行った。

【方法】実験室酵母 BY4742 を親株とし、16 本の染色体を 100～200 kb 毎に重複させた染色体部分重複株 50 株を、総米 50 g の清酒醸造試験に供し、清酒の一般分析（日本酒度、アルコール分、酸度、アミノ酸度)、有機酸、糖、アミノ酸、香気成分を分析した。

【結果・考察】染色体部分重複株では、炭酸ガス減少量を指標とした発酵経過を見ると、発酵の良さ、立ち上がりの良さについては株により異なっていた。また、有機酸組成を分析したところ、2 番染色体の右腕部分を重複させた株でリンゴ酸が低生産になっていた。清酒酵母 GA-1 についてもその一倍体株の異数性および醸造特性を比較したところ、同じく 2 番染色体が増加している株ではリンゴ酸が低く推移しており、染色体部分重複株と同様の傾向が見られたことから、2 番染色体の異数性はリンゴ酸生成に影響を与えると考えられた。その他の成分と異数性の関連についても報告する予定である。

1) 日本農芸化学会 2018 年度大会 2A08p01
2) W.Natesuntorn *et al.*, *Sci. Rep.*, 5, 12510 (2015)

Saccharomyces cerevisiae, aneuploid, sake

発表責任者：堀田　夏紀（hotta@gekkeikan.co.jp）

講演番号：3C7p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ 1 号館 C7 会場

セルレニン耐性/感受性を指標に得られた清酒酵母のゲノムの特徴と醸造特性
Relationship between genetic structure of sake yeast strains obtained by using cerulenin-resistant or sensitive property and sake brewing characteristics
○小高 敦史、堀田 夏紀、松村 憲吾、秦 洋二 (月桂冠・総研)
○Atsushi KOTAKA, Natsuki HOTTA, Kengo MATSUMURA, Yoji HATA (Res. Inst., Gekkeikan Sake)

【目的】
出芽酵母は、*FAS2* 遺伝子の 3748 番目の G が A へと変異することにより、脂肪酸合成酵素阻害剤セルレニンに対して耐性を示し、清酒醸造において吟醸香のひとつであるカプロン酸エチルを高生産する。吟醸造りに多用される清酒酵母きょうかい 1801 号（K-1801）はこの変異型 *FAS2* をヘテロに持っている。これまでに我々は、K-1801 を親株として、セルレニンに対して感受性を示した変異株（FAS2-WT）[1)] と高濃度セルレニンに対して耐性を示した変異株（FAS2-MUT）[2)] をそれぞれ複数取得しており、清酒小仕込み試験により、FAS2-WT は酢酸イソアミル高生産、FAS2-MUT はカプロン酸エチル超高生産であることを報告している。FAS2-WT は野生型 *FAS2* のみ、FAS2-MUT は変異型 *FAS2* のみを持っている。しかし、それぞれの変異株間では増殖や清酒醸造特性が異なっており、特に FAS2-MUT は変異株間での差が非常に大きかった。こうした差異の原因を明らかにするため、以下の検討を行った。
【方法】
親株 K-1801、変異株 FAS2-WT（10 株）および FAS2-MUT（7 株）を次世代シーケンサー解析に供した。*FAS2* 遺伝子のある 16 番染色体の変異の出現頻度を調べることによって 16 番染色体で生じたヘテロ接合性の消失（LOH）のパターンを推測した。また、全ゲノムに対してデプスおよび変異の出現頻度をまとめることによって各染色体の本数を評価した。
【結果】
FAS2-WT の多くは 16 番染色体の一部で LOH が生じていた。他方、FAS2-MUT の多くは 16 番染色体を 1 本消失していた。また FAS2-WT は親株 K-1801 と同じ倍数性であり、一部の株で異数性がみられた。他方、FAS2-MUT は全て異数体であり、菌株間で染色体の本数が大きく異なっていた。以上のことから FAS2-MUT の菌株間の増殖、醸造特性の差が大きいのはゲノムの構成が大きく異なることが一因ではないかと考えられた。現在、異数性と醸造特性などの表現型との関連について解析を行っている。

1）小高ら：醸協, **112**, 133-139（2017）
2）Kotaka et al.: J. Biosci. Bioeng., **110**, 675-678（2010）

cerulenin, aneuploidy, sake brewing

発表責任者：小高　敦史（a_kotaka@gekkeikan.co.jp）

講演番号：3C7p05
講演日時：3 月 26 日 14:34～ 1 号館 C7 会場

清酒酵母の減数分裂染色体組換え不全を相補する遺伝子のクローニング

Cloning of the gene that complements meiotic recombination defect of sake yeast

○下飯 仁、川村 夏希、山田 美和（岩手大農）
○Hitoshi SHIMOI, Natsuki KAWAMURA, Miwa YAMADA (Iwate Univ.)

【目的】清酒醸造に用いられているきょうかい7 号(K7)などの清酒酵母は胞子形成能が低く、まれに生じた胞子もほとんど発芽しない。我々は、その原因の一つとして清酒酵母の減数分裂染色体組換えには欠陥があることを報告した[1)]。このため清酒酵母は減数分裂時に染色体の不分離が生じ、染色体の欠損や異数性のため胞子の生存率が著しく低下すると考えられた。今回、K7系統株の減数分裂染色体組換え欠損を相補する遺伝子をクローニングして解析した。その結果、K7では、減数分裂染色体組換えの開始に必要な染色体二重鎖切断を引き起こすSpo11をコードする遺伝子の変異のために染色体組換えが生じず、胞子発芽率が低下していることが明らかとなった。

【方法】K7 泡なし株の栄養要求性株である UT-1（*ura3*Δ/*ura3*Δ *trp1*Δ/*trp1*Δ）を親株として *URA3* のマーカーリサイクル法により *CAN1* および *ADE2* をヘテロザイガスに遺伝子破壊し、さらに *TRP1* をマーカーとして *HIS3* をヘテロザイガスに遺伝子破壊した。作成した株の中から、*ADE2* と *HIS3* がシスの関係にある株（UTCAH-3）を選択して、実験室酵母の YCp 型プラスミドゲノムライブラリを形質転換した。ウラシル欠培地で選択した形質転換体をレプリカして胞子形成させ、一倍体を選抜するため canavanine および 5-fluoroanthranilic acid を含み、ヒスチジンを含まない選択培地で培養した。*ADE2* と *HIS3* は共に 15 番染色体にあるため染色体組換えがない場合、選択培地で生育する株は *can1 trp1 ADE2 HIS3* であり、すべて白コロニーとなる。一方、染色体組換えが生じた場合、*can1 trp1 ade2*Δ *HIS3* も増殖するため赤コロニーも生じることになる。

【結果】形質転換体約 1 万株を胞子形成させた後、選択培地で増殖させた結果、組換え一倍体の可能性のある赤色のコロニーを 1 株取得した。この株からプラスミドを抽出し、UTCAH-3 を再形質転換したところ、胞子形成後に高い頻度で赤コロニーを生じ、四分子解析による胞子発芽率も向上した。このプラスミドの中には減数分裂組換え時の染色体二重鎖切断をおこなう酵素をコードする *SPO11* が含まれていた。実験室酵母の *SPO11* で UTCAH-3 を形質転換すると、減数分裂染色体組換えと胞子発芽能が回復したが、K7 の *SPO11* を形質転換しても、減数分裂染色体組換えと胞子発芽能は回復しなかった。また、K7-*SPO11* は、実験室酵母の *spo11*Δ/*spo11*Δの低胞子形成能や低胞子発芽率を回復させることができなかった。以上の結果から、K7 では Spo11 が機能しておらず、これが染色体組換え不全と低胞子発芽能の原因であると考えられた。

1) Shimoi et al. J. Biosci. Bioeng. in press

Sake yeast, meiosis, *SPO11*

発表責任者：下飯仁（simoi@iwate-u.ac.jp）

講演番号：3C7p06
講演日時：3 月 26 日 14:55～ 1 号館 C7 会場

エタノール耐性清酒酵母きょうかい 11 号で発見されたアデニル酸シクラーゼ遺伝子変異の実験室酵母のストレス耐性に対する効果

Effect of the mutation of the adenylate cyclase gene found in sake yeast Kyokai no. 11 on stress tolerance of a laboratory yeast.

○石田 義大[1]、山田 美和[1]、森中 和也[2]、赤尾 健[2]、下飯 仁[1] ([1]岩手大、[2]酒総研)
○Yoshihiro Ishida[1], Miwa Yamada[1], Kazuya Morinaka[2], Takeshi Akao[2], Hitoshi Shimoi[1] ([1]Iwate Univ., [2]NRIB)

【目的】
清酒酵母きょうかい 11 号（K11）はきょうかい 7 号 （K7）の変異株であり、エタノールをはじめとする様々なストレスに耐性である。K11 の表現型の原因となる変異を探索した結果、アデニル酸シクラーゼをコードする遺伝子 *CYR1* の変異が原因であることがわかった。この変異（*CYR1*^{G2066A}）は Cyr1 の活性調節因子である Ras2 と相互作用する領域に存在することから、この変異が K11 における Ras2 と Cyr1 のシグナル伝達に影響を与えており、その結果エタノール耐性が向上することが考えられた。そこで本研究では、清酒酵母の変異（*CYR1*^{G2066A}）に相当する変異（*CYR1*^{G2042A}）を実験室酵母菌株に導入し、その表現型を調べた。
【方法と結果】
二倍体実験室酵母 BY4743 の一方の *CYR1* をロイシン栄養要求性マーカーを用いて遺伝子破壊した。作成したヘテロ遺伝子破壊株に野生型の *CYR1* を含む YCp 型プラスミドを形質転換した。作成した菌株の胞子形成と四分子解析をおこない、*CYR1* が遺伝子破壊されているがプラスミド上の *CYR1* によって相補されている一倍体菌株を取得した。次に、*CYR1*^{G2042A} を有する YCp 型プラスミドを作製し、これを用いて先に取得した一倍体菌株を形質転換した。この形質転換体から野生型の *CYR1* 遺伝子を含むプラスミドを除去することで、*CYR1*^{G2042A} を有する一倍体菌株を作成した（*CYR1*^{G2042A} 株)。また、コントロール株として野生型の *CYR1* を含む一倍体菌株を作成した。これらの菌株を用いてストレス耐性試験をおこなった結果、*CYR1*^{G2042A} 株はコントロール株と比較して、対数増殖期において高いストレス耐性を示した。

Saccharomyces cerevisiae, *CYR1*, stress response

発表責任者：下飯仁（simoi@iwate-u.ac.jp）

講演番号：3C7p07
講演日時：3 月 26 日 15:06～ 1 号館 C7 会場

釜石はまゆり酵母の清酒発酵力の強化

Improvement of fermentation activity of Kamaishi Hamayuri yeast

○齊藤 隆行[1]、澤口 なつ美[2]、山田 美和[1]、下飯 仁[1]([1]岩手大院・農、[2]釜石市)
○TAKAYUKI SAITO[1], NATSUMI SAWGUCHI[2], MIWA YAMADA[1], HITOSHI SHIMOI[1] ([1]Iwate Univ. Grad. Sch. Agric., [2]Kamaishi city)

【目的】

釜石はまゆり酵母は岩手県釜石市のはまゆりから取得された酵母群であり、そのうち KS5 及び KS6 の 2 株が清酒醸造用酵母としての適性を持っていた[1)]。また、これらの酵母はゲノム解析の結果、既存の清酒酵母とは異なる系統に属していることがわかった[2)]。しかし、本酵母は一般的な清酒酵母であるきょうかい 7 号酵母（K7）よりも発酵力が低く製成酒の酸度が高いことから、今後の利活用のために本酵母の発酵力の強化と酸度の軽減が求められている。本研究では、ストレス感受性変異株の取得および四倍体胞子分離の二つの方法で釜石はまゆり酵母 KS6 の清酒醪における発酵力の強化を目指した。

【方法及び結果】

①ストレス感受性変異株　我々は以前の研究で、ストレス感受性変異株の中には発酵力が向上した菌株が含まれることを報告した[3)]。そこで、高発酵力の変異株を取得するために、KS6 を紫外線処理して得られた約 6000 コロニーの中から 30℃、37℃では正常に生育するが 55℃30 分の熱処理で死滅しやすくなった変異株を選抜した。得られたストレス感受性変異株 19 株について清酒小仕込み試験をおこなった結果、K7 と同等以上の高い発酵力を示す変異株を取得した。また、得られた高発酵力変異株は酸度も低下していた。

②四倍体胞子分離株　清酒酵母はヘテロ二倍体であるため、胞子分離によって得られた一倍体株は、減数分裂における相同染色体の分離と組換えのため多様な遺伝子型と表現型を持つことが期待できる。しかし、一般に一倍体は発酵力が低く、酒類醸造への使用には適さない。そこで、接合型変換によって二倍体同士を接合させて四倍体を作成し、その胞子分離によって二倍体を取得することを試みた。この場合も、相同染色体の分離と組換えによる多様な遺伝子型と表現型が期待できる。KS6 の接合型を変換するために紫外線照射を行い、標準一倍体株との接合試験によって接合型変換株（*MAT*a/a および *MAT*α/α）を取得した。これらの接合型変換株同士を接合させることで四倍体を作成した。得られた四倍体を胞子形成させ四分子解をおこなうことで胞子分離株を 100 株取得した。胞子分離株 100 株を用いて清酒小仕込み試験をおこなった結果、多様な醸造特性を持つ菌株を取得することができた。

(1) 齊藤ら、第 69 回日本生物工学会大会（2017）4P-H087
(2) 齊藤ら、第 70 回日本生物工学会大会（2018）2Ka07
(3) 前田ら、日本農芸化学会 2017 年度大会 3C23a04

fermentation, sake yeast, breeding

発表責任者：下飯仁（simoi@iwate-u.ac.jp）

講演番号：3C7p08
講演日時：3 月 26 日 15:17～ 1 号館 C7 会場

清酒酵母型 *ERC1* 遺伝子がアルコール発酵に及ぼす影響
Research on effect of sake yeast *YHR032W/ERC1* haplotype on alcohol fermentation
○金井 宗良[1]、森本 朋子[1]、水沼 正樹[2]、渡辺 大輔[3]、高木 博史[3]、赤尾 健[1,2]、藤井 力[1,4]、向井伸彦[1] ([1]酒総研、[2]広島大・先端研、[3]奈良先端大、[4]広島大・生物圏)
○MUNEYOSHI Kanai[1], TOMOKO Morimoto[1], MASAKI Mizunuma[2], DAISUKE Watanabe[3], HIROSHI Takagi[3], TAKESHI Akao[1,2], TSUTOMU Fujii[1,4], NOBUHIKO Mukai[1] ([1]NRIB, [2]Hiroshima Univ. of Adv. Sci. of Mat., [3]NAIST, [4]Hiroshima Univ. of Bio. Sci.)

【目的】清酒醸造において、清酒酵母は増殖を停止させた後も細胞内で様々な代謝経路を用いて、エタノールを約 20%の高濃度になるまで生産する。つまり、清酒酵母はもろみ環境での様々なストレスに対して多様な応答経路を駆使しながら高発酵性を獲得していると予想されるが、清酒酵母の高発酵性機構については未だ不明な点が多い。また、現在までに清酒酵母に特徴的な遺伝子の変異がいくつか同定されているが、その変異と醸造特性との関係性についても未解明な部分が多い。そこで、本研究では清酒酵母に特徴的な遺伝子の中で、*S*-アデノシルメチオニン（SAM）の高蓄積能に寄与し、酸化・熱ショックのストレスに対する耐性及び細胞の寿命延長に関与することが知られている清酒酵母型 *YHR032W/ERC1* 遺伝子の機能が醸造特性等に与える影響を明らかにし、優良な醸造用酵母の育種等に応用することを目的としている。
【方法】実験室酵母の二倍体（BY4743）に清酒酵母型または実験室酵母型の *ERC1* を発現するプラスミドを導入し、得られた形質転換体を用いて清酒小仕込み試験を行った。具体的には、経日的にサンプリングを行い醸造特性（炭酸ガス減量、エタノール濃度等）に及ぼす影響を調べた。さらに、サンプリングしたもろみから酵母を分離し、細胞内の SAM 含量を経日的に測定した。
【結果】実験室酵母の細胞内で清酒酵母型 *ERC1* を発現させることでアルコール発酵性が向上したが、実験室酵母型 *ERC1* を発現させてもアルコール発酵性に変化が見られなかったことから、清酒酵母型 *ERC1* の機能がアルコール発酵を正に制御している可能性が示された。また、清酒醸造において、実験室酵母に清酒酵母型 *ERC1* を発現させることで細胞内に SAM の蓄積が観察されたことから、清酒酵母のアルコール高発酵能と細胞内 SAM 量との間に関係性があることも示唆された。

Sake yeast, Alcohol fermentation, *YHR032W/ERC1*

発表責任者：金井宗良（kanai@nrib.go.jp）

講演番号：3C7p09
講演日時：3 月 26 日 15:28～ 1 号館 C7 会場

焼酎酵母における Rim15p の欠損が麦焼酎醸造に及ぼす影響

Loss of Rim15p in shochu yeast alters carbon utilization during barley shochu fermentation

○渡辺 大輔[1]、田代 智史[2]、新谷 大[2]、杉本 幸子[1]、岩見 明彦[2]、梶原 康博[2]、高下 秀春[2]、高木 博史[1] ([1]奈良先端大、[2]三和酒類)

○Daisuke WATANABE[1], Satoshi TASHIRO[2], Dai SHINTANI[2], Yukiko SUGIMOTO[1], Akihiko IWAMI[2], Yasuhiro KAJIWARA[2], Hideharu TAKASHITA[2], Hiroshi TAKAGI[1] ([1]NAIST, [2]Sanwa Shurui Co. Ltd.)

我々は以前に、真核生物に保存された Greatwall プロテインキナーゼ Rim15p 上の機能欠失変異が清酒酵母の高いアルコール発酵力を生み出す原因であることを明らかにした。これは、実用酵母菌株の高発酵力の原因を遺伝子レベル・代謝レベルで解明した初めての成果となった。さらに、清酒酵母以外の多くの酵母菌株において保持されている Rim15p を人為的に欠損させることにより、ビール酵母やバイオエタノール酵母の発酵力を改善することにも成功し、酵母の発酵力を自在に変化させる「発酵デザイン技術」の確立を目指している。そこで本研究では、焼酎酵母における Rim15p の欠損が焼酎醸造に及ぼす影響について調べた。

まず、焼酎酵母 SH-4 株の *RIM15* 遺伝子破壊株を作製し、20%グルコース含有 YPD 培地における発酵試験に供したところ、親株と比較して高い二酸化炭素発生量およびエタノール生産量を示した。次に、この *RIM15* 遺伝子破壊株を用いて麦焼酎小仕込試験を実施した。一次もろみは 25℃で 5 日間発酵させ、二次もろみは 25℃で 10 日間、もしくは、10℃で 20 日間発酵を行った。いずれの発酵温度においても、Rim15p の欠損により発酵終了後のもろみの比重が低下したため、エタノール収量が増加したのではないかと期待されたが、実際には影響は見られなかった。YPD 培地での発酵試験では Rim15p の欠損によってエタノール収量が増大したことを考え合わせると、麦焼酎もろみ中の何らかの成分が、Rim15p による発酵促進効果を打ち消すと推測された。

Rim15p の欠損によってもろみの比重が低下した原因を探るため、糖類およびグリセロールの定量を実施した結果、*RIM15* 遺伝子破壊株では、麦デンプンに由来するグルコースと麦ヘミセルロースに由来するアラビノースの含量が低く、グリセロールの含量が高いことが明らかになった。焼酎酵母はアラビノースを資化することはできないが、細胞膜上のトランスポーターGal2p によって細胞内に取り込むことができる。このことから、Rim15p の欠損がグルコースやアラビノースの取り込みを促進することでもろみの比重を低下させる可能性が考えられた。さらに、過剰に取り込まれたグルコースは、エタノールとは異なる解糖系副産物であるグリセロールに変換されるのではないかと推測された。

以上の結果から、焼酎酵母における Rim15p の欠損は、麦焼酎もろみにおけるエタノール収量の増大にはつながらないことが判明した。今後 *RIM15* 遺伝子破壊株を活用するためには、麦焼酎もろみ中に存在し発酵促進を打ち消す未知成分の同定や、グリセロール合成経路の欠損との組合せによる効果の解析を進めていく必要がある。

shochu yeast, Rim15p, barley shochu fermentation

講演番号：3C7p10
講演日時：3 月 26 日 15:39～ 1 号館 C7 会場

米麹の破精の構造と白色度の関係

Relation between the structure and the whiteness in *haze* of rice *koji*

○谷野 有佳[1]、伊藤 一成[1]、五味 勝也[2]、狩山 昌弘[3]、花房 裕子[1]、三宅 剛史[1] ([1]岡山県工技セ、[2]東北大院農、[3]株式会社フジワラテクノアート)
○Yuka TANINO[1], Kazunari ITO[1], Katsuya GOMI[2], Masahiro KARIYAMA[3], Hiroko HANAFUSA[1], Tsuyoshi MIYAKE[1] ([1]Industrial Technology Center of Okayama Prefecture, [2]Tohoku Univ., [3]Fujiwara Techno-Art Co., Ltd.)

【目的】清酒の品質には麹の品質が大きく関与しており、清酒製造技術の中でも製麹技術が重要視されている。清酒製造現場で麹の品質を判断する基準の一つとして、麹菌が蒸米に増殖して白く見える“破精”があり、破精の状態により酵素の生産量やバランスが異なることから、重要な判断基準となっている。我々はこれまでに、デジタルマイクロスコープを用いた破精の簡便な評価法を確立している。この方法では、麹粒をデジタルマイクロスコープで撮影し、得られた画像をグレースケールにした後、解析ソフトウェアを用いて白色の強度により破精部分を判別し、破精の割合を数値化する。破精が白く見えるのは、菌糸とその周辺の米組織の粒状崩壊による光の乱反射のためと言われているが、デジタルマイクロスコープで破精ありと判断した白い部分には多くの菌糸と米組織の崩壊があり、破精なしと判断した黒い部分にはそれらがないことを電子顕微鏡で確認している。一方で、デジタルマイクロスコープでの解析で破精ありと判断できる部分でも白色の強度に差がみられる。破精を肉眼で見た際に同様の白色度に見えていても、走査型電子顕微鏡で観察すると菌糸の状態や米組織の崩壊、消化性に差が見られるという報告から、白色度の差がみられるのは麹の破精構造に違いが生じていることが原因ではないかと考えた。そこで本研究では、麹粒の白色度が異なる部分の破精の構造を走査型電子顕微鏡により観察し、その違いを評価した。
【方法】麹粒表面をデジタルマイクロスコープで撮影し、得られた画像をグレースケールにした後、解析ソフトウェアを用いて白色の強度の違いを評価した。その後、麹粒の白色度の高い部分と低い部分を走査型電子顕微鏡により観察した。走査型電子顕微鏡は低真空モード、電圧 15 kV、圧力 30 Pa、クールステージ-10°C の条件で観察を行った。
【結果】以前報告した通り、デジタルマイクロスコープの観察で破精ありと判断した白い部分には多くの菌糸があり、破精なしと判断した黒い部分にはそれらがないことを走査型電子顕微鏡の観察で改めて確認した。そして白色度が高い部分と低い部分とを区別して観察したところ、白色度の高い部分では低い部分と比較して米組織の崩壊が進み、麹菌の菌糸がはっきりと観察できた。さらに、白色度が高い部分と低い部分の断面を観察すると、白色度の高い部分の断面では麹粒内部までよりはっきりとした破精が観察された。デジタルマイクロスコープで白色度が高くなる部分は、麹表面の組織の崩壊が進み、内部への破精込みが進んでいる部位であると考えられる。

koji, haze, SEM

発表責任者：谷野　有佳（yuka_tanino@pref.okayama.lg.jp）

講演番号：3C7p11
講演日時：3 月 26 日 16:00～ 1 号館 C7 会場

試験製麹における麹菌の転写因子 FlbC の発現と酵素生産との関連

Expression of FlbC in *Aspergillus oryzae* on *koji* making test and its relationship to enzyme production

○伊藤 一成[1]、谷野 有佳[1]、五味 勝也[2]、狩山 昌弘[3]、花房 裕子[1]、三宅 剛史[1]([1]岡山県工技セ、[2]東北大院農・生物産業創成、[3]株式会社フジワラテクノアート)
○Kazunari ITO[1], Yuka TANINO[1], Katsuya GOMI[2], Masahiro KARIYAMA[3], Hiroko HANAFUSA[1], Tsuyoshi MIYAKE[1] ([1]Industrial Technology Center of Okayama Prefecture, [2]Tohoku Univ. of Agric., [3]Fujiwara Techno-Art Co., Ltd.)

【目的】 清酒製造で製麹は最も重要な工程の 1 つであり、その後の清酒の製造工程管理や品質に大きく影響を及ぼす。製造現場での製麹工程では、目的とする酵素力価と酵素バランスの良い麹を製造するため、麹菌の株、蒸米の水分量、植え付ける胞子数、製麹時間をかえて行うほか、製麹中には環境の温度と湿度を逐次変化させ、麹の品温と水分量を制御している。最近、麹菌の分生子形成に関わる転写因子 FlbC の遺伝子である *flbC* が、固体培養により強く発現することが見いだされ、本遺伝子が同じく固体培養特異的に発現するグルコアミラーゼ（GlaB）や酸性プロテアーゼの生産に関わっていることが報告された。これらの酵素は清酒製造において重要であり、実際の製麹工程で FlbC がどのように各酵素生産に関わっているのか非常に興味深い。我々はこれまでに、実験室レベルで製造現場と同等の製麹が可能な新たな試験製麹法を構築しており、これを用いた製麹工程および麹の評価を行っている。本研究では、製麹工程における酵素生産とこれに関わる FlbC の解析を目的として、上記の試験製麹で得られた麹の α-アミラーゼ、グルコアミラーゼ、酸性プロテアーゼについて遺伝子発現量の測定を行った。

【方法】 精米歩合 60%の雄町と清酒用麹菌 *Aspergillus oryzae* RIB128 株を用いて、均一で再現性の高い培養状態の維持と培養期間中の制御が可能な無通風箱培養法で試験製麹を行った。製麹は恒温恒湿槽内で行い、設定温度は 30℃で 24 時間、その後 12 時間かけて 40℃まで上昇させ、そこから 40℃で 12 時間、計 48 時間の製麹経過とした。なお湿度は製麹期間中 95%RH で一定とした。製麹時間ごとの麹から total RNA を抽出後、qPCR 法により各遺伝子の定量を行った。また、酵素力価及び菌体量も併せて測定した。

【結果】 製麹期間中の *flbC* の発現パターンは、糖化酵素の発現に関わる転写因子の *amyR* とよく似ており、FlbC は AmyR と同じように働いていることが予想された。製麹期間中 α-アミラーゼの全発現量はあまり変わらず、 *glaB* は製麹後半でも上昇傾向であった。これらのことから *glaB* はイソマルトースによる活性化と核内移行が起こる AmyR に加え、低水分や高温による FlbC の制御が実際の製麹工程においても関与していることが推測された。酸性プロテアーゼ遺伝子である *pepA* は製麹過程初期で非常に高い発現量だったが、製麹が進むにつれ激減した。現在のところ *pepA* の発現に対して FlbC の関与の仕方は不明であるが、温度による影響が大きいことが確認できた。

Aspergillus oryzae, transcription factor, *koji* making test

発表責任者：伊藤一成（kazunari_itou@pref.okayama.lg.jp）

講演番号：3C7p12
講演日時：3 月 26 日 16:11～ 1 号館 C7 会場

麹菌群の比較ゲノム解析
Comparative genome analysis of *Aspergillus oryzae* strains.
○齊藤 亮太[1]、織田 健[1]、岩下 和裕[1,2] ([1]酒総研、[2]広先端研)
○Ryota Saito[1], ken Oda[1], Kazuhiro Iwashita[1,2] ([1]Nat. Res. Inst. Brew., [2]Adsm. Hiroshima Univ)

[背景・目的]麹菌(*A.oryzae*)は、日本の伝統食品である清酒、醤油、味噌等の製造に必要不可欠であり、各麹菌の特性はゲノムの違いに起因すると考えられているが、菌株の特性とそれに関与するゲノム領域についての情報は十分でない。これまで我々は、麹菌 DNAchip を用いたゲノムアレイ解析による様々な由来の 55 菌株の系統解析や、RIB40 と清酒用麹菌 RIB128、RIBOIS01、醤油用麹菌 RIB915 の 4 株間で比較ゲノム解析を行ってきた。その結果、1.麹菌群は 13 系統に分類される、2.ゲノム系統と菌株の特性には相関がある、3.各菌株には大・小様々な塩基の欠失や挿入がある、4.系統分化の過程で染色体間組換えが起きている、5.各菌株特異的な遺伝子が株の特性に関わっていることが示唆された。これらの研究では、比較ゲノム解析した麹菌が 4 株に限られており、麹菌群の特性とゲノムの関係の全貌を解明するためには、様々な用途で使用する麹菌のゲノム解析を行う必要がある。そこで本研究は、麹菌群全体を網羅できると考えられる 13 系統株間で比較ゲノム解析を行なった。
[方法･結果] 最初に、ゲノム配列を取得していない 9 系統の代表株を、Illumina 社の HiseqX に供しリードデータを取得した。その後、RIB40 株を参照配列としたマッピング解析、de novo アセンブルからの遺伝子予測等の解析データを得た。de novo アセンブル結果から、各菌株のコンティグの全長は 36.8~38. 7Mb であった。各菌株で SNP 数や in/del も異なっており、例えば RIB1172 株では SNP が約 6 千箇所、RIB143 株では約 18 万箇所存在し、この結果は系統樹を反映していた。また、全ての菌株に存在する 16 bp 以上の欠失、新規塩基配列の挿入や、染色体間組み換え等の構造変異は、合計約 6 千箇所にのぼった。以上の結果から、麹菌群のゲノム構造の多様性は非常に大きいことが明らかになった。次にマッピング解析から全ての菌株に保存されている遺伝子は 10,000 個であり、これは RIB40 の持つ遺伝子総数の約 72%であった。続いて、2 次代謝遺伝子クラスターを例として解析すると全ての菌株で保存されている遺伝子クラスターは 47 個であった。また、菌株独自の遺伝子クラスターを見つけるため、RIB40 にマッピングされなかった配列中に backbone 遺伝子が存在するか探索した。その結果、0~8 個の backbone 遺伝子が確認され、これらの遺伝子は各株を特性づける因子の 1 つであると考えられた。なお、安全性の観点からアフラトキシン遺伝子クラスターを解析した結果、これまでに知られている *aflR*、*aflJ* のプロモーター領域の変異以外にも多くの欠失等の変異が見られ、全ての菌株で遺伝子クラスターが機能していないことを確認した。現在、各菌株の遺伝子クラスターの詳細な比較解析を行っているところである。

Aspergillus oryzae, Comparative Genome Analysis

講演番号：3C7p13
講演日時：3 月 26 日 16:22～ 1 号館 C7 会場

泡盛黒麹菌 *Apergillus luchuensis* の全ゲノム比較による機能遺伝子の解析
Comparative genomics of *Apergillus luchuensis*
○塚原 正俊[1]、阿部 峻之[1]、東 春奈[1]、外山 博英[2]、水谷 治[2]、山田 修[3] ([1]バイオジェット、[2]琉球大農、[3]酒総研)
○Masatoshi TSUKAHARA[1], Takayuki ABE[1], Haruna AZUMA[1], Hirohide Toyama[2], Osamu MIZUTANI[2], Osamu YAMADA[3] ([1]Biojet, [2]Univ. of Ryukyus, [3]NRIB)

黒麹菌は、沖縄県の伝統的酒類である「泡盛」の醸造に用いられてきた微生物で、黄麹菌と共に国菌として認定されている。沖縄県での一般的な泡盛醸造は異なる黒麹菌株を混合した複菌麹が用いられており、個々の株が異なる特性を有することが経験的に知られると共に、それぞれの株の特性を効果的に活用している。これまでに我々は沖縄県で利用されている黒麹菌株やその近縁種を含む全ゲノムデータを取得し系統解析を行っている。その結果、泡盛黒麹菌はすべて *Aspergillus luchuensis* であり、他の海外で発酵食品に用いられる黒アスペルギルス属とは区別できることが明らかになった。本研究においては、詳細な種内系統解析から産業有用菌株としての黒麹菌の機能解析に資する基盤情報が得られるか検討を行った。

琉球大学に保存されている沖縄由来の株（酒造所あるいは自然環境から採取）および公共機関・研究所の供託菌株から次世代シーケンサーMiseq によりゲノム情報を取得した。これにデータベース上の情報を加えた全 49 株のゲノム由来ショートリードと *A. luchuensis* NBRC4314 リファレンス配列との比較により得られた変異情報を用いて系統解析を行った。

A. luchuensis 内の詳細な解析の結果、経験的に異なる醸造特性を有する菌株がそれぞれ異なるグループ（A もしくは SK グループ）に属することが分かった。そこでゲノム構造に着目してグループ間の比較を行うことで、機能の差を説明しうる遺伝子情報の抽出を目指した。その結果、個々の株で比較的大きな欠損（数 10kb）が複数存在すること、この欠損様式がそれぞれのグループ内で共通していることを確認した。さらに、欠損部位に含まれる 191 遺伝子の CDS を取得し、アミノ酸配列からデータベース上で相同遺伝子の情報を取得した。その結果、機能が推測可能な複数の遺伝子が確認された。このうち、SK グループのみで欠失している Psi factor-producing oxygenase (Ppo)に着目した。この遺伝子は PpoC と相同な遺伝子であり、泡盛の古酒香である 1-octen-3-ol の産生に関与することが示唆されている。実際の製麹において PpoC 欠損株と保有株には 1-octen-3-ol の生産性に関して有意な差が存在することが示されている。

以上のことから、全ゲノム情報を用いた詳細な比較解析により、近縁菌株で異なる形質、機能に関与する遺伝子情報が効率的に抽出可能であることを明らかにした。本手法は黒麹菌にとどまらず、近縁種間、近縁株間の系統解析を可能とし、さらに機能解析のための遺伝子スクリーニングとしても応用可能である。

Black koji mold, Awamori, Genome

発表責任者：塚原 正俊（tsuka@biojet.jp）

講演番号：3C7p14
講演日時：3 月 26 日 16:33～ 1 号館 C7 会場

麹菌のクエン酸生産に関与する推定細胞質膜局在輸送体 CitT の機能解析
Functional characterization of putative plasma membrane-localized transporter CitT, which is involved in the citric acid production in koji fungi

○中村 恵理[1]、門岡 千尋[2]、奥津 果優[1,2]、吉﨑 由美子[1,2]、髙峯 和則[1,2]、後藤 正利[1,3]、玉置 尚徳[1,2]、二神 泰基[1,2] ([1]鹿児島大・農、[2]鹿児島大・連農、[3]佐賀大・農)
○Eri NAKAMURA[1], Chihiro KADOOKA[2], Kayu OKUTSU[1,2], Yumiko YOSHIZAKI[1,2], Kazunori TAKAMINE[1,2], Masatoshi GOTO[1,3], Hisanori TAMAKI[1,2], Taiki FUTAGAMI[1,2] ([1]Kagoshima Univ.of Agric, [2]Unit. Grad. Sch. Agri. Sci. Kagoshima Univ., [3]Saga Univ.of Agric)

焼酎製造に用いられる白麹菌は、菌体外に多量のクエン酸を分泌生産する性質をもつ。これは清酒、味噌、醤油などの製造に用いられる黄麹菌にはない、白麹菌の特徴である。クエン酸の高生産には、クエン酸の排出が重要である可能性が指摘されているが、細胞質膜局在型のクエン酸輸送体は未だ同定されていない。先行研究において、白麹菌と黄麹菌のゲノムに保存されたオルソログ間の比較トランスクリプトーム解析を行い、白麹菌で有意に発現量が高いトランスポーターをリストアップした。しかし、最近、白麹菌と同様にクエン酸高生産糸状菌である *Aspergillus niger* において細胞質膜局在型クエン酸輸送体の有力な候補として *citT* が報告された（Odoni et al. bioRxiv 259051)。我々のトランスポーターリストの中にも *citT* のホモログが存在した。本研究では麹菌において *citT* ホモログがクエン酸生産に関与するのかどうかを明らかにすることを目的した。
まず、白麹菌において *citT* 破壊株と *citT* 過剰発現株を構築し、菌体量あたりのクエン酸生産量を測定した結果、*citT* 破壊株のクエン酸生産はコントロール株と比較して約 1%に低下し、*citT* 過剰発現株では約 3 倍に増加した。次に、クエン酸生産量に影響する因子として各株のグルコース消費量を比較した結果、グルコース消費量には有意な差は見られなかった。そこで、*citT* 破壊株はクエン酸の対糖収率が低下し、*citT* 過剰発現株では増加することが示唆された。また、*citT* 過剰発現株はコントロール株と比較して培養初期段階からクエン酸生産が開始されることが明らかとなった。一方、各株を用いて製麹を行い、麹あたりのクエン酸生産量を測定した結果、*citT* 破壊株では約 2%に低下し、*citT* 過剰発現株では約 2.5 倍に増加したため、*citT* は製麹時においてもクエン酸生産に関与することが示唆された。黄麹菌のゲノムには *citT* ホモログは 2 つ存在しており、比較トランスクリプトーム解析の結果から、ほとんど発現していないことが示唆された。そこで、黄麹菌における *citT* の高発現による有機酸生産能への影響について解析した。白麹菌由来の *citT*（*AkcitT*）、黄麹菌由来の *citT*（*AocitT*-1, *AocitT*-2）を *amyB* プロモーターの制御下で高発現する株を構築し、クエン酸生産量を測定した結果、コントロールと比較して *AkcitT* 過剰発現株では約 20 倍、*AocitT* 高発現株ではそれぞれ約 10 倍、7 倍にまで増加した。また、麹あたりのクエン酸生産量は *AkcitT* 高発現株では約 85 倍、*AocitT* 高発現株ではそれぞれ約 16 倍、14 倍に増加した。以上の結果から、白麹菌の推定クエン酸輸送体 *citT* はクエン酸生産能を決定づける重要な因子であり、黄麹菌がもつ *citT* も強制高発現によってクエン酸生産量を増加させる機能をもつことが示唆された。

koji fungi, citric acid, transportor

発表責任者：二神泰基（futagami@chem.agri.kagoshima-u.ac.jp）

講演番号：3C7p15
講演日時：3 月 26 日 16:44～ 1 号館 C7 会場

白麹菌のクエン酸生産に関与する推定転写因子 NosA と RosA の機能解析

Functional analysis of putative transcriptional factors NosA and RosA, which are involved in citric acid production, in the white koji fungu]s

○二神 泰基[1,2]、門岡 千尋[1]、後藤 正利[1,3]、玉置 尚徳[1,2]（[1]鹿大連農、[2]鹿大農、[3]佐大農）
○Taiki FUTAGAMI[1,2], Chihiro KADOOKA[1], Masatoshi GOTO[1,3], Hisanori TAMAKI[1,2] ([1]Unit. Grad. Sch. Agri. Sci. Kagoshima Univ., [2]Kagoshima Univ., [3]Saga Univ.)

焼酎製造に用いられる白麹菌 *Aspergillus kawachii* はクエン酸を高生産する性質をもつ。焼酎用の麹造りでは、途中で温度を低下させることによりクエン酸の高生産を促す温度管理を行う。先行研究において、クエン酸生産機構の全体像を明らかにすることを目的として、大麦を原料とした麹造りの過程における DNA マイクロアレイ解析を行い、温度を低下させた際に高発現する推定転写因子 *nosA* と *rosA* を同定した。NosA と RosA は、モデル糸状菌 *Aspergilus nidulans* において無性世代から有性世代への移行に関与することが報告されていた。本研究では、NosA と RosA が白麹菌において、有性世代とクエン酸高生産に関与するのかどうかを明らかにすることを目的とした。
まず、白麹菌において *nosA* および *rosA* の破壊株を構築し、表現型を解析したところ、*nosA* 破壊株はコントロール株と比較して分生子形成能が低下し、*rosA* 破壊株ではコロニー径が大きくなった。この結果から、*nosA* は分生子形成、*rosA* は菌糸伸長に関与することが示唆された。また、子嚢胞子と菌核の形成能を解析した結果、いずれの株においても形成しなかったことから、白麹菌には有性世代が存在せず、菌核形成能ももたない可能性が示唆された。次に、各破壊株のクエン酸生産量を比較したところ、*nosA* 破壊株はコントロール株の約 2 倍に上昇し、*rosA* 破壊株では約 0.6 倍に低下した。また、NosA-GFP と RosA-GFP の局在観察を行ったところ、ヒストン H2B-mRFP と共局在することが観察されたことから、NosA と RosA は核に局在することが示唆された。さらに、クエン酸生産条件において、*nosA* および *rosA* の破壊により発現変動した遺伝子を同定するため、CAGE（Cap Analysis of Gene Expression）-Seq 解析を行った。その結果、*nosA* 破壊株で 507 遺伝子、*rosA* 破壊株で 13 遺伝子が発現変動したことが示唆された。*rosA* 破壊株の発現変動遺伝子は 13 遺伝子と少なく、そのうち 9 遺伝子は *nosA* 破壊株の発現変動遺伝子に含まれていた。そこで、この 9 遺伝子の中にクエン酸生産に関与する因子が存在する可能性が高いと考えて、現在、遺伝子破壊株を構築している。その結果、*rosA* 破壊株で発現が 2.1 倍、*nosA* 破壊株で発現が 1.7 倍に上昇した HpcH/HpaI aldolase/citrate lyase family protein 遺伝子の破壊株において菌体量あたりのクエン酸生産量が 1.6 倍に上昇した。以上の結果より、白麹菌の NosA および RosA は有性世代には関与しておらず、クエン酸生産に関与する転写因子であることが示唆された。

white koji fungus, citric acid, transcriptional factor

発表責任者：二神泰基（futagami@chem.agri.kagoshima-u.ac.jp）

講演番号：3D1a06
講演日時：3 月 26 日 10:05～ 1 号館 D1 会場

フロクマリン類の合成および増殖抑制効果に関する研究

Synthesis of furocoumarin and their antiproliferative activity

○新井 隆介[1]、川井 悟[1]、常盤野 哲生[2]、吉澤 結子[2] ([1]東電大理工、[2]秋田県大生資料)
○Ryusuke ARAI[1], Satoru KAWAII[1], Tetsuo TOKIWANO[2], Yuko YOSHIZAWA[2] ([1]Tokyo Denki Univ., [2]Akita Prefectural Univ.)

【目的】クマリン類は植物界に遊離あるいは配糖体として広く分布し、特にセリ科、ミカン科などの樹皮、葉、根に多く含まれている。今日では天然物、および合成物として 1000 種類以上のクマリン化合物が見出されている。天然クマリン類はその骨格および置換形式によりフロクマリン類、ピラノクマリン類、ビスクマリン類、プレニルクマリン類などに分類される。これら天然クマリン類の生理活性としては、血管透過性の抑制、尿酸排泄促進作用、抗菌作用、血液凝固阻止作用などが報告されている。本研究では、がん増殖抑制効果、抗酸化作用やアトピー性皮膚炎などの皮膚疾患の治療に用いられるフロクマリン類について検討することとした。

これまでに当研究室では、クマリン骨格の 6-7 位にフラン環が縮合したプソラレン型フロクマリンに着目し、種々の置換基を導入したプソラレン型フロクマリンの系統的合成を行うとともに、合成した化合物の生物活性を調べ、構造活性相関に関する検討を行ってきた。

一方、クマリン骨格の 7-8 位にフラン環が縮合したアンゲリシン型フロクマリン類についての検討は行われていなかったので、本研究ではアンゲリシン型フロクマリン類の系統的合成と生物活性について検討することとした。一般には、アンゲリシン型フロクマリンは屈曲型であり立体障害が顕著であり、直線状のプソラレン型フロクマリンが優先的に生成することが知られており、選択的にアンゲリシン型フロクマリンを合成する条件を検討することとした。

【方法】本研究では、フェノール類を出発物質として、濃硫酸存在下でβ-ケトエステル類との Pechmann 縮合により、7-ヒドロキシクマリン類を合成した。この 7 位ヒドロキシル基に、塩基性条件下でクロロケトン類を反応させて Williamson エーテル合成によりエーテル中間体を合成した。このエーテル中間体を塩基性条件下で環化させることで選択的にプソラレン型フロクマリン類を合成し、また酸性触媒下で環化することで、アンゲリシン型フロクマリン類を合成した。

【結果】7-ヒドロキシクマリン類の 7 位エーテル中間体を環化することで、プソラレン型フロクマリン類とアンゲリシン型フロクマリン類それぞれを選択的に合成することができた。これらの生物活性については、現在検討中である。

furocoumarin, antiproliferative, HL-60

講演番号：3D1a07
講演日時：3 月 26 日 10:16～ 1 号館 D1 会場

ピラノクマリン類の合成及び増殖抑制活性に関する研究

Synthesis of pyranocoumarins and their antiproliferative activity

○松浪 悠貴[1]、川井 悟[1]、常盤野 哲生[2]、吉澤 結子[2] ([1]東電大理工、[2]秋田県立大生資料)
○Yuki MATSUNAMI[1], Satoru KAWAII[1], Tetsuo TOKIWANO[2], Yuko Yoshizawa[2] ([1]Tokyo Denki Univ., [2]Akita Prefectural Univ.)

【目的】ピラノクマリン類は、クマリンの A 環にピラン環が縮合した化合物群の総称であり、セリ科、ミカン科、マメ科などの天然資源中に多様な構造が見出されている。ピラノクマリンについては、様々な生物活性が知られており、例えば、ミカン科ミカン属植物に含有されている nordentatin、マメ科デリス属植物に含有されている(+)-decursinol、およびテリハボク科テリハボク属植物に含有されている calanolide A には、抗ガン作用、抗 HIV 作用、抗酸化作用、抗炎症作用などが報告されている。このようにピラノクマリン類は強い生物活性を示すことが知られているが、天然資源中には微量にしか含まれていないため、その生理活性や構造活性相関に関する知見は十分に得られていない。そこで、本研究では、天然型ピラノクマリン類及び様々な置換基を導入した非天然型ピラノクマリン類を合成し、これらの生物活性を比較することで、ピラノクマリン類の構造活性相関作用及び生物活性に関する知見を深めることを目的とした。

【方法】本研究では、3-ピコリン存在下 *p*-キシレン溶媒中での、ヒドロキシアセトフェノン類と 3-メチル-2-ブテナールの Michael 付加により、ピラノヒドロキシアセトフェノン類を合成した。これを出発物質として、クマリン骨格を形成し、様々な置換基を有するピラノクマリン類の合成を行った。一方、3,4 位にアルキル基を有するピラノクマリン類は、ピラノアセトフェノン類を出発物質とした経路では合成できなかったため、先にヒドロキシクマリンを合成し、これに 3-メチル-2-ブテナールを環化させることで、その合成を試みたが、ヒドロキシクマリンのベンゼン環炭素の反応性は低下しており、ピラン環を縮合させることはできなかった。そこで、3-メチル-2-ブテナールの代わりにそのジエチルアセタール保護体である 1,1-ジエトキシ-3-メチル-2-ブテンを用いたところ、3,4 位にアルキル基が導入されたピラノクマリン類を合成することができた。合成したピラノクマリン類は、前骨髄性白血病細胞 HL-60 に対する増殖抑制を指標としてその生物活性を評価した。

【結果】様々な置換基を導入した非天然型ピラノクマリン類、および天然型ピラノクマリン類である、seselin や calanolide A の合成を行い、現在までに 100 種類以上のピラノクマリン類を合成した。合成した化合物の中で、3 位にフェニル基を導入した 3-(3,4,5-トリメトキフェニル)-ピラノクマリン、および calanolide A に強い HL-60 増殖抑制活性を認めた。天然型ピラノクマリン類である nordentatin や (+)-decursinol の合成については、現在検討中である。

pyranocoumarins, structure activity relationship, antiproliferative activity

講演番号：3D1a08
講演日時：3 月 26 日 10:27～ 1 号館 D1 会場

ピラノフラボノイドの合成及び増殖抑制活性に関する研究
Synthesis of pyranoflavonoids and their antiproliferative activity
○澤野 美紗[1]、川井 悟[1]、常盤野 哲生[2]、吉澤 結子[2] ([1]東電大理工、[2]秋田県大生資料)
○Misa SAWANO[1], Satoru KAWAII[1], Tetuo TOKIWANO[2], Yuko YOSIZAWA[2] ([1]Tokyo Denki Univ., [2]Akita Prefectural Univ.)

【目的】天然資源中に存在する生理活性物質の化学修飾は、新規医薬品探索の有効な手段である。フラボノイド類には，フラン環あるいはピラン環が縮合した化合物が知られており，それぞれフロフラボノイドやピラノフラボノイドとよばれている。これらの化合物には単純フラボノイドよりも拡張したπ電子系が存在し，このようなπ電子系が生物活性にどのような影響を及ぼすか興味が持たれている。しかし、天然資源中におけるピラノフラボノイド類の分布は限られており、さらにその含有量も微量であるため、生物活性に関する報告は散見されるものの、体系的な研究は十分とは言い難い。

当研究室ではこれまでに、おもに 7-8 位にピラン環が縮合したピラノフラボン類やピラノカルコン類を合成し、その生物活性を調べており、これらの化合物においてピラン環が活性発現に重要な役割を果たしていることを報告している。今回は、新たにピラノフラボノイド類縁体として、ピラノフラバノン、ピラノフラボノール、およびピラノイソフラボン類の系統的合成を試みた。これらの化合物について生物試験を行うことで、置換基の種類や位置が生物活性に及ぼす影響について検証を試みた。生物活性は前骨髄性白血病細胞 HL-60 に対する増殖抑制を指標とした。

【方法】ジヒドロキシアセトフェノン類を出発物質とし、パラキシレン溶媒下で 3-メチル-2-ブテナールとの 24 時間加熱還流にて Michael 付加を行い、さらに分子内環化を経て数種のピラノアセトフェノン類を合成した。これを 5 % 水酸化カリウム/エタノール溶液を溶媒としてベンズアルデヒド類と 24 時間室温で撹拌し、アルドール縮合によってピラノカルコンを合成した。これをエタノール溶媒中で酢酸ナトリウムと 24 時間加熱還流することで分子内環化させてピラノフラバノン類を合成した。また、同じくカルコンをジオキサンーエタノール混合溶媒中、過酸化水素水、水酸化ナトリウム水溶液存在下で氷浴中 0℃で 2 時間、その後室温で 24 時間撹拌し、アルガー・フリン・大山田反応によってピラノフラボノール類を合成した。合成した化合物は、前骨髄性白血病細胞 HL-60 に対する増殖抑制を指標としてその生物活性を評価した。

【結果】ピラノフラバノン類とピラノフラボノール類を合成した。これらの生物活性については、現在検討中である。また、ピラノイソフラボン類については合成条件の検討中である。

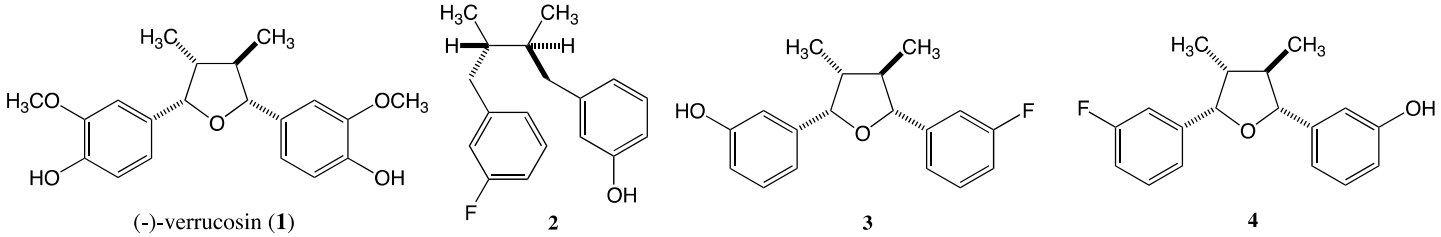
Flavanone, pyranoflavonoid, antiproliferative

講演番号：3D1a09
講演日時：3 月 26 日 10:38～ 1 号館 D1 会場

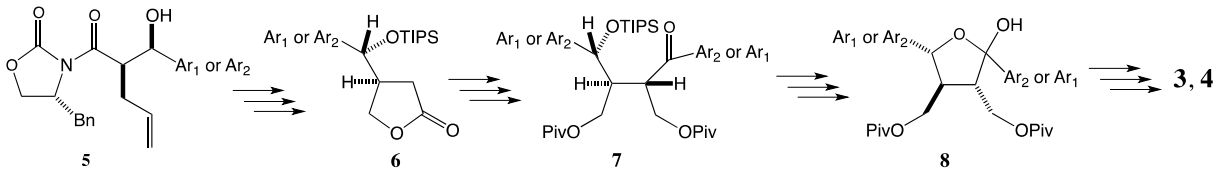
フッ素と水酸基をベンゼン環上に有する四置換テトラヒドロフラン型リグナンの抗カビ活性
Antifungal activity of tetrasubstituted tetrahydrofuran type lignan having fluorine and hydroxyl group on benzene ring

○神野 公哉[1]、西脇 寿[1]、秋山 浩一[2]、山内 聡[1] ([1]愛媛大院農、[2]愛媛大総科支セ)
○Kimiya JINNO[1], Hisashi Nishiwaki[1], Kouichi Akiyama[2], Satoshi Yamauchi[1] ([1]Ehime Univ. of Agric., [2]Ehime Univ. of ADRES)

目的）これまでに、植物から単離された四置換テトラヒドロフラン型リグナンの抗カビ活性の報告はあったが、立体構造、置換基が活性に与える影響は不明であった。そこで、二つのベンゼン環を食品性植物中のリグナンに見られるような 4-hydroxy-3-methoxyphenyl に固定して全ての立体構造を合成して抗カビ活性を測定した。その結果、(-)-verrucosin (**1**)が *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype に対して最も高い活性を示し、EC_{50} 値が 89.2 μM だった。一方で、*Colletotrichum lagenarium* に対する活性は全ての立体異性体で弱く、EC_{50} 値が 279～497 μM だった。以前、ブタン型リグナンの抗カビ活性についての構造活性相関研究を行い、誘導体 **2** に *A. alternata* Japanese pear pathotype に対して EC_{50} = 28.5 μM、*C. lagenarium* に対して EC_{50} = 57.8 μM の活性を観察したことから、今回は、(-)-verrucosin (**1**) の立体構造を持ち、ベンゼン環が 3-fluorophenyl 基、3-hydroxyphenyl 基である四置換テトラヒドロフラン型リグナン **3**, **4** を合成し、抗カビ活性を比較した。



方法、結果）*S* 体の Evans の不斉補助基に対してアシル化した後 Evans の *syn*-アルドール縮合を行って **5** を得た。水酸基の保護、還元、アルケンの酸化開裂、ラクトンへの酸化によりラクトン 6 とした後、対応するベンズアルデヒド類とのアルドール縮合、ラクトンのジオールへの還元、一級水酸基の保護、二級水酸基の酸化を行ってケトン **7** を得た。さらに、脱シリル化、生じたヘミアセタール **8** の $Pd(OH)_2$ 存在下での H_2 添加のよる立体選択的還元により立体構造を構築し、脱保護、還元等により 3,4 を得た。3,4 は、*C. lagenarium* に対して **1** の 7～11 倍高い活性を示した。*A. alternata* に対する活性は同レベルであった事からベンゼン環上の置換基は種特異性に関係している事が分かった。



Antifungal activity, Tetrasubstituted tetrahydrofuran type lignan, 3-fluorophenyl, 3-hydroxyphenyl derivative

発表責任者：神野公哉（f652012h@mails.cc.ehime-u.ac.jp）

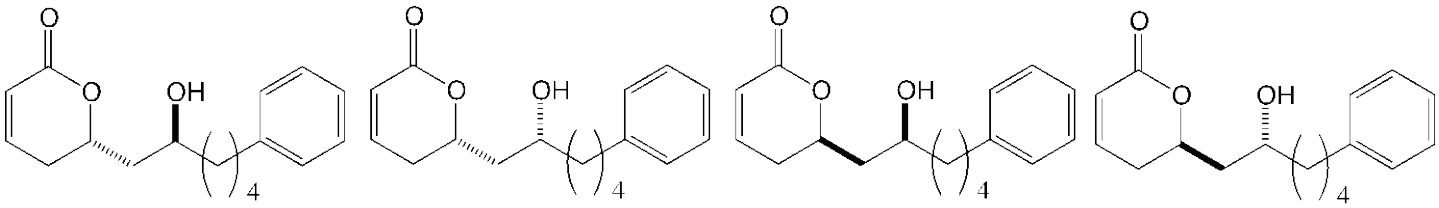
講演番号：3D1a10
講演日時：3 月 26 日 10:49～ 1 号館 D1 会場

6 位が alkyl 化されたα-pyrone 化合物の共役二重結合、alkyl 基の構造が植物の発芽、生長に与える影響

Effect of conjugated double bond, alkyl group structure of α-pyrone compound alkylated at 6-position on plant germination and growth

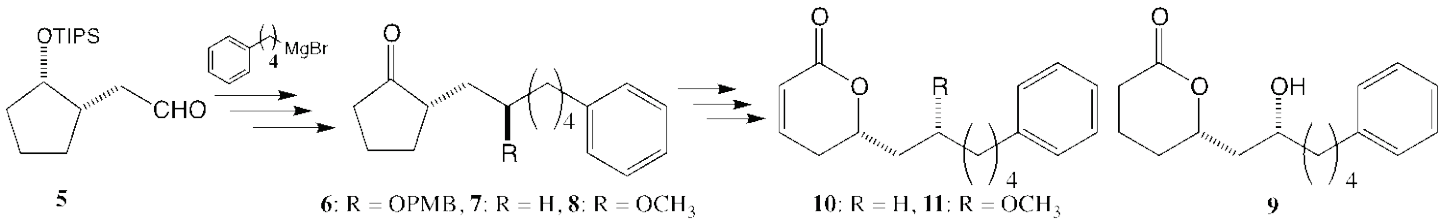
○越智 良太、西脇 寿、山内 聡（愛媛大院農）
○Ryouta OCHI, Hisashi NISHIWAKI, Satoshi YAMUCHI (Ehime Univ.)

目的）6 位がアルキル化されたα-pyrone 化合物の立体異性体 **1**～**4** を合成し生物活性試験を行ったところ、立体異性体 **2** にレタス、ライグラスの根に対する生長阻害活性(IC_{50} = 62 μM および 43 μM)とライグラスに対する 1 mM でのコントロールに対する約 50%の発芽阻害活性を観察した。また、立体異性体 **4** が HL-60 細胞および HeLa 細胞に対してそれぞれ IC_{50} 値 3.2 μM および 6.0 μM の細胞毒性を示した。今回は、アルキル基上の水酸基、共役二重結合、alkyl 鎖の長さが生物活性に与える影響を調べることを目的として **2** の立体構造を持つ誘導体の合成を行い、植物に対する活性試験を行った。



1 **2** **3** **4**

方法、結果）高い光学純度を持つ酵母還元生成物から調整したアルデヒド **5** に対して Grignard 反応を行い、得られた二級水酸基の PMB 基による保護、脱シリル化、PCC 酸化によりケトン **6** へ導いた。さらに、Baeyer-Villiger 酸化、脱保護により共役二重結合を欠く誘導体 **9** が得られた。また、Grignard 反応の後、水酸基のメシル化、$NaBH_4$ 還元により水酸基を除去し、同様に六員環ラクトンへ導き、$(PhSeO)_2O$ との反応により共役二重結合を導入し、脱保護を行って水酸基を持たない誘導体 **10** を得た。現在は、水酸基の代わりにメチル化を有する誘導体、および、アルキル鎖の長さが異なる誘導体を合成している。誘導体 **10** のライグラスに対する発芽抑制試験を行ったところ、化合物 **2** に比べて活性は大きく低下した。このことから、alkyl 鎖の水酸基の存在が発芽抑制活性に重要であることが示唆された。現在、他の誘導体を用いた植物の発芽試験、植物生長調節活性試験を行っている。



5 **6**: R = OPMB, **7**: R = H, **8**: R = OCH_3 **10**: R = H, **11**: R = OCH_3 **9**

6-alkyl-5,6-dihydro-α-pyrone, plant germination and growth, structure-activity relationship

講演番号：3D1a11
講演日時：3 月 26 日 11:10～ 1 号館 D1 会場

2-azahypoxanthine 誘導体の植物成長調節活性に関する化学的研究

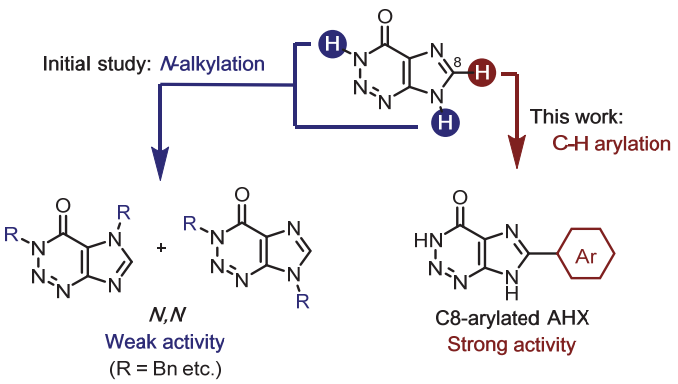
Studies on plant-growth regulatory activities of 2-azahypoxanthine analogues

○崔 宰熏[1,2]、北野 浩之[3]、上田 彩果[3]、伊藤 英人[3]、萩原 伸也[3]、徳山 真治[1]、平井 浩文[1,2]、菅 敏幸[4]、伊丹 健一郎[3]、河岸 洋和[1,2]（[1]静大院・総合農、[2]静大・グリーン研、[3]名大 WPI-ITbM、[4]静県大・薬）

○Jae-Hoon CHOI[1,2], Hiroyuki KITANO[3], Ayaka UEDA[3], Hideto ITO[3], Shinya HAGIHARA[3], Shinji TOKUYAMA[1], Hirofumi HIRAI[1,2], Toshiyuki KAN[4], Kenichiro ITAMI[3], Hirokazu KAWAGISHI[1,2] ([1]Grad. Sch. of Inte. Sci and Tech., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ., [3]WPI-ITbM, Nagoya Univ., [4]Sch. Pharm. Sci., Univ. Shizuoka)

【目的】フェアリーリングを形成するコムラサキシメジ (*Lepista sordida*) の菌糸体培養濾液からフェアリーリング惹起物質である2-azahypoxanthine (AHX) 及びimidazole-4-carboxamide (ICA) が単離された[1,2]。更に、AHXを処理したイネからAHXの代謝産物である2-aza-8-oxohypoxanthine (AOH) が単離された[3]。これらの化合物をフェアリー化合物 (fairy chemicals, FCs) と称している[4]。FCsは植物成長調節活性を有するだけでなく、植物に普遍的に内生し、様々なストレス耐性を付与することが判明している[3,4]。これまでの結果は、FCsが新しい植物ホルモンである可能性を示唆している。このような興味深い生理活性分子でありながら、AHXが植物内で働く仕組みは明らかにされていない。そこで本研究では、AHXの受容体同定とAHXの作用機序解明を目指し、様々なAHX誘導体を合成し、構造活性相関を調べることにした。

【方法・結果】窒素原子上には求核置換反応を用いて、アルキル基を導入した誘導体を合成した。残る変換可能な部位であるC8位にアリール基を導入した誘導体を合成し、植物成長促進活性を評価したところ、窒素上へ置換基を導入した誘導体は活性の大幅な低下が見られた。一方、C8位にアリール基を導入した誘導体は、AHXよりも強い成長促進作用を示した[5]。現在、合成した誘導体のAHXに対するアンタゴニスト活性等を検討している。



【参考文献】

1) Choi, J.-H. Kawagishi, H.*et al*. *ChemBioChem* **11**, 1373–1377 (2010).

2) Choi, J.-H. Kawagishi, H.*et al*. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 9956–9959 (2010).

3) Choi, J.-H., Kawagishi, H. *et al*. *Angew. Chem. Int. Ed*. **53**, 1552–1555 (2014).

4) Kawagishi, H. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **82**, 752–758 (2018).

5) Kitano, H., Kawagishi, H., Itami, K. *et al*. *Org. Lett.*, **20**, 5684–5687 (2018).

fairy chemicals, plant growth regulators, antagonist

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

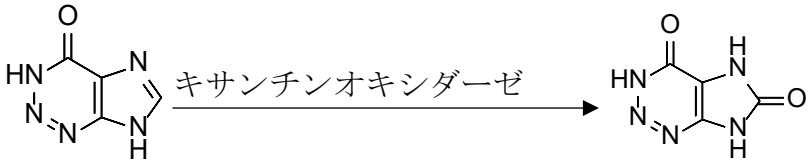
講演番号：3D1a12
講演日時：3 月 26 日 11:21～ 1 号館 D1 会場

フェアリー化合物 2-azahypoxanthine の代謝酵素における生化学的研究
Biochemical study on metabolic enzymes of one of fairy chemicals, 2-azahypoxanthine

○稲木 僚[1]、崔 宰熏[1,2]、徳山 真治[1]、道羅 英夫[2]、平井 浩文[1,2]、河岸 洋和[1,2,3] ([1]静大農、[2]静大・グリーン研、[3]静大院・創造)
○Ryo Inaki[1], Jae-Hoon Choi[1,2], Shinji Tokuyama[1], Hideo Dohra[2], Hirofumi Hirai[1,2], Hirokazu Kawagishi[1,2,3] ([1]Fac. of Agric., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ., [3]Grad. Sch. of Sci. and Technol., Shizuoka Univ.)

【目的】

我々は、コムラサキシメジの培養濾液からフェアリー化合物2-azahypoxanthine (AHX) を見出し、さらにAHXは植物内でも内生されていることを明らかにしてきた[1-3]。さらに、AHXを植物に投与すると、2-aza-8-oxohypoxanthine (AOH) に代謝され、AHXおよびAOHは植物成長調節作用を有することが確認されている[2]。AOHは化学合成が極めて困難であるが、以前にAHXからAOHを効率的に変換する菌を発見し、それを*Burkholderia contaminans*と同定しCH-1株と命名した。このCH-1株の静止細胞を用いることにより、AHXをAOHへと生物変換することが可能である[4]。また、ゲノムドラフト解析により、AHXからAOHへの変換に関与する可能性のあるタンパク質として、キサンチンデヒドロゲナーゼ小サブユニット(Xdh A)、キサンチンデヒドロゲナーゼ大サブユニット(Xdh B)、キサンチンデヒドロゲナーゼ補因子(Xdh C)の存在が示唆されている[5]。本研究では、CH-1株からのAOH合成酵素の単離・同定を目的とした。



AHX　　AOH

【方法・結果】

培養したCH-1株の菌体を抽出し、粗抽出液を得た。これを硫安沈殿、陰イオン交換クロマトグラフィー (DEAE)、ゲル濾過(TOYOPEAL HW 55F) を用いて分画を進め、その溶出画分を、脱塩・濃縮後、酵素液としてAHXを添加することでAOH合成活性を確認した。活性のみられた画分をSDS-PAGEに供し、トリプシン処理後、ペプチド配列を解析した。現在これらのタンパク質の同定を試みている。

1) J.-H. Choi, H. Kawagishi et al., *ChemBioChem*, 11, 1373-1377 (2010)
2) J.-H. Choi, H. Kawagishi et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 53, 1553-1555 (2014)
3) H. Kawagishi, *Biosci. Biotechno.l Biochem.*. 82, 752-758 (2018)
4) J.-H. Choi, H. Kawagishi et al., *Biosci. Biotechno.l Biochem.*., 80, 2045-2050 (2016)
5) J.-H. Choi, H. Kawagishi. et al.; *Genome Announc*. ,5, e01148-17 (2017).

fairy rings, *Burkholderia contaminans*

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3D1a13
講演日時：3 月 26 日 11:32～ 1 号館 D1 会場

コムラサキシメジ（*Lepista sordida*）における 2-azahypoxanthine の生合成研究
Biosynthetic studies on 2-azahypoxanthine in *Lepista sordida*

○伊藤 彰将[1,2]、古田島 美颯[3]、崔 宰熏[3,4]、道羅 英夫[4]、平井 浩文[3,4]、浅川 倫宏[5]、大内 仁志[6]、稲井 誠[6]、菅 敏幸[6]、河岸 洋和[1,4]（[1]静大院・創造、[2]JSPS、[3]静大院・総合農、[4]静大・グリーン研、[5]東海大・創造、[6]静県大・薬）
○Akinobu ITO[1,2], Mihaya KOTAJIMA[3], Jae-Hoon CHOI[3,4], Hideo DOHRA[4], Hirofumi HIRAI[3,4], Tomohiro ASAKAWA[5], Hitoshi OUCHI[6], Makoto INAI[6], Toshiyuki KAN[6], Hirokazu KAWAGISHI[1,4] ([1]Grad. Sch. of Sci. and Technol., Shizuoka Univ., [2]Res. Fellow of Japan Soc. for the Prom. of Sci., [3]Grad. Sch. of Inte. Sci. and Technol., Shizuoka Univ., [4]RIGST, Shizuoka Univ., [5]Inst. of Innov. Sci. and Technol., Tokai Univ., [6]Sch. Pharm. Sci., Univ. of Shizuoka)

【目的】2010年、コムラサキシメジ (*Lepista sordida*) の菌糸体培養濾液からフェアリーリング惹起物質 2-azahypoxanthine (AHX) 及びimidazole-4-carboxamide (ICA) の発見が報告された (fairy chemicals, FCs と呼称する) [1,2]。FCsは植物成長調節活性を有するだけでなく、植物に様々なストレス耐性を付与することが判明している[1-3]。更に、FCsは植物やキノコにおいて普遍的に内生していることが最近明らかになった[3,4]。これまでの結果を踏まえ、我々はFCsが植物やキノコにおいて新規のホルモンであるという仮説を立てた。しかし、FCsの生合成において鍵となる酵素群はほとんど未同定のままであり、その生合成経路は不明な点が多い。前回大会に引き続き、本研究では、特にAHXに焦点を当て、AHXが天然物として初めて単離されたコムラサキシメジにおけるその生合成経路の解明を目的とし、AHXの生合成酵素の探索に着手した。
【方法・結果】AHXの生合成前駆体は5-aminoimidazole-4-carboxamide (AICA) である。プリン代謝経路の中間体である5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranosyl 5'-monophosphate (AICAR) が、adenine phosphoribosyltransferase (APRT) によってAICAへ変換されることを前回大会にて報告した[5)]。AICAからAHXへの変換には窒素源が必要であり、コムラサキシメジのAHX産生量は培地にL-Argを添加することで大幅に増加することから、その窒素源はNO synthase (NOS) によってL-Argから生成するNOであると仮説を立てた。AICAとNO発生剤である1-hydroxy-2-oxo-3-(3-aminopropyl)-3-isopropyl-1-triazene (NOC5) を反応させた結果、AHXの生成が確認でき、NOがAHXの生合成に関与していることが示唆された。そこで、コムラサキシメジのゲノム解析を行った結果、NOS様遺伝子を8個見出すことができ、そのうち発現量の多い2個の遺伝子の全長クローニングに成功した。これらの遺伝子を、大腸菌を宿主として異種発現させ、リフォールディング及び各種クロマトグラフィーに供することで、組換えタンパク質を調製した。更に、NOSの補因子の1つであるcalmodulinに関しても大腸菌で過剰発現させ、組換えタンパク質を取得した。現在、*in vitro* 酵素活性試験を行い、NOS酵素活性について詳細に検討中である。
【参考文献】
1) Choi. J.-H, Kawagishi. H, *et al*., *ChemBioChem* **11**, 1373－1377 (2010).
2) Choi. J.-H, Kawagishi. H, *et al*., *J. Agric. Food Chem.* **58**, 9956－9959 (2010).
3) Choi. J.-H, Kawagishi. H, *et al*., *Angew. Chem. Int. Ed*. **53**, 1552－1555 (2014).
4) Kawagishi. H, *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **82**, 752－758 (2018).
5) 伊藤 彰将, 河岸 洋和ら, 日本農芸化学会大会講演要旨集, 576 (2018).

fairy chemicals, nitric oxide synthase, *Lepista sordida*

発表責任者：河岸 洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3D1a14
講演日時：3 月 26 日 11:43～ 1 号館 D1 会場

コムラサキシメジにおけるフェアリー化合物 ICA 及び AOH の生合成研究
Biosynthetic studies on fairy chemicals, ICA and AOH, in *Lepista sordida*

○古田島 美颯[1]、伊藤 彰将[2,3]、崔 宰熏[1,4]、道羅 英夫[4]、鈴木 智大[5]、徳山 真治[1]、平井 浩文[1,4]、浅川 倫宏[6]、大内 仁志[7]、稲井 誠[7]、菅 敏幸[7]、河岸 洋和[1,2,4]（[1]静大院・総合農、[2]静大院・創造、[3]JSPS、[4]静大・グリーン研、[5]宇都宮大・バイオ、[6]東海大・創造、[7]静県大・薬）
○Mihaya Kotajima[1], Akinobu Itou[2,3], Jae-Hoon Choi[1,4], Hideo Dohra[4], Tomohiro Suzuki[5], Shinji Tokuyama[1], Hirofumi Hirai[1,4], Tomohiro Asakawa[6], Hitoshi Ouchi[7], Makoto Inai[7], Toshiyuki Kan[7], Hirokazu Kawagishi[1,2,4] ([1]Grad. Sch. of Inte. Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [3]JSPS, [4]RIGST, Shizuoka Univ., [5]Center for Biosci. Res. and Educ., Utsunomiya Univ., [6]Inst. of Innov. Sci. and Technol., Tokai Univ., [7]Sch. Pharm. Sci., Univ. Shizuoka）

【目的】

フェアリーリング惹起物質としてコムラサキシメジ (*Lepista sordida*) 菌糸体培養濾液から単離された2-azahypoxanthine (AHX) 及びimidazole-4-carboxamide (ICA) は、植物成長調節活性を有する[1-3)]。両化合物は5-aminoimidazole-4-carboxamide (AICA) から生合成されることも明らかにしている。AHXを処理したイネからはAHXの代謝産物である2-aza-8-oxohypoxanthine (AOH) が単離され、この変換はxanthine oxidase (XOD) によって触媒されることが示唆された[4)]。AOHもまた、植物成長調節活性を示す。本研究では、ICA及びAOHの生合成経路の解明を目的として、その生合成に関与する酵素の同定を試みた。

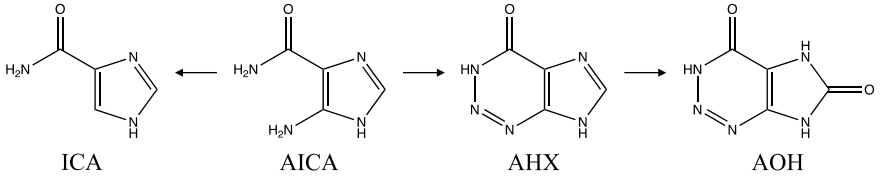


Fig. コムラサキシメジにおけるフェアリー化合物推定生合成経路

【方法・結果】

コムラサキシメジ菌糸体の抽出物からのICA生合成酵素の探索を行った。この抽出物の硫酸アンモニウム分画を行った結果、40%硫安沈殿画分でAICAからICAへの変換が確認されたため、この酵素のさらなる分画及び精製を進めている。また、70%硫安沈殿画分ではAHXからICAへの変換を確認した。

また、当研究室で確立したフェアリー化合物検出法を使用することによって、今回初めてコムラサキシメジにおけるAOHの内生を確認し、定量を行った。しかし、コムラサキシメジを含む担子菌類では、XOD遺伝子は見つかっていない。そこで、コムラサキシメジの全ゲノムシーケンス解析により、類似遺伝子の探索を行い、現在AOH生合成酵素の同定を試みている。

1) Choi, J.-H., Kawagishi, H. *et al*. *ChemBioChem* 11, 1373-1377 (2010).
2) Choi, J.-H., Kawagishi, H. *et al. J. Agric. Food Chem.* 58, 9956-9959 (2010).
3) Kawagishi, H., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 82, 752-758 (2018).
4) Choi, J.-H., Kawagishi, H. *et al. Angew. Chemie. Int. Ed.* 53, 1552-1555 (2014).

fairy rings, *Lepista sordida*, biosynthesis

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

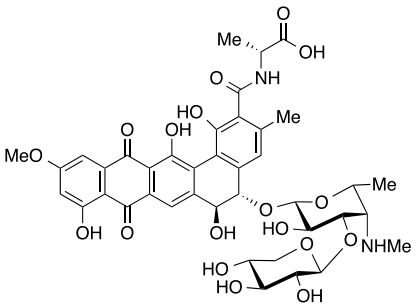
講演番号：3D1a15
講演日時：3 月 26 日 11:54～ 1 号館 D1 会場

糖結合性天然色素の二量体を用いた真菌の染色

Fungal staining by dimers of a sugar-binding natural pigment

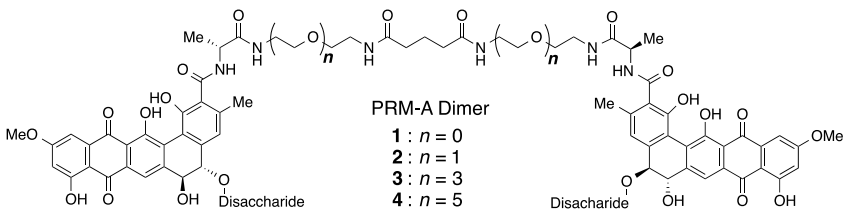
○田浦 寛太[1]、小鹿 一[1]、五十嵐 康弘[2]、伊藤 幸成[3]、中川 優[1,3] ([1]名古屋大、[2]富山県大、[3]理研)
○Kanta TAURA[1], Makoto OJIKA[1], Yasuhiro IGARASHI[2], Yukinari ITO[3], YU NAKAGAWA[1,3]
([1]Nagoya Univ., [2]Toyama Univ., [3]RIKEN)

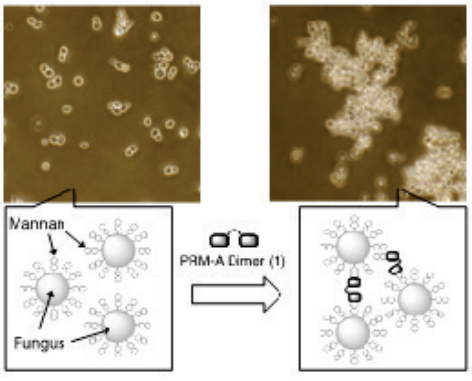
【目的】プラディミシン A (PRM-A) は, Ca^{2+}存在下で D-マンノース (Man) に特異的に結合する天然色素である。我々は近年, PRM-A のカルボキシ基をアミド化した誘導体が Man 結合活性を保持し，さらに細胞表面にマンナン (Man を構成糖とする多糖) を有する真菌 *Candida rugosa* に結合することを確認している。そこで本研究では, 二分子の PRM-A をカルボキシ基部分で連結することで二量体化し，真菌細胞を架橋して凝集させると同時に染色する誘導体の開発を試みた。



Pradimicin A (PRM-A)

【方法と結果】 二分子の PRM-A を長さの異なる PEG リンカーで連結した二量体 (**1**–**3**) を合成し，等温滴定カロリメトリーを用いてそれらの Man 結合活性を評価した。その結果，リンカーの長さによってアフィニティーは異なるものの，いずれの二量体も Man と結合することが確認された。そこで，*C. rugosa* の懸濁液に **1**–**3** を添加して真菌細胞の架橋が認められるかどうかを評価したところ，**1** を添加した場合において真菌細胞の凝集体が観察された。本結果は，**1** が複数の真菌細胞の細胞壁マンナンに同時に結合することにより細胞同士を架橋して凝集させていることを示唆している。さらに，**1** によって形成される *C. rugosa* の凝集体は赤色に染まっており，赤色沈殿として肉眼で明確に観察できた。これらの結果は，**1** が真菌の検出薬として利用できる可能性を示唆している。現在，PEG リンカーをさらに伸長した **4** の合成を行なっており，**4** による架橋試験の結果も合わせて報告する。





Fungal detection, carbohydrate recognition, pradimicin

講演番号：3D1p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ 1 号館 D1 会場

白癬菌が産生する抗生物質とその生合成遺伝子の探索

Discovery of antibiotics produced by Trichophyton rubrum and the candidate biosynthetic gene

○増田 圭恭[1]、二宮 章洋[1]、矢口 貴志[2]、浦山 俊一[1]、萩原 大祐[1] ([1]筑波大・生命環境、[2]千葉大・真菌センター)
○ Keisuke Masuda[1], Akihiro Ninomiya[1], Takashi Yaguchi[2], Shun-ichi Urayama[1], Daisuke Hagiwara[1] ([1]Fac. of Life and Env., Univ. of Tsukuba, [2]MMRC,Chiba Univ.)

【背景・目的】白癬菌は皮膚病原糸状菌であり、水虫などの皮膚感染症の原因菌である。日本におけるその推定患者数は 2000 万人を超えており、発症していない潜在的な患者（保菌者）も含めれば国民の 50%に達する。白癬菌の病原因子について様々な研究が行われてきたが、本菌の生理、生態的な理解は乏しい。特に、白癬菌が産生する二次代謝産物とその活性に関する研究は進んでおらず、感染における二次代謝産物の関与は全く解析されていない。

本研究では、白癬菌における二次代謝の全容解明を目指し、まず抗菌活性を示す化合物の特定を試みた。さらに、当該物質の生産条件の検討を行い、トランスクリプトーム解析により生合成遺伝子の推定を試みた。

【方法･結果】対象とする白癬菌には、ゲノム情報が明らかにされている 5 種（*Trichophyton rubrum*、*T. mentagrophytes*、*T. tonsurans*、*Microsporm canis*、*M. gypseum*）を使用した。これらの白癬菌をサブロー培地、ポテト培地などを用いて液体およびプレート培養し、培養抽出物の抗菌および抗真菌活性を評価した。被試験菌として皮膚常在菌・病原菌を含むグラム陽性細菌、グラム陰性細菌、および真菌を用いた。試験の結果、*M. canis* を除く 4 種の培養抽出物が枯草菌と黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性を示し、中でも *T. rubrum* 由来抽出物が最も高い抗菌活性を示した。そこで、*T. rubrum* の培養抽出物を順次二層分配、ODS カラムクロマトグラフィー、HPLC によって精製し，活性成分を得た。活性成分は赤色色素であり、*M. canis* を除く 4 種の白癬菌の培養抽出物に当該成分が含まれることを HPLC 分析によって確認した。現在は本化合物の構造決定を進めている。

次に、様々な培養条件で上記の化合物の生産量を詳しく検討したところ、サブロー培地でプレート培養する際に、テープを巻いて通気を遮断すると産生が顕著に抑制されることを発見した。そこで、この非産生条件を利用しトランスクリプトーム解析を行い、当該化合物の生合成遺伝子の特定を目指した。アミノ酸配列の相同性を指標に探索すると、*T. rubrum* のゲノムには、PKS、NRPS、PKS-NRPS Hybrid 遺伝子が、それぞれ 11、15、3 個見つかり、そのうち、化合物の産生と発現プロファイルがリンクする遺伝子を 6 つに絞り込んだ。さらに、antiSMASH による遺伝子クラスター予測を元に、クラスター内の遺伝子が協調的に発現変動しているものを、候補として推定した。今後、遺伝子破壊を試み生合成遺伝子の特定を進めていく。

secondary metabolism, antibiotics, Trichophyton

発表責任者：萩原大祐（hagiwara.daisuke.gb@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3D1p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ 1 号館 D1 会場

糸状菌間相互作用による二次代謝活性化の機構解明を目指したモデル共培養系の確立
Establishment of a model co-culture system for elucidation of the mechanism underlying activation of secondary metabolism by fungal-fungal interaction
○二宮 章洋、浦山 俊一、萩原 大祐（筑波大生命環境）
○Akihiro NINOMIYA, Shun-ichi URAYAMA, Daisuke HAGIWARA (Fac. of Life & Env., Univ. of Tsukuba)

糸状菌のゲノム中には，通常の培養条件では発現しない二次代謝産物の生合成遺伝子（休眠遺伝子）が多く含まれる。休眠遺伝子の発現を促す手法の 1 つとして共培養が挙げられる。共培養により糸状菌から新規化合物を得たとの報告が相次いでいるが，一方で，共培養がどのような分子機構を通して二次代謝を活性化するかについては未解明の部分が多い。我々は，糸状菌間相互作用が二次代謝を活性化する分子機構の解明を指向し，当該機構の解析に適したモデル系の確立を本研究の目的とした。

まず，二次代謝産物の生産性に影響を及ぼす糸状菌間相互作用の探索をおこなった。二次代謝に関する情報が豊富なモデル糸状菌 *Aspergillus fumigatus* (*Af*), *Aspergillus nidulans* (*Anid*), *Aspergillus niger*, および *Aspergillus oryzae* を対象とした。これら 4 種の糸状菌のうちいずれか 2 種ずつを共培養し，共培養が二次代謝プロファイルに与える影響を調べた。その結果，*Af* と *Anid* の共培養によって 2 種の化合物の生産量が顕著に増加することが明らかになった。これらの化合物を単離し，MS および NMR データに基づいて violaceols I および II と同定した。Violaceols は *Emericella violacea* から単離された化合物であり，様々な微生物に対して抗菌および抗真菌活性を示すことが報告されている。[1] そこで，violaceols の抗菌および抗真菌活性を調べた結果，*Bacillus subtilis* に対して生育阻害活性を示した。

次に，violaceols の生産を誘導する因子が菌同士の接触であるか，あるいは化学シグナルであるかを明らかにするため，二槽式透析培養器を用いて *Af* と *Anid* を培養した。その結果，両者を混合して培養した場合には violaceols の生産が促進されたが，透析膜を隔てて両者を培養した場合には violaceols の生産の促進は認められなかったため，菌同士の接触が violaceols の生産の誘導に必要であることが示唆された。

さらに，RNA-seq 解析によって，共培養が *Af* および *Anid* の二次代謝関連遺伝子の発現量に及ぼす影響を調べた。その結果，共培養によって *Anid* のオルセリン酸生合成遺伝子クラスターの発現量が増加することが明らかになった。当該クラスターは violaceols を含む多様なポリケチドの生合成に関与することが報告されているため，[2, 3] 我々は，*Af* と *Anid* の相互作用がオルセリン酸生合成遺伝子クラスターの活性化を通して violaceols の生合成を促進すると推定した。今後，本共培養系をモデルとして，糸状菌間相互作用による二次代謝活性化の分子機構を解析する予定である。

(1) Yamazaki, M. *et al*. *Chem*. *Pharm*. *Bull*. **30**, 514−518, (1982), (2) Schroeckh, V. *et al*. *PNAS* **106**, 14558−14563, (2009), (3) Nielsen, M. L. *et al*. *FEMS Microbiol. Lett*. **321**, 157−166, (2011).

fungal interaction, secondary metabolites, *Aspergillus*

講演番号：3D1p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ 1 号館 D1 会場

複合培養における赤色色素生産非応答性変異株の解析

Analysis of RED response-deficient mutants of Streptomyces coelicolor JCM4020 against Tsukamurella pulmonis

○石塚 匠[1]、浅水 俊平[1]、柳澤 昌臣[1]、佐藤 勝也[2]、尾仲 宏康[1]([1]東大院農生科、[2]量研機構)
○Takumi ISHIZUKA[1], Shumpei ASAMIZU[1], Masaomi YANAGISAWA[1], Katsuya SATOH[2], Hiroyasu ONAKA[1] ([1]Grad. School of Agricultural and Life Sci. Univ. of Tokyo, [2]Natl. Inst. for Quantum and Radiological Sci. and Tech.)

【背景】 放線菌の共培養方法の 1 つであるミコール酸含有細菌(MACB)との複合培養法では、放線菌の純粋培養では生産されない二次代謝物の生産が活性化する[1,2]。これまで、放線菌と生きた MACB との物理的な接触を介して放線菌二次代謝が活性化されていることが強く示唆されていた[1,3]。一方、どのような分子機構が接触に依存した放線菌の応答に必要であるのかは未解明のままである。そこで、本研究では放線菌応答の原因遺伝子を順遺伝学的手法により同定し、MACB との接触から二次代謝発現までの分子メカニズムを解明することを目的とした。赤色色素(RED)生産を指標とした接触依存応答のモデルとなり、ゲノム解読が完了した *Streptomyces coelicolor* JCM4020 株を使用した。これまで、量研・高崎研 TIARA で炭素イオンビーム照射により放線菌の変異株ライブラリを作製し、得られた 152,000 個の胞子から MACB である *Tsukamurella pulmonis* との対峙培養により赤色生産能欠失変異株を選抜していた。本発表では、気中菌糸形成能及び最小培地生育能を有する株を選抜し、59 株の変異株について解析を行ったことについて報告する。
【方法】59 株中 43 株についてゲノムリシーケンスにより変異点を同定した。変異遺伝子について、染色体組込み型プラスミドを用いて遺伝子相補株を作製し、*T. pulmonis* との対峙培養を行い、その形質を確認した。
【結果及び考察】 変異点を同定した 43 株中から RED 生合成遺伝子の変異を持つ 13 株を除いた 30 株について同定した 55 変異遺伝子について解析を行った。酵素遺伝子(28 個)、制御遺伝子(6 個)、機能未知タンパク質(10 個)などに変異が同定された。相補実験により、グルタミン酸合成酵素 B サブユニット *gltB*、翻訳因子 EF-G である *fusA*、機能未知膜タンパク質 *sarA* 及び TetR 様制御タンパク質遺伝子について、その相補株において色素応答形質が回復した。特に、TetR 様遺伝子の変異株は、Bennett's maltose 上では野生株と同様に RED 生産することが確認され、*T. pulmonis* への接触応答に関与する重要な役割を果たしていることが示唆された。TetR 様制御タンパク質は、一般的に低分子リガンドの結合により DNA から解離するリプレッサーとして機能する。このことから、複合培養では、*T. pulmonis* の接触は何らかの低分子リガンドを介し RED 生産に伝達する、新規な機構の存在が示唆された。
【文献】

[1] H. Onaka, et al. Appl Environ Microbiol. 77, 400 (2011). [2] H. Onaka, J Antibiot. 70, 865 (2017).
[3] S. Asamizu, et al. PLoS One. 10, e0142372 (2015).

bacterial interaction, contact-dependent response, combined-culture

講演番号：3D1p05
講演日時：3 月 26 日 14:34～ 1 号館 D1 会場

複合培養により活性化される二次代謝遺伝子プロモーターの制御機構の解析

Analysis of the regulation mechanism of secondary metabolism gene promoters activated by combined-culture

○桐原 正隆、浅水 俊平、尾仲 宏康（東大院・農学生命科学研究科）
○Masataka Kirihara, Shumpei Asamizu, Hiroyasu Onaka (Grad. Sch. Agricultural and Life Sci. Univ. Tokyo)

【目的】*Streptomyces* 属放線菌からの新規天然物の探索のために、休眠した二次代謝遺伝子を覚醒させる手法の研究が盛んである [1]。その一つに複合培養法がある [2]。これは、*Streptomyces* 属放線菌を、*Tsukamurella pulmonis* などのミコール酸を細胞壁成分に含む細菌（MACB）と共培養する手法であり、二次代謝産物の生産量増加や、純粋培養時には生産しない二次代謝産物生産が誘導される。これらの応答は MACB との細胞同士の接触に依存し [2]、また、MACB 死菌体の培地添加ではおこらない [3]。このように微生物が周囲の生物を感知して応答する点で、複合培養は生態学的にも興味深い。我々は、複合培養での MACB の認識から二次代謝産物の生産増加に至る分子機構に注目している。本研究では、*Streptomyces lividans* TK23 株を宿主とした異種発現で複合培養時に生産量が増加するゴードスポリンの生合成遺伝子クラスター(*god*)[4] と、*Streptomyces nigrescens* HEK616 株で複合培養特異的に生産される 5aTHQs[5] の生合成遺伝子クラスター(*stm*)を二次代謝遺伝子のモデルとし、それらのプロモーターの転写制御機構の解析から、複合培養における分子応答メカニズムを解明することを目的とした。
【方法・結果】*god* と *stm* それぞれの複合培養応答プロモーター領域である P_{godA}、P_{stmA} の下流にビオラセイン生合成遺伝子（*vioA-E*）を連結し、*S. lividans* TK23 株で異種発現させ、ビオラセイン由来青色色素を定量してプロモーターの活性を測定した。P_{godA} では複合培養で色素生産が劇的に増加したが P_{stmA} では減少した。この P_{godA}-*vioA-E* 異種発現株の *vioA* の転写量を qRT-PCR で定量したところ、培養 20 時間の時点で複合培養では純粋培養のおよそ 3 倍から 5 倍に増加した。P_{godA} はその配列から主要シグマ因子である HrdB が結合すると予測された。また複合培養に応答しないプロモーターの候補として、構成的に発現することが知られている *hrdB* のプロモーターを連結した P_{hrdB}-*vioA-E* 異種発現株で同様に定量したところ、予想外におよそ 4 倍の増加が見られた。
【考察】本研究によりゴードスポリン生産の複合培養における応答は転写段階で起こることが示され、その転写活性化は *hrdB* の発現量増加に起因することが示唆された。一方で複合培養時には *hrdB* を介して一次代謝を含む代謝系全体の大規模な変化が起きていると予想され、転写活性化が見られなかった 5aTHQs の生産には基質供給などの代謝の段階での制御がかかわっていることが示唆された。
【文献】[1] 尾仲 宏康, *化学と生物* 52 (2014) [2] Onaka, H. , *et al*. *Appl*. *Environ*. *Microbiol*. 77.2 (2011) [3] Asamizu, S. , *et al*. *PloS one* 10.11 (2015): e0142372. [4] Onaka, H. , *et al*. *J*. *Antibiot*. 68, (2015) 【5】 Sugiyama, R. , *et al*. *Org*. *Lett*. 17, (2015)

combined-culture, transcriptional activation, bacterial interaction

発表責任者：桐原正隆（kirihara-masataka@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

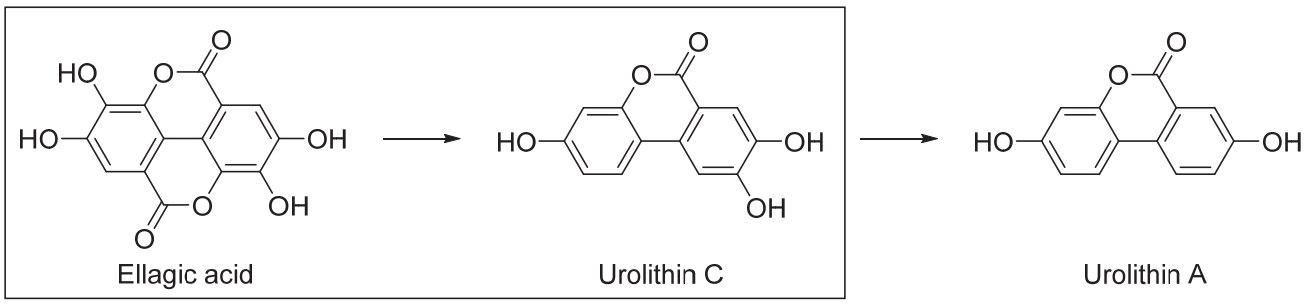
講演番号：3D1p06
講演日時：3 月 26 日 14:55～ 1 号館 D1 会場

複合微生物系によるウロリチンの生産に関する研究(2) ～新規ヒト腸内由来ウロリチン C 生産菌の取得～

A study for metabolic pathway of urolithins in gut microbiota (2) -Discovery of novel urolithin C-producing bacterium from human feces-

○林 素子、石輪 俊典、工藤 眞丈、中島 賢則、山本 浩明（ダイセル・コーポレート研）
○Motoko HAYASHI, Shunsuke ISHIWA, Masatake KUDOH, Takanori NAKAJIMA, Hiroaki YAMAMOTO (Daicel Corp., Corporate Research Center)

【目的】ウロリチンA は、スーパーフルーツと言われるザクロやベリー類に含まれるエラジタンニンやその加水分解物であるエラグ酸が、生体内、特に腸内細菌で代謝されてできる物質で、マイトファジー促進効果による線虫の寿命延長効果、骨・筋肉の機能低下防止効果、脂肪滴蓄積抑制効果、破骨細胞分化抑制効果等が報告されている。ウロリチンA は、エラグ酸を原料とし、ウロリチンC を含む様々な類縁体を中間体として生成するが、詳細な反応経路は明らかになっていない。今回、ヒト糞便からエラグ酸をウロリチンA に変換する微生物を探索した。
【方法】ザクロ抽出物を含むサプリメントを摂取後の尿からウロリチンA が検出されたヒト（ウロリチンA 生産者）の糞便を採取した。希釈した糞便サンプルを培地に接種して集積培養を行った後、プレートに塗布して単菌分離を行った。得られたコロニーをエラグ酸含有培地に接種し、培養後にウロリチン誘導体の分析を行った。
【結果】ヒト糞便から分離したコロニーを評価した結果、エラグ酸をウロリチンA に直接変換する微生物を見出すことはできなかった。一方、中間体であるウロリチンC を生産する微生物を複数得ることができた。16S rRNA 解析による同定を行った結果、ウロリチンC 生産菌の大部分はウロリチンC 生産菌として報告されている *Gordonibacter* 属であったが、それ以外の微生物として唯一 *Eggerthella* sp. DC 3563 を見出すことができた。本株によるウロリチンC の生産には水素が必須であった。



【参考文献】
（1） 工藤 眞丈、中島 賢則、山本 浩明、WO2018/155485.
（2） M. V. Selma *et al.*, *Food Funct.*, **5** (8), 1779-1884 (2014).

urolithin, Eggerthella, Gordonibacter

発表責任者：林 素子（mk_hayashi@jp.daicel.com）

講演番号：3D1p07
講演日時：3 月 26 日 15:06～ 1 号館 D1 会場

複合微生物系によるウロリチンの生産に関する研究(3) ～新規ヒト腸内由来ウロリチン A 生産菌の発見～

A study for metabolic pathway of urolithins in gut microbiota (3) -Discovery of novel urolithin A-producing bacterium from human feces-

○中島 賢則、石輪 俊典、工藤 眞丈、林 素子、山本 浩明（ダイセル・コーポレート研）
○Takanori NAKAJIMA, Shunsuke ISHIWA, Masatake KUDOH, Motoko HAYASHI, Hiroaki YAMAMOTO (Daicel Corp., Corporate Research Center)

【目的】
ウロリチン A は、スーパーフルーツと言われるザクロやベリー類に含まれるエラジタンニンやその加水分解物であるエラグ酸が、生体内、特に腸内細菌で代謝されてできる物質で、マイトファジー促進効果による線虫の寿命延長効果、骨・筋肉の機能低下防止効果、脂肪滴蓄積抑制効果、破骨細胞分化抑制効果等が報告されている。ウロリチン A は、エラグ酸を原料とし、水酸基の位置、数が異なる様々な類縁体を経由して生成されるが、詳細な反応経路は明らかになっていない。今回、ヒト糞便から、エラグ酸をウロリチン A に変換する微生物の探索を試みた。
【方法】
ザクロ抽出物を含むサプリメントを摂取後の尿中からウロリチン A が検出されたヒト（ウロリチン A 生産者）の糞便を採取した。これをもとにウロリチン A 生産菌の分離を試みた。すべての培養実験はエラグ酸を含む ABB 培地 (oxoid) を用いて、気相を N2/H2/CO2 (80/10/10)で置換した嫌気条件下、37℃の培養を実施し、培養液中に生成したウロリチン類を HPLC によって定量分析することにより行った。これらの条件下、糞便サンプルの希釈培養法、各培養物におけるウロリチン A 生産評価および菌叢の 16S rRNA メタゲノム解析を組み合わせた手法によってウロリチン A 生産菌の分離を試みた。
【結果】
ウロリチン A 生産者の糞便をもとに、上記手法でスクリーニングすることによって、ウロリチン A 生産能を有する新規な微生物を分離することができた。16S rRNA 遺伝子用いた同定の結果、本生産菌は *Clostridium* 属に属する微生物であった。本生産菌に関してウロリチン A 生産能を評価した結果、エラグ酸を出発物質とした場合においてはウロリチン A を生産しなかったが、前駆体物質であるウロリチン C を基質とした場合にウロリチン A を生産することがわかった。
本発表では、ヒト糞便より分離した上記ウロリチン A 生産菌に関して、各種ウロリチン類に対する脱水酸化の基質特異性についても報告する。

urolithin A, dehydroxylation, Clostridium

発表責任者：中島賢則（tk_nakajima@jp.daicel.com）

講演番号：3D1p08
講演日時：3 月 26 日 15:17～ 1 号館 D1 会場

複合微生物系によるウロリチンの生産に関する研究(4) ～腸内細菌共培養によるウロリチン A 発酵生産～

A study for metabolic pathway of urolithins in gut microbiota (4) -Production of urolithin A by co-culture-

○石輪 俊典、中島 賢則、林 素子、工藤 眞丈、山本 浩明（ダイセル・コーポレート研）
○Shunsuke ISHIWA, Takanori NAKAJIMA, Motoko HAYASHI, Masatake KUDOH, Hiroaki YAMAMOTO (Daicel Corp., Corporate Research Center)

【目的】
ウロリチン A は、スーパーフルーツと言われるザクロやベリー類に含まれるエラジタンニンやその加水分解物であるエラグ酸が、生体内、特に腸内細菌で代謝されてできる物質で、マイトファジー促進効果による線虫の寿命延長効果、骨・筋肉の機能低下防止効果、脂肪滴蓄積抑制効果、破骨細胞分化抑制効果等が報告されている。ウロリチン A は、エラグ酸を基質とし、水酸基の位置、数が異なる様々な類縁体を経由して生成されるが、詳細な反応経路は明らかになっていない。今回、ヒト糞便より分離した 2 種類の腸内細菌を用いて、エラグ酸からウロリチン A の生産を試みた。
【方法】
前報で分離したウロリチン C 生産菌およびウロリチン A 生産菌の培養はエラグ酸またはウロリチン C を含む ABB 培地 (Oxoid 社製) を用いて、気相を N2/H2/CO2 (80/10/10) で置換した嫌気条件下、37℃で実施し、培養液中に生成したウロリチン類を HPLC によって定量分析した。また、エラグ酸を出発物質としたウロリチン A 発酵生産においては、エラグ酸を含む同培地にウロリチン C 生産菌およびウロリチン A 生産菌を同時に接種し、上記と同様の条件下で共培養し、生成したウロリチン類を HPLC により定量した。
【結果】
ヒト糞便より分離したウロリチン C 生産菌およびウロリチン A 生産菌をそれぞれ単独で培養した結果、ウロリチン C 生産菌においては、水素供給下においてのみ、エラグ酸を基質としてウロリチン M5、ウロリチン M6、ウロリチン C を生産したが、ウロリチン A は生産しなかった。一方、ウロリチン A 生産菌では、水素供給なしで、ウロリチン C を基質としてウロリチン A のみを生産した。更に、ウロリチン C 生産菌とウロリチン A 生産菌を共培養することにより、エラグ酸を出発物質として、ウロリチン A を効率的に生産することができ、安定的にウロリチン A を生産可能な共培養系を確立することができた。本発表では、上記の共培養系における気相ガスの影響についても報告する。

urolithin A, co-culture, gut bacteria

発表責任者：石輪俊典（ss_ishiwa@jp.daicel.com）

講演番号：3D1p09
講演日時：3 月 26 日 15:28～ 1 号館 D1 会場

自家蛍光シグネチャー評価による新規スクリーニング法：酵母の油脂代謝性をモデルとして
Autofluorescence signature-based screening: minimally-invasive analysis of lipid productivity
○平山 智弘[1]、八幡 志央美[2]、高部 響介[2]、川村 優樹[3]、岡野 千草[2]、野村 暢彦[2]、八幡 穣[2]([1]筑波大学・生命環境学群、[2]筑波大学・生命環境系、[3]筑波大学大学院・生命環境)
○Tomohiro HIRAYAMA[1], Shiomi YAWATA[2], Kyohsuke TAKABE[2], Yuhki KAWAMURA[3], Chigusa OKANO[2], Nobuhiko NOMURA[2], Yutaka YAWATA[2] ([1]Sch. of Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Fac. of Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [3]Grad. Sch. of Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

不均一な微生物集団から目的の細胞を見つけ出すスクリーニング技術は微生物の生態解明や工業利用において重要な役割を果たしている。しかし、従来のスクリーニング技術では、例えば、細胞を壊し生体分子を調べる、標識遺伝子を挿入して発現を調べるなどのステップを要し、集団内での細胞の性質を無処理で調べることは困難であった。そこで我々は、細胞集団を顕微鏡で観察するだけで一細胞ごとの性質を評価できる非破壊的な新規スクリーニング技術を開発することを目的とした。
非破壊的スクリーニング技術の基盤として、我々は一細胞の『自家蛍光シグネチャー』に着目した。自家蛍光とは細胞内の酵素や脂質など生体分子に由来する微弱な蛍光であり、細胞の様々な生理状態を反映することが知られている。細胞の内在性シグナルである自家蛍光を用いることで、GFP などによる侵襲的なタグ付けが必要なくなる。我々の研究グループは細胞集団の自家蛍光を一細胞レベルの『自家蛍光シグネチャー』として調べるために、共焦点レーザー顕微鏡と画像解析、機械学習を組み合わせた手法（：CRIF）を構築している。CRIF を用いることで、微生物細胞の様々な性質を『自家蛍光シグネチャー』に基づき評価できることが分かってきている。本研究では、油糧酵母 *Lipomyces starkeyi* をモデル生物として、CRIF を発展し、細胞集団から非破壊的に目的の細胞をスクリーニングする技術開発を行う。
本発表では、油脂を生産・蓄積する酵母 *Lipomyces starkeyi* の異なる油脂生産性を自家蛍光シグネチャーに基づいて評価・識別できるかを検証した結果を報告する。油脂代謝性の異なる酵母細胞の自家蛍光シグネチャーを比較すると、油脂代謝の違いに伴った特徴が見られた。まず、野生株・油脂高蓄積株・油脂低蓄積株の３株を比較すると、油脂蓄積の多い株ほど長波長蛍光シグナルが大きく、逆に油脂蓄積の少ない株では短波長蛍光シグナルが強くなっていた。また、代謝段階の異なる細胞を比較すると、代謝が経時的に変化するにつれて蛍光シグナルが遷移していく様子も見られた。これらの結果は自家蛍光シグネチャーが細胞の生理状態を反映することを示している。さらに自家蛍光シグネチャーに基づいて株や代謝段階を高精度に判別する機械学習モデルを構築できた。CRIF に基づいた細胞評価技術が、非破壊的に細胞の性質を評価する新規スクリーニング法として活用できる可能性を示している。

screening method, autofluorescence, confocal microscopy

発表責任者：平山智弘（hirayama.tomohiro.sg@alumni.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3D1p10
講演日時：3 月 26 日 15:39～ 1 号館 D1 会場

外的刺激を応用した微生物の単離法
Isolation of microbes by applying the exogenous stimulation
○井澤 賢一[1]、大場 愛斗[1]、五味 滉樹[1]、佐藤 夏響[1]、天貝 啓太[1,2] ([1]三田国際学園、[2]理研 CSRS)
○Kenichi IZAWA[1], Manato OOBA[1], Hiroki GOMI[1], Natsuki SATO[1], Keita AMAGAI[1,2] ([1]Mita International School, [2]RIKEN CSRS)

【目的】
現在まで知られている抗生物質は、その大部分が放線菌によって作られている。そのため我々は、新規抗生物質を生産する放線菌を探し出すことを目的とした。しかし、現在まで単離してきた微生物は、地球上に存在する全ての微生物のわずか 1%にすぎないと考えられている。そこで新たな微生物単離方法の開発を目標とし、研究を展開した。新たな微生物単離手法の候補として、明暗の有無や温度条件、電流の存在、酸素濃度などがあげられた。つまり、主に土壌中で棲息する放線菌ではあるが、単離時に周りの環境を変え、培地に播種した微生物の成育の変化の有無を見るというものである。これらの単離方法を用いて、難培養微生物、新規抗生物質生産菌の単離を目指していく。

【手法・結果】
まず我々は、新規微生物の単離手法を開発する前に、従来法による微生物単離を行った。抗生物質を生産する微生物の多くが放線菌であることから、放線菌だけが優先的に生育できる寒天培地を用い、土壌や植物から微生物を単離した。単離した微生物については抗菌活性測定を行い、活性が見られた微生物を収集した。これらの微生物の培養液を酢酸エチルもしくはブタノールで抽出し、LC/MS 解析を行った。また生物種を調べるため、16S rRNA 系統解析を行った。これらの結果をデータベースと照合し、得られた抗生物質の新規性を評価した。現在まで 500 株ほどの微生物を単離し、そのうち 50 株ほどが麹菌に対して抗菌活性を示した。特に熊本県阿蘇市、兵庫県加東市、東京都世田谷区の 3 ヶ所から採取した 7 株については、化合物の抽出、LC/MS 解析及び TLC-抗菌活性相関を行った。その中でも GC09 株は 16S rRNA の配列から新しい放線菌である可能性があることがわかり、生産する抗生物質についても新規であることが示唆された。また、新しい単離手法については、単離する際の光の有無について検討を行った。得られた微生物については先と同様に 16S rRNA 系統解析、抗菌活性測定を行い、両者の相違点を調べ考察を行っていく。

Streptomyces, Antibiotics

発表責任者：天貝 啓太（k.amagai@mita-is.ed.jp）

講演番号：3D1p11
講演日時：3 月 26 日 16:00～ 1 号館 D1 会場

複合培養における *Streptomyces* sp. HEK616 による 5aTHQ の生産機構

Analysis of production mechanism of 5aTHQ by *Streptomyces* sp. HEK616 in combined-culture

○浅水 俊平[1]、尾崎 太郎[1,2]、西村 慎一[1,3]、掛谷 秀昭[3]、尾仲 宏康[1] ([1]東大院農生科、[2]北大理、[3]京大薬)
○Shumpei ASAMIZU[1], Taro OZAKI[1,2], Shinichi NISHIMURA[1,3], Hideaki KAKEYA[3], Hiroyasu ONAKA[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Hokkaido Univ., [3]Kyoto Univ.)

【背景・目的】放線菌 *Streptomyces* sp. HEK616 はミコール酸含有細菌 *Tsukamurella pulmonis*（*Tp*）との複合培養特異的に抗真菌活性を有する 5aTHQ 類を生産する[1]。また HEK616 株は純粋培養時に抗菌活性を有する Streptoaminal（STAM）類を生産し、複合培養により生産量は増加することが明らかになっている[2]。これまでに HEK616 ゲノムから推定した生合成遺伝子領域の異種発現から 5aTHQs / STAMs 生合成に関与する同一の遺伝子群（*stm*）を同定していた。一方、*Streptomyces lividans* TK23 株においては、*Tp* との異属細菌間の物理的な接触を介した二次代謝産物生産の活性化が観察されていた[3]。そこで本研究では、HEK616 株における 5aTHQs と STAMs の生産活性化機構について、*Tp* 接触に依存した活性化が生じているかを明らかにするために、二層式フラスコを用いた培養液抽出物の LC-MS 解析を行った。また、複合培養時の HEK616 株の遺伝子発現変動を mRNA-seq により解析し、5aTHQs / STAMs の生産活性化機構を解析した。

【方法・結果】二層式フラスコを用いて代謝産物の比較解析を行った結果、5aTHQs の生産は 2 種の菌を透析膜で隔てた場合、全く生産が観察されず、2 種の菌を混合した場合のみ生産が確認された。一方、STAMs は 2 種の菌を透析膜で隔てた場合においても、生産性が向上することが観察された。純粋培養と複合培養との RNA-seq 比較解析では、予想外に *stm* 転写には有意な変動の差は確認されなかった。一方で、複合培養では分枝脂肪酸合成系を含めた一次代謝系酵素遺伝子の転写活性化が観察された。更に STAMs を 5aTHQs に変換すると予想される酸化還元酵素を探索したところ、多数の候補遺伝子の転写活性化が観察された。

【考察】STAMs では、栄養源の変化、または何らかの物質を感知し、分枝脂肪酸合成系を含めた一次代謝系の活性化により前駆体基質の量が増加し、結果として生産量が増加することが考えられた。また 5aTHQ では、接触依存的な機構を介し、未同定の酸化還元酵素の遺伝子発現の活性化により STAMs から 5sTHQs への変換反応が進行したことが考えられた。以上の結果から、多様な微生物間相互作用が引き起こす生育環境変化に適合応答する、放線菌による抗菌活性物質の作り分け機構の存在が示唆された。

【文献】[1] Sugiyama R. *et al. Org Lett.* 17(8): 1918-1921 (2015). [2] Sugiyama R. *et al. Angew Chem Int Ed Engl.* 55(35): 10278-10282 (2016). [3] Onaka H. *et al*. *Appl Environ Microbiol*. 77(2): 400-406 (2011).

secondary metabolism, bacterial interaction, combined-culture

発表責任者：浅水俊平（asamizu@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3D1p12
講演日時：3 月 26 日 16:11～ 1 号館 D1 会場

放線菌の形態異常を引き起こす三種複合培養の解析

Analysis of morphologic abnormality in *Streptomyces* sp. HEK138A induced by three strain combined-culture

○加藤 愛美、浅水 俊平、尾仲 宏康（東大院農生科）
○Manami KATO, Shumpei ASAMIZU, Hiroyasu ONAKA (Univ. of Tokyo)

【背景・目的】我々はミコール酸含有細菌（MACB）と放線菌の相互作用に起因する二次代謝の活性化に注目し、研究を行っている。 *Tsukamurella pulmonis*（*Tp*）と *Streptomyces lividans*（*Sl*）の二菌間の相互作用で、*Tp* の接触を介して色素性二次代謝産物（RED）の生産が活性化された [1,2]。石川県舳倉島由来の土壌中から共分離された放線菌 *Streptomyces variegatus* HEK138A（*Sv*）と MACB である *Mycobacterium septicum* HEK138M（*Ms*）の相互作用の解析を行っていた過程で、*Sv* と *Ms* と *Bacillus subtilis*（Bs）を寒天培地上で三者対峙培養した際、*Sv* の菌糸が異常な分枝を多く持つ、特徴的な形態（*Sv* 異常分枝形態）に変化することを報告した（昨年度日本農芸化学会名古屋大会）。*Sv* と *Ms*、もしくは *Sv* と *Bs* の対峙培養では *Sv* 異常分枝形態は観察できず、三者が共存して初めて生じる現象であることが示唆されていた。本研究では、*Sv* 異常分枝形態の原因物質の同定を目指し、研究を行った。
【結果】三者（*Sv*、*Ms*、*Bs*）の対峙培養部分を BuOH で抽出し、*Sv* のコロニーの隣に添加すると、*Sv* 異常分枝形態が走査型電子顕微鏡（SEM）で観察され、化学シグナルに起因することが明らかになった。一方、三者の液体培養中では *Sv* 異常分枝形態は見られず、固体培地上で起こる現象であることが SEM 観察で確認された。他の放線菌に対する影響を調べるために、*Sl*、*Ms*、*Bs* の三者対峙培養を行ったが、*Sl* には異常分枝形態は見られなかった。また, 異常分枝形態を引き起こす物質の生産者を明らかにするために, コロニー全体を SEM 観察したところ、三者（*Sv*、*Ms*、*Bs*）対峙培養で起こる *Sv* 異常分枝形態は、*Bs* の接触面に沿っていることが観察された。
【考察】*Sv* 異常分枝形態の原因物質は *Bs* の生産する未知化合物（X）であることが示唆される。また、この化合物 X は *Bs* が *Sv* のみ、*Ms* のみと相互作用するときには誘導されないことから、*Bs* による化合物 X の生産には *Sv* に影響を受けた *Ms* によって誘導されると推定している。化合物 X は放線菌の分枝に関わる因子に影響し、異常形態を引き起こすことが示唆される。放線菌の分枝には、隔壁形成に関わる FtsZ の発現抑制 [3] や先端成長部位に局在する DivIVA のリン酸化を制御する、Ser/Thr kinase である AfsK の発現誘導 [4] が知られており、その制御系が撹乱していることが考えられるが、機構解明には引き続き詳細な研究が必要となる。三者間の相互作用が存在するときのみ起こる本現象は、微生物生態における複雑な異属細菌間コミュニケーションの示すものと考えている。
【文献】[1] Onaka H., *et al.* AEM (2011), [2] Asamizu S., *et al.* PlosONE (2015), [3] Santos-Benneit *et al*., Nat. commun. (2017), [4] Hempel A *et al*., PNAS (2012)

bacterial interaction, morphology, combined-culture

講演番号：3D1p13
講演日時：3 月 26 日 16:22～ 1 号館 D1 会場

抗生物質リンコマイシンが放線菌の二次代謝能を高める仕組みの解析
Analysis of the molecular mechanisms for lincomycin induction of secondary metabolism in streptomycetes

○向井 慶一郎[1]、石塚 美咲[1]、小林 桃子[2]、今井 優[3]、保坂 毅[1,2,4] ([1]信州大院総合理工、[2]信州大農、[3]ノースイースタン大、[4]信州大バイオメディカル研)
○ Keiichiro MUKAI[1], Misaki ISHIZUKA[1], Momoko KOBAYASHI[2], Yu IMAI[3], Takeshi HOSAKA[1,2,4] ([1]Grad. Sch. of Sci. and Technol., Shinshu Univ., [2]Fac. Agric., Shinshu Univ., [3]Northeastern Univ., [4]IBS-ICCER, Shinshu Univ.)

【背景・目的】 これまでに我々は, 低濃度の抗生物質リンコマイシンが放線菌の二次代謝能を高めることを報告してきた[1, 2]. 本研究では, この現象の仕組みを詳しく理解することを目的とし, 以下の検討を行った。

【方法】 改変 R5 液体培地で放線菌基準株 *Streptomyces coelicolor* A3(2) を 30℃で 36 時間振とう培養し, 5 μg/mL となるようにリンコマイシンを加え, さらに培養を続けると, 青色色素抗生物質生産量の増加が認められる。この条件において, リンコマイシン添加後の遺伝子発現量の変動を網羅的に追跡するとともに, 同抗生物質の標的であるリボソームの量的及び質的変化を解析し, 抗生物質高生産化の鍵となり得る要因を探索した。その際に, リンコマイシン非存在下あるいは二次代謝の活性化が起こらない濃度のリンコマイシン存在下(0.5 及び 200 μg/mL)の条件を比較対照とした。

【結果・考察】 二次代謝が活性化する条件(5 μg/mL リンコマイシン存在下)でのみ認められる変化の一つに, リボソームタンパク質やリボソーム関連因子(23S rRNA メチル基転移酵素やリボソームからリンコマイシンを剥がす ATP binding cassette F-family タンパク質など)の発現が mRNA（とタンパク質）レベルで劇的に高くなることを見出した。実際にこの条件では, リンコマイシン添加後のしばらくの間(少なくとも 96 時間まで), リンコマイシン非存在時に比べ, リボソーム量が 2～3 倍ほど多いことを示唆する結果が得られた。リボソーム量の増加が認められたこの時期には, 青色色素抗生物質の生合成を正に調節する遺伝子(*actII*-orf4)の mRNA 発現量が高いことも確認できた。5 μg/mL リンコマイシン存在下でのリボソームは, その量的変化と質的変化により, *actII*-orf4 遺伝子の mRNA を高効率で翻訳できる可能性が推察された。このことが, 青色色素抗生物質の生合成酵素量の増加をもたらし, 結果的に同色素抗生物質の高生産化が起こることは十分に考えられる。以上のように, リンコマイシン存在下におけるリボソームの量的及び質的変化が二次代謝活性化の鍵であることの見通しを得た。

[1] Imai Y., et al., Appl. Environ. Microbiol., 81:3869-3879 (2015).
[2] Ishizuka M., et al., Antonie Van Leeuwenhoek, 111:705-716 (2018).

streptomycetes, lincomycin, secondary metabolism

発表責任者：保坂　毅（thosaka@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3D1p14
講演日時：3 月 26 日 16:33～ 1 号館 D1 会場

放線菌の二次代謝に対する抗生物質タイロシンのユニークな濃度依存的活性化作用

The uniquely dose-dependent activating effects of antibiotic tylosin on secondary metabolism in actinomycetes

○小林 桃子[1]、向井 慶一郎[2]、石塚 美咲[2]、今井 優[3]、保坂 毅[1,2,4]([1]信州大学・農、[2]信州大院・総合理工、[3]ノースイースタン大、[4]信州大バイオメディカル研)
○ Momoko KOBAYASHI[1], Keiichiro MUKAI[2], Misaki ISHIZUKA[2], Yu IMAI[3], Takeshi HOSAKA[1,2,4] ([1]Fac. Agric., Shinshu Univ., [2]Grad. Sch. of Sci. and Technol., Shinshu Univ., [3]Northeastern Univ., [4]IBS-ICCER, Shinshu Univ.)

［**背景**］ 低濃度の抗生物質存在下で放線菌の二次代謝が活発になることがある[1,2]. これまでに, この現象がリボソームを標的とする抗生物質の多くで認められることを明らかにしてきた. 本研究において我々は, タイロシン存在下で起こる放線菌の二次代謝活性化現象が極めてユニークであることを新たに見出したので報告する.

［**方法**］ *Streptomyces coelicolor* A3(2) の胞子（2×10^6 colony forming units）を 20mL の YEME 液体培地に接種し, 30℃で振とう培養した. これを基本培養条件とし, 抗生物質タイロシンが *S. coelicolor* A3(2) の二次代謝に及ぼす影響を, 様々な添加濃度（0～32 μg/mL）と時期（培養開始直後～48 時間後）で検証した.二次代謝活性化の有無は, 培養 7 日目の色素抗生物質の生産量から評価した.

［**結果**］ 培養 36 時間後に 1 μg/mL となるようにタイロシンを添加して培養を続けると, 色素抗生物質生産量の劇的な増加が認められた. この時の赤色および青色色素抗生物質生産量は, タイロシン非添加時と比べてそれぞれ 27 倍および 15 倍と高い値を示した. このような色素抗生物質の高生産化は, 同時期におけるタイロシンの濃度が 0.5 μg/mL あるいは 2 μg/mL では認められず, 極めて狭い濃度域で起こることが判明した. 加えて, そのようなタイロシンの作用は, 培養 36 時間を中心とした前後数時間内の限定された条件でしか認められないことも明らかになった.

［**考察**］ 先行研究で我々は, 低濃度の抗生物質リンコマイシン存在下で *S. coelicolor* A3(2) の色素抗生物質生産量が増加することを明らかにしている[1,2]. リンコマイシンによる色素抗生物質の高生産化は, タイロシンよりもずっと広範な濃度域で, その添加時期も特定の時間内に限定されずに起こる. 加えて, 生産量が増加するのは青色色素抗生物質のみで, 赤色色素抗生物質は高生産されない. これらの事実と本研究の結果から, 放線菌の二次代謝に対するタイロシンの濃度依存的活性化作用は, 添加濃度や時期の条件面で限定的であるが強力であること, さらにはリンコマイシンの作用とは仕組みが異なることが示唆された. 現在我々は, 様々な放線菌に抗生物質タイロシンの二次代謝活性化作用を働かせて, それらの潜在的二次代謝産物を効率的に発掘できるか否かの検証にも取り組んでいる. 本発表ではその取組みについても報告する予定である.

[1] Imai Y. et al. Applied and Environmental Microbiology, 81:3869-3879 (2015).
[2] Ishizuka M. et al., Antonie Van Leeuwenhoek, 111:705-716 (2018)

tylosin, *Streptomyces*, secondary metabolism

発表責任者：保坂　毅（thosaka@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3D1p15
講演日時：3 月 26 日 16:44～ 1 号館 D1 会場

放線菌から取得したオフロキサシン耐性変異株の特性解析

Physiological and genetic characterization of ofloxacin-resistant mutants isolated from actinomycetes

○星野 颯[1]、谷津 穂高[2]、保坂 毅[1,2,3] ([1]信州大院総合理工、[2]信州大農、[3]信州大バイオメディカル研)
○Kanata HOSHINO[1], Hotaka YATSU[2], Takeshi HOSAKA[1,2,3] ([1]Grad. Sch. of Sci. and Technol., Shinshu Univ., [2]Fac. Agric., Shinshu Univ., [3]IBS-ICCER, Shinshu Univ.)

【背景】 オフロキサシンは細菌の DNA ジャイレースに作用し，DNA 複製を阻害することで細胞の増殖を妨害するニューキノロン系抗生物質である。本研究において我々は，様々な放線菌からオフロキサシン耐性変異株を取得し，それらの特性を解析した。その結果，以下に示す興味深い知見を得たので報告する。

【方法】 放線菌基準株 *Streptomyces coelicolor* A3(2) や土壌から分離した *Nocardia* 属放線菌を含む計 7 種類の放線菌を供試菌株とした。最小生育阻止濃度 (MIC) の 2~5 倍濃度のオフロキサシンを含む寒天培地上に各放線菌の胞子を接種し，30℃で 7~31 日間培養した。出現したコロニーのうち，MIC の 2 倍濃度のオフロキサシン存在下で生育が確認できたものをオフロキサシン耐性変異株とし，それらの性質 (培養性状や二次代謝産物生産性，変異点など) を調べた。

【結果・考察】

***S. coelicolor* A3(2) のオフロキサシン耐性変異株** 計 444 菌株のオフロキサシン耐性変異株を取得した。それらのオフロキサシン耐性は，MIC の 4 倍から，高い菌株では 16 倍以上と様々であった。興味深いことに，取得したオフロキサシン耐性変異株の中には，黄色色素や赤色あるいは青色色素抗生物質の高生産を示す菌株，加えて，オフロキサシン存在下でそれらの生産がさらに高まる菌株などが含まれていた。この結果は，*S. coelicolor* A3(2) のオフロキサシン耐性変異株が，二次代謝産物生産性で実にバラエティーに富むことを示唆した。

その他の放線菌から取得したオフロキサシン耐性変異株 *S. lividans* 66, *S. griseus* IFO 13189, *S. parvulus* ATCC12434, *S. antibioticus* 3720, および 2 種類の土壌分離放線菌 (*Streptomyces* 属と *Nocardia* 属) からも多数のオフロキサシン耐性変異株を取得した。*S. coelicolor* A3(2)と同様に，性質が劇的に変化したオフロキサシン耐性変異株がそれら放線菌からも取得できたことを確認した。

以上のように，放線菌にオフロキサシン耐性を付与することで，同菌の性質を劇的に変えられることを新たに見出した。現在，DNA ジャイレース遺伝子 (*gyrA* と *gyrB*) を中心に，取得したオフロキサシン耐性変異株における変異点を特定中である。今後は，オフロキサシン耐性変異が放線菌の性質変化に与える影響の解明を目指す。加えて，得られた知見を利用して，潜在的二次代謝産物発掘への応用研究にも取り組む予定である。

ofloxacin-resistant mutatants, secondary metabolism, actinomycetes

発表責任者：保坂毅（thosaka@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3D2a06
講演日時：3 月 26 日 10:05～ 1 号館 D2 会場

渦鞭毛藻におけるサキシトキシン生合成の ^{15}N 同位体標識硝酸ナトリウムを用いたメタボロミクス解析

Metabolomic study on saxitoxin biosynthesis in dinoflagellates using ^{15}N-labelled sodium nitrate as a nitrogen source

○長 由扶子[1]、土屋 成輝[1]、大村 卓朗[2]、小池 一彦[3]、及川 寛[4]、此木 敬一[1]、大島 泰克[5]、山下まり[1]（[1]東北大・院農、[2]水圏科学、[3]広島大・院生物圏、[4]中央水研、[5]東北大・院生命）

○Yuko CHO[1], Shigeki Tsuchiya[1], Takuo Omura[2], Kazuhiko Koike[3], Hiroshi Oikawa[4], Keiichi Konoki[1], Yasukatsu Oshima[5], Mari Yamashita[1] ([1]Graduate school of Agric., Tohoku Univ., [2]LASC, [3]Graduate School of Biosphere Sci., Hiroshima Univ., [4]National Research Institute of Fisheries Science, [5]Graduate School of Life Sciences, Tohoku Univ.)

【背景・目的】麻痺性貝毒はサキシトキシンに代表される三環性のアルカロイドで、麻痺性貝中毒の原因物質である。海産渦鞭毛藻が生産した毒が二枚貝に蓄積し、毒化した貝を喫食したヒトに中毒を引き起こす。近年温暖化や開発などにより麻痺性貝毒生産渦鞭毛藻の出現海域が拡大している。海洋環境の変化が渦鞭毛藻の毒組成や毒量に影響するという報告が多くなされおり、毒生産への環境因子の作用機構解明は急務であるが、その作用点や機構については依然として不明な点が多い。渦鞭毛藻は無機態窒素を利用して生育可能であることから安定同位体 ^{15}N を窒素源として含む培地で培養し、経時的な ^{15}N 取り込みを追跡することが機構解明に有用であると考えた。そこで本研究ではすでに生合成中間体が検出されている *Alexandrium catenella* での麻痺性貝毒生合成前駆体や中間体及び最終産物である麻痺性貝毒の ^{15}N 取り込み挙動を解析することを目的とした。さらに渦鞭毛藻の有毒種及び無毒種の生合成中間体量を測定し、本手法の応用可能性を調べた。

【方法及び結果】渦鞭毛藻 *A. catenella* 有毒株を ^{15}N 硝酸ナトリウムのみを窒素源として含む T_1 改変培地で培養し、経時的に細胞を収穫した。細胞抽出液を HILIC 固相抽出に供し、溶出液をカラムスイッチング HILIC-MS 改良法で分析した[1)]。麻痺性貝毒前駆体（アルギニン）、生合成中間体（Int-A', Int-C'2, 11-hydroxy-Int-C'2, Int-E'）、シャント化合物（Cyclic-C'）[2)]及び主要麻痺性貝毒成分 4 種の ^{15}N が取り込まれた isotopomer について extracted ion chromatogram のピーク面積から定量した。中間体の中には蓄積量及び isotopomer 分布が著しく異なる化合物があり、ターンオーバー速度に違いがあることが示唆された。統計学的解析により各化合物には ^{15}N 取り込み率の異なる集団が異なる割合で存在すると予想された。渦鞭毛藻有毒種及び無毒種の細胞抽出液における生合成中間体を分析したところ、*Alexandrium* 属以外の有毒渦鞭毛藻（*Gymnodinium catenatum*）からも検出され、無毒種からは検出されなかったことから生合成中間体は有毒種に特異的な化合物であることが示唆され、本手法は渦鞭毛藻におけるサキシトキシン生合成研究に広く応用可能であると考えられた。

1) Y. Cho, S. Tsuchiya, R. Yoshioka, T. Omura, K. Konoki, Y. Oshima, M. Yotsu-Yamashita, *J. Chromatogr. A,* 1474, 109-120 (2016).
2) S. Tsuchiya, Y. Cho, R. Yoshioka, K. Konoki, K. Nagasawa, Y. Oshima, and M. Yotsu-Yamashita, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 56, 5327–5331 (2017).

saxitoxin, biosynthesis, paralytic shellfish toxins

発表責任者：長　由扶子（yuko.cho.a4@tohoku.ac.jp）

講演番号：3D2a07
講演日時：3 月 26 日 10:16～ 1 号館 D2 会場

タンパク質膜挿入に関与する糖脂質酵素 MPIase の生合成中間体の生成機構
Mechanisms underlying biosynthesis of a glycolipozyme MPIase, involved in membrane protein integration

○亀本 有生[1]、川上 真由[2]、船場 菜々香[2]、藤川 紘樹[3]、島本 啓子[3]、西山 賢一[1,2] ([1]岩手大大学院 総合科学研究科 農学専攻、[2]岩手大 農学部、[3]サントリー生命科学財団 生物有機科学研究所)
○ Yuki KAMEMOTO[1], Mayu KAWAKAMI[2], Nanaka Funaba[2], Kohki FUJIKAWA[3], Keiko SHIMAMOTO[3], Ken-ichi NISHIYAMA[1,2] ([1]Graduate School of Agriculture, Iwate Univ., [2]Faculty of Agriculture, Iwate Univ., [3]Bioorganic Research Institute, Suntory Foundation for Life Sciences)

すべての生物の生体膜には膜タンパク質が存在し、生命機能に必須の役割を担っている。モデル生物大腸菌においては、膜タンパク質を細胞質膜内に局在化する際、SecYEG や YidC などのタンパク質性因子の他に MPIase (Membrane Protein Integrase) と命名された糖脂質が必須であることが明らかとなっている。我々はこれまでに、MPIase 生合成酵素の 1 つとして CdsA を同定した。CdsA は大腸菌の脂質生合成において、すべてのリン脂質生合成の前駆体となる CDP ジアシルグリセロール (CDP-DAG) の生合成酵素として知られている。それに対し、MPIase 生合成においては CdsA がどのように関与するかは未知であった。本研究では MPIase の中間体生成過程に焦点を当て、MPIase 第 1 中間体 (compound I と呼称) 生合成時における CdsA の機能および compound I の生合成基質を解明した。

MPIase 生合成の第 1 段階は、CdsA により、フォスファチジン酸 (PA) にリン酸を介して GlcNAc が付加した形の compound I が生成する反応であると予想し、この反応が実際に起こるかを検証した。その結果、PA、CTP、GlcNAc-1P に、大腸菌から調製した内膜反転膜小胞 (INV) を混合し反応させた条件において、compound I の生成が認められた。一方、他の GlcNAc 供与体で反応をおこなったときや、CDP-DAG と GlcNAc 供与体を反応させたときには compound I は生成されなかった。このことから、PA、CTP および GlcNAc-1P からなる compound I の生合成経路が大腸菌に存在することが明らかになった。また、経時的に反応生成物量を観察した結果、CDP-DAG が生合成された後に compound I が生合成されていく様子が見られた。したがって、compound I は、PA と CTP から CDP-DAG が生合成された直後に、CdsA 上で GlcNAc-1P が付加するという 2 ステップの反応によって生合成されることが強く示唆された。中間体である compound I の生成は極めて微量であるが、オートラジオグラフィーでの検出に加え、LC-MS/MS による定量的な検出にも成功した。

INV での結果に対し、*in vitro* 合成した CdsA のみでは、PA、CTP、GlcNAc-1P を反応系に加えても compound I の産生は検出されなかった。このことから、GlcNAc-1P を CdsA に取り込むはたらきをもつ何らかの補助的な因子が必要であることが考えられる。内膜画分よりこの因子の精製を進めたところ、SDS-PAGE 時に約 5～10 kDa のシングルバンドを得ることができた。現在、当該因子の同定を進めている。

MPIase, CDP-diacylglycerol synthase, membrane protein integration

発表責任者：亀本有生（g0418014@iwate-u.ac.jp）

講演番号：3D2a08
講演日時：3 月 26 日 10:27～ 1 号館 D2 会場

大腸がんリスク因子物質コリバクチン関連化合物の特定

Identification of new compound related to colibactin exhibiting a risk factor of colorectal cancer

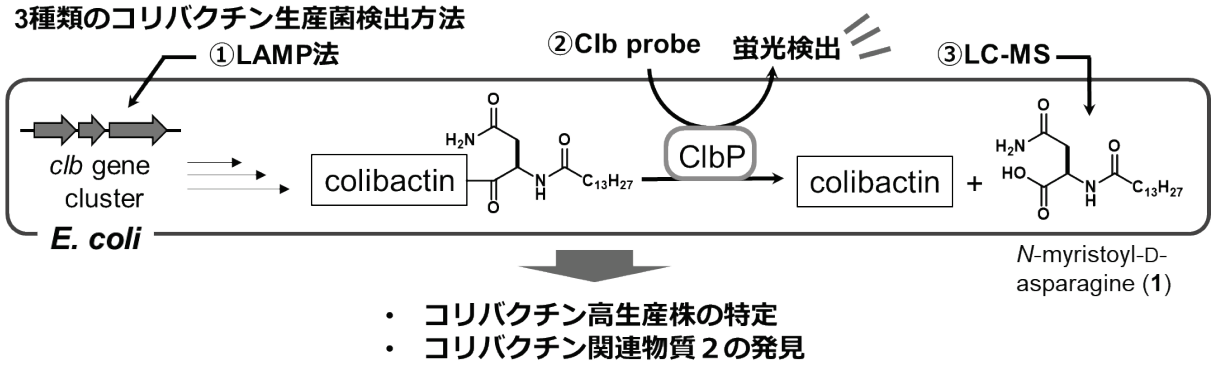
○平山 裕一郎、玉舟 亮太、恒松 雄太、渡辺 賢二 (静岡県大薬)
○Yuichiro HIRAYAMA, Ryota Tamafune, Yuta Tsunematsu, Kenji Watanabe (Dept. Pharm. Sci., Univ. Shizuoka)

【目的】2006 年に腸内細菌叢を構成する一群の大腸菌が産生している「コリバクチン」が強い変異原性を有していることが報告され [1]、この物質が大腸がんのリスク要因として有用なマーカーになるのではないかと期待されている。ところが、現在においてもコリバクチンそのものは検出すらできておらず、その分子式や化学構造は未解明である。このことがコリバクチンの詳細な発がんメカニズムの解明や発がん予防法の確立を困難にしている。そこで本研究では、未だ検出すら困難なコリバクチンの検出と特定に取り組んだ。

【方法・結果】コリバクチンの生合成酵素を特異的に認識して蛍光を発する分子プローブや、簡便な処理で遺伝子を検出出来る Loop-Mediated Isothermal Amplification(LAMP)法での検出方法を確立し、これらを用いて大腸がん患者由来の組織から、多数のコリバクチン生産菌を見出した。さらにこれらの株から、コリバクチンと対になって生産されると考えられている *N*-myristoyl-D-asparagine (**1**)を LC-MS で定量的に検出し、**1** を高生産する株を見出すことに成功した。このコリバクチン高生産株とその生合成遺伝子破壊株の生産物を差異解析した結果、コリバクチン生産菌にのみ特異的に生産される化合物 **2** を見出すことに成功した。

【考察】見出した化合物 **2** はコリバクチンの生合成に必須な遺伝子の破壊株では全く検出されず、安定同位体標識したアミノ酸の取り込み実験から既知のコリバクチン中間体と同様のアミノ酸組成をしていることが強く示唆されたため、コリバクチン関連化合物であると考えている。コリバクチン生産菌の野生株からコリバクチンに由来する化合物が得られたのは、これが初めての例である。

[1] Nougayrède, J.-P. et al. *Science*, 2006, *313*, 848-851.

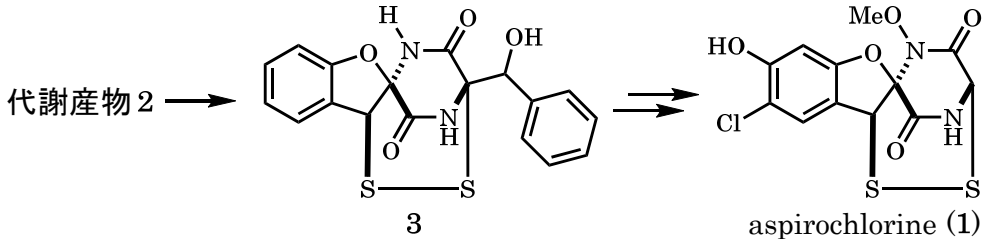


colibactin, loop-mediated isothermal amplification, fluorescent probe

講演番号：3D2a09
講演日時：3 月 26 日 10:38～ 1 号館 D2 会場

Aspirochlorine 生合成経路におけるスピロ環形成を担う新規酵素の発見と機能解析
Discovery of an unprecedented enzyme responsible for the formation of the spiro-ring in aspirochlorine biosynthesis
○前田 直哉[1]、恒松 雄太[1]、Christian Hertweck[2]、渡辺 賢二[1] ([1]静岡県大薬、[2]Leibniz Institute (HKI))
○Naoya MAEDA[1], Yuta TSUNEMATSU[1], Christian Hertweck[2], Kenji WATANABE[1] ([1]Univ. of Shizuoka, [2]Leibniz Institute (HKI))

【目的】醤油や日本酒の製造に用いられる麹菌 *Aspergillus oryzae* は日本の食文化において欠かすことのできない有用微生物の一つである。*A. oryzae* によって生合成される二次代謝産物の一つとして aspirochlorine が挙げられる。Aspirochlorine は抗真菌活性を有しており、その活性には epidithiodiketopiperazine(ETP)骨格が寄与すると考えられている。また、アスペルギルス症発症との関連が示唆されている gliotoxin と構造が類似していることから、aspirochlorine 及びその生合成中間体の生物活性・安全性の評価を行うことは重要である。ところで、aspirochlorine は他の ETP 骨格を有する化合物とは異なり、スピロ炭素を有するビシクロ[3.2.2]環により ETP 骨格が形成されている。しかしながら、そのユニークな ETP 骨格が生合成経路中においてどのような機構で形成されているかは未解明であった。本研究では、遺伝子操作によってスピロ環形成を担う酵素遺伝子の探索及び同定すること、加えて酵素反応の詳細な機構解明を目指した。
【方法・結果】Aspirochlorine 生合成遺伝子クラスターに含まれる機能未知遺伝子に対し、相同組み換えによる遺伝子破壊を行った。得られた遺伝子破壊株の代謝産物を解析し、スピロ環を持たない生合成中間体を探索したところ、チオレドキシン様酸化還元酵素とアノテーションされる *aclR* の遺伝子破壊株において、aspirochlorine の生産の消失と新たな代謝産物 **2** の蓄積が確認された。そこで、代謝産物 **2** の構造決定を試みた。20 L の培地にて *aclR* 破壊株を 3 日間培養後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー及び HPLC を用いて精製し、NMR による構造解析を行うことで実際に代謝産物 **2** がスピロ環を有さない新規化合物であると決定した。一方、*A. oryzae* より抽出した RNA をもとに cDNA を作製し *aclR* 遺伝子のクローニングを行った後、大腸菌を用いてリコンビナント酵素を獲得した。得られた酵素と単離した **2** を用いて *in vitro* における酵素活性を測定したところ、AclR 酵素依存的にスピロ環を持つ既知生合成中間体 **3**[1] の生成が確認された。



1. Y. Tsunematsu, *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 14051-14054.

Aspergillus oryzae, biosynthesis, spiro-ring

講演番号：3D2a10
講演日時：3 月 26 日 10:49～ 1 号館 D2 会場

放線菌由来 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid 合成酵素の同定および酵素学的諸性質
Identification and characterization of bacterial 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase
○茅根 千湖[1]、橋本 絢子[2]、小曽根 郁子[2]、新家 一男[3]、濱野 吉十[1]、丸山 千登勢[1]([1]福井県大院・生物資源、[2]JBIC、[3]産総研)
○Yukiko CHINONE[1], Junko HASHIMOTO[2], Ikuko KOZONE[2], Kazuo SHIN-YA[3], Yoshimitsu HAMANO[1], Chitose MARUYAMA[1] ([1]Fukui Pref. Univ., [2]JBIC, [3]AIST)

【目的】放線菌によって生産される Q6402 は、Thr、Phe、Glu、hydroxy-Trp、hydroxy-phenylglycine、2-methyl-1-aminocyclopropanecarboxylic acid（methyl-ACC）の 6 残基のアミノ酸からなる環状オリゴペプチド構造を有し、抗炎症作用を持つ生理活性物質である。本化合物は特徴的な methyl-ACC 構造を有しており、その生合成機構には大変興味が持たれた。ACC は植物ホルモンの 1 種である ethylene の生合成前駆体であり、*S*-adenosylmethionine（SAM）から PLP 依存型 ACC synthase の触媒によって生合成される[1]。また大腸菌が生産する colibactin 生合成においても、ACC が SAM を基質として非リボソーム型ペプチド合成酵素の関与によって生合成されることが報告されている[2]。しかしこれらに相同性を示す酵素遺伝子は Q6402 生合成遺伝子群には存在せず、新規 ACC 合成酵素遺伝子の存在が予想された。そこで本研究では、Q6402 生合成に関わる遺伝子群の機能解析による生合成経路の解明を目的とした。
【方法と結果】Q6402 異種発現菌の[1-^{13}C]-L-methionine 及び[methyl-^{13}C]-L-methionine の添加培養の結果から、methyl-ACC 骨格は methionine あるいは SAM 由来の炭素骨格を有することが示唆された。そこで、PLP や SAM の結合ドメインを有する酵素遺伝子を探索したところ、B12 結合型 radical SAM 酵素に相同性を示す *orf2399* および PLP 依存型 aminotransferase に相同性を示す *orf2400* が見出された。実際に *orf2400* の組換え酵素を用いて *in vitro* にて酵素反応を行い、酵素反応液を LC-MS にて分析した結果、SAM を基質にした場合で PLP 依存的に ACC の生成が確認された。本酵素は植物由来 ACC synthase と同様の反応を触媒することが明らかとなったが、一次配列の相同性は極めて低く、バクテリアにおいては前例がない。したがって、本酵素はバクテリア由来 ACC synthase として初めて同定された。そこで、酵素学的諸性質を明らかにしたところ、本酵素は 2 量体を形成し、至適条件はリン酸緩衝液、pH 9、30 °C であり、比活性は 4.3±0.6 mU/mg と算出された。また、2 価金属イオンの要求性は確認されなかった。今回の発表ではその詳細に加えて、methyl 化を触媒すると予想される *orf2399* についても報告する。
【文献】
1. Ramalingam, K., *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 82, 7820-7824. (1985).
2. Zha, L. *et al., Nat. Chem. Biol.,* 13, 1063-1065 (2017).

cyclopropane, *S*-adenosylmethionine, biosynthesis

発表責任者：丸山千登勢（c-maruyama@fpu.ac.jp）

講演番号：3D2a11
講演日時：3 月 26 日 11:10～ 1 号館 D2 会場

Saprolmycin の生合成に関わる糖転移酵素遺伝子 *sprGT* の機能解析

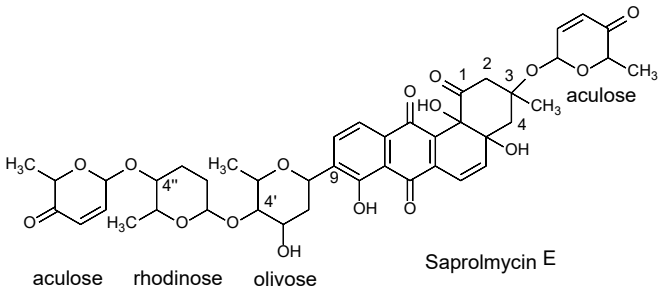
Functional analysis of glycosyltransferase gene *sprGT* involved in biosynthesis of saprolmycin

○川崎 崇[1,3]、佐藤 美怜[2]、今村 信孝[2]、矢崎 一史[1]([1]京大・生存研、[2]立命館大・薬、[3]立命館大・総研)
○Takashi Kawasaki[1,3], Misato Satou[2], Nobutaka Imamura[2], Kazufumi Yazaki[1] ([1]Research Institute for Sustainable Humanosphere, Kyoto Univ, [2]Col. Pharm. Sci, Ritsumeikan Univ, [3]Research Organization of Science and Technology, Ritsumeikan Univ)

［目的］*Streptomyces* sp.TK08046 株が産生する saprolmycin A～E はミズカビ病の起因生物である *Saprolegnia parasitica* へ活性を示すアングサイクリン系抗生物質である。特に saprolmycin A および E は、ミズカビに対して特異的に作用する。この特異的な作用に関しては、saprolmycin 類の構造活性相関から希少糖であるアキュロースが 2 つ必要なことが示唆されている[1]。そこで、本研究では saprolmycin 生合成においてアキュロースの糖転移に関与する遺伝子を特定し、その機能を明らかにすることを目的とした。

［方法・結果］糖転移酵素と相同性を示す *sprGT1*, *sprGT2*, *sprGT3* の遺伝子破壊を行うために、saprolmycin 生合成クラスターを保持する *Streptomyces lividans* TK23 形質転換体へ各領域の破壊用プラスミドを導入し、各遺伝子破壊株を取得した。その後、遺伝子破壊株の培養を行い、培養液の酢酸エチル抽出物の HPLC および ESI-MS での分析を行った結果、各破壊株では HPLC 分析において saprolmycin A, C, E のピークが消失した。また、蓄積された代謝物と考えられるピークが *sprGT1* 破壊株で 3 つ、*sprGT2* 破壊株で 2 つ、*sprGT3* 破壊株では 1 つ確認された。それぞれのピークは、ESI-MS 分析より *sprGT1* 破壊株代謝物の分子量は、600、596 および 596 で、*sprGT2* 破壊株代謝物の分子量は、486 および 470 であることが推定され、*sprGT3* 破壊株代謝物の分子量が 356 と推定された。分子量と極大吸収波長をもとにデータベースでの検索を行った結果、*sprGT1* 破壊株代謝物の一つはデオキシ糖が二つ結合した saquayamycin A1 であることが考えられた。また、*sprGT2* 破壊株代謝物は、デオキシ糖が一つ結合した aquayamycin および 3’-deoxy-aquayamycin であり、*sprGT3* 破壊株代謝物は、saprolmycin のアグリコンであることが考えられた。

上記の結果から、*sprGT1* は、3 位および 4”位の水酸基にデオキシ糖を転移することが考えられ、*sprGT1* がアキュロースの転移に関与することが示唆された。現在、各遺伝子破壊株が蓄積する代謝産物の単離と精製を行い、精製できた化合物については構造決定を試みている。



文献 [1] Nakagawa K., et al. *J. Antibiot*. 65, 599–607 (2012).

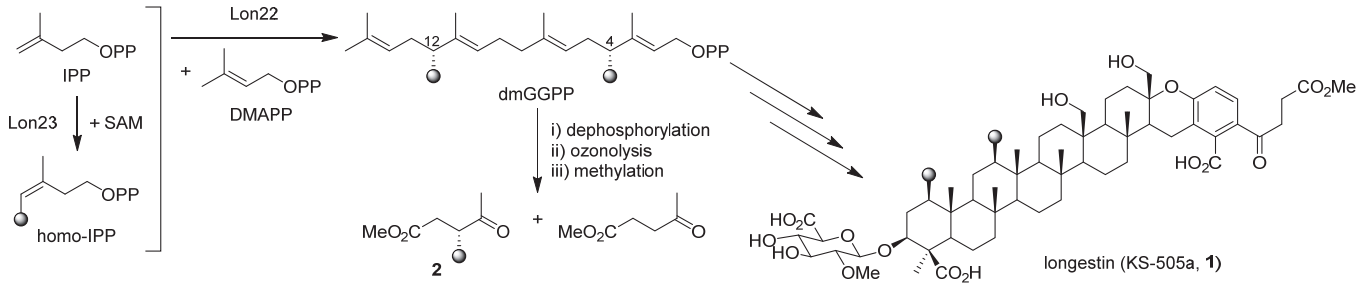
saprolmycin, glycosyltransferase, anti-*Saprolegnia parasitica* activity

講演番号：3D2a12
講演日時：3 月 26 日 11:21～ 1 号館 D2 会場

ロンゲスチン生合成における特異なメチル基導入機構の解明
Studies on the biosynthesis of a skipped methyl-substituted polyprenyl chain of longestin (KS-505a)

○尾崎 太郎[1]、シンデ サンディップ[1]、高 磊[1]、奥泉 諒[1]、劉 成偉[1]、小笠原 泰志[2]、大利 徹[2]、南 篤志[1]、及川 英秋[1] ([1]北大院理、[2]北大院工)
○Taro OZAKI[1], Sandip S. Shinde[1], Lei Gao[1], Ryo Okuizumi[1], Chengwei Liu[1], Yasushi Ogasawara[2], Tohru Dairi[2], Atsushi Minami[1], Hideaki Oikawa[1] ([1]Fac. Sci., Hokkaido Univ., [2]Fac. Eng., Hokkaido Univ.)

【目的】ロンゲスチン (KS-505a, **1**) は放線菌 *Streptomyces argenteolus* の二次代謝産物であり、ホスホジエステラーゼの阻害剤として知られている。**1** は放線菌由来で初めてのテトラテルペノイドであり、ポリプレニル鎖がメチル化されたと予想される他のテルペノイドに例を見ない構造上の特徴を示す。これまでに標識化合物の取り込み実験によってメチル基がメチオニンに由来することが報告されているが、メチル基が導入されるタイミングについては明らかにされていなかった。本研究では、この特異なメチル基の導入機構の解明を目的として研究を行った。
【方法・結果】**1** の生合成遺伝子クラスターにコードされるメチル基転移酵素 Lon23 及びプレニル基転移酵素 Lon22 がメチル基の導入に関与すると推測し、それぞれの組換えタンパク質を調製した。初めに Lon23 をイソペンテニル二リン酸 (IPP) のメチル化反応に供したところ、期待通りメチル化反応が進行した。標品との比較により生成物が(3*Z*)-3-methyl IPP (homo-IPP) であることを明らかにした。続いてジメチルアリル二リン酸 (DMAPP) を開始基質、IPP と homo-IPP を伸長基質として Lon22 によるプレニル化反応を行い、本酵素がジメチルゲラニルゲラニル二リン酸 (dmGGPP) を生成することを明らかにした。2 つのメチル基の立体化学は、生成物をオゾン分解、メチル化によりメチルエステル **2** へ変換し、キラル GC-MS で標品と比較することで(*4R*, *12R*)であると決定した。立体化学が一致することから、dmGGPP は **1** の生合成前駆体だと考えられる。
【考察】本研究により、テルペノイドの普遍的な前駆体である IPP のメチル化及び homo-IPP を伸長基質とするプレニル化反応を初めて明らかにした。このような homo-IPP を位置・立体選択的に取り込むプレニル化反応は、アリの道標フェロモン等の生合成にも関与すると考えられる。そのため今回の知見は、それらの生物活性天然物の生合成経路解明の一助になると期待される。



Ozaki, T., Shinde, S. S. *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 6629–6632.

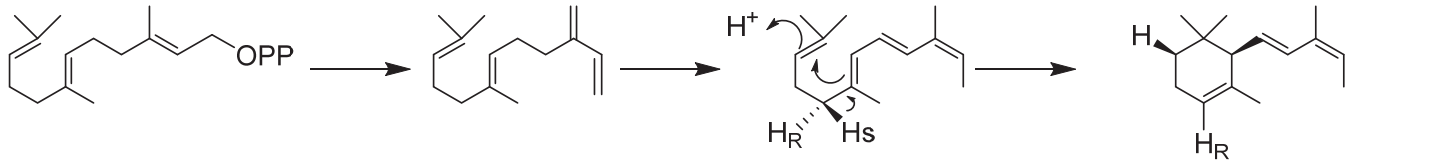
terpenoid, prenyltransferase, Streptomyces

発表責任者：及川英秋（hoik@sci.hokudai.ac.jp）

講演番号：3D2a13
講演日時：3 月 26 日 11:32～ 1 号館 D2 会場

植物ホルモン Abscisic Acid の生合成における新規環化酵素の機能解析-1-
Functional analysis of sesquiterpene synthase in the biosynthesis of ABA -1-
○瀧野 純矢、小崎 拓登、佐藤 芳郎、劉 成偉、尾崎 太郎、南 篤志、及川 英秋（北大院理）
○Junya TAKINO, Takuto KOZAKI, Yoshiro SATO, Chengwei LIU, Taro OZAKI, Atsushi MINAMI, Hideaki OIKAWA (Fac. Sci., Hokkaido Univ.)

【目的・背景】植物の乾燥などに対するストレス応答に関わる重要な植物ホルモンであるアブシジン酸（ABA）は、植物に加え、灰色かび病菌 *Botrytis cinerea* などの糸状菌からも生産される。同位体標識前駆体の取り込み実験などから、糸状菌では、①炭素数 15 のファルネシル二リン酸（FPP, **1**）の直接環化によるα-ionylideneethane（**2**）の生成、②酸化修飾反応によって ABA が生合成されると考えられていた[1)2)]。また、2006 年には生合成遺伝子クラスター（*aba*）も発見され、遺伝子破壊実験などから、酸化酵素である BcABA1,2,4 が酸化修飾に関わることが示唆された[3)]。しかしながら、生合成において鍵となる環化酵素遺伝子は明らかにされていなかった。今回我々は、クラスターに存在する機能未知遺伝子 *bcABA3* が **2** の生成に関わる環化酵素であることを同定し、*in vitro* 実験と *in vivo* 実験からその環化機構を解明したので、その詳細を報告する。
【方法・結果】はじめに、データベースに登録されていた 2 種の配列（BcABA3-S、BcABA3-L）を麹菌で異種発現した。各形質転換体が生産した揮発性化合物を GC-MS で分析したところ、BcABA3-L 導入株で **2** の生産を確認した。次いで、13 種の重水素標識 FPP などを用いた *in vitro* の実験で **2** の標識パターンを詳細に調べることで、β-farnesene（**3**）と allofarnesene（**4**）を経由した環化機構を推定した。炭化水素を中間体とする環化機構の実験的な検証は困難であると考えられていたが、FPP 生合成の阻害剤 fosmidomycin を用いた *in vivo* 実験系を新たに確立することで、**3** や **4** から **2** への変換を確認した。以上より、BcABA3 は 1）**1** の脱リン酸化による **3** の形成、2）**3** から **4** への異性化、3）**4** から **2** への環化という 3 段階の環化反応を触媒する極めて稀な酵素であることを明らかにした[4)]。本酵素は、機能既知テルペン環化酵素に保存されているモチーフをもたない新奇テルペン環化酵素である。



FPP (**1**) β-farnesene (**3**) allofarnesene (**4**) α-ionylideneethane (**2**)

参考文献
1) *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **2000**, *64*, 1448-1458. 2) *Phytochemistry* **2004**, *65*, 2667-2678.
3) *Appl. Environ. Microbiol*. **2006**, *72*, 4619-4626. 4) *J. Am. Chem. Soc.* **2018,** *140*, 12392−12395.

Abscisic acid, terpene synthase, cyclization mechanism

講演番号：3D2a14
講演日時：3 月 26 日 11:43～ 1 号館 D2 会場

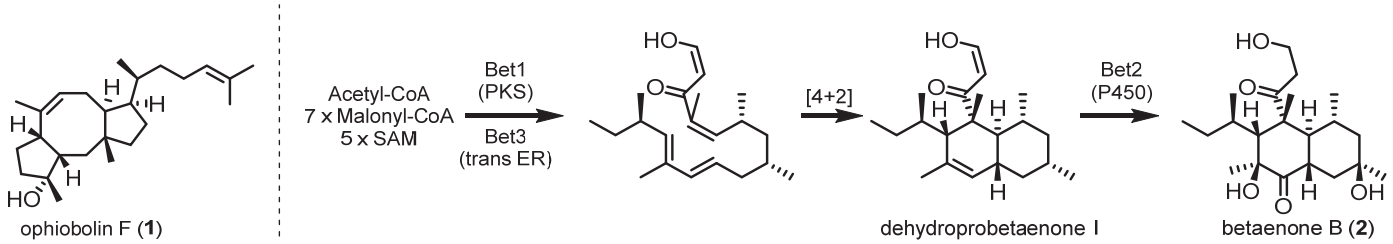
ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 を用いた糸状菌天然物の異種生産 (2)
Heterologous production of fungal natural products by using genome editing technology CRISPR/Cas9 (2)

○曽ケ端 花帆[1]、尾崎 太郎[1]、劉 成偉[1]、丸山 潤一[2]、南 篤志[1]、及川 英秋[1] ([1]北大院理、[2]東大院農)
○Kaho SOGAHATA[1], Taro OZAKI[1], Chengwei LIU[1], Jun-ichi MARUYAMA[2], Atsushi MINAMI[1], Hideaki OIKAWA[1] ([1]Fac. Sci., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo)

【目的】麹菌 *Aspergillus oryzae* は、糸状菌に由来する天然有機化合物の異種生産に有用な宿主である。これまでに我々は、テルペノイドである ophiobolin F (**1**) やポリケチドである betaenone B (**2**) 等、様々な糸状菌由来天然物の異種生産に成功してきた。一方で、サイズの大きい遺伝子や複数の遺伝子を導入する際には、望む酵素活性を有する形質転換体の選別に多大な労力と時間を要してきた。これは非相同末端結合により麹菌のゲノム上のランダムな位置に標的遺伝子が導入されることに一因がある。昨年度の本大会では、ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 を利用することで、高い効率 (50–70%) で目的の形質転換体が得られることを報告した (佐藤ら、日本農芸化学会 2018 年度大会一般講演) 。今回はこれまでの知見をもとに、より汎用的な異種生産法の確立を目指し研究を行った。

【方法・結果】これまでに構築した形質転換体のうち特に高い生産量 (153 mg kg^{-1}) を与えた **2** を生産する形質転換体 (AO-*bet1*/*3*/*2*)のゲノム解析を行い、6 か所の生合成遺伝子挿入部位を見出した。本研究ではこのうち、8 番染色体上に見出した遺伝子間領域を対象として、相同組換えによるこの部位への生合成遺伝子導入及び機能発現の効率を評価した。

はじめに、上記の挿入部位を標的とするための single guide RNA を fusion PCR により調製し、丸山らが構築したゲノム編集用プラスミド ppAsACas9 へ In-Fusion 法を用いて導入した。また、挿入部位の上流・下流 1 kb、及び **1** の生合成遺伝子を PCR により増幅し、ギブソンアッセンブリーを用いて pUC19 ベクターへ連結した。これをドナープラスミドとして麹菌 NSAR1 株のゲノム編集を行った結果、得られた形質転換体の約 7 割が好収量で **1** を生産した。さらに非相同組換えが不活性化した NSPlD1 株を宿主として同様の実験を行った結果、全ての形質転換体が **1** を生産した。生産が確認できた株についてシーケンス解析を行い、標的部位で相同組換えが起きたことも確認した。原理的には他の挿入部位でも同様の遺伝子導入が可能だと考えられ、マーカーリサイクリング等と組み合わせることで効率的な多重遺伝子導入も可能になると期待される。



genome editing technology, natural products, heterologous expression

発表責任者：及川　英秋（hoik@sci.hokudai.ac.jp）

講演番号：3D2a15
講演日時：3 月 26 日 11:54～ 1 号館 D2 会場

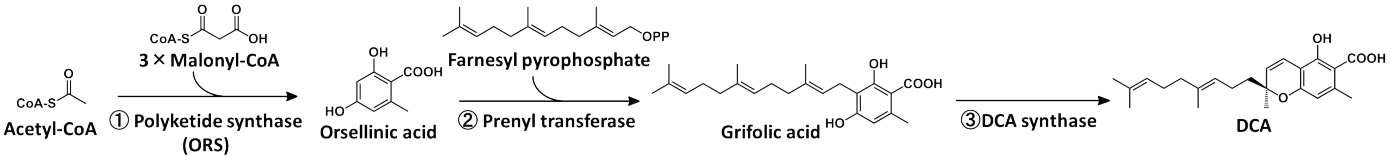
抗 HIV 天然物ダウリクロメン酸生産系の開発に向けた基礎研究

The basic research for the development of anti-HIV natural product daurichromenic acid production system

○飯島 未宇、黒崎 文也、田浦 太志（富山大院薬）
○Miu IIJIMA, Fumiya KUROSAKI, Futoshi TAURA (Toyama Univ. of Pharmaceutical sciences)

【背景・目的】 エゾムラサキツツジ（*Rhododendron dauricum*）が生産するダウリクロメン酸（DCA）は強力な抗 HIV 活性を示すことから医薬資源として注目されるメロテルペノイドである。下図のように DCA の生合成経路はポリケタイド合成、プレニル化、及び酸化閉環の 3 ステップで構成される。我々はエゾムラサキツツジのトランスクリプトーム解析を基盤とした手法を採用し、これまでに本生合成経路の①ポリケタイド合成酵素の ORS[1)]、②プレニル転移酵素の RdPT1[2)]、③酸化閉環酵素（DCA synthase[3)]）の全遺伝子クローニングに成功した。なお ORS はアセチル CoA をスターターとしてテトラケタイド CoA を生成する酵素であり、オルセリン酸生合成には環化酵素の共存を必要とすること、及び大麻由来の olivetolic acid cyclase（OAC）を加えることで第一生成物であるオルセリン酸の生成が可能であることも確認している[1)]。

本研究では DCA の生合成経路を酵母（*Pichia pastoris*）に再構築することにより、新たな生物生産システムを確立することを目的とする。



【方法・結果】 まず初めに *ORS* のみを酵母ゲノムにインテグレーションしたところ、オルセリン酸の生成は微量であり、脱炭酸体のオルシノールが主生成物として得られることを確認した。オルシノールは ORS により生成したテトラケタイド CoA の非酵素的な閉環産物と考えられた[1)]。そこで *ORS* が導入された酵母株に大麻由来の *OAC* を導入したところ、オルセリン酸の生産を >100 mg/L レベルで達成した。今後は基質供給経路の発現制御を行うことで各生合成酵素が利用可能な基質量を増大させ、第二生成物であるグリフォリン酸、さらに最終産物である DCA の酵母での生産に向けて検討していく予定である。

【引用文献】

1) F. Taura et al., *Front Plant Sci* 7: 1452 (2016)
2) H. Saeki et al., *Plant Physiol* 178: 535–551 (2018)
3) M. Iijima et al., *Plant Physiol* 174: 2213–2230 (2017)

anti-HIV, biosynthesis, synthetic biology

発表責任者：田浦　太志（taura@pha.u-toyama.ac.jp）

講演番号：3D2p01
講演日時：3 月 26 日 13:50～ 1 号館 D2 会場

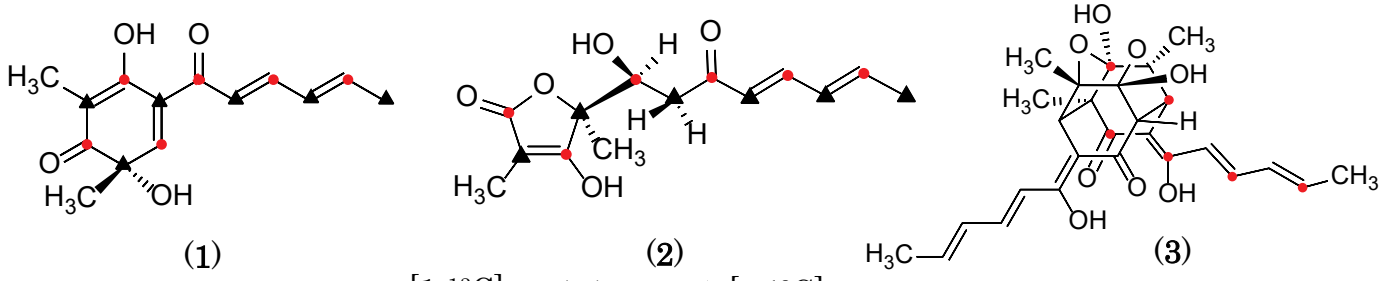
Trichoderma sp. USF-2690 株が産生する sorbicillinoid 類の生合成研究
Biosynthesis of sorbicillinoids produced by *Trichoderma* sp. USF-2690

○國方 真希[1]、寺島 健仁[2]、豊田 彩美[3]、菅谷 紘一[3]、小野瀬 淳一[3]、阿部 尚樹[1,2,3]（[1]東農大院・健康、[2]東農大院・食品栄養、[3]東農大・応生・健康）
○Maki KUNIKATA[1], Takehito TERAJIMA[2], Ayami TOYODA[3], Kouichi SUGAYA[3], Junichi ONOSE[3], Naoki ABE[1,2,3] ([1]Dept. of Nutri. Sci. & Food Safety, Grad. Sch. of Agric., Tokyo Univ. of Agric., [2]Dept. of Food & Nutri. Sci., Grad. Sch. of Agric., Tokyo Univ. of Agric., [3]Dept. of Nutri. Sci. & Food Safety, Faculty of Applied Bio-Sci., Tokyo Univ. of Agric.)

【目的】Sorbicillinoid 類は、多彩な炭素骨格を有し、特異な生物活性を有するポリケチド化合物の一群である。我々の研究室でもこれまでに糸状菌 *Trichoderma* sp. USF-2690 株が産生する新規化合物を含む 13 種の sorbicillinoid 類を単離し、その生理活性を評価してきた。さらに、^{13}C 取り込み実験により、sorbicillinoid 類の多くは鍵中間体化合物である sorbicillinol（**1**）が起点となり生合成されることも明らかにしてきた。一方、5-epihydroxyvertinolide（**2**）及び trichodimerol の methyl 基が一つ欠損した demethyltrichodimerol（**3**）などについては **1** との生合成的関係性は明らかになっていない。そこで本研究では **1** に安定同位体 ^{13}C を取り込ませた ^{13}C ラベル sorbicillinol を培地中に添加する取り込み実験により、**1** とこれらの生合成的関係性を明らかにすることを目的とした。

【方法】[1-^{13}C] 、[2-^{13}C]酢酸ナトリウムをそれぞれ添加した USF-2690 株の培養液より、^{13}C ラベル sorbicillinol アイソトポマーを調製し、それらを別途培養した USF-2690 株培養液中に各々添加した。数日間培養後、得られたそれぞれの培養液を有機溶媒にて抽出し、各種カラムクロマトグラフィーを用いて、**2** 及び **3** を単離、^{13}C-NMR スペクトルを測定することにより、^{13}C の取り込みを確認した。

【結果】^{13}C の取り込み実験の結果より、**2** においては図に示した位置への ^{13}C の取り込みが確認されたことから、**1** が前駆体となって生合成されることが明らかとなった。一方、**3** に関しては、methyl 基の欠損が見られないユニットにおいてのみ ^{13}C の取り込みが確認されたことから、2 分子の **1** によって構成される trichodimerol とは異なり、**3** は **1** の 1 個のメチル基が欠損した未知化合物と **1** とが反応して産生する可能性が強く示唆された。現在、**2** では[1,2-^{13}C]酢酸ナトリウム、**3** においては[2-^{13}C]及び[1,2-^{13}C]酢酸ナトリウムを用いた取り込み実験の実施を検討している。



(1) (2) (3)

● [1-^{13}C] acetate ▲ [2-^{13}C] acetate

polyketide biosynthesis, sorbicillinoids, *Trichoderma* sp. USF-2690

発表責任者：阿部尚樹（abe@nodai.ac.jp）

講演番号：3D2p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ 1 号館 D2 会場

糸状菌 *Pleosporales* sp. RKB3564 の生産する pyrrolizilactone 生合成経路の解析

Analysis of the pyrrolizilactone biosynthesis pathway in *Pleosporales* sp. RKB3564

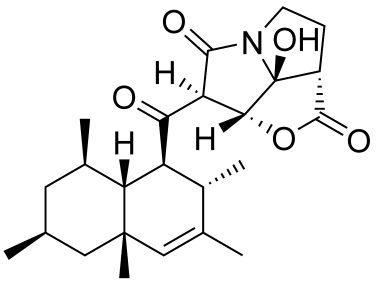
廣澤 早香[1,3]、○加藤 直樹[2]、野川 俊彦[1]、衣笠 清美[2]、高橋 俊二[2]、長田 裕之[1,3] ([1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー、[2]理研 CSRS・天然物生合成、[3]埼玉大院・理工)

Sayaka HIROSAWA[1,3], ○Naoki KATO[2], Toshihiko NOGAWA[1], Kiyomi KINUGASA[2], Shunji TAKAHASHI[2], Hiroyuki OSADA[1,3] ([1]Chem. Biol., RIKEN CSRS, [2]Nat. Prod. Biosynth., RIKEN CSRS, [3]Grad. Sch. Sci. Eng., Saitama Univ.)

糸状菌 *Pleosporales* sp. RKB3564 の生産する pyrrolizilactone（**1**）は、γ-ラクトンが縮合した三環性のピロリジジノンがカルボニル基を介して *cis*-デカリンと連結した非常にユニークな化学構造を有している。プロテアソームのトリプシン様活性に選択的な阻害活性を有しており、bortezomib や lactacystin といったキモトリプシン様活性に選択性を示す既存のプロテアソーム阻害剤とは作用機序が異なることが示唆されている。さらなる生物活性評価に向けた **1** の安定的高生産と構造多様化の実現には、生合成機構の解明が不可欠である。そこで本研究では、生産菌からの生合成遺伝子クラスターの同定と、アミノ酸基質である 3-メチルプロリン生合成経路の解明を目的とした。

1 の化学構造から、骨格構築をポリケチド合成酵素（PKS）－非リボソームペプチド合成酵素（NRPS）ハイブリッド酵素が担い、アミノ酸基質として、3-メチルプロリンが取り込まれると予想した。生産菌 *Pleosporales* sp. RKB3564 のドラフトゲノム解読を行ったところ、ゲノム中に 5 つの PKS-NRPS ハイブリッド酵素遺伝子が含まれていた。トランスクリプトーム解析を行い、**1** の生産条件でのみ高発現している PKS-NRPS ハイブリッド酵素遺伝子を見出した。周辺には、PKS-NRPS ハイブリッド酵素とともに骨格構築を担うエノイルレダクターゼとデカリン合成酵素、3-メチルプロリン生合成への関与が予想されるα-ケトグルタル酸（α-KG）依存性ジオキシゲナーゼをコードする遺伝子が存在しており、この遺伝子クラスターを候補として解析を進めることとした。

本遺伝子（*pzl*）クラスターの **1** 生合成への関与を検証するため、3-メチルプロリン生成を担うと予想した *pzlG* および *pzlF*（それぞれα-KG 依存性ジオキシゲナーゼ、および short-chain dehydrogenase/reductase をコード）の機能解析を行った。大腸菌発現系を用いた生物変換実験、ならびに組換え酵素を用いた *in vitro* 反応実験を行うことで、両酵素が L-イソロイシンから 3-メチルプロリンへの変換を担っていることを明らかにした。以上の結果より、3-メチルプロリン生合成への関与が明らかとなった *pzlF* と *pzlG* を含む、当該遺伝子クラスターが **1** の生合成を担っていることが強く示唆された。



pyrrolizilactone (**1**)

PKS-NRPS hybrid, filamentous fungi, 3-methylproline

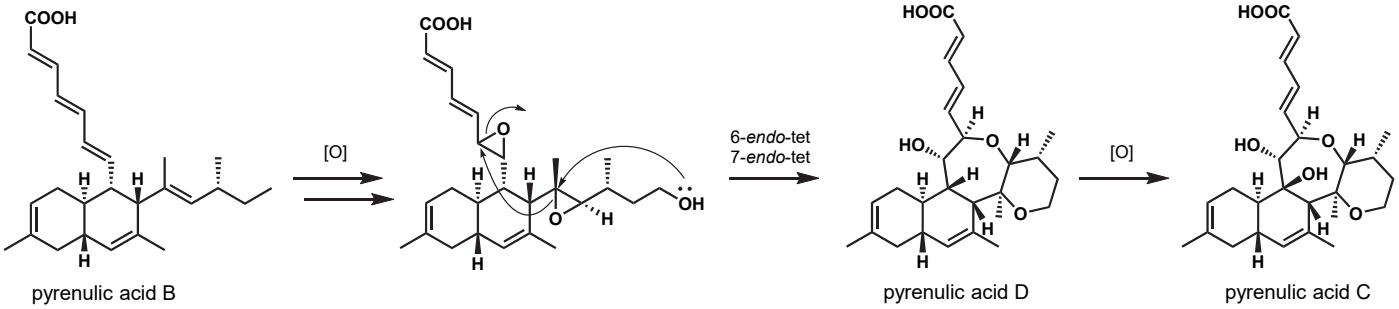
発表責任者：加藤　直樹（naoki-kato@riken.jp）

講演番号：3D2p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ 1 号館 D2 会場

共生型子嚢菌 *Pyrenula* sp.由来 pyrenulic acid 類の生合成研究
Biosynthetic study of pyrenulic acid
○佐藤 道大[1]、籠浦 倫美[1]、恒松 雄太[1]、竹仲 由希子[2]、棚橋 孝雄[2]、渡辺 賢二[1] ([1]静岡県大薬、[2]神戸薬大)
○ Michio SATO[1], Tomomi KAGOURA[1], Yuta TSUNEMATSU[1], Yukiko TAKENAKA[2], Takao TANAHASHI[2], Kenji WATANABE[1] ([1]University of Shizuoka, [2]Kobe Pharmaceutical University)

【目的】ベトナム産地衣類由来の子嚢菌 *Pyrenula* sp.から単離された pyrenulic acid 類は、DNA ポリメラーゼ阻害活性およびヒトがん細胞増殖阻害活性を示すポリケタイド化合物である[1]。Pyrenulic acid C および D は、6・7 員環エーテルという特徴的な構造を有しているが、このエーテル環構造はポリケタイド鎖のエポキシ化に続く *anti*-Boldwin 則に従った連続的な縮環により形成すると考えられている。このような連続的閉環反応は、子嚢菌の二次代謝産物においてはほとんど報告例がない。そこで、この炭素骨格構築機構の解明を目指し研究に着手した。
【結果】はじめに *Pyrenula* sp.のゲノムシーケンスを行い、本菌の全ゲノム情報を得た。ゲノムアノテーションを行ったところ､本菌のゲノム中には 60 個を超える二次代謝産物生合成遺伝子クラスターが存在しており、特にポリケタイド合成酵素 (PKS) は 40 個以上にも上ることが明らかとなった。Pyrenulic acid はその構造から、還元型 PKS により生合成されること、また炭素鎖末端がカルボン酸であることからチオエステラーゼドメインを有していることが予想された。そこで全 PKS 遺伝子の中から、還元 I 型 PKS およびチオエステラーゼドメインを有し、かつエポキシド生成に関わる酸化酵素を含む 13 のクラスターに絞った。さらに遺伝子発現解析の結果を用いて 13 のクラスター中から pyrenulic acid 生合成遺伝子クラスターを推定し、*pyp* クラスターとした。続いて *pyp* クラスターに存在する酸化酵素を用い、pyrenulic acid D を基質として *in vitro* 反応に供したところ、pyrenulic acid C への変換反応が確認された。このことから、*pyp* クラスターが pyrenulic acid 生合成遺伝子クラスターであることが示唆された。現在、エポキシ化およびアルキル鎖末端の水酸化に関わる酵素の同定を進めている。

1. Tanahashi, T., *et al. J. Nat. Prod.* **2014**, 77, 1404-1412.



Pyrenulic acid の推定生合成経路

biosynthesis, polyketide, fungi

講演番号：3D2p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ 1 号館 D2 会場

レギュレーター遺伝子改変法による *Coprinopsis* 属担子菌の新規天然物生合成経路活性化
Stimulating the biosynthetic pathway in *Copronopsis cinerea* by engineering of the regulatory gene

○高西 潤[1]、桝谷 貴洋[1]、中沢 威人[2]、恒松 雄太[1]、佐藤 道大[1]、渡辺 賢二[1] ([1]静岡県大薬、[2]京大院農)
○Jun TAKANISHI[1], Takahiro MASUYA[1], Takehito NAKAZAWA[2], Yuta TSUNEMATSU[1], Michio SATO[1], Kenji WATANABE[1] ([1]Dept. Pharm. Sci., Univ. of Shizuoka, [2]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【目的】キノコ(担子菌類)は他の生物種とは異なるユニークな二次代謝産物を生産することが知られている。しかし、キノコのゲノム情報が解読されるにつれ、既にキノコより単離されている二次代謝産物よりも多くの二次代謝産物生合成遺伝子がゲノム中に存在すると示唆されたため、多くの生合成遺伝子は休眠型であると考えられた。これら休眠型生合成遺伝子を強制的に発現させることで、構造新規な二次代謝産物の獲得が期待される。既にカビ(子嚢菌類)を用いた天然物研究において、生合成遺伝子の発現量を制御するレギュレーター遺伝子の過剰発現、破壊を行うことで特定の生合成経路を活性化させ、新規化合物の取得に成功しているが、キノコでは現在までにそのような研究例は報告されていない。そこで、本研究ではキノコのレギュレーター遺伝子改変に基づく生合成経路の活性化により新規化合物の獲得を目指した。
【方法】本研究では、キノコのモデル生物で遺伝子操作系が確立されているウシグソヒトヨタケ *Coprinopsis cinerea* を用いた。*C. cinerea* のゲノム情報から、グローバルレギュレーター遺伝子を探索したところ、*Aspergillus fumigatus* のグローバルレギュレーター遺伝子 *laeA* と相同性の高い CC1G_00498 遺伝子(*CclaeA*)を見出した。そこでプロトプラスト-PEG 法にて *CclaeA* を破壊し、得られた破壊株の化合物生産を調べた。
【結果】培養液抽出物を LC-MS 分析に供した結果、*CclaeA* 破壊株において野生株より化合物生産が約 100 倍に上昇した分子式 $C_{35}H_{65}N_7O_{10}$ で表される化合物 **1** を見出した。化合物 **1** の単離、構造決定を行ったところ、化合物 **1** は N^5-hydroxy-L-ornithine の 3 量体構造を含む新規アシル化トリペプチドであることがわかった。
【考察】*CclaeA* の破壊により生産性が劇的に向上した化合物 **1** は、*C. cinerea* が持つ非リボソーム性ペプチド合成酵素遺伝子(CC1G_04210)由来であることが示唆された。そこで CC1G_04210 の遺伝子破壊を行うなど、本遺伝子と化合物 **1** 生合成との関連性について解析を進めている。子嚢菌由来 *laeA* は二次代謝産物生産を正に制御するのに対し、予想外にも担子菌由来 *CclaeA* は化合物 1 の生産を負に制御していた。本研究は LaeA タンパク質の二次代謝制御における新たな機能を世に提示するものであり、本機能の解明により生合成遺伝子の休眠・覚醒化の理解、ひいては効率的な新規天然物獲得法の樹立へとつながると期待される。

biosynthesis, basidiomycetes, regulatory gene

講演番号：3D2p05
講演日時：3 月 26 日 14:34～ 1 号館 D2 会場

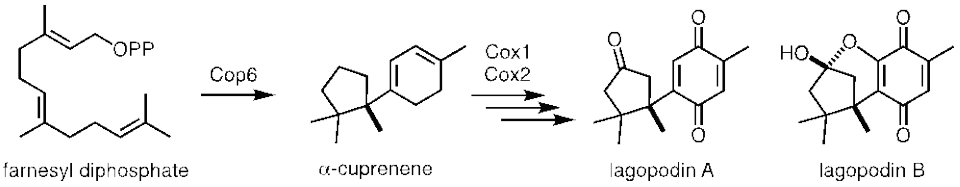
複雑な酸化経路を含むキノコ由来 lagopodin 類の生合成研究

Biosynthetic pathway of lagopodin

桝谷 貴洋[1]、平山 裕一郎[1]、高西 潤[1]、恒松 雄太[1]、佐藤 道大[1]、大高 潤之介[2]、本山 高幸[2]、長田 裕之[2]、○渡辺 賢二[1] ([1]静岡県大薬、[2]理研 CSRS)

Takahiro MASUYA[1], Yuichiro HIRAYAMA[1], Jun TAKANISHI[1], Yuta TSUNEMATSU[1], Michio SATO[1], Junnosuke OTAKA[2], Takayuki MOTOYAMA[2], Hiroyuki OSADA[2], ○Kenji WATANABE[1] ([1]University of Shizuoka, [2]RIKEN CSRS)

【目的】Lagopodin A および B は *Coprinopsis* 属担子菌（キノコ）により生産されるα-cuprenene 型の二次代謝産物である（図)。Cuprenene 型化合物は抗菌活性を有する報告もあり、医薬、農薬分野で興味が持たれている。また、lagopodin 類の生合成経路に関しては、α-cuprenene が順次酸化されることで生合成されると予想されているものの(図)、現在までに実験的には証明されていない。そこで、本研究では lagopodin 類の生合成経路の解明を目的として研究に着手した。



【方法】本生合成に取り組むにあたり、lagopodin 類を生産し、遺伝子操作も確立されている *Coprinopsis cinerea* (ウシグソヒトヨタケ)を用いた。ウシグソヒトヨタケの *cop6* 遺伝子にコードされたテルペン環化酵素が farnesyl diphosphate を環化することでα-cuprenene を生産することが知られている。また、ウシグソヒトヨタケのゲノム情報の解析の結果から、酸化酵素シトクロム P450 をコードする 2 種類の遺伝子（*cox1*、*cox2*）が *cop6* に隣接して存在していることが予測された。そこで、本研究ではウシグソヒトヨタケにコードされたこれらの酵素遺伝子を破壊することで生合成経路を推定し、続いて *cop6*、*cox1* および *cox2* 遺伝子を出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用い異種発現させ中間体の生物変換を試みることで lagopodin 類の生合成経路を解明した。

【結果・考察】上記の遺伝子群を組込んだベクターで出芽酵母を形質転換した後、それらの生成物を確認したところ、*cop6* 導入株ではα-cuprenene の生産が確認された。さらに、*cop6*、*cox1* および *cox2* の共発現株からは lagopodin A の生合成前駆体と予想される化合物の生合成が確認されたものの、lagopodin 類の生産は確認されなかった。続いて、ウシグソヒトヨタケにコードされた上記 3 種の酵素遺伝子の破壊株を用いて lagopodin 類の生産を調べたところ、*cop6* 破壊株では lagopodin 類の生産は確認されなくなったものの、*cox1* あるいは *cox2* 破壊株では lagopodin 類の生産は依然として認められた。これらの実験結果から、α-cuprenene を lagopodin 類へと酸化する酵素が *cox1* および *cox2* 以外にもウシグソヒトヨタケ内にコードされていることが示唆された。

1. Osada, H., *et al*. *Org. Lett.* **2017**.; 2. Osada, H., *et al*. *Org. Lett.* **2018**.; 3. Watanabe, K., *et al*. *Org. Biomol. Chem*. in press.

terpene, mushroom, biosynthesis

講演番号：3D2p06
講演日時：3 月 26 日 14:55～ 1 号館 D2 会場

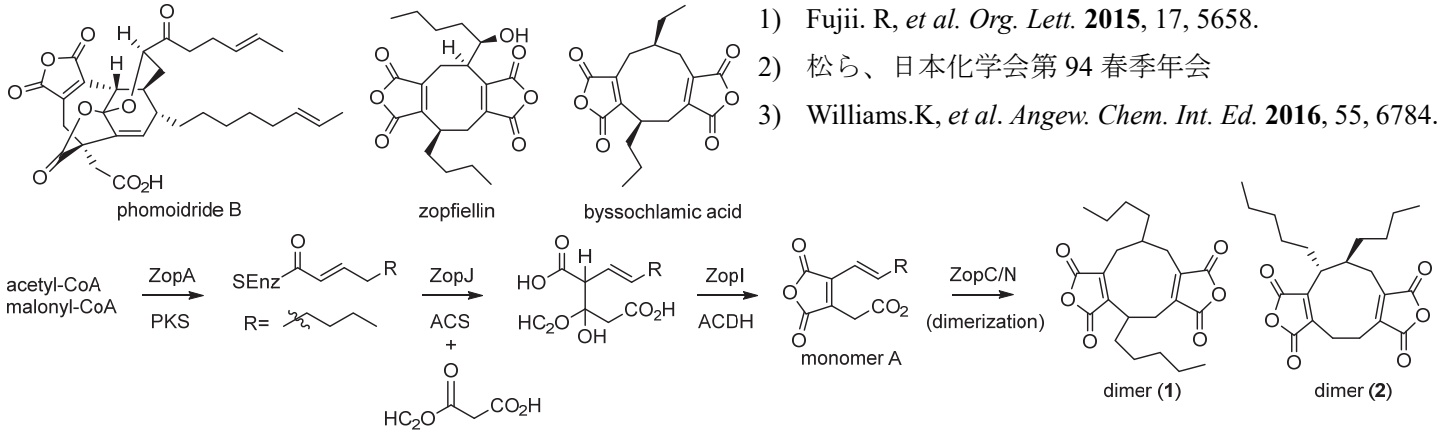
糸状菌が生産する酸無水物多量体の生合成に関する研究

Biosynthetic studies on fungal dimeric anhydrides

○椎名 哲也、長嶺 翔太、松 優佑、尾崎 太郎、劉 成偉、南 篤志、及川 英秋（北大院理）
○Tetsuya SHIINA, Shota NAGAMINE, Yusuke MATSU, Taro OZAKI, Chengwei LIU, Atsushi MINAMI, Hideaki OIKAWA (Fac.Sci.,Hokkaido Univ)

【目的・背景】糸状菌の代謝物には、無水マレイン酸を部分構造として持ち、それらが多量化した天然物が存在する。多量化の様式や酸化度が異なる構造多様な類縁体が知られる天然物群であり、抗高脂血症薬のリードとして開発された phomoidride B 等有用化合物が多く存在する。酸無水物多量体の一つである zopfiellin は糸状菌 *Zopfiella curvata* No.37-3 の二次代謝産物であり、顕著な抗カビ活性を示す。他の酸無水物二量体には見られない八員環骨格を有することから、その生合成機構に着目し本研究を開始した。これまでに我々は phomoidride B の生合成遺伝子群を同定し、無水マレイン酸モノマーがケト酸へのポリケチドの付加及び脱水反応により生成することを明らかにしてきた[1]。以前に我々が見出した zopfiellin 生合成遺伝子クラスター中にも phomoidride B と同様の生合成遺伝子が保存されていることから、本化合物の生合成におけるモノマーも同様の反応で生成すると考えられる[2]。また、byssochlamic acid 等の生合成で二量化への関与が示唆されている酵素遺伝子も保存されていた[3]。今回は麹菌異種発現系を利用してこれらの生合成遺伝子群の機能解析を行ったので、報告する。

【方法・結果】初めに麹菌 *Aspergillus oryzae* NSAR1 を宿主として生合成遺伝子の異種発現を行い、遺伝子クラスター中にコードされるポリケチド合成酵素 ZopA、アルキルクエン酸合成酵素 ZopJ、アルキルクエン酸脱水酵素 ZopI の異種発現によりモノマーA が生産されることを確認した。この形質転換体を宿主として、加水分解酵素 ZopM 及び二量化酵素 ZopC・ZopN を異種発現した。得られた形質転換体の代謝産物を分析し、形質転換体が九員環を有するダイマー**1** 及び **2** を生産することを明らかにした。これより ZopC と ZopN が置換様式の異なる二種類の二量化反応に関与することが示唆された。さらに、酸化酵素遺伝子 *zopK* を追加導入したところ、**1** の酸化反応が進行したため、現在構造解析を進めている。また、zopfiellin が有する八員環の生合成経路についても検討を進めている。



1) Fujii. R, *et al. Org. Lett.* **2015**, 17, 5658.
2) 松ら、日本化学会第 94 春季年会
3) Williams.K, *et al*. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 6784.

anhydride, biosynthesis, heterologous expression

講演番号：3D2p07
講演日時：3 月 26 日 15:06～ 1 号館 D2 会場

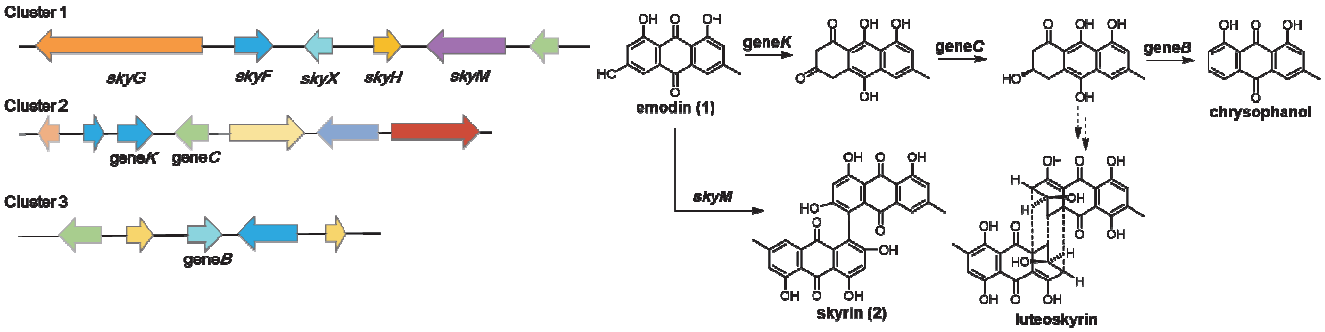
糸状菌アントラキノン系ポリケタイドの生合成に関わる酵素遺伝子の機能解析-2-

Biosynthetic study of anthraquinone polyketides produced by fungi -2-

○深谷 充功[1]、南 篤志[1]、尾崎 太郎[1]、劉 成偉[1]、丸山 潤一[2]、及川 英秋[1]（[1]北大院理、[2]東大院農）
○Mitsunori FUKAYA[1], Atsushi MINAMI[1], Taro OZAKI[1], Chengwei LIU[1], Jun-ichi MARUYAMA[2], Hideaki OIKAWA[1] ([1]Fac. Sci., Hokkaido Univ, [2]Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo)

【目的】アントラキノン系天然物は、３環性キノン骨格をもつ emodin(1)を共通の中間体として、酸化・還元反応や２量化反応を経て生合成されると考えられている。我々は昨年の本会において、skyrin[1)] (2)や luteoskyrin[1)]のようなビアントラキノンと各種モノマーを生産する *Talaromyces islandicus* から、1 の生合成に関わる骨格構築酵素遺伝子と 2 種の修飾酵素遺伝子を同定したことを報告した。加えて、これらに隣接して存在する修飾酵素遺伝子が 1 の二量化を触媒して 2 を与えることを明らかにした。しかしながら、この遺伝子クラスターには他の修飾酵素遺伝子は存在しないため、1 以外のモノマーの生合成酵素遺伝子は染色体上の別の位置に存在しているのではないかと考えられた。本会で我々は、1 に対する修飾酵素遺伝子の探索とその機能解析を行ったので、その詳細を報告する。

【方法・結果】1 の修飾反応に関わる酵素遺伝子は、xanthon などの構造類縁体の生合成に関わると予想される脱水素酵素遺伝子をクエリーとして探索した。その結果、新たに 5 種のクラスターを見出した。この内、クラスター2 には修飾酵素遺伝子に加えて先の実験で機能解析に成功した骨格構築酵素も隣接していたことから、関連化合物の生合成遺伝子クラスターであることが示唆された。そこで、生産条件下での発現解析を行ったところ、gene*K*、*C*、*B* およびその他修飾酵素遺伝子が発現していることを確認した。各修飾酵素の組み換え酵素を調製して emodin を基質とした *in vitro* 反応を行ったところ、chrysophanol の生成を確認することができた。これらのクラスターがアントラキノン系天然物の生合成に関わることが支持された。現在、生産条件下で発現が確認された修飾酵素遺伝子に関して機能解析を進めており、その解析結果についても報告する予定である。



ref.) **1)** Bouhet, JC. *et al.*, J. Agric. Food Chem. **1976**. Vol. 24, No. 5. 964-972.

Polyketide, Biosynthesis, Fungi

講演番号：3D2p08
講演日時：3 月 26 日 15:17～ 1 号館 D2 会場

Diels-Alder 反応を触媒する酵素 CghA の基質合成および反応解析

Chemical synthesis of substrate for intramolecular Diels-Alderase CghA

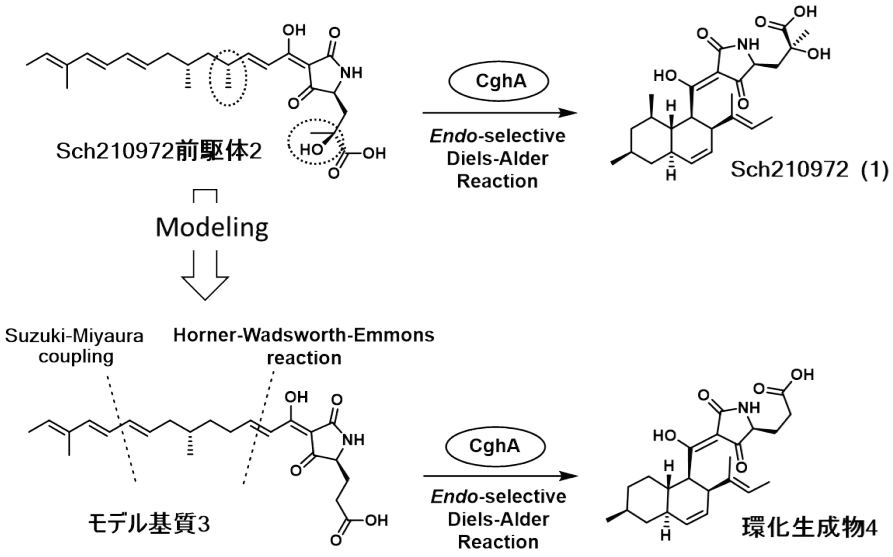
○成田 一仁、岸本 真治、横山 葵、恒松 雄太、佐藤 道大、渡辺 賢二（静岡県大薬）
○Kazuto NARITA, Shinnji KISHIMOTO, Mamoru YOKOYAMA, Yuta TSUNEMATSU, Michio SATOU, Kenji WATANABE (Dept. Pharm. Sci., Univ. Shizuoka)

【目的】糸状菌 *Chaetomium globosum* 由来の二次代謝産物 Sch210972 は Diels-Alder 反応で生合成されている。近年我々はこの Diels-Alder 反応を触媒する酵素 CghA の特定[1]と X 線結晶構造解析に成功した。さらには生成物である Sch210972 (**1**)との共結晶も獲得し、その構造を明らかにすることで反応の立体選択性に重要と考えられるアミノ酸残基を特定した[2]。

しかし CghA の遺伝子破壊を行っても、分子内に diene と dienophile を有する Sch210972 前駆体 **2** を生産菌から獲得することができず、CghA の詳細な機能解明が難航していた。そこで有機合成により CghA の基質となる化合物を供給しその機能を証明することを目的として研究を行った。

【方法・結果】化合物 **1** と CghA との共結晶構造を解析し、CghA の触媒する反応の立体選択性制御には関与しないと予想された置換基を取り除くことで,化合物 **2** の構造を簡略化したモデル基質 **3** を設計した。化合物 **3** の合成では、基質の構造と CghA の酵素活性との相関を調べることを見据え、容易に構造展開が可能な経路を計画した。化合物 **3** を３つのセグメントに分割して合成し、各セグメントを順次結合させるルートである。この経路に従って各セグメントを合成したあと、Horner-Wadsworth-Emmons 反応及び、鈴木宮浦カップリングを用いた縮合反応によって目的化合物 **3** の合成を達成した。

合成したモデル基質 **3** は予想した通り、CghA に基質として認識され、ジアステレオ選択的な環化反応で単一の生成物 **4** へと変換されることを確認した。本発表では各合成の詳細およびモデル基質 **3** が CghA によって変換されて生じた環化生成物 **4** の化学構造について報告する。



【参考文献】

1. Sato, M. *et al*. *ChemBioChem* **2015**, *16*, 2294.
2. 横山 葵ら日本生薬学会第 65 回年会, **2018.**

organic synthesis, CghA, endo-selective Dials-Alder reaction

講演番号：3D2p09
講演日時：3 月 26 日 15:28～ 1 号館 D2 会場

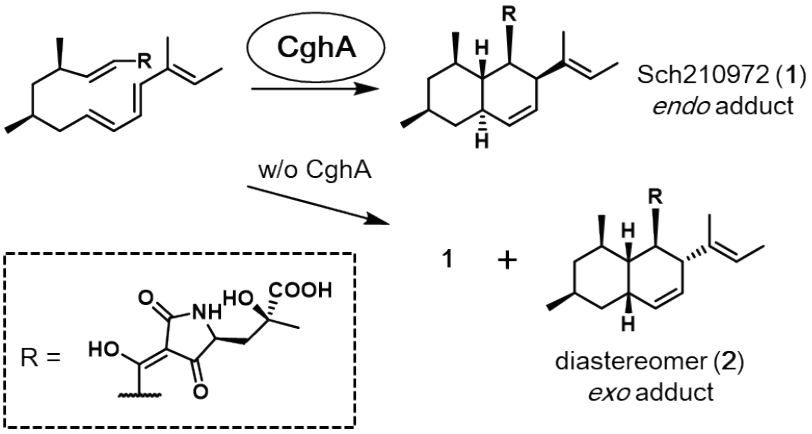
糸状菌由来酵素 CghA による立体選択的な Diels-Alder 反応の機構解明

Stereoselective Diels-Alder reaction catalyzed by fungal enzyme CghA

○岸本 真治、横山 葵、佐藤 道大、前田 直哉、恒松 雄太、原 幸大、橋本 博、渡辺 賢二（静岡県大薬）
○ Shinji KISHIMOTO, Mamoru YOKOYAMA, Michio SATO, Naoya MAEDA, Yuta TSUNEMATSU, Kodai HARA, Hiroshi HASHIMOTO, Kenji WATANABE (Dept. Pharm. Sci., Univ. Shizuoka)

【背景・目的】自然界には酵素による立体選択的なDiels-Alder反応を経て生合成されたと考えられる化合物がいくつも見出されているが、反応を担う酵素やその触媒機構はほとんど明らかになっていない。糸状菌 *Chaetomium globosum* が生産する二次代謝物 Sch210972 (**1**) 中に見られるオクタリン骨格の生合成にも Diels-Alder 反応が関与していると予想されていたが、近年我々は遺伝子破壊実験および異種宿主発現系を用いた生合成経路の再構築により **1** の生合成において酵素 CghA が *endo* 選択的な Diels-Alder 反応を触媒していることを見出した [1]。さらに、X 線結晶構造解析により中心部に反応前駆体が収まるサイズのポケットを有する CghA の構造を明らかにした [2]。今回、CghA による Diels-Alder 反応の触媒機構を解明するべく、各種実験を行ったので報告する。

【方法・結果】CghA と生成物である **1** との相互作用を調べるために、大腸菌を宿主として調製した CghA を用いて **1** との共結晶化実験を行った。酵素の 5 倍量の化合物 **1** を加えた条件で結晶化を行うことで目的の結晶が得られ、これを用いて X 線結晶構造解析を行ったところ、エノールがケトンへと異性化した状態の **1** が CghA と結合している構造を明らかにすることができた。続いて共結晶中で **1** と相互作用しているアミノ酸残基の役割を明らかにするべく、CghA に位置特異的な変異導入を行った。この変異体酵素を有する糸状菌での **1** と **1** のジアステレオマー (**2**) の生産量を解析することで各アミノ酸残基の酵素活性への関与を調べた。化合物生産量に顕著な変化が見られた変異体については大腸菌を宿主として酵素を調製し、別途合成したモデル基質を用いた *in vitro* での反応解析を行った。この結果、基質結合部位に存在する複数のアミノ酸残基（Trp183, Trp235, Met257）が酵素活性に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。



【参考文献】

1. Sato M. et al. *ChemBioChem* **2015**, *16*, 2294.
2. 横山 葵ら. 日本生薬学会第 64 回年会（千葉） **2017**, 1C-06.

Diels-Alderase, co-crystal, mechanism

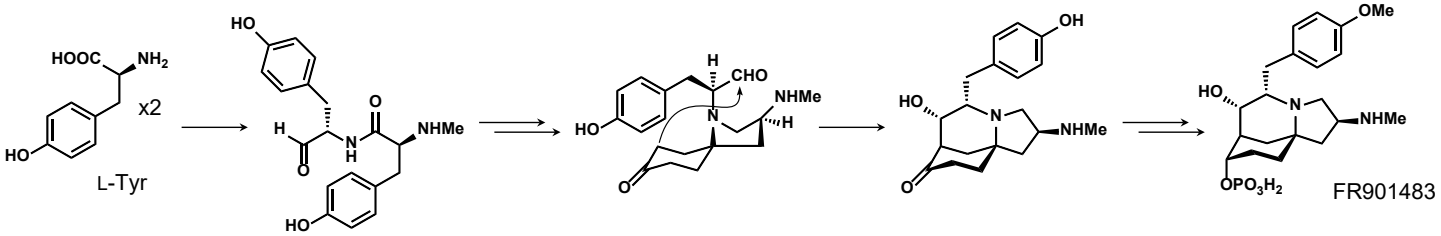
講演番号：3D2p10
講演日時：3 月 26 日 15:39～ 1 号館 D2 会場

免疫抑制活性物質 FR901483 の生合成研究

Biosynthetic pathway of FR901483

○田村 優依[1]、佐藤 道大[1]、谷口 昌要[2]、笹村 智司[2]、永井 浩二[2]、渡辺 賢二[1]([1]静岡県大薬、[2]大鵬薬品工業)
○Yui Tamura[1], Michio Sato[1], Masatoshi Taniguchi[2], satoshi Sasamura[2], Kouji Nagai[2], Kenji Watanabe[1] ([1]Univ. of Shizuoka, [2]TAIHO Pham. Co., Ltd)

【目的】真菌が産生する代謝産物は多様な活性を有しており、その構造を元にして数多くの薬が開発されてきた。糸状菌 *Cladobotryum* sp.から単離された FR901483 は IL-2 産生阻害に基づかない新規メカニズムの免疫抑制活性を示すことから、新たな免疫抑制剤開発の足掛けとなることが期待される化合物である。また本化合物は含窒素三環性骨格および多彩な官能基を有していることから、有機合成化学的にも注目され、これまでに数多くの全合成研究が報告されている。一方で生合成経路に関しては 2 つのチロシンから生合成されると予想されているものの、現在までに詳細な経路に関する報告例はない。そこで本研究では FR901483 の生合成経路の全容解明および本化合物の類縁体を得ることを目的として研究に着手した。
【方法】はじめに *Cladobotryum* sp.の全ゲノム配列を解読した。FR901483 の構造から予想される生合成経路を基に生合成に必要となる遺伝子を推定し、それら遺伝子を含むクラスターを 1 つ見出した。そのクラスターの遺伝子発現量を RT-PCR により確認後、RNA-seq 解析を行い、クラスター中の各遺伝子の ORF を特定した。続いてこれら遺伝子にコードされているタンパク質を組換えタンパク質として獲得し、*in vitro* 実験を行った。
【結果と考察】推定生合成遺伝子クラスターを *clf* クラスターとした。本クラスターに存在する *clf4* (非リボソームペプチド合成酵素) を大腸菌発現系を用いて組換えタンパク質として獲得した。本酵素をチロシンを基質とした *in vitro* 反応に供したところ、チロシンの二量体環化生成物が得られた。また、生合成クラスター中に存在するキナーゼと推定される Clf1 および Clf9 を組換えタンパク質として獲得し、FR901483 脱リン酸体を基質として *in vitro* 反応に供したところ Clf9 にリン酸化活性が認められた。これらのことから、*clf* クラスターが FR901483 生合成遺伝子クラスターであることが強く示唆された。現在、*clf* クラスターに存在する他の遺伝子の機能について解析を進めている。



FR901483 予想生合成経路

Cladobotryum.sp

講演番号：3D2p11
講演日時：3 月 26 日 16:00～ 1 号館 D2 会場

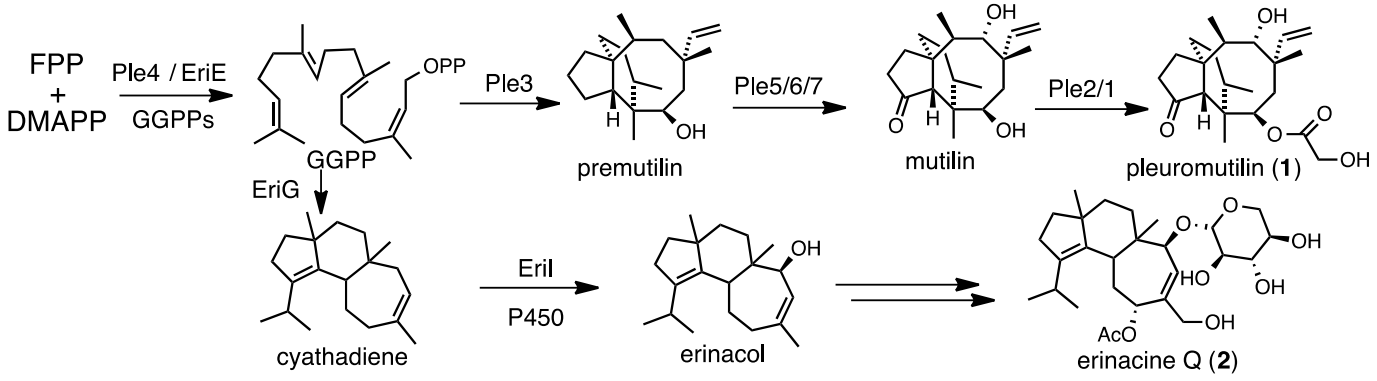
キノコ由来テルペン系天然物の汎用的な生産法の開発 -1-

Heterologous production of natural terpenoids derived from mushroom -1-

○劉 成偉[1]、佐藤 芳郎[1]、尾崎 太郎[1]、呉 静[2]、丸山 潤一[3]、南 篤志[1]、河岸 洋和[2]、及川 英秋[1]
([1]北大院理、[2]静岡大・農、[3]東大院・農生科・応生工)
○Chengwei LIU[1], Yoshiro SATO[1], Taro OZAKI[1], Jing WU[2], Jun-ichi MARUYAMA[3], Atsushi MINAMI[1], Hirokazu KAWAGISHI[2], Hideaki OIKAWA[1] ([1]Grad. Sch. Sci., Hokkaido Univ., [2]Fac. of Agric., Shizuoka Univ., [3]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo.)

【目的】キノコ（担子菌）は我々の生活に密接に関わっている重要な食用資源であり、古くから健康食品として広く利用されてきた。近年では、免疫活性や抗酸化活性、抗腫瘍活性を有することから、その薬用効果にも高い関心が寄せられている。しかし、キノコは子実体形成の有無や培養条件のわずかな違いで異なる代謝物を与えるため、その代謝物の安定供給が難しいことが知られている。この問題を解決するには、異種宿主を用いた物質生産が有効だと考えられている。従来は、cDNA 配列を用いた異種発現が検討されてきたが、通常の培養条件下では転写されていない遺伝子の機能解析ができないため、研究対象が限定的であった。この問題を解決するため、本研究では、２種の天然物（pleuromutilin (**1**)、erinacine (**2**)）を題材として、これまでに報告例のないゲノム DNA 配列を利用した異種生産を検討した。

【方法・結果】**1** 及び **2** の基本骨格は、GGPP 合成酵素（Ple4/EriE）と環化酵素（Ple3/EriG）により構築される[1,2]。各遺伝子を麹菌へと導入し、取得した形質転換体 (AO-*eriEG*, AO-*ple43*)の代謝産物を GC-MS で分析したところ、premutilin と cyathadiene の生産を確認した。また、各形質転換体から mRNA を調製して cDNA 配列を確認した結果、報告されている配列と同一であることも確認した。これより、麹菌はキノコ由来の遺伝子も正しくスプライシングできることが示唆された。この実験事実の一般性を検証するため、イントロンの数が多く（平均 10 カ所以上）短小エキソンなども存在するチトクローム P450 遺伝子を麹菌へ導入し、取得した環化体の修飾反応を検討した。発表では、反応生成物の解析結果と導入した遺伝子のスプライシングについても議論する予定である。



1) *Chembiochem*. **2017**, *18*, 2317-2322.; 2) *Angew Chem Int Ed Engl*. **2017**, *56*, 4749-4752.

mushroom, terpene, Heterologous production

講演番号：3D2p12
講演日時：3 月 26 日 16:11～ 1 号館 D2 会場

キノコ由来テルペン系天然物の汎用的な生産法の開発 -2-

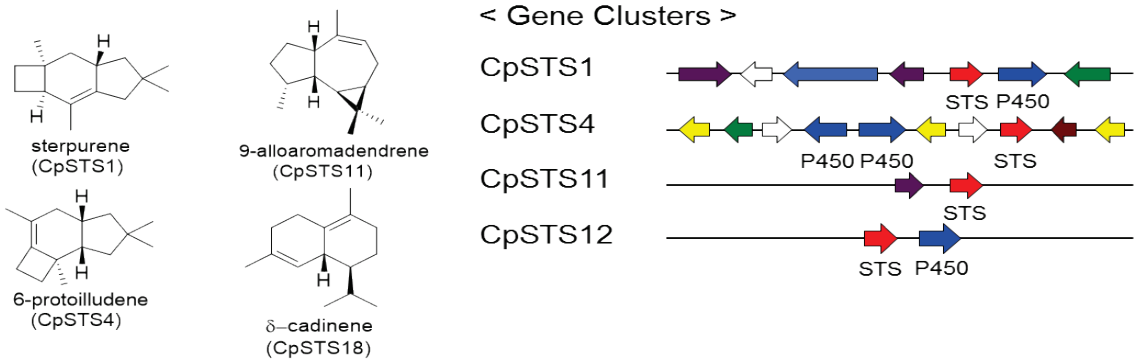
Heterologous production of natural terpenoids derived from mushroom -2-

○西下 純平[1]、長嶺 翔太[1]、小崎 拓登[1]、劉 成偉[1]、尾崎 太郎[1]、丸山 潤一[2]、南 篤志[1]、及川 英秋[1] ([1]北大院理、[2]東大院農)

○Jumpei NISHISHITA[1], Shota NAGAMINE[1], Takuto KOZAKI[1], Chengwei LIU[1], Taro OZAKI[1], Jun-ichi MARUYAMA[2], Atsushi MINAMI[1], Hideaki OIKAWA[1] ([1]Fac. Sci.,Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo)

[目的] 担子菌は生物活性テルペンを探索する上での重要な資源の一つであり、その染色体上には１０種以上のテルペン生合成遺伝子が存在する。しかし、実験室での培養条件下ではその半数以上が転写されておらず[1)]、従来の発現系では転写されていない酵素遺伝子の機能解析は困難であった。この本質的な問題を解決するべく、麹菌を宿主としたゲノム DNA 配列による異種発現系を用いて検討を進めたところ、「子嚢菌である麹菌が担子菌由来の遺伝子を正しくスプライシングする」という予備的な実験結果を得た。この結果を受けて、本研究では *Clitopilus pseudo-pinsitus* がもつテルペン環化酵素遺伝子を題材としてゲノム DNA 配列を利用した異種発現の利用可能性を検討した。

[方法・結果] 担子菌である *Clitopilus pseudo-pinsitus* のゲノムを、担子菌及び子嚢菌の既知セスキテルペン環化酵素をクエリとして検索したところ 18 種類のテルペン環化酵素遺伝子を発見した。各テルペン環化酵素遺伝子のゲノム DNA 配列をクローニングして麹菌へと導入し、各形質転換体が生産した揮発性成分を GC-MS で確認したところ、8 種の形質転換体でセスキテルペンの生成を確認できた。生成物の構造は、①文献データとのマススペクトルのフラグメントパターンとの比較、②NMR 解析のいずれかの方法で決めた。取得した化合物は全て既知化合物ではあったものの、5-6-4 員環から成る sterpurene を与える環化酵素を世界に先駆けて同定することができた。機能解析に成功した環化酵素遺伝子の周辺にはチトクローム P450 などの修飾酵素遺伝子が隣接していたことから、生成した環化体は酸化的な修飾反応を受けると考えられた。現在、環化酵素遺伝子と修飾酵素遺伝子の共発現を検討しており、その解析結果についても報告する予定である。



1) *ChemBioChem* **2013,** *14*, 2480-2491.

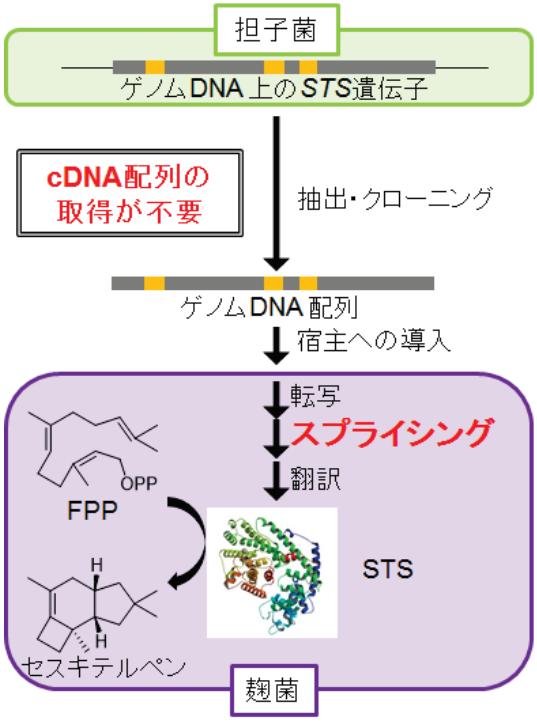
Basidiomycetes fungi, Sesquiterpene cyclase, Heterologous expression

講演番号：3D2p13
講演日時：3 月 26 日 16:22～ 1 号館 D2 会場

キノコ由来テルペン系天然物の汎用的な生産法の開発 -3-
Heterologous production of natural terpenoids derived from mushroom -3-
○長嶺 翔太[1]、西下 純平[2]、劉 成偉[1]、尾﨑 太郎[1]、丸山 潤一[3]、南 篤志[1]、及川 英秋[1] ([1]北大院理、[2]北大理、[3]東大院農)
○ Shota NAGAMINE[1], Jumpei NISHISHITA[2], Chengwei LIU[1], Taro OZAKI[1], Jun-ichi MARUYAMA[3], Atsushi MINAMI[1], hideaki OIKAWA[1] ([1]Fac.Sci., Hokkaido Univ., [2]Sch. Sci., Hokkaido Univ., [3]Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo)

【目的】担子菌は様々な生物活性天然物を生産しており、医薬品シード化合物の発見につながる有用な資源として注目されている。それにもかかわらず生合成酵素の機能解析や異種生産の報告例が少ないのは、酵母や大腸菌を用いた従来の異種発現系の適応時に必須となるcDNA配列の取得が困難であることに起因する。我々はこの問題を解決するため、ゲノムDNA配列を導入した麹菌内でスプライシングを行わせることで、生産菌からのcDNA配列の取得を必要としない異種発現系の開発を目指してきた。本研究では、麹菌に導入した遺伝子のスプライシングパターンの解析と取得したcDNA配列を基とした機能修復を検討し、担子菌由来のセスキテルペン環化酵素（STS）の網羅的な解析に成功した。

【方法・結果】我々は *Clitopilus pseudo-pinsitus* 由来の 18 種の STS を麹菌へと導入し、8 種の STS の機能解析に成功している [1]。残りの 10 種で代謝産物が得られなかった原因を探るために cDNA 配列を確認したところ、8 種において一部のイントロン（多くは 1 ヶ所）が除去されていないことがわかった。そこで、残ったイントロンを人工的に除去して配列を修正し、大腸菌で発現したところ、8 種全ての活性検出に成功した。また、担子菌 *Stereum hirsutum* 由来のセスキテルペン環化酵素遺伝子 13 種に関しても同様に、1) ゲノム DNA 配列を用いた麹菌での異種発現、2) 麹菌形質転換体より得た cDNA 配列を修正して大腸菌で異種発現、という 2 段階の方法で機能解析した結果、1)で 7 種、2)で 6 種、計 13 種全てがセスキテルペンを与えることを確認した。これにより、担子菌に存在する STS のほとんどが酵素活性を有することが明らかとなった。また、類似した構造をもつセスキテルペンを生産する STS はその遺伝子構造も類似していたことから、担子菌では頻繁に遺伝子重複が起こっていると考えられた。その詳細を報告する。



1) 西下純平　他、日本農芸化学会 2019 年度大会、発表予定

basidiomycetes fungi, heterologous expression, *Aspergillus oryzae*

講演番号：3D2p14
講演日時：3 月 26 日 16:33～ 1 号館 D2 会場

アーキアに広く保存される「省エネ型」新奇メバロン酸経路を用いた大腸菌でのリコペン生産強化

Enhancement of lycopene production in *Escherichia coli* using the “energy saving” novel mevalonate pathway widely conserved in almost archaea.

○吉田 稜、吉村 徹、邊見 久 (名大院生命農)
○Ryo YOSHIDA, Tohru YOSHIMURA, Hisashi HEMMI (Grad. Sch. of Bioagr. Sci., Nagoya Univ.)

イソプレノイドは自然界で最大の天然化合物群であり，現在までに 80,000 種を超える化合物が報告されている．その中にはタキソールやアルテミシニンといった天然物医薬品をはじめとする有用化合物が含まれる．メバロン酸経路はイソプレノイドの前駆体であるイソペンテニル二リン酸(IPP)の供給経路の一つであり，主に真核生物とアーキアに分布している．ほぼ全ての真核生物と一部のアーキアが持つ古典的メバロン酸経路では,アセチル CoA からメバロン酸が合成された後,5 位の水酸基がリン酸化され 5-ホスホメバロン酸(MVA-5-P)が合成される．次いで更なるリン酸化により 5-ジホスホメバロン酸(MVA-5-PP)が得られた後，MVA-5-PP 脱炭酸酵素により IPP が合成される．また，一部のアーキアやバクテリアからは，部分的に異なった中間体を経由する変形メバロン経路が見出されている．これらの既知メバロン酸経路は，いずれも 1 分子の IPP の合成に 3 分子の ATP を消費するエネルギーコストが高い経路である．

我々は最近，大部分のアーキアに保存される新奇な変形メバロン酸経路を見出した．同経路は MVA-5-P までは古典的経路と同様に進むが，その後，MVA-5-P 脱水酵素が働いて 5-ホスホ-*trans*-アンヒドロメバロン酸(tAHMP)が得られる．続いて，tAHMP 脱炭酸酵素によりイソペンテニルリン酸(IP)が合成され，最終的に IP リン酸化酵素により IPP へと変換される．同経路は 1 分子の IPP を合成するのに 2 分子の ATP しか使用せず，イソプレノイドの物質生産に有利であると期待される．

本研究では，常温性メタン生成アーキア *Methanosarcina mazei* より単離した同新奇メバロン酸経路の一部，メバロン酸から IPP までの生合成経路の遺伝子を，イソプレノイドの一種である赤色カロテノイドのリコペンの生合成遺伝子とともに大腸菌に導入した．メバロノラクトンを添加した培地で培養した結果，同菌のリコペン生産量はメバロノラクトン無添加の場合と比較しておよそ 7 倍向上した．

isoprenoid, mevalonate pathway, archaea

発表責任者：邊見久（hhemmi@agr.nagoya-u.ac.jp）

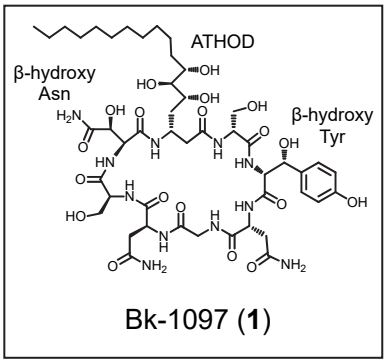
講演番号：3D3a03
講演日時：3 月 26 日 09:22～ 1 号館 D3 会場

抗真菌活性向上を目的とした Bk-1097 類似体の合成

Synthesis of Bk-1097 analogs for improvement of antifundal activity

○佐々木 美緒、加藤 誠弥、千田 綜、矢野 成和、今野 博行 (山形大学)
○Mio SASAKI, Seiya KATO, So CHIDA, Shigekazu YANO, Hiroyuki KONNO (Yamagata Univ.)

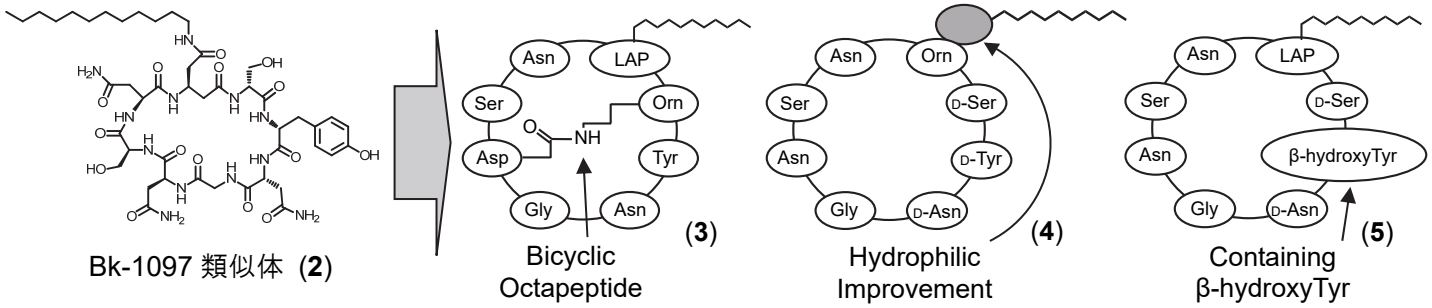
[目的] Burkholdine (Bk) -1097 (**1**) は Schmidt らにより 2010 年に単離、構造決定された環状リポペプチドである。Bk-1097 (**1**) は異常アミノ酸を含む 8 つのアミノ酸で構成され、脂肪鎖を有する。生物活性として *S. cerevisiae* と *A. niger* に対して MIC = 1.6 μg/ml の抗真菌活性を示し、その値は Amphotericin B を上回る。しかしながら Bk-1097 (**1**) の活性部位、標的酵素は未解明であり、全合成も達成されていない。そこで、本研究室では Bk-1097 (**1**) を構成するアミノ酸をもとに類似体を合成し構造活性相関研究を行う研究を展開してきた。



Bk-1097 (**1**)

Bk-1097 類似体を設計、合成するにあたり、3 つの異常アミノ酸である ATHOD 及び β-hydroxyAsn、β-hydroxyTyr をそれぞれ N-lauryl-3-amino-4-carbamoylpropanoic acid (LAP)、Asn、Tyr に変更した。その結果、Bk-1097 類似体 (**2**) が MIC = 25 μg/ml の抗真菌活性を示すことを見出している。そこで今回 2 環ペプチド (**3**) と脂肪鎖の親水性向上類似体 (**4**) 、β-hydroxyTyr 含有類似体 (**5**) の合成を行った。

[方法と結果] Bk-1097 (**1**) と類似体 (**2**) の立体構造の最適化と分子内水素結合を解析した結果、Xaa3 と Xaa7 間において水素結合の存在が示された。このことから、環構造のコンフォメーション固定が活性の向上につながると期待し、Xaa3 と Xaa7 のアミノ酸側鎖を結合させた 2 環ペプチド (**3**) を合成した。また、Bk-1097 (**1**) の構造に注目すると脂肪鎖の周辺に水酸基などの極性官能基が多く集中していることが分かる。そのため、脂肪鎖の親水性と生物活性に相関があることを期待し、水酸基を保持した脂肪鎖を持つ類似体 (**4**) を合成した。さらに、Bk-1097 (**1**) の全合成を視野に入れて β-hydroxyTyr を合成し、それを組み込み類似体 (**5**) に導いた。現在抗真菌活性を評価している。



Bk-1097 類似体 (**2**)
(**3**) Bicyclic Octapeptide
(**4**) Hydrophilic Improvement
(**5**) Containing β-hydroxyTyr

antifungal, cycliclipopeptide, structure activity relationships

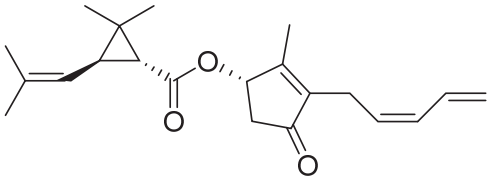
講演番号：3D3a04
講演日時：3 月 26 日 09:33～ 1 号館 D3 会場

ハロベンジル置換基をもつ新規ホスホン酸エステル類のピレスリン生合成阻害活性

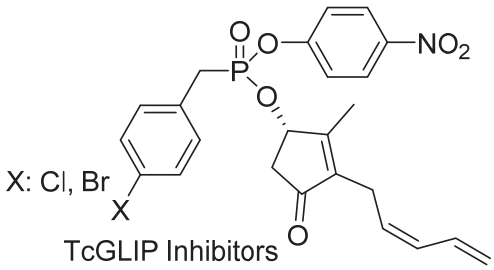
Synthesis and pyrethrin biosynthesis inhibitory activity of phosphonates containing halo-benzyl substituents

○髙松 元紀[1]、小椋 明生[1]、伊原 誠[1]、松尾 憲忠[2]、松田 一彦[1]([1]近畿大農、[2]関西学院大理工)
○ Genki TAKAMATSU[1], Akio OGURA[1], Makoto IHARA[1], Noritada MATSUO[2], Kazuhiko MATSUDA[1] ([1]Fac. of Agri., Kindai Univ., [2]Sch. of Sci. Tech., Kwansei Gakuin Univ.)

【目的】ピレスリンは除虫菊が生合成するエステル構造をもつ天然殺虫剤である。その酸部は非メバロン酸経路で、アルコール部はオキシリピン経路で生合成され、最後に両者が GDSL リパーゼの一種 TcGLIP のはたらきによりエステル化されることでピレスリンが構築される。これまでにわれわれは、除虫菊でのピレスリン生合成の調節機構を理解するために、*p*-ニトロフェニル基、アルキル基およびピレスリンと同じアルコール部 *S*-ピレスロロンを置換基としてもつホスホン酸エステル型の阻害剤を合成し、そのアルキル基が 5 炭素程度の化合物がとりわけ高い TcGLIP 阻害活性を示すことを報告している。今回、ピレスロイドの一種フェンバレレートを参考に、*p*-ハロベンジル基を置換基としてもつホスホン酸エステル類を合成し（下図)、それらの TcGLIP 阻害活性を評価したので報告する。



Pyrethrin I



TcGLIP Inhibitors

【方法と結果】目的化合物は、*p*-ハロベンジル基をもつホスホン酸ジクロリドと *S*-ピレスロロンとを反応させることで生じるホスホン酸モノクロリドを、*p*-ニトロフェノールと反応させることによって合成した。ジアステレオマー混合物として得られた目的化合物はシリカゲルカラムで分離した。

TcGLIP はマルトース結合タンパク質との融合体として大腸菌で発現させ、アミロースレジンと陰イオン交換樹脂を用いて精製した。本酵素のピレスリン合成反応は、菊酸 CoA を *S*-ピレスロロンと反応させることで生じるピレスリン I を定量することで測定した。今回合成した化合物のうち、*p*-クロロベンジル基をもつホスホン酸エステルの立体異性間で活性を比較したところ、シリカゲル TLC で低極性側にスポットを与える化合物は、高極性側にスポットを与える化合物よりも高い TcGLIP 阻害活性を示し、1 μM 以下の濃度でも有意に本酵素のピレスリン合成活性を阻害した。本発表では、この情報に *p*-ブロモベンジル基およびアルキル基をもつホスホン酸エステル類の TcGLIP 阻害活性の情報を加え、構造活性相関を検討した結果を紹介する。

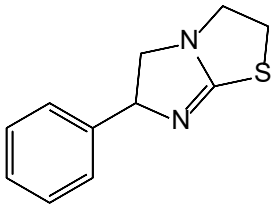
pyrethrin biosynthesis, phosphonates, GDSL lipase

発表責任者：松田一彦（kmatsuda@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：3D3a05
講演日時：3 月 26 日 09:44～ 1 号館 D3 会場

線虫ニコチン性アセチルコリン受容体のタイプ分類に関与する構造因子
Structural determinants of type classification of nematode nicotinic acetylcholine receptors
○二木 邦浩、重藤 渉、嶋田 翔太、野口 晃、伊原 誠、松田 一彦（近大院・農・応生化）
○ Kunihiro NIKI, Sho SHIGETOU, Shota SHIMADA, Akira NOGUCHI, Makoto IHARA, Kazuhiko MATSUDA (Fac. of Agri. Kindai Univ.)

【目的】神経作用性の殺線虫剤レバミゾール、モランテル（図 1）は、複数のタイプが存在する線虫のニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)の中でも L 型 nAChR に対して選択的にアゴニスト活性を示すことが知られているが、そのメカニズムは解明されていない。本研究では、この未解明の問題について線虫 *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*)の nAChR を用いて検討した。



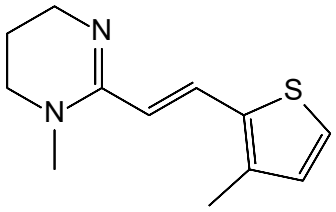


図 1. レバミゾール　　モランテル

【方法と結果】アフリカツメガエル卵母細胞に L 型および N 型の *C. elegans* の nAChR を発現させた。二電極膜電位固定法を用いてそれらに対する上記リガンドの作用を測定したところ、化合物は既報の通り L 型 nAChR に選択的にアゴニスト作用を示すのに対して、N 型 nAChR に対してはアンタゴニストとして作用した。これらの nAChR を構成するサブユニットのアミノ酸配列を比較したところ、nAChR をつくるほとんど全ての α サブユニットがオルソステリック部位（殺線虫剤結合部位）を構築する loop C に YXCC 配列（X は任意）をもつのに対して、L 型 nAChR をつくる α サブユニットは YXXCC 配列を有するという違いを見出した。これまでに我々は、係る YXCC 配列が殺虫剤ネオニコチノイドの昆虫選択的毒性発現機構の一部を担っていることを明らかにしている [1]。そこで *C. elegans* の N 型 nAChR を構成する ACR16 サブユニットの loop C の YDCC 構造を YPSCC 構造へと置換し、それによって ACR16 nAChR のアセチルコリン（ACh）と殺線虫剤に対する応答が影響を受けるのかどうか検討した。その結果、当該アミノ酸置換によって ACh に対する ACR16 の応答サイズは野生型の ACR16 のそれに比べて著しく抑制されたものの、この変異体に対してレバミゾール等の殺線虫剤はアゴニスト活性を示さなかったことから、今回注目した特殊な loop C の配列は、nAChR の機能構築に関与すると推察された。

1. M. Shimomura et al., *Neurosci. Lett.* **363**, 195-198 (2004)

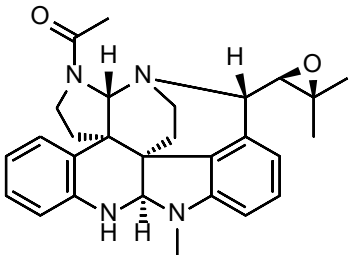
nematicide, nicotinic acetylcholine receptor, Caenorhabditis elegans

発表責任者：松田　一彦（kmatsuda@nara.kindai.ac.jp）

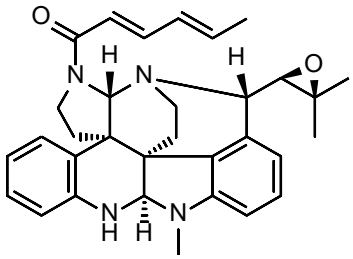
講演番号：3D3a06
講演日時：3 月 26 日 10:05～ 1 号館 D3 会場

コムネシン類と標的受容体の構造活性相関
Structure-activity relationships of communesins and their targets
○野口 晃[1]、村田 和也[1]、伊原 誠[1]、甲斐 建次[2]、林 英雄[2]、松田 一彦[1]([1]近畿大農、[2]阪府大農・生環科)
○ Akira NOGUCHI[1], Kazuya MURATA[1], Makoto IHARA[1], Kenji KAI[2], Hideo HAYASHI[2], Kazuhiko MATSUDA[1] ([1]Fac. of Agri., Kindai Univ., [2]Grad. Sch. Life Env. Sci., Osaka Pref. Univ.)

【目的】糸状菌が豆腐の搾りかすオカラで培養したときに作る二次代謝産物の中には昆虫活性を示すものがある。その一例であるコムネシン類はインドールアルカロイドで、隣接不斉 4 級炭素を含めて複雑な骨格をもつ。これまでに我々は、コムネシン類が昆虫の抑制性グルタミン酸受容体（GluCl）を選択的に活性化することを見出している。本研究ではこの活性に要するコムネシン類の構造活性相関を研究するとともに、GluCl 内の結合部位についても検討したので報告する。



コムネシンA



コムネシンB

【方法と結果】コムネシン類は *Penicillium expansum* MK57 株を培養したオカラ培地から液－液分配、シリカゲルカラムクロマトグラフイーおよび逆相分取 HPLC で精製した。一方昆虫の GluCl は、その cRNA をアフリカツメガエル卵母細胞にマイクロインジェクションすることで発現させた。GluCl に対するコムネシン類の活性化作用は、本作用で生じる GluCl 発現細胞での塩素電流の増加を二電極膜電位固定法で測定することで評価した。

コムネシン類の特徴として骨格の複雑さ以外に、N アシル基，N メチル基等がある。これらの部分構造の有無は GluCl 活性化作用に影響を与えることから、本受容体との相互作用に貢献していることが示唆された。コムネシン類の GluCl 活性化作用は *GluCl* 遺伝子の exon 3 のスプライシングの違いにより生じる GluCl の変化により大きな影響を受けなかったことから、exon 3 がコードする領域に結合しないと推察された。これまでにわれわれは、コムネシン類と同様に GluCl を活性化するオカラミンの場合、膜貫通領域の L319F 変異により活性を失うことを明らかにしている。そこで、コムネシン類の GluCl 活性化作用に対する L319F 変異の効果について検討したところ、本アミノ酸変異により活性はやや低下したもののコムネシン B は GluCl 活性化作用を維持した。このことから、コムネシン類はオカラミン類とは異なる様式で GluCl に結合するものと推察された。

communesin, structural activity relationship, ion channels

発表責任者：松田一彦（kmatsuda@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：3D3a07
講演日時：3 月 26 日 10:16～ 1 号館 D3 会場

ネオニコチノイドの選択毒性発現における Loop C の役割
Role of Loop C in its interactions with neonicotinoids
○嶋田 翔太、疋田 麻衣、重藤 渉、松本 祥太郎、谷河 純、伊原 誠、松田 一彦（近大院・農・応生科）
○Shota SHIMADA, Mai HIKIDA, Sho SHIGETOU, Shotaro MATSUMOTO, Jun TANIKAWA, Makoto IHARA, Kazuhiko MATSUDA (Fac, of Agri, Kindai Univ,)

【目的】イミダクロプリドに代表される殺虫剤ネオニコチノイドは昆虫のニコチン性アセチルコリン受容体（nAChR）に対して高選択的にアゴニスト・アンタゴニスト作用を示すことで、昆虫制御効果を発揮する。本剤は種子処理が可能であるため世界中に普及したものの、近年花粉媒介昆虫に対する影響に対する懸念から EU で一部の化合物の使用が禁止されている。本研究ではこのような現状と、ショウジョウバエ Dα1 サブユニットヒヨコ β2 サブユニットからなる nAChR が高ネオニコチノイド感受性を示すことを念頭に [1,2]、ネオニコチノイドと nAChR との相互作用における nAChR の loop C の YXCC 配列の役割について検討したので報告する。
【方法と結果】Dα1β2 nAChR は、それぞれのサブユニットをコードする cRNA をアフリカツメガエル卵母細胞にマイクロインジェクションすることにより機能的に発現させた。その際、サブユニット cRNA の混合比率を変えることで、$(D\alpha1)_3(\beta2)_2$ nAChR と $(D\alpha1)_2(\beta2)_3$ nAChR を構築した [1]。それぞれの nAChR に対するアセチルコリン（ACh）とネオニコチノイドのアゴニスト活性は膜電位固定法によりイオン電流として計測した。

Dα1 サブユニットのオルトステリック部位（アゴニスト結合部位）を構築する loop C は YSCC 配列をもち、その中のセリン残基がネオニコチニドのニトロ基あるいはシアノ基と水素結合することで Dα1β2 nAChR が高ネオニコチノイド感受性を示している可能性がある。そこで、Dα1 サブユニットの YSCC 配列のセリンをヒトの α4 サブユニット等の loop C で見られる YECC 配列に置換したところ、とくに $(D\alpha1)_3(\beta2)_2$ nAChR に対するイミダクロプリドおよびチアクロプリドのアゴニスト作用が顕著に低下したことから、loop C のセリンは以前われわれが Dα2 サブユニットを用いて主張したように、α サブユニットとの相互作用を通じてネオニコチノイドの選択毒性の発現に寄与していることが示唆された。しかしこの観察事実は、セリンをグルタミン酸へと置換したことによるアミノ酸残基の形状の増大あるいは負電荷の新たな付与に基づくものであって、セリンとネオニコチノイドとの間の水素結合の消失によるものではないかもしれない。そこで、当該セリンを水素結合ができないアラニンに置換したところ、ネオニコチノイドが誘起するアゴニスト作用のサイズは減少したものの、半数効果濃度はほとんど影響を受けないことが明らかとなった。

1. H. Ihara et al., *Br. J. Pharmacol.* **175**, 1999-2012 (2018).
2. M. Hikida et al., *Pestic. Biochem. Physiol.* **151**, 47-52 (2018).

nicotinic acetylcholine receptor, neonicotinoids, voltage clamp electrophysiology

発表責任者：松田一彦（kmatsuda@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：3D3a08
講演日時：3 月 26 日 10:27～ 1 号館 D3 会場

合成キノン類を用いた呼吸鎖複合体-I のキノン結合ポケットの構造特性の解明

Exploring the quinone binding pocket in respiratory complex I using synthetic quinone analogues

○宇野 晋平、村井 正俊、三芳 秀人（京大院農・応用生命）
○Shinpei UNO, Masatoshi MURAI, Hideto MIYOSHI (Kyoto University, Graduate school of Agriculture)

【背景・目的】ミトコンドリア呼吸鎖電子伝達系の初発酵素であるNADH-キノン酸化還元酵素（呼吸鎖複合体-I）は、基質の酸化還元と共役したプロトン輸送を行う膜タンパク質複合体であり、酸化的リン酸化（ATP合成）の基幹酵素である。複合体-Iの“鍵領域”であるキノン結合ポケットは多様な阻害剤の結合部位であり、同ポケットの構造と機能を解明することは、複合体-Iを標的とする医農薬の開発において重要である。複合体-IのX線結晶構造およびクライオEM構造を参照すると、キノン結合ポケットは、入口の内径が約3～5Å、奥行きが約30Åの狭く長い“チャンネル様”の構造をとり、化学的に多様な阻害剤は、全てこの空間に収容されると予想されている。ところが、我々がこれまでに実施した光親和性標識実験では、多様な阻害剤はキノン結合ポケットの近傍に結合するものの、必ずしもチャンネル内部には結合しない。また、チャンネルの内径よりもはるかに嵩高い分子が、キノン結合ポケット最深部に収容されることも報告してきた。本研究では、系統的に合成した人工キノン類を化学ツールとして用いることで、構造生物学から提唱されている“チャンネルモデル”を検証することを目的とした。

【方法・結果】チャンネルモデルによれば、キノン分子はチャンネル最深部に位置する鉄-硫黄クラスター（N2）まで接近して電子を受容し、“後退り” してチャンネルから出て行くと考えられている。そこで、ユビキノンの疎水性側鎖末端に、チャンネル内径よりも嵩高いブロックを結合させたキノン分子や（SF-UQ類、**図1**）、リン脂質とハイブリッドさせたキノン分子（PC-UQ類、**図1**）を合成した。これら人工キノン類のキノン環部は、立体障害のためにチャンネル最深部まで到達することはできないはずである。ところが予想に反して、SF-UQ類およびPC-UQ類はウシ心筋複合体-Iの電子受容体として機能し、その還元反応はプロトン輸送と共役していた。以上の実験結果は、チャンネルモデルとは対照的に、「**キノンや阻害剤の結合ポケットは、ダイナミックに構造変化でき、多様なリガンド分子を柔軟に収容できる**」ことを強く示唆している。

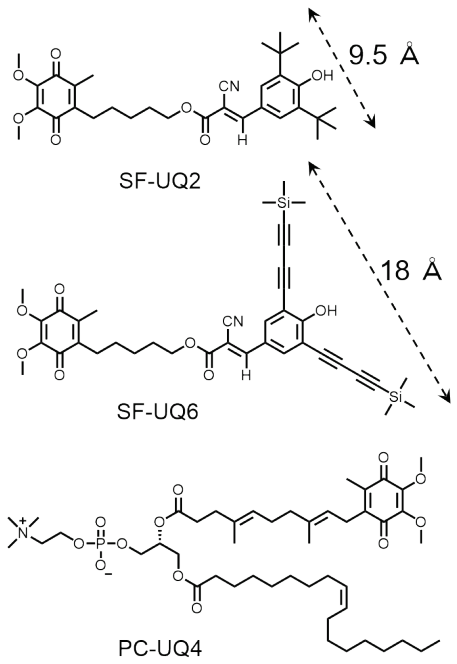


図 1. 合成キノンの構造

respiratory complex I, ubiquinone, mitochondria

発表責任者：三芳秀人（miyoshi@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3D3a09
講演日時：3 月 26 日 10:38～ 1 号館 D3 会場

ミトコンドリア呼吸鎖複合体-I におけるアミロライド類の結合部位の同定

Identification of the binding site of amilorides in respiratory complex I

○木村 洋則、村井 正俊、三芳 秀人（京大院農・応用生命）
○HIRONORI KIMURA, MASATOSHI MURAI, HIDETO MIYOSHI (Kyoto University, Graduate School of Agriculture)

【背景と目的】ミトコンドリア電子伝達系の初発酵素である呼吸鎖複合体-I（NADH-キノン酸化還元酵素）は、基質の酸化還元と共役したプロトン輸送を行う膜タンパク質複合体である。クライオ電顕で解かれたウシ心筋複合体-I の構造を参照すると、本酵素の“鍵領域”であるキノン結合ポケットは、入口の内径が約 3～5Å、奥行きが約 30 Åの狭く長い“チャンネル様”の構造をとり、化学的に多様な阻害剤は、全てこの空間に収容されると予想されている。しかし、我々がこれまでに実施した光親和性標識実験では、多様な阻害剤は“キノン結合チャンネル”の近傍に結合するが、必ずしもチャンネル内部には結合していない。

Na^+/H^+-アンチポーターの代表的な阻害剤であるアミロライド類は、複合体-I に対しても弱い阻害活性を示すことから、膜ドメインを構成するアンチポーター様サブユニット(ND2, ND4, ND5)に結合すると予想されて来た。しかし、当研究室での光親和性標識実験によって、キノン結合部位を構成する 49 kDa サブユニットに結合することが判明した。本研究では、光反応性アミロライド類を新たに合成し、その結合部位を詳細に解析することで、“**チャンネルモデル**”を検証することを目的とした。

【方法と結果】光反応性アミロライド（[^{125}I]PRA3～[^{125}I]PRA6）の構造を**図 1** に示した。ウシ心筋亜ミトコンドリア粒子を用いて光親和性標識実験を行ったところ、上記 4 化合物はキノン結合チャンネルを構成する 49 kDa (Asp41-Glu67)、PSST (Leu33-Tyr41)および ND1 サブユニット(Asp199-Lys262)に加え、チャンネルを構成していないはずの 39 kDa サブユニット (Thr227-Lys283)にも結合することがわかった。また、[^{125}I]PRA3～[^{125}I]PRA6 による標識は、複数の異なるタイプの阻害剤によって顕著に抑制された。以上の結果は、提案されているチャンネルモデルとは必ずしも一致しないことから、「**ユビキノンや阻害剤の結合ポケットは、ダイナミックに構造変化でき、多様なリガンド分子を柔軟に収容できる**」と考えた方が合理的である。

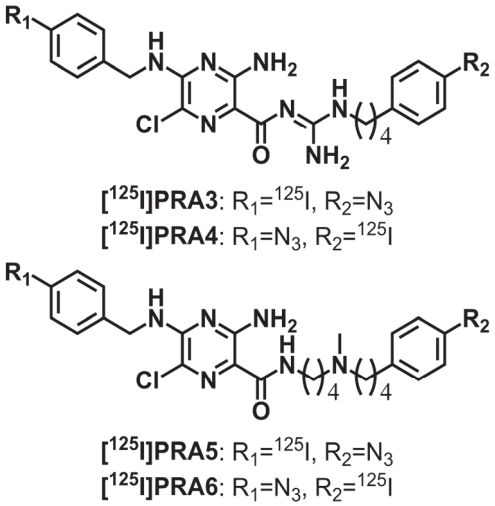


図 1．光反応性アミロライドの構造

respiratory complex I, amiloride (s), photoaffinity labeling

講演番号：3D3a10
講演日時：3 月 26 日 10:49～ 1 号館 D3 会場

ミトコンドリア呼吸鎖複合体-I からの活性酸素発生を抑制する化合物群（S1QEL 類）の作用機 構研究

Action manner of S1QELs, specific suppressors of superoxide production from mitochondrial respiratory complex I

○馬場 敦志、辻 諄人、木村 洋則、村井 正俊、三芳 秀人（京大院農・応用生命）
○Atsushi BAMBA, Atsuhito TSUJI, Hironori KIMURA, Masatoshi MURAI, Hideto MIYOSHI (Kyoto University,Graduate School of Agriculture)

【背景・目的】ミトコンドリアは酸化的リン酸化によってATPを生産する重要なオルガネラであるが、酸化的リン酸化に不可避の副産物として活性酸素を発生させ、様々な疾病や老化の亢進に関与する。近年の研究から、ミトコンドリアにおける活性酸素の主たる発生メカニズムは、コハク酸の過剰な蓄積に起因するNADH-キノン酸化還元酵素（呼吸鎖複合体-I）の逆反応（キノール酸化反応）に起因することが明らかになりつつある。

2016年、Buck研究所とNovartis財団研究所のチームは、ラット骨格筋ミトコンドリアを用いた一連のアッセイ系を確立し、複合体-Iからの活性酸素発生のみを特異的に抑制する低分子化合物群を発見した（**S1QEL類、図１**）。本化合物群は、活性酸素を発生源から遮断できる新規な薬剤シーズであると同時に、複合体-Iにおける活性酸素発生のメカニズムを解明する上での重要な化学ツールである。本研究では、S1QEL類の複合体-Iに対する影響を明らかにするために、光親和性標識実験によってS1QEL類の結合部位を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】報告されたS1QEL類のうち、チアゾール骨格を有する**AB-1～AB-3**、ピペラジン骨格を有する**AB-4**と**AB-5**の合計5種類を合成し、ウシ心筋複合体-Iに対する影響を精査した。その結果、全ての化合物が複合体-Iに対して阻害活性を示すものの、AB-1以外では、完全阻害には至らない（30～50%の酵素活性が残存する）というユニークな特徴が判明した。

最も強い阻害活性を示したAB-1(IC_{50} = 60 nM)について、光親和性標識プローブ**[^{125}I]PAB-1**（IC_{50} = 23 nM）を合成し、光親和性標識実験を行った。その結果、[^{125}I]PAB-1は複合体-Iのキノン結合ポケットの入り口を構成するND1サブユニットに特異的に結合することがわかった。また、興味深いことに、[^{125}I]PAB-1による標識は、アセトゲニンやキナゾリンなどの既存の阻害剤では抑制されなかった。**S1QEL類は、既存の複合体-I阻害剤とは異なるメカニズムで複合体-Iを阻害している**ことが強く示唆された。

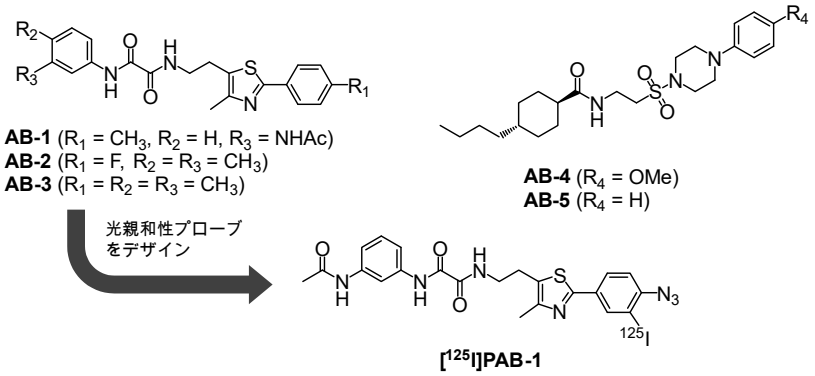


図 1. S1QEL 類縁体の構造.

respiratory complex I, mitochondria, reactive oxygen species

発表責任者：三芳秀人（miyoshi@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3D3a11
講演日時：3 月 26 日 11:10～ 1 号館 D3 会場

ペンテンジオール類は出芽酵母ミトコンドリア VDAC1 を特異的に阻害する
Pentendiol-type compounds specifically inhibit mitochondrial VDAC1 in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria

○運天 優歩[1]、村井 正俊[1]、一丸 直哉[1]、山本 武範[2]、篠原 康雄[2]、三芳 秀人[1]([1]京大院農・応用生命、[2]徳島大・先端酵素学研究所)
○ Yufu UNTEN[1], Masatoshi MURAI[1], Naoya ICHIMARU[1], Takenori YAMAMOTO[2], Yasuo SHINOHARA[2], Hideto MIYOSHI[1] ([1]Kyoto University, Graduate School of Agriculture, [2]University of Tokushima, Institute of advanced Medical Sciences)

【背景・目的】ミトコンドリア外膜に存在する電位依存性アニオンチャンネル（voltage-dependent anion channel 1、VDAC1）は、19 本の β シートで構成される分子質量約 30 kDa のバレル型タンパク質であり、ミトコンドリアと細胞質の間でのイオンや代謝物の出入りを制御している。さらに VDAC1 は、ミトコンドリア外膜や内膜に存在する様々なタンパク質と相互作用し、ミトコンドリアのエネルギー代謝に深く関わっているとされる。しかし、VDAC1 の機能全般に関する統一的な理解は得られていない。その要因として、VDAC1 に対する特異的阻害剤が発見されていなかったことが挙げられる。

我々は、出芽酵母ミトコンドリア外膜からの ADP/ATP 透過を指標に VDAC1 特異的阻害剤の探索を行い、ユニークなペンテンジオール構造を分子左端に持つ化合物群（**PTD 類、図 1**）が、ATP 排出を強く阻害することを見出した（例えば、**PTD-023**）。本研究では、PTD 類を鋳型としたリガンド分子を合成し、PTD 類の作用機構を解明することを目的とした。

【方法・結果】合成したリガンド分子(**tPTD-023**)の構造を**図 1** に示した。tPTD-023 は、いわゆる“トシル化学”を利用して、VDAC1 の PTD 結合部位近傍の求核性アミノ酸残基に末端アルキンを転移させることを意図して設計した。出芽酵母ミトコンドリアを tPTD-023 とインキュベートし、末端アルキンを足場としてクリックケミストリーによって蛍光発色団 TAMRA を導入した。その結果、tPTD-023 は、出芽酵母 VDAC1 に存在する 2 つのシステイン残基（C130 および C210）を約 1:5 の比率で特異的に化学修飾することが判明した。酵母 VDAC 1 の立体構造をモデル化すると、この 2 つのシステイン残基から等距離（約 16 Å）に存在する酸性アミノ酸残基（D139 および E152）が、PTD 類の必須構造である分子左端ジオール部分の水素結合パートナーとなる可能性が示唆された。そこで、この 2 残基をアラニン置換した VDAC1 二重変異体(D139A/E152A)を発現させた酵母ミトコンドリアを用いて ATP 排出活性を測定したところ、PTD-023 に対する感受性が顕著に低下することがわかった。

以上、我々は VDAC1 の特異的阻害剤の結合部位を、アミノ酸残基レベルで初めて明らかにした。

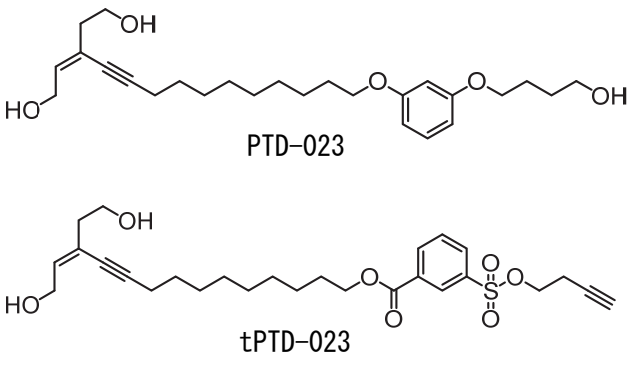


図 1. 本研究で用いた PTD 類の構造

voltage-dependent anion channel, mitochondria, ligand-directed tosylate chemistry

講演番号：3D3a12
講演日時：3 月 26 日 11:21～ 1 号館 D3 会場

エポキシシクロヘキセンジオン類によるミトコンドリア ADP/ATP 輸送体の凝集メカニズムの 解明

Mechanism of aggregation of mitochondrial ADP/ATP carrier induced by epoxycyclohexenedione-type compounds

○青山 綾希、村井 正俊、三芳 秀人 (京大院・農・応用生命)
○Ayaki AOYAMA, Masatoshi MURAI, Hideto MIYOSHI (Kyoto University)

【背景・目的】ミトコンドリア ADP/ATP 輸送体(AAC)は、ミトコンドリア内膜上で ADP と ATP の交換反応を行う分子質量約 30 kDa の膜輸送体であり、マトリックス側で生産された ATP を細胞質へ供給する役割を担っている。AAC は細胞のエネルギー代謝の要となる膜輸送体であるため、本輸送体の特異的阻害剤に関する研究は、エネルギー代謝を制御する新規な薬剤の開発研究に資するところが大きい。当研究室では、epoxycyclohexenedione 類（ECHD 類、AMM-59, 図 1）が、ウシ心筋 AAC のマトリックス側ループ領域に存在するシステイン残基(Cys57)と共有結合を形成することで、AAC を阻害することを見出した[*1*]。さらに、特筆すべき現象として、より高濃度(50-100 μM)の ECHD 類でウシ心筋ミトコンドリアを長時間（4 時間程度）処理すると、AAC の顕著な凝集が誘導されることが判明した。こうした凝集誘導は、BKA や CATR などの既知の AAC 阻害剤では認められない極めてユニークな現象である。本研究では ECHD 類による AAC の凝集誘導のメカニズムを明らかにすることを目指した。

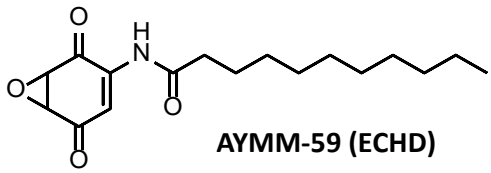


図 1. 代表的な ECHD 類(AMM-59)の構造.

【方法・結果】システイン修飾剤である *N*-エチルマレイミド（NEM）を用いて、AAC 表面上に存在する 3 箇所のシステイン残基（Cys57, Cys160, Cys257)全てを修飾したところ、ECHD 類による AAC の凝集誘導は完全に抑制されたことから、AAC の凝集はシステイン残基の修飾に起因することがわかった。一方、上記 3 箇所のシステイン残基のうち、Cys57 のみを NEM 修飾した場合、ECHD 類による AAC の凝集誘導が観察されたことから、残り 2 つのシステイン残基（Cys160, Cys257）が ECHD 類と共有結合を形成し、これが AAC 凝集のトリガーとなっていることが予想された。

ECHD 類と同じく求電子性反応基を持つ高度不飽和脂肪酸の過酸化分解物である 4-hydroxy-2-nonenal（4-HNE）は、AAC と共有結合を形成することが以前から報告されてきた。4-HNE のウシ心筋 AAC に対する効果を ECHD 類と比較したところ、ECHD 類と同様に、4-HNE も AAC のシステイン残基を選択的に修飾することがわかったが、高濃度 4-HNE 存在下での AAC の凝集誘導はおろか、AAC による基質輸送活性の阻害すら観察されなかった。したがって、AAC のシステイン残基の修飾によるヌクレオチド輸送の阻害や凝集誘導効果は、求電子性の疎水性分子に共通して見られる現象ではなく、ECHD 類で観察されるユニークな現象であることが判明した。

1) Aoyama *et al.* (2018) *Biochemistry* 57, 1031-1044.

ADP/ATP carrier, protein aggregation, mitochondria

講演番号：3D3a13
講演日時：3 月 26 日 11:32～ 1 号館 D3 会場

N-結合型糖鎖修飾における糖鎖調整能の解明に向けた新規ゴルジβ-ガラクトシダーゼ阻害剤の探索

Screening of Golgi β-galactosidase inhibitor for elucidating an ability of *N*-linked glycan regulation

○小野寺 千尋、袴田 航、平野 貴子、西尾 俊幸（日大院生資科）
○Chihiro ONODERA, Wataru HAKAMATA, Takako HIRANO, Toshiyuki NISHIO (Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon Univ.)

【目的】真核生物のタンパク質翻訳後修飾過程において、*N*-結合型糖鎖修飾は広範囲にわたって行われている。近年、多様な糖鎖解析手法の発展により、従来の *N*-結合型糖鎖修飾では十分に説明ができない糖鎖が見出されている。我々はヒト細胞内において、未解明な *N*-結合型糖鎖修飾が存在すると考え、ヒト培養細胞で加水分解されやすい β-ガラクトシダーゼ特異的蛍光基質の設計・合成を行い、ゴルジ体に新規な β-ガラクトシダーゼ活性を確認し、本酵素の *N*-結合型糖鎖修飾への関与を提案した（K. Miura *et al*, *Bioorg. Med. Chem.* **24**, 1369, 2016）。ヒト細胞内に存在する β-ガラクトシダーゼ遺伝子は *GLB1* 遺伝子のみであることから､我々は本遺伝子により生合成されたタンパク質が発見した β-ガラクトシダーゼ活性を示す可能性が高いと考えた。*GLB1* 遺伝子の産物は細胞老化マーカーとしてよく知られているリソソーム β-ガラクトシダーゼであり、本酵素は前駆体として生合成され、小胞体にてシグナル配列の N 末端（1-23 残基）・リソソームにて C 末端（531-677 残基）が除去され、成熟する。我々は、成熟過程においてゴルジ体に存在する precursor GLB1 (pGLB1、24-677 残基) が発見したゴルジ体 β-ガラクトシダーゼ活性を示し､ゴルジ体内においてコンプレックス型糖鎖およびハイブリット型糖鎖の調整に関与しているのではないかと仮定し、細胞内からの pGLB1 の単離および機能解明を目的として、pGLB1 に由来するゴルジ体 β-ガラクトシダーゼの阻害剤探索を実施した。
【方法・結果】pGLB1 がゴルジ体 β-ガラクトシダーゼ活性を有することを明らかとするため、リソソームで切断される 531-545 残基を抗原とする pGLB1 特異的抗体と蛍光基質を用いた細胞染色法により、pGLB1 の細胞内局在とゴルジ体 β-ガラクトシダーゼ活性の局在が一致することを確認した。次に、遺伝子組換えヒト型 pGLB1 (rhpGLB1、24–677 残基) を用いて、リソソームとゴルジ体を模した pH 条件下において、リソソーム β-ガラクトシダーゼ基質とゴルジ体 β-ガラクトシダーゼ基質を作用させた結果、rhpGLB1 はゴルジ体条件下でゴルジ体 β-ガラクトシダーゼ基質に対して高い加水分解活性を示すことを確認した。さらに、ゴルジ体 β-ガラクトシダーゼ阻害剤探索ための、ヒト培養細胞を用いた Cell-based 阻害アッセイ系および rhpGLB1 を用いた *in vitro* 阻害アッセイ系を構築し、天然化合物ライブラリより阻害剤探索を行った。その結果、イソフラボン誘導体を pGLB1 阻害剤の最終ヒット化合物として選抜した。得られた阻害剤について Cell-based および *in vitro* での再評価を行った結果、両アッセイ系において適度な阻害活性を確認することができた。今後は、本阻害剤の構造展開により、更に高い阻害活性を有する化合物の開発を試みる。

Inhibitor screening, N-glycan processing, β-Galactosidase

発表責任者：袴田 航（hakamata.wataru@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3D3a14
講演日時：3 月 26 日 11:43～ 1 号館 D3 会場

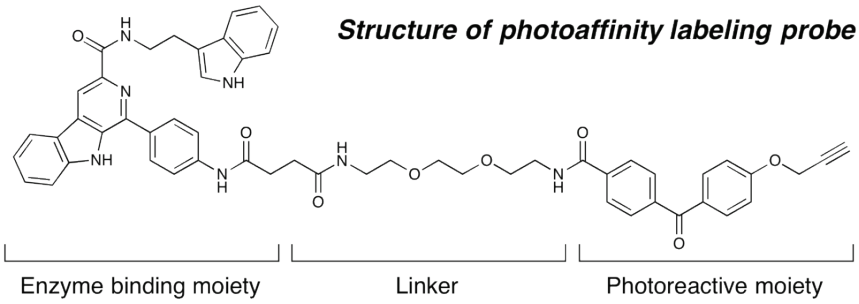
光親和性標識法による抗ウイルス活性を有する小胞体グルコシダーゼ II 阻害剤の作用ユニットの同定

Identifying a subunit of endoplasmic reticulum glucosidase II inhibitor with antiviral activity by photoaffinity labeling method.

○竹本 佑平[1]、恩田 桃子[2]、袴田 航[1,2]、平野 貴子[1,2]、西尾 俊幸[1,2] ([1]日大生資科・生命化、[2]日大院生資科)
○Yuhei TAKEMOTO[1], Momoko ONDA[2], Wataru HAKAMATA[1,2], Takako HIRANO[1,2], Toshiyuki NISHIO[1,2] ([1]Chem. and Life Sci., College of Bioresource Sciences. Nihon Univ., [2]Graduate school of Bioresource Sciences, Nihon Univ.)

【目的】新興・再興ウイルス感染症が世界的な問題となっているが、抗ウイルス薬は限られており、様々なウイルス感染症に有効である抗ウイルス剤が強く求められている。これまでに我々は、抗ウイルス薬の標的酵素として小胞体グルコシダーゼ II（GII）を選択し、GII 阻害剤の探索を行い、カルボリンを母核とする GII 阻害剤を見出し、AR400 シリーズと命名した。AR400 シリーズ化合物の合成法は報告されていたなかったため、構造展開可能な合成法を確立し、購入した化合物を含め 37 種類の誘導体を調整した。これらの誘導体の GII 阻害活性を評価した結果、AR407 が最も阻害活性が高く、さらに、その細胞内での GII 阻害活性を *N*-結合型糖鎖の網羅的な測定により解析したところ、細胞内にて、AR407 が GII を阻害していることを確認した。更に、AR407 は既知 GII 阻害剤の 5 倍の抗ウイルス活性を示すことを明らかにした。今後、AR407 を抗ウイルス剤として展開するには、GII 阻害活性向上が必要となる。そこで、AR400 シリーズ化合物と GII 結晶構造のドッキングモデルの構築・評価に基づいた構造展開により、GII 阻害活性の向上を行うこととした。しかしながら、GII はヘテロダイマー構造であり、AR407 が活性部位を含むαサブユニット・糖鎖認識部位を含むβサブユニットのどちらに結合しているのか明らかになっていない。そこで、AR407 をプローブとした光親和性標識法により、AR407 がどちらのサブユニットに結合するか明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】GII の光親和性標識プローブとして、右下の化合物を設計した。本プローブは酵素結合物部位として AR407、光反応性基としてベンゾフェノンを選択し、それらをリンカーで接続した構造とした。プローブの合成は、L-トリプトファンメチルエステル塩酸塩と 4-ニトロベンズアルデヒドから、カルボリン骨格を構築した。得られたカルボリンのメチルエステルをカルボキシ基とした後にトリプタミンを導入し AR407 部分を合成した。得られた化合物のニトロ基をアミノ基に還元し、コハク酸と Azido-PEG$_2$-Amine をリンカーとし導入、末端のアジド基を還元しアミノ基とした後に光反応性基としてベンゾフェノンを導入した。今後は、本プローブを用いて光親和性標識法を行い、ウエスタンブロッティング法により AR407 がどちらのサブユニットに結合するか明らかにする予定である。



glucosidase, N-linked glycan, photoaffinity labeling

発表責任者：袴田 航（hakamata.wataru@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3D3a15
講演日時：3 月 26 日 11:54～ 1 号館 D3 会場

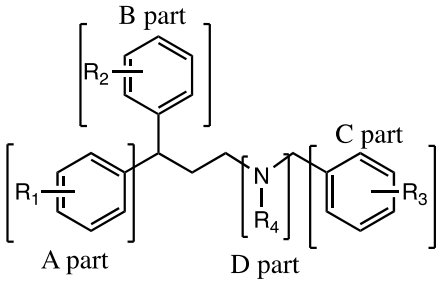
がん幹細胞の抑制を可能とするゴルジ体マンノシダーゼ阻害剤の開発

Development of a Golgi mannosidase inhibitor with possibility to be suppressed of cancer stem cells.

○加納 結衣[1]、小山 亮祐[2]、菊島 香織[1]、袴田 航[1,2]、平野 貴子[1,2]、西尾 俊幸[1,2] ([1]日大生資科・生命化、[2]日大院生資科)
○ Yui KANO[1], Ryousuke KOYAMA[2], Kaori KIKUSHIMA[1], Wataru HAKAMATA[1,2], Takako HIRANO[1,2], Toshiyuki NISHIO[1,2] ([1]Chem. and Life Sci., College of Bioresource Sciences. Nihon Univ., [2]Graduate school of Bioresource Sciences, Nihon Univ.)

【目的】がん幹細胞とは自己複製と分化した細胞を作る能力を合わせ持った幹細胞の性質をもつ細胞であり、がん腫瘍においては、がん幹細胞の周囲を通常のがん細胞が覆っていると言われている。そのため、既存の抗がん剤ではがん幹細胞の周囲に存在するがん細胞にしか作用せず、がん幹細胞が生存することにより、がんが再発する可能性が高い。そこで我々は、細胞同士の接着に関与する細胞表面タンパク質上の *N*-結合型糖鎖を介した細胞間コミュニケーションに着目した。この *N*-結合型糖鎖は多数の酵素により小胞体からゴルジ体にかけて生合成されている。その中でも、ゴルジ体マンノシダーゼ I (GMI) の阻害は『阻害により生じた未成熟糖鎖が細胞表面に輸送され細胞間コミュニケーションを阻害する』ことが報告されている。本知見に基づき、がん腫瘍に GMI 阻害剤を作用させ、がん幹細胞を覆う通常がん細胞の表面糖鎖を未成熟とし、それらの細胞間コミュニケーションを阻害することによって、がん腫瘍から通常がん細胞を取り除きがん幹細胞を露出させ、露出したがん幹細胞を既存の抗がん剤により抑制する抗がん戦略を確立することを本研究の目的とした。

【方法と結果】本研究の目指す抗がん戦略の遂行には GMI 阻害剤が必要となるが、既知 GMI 阻害剤は、GMI の基質であるマンノースの誘導体であり、親水性が高く薬剤作用濃度が高い・構造中に不斉中心が多く構造展開が困難等の医薬品とするには構造的な問題を多く抱えている。本問題点を解決するため、化合物ライブラリから新規 GMI 阻害剤の探索を行った結果、抗がん剤である Tamoxifen および Raloxifene、抗炎症剤である Sulindac、さらに新規化合物である AR500 の合計 4 種の GMI 阻害剤を見出した（*Chem. Pharm. Bull*., **66**, 678-681, 2018)。しかしながら、AR500 の合成法の報告は完全ではなかったため、AR500 の構造展開が可能な有機合成法を確立し、下図の A～C parts の構造を変化させた 9 種類の新規 AR500 シリーズの合成を行った。これらの合成した化合物をヒト培養細胞に投与し、細胞表面のハイマンノース型糖鎖の量を蛍光標識コンカナバリン A を用いて定量し、GM 阻害活性を見積もった。その中で最も高いハイマンノース型糖鎖の蓄積を示した AR524 を選抜し、構造中のアミン（D part）の重要性を明らかにするために、アミンのアセチル体とベンゾイル体の合成を行った。それらのヒト細胞に対する細胞毒性を調べた結果、細胞毒性が大幅に低下していたことから、今後は GM 阻害活性との相関を調べる予定である。



AR500 シリーズの母核構造

Golgi mannosidase inhibitor, N-linked oligosaccharide, cancer stem cell

発表責任者：袴田　航（hakamata.wataru@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3D3p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ 1 号館 D3 会場

機能性高分子の ε-poly-L-lysine 修飾による細胞内送達法の確立
Intracellular delivery of macromolecules modified with ε-poly-L-lysine
○武内 大和[1]、牛丸 和乗[1]、加藤 康夫[2]、丸山 千登勢[1]、濱野 吉十[1]([1]福井県大院・生物資源、[2]富山県大・生工研セ)
○ Yamato TAKEUCHI[1], Kazunori USHIMARU[1], Yasuo KATO[2], Chitose MARUYAMA[1], Yoshimitsu HAMANO[1] ([1]Fukui Pref. Univ., [2]Biotechnol. Res. Cent., Toyama Pref. Univ.)

【目的】放線菌 *Streptomyces albulus* によって生産される ε-poly-L-lysine（ε-PL）は、25～35 残基の L-lysine が直鎖状につながった天然のポリカチオンである。これまでに我々は、ε-PL の生合成メカニズムを解明しており（*Nat. Chem. Biol.*, 4, 766, 2008）、ε-PL 合成酵素の基質特異性を応用利用することで、様々なアルコール分子を ε-PL のカルボキシル基末端にエステル結合で導入できることを見出した。さらに、ε-PL 生産菌をアルコール含有培地で培養するだけで、ε-PL のカルボキシル基末端に種々のアルコールを導入することが可能である。実際に、ε-PL に azide 基を有するアルコールも極めて簡単に導入することができた。得られた ε-PL-PEG_4-azide は、azide 基を介したクリックケミストリーを利用して様々な分子と結合させることができる。ポリカチオン性の ε-PL は、その化学的特性から生体膜透過性が期待されるバイオポリマーであるが、それが実証された報告例はない。そこで、蛍光色素である FAM を azide 基を介して ε-PL で化学修飾したところ、ε-PL は速やかに動物細胞の細胞膜を透過して細胞内に送達することを視覚的に確認できた。そこで本研究では、ε-PL-PEG_4-azide が種々機能性分子に生体膜透過性を付与できる化学修飾分子として利用できるか検証した。

【方法と結果】タンパク質や酵素、そして抗体などの高分子化合物は、通常、生体膜を透過しない。そこで、これらを ε-PL-PEG_4-azide で化学修飾することで生体膜透過性を付与できるか、蛍光タンパク質 monomeric Azami Green（mAG）をモデル高分子化合物として検証した。組換え酵素として得た mAG に対して 1 当量の dibenzylcyclooctyne (DBCO)-PEG-NHS エステルを加え、mAG の酵素表面に化学的に DBCO 基を導入した。さらに、1 当量の ε-PL-PEG_4-azide を加え、azide/DBCO のクリックケミストリーを介して mAG を ε-PL で化学修飾した。得られた ε-PL-PEG_4-azide/DBCO-PEG-mAG の細胞膜透過性を HeLa 細胞で確認したところ、未修飾の mAG と比較して、顕著な細胞膜透過性が確認された。また、ATP 依存的なエンドサイトーシスが起こらない低温環境下（4℃）においても細胞内への取り込みが観察されたことから、他の塩基性ペプチドと同様にエンドサイトーシスとは異なる経路で細胞内に送達されることが示唆された。さらに現在、ε-PL 修飾した酵素が細胞内で正常に機能するか、Cre recombinase をモデルとして検証を進めており、その結果についても報告する。

cell penetrating peptide, polycation, drug delivery

発表責任者：濱野吉十（hamano@fpu.ac.jp）

講演番号：3D3p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ 1 号館 D3 会場

ユビキチンリガーゼ Rsp5 遺伝子変異酵母株を用いた塩ストレスに対する生育回復活性物質のスクリーニング

Screening for the growth-restoring activity against the Rsp5 mutant yeast involving ubiquitin ligase in the presence of the salt stress

○松浦 秀太郎[1]、栗澤 尚瑛[2]、西谷 直之[3]、高木 博史[4]、木村 賢一[1,2] ([1]岩手大・農、[2]岩手大院・総合科学、[3]岩手医大薬・情報薬科学、[4]奈良先端大・バイオサイエンス)
○Syutaro MATSUURA[1], Naoaki KURISAWA[2], Naoyuki NISHIYA[3], Hiroshi TAKAGI[4], Ken-ichi KIMURA[1,2] ([1]Iwate Univ. of Agric., [2]Grad. Sch. of Arts and Sci. Iwate Univ., [3]Iwate Medical Univ. of Pharm., [4]Grad. Sch. of Biol. Sci., NAIST.)

【目的】酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の *rsp5*^{A401E} 株は、ユビキチンリガーゼ Rsp5 に機能欠損（Ala401Glu）が生じている変異株である。本株は、ストレスなどで細胞内に生成する異常タンパク質の修復・分解能が低下しているため、種々のストレスに高い感受性を示す[1)]。このユニークな性質を利用して新規な生物活性物質の探索を試みたところ、高温（37℃）ストレスでは免疫抑制剤のカルシニューリン阻害剤 FK506[2)]が、また、プロリンの毒性アナログである L-azetidine-2-carboxylic acid（AZC）ストレスにおいては、電子伝達系複合体Ⅲ阻害剤 antimycin A[3)] がそれぞれ *rsp5*^{A401E} 株の生育回復活性を示した。これらの結果から、同じ酵母を用いても異なるストレスを与えることで、異なるメカニズムの生物活性物質が探索できることから、本研究では塩ストレスの場合について同様に検討した。
【方法】塩ストレスとして LiCl を用い、条件検討により菌数を 4.2 x 10^5 cells/mL、LiCl の濃度を 0.2 M と決定した。本研究室が所有する植物・食材を中心とした約 1,000 種の天然資源抽出物については 4 μg/spot、また、化合物ライブラリーとして化学療法基盤支援活動 標準阻害剤キット 328 種、並びに Prestwick Chemical Library（FDA 医薬品キット）1,120 種と、それぞれ 2 pmol/spot、1 nmol/spot し、28℃、3 日間培養した後の生育円の有無を観察した。
【結果】天然資源抽出物には *rsp5*^{A401E} 株の生育回復活性が認められなかったが、標準阻害剤キットからは小胞体ストレスの誘導、ペプチドグリカン合成阻害、並びにタンパク質の糖鎖修飾阻害などが知られている tunicamycin が、また FDA 医薬品キットからは、抗リウマチ薬の leflunomide がそれぞれ生育回復活性を示した。Tunicamycin は 25 ng/spot まで、leflunomide は 1.25 μg/spot までそれぞれ生育円が観察でき、tunicamycin の活性が leflunomide よりも約 50 倍強かった。さらに、生育円の表現型は異なるとともに、tunicamycin は高温と AZC の両ストレスにおいて 0.2 μg/spot でも活性を示さなかったことから、LiCl ストレスに対する特異性が確認できた。そこで、tunicamycin のどの活性が生育回復活性に関与しているか各種薬剤を用いて調べた。その結果、thapsigargin や 2-deoxy-D-glucose など他の小胞体ストレス誘導剤では、2.5 μg/spot でも生育回復活性を示さなかった。また、同じヌクレオシド系抗生物質で、強力なペプチドグリカン合成阻害を示す liposidomycin 類でも、阻止円のみ確認され生育円は観察されなかった。現在、糖鎖修飾阻害剤の活性や leflunomide について解析を行っている。

1) C. Hoshikawa, *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*., **100**, 11505-11510 (2003), 2) S. Uesugi, *et al*., *FEMS Yeast Res.*, **14**, 567-574 (2014), 3) R. Watanabe, *et al*., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, submitted.

rsp5^{A401E} strain, Salt stress, tunicamycin

発表責任者：木村賢一（kimurak@iwate-u.ac.jp）

講演番号：3D3p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ 1 号館 D3 会場

遺伝子変異酵母株の生育回復活性を用いたスペイン産とドイツ産琥珀に含まれる生物活性物質の単離精製と同定

Biologically active compounds isolated and identified from Spanish and German ambers using the growth-restoring activity against the mutant yeast

○井上 奈々[1]、下田 希[1]、越野 広雪[2]、Menor-Salvan Cesar[3]、木村 賢一[1]（[1]岩手大院・総合科学、[2]理研 CSRS、[3]University of Alcala）
○Nana INOUE[1], Nozomu SHIMODA[1], Hiroyuki KOSHINO[2], Cesar MENOR-SALVAN[3], Ken-ichi KIMURA[1] ([1]Grad. Sch. of Arts and Sci. Iwate Univ., [2]RIKEN CSRS, [3]Univ. of Alcala)

【目的】Ca^{2+}シグナル伝達に関わる遺伝子変異酵母 YNS17 株の生育回復活性を用いて、久慈産琥珀（9000～8600 万年前）から、新規抗アレルギー物質 kujigamberol (15,20-dinor-5,7,9-labdatrien-18-ol) を始めとする新規生物活性物質を単離し、一方でロシア産、ドミニカ産、ミャンマー産琥珀からは、現代の植物や他の琥珀にも含まれる既知物質のみがそれぞれ単離できた [1-3]。そこで、久慈産琥珀からのみ新規物質が単離できる謎を解くため、スペイン産琥珀（11200～11000 万年前）[4]とドイツ産琥珀（4500 万年前）について、新たにケミカルバイオロジーの視点で比較分析を行なうこととした。
【方法】久慈産、ロシア産、ドミニカ産、ミャンマー産、スペイン産、並びにドイツ産の琥珀の固体を同様の条件下で粉末化し、メタノールで 3 日間抽出した。生物活性は、0.3M $CaCl_2$を含む YPD 培地で 28℃、3 日間培養した際の YNS17 株の生育回復活性を指標とした。HPLC 分析は、ODS カラムで 80%、あるいは 90% MeOH-0.1% CH_3COOH で行なった。細胞毒性活性にはヒト急性前骨髄性白血病細胞 HL60 を用い、脱顆粒抑制活性は、ラット好塩基球性白血病細胞 RBL-2H3 で A23187 刺激により放出されるβ-hexosaminidase 活性を測定した。
【結果・考察】各国の琥珀のメタノール抽出効率は、琥珀の年代の新しさに比例していた。YNS17 株における活性は、久慈産、ロシア産、ドミニカ産、ミャンマー産で表現型が異なっており、実際に生物活性物質の構造もそれぞれ異なっている [2]。一方、スペイン産とドイツ産琥珀の場合は、久慈産琥珀の表現型と類似していた。そこで、HPLC で活性ピークの同定を進めたところ、スペイン産、ドイツ産の琥珀には kujigamberol は含まれていないが、HPLC のパターンでは、スペイン産とミャンマー産は類似している一方、ドイツ産はいずれとも異なっていた。また、中生代の琥珀のバイオマーカーである amberene 類 [4,5]は、久慈産、ミャンマー産、並びにスペイン産琥珀にのみ認められた。さらに HL60 細胞に対する細胞毒性を調べたところ、ドイツ産琥珀が最も強い一方で、RBL-2H3 細胞における脱顆粒抑制活性はドミニカ産琥珀が最も強い傾向を示した。このことは、含まれている 3-cleroden-15-oic acid などの活性の強さを反映しているものと思われる [3]。

1)K. Kimura, *et al.*, Fitoterapia, **83**, 907 (2012), 2)K. Kimura, J. Antibiot. (review), submitted., 3)T. Abe, *et al.*, Fitoterapia, **113**, 188 (2016), 4) C. Menor-Salván, *et al.* Org Geochem. **93**, 7 (2016), 5)T. Kawamura, *et al.*, Org. Geochem., **120**, 12 (2018)

Spanish and German Amber, Kujigamberol, amberene

発表責任者：木村　賢一（kimurak@iwate-u.ac.jp）

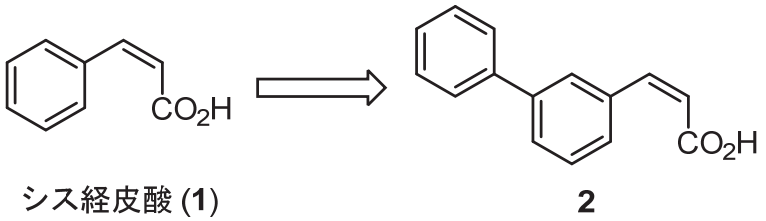
講演番号：3D3p05
講演日時：3 月 26 日 14:34～ 1 号館 D3 会場

重力屈性阻害作用を示すシス桂皮酸誘導体プローブの合成

Synthesis of Molecular Probes about Antigravitropic Analog of *Cis*-cinnamic Acid

○古澤 佑貴[1]、岩田 隆幸[2]、新藤 充[2] ([1]九大総理工、[2]九大先導研)
○Yuki Furusawa[1], Takayuki Iwata[2], Mitsuru Shindo[2] ([1]IGSES, Kyushu Univ., [2]IMCE, Kyushu Univ.)

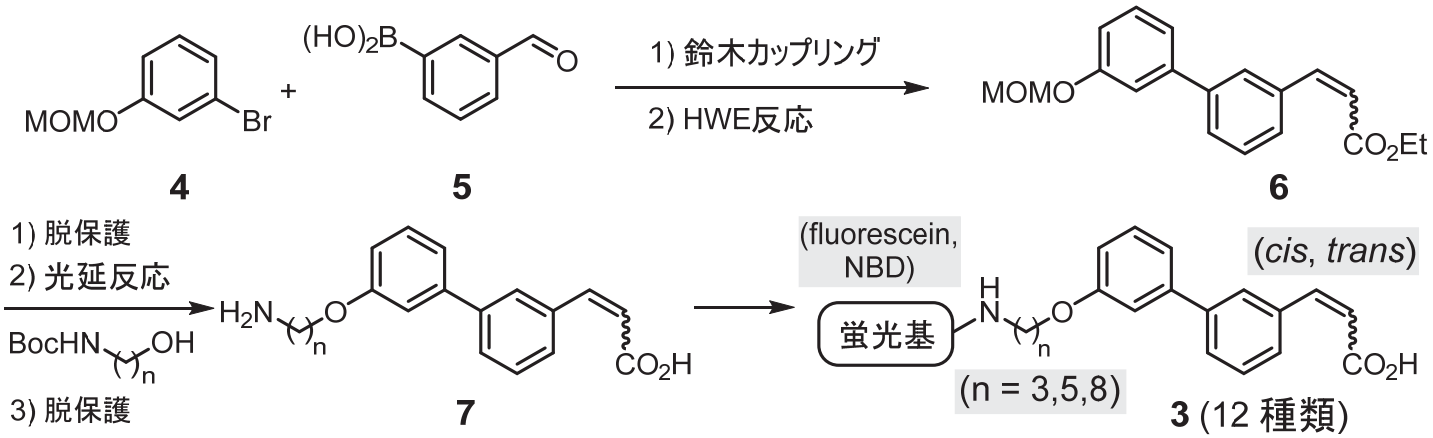
シス経皮酸**(1)**はユキヤナギ由来のアレロケミカル（植物多感作用分子）の活性本体として報告されており、植物に対する顕著な伸長阻害活性を示す[1]。発表者らは **1** の構造活性相関研究[2]の過程で、誘導体 **2** が植物の根の重力屈性を顕著に阻害することを明らかとした[3]。そこで、本研究では **2** の重力屈性阻害作用の作用機序解明を目的として、分子プローブの設計および合成について検討した。



シス経皮酸 (1)　　2

（伸長阻害活性）　　（重力屈性阻害活性）

誘導体 **2** の植物内での局在を調べるため、発表者らの構造活性相関研究の結果に基づき蛍光プローブ **3** を設計した。プローブ **3** の合成では、まず臭化物 **4** とホウ酸 **5** の鈴木カップリングを行った後、Horner-Wadsworth-Emmons 反応によってオレフィン **6** へと誘導した。MOM 基の脱保護後、光延反応を用いてアミノアルコールをリンカーとして導入し、さらに２段階の脱保護を経て、アミノ基への蛍光基の導入を行った。結果として、シスおよびトランス異性体それぞれについて、リンカー３種類、蛍光基２種類を導入することで計 12 種類の蛍光プローブを得た。各プローブを用いた蛍光イメージング実験からは、シス体プローブでのみ根の先端部位での染色が見られた。



(1) S. Hiradate, Y. Fujii, at al., *J. Chem. Ecol*. **2005**, *31*, 591. (2) M. Shindo, et al., *Phytochemistry*, **2012**, *84*, 56.; *Phytochemistry*, **2013**, *96*, 132.; *Phytochemistry* **2013**, 96, 223. (3) manuscript in preparation

gravitropism, *cis*-cinnamic acid, molecular probes

講演番号：3D3p06
講演日時：3 月 26 日 14:55～ 1 号館 D3 会場

プラディミシン A との複合体形成におけるマンノースの環内酸素原子の寄与

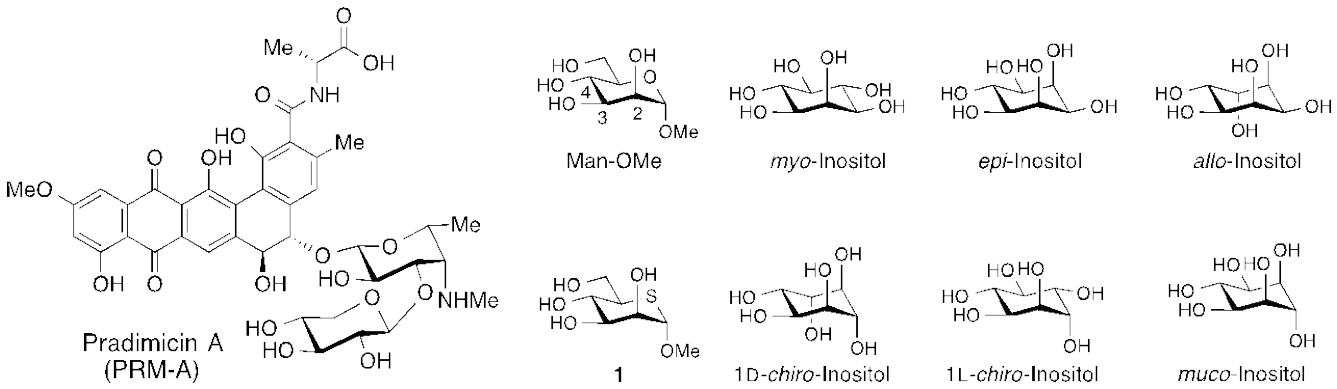
Contribution of the endocyclic oxygen atom of D-mannose to its complex formation with pradimicin A

○渡邉 泰典[1]、小鹿 一[1]、菅原 貴弘[2]、相田 美砂子[2]、五十嵐 康弘[3]、伊藤 幸成[4]、中川 優[1,4] ([1]名大院・生命農、[2]広大院・理、[3]富山県大・生工、[4]理研)

○Yasunori WATANABE[1], Makoto OJIKA[1], Takahiro SUGAWARA[2], Misako AIDA[2], Yasuhiro IGARASHI[3], Yukishige ITO[4], Yu NAKAGAWA[1,4] ([1]Nagoya Univ., [2]Hiroshima Univ., [3]Toyama Pref. Univ., [4]REKEN)

【目的】 放線菌由来の Pradimicin A (PRM-A) は，Ca^{2+} 存在下で D-マンノース (Man) を認識するユニークな抗生物質である．最近，我々は X 線結晶構造解析と固体 NMR 解析から得られた情報に基づいて PRM-A と Man の結合様式を計算化学的に予測し，PRM-A/Ca^{2+}/Man 複合体モデルを提唱している．本モデルにおいては，Man のピラノース環内酸素原子が Ca^{2+} の配位水と水素結合を形成して複合体を安定化しているが，Man の環内酸素原子の役割に関する実験的知見はなく，その妥当性は不明である．そこで本研究では，methyl α-D-mannopyranoside (Man-OMe) の 5-チオ体 (**1**) とイノシトールを用いて，PRM-A との結合における Man の環内酸素原子の重要性を検証した．

【方法および結果】 水分子との相互作用をモデルとして Man-OMe と **1** の水素結合能を密度汎関数法で評価したところ, **1** の環内硫黄原子の水素結合能は Man-OMe の環内酸素原子よりも低いことが予測された．この計算結果を受けて，PRM-A に対する **1** の結合能を抗真菌試験，凝集試験および等温滴定カロリメトリー試験で評価したところ，いずれの試験においても **1** は Man-OMe よりも低い結合活性を示した．さらに，環内酸素原子をもたないイノシトール 6 種を用いて同様の結合試験を行なった．その結果，いずれのイノシトールも，PRM-A との結合に重要な Man の 2, 3, 4 位水酸基の空間的配置をミミックできるにも関わらず，PRM-A と全く結合しなかった．以上の結果は，Man の環内酸素原子が PRM-A との複合体形成に寄与していることを示しており，我々の提唱している複合体モデルを支持するものである．



antibiotic, carbohydrate recognition, pradimicin

講演番号：3D3p07
講演日時：3 月 26 日 15:06～ 1 号館 D3 会場

Cherimolacyclopeptide E の全合成と生物活性評価
Total synthesis and biological evaluation of cherimolacyclopeptide E

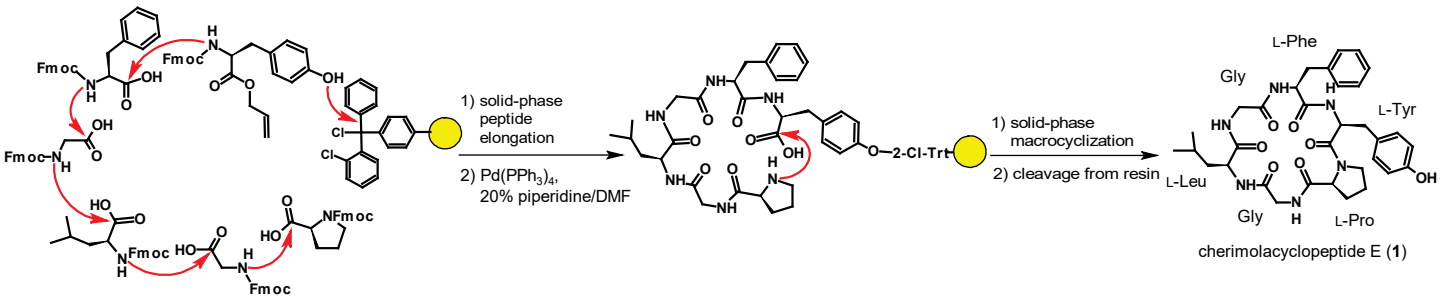
○吉田 優香、増田 裕一（三重大生物資源）
○Yuka YOSHIDA, Yuichi MASUDA (Mie Univ. of bioresources.)

【目的】

Cherimolacyclopeptide E (**1**) は、バンレイシ科植物のチェリモヤ (*A. cherimola*) の種から単離・構造決定された 6 残基の環状ペプチドであり、ヒト口腔類表皮癌由来の KB 細胞に対して強い細胞毒性を示す (IC_{50} 0.02 μM) [1]。Shaheen らは **1** の固相全合成を報告しているが、その NMR データは天然物のものと一致せず、がん細胞株に対する毒性も弱かった [2]ことから、天然物の構造が提唱されたものとは異なることを考えた。本研究では、全合成によって cherimolacyclopeptide E の化学構造を解明するとともに、活性を評価することを目的とした。

【方法・結果】

まず、提唱構造 **1** の全合成に着手した。Fmoc-L-Tyr-OAll の側鎖のヒドロキシ基を 2-Cl-trityl chloride resin に担持させ、Fmoc 固相法によりペプチド鎖を伸長した後、固相上で環化反応を行った。その後、ペプチド鎖の resin からの切り出しを行うことで、**1** の全合成を達成した。我々が合成した **1** の NMR データは、Shaheen らのデータ [2]とは一致せず、天然物のもの [1]とよい一致を示したことから、天然物の構造提唱された通り **1** であることが確認された。しかしながら、合成した **1** の細胞毒性を、KB 細胞を用いた MTT アッセイにより評価したところ、細胞毒性はほとんど示さなかった (IC_{50}>100 μM)。



【引用文献】
1) Wélé, A. *et al.*, *Phytochemistry*, **2005**, *66*, 2376-2380.
2) Shaheen, F. *et al.*, *J. Nat. Prod.*, **2012**, *75*, 1882-1887.

cyclic peptide, solid phase total synthesis, biological evaluation

講演番号：3D3p08
講演日時：3 月 26 日 15:17～ 1 号館 D3 会場

シフォナキサンチン代謝産物の抗炎症作用の評価と作用メカニズムの解明

Anti-inflammatory activities and molecular mechanisms of three metabolites of siphonaxanthin

○真鍋 祐樹、新多 智明、菅原 達也（京大院農）
○Yuki MANABE, Tomoaki NITTA, Tatsuya SUGAWARA (Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【目的】演者らは、海洋生物に由来するものを中心に、様々なカロテノイドを単離精製し、その生物活性や健康機能性の探索を進めている。そのなかで、海ぶどう（クビレズタ）やミルなどの緑藻類に含まれるシフォナキサンチン（SPX）に強い炎症抑制作用を見出した。さらに、SPX はマウス体内において少なくとも 3 種類の代謝産物へと変換されることを見出し、NMR を用いた化学構造解析などから、それらが SPX の酵素酸化物であることをつきとめた。また、マウス体内における SPX と代謝産物の存在比は臓器毎に異なり、SPX よりも代謝産物の方が多く蓄積している臓器も認められた。したがって、個体における SPX の抗炎症作用をより深く理解するためには、SPX 代謝産物が炎症反応に与える影響を調べる必要があると考えられた。そこで本研究では、培養細胞モデルを用いて SPX 代謝産物の炎症抑制作用を評価し、さらにその作用メカニズムを明らかにすることを目的とした。
【方法】マウスまたはラットの肝臓ホモジネートを用いて 3 種類の SPX 代謝産物を調製した。ヒト単球様細胞株 THP-1 をモデルとして用い、Toll 様受容体（TLR）リガンドや炎症性サイトカインなどによって惹起した炎症反応に対する抑制作用を評価した。また、ヒト肝がん由来細胞株 HepG2 を用いて、SPX 代謝産物の Nrf2 活性化作用を調べた。
【結果と考察】TLR リガンドとして Pam_3CSK_4、poly(I:C)、LPS の 3 種類を、炎症性サイトカインとして TNF-α、IL-1β、IFN-γの 3 種類を、さらにその他の刺激剤として終末糖化産物とホルボールエステルを用いて炎症反応を惹起し、それぞれに対する抑制作用を評価したところ、SPX 代謝産物は SPX よりも強い抑制活性を示すことがわかった。特に Pam_3CSK_4 によって誘導される転写因子 IRFs の活性化を強く抑制したため、このシグナル伝達経路に注目して作用メカニズムを解析した。化学構造と抑制活性を比較したところ、SPX のエンドグループに存在するα,β-不飽和カルボニル構造が重要と考えられた。α,β-不飽和カルボニル構造は PPARγに対するリガンド活性や Nrf2 活性化作用に重要との報告があり、PPARγアゴニストや Nrf2 活性化剤には抗炎症作用が報告されている。そこで、PPARγアンタゴニストや Nrf2 阻害剤が SPX 代謝産物の IRFs 転写抑制作用に与える影響を調べたところ、Nrf2 阻害剤である ML385 や AEM1 によって、その抑制活性が著しく減弱された。さらに HepG2 細胞を用いたルシフェラーゼアッセイによって、SPX 代謝産物が Nrf2 を活性化することを見出した。以上のことから、SPX 代謝産物は Nrf2 の活性化を介し、SPX よりも強い抗炎症作用を示すと考えられた。

carotenoid, anti-inflammatory, Nrf2

発表責任者：真鍋　祐樹（yuukim@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3D3p09
講演日時：3 月 26 日 15:28～ 1 号館 D3 会場

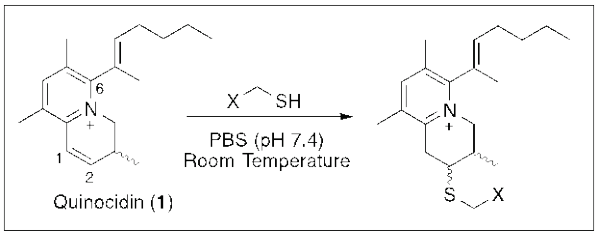
細胞毒性とチオール捕捉能を有する Quinocidin の構造活性相関研究

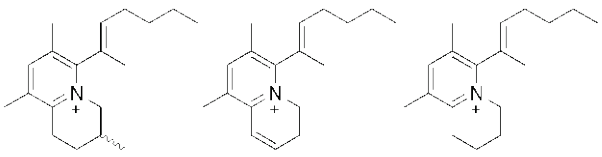
Structure-activity relationship study of Quinocidin with cytotoxicity and this-trapping activity

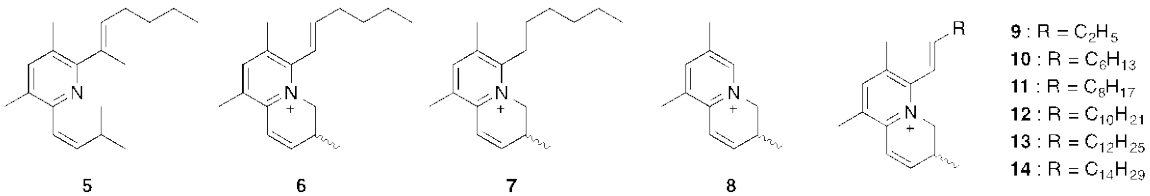
○中川 優、澤木 裕紀、小鹿 一（名大院・生命農）
○Yu NAKAGAWA, Yuki SAWAKI, Makoto OJIKA (Nagoya Univ.)

放線菌由来の Quinocidin (**1**) は, 天然では極めて稀な 3,4-dihydroquinolizinium 骨格を有し, HeLa-S3 細胞に対して顕著な毒性を示す (IC_{50} = 0.63 μM)[1]。我々は，**1** が中性水溶液中でチオールと付加反応を起こすことを見出したが, 本チオール捕捉能が **1** の細胞毒性に関与しているかどうかは不明である。そこで本研究では，1, 2 位二重結合を飽和したアナログ (**2**) の HeLa-S3 細胞に対する毒性とチオール捕捉能を評価し，これら二つの相関を評価した。さらに，**1** の 3,4-dihydroquinolizinium 環および 6 位アルケン側鎖を構造改変したアナログを系統的に合成し, 細胞毒性における **1** の構造活性相関を詳細に調べた。

3,5-Lutidine を出発原料として **2** を合成し，2-mercaptoethanol に対する反応性を評価したところ，付加反応は全く進行しないことが確認された。その一方で，**2** は HeLa-S3 細胞に対して **1** と同等の毒性を示したことから, **1** の細胞毒性とチオール捕捉能との間に相関はないことが明らかになった。さらに 3,4-dihydroquinolizinium 環を改変したアナログにおいて，pyridinium 環を有する **3** および **4** が **1** と同等の毒性を示したのに対して，pyridine 環を有する **5** が不活性であったことから，**1** の細胞毒性には pyridinium 部分が重要であることが示唆された。一方，6 位アルケン側鎖を改変したアナログ (**6~14**) に関しては，側鎖の炭素数が多いほど強い細胞毒性がみられたことから，**1** の細胞毒性がアルケン側鎖の疎水性に依存していることが明らかになった。







1) Nakagawa, Y. *et al. Chem. Eur. J.* **2017**, 23, 17894.

antibiotic, structure-activity relationship, quinocidin

発表責任者：中川　優（yu@agr.nagoya-u.ac.jp）

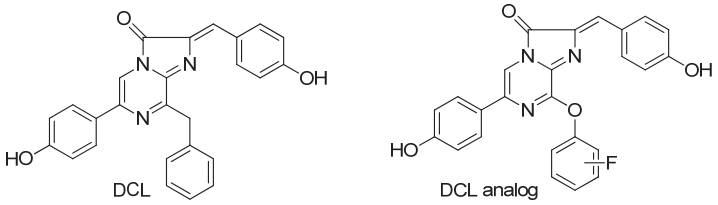
講演番号：3D3p10
講演日時：3 月 26 日 15:39～ 1 号館 D3 会場

デヒドロセレンテラジン(DCL)および DCL 誘導体の化学合成

Synthesis of DCL and DCL analogs

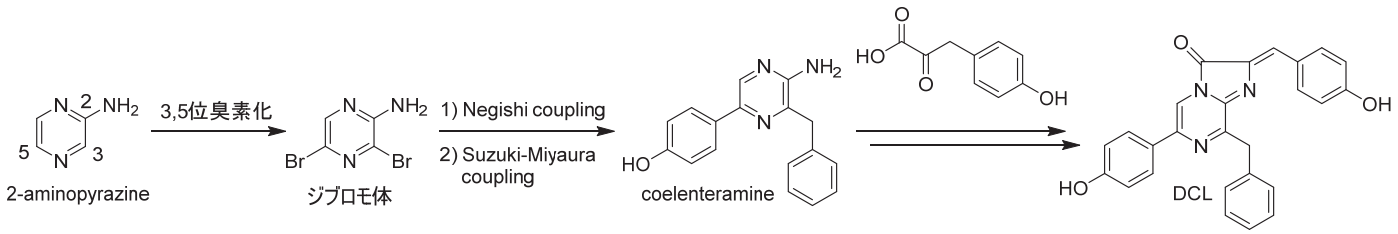
○森口 舞子[1]、滝川 浩郷[2]、久世 雅樹[1] ([1]神戸大院農、[2]東京大院農生科)
○Maiko MORIGUCHI[1], Hirosato TAKIKAWA[2], Masaki KUSE[1] ([1]Kobe Univ., [2]Tokyo Univ.)

【目的】発光タンパク質（フォラシン）はデヒドロセレンテラジン（DCL）を基質として利用し、活性部位のシステイン残基が DCL と結合したクロモフォア（発光を司る化学構造）を形成し、活性酸素種の刺激で発光する。しかしながらその詳細な発光機構については未解明のままである。詳細な発光機構や構造活性相関を解明するためには、発光基質である DCL および DCL 誘導体を効率よく合成する方法が必要不可欠である。そこで本研究では DCL および DCL 誘導体の効率的な化学合成法の確立を目的とした。



【方法】市販の 2-アミノピラジンの 3 位と 5 位を臭素化しジブロモ体へと誘導した後、２つの臭素の反応性の差を利用し、先に根岸カップリング反応を行い、次いで鈴木－宮浦クロスカップリング反応を行うことで、DCL の前駆体であるセレンテラミンを短段階で合成できると考えた。

【結果】2-アミノピラジンからジブロモ体を合成し、3 位選択的なカップリング反応を行った後に、鈴木－宮浦クロスカップリング反応を行うことでセレンテラミンの合成に成功した。最後にセレンテラミンとピルビン酸とを縮合し、わずか５段階で DCL を合成した。従来のセレンテラミン誘導体の総収率は 10%程度であったが、60%程度にまで向上させることに成功した。同様の合成戦略を用いて DCL の 8 位をエーテル酸素で置換した DCL 誘導体の合成にも成功した。



total synthesis, pholasin, dehydrocoelnterazine

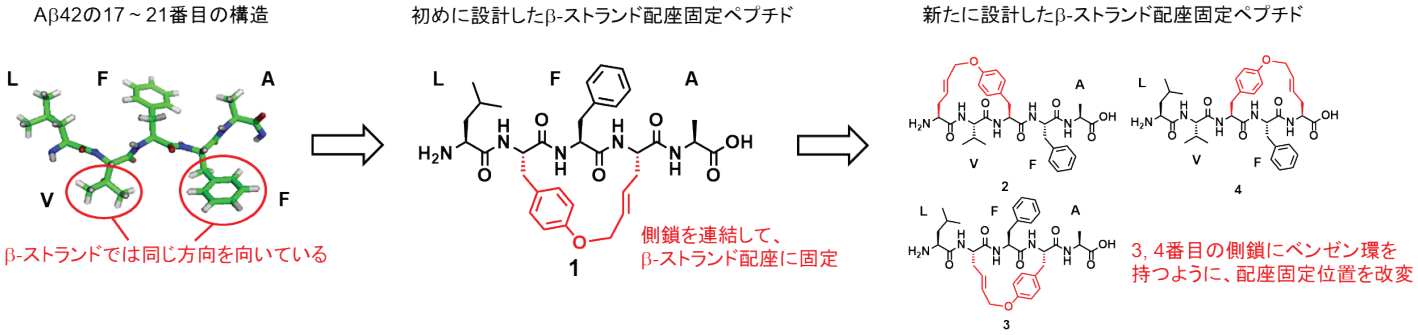
講演番号：3D3p11
講演日時：3 月 26 日 16:00～ 1 号館 D3 会場

アミロイドβの凝集を阻害するβ-ストランド配座固定ペプチドの設計と合成 ： ベンゼン環と配座固定の位置の検討

Design and synthesis of β-strand-fixed peptides inhibiting aggregation of amyloid β : Investigation of position of conformational fixation and benzene ring

○田中 郁也、柴田 果奈、増田 裕一（三重大院生物資源）
○Fumiya TANAKA, Kana SHIBATA, Yuichi MASUDA (Grad. Sch. Bioresources, Mie Univ.)

【背景・目的】
アルツハイマー病因ペプチドである 42 残基のアミロイドβ (Aβ42) は、分子間β-シートを形成して凝集し，神経細胞毒性を示す。Aβ42 の分子間β-シートに結合し、その伸長を阻害する短鎖ペプチドはβ-シートブレーカーペプチド (BSBp) と呼ばれ [1]，アルツハイマー病治療薬の候補として期待されている。我々はこれまでに、Aβ42 凝集体のβ-シートに含まれる 17 ~ 21 番目のアミノ酸配列 (LVFFA) (図・左) を基に、同じ方向を向いている側鎖どうしを連結させることにより [2]、β-ストランド配座に固定したペプチド **1** (図・中央) を設計・合成した。**1** は Aβ42 の凝集を強く阻害したことから、β-ストランド配座固定は BSBp の Aβ42 凝集阻害能を向上させることが示唆された [3]。この知見を基に、ベンゼン環とβ-ストランド配座固定の位置に着目した新たな BSBp の設計・合成を研究目的とした。
【方法・結果】
Aβ42 の凝集には、F19 と F20 の 2 つのベンゼン環による分子間π/ π相互作用が重要な駆動力となっている。しかしながら、以前に設計した **1** はベンゼン環の位置が 2, 3 番目の側鎖となっており、 LVFFA の配列を完全には模倣できていない。そこで、5 残基のペプチドの 3, 4 番目の側鎖にベンゼン環を有する、β-ストランド配座固定ペプチド **2**-**4** を設計した (図・右)。**2**-**4** の合成は、環化位置のアミノ酸側鎖にアリル基を持つペプチドを、液相ペプチド合成法により 5 残基まで伸長させた後、オレフィンメタセシス反応で環化することにより行った。現在、新たに合成したペプチドの Aβ42 凝集阻害活性の評価をチオフラビン T 法により行っている。



【参考文献】
1) Soto, C. *et al*., *Nat*. *Med*. **1998**, *4*, 822.
2) Abell, A. D. *et al*., *J*. *Org*. *Chem*. **2009**, *74*, 4354.
3) 田中 郁也, 柴田 果奈, 増田 裕一, 日本農芸化学会 中部支部 第 183 回例会, ポスター番号 38

amyloid ß, ß-strand, Alzheimer's disease

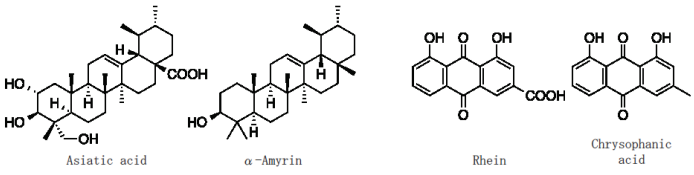
講演番号：3D3p12
講演日時：3 月 26 日 16:11～ 1 号館 D3 会場

アミロイドβの毒性オリゴマー形成阻害能を有する生薬化合物のカルボキシ基の役割

Role of the carboxy groups of herbal compounds that inhibit the formation of the toxic oligomers of amyloid ß

○堀井 詩織[1]、村上 一馬[1]、花木 瑞穂[1]、粟野 達也[2]、高部 圭司[2]、川瀬 泰司[3]、廣瀬 賢治[3]、入江 一浩[1] ([1]京都大学農学研究科食品生物科学、[2]京都大学農学研究科森林科学、[3]日本ウォーターズ)
○Shiori HORII[1], Kazuma MURAKAMI[1], Mizuho HANAKI[1], Tatsuya AWANO[2], Keiji TAKABE[2], Taishi KAWASE[3], Kenji HIROSE[3], Kazuhiro IRIE[1] ([1]Kyoto Univ. of Agric. Food Science, [2]Kyoto Univ. of Agric. Forest and Biomaterials Science, [3]Waters)

【背景・目的】アルツハイマー病（AD）の原因物質の一つと考えられているアミロイド β（Aβ42）は分子間 β シート構造を取ることにより凝集（オリゴマー化）し、最終的に線維化する。重合核依存性凝集モデル[1)] では、凝集過程は 2 段階に分けられ、Aβ モノマーが重合核（毒性オリゴマー）を形成する「核形成過程」と、重合核を起点としてモノマーが連続的に結合する「線維伸長過程」が存在する。毒性オリゴマーに至る核形成過程を阻害する化合物は、AD 予防に有効であり、食品や生薬はその探索源として注目されている。当研究室ではこれまでに、抑肝散に含まれるウンカリン酸 C が核形成過程を特異的に抑制し、その活性には 28 位のカルボキシ基が関与していることを明らかにした[2)]。本研究では、様々な生薬由来化合物の核形成過程抑制活性を比較することによって、カルボキシ基の寄与を検証するとともに、LC-MS およびイオンモビリティ質量分析法（IM-MS）を用いて、Aβ42 の何量体が作用標的であるのかを詳細に調べた。



【方法・結果・考察】HFIP（ヘキサフルオロイソプロピルアルコール）処理した Aβ42 を用いて、凝集能をチオフラビン T（Th-T）蛍光法および電子顕微鏡によって評価した。Th-T 試験では 10 分間隔で 24 時間連続測定を行った。まず、トリテルペンカルボン酸・アシアチン酸とトリテルペンアルコール・α-アミリンを、それぞれ核形成阻害能に着目して比較したところ、カルボキシ基の重要性が明らかになった。またアントラキノイド骨格をもつレイン（カルボキシ基あり）とクリソファン酸（カルボキシ基なし）の比較より、カルボキシ基は高い平面性を有する骨格に結合した場合、核形成抑制だけでなく線維伸長抑制にも一部寄与していることが判明した。これら Th-T 試験の結果と電子顕微鏡の観察結果は概ね一致した。さらに IM-MS 測定において、アシアチン酸は Aβ42 の 2 量体および 4 量体と、レインは 4 量体とそれぞれ付加体を形成することにより、オリゴマー形成を阻害することが示唆された。一方、それぞれのカルボキシ基をもたない対照化合物は、Aβ42 のオリゴマー形成にほとんど影響を与えなかった[3)]。以上より、カルボキシ基は主として核形成阻害に関与しているが、その強さや特異性は各々の母核構造に依存しているものと考えられる。

1) Naiki, H. et al., Yakugaku Zasshi, 2010, 130, 503; 2) Yoshioka, T., et al., J. Nat. Prod. 2016, 79, 2521; 3) Murakami, K., et al., Chem. Commun. 2018, 54, 6272.

amyloid ß, Alzheimer's disease, aggregation

講演番号：3D3p13
講演日時：3 月 26 日 16:22～ 1 号館 D3 会場

アミロイドβ42 の毒性オリゴマーに対する核酸アプタマーの開発研究と脳組織染色への応用

Nucleic acid aptamers that recognize the toxic oligomer of Aß42 and their application to histochemistry

○村上 一馬[1]、小畑 弥生[1]、関川 あさ[1]、上田 遥[1]、泉尾 直孝[2]、粟野 達也[1]、高部 圭司[1]、清水 孝彦[2]、入江 一浩[1]（[1]京大農、[2]千葉大医）

○Kazuma MURAKAMI[1], Yayoi OBATA[1], Asa SEKIKAWA[1], Haruka UEDA[1], Naotaka IZUO[2], Tatsuya AWANO[1], Keiji TAKABE[1], Takahiko SHIMIZU[2], Kazuhiro IRIE[1] ([1]Kyoto Univ. of Agric., [2]Chiba Univ. of Med.)

【研究背景】 アルツハイマー病 (AD) の原因物質の一つであるアミロイド β42 (Aβ42) の凝集経路には，フィブリルに至る過程と，球状構造体やプロトフィブリル (PF) などのオリゴマーを形成する過程の少なくとも 2 種類が存在する．近年 Aβ42 の毒性本体は，フィブリルではなくオリゴマーであるとする「オリゴマー仮説」が広く受け入れられている．本研究グループの入江らは，毒性コンホマーからなる毒性オリゴマーを形成しやすい E22P-Aβ42 に着目して，オリゴマー化に重要な C 末端の 40 番目において L,L-2,6-diaminopimelic acid (DAP) で架橋した 2 量体モデル（下図）を合成した.[1)] 本モデルは，準安定なオリゴマーを形成することにより，神経細胞毒性を示した．近年，一本鎖からなる核酸アプタマーは，様々な高次構造を取ることによって，標的に対して高い選択性と結合性を示す機能性核酸として注目されている．本研究では，Aβ42 の毒性オリゴマーの一つである PF に対する核酸アプタマーを，試験管内人工進化法（SELEX 法）を用いて開発し，各種 *in vitro* および *in vivo* 実験によって，毒性オリゴマーに対する特異性を詳細に調べた．

【方法と結果】まず，PF に対する DNA アプタマーの選抜をカラム法（固相–液相反応）で行ったところ，DNA プールの濃縮は見られたが，モノクローン化には至らなかった．そこで，より多様性の大きい RNA アプタマーの選抜を，溶液状態におけるメンブレンフィルター法（液相–液相反応）で試みた結果（下図），7 ラウンド後に結合活性が増大した．クローニングの結果，フィブリルにはほとんど結合せず，PF に強く結合する 3 種のモノクローン (E22P-AbD-4, 31, 43) を得た．バイオレイヤー干渉実験より，最も結合能が強かった E22P-AbD-43 アプタマー (K_D = 154 nM) は，WT-Aβ42 と E22P-Aβ42 のモノマー (K_D = 80.0, 49.8 nM) と比べて，E22P-Aβ42 のダイマー (K_D = 19.7 nM) に対して強い結合活性を示した．興味深いことに，チオフラビン S 蛍光試験において, E22P-AbD-43 は Aβ42 のフィブリル化を促進した．さらに AD モデルマウスの脳切片を E22P-AbD-43 で染色すると，PF 等に由来する diffuse deposits が検出されたのに対して, フィブリルからなる老人斑は染まらなかった．一方，Aβ42 の N 末端を認識する市販抗体 (82E1) は老人斑を染色した．これらのクローンは, Aβ42 の毒性オリゴマーに対する初めての核酸アプタマーであり，脳組織のオリゴマーを捉えたことから，AD 治療における新しい核酸医薬になる可能性がある．

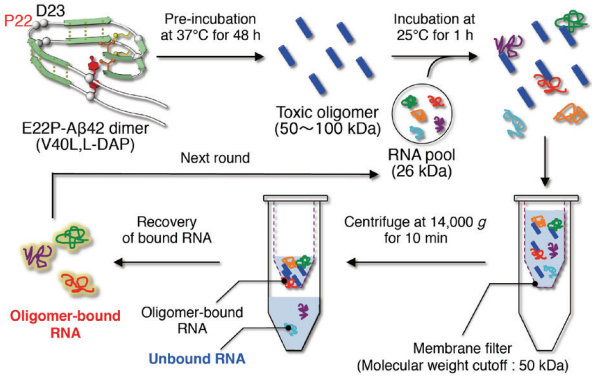


図 RNA アプタマーの選抜

【参考文献】 1) K. Murakami *et al., Sci. Rep.*, **6**, 29038 (2016)

amyloid ß, aptamer, Alzheimer's disease

講演番号：3D3p14
講演日時：3 月 26 日 16:33～ 1 号館 D3 会場

分子内ジスルフィド結合形成によるアミロイドβ42 の毒性配座モデルの合成と機能解析

Synthesis and biochemical characterization of the toxic-conformer models of amyloid ß42 by intramolecular disulfide bond formation

○松島 由佳[1]、村上 一馬[1]、花木 瑞穂[1]、粟野 達也[1]、高部 圭司[1]、柳田 亮[2]、入江 一浩[1]([1]京大院農、[2]香川大農)
○Yuka MATSUSHIMA[1], Kazuma MURAKAMI[1], Mizuho HANAKI[1], Tatsuya AWANO[1], Keiji TAKABE[1], Ryo YANAGITA[2], Kazuhiro IRIE[1] ([1]Kyoto Univ. of Agric., [2]Kagawa Univ. of Agric.)

【目的】アルツハイマー病は，加齢に伴う脳内へのアミロイド β (Aβ) タンパク質の蓄積を特徴とする. Aβ は 36~43 残基のペプチドであり, Aβ42 はその中で特に高い凝集性および神経細胞毒性を示す. 以前は Aβ が凝集し線維化したフィブリルが毒性本体と考えられていたが, 近年は凝集中間体である可溶性の Aβ オリゴマーが毒性本体と考えられている．本研究グループのこれまでの研究により, Aβ42 は Glu22, Asp23 付近でターン構造をもつ毒性コンホマーを形成することにより，高い凝集性および神経細胞毒性を示すことが明らかになった [1)]．その際，Tyr10 と Met35 の接近によって効率的に産生されるラジカルが，Aβ42 の神経細胞毒性に寄与することも示唆されている [2)]. 本研究では，毒性コンホマーを特異的に認識する抗体や核酸試薬の開発に向けて，分子内ジスルフィド結合形成による各種毒性配座固定アナログの合成を目的とした.

【方法と結果】 毒性コンホマーモデルならびに Aβ42 フィブリルの構造解析結果に基づき，Aβ42 の特定の 2 残基を Cys または homoCys に置換した各種変異体を Fmoc 法で固相合成し, DMSO 酸化により分子内ジスルフィド結合を形成させた．まず，4 種のペプチド［A21homoCys,V24C-Aβ42 (**1**), F19C,A30homoCys-Aβ42 (**2**), Y10C,M35homoCys-Aβ42 (**3**), V12C,G33C-Aβ42 (**4**)］を合成し, Th-T 試験, Western blot 法および透過型電子顕微鏡観察により凝集性を, MTT 試験により SH-SY5Y 細胞に対する神経細胞毒性を調べた．その結果，毒性コンホマーを模した **1** は野生型 Aβ42 と同等の神経細胞毒性を示し, 野生型よりも高い凝集性を示した. また, Aβ42 のフィブリル構造を模した **2** は, 野生型 Aβ42 と同様のフィブリルを形成したが, 毒性は弱かった．一方，**4** は毒性を示さなかったが，準安定なオリゴマーを形成した．さらに，ラジカル産生に重要な Tyr10 と Met35 の位置で架橋した **3** の凝集性および毒性は非常に低かった．これらの結果より，**1** および **4** は抗体や核酸医薬を開発する上で有用なモデルになりうると考え，Aβ42 の Val12 と Gly33 を架橋した配座固定アナログと，Ala21 と Val24 を架橋した配座固定アナログについて，Cys と homoCys の組み合わせを系統的に検討した．前者については, Cys 同士で架橋した場合と Val12 を Cys に, Gly33 を homoCys に置換して架橋した場合にのみ準安定なオリゴマーを形成したが，いずれの組み合わせにおいても神経細胞毒性は示さなかった．後者の組み合わせについては現在検討中である.

【文献】 1) Masuda, Y. *et al., ChemBioChem* **2009**, *10*, 287-295.
2) Murakami, K. *et al., ChemBioChem* **2007**, *8*, 2308-2314.

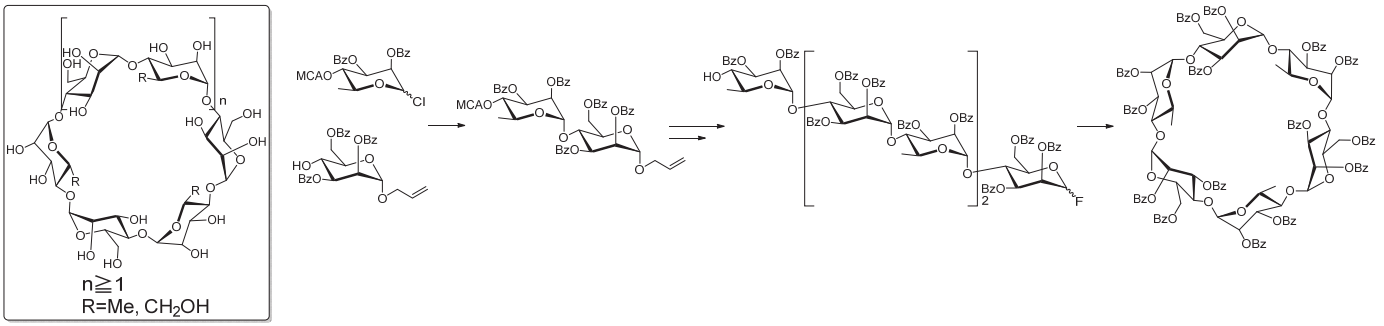
amyloid ß, Alzheimer's disease, disulfide bond

発表責任者：入江一浩（irie@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3D4a01
講演日時：3 月 26 日 09:00～ 1 号館 D4 会場

D-体と L-体の糖を構成成分とするシクロデキストリン類縁体の合成研究
Synthetic study of cyclodextrin analogues consists of D- and L-sugars
○後藤 楠太[1]、河原 直子[2]、井上 裕香[2]、勝田 亮[3]、矢島 新[3]、石神 健[3]、額田 恭郎[3] ([1]東農大院・農、[2]東農大・応生、[3]東農大・生命)
○Kenta GOTO[1], Naoko KAWAHARA[2], Yuuka INOUE[2], Ryo KATSUTA[3], Arata YAJIMA[3], Ken ISHIGAMI[3], Tomoo NUKADA[3] ([1]Graduate School of Agriculture, Tokyo Univ. of Agric., [2]Faculty of Applied Biosciences, Tokyo Univ. of. Agric., [3]Department of Chemistry for Life Sciences and Agriculture, Tokyo Univ. of. Agric.)

【背景・目的】環状オリゴ糖であるシクロデキストリンは包接という特徴的な機能を有しており、食品、化粧品、医薬品などの多くの分野での利用が研究されている。現在知られている環状オリゴ糖は D 体のみからなるものがほとんどであり、L 体のみ、あるいは D 体と L 体を組み合わせた化合物の合成例は極めて少ない。特に、D 体と L 体を組み合わせた環状糖はシクロデキストリンとは異なり、傾斜の無い円筒状の構造を有することが Stoddart らによって報告[1)]されており、環状糖における新しい可能性を秘めている。彼らの手法は、異なる糖数の環状糖を同時に合成することにおいて有効であるが、ラムノースを含まない場合、環化よりも糖鎖の伸長が優先されることが示唆されている。そこで我々は、D−マンノースと L−ラムノース、または D−マンノースと L−マンノースからなる環状糖の古典的手法による合成法の確立と、物性の解明を目的として研究を開始した。
【結果】L−ラムノースより誘導した糖供与体と D−マンノースより誘導した糖受容体の銀トリフラートを用いたグリコシル化により二糖を合成した。続いて、得られた二糖を糖供与体及び糖受容体の双方へと誘導し、同様のグリコシル化により四糖を合成した。さらに四糖の糖受容体への誘導、二糖供与体とのグリコシル化を経て、直鎖六糖を得た。得られた六糖の還元末端をフッ素化し、三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体を用いた環化により 30%の収率で六糖環化体の合成に成功した。現在は環化の収率の改善と、より長鎖での環状糖の合成を行っている。



1) P. R. Ashton, S. J. Cantrill, G. Gattuso, S. Menzer, S. A. Nepogodiev, A. N. Shipway, J. F. Stoddart*, and D. J. Williams, *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 1299-1314.

synthesis, cyclodextrin analogues, glycosylation

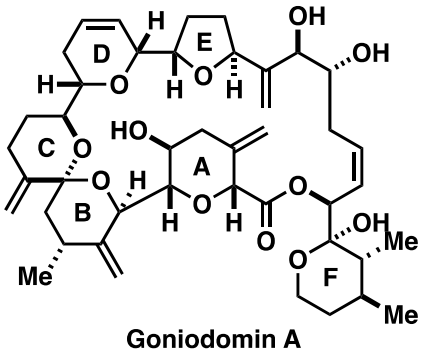
発表責任者：額田　恭郎（t1nukada@nodai.ac.jp）

講演番号：3D4a02
講演日時：3 月 26 日 09:11～ 1 号館 D4 会場

ゴニオドミン A の DE 環部の合成

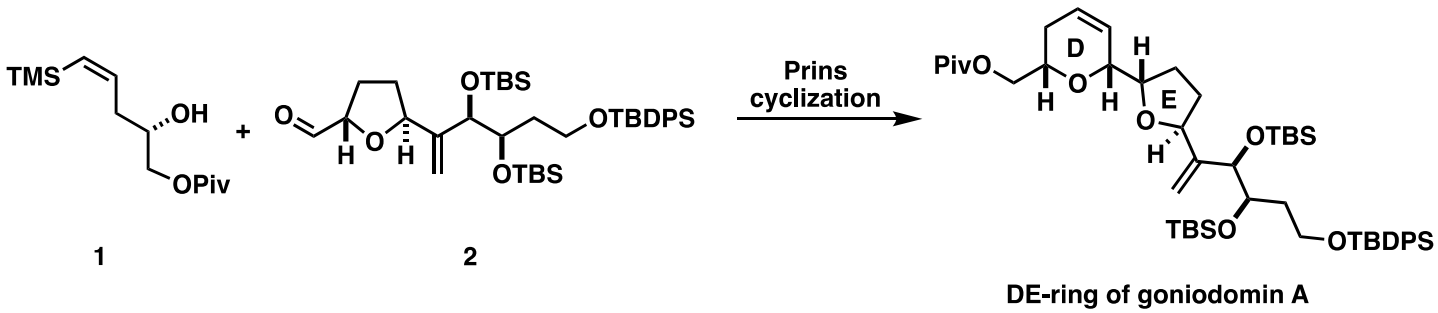
Synthesis of the DE-ring of goniodomin A

○斉藤 竜男[1]、Zakarian Armen[2] ([1]東農大生命、[2]UC サンタバーバラ)
○Tatsuo SAITO[1], Armen Zakarian[2] ([1]Tokyo Univ. of Agric., [2]UC Santa Barbara)



【背景と目的】Goniodomin A は 1988 年に村上らにより神奈川県三浦市城ヶ島産の渦鞭毛藻 *Alexandrium hiranoi* から強力な抗真菌活性を指標に単離された海洋産ポリエーテル系天然物で [1)]、その後 Moeller によりアメリカ西海岸産の渦鞭毛藻 *Alexandrium monilatum* からも単離が報告された [2)]。これまで詳細な NMR によって平面構造のみ決定されていたが、2008 年 佐々木らによってようやく天然標品の分解、誘導化実験による絶対立体配置が推察された [3)]。構造上の特徴は、6,6-スピロケタール を含む 6 つの環状エーテル、4 つのエキソメチレンを有する 32 員環マクロリドという複雑な構造を持つ点である。また生物活性も研究が進められており、アクトミオシン ATPace 抑制活性を誘導することが明らかになった [4)]。演者は未だ議論の余地が残る立体配置の決定と活性発現に必要な部分構造の確認を目的に、DE 環部の合成に着手した。

【方法と結果】全合成と構造活性相関を同時に行う合成戦略として、D 環上での収束的合成を計画した。本発表では BC 環部を有さないアルコール **1** と E 環セグメント **2** を Prins 環化条件に付すことでわずか 1 工程で D 環構築を達成した。発表ではその合成の詳細について紹介する。



【参考文献】1) Murakami, M.; Makabe, K.; Yamaguchi, K.; Konosu, S.; Wälchli, M. R. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 1149-1152.; 2) Hsia, M. H.; Morton, S, L.; Smith, L. L.; Beauchesne, K. R.; Huncik, K. M.; Moeller, P. D. R. *Harmful Algae*, **2006**, *5*, 290-299.; 3) Takeda, Y.; Shi, J.; Oikawa, M.; Sasaki, M. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 1013-1016.; 4) Furukawa, K.; Sakai, K.; Watanabe, S.; Maruyama, K.; Murakami, M.; Yamaguchi, K.; Ohizumi, Y. *J. Biomol. Chem.* **1993**, *268*, 26026-26031.

marine natural product, polyether, macrolide

発表責任者：斉藤竜男（ts206791@nodai.ac.jp）

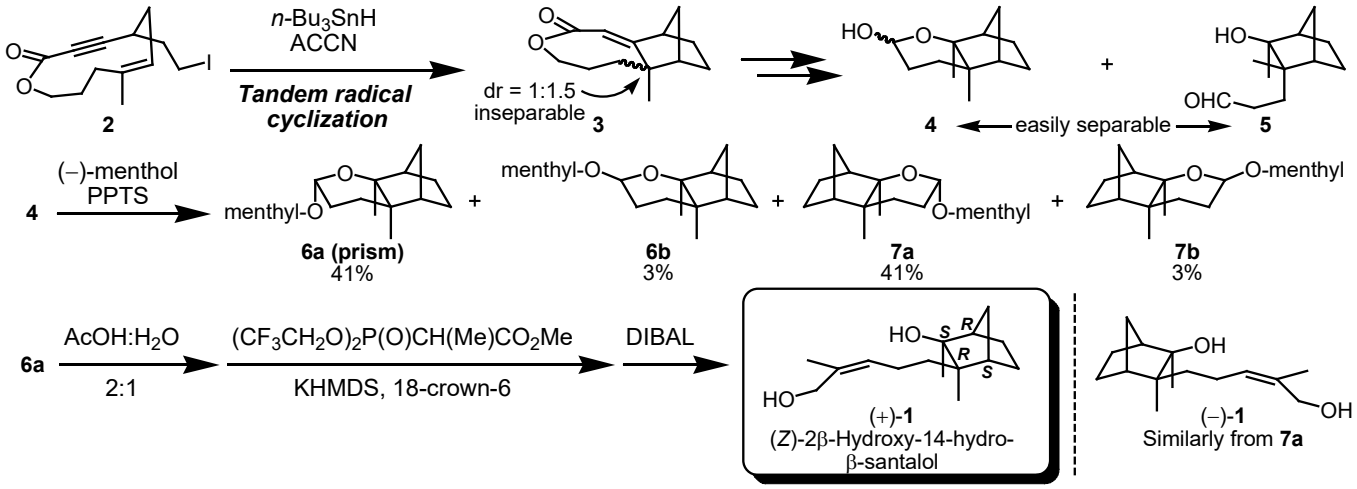
講演番号：3D4a03
講演日時：3 月 26 日 09:22～ 1 号館 D4 会場

(*Z*)-2β-Hydroxy-14-hydro-β-santalol の両鏡像体の合成と絶対立体配置の決定
Synthesis of both enentiomers of (*Z*)-2β-hydroxy-14-hydro-β-santalol and determination its absolute configuration

○門脇 和生[1]、山田 慎也[1]、會場 翔平[2]、川崎 常臣[2]、勝田 亮[3]、矢島 新[3]、額田 恭郎[3]、滝川 浩郷[1]、渡邉 秀典[1]、石神 健[3] ([1]東大院農、[2]東理大理、[3]東農大・生命)
○ Kazuki KADOWAKI[1], Shinya YAMADA[1], Shohei AIBA[2], Tsuneomi KAWASAKI[2], Ryo KATSUTA[3], Arata YAJIMA[3], Tomoo NUKADA[3], Hirosato TAKIKAWA[1], Hidenori WATANABE[1], Ken ISHIGAMI[3] ([1]the Univ. of Tokyo, [2]Tokyo Univ. of Science, [3]Tokyo Univ. of Agric.)

(*Z*)-2β-Hydroxy-14-hydro-β-santalol (**1**)[1]は *Santalum album* L. の心材より単離された抗ピロリ菌活性セスキテルペンである。我々は未解明である絶対立体配置の決定を目的に合成研究を行っており、過去の本大会においてラセミ体での合成を報告している[2]。今回、合成中間体の光学分割による本化合物の両鏡像体の合成および絶対立体配置の決定を達成したため、その成果を報告する。

まず、アセト酢酸メチルより合成した環化前駆体 **2** に対して連続的なラジカル環化反応を行い、**1** の特徴的な構造であるビシクロ[2.2.1]ヘプタン骨格を一挙に構築した。この時 **3** はジアステレオマー比が 1:1.5 の分離困難な混合物として得られたが、混合物のままヒドロキシアルデヒドへと導いたところ、望むジアステレオマーのみがヘミアセタール **4** として得られたため、容易に分離することができた。続いて **4** に対して光学分割を行うこととした。種々の条件検討の結果、酸性条件下で(−)-menthol を縮合させることにより、アセタール **6a**, **6b**, **7a**, **7b** が得られ、全てが容易に分離可能であったことから、光学分割を達成した。また **6a** は結晶として得られたため、X 線結晶構造解析により絶対立体配置を決定した。続いて主生成物である **6a** と **7a** を用いて **1** の両鏡像体へ導くこととした。それぞれに対して加水分解と側鎖の伸長を行い、(+)-**1** および(−)-**1** の合成を達成した。天然物と両合成品の比旋光度を比較した結果、天然物の絶対立体配置は(1*R*, 2*S*, 3*R*, 4*S*)であることが明らかとなった。



1) Y. Takaishi, et al. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 819.
2) 石神 健 他 2012 年度大会 3A07a06.; K. Ishigami, et al. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 5816.

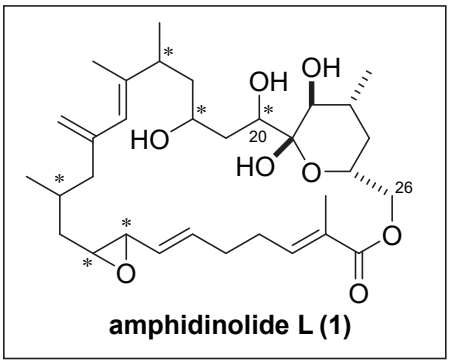
Sesquiterpene, Total Synthesis, Determination of absolute configuration

講演番号：3D4a04
講演日時：3 月 26 日 09:33～ 1 号館 D4 会場

アンフィジノリド L の合成研究

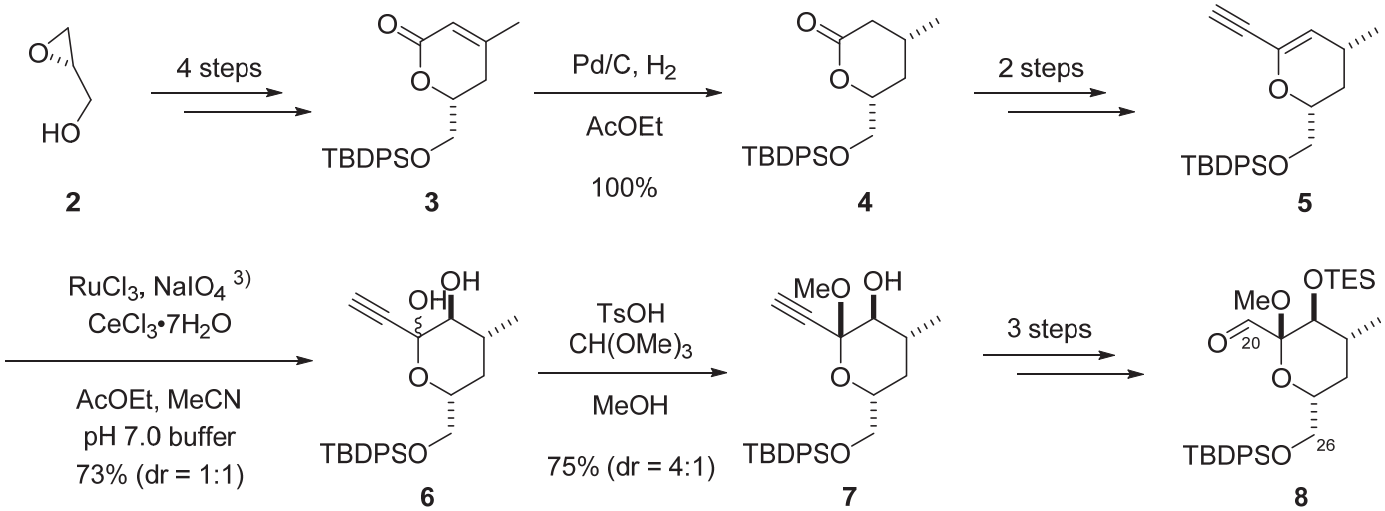
Synthetic study of Amphidinolide L

○小泉 潤、深谷 圭介、占部 大介（富山県大工）
○Jun KOIZUMI, Keisuke FUKAYA, Daisuke URABE (Toyama Pref. Univ.)



アンフィジノリド L (**1**)は、渦鞭毛藻 *Dinophysis acuminata* から単離された 27 員環マクロリドである [1]。強力ながん細胞増殖阻害活性を持つため、新規抗がん剤のリード化合物として期待されている。一方で、**1** は天然からごく微量にしか得られず、*で示した一部の立体化学が未決定のままである。我々は、全合成による **1** の完全な構造決定を目指し、まずは立体化学が明らかな C20-C26 フラグメントの合成に着手した。

(–)-グリシドール(**2**)を出発原料として既知の方法に従い、ラクトン **3** へと導いた [2]。**3** の立体選択的な水素添加によって **4** を得た後、2 工程でエンイン **5** を合成した。続いて、塩化ルテニウムを用いてジヒドロキシル化 [3]すると、**6** を 1:1 のジアステレオマー混合物として与えた。**6** のメチルアセタール化により **7** (dr = 4:1)とした後、種々官能基変換を経て C20-C26 フラグメント(**8**)を合成した。



1) Kobayashi, J. *et al. J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 3734.　2) Yue, J.-M. *et al. J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 599.
3) Plietker, B.; Niggemann, M. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 2402.

total synthesis, organic synthetic chemistry, natural products chemistry

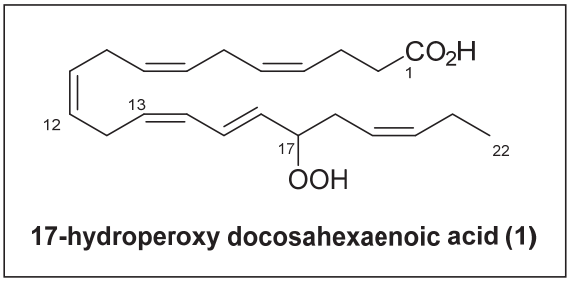
発表責任者：占部大介（urabe@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：3D4a05
講演日時：3 月 26 日 09:44～ 1 号館 D4 会場

17-ヒドロペルオキシドコサヘキサエン酸の合成研究

Synthetic Study of 17-Hydroperoxy Docosahexaenoic Acid

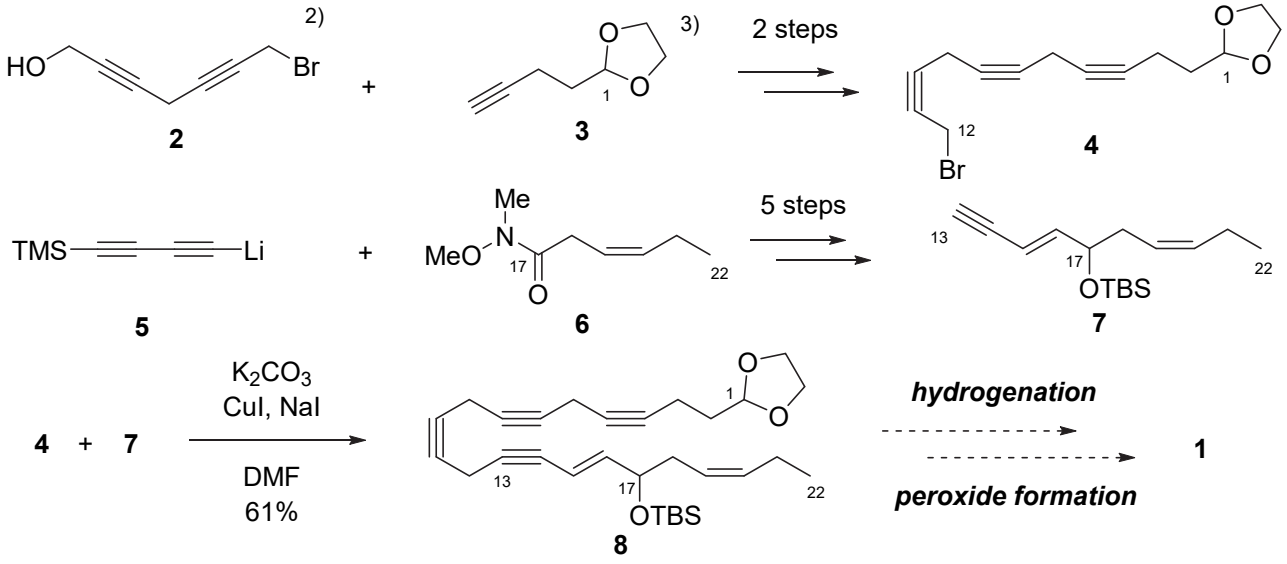
○岩井 柚樹、深谷 圭介、占部 大介（富山県大）
○Yuki IWAI, Keisuke FUKAYA, Daisuke URABE (Toyama Pref. Univ.)



17-hydroperoxy docosahexaenoic acid (1)

ドコサヘキサエン酸の酸化代謝物である 17-ヒドロペルオキシドコサヘキサエン酸(**1**)は、神経芽細胞腫に対する細胞毒性をもつ。小児がん治療薬として期待されるものの、ドコサヘキサエン酸の酵素的酸化反応によって合成できる量は僅かであるため細胞毒性を引き起こす詳細な分子機構は解明されていない。[1] そこで我々は活性発現機構の解明に必須となる **1** の量的供給を目的とし、その合成経路の確立に着手した。

1 のヒドロペルオキシ基は合成終盤に導入できるものとして、C1-C12 フラグメント **4** と C13-C22 フラグメント **17** を用いた収束部分合成法を計画した。まず、既知のジイン **2** とアセタール **3** を連結しプロパルギルブロミド **4** を得た。また末端アルキン **7** は、リチウムアルキニド **5** と Weinreb アミド **6** から 5 工程を経て合成した。得られた **4** と **7** に炭酸カリウム存在下、ヨウ化銅を作用させるとカップリング反応が進行し、テトライン **8** を収率 61%で与えた。現在、**8** の部分還元を検討している。



1) Gleissman, H. *et al. FASEB J.*, **2010**, *24*, 906. 2) Kuhn, H. *et al. Bioorg. Med. Chem.*, **2002**, *10*, 2335. 3) Ghani, S. *et al. J. Org. Chem.*, **2009**, *74*, 6924.

Total Synthesis, Organic Synthetic Chemistry, Natural Products Chemistry

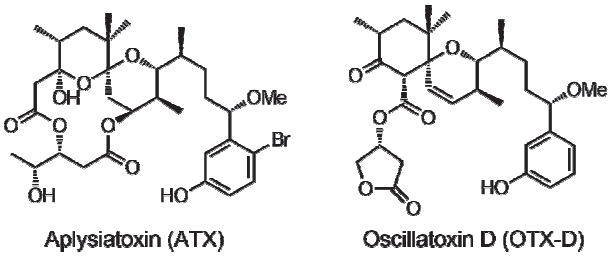
講演番号：3D4a06
講演日時：3 月 26 日 10:05～ 1 号館 D4 会場

Oscillatoxin D の合成と生物活性評価
Total synthesis and biological activity of oscillatoxin D

○花木 祐輔[1]、新木 悠介[1]、野倉 吉彦[1]、中崎 敦夫[1]、北 将樹[1]、早川 皓太郎[2]、入江 一浩[2]、西川 俊夫[1] ([1]名大院生命農、[2]京大院農)
○Yusuke Hanaki[1], Yusuke Araki[1], Yoshihiko Nokura[1], Atsuo Nakazaki[1], Masaki Kita[1], Koutaro Hayakawa[2], Kazuhiro Irie[2], Toshio Nishikawa[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Kyoto Univ.)

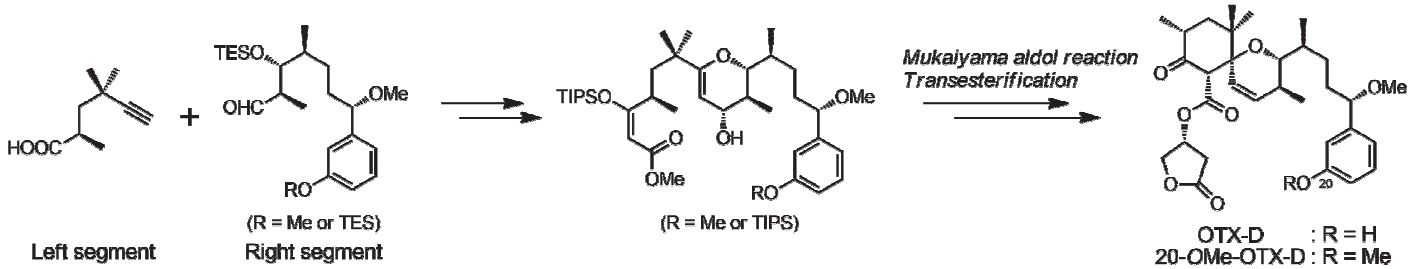
【背景・目的】

Aplysiatoxin（ATX）は，*Lyngbia* 属，*Oscillatoria* 属などの有毒シアノバクテリアが産生するポリケチド系天然物であり，細胞内情報伝達の鍵酵素・プロテインキナーゼ C（PKC）の活性化を介して発がん促進性や細胞毒性を示す．Oscillatoxin D（OTX-D）は，ATX とともに単離された類縁化合物であり，L1210 細胞（マウスリンパ球性白血病）に対する抗白血病作用が見いだされているが，活性強度や作用機作などの詳細は不明である [1, 2]．過去に市原らが OTX-D の全合成を達成しているが，生物活性については調べられていない [2]．そこで本研究では，OTX-D をより簡便な合成法によって供給し，L1210 細胞に対する増殖抑制能ならびに PKC 結合能を評価することにした．



【方法・結果】

本研究グループはこれまでに，左右のセグメントのカップリングや分子内向山アルドール反応を用いて OTX-D の 20-*O*-Me 体を合成したが，最終段階におけるメチルエーテルの開裂は困難であった [3, 4]．本研究では，合成序盤でメチル基をシリル系保護基に付け替えることにより，同様の合成経路で OTX-D の全合成を達成した．WST 法により L1210 細胞に対する増殖抑制能を評価したところ，OTX-D は数十μM にて顕著に増殖を抑制した．一方，白血病細胞において高発現している PKC アイソザイムである PKCδ に対する結合能を調べたところ，OTX-D の結合能は ATX よりも 1000 倍以上低かった．従って，OTX-D は PKC に依らない作用機作で L1210 細胞の増殖を阻害していることが示唆された．



【参考文献】

1) Entzeroth, M. *et al*., *J. Org. Chem*. **1985**, *50*, 1225.; 2) Toshima, H. *et al*., *Tetrahedron Lett*. **1995**, *36*, 3373.; 3) Nokura, Y. *et al*., *Org. Lett*. **2017**, *19*, 5992.; 4) 新木ら，2017 年度日本農芸化学会大会 4C12a08.

Oscillatoxin D, Cyanotoxin, Total synthesis

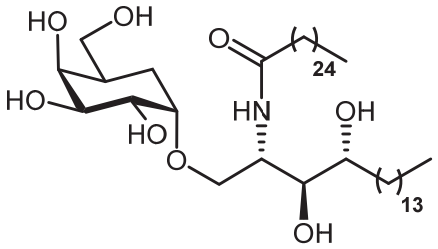
講演番号：3D4a07
講演日時：3 月 26 日 10:16～ 1 号館 D4 会場

RCAI-56 のα-カルバガラクトース部分の新規合成法
A new synthetic route of α-carbagalactose part of RCAI-56

○牛田 直輝[1]、永井 伸和[1]、石井 保之[2]、西川 俊夫[1]（[1]名大院生命農、[2]（株）レグイミューン）
○Naoki USHIDA[1], Nobukazu NAGAI[1], Yasuyuki ISHII[2], Toshio NISHIKAWA[1] ([1]Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ., [2]REGiMMUNE Co., Ltd.)

【背景と目的】

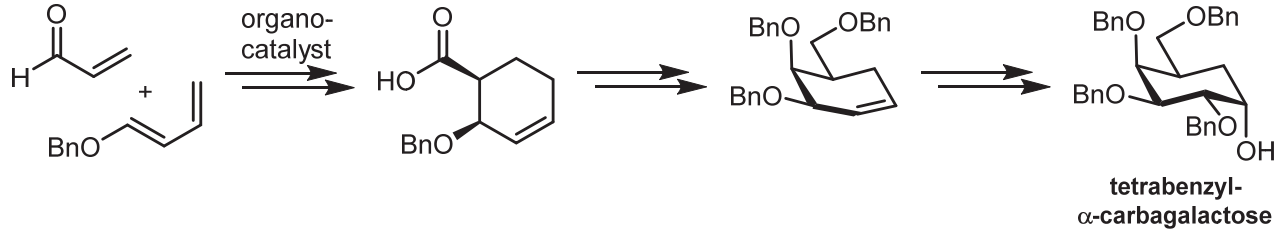
RCAI-56 [1)] は、カイメンの一種である *Agelas mauritianus* から単離された agelasphin-9b [2)] の構造活性相関研究により開発された合成スフィンゴ糖脂質 KRN-7000 [3)]のカルバ糖アナログである。本化合物は、Th1 型サイトカインを選択的に誘導し強力な抗腫瘍活性を示すことから [4)]、抗ガン剤としての実用化が期待されている。森らは、3 つの成分のカップリングにより RCAI-56 を合成しており、そのうちα-カルバガラクトース部分はメチル-α-ガラクトシドから 13 段階で合成される。しかし、そのほとんどの合成中間体が結晶性を示さないため、工業スケールでの合成が難しく、本化合物の実用化の妨げになると言われている。そこで、本研究ではα-カルバガラクトース部分の大量合成可能な新しい合成方法の開発を目指した。



RCAI-56

【方法と結果】

まず、アクロレインと 1-ベンジルオキシブタジエンの不斉有機触媒を用いた Diels-Alder 反応によりキラルなシクロヘキセン化合物を高い光学純度で得た。次いで、立体選択的な酸素官能基の導入および水酸基の位置選択的なベンジル化によって 9 段階でテトラベンジル-α-カルバガラクトースの合成を達成した。本合成ルートの 8 つの合成中間体のうち 4 つが結晶性を示すため、大量化に適した合成方法であると考えられる。



tetrabenzyl-
α-carbagalactose

References
1) K. Mori *et al. Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 3343.
2) T. Higa *et al. Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 5591.
3) H. Fukushima *et al. J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 2176.
4) M. Taniguchi *et al. Int. Immunol.* **2010**, *22*, 319.

RCAI-56, carbagalactose, organocatalyst

発表責任者：西川俊夫（nisikawa@agr.nagoya-u.ac.jp）

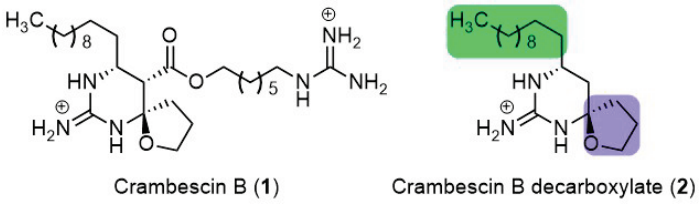
講演番号：3D4a08
講演日時：3 月 26 日 10:27～ 1 号館 D4 会場

クランベシン B 単純化アナログの合成研究

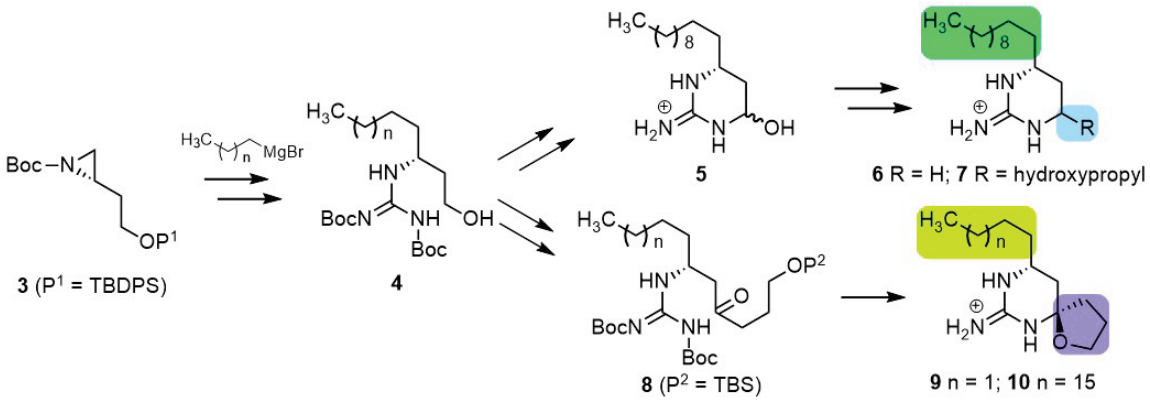
Synthetic studies on simplified analogues of crambescin B

○毛利 春輔[1]、山下 まり[2]、中崎 敦夫[1]、西川 俊夫[1] ([1]名大院生命農、[2]東北大院農)
○Shunsuke MOURI[1], Mari YOTSU-YAMASHITA[2], Atsuo NAKAZAKI[1], Toshio NISHIKAWA[1] ([1]Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, [2]Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University)

電位依存性 Na^+チャネル（Na_v）は細胞膜の脱分極に伴い細胞外から細胞内へ Na^+を流入させる膜タンパク質であり、活動電位の発生と伝播に関与している。Na_vには 9 種類のサブタイプが存在し、その機能解明及び精密制御のためにサブタイプ選択的な阻害剤の開発が盛んに行われている。当研究室で合成された海産天然物クランベシン B (**1**)の単純化アナログであるクランベシン B 脱炭酸体 (**2**)は、Neuro 2A 細胞を用いたアッセイ系において Na_vに対する阻害活性を示した[1]。その強度は Na_v阻害剤であるテトロドトキシン（TTX）に匹敵した。しかし、電気生理学的手法による活性評価の結果、その作用部位が TTX のそれとは異なることが明らかになった[2]。我々は、詳細な作用機序解明を目的とした構造活性相関研究を開始し、これまでに単純化アナログ **5-7** の合成を達成している[3]。今回、炭素鎖長を変更したクランベシン B 脱炭酸体 **9** と **10** の合成を新たに行ったので報告する。



単純化アナログ **9** と **10** は、**5-7** と同様の合成中間体 **3** から、対応する炭素鎖長を持つ Grignard 反応剤を用いて **4** を経て導いた。また、**4** に対して THF 環に相当するビルディングブロックを導入して **8** とし、酸性条件下で脱保護とスピロ環構築を一挙に行うことで **9** と **10** をほぼ単一のジアステレオマーとして合成できた。本発表では、各変換の詳細について述べる。



References

[1] Nakazaki, A. *et al. Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 5304. [2] Konoki, K. *et al. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 1247. [3] 毛利春輔，中崎敦夫，西川俊夫，日本農芸化学会 2018 年度大会(名古屋), 3A16a05.

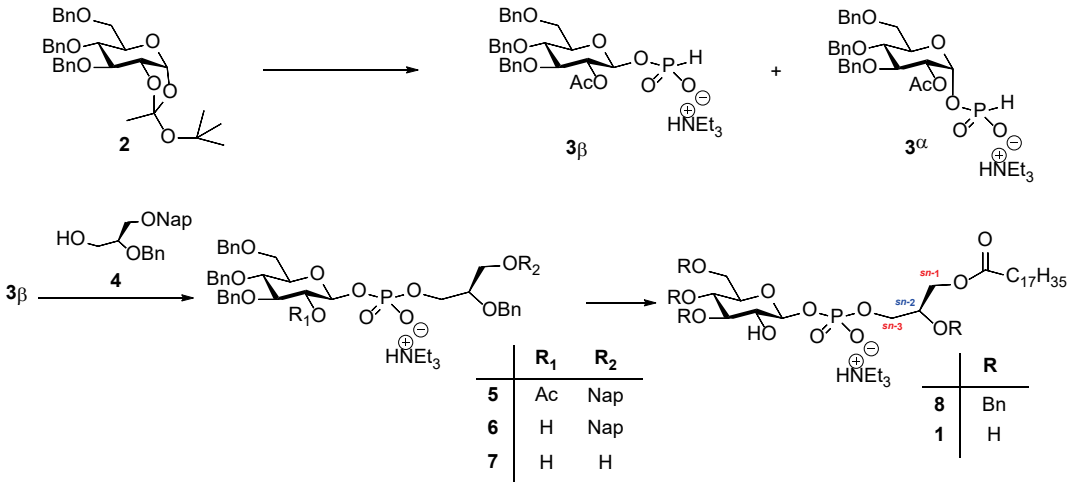
guanidine alkaloid, spiro-aminal, structure-activity relationship

発表責任者：毛利春輔（mouri.shunsuke@b.mbox.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3D4a09
講演日時：3 月 26 日 10:38～ 1 号館 D4 会場

リゾホスファチジルグルコシドの合成
Synthesis of *Lyso*-phosphatidyl-ß-D-glucoside
○狩野 航輝[1]、大山 純平[1]、齋藤 祥吾[2]、グレイメル ピーター[3]、松尾 一郎[1,2] ([1]群馬大院・理工、[2]群馬大・理工、[3]理化学研究所)
○ Koki KANO[1], Jyunpei OHYAMA[1], Shogo SAITO[2], Peter GREIMEL[3], Ichiro MATSUO[1,2] ([1]Gunma Univ. Division of Molecular Science, [2]Gunma Univ. School of Sci. and Tech., [3]RIKEN)

【背景・目的】リゾリン脂質の一種である *Lyso*-phosphatidyl-β-D-glucoside (LPG:**1**)は、グルコースの 1 位にリゾホスファチジン酸のリン酸基がβ-グリコシド結合した構造をとっている。我々は、この新奇リゾリン脂質の化学合成に取り組み、ミリグラムスケールでの合成に成功した[1)]。しかし、我々の合成法では、グルコース 1 位にホスホン酸を導入する際の立体選択性の再現性が低く、グリセロールの *sn*-3 位から *sn*-1 位へのリン酸エステルのマイグレーションも完全に制御することはできていなかった。これらを踏まえ、LPG の合成法を再検討した。
【方法・結果】グルコースオルトエステル誘導体 **2** へのホスホン酸の導入に、反応条件を厳密に制御することが可能なフローマイクロリアクター (FMR)を用いた。温度、濃度、反応停止条件を種々検討した結果、反応停止条件を制御することで、グルコース 1 位の立体異性体 **3**αの生成を抑制し、β-結合したホスホン酸誘導体 **3**βを再現性よく得られることが明らかとなった。ホスホン酸誘導体 **3** に対してグリセロール誘導体 **4** を導入した。なお、グリセロール誘導体の *sn*-1 位の水酸基の保護は、リン酸エステルの転移を抑制するために中性条件で除去可能なエーテル系の保護基を用いた。**5** のグルコース残基の 2 位水酸基上のアセチル基を塩基性条件下で除去した後に、中性条件下、グリセロール *sn*-1 位上の 2-ナフチルメチル(Nap)基を脱保護した。その後、グリセロール *sn*-1 位の水酸基に対して選択的にステアリン酸を導入、得られた保護体 **8** の糖水酸基とグリセロール *sn*-2 位上のベンジル(Bn)基を除去することで、目的とした LPG の合成を達成した。



	R1	R2
5	Ac	Nap
6	H	Nap
7	H	H

	R
8	Bn
1	H

1) A. T. Guy, K. Kano, J. Ohyama, H. Kamiguchi, Y. Hirabayashi, Y. Ito, I. Matsuo, P. Greimel, DOI: 10.1021/acschemneuro.8b00505

microfluidic system, lyso phospholipid

発表責任者：松尾一郎（matsuo@gunma-u.ac.jp）

講演番号：3D4a10
講演日時：3 月 26 日 10:49～ 1 号館 D4 会場

エーテル型リン脂質プラズマローゲン類の合成
Synthesis of plasmalogens and analogues
○安部 真人、田中 遼太郎（愛大農）
○Masato ABE, Ryotarou TANAKA (Grad. School of Agric. Ehime Univ.)

【目的】プラマローゲンはエーテル型リン脂質であり図 1（プラスメニルコリン）に示すような化学構造を有する。ヒトを含む哺乳類では神経系や免疫系、循環器系に豊富に存在しているものの詳細な機能については不明な点が多く残されている。これまでに、脂肪酸部の高度不飽和脂肪酸に由来する抗酸化能や、ビニルエーテル結合に対する塩素化反応に由来する炎症系のシグナル伝達などが知られている。さらに最近になって、ミトコンドリア膜のリモデリング酵素である tafazzin がプラズマローゲンに対するトランスアシル化を触媒することが報告された。発表者らはリン脂質カルジオリピンの化学合成を用いた、tafazzin のリモデリングに関する高精度な評価系を確立してきた。このため、新たにプラズマローゲンの類縁体合成が実現すれば、tafazzin との反応性を明らかにできると考えた。

【方法と結果】効率的なプラズマローゲン類の合成のためには、分子中央のグリセロール部の *sn*-2 の水酸基の立体をケアしつつトランス型のビニルエーテル構造の構築が必要である。近年、シス型のビニルエーテル構造については導入方法が複数報告されたもののトランス型には対応していなかった。改めてリサーチした結果、2009 年に Lankalapalli らが用いたイリジウム触媒によるオレフィン異性化反応を用いる経路の有用性に着目した。この方法を拡張すれば、プラズマローゲン類の広汎なデザイン合成を確立することができる。本発表では、鍵となるグリシドールの開環反応と続くオレフィンの異性化反応について報告する。

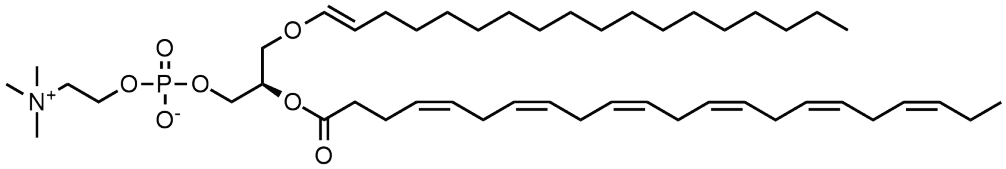


図 1　プラスメニルコリンの化学構造式

Plasmalogen, Chemical synthesis, Phospholipid

発表責任者：安部真人（abe.masato.si@ehime-u.ac.jp）

講演番号：3D4a11
講演日時：3 月 26 日 11:10～ 1 号館 D4 会場

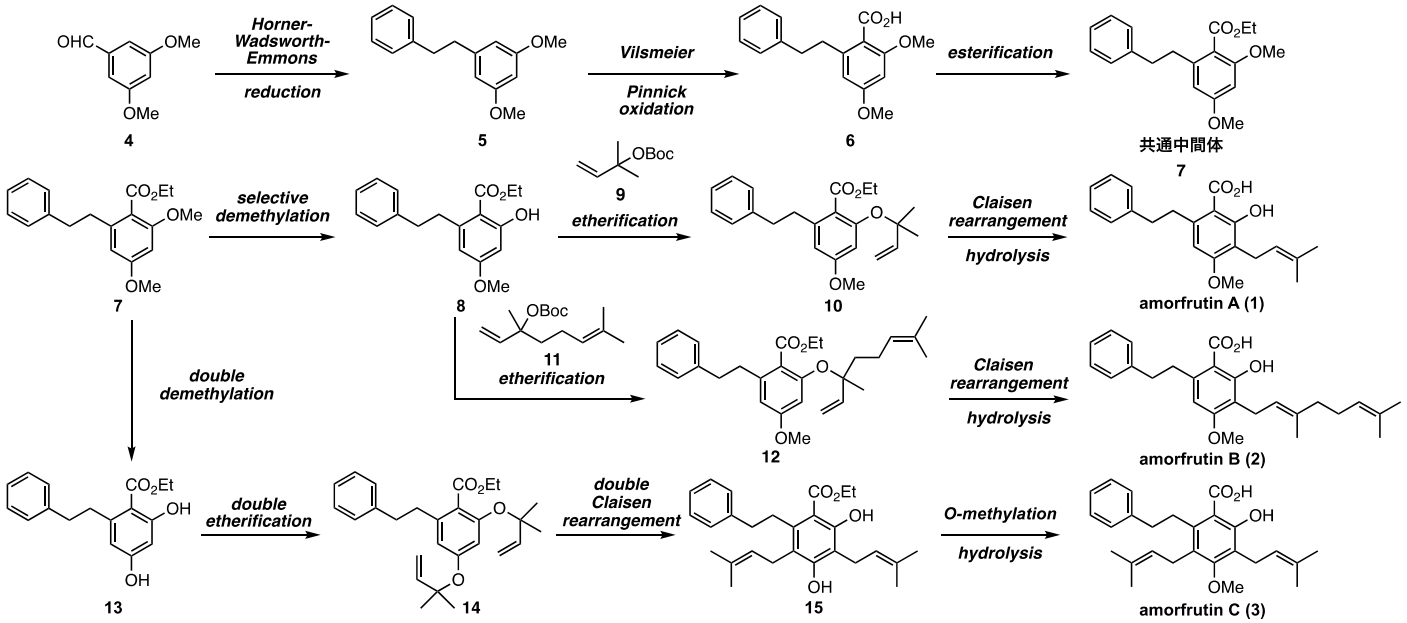
Amorfrutin 類の合成研究

synthetic study of Amorfrutins

○藤田 忠文、桑原 重文、小倉 由資（東北大院農）
○Tadafumi Fujita, Shigefumi Kuwahara, Yusuke Ogura (Tohoku Univ. of Agric.)

【目的】*Amorpha fruticosa* から単離・構造決定された amorfrutin A (**1**)及び B (**2**)は、PPARγ のアゴニストとして作用する [1]。また、*Glycyrrhiza foetida* から単離・構造決定された amorfrutin C (**3**)は癌細胞に対する増殖抑制作用を示す [2]。このように魅力的な生物活性を示す amorfrutin 類は天然物としては珍しい多置換ベンゼン環を有し、有機合成化学的にも興味を引く。本研究では amorfrutin 類の網羅的合成法の確立を目指し、合成研究に着手した。

【方法・結果】出発原料である **4** に対し、Horner-Wadsworth-Emmons 反応によるスチルベンの合成と Vilsmeier 反応によるホルミル基の導入を含む 5 工程の変換を行い、共通中間体 **7** を得た。次に **7** の選択的脱メチル化と **9, 11** との Pd を用いたアリルエーテル化によって **10**, **12** へと導いた。**10** に対してマイクロウェーブ照射下、Claisen 転位による側鎖の導入と加水分解を行って、**1** の合成を達成した。同様に **12** を Claisen 転位に付すと幾何異性体の混合物を与えてしまい、それらの分離は困難であったため、現在 *E* 体選択的な **2** の合成を検討している。一方、**7** に対して 2 ヶ所の脱メチル化とアリルエーテル化を行うと **14** が得られ、これを double Claisen 転位に付した所、所望の転位体が良好な収率で得られ、続く選択的メチル化と加水分解を行うことで **3** の合成を達成した。



1) S. Sauer, *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, 7257.; 2) S. Sauer, *et al*., *J. Nat. Prod*. **2016**, *79*, 2.

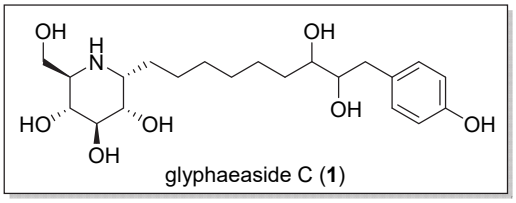
total synthesis, PPARγ, amorfrutin

講演番号：3D4a12
講演日時：3 月 26 日 11:21～ 1 号館 D4 会場

立体化学決定を目的とした glyphaeaside C の全合成研究

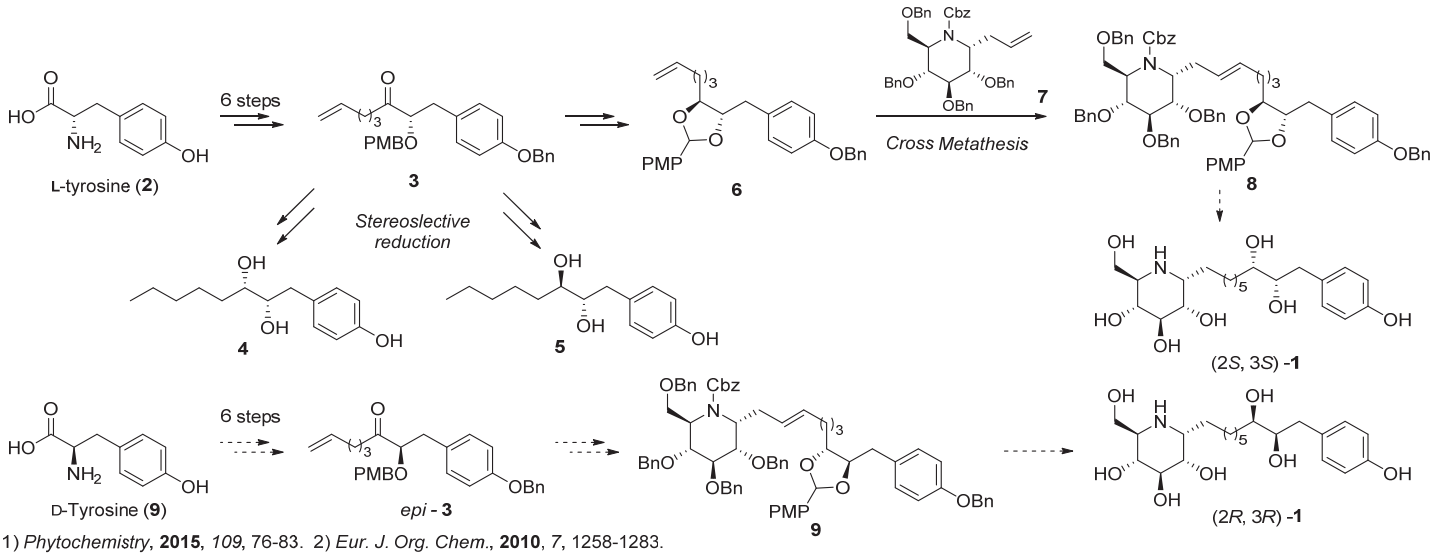
Synthetic study of glyphaeaside C

○阿部 泰之、桑原 重文、小倉 由資（東北大農）
○Yasuyuki Abe, Shigefumi Kuwahara, Yusuke Ogura (Tohoku Univ.)



【目的】glyphaeaside C (**1**)は 2015 年、Magid らによってアオイ科植物である *Glyphaea brevis* の根より単離・構造決定された [1]。非常に強力な選択的 β-グルコシダーゼ阻害活性(IC_{50} = 0.15 μM）が報告されており、農薬への応用が期待される。**1** はイミノ糖骨格と芳香環が炭素鎖で連結した骨格を有するが、リンカーである炭素鎖上の *vic*-ジオール部位の立体化学は未決定である。そこで、我々は **1** の初の全合成と立体化学の決定を目的として研究に着手した。

【方法・結果】まずは側鎖部位の合成を行い、それらを天然物と比較することで *vic*-ジオール部位の相対立体配置の推定を目指した。L-tyrosine (**2**)から 6 工程にて **3** を調製し、立体的選択的な還元、続く脱保護と二重結合の還元を行い、*syn*-ジオール **4** と *anti*-ジオール **5** を得た。これらと **1** の NMR スペクトルを比較したところ、*syn*-ジオール **4** がより良い一致を示し、*vic*-ジオール部位の相対立体配置は *syn* であると推定した。**3** より得たアセタール **6** と既知のイミノ糖 **7**[2]とのクロスメタセシスを行い **8** を得た。現在 **8** から(2*S*, 3*S*) -**1** への脱保護の検討を行っている。今後はキラルプールとして D-tyrosine を用いて、同様の合成経路にて(2*R*, 3*R*) -**1** を調製し、両異性体と **1** を比較することで glyphaeaside C (1)の絶対立体配置を決定する予定である。



1) *Phytochemistry*, **2015**, *109*, 76-83. 2) *Eur. J. Org. Chem.*, **2010**, *7*, 1258-1283.

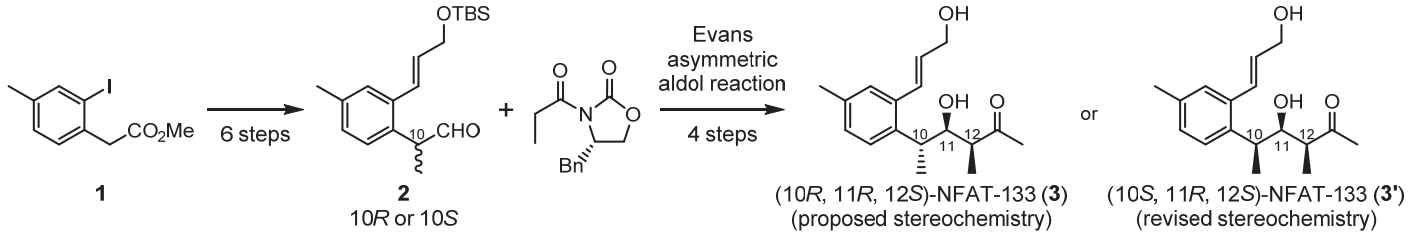
iminosugar, total synthesis, structural determination

講演番号：3D4a13
講演日時：3 月 26 日 11:32～ 1 号館 D4 会場

NFAT-133 の全合成と立体化学の訂正
Synthesis and Stereochemical Revision of NFAT-133

○佐藤 光[1]、權 垠相[3]、田口 優佳[2]、吉田 慎一郎[3]、桑原 重文[1]、小倉 由資[1] ([1]東北大院農、[2]東北大農、[3]東北大理)
○Hikaru Sato[1], Eunsang Kwon[3], Yuka Taguchi[2], Shinichiro Yoshida[3], Shigefumi Kuwahara[1], Yusuke Ogura[1] ([1]Tohoku Univ. Graduate School of Agriculture, [2]Tohoku Univ. Faculty of Agriculture, [3]Tohoku Univ. Faculty of Science)

【目的】放線菌類が生産する NFAT-133 は、免疫抑制[1)]や抗糖尿病活性[2)]、抗トリパノソーマ活性[3)]といった複数の生物活性を示すポリケチドである。NFAT-133 の化学構造は初の単離から 20 年以上、平面構造のみの報告にとどまり、その立体化学に関する研究は行われていなかった。2016 年 Igarashi らは本化合物を再単離し、改良モッシャー法、NOESY 測定、および *J*-based 配座解析(*JBCA* 法)を駆使し、NFAT-133 の絶対立体配置を 10*R*,11*R*,12*S* と推定した[4)]。今回、我々は NFAT-133 の有する生物活性に興味を持ち、構造的特徴である C10 位から C12 位に連続する不斉点の構築を鍵とした本化合物の初の全合成を目指し、合成研究に着手した。
【方法・結果】既知のヨードフェニル酢酸エステル誘導体 **1** を出発原料に、側鎖アリルアルコール部位の導入、不斉補助基を用いた C10 位メチル基の立体選択的構築を含む 6 工程の変換を経て、*R* 体のアルデヒド(*R*)-**2** を調製した。これに対して Evans 不斉アルドール反応を行って C11 位、C12 位の不斉点を導入し、次にメチルケトン部位を構築して提唱構造である(10*R*,11*R*,12*S*)-NFAT-133 (**3**)を合成した。しかし、**3** の各種スペクトルデータは天然物とは一致しなかった。そこで合成した **3** の立体化学を確認すべく、**3** を結晶性誘導体へと変換し、その X 線結晶構造解析により **3** の立体化学を確認した。一方、**3** の合成時に微量に得られた副生成物の ^{1}H-NMR が偶然にも天然物と一致したため、天然物の立体化学は **3** の C10 位におけるジアステレオマーである 10*S*,11*R*,12*S* と推測した。そこで、先と同様の手法に従って(*S*)-**2** から(10*S*,11*R*,12*S*)-NFAT-133 (**3'**)を合成したところ、比旋光度、NMR など各種スペクトルデータは文献値と良い一致を示した。以上により、我々は NFAT-133 の全合成を達成し、その絶対立体配置は 10*S*,11*R*,12*S* と訂正された。



1) McAlpine J. B. *et. al. J. Antibiot.* **1995**, *48*, 380.; 2) Kulkarni-Almeida A. A. *et. al. AMB-Express*, **2011**, *1*, 42.; 3) Omura, S. *et. al. J. Antibiot*, **2012,** *65*, 197.; 4) Igarashi, Y. *et. al. J. Antibiot*, **2016,** *69*, 69.

Total synthesis, Stereochemical Revision, NFAT-133

講演番号：3D4a14
講演日時：3 月 26 日 11:43～ 1 号館 D4 会場

パラジウム触媒による環化反応を用いた(+)-muconin の合成研究

Synthetic studies on (+)-muconin using Pd(II) catalyzed cyclization

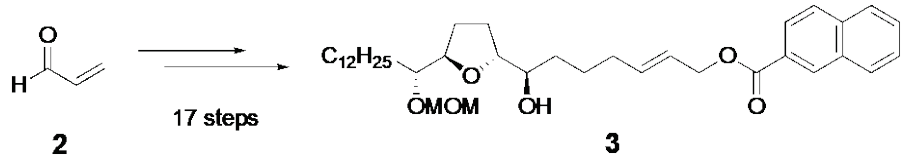
○納所 早弥華、彦坂 源、真壁 秀文 (信大総合理工学院農)
○Sayaka NOUSHO, Gen Hikosaka, Hidefumi Makabe (Shinshu Univ. Grad. School of Science and Technology. Agric.)

【目的】

テトラヒドロピラン (THP)環は, 生理活性を示す天然有機化合物に広く見られる構造であるため様々な合成手法が報告されている. 我々は, 2 価の Pd 触媒を用いた立体選択的な環化反応(oxypalladation)を開発し, pyranicin や decytospolide A, B の合成に応用してきた. 本研究では, 上述の反応をより複雑な構造を持つバンレイシ科アセトゲニンである muconin (**1**)の合成研究に応用したので報告する.

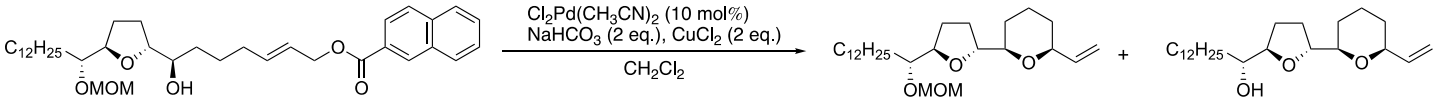
【方法と結果】

アクロレイン(**2**) より, １７段階にて環化前駆体 **3** を合成した.



2 **3**

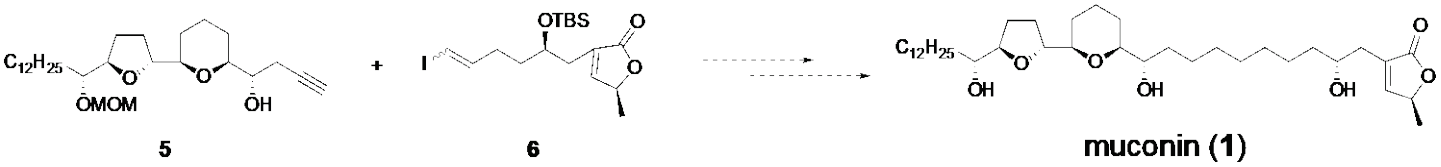
環化前駆体 **3** に対し, 立体選択的な環化反応（oxypalladation）を行い, 環化体 **4a** 及び **4b** を得た.



3 **4a** **4b**

43 % 22 %

環化体 **4a** から更に数段階の反応を経て, THP—THF 環フラグメント **5** を合成した.
今後, 別途合成した γ-ラクトン環フラグメント **6** とのカップリング反応に供し, muconin (**1**)の全合成を達成する予定である.



5 **6** **muconin (1)**

total synthesis, natural product, palladium catalyst

発表責任者：真壁秀文（makabeh@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3D4a15
講演日時：3 月 26 日 11:54～ 1 号館 D4 会場

酸性条件によるメタルフリーピリジン合成と Anibamine の全合成

Development of metal-free pyridine synthesis under acidic condition and total synthesis of Anibamine

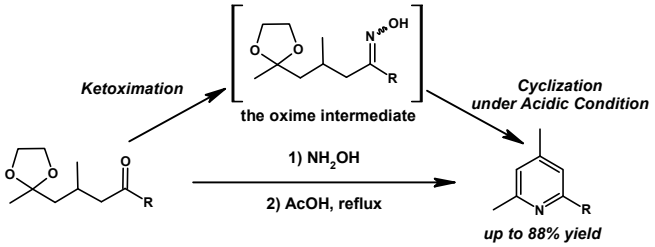
○三原 大宙、宮腰 建、今野 博行（山形大院理工）
○Hiromichi MIHARA, Takeru MIYAKOSHI, Hiroyuki KONNO (Yamagata Univ. Grad. Sch. of Sci. and Eng.)

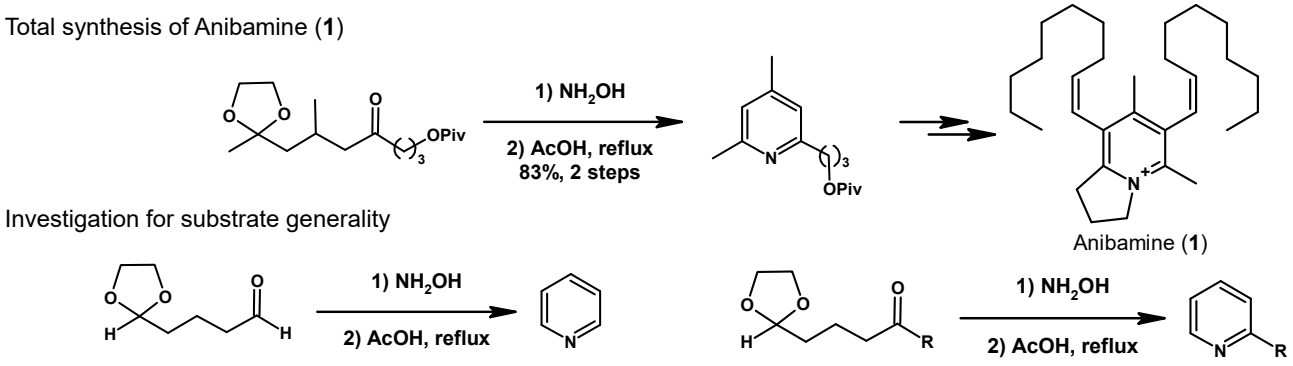
【背景・目的】

ピリジン環は、アルカロイド等の天然物に含まれる重要なヘテロ環式骨格である。またその用途は触媒や医薬品、農薬といったものへ拡大されている。現在のピリジン環構築法として知られているのは主に金属触媒を用いるものであり、メタルフリーの条件においては、嵩高い官能基を持ち基質自体が硬直なものに限られている。そこで今回、より単純な基質である 1,5-ジケトアルカン誘導体を用いたメタルフリーピリジン合成法の開発および、その基質一般性の探索を行った。更に本反応を 6 置換ピリジン Anibamine (**1**) の合成へ適用した。

【方法・結果】

今回開発したメタルフリーピリジン合成法では、基質として 1,5-ジケトアルカン誘導体、窒素源としてヒドロキシルアミンを用いた。基質をオキシムとした後、酢酸溶媒中で加熱還流することでピリジン環を構築できた。更に、一つのカルボニルをケタールで保護した基質で反応させた所収率の改善が見られた。この反応はオキシム中間体の形成を確認後、酢酸処理を行うことによってのみ進行する。次に、本方法を鍵反応として 6 置換ピリジン系天然物 Anibamine (**1**) の全合成を検討した。対応する基質からピリジン環を構築後、ダブル鈴木カップリング反応などを行うことで達成することができた。現在は環化前駆体の基質一般性探索を行うため、アルデヒド型基質、アルデヒド-ケトン型基質についてこの合成法が適用可能かを検証している。酸および溶媒のスクリーニングについても併せて報告する。





Metal-free, Pyridine, Anibamine

発表責任者：三原 大宙（the55284@st.yamagata-u.ac.jp）

講演番号：3D4p07
講演日時：3 月 26 日 15:06～ 1 号館 D4 会場

急性 T リンパ芽球性白血病細胞の増殖を特異的に抑制する化合物の開発

Development of compounds that specifically inhibit the proliferation of acute T lymphoblastic leukemia cells

○吉田 千紘[1]、鉢呂 佳史[1]、東 智也[1]、八木 拓哉[2,3]、中田 千尋[2,4]、武智 あづさ[2,5]、原 孝彦[2,3,5]、牧 昌次郎[1,6] ([1]電通大院・情報理工学、[2]都医学研・幹細胞、[3]東京医歯大院・医歯学総合、[4]中央大学理工学部生命科学科、[5]首都大院・幹細胞制御学、[6]電通大・脳医工学研究センター)
○ Chihiro YOSHIDA[1], Yoshihumi HACHIRO[1], Tomoya HIGASHI[1], Takuya YAGI[2,3], Chihiro NAKADA[2,4], Azusa TAKECHI[2,5], Takahiko HARA[2,3,5], Shojiro MAKI[1,6] ([1]Engineering Science, University of Electro-Communications, Japan, [2]Stem cell project, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Japan, [3]Tokyo Medical and Dental University, Graduate School of Medical and Dental Sciences, [4]Chuo University Faculty of Science and Technology Department of Life Sciences, [5]Department of Biological Sciences, Tokyo Metropolitan University, [6]Center for Neuroscience and Biomedical Engineering)

急性 T リンパ芽球性白血病（T-cell acute lymphoblastic leukemia: T-ALL）は、日本人の約 40 万人に 1 人が罹患し、その多くは小児期に発症する非常に稀な病気である。その罹患率の低さと難治性とから、日本では 2014 年に希少疾病かつ難病に指定されている。欧米では患者数がもっと多いため、T-ALL に対する分子標的薬の開発研究が精力的に進められているが、まだ販売認可には至っていない。

我々は以前、天然物ライブラリーのスクリーニングによって、ヒト T-ALL 由来細胞株 CCRF-CEM の増殖を抑制するが、B リンフォーマ由来細胞株 Raji の増殖に影響を与えない 3 種類の低分子化合物 44D-L008, 31D-F005 を同定した。44D-L008 と 31D-F005 は共通の化学構造を有していたことから、その部分を中心として数十種類の関連アナログを有機合成し、CCRF-CEM 細胞と Raji 細胞に対する *in vitro* 増殖抑制活性を測定した。

その結果、特定の含窒素複素環とポリエンを有する化合物が T-ALL 選択的な増殖抑制活性を示すことを発見した[1)]。本活性にはトリエン以上が必須で、テトラエンが最も活性が強かった。さらに、複素環を化学修飾することによって、天然化合物に匹敵する 0.5 μM 程度の IC_{50} 値を示す化合物の創出に成功し、ポリエン部分を化学修飾することで、*in vivo* 試験や標的分子同定のためのツールとして有望な化合物の合成に成功した。本物質は、新しい T-ALL 治療薬の創製に向けて有望であるとともに、T-ALL 特異的な分子標的の探索にも役立つものと期待される。

1)特願 2018-90192,『白血病治療用医薬組成物』

Leukemia, Drug development, Natural compounds

発表責任者：吉田 千紘（y1833142@edu.cc.uec.ac.jp）

講演番号：3D4p08
講演日時：3 月 26 日 15:17～ 1 号館 D4 会場

急性 T リンパ芽球性白血病細胞の増殖を抑制する化合物の活性に必須な化学構造の発見

Discovery of the chemical structure essential for the activity of compounds that inhibit the proliferation of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells

○東 智也[1,2]、鉢呂 佳史[1,2]、吉田 千紘[1,2]、八木 拓哉[3,4]、中田 千尋[5]、武智 あづさ[3,6]、原 孝彦[3,4,6]、牧 昌次郎[1,2] ([1]電通大院・情報理工学、[2]電通大・脳医工学研究センター、[3]都医学研・幹細胞、[4]東京医歯大院・医歯学総合、[5]中央大・理工学、[6]首都大院・幹細胞制御学)
○Tomoya HIGASHI[1,2], Yoshifumi HACHIRO[1,2], Chihiro YOSHIDA[1,2], Takuya YAGI[3,4], Chihiro NAKATA[5], Adusa TAKECHI[3,6], Takahiko HARA[3,4,6], Shojiro MAKI[1,2] ([1]University of Electro-Communications, [2]University of Electro-Communication, [3]Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, [4]Tokyo Medical and Dental University, [5]Chuo University, [6]Tokyo Metropolitan University)

急性 T リンパ芽球性白血病（T-cell acute lymphoblastic leukemia: T-ALL）は、日本人の約 40 万人に 1 人が罹患し、その多くは小児期に発症する非常に稀な病気である。その罹患率の低さと難治性とから、日本では 2014 年に希少疾病かつ難病に指定されている。欧米ではより罹患者が多いため、T-ALL に対する分子標的薬の開発研究が精力的に進められているが、まだ販売認可には至っていない。我々は既に、天然物ライブラリーのスクリーニングによって、ヒト T-ALL 由来細胞株 CCRF-CEM の増殖を抑制するが、B リンフォーマ由来細胞株 Raji の増殖に影響を与えない 2 種類の低分子化合物 44D-L008, 31D-F005 を同定している。
44D-L008 と 31D-F005 は共通の化学構造を有していたことから、その部分をコア構造として数十種類の関連アナログを有機合成し、CCRF-CEM 細胞と Raji 細胞に対する細胞感受性実験を行った。その結果、特定の N 原子含有複素環とポリエンを有する化合物が T-ALL 細胞特異的な増殖抑制活性を示すことを発見した。本活性には 3 個以上のオレフィンが必須で、4 個有する場合が最も活性が強かった。（特願 2018-090192, 『白血病治療用医薬組成物』）
そこで更なる構造活性相関データを取得するために誘導体の構造改変を行ったところ、今回新たに、両者の細胞に対する増殖抑制活性を喪失させるような化学構造があることを発見した。
複素環から伸びる側鎖の末端にあるエステルの α位をメチル化することで CCRF-CEM 細胞と Raji 細胞の両者に対しより高い増殖抑制活性を示すことは既知であった。今回それに加え、N 原子含有複素環のある特定の位置に化学修飾することで CCRF-CEM 細胞と Raji 細胞の両者に対し増殖抑制活性を示さないことが判明した。これら2つの構造活性相関データを加味した上で、「エステルの α位」と「複素環」の両方に化学修飾を行った、しかし興味深いことに 2 つの細胞に対し増殖抑制活性を示さなかった。これらの結果から、T-ALL 細胞特異的な増殖抑制活性には、化学修飾が行われていない N 原子含有複素環が必要な構造であると考えられる。今回得られた構造活性相関は T-ALL 特異的に増殖抑制活性を持つ低分子化合物の創出、および T-ALL 特異的な分子標的の探索に標石となるものと期待される。

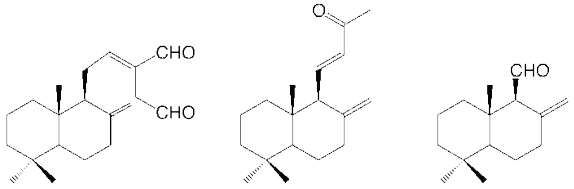
T-cell acute lymphoblastic leukemia, Medicinal chemistry, Structure activity relationship

発表責任者：東智也（h1513159@edu.cc.uec.ac.jp）

講演番号：3D4p09
講演日時：3 月 26 日 15:28～ 1 号館 D4 会場

インド産マンゴージンジャー(*Curcuma amada* Roxb.)根茎由来ジテルペンと誘導体のα-グルコシダーゼとリパーゼに対する阻害活性
α-Glucosidase and lipase inhibitors from mango ginger rhizomes
○吉村 奈緒里[1]、吉岡 百合[2]、松村 晋一[2]、森本 正則[1] ([1]近畿大農、[2]稲畑香料)
○Naori YOSHIMURA[1], Yuri YOSHIOKA[2], Shinichi MATSUMURA[2], Masanori MORIMOTO[1] ([1]Kindai Univ., [2]INABATA KORYO CO.,LTD.)

【目的】
インド原産のショウガ科植物であるマンゴージンジャー(*Curcuma amada* Roxb.)根茎は、多様な生理活性を持つ二次代謝産物を含有する。本研究では、本種に含まれるラブダン型ジテルペン類およびそれらを化学修飾した誘導体のα-グルコシダーゼおよびリパーゼに対する酵素阻害活性を評価した。
【方法と結果】
インド産マンゴージンジャー乾燥根茎をヘキサンで抽出し、シリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィーを用いて構成成分の精製し、主成分として既知のラブダン型ジテルペン類(1–3)を単離・同定した。



1 2 3

誘導体の調製は、ジアール体（1）から水素化ホウ素ナトリウムを用いて還元することによって対応するジオール体へと導き、さらにジオール体をピリジンを溶媒として無水酢酸と反応させてアセチル化して対応するジアセテートとモノアセテート体を得た。一方、ジアール体（1）はピニック酸化によって対応するジカルボン酸とモノカルボン酸を調製した。得られたジカルボン酸は、三フッ化ホウ素メタノール錯体を用いてメチルエステルへと変換した。これらの化合物については、構造確認の後、ラット小腸アセトンパウダー由来α-グルコシダーゼとブタ膵臓由来リパーゼを用いて酵素阻害活性を評価した。

ジアール体（1）のα-グルコシダーゼ阻害活性は、ポジティブコントロールとして使用した acarbose の 20 分の 1 程度の阻害活性を示し、ジノル体（2）は、ジアール体（1）の半分程度であった。その他の誘導体のα-グルコシダーゼ阻害活性は、いずれも活性が消失したが、ジオール体は活性を維持した。一方、化合物 1,2 のリパーゼ阻害活性評価では両化合物共に活性を示し、その他の各種誘導体に関しても、天然物のジアール体（1）よりは低いものの IC_{50} 73.4 μM から 258.1 μM の間の阻害活性を維持していた。しかし、セスキテルペンアルデヒドである化合物 3 については、両酵素に対する阻害活性が認められなかった。

enzyme inhibitor, diterpene, mango ginger

発表責任者：吉村　奈緒里（rirokirea923@gmail.com）

講演番号：3D4p10
講演日時：3 月 26 日 15:39～ 1 号館 D4 会場

アミロイドβを創薬標的としたシリビニン誘導体の開発

Synthesis of silibinin analogues targeting amyloid beta

○水野 美麗、土屋 圭輔、森 一憲、柴沼 質子、福原 潔 (昭和大薬)
○ Mirei MIZUNO, Keisuke TSUCHIYA, Kazunori MORI, Motoko SHIBANUMA, Kiyoshi FUKUHARA (Showa Univ.)

【目的】アルツハイマー病(AD)の病理学的特徴に、アミロイドβ(Aβ)凝集時に発生する活性酸素及びその凝集体(老人斑)による神経細胞毒性があげられる。クルクミンなど一部の抗酸化物質に、Aβ凝集阻害作用を有することが知られているが、決してその作用は強力でない。当研究室では、天然抗酸化物質であるカテキンの立体構造を固定化した「平面型カテキン(PCat)」を開発した。立体構造を固定化することで、抗酸化活性及びAβ凝集阻害作用が増強することを明らかにした。メディカルハーブの一種で Aβ凝集阻害作用を有するシリビニン(Sib)は平面性の高い最安定化構造をとることが知られており、化合物の立体構造と Aβ凝集阻害作用に何らかの相関があることが推察される。本研究では Sib のフラボノイド構造を、平面型カテキンおよび非平面型エピカテキンに置換した化合物(Sib-C, Sib-EC)を設計・合成した。そして Sib と得られた化合物の抗酸化活性，Aβ凝集阻害作用，神経細胞毒性抑制作用を明らかにし、化合物の平面性との相関について検討を行った。

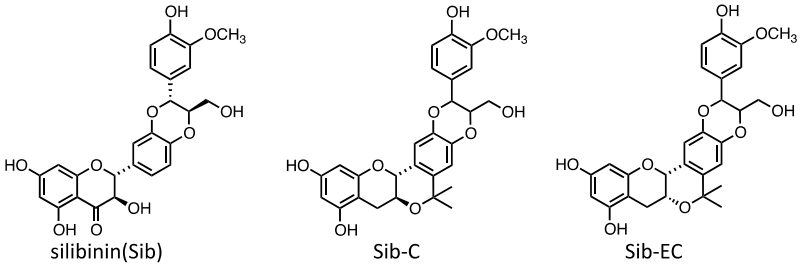
【方法・結果・考察】

＊合成：(+)-catechin および(-)-epicatechin の立体構造を固定化した後、各々をカテコール誘導体との縮合反応により新規誘導体 Sib-C, Sib-EC を合成した。

＊抗酸化活性：Fenton 反応で発生したヒドロキシラジカルの消去作用を ESR スピントラップ法により測定した。またヒドロキシラジカルによる酸化的 DNA 損傷の抑制作用を、電気泳動法により確認した。ESR については、いずれの化合物もヒドロキシラジカルの消去作用は見られなかった。酸化的 DNA 損傷に対しては、Sib-EC がやや抑制していることがわかった。

＊神経細胞保護効果：ヒト神経芽細胞腫(SH-SY5Y)を用いて Aβによる神経細胞毒性を各化合物がどの程度抑制するか、MTT assay により評価した。その結果、いずれも抑制作用が見られなかった。

＊Aβ凝集阻害作用：Thioflavin-T 法により Aβ凝集の阻害程度を評価した。その結果、Sib の平面性を高めた Sib-C が最も強力に凝集を阻害していることが明らかとなった。この結果より、化合物の平面性と Aβ凝集阻害作用の相関が示唆された。



amyloid beta, silibinin, Alzheimer's disease

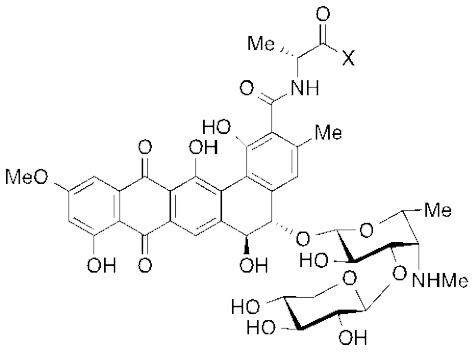
発表責任者：水野美麗（mizuno@pharm.showa-u.ac.jp）

講演番号：3D4p11
講演日時：3 月 26 日 16:00～ 1 号館 D4 会場

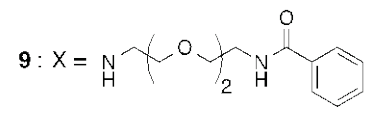
プラディミシン A のアミド誘導体の合成と活性評価
Synthesis and biological evaluation of amide derivatives of pradimicin A
○宮西 航[1]、小鹿 一[1]、五十嵐 康弘[2]、伊藤 幸成[3]、中川 優[1,3] ([1]名大院・生命農、[2]富山県大・生工、[3]理研)
○Wataru MIYANISHI[1], Makoto OJIKA[1], Yasuhiro IGARASHI[2], Yukinari IGARASHI[3], YU NAKAGAWA[1,3] ([1]Nagoya Univ., [2]Toyama Univ., [3]RIKEN)

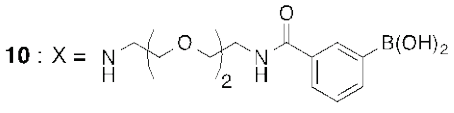
【目的】 Pradimicin A (PRM-A) は，真菌の細胞壁マンナンに結合して抗真菌活性を示す抗生物質である。PRM-A は糖鎖を標的としたユニークな抗真菌薬リードとして注目されているが，水溶液中で高い凝集性を示すことが大きな問題となっている。我々は近年，PRM-A のカルボキシ基に 2-aminoethanol をアミド縮合することにより，凝集性を大幅に抑制できることを見出した。しかしながら，本アミド誘導体 (**1**) の抗真菌活性は PRM-A よりも 4 倍程度低い。そこで本研究では，PRM-A のアミド化を分子設計の基盤として，凝集性を示さず，かつ **1** よりも高い抗真菌活性を示す誘導体を開発することを目的とした。

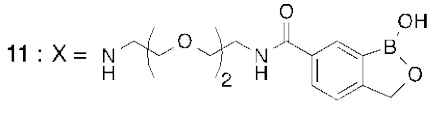
【方法および結果】 PRM-A のメチルエステル化とエステル/アミド交換反応により，10 種のアミド誘導体 (**2**–**11**) を合成した。まず，MOPS バッファー (pH 7.4) 中で凝集試験を行なったところ，硫黄原子を有する **7**, **8** 以外の 8 種の誘導体はほとんど凝集しないことが確認された。そこで，**7**, **8** 以外の誘導体の *Candida rugosa* に対する抗真菌活性を評価したところ，ベンゼン環を有する誘導体 (**9**–**11**) はほぼ不活性であったのに対して，ベンゼン環をもたない誘導体 (**2**–**6**) はいずれも顕著な抗真菌活性を示すことが明らかになった。なかでも，**2** の抗真菌活性は，**1** よりも高く，PRM-A に匹敵するものであった。さらに，真菌マンナンの構成糖である D-マンノース (Man) に対する結合活性を等温滴定カロリメトリーで評価したところ，**2** は PRM-A と同等の Man 結合活性を示すことが確認された。以上の結果は，**2** が PRM-A よりも優れた抗真菌薬リードになりうることを示唆するものである。



PRM-A : X = OH
1 : X = $NHCH_2CH_2OH$
2 : X = NHOH
3 : X = $NHNH_2$
4 : X = NH_2
5 : X = $NHCH_2CH_2NH_2$
6 : X = $NH(CH_2CH_2O)_2CH_2CH_2NH_2$
7 : X = $NHCH_2CH_2SH$
8 : X = $NHCH_2CH_2SSCH_2CH_2NH_2$







antibiotic, antifungal drug, pradimicin

講演番号：3D4p12
講演日時：3 月 26 日 16:11～ 1 号館 D4 会場

ネコブセンチュウの誘引機構の解明とその応用
Studies on the attractant of root knot nematodes
○井田 和輝[1]、吉田 翔太郎[1]、西川 博崇[1]、開出 智美[1]、伊藤 晋作[2]、石毛 太一郎[3]、岩堀 英晶[4]、近藤 竜彦[1]、小鹿 一[1]([1]名大院・生命農、[2]東農大・応用科・バイオ、[3]東農大・ゲノムセンター、[4]龍谷大学・農)
○Kazuki IDA[1], Shotaro YOSHIDA[1], Hirotaka NISHIKAWA[1], Tomomi KAIDE[1], Shinsaku ITO[2], Taichiro ISHIGE[3], Hideaki IWAHORI[4], Tatsuhiko KONDO[1], Makoto OJIKA[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Dept. Bio-science., Tokyo Univ. of Agr., [3]Genome Research Center, NODAI Research Institute, Tokyo University of Agriculture, Tokyo, Japan, [4]Ryukoku Univ.)

【背景・目的】
植物寄生性線虫であるネコブセンチュウは、宿主植物の根に侵入、定着し、維管束周辺に形成した摂食部位から養分を吸収する。この線虫による農作物被害は世界中で報告されており、ネコブセンチュウの防除法の確立は農業上非常に重要な課題である。ネコブセンチュウは、宿主根に感染する際に何らかの化学物質を感知し、感染部位へ誘引されると考えられているが、線虫の誘引に関わる化学物質や作用機序については未だ不明の点が多い。我々はネコブセンチュウを誘引する土壌細菌を複数発見し、その細菌の多くが根浸出液に応答してその存在比を増加させることを明らかにした。この結果から、宿主根から分泌される物質によりこれらの細菌が根の周囲で局所的に増殖し、増殖した細菌が生産する誘引物質を線虫が感知して根に誘引される、という三者間相互作用による線虫誘引モデルの存在が示唆された。本研究では単離した線虫誘引細菌を用いて、この細菌が引き起こす線虫誘引現象の機構の解明を目的とした。

【方法・結果】
線虫誘引試験は、被検試料（細胞培養液、抽出物等）を、寒天溶液と混合して作成した寒天玉を軟寒天中に設置した検定装置を作成し、ネコブセンチュウが軟寒天中を移動して寒天玉に誘引され、軟寒天の周囲に局在するかどうかを判定することで行なった。その結果、線虫誘引細菌の培養液は顕著な線虫誘引活性を示すにもかかわらず、線虫誘引細菌の培養上清や菌体抽出物などは全く活性を示さなかった。そこで、線虫誘引細菌の培養液を用いて寒天玉を調整し、寒天玉の周囲に充填する軟寒天溶液に様々な物質を添加して生物検定を行うことで、細菌による線虫誘引現象を阻害・撹乱する因子の探索を行った。その結果、細菌による線虫誘引現象を有意かつ濃度依存的に阻害する因子として、鉄イオンの関与が示唆された。さらに鉄イオンが単独で線虫誘引活性を示すことを明らかにした。これらの結果は、土壌中において植物根または根圏細菌の生命活動によって可溶化された鉄イオンが線虫誘引物質として機能していることを示唆している。現在、実際に土壌中で鉄イオンを線虫の感染防除、または駆除に活用する方法についても検討を進めており、その結果についてもあわせて発表する予定である。

nematode, nematicide, attractant

講演番号：3D4p13
講演日時：3 月 26 日 16:22～ 1 号館 D4 会場

質量顕微鏡による *Solanum lycopersicum* におけるネオニコチノイド系農薬の移行の解析
Analysis of neonicotinoids movement in *Solanum lycopersicum* using Mass Spectrometer
○生田 宗一郎[1]、岡澤 敦司[2]、西脇 寿[3]、福崎 英一郎[1]、新間 秀一[1]([1]阪大院・工、[2]阪府大院・生命環境、[3]愛媛大院・農)
○Soichiro IKUTA[1], Atsushi OKAZAWA[2], Hisashi NISHIWAKI[3], Eiichiro FUKUSAKI[1], Shuichi SHIMMA[1] ([1]Osaka Univ., [2]Osaka Pref. Univ., [3]Ehime Univ.)

ネオニコチノイド系殺虫剤(以下，ネオニコチノイド)は，ミツバチの大量失踪の原因の一つであると報告されている．もし，ネオニコチノイドがこの現象に関係しているのであれば，植物の根などから吸収されたネオニコチノイドが花粉まで運ばれミツバチをはじめとするポリネーターに拡散されていると考えられる．
本研究グループは，これまで質量顕微鏡を用いて，植物体内におけるネオニコチノイド動態の可視化を行ってきた．先行研究にて，ネオニコチノイドの一種であるイミダクロプリドをトマト（*Solanum lycopersicum*）の根に与え，その移行を器官内(根，茎，葉柄，葉，果実，花弁)で視覚化する手法を確立した．しかし，雄ずいや雌ずい，花粉へのイミダクロプリドの移行は未確認であった．また，イミダクロプリド以外のネオニコチノイドの植物体内における動態も未確認である．そこで本研究では，これまでに確立した手法を拡張し，3 種のネオニコチノイド(イミダクロプリド，クロチアニジンおよびアセタミプリド)の雄ずいや雌ずい，花粉への移行を解析した．
実験では，トマトの花茎を切り出し，各ネオニコチノイド 100 ppm 溶液に浸した．3 日後に花を採取し，雄ずい，雌ずいをサンプルとして用いた．さらに，植物全体を実験に用いた場合には，イミダクロプリド 100 ppm 溶液に根を 24 時間浸した．1，3，5，7 日後に花を採取し，雄ずい，雌ずい，および，花粉を同様にサンプルとして用い，イミダクロプリド移行のタイムコースを可視化した．イメージング質量分析には島津製作所の iMScope TRIO を用いた．
結果，各ネオニコチノイドの雄ずい，雌ずいへの移行が確認でき，イミダクロプリドでは，5 日後の雄ずいや雌ずいへの根からの移行を可視化できた．さらに 7 日後の花粉へのイミダクロプリドの移行も確認できた．本研究の結果よりイミダクロプリドは花の器官や花粉を通じてポリネーターまで拡散していると考えられる．

imaging mass spectrometry, pesticide, plant

講演番号：3D4p14
講演日時：3 月 26 日 16:33～ 1 号館 D4 会場

ヤーコン葉部腺毛由来セスキテルペンラクトン類の昆虫摂食阻害発現に必要な化学構造因子
Insect antifeedant activity of sesquiterpene lactones and their congeners from yacon leaves
○綱木 海成、森本 正則、松田 一彦（近畿大農）
○Kaisei TSUNAKI, Masanori MORIMOTO, Kazuhiko MATSUDA (Kindai Univ.)

〔目的〕

ヤーコン(*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Rob) はアンデス地方原産のキク科植物であり、その肥大した根茎は食用とされてきた。同じく北アメリカ原産キク科植物のキクイモ(*Helianthus tuberosus* L.)もその肥大した塊茎を食用とするために栽培される。同属のイヌキクイモ(*H. strumosus* L.)は、江戸時代末期に日本へ侵入し、現在ではキクイモとともに各地で帰化している。これらのキク科植物は、いずれも葉表面に多数の腺毛をもち病害虫に対して高い耐性を示すことから、その腺毛から分泌される物質を防御物質として使用しているのではないかと推察された。本研究では、これらの種の腺毛の分泌物を収集し、そこに含まれる化合物を解明するとともに、それらのハスモンヨトウ(*Spodoptera litura* F.)3 齢幼虫に対する昆虫摂食阻害活性を評価することにより、この仮説を実証することを目的とした。

〔方法と結果〕

ヤーコン葉部をジクロロメタン(DCM)で数秒洗浄し、腺毛中の滲出物を溶解した。これを減圧濃縮することによって葉部滲出物を黄色油状物として得た。さらに葉部残渣を DCM で抽出後、抽出液を減圧濃縮することにより濃緑色油状物を得た。イヌキクイモ葉部についても同様な手法で抽出した。この様にして得た抽出物の昆虫摂食阻害活性を評価したところ、滲出物が摂食阻害活性を示した。そこで、これをヘキサンと酢酸エチルを展開溶媒とするシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィーで精製した。

ヤーコン葉部滲出物からは、セスキテルペンラクトン(SL)構造をもつ Uvedalin、Enhydrin およびそれらの類縁体を得た。このうち Uvedalin と Enhydrin はパラジウム炭素を触媒として用いて水素を付加し、還元体を得た。一方、イヌキクイモ葉部滲出物からは SL に属する Erioflorin を得た。これらの SL 類とナツシロギク(*Tanacetum parthenium*)由来の SL である Parthenolide についてハスモンヨトウ幼虫に対する摂食阻害活性を評価した。Uvedalin、Enhydrin はインドセンダン（*Azadirachta indica* A. Juss.）由来の Azadirachtin A と比較してやや弱いもののハスモンヨトウ 3 齢幼虫に対して顕著な摂食阻害活性を示した。これらは Erioflorin や Parthenolide よりも高い摂食阻害活性を示し、分子内の二重結合を還元すると摂食阻害活性の低下を招いた。これらの結果から、ヘミテルペン、メチルエステル、アセトキシあるいは γ-ラクトン環の二重結合が摂食阻害活性に貢献しているものと推察された。

insect antifeedant, sesquiterpene lactone, yacon

発表責任者：綱木 海成（1833670014v@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：3D4p15
講演日時：3 月 26 日 16:44～ 1 号館 D4 会場

環状ペプチド薬の結晶構造と溶液構造を用いた差の可視化

Visualization of structure difference using crystal and solution structure analysis of cyclic peptide drug.

○松本 崇、山野 昭人（株式会社リガク）
○Takashi MATSUMOTO, Akihito YAMANO (Rigaku Corporation)

現在医薬品で主流の低分子医薬と市場を拡大している抗体医薬にはそれぞれメリット・デメリットが存在する。近年、この両者の特長を併せ持ち、それぞれの問題点を解決できる可能性を秘めた次世代医薬品として、中分子である環状ペプチド医薬が注目されてきている。この環状ペプチドは医薬品としてだけでなく、農薬、殺虫剤としても注目されている化合物である。

環状ペプチド薬の開発において、機能向上およびターゲット蛋白質との相互作用の最適化には、構造情報が必須である。しかしながら、結晶構造は結晶のパッキングによる影響があるため、溶液中の構造と異なっている可能性もある。このため、環状ペプチド薬の開発には、結晶構造だけではなく、溶液構造も明らかにする必要性があると考えられる。

X 線小角散乱（SAXS）は溶液中の構造解析が可能な貴重な手法である。しかしながら SAXS の散乱強度は分子量に依存するため、分子量の大きい蛋白質の溶液構造解析に主に用いられているが、環状ペプチド等の中分子では測定解析が試されていない。そこで、中分子の分子量で、解析可能な散乱強度が得られるかを検討した。

次に、結晶構造解析と SAXS による溶液構造解析を実施し、溶液中の本来の構造がどのような特徴を持つのかについて調べた。

環状ペプチド薬として、もっとも有名な Cyclosporine A を用いた。最初、Cyclosporine A 溶液に対して SAXS の測定を試したところ、解析可能な散乱強度を得ることができた。次に、結晶構造解析による詳細な構造解析と SAXS による溶液構造解析を行い、結晶状態と溶液状態を比較したところ、推測していた通り両者は大きく異なることが明らかとなった。環状ペプチド薬の本来の構造を正しく評価するためには、詳細な三次元分子構造が得られる結晶構造解析に加え、SAXS による溶液構造解析も必須であろうことが示された。

cyclic peptide drug, solution structure, drug development

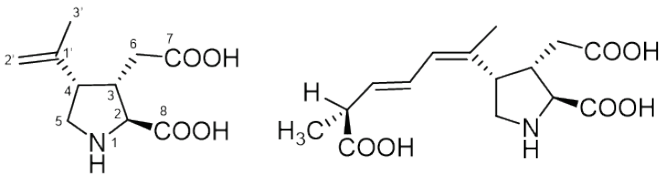
発表責任者：松本　崇（t-matumo@rigaku.co.jp）

講演番号：3D5a02
講演日時：3 月 26 日 09:11～ 1 号館 D5 会場

カイニン酸新規類縁体の探索及び生合成経路の推定
Screening for novel kainic acid analogs and prediction of the biosynthetic pathway

○前野 優香理[1]、寺田 竜太[2]、小瀧 裕一[3]、長 由扶子[1]、此木 敬一[1]、山下 まり[1] ([1]東北大院農、[2]鹿児島大院連合農、[3]福島学院大)
○ Yukari MAENO[1], Ryuta Terada[2], Yuichi Kotaki[3], Yuko Cho[1], Keiichi Konoki[1], Mari Yotsu-Yamashita[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Kagoshima Univ., [3]Fukushima College)

【背景・目的】カイニン酸 (Kainic acid, KA, Figure 1) は、回虫駆除薬として用いられていた紅藻カイニンソウ (別名マクリ、*Digenea simplex*) から単離された。[1] KA は、神経細胞のイオンチャネル型グルタミン酸受容体に結合すると、受容体を過度に活性化させ、細胞死をもたらす。[2] KA の構造はグルタミン酸の部分構造と、(2*S*, 3*S*, 4*S*) の立体配置の 3 置換ピロリジン構造をもつ。同様の構造と神経興奮活性をもつアクロメリン酸、ドウモイ酸 (Domoic acid, DA, Figure 1) を含め、これらはカイノイドと総称される。我々はこれまで、6 種の DA の新規類縁体を単離構造決定し、それらの構造的特徴から、DA の生合成経路を提唱した。[3] KA の生合成経路は未だ解明されていなかったが、KA と DA は同様の骨格構造を有することから、生合成における環化反応は共通すると推定される。我々は、KA の生合成経路の解明を目的として KA の新規類縁体の探索を行った。



Kainic acid (KA)　　Domoic acid (DA)
Figure 1. Structures of KA and DA

【方法】生合成中間体は KA よりも極微量であると推定し、LC-MS/MS を用いて、新規 KA 類縁体を探索した。類縁体と思われる化合物は各種カラムクロマトグラフィーにより単離し、HR-ESI-MS と各種 NMR スペクトルにより構造解析した。得られた化合物のうち 1 種については化学合成と改良マーフィー法により天然物の絶対立体配置の決定を試みた。得られた新規化合物のうち 2 種についてはマウス脳室内投与試験を行った。

【結果】探索の結果、4 種の新規 KA 類縁体を単離、構造決定した。このうち 2 種は KA の生合成中間体と考えられ、KA と DA の生合成における環化反応は共通していることが示唆された。また、残りの 2 種は KA および KA の類縁体 *allo*-KA[4]、それぞれの代謝物と推定された。これらについてはマウス脳室内投与試験を行い、KA の構造活性相関におけるこれまでの知見を支持する結果を得た。

[References]

1. Murakami, S.; Takemoto, T.; Shimizu, Z. *J. Pharm. Soc. Jpn*. **1953**, 73, 1026–1028.
2. Shinozaki, H.; Konishi, S. *Brain Res*. **1970**, 24, 368–371.
3. Maeno, Y.; Kotaki, Y.; Terada, R.; Cho, Y.: Konoki, K.; Yotsu-Yamashita, M. *Sci. Rep*. **2018**, 8, 356.
4. Nitta, I.; Watase, H.; Tomiie, Y.; *Nature* **1958**, 181, 761–762.

kainic acid, biosynthesis, kainoid

発表責任者：山下まり（mari.yamashita.c1@tohoku.ac.jp）

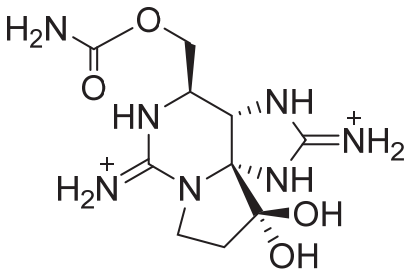
講演番号：3D5a03
講演日時：3 月 26 日 09:22～ 1 号館 D5 会場

東日本で養殖したホタテガイ中の LC-MS/MS による麻痺性貝毒分析

Analysis of paralytic shellfish toxins in the scallop cultured in a coast of eastern Japan by LC-MS/MS

○沼野 聡、工藤 雄大、長 由扶子、此木 敬一、山下 まり（東北大院農）
○Satoshi Numano, Yuta Kudo, Yuko Cho, Keiichi Konoki, Mari Yotsu-Yamashita (Tohoku Univ.)

[背景] 麻痺性貝毒 (paralytic shellfish toxins, PSTs) は、電位依存性ナトリウムイオンチャネルを特異的に阻害する強力な神経毒である。サキシトキシン (STX, **1**) を代表として、ゴニオトキシン (GTX) 類や C トキシン類など 50 種以上の類縁体が知られている。近年、日本近海において、貝類の高毒化や毒蓄積の長期化が問題となっている。しかし、現在、我が国の公定法はマウス毒性試験法であり、PSTs の上昇期および減衰期における各類縁体の詳細な経時変化は報告例が少ない。そこで、これまでに報告された PSTs の LC-MS/MS 法を改良し、PSTs の主要毒に加えて、PSTs の代謝物とされる M トキシン類も数種含めて分析することを目指した。本研究は、試験用に養殖されたホタテガイを用い、中腸腺の毒成分の経時的な組成比変化について知見を得ることを目的とした。



Saxitoxin (1)

[方法] PSTs 生産渦鞭毛藻 (*Alexandrium* 属) が発生する東日本の海域で養殖されたホタテガイを、2017 年 3 月から 12 月まで 1 週間おきに 5 個体､定期的に採集した｡検体から中腸腺のみを切り出し、希塩酸中加熱抽出した毒成分を、HILIC-MS/MS で定性および定量分析した。一部の類縁体は、高分解能 LC-TOF-MS で測定し、同定した。

[結果・考察] 養殖ホタテガイに蓄積した毒成分の組成比は、これまで報告されているように GTX 類が全体の 8 割以上、C トキシン類や STX 類が 2 割程度で構成されていた。PSTs の上昇期および減衰期における濃度変化は、C トキシン類よりも GTX 類の方が大きいことが分かった。また、M トキシン類と推定した成分は、PSTs の上昇期より複数観察された。解析の結果、これらのピークは、C トキシン類の代謝物と考えられる。一方で、他の毒成分は、含有量が少ないことから、今後更に検証が必要と考えられた。

[References]

1. Dell'Aversano, *C. et al., J. Chromatogr. A.* **2005**, 1081, 190-201.
2. Turner, A. D. *et al., J. AOAC. Int.* **2015**, 98, 609-621.
3. Ding, D. *et al., J. Agric. Food Chem*. **2017**, 65, 5494-5502.

paralytic shellfish toxis, saxitoxin, LC-MS/MS

発表責任者：山下 まり（mari.yamashita.c1@tohoku.ac.jp）

講演番号：3D5a04
講演日時：3 月 26 日 09:33～ 1 号館 D5 会場

Bioorganic chemical studies on the fruiting bodies of *Pleurocybella porrigens*

○Arif Yanuaru RIDWAN[1], Jing WU[2], Etsuko HARADA[3], Esteban C GABAZZA[4], Jae-Hoon CHOI[2], Hirofumi HIRAI[1,2], Hirokazu KAWAGISHI[1,2] ([1]Grad. Sch. of Sci. and Technol., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ., [3]Iwade Research Institute of Mycology, [4]Grad. Sch. of Med., Mie Univ)

[Background]

In 2004, the wild mushroom *Pleurocybella porrigens* (Sugihiratake in Japanese) poisoned 55 people who ate it. Among them, 17 people died due to acute encephalopathy.[1] The case has attracted several researchers to solve the relationship between the mushroom intake and the disease. In recent years, our group has reported the isolation and characterization of a novel lectin and unusual amino acids from the mushroom which might be responsible for the poisoning.[2,3] Thus, further investigation led to the discovery of unstable amino acid pleurocybellaaziridine as a toxic precursor.[4] Other studies also suggested the poisoning accident might involve vitamin D analogue and intoxication of cyanide and thiocyanate after Sugihiratake ingestion.[5,6] Despite its toxic nature of *P. porrigens*, there are a few reports of metabolite production in this mushroom.[3,7,8] In this study, we attempt to isolate metabolites and evaluate their biological activities.

[Methods and results]

The fruiting bodies of *P. porrigens* were extracted with ethanol and acetone, respectively. After combining the solution and concentrating it under reduced pressure, the extracts were divided into *n*-hexane soluble part, EtOAc soluble part, ethanol soluble part and water soluble part. The EtOAc soluble part was subjected to repeated chromatography. As a result, several compounds were obtained. The chemical structures of the compounds were determined by the interpretation of NMR, IR, and MS spectra. The compounds were tested for their inhibition activity against a lung cancer line.

[References]

1) Suzuki, T. et al. J. Microbiol. Methods., 100, 70–76 (2014).
2) Suzuki, T. et al. Biosci. Biotechnol. Biochem., 73, 702–709 (2009).
3) Kawaguchi, T. et al. Tetrahedron, 66, 504–507 (2010).
4) Wakimoto, T. et al. Angew. Chem. Int. Ed., 50, 1168 –1170 (2011).
5) Sasaki, H. et al. Biol. Pharm. Bull., 29, 2514–2518 (2006).
6) Akiyama, H. et al. Food Safety., 3, 16–29 (2014).
7) Amakura, Y. et al. Chem. Pharm. Bull., 54, 1213–1215 (2006).
8) Hasegawa, T. et al. Chem. Pharm. Bull., 55, 1748–1749 (2007).

Pleurocybella porrigens, structure determination, lung cancer inhibitory activity

発表責任者：Hirokazu Kawagishi（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3D5a05
講演日時：3 月 26 日 09:44～ 1 号館 D5 会場

Elucidation of Absolute Configuration and Structure Activity Relationship of a Novel Bioactive Compound from *Leucopaxillus giganteus*

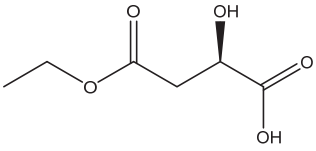
○Irine Yunhafita Malya[1], Jing Wu[2], Etsuko Harada[3], Esteban C Gabazza[4], Jae-Hoon Choi[2], Hirofumi Hirai[2], Hirokazu Kawagishi[1,2] ([1]Grad. Sch. of Sci. and Technol., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ., [3]Iwade Research Institute of Mycology, [4]Grad. Sch. of Med., Mie Univ.)

[Background]

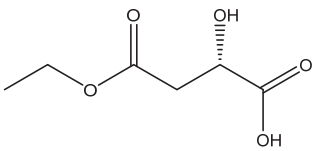
An edible mushroom, *Leucopaxillus giganteus* is commonly called Giant Funnel in English and Ooichotake in Japanese, which belongs to *Tricholomataceae* family grows in grassland and often forms ring shape[1)]. In the previous study, we isolated compound (**1**) from the fruiting bodies of *L. giganteus* by successive chromatography. Compound **1** showed no activity towards human lung cancer cell lines. However, compound **1** exhibited strong inhibition activity on the growth of root and hypocotyl of lettuce[2)]. The absolute configuration of **1** remains undetermined. In this study, we synthesized stereoisomers of **1** to determine the absolute configuration and also other two analogs to study the structure activity relationship.

[Methods and Results]

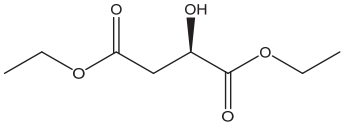
(L) or (D)-Malic acid was dissolved with EtOH and then reacted with HCl for 15 minutes at room temperature[3)]. The reaction mixture was subjected to silica gel flash column chromatography followed by Sephadex LH-20 chromatography. As a result, two stereoisomers of monoethyl esters (**1** and **2**) along with diethyl esters (**3** and **4**) were isolated. The absolute configuration of **1** was determined by comparing specific rotation of the synthetic products. As a result, compound **1** was determined to be *R*, indicating that it was a novel compound. Furthermore, all the synthetic products were evaluated their activity against the growth of lettuce and cytotoxicity against human lung cancer cell lines in order to study the structure activity relationship.



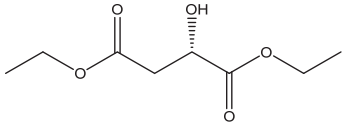
(*R*)-4-ethyl-2-hydroxylsuccinate (**1**)



(*S*)-4-ethyl-2-hydroxylsuccinate (**2**)



(*R*)-diethyl-2-hydroxysuccinate (**3**)



(*S*)-diethyl-2-hydroxysuccinate (**4**)

1) Ibeiro, R., *et al., J. Agric. Food Chem.*, 56, 4769–4774 (2008)
2) Malya, I. Y., *et al., Proceedings of The Annual Meeting of Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry* (pp. 624). Nagoya, Japan: Meijo University (2018)
3) Cohen, S. G., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 88, 5306–5314 (1966)

Leucopaxillus giganteus, absolute configuration, structure activity relationship

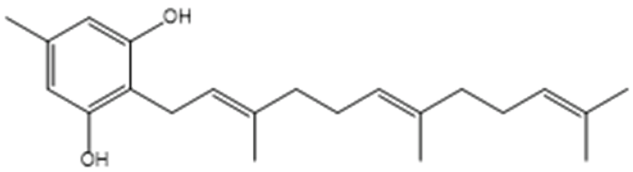
発表責任者：Hirokazu KAWAGISHI（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3D5a06
講演日時：3 月 26 日 10:05～ 1 号館 D5 会場

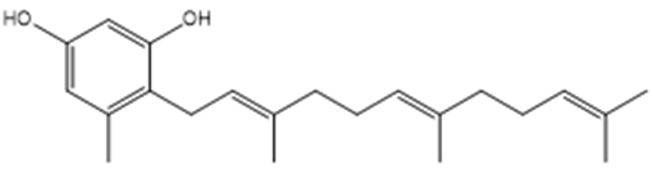
ニンギョウタケ(*Albatrellus confluens*)子実体由来の生物活性物質の探索
Search for biologically functional compounds from fruiting bodies of *Albatrellus confluens*
○日比 琢斗[1]、石岡 達郎[2]、呉 静[1]、崔 宰熏[1,2,3]、平井 浩文[1,2,3]、河岸 洋和[1,2,3,4] ([1]静大農、[2]静大院・総合農、[3]静大・グリーン研、[4]静大院・創造)
○ Takuto HIBI[1], Tatsuro ISHIOKA[2], Jing WU[1], Jae-Hoon CHOI[1,2,3], Hirofumi HIRAI[1,2,3], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,3,4] ([1]Fac. of Agric., Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. of Inte. Sci and Tech., Shizuoka Univ., [3]RIGST, Shizuoka Univ., [4]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ.)

【目的・背景】
ニンギョウタケ（*Albatrellus confluens*）はニンギョウタケモドキ科ニンギョウタケモドキ属の可食性のキノコである。全体の直径が20 cm以上、傘は肉厚で扇形やへら形、柄は傘の横や中心を外れた位置にできる形をしたキノコで、日本やヨーロッパ、北アメリカにみられる[1)]。当研究グループでは過去に、ニンギョウタケ子実体粉末の酢酸エチル可溶部から、血漿コレステロールレベル低下作用をもつ物質を単離した[2)]。本研究において、ニンギョウタケ子実体各抽出物を用いてエノキタケ菌糸体成長調節活性試験を行ったところ、酢酸エチル可溶部に菌糸体成長調節活性がみられた。そこで、ニンギョウタケ子実体から生物活性物質の単離、精製、構造決定を試みた。

【方法・結果】
ニンギョウタケ子実体をエタノール、アセトンにより抽出した。抽出物をヘキサン、酢酸エチル、エタノール及び水で順次抽出することにより各可溶部を得た。活性試験を指標にして、酢酸エチル可溶部をフラッシュクロマトグラフィー、MPLCおよびHPLC等を用いて分画し、化合物の単離・精製を試みた。その結果、grifolinおよびneogrifolinを含む数種の化合物の単離に成功した。これらの化合物の構造はMSおよび各種NMRスペクトルにより決定した。現在これらの化合物を各種活性試験に供し、生物活性について検討している。



grifolin



neogrifolin

1）今関　六也ら、日本のきのこ、山と渓谷社、448（1999）
2）K. Sugiyama, *et al*, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.,* 38, 335-342, (1992)

Albatrellus confluens, structure determination, biologically functional compounds

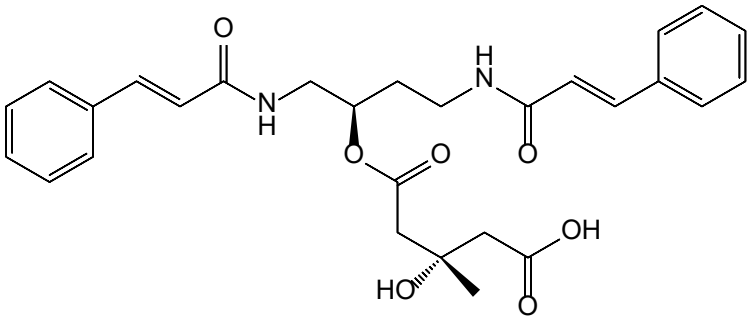
発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3D5a07
講演日時：3 月 26 日 10:16～ 1 号館 D5 会場

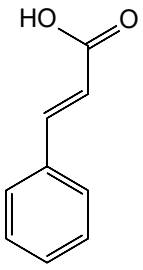
キナメツムタケ子実体由来の生体機能性物質の探索
Search for biofunctional compounds from *Pholiota spumosa*
○高橋 真奈美[1]、呉 静[2]、崔 宰熏[1,2,3]、平井 浩文[1,2,3]、河岸 洋和[1,2,3,4] ([1]静大院・総合農、[2]静大農、[3]静大・グリーン研、[4]静大院・創造)
○ Manami TAKAHASHI[1], Jing WU[2], Jae-Hoon CHOI[1,2,3], Hirofumi HIRAI[1,2,3], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,3,4] ([1]Grad. Sch. of Inte. Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [2]Fac. of Agric., Shizuoka Univ., [3]RIGST, Shizuoka Univ., [4]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ.)

【背景・目的】
キノコの形態や機能は多種多様であり、古くから食用のみならず、生薬あるいは漢方薬として重宝されてきた。そのためキノコから様々な生理作用を示す化合物が数多く単離されている。
キナメツムタケ（*Pholiota spumosa*）はモエギタケ科スギタケ属に属するキノコで、秋から晩秋にかけて倒木上やその周辺の地上に発生する食用キノコである。子実体から単離された pholiotic acid（**1**）は、前立腺がん細胞の細胞増殖を阻害するという報告があるが、このキノコに関する研究例は非常に少ない[1)]。
本研究では、キナメツムタケの子実体由来の新規機能性物質の探索を目的とした。

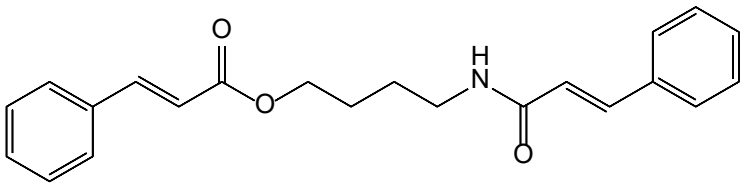
【方法・結果】
キナメツムタケ子実体 17.0 kg を 80%エタノール、アセトンで順次 2 回ずつ抽出、抽出液を減圧濃縮し、粗抽出物を得た。その後、ヘキサンおよび酢酸エチルで順次液-液分配、エタノールで固-液分配し、減圧濃縮後、各可溶部を得た。得られた酢酸エチル可溶部 11.5 g をフラッシュカラムクロマトグラフィー、MPLC、HPLC を用いて分画し、化合物の単離および精製を試みた。
酢酸エチル可溶部から 2 種の化合物（**2**：35.1 mg, **3**：1.7 mg）の単離に成功した。単離された化合物の構造は MS、IR および各種 NMR スペクトルデータの解析によって同定した。現在、これらの化合物を菌糸体成長調節活性に供している一方で、更なる化合物の単離を試みている。



1



2



3

1) Marco C, *et al*., *Eur. J. Org. Chem.*, 33, 5551-5559 (2007)

Pholiota spumosa, mushroom, structure determination

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3D5a08
講演日時：3 月 26 日 10:27～ 1 号館 D5 会場

黒穂菌由来の植物成長調節物質に関する化学的研究
Chemical study on plant growth regulators from *Ustilago esculenta*

○森本 悠介[1]、呉 静[1]、崔 宰熏[1,2,3]、徳山 真治[1,2]、平井 浩文[1,2,3]、河岸 洋和[1,2,3,4] ([1]静大・農、[2]静大院・総合農、[3]静大・グリーン研、[4]静大院・創造)
○ Yusuke MORIMOTO[1], Jing WU[1], Jae-Hoon CHOI[1,2,3], Shinji TOKUYAMA[1,2], Hirofumi HIRAI[1,2,3], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,3,4] ([1]Fac. of Agric., Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. of Inte. Sci and Tech., Shizuoka Univ., [3]RIGST, Shizuoka Univ., [4]Grad. Sch. of Sci. and Technol., Shizuoka Univ.)

【目的】

マコモタケとはイネ科マコモ属であるマコモ（*Zizania latifolia*）に黒穂菌（*Ustilago esculenta*）が感染するとオーキシンが盛んに分泌され，茎での細胞分裂が活性化し，肥大化することで得られるという説が存在する。黒穂菌が感染後に分泌するオーキシン以外の肥大化の誘導物質が存在すると仮定し，その化合物の単離・精製，構造決定及び共生のメカニズムの解明をする。現在までに当研究室ではマコモタケから破骨前駆細胞分化抑制物質 makomotine 類および腫瘍細胞増殖抑制物質 makomotindoline 類を発見し[1-3]，黒穂菌培養ろ液から 5 種の化合物を新規物質として単離したが、植物に対する活性は見いだしていない[4,5]。本研究では、黒穂菌から植物成長調節物質の探索を目的とした。

【方法・結果】

黒穂菌 NBRC9887 株を 1 週間前培養したものを、ポテトデキストロースブロス培地を用いてジャーファメンターで培養・濾過を行い 10.5 L の培養ろ液を得た。その後、減圧濃縮した粗抽出物を、ヘキサン、酢酸エチルおよびブタノールで順次液-液分配、エタノールで固-液分配し、減圧濃縮後、各可溶部を得た。得られた酢酸エチル可溶部 2.68 g をフラッシュカラムクロマトグラフィー、HPLC を用いて分画し、化合物の単離および精製を試みた。現在，単離した化合物は NMR, IR, MS を用いて構造決定を行っている。さらに、植物成長調節活性試験を行い、マコモの肥大化の誘導物質かどうかを検討する。

1) H. Kawagishi, *et al*., *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **70**, 2800-2802 (2006)
2) T. Suzuki, H. Kawagishi, *et al*., *Bioorga. Med. Chem. Lett*. **22**, 4246-4248 (2012)
3) J.-H. Choi, H. Kawagishi, *et al*., *Tetrahedron Lett*. **55**, 3596-3599 (2014)
4) 西山 祐貴ら、平成 28 年度日本農芸化学大会講演要旨集 p.123
5) 森 拓未ら、平成 29 年度日本農芸化学大会講演要旨集

Zizania latifolia, *Ustilago esculenta*, structure determination

発表責任者：河岸　洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3D5a09
講演日時：3 月 26 日 10:38～ 1 号館 D5 会場

陸上由来のテトロドトキシン新規類縁体、生合成関連化合物の構造と生理活性
Structures and bioactivities of new tetrodotoxin analogue and biosynthetic shunt compound from the newt
○工藤 雄大、山下 まり（東北大院農）
○Yuta Kudo, Mari Yotsu-Yamashita (Tohoku Univ. of Agric.)

[背景] テトロドトキシン (Tetrodotoxin, TTX, **1**, 図 1) はフグを含む海洋生物、陸棲の両生類に含まれ、電位依存性ナトリウムイオンチャネル (Na_v) を阻害する神経毒である。代表的な自然毒である一方で、TTX の生合成遺伝子は一切同定されておらず、複雑な構造がどのように構築されるか未解明である。我々は生合成経路の解明の糸口となり得る化合物 TTX 類縁体、生合成中間体を探索し、有毒イモリから得られた化合物 **2**, **3** の構造を基に陸上における生合成経路を推定した (図 1)[1]。また、イモリは自身で毒を生産せず、外部から蓄えることを示した[2]。一方で、得られた TTX 類縁体の生理活性を調べ、構造活性相関研究を進めてきた。本発表では、有毒イモリから得られた新規成分の構造と TTX の生合成経路の考察、および生理活性試験の結果を報告する。

[方法] オキナワシリケンイモリ (*Cynops ensicauda popei*) の抽出物を高分解能 LC-MS/MS で解析し、新規成分を探索した。検出された新規成分 2 種をそれぞれ単離し、NMR で構造解析した。得られた新規 TTX 類縁体の Na_v 阻害活性をマウス神経芽細胞腫 Neuro-2a を用いて調査した。

[結果] 構造解析の結果、新規成分の一つは 8-*epi*TTX と同定された。TTX の約 1/60 の EC_{50} 値を示し、エクアトリアル配置の 8 位ヒドロキシ基が生理活性に大きく寄与することが示された。TTX の 6-*epi* 体、8-*epi* 体は、有毒イモリにのみ含まれる類縁体だが、これらは推定生合成中間体 (**3**) のような二環性化合物から、三環が構築される際に生ずると推測される。もう一種の新規成分は含グアニジン 6 員環と 7 員環を有する二環性化合物と同定され、我々の考える shunt 経路の一成分だと推測された。

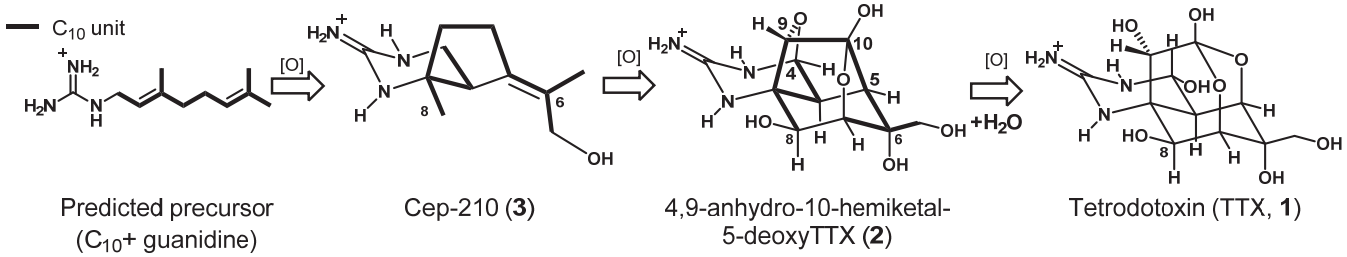


図 1. 陸上における TTX の推定生合成経路 [1]

[引用] 1) Kudo, Y.; Yasumoto, T.; Mebs, D.; Cho, Y.; Konoki, K.; Yotsu-Yamashita, M.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 8728. 2) Kudo, Y.; Chiba, C.; Konoki, K.; Cho, Y.; Yotsu-Yamashita, M.; *Toxicon*, **2017**, *137*, 78.

tetrodotoxin, sodium ion channel blocking activity, structure elucidaton

発表責任者：山下まり（mari.yamashita.c1@tohoku.ac.jp）

講演番号：3D5a10
講演日時：3 月 26 日 10:49～ 1 号館 D5 会場

テトロドトキシン推定生合成中間体のテトロドトキシン含有生物への投与
Administration of possible biosynthetic intermediates of tetrodotoxin to tetrodotoxin possessing animals

○杉本 敬太[1]、工藤 雄大[1]、宮坂 忠親[2]、安立 昌篤[2]、長 由扶子[1]、此木 敬一[2]、千葉 親文[3]、西川 俊夫[2]、山下 まり[1]（[1]東北大院農、[2]名大院生命農、[3]筑波大生命環境系）
○Keita SUGIMOTO[1], Yuta Kudo[1], Tadachika Miyasaka[2], Masaatsu Adachi[2], Yuko Cho[1], Keiichi Konoki[2], Chikafumi Chiba[3], Toshio Nishikawa[2], Mari Yamashita[1]（[1]Tohoku Univ., [2]Nagoya Univ., [3]Univ. of Tsukuba）

[背景] テトロドトキシン (Tetrodotoxin, TTX, **1**, 図 1) はフグなどの海洋生物やイモリなどに含まれるが TTX の生合成経路は未解明である。当研究室では、陸上および海洋の両方の環境から、生合成中間体と思われる関連化合物を単離構造決定し、生合成経路を推定してきた[1,2]。今回、既報の Cep-242[3] に引き続き、オキナワシリケンイモリ (*Cynops ensicauda popei*) から得られた Cep-212 (**2**)[1]の合成品[4]を用いて、研究室飼育の無毒アカハライモリ (*C. pyrrhogaster*) に投与し、蓄積、他の関連化合物への変換を調べたので報告する。
[方法] 引用文献 3 と同様の方法を用いて、**2** の合成品を研究室飼育の無毒アカハライモリに餌にまぜて投与し、飼育水とともに 1 ヶ月後に身体と内蔵に分けて抽出して、LC-MS で各成分を分析した。
[結果] 投与した **2** の一部が内蔵以外の身体組織に蓄積したことを確認した。このことは、TTX 非生産者であるイモリから **2** などの生合成中間体が単離されたことを裏付ける結果と考えられた。さらに、ハチノジフグ (*Tetraodon biocellatus)* から単離した Tb-210B (**3**)[2]の安定同位体ラベル体を合成し、海洋生物についても類似の実験を行う予定である。

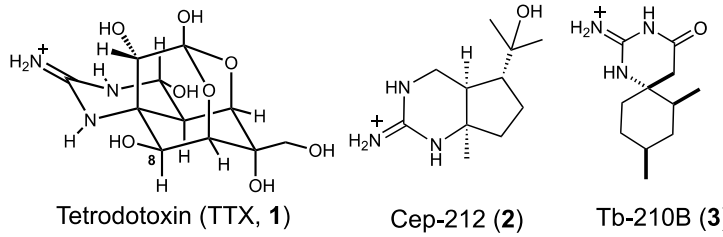


図 1. テトロドトキシンおよび陸上と海洋の推定生合成中間体の構造

[引用] 1) Kudo, Y.; Yotsu-Yamashita, M. *et al*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 8728–8731.
2) Ueyama, N., Yotsu-Yamashita M., *et al*., *Chem. Eur. J*., **2018,** 24, 7250–7258.
3) Kudo, Y.; Yotsu-Yamashita, M. *et al., Toxicon,* **2017**, *137*, 78–82.
4) 宮坂、安立、杉本、山下、西川　日本農芸化学会 2018 年度大会 3A16p05

tetrodotoxin, newt

発表責任者：山下まり（mari.yamashita.c1@tohoku.ac.jp）

講演番号：3D5a11
講演日時：3 月 26 日 11:10～ 1 号館 D5 会場

ヤマブシタケ（*Hericium erinaceus*）の生活環各段階における生物活性物質の網羅的探索
Exhaustive search for bioactive compounds at each stage of life cycle of *Hericium erinaceus*
○呉 静[1]、石岡 達朗[2]、崔 宰熏[1,2,3]、平井 浩文[1,2,3]、河岸 洋和[1,2,3,4]（[1]静大・農、[2]静大院・総合農、[3]静大・グリーン研、[4]静大院・創造）
○Jing Wu[1], Tatsuro Ishioka[2], Jae Hoon Choi[1,2,3], Hirofumi Hirai[1,2,3], Hirokazu Kawagishi[1,2,3,4]
([1]Fac. of Agric., Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. of Inte. Sci and Tech., Shizuoka Univ., [3]RIGST, Shizuoka Univ., [4]Grad. Sch. of Sci. and Technol., Shizuoka Univ.)

【目的】キノコ（子実体）を形成する高等菌類は，胞子から菌糸，菌糸から子実体，そして子実体から胞子という生活環を持っている。また，一般にキノコの発生時に菌糸体表面に液体が分泌される。我々はこれまで誰も注目していなかったこの液に着目し，子実体形成に関与していると考え，fruiting liquid（FL）と命名した。ヤマブシタケ FL はエノキタケに対して子実体形成促進あるいは誘導活性が確認された。本研究では，ヤマブシタケ生活環の各段階と FL から生物活性物質の単離・精製および構造決定を目的とした。

ヤマブシタケ（*Hericium erinaceus*）は，サンゴハリタケ科サンゴハリタケ属の可食性のキノコである。過去に当研究室は，認知症の予防や治療への有効性が指摘されている神経成長因子の合成を促す物質として，ヤマブシタケ子実体から hericenone 類を，ヤマブシタケ菌糸体から erinacine 類を発見している。ヤマブシタケ培養ろ液から，HeLa 細胞に対して増殖阻害活性を示す物質として erinapyrone 類を報告している。ヤマブシタケ廃菌床から，小胞体ストレス誘導神経細胞死抑制物質を単離している[1)]。「キノコは何故生活環をもっているのか, そして, それぞれの生育段階でどのような分子を創り，何故，それらを創っているのか」の解明を目指す。

【方法と結果】ヤマブシタケ培養ろ液，胞子および FL をヘキサン，酢酸エチルで順次抽出し，減圧濃縮して各可溶部を得た。活性が確認された各可溶部を各種クロマトグラフィーに供し，培養ろ液から 15 種の化合物，胞子から 10 種の化合物，FL から 4 種の化合物を単離した。これらの化合物の構造は MS，IR および各種 NMR スペクトルにより決定した。新規化合物は 13 種，天然から初めて単離された化合物は 2 種であった。

ヤマブシタケ生活環の各段階から単離された化合物を菌糸体成長調節活性および植物成長調節活性試験に供した。Erinacine A, C および K は 1 週間後にエノキタケとウシグソヒトヨタケ菌糸体成長を強く阻害し，2 ヶ月後に erinacine A および C にエノキタケ子実体形成誘導活性が確認された。また，いくつかの化合物は植物成長調節活性を示した。

一種類のキノコに対して，生活環各段階（胞子，菌糸体，子実体）における網羅的な 2 次代謝産物の研究はあまり行われていない。特に，FL 中の化合物が明らかになったのは今回が世界で初めてである。

1) 河岸洋和，キノコからの生体機能分子，*有機合成化学協会誌*，68, 514–521 (2010)

structure determination, the mushroom life cycle, *Hericium erinaceus*

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3D5a12
講演日時：3 月 26 日 11:21～ 1 号館 D5 会場

サンゴハリタケ （*Hericium coralloides*） 由来の生体機能性物質の探索
Search for biofunctional compounds from *Hericium coralloides*

○清宗 大[1]、呉 静[1]、崔 宰熏[1,2,3]、徳山 真治[1,2]、平井 浩文[1,2,3]、河岸 洋和[1,2,3,4] ([1]静大農、[2]静大院・総合農、[3]静大・グリーン研、[4]静大院・創造)
○Dai KIYOMUNE[1], Jing WU[1], Jae-Hoon CHOI[1,2,3], Shinji TOKUYAMA[1,2], Hirofumi HIRAI[1,2,3], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,3,4] ([1]Fac. of Agric., Shizuoka Univ., [2]Grad.of Inte.Sci.,Shizuoka Univ., [3]RIGST, Shizuoka Univ., [4]Grab. Sch. of Sci. and Tech.,Shizuoka Univ.)

【背景・目的】当研究室では、過去にサンゴハリタケ属であるヤマブシタケ（*Hericium erinaceus*）子実体および菌糸体から認知症の予防や治療への有効性が指摘されている神経成長因子の合成を促す物質として、hericenone 類および erinacine 類を発見し[1-6]、菌糸体培養濾液から HeLa 細胞に対して増殖阻害活性を示す物質として erinapyrone 類および植物成長調節物質として erinaceolactone 類を発見した[7-9]。ヤマブシタケ廃菌床から，小胞体ストレス誘導神経細胞死抑制物質を単離している[10]。そのため，我々は同じサンゴハリタケ属であるサンゴハリタケ（*H. coralloides*）に着目した。

サンゴハリタケは、サンゴハリタケ科サンゴハリタケ属の可食性のキノコである[11]。サンゴハリタケは傘をつくらずサンゴ状に分岐する枝を横ざまにのばし、枝の下面から無数の針を垂らす。全体的に白く、直径の大きさは 10 cm から 20 cm 程度で針の長さは 1 mm から 6 mm であり、日本やヨーロッパ、北アメリカなどでみられる[12]。サンゴハリタケに関する二次代謝産物の研究は少ないため，本研究ではサンゴハリタケ菌糸体および培養濾液からの機能性物質の単離・精製を目的とした。

【方法・結果】MEA 培地（1 L あたりに麦芽エキス 20 g, グルコース 20 g, ペプトン 1 g）で培養されたサンゴハリタケ菌糸体（40.8 g）をミキサーで粉砕し，ヘキサン、酢酸エチル、エタノール、水で各 2 回ずつ抽出した。その後、ヘキサン可溶部、酢酸エチル可溶部をフラッシュカラムクロマトグラフィー、MPLC、HPLC で分画を進め、化合物の単離・精製を試みた。また、サンゴハリタケ菌糸体を 1 L あたりにグルコース 40 g、ペプトン 3 g、コーンスティープリカー 50 g、リン酸二水素カリウム 503 mg、リン酸水素二ナトリウム 492.6 mg を含む液体培地で振とう培養し、濾過して菌糸体、培養濾液に分け、培養濾液（6 L）をヘキサン、酢酸エチルで液-液分配し、水層を乾固しエタノールで抽出した。培養濾液の酢酸エチル可溶部をフラッシュカラムクロマトグラフィーに供し分画を進め、化合物の単離・精製を試みた。その結果、数種の化合物の単離に成功した。これらの化合物の構造は MS、IR および各種 NMR スペクトルにより決定した。今後、これらの化合物の活性試験を行う予定である。

【参考文献】

1) Kawagishi, H. et al., Tetrahedron Lett., 32, 4561–4564 (1991)
2) Kawagishi, H. et al., Phytochem., 32, 175–178 (1993)
3) Kawagishi, H. et al., Tetrahedron Lett., 35, 1569–1572 (1994)
4) Kawagishi, H. et al., Heterocycl. Commun., 2, 51–54 (1996)
5) Kawagishi, H. et al., Tetrahedron Lett., 37, 7399–7402 (1996)
6) Lee, E. W. et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 64, 2402–2405 (2000)
7) Kawagishi, H. et al., Chem. Lett., 21, 2475–2476 (1992)
8) Okamoto, K. et al., Phytochem., 34, 1445–1446 (1993)
9) Wu, J. et al., J. Nat. Prod., 78, 155–158 (2015)
10) Ueda, K. et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 73, 1908‐1920 (2009)
11) Zou, Y. J. et al., J. Microbiol., 50, 72-78 (2012)
12) 今関 六也ら、日本のきのこ、山と渓谷社、432 (1999)

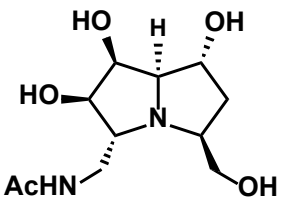
Hericium coralloides, structure determination, mushroom

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

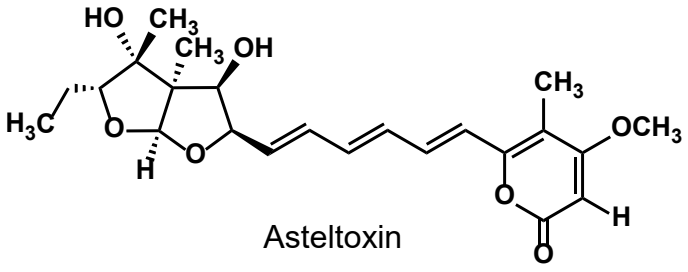
講演番号：3D5a13
講演日時：3 月 26 日 11:32～ 1 号館 D5 会場

Pochonia suchlasporia の固体培養により生産される糸状菌胞子発芽阻害物質
Inhibitor of fungal spore germination produced by solid-state culture of *Pochonia suchlasporia*
○片岡 智範、神崎 浩、仁戸田 照彦（岡山大院・環境生命）
○Tomohiro KATAOKA, Hiroshi KANZAKI, Teruhiko NITODA (Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okayama Univ.)

【目的】当研究室ではこれまでに, 押し麦を培地とする固体培養において, 糸状菌 *Pochonia suchlasporia* var. *suchlasporia* TAMA87 株が新規 β-*N*-acetylglucosaminidase (GlcNAcase)阻害物質 pochonicine を生産することを見出した [1)]。Pochonicine が昆虫 GlcNAcase に対して強力な阻害活性を示したことから本菌株の培養抽出物をヒロズキンバエ殺虫試験に供したところ, 活性が認められた。精製・構造解析の結果, 活性物質は pochonicine ではなく，asteltoxin の類縁化合物 ET-1 であることを見出した。糸状菌の固体培養では多様な二次代謝産物が生産されることから，本菌株は pochonicine, ET-1 以外にも生理活性物質を生産すると推測される。今回，本菌株の固体培養抽出物が糸状菌胞子発芽阻害活性を有することを見出したことから，その活性物質を明らかにすることを目的とした。【方法・結果】Pochonicine の生産に用いられてきた条件で *P. suchlasporia* の固体培養を行った。得られた培養物を MeOH で抽出し，糸状菌胞子発芽阻害試験に供したところ，76 μg/mL で胞子発芽阻害活性が認められた。上記の GlcNAcase 阻害物質 pochonicine は 5.0 mg/mL においても活性を示さず，活性物質が pochonicine ではないことが推定された。培養日数ごとに MeOH 抽出物の糸状菌胞子発芽阻害活性を調べたところ，培養 25 日目の抽出物に最も強い活性が認められた。培養日数 25 日で大量培養を行い，MeOH 抽出物を水と酢酸エチルで溶媒分画したところ，水可溶画分に MeOH 抽出物と同等の活性が認められた。水可溶画分を Oasis HLB カートリッジカラムに供したところ，75% MeOH 溶出画分に活性が認められた。この画分を, 多波長検出器を用いた ODS-HPLC 分析に供したところ, 検出波長 281 nm において全ピークの 76%を占めるメインピークが認められ，そのピークの UV 吸収スペクトルおよび溶出時間は上記の殺虫活性物質 ET-1 のものと一致した。以上より，*P. suchlasporia* が生産する糸状菌胞子発芽阻害物質は，本菌株から以前我々が見出した殺虫活性物質 ET-1 であることが示唆された。



Pochonicine



Asteltoxin

[1)] H.Usuki, M. Toyo-oka, H. Kanzaki, T. Okuda, T. Nitoda, *Bioorg. Med. Chem.*, **17**, 7248-7253 (2009)

secondary metabolite, ß-*N*-acetylhexosaminidase　inhibitor, insecticidal activity

発表責任者：仁戸田照彦（nitoda@okayama-u.ac.jp）

講演番号：3D5a14
講演日時：3 月 26 日 11:43～ 1 号館 D5 会場

LC/Q-TOF MS によるパリトキシン類縁体オストレオシン類の構造研究－Pseudo-MS^3 法の妥当性検証とオストレオシン-E1 構造解析への適用―
Structure of ostreocin-E1, a novel palytoxin analogue, characterized by LC/MS/MS and pseudo-MS^3 experiments

○寺島 健仁[1]、内田 秀明[2]、阿部 尚樹[1,3]、安元 健[4] ([1]東農大院・食品栄養、[2]アジレント・テクノロジー、[3]東農大・応生、[4]日本食品分析センター)
○Takehito TERAJIMA[1], Hideaki UCHIDA[2], Naoki ABE[1,3], Takeshi YASUMOTO[4] ([1]Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture, [2]Agilent Technologies Japan, Ltd., [3]Faculty of Applied Bioscience, Tokyo University of Agriculture, [4]Japan Food Research Laboratories)

【背景・目的】 渦鞭毛藻 *Ostreopsis siamensis* が生産するオストレオシン類 (OSTs)は、パリトキシン (PLTX) の類縁体で、巨大で複雑な化学構造を有し、食中毒の原因となる有毒天然物である。主要成分オストレオシン-D (OSTD)は NMR と FAB-CID-MS/MS により構造決定されたが[1]、微量成分は生産量が少ないことなどから NMR 解析は妨げられていた。これまでに、我々は LC/Q-TOF MS を使用して$[M + H]^+$・$[M - H]^-$をプリカーサーとした MS/MS により、沖縄由来 *O. ovata*-IK2 と *O. siamensis* より得た 3 種のオバトキシン-IK2 と 2 種の微量 OSTs の平面構造を決定した[2]。本手法は混合物かつ数百ナノグラムの試料量でも解析が可能で、PLTXs の構造研究に有効な方法であることを示したが、詳細な構造変化を議論する際の特徴的なイオンが観測されない例もあった。本発表では、LC/Q-TOF MS を使用し pseudo-MS^3 法により PLTXs の詳細な構造解析を可能にしたこと、新奇類縁体オストレオシン-E1 (OSTE1)の平面構造決定に寄与した例を報告する。

【方法・結果】 試料には *O. siamensis* より既報[1b]に従い得た OSTD、混合物として得た OSTE1 及び標準品 PLTX を用い、分析機器に Agilent 社製 6530 LC/Q-TOF MS を使用し、分析条件は既報[2a,b]に従った。まず、OSTD・PLTX を試料とし、部分構造 C8'-C45 と C49-C115 に対応するイオンをプリカーサーとする pseudo-MS^3 (陰イオンモード)を行った。C8'-C45 では、OSTD と PLTX の差異 (OSTD で C3,26-didemethyl, C19-deoxy, C42-hydroxy, C44-deoxy)を明確に判別できるイオンが観測された。OSTD と PLTX では毒性が約 5 倍程度異なることからも、2 つの差異を見分けられる pseudo-MS^3 は PLTXs の構造研究、あるいは構造活性相関研究での強力なツールになりうると推測される。一方で、C49-C115 では、既報[1c]と同様な部位での開裂も確認され、これまでの 1 価イオンをプリカーサーとした MS/MS に比較し、詳細な部分構造を反映するイオンが観測された。続いて、新奇類縁体 OSTE1 の構造解析に適用し、$[M + H]^+$・$[M - H]^-$をプリカーサーとした MS/MS と pseudo-MS^3 により、OSTE1 の平面構造を 72,73-didehydroOSTD と決定した。

【References】

1. a)Usami M et al. *J Am Chem Soc*. 1995. b)Ukena T et al. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2001. c)Ukena T et al. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2002. 2. a)Uchida H et al. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2013. b) Terajima T et al. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2018. c)Terajima T et al. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2018.

pseudo-MS^3, ostreocin-E1, palytoxin analogue

発表責任者：寺島健仁（45216001@nodai.ac.jp）

講演番号：3D5a15
講演日時：3 月 26 日 11:54～ 1 号館 D5 会場

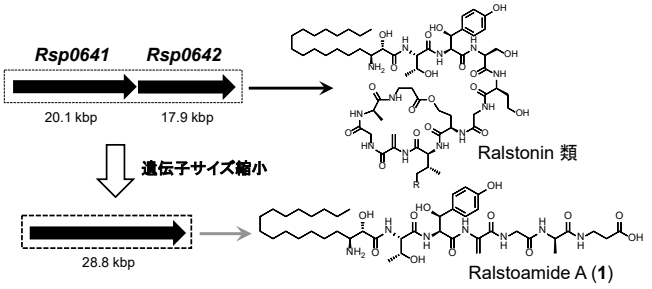
蓄積された青枯病菌ゲノム情報を活用した新規リポペプチドの探索と単離・構造決定

Genome and mass spectrometry-guided discovery of ralstoamides A and B from *Ralstonia solanacearum*

○小松 頌子、甲斐 建次（阪府院・生命環境）
○Shoko KOMATSU, Kenji KAI (Osaka Prefecture University)

【目的】青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* は，200 種以上の植物に感染して萎凋病を引き起こす植物病原細菌である。本菌が産生する ralstonin 類は，*Rsp0641/0642* がコードする polyketide synthase-nonribosomal peptide synthetase（PKS-NRPS）によって合成され，植物に対する弱い毒素活性と真菌類に対する厚壁胞子誘導活性を有することが明らかとなっている。青枯病菌は生育環境や宿主に応じて適応・進化してきたため，様々な特性を持つ菌株が報告されゲノムが読まれてきた。本研究では，蓄積されたゲノム情報を用いて新規リポペプチドを探索し，青枯病菌の分子進化に迫ることを目指した。

【探索法】データベースに登録された菌株の中には，*Rsp0641/0642* と相同性が高く遺伝子長の短い PKS-NRPS 遺伝子を持つものが存在していた。さらに，NRPSpredictor2 によりそれらの生合成産物の構造を予想すると，ralstonin 類より分子量の小さい類縁体候補が存在すると分かった。LC/MS を用いた探索により，日本の分離株 MAFF211479 株が類縁体候補の中の 1 種と同じ分子量を持つ化合物を産生することを見出した。



【結果】MAFF211479 株を BG 寒天培地で培養し，アセトンで浸漬抽出した。抽出物中のアセトンを減圧留去して得られた水性濃縮物を酢酸エチルで抽出し，その濃縮物をシリカゲルカラムに供した。LC/MS により目的物（分子量 864）が含まれている画分を特定し，その画分から逆相 HPLC で分析すると，さらにもう 1 種のリポペプチドが含まれていた。そこで，産生量の多い化合物 **1** の単離・構造決定を進めた。^{1}H-NMR，^{13}C-NMR，DEPT，COSY，HMQC データより，化合物 **1** に含まれるアミノ酸残基 6 種とアミノ脂肪酸 1 種を決定した。また，それらのユニットの結合を HMBC 相関に基づいて決定し，右上図に示す構造であることを明らかにした。さらに，各アミノ酸残基はマーフィー法により，アミノ脂肪酸と β-OH-Tyr は化合物 **1** を Pronase 処理して調製したトリペプチドを用いて立体配置を決定した。以上の結果から，化合物 **1** は新規化合物であることが明らかとなり，ralstoamide A と名付けた。もう一方の化合物 **2** は ralstoamide A と似た NMR スペクトルを与えたことから，ralstoamide 類縁体で環状構造であることが推察された。現在，リポペプチド **2**（ralstoamide B）の構造決定を進めている。本手法のように蓄積されたゲノム情報を有効活用することで，対象菌株のゲノム解析なしに新奇リポペプチドの効率的な発見が可能であることが実証された。

lipopeptide, PKS-NRPS, *Ralstonia solanacearum*

発表責任者：甲斐建次（kai@biochem.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：3D5p01
講演日時：3 月 26 日 13:50～ 1 号館 D5 会場

ジベンゾイルメタン類の合成及び HL-60 に対する増殖抑制活性に関する研究

Synthesis of dibenzoylmethanes and study on growth inhibitory activity against HL-60

○小林 玲斗[1]、川井 悟[1]、常盤野 哲生[2]、吉澤 結子[2] ([1]東電大理工、[2]秋田県大生資料)
○Reito KOBAYASHI[1], Satoru KAWAII[1], Tetsuo TOKIWANO[2], Yuko YOSHIZAWA[2] ([1]Tokyo Denki Univ., [2]Akita Prefectural Univ.)

【目的】ジベンゾイルメタンは 1,3-ジケトン構造を持つ化合物であり、容易にフラボン骨格を形成することからフラボノイドの一種として扱われている。マメ科カンゾウ属植物に含有されており、生薬として使用される甘草の抗腫瘍活性、抗炎症活性、抗突然変異能などの生物活性に関与していることが報告されている。また近年、クルクミンの構造類縁体として、生物活性に関する報告がされているが、ジベンゾイルメタンを基本骨格とした関連化合物の生物活性に関する報告は少ない。

そこで当研究室では、ジベンゾイルメタンの構造活性相関に関する知見を深めることを目的として、種々の置換基を導入した化合物を系統的に合成し、その生物活性を調べることとした。特に、二つのカルボニル基に挟まれた活性メチレンにアルキル基／アリール基を導入した化合物の合成と生物活性について検討することとした。

【方法】ジベンゾイルメタン類は、アセトフェノン類と安息香酸メチル類をトルエン溶媒中塩基性条件下で加熱して Claisen 縮合による合成を行った。

アルキル化ジベンゾイルメタン類の合成では、アルキル化剤の反応性を高めるため、塩化アルキルまたは臭化アルキルをヨウ化ナトリウムで処理してヨウ化アルキルとし、これを塩基性条件下でジベンゾイルメタンと反応させた。

ジベンゾイルメタン類のプレニル化剤として、プレニルアルコールの臭素化による臭化プレニルの調製を試みたが二重結合への臭素付加体が生成したため、本発表ではプレニルアルコールのトシル化により調製したトシル化プレニルを用いた。

ベンジル化ジベンゾイルメタン類を合成するための臭化ベンジル類は、ベンズアルデヒド類をヒドリド還元によりベンジルアルコール類とし、これを三臭化リンにより臭素化して調製した。これを、アセトン溶媒中炭酸カリウム存在下でジベンゾイルメタンと共に加熱攪拌することによりベンジル化ジベンゾイルメタンを合成した。

【結果】本発表では、単純なジベンゾイルメタン類に加え、活性メチレンにアルキル基／アリール基を導入した化合物の合成を行うことで、数十種のジベンゾイルメタン類を合成した。これらの生理活性については、現在検討中である。

Dibenzoylmethane, growth inhibitory activity, HL-60

講演番号：3D5p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ 1 号館 D5 会場

ベンゾフェノン類の合成及び増殖抑制活性に関する研究

Synthesis of benzophenones and their antiproliferative activity

○柳 祐太朗[1]、川井 悟[1]、常磐野 哲生[2]、吉澤 結子[2]([1]東電大、[2]秋田県立大資料)
○Yutaro YANAGI[1], Satoru KAWAI[1], Tetsuo TOKIWANO[2], Yuko YOSHIZAWA[2] ([1]Tokyo Denki Univ., [2]Akita Prefectural Univa.)

【目的】天然資源由来の生物活性化合物の中には、ピラン環やフラン環が縮合した化合物が数多く存在し、様々な生物活性を示すことが報告されている。ピラン環やフラン環が生物活性にどのような役割を果たしているか興味がもたれている。当研究室でも、ピラン環やフラン環が縮合したクマリン類やフラボン類の合成を行い、その生物活性について検討を行っている。ピラン環やフラン環を導入した化合物は、もとの単純なクマリン骨格やフラボン骨格の化合物よりも強い生物活性を示しており、ピラン環やフラン環の導入は活性増強に作用する傾向を認めている。

ベンゾフェノン類は創薬研究において重要な化合物であり、これを足場化合物とした創薬研究がなされている。一方で，そのピラン環縮合体であるピラノベンゾフェノン類についての研究報告は少ない。天然資源からは、オトギリソウ科植物から、抗酸化物質として cariphenone A をはじめとするピラノベンゾフェノン類が単離されているが、いずれも微量にしか存在していないため、生物活性に関する知見は十分には得られていない。

そこで、本研究では cariphenone A に関連したピラノベンゾフェノン類の系統的合成を行うとともに、得られた化合物の前骨髄性白血病細胞 HL-60 増殖抑制効果を調べることで、これらの構造活性相関に関する知見を深めることを目的とした。

【方法】本研究でのベンゾフェノン骨格の構築には、出発物質の入手性に応じて、ベンズアルデヒド類とブロモベンゼン類より調製したグリニヤール試薬の反応によりベンズヒドロール類を合成し，これを PDC 酸化してベンゾフェノン類を合成する方法と、PPA 中で安息香酸類によるベンゼン類の Friedel-Crafts アシル化による方法を採用した。また、出発物質となるヒドロキシベンズアルデヒド類へのピラン環導入は、（１）3-メチルピリジン触媒下での 3-メチル-2-ブテナールと Michael 付加による方法と（２）1,1-dimethylprop-2-ynyl エーテルの環化による方法を検討した。合成した化合物は、前骨髄性白血病細胞 HL-60 に対する増殖抑制を指標としてその生物活性を評価した。

【結果】これまでに10数種類のピラノベンゾフェノン類を合成し、予備的にHL-60に対する増殖抑制活性を調べたところ、興味深い結果が得られたので報告する。

Benzophenone, Cariphenone A, antiproliferative activity

発表責任者：柳　祐太朗（18rmb24@ms.dendai.ac.jp）

講演番号：3D5p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ 1 号館 D5 会場

アクリドン類の合成および増殖抑制効果に関する研究

Synthesis of acridone and their antiproliferative activity

○坂中 宏充[1]、川井 悟[1]、常盤野 哲生[2]、吉澤 結子[2]([1]東電大理工、[2]秋田県大生資料)
○Hitomitsu SAKANAKA[1], Satoru KAWAII[1], Tutu TOKIWANO[2], Yuko YOSHIZAWA[2] ([1]Tokyo Denki Univ., [2]Akita Prefectural Univ.)

【目的】アクリドンはpiperidine-4-one環が二つのベンゼン環に挟まれた構造であり、医薬品開発等において、足場化合物として重要な役割を果たしている。天然資源からは、オーストラリアで自生しているミカン科 *Acronychia* 属植物からアクリドンアルカロイドであるacronycineが単離されたのをはじめとして、多様な構造のアクリドン類が存在することが知られており、抗腫瘍活性など興味深い生物活性を示すことが報告されている。

しかし、天然中に存在するアクリドン類は、その含有量がわずかであることに加え、比較的複雑な構造を有していることから、その構造のどの部分が生理活性に重要であるかなどの、構造活性相関に関する知見は十分には得られていない。一方、アクリドン骨格はπ-π相互作用によるスタッキングが起こりやすく、各種溶媒に対する溶解性が低いことが知られており、スタッキングと生物活性の関係に興味がもたれている。

本発表では、アクリドン芳香環上に種々の官能基を導入した化合物の系統的合成を行うとともに、スタッキングを抑制するために、アクリドンのイミノ基へさまざまなアルキル基・アリール基の導入を検討することとした。

【方法】ハロゲン化アリール類とアニリン類を出発とし、イミノ基架橋部分を DMF 溶媒中、炭酸カリウムと銅触媒による Ullmann 縮合により *N*-フェニルアントラニル酸中間体を合成した。これを Eaton 試薬中、Friedel-Crafts アシル化により環化させてアクリドン誘導体を合成した。これを THF 溶媒中､KOH とハロゲン化アルキルによる S_N2 反応によりイミノ基置換アクリドン誘導体を合成した。本合成経路の鍵段階である Ullmann 縮合の収率向上を図るために、反応溶媒や配位子などの反応条件についても検討した。

【結果】アクリドンの芳香環上に種々の官能基を導入したアクリドン類を合成するとともに、それらの *N*-アルキル体を誘導した。*N*-アルキル化することにより有機溶媒に対する溶解性が向上するとともに、生物活性の増強が認められた。また、イミノ基に導入するアルキル鎖の炭素数の偶奇によって活性が変化する傾向を認めた。これらの詳細な生物活性については現在検討中である。

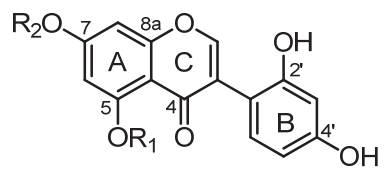
Acridone, Antiproliferative, HL-60

講演番号：3D5p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ 1 号館 D5 会場

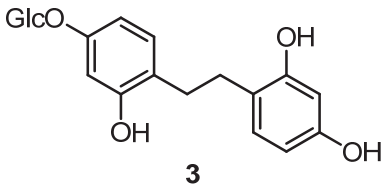
アピオスイソフラボン誘導体の化学合成とそれらのチロシナーゼ阻害活性
Chemical synthesis of apios isoflavone derivatives and their tyrosinase inhibitory activity

○馬酔木 奈々、二瓶 賢一（宇都宮農）
○Nana ASEBI, Ken-ichi NIHEI (Utsunomiya Univ. of Agric.)

天然物 **1** と **2** はアピオス可食部に含まれるイソフラボン配糖体である(右図)．それらは，先に当研究室で開発された強力なチロシナーゼ阻害剤であるビベンジル配糖体 **3** の類似体に位置付けられる．そこで **1** を全合成し，そのアグリコン **4** とともにチロシナーゼ阻害活性の評価を行った．その結果，濃度を 1 mM まで高めても **4** の IC_{50} は算出できなかったが，**1** の IC_{50} は約 400 μM を示すことが分かった．B 環部のレゾルシノール構造は，チロシナーゼ活性中心に対して高い親和性を持つことが知られている．したがって，**1** と **4** の活性の差異は A 環部の修飾に起因すると推察される．本研究では Bischler-Napieralski 型環化反応を鍵段階として，**4** の A 環部の水酸基にメチル基を導入した誘導体 **5** および **6** を合成し，それらのチロシナーゼ阻害活性を評価した．また，メチル化された天然物 **2** の全合成についても報告する．



1: R_1 = H, R_2 = Glc
2: R_1 = Me, R_2 = Glc
4: R_1 = R_2 = H
5: R_1 = H, R_2 = Me
6: R_1 = Me, R_2 = H



3

フェニル酢酸と 1,3,5-トリメトキシベンゼンとの Friedel-Crafts 型カップリングで得られたアセトフェノンを原料に，Bischler-Napieralski 型環化反応を行い，**4** のテトラメチル化体を合成した．このメチル化体に BCl_3 を作用させると，5 位，2'位および 4'位のメトキシ基が水酸基に変換され，**5** の化学合成が達成された．また，**4** のテトラメチル化体を BBr_3 処理により **4** に導き，そのピバロイル(Pv)化を行うことで，7 位，2'位および 4'位の水酸基がアシル化された合成中間体を得た．その 5 位の水酸基にメチル基を導入した後，Pv 基を除去することで **6** が化学合成された．

合成したイソフラボン **5** と **6** のチロシナーゼ阻害活性を評価したが，どちらも IC_{50} は 1 mM では求められなかった．すなわち，これらイソフラボンがチロシナーゼ阻害活性を示すためには，A 環部の配糖体化が鍵であると考えられた．そこで，天然物 **2** の全合成に着手した．

アグリコン **4** の 7 位の水酸基を選択的に配糖体化した後，B 環部の水酸基のみを Pv 化した．次に，A 環部 5 位の水酸基にメチル基を導入し，最後に全ての Pv 基を除去することで，天然物 **2** の全合成を達成した．現在，そのチロシナーゼ阻害活性の評価を行っている．

本研究の一部は，公益財団法人前川報恩会による助成を受けて行われたものであり，ここに感謝申し上げます．

Apios, isoflavone, tyrosinase inhibitor

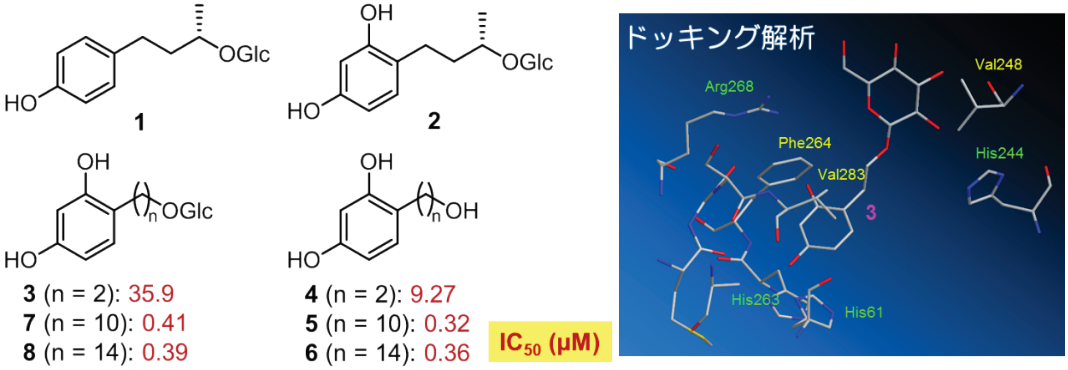
講演番号：3D5p05
講演日時：3 月 26 日 14:34～ 1 号館 D5 会場

レゾルシノールアルキルグルコシドおよびヒドロキシアルキルレゾルシノール,それらの強力なチロシナーゼ阻害活性

Resorcinol alkyl glucosides and hydroxylalkyl resorcinols, their potent tyrosinase-inhibitory activity

○石岡 和佳奈、二瓶 賢一（宇都宮農）
○Wakana ISHIOKA, Ken-ichi NIHEI (Utsunomiya Univ. of Agric.)

民間薬として使用されているメグスリノキ(*Acer nikoense*)には，特徴的な成分としてエピロドデンドリン(**1**)が含まれている(下図)．当研究室では，その構造を変化させることで，チロシナーゼ阻害活性を示すレゾルシノールアルキルグルコシド **2** を開発した．さらに **2** の構造の単純化および，レゾルシノール部分とグルコース部分の距離の最適化を図るため，直鎖状のアルキルスペーサーを持つレゾルシノールアルキルグルコシドを化学合成し，チロシナーゼ阻害活性の評価を行った．



その結果，スペーサー部分の炭素数が C_2 から C_3 に変化したところで，阻害活性が約 10 倍増強されることが明らかになった．レゾルシノール類は，チロシナーゼに対する競争阻害剤として働くことが分かっている．チロシナーゼの結晶構造を用いて，C_2 誘導体 **3** とのドッキング解析を行ったところ，**3** のグルコース部分は活性中心の Val248 の側鎖と接近していることが示唆された．したがって，**3** の弱い阻害活性は，グルコース部分によりレゾルシノール部分のチロシナーゼ活性中心への接近が妨げられているためであると推察した．

そこで，グルコース部分を持たないヒドロキシアルキルレゾルシノールを新たに化学合成し，それらのチロシナーゼ阻害活性の評価を行った．その結果，C_2 誘導体 **4** はグルコシド型の C_2 誘導体 **3** よりも，約 4 倍の強い阻害活性を示した．これにより，グルコース部分が **3** の活性中心に対する親和性を妨げていることが証明できた．また，C_{10} および C_{14} 誘導体である **5** と **6** は，グルコシド型の C_{10} および C_{14} 誘導体 **7** と **8** と同程度の阻害活性を持っていた．すなわち，C_{10} 以上の長さを持つスペーサーの末端部分を構造修飾しても，レゾルシノールアルキル型のチロシナーゼ阻害剤の活性は，ほとんど影響を受けないことが明らかになった．

tyrosinase inhibitor, Resorcinol

講演番号：3D5p06
講演日時：3 月 26 日 14:55～ 1 号館 D5 会場

2-Methyl-2-butene contributes to generate (*Z*) olefin in dihydrogenation of alkynes to alkenes using Lindlar's catalyst

○Vera Fitriya ERSALENA, Kanji MIYAWAKI, Kosaku TAKAHASHI, Hideyuki MATSUURA (Hokkaido University)

This study is aimed to identify the efficiency of 2-methyl-2-butene as an additive for Lindlar catalyst reaction to achieve dihydrogenation of alkynes to give (*Z*) alkenes with suppressing over dihydrogenation to a minimum. Lindlar's catalyst is widely used as a catalyst for selective partial dihydrogenation of alkynes to alkenes, although the catalyst suffers from over dihydrogenation. Thus, there is a demand for the development of novel selective method that is able to afford high yields and selectivity, and a lot of improved method were reported such as using Ni nanoparticles, Pd^0 polyethyleneimine catalyst, and Pd/SiO_2-demethyl sulfoxide. In this presentation, we are going to present a convenient method for dihydrogenation using 2-methyl-2-butene.

Acetyl derivatives of 3-decyn-1-ol, 3-nonyn-1-ol, 3-octyn-1-ol, and 3-heptyn-1-ol were synthesized according to the usual manner using acetic anhydride in pyridine to give 1-*O*-acetyl 3-decyn-1-ol (**1**), 3-nonyn-1-ol (**2**), 3-octyn-1-ol (**3**), and 3-heptyn-1-ol (**4**), respectively. Dihydrogenation using Lindlar's catalyst was performed using MeOH with or without 2-methyl-2-buten (condition A and B, respectively). The chemical structures of the products were analyzed using GC-MS, which revealed that compounds having longer carbon chain were give more amount of saturated derivatives, meanwhile, the addition of 2-methyl-2-butene (condition A) resulted to reduce the amount of saturated derivatives compared with that under condition B. 1-*O*-Acetyl octa-9-decyn-1-ol (**5**) was synthesized according to the usual manner, and dihydrogenation of **5** under conditions A and B gave (9*Z*) 1-*O*-acetyl octa-9-decen-1-ol (**6**) and 1-*O*-acetyl octadecan-1-ol (**7**), in which condition A gave higher synthetic yield for **6** whereas condition B gave it for **7**. Therefore, it was thought that 2-methyl-2-butene would contribute to generate desired compound in dihydrogenation of alkynes to alkenes using Lindlar's catalyst.

partial dihydrogenation, alkyne, alkene, Lindlar's catalyst

発表責任者：Hideyuki MATSUURA（matsuura@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：3D5p07
講演日時：3 月 26 日 15:06～ 1 号館 D5 会場

水溶性の色素（クロロフィル、カロテノイド）結合タンパク質を HPLC に直接導入する色素分析方法の検討

Direct injection of water soluble pigment-protein complexes and membranes to C18-HPLC

○高市 真一[1]、大越 慧[2]、大友 征宇[2]、三角 将洋[3]、園池 公毅[3]、原田 二朗[4] ([1]東京農大分子微生物、[2]茨城大理、[3]早稲田大教育、[4]久留米大医化学)
○Shinichi Takaichi[1], Akira Okoshi[2], Seiu Otomo[2], Masahiro Misumi[3], Kintake Sonoike[3], Jiro Harada[4] ([1]Tokyo Univ. Agric., [2]Ibaraki Univ., [3]Waseda Univ., [4]Kurume Univ. Sch. Med.)

【目的】カロテノイドや（バクテリオ）クロロフィルなどの脂溶性色素を C18-HPLC で分析するには、通常は試料から色素を有機溶媒で抽出し、水分を含む有機溶媒を蒸発乾固し、少量の有機溶媒に溶かし、HPLC 用フィルターを通し、HPLC 分析をする。ただし操作中に室内光により一部の色素の異性化や分解が起きてしまう。また試料中の色素を全て HPLC に注入できるわけではない。そこで水に溶けた状態の試料を HPLC に直接導入して色素分析する方法を検討した。
【方法】材料は紅色光合成細菌 *Allochromatium tepidum* の膜標品とコア集光-反応中心タンパク複合体(LH1-RC)、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の膜標品、ホウレンソウの膜標品と光化学系 II 粒子(PS II)、緑色硫黄細菌 *Chlorobaculum tepidum* のクロロソームを用いた。これらは緩衝液に溶けた状態あるいは懸濁して、HPLC に 10 から 50 μl 注入した。
【結果】種々の色素タンパク複合体や膜画分のカロテノイドと（バクテリオ）クロロフィルの HPLC 溶出曲線および色素組成は直接導入でも通常の抽出方法でもほぼ同一であった。
【考察】直接導入の原理としては、水溶性の試料は HPLC 溶出溶媒に挟まれて、ガードカラムに到着すると直ちにカラム表面に広がり非常に薄い層となる。ほぼ同時に HPLC 溶出溶媒により脂溶性物質（色素や脂質など）が抽出されて、通常と同様に HPLC カラムによる分離が始まる。
問題点はタンパク質が変性をしてカラムの頭に残り、また多糖類などがカラムの目詰まりの原因となることだろう。実際、この分析の最中に HPLC 圧は高まった。しかし通常の分析方法よりも試料の量が少なくてすみ、抽出濃縮中に起きる色素の異性化や分解を防げるなどの利点がある。試料の量や濃度、溶出溶媒の種類や流速、カラムの種類、カラムの径や粒子の径、夾雑物の量、なども分析に影響すると思われる。これらを考慮しながら個々のケースごとに、この方法を使えるか検討の必要がある。結局の所、試料の価値・コスト（生物の培養、調整、労力、時間など）と HPLC の価格（カラムやガードカラムの価格など）を比べて、利点を感じるならば試してみて下さい。

HPLC, pigment, carotenoid

発表責任者：高市 真一（ShinTakaichi@gmail.com）

講演番号：3D5p08
講演日時：3 月 26 日 15:17～ 1 号館 D5 会場

重水素化標識ブラシノステロイドの合成研究

Synthesis of deuterated brassinosteroids

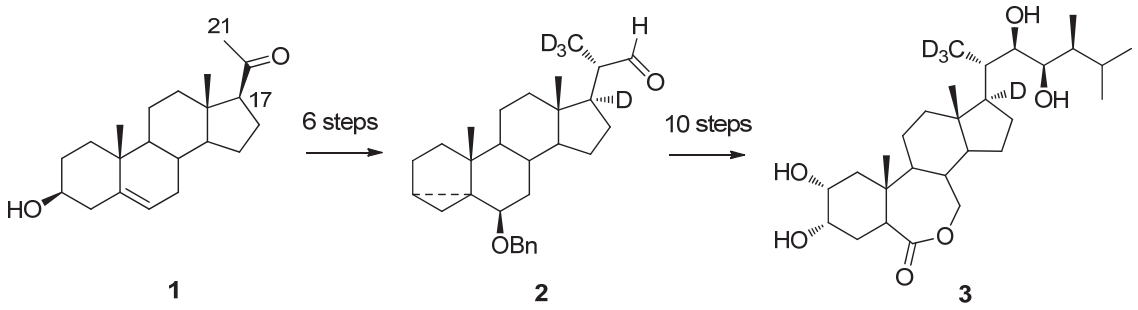
○関亦 克彦（理研 CSRS 創薬化学基盤ユニット）
○Katsuhiko SEKIMATA (RIKEN CSRS)

【目的】

生理活性物質の同位体標識は、その物質代謝や体内動態研究分野で広く利用されている。今回、様々な生理作用を有するステロイド系化合物に着目し、多様な構造に展開可能なステロイド化合物の同位体標識化、特に重水素化標識に注力した。ステロイド側鎖の構造展開に拡張可能な重水素化標識ステロイド化合物 **2** を設計・合成した。更に、内部標準物質として活用される重水素化標識ブラシノステロイドを合成展開したので報告する。

【方法と結果】

出発原料プログネノロン **1** の反応性官能基を保護した後、塩基触媒による水素－重水素交換反応を行い、[17α, 21, 21, 21-$^{2}H_4$]プログネロン誘導体を得た。続く 4 工程の変換によりアルデヒド中間体 **2** を合成した。グリニャール反応により側鎖を伸長した後、9 工程を経て、今回の最終目的物ブラシライド **3** を得た。今後、多様なステロイドに合成展開する予定である。



1 **2** **3**

Deuterium labels, Brassinosteroids

発表責任者：関亦克彦（katsuhiko.sekimata@riken.jp）

講演番号：3D5p09
講演日時：3 月 26 日 15:28～ 1 号館 D5 会場

インドネシア産ハリナシバチ由来のプロポリスの化学的研究

Component analysis and biological activities of propolis from Indonesian stingless bees

○宮田 椋[1]、Muhamad Sahlan[3]、石川 吉伸[2]、橋本 博[2]、本田 沙理[1]、熊澤 茂則[1] ([1]静岡県大食品栄養、[2]静岡県大薬、[3]インドネシア大学)
○Ryo MIYATA[1], MUHAMAD Sahlan[3], Yoshinobu ISHIKAWA[2], Hiroshi HASHIMOTO[2], Sari HONDA[1], Shigenori KUMAZAWA[1] ([1]University of Shizuoka of Food and Nutritional Sciences, [2]University of Shizuoka of Pharmaceutical Sciences, [3]Universitas Indonesia)

【目的】

プロポリスとは、セイヨウミツバチ (*Apis mellifera*) が植物の新芽や樹皮から採集した樹脂状物質を巣箱の隙間に塗布したものであり、日本では健康食品の素材などに利用されている。今回、セイヨウミツバチではなく、ハリナシバチが生産するプロポリスを研究対象とした。ハリナシバチとは、インドネシアやタイをはじめとする熱帯地域に生息している文字通り毒針を持たないミツバチである。ハリナシバチのプロポリスは、巣箱の隙間に塗布された樹脂状物質だけでなく、巣全体でプロポリスと称されることが多い。セイヨウミツバチのプロポリスに関する研究は数多く報告されているものの、ハリナシバチ由来のプロポリスの成分分析および機能性評価研究に関しては、報告が非常に少ないのが現状である。そこで本研究では、インドネシアのハリナシバチ (*Tetragonula* aff. *biroi*) が生産するプロポリスの成分分析および機能性評価を行い、その利用価値を見出すことを目的とした。

【方法】

インドネシアのスラウェシ島で採集したハリナシバチ (*T. biroi*) 由来のプロポリスを 70% エタノールで抽出し、ヘキサン、酢酸エチル、水で分配した。ヘキサンおよび酢酸エチル抽出画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて分画し、分取 HPLC にて含有化合物の単離・精製を行った。その後、精製した化合物を MS、NMR など各種分析機器を用いて構造解析を行った。また、単離・同定した化合物に対し、HPLC によるアッセイ法を用いて xanthine oxidase (XO) 阻害活性を評価した。

【結果】

成分分析の結果、9 種類の既知化合物と文献未記載の新規化合物である 4-(4'-hydroxy-3'-methoxy phenyl)-3,5,7-trihydroxycoumarin、sulawesin A、sulawesin B、2',3'-dihydro-3'-hydroxypapuanic acid を単離・同定した。なお、新規化合物である sulawesin A は、単結晶 X 線構造解析法にて、その絶対構造を決定することにも成功した。さらに、sulawesin B に関しては、ECD スペクトルのシミュレーションと sulawesin A とのスペクトルの比較により、絶対構造を決定した。

単離・同定した新規化合物の内、収量の多かった 4-(4'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy coumarin と sulawesin A に対して、XO 阻害活性を評価したところ、4-(4'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)-3,5,7-trihydroxycoumarin に強い阻害活性を見出した (IC_{50} : 3.9 μM)。

propolis, stingless bees, xanthine oxidase

発表責任者：熊澤茂則（kumazawa@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：3D5p10
講演日時：3 月 26 日 15:39～ 1 号館 D5 会場

昆虫吐出し液がイネのイソペンチルアミン蓄積に与える影響
Effect of lepidopteran oral secretion on isopentylamine accumulation in rice.
○飯塚 千晶[1]、寺石 政義[2]、森 直樹[2]、村山 哲也[1]、網干 貴子[1] ([1]山形大農、[2]京大院農)
○ Chiaki IITSUKA[1], Masayoshi TERAISHI[2], Naoki MORI[2], Tetsuya MURAYAMA[1], Takako ABOSHI[1] ([1]Yamagata Univ. of Agric., [2]kyoto Univ. of Agric.)

【目的】植物は病原菌の感染や昆虫の食害に対し、化学的な防御応答を行う。イネでは、感染時にジテルペン化合物やフラボノイドがファイトアレキシンとして増加する。また、食害時にはフェノール性アミドが増加し、これをトビイロウンカに与えると致死率が増加すると報告されている。これまでに我々は、昆虫食害やジャスモン酸処理によりイネでイソペンチルアミンが増加することを見出したが、その誘導機構の詳細については不明である。昆虫の吐出し液からは、食害誘導性の植物の応答に影響を与えるエリシターが同定されている。そこで本研究では、鱗翅目昆虫の吐出し液がイネのイソペンチルアミンの蓄積に与える影響を調べることとした。
【方法】イネ幼苗（日本晴）の葉にハサミで切れ込みを入れ、アワヨトウ *Mythimna separate* 幼虫、ハスモンヨトウ *Spodoptera litura* 幼虫の吐出し液をそれぞれイネ葉傷害部に塗布した。1 日後に回収した葉を 50% MeOH 水溶液で抽出し、6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidylcarbamate で誘導体化後、LC/MS でイソペンチルアミンの蓄積量を測定した。また、ハスモンヨトウ吐出し液を 95℃、30 分の加熱処理を施し、これを塗布したイネ葉を同様に分析した。次に、鱗翅目昆虫の幼虫吐出し液に含まれる linoleoyl-L-glutamine を合成し、各濃度に調整したものを傷害部に塗布した。
【結果】切れ込みを入れた葉に蒸留水を塗布した傷害イネでは、葉 1 g あたり約 1.2 μg のイソペンチルアミンが誘導されるが、ハスモンヨトウの吐出し液を塗布したイネはその半量であり、イソペンチルアミンの蓄積量が抑制された。一方、アワヨトウの吐出し液塗布では、蓄積量に有意な変化は生じなかった。次に、加熱処理を行ったハスモンヨトウ吐出し液を塗布したところ、同様に本化合物の蓄積量が抑制された。よって、非タンパク性成分がイソペンチルアミンの蓄積量の抑制に関与していることが示唆された。鱗翅目昆虫の吐出し液には、植物に揮発成分の放出を誘導するエリシターとして、脂肪酸とグルタミンの縮合物が含まれている。Linoleoyl-L-glutamine を合成し、これを傷害部に塗布したところ、傷害処理時と同様にイソペンチルアミンが蓄積した。このことから、イネの傷害により蓄積が誘導されるイソペンチルアミンは、吐出し液中の非タンパク性成分により蓄積が抑制されるが、それは linoleoyl-L-glutamine でないと考えられた。

Plant response, Oral secretion, Elicitor

講演番号：3D5p11
講演日時：3 月 26 日 16:00～ 1 号館 D5 会場

イネ由来 adenine phosphoribosyltransferase の機能に関する生化学的研究

Biochemical study on the function of adenine phosphoribosyltransferase from rice

○竹村 太秀[1]、崔 宰熏[1,2]、大西 利幸[1,2]、徳山 真治[1]、平井 浩文[1,2]、大内 仁志[3]、稲井 誠[3]、浅川 倫宏[4]、菅 敏幸[3]、河岸 洋和[1,2,5]（[1]静大院農、[2]静大グリーン研、[3]静岡県大薬、[4]東海大創造、[5]静大院創造）

○ Hirohide TAKEMURA[1], Jae-Hoon CHOI[1,2], Toshiyuki OHNISHI[1,2], Shinji TOKUYAMA[1], Hirofumi HIRAI[1,2], Hitoshi OUCHI[3], Makoto INAI[3], Tomohiro ASAKAWA[4], Toshiyuki KAN[3], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,5] ([1]Grad. Sch. of Inte. Sci. and Technol., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ., [3]Sch. of Pharm. Sci., Univ. of Shizuoka, [4]Inst. of Innov. Sci. and Technol., Tokai Univ., [5]Grad. Sch. of Sci. and Technol., Shizuoka Univ.)

【背景・目的】

芝草がリング状に繁茂あるいは枯死した後にキノコが発生する現象はフェアリーリングと呼ばれ、世界各地で確認されている。当研究室ではフェアリーリングの原因物質として 2-azahypoxanthine (AHX)、imidazole-4-carboxamide (ICA) 及び 2-aza-8-oxohypoxanthine (AOH) の単離に成功し、これらの化合物をフェアリー化合物 (FCs) と称している。また、FCs は植物に対して成長調節活性やストレス耐性を付与する[1-4]。

当研究室では FCs の生合成経路として図 1 に示すようなリボチドを中間体とした経路を推定し、昨年度本大会において hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT) が AHX 及び AOH の生合成に関与していることを報告した[5]。一方で、ICA 及び AICA に対する活性は確認されなかったことから、これらの生合成に関与する酵素の探索を試みた。

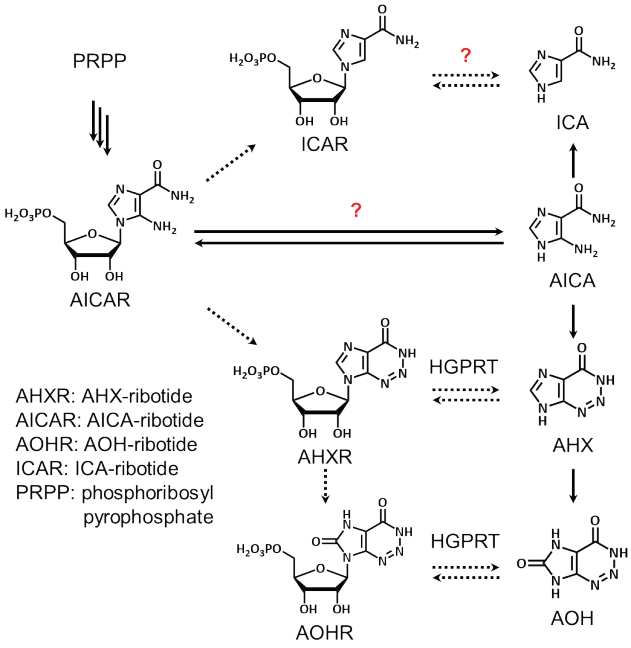


図 1 植物における FCs の生合成経路

実線: イネで証明した生合成経路, 破線: 推定生合成経路

【方法・結果】

LC-MS/MS を用いてイネの分析を行い、ICA-ribotide (ICAR) が内生していることを確認した。また、ICA 及び AICA のホスホリボシル化・脱ホスホリボシル化に adenine phosphoribosyltransferase (APRT) が関与していると推定し、イネでは 4 種の APRT が存在することを確認した。そこで、これらの遺伝子を含むプラスミドの構築を行い、大腸菌を宿主とした異種発現および Ni アフィニティークロマトグラフィーを用いた精製を試みた。その結果、APRT が FCs に対して活性を示し、FCs の生合成に関与していることが示唆された。

1) J.-H. Choi, H. Kawagishi et al., *ChemBioChem*. 11, 1373-1377 (2010)
2) J.-H. Choi, H. Kawagishi et al., *J. Agric. Food Chem.* 58, 9956-9959 (2010)
3) J.-H. Choi, H. Kawagishi et al., *Angew. Chem. Int.* Ed. 53, 1553-1555 (2014)
4) H. Kawagishi, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 82, 752-758 (2018)
5) 竹村, 河岸ら,日本農芸化学会大会要旨集 p581 (2018)

adenine phosphoribosyltransferase, fairy ring, rice

発表責任者：河岸 洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3D5p12
講演日時：3 月 26 日 16:11～ 1 号館 D5 会場

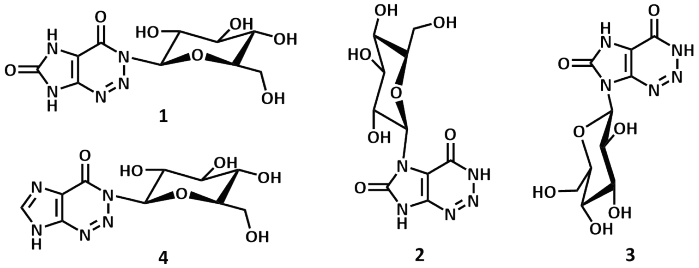
イネにおけるフェアリー化合物の配糖化に関与する糖転移酵素に関する化学的研究
Chemical studies on glucosyltransferase to form glucosides of fairy chemicals in rice

○渥美 有矢[1]、近藤 遼一[2]、崔 宰熏[1,2,3]、徳山 真治[1,2]、平井 浩文[1,2,3]、浅川 倫宏[4]、大内 仁志[5]、稲井 誠[5]、菅 敏幸[5]、河岸 洋和[1,2,3,6]([1]静大農・応生化、[2]静岡大院・総合農、[3]静岡大・グリーン研、[4]東海大・創造、[5]静岡県大・薬、[6]静岡大院・創造)

○Yuya ATSUMI[1], Ryoichi Kondoh[2], Jae-Hoon Choi[1,2,3], Shinji TOKUYAMA[1,2], Hirofumi HIRAI[1,2,3], Tomohiro ASAKAWA[4], Hitoshi OUCHI[5], Makoto Inai[5], Toshiyuki Kan[5], Hirokazu Kawagishi[1,2,3,6] ([1]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [2]Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka University, [3]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, [4]Institute of Innovative Science and Technology, Tokai University, [5]School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, [6]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University)

【目的】

我々はフェアリーリング惹起物質としてコムラサキシメジ培養濾液から植物成長調節活性を有する 2-azahypoxanthine (AHX) を単離し、AHX が植物内で内生されていることを報告した[1,2]。また、AHX をイネ科等の植物に投与すると 2-aza-8-oxohypoxanthine (AOH) に代謝され、この AOH もまた植物成長調節活性を有することが確認されている[2]。さらに、植物中から AHX 及び AOH の代謝産物が検出され、これらはβ-D-glucoside であると確認した[3,4]。そしてイネの培養細胞から AHX-1-β-D-glucoside (**4**), AOH-7-β-D-glucoside (**2**)および AOH-9-β-D-glucoside (**3**)を生成する酵素 OsUGT1 (salicylic acid glucosyltransferase)が同定された[5]。しかし AOH-1-β-D-glucoside (**1**)を生成する酵素が同定されていない。本研究ではこの酵素を同定することを目的とした。



【方法・結果】

AHX と AOH に糖転移活性を示した酵素 OsUGT1 は salicylic acid glucosyltransferase であった。そして OsUGT1 はシロイヌナズナの salicylic acid glucosyltransferase のオーソログであったため、シロイヌナズナで同定されている 4 つの salicylic acid glucosyltransferase から、イネにおけるオーソログ遺伝子を探した。さらにその遺伝子の中から、AHX と AOH を処理したイネにおけるマイクロアレイで高発現した遺伝子を選別した。これらの遺伝子を全長クローニングし、大腸菌を宿主とした異種発現を行った。現在 AHX と AOH に対する糖転移活性を確認中である。

1) J.-H. Choi, H. Kawagishi et al., *ChemBioChem*, 11, 1373-1377 (2010)
2) J.-H. Choi, H. Kawagishi et al., *Angew. Chem. Int. Ed.,* 53, 1553-1555 (2014)
3) J.-H. Choi, H. Kawagishi et al., *Org. Lett.*, 20, 312-314 (2018)
4) H. Kawagishi, *Biosci. Biotecnol. Biochem.* 82, 752-758 (2018)
5) 崔、河岸ら、日本農芸化学会大会講演要旨集 p583 (2018)

fairy rings, glucosyltransferase

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

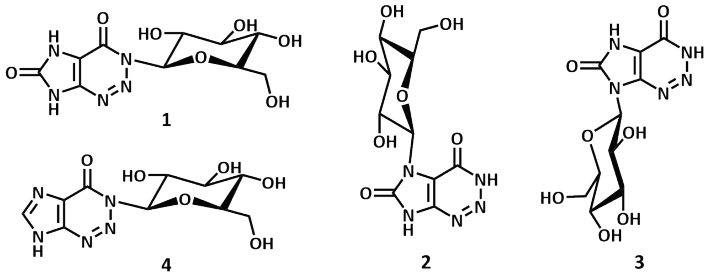
講演番号：3D5p13
講演日時：3 月 26 日 16:22～ 1 号館 D5 会場

イネにおけるフェアリー化合物の代謝に関する化学的研究
Chemical studies on metabolism of fairy chemicals in rice

○與五澤 薫[1]、崔 宰熏[1,2]、平井 浩文[1,2]、大内 仁志[3]、稲井 誠[3]、浅川 倫宏[4]、菅 敏幸[3]、河岸 洋和[1,2,5] ([1]静大院・総合農、[2]静大・グリーン研、[3]静岡県大・薬、[4]東海大・創造、[5]静大院・創造)
○Kaoru YOGOSAWA[1], Jae-Hoon CHOI[1,2], Hirofumi HIRAI[1,2], Hitoshi OUCHI[3], Makoto INAI[3], Tomohiro ASAKAWA[4], Toshiyuki KAN[3], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,5] ([1]Grad. Sch. of Inte. Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ., [3]Sch. Pharm. Sci., Univ. Shizuoka, [4]Inst. of Innov. Sci. and Technol., Tokai Univ., [5]Grad. Sch. of Sci. and Technol., Shizuoka Univ.)

【目的】

我々は以前、フェアリーリング惹起物質としてコムラサキシメジ（*Lepista sordida*）の培養濾液から植物成長調節活性を有する 2-azahypoxanthine（AHX）を発見した[1,2]。AHX は植物に処理することにより 2-aza-8-oxohypoxanthine（AOH）に代謝され[1,3]、この AOH もまた植物成長調節活性を有している[1,4]。これまで、AHX あるいは AOH を処理したイネの抽出物から AOH の *N*-グルコシド 3 種 (**1**-**3**)及び *O*-グルコシド 1 種、AHX の *N*-グルコシド 1 種 (**4**)及び *O*-グルコシド 1 種が単離、同定されている[4,5]。本研究では、AHX と AOH の植物体内におけるさらなる代謝産物の単離を目的とした。また、AHX の *N*-グルコシドはイネに処理すると AHX に分解されることが確認されているため、それに関与する代謝酵素を同定することを目的とした。



【方法・結果】

2 週間 AHX 溶液中で培養したイネを地上部と根部に切り分け、エタノール、アセトンで順次抽出し、得られた可溶部を減圧濃縮した。この抽出物を各種クロマトグラフィーに供し、精製を行った。現在、この化合物について構造解析を行うとともに、更なる代謝産物の探索を行っている。また、イネの培養細胞から酵素液を抽出し、AHX-1-β-D-glucoside (**4**) の分解に関与する酵素を同定するため、現在各種クロマトグラフィーを用いて精製を行っている。

1) H. Kawagishi, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 82,753 (2018)
2) J.-H. Choi, H. Kawagishi et al., *ChemBioChem*, 11, 1373 (2010)
3) J.-H. Choi, H. Kawagishi et al., *Angew.Chem.Int.Ed.*, 53, 1553 (2014)
4) J.-H. Choi, H. Kawagishi et al., *Org. Lett.*, 20, 312 (2018).
5) 與五澤・河岸ら、日本農芸化学会大会講演要旨集, p.582 (2018)

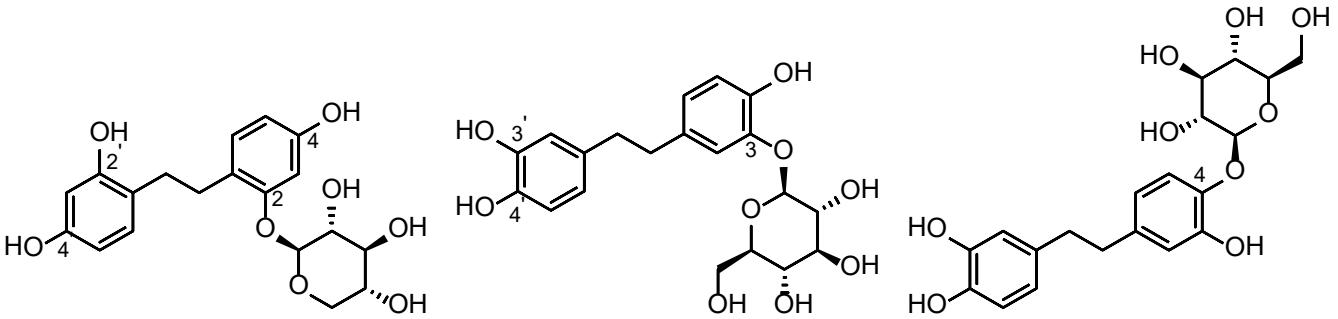
fairy chemicals, metabolism, rice

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3D5p14
講演日時：3 月 26 日 16:33～ 1 号館 D5 会場

構造訂正に向けての天然ビベンジル配糖体の化学合成
Chemical synthesis of natural bibenzyl glycoside towards structural revision
○関下 帆乃香[1]、李 佳薇[1]、越野 広雪[2]、二瓶 賢一[1]([1]宇都宮農、[2]理研 CSRS)
○Honoka SEKISHITA[1], Jiawei LI[1], Hiroyuki KOSHINO[2], Ken-ichi NIHEI[1] ([1]Utsunomiya Univ. of Agric., [2]RIKEN CSRS)

ビベンジル配糖体 **1** はユリ科植物の *Chlorophytum arundinaceum* から単離・構造決定されたキシロシドである(下図)．当研究室ではその全合成を行ったが，得られた NMR データは発表された **1** のものと一致しなかった．現在まで化学合成した種々のポリフェノール配糖体の NMR データを比較したところ，**1** の真の構造は，カテコール骨格を有するビベンジルグルコシド **2** もしくは **3** ではないかと推察された．そこで本研究では **1** の構造訂正を目標に，Wittig 反応および Schmidt 配糖体化反応を経由し，**2** および **3** の化学合成を行った．



出発物質として 3,4-ジヒドロベンズアルデヒドを選択し，水酸基の保護，ヒドリド還元，塩素化およびホスホニウム塩の調製により Wittig 試薬を合成した．また，同じ出発物質の水酸基を保護し，Wittig 反応の原料となるアルデヒドを合成した．NaHMDS を塩基として用い，それらを Wittig 反応により連結し，スチルベンを得た．その二重結合を，パラジウムエチレンジアミン錯体を用いて選択的に還元し，アグリコン部分となるビベンジルを合成した．

得られたビベンジルの 3 位または 4 位の保護基を選択的に除去した後，グルコース供与体であるトリクロロアセトイミデートを用い，ルイス酸存在下で Schmidt 配糖体化反応を行った．最後に，得られた保護体の全ての保護基をエステル交換と加水素分解により除去して，ビベンジルグルコシド **2** および **3** の全合成を達成した．

天然物の NMR データと，合成したビベンジルグルコシド **2** および **3** の NMR データの比較を行った．その結果，**3** よりも **2** の NMR データが天然物のものと類似していた．したがって，天然ビベンジル配糖体の真の構造は，**2** ではないかという結論に達した．

structural revision, chemical synthesis, bibenzyl glycoside

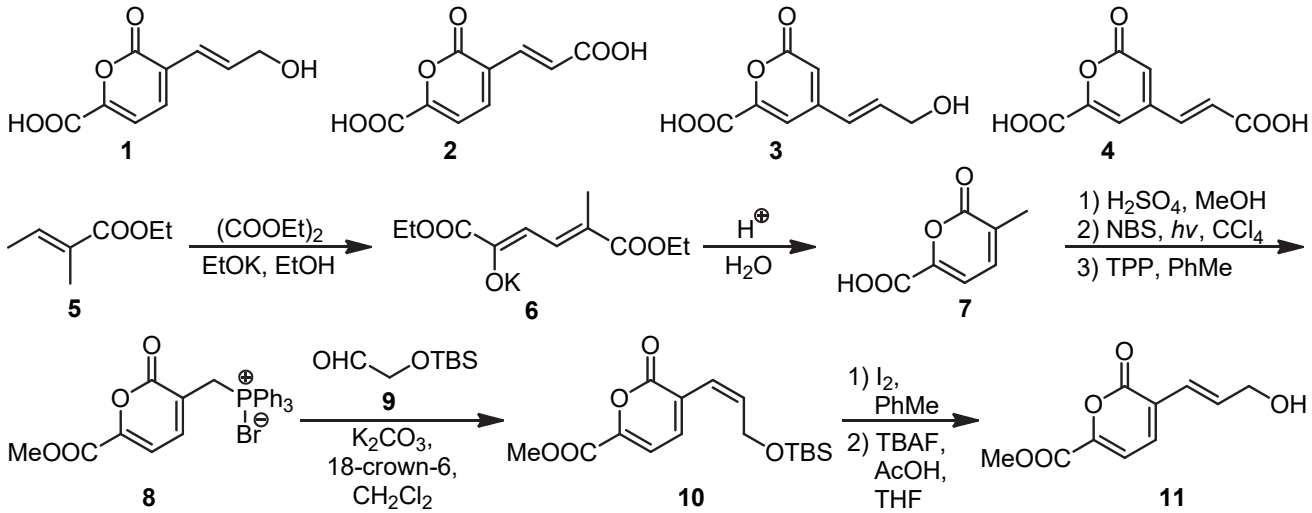
講演番号：3D5p15
講演日時：3 月 26 日 16:44～ 1 号館 D5 会場

アラビドピロン類の化学合成研究
Synthetic study of arabidopyrones
○松本 拓也[1]、張間 紗希[1]、クリント チャップル[2]、二瓶 賢一[1] ([1]宇都宮大農、[2]パデュー大)
○Takuya MATSUMOTO[1], Saki HARIMA[1], Chapple CLINT[2], Ken-ichi NIHEI[1] ([1]Utsunomiya Univ. of Agric., [2]Purdue Univ. of Bio.)

イソアラビドピルアルコール(**1**)，イソアラビドピック酸(**2**)，アラビドピルアルコール(**3**)およびアラビドピック酸(**4**)は 2012 年にシロイヌナズナから単離・構造決定されたアラビドピロン類である(下図)．それらはカフェアルデヒドの芳香環部の位置選択的な酸化的開裂により，生合成されることが明らかになっている．しかしながら，**3** 以外の化学合成は現在まで達成されていない．そこで本研究では，Claisen 縮合および Wittig 反応を鍵反応として **1**，**2** および **4** の全合成を計画した．

市販のチグリン酸エチル(**5**)を出発物質として，シュウ酸ジエチルとの Claisen 縮合を行い，ジエステル **6** を合成した．酸性条件下で **6** をラクトン化して α-ピロン **7** に導いた．Fischer エステル化反応により **7** をメチルエステル化した後，そのアリル位を NBS により臭素化し，さらに，トリフェニルフォスフィンを使用して Wittig 試薬 **8** へと変換した．

Wittig 反応により，**8** とアルデヒド **9** を連結し，オレフィン **10** を合成した．その ^{1}H-NMR を解析したところ，95%がシス型で存在していた．TBAF により **10** の TBS 基を除去できたが，収率は低かった．その理由として，脱保護の条件においてシス型の **11** が不安定であることが考えられた．そこで，ヨウ素溶液により **10** をトランス型へと変換し，TBS 基を除去したところ，**11** が収率良く得られた．このように本研究では，**1** のメチルエステル体 **11** の化学合成に成功した．現在，**1** の脱保護条件の検討と **2** および **3** の化学合成に着手している．



synthesis, Arabidopyrones, Wittig reaction

講演番号：3D7a01
講演日時：3 月 26 日 09:00～ 1 号館 D7 会場

ポリエステル重合酵素を用いたオリゴマーの分泌生産
Secretory production of polyhydoroxyalkanoate oligomer in *Escherichia coli* by using polyester-polymerizing enzymes
○宮原 佑宜[1,2]、廣江 綾香[1,2]、柘植 丈治[2,3]、田口 精一[1]（[1]東農大、[2]JST-MIRAI、[3]東工大）
○Yuki MIYAHARA[1,2], Ayaka HIROE[1,2], Takeharu TSUGE[2,3], Seiichi TAGUCHI[1]（[1]Tokyo Univ. of Agric., [2]JST-MIRAI, [3]Tokyo Tech）

【背景・目的】 ポリヒドロキシアルカン酸（PHA）は、微生物のエネルギー貯蔵物質として細胞内で合成・蓄積される脂肪族ポリエステルである。微生物細胞から抽出した PHA は、生分解性プラスチックとして利用することができる。PHA は、使用する重合酵素やその発現量に依存して、数万から数百万の分子量を示すことが知られている。これまでの研究で、ある種の重合酵素を発現した組換え大腸菌において、「PHA オリゴマー（PHAO）」が菌体外成分として存在することが見出されている。PHAO は植物の成長因子やクモの性フェロモンに含まれる生理活性物質であり、さらに、化成品素材となり得ることから、付加価値の高い化合物である。そこで本研究では、様々な重合酵素を用いて PHAO の分泌生産を検討し、オリゴマー生産に有効な重合酵素の特徴および生産物の構造との関係について報告する。

【実験】 大腸菌の野生株およびアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子を欠損した変異株を宿主として使用した。PHA モノマーを合成するために、3-ケトチオラーゼ遺伝子（*phaA*）、アセトアセチル CoA レダクターゼ遺伝子（*phaB*）を導入し、そこに、いくつかの PHA 重合酵素遺伝子（*phaC*）を導入した組換え大腸菌を作製した。PHAO の分泌量は、培養液を加水分解し、その中に含まれるモノマー濃度を酵素法により決定した。また、PHAO の構造は ESI-TOF-MS と ^{1}H NMR を用いて分析した。

【結果・考察】 培養の結果、数種類の大腸菌の組換え系において、培地中に PHAO の分泌生産を確認した。特に、特定の重合酵素を発現させた 2 種類の大腸菌では、著量の PHAO 生産を確認した。また、細胞外に分泌したオリゴマーは 10 量体程度であることがわかった。次いで、生産したオリゴマーの末端構造を解析したところ、カルボキシ末端にエタノールが付加されていることが分かった。これは、内在性のエタノールが重合反応における連鎖移動剤として優先的に機能し、分子鎖末端に取り込まれたためと考えられた。そこで、エタノール合成を抑制した変異株（アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子欠損）を宿主に用いて培養実験を行ったところ、分泌された PHAO においてエタノールによる末端修飾を極めて低くすることができた。今回の実験により、PHAO の分泌生産に有効な重合酵素の特徴とその生産物の構造に関する知見を得ることができた。

Polyhydoroxyalkanoate oligomer, Secretory production, Polyhydoroxyalkanoate synthase

発表責任者：田口精一（st206172@nodai.ac.jp）

講演番号：3D7a02
講演日時：3 月 26 日 09:11～ 1 号館 D7 会場

ジオール末端基を有するポリヒドロキシアルカン酸オリゴマーの分泌生産

Secretory production of polyhydroxyalkanoate oligomer with a diol terminal group

○廣江 綾香[1,2]、宮原 佑宜[1,2]、柘植 丈治[2,3]、田口 精一[1]([1]東農大、[2]JST-MIRAI、[3]東工大院)
○Ayaka HIROE[1,2], Yuki MIYAHARA[1,2], Takeharu TSUGE[2,3], Seiichi TAGUCHI[1] ([1]Tokyo Univ. of Agric., [2]JST-MIRAI, [3]Tokyo Tech)

【背景・目的】ポリヒドロキシアルカン酸(PHA)は、微生物がエネルギー貯蔵物質として細胞内で合成するポリエステルである。PHA は再生可能なバイオマスから合成されることから、石油由来プラスチックの代替材料としての利用・普及が期待されている。一方、最近 PHA 合成過程で生成される 10 量体程度のオリゴマー（PHA オリゴマー；PHAO）が菌体外へと分泌される現象が見いだされた。本研究では、末端にジオール基を有する PHAO の分泌生産について報告する。ジオール末端型の PHAO は、ポリウレタンなどの高分子材料の基幹物質としての利用が期待でき、付加価値の高い化合物である。
【実験】アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子を欠損した大腸菌に PHAO 合成に必要な 3 遺伝子(*phaC*, *phaA*, *phaB*)を含むプラスミドを導入し、培養を行った。LB 培地に炭素源となるグルコース、アンピシリン、ジオール末端付与のため連鎖移動剤を添加し、30°C、48 時間、130rpm で振とう培養した。重合酵素は 3 種類を選抜し、各重合酵素での連鎖移動剤濃度と PHAO 分泌生産量の関係を調べた。分泌された PHAO 量は酵素法で、PHAO 構造は ESI-TOF-MS および NMR 分析にて決定した。
【結果・考察】3 種類の重合酵素のうち 2 種類で、連鎖移動剤の添加量に伴い PHAO 分泌量が大きく増加し、非添加時と比較して最大で 20 倍(5 g/L)分泌量が高まった。また、構造解析から PHAO 末端に連鎖移動剤（＝ジオール末端）が付加されていることを確認した。現在、PHAO のジオール末端修飾率や重合度の詳細な解析を進めているところである

Polyhydroxyalkanoate oligomer, Secretory production, Diol terminal group

発表責任者：廣江綾香（ah206178@nodai.ac.jp）

講演番号：3D7a03
講演日時：3 月 26 日 09:22～ 1 号館 D7 会場

ジオール末端を有するポリエステルオリゴマーの分泌生産および構造解析
Secretory production and structure analysis of microbial polyester oligomers with diol end groups
○水野 匠詞[1,2]、櫻井 徹生[1,2]、廣江 綾香[2,3]、田口 精一[3]、柘植 丈治[1,2] ([1]東工大、[2]JST-MIRAI、[3]東京農大)
○ Shoji MIZUNO[1,2], Tetsuo SAKURAI[1,2], Ayaka HIROE[2,3], Seiichi TAGUCHI[3], Takeharu TSUGE[1,2] ([1]Tokyo Tech., [2]JST-MIRAI, [3]Tokyo Univ. of Agric.)

【目的】
微生物により生合成可能なポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は再生可能な資源であるバイオマスから合成でき、生分解性能を有している。このことから、PHA は石油由来プラスチックに代わる高分子材料として注目されている。近年、アルコールなどの末端にヒドロキシ基をもつ化合物が系中に存在する際に PHA 重合酵素 (PhaC) がアルコールを基質として認識して連鎖移動反応を生じることがわかり、培養上清中に中分子量の PHA オリゴマー (PHAO) が分泌されていることが分かった。この PHAO をマクロモノマーとして利用できれば、PHA の生分解性を有する新しい材料を作り出すことができる。しかしながら、PHAO の分泌量は依然として低いままである。そこで本研究では、培養上清中に効率よく PHAO を分泌生産させるために、培養条件の検討、種々の連鎖移動剤の添加効果について検討を行った。さらには、培養液からの PHAO 回収法についても検討を行った。
【方法】
PHAO の生産量を増加させるために、培地組成および種々の連鎖移動剤の添加効果を検討した。さらに、PHAO の精製法として溶媒抽出法およびカラム法について検討した。精製した PHAO は、^{1}H NMR 分析および ESI-TOF-MS 分析に供した。
【結果と考察】
大腸菌を生産宿主として、糖質を炭素源として PHAO の生産増強について検討を行った。連鎖移動剤を加えない条件ではわずかな PHAO の分泌しか確認できなかったが連鎖移動剤としてジエチレングリコール (DEG) を加えた場合に 5 g/L 程度の PHAO の生産が確認できた。連鎖移動剤として DEG 以外の他の候補としてプロパンジオール (PDO) およびブタンジオール (BDO) を添加した際に位置異性体の一級アルコールよりも二級アルコールをもつ化合物の方が、PHAO 生産に対して増強効果を示すことがわかった。次に、溶媒抽出法およびカラム法により培地上清に分泌生産された PHAO の精製を検討した。ODS カラムを用いた精製において、比較的高い回収率で PHAO を精製することが可能であった。さらには、^{1}H NMR 分析の結果、両末端にアルコールを有する PHAO が高純度で生産できていることを確認した。また、ESI-TOF-MS 分析により PHAO は主に 800 程度（約 10 量体）の分子量を有することがわかった。これらの結果から、分泌生産により得られた PHAO は、マクロモノマーとして高分子合成に利用可能であることが示唆された。

Microbial polyester oligomer, Secretory production, Macromonomer

講演番号：3D7a04
講演日時：3 月 26 日 09:33～ 1 号館 D7 会場

微生物産生ポリエステルオリゴマーを用いたウレタン材料の合成

Synthesis of polyurethane with microbial polyester oligomers

○櫻井 徹生[1,2]、水野 匠詞[1,2]、廣江 綾香[2,3]、田口 精一[3]、柘植 丈治[1,2]（[1]東工大、[2]JST-MIRAI、[3]東京農大）
○ Tetsuo SAKURAI[1,2], Shoji MIZUNO[1,2], Ayaka HIROE[2,3], Seiichi TAGUCHI[3], Takeharu TSUGE[1,2] ([1]Tokyo Tech, [2]JST-MIRAI, [3]Tokyo Univ. of Agric.)

【目的】

近年、高分子材料の大量生産・大量廃棄による地球汚染の深刻化が叫ばれており、このような問題の対応策の一つとしてポリヒドロキシアルカン酸（PHA）の利用が関心を集めている。PHA は、糖や植物油など再生可能な資源から微生物によって合成されるポリエステルであり、また生体親和性・生分解性を有することから、医療用材料・環境低負荷材料としても注目されている。最近、微生物菌体内で生産させる高分子量 PHA とは異なり、菌体外に PHA オリゴマー（PHAO）を生産する方法が確立された[1)]。PHAO をマクロモノマーとして利用できれば、PHA の生体親和性や生分解性を維持しつつ PHA とは異なる物性の材料を作り出せる可能性がある。そこで本研究では、分泌生産した PHAO の材料化を目的に、PHAO とイソシアネートを用いて重付加を行い、得られた生成物について化学構造および溶媒への溶解性を調べた。

【方法】

Escherichia coli は、培養液中にアルコールなどの連鎖移動剤を添加することにより、PHA を低分子量化することができる。PHA 生合成の宿主に *E. coli* BW25113、連鎖移動剤としてジエチレングリコールを用いることで、末端にヒドロキシ基を有する PHAO を生合成した。加熱した PHAO とイソシアネートを混合させ、窒素雰囲気下、種々の時間と温度で加熱し反応を行った。反応終了後、反応物を真空乾燥し生成物とした。得られた生成物について、FTIR 測定、^{1}H NMR 測定、および溶解性試験を行った。

【結果と考察】

FTIR 測定より、生成物には未反応イソシアネートに由来する 2300 cm^{-1} 付近のシグナルが消失し、ウレタン結合に由来するアミド I およびアミド II シグナルが観測された。^{1}H NMR 測定より、PHAO、およびイソシアネートに由来するシグナルに加え、ウレタン結合に由来するシグナルが観測された。これより、ウレタン系共重合体が合成されたことを確認した。溶解性試験より、得られたウレタン重合物は原料イソシアネートが溶解しないピリジンへの溶解性を示した。これより、重合により有機溶媒への溶解性が変化したことを確認した。

【参考文献】

1) Utsumomia C, Matsumoto K, Taguchi S. ACS Sustainable Chem Eng, 5, 2360-2367, 2017.

polyester oligomer, urethane, bio-based

講演番号：3D7a05
講演日時：3 月 26 日 09:44～ 1 号館 D7 会場

リパーゼによる水酸化脂肪酸重合体の生産
Production of hydroxy fatty acid polymers using lipase
○藤川 真理子[1]、岸野 重信[1]、外山 大地[1]、米島 靖記[2]、小川 順[1] ([1]京大院農応用生命、[2]日東薬品工業(株))
○Mariko FUJIKAWA[1], Shigenobu KISHINO[1], Daichi TOYAMA[1], Yasunori YONEJIMA[2], Jun OGAWA[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Nitto Pharmaceutical Industries)

【背景・目的】我々は、腸内細菌の一種である乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* AKU1009a に置けるリノール酸の飽和化代謝経路を明らかにし[1)]、さらにその代謝中間体である 10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid (HYA)が、腸管上皮バリアを保護する機能[2)]や、肝細胞への脂肪蓄積を抑制する機能[3)]など、健康に有益な作用を示すことを報告してきた。一方、Yore らは FAHFA と呼ばれる新規タイプの水酸化脂肪酸重合体が抗糖尿病、抗炎症物質であることを報告している[4)]。しかし、FAHFA 内因性の生合成経路は不明であり、多種存在する分子種の有機合成が困難であることから、詳細な生理機能の解析は遅れている。そこで我々は、HYA の可能性を拡大するとともに FAHFA の機能解析に寄与するため、酵素反応を用いて HYA を FAHFA へと変換することを試みた。
【方法・結果】様々な酵素を対象に、FAHFA への変換を可能とする酵素の探索を行った。そのうち最も活性が高く、再現性が良かった *Candida rugosa* 由来のリパーゼを選抜した。HYA と水を超音波でエマルジョン化し、リパーゼを添加して反応を行った。得られた反応液から生成物を精製後、HPLC、LCMS、NMR 分析を行い、構造を同定した。その結果、HYA の水酸基と HYA のカルボキシル基が分子間脱水して、2 量体、3 量体、4 量体等へとポリマー化していることが明らかになった。さらに、選抜したリパーゼを用いて、FAHFA への変換効率が高い反応条件の検討(反応組成、反応温度、時間、pH)を行い、反応条件を最適化した。

Reference
1) S. Kishino et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 110(44), 17808-17813, (2013)
2) J. Miyamoto et al., J. Bio. Chem. 290(5), 2902-2918, (2015)
3) T. Goto et al., BBRC 459, 597-653, (2015)
4) M. Yore et al., Cell 159, 318-332, (2014)

functional fatty acid, lipase, 10-hydroxy-cis-12-octadecenoic acid

発表責任者：岸野重信（kishino@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3D7a06
講演日時：3 月 26 日 10:05～ 1 号館 D7 会場

Screening and functional analysis of a medium-chain fatty alcohol oxidative enzyme for microbial production of alkanes

Shigenobu Kishino[1], Satoshi Maruyama[1], ○ Daniel Makoto Takeuchi[1], Masakazu Ito[2], Masayoshi Muramatsu[2], Shusei Obata[2], Jun Ogawa[1] ([1]Kyoto University Graduate School of Agriculture, [2]Toyota Motor Corporation)

Introduction: In recent years, biofuels have gained attention as an alternative energy source to fossil fuels. Currently used biofuel examples include bioethanol produced from sugar canes and corn, along with biodiesel or fatty acid methyl esters (FAME) derived from vegetable oils. However, these examples tend to corrode metallic engine parts found in combustible engines[1),2)], and biofuels that better mimic the chemical properties of fossil fuels are still desired. Alkane is the main component of diesel and gasoline and has a very high energy density compared to biodiesel and bioethanol. Also, unlike the current biofuels, alkanes are much easier to adapt in current infrastructure of combustible engines. The biosynthesis genes for alkane production have been identified from cyanobacteria and insects and there is a great potential for mass production using *Escherichia coli* (*E. coli*). However, producing alkane using *E. coli*, tends to produce an alcohol byproduct by reducing the aldehyde, which is an alkane precursor with an endogenous reductase[3),4)]. Therefore, in this study, we aimed to reduce byproducts in alkane production and improve production efficiency by searching for enzymes with strong oxidation activity of aliphatic alcohol and performed the functional analysis of these enzymes.

Method and Results: Roughly 500 strains of air-dried bacteria owned by the laboratory and about 350 soil isolates were screened for the oxidation activity using resting cell reaction with 1-tetradecanol as a substrate. The production of NAD(P)H was monitored by evaluating absorbance change at 340 nm and quantifying tetradecanal and tetradecanoic acid using gas chromatography. As a result, it was confirmed that tetradecanal was produced in a total of 21 strains, and the production of tetradecanoic acid was confirmed in 46 strains (of which 18 strains produced both tetradecanal and tetradecanoic acid). Out of all the positive stains, *Pantoea* sp. showed the overall highest 1-tetradecanol oxidative activity. Enzyme purification was carried out from this strain using the activity as an indicator, and alcohol dehydrogenase adhP was identified as an enzyme involved in the oxidation reaction of 1-tetradecanol. Furthermore, we were able to understand the properties of this enzyme by investigating the purified enzyme derived from modified *E. coli* overexpressing this enzyme.

Reference: 1) Yoshimoto et al. (2009) *J. Combust. Soc. Jpn.*, **51**, 121-128, 2) Park et al. (2011) *Fuel*, **90**, 633-639, 3) Schirmer et al. (2010) *Science*, **329**, 559-562, 4) Fatma et al. (2016) *Metab. Eng.*,**37**, 35-45

alcohol dehydrogenase, screening, biofuel

発表責任者：Shigenobu Kishino（kishino@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3D7a07
講演日時：3 月 26 日 10:16～ 1 号館 D7 会場

新規脂肪族アルコール脱水素酵素のバイオアルカン生産への応用
Application of fatty alcohol dehydrogenase PsAdhP to the microbial production of alkanes for next generation biofuels
○丸山 悟史[1]、岸野 重信[1]、伊藤 正和[2]、村松 正善[2]、小畑 充生[2]、小川 順[1]([1]京大院農・応用生命、[2]トヨタ自動車)
○Satoshi Maruyama[1], Shigenobu Kishino[1], Masakazu Ito[2], Masayoshi Muramatsu[2], Shusei Obata[2], Jun Ogawa[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Toyota Motor Corporation)

【緒言】
温室効果ガスに起因する地球温暖化は深刻な社会問題の一つであり、近年は二酸化炭素排出量の低減を掲げ、カーボンニュートラルなバイオ燃料への関心が高まってきている。アルカンはガソリンや軽油に多く含まれる成分であり、エネルギー密度の高さや現行インフラへの適合性などにおいて利点がある。アルカンの生合成はアシル ACP やアシル CoA のアルデヒドへの還元及びそれに続く脱カルボニル反応からなり、これらの遺伝子を大腸菌に発現させることで大量生産できる可能性がある[1)]。しかしながら、宿主大腸菌は内在性の強力なアルデヒド還元活性を有し[2)]、アルカン前駆体であるアルデヒドがアルコールまで還元されてしまうという問題がある[1)]。そこで本研究では大腸菌を用いたアルカン生産の効率向上を目指し、当研究室で取得した脂肪族アルコール酸化酵素(PsAdhP)の導入を通じて、蓄積したアルコールをアルカン生産へ再利用することを試みた。また、アルカン生産基質の多様化を狙い、アルコールからアルカンへの微生物変換についても検討を行った。
【方法・結果】
①脂肪族アルコールを基質としたアルカンへの変換反応
脂肪族アルコール酸化酵素及びアルデヒド脱カルボニル酵素を共発現させた組換え大腸菌を用い、休止菌体反応で条件の検討を行った。基質には 1-tetradecanol を用い、生成物である tridecane をガスクロマトグラフィーで定量した。反応 pH、反応時間、触媒量等を検討した結果、2500 μM の 1-tetradecanol から 1120 μM の tridecane を生産することに成功した。
②グルコースを用いたアルカン発酵生産における脂肪族アルコール酸化酵素導入効果
アルカン生合成酵素群を導入した組換え大腸菌に対して、脂肪族アルコール酸化酵素導入の有無によるアルカン生産能及び副産アルコール蓄積量を比較した。ジャーファーメンターを用いて培養を行い、ガスクロマトグラフィーを用いて各化合物の生産量を継時的に追跡した。その結果、脂肪族アルコール酸化酵素を導入した株では、コントロールと比較して副産アルコールの蓄積が減少し、アルカン生産量が増加する傾向が見られた。

1) Schirmer et al. (2010) *Science*, **329**, 559-562
2) Fatma et al. (2016) *Metab. Eng.*, **37**, 35-45

alkane, alcohol dehydrogenase, biofuel

発表責任者：岸野重信（kishino@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3D7a08
講演日時：3 月 26 日 10:27～ 1 号館 D7 会場

固定化糸状菌胞子を用いた非水系微生物還元

Non-aqueous microbial reduction with immobilized fungal spores

○小田 忍、林 優佑（金沢工大ゲノム研）
○Shinobu ODA, Yusuke HAYASHI (Kanazawa Inst. Technol.)

【目的】カビの胞子は高い有機溶媒耐性を示す活性型の細胞であり[1]、決して休眠状態にあるのではなく、補酵素要求性の還元反応をも有機溶媒中で触媒することができる[2]。例えば *Aspergillus sojae* NBRC 32074 の固定化胞子は、log *P* = 5.12 の di-*n*-hexyl ether(HE)中で benzil の benzoin への還元を安定的に繰り返し触媒することができる。本固定化胞子は log *P* = 1.76 の *tert*-butyl acetate(BuOAc)中でも benzil を還元することができるが、その活性と安定性は高くはない[2]。そこで本研究では、*tert*-BuOAc 中で benzil 還元活性を示す分離カビの胞子をスクリーニングし、それの *tert*-BuOAc あるいは含 *tert*-BuOAc 有機溶媒中での benzil 還元能を評価することを目的とした。
【方法】胞子形成能を示す 437 株の分離カビについて、寒天平板(PDA)/*tert*-BuOAc 界面で benzil を還元し得るカビをスクリーニングした。ヒットした 63 株の中より最も還元活性の高い未同定カビ KIT-J0010 を選び、濾過板吸着固定化胞子と Ca-alginate 包括固定化胞子を調整した。これらの固定化胞子について、*tert*-BuOAc 中での菌糸との還元活性の比較、有機溶媒種や基質濃度の影響、ヒドリド源種とその最適濃度の選定、Ca-alginate 中への両親媒性物質の添加効果、さらには繰り返しバッチ式反応などを検討した。
【結果】最優秀分離株である KIT-J0010 の濾過板吸着胞子は、濾過板/HE 界面ではその菌糸と同レベル、PDA/*tert*-BuOAc 界面では菌糸の 7.6 倍もの還元活性を示し、高い有機溶媒耐性を示した。同株を Ca-alginate ゲルに包括固定化した場合、12%もの高濃度の benzil を還元可能であり、benzoin の蓄積濃度は 4 日間で 0.95 g/L、8 日間では 1.18 g/L となった。ヒドリド源としては 2-propanol の有機層中への添加(0.5%レベル)、Ca-alginate 濃度は 2%が最適であった。KIT-J0010 株をもってしても *tert*-BuOAc の微生物毒性を十分に回避することができなかったが、低沸点ジメチルシリコンオイル(KF-96L-1CS)に対し *tert*-BuOAc を 20% (v/v)レベルで混和することにより、benzil の溶解度は 20 g/L の高値となり、微生物毒性も大幅に回避できた。この混合溶媒中、Ca-alginate 固定化胞子を用いて 10 g/L の benzil を繰り返しバッチ反応に供したところ、3 日反応を 4 回、4 日反応を 1 回の計 5 回、16 日間の繰り返し反応でも活性低下は認められず、全バッチとも 1.5 g/L 以上の benzoin を与えた。

1) Oda S, Sugitani A, Ohashi S, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **78**, 1971-1974 (2014).
2) Oda S, Hayashi Y, Kido R, *J. Oleo Sci.*, **67**, 1123-1129 (2018).

non-aqueous bioconversion, asymmetric reduction, fungal spore

発表責任者：小田　忍（odas@neptune.kanazawa-it.ac.jp）

講演番号：3D7a09
講演日時：3 月 26 日 10:38～ 1 号館 D7 会場

人工細胞系によって醗酵生産のような効率的な低分子合成は可能か？
Bioconversion by artificial cells as a mimic of bacterial fermentation

○藤原 慶 (慶應義塾大学)
○Kei FUJIWARA (Keio Univ.)

我々は細胞再構成をキーワードに、試験管内に取り出された生体分子をどこまで生命に近づけることができるかを追求している。この取組として、細胞抽出液を生命に近づける試みと、細胞のように振る舞う人工系を創成する試みを行っている[1-3]。

これらの研究において、細胞内高分子濃度を持つ人工細胞を創成する過程で、外部浸透圧によって人工細胞内部の高分子濃度を制御可能であることを見出した[2]。この系を活用し、人工細胞を用いた物質変換の可能性を追求した。具体的に、微生物でなく人工細胞(脂質二重膜小胞、リポソーム)によっても発酵生産のような物質生産ができないか？という問いに乳酸からのエタノール合成系という単純なモデル系を用いることで迫った。

本研究で用いたエタノール合成系は乳酸を初発物質とし、納豆菌の乳酸脱水素酵素、テキーラ醸造菌のピルビン酸デカルボキシラーゼ、出芽酵母のアルコールデヒドロゲナーゼによりエタノールが合成される。試験管内では、0.15M の乳酸から 0.08M のエタノールが合成可能であった。人工細胞を用いた場合でもエタノール合成は観察されたが、その量は微量であった。この理由は人工細胞の形成効率と、基質の膜透過効率に由来すると考えられた。そこで、浸人工細胞を浸透圧処理し、バクテリアのような桿菌形状を誘導し、膜透過効率を上昇させたところ、4℃10 日間の反応により、人工細胞外において 0.1M に達する量のエタノール合成に至った。人工細胞に内包されている酵素量の定量と、プロテアーゼによる人工細胞が酵素の分解により、人工細胞によるエタノール合成効率を試験管の系と比較したところ、少ない分子量で効果的に物質変換が可能であることを見出した。理論的な検討により、補酵素と酵素の会合率の上昇により少量の酵素系でも効率的な反応を実現可能なところが人工細胞系の利点であることが示された[4]。

[1] K Fujiwara et al., *Nucleic Acids Res.* 2013, 41 (14), pp.7176-7183
[2] K Fujiwara & M Yanagisawa. *ACS synthetic biology*, 2014, 3 (12), pp 870-874
[1] K Fujiwara et al., *Nucleic Acids Res.* 2017, 45(19), pp. 11449-11458
[3] K Fujiwara et al., *ACS synthetic biology*, 2018, 7(2), pp 363-370

artificial cells, fermentation, bioconversion

発表責任者：藤原慶（fujiwara@bio.keio.ac.jp）

講演番号：3D7a10
講演日時：3 月 26 日 10:49～ 1 号館 D7 会場

フラボノイド誘導体の酵素合成と抗菌性評価
Synthesis of flavonoid esters by lipase and their antibacterial activity
○飯田 聡史、服部 裕美、中村 涼、中澤 昌美、上田 光宏、阪本 龍司（大阪府大院・生命環境）
○Satoshi Handa, Hiromi Hattori, Ryo Nakamura, Masami Nakazawa, Mitsuhiro Ueda, Tatsuji Sakamoto (Life Environ Sci, Osaka Pref Univ)

【目的】フラボノイドは柑橘類の果皮などに含まれ、抗菌性、抗酸化性、抗炎症性、抗アレルギー性などの機能性を有することが報告されており、食品や化粧品などへ利用されている。一方で水や油への溶解度が低く、利用方法が限られている。これらの問題を解決するために酵素を利用したフラボノイドの構造改変が用いられている。エステル転移や糖転移などの構造改変によるフラボノイドの物性改変や機能性の向上が報告されており、新規有用物質の創製が期待されている。そこで本研究では新たな機能性物質を獲得することを目的とし、フラボノイドを基質とした酵素化学的手法により種々の誘導体を合成し、それらの抗菌活性を評価した。
【方法･結果】まず基質となるフラボノイドについて検討した。ナリンジン(Nar)、ヘスペリジン(Hes)、ルチン（Rut）をそれぞれアセトンに溶解し、さらにラウリン酸（C12）ビニル、モレキュラーシーブスおよび固定化リパーゼを加え、50℃で撹拌しエステル転移反応を行った。反応後、未反応のフラボノイドとラウリン酸ビニルを除去するため、ヘキサンおよび 30%メタノールを用い、Nar-C12、Hes-C12、Rut-C12 を精製した。精製した各エステル体の抗菌活性を *Bacillus subtilis* を用いて評価した結果、Nar-C12 の MIC 値（最小発育阻止濃度）が 12.5 μM と最も優れていた。
次に、Nar を鎖長の異なる脂肪酸（C4～18）でエステル化し、それらの抗菌活性を評価した結果、Nar-C8～-C12 に高い抗菌活性が認められた。さらに Nar 中のグルコース残基 3 位に、もう一つグルコースが結合したαGNar のラウリン酸エステル（αGNar-C12）に関しても Nar-C12 と同様に高い抗菌活性（MIC 値 12.5 μM）を示した。また、αGNar-C12 の水溶性は Nar-C12 と比較して約 500 倍向上した。
続いて、作製した Nar-C12 について、*B. subtilis* 以外の菌体に対する抗菌活性を評価した。Nar-C12 による高い抗菌活性が認められた菌種は、*Cutibacterium acnes*（MIC 値 62.5 μM）、*Trichophyton tonsurans*（MIC 値 62.5 μM）、*Trichophyton rubrum*（MIC 値 31.3 μM）、*Porphyromonas gingivalis*（MIC 値 125 μM）、*Streptococcus pneumoniae*（MIC 値 31.3 μM）であった。これら病原性菌に対し高い抗菌活性を示したことから、Nar-C12 は新規抗菌剤としての利用が期待される。
Nar-C8～-C12 の大量かつ安価な生産方法を確立するため、脂肪酸供与体としてヤシ油を用いた酵素反応系を現在検討している。

flavonoid esters, Naringin, Antibacterial activity

講演番号：3D7a11
講演日時：3 月 26 日 11:10～ 1 号館 D7 会場

多様なリグニン組成に対応できる *Pseudomonas* sp. NGC7 株を利用したムコン酸生産 (I): 新規単離微生物株を用いたムコン酸生産株の作出
Muconic acid production with *Pseudomonas* sp. NGC7 capable of metabolizing variety of lignin-related phenols (I): Engineering a platform for muconic acid production using a newly isolated bacterium
○阿部 七瀬[1]、篠田 英里[1]、高橋 健司[1]、杉田 晴佳[2]、上村 直史[1]、園木 和典[2]、政井 英司[1]([1]長岡技科大・生物、[2]弘前大・農生)
○Nanase ABE[1], Eri SHINODA[1], Kenji TAKAHASHI[1], Haruka SUGITA[2], Naofumi KAMIMURA[1], Tomonori SONOKI[2], Eiji MASAI[1] ([1]Nagaoka Univ. Tech., [2]Agri. Life Sci., Hirosaki Univ.)

【背景・目的】植物バイオマスの主要成分であるリグニンは、複雑な構造を持つ芳香族高分子であり、化学処理により不均一なリグニン由来フェノール類が生成する。リグニンの有効利用に向けて、当研究グループでは *Pseudomonas putida* KT2440 株を宿主として、需要の大きい糖質を利用せず針葉樹と草本類に含まれる G-、H-リグニン由来フェノール類を炭素源かつ原料とし、ポリマー原料となる *cis,cis*-ムコン酸 (ccMA)を生産できる微生物株の作出に成功している (Sonoki et al., *ACS Sus Chem Eng*, 2018) 。一方、広葉樹などに多く含まれる S-リグニンに由来するフェノール類は ccMA に変換できないため、これらを炭素源とし、G-、H-リグニン由来フェノール類から ccMA 生産を行うことで糖質に依存しない生産システムを構築できる。しかし、KT2440 株は S-リグニン由来フェノール類を炭素源として利用できないため、本生産システムを構築するための宿主微生物が必要であった。本研究では、S-、G-、H-リグニン由来フェノール類を炭素源として利用できる株を単離し、広葉樹リグニン由来のフェノール類を炭素源・原料に用いて ccMA 生産が可能な株を作出することを目的とした。
【方法・結果・考察】土壌から S-、G-、H-リグニン由来フェノール類であるシリンガ酸 (SA)、バニリン酸 (VA)、4-ヒドロキシ安息香酸を炭素源として良好に生育する *Pseudomonas* sp. NGC7 株を単離した。リグニン由来フェノール類を炭素源・原料に用いて ccMA 生産を行うには、1) G-、H-リグニン由来フェノールの代謝で生成するプロトカテク酸 (PCA)の変換に関わる PCA 3,4-dioxygenase 遺伝子 (*pcaHG*)を破壊し、2) PCA decarboxylase 遺伝子 (*aroY*)の導入により PCA をカテコールに変換させ、3) カテコールから生成する ccMA を蓄積させるために ccMA cycloisomerase 遺伝子 (*catB*)を破壊する必要がある。そこで、類縁株の塩基配列を利用して PCR により NGC7 株の同遺伝子を単離し、相同組換えにより *pcaHG* と *catB* を破壊した NGC703 株を取得した。NGC703 株に *aroY* と AroY の補因子を合成する flavin prenyltransferase 遺伝子 (*kpdB*)を連結したプラスミドを導入した NGC703(pTS074)株は、10 mM SA + 5 mM VA の培養条件で SA を炭素源として良好に生育し、VA から 28% (mol ccMA/mol VA)の収率で ccMA を生産した。さらに *aroY*、*kpdB* に加えて VA *O*-demethylase 遺伝子 (*vanAB*)、catechol 1,2-dioxygenase 遺伝子 (*catA*)を発現させた NGC703(pTS084)株は、同培養条件にて 87% (mol ccMA/mol VA)の収率で ccMA を生産可能であることが示された。以上の結果から、NGC7 株はリグニン由来フェノール類だけを用いた ccMA 生産の宿主として有用であることが示唆された。
本研究は JST-ALCA (JPMJAL1506) の支援を受けて実施した。

lignin, *cis,cis*-muconic acid, *Pseudomonas*

講演番号：3D7a12
講演日時：3 月 26 日 11:21～ 1 号館 D7 会場

多様なリグニン組成に対応できる *Pseudomonas* sp. NGC7 株を利用したムコン酸生産 (II): 針葉樹リグニンからの生産

Muconic acid production with *Pseudomonas* sp. NGC7 capable of metabolizing variety of lignin-derivatives (II): Production from softwood lignin.

○阿久津 美歩[1]、杉田 晴佳[1]、高橋 健司[2]、上村 直史[2]、政井 英司[2]、園木 和典[1] ([1]弘前大院・農学生命、[2]長岡技大院・工・生物)
○Miho AKUTSU[1], Haruka SUGITA[1], Kenji TAKAHASHI[2], Naohumi KAMIMURA[2], Eiji MASAI[2], Tomonori SONOKI[1] ([1]Hirosaki Univ. of Grad. Sch. Agric. Life Sci., [2]Nagaoka Univ. Tech. of Grad. Sch. Eng.)

【目的】*Pseudomonas putida* KT2440 株のリグニン由来フェノール類分解経路を制御して針葉樹 (スギ) リグニン由来フェノール類をプロトカテク酸 (PA) へと収束することで、炭素源として糖質などの需要の大きい炭素源を用いることなく基幹化合物である *cis,cis*-ムコン酸 (ccMA) を生産することが可能であることをこれまでに報告してきた[1)]。しかしこの微生物株はシリンガ酸 (S-リグニンモデル) を炭素源として利用できないため、広葉樹などの S-リグニンを多く含むバイオマス種からの ccMA 生産には適用できなかった。そこで我々は新たに、自然界から SA を炭素源として増殖できる *Pseudomonas* sp. NGC7 株を単離した。この微生物株の代謝経路を改良することで広葉樹リグニン由来フェノール類のみを炭素源として ccMA 生産が可能な微生物株の作出に成功した[2)]。これによりバイオマス種毎に異なる不均一なリグニンの組成に対応した ccMA 生産が可能になったが二種類の微生物株を用いなければならない。そこで本研究では *Pseudomonas* sp. NGC7 株を宿主として、針葉樹リグニン由来フェノール類だけを炭素源として ccMA を生産できる微生物株の作出を検討した。
【結果】PCA 3,4-dioxygenase 遺伝子 (*pcaH*, *pcaG*) と ccMA cycloisomerase 遺伝子 (*catB*) を破壊した *Pseudomonas* sp. NGC703 株は、G-リグニンモデルであるバニリン酸 (VA) と H-リグニンモデルである 4-ヒドロキシ安息香酸 (HBA) を PCA へと変換できるが、PCA は分解しなかった。そこで PCA を PCA 3,4-dioxygenase 反応を経て増殖源として利用するルートと、ccMA に変換するルートを共存させた。PCA decarboxylase 遺伝子 (*aroY*) と *pcaH*、*pcaG* を連結したプラスミドを導入した NGC703/pTS110 株は、VA、HBA またはそれらの混合物を炭素源とした条件下で増殖し、ccMA を生産した (収率約 6 wt%)。この微生物株はスギを化学分解して調製したリグニン由来フェノール類を炭素源としても増殖し ccMA を生産した。次に PCA をより ccMA に分配し収率向上に効果的な培養条件を検討した結果、溶存酸素濃度 (DO) =0.38 – 0.76 ppm O_2 のときに ccMA 収率が 20 wt%以上に向上することを見出し、さらに *aroY*、*pcaH*、*pcaG* に加えて VA *O*-demethylase 遺伝子、Catechol 1,2-dioxygenase 遺伝子を発現することで、VA と HBA の混合物から 30 wt%以上の収率で ccMA が生産できることを明らかにした。

本研究は JST-ALCA (JPMJAL1506) の支援を受けて実施した。
[1)] 杉田ら、日本農芸化学会 2018 年大会、[2)] 阿部ら、日本農芸化学会 2019 年大会

Lignin, *Pseudomonas*, *cis,cis*-muconic acid

発表責任者：園木和典（sonoki@hirosaki-u.ac.jp）

講演番号：3D7a13
講演日時：3 月 26 日 11:32～ 1 号館 D7 会場

EPA 酸化能を有する微生物の探索と反応条件の最適化

Screening of microorganisms with EPA oxidizing activity and reaction optimization

○野村 優太、斎藤 一輝、岸野 重信、小川 順（京大院農・応用生命）
○Yuta NOMURA, Kazuki SAITO, Shigenobu KISHINO, Jun OGAWA (Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【緒言】

EPA は魚油に多く含まれている ω-3 脂肪酸であり、抗がん作用や心血管保護作用など様々な生理機能を持つことが知られている。さらに、近年、EPA のエポキシ化物（17,18-Epoxyeicosatetraenoic acid、以下 17,18-EpETE）に抗炎症作用、EPA の水酸化物（18-hydroxyeicosapentaenoic acid、以下 18-HEPE）に心臓保護作用など様々な生理機能が見出されてきている。一方、これらの EPA 酸化代謝物に注目が集まっているにもかかわらず、未だこれらの酸化代謝物の効率的な生産法は確立されていない。そこで本研究では、EPA から EPA 酸化代謝物を高生産することができる微生物の探索及び選抜した微生物を用いて EPA 酸化代謝物生産の反応条件の最適化を試みた。

【方法及び結果】

魚油を単一炭素源とした液体培地を用いて、自然界から EPA 酸化代謝物を生産する微生物の探索を行った結果、約 3500 種の微生物の中から、EPA 酸化代謝物を生産する微生物を 10 株見出した。これら 10 株の微生物は EPA から EPA のエポキシ化物（17,18-EpETE）を主に生産した。見出した 10 株中、抗炎症作用を持つ 14,15-Epoxyeicosatetraenoic acid（14,15-EpETE）も生産していた MN15 株を選抜し、16S rRNA シーケンス解析により *Bacillus* sp.と同定した。次に、MN15 株を用いて、抗炎症作用を持つ 17,18-EpETE 生産の反応条件の検討を行った。反応時の補酵素、温度、pH について検討した結果、補酵素 NADPH、反応温度 35℃、100 mM Tris-HCl pH 8.0 の条件下にて、17,18-EpETE 生産が効率化されることを明らかにした。次に、MN15 株の培養条件の検討を行った。培地成分の炭素源、窒素源の影響を調べた結果、炭素源が 0.4%ガラクトース、窒素源が 1.5% Yeast extract の時、17,18-EpETE を高生産しうる菌株が得られることを明らかにした。最終的に最適培養条件で培養した菌体を用い、最適反応条件で反応することにより 1.7 mM の EPA から 1h で 0.24 mM の 17,18-EpETE を得ることに成功した。

P450, EPA, 17,18-EpETE

講演番号：3D7a14
講演日時：3 月 26 日 11:43～ 1 号館 D7 会場

N-アセチルグルコサミン含有ホモ及びヘテロオリゴ糖の酵合成
Enzymatic synthesis of homo- and hetero-oligosaccharides containing *N*-acetylglucosamine
○白井 沙也加、平野 貴子、袴田 航、西尾 俊幸（日大生資科・生命化）
○Sayaka SHIRAI, Takako HIRANO, Wataru HAKAMATA, Toshiyuki NISHIO (Chem. and Life Sci., College of Bioresource Sciences. Nihon Univ.)

【目的】キチンは、*N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)がβ-1,4 グリコシド結合で連なった多糖であり、カニやエビなどの甲殻類の骨格、昆虫の外骨格、真菌類の細胞壁などの主成分であり、地球上でセルロースに次いで多く存在するバイオマス糖質資源である。GlcNAc が重合した特定鎖長のキチンオリゴ糖や GlcNAc を構成糖として含むヘテロオリゴ糖には、様々な有用生理機能が報告されている。そこで我々は、GlcNAc を含む様々なオリゴ糖を合成し、その生理機能を評価している。現在までに、*Stenotrophomonas maltophilia* 由来の糖転移型β-*N*-アセチルヘキソサミダーゼを用いて中鎖キチンオリゴ糖の効率の良い合成法の確立に成功している。さらに、*Aspergillus oryzae* の糖転移型β-フルクトフラノシダーゼを用い、GlcNAc 含有ヘテロオリゴ糖として、スクロースのグルコース残基が GlcNAc に置き換わった *N*-アセチルスクロサミン(SucNAc)の効率の良い合成にも成功している。本研究では、さらなる GlcNAc 含有オリゴ糖の合成を目的とし、キチンオリゴ糖にフルクトースが結合した新規 GlcNAc 含有ヘテロオリゴ糖の酵素合成を行うことにした。
【方法・結果】$(GlcNAc)_2$ と SucNAc の高濃度溶液に糖転移型β-*N*-アセチルヘキソサミダーゼを含む *S.maltophilia* の乾燥菌体を全細胞触媒として作用させることで、β-GlcNAc-(1,4)-α-GlcNAc-(2,1)-β-Fructoside[$(GlcNAc)_2$-Fru]の合成を試みた。しかし、乾燥菌体を用いた$(GlcNAc)_2$-Fru の合成法の収率は 15.3%と、あまり高くなかった。より高い収率で$(GlcNAc)_2$-Fru を合成するため、*S.maltophilia* NYT501 から糖転移型β-*N*-アセチルヘキソサミダーゼを抽出し、粗酵素を合成に用いることにした。$(GlcNAc)_2$ と SucNAc を含む溶液にこの抽出酵素を添加後、継時的にサンプリングし、TLC および HPLC で分析した。その結果、$(GlcNAc)_2$ と SucNAc が減少するにつれ、$(GlcNAc)_2$-Fru が増加していることが分かった。このときの収率は 33.0%であり、乾燥菌体による合成より高収率で$(GlcNAc)_2$-Fru を得ることができた。次に、キチンオリゴ糖部位の重合度がさらに高い新規オリゴ糖の合成を行うため、$(GlcNAc)_2$-Fru を基質として用いることで$(GlcNAc)_2$-Fru にさらに GlcNAc が付加したオリゴ糖の合成を試みた。$(GlcNAc)_2$-Fru と$(GlcNAc)_2$ が含まれる高濃度溶液に本酵素を作用させた。この反応液を TLC および HPLC で分析したところ、基質が減少するにつれ糖転移生成物と思われる物質が増加していた。この反応液を活性炭クロマトグラフィーで精製し、糖転移生成物を得た。TLC、NMR および MS 分析したところ、生成物はβ-GlcNAc-(1,4)-β-GlcNAc-(1,4)-α-GlcNAc-(2,1)-β-Fructoside であることが分かった。

Enzymatic synthesis, oligosaccharides, *N*-acetylglucosamine

発表責任者：西尾　俊幸（nishio.toshiyuki@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3D7a15
講演日時：3 月 26 日 11:54～ 1 号館 D7 会場

Cyclic GMP-AMP 量産化技術の確立

Practical enzymatic production of cyclic GMP-AMP

○吉田 晃、石毛 和也（ヤマサ醤油・医薬化成品）
○Ko Yoshida, Kazuya Ishige (Yamasa Corp. Biochemicals div.)

【目的】環状ジヌクレオチドなどの STING リガンドは、樹状細胞などの抗原提示細胞に強く発現するアダプタータンパク質STINGに作用して自然免疫を強く惹起し､TLRリガンドである従来の核酸アジュバントと異なる新たなサブセットの核酸アジュバントとして注目されている。なかでも、GMP と AMP のヘテロ環状二量体である cyclic GMP-AMP(以下 cGAMP)は、がん免疫アジュバントとしての高い潜在能力が明らかとなり、次世代アジュバント候補として期待を集めている。しかしながら、cGAMP の実用的な合成法は開発されておらず、研究用試薬として著しく限定された量しか入手できないのが実情である。そこで、本研究では、cGAMP のワクチンアジュバントとしての開発に向けて、その量産化技術の確立を図った。
【方法と結果】報告者らは、代表的な cGAMP 合成酵素であるコレラ菌 *Vibrio cholerae* 由来 DncV を取得し、当該酵素を用いて ATP/GTP からの cGAMP 合成特性を調べた。この結果、本酵素の cGAMP 合成活性は著しく低く、その効率的な合成には大幅な活性向上が必要であることが判明した。また、一般的に cGAMP 合成酵素は、副反応として他種の環状ジヌクレオチドである cyclic di-GMP や cyclic di-AMP を生成させることが知られていたが、DncV を用いた場合においても、cyclic di-GMP/-AMP が著量副生することが確認された。これらの他種環状ジヌクレオチドは、その物理化学的特性が cGAMP と酷似していることに起因して cGAMP との分離が難しく、これらが著量副生した場合、アジュバントとして求められる高純度な製品の取得が困難であることが判明した。従って、これらの他種環状ジヌクレオチドの合成段階での副生抑制が、cGAMP 量産化技術確立に向けた大きな課題であることが明らかとなった。そこで、報告者らは、まず、当該酵素へのランダム変異導入により cGAMP 合成活性が向上した変異酵素を網羅的に取得し、これらの変異を組み合わせることにより、当該酵素の活性を飛躍的に高めることに成功した。また、同様に、cyclic di-GMP/-AMP の副生が抑制された変異酵素を取得し､変異点の組み合わせを最適化することで､その副生を顕著に低減させることに成功した｡さらに、当該機能改変 DncV に、AMP からの ATP 供給系、および、GMP からの GTP 供給系を共役させ、それらの活性バランスを最適化することで、cGAMP 合成反応の効率をさらに高めることに成功した。このようにして構築した cGAMP 酵素合成系に、結晶化による精製方法を組み合わせることにより、高純度な cGAMP の量産が可能となった。

cyclic GMP-AMP, vaccine adjuvant, STING ligand

発表責任者：石毛和也（ishige-k@yamasa.com）

講演番号：3D7p01
講演日時：3 月 26 日 13:50～ 1 号館 D7 会場

細菌型α-1,3-グルカナーゼを用いたニゲロオリゴ糖生産
Production of nigero-oligosaccharide by bacterial α-1,3-glucanase
○矢野 成和[1]、玉木 友理[1]、小黒 夏樹[1]、今野 博行[1]、若山 守[2]([1]山形大院理工、[2]立命館大生命)
○ Shigekazu YANO[1], Yuri TAMAKI[1], Natsuki OGURO[1], Hiroyuki KONNO[1], Mamoru WAKAYAMA[2] ([1]Yamagata Univ., [2]Ritsumeikan Univ.)

【目的】
ニゲロオリゴ糖は、グルコースが α-1,3-グルコシド結合によって結合したオリゴ糖であり、味醂、酒や蜂蜜に含まれるコク味成分として知られている。ニゲロオリゴ糖は古くから食経験があり、日本人の味覚にも適していることから、新たな生産法の開発が求められている。

我々は、*Bacillus circulans* KA-304 が、グリコシダーゼファミリー87 に属する細菌型 α-1,3-グルカナーゼ（Agl-KA）を生産すること、大腸菌宿主ベクター系で容易に発現することを報告した(1)。

本研究では、*Streptococcus mutans* 由来のグルコシルトランスフェラーゼ（GTF1）を用いて調製した α-1,3-グルカン（α-1,3-グルカン St）を基質として、Agl-KA の加水分解条件を検討し、生成するオリゴ糖を分析した。また、*Leuconostoc mesenteroides* が生成する不溶性グルカン(2)から調製した α-1,3-グルカン(α-1,3-グルカン Le)、Agl-KA の触媒ドメインのみから構成される変異酵素 AglΔDCD-UCD を用いて加水分解試験を行った。

【方法と結果】
Agl-KA と AglΔDCD-UCD は、pET ベクター系を用いて *Escherichia coli* Rosseta-gami（DE3）で発現させた。大腸菌で発現させた GTF1 を 20%スクロース溶液に加えて、30℃で反応させることで α-1,3-グルカン St を得た。また、α-1,3-グルカン Le は、*L. mesenteroides* の培養液中に蓄積した不溶性グルカンから酵素処理とデキストラナーゼ処理を行うことで得た。

1%、4%の α-1,3-グルカン St を基質として Agl-KA の加水分解反応を行った結果、1%の場合に約 10 mM の還元糖が、4%では 27 mM の還元糖が生成した。薄層クロマトグラフィーを用いて、生成物を分析した結果、主たる生成物は 4 糖であり、2 糖、3 糖、5 糖も確認された。AglΔDCD-UCD を用いて、1%、4%の α-1,3-グルカン St を分解した結果、Agl-KA と比べて遊離する還元糖量がわずかに減少した。

α-1,3-グルカン Le を基質として、Agl-KA の加水分解反応も行った。基質 1%では還元糖量が 3.5 mM、4%基質では 7 mM であり、α-1,3-グルカン St の場合よりも還元糖生成量が減少した。本研究ではさらに条件を変化させて、細菌型 α-1,3-グルカナーゼを用いたニゲロオリゴ糖の生成条件を調べた。

(1) Yano, S., Biosci. Biotechnol. Biochem., 67, 1976-82 (2003).
(2) 堀 友佳理、日本農芸化学会 2014 年度大会講演要旨集、講演番号 3A34p07.

α-1,3-glucanase, nigero-oligosaccharide, *Streptococcus mutans*

講演番号：3D7p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ 1 号館 D7 会場

P. saccharoketogenes IFO14483 株の微生物変換における酸化活性の基質特異性
Substrate specificities of microbial oxidation by *P. saccharoketogenes* IFO14483
○桐生 高明、木曽 太郎、村上 洋（大阪技術研）
○Takaaki Kiryu, Taro Kiso, Hiromi Murakami (Osaka Res. Inst. Ind. Sci. Tech.)

（目的）植物などには様々な配糖体が含まれ、その中には人に対して有効な機能性を示し、機能性食品等への利用が期待されているものも多い。しかし、配糖体の中には水に対する溶解性が低い、味質が悪いなどの好ましくない性質を示すものがある。これらの配糖体にシクロデキストリン・グルカノトランスフェラーゼ（CGTase）などの糖転移酵素を利用し、さらに糖を結合させることで、水溶性や味質を改善する試みが行われている。しかし、糖転移反応により配糖体に糖を付加する場合、配糖体の水溶性が低い場合は、糖受容体として必要な濃度を十分確保できない。また、すでに配糖化された生成物に、さらに糖を付加して、糖の鎖長を延伸してしまうなどして、アグリコンへの転移反応が十分に進行しないケースが見られる。一方、*Pseudogluconobacter saccharoketogenes* は糖質のヒドロキシメチル基を酸化する活性を示すバクテリアであり。本菌のアルコールデヒドロゲナーゼは、アルドースの C-6 位のヒドロキシメチル基を酸化し、ウロン酸に変換することができる。[1] この反応を利用し、配糖体アルドース残基をウロン酸残基に変換すれば、配糖体の水溶性の向上や味質の改善が期待できる。糖酸化反応は糖転移反応と異なり、配糖体の水溶性が低い場合でも、反応は確実に進み、配糖体の糖酸化物の生成が高収率で期待できる。今回は *P. saccharoketogenes* 休止菌体の配糖体や二糖類への作用性を報告する。
（方法）*P. saccharoketogenes* IFO14483 株を培養し、生理食塩水で二回洗浄した。休止菌体を調製した。本休止菌体をメチル-α-グルコシド、メチル-β-グルコシド、pNP-β-グルコシドに作用させた。反応後、生成物を精製し、構造を NMR などにより同定した。さらに、トレハロース、β,β トレハロース、セロビオース、ゲンチオビオースの酸化を行い、二糖類への作用性を調べた。
（結果）*P. saccharoketogenes* 休止菌体をメチル-α-グルコシド、メチル-β-グルコシド、pNP-β-グルコシドを含む反応液に加え振盪した。酸化反応は効率的に進み、生成物を分析した結果、それぞれメチル-α-グルクロニド、メチル-β-グルクロニド、pNP-β-グルクロニドと同定した。一方、トレハロースおよびβ,β トレハロースの酸化物の構造はそれぞれ、グルクロン酸 2 分子がα1,1 結合したトレハロース二酸化物とβ1,1 結合したβ,β トレハロース二酸化物であると確認された。セロビオースやゲンチオビオースの酸化物は、二酸化物であったが、構造の同定にはさらなる検討が必要であることがわかった。以上の結果から、*P. saccharoketogenes* の休止菌体は配糖体や二糖類を酸化し、対応する酸化物を生成することが明らかになった。(1)日本応用糖質科学会誌 3, B46, 2013

glycoside, oxidaiton, *Pseudogluconobacter saccharoketogenes*

発表責任者：桐生高明（kiryu@omtri.or.jp）

講演番号：3D7p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ 1 号館 D7 会場

植物由来ヒドロキシニトリルリアーゼによる立体選択的なアミノニトリルの合成
Stereoselective aminonitrile synthesis using plant hydroxynitrile lyases

○板倉 葵、松井 大亮、浅野 泰久（富山県大工・生工研セ）
○Aoi Itakura, Daisuke Matsui, Yasuhisa Asano (Toyama Pref. Univ)

【目的】医薬品合成などに利用できるアミノニトリルは、アルデヒドまたはケトン、アンモニア、シアン化水素から合成され、ストレッカー合成の中間体として知られている。最近我々は変異型 D-アミノ酸酸化酵素を用いたアミンからアミノニトリルの合成[1]や、ストレッカー合成にニトリラーゼを組み合わせた *R* 選択的なアミノ酸の合成[2]について報告している。本研究はアミノニトリルを酵素を用いてアルデヒドから不斉合成することを目的とし、その反応機構からヒドロキシニトリルリアーゼ（HNL）を利用することが最適であると考えた。

【方法】植物由来の 4 種類の *R* 選択的 HNL (シロイヌナズナ (*At*HNL)、アマ (*Lu*HNL)、南天 (*Nd*HNL)、パッションフルーツ (*Pe*HNL)) と 3 種類の *S* 選択的 HNL (バリオスペルマムモンタナム (*Bm*HNL)、パラゴムノキ (*Hb*HNL)、キャッサバ (*Me*HNL)) を大腸菌異種発現系で調製した。ピロリジンからピロリジン-2-カルボニトリル (PCN)、フェニルアセトアルデヒドから 2-アミノ-3-フェニルプロパニトリル (APN)、ベンズアルデヒドから 2-メチルアミノ-2-フェニルアセトニトリル (2mPAN) を有機合成により調製した。市販の 2-フェニルグリシノニトリル (PGN) を合わせた 4 種類のアミノニトリルで pH 4.0、7.0、9.0 でのアミノニトリルからの分解反応を、クロラミン T と 1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロンを用いたシアン比色定量法で比較した。さらにアルデヒドからアミノニトリルへの合成反応を、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) でキラルカラム CHIRALCEL OJ-H を用いて分析した。

【結果】アミノニトリルの分解反応を検討した結果、pH 4.0 の条件下で全てのアミノニトリルで HNL による触媒活性が見られた。PGN、APN、PCN ではいずれの HNL でも非常に低い活性を示したが、2mPAN においてすべての HNL で比較的高い活性が見られた。特に *Bm*HNL、*Me*HNL、*Pe*HNL で各々 0.0161、0.0249、0.0134 U/mL（reaction mixture）の分解活性が見られた。ベンズアルデヒド、メチルアミン、シアン化カリウムを用いて 2mPAN の合成反応を検討した結果、2mPAN 由来のピークを HPLC で確認できた。本研究は酵素を用いる不斉ストレッカー合成の初めての例である。

【参考文献】

1) N. Kawahara, K. Yasukawa, and Y. Asano, *Green Chem.*, **19**, 418-424 (2017).
2) N. Kawahara, and Y. Asano, *ChemCatChem*, **10**(21), 5000-5006 (2018).

hydroxynitrile lyase, aminonitrile, Strecker amino acid synthesis

講演番号：3D7p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ 1 号館 D7 会場

α置換マロン酸ジエチル加水分解酵素の遺伝子同定と異種発現系の構築

Identification and gene expression of hydrolase acting on diethyl α-substituted malonates

○菊川 寛史[1]、村上 陽亮[1]、大須賀 勇人[1]、川端 潤[2,3]、三宅 良磨[2]、滿倉 浩一[1]、吉田 豊和[1] ([1]岐阜大工・化生工、[2]三菱ケミカル株式会社、[3]株式会社エーピーアイコーポレーション)
○Hiroshi Kikukawa[1], Yosuke Murakami[1], Hayato Osuka[1], Hiroshi Kawabata[2,3], Ryoma Miyake[2], Koichi Mitsukura[1], Toyokazu Yoshida[1] ([1]Fac. Eng., Gifu Univ., [2]Mitsubishi Chemical Corp., [3]API Corp.)

【背景・目的】α 置換マロン酸モノエステルは四級炭素の合成ブロックとして有用であり、医薬品合成などに利用される。光学活性マロン酸モノエステルの酵素合成法の開発に向けマロン酸ジエステルの立体選択的エステラーゼ活性を探索したところ、ジエチルマロン酸ジエチルを単一炭素源とする集積培養によって放線菌 *Rhodococcus* sp. D32 を発見した[1)]。本研究では、D32 株エステラーゼの精製・遺伝子同定および異種発現系を構築し、光学活性マロン酸エステル誘導体の酵素合成を試みた。

【方法・結果】酵素精製では 2-エチル-2-メチルマロン酸ジエチル（DEMM）を基質に用いて酵素活性を評価した。D32 株の無細胞抽出液を各種カラムクロマトグラフィーに供して、収率 57%で D32 株由来エステラーゼを単離精製した。精製酵素は分子質量 36 kDa のモノマー酵素で、α 位にメチル基あるいはエチル基をもつ一置換ジエステルに対して高い活性を示した。精製酵素の N 末端アミノ酸配列と *Rhodococcus* sp. D32 の全ゲノム解析より、D32 株のエステラーゼをコードする 1,062 bp の遺伝子配列を見出した。この遺伝子産物は 353 アミノ酸残基で分子質量 38 kDa であった。このエステラーゼ遺伝子を pET-21a(+)ベクターに組込み大腸菌で発現させたところ、野生株の 9 倍の比活性を示した。また、生成したモノエステルをキラル HPLC 分析したところ、95% ee (*S*)と野生株同様の高い光学純度を示した。このエステラーゼのアミノ酸配列は、*Euzebya* sp. DY32-46 の ß-ketoadipate enol-lactone hydrolase と 47%、*Haloterrigena turkmenica* DSM 5511 の α/ß hydrolase と 43%の相同性を示した。これらの結果より、本酵素は新奇な加水分解酵素であると示唆された。

1) 菊川ら：日本生物工学会 2018 年度大会, 2Lp06 (2018)

asymmetric hydrolysis, diester, *Rhodococcus*

講演番号：3D7p05
講演日時：3 月 26 日 14:34～ 1 号館 D7 会場

PLE 代替え酵素を使用したラニレスタットの鍵中間体 ASI-2 の新規生産法

A novel method of producing the key intermediate ASI-2 of ranirestat using a PLE substitute enzyme

○山村 栄虎、津﨑 和也、北 伸二 (協和ファーマケミカル)
○Ei-Tora YAMAMURA, Kazuya TSUZAKI, Shinji KITA (Kyowa Pharma Chemical Co., Ltd.)

【背景・目的】Ranirestat は、糖尿病性合併症治療薬として創出された化合物で、アルドース還元酵素阻害剤として知られている。Ranirestat の鍵中間体の 1 つである ASI-2 の化学合成法について報告例が数例ある。光学分割する方法[1)]があるが、光学分割後の原料回収のプロセスが煩雑になるという問題点がある。光学分割しない方法として、プロキラルなエステル誘導体を、ブタ肝臓エステラーゼ(PLE)を用いて光学活性なカルボン酸誘導体に導くモデルが提案されている[2)]。このモデルは理論収率 100%で光学活性カルボン酸誘導体を得ることができるが、PLE は動物臓器由来酵素であり、ロット間差が大きいといった問題点がある。さらに、PLE は特異な基質特異性からプロセス化学において重要な酵素であるため、PLE 生産株作製の研究が多くなされているが、PLE の過剰発現に成功した例がない。そこで、本研究では微生物由来 PLE 代替え酵素の取得と、それを用いてプロキラルなエステル誘導体から光学活性なカルボン酸誘導体にし、ASI-2 を合成することを目的とした。
【方法・結果】PLE に代わる微生物由来酵素を探索した。バクテリアを 344 株スクリーニングしたところ、1 株に活性を見出した。酵素精製により酵素を特定したところ、エステラーゼ(EstBT)であることが示唆された。EstBT を用いてプロキラルなエステル誘導体(Z-MDE-AE)を加水分解したところ、光学純度 99.9% ee で光学活性なカルボン酸誘導体(Z-MME-AE)を得ることができた。ここで、PLE を用いて Z-MDE-AE を加水分解したところ 93.6% ee で Z-MME-AE を得たことから、EstBT は PLE よりも高選択性の酵素であることが示唆された。EstBT の遺伝子配列を決定し大腸菌で発現させたところ、EstBT の酵素量は総菌体重量に対し 5.7%であり過剰発現していた。工業的に入手可能なアミノマロナート誘導体とハロゲン化酢酸エステル誘導体を出発原料とし、組換え大腸菌を用いたプロセスで ASI-2 を合成したところ、トータル収率 55%で ASI-2 を得ることができた。PLE を用いた場合、トータル収率は 38%であったため、PLE を使用する場合よりも高収率で ASI-2 を得ることができた。これらのことから、化学合成とバイオコンバージョン[3)]が融合した ASI-2 の製造プロセスの構築と PLE 代替え酵素を取得することができた。

【参照】

1) 大日本住友製薬; JP5130212B2, JP5130211B2
2) Kasai, M. et al. ; United States patent, US 8,633,001 B2
3) Kimura, T., Ishikawa, C., Osorio-Lozada, A., Robins, K.T., Hibi, M., and Ogawa, J., *Biosci. Biotechnol. Biochem.,* 78, 1772-1776 (2014).

bioconversion, pharmaceutical intermediate, gene expression

発表責任者：山村　栄虎（eitora.yamamura@kyowa-kirin.co.jp）

講演番号：3D7p06
講演日時：3 月 26 日 14:55～ 1 号館 D7 会場

α-EG が糸状菌の生育や酵素活性に及ぼす影響について
The influence of α-EG on growth and enzyme activity of filamentous fungi
○大森 有花子[1]、内野 昌孝[2]、高野 克己[3]（[1]東京農大院農・農化、[2]東京農大生命・微生物、[3]東京農大応生・農化）
○Yukako OMORI[1], Masataka UCHINO[2], Katsumi TAKANO[3] ([1]Agrichem. Agr., Grad.Sch. Tokyo Univ. of Agric., [2]Dept. Mol. Microbiol. , Fac. Tokyo Univ. of Agric., [3]Dept.Agrichem. Fac.Biosci. Tokyo Univ. of Agric.)

【目的】
エチル-α-グルコシド（α-EG）は、グルコースの 1 位炭素にエトキシル基が結合した非還元糖である。日本酒やみりんなどの発酵食品に微量成分として含まれており、速効性の甘味と遅効性の苦味を持ち、消臭効果、味質改善効果、美肌効果などがあると報告されている。したがって、化粧料や機能性物質として有用とされている。α-EG は清酒製造過程では麹菌のα-グルコシダーゼの作用によって生産され、日本酒の風味に影響を与える一方、発酵過程中において微生物および発酵作用とα-EG の関連は報告されていない。本報告ではα-EG が存在する環境が微生物のα-グルコシダーゼ活性に対してどのような影響を及ぼすかを調べたので、その結果を報告する。
【方法】
α-EG は、エタノール量に対して D-(+)-グルコース 20%、濃硫酸 0.1%を添加後、加熱、中和、濃縮し、得られたシロップを純水に溶解し、β-グルコシダーゼを作用させ、活性炭カラム（Φ5cm×41cm）にて精製した。α-EG 量はフェノール-硫酸法にて測定した。供試菌株は *Aspergillus oryzae* NRIC 1224、*Aspergillus niger* NRIC 0456、*Aspergillus kawachii* N-3 を用いた。これらを MYP 液体培地にて 37 度、24 時間振盪培養し、純水で菌体を洗浄した。その後、炭素源をグルコース、マルトース、α-EG それぞれで置き換えたツァペックドックス液体培地に移し、再び 37 度、24 時間振盪培養後、純水で菌体を洗浄した。その菌体を用いて、PNPG 法によりα-グルコシダーゼ活性を測定し、その後凍結乾燥を行い、生育量の測定をした。
【結果】
α-EG の合成試験での収率は 57.8%であった。菌体培養後の生育量は、炭素源マルトース、グルコースでは大きく変わらず、α-EG で少ない結果であった。菌体 1g 当たりのα-グルコシダーゼ活性は、炭素源グルコース、マルトースでは菌株によって差異があったが、すべての菌株に共通して、α-グルコシダーゼ活性はグルコースよりもα-EG を炭素源としたものが高い値を示した。

α-glucosidase, filamentous fungi, Ethyl α-D-Glucoside

講演番号：3D7p07
講演日時：3 月 26 日 15:06～ 1 号館 D7 会場

麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来新規リパーゼの特徴付け
Characterization of a novel lipase from *Aspergillus oryzae*
○市川 響太郎、吉田 彩花、塩野 義人、小関 卓也（山形大農）
○Kyotaro Ichikawa, Ayaka Yoshida, Yoshihito Shiono, Takuya Koseki (Fac. Agric., Yamagata Univ.)

【背景】クロロゲン酸エステラーゼはクロロゲン酸をカフェ酸とキナ酸に加水分解する一種のカルボキシエステラーゼとして知られている。*Aspergillus oryzae* RIB40 が持つ機能未知遺伝子 AO090010000745 は *Aspergillus niger* および *Ustilago maydis* で報告されたクロロゲン酸エステラーゼ遺伝子と相同性が比較的高いことから、クロロゲン酸エステラーゼ遺伝子である可能性が考えられた。そこで本研究では機能未知酵素遺伝子 AO090010000745 をメタノール資化性酵母である *Pichia pastoris* GS115 を用いて異種発現させ、その酵素学的諸性質を解析した。加えて *Aoest1*（AO090012000069）、*Aoest2*（AO090038000122）もクロロゲン酸エステラーゼと推定される酵素遺伝子であるため、同時に解析した。
【結果】本酵素は SDS-PAGE では約 60kDa のタンパク質で、合成基質 α-ナフチル酪酸（C4）を用いた最適条件は最適 pH7.0、最適温度 40℃を示した。熱安定性は 40℃の 1 時間処理で 84%の残存活性を示し、50℃の処理では半減したものの、60℃の処理でも 30%の残存活性を示した。また本酵素は C4 および C8 を中心に広範囲な鎖長の α-ナフチルエステルを加水分解し、高い比活性を示した。しかしながら、本酵素にクロロゲン酸エステラーゼの活性は認められなかった。また AoEst1 および AoEst2 も同様にクロロゲン酸エステラーゼ活性はなく、合成基質に対する比活性も有意に低かった。
一方で、シャーレ内で乳化させたトリブチリンを基質に消化試験を行ったところ、分解を確認できた。また 1-モノパルミチン、1,3-ジパルミチン、トリパルミチンに対しても同様に消化試験を行ったところ、トリパルミチンに対してもわずかに活性を示した。以上の結果から本酵素はクロロゲン酸エステラーゼとは異なりリパーゼであることが判明したため、Lip0745 と名付けた。本酵素はこれまでに解析されている *A. oryzae* 由来のリパーゼ CutL1、MdgL2、TgL3、Lip0375 とは、アミノ酸配列の類似性はなく、新規のリパーゼである可能性が示唆された。今後は詳細な基質特異性、エステル交換反応に関する解析などを進めていく予定である。

lipase, *Aspergillus oryzae*, *Pichia pastoris*

発表責任者：市川響太郎（agri14012@gmail.com）

講演番号：3D7p08
講演日時：3 月 26 日 15:17～ 1 号館 D7 会場

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* における糖鎖欠損型分泌糖タンパク質生産株の解析

Analysis of the strain that produces *N*-glycan-deleted glycoproteins in *Aspergillus oryzae*

○李 秋実、竹川 薫、樋口 裕次郎（九大院・生資環）
○Qiushi LI, Kaoru TAKEGAWA, Yujirou HIGUCHI (Dept. of Biosci.Biotechnol.,Kyushu Univ)

【背景】近年、バイオ医薬品市場は確実に拡大している。そのバイオ医薬品の中では糖タンパク質が約 7 割を占め、生産量の確保が重要課題となっている。糖タンパク質バイオ医薬品の糖鎖構造は、その薬効に大きな影響を与えることが多く、糖鎖構造の均一性が求められている。現在、均一な糖鎖構造を持つ糖タンパク質を化学酵素学的に調製する手法として、糖タンパク質をまず endo-β-*N*-acetylglucosaminidase で処理し、得られた GlcNAc タンパク質を基質に、均一な糖鎖を糖供与体とし、糖転移酵素により均一糖鎖タンパク質を作製する方法がある。そこで、均一糖鎖構造を有する糖タンパク質を調製する前段階として、GlcNAc タンパク質を多量に調製することが必要となる。黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は日本の“国菌”であり、その安全性や高いタンパク質分泌能力を持つため、異種タンパク質の生産宿主としてよく利用される。本研究では，黄麹菌を用いて GlcNAc タンパク質を大量に調製するために、AoGlycoDelete 株を作製するとともに、その株の性質解析を行った。

【方法および結果】*Aspergillus oryzae* のゲノムからゴルジ体膜に存在するいくつかのタンパク質を選抜し、それらの膜貫通領域の C 末端側に *Hypocrea jecorina* 由来の endo-*N*-acetyl-β-D-glucosaminidase T (EndoT、黄麹菌用にコドン最適化) を融合発現するプラスミドを作製し、形質転換により AoGlycoDelete 候補株を得た。それらを親株と共に DPY 液体培地で 4 日間振盪培養し、その培養上清を SDS-PAGE 後に CBB 染色した結果、EndoT 発現によって *N* 型糖鎖を一つ持つ α-アミラーゼのバンドサイズの減少が確認された。このバンドサイズの減少は、エンドグリコシダーゼである EndoCC1 で処理した α-アミラーゼのバンドサイズと同様であったことから、AoGlycoDelete 株により生産された糖タンパク質は GlcNAc タンパク質であると示唆された。また、DPY プレート培地で各菌株の生育を調べたところ、4 種類の AoGlycoDelete 株のうち、特に高温条件下で 2 種類の株のコロニー形態にわずかな異常が観察されたものの、生育に大きな影響は見られなかった。この 2 株を野生株と共に DPY 液体培地で 4 日間振盪培養し、α-アミラーゼの生産量および活性測定を経時的に行ったところ、顕著な差は見られなかった。このことから、糖鎖の有無に関わらず、α-アミラーゼは活性を有していることが明らかになった。今後、AoGlycoDelete 株を用いて異種 GlcNAc タンパク質の生産を試みるとともに、糖転移反応による均一糖鎖を有するタンパク質を作製する。

Aspergillus oryzae, *N*-glycan, glycoprotein

講演番号：3D7p09
講演日時：3 月 26 日 15:28～ 1 号館 D7 会場

紅麹菌の特性評価に資する加水分解酵素の解析
Analysis of characteristics of genus *Monascus* based on hydrolases
○橘 信二郎[1]、比嘉 悠貴[2]、金 英寿[2] ([1]琉球大・農、[2]小林製薬株式会社)
○Shinjiro TACHIBANA[1], Yuki HIGA[2], Young-Soo KIM[2] ([1]Univ. Ryukyus, Fac. Agric., [2]R&D Center, Kobayashi Pharmaceutical Co., Ltd)

【背景・目的】紅麹菌 *Monascus* は、東アジア、東南アジアおよび沖縄で古くから発酵食品の製造に利用されてきた有用微生物である。本菌は、アザフィロン系の色素産生を特徴とし、その他にも多様な生理活性を有する二次代謝産物を産生する。それゆえ、紅麹菌の特性評価において色素生産性や二次代謝産物の生産性を指標とすることが多い。当研究室では、紅麹菌の生理活性スクリーニングを行っているが、色素非生産株においても多様な生理活性を見出している。そこで、今回は、紅麹が産生する酵素に着目した特性評価について検討した。

【方法・結果】*Monascus* 属菌は、オートクレーブ滅菌したうるち米を用いて 30℃で 10 日間静置培養し、麹を得た。麹重量に対して 3 倍量の緩衝液で粗酵素を抽出した。この粗酵素液を用いて、プロテアーゼ、アミラーゼ、グルコアミラーゼおよびリパーゼ活性を網羅的に調べた。その結果、アミラーゼ活性は広範囲の pH で活性を有するのに対し、グルコアミラーゼは酸性領域で活性を有する種が多かった。このうち、アルカリ領域において高い活性を示す株も散見された。プロテアーゼ活性はほぼ酸性領域において活性を示した。これらの結果より、酵素活性を指標とした紅麹菌の特性評価を発酵食品の製造および生理活性探索の指標に適用できる可能性が示唆された。

Monascus, hydrolase, koji

発表責任者：橘信二郎（tachiban@agr.u-ryukyu.ac.jp）

講演番号：3D7p10
講演日時：3 月 26 日 15:39～ 1 号館 D7 会場

糸状菌 *Aspergillus nidulans* のセクレトーム解析から同定された hypothetical protein の機能解析

Characterization of the hypothetical proteins produced by filamentous fungus *Aspergillus nidulans*

○大堀 沙貴子[1]、酒井 杏匠[1]、糀谷 紗季[1]、山口 愛彩[1]、木島 尚輝[1]、松江 渚[1]、小栗 莉奈[1]、高須賀 太一[2]、堀 千明[3]、志水 元亨[1]、加藤 雅士[1] ([1]名城大農、[2]北大院農、[3]北大院工)
○Sakiko OHORI[1], Kiyota SAKAI[1], Saki KOJIYA[1], Aya YAMAGUCHI[1], Naoki KIJIMA[1], Nagisa MATSUE[1], Rina OGURI[1], Taichi TAKASUKA[2], Chiaki HORI[3], Motoyuki SHIMIZU[1], Masashi KATO[1] ([1]Meijo Univ. of Agric., [2]Grad. Sch. Agric., Hokkaido Univ., [3]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

【目的】

自然界に存在する植物バイオマスに含まれる多糖類の分解速度および効率が高まれば、バイオ燃料生産やバイオファイナリーなどの産業分野に大きく貢献することができる。糸状菌 *Aspergillus nidulans* はデンプン、セルロース、ヘミセルロースの分解能を有していることから、それら多糖類の分解に関わる細胞外酵素およびそれらの転写制御についての研究が盛んに行われている。

本研究では、種々の多糖類（結晶性セルロース (MCC)、カルボキシメチルセルロース (CMC)、キチン、キシラン、グルコマンナン、ガラクトマンナン、ペクチン、デンプン）をそれぞれ唯一の炭素源にして生育させた際に、*A. nidulans* が細胞外に分泌するタンパク質を網羅的に解析した。また、同定されたタンパク質の中で機能が明らかになっていないタンパク質 (Hypothetical Protein ; HP) を選抜し、それらの機能を解析した。

【方法および結果】

種々の多糖類（MCC、CMC、キチン、キシラン、グルコマンナン、ガラクトマンナン、ペクチン、デンプン）をそれぞれ唯一の炭素源にした培地で *A. nidulans* を所定時間培養後、菌体をろ別した。得られた培養ろ液から TCA/アセトン沈殿によりタンパク質を回収した。トリプシン処理後、LC-MS/MS にてセクレトーム解析したところ、総数で 622 種のタンパク質が同定され、その内の 87 種が HP であった。MCC、CMC、キチン、キシラン、グルコマンナン、ガラクトマンナン、ペクチン、デンプン培養ではそれぞれ 9 種、 29 種、 5 種、 65 種、 61 種、 52 種、 55 種、 45 種の HP が発現していた。他の炭素源と比べて、ペクチンを炭素源にした場合、ペクチンの分解に関わる酵素である Glycoside Hydrolase family 78 (GH78) 、GH105 や Polysaccharide Lyase family 1 (PL1) 、PL3 、PL4 、PL9 に属するタンパク質が発現していた。

現在、いくつかの HP を大腸菌およびメタノール資化酵母 *Pichia pastoris* を用いて異種発現させ、それらの機能を解析している。

Aspergillus nidulans, hypothetical protein, secretome

講演番号：3D7p11
講演日時：3 月 26 日 16:00～ 1 号館 D7 会場

非天然ボトリオコッセン合成経路の進化デザイン

Directed evolution of pathways for non-natural botryococcenes

○多田 和樹、坂本 康二、河合 繁子、斎藤 恭一、梅野 太輔（千葉大院工）
○Kazuki TADA, Kouji SAKAMOTO, Shigeko KAWAI, Kyoichi SAITO, Daisuke UMENO (Chiba Univ. Grad. Sch. of Eng.)

[背景と目的]

微細藻類 *Botryococcus braunii* が蓄積するボトリオコッセン (Bo) は，石油代替燃料や新たな特殊潤滑油として近年注目を集めている。Bo は炭素数 30 の化合物であり、炭素数 15 の基質分子 Farnesyl diphosphate (FPP) の 2 分子縮合により合成される。この反応は，スクアレン (Sq) 合成酵素のホモログである 2 つの酵素，SSL1, SSL3 が担う。これらの酵素のサイズ特異性を改変し，C40, C50，そして C20 などの骨格をもつ非天然 Bo の合成酵素に変更できれば，ボトリオオイルの油質や燃料物性のラインナップ化が可能となると期待される。ただし，Bo 合成は二酵素反応であるため，SSL1/3 両者が同時に目的の特異性を獲得しない限り，非天然 Bo の生合成は実現が難しい。

そこで我々は、まず SSL1, SSL3 ともに進化分子工学に供し，それぞれを独立した 2 ステップ酵素 (単独で炭化水素合成を完成できるもの) に改変し, ついで, そのサイズ特異性変異体のスクリーニング取得を行うという二段階戦略を計画した。

[実験と結果]

SSL1 は FPP をプレスクアレンニリン酸 (PSPP) に変換するが，PSPP を炭化水素にする機能を進化の過程で失っている。この構造遺伝子にランダム変異を導入しライブラリ化したところ，二段階目を回復し，Dehydrosqualene (DSq) を単独合成できる変異体が得られた。この変異体を親とした第２世代ライブラリに対してリコペン生合成経路の補完能に対するコロニー色スクリーニングを実施したところ，フィトエンを合成した変異体が得られた。さらに C50 フィトエン骨格を合成する変異体も得られた。

SSL3 は PSPP を Bo に変換する酵素である。この酵素の近縁酵素であるスクアレン合成酵素やカロテノイド合成酵素で以前見出されたサイズ特異性変異を，本酵素に導入したところ，その幾つかは SSL3 のサイズ特異性もシフトさせることがわかった。こうして得られた SSL1,SSL3 のサイズ変異を SSL1/SSL3 の人工オペロンに導入したところ， C35, C40, C45 などの非天然 Bo の生合成経路が確立できた。

isoprenoids, triterpenoids, synthetic biology

講演番号：3D7p12
講演日時：3 月 26 日 16:11～ 1 号館 D7 会場

生分解性プラスチック分解酵素を高生産する *Pseudozyma antarctica* セルフクローニング株の構築
Construction of a *Pseudozyma antarctica* self-cloning strain for high yield production of a biodegradable plastic-degrading enzyme

○山下（鮫島） 結香[1]、渡部 貴志[1,2]、田中 拓未[1]、坪井 隼[1]、鎗水 透[1]、森田 友岳[3]、小池 英明[3]、鈴木 健[1]、北本 宏子[1] ([1]農研機構、[2]群技セ、[3]産総研)
○ Yuka YAMASHITA(SAMESHIMA)[1], Takashi WATANABE[1,2], Takumi TANAKA[1], Shun TSUBOI[1], Tohru YARIMIZU[1], Tomotake MORITA[3], Hideaki KOIKE[3], Ken SUZUKI[1], Hiroko KITAMOTO[1] ([1]NARO, [2]GIST, [3]AIST)

【背景・目的】
世界的な問題であるプラスチックごみの蓄積を防ぐ対策の一つとして、生分解性プラスチック（生プラ）の実用性向上技術が必要とされる。生プラは、微生物の働きによって最終的に二酸化炭素と水まで分解される。しかし、その分解速度は素材や環境によって大きく異なり、使い手が期待する速度で分解しない場合がある。担子菌酵母 *Pseudozyma antarctica* GB-4(0) 株が培養液中に分泌するエステラーゼ (PaE) は、使用済み生プラ製品の分解促進剤としての活用が期待される。より安価に PaE を使用するためには、PaE 高生産株と生産条件の確立が必要である。我々は以前、*P. antarctica* 由来のキシロース誘導型キシラナーゼプロモーター下流に PaE 遺伝子を接続した PaE 発現カセットを、外来の薬剤耐性遺伝子を選択マーカーに用いて導入した *P. antarctica* 株を構築した。この株にキシロースを与え、PaE を大量に分泌させた [1)]。本研究では、安全性を高めるとともに生産コストを下げることを目的とし、PaE を高生産するセルフクローニング株の構築を検討した。

【方法・結果】
まず、セルフクローニング株の宿主作成のために栄養要求性株の取得を目指し、野生株 GB-4(0)株への UV 処理とナイスタチン濃縮を行った結果、リジン要求性を示す GB-4(0)-L1 株を取得した。相補試験とゲノム配列解析の結果、GB-4(0)-L1 株は、Lys12 遺伝子 (Pa*LYS12*) の一部が欠失していることが明らかとなった。次に、GB-4(0)株のキシラナーゼプロモーター下流に PaE 遺伝子を接続した PaE 高発現カセットを、Pa*LYS12* を選択マーカーに用いて、GB-4(0)-L1 株染色体にランダムに挿入した。取得した 313 個の形質転換体の中から、生プラ（ポリブチレンサクシネート-*co*-アジペート）エマルジョン分解能を指標に、PaE 高生産株を選抜した。定量 PCR 解析の結果、選抜した PaE 高生産株は、ゲノム中に 4 コピーの PaE 高発現カセットが挿入されており、3 L ジャーでのキシロース流加培養 72 時間で 2.0 g/L の PaE を生産した。

本研究は農研機構生研支援センター「イノベーション創出強化研究推進事業」[25017AB]の支援を受けて行った。

【参考文献】1) Watanabe, T. et al. (2015) Appl. Microbiol. Biotechnol. 100(7): 3207-3217.

Pseudozyma antarctica, biodegradable plastic-degrading enzyme, self-cloning

発表責任者：北本　宏子（kitamoto@affrc.go.jp）

講演番号：3D7p13
講演日時：3 月 26 日 16:22～ 1 号館 D7 会場

遺伝子破壊ベクター系等による工学的改変ピキア酵母株の作製

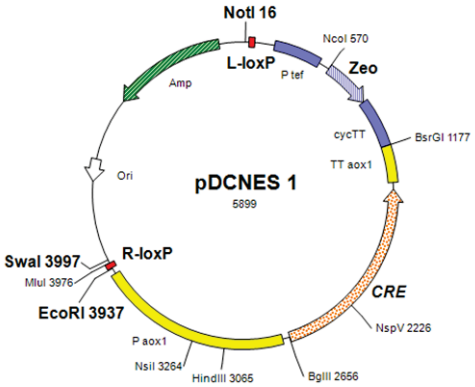
Generation of engineered Pichia pastoris strains with new gene-disruption and vector systems.

○渋井 達郎、原 宏佳、元山 敬太、福井 麻由（日本獣医生命科学大学)
○TATSURO SHIBUI, HIROYOSHI HARA, KEITA MOTOYAMA, MAYU FUKUI (NVLU)

ピキア酵母は組換え宿主として様々な組換えタンパク質の生産に利用されている。当研究室では、*Cre*-変異 *lox*P システムを利用し様々なピキア酵母株に使用可能な再利用可能汎用ベクター系を開発し報告している[1) 2)]。また、本ベクター系を用いたピキア酵母遺伝子破壊系のＰＣＲによる簡易構築法およびその効率（2-4%）[3)] について昨年の本大会にて報告した。

昨年度の系では破壊（ターゲティング）効率が低かったため、効率を向上すべく遺伝子破壊用新規ベクターを上記 *Cre*-変異 *lox*P システム用い再構築した(下図)。新たな系では、遺伝子ターゲティング効率は上昇し、昨年度報告の方法の約 10 倍の高効率が得られた。

この新規システムを用いたプロテーアーゼ遺伝子欠損、分泌関連遺伝子欠損、糖鎖遺伝子改変等の工学的改変を行った株（G-Man 株：*△och1, △pep4, △yscb, △vps21, his, +gap pro. ManI*（GS115 由来））作製について報告する。



1) T Shibui *et,al.*“Construction and effects of tandem-repeat expression genes for *Pichia pastoris,* and their incorporation efficiencies and stabilities by electroporation.”
CIBTech Journal of Biotechnology, 3, .25-35 (2014)
2) T Shibui *et,al.*“A New Efficient Vector for Repeated Use in *Pichia pastoris*.”
International Journal of Research Studies in Biosciences, 3(9), 72-79 (2015)
3) T Shibui *et,al.*“A new type of gene-disruption cassette with a rescue gene for Pichia pastoris. ”
Biotechnology Progress. 33(5), 1201-1208 (2017).

p. pastoris, gene destruction, glyco-engineering

発表責任者：渋井達郎（tshibui@nvlu.ac.jp）

講演番号：3D7p14
講演日時：3 月 26 日 16:33～ 1 号館 D7 会場

工学的改変ピキア酵母株による抗体医薬（ヒュミラ）の生産

Production of a therapeutic antibody (adalimumab) by genetically engineered Pichia pastoris strains

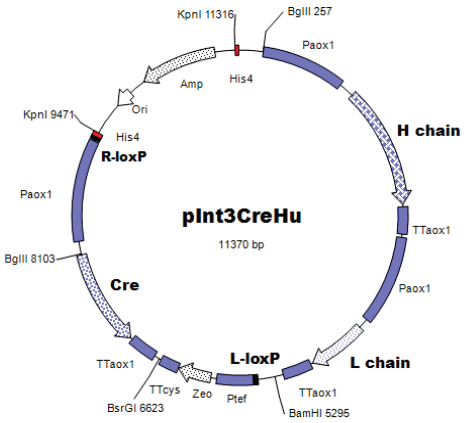
○福井 麻由、渋井 達郎、原 宏佳、元山 敬太（日本獣医生命科学大学）
○MAYU FUKUI, TATSURO SHIBUI, HIROYOSHI HARA, KEITA MOTOYAMA (NVLU)

ピキア酵母は増殖力およびタンパク質生産能力が優れているため、組換え宿主として様々なタンパク質の生産に利用されている。当研究室では、目的遺伝子のコピー数をベクター上で増やす方法や *Cre*-変異 *lox*P システムを利用し様々なピキア酵母株に使用可能な再利用可能汎用ベクター系を開発し報告している[1) 2)]。

本ベクター系を用い、糖鎖遺伝子改変、プロテーアーゼ遺伝子欠損、分泌関連遺伝子改変等の工学的改変を施した株（G-Man 株：*△och1, △pep4, △yscb, △vps21, his, +gap pro. ManI*, ：GS115 由来）を構築した。更に、抗体医薬品として使用されている adalimumab（抗ＴＮＦαヒト型抗体：Humira）発現用遺伝子を人工合成し、本ベクター系に導入して多重質転換可能な同抗体遺伝子発現ベクター（pInt3CreHu、下図）を構築した。

G-Man 株に pInt3CreHu を複数回導入し、抗体生産株を分離・取得した。

取得した生産株による機能を持った抗体の生産性および生産抗体の性状等について、フラスコ培養で得られた初期データを報告する。



1) T Shibui *et,al.*“Construction and effects of tandem-repeat expression genes for *Pichia pastoris,* and their incorporation efficiencies and stabilities by electroporation.” CIBTech Journal of Biotechnology, 3, .25-35 (2014)
2) T Shibui *et,al.*“A New Efficient Vector for Repeated Use in *Pichia pastoris*.” International Journal of Research Studies in Biosciences, 3(9), 72-79 (2015)

p.pastoris, antibody production, humira

発表責任者：渋井達郎（tshibui@nvlu.ac.jp）

講演番号：3D7p15
講演日時：3 月 26 日 16:44～ 1 号館 D7 会場

メタノールセンサー宿主細胞を用いたメタン酸化生体触媒の開発
Development of methanol-producing biocatalyst using yeast cell sensor
○矢野 龍一[1]、竹谷 友之[1]、由里本 博也[1]、寶関 淳[1]、緒方 英明[2]、嶋 盛悟[2]、阪井 康能[1]([1]京大院農、[2]北大)
○Ryuichi YANO[1], Tomoyuki TAKEYA[1], Hiroya YURIMOTO[1], Jun HOSEKI[1], Hideaki OGATA[2], Seigo SHIMA[2], Yasuyoshi SAKAI[1] ([1]Kyoto Univ. of Agric., [2]Hokkaido)

【目的】メタノール資化性酵母はメタノールにより特異的かつ強力に誘導される遺伝子プロモーターを持ち、その誘導の強さ、すなわち支配下の遺伝子の発現量はメタノール濃度に依存する。我々はメタノール資化性酵母 *Komagataella phaffii (Pichia pastoris)* のメタノール誘導性遺伝子のひとつであるジヒドロキシアセトンシンターゼ遺伝子（*DAS2*）のプロモーター支配下に蛍光タンパク質 Venus-PTS1（PTS1; ペルオキシソーム局在化シグナル配列）を発現させた『メタノールセンサー宿主細胞』を開発し、この細胞に発現させたメタノール生成酵素の活性の強弱を、フローサイトメトリー(FACS)を用いて評価できることを報告した [1)]。一方、天然ガスの主成分であるメタンからメタノールを生成するメタン資化性細菌がもつメタン酸化酵素は、大きなエネルギーが必要な CH 結合活性化の触媒原理を明らかにするばかりでなく、様々なバイオコンバージョン反応にも利用できる産業上の有用性から、大量生産法の確立ならびに高活性菌体の開発が期待されている。しかし、メタン酸化酵素は、大腸菌など、異宿主での発現が著しく困難で、膜結合型メタン酸化酵素の可溶性触媒ドメインを大腸菌に異種発現させると不活性な凝集体となることが報告されている [2)]。本研究では、本センサー細胞に発現させることでメタン酸化活性を評価し、メタン酸化生体触媒の活性発現および高機能化を目的とした。

【方法・結果】*K. phaffii* メタノールセンサー細胞を宿主として、メタン資化性細菌由来の膜結合型メタン酸化酵素の可溶性触媒ドメインの様々な変異体･改変体をコードする遺伝子を *GAP* プロモーター支配下に導入した。グルコースを炭素源として培養した酵母細胞を、メタンを基質として反応させ、培養 4 時間後の細胞を回収してフローサイトメトリーに供し、各菌体のメタノール生成活性を調べたところ、メタン依存的にメタノール生成活性が認められる形質転換体を取得した。この陽性菌体については、プロピレンを基質とした酸化プロピレンの生成反応によってもメタン酸化酵素の活性発現を確認した。今後、FACS を用いたハイスループットスクリーニングにより、メタン酸化生体触媒の高機能化が可能であると考えている。

1) Takeya *et al.*, ***Appl Microbiol Biotechnol*** **102**: 7017-7027 (2018).
2) Balasubramaian *et al.* ***Nature*** **465**: 115-119 (2010).

Pichia pastoris, methanol, protein production

発表責任者：阪井康能（ysakai@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3D8a08
講演日時：3 月 26 日 10:27～ 1 号館 D8 会場

光合成をモチーフとした高出力バイオ太陽電池の構築
High-power bio-solar cell designed from photosynthesis

○足立 大宜[1]、北隅 優希[1]、白井 理[1]、片岡 邦重[2]、加納 健司[1]（[1]京大院農、[2]金沢大理工）
○Taiki ADACHI[1], Yuki KITAZUMI[1], Osamu SHIRAI[1], Kunishige KATAOKA[2], Kenji KANO[1]
([1]Kyoto Univ. of Agric., [2]Kanazawa Univ. of Sci.)

【目的】

持続可能な社会の実現に向けて，環境に優しいエネルギーを活用する技術の開発が必要とされている．なかでも，光エネルギーを電気エネルギーへと変換する太陽電池は，期待されているデバイスの一つである．しかし，現在最も主流であるシリコン系太陽電池は，材料となる半導体のコストが高く，より安価に入手できる素材の開発は必須である．近年，安価な光エネルギー捕捉材料として，天然の太陽電池ともいえる葉緑体中に含まれるチラコイド膜が注目を集めている．また，我々はそれに加え，穏和条件下で高い触媒能・選択性を持つ触媒である酵素にも着目している．チラコイド膜や酵素における酸化還元反応は，低分子酸化還元物質（メディエータ）を仲介させて，あるいはメディエータなしで直接的に，電極反応と共役できる．本研究では，チラコイド膜を固定した陽極における水の酸化と，高い酸素還元活性を有するビリルビンオキシダーゼ（BOD）を固定した陰極における酸素の還元に伴い，犠牲試薬を必要とせずに光から電力を生み出すバイオ太陽電池の構築を目指した．

【方法】

陽極は，光透過性の高い ITO 電極上に金の薄膜を真空蒸着させ，その表面にホウレンソウから単離精製したチラコイド膜とナノ炭素材料である多層カーボンナノチューブ（MWCNT）の混合液を滴下・乾燥させて作製した．陰極は，多孔質炭素材料であるケッチェンブラック（KB）とフッ素樹脂を混合して電極基盤を作製し，その表面に BOD を吸着させて酵素機能電極を作製した．陽極の背面から光量子束密度 200 μmol m^{-2} s^{-1} 以上の光を照射し，25 °C，大気雰囲気下で電気化学測定を行った．

【結果と考察】

陽極におけるメディエータとして 1,2-naphthoquinone（NQ）を反応液に加えたとき，光照射中にチラコイド膜による水の酸化触媒電流密度の上昇を確認した．NQ がメディエータとして機能した理由は，NQ がチラコイド膜から電子を受容するのに必要な電位差と，チラコイド膜に侵入するための適度な疎水性を有していたためだと考えられる．本研究で作製したバイオ太陽電池の出力密度は 20 μW cm^{-2} を上回り，開回路電圧は約 0.6 V であった．この出力密度は既報のバイオ太陽電池の中で最大であり，持続可能な社会の実現への大きな突破口となる．

bio-solar cell, thylakoid membrane, bilirubin oxidase

発表責任者：加納　健司（kano.kenji.5z@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3D8a09
講演日時：3 月 26 日 10:38～ 1 号館 D8 会場

電極周辺土壌への鉄粉散布による水田発電の出力上昇

Improved power generation in rice-paddy microbial fuel cells by the supplementation of anode soil with iron powder

○猪鼻 淑乃、上岡 永佳、名古屋 美紗、松元 陽歩、高妻 篤史、渡邉 一哉（東薬大生命）
○ Yoshino INOHANA, Nagayoshi UEOKA, Misa NAGOYA, Akiho MATSUMOTO, Atsushi KOUZUMA, Kazuya WATANABE (Tokyo Univ. of Pharm. Life sci.)

近年、有機物を酸化分解した際に発生する電子を電極等の細胞外電子受容体に放出することにより生育する微生物が発見され、注目を集めている。このような微生物は「発電菌」と呼ばれ、下水や生ゴミ等を処理しながら発電する微生物燃料電池（Microbial fuel cell, MFC）における応用が期待されている。発電菌は、土壌や湖沼堆積物など我々の身近な環境に生息しており、幾つかの菌株がそれら環境から単離されている。我々は環境中に存在する発電菌を利用すれば水田でも発電できると考え、“水田発電”の研究をおこなってきた。水田においてイネは、光合成により有機物を合成し、その一部を根から根圏土壌中に放出する。そこで田んぼ発電においては、イネの根圏にアノード電極を埋め、水面にカソード電極を設置する。これにより、イネが根圏に放出した有機物を発電菌が分解して発生する電子をアノード電極で回収して電流を発生させることができ、イネと土壌微生物が関与する自然の営みを利用した発電といえる。稲の光合成に伴い発電が促進されるため、昼間に出力が上昇し、夜間に出力が低下する。今までの研究において、電極の素材や面積の最適化など、装置の改善がおこなわれてきた。これにより出力が上昇し、近年の我々の研究では 140 $mW \cdot m^{-2}$（アノード面積当たり）の最大出力密度が報告されている（Ueoka et al. 2016. *J. Sus. Biol. Syst.* 6, 10-15）。

本研究では、更なる出力の上昇を目指し、発電菌とアノード電極間の電子伝達を高効率化する可能性のある導電性微粒子（カーボンブラック、鉄粉）の根圏土壌への添加を試みた。それぞれをアノード電極の周囲に散布し、コントロールとして何も散布していない土壌を用いて発電実験をおこなった。4 月の田植えから 8 月末の稲刈までの期間、アノードとカソード間に設置した抵抗の両端の電圧を常時モニタリングするとともに、月に数回程度ポテンショスタットを用いて分極解析を行った。その結果、鉄粉を塗布した電極で最も高い出力を示し、最大出力密度は約 400 $mW \cdot m^{-2}$ に達した。一方、カーボンブラックを塗布した電極は、実験開始から 1 ヶ月後の解析ではコントロールの 2 倍以上の出力であったが、その後出力は伸びず、コントロールと同程度の出力（約 120 $mW \cdot m^{-2}$）に留まった。また、電圧のモニタリングの結果、すべての電池において昼夜における電圧の変動が確認された。これらの結果は、アノード電極に鉄粉を塗布することで根圏土壌中の発電菌が活性化され、出力が上昇したことを示すものと考えられた。現在、鉄粉の根圏微生物への影響を明らかにすることを目的に、アノード電極に付着した細菌および電極周辺土壌中の細菌の菌叢解析を行っている。

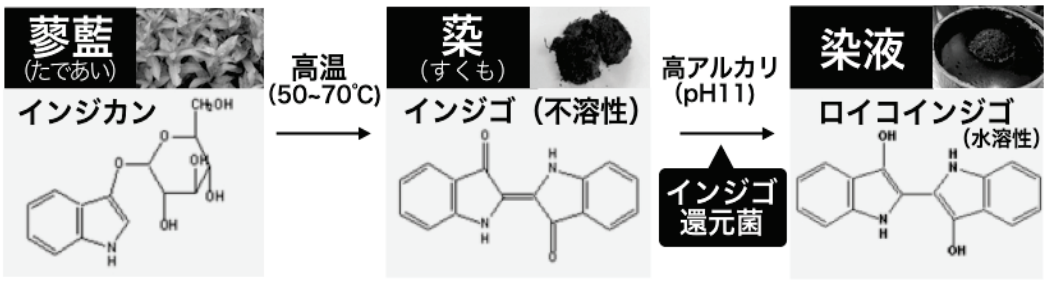
rice paddy-field MFC, iron powder, carbon black

講演番号：3D8a10
講演日時：3 月 26 日 10:49～ 1 号館 D8 会場

藍染液中の電子伝達に関わる微生物・反応促進物質の探索
Screening of microorganisms and reaction-promoting compounds related to electron transport in indigo dye liquor

○中川 香澄[1]、多田 真奈巳[1]、西林 菜華[2]、阪本 鷹行[2]、清藤 鈴奈[3]、竹内 道樹[3]、加納 健司[3]、小川 順[3]、櫻谷 英治[2] ([1]徳島大院・先端技術、[2]徳島大・生物資源、[3]京大院農・応用生命)
○Kasumi NAKAGAWA[1], Manami TADA[1], Nanoha NISHIBAYASHI[2], Takaiku SAKAMOTO[2], Suzuna KIYOHUJI[3], Michiki TAKEUCHI[3], Kenji KANOU[3], Jun OGAWA[3], Eiji SAKURADANI[2] ([1]Fac. Eng., Tokushima Univ., [2]Fac. Sci. Technol., Tokushima Univ., [3]Grad. Sch. Agri., Kyoto Univ.)

【背景・目的】
持続可能なエネルギー社会の実現のため、微生物燃料電池（Microbial Fuel Cells, MFC）が注目されている。これまで多くの MFC が開発されてきたが、取得電力が低いため実用化には至っていない。アルカリ性の電解質を用いることで取得電力の向上が見込まれるが、既に報告のある電子伝達微生物はアルカリ条件での培養が困難である。そこで、アルカリ性の電子伝達微生物を探索するため、徳島県の伝統工芸である藍染に着目した。藍染はアルカリ条件下で、微生物の作用によって不溶性のインジゴを水溶性のロイコインジゴへと還元することで染色が可能となる技法である。本研究では、作成した染液中からインジゴ還元に関わる微生物及び還元作用を促進する物質を探索することを目的とした。



【方法・結果】
45L 容量の密閉式ポリバケツで藍染液を作成した。染液中にカーボンフェルト電極を設置し、電圧を測定したところ、初日は 0.2V であったが、翌日以降は 0.4V となった。電極に集まった微生物を電子伝達微生物とし、アルカリ性培地から単離した。また、染液中にどのような微生物が分布しているか明らかにするため、染液の水表面から 1 cm 以内から取ったものを上層部、染液をよくかき混ぜてから取ったものを下層部とし、アルカリ・好気条件または嫌気条件にて単離を行った。単離株の 16S rDNA 解析を行い、それぞれの菌の簡易同定を試みた。また、単離した株をインジゴ還元評価培地で 2 日間培養し、600 nm における吸光度を測定することでインジゴ還元力を評価した。さらに、日本酒を 1 週間に 1 度添加することにより、藍染液の状態が維持される。そこで、エタノールを添加したインジゴ還元評価培地を用いて還元力を評価し、コントロールに比べてインジゴ還元力が高くなる株を見出した。

indigo, Microbial Fuel Cells, alkaline conditions

講演番号：3D8a11
講演日時：3 月 26 日 11:10～ 1 号館 D8 会場

高性能バイオカソード構築のための耐熱性酵素の配向固定及び過酸化水素発生量に基づく配向性の確認

Oriented immobilization of thermostable enzyme and confirmation of orientationally of the enzyme based on the amount of hydrogen peroxide for construction of high performance biocathode

○多喜 俊介[1]、中村 卓登[1]、高村 映一郎[2]、坂元 博昭[1,4]、里村 武範[3,4]、櫻庭 春彦[5]、大島 敏久[6]、末 信一朗[1,3,4] ([1]福井大学院・工・繊維、[2]福井大学院・工・総合、[3]福井大学院・工・生物応用化、[4]福井大学・生命セ、[5]香川大農、[6]大阪工大)

○Shunsuke TAKI[1], Takuto NAKAMURA[1], Eiichiro TAKAMURA[2], Hiroaki SAKAMOTO[1,4], Takenori SATOMURA[3,4], Haruhiko SAKURABA[5], Toshihisa OHSHIMA[6], Shin-ichiro SUYE[1,3,4] ([1]Dept. Front. Fib., Grand. Sch. Eng., Univ. Fukui, [2]Dept. Adv. Interdiscip. Sci. Technol., Grad. Sch. Eng., Univ. Fukui, [3]Dept. Appl. Chem. Biotechnol., Grand. Sch. Eng., Univ. Fukui, [4]Res. Edu. Prog. Life Sci., Univ. Fukui, [5]Kagawa Univ., [6]Osaka Inst. Tech)

[緒言]

近年、資源の枯渇や地球温暖化の問題から、クリーンな次世代エネルギーが求められており、その一つとしてバイオ電池（Biofuel cell:BFC）が注目されている。BFC は生物が利用する物質を燃料とする燃料電池であり、温和な条件での作動が可能、小型化が容易といった利点を持ち、幅広い応用が期待されているが、酵素の安定性や電池の出力の低さなどの問題から実用化には至っていない。

現在、BFC のカソード用酵素としてマルチ銅オキシダーゼ（MCO）がよく用いられている。MCO は補因子として 4 つの銅イオンをもち、それぞれタイプ 1 (T1)、タイプ 2 (T2)、そして 2 つのタイプ 3 (T3)に分類される。T1 銅部位では電子授受が、T2/T3 銅部位では基質との触媒反応が行われ、酸素を 4 電子還元し 2 分子の水を生成する。MCO は分子内に酸化還元部位と触媒反応部位をそれぞれ有しており、触媒活性部位である T2/T3 銅部位が T1 銅部位より電極近傍に位置するとき、酸化還元反応中間体の過酸化水素を生成する。過酸化水素は 2 電子還元で生成されるため、電流密度の低下を招く。そこで本研究では、異なる配向で固定化された超高熱性アーキア *Pyrobaculum aerophilum* 由来 MCO(McoP)修飾電極の電気化学反応によって生成される過酸化水素を定量することで、固定化された McoP の配向を検討し、長寿命かつ高出力なバイオカソードの構築を目的とした。

[方法]

多層カーボンナノチューブ(MWCNT)を固定したガラス状炭素電極上で N-(5-Amino-1-carboxypentyl) iminodiacetic acid (AB-NTA)に Ni イオンを配位させ、遺伝子工学的に His-tag を N 末端及び C 末端に導入した McoP N-His、McoP C-His をヒスチジンと Ni のアフィニティ結合を利用して配向的に固定した。クロノアンペロメトリーによって電気化学反応を行い、過酸化水素の生成量を比較した。

[結果]

McoP N-His 修飾電極では 60.8 μM、McoP C-His 修飾電極では 26.4 μM の過酸化水素が生成された。また、サイクリックボルタンメトリーにより測定した結果、0 V(vs. Ag/AgCl)における電流密度は、McoP N-His および C-His 修飾電極では、それぞれ-294 μA/cm^2、-368 μA/cm^2 であった。これらの結果から、McoP N-His 修飾電極は T2/T3 銅部位が電極近傍に位置していることで過酸化水素が比較的多く生成し、電流密度が低下したと考えられる。したがって、高出力なカソード構築のために McoP C-His 修飾電極の有用性が示された。

biofuel cell, multicopper oxidase, orientation

講演番号：3D8a12
講演日時：3 月 26 日 11:21～ 1 号館 D8 会場

酵素分子の配向性と位置制御を目指したペプチド融合酵素を用いたバイオ電池用カソードの構築
Construction of cathode for biofuel cell using a peptide fusion enzyme aiming at orientation and positional control of enzyme molecules

○二村 梨絵[1]、殿岡 愛菜[1]、坂元 博昭[1,2]、里村 武範[2,3]、櫻庭 春彦[4]、大島 敏久[5]、末 信一朗[1,2,3]
([1]福井大学院・工・繊維、[2]福井大学・ 生命セ、[3]福井大学院・工・生物応用化、[4]香川大農、[5]大阪工大)
○ Rie FUTAMURA[1], Aina TONOOKA[1], Hiroaki SAKAMOTO[1,2], Takenori SATOMURA[2,3], Haruhiko SAKURABA[4], Toshihisa OHSHIMA[5], Shin-ichiro SUYE[1,2,3] ([1]Dept. Front. Fib., Grand. Sch. Eng., Univ. Fukui, [2]Res. Edu. Prog. Life Sci., Univ. Fukui, [3]Dept. Appl. Chem. Biotechnol., Grand. Sch. Eng., Univ. Fukui, [4]Kagawa Univ., [5]Osaka Inst. Tech.)

[緒言]

バイオ電池は、酵素を電極の触媒として用いて電気エネルギーを発生させる装置である。燃料としてバイオマスを用いることから環境負荷が小さく、安全であるという特徴が挙げられるが、安定性や電池の出力が低いことが実用化への問題となっている。

これらの問題を解決するため、高い安定性を有する超好熱性アーキア *Pyrobaculum aerophilum* 由来のマルチ銅オキシダーゼ(Multi copper oxidase from *P. aerophilum*：McoP)を触媒として用いて、長寿命かつ高出力な電極を構築することを目標とした。高出力化のために、高い比表面積を有するカーボンナノ材料に McoP を配向固定し、酵素-電極間の高効率な電子伝達を達成するための電極界面を設計した。カーボンナノ材料の中でも特に高い比表面積を有するカーボンナノチューブ(carbon nanotubes ： CNT)に特異的に結合するペプチド(Carbon nanotube binding peptide: CBP(CBP 配列：LLADTTHHRPWT))に着目した。McoP 分子中の電子を受け取る部位であるタイプ 1 銅(T1Cu)は、C 末端付近に位置することから、McoP の C 末端に CBP を融合した McoP(McoP-CBP)を作製した。本研究では、CNT 上に McoP-CBP を配向固定した複合体を用いて電極を構築し、CBP がもたらす効果を明らかにした。

[方法]

McoP および McoP-CBP に単層カーボンナノチューブ (SWCNT) を加え、3 時間超音波処理を行い SWCNT 表面に酵素を修飾した。その後、未修飾の酵素を洗浄除去し McoP-SWCNT 複合体および(McoP-CBP)-SWCNT 複合体を得た。得られた各複合体をグラッシーカーボン電極 (GCE) 上に滴下,乾燥し、Nafion を滴下し、複合体修飾電極を作製した。サイクリックボルタンメトリー (CV) によって得られた電極の電気化学的性質を評価した。

[結果]

McoP-SWCNT および(McoP-CBP)-SWCNT 複合体上の固定化酵素量は、ほぼ等しかった。両複合体を修飾した電極について CV 測定を行った結果、GC/(McoP-CBP)-SWCNT 電極の触媒反応における電流密度は、GC/McoP-SWCNT 電極に対して 5.4 倍の値を示した。これは、CBP の融合によって酵素が SWCNT 上に配向的に固定化され、McoP における酸化還元部位である T1Cu が電極に近い位置関係となり、電子伝達効率が向上したためであると考えられる。

biofuel cell, orientated immobilization, carbon nanotube

講演番号：3D8a13
講演日時：3 月 26 日 11:32～ 1 号館 D8 会場

好熱菌由来脱水素酵素の多段階酸化反応を介した新規バイオ電池用アノードの開発

Development of a novel anode for biofuel cell via cascade reaction of thermophilic enzymes

○堀永 晃作[1]、高村 映一郎[1]、里村 武範[1,2]、櫻庭 春彦[3]、大島 敏久[4]、末 信一朗[1,2]（[1]福井大工、[2]福井大ライフ、[3]香川大農、[4]大阪工大工）

○ Kousaku HORINAGA[1], Eiichirou TAKAMURA[1], Hiroaki SAKAMOTO[1,2], Haruhiko SAKURABA[3], Toshihisa OHSHIMA[4], Shin-ichiro SUYE[1,2] ([1]Univ. Fukui, [2]Life Univ. Fukui, [3]Kagawa Univ, [4]Osaka Inst. Tech)

[目的]

バイオ電池は、酸化還元酵素を素子として基質である糖やアルコールなどが持つ化学エネルギーを電気エネルギーに変換するデバイスである。バイオ電池は安全であり、小型化、軽量化が可能といったメリットがある。しかしながら酵素の安定性や活性の低さに起因する電池の耐久性や低出力の克服が課題となっている。我々の研究グループでは、高い安定性を有する超好熱性アーキア由来色素依存性 L-プロリン脱水素酵素（Ape-LPDH）を用いることで高い耐久性を示す L-プロリンを燃料とするバイオ電池用バイオアノードの構築に成功した[1]。しかしながら、構築したアノードでは十分な出力を得ることができなかった。そこで本研究では、Ape-LPDH と複数の好熱菌由来酸化還元酵素を組み合わせて多段階酸化反応を行うことで本アノードの低出力の課題の解決を目的として研究を行った。

[実験・結果]

L-プロリンの多段階酸化反応を行うバイオ電池用アノードを構築するために、Ape-LPDH、ピロリン-5-カルボン酸脱水素酵素、グルタミン酸脱水素酵素、NADH 脱水素酵素の 4 種類の好熱菌由来酸化還元酵素をナフィオン溶液に混合し、グラッシーカーボン電極上に固定化した。フェロセンカルボン酸を酵素-電極間のメディエータとして用いてサイクリックボルタンメトリー測定を行い、4 酵素の多段階酸化反応の電気化学的評価を行った。その結果、各段階における酸化反応が進むにつれて酸化ピークの電流の増大が確認された。また、本修飾電極をアノードとしたバイオ電池を構築し、電池出力の評価を行ったところ、多段階酸化反応が進むにつれて出力の増加が認められた。これらの結果より、4 種類の酵素を固定化したアノードを構築することで電池出力を向上させることに成功した。

1. Tonooka, A., Komatsu, T., Tanaka, S. et al. Mol Biol Rep (2018) https://doi.org/10.1007/s11033-018-4328-z

biofuel cell, oxidoreductase, thermophile

講演番号：3D8a14
講演日時：3 月 26 日 11:43～ 1 号館 D8 会場

分子揺動性を考慮した耐熱性酵素の配向固定による高性能バイオアノードの構築
Construction of high performance bioanode by orientated immobilization of thermostable enzyme in consideration of molecular fluctuation

○鈴木 治人[1]、高村 映一郎[2]、坂元 博昭[1,3]、里村 武範[3,4]、櫻庭 春彦[5]、大島 敏久[6]、末 信一朗[1,3,4]([1]福井大学院・工・繊維、[2]福井大学院・工・総合、[3]福井大学・生命セ、[4]福井大学・工・生物応用化、[5]香川大農、[6]大阪工大)
○Haruto SUZUKI[1], Eiichiro TAKAMURA[2], Hiroaki SAKAMOTO[1,3], Takenori SATOMURA[3,4], Haruhiko SAKURABA[5], Toshihisa OHSHIMA[6], Shin-ichiro SUYE[1,3,4] ([1]Dept. Front. Fib. Tech. Sci. Eng., Grad. Sch. Eng., Fukui Univ., [2]Dept. Syn., Grad. Sch. Eng., Fukui Univ., [3]Life Sci. Innov., Fukui Univ., [4]Dept. Appl. Chem. Biotech., Grad. Sch. Eng., Fukui Univ., [5]Kagawa Univ. Agric., [6]Osaka Inst. Technol.)

[緒言]
酵素を触媒とするバイオ電池は環境負荷が小さいなどの利点から、バイオマスの有用な利用法の一つとして注目されている。しかし、酵素の長期安定性や出力密度の問題から、実用化には至っていない。本研究室では、長期安定性を有する超高熱性アーキア *Aeropyrum pernix* 由来の L-プロリン脱水素酵素（LPDH）に着目してアノード電極を作製してきた。これまでに N 末端に His-tag を付加した酵素を用いて、酵素反応に伴う電子伝達が円滑となる様に配向固定することで無配向固定電極の 90 倍の電流密度を得ることに成功している。近年、構造自由度の高いポリエチレングリコールを導入し、電極上に固定化されたメディエーター分子は電極上で揺動するため、酵素の酸化還元部位に容易に到達することができ、得られる触媒電流値が増大することが報告された。そこで本研究では電極上での酵素の揺動性に着目し、メディエーターとして用いるフェロセンカルボン酸（Fc-COOH）を酵素と共に電極に固定化して酵素分子密度を変化させることで、酵素分子の配向及び揺動を制御したバイオアノードの構築を目的とした。
[方法]
1-メチル 2-ピロリドン（NMP）に分散させ MWCNT 溶液をグラッシーカーボン（GC）電極に滴下し、風乾させた。電極を 1-アミノピレン（Pyr-NH_2），1-ピレン酪酸スクシンイミドエステル（PBSE）混合液に浸漬し、洗浄後さらにカルボキシル基を活性化させた Fc-COOH 溶液に浸漬し、Fc-COOH を固定化した。その後、電極を AB-NTA, $NiCl_2$, LPDH 溶液の順に浸漬し、His-tag を介して LPDH を電極上に固定化した。作製した電極の評価は、3 電極方式にてサイクリックボルタンメトリー(CV)にて行った。
[結果]
LPDH 固定化電極の CV 測定を行ったところ、LPDH の分子間密度を制御していない電極では基質存在下でのメディエータであるフェロセンカルボン酸由来のピーク電流の増大は 17.0 μA/cm^2 であった。一方で His-tag を介して LPDH を配向固定し、スペーサーにより LPDH 間の分子密度を下げることで揺動性を向上させた電極では 22.8 μA/cm^2 の増大が確認された。His-tag を介して LPDH を配向固定化することで酵素の触媒活性部位が基質との反応に有利な位置に配位し、さらに酵素分子密度を制御することでペプチドタグを介して酵素が電極上で揺動し、基質との接触性が高まったためであると考えられる。

biofuel cell, hyperthermophilic archaeon, fluctuation

講演番号：3D8p01
講演日時：3 月 26 日 13:50～ 1 号館 D8 会場

生分解性 PBSA マルチフィルムを埋設した 2 種の畑土壌における真菌の推移と PBSA 分解真菌類の分離

Transition of fungal community and isolation of fungal degraders of poly(butylene succinate-co-adipate) (PBSA) films in two types of cultivated soil during incubation with PBSA

○山元 季実子、星野（高田） 裕子、山下（鮫島） 結香、坪井 隼、岸本 文紅、北本 宏子（農研機構・農環研）
○Kimiko YAMAMOTO-TAMURA, Yuko TAKADA-HOSHINO, Yuka SAMESHIMA-YAMASHITA, Shun TSUBOI, Wenhong KISHIMOTO-MO, Hiroko KITAMOTO (NIAES, NARO)

【背景と目的】
従来のポリエチレン製農業用マルチフィルムは、使用後回収し廃棄する必要がある。生分解性ポリエステル製マルチ（生プラマルチ）は、使用後に土壌中に鋤き込めば分解され、この分解には土壌微生物、特に真菌類の関与が大きいと考えられている。本研究では、生プラマルチ分解速度が異なる 2 種類の土壌について、室内実験において、生プラ埋設土壌における分解菌数の増減と、分離された真菌類の構成を比較した。
【方法】
土壌は、生プラ分解が速い低地土（岡山）と分解が遅い黒ボク土（茨城）を用い、水分は保温期間中、低地土で最大容水量の 50%、黒ボク土では 60%に維持した。生プラマルチのモデルとしてポリブチレンサクシネート-*co*-アジペート(PBSA)フィルム(20 μm 厚)を 1 cm 角に切断し、土壌 60 g（乾土相当）に対し 1 g の割合で埋設し、蓋付きシャーレに詰め、25°C で 3~6 か月間保温した。フィルムの分解量を推定するために、土壌から発生する CO_2 量を経時的に測定した。一方で、土壌 1 g 当たりの培養可能な全真菌数、および PBSA エマルジョン重層培地にクリアゾーンを生じる分解真菌数を計数した。PBSA エマルジョン分解菌は、5.8S rDNA-ITS 配列解析による分類群の簡易同定を行い、各分類群の代表菌株を選んで、寒天培地上で PBSA フィルムの分解の可否を調べた。
【結果】
10 週目以降、低地土ではフィルム形状を肉眼ではほとんど確認できなくなったが、黒ボク土では以降も残存した。このとき低地土に埋設したフィルムの理論分解率は 70%、黒ボク土では 5%であった。また低地土では全菌数・分解菌数ともに、3 週目前後をピークとして著しく菌数が増加した。黒ボク土では PBSA 埋設によるこのように明瞭な菌数増加は認められなかった。一方、PBSA 分解真菌は低地土・黒ボク土ともに PBSA 埋設の有無を問わずに分離された。低地土からは酵母の一種である *Papiliotrema* (= *Cryptococcus*)属菌が高頻度で分離された。*Papiliotrema* 属菌は黒ボク土からも分離されたが、分離率はより低く、分離株の主体は糸状菌に占められていた。他に共通する分類群として *Purpureocillium* 属菌がみられた。これら PBSA エマルジョン分解真菌の代表株のうち、*Mucor* 属菌を除く全ての株が寒天プレート上で PBSA フィルムを分解する能力を持っていた。

Andosol, biodegradable plastics, Fluvisol

発表責任者：山元　季実子（kimtam@affrc.go.jp）

講演番号：3D8p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ 1 号館 D8 会場

脂肪族ポリエステル類の淡水中での生分解

Biodegradation of aliphatic polyesters in fresh water

○中山 敦好、川崎 典起、山野 尚子（産総研）
○Atsuyoshi NAKAYAMA, Norioki KAWASAKI, Naoko YAMANO (AIST)

【目的】環境中に散逸したプラスチック類は河川等から海洋中に運ばれ、蓄積する。我々は以前、生合成系及び化学合成系脂肪族ポリエステル類の海水中での生分解について、採取場所の違いによる海水の生分解活性や海水生分解に影響する因子について報告した[1)]。本発表では、海水環境と対比させて、淡水環境中での生分解性樹脂の分解について検討したので報告する。

【方法】生分解性試験は琵琶湖及び大阪湾に流れ出る河川を対象に表層水を採取し、ﾎﾟﾘ(3-ﾋﾄﾞﾛｷｼﾌﾞﾁﾗｰﾄ)，（PHB）、ﾎﾟﾘ(e-ｶﾌﾟﾛﾗｸﾄﾝ)，（PCL）、ﾎﾟﾘｱﾐﾄﾞ 4，（PA4）の生分解性をラボにて行い、消費酸素量にて評価した。

【結果】採水は図に示すように、琵琶湖-淀川水系、初瀬川-大和川水系、猪名川-神崎川水系の各地点で行った。琵琶湖は北部の長浜郊外と南部の大津市街域で行い、湖水中の一般細菌数は大津の方が多かったが、各樹脂の生分解には大きな差異はなかった。しかしながら、琵琶湖の流れ出る淀川下流域では河川水の生分解活性は湖水よりも大きく、河口の大阪港（南港、海水）はさらに大きな生分解活性を示した。淀川と同じく国の一級河川である大和川では、中下流の汚染度は淀川より高く河川水の生分解活性は大阪港よりも高かった。しかしながら、上流の奈良県では一般細菌数も少なく、生分解も遅かった。淀川、大和川ほど大きな河川ではないが、汚濁度の高い川として知られる神崎川下流では今回対象とした地点の中ではもっとも高い生分解活性を示し、菌数もかなり多かった。このように河川水中の菌数は生分解活性に大きく関係することが分かった。ただし、河川水と海水との菌数をそのまま比較するのは適当ではないと考えられる。



biodegradation, marine degradation, polyester

発表責任者：中山敦好（a.nakayama@aist.go.jp）

講演番号：3D8p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ 1 号館 D8 会場

疎水性プラスチックを強く吸着する *Cladosporium* sp. TPet-1 株の分離とその諸性質
Isolation and characterization of *Cladosporium* sp. TPet-1 enabling to capture polyethylene powder
○小池 優、橋床 泰之（北海道大学院農）
○Yu KOIKE, Yasuyuki HASHIDOKO (Hokkaido Univ. of Agric.)

【背景・目的】 環境中に排出された廃プラスチックは紫外線や物理作用による破断を受けて微小顆粒，いわゆるマイクロプラスチックとして海洋や湖水，土壌に分散する。また，ポリエチレンパウダーのような人工的にマイクロビーズへと形成されたプラスチック粉末は，樹脂・ゴム・接着剤の改質剤，グリース・インキ・塗料の添加剤など工業的用途の他，洗顔剤のスクラブ成分や歯磨き粉の吸着樹脂などパーソナルケア商品にも幅広く利用されている。しかしながら，これらが廃水を通して環境中に放出されると，特に海洋生態系に大きな影響を及ぼし，生態系破壊要因になりうることが指摘され始めている。そのため，世界的にプラスチックの安易な廃棄やマイクロプラスチックを利用した製品の製造を禁止する動きがトレンドになりつつある。一方で，環境中に放出されてしまった大量のミクロプラスチックの回収や分解には多大なコストを要するため，そのようなマイクロプラスチック粒子を環境から選別し，分解除去できる真菌を探索することは非常に重要と考えられる。今回，冷ました煎茶を，同じ 1 L ペットボトルに継続的につぎ足して冷蔵庫で保存したところ，糸状菌様コロニーが突如多数発生するのを観察し，しかも全てがペットボトル内部壁面に強く付着していた。そこでこれを TPet-1 株として純粋分離し，疎水性プラスチック資材への強い付着性と分解能について調べてみた。
【方法・結果・考察】得られた真菌 TPet-1 株の ITS 領域塩基配列のホモロジー検索から，これを *Cladosporium* sp.と同定した。分離した *Cladosporium* sp. TPet-1 株を 0.5g/L ポリエチレンパウダー入り Winogradsky’s 液体培地（100 mL）中で振盪培養し，コレステロール分解真菌として北大構内土壌から分離した *Leptodontidium* sp. SCho-1 株およびイネ根圏から分離した *Trichoderma virens* PS1-7 株の挙動と比較した。それぞれの菌塊を実体顕微鏡で観察した結果，TPet-1 株は液体培地表面に浮かぶポリエチレン粒子を積極的に菌糸で捕捉し，菌塊内部と表面に大量の粒子を保持することが分かった。また，0.1 g/L コレステロール入り Winogradsky’s 液体培地で振盪培養したところ，*Leptodontidium* sp. SCho-1 株と同様，培地中で白濁するコレステロール微粒子を培養 3 日目でほぼ完全に除去した。*Cladosporium* sp. TPet-1 株が示すポリエチレンパウダー吸着メカニズムの解明とプラスチック分解能評価系の構築は，好気的有機物分解者としての有利性からも重要である。ポリエチレン分解能を持つ真菌の報告例は極めて少ないが，*Cladosporium* sp. TPet-1 株は煎茶のような比較的低栄養条件下，4℃ で十分生育することから，北海道のような寒冷地の土壌や湖水で効率良く機能する疎水性マイクロプラスチック除去分解微生物の指標になる可能性があると考えている。

Cladosporium sp., microplastics, biodegradation

講演番号：3D8p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ 1 号館 D8 会場

微生物群集解析による生分解性プラスチックの河川への影響

Effects of bacterial community in the river water by degradation of bioplastic

○門屋 亨介[1,2]、田中 尚人[2]、藤田 信之[2]、石井 大輔[2]、田口 精一[2]([1]東大院農・食の安全セ、[2]東農大生命)
○Ryosuke KADOYA[1,2], Naoto TANAKA[2], Nobuyuki FUJITA[2], Daisuke ISHII[2], Seiichi TAGUCHI[2]
([1]Tokyo Univ., [2]Tokyo Univ. of Agric.)

（**研究背景**）石油由来プラスチックが環境に及ぼす影響として、海洋中に流出した漁網やロープなどが海洋生物に絡みつくなどの物理的な現象に加え、袋などを誤飲・誤食することによる摂食障害が指摘されている。最近では、これらに加えて 5mm 以下のサイズのプラスチック片である「マイクロプラスチック」が問題視されている。マイクロプラスチックは研磨剤などに利用されており、廃棄後、海洋中に拡散し、有害物質を吸着・濃縮することが報告されている。これらの誤食と食物連鎖に伴い、有害物質の生体濃縮の原因となることが懸念されている。すでにアメリカやヨーロッパでは「石油由来マイクロプラスチック」の使用が禁止されている。日本でも自主的に規制が行われており、早急な対策が必要である。本研究では、これらの課題の解決に資するバイオプラスチックの生分解性の環境への安全性を微生物群衆の観点から測定した。

（**方法・結果**）生分解性プラスチックの実用化にあたり、その生分解が自然環境、特に水環境へ及ぼす影響が不明瞭な点が多い。本研究では水環境中細菌叢の変化を指標に生分解性プラスチックの分解が環境に及ぼす影響を観察した。河川水中のバイオプラスチックの分解度は重量変化や表面構造の変化を経時的に測定して評価した。また、分解に伴い変化する河川水中細菌叢は次世代高速シークエンサーを用いたメタ解析によって行った。特定の「清流」と「工業用水」の河川 4 ヶ所から水を採取し、生分解性プラスチック poly(3-hydroxybutyrate)[P(3HB)]のフィルムを 4 週間漬けた。P(3HB)の重量減少に伴い河川水中の微生物数は増加し、P(3HB)フィルム表面には微生物の付着が観察された。また、河川水中の細菌叢も P(3HB)分解前後で大きく変化していた。P(3HB)分解や細菌叢変化等で大腸菌種のような病原微生物の増加は見られなかったことから、生分解性プラスチック利用における環境・衛生安全面の検討における重要な知見となる。

biodegradable plastic, microbiome, Pathogenic microorganism

講演番号：3D8p05
講演日時：3 月 26 日 14:34～ 1 号館 D8 会場

生分解性プラスチックの河川微生物叢への影響
Effects of biodegradable plastic on river microbiome
○田中 尚人[1]、門屋 亨介[1,2]、石井 大輔[1]、藤田 信之[1]、田口 精一[1] ([1]東農大生命、[2]東大院食の安全セ)
○ Naoto TANAKA[1], Ryosuke KADOYA[1,2], Daisuke ISHII[1], Nobuyuki FUJITA[1], Seiichi TAGUCHI[1] ([1]Tokyo Univ. of Agric., [2]Tokyo Univ.)

（**目的**）生分解性プラスチックは微生物酵素により、無害な物質（自然的副産物）にまで分解される。ただし、実用化するには石油由来プラスチックと同等の強度等が必要であり、結果的にその分解速度は遅くなり、生産と分解のバランスの維持が難しくなることが考えられる。本研究では分解が律速になったときのモデルケースとして、閉鎖的環境で生分解性プラスチックを河川水に暴露してから分解が進行した時の微生物叢の変化および実際に分解活性を有する微生物の単離・同定を行い、生分解性プラスチックが環境に及ぼす微生物学的影響を明らかにすることを目的とした。
（**方法**）埼玉県内の 4 カ所の河川水を使用した。乾熱滅菌した試験管に 5mL の河川水を加え、生分解性プラスチックの一つである粉末状の poly-3-hydroxybutyrate [P(3HB)] を 0.1%相当添加、25˚C で 4 週間振とう培養した。P(3HB) 無添加で同条件にて培養したものを比較対象とした。培養後の合計 8 サンプルを MiSeq による菌叢解析（16S メタ解析）および P(3HB) 分解菌の分離に用いた。菌叢については統計的手法による多様性解析を行った。分離には 0.1% P(3HB) 含有 ×1/20 Marine 2216 培地 (Difco 社製) を用いた。サンプルを適宜希釈し、平板塗抹した後に 25˚C で培養し、ハロを形成したコロニーを純化した。分離株は 16S rDNA 配列による簡易同定を行った。
（**結果と考察**） 16S メタ解析の結果、P(3HB) を添加した河川水の菌叢は上位の分類階層で見ると *Betaproteobacteria* 綱と *Bacteroidetes* 門の割合が高くなり、前者は *Comamonadaceae* 科の割合が高いことが明らかとなった。この科は生分解性プラスチック分解菌の報告が多い系統群である。また、4 河川のうち 3 河川は P(3HB) 暴露により他の系統群を含めて極めて類似した菌叢を形成した。そして、多様性解析の結果から P(3HB) は菌叢への選択圧になっている傾向が見られた。一方、分解菌は 21 株が得られ、同定の結果、8 割は *Comamonadaceae* 科であった。*Bacteroidetes* 門の株は得られなかった。この系統群を分離するには培地を検討する余地があると考えられる。以上のことから、閉鎖的な環境では、P(3HB) はその分解活性を有する細菌が優位になることが明らかとなった。今後さらなる生態系への影響の検討は必要と考える。

biodegradable plastic, metagenomics, microbiome

講演番号：3D8p06
講演日時：3 月 26 日 14:55～ 1 号館 D8 会場

生分解性プラスチックナイロン 4 分解菌の探索
Screening of microorganisms for degradation of biodegradable plastic, nylon 4
○錦 はるか[1]、橘 弘一郎[2]、下飯 仁[1]、山田 美和[1]([1]岩手大・農、[2]理研・CSRS)
○Haruka NISHIKI[1], Koichiro TACHIBANA[2], Hitoshi SHIMOI[1], Miwa YAMADA[1] ([1]Iwate Univ., [2]RIKEN, CSRS)

【目的】
繰り返し構造内に炭素原子を 4 つ含むポリアミドであるナイロン 4 は、バイオマス由来のグルタミン酸から得られる 2-ピロリドンをモノマーとするため、バイオベースのポリマーであり、ナイロンの中で唯一生分解性が認められている。また、高い融点・耐久性を持つなど物理的性質も優れているため、現在注目されている素材である。しかし、ナイロン 4 の生分解機構の詳細は未だ明らかとなっていない。そこで、本研究では、ナイロン 4 生分解機構の解明や分解酵素の特定を目指して、自然界に存在するナイロン 4 分解菌を探索した。
【方法】
岩手大学敷地内 5 か所から土壌を採集し、ナイロン 4 粉末を主な栄養源とする集積用液体培地(ナイロン 4 培地)(pH 4、7、9)へ添加して試験管培養を行った。その中で、ナイロン 4 粉末の分解が見られた試験管内の菌液をナイロン 4 寒天培地(pH 4、7、9)へ植菌することで単菌分離を行った。さらに、寒天培地上でクリアゾーンを形成したコロニーを選抜し、選抜菌をナイロン 4 液体培地に植菌して、目視による観察でナイロン 4 分解能の評価を行った。分解能が高い菌株を選抜し、16S rRNA 配列の BLAST 検索を行うことで分解菌の属の推定を行った。続いて、選抜した菌が産生する分解酵素の最適 pH の検討を行った。分解活性は、培地上清を用いて、pH 5～8 の Tris-HCl バッファー条件下におけるナイロン 4 エマルションの分解を 600 nm の吸光度減少で測定した。最後に、培養 1 日ごとに回収した培地上清を用いて各 pH で活性測定を行い、分解酵素の産生量が最も高い培養日数を検討した。
【結果】
単菌分離した 282 株のナイロン 4 分解菌候補株のうち、ナイロン 4 粉末を含む寒天培地上でクリアゾーンを形成した菌株は、pH 4 で 13 株、pH 7 で 84 株、pH 9 で 53 株得られた。その中で分解能が高い pH 7 の 7 株を選抜した。これら 7 株の 16S rRNA 配列の解析と BLAST による相同性検索により、7 株のうち 3 株が *Mycoplana dimorpha*、2 株が *Arthrobacter* sp.、2 株が *Ensifer adhaerens* と推定された。推定されたこれらの菌株によるナイロン 4 分解の報告はこれまでにない。また、*Mycoplana dimorpha* が産生する分解酵素の最適 pH を、培地上清を用いて検討した結果、pH 6 または 7 で酵素活性が最大となった。さらに、同菌株の培地上清を用いた分解試験では培養開始から 2、3 日後にナイロン 4 分解活性が最も高く、分解酵素の分泌量が高いと示唆された。

Biodegradable plastic, Nylon4, Microbial degradation

講演番号：3D8p07
講演日時：3 月 26 日 15:06～ 1 号館 D8 会場

繊維強化プラスチック分解微生物の探索
Screening of microorganisms for degradation of fiber reinforced plastic
○門脇 美晴[1]、河合 盛進[2]、石原 真以[2]、鈴木 宏昭[2]、橘 弘一郎[3]、阿部 英喜[3]、下飯 仁[1]、山田 美和[1] ([1]岩手大院総合科学、[2]トヨタ紡織・基礎研、[3]理研・CSRS)
○ Miharu KADOWAKI[1], Sung-Jin KAWAI[2], Mai ISHIHARA[2], Hiroaki SUZUKI[2], Koichiro TACHIBANA[3], Hideki ABE[3], Hitoshi SHIMOI[1], Miwa YAMADA[1] ([1]Iwate Univ., [2]TOYOTA BOSHOKU, [3]RIKEN, CSRS)

【目的】
繊維強化プラスチック (Fiber Reinforced Plastic: FRP) である炭素繊維強化プラスチック (Carbon FRP: CFRP)およびガラス繊維強化プラスチック (Glass FRP: GFRP) は、軽量で強度が高いことから近年需要が増加している。しかし、FRP の廃棄処理については高温高圧の高エネルギーおよび有機溶剤が必須な方法が主流であるため、環境への影響が懸念されている。本研究では、環境負荷の低い微生物分解による FRP 分解処理方法の構築を目的とし、FRP 分解微生物の探索を行った。
【方法】
FRP または FRP を構成する樹脂としてよく利用されているポリアミド 66 (PA66) のフィルムを主要な炭素源とし添加した 5 mL 液体培地 (PA66CF20 培地、PA66GF35 培地、PA66 培地) を pH 4, 7, 9 に調整し準備した。これらの培地を用い、自然界の土壌をスクリーニング源として 30ºC で約 3~6 ヶ月間、集積培養を行った。その後、培養試験管から菌体の付着が確認できたフィルムを取り出し、あらかじめ重量を測定したフィルム入りの新たな培地に添加して、1 ヶ月間継代培養した。培養後フィルムを回収し菌体除去後、再び重量を測定した。フィルムの重量減少が確認された培養液から PA66 オリゴマー添加寒天培地を用いて単菌分離を行った。寒天培地でクリアゾーンを形成した菌株からゲノム抽出後、18S rDNA フラグメントを PCR 増幅して、DNA シークエンス解析を行い、塩基配列を決定した。
【結果・考察】
土壌からの集積および継代培養後、フィルム重量減少が確認された試験管は、PA66CF20 培地で 11 本 (pH 4: 6 本、pH 7: 1 本、pH 9: 4 本)、PA66GF35 培地で 19 本 (pH4: 10 本、pH7: 6 本、pH 9: 3 本)、PA66 培地で 15 本 (pH 4: 14 本、pH 7: 1 本)であった。同培養液を用いてフィルム重量変化を 2 回測定し、5 本 (PA66 pH 4: 3 本、pH 7: 1 本、PA66GF35 pH 4: 1 本)にしぼった。続いて PA66 オリゴマー寒天培地を用い、各試験管の培養液から単菌分離したところ、1 株でクリアゾーン形成が確認された。本分解候補菌の 18S rDNA 配列 (1,797 bp) を BLAST 検索に供した結果、*Aspergillus* 属と相同性が高かった。また、本菌を PA66CF20、PA66GF35、および PA66 培地で培養し、培養後のフィルム表面の SEM 観察および菌体除去後のフィルム重量測定を行った結果、フィルム表面に菌の付着が確認されたが、重量減少は確認されなかった。よって、本菌は PA66 オリゴマー分解酵素を産生している可能性があるが高分子量フィルムの分解は行えず、フィルム分解には複数の微生物が関わっていると示唆された。

Microbial degradation, Fiber Reinforced Plastic, Polyamide

発表責任者：山田美和（myamada@iwate-u.ac.jp）

講演番号：3D8p08
講演日時：3 月 26 日 15:17～ 1 号館 D8 会場

海洋性ポリ(ε-カプロラクトン) およびポリエチレンスクシネート分解細菌の特徴付け

Characterization of a marine poly(ε-caprolactone) and poly(ethylene succinate)-degrading bacterium

○鈴木 美和[1]、橘 熊野[2,3]、大場 皓平[2]、滝澤 玲香[2]、粕谷 健一[2,3] ([1]群馬大、[2]群馬大院理工、[3]群馬大食健康セ)

○Miwa SUZUKI[1], Yuya TACHIBANA[2,3], Kohei OBA[2], Reika TAKIZAWA[2], Ken-ichi KASUYA[2,3] ([1]Gunma Univ., [2]Gunma Univ. of Sci. and Tech., [3]Gunma Univ. Center of Food Sci. and Wellness)

【緒言】 プラスチック廃棄物による海洋環境汚染問題の解決策として，生分解性プラスチックが注目されている。化学合成生分解性プラスチックの海洋分解性は，そのプラスチックの構造により異なる。ポリ（ε-カプロラクトン）（PCL）は，海洋中で優れた生分解性を示す。一方で，ポリ（エチレンスクシネート）（PESu）の海洋環境中での生分解速度は極めて低い。この PCL と PESu の海洋分解性の差が生じる原因を考察するために，本研究では，海洋性 PCL および PESu 分解菌のスクリーニングおよび特徴付けを行った。

【結果】 千葉県館山市の沖ノ島公園の沿岸海水に廃棄されていた PET ボトル表面のバイオフィルムを微生物接種源とした。PCL および PESu 含有培地上でのクリアゾーン形成能により，PCL および PESu 分解菌 TKCM64 株を単離した。16S rDNA 塩基配列に基づく遺伝系統学的解析の結果，本株は，*Pseudomonas* 属の細菌であることが示された。本株は，PCL を $1.39 \pm 0.09\ \mathrm{mg \cdot cm^{-2} \cdot day^{-1}}$ の速度で分解した。一方，本株は PESu を，PCL 分解速度の 1/50 の速度でしか分解できなかった。各種炭素源存在下での菌体増殖レベルと，その培養上清の PCL および PESu 分解活性との関係を調べたところ，本株は，PCL，PCL 加水分解物(6-ヒドロキシヘキサン酸)および主要なクチン構成物(16-ヒドロキシヘキサドデカン酸)の存在下で，菌体増殖と PCL 加水分解酵素の生産誘導が見られた。一方，PESu および PESu 構成物であるエチレングリコール存在下では菌体増殖および PCL 分解活性が見られなかった。また，各培養上清の PESu 分解活性は，PCL 分解活性と比較して極めて小さかった。

【考察】 陸性の PCL 分解菌において，PCL 加水分解酵素（クチナーゼ）は，PCL オリゴマーが，クチナーゼの天然の誘導物質（クチン加水分解物）とその構造が類似しているため，PCL 加水分解物によって誘導される。本株においても，PCL 加水分解物は，クチンオリゴマーのアナログであり，クチナーゼの一種である PCL 加水分解酵素の誘導物質として機能することが示唆された。一方，PESu やその構成物であるエチレングリコールは，本株に対するポリエステル加水分解酵素の生産誘導物質にはなり得なかった。加えて，エチレングリコールは，本株の増殖を阻害した。また，各培養上清の PESu 分解活性と PCL 分解活性に差があることから，本株が生産するポリエステル分解酵素は，PCL に対する基質特異性が高く，他方 PESu に対しては低いことが示唆された。これらのことが，PCL と PESu の海洋分解性の差が生じる原因と考えられる。

Biodegradable plastic, marine environment, poly(ε-caprolactone)

講演番号：3D8p09
講演日時：3 月 26 日 15:28～ 1 号館 D8 会場

中温性細菌が生産する芳香族-脂肪族ポリエステル分解酵素の特性解析

Characterization of a aromatic-aliphatic polyester hydrolase from a mesophilic bacterium

○芝田 友香[1]、室井 文篤[1]、橘 熊野[1,2]、スレーントーン プウビライ[1]、山本 桐子[1]、水野 司[1]、櫻井 喬典[1]、小林 由紀子[1]、粕谷 健一[1,2] ([1]群馬大院理工、[2]群馬大食健康セ)
○ Yuka SHIBATA[1], Fumihiro MUROI[1], Yuya TACHIBANA[1,2], Phouvilay SOULENTHONE[1], Kiriko YAMAMOTO[1], Tsukasa MIZUNO[1], Takanori SAKURAI[1], Yukiko KOBAYASHI[1], Ken-ichi KASUYA[1,2] ([1]Gunma Univ, of Sci. and Tech., [2]Gunma Univ Ctr, of Food Sci. and Wellness)

【目的】

Poly(butylene adipate-*co*-terephthalate) (PBAT)は，優れた熱的・機械特性を有する生分解性脂肪族-芳香族ポリエステルである。PBAT は，主に生分解性農業用マルチフィルムの原料として利用されている。現在までに，コンポスト中における PBAT の生分解動態が調べられ，高温環境下で PBAT の分解に関与する微生物や酵素が特徴付けられた。一方，実際にマルチフィルムが利用される好気中温条件下において，PBAT 分解に関与する中温性細菌や酵素についての詳細な報告例は少ない。そこで，本研究は自然環境中における PBAT 分解機構を解明するために，土壌から単離した中温性 *Bacillus* 属細菌が生産する PBAT 分解酵素のクローニングおよび特性解析を行った。

【実験】

中温性 PBAT 分解細菌である *Bacillus pumilus* NKCM3201 株由来 PBAT 加水分解酵素(PBATH$_{Bp}$)の遺伝子をクローニングし，アミノ酸配列解析を行った。*Brevibacillus* 発現系を用いて得た PBATH$_{Bp}$ 発現組み換え株から過剰発現された酵素を精製した。特性解析では，PBATH$_{Bp}$ の基質特異性評価，温度安定性評価，pH 安定性評価，および各種のポリエステルフィルムの酵素分解試験，変異酵素の活性測定，及び速度論解析を行った。

【結果】

アミノ酸配列解析に基づき，PBATH$_{Bp}$ は *B. subtilis* lipase (LipA)と 81%の相同性があることがわかった。また，本酵素の活性は温度条件 4～40 ˚C，及び pH 条件 5.0～10.5 の範囲で静置した後も安定であった。本酵素の温度感受性は，他の中温性微生物が生産する酵素の特徴に類似していた。走査型顕微鏡を用いた形態観察より，酵素分解試験後のフィルム表面には亀裂が生じることがわかった。加えて，PBAT フィルムの分子量測定を行ったところ，分解前後において分子量に差が見られなかった。これらの結果から，本酵素によるポリエステルフィルムの重量減少は，表面分解によることが示された。また，点変異体より本酵素の触媒三残基は S77, D133, H156 であることが示された。このことから，本酵素はセリン加水分解酵素スーパーファミリーに属することが明らかとなった。*p* -nitrophenyl ester を基質とした速度論解析から，基質の炭素鎖が長鎖になるほど，酵素との親和性が低くなるため，分解活性が低下することが明らかとなった。

Biodegradable plastic, Poly(butylene adipate-co-terephthalate), Aromatic-aliphatic polyester

講演番号：3D8p10
講演日時：3 月 26 日 15:39～ 1 号館 D8 会場

環境浄化を目指した植物における亜テルル酸特異的還元系の解明

Analysis of tellurite reduction system in plants

○渡部 翔太[1]、田中 里奈[2]、新 晶帆[2]、中條 滉叡[2]、武田 徹[1,2]（[1]近畿大院農、[2]近畿大農）
○Shota Watabe[1], Rina Tanaka[2], Akiho Atarashi[2], Hiroaki Chujo[2], Toru Takeda[1,2] ([1]Kindai Univ. Graduate School of Agric., [2]Kindai Univ. of Agric.)

【目的】第 16 族元素のひとつであるテルル（Te）は、太陽光発電セルや CD-RW など様々な産業製品に欠かせないレアメタルのひとつであり、病原体の特定などといった工業以外の分野においても需要が高まっている。それに伴い、環境中に排出される水溶性のテルル酸および亜テルル酸に起因する新たな環境汚染問題が懸念されている。テルル酸（Te[VI]）および亜テルル酸（Te[IV]）はいずれも高い毒性を有し、多くの生物種に対して重篤な障害をもたらす。それゆえ、生物による Te の安全かつ効率的な回収・リサイクル技術が注目され始めている。このような状況下、微生物による Te 回収技術が最近報告されたが、植物を用いた例はほとんどない。植物において、Te は硫黄と同族であることから、Te[VI]は根の硫酸トランスポーターにより取り込まれ硫黄同化経路で代謝されると考えられるが、その詳細は明らかになっていない。そこでテルルと同族のセレンを蓄積する植物で Te を吸収することが判明している単子葉植物のソルガムにおける、Te[IV]のテルル元素への還元系について検討した。
【方法・結果】ソルガム種子は液肥を十分に含んだバーミキュライトに播種し、人工気象室（明期 14 時間（240 μmol/m^2/s ：24°C）／暗期 10 時間（20°C））で 7 日間栽培後、50%ムラシゲ・スクーグ混合塩類を含む水耕液に移植し、さらに 7 日間栽培した。Te 添加群は、水耕液に移植の際、5～100 μM Te[IV]あるいは Te[VI]を添加して栽培した。すべての Te 添加群の根において、Te[IV]および Te[VI]の取り込みが濃度依存的に認められ、地上部では同様の Te[IV]および Te[VI]取り込みが認められたが、取り込み量は根より低かった。生育に及ぼす影響を地上部および根の長さと乾燥重量でそれぞれ評価した。その結果、20 μM 添加群で地上部および根ともに生育に影響を受けはじめ、100 μM 添加群ではいずれも顕著な生育阻害が認められた。亜硫酸還元系での Te[IV]還元活性を調べたところ、コントロールおよび Te 添加群の地上部および根のいずれにおいても活性は認められなかった。一方、NADH を電子供与体とする Te[IV]還元活性はコントロールおよび Te 添加群の地上部および根から検出された。地上部および根の Te[IV]還元活性は、高濃度 Te 添加群において有意に増加していた。Te[IV]還元活性を Native PAGE 後の活性染色法により評価したところ、地上部では最低 5 種類、根では 3 種類の Te[IV]還元酵素が存在することが判明した。また、その一部がグルタチオンレダクターゼやカタラーゼと一致していたため、Te[IV]還元酵素の一部はグルタチオンレダクターゼやカタラーゼと同一であることが推測された。現在、Te[IV]還元活性を有するその他のタンパク質の同定および機能解析を試みている。

tellurite reduction, *Sorghum bicolor*, Phytoremediation

発表責任者：武田徹（t_takeda@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：3D8p11
講演日時：3 月 26 日 16:00～ 1 号館 D8 会場

Pseudomonas stutzeri NT-I による水相のテルルの効率的揮発化
Efficient biovolatilization of tellurium from water phase by *Pseudomonas stutzeri* NT-I
○黒田 真史、畠中 玄彦、末神 悠人、井上 大介、池 道彦（阪大院工）
○Masashi KURODA, Haruhiko HATANAKA, Yuto SUEGAMI, Daisuke INOUE, Michihiko IKE (Osaka Univ.)

【背景・目的】原子番号 52 の元素であるテルル(Te)は、太陽電池等に用いられる半導体の原料となるレアメタルであり、近年の需要の高まりから将来的な資源枯渇が懸念されている。一方、Te の水相での主な形態である亜テルル酸（Te(IV)）は毒性が高く、産業における Te の利用の進展に伴って水環境汚染が発生することが危惧されている。本研究では、水相からの Te の除去と回収を同時に達成しうるバイオプロセスを構築することを目指して、これまでの研究でテルルの揮発化活性を持つことが明らかになった細菌 *Pseudomonas stutzeri* NT-I の培養条件の最適化を行い、効率的な Te 揮発化を達成することを目的とした。
【結果・考察】1 L 容ジャーファーメンターに 0.1 mM の Te（IV)を含む TSB 培地 600 mL を添加し、好気条件で培養した。培養各時点での水相および固相の Te 濃度を測定し、初期に添加した Te 量との差から揮発化分を見積もった。Te の揮発化に及ぼす培養条件の影響を検討したところ、温度は揮発化に大きく影響し、20～45℃の範囲では 20℃が最も効率的であることが明らかとなった。また、pH については 6～9 の範囲で大きな影響はなく、通気量については 0.5 L/min の時に最も高い Te 揮発化率を示した。続いて、上記検討によって見出した最適条件である 20℃、pH7、通気量 0.5 L/min で培養を行ったところ、Te は高速で水相から除去され、24 時間の培養により初期に添加した Te の 83%が揮発化した。これまでに報告されている Te 揮発化微生物は、最も優れたものでも初期添加量の数%が揮発するのみであることから、最適条件で培養した NT-I 株による Te 揮発化は極めて優れたものであると言える。
謝辞：発酵研究所大型研究助成（L-2018-3-005)、科研費若手研究（18K14373）

tellurium, biovolatilization, Pseudomonas stutzeri

発表責任者：黒田真史（kuroda@see.eng.osaka-u.ac.jp）

講演番号：3D8p12
講演日時：3 月 26 日 16:11～ 1 号館 D8 会場

重金属の分離回収を目的とした微生物と線虫によるバイオプロセスの構築

Construction of bioprocess with microorganisms and Nematodes for separation and recovery of heavy metals

岡野 凌一[1]、濱野 樹[2]、倉橋 健介[3]、吉原 静恵[2]、○徳本 勇人[2] ([1]阪府大院・工、[2]阪府大院・理、[3]阪府大高専)

Ryoichi OKANO[1], Itsuki HAMANO[2], Kensuke KURAHASHI[3], Shizue YOSHIHARA[2], ○Hayato TOKUMOTO[2] ([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Pref. Univ., [2]Grad. Sch. Sci., Osaka Pref. Univ., [3]Osaka Pref. Univ. Coll. Technol.)

【背景・目的】重金属吸収能に優れた植物を用いるファイトレメディエーションは、低濃度の汚染地域を対象とした広範囲な除染に適している。しかし、植物体あたりの回収率が低いために、重金属を吸収した大量の植物バイオマスが廃棄物として発生する。そこで、この植物バイオマスを微生物によって分解し、増殖した微生物が重金属を吸着・吸収し、この微生物を線虫による捕食で回収することができれば、生物濃縮を利用したバイオレメディエーション技術の構築に繋がると考えた。本研究では、嫌気発酵汚泥に重金属を添加して培養し、植物バイオマスの分解挙動、微生物への重金属移行量を解析するとともに、汚泥の構成菌叢をメタゲノム解析した。さらに、嫌気発酵微生物を給餌した場合の線虫 *Caenorhabditis elegans* （*C. elegans*） N2 株の培養条件の最適化や、*C. elegans* による重金属回収試験および、種々の *C. elegans* 株による重金属回収率の比較、評価を実施した。
【方法・結果】除染対象の重金属にはカドミウム（Cd）を用いた。嫌気発酵汚泥を 40 v/v%、植物バイオマスとしてデンプンを 2 g/L、さらに Cd を任意の濃度でバイアル瓶に封入し、嫌気条件下において 37℃で静置培養を行った。培養期間中のバイオガス生成量および、そのときの発酵汚泥菌叢に Cd の有無による変化が見られなかったため、汚泥中の微生物が Cd 耐性を有し、植物バイオマスを良好に分解していることが分かった。続いて、汚泥中の微生物が吸収・吸着した重金属量を逐次抽出法により分画化し、ICP-MS を用いて分析した結果、投与した Cd のうち約 99%が微生物に吸収、もしくは強固に吸着されることが判明し、Cd は微生物に固定化されていることが分かった。次に、Cd を吸収吸着した微生物を *C. elegans* N2 株に給餌した場合に、線虫の増殖挙動を確認できたことから、線虫も Cd 耐性を有することが明らかになった。そこで、線虫に給餌する汚泥培養液量および、初期線虫数を変化させ、各条件における線虫数を計数することで、線虫の培養条件を最適化した。さらに、Cd が移行した汚泥中の微生物を餌として線虫を培養し、線虫が吸収した Cd 量を測定した。その結果、微生物に移行した Cd のうち 9%を線虫により回収できたが、線虫が体内に取り込んだ Cd の多くが、フンと共に体外に排出されている可能性が示唆された。今後は、処理回数を増加させることで Cd 回収率の向上を目指す。最後に、種々の *C. elegans* 株を用いて本プロセスに最適な線虫の探索を行なった。N2 株の他に、集団行動を示す CB4932 株、体躯が大きくなる変異体 MT1073 egl-4 株を用いて Cd を回収したところ、株により回収率が異なる結果が得られた。そのため、対象とする重金属やプロセスに応じて使用する線虫を選別することで、プロセスの高効率化が達成できると考えられる。

Nematodes, Heavy metal pollution, Bioremediation

発表責任者：徳本勇人（tokumoto@b.s.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：3D8p13
講演日時：3 月 26 日 16:22～ 1 号館 D8 会場

線虫による白金還元細菌の細胞破砕と回収プロセスの構築
Construction of cell disruption and recovery process of platinum reducing bacteria by Nematodes
○濵野 樹[1]、倉橋 健介[2]、吉原 静恵[3]、齊藤 丈靖[4]、徳本 勇人[3]([1]阪府大・生命環境、[2]阪府大高専、[3]阪府大院・理、[4]阪府大院・工)
○ Itsuki HAMANO[1], Kensuke Kurahashi[2], Shizue Yoshihara[3], Takeyasu Saito[4], Hayato Tokumoto[3] ([1]Grad. Sch. Life and Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Osaka Pref. Univ. Coll. Technol., [3]Grad. Sch. Sci., Osaka Pref. Univ., [4]Grad. Sch. Eng., Osaka Pref. Univ.)

【背景・目的】生物の鉱物形成作用であるバイオミネラリゼーションを利用した、細菌による希薄溶液中の金属イオンの回収法が耳目を集めている。しかし、細菌体内から金属粒子を回収することは困難で、強固な細胞壁を高圧ホモジナイザーなどの高コストな装置を使用して、高エネルギー下で細胞を破砕する必要がある。一方で、線虫は細菌を餌とし捕食する過程で、咀嚼により細胞破砕を行う。そのため、線虫を用いて、細菌の破砕や消化、排泄などの生理作用や高い繁殖力を利用すれば、処理能力を維持でき、低コストで細胞破砕が可能であると期待できる。本研究では、対象金属として白金（Pt）を用いた。体内に Pt を還元・蓄積した細菌を給餌した線虫の培養条件の検討及び細菌捕食の確認、線虫排泄物から回収される Pt 量の測定を行った。また、回収した Pt の結晶子サイズを測定した。
【方法及び結果】本実験では、線虫のモデルとして *Caenorhabditis elegans*（*C. elegans*）、Pt 蓄積細菌のモデルとして *Shewanella algae*（*S. algae*）JCM13988 株を用いた。また、Pt 蓄積細菌は *S. algae* を Pt 300 ppm に暴露させ前培養したものを用いた。まず、NGM 寒天培地に、異なる量の Pt 蓄積細菌を播種し、*S. algae* を給餌して前培養した線虫を 5 頭投与して、21℃で 13 日間培養し、培養期間中の線虫数を計数した。その結果、線虫数は細菌給餌量に関わらず、10~11 日で最大となった。さらに、投与する線虫を増加させて実験を行ったところ、投与数を増加させるほど、線虫数が最大となる日数が短縮された。以上より、線虫数が最大となる日数は、初期線虫数に依存することが明らかとなった。また、*C. elegans* の繁殖における Pt の EC_{50} は 497 ppb であるのに対し、本実験では Pt 濃度 12 ppm の細菌を給餌したが、線虫の増殖が確認できた。これは、Pt を保持していない増殖した *S. algae* を線虫が捕食することで、体内の Pt 濃度が低下し、生体への毒性が軽減したと考えられる。次に、Pt 蓄積細菌を給餌した線虫を回収して、ICP-MS により線虫体内の Pt 量を測定したところ、線虫体内から Pt が検出された。これより、線虫による Pt 蓄積細菌の捕食が確認できた。さらに、細菌給餌量を増加させるほど、線虫体内の Pt 量が増加した。そのため、細菌給餌量を増加させることで、Pt 蓄積細菌の捕食量を増加させることが可能であると示唆された。最後に、培養後の線虫排泄物を ICP-MS により Pt 量を測定した結果、Pt が検出された。また、線虫排泄物内の Pt の結晶子サイズを XRD で測定したところ、Pt の結晶子サイズは 17.8 nm と微細であった。そのため、電気炉焼却処理による Pt 粒子径の発達を回避した新たな Pt 回収法が期待される。以上より、細菌によるバイオミネラリゼーションと線虫処理を融合することで、細胞破砕機や金属ナノ粒子加工の代替が可能であると考えている。

Nematodes, Platinum, Biomineralization

発表責任者：徳本勇人（tokumoto@b.s.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：3D8p14
講演日時：3 月 26 日 16:33～ 1 号館 D8 会場

Dietzia timorensis RD012625 のセシウム蓄積能の解析
Analysis of cesium accumulation ability by *Dietzia timorensis* RD012625
○吉岡 潤一[1]、林 秀謙[1,2] ([1]前工大院工、[2]前工大工)
○Junichi YOSHIOKA[1], Hidenori Hayashi[1,2] ([1]Grad. Maebashi institute of technology, [2]Maebashi institute of technology)

【背景と目的】2011 年に福島第一原発事故が発生し、放射性核種が放出された。特に ^{137}Cs は物理学的半減期の観点から長期に渡り環境中に残存するため、放射性セシウムの除去は早急に解決されるべき課題である。^{137}Cs は多くの微生物が生息する土壌表面に付着することが知られており、一部の微生物では菌体内にセシウムを蓄積することが判明している。我々は、これまでに放線菌から複数のセシウム蓄積細菌を獲得した。本研究では、セシウム蓄積量の高かった *Dietzia timorensis* RD012625 のセシウム蓄積能の評価及び蓄積機構の解明を目的とした。
【方法】NBRC より購入した *D. timorensis* RD012625 を 1 mM CsCl を含む液体培地で培養し、菌体内にセシウムを蓄積させた。菌体を回収後、乾燥重量を測定し、調製した溶菌液を原子吸光分析により、セシウム蓄積量を算出した。さらに、セシウムを含まない液体培地で培養後、菌体を回収し、セシウムを含む緩衝液に菌体を懸濁し、緩衝液の種類、緩衝液濃度、温度、pH、セシウム濃度、カリウムイオン濃度の条件を変更し、セシウム蓄積試験を行った。野生株をチオストレプトン含む寒天培地に塗布し、耐性変異株を取得し、セシウム蓄積量を測定した。セシウム蓄積能の向上した耐性変異株は、次世代シークエンサーを用いて全ゲノム配列を獲得し、変異導入部位の比較解析を行った。
【結果及び考察】*D. timorensis* RD012625 のセシウム蓄積能について、培地中で 122 μmol/g [dry weigt]、緩衝液中で 160 μmol/g [dry weigt]の蓄積量を示した。緩衝液の種類によるセシウム蓄積量を検討したところ、HEPES で最も高い蓄積を示した。HEPES 濃度を変化させたところ、濃度の低下に従いセシウム蓄積量が増加した。緩衝液中のセシウム濃度を変化させたところ、濃度増加に比例して蓄積量が上昇し、500 mM で最大の 627 μmol/g[dry weigt]を示した。緩衝液中でのセシウムの菌体へ取り込みの至適温度と至適 pH はそれぞれ 30°C、7.0 であった。カリウムイオン存在下でセシウム蓄積を行ったところ、カリウムイオン濃度 0～3 mM の範囲で 50%程度のセシウム蓄積能を維持することが示された。これらの結果から、自然環境下の土壌においても、高いセシウム蓄積能を有すると考えられる。また、カリウムイオン存在下でセシウム蓄積量が減少した事から細胞外セシウムの取り込みにはカリウム輸送系が関与していると考えられる。作成したチオストレプトン耐性変異株のうち 6 菌株でセシウム蓄積能の向上が見られ、そのうち 2 菌株でセシウム蓄積能が 1.5～2 倍程度、増加した。しかしながら、ゲノム DNA 解析の結果、遺伝子変異の特定には至らなかった。今後は、セシウム蓄積能とカリウム輸送系の相関関係について解析する予定である。

bioremediation, cesium, actinomycetes

講演番号：3D8p15
講演日時：3 月 26 日 16:44～ 1 号館 D8 会場

強力な N_2O 消去細菌 *Chitinophaga* sp. STop-15 株は不完全 DNRA 細菌である
Potent N_2O quencher, *Chitinophaga* sp. STop-15 is an incomplete DNRA bacterium
○橋床 泰之[1]、ラウ シャロン[2]、高津 祐太[1]、メリング ルリ[2] ([1]北大院農、[2]TROPI)
○Yasuyuki Hashidoko[1], Sharon Lau[2], Yuta Takatsu[1], Lulie Melling[2] ([1]Res. Agric. Hokkaido Univ., [2]Sarawak Tropic. Peat Res. Inst.)

【背景】強力な N_2O 消去細菌としてマレーシア・サラワク州の熱帯泥炭林開墾地オイルパーム圃場の深度 3.5 m-4.0m の泥炭層から分離した *Chitinophaga* sp. STop-15 株は，0.5%ショ糖と 0.005%酵母エキスを添加した 10 mL の Winogradsky’s 無機塩培地を 0.3%ジェランガムゲルで固め，22 mL 容ヘッドスペースに 10,000 ppmv 濃度になるよう N_2O ガスを注入したガスクロマトグラフバイアルで培養すると，培養 5 日目には N_2O をほぼゼロレベルまで消去する。また，北海道の N_2O 放出ホットスポットである黒ボク土コーン畑土壌から分離した強力な N_2O 消去細菌も別種の *Chitinopghaga* sp. であることが分かっている。これら *Chitinophaga* 属細菌の N_2O 消去機構を明らかにするため，*Chitinophaga* sp. STop-15 株ゲノムの塩基配列解読を試みた。
【方法・結果】Illumina NGS を用い，8.52 Mbp のゲノム塩基配列を 84 のコンティグとして得た。この配列で見出される翻訳アミノ酸配列が 100 個以上の ORF についてアノテーション解析を試み，脱窒，窒素還元（窒素固定），ならびに硝化に関わる遺伝子クラスターの探索を行い，主要な無機窒素代謝経路を明らかにしようとした。ドラフトシーケンスによって，*nor* 遺伝子と *nos* 遺伝子のクラスターがそれぞれ確認できた。特に *nosZ* はその翻訳産物のアミノ酸配列相同性から NosZII（clade 2 NosZ）にグルーピングでき，*Chitinophaga* sp. STop-15 株は *Bacteroidetes* 門細菌群に認められる DNRA (dissimilatory nitrate reduction to ammonia)型の無機窒素代謝経路を有すると考えられた。しかしながら，*nar*/*nap* 系の硝酸還元酵素遺伝子は単独のものを含めゲノム上に確認できず，また DNRA に必須とされ，亜硝酸のアンモニアへの還元反応を触媒するニトロゲナーゼ遺伝子 *nif*/*nrf* クラスターも *nrfA* 遺伝子そのものも見出されなかった。それに対し，NO に O_2 を付加して NO_3 を生成する NO dioxygenase （*hmpA*/*ferredoxin-NADP reductase*） 遺伝子が単独で存在していた。*Chitinophaga* sp. STop-15 株では，この NosZII が N_2O を電子受容体とする respiratory 還元（N_2 ガスへの還元）に寄与しているとの証拠は得られず，*nirS* は単独で *norCB* に隣接していた。一方，*Chitinophaga* sp. STop-15 株の培地と菌体サイトプラズマのイオンクロマト分析によって，高濃度 N_2O 存在下での STop-15 株培養物では，N_2O から NO を経た亜硝酸アニオン（NO_2^-）の生成が強く示唆された。従って，*Chitinophaga* sp. STop-15 株は不完全 DNRA（同化型硝酸塩アンモニア還元）細菌であると結論づけ，呼吸型 N_2O 還元ではなく同化型 N_2O 酸化プロセスが本株の N_2O 消去を担うのではないかと推測した。さらに，これに類似する不完全 DNRA 細菌が，地球規模での窒素循環に果たす役割についても考察した。

N_2O quencher, *Chitinophaga*, *nosZII*

発表責任者：橋床泰之（yasu-h@abs.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：3E2a02
講演日時：3 月 26 日 09:11～ 1 号館 E2 会場

Anammox 細菌"*Candidatus* Kuenenia"が保有する亜硝酸還元酵素の精製および生化学的性状
Purification and biochemical properties of nitrite reductase possessed by Anammox bacterium "*Candidatus* Kuenenia"

○中林 豊博[1]、押木 守[1]、荒木 信夫[1]、岡部 聡[2]、山口 隆司[3] ([1]長岡高専、[2]北大、[3]長岡技大)
○Toyohiro NAKABAYASHI[1], Mamoru OSHIKI[1], Nobuo ARAKI[1], Satoshi OKABE[2], Takashi YAMAGUCHI[3] ([1]Nagaoka Col. of Tech, [2]Hokkaido Univ., [3]Nagaoka Univ. of Tech)

嫌気性アンモニウム酸化(anammox)反応とは無酸素条件下において、亜硝酸を電子受容体としてアンモニウムを酸化し、窒素ガスに変換するプロセスである。Anammox 反応を行う細菌(anammox 細菌)は地球上の淡水・海水域の無酸素領域に幅広く分布しており、窒素循環に大きく寄与していることが知られている。Anammox 反応は以下の 3 段階で進むと考えられている。1)亜硝酸(NO_2^-)の一酸化窒素(NO)への還元反応、2) ヒドラジンシンターゼ(Hzs)による NO のヒドロキシルアミン(NH_2OH)への還元および NH_2OH およびアンモニウム(NH_4^+)からのヒドラジン(N_2H_4)合成、3) ヒドラジンデヒドロゲナーゼ(Hdh)による N_2H_4 の酸化および窒素ガスの生成。Anammox 細菌”*Candidatus* Kuenenia”はゲノム上にシトクロム *cd*$_1$ 含有亜硝酸還元酵素をコードする遺伝子 *nirS* を保有していることから、NirS が”*Candidatus* Kuenenia”による亜硝酸還元に寄与していると予想されている。しかし、*nirS* は転写およびタンパク質レベルではほとんど発現しておらず、NirS とは異なる亜硝酸還元酵素(オクタヘムタンパク質)が関与することを推測する論文も近年報告されている。このように、”*Candidatus* Kuenenia”の亜硝酸還元反応を触媒する酵素の正体・特性は未だ明らかになっていない。本研究の目的は”*Candidatus* Kuenenia”の Nir を精製・同定することである。Nir の精製・同定を行う前段階として、”*Candidatus* Kuenenia”を膜画分、可溶性画分に分離し、どちらの画分に Nir が存在するかを調査した。菌体から粗抽出液、可溶性画分、膜画分を調整し、タンパク質濃度の定量および亜硝酸還元試験を行った。その結果、単位タンパク質量当たりの比活性を比較すると粗抽出液に対して可溶性画分は 1.86 倍、膜画分は 3.14 倍の比活性が見られた。また、粗抽出液中の総活性を 100%とすると可溶性画分、膜画分それぞれ 56%、63%の活性が回収された。このことから”*Candidatus* Kuenenia”は可溶性 Nir および膜結合型 Nir を発現していることが示唆された。さらに、Nir が酸素感受性であるかを調査するために、調整した粗抽出液、可溶性画分、膜画分に 1 mM ジチオトレイトール(DDT)を加え、タンパク質濃度の定量および亜硝酸還元試験を行った。その結果、いずれの画分についても DTT を添加することによって亜硝酸還元活性が低下した。”*Candidatus* Kuenenia”の Nir が酸素感受性であれば、DTT の添加によって亜硝酸還元活性が上昇するはずなので、このことから Nir が酸素感受性ではないことが明らかとなった。従って、”*Candidatus* Kuenenia”の Nir の精製は大気条件下で行うことができると考えられる。今後は、”*Candidatus* Kuenenia”の可溶性 Nir および膜結合型 Nir の精製・同定を行い、どのようなタンパク質であるかを明らかにする。

anaerobic ammonium oxidation, "*Candidatus* Kuenenia", nitrite reductase

講演番号：3E2a03
講演日時：3 月 26 日 09:22～ 1 号館 E2 会場

アンモニア酸化古細菌 *Nitrososphaera viennensis* が保有する銅含有型亜硝酸還元酵素(NirK)の触媒特性

Enzymatic properties of copper-containing nitrite reductase from *Nitrososphaera viennensis*

○押木 守[1]、小林 駿[1]、平 大輔[2]、吉田 圭太朗[3]、豊福 雅典[3]、志田 洋介[4]、小笠原 渉[4]、山口 隆司[4]、荒木 信夫[1] ([1]長岡高専、[2]崇城大学、[3]筑波大学、[4]長岡技大)
○Mamoru OSHIKI[1], Shun Kobayashi[1], Daisuke Hira[2], Keitaro Yoshida[3], Masanori Toyofuku[3], Tosuke Shida[4], Wataru Ogasawara[4], Takashi Yamaguchi[4], Nobuo Araki[1] ([1]Nat. Inst. Technol. Nagaoka Coll., [2]Sojo Univ., [3]Univ. Tsukuba, [4]Nagaoka Univ. Technol.)

硝化・脱窒は地球上における窒素循環において重要なプロセスであり硝化・脱窒法という形で排水処理プロセスに応用されている．硝化反応($NH_3 \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO_3^-$)におけるアンモニア酸化は長らくアンモニア酸化細菌 (AOB) によって担われていると考えられてきた．しかし近年，アンモニア酸化古細菌 (AOA) の存在が発見され，AOA が海洋や土壌といった幅広い自然環境に分布していることが明らかにされつつある．海洋，土壌中において，AOA のアンモニア酸化酵素遺伝子(*amoA)*の転写量が AOB を上回る量で検出されていることから，AOA は地球上におけるアンモニア酸化反応に大きく関与していると考えられている．

AOA のアンモニア酸化反応において，一酸化窒素(NO)を選択的に除去すると，AOA がアンモニア酸化活性を失うことが明らかとなっている．このことから AOA のアンモニア酸化反応において NO は必須の中間代謝物と考えられているが，AOA が NO を生成する機構は解明されていない．NO_2^-を NO まで還元する銅含有型亜硝酸還元酵素(NirK)は脱窒菌で広く知られている酵素であるが，AOA のゲノム解析から AOA が *nirK* を共通して保有していることが明らかとなっている．AOA による NO の生成において NirK が関与していることが示唆されているものの，AOA の NirK が NO_2^-を還元し，NO を生成することは未だ実証されてない．本研究では，土壌性アンモニア酸化古細菌 *Nitrososphaera viennensis* の保有する NirK について，大腸菌を用いた異種発現を行い，NirK の酵素学的特な特性を明らかにすることを目指した．

Ns. viennensis nirK をタンパク質発現用ベクター pColdI へ組み込み、大腸菌 BL21 で異種発現を行った．His タグ精製によって可溶性画分から NirK を精製し、精製 NirK について透析によって銅サイトの再構築を行った．本研究で得られた NirK について物性を調査したところ、105 kDa の分子量を持つホモ三量体構造を有し、アミノ酸配列から推定された通り type 1 および 2 銅結合サイトを保有していた．NirK は亜硝酸還元活性を有し、$^{15}NO_2^-$を ^{15}NO に還元した．また、興味深い現象として、*Ns. viennensis* NirK はオキシダーゼ活性を有し、$^{15}NH_2OH$ を ^{15}NO に酸化すること、NO_2^-と NH_2OH から N_2O を生成する反応を触媒することを我々は明らかにした．本研究は AOA の生化学を触媒酵素のレベルで解析した世界初の報告であり、従来予想されていた NO の生成反応以外にも NirK が AOA の代謝反応に寄与していることを明らかにした．

aerobic ammonia-oxidizing archaea, *Nitrososphaera viennensis*, copper-containing nitrite reductase (NirK)

発表責任者：押木守（oshiki@nagaoka-ct.ac.jp）

講演番号：3E2a04
講演日時：3 月 26 日 09:33～ 1 号館 E2 会場

NAD(P)H を電子供与体とする *Lactobacillus plantarum* P1-2 株由来の過酸化物還元酵素。
NAD(P)H peroxides oxidoreductases from *Lactobacillus plantarum* P1-2.

○高波 友希[1]、大山 修平[1]、美原 直樹[1]、川鍋 明久[1]、小林 裕太郎[1]、香川 一人[1]、金子 剛明[1]、木俣 真弥[1]、武田 晃治[2]、渡邊 昭夫[3]、新村 洋一[1]([1]東農大バイオ、[2]東農大教職、[3]大洋香料)
○Tomoki TAKANAMI[1], Shuhei OHYAMA[1], Naoki MIHARA[1], Akihisa KAWANABE[1], Yutaro KOBAYASHI[1], Kazuhito KAGAWA[1], Masaaki KANEKO[1], Shinya KIMATA[1], Kouji TAKEDA[2], Akio WATANABE[3], Youichi NIIMURA[1] ([1]TUA bio., [2]TUA edu., [3]TAIYO corp.)

【背景・目的】酸化ストレスの原因となる過酸化物は生体内外で容易に生成され、種々の疾病や細胞の老化、ガン化の要因となる。私達は菌体外過酸化脂肪酸(linoleic acid hydroperoxide:LOOH)とそのモデル化合物(cumene hydroperoxide:CuOOH)を還元する *Lactobacillus plantarum* P1-2 株を分離した。本菌を酸素感受性短寿命変異体の線虫に投与したところ、平均寿命の延長と加齢性色素(リポフスチン)の生成抑制が観察された。続いて鉄剤で脂質過酸化を誘導したラットに投与した結果、大腸粘膜中の脂質過酸化指標の低下が示された[1)]。そこで子豚に投与したところ、増体重効果、血清中脂質過酸化指標の低下が観察された[2)]。本菌の過酸化物還元活性は加熱処理により消失し、ラットにおける生理活性は死菌体で消失することから、本菌の過酸化物還元活性は酵素に起因すると推定された。そこで本菌の過酸化物還元酵素の精製を試みた。

【方法・結果】*L. plantarum* P1-2 株の好気培養菌体の無細胞抽出液を TOYOPEARL Butyl 650S に供したところ、H_2O_2還元活性を持つ 1 画分と CuOOH 還元活性を持つ 2 画分が得られた。2nd カラムとして H_2O_2還元活性を持つ 1 画分を Red sepharose に供した結果、NADH を電子供与体として過酸化水素に対して還元活性を示す 50kDa の酵素が精製された。この酵素は BLAST 検索により、既知の H_2O_2還元酵素の *Enterococcus fecalis* NADH peroxidase と 74%の similarity を示したため、NADH peroxidase であることが示唆された。

CuOOH 還元活性を持つ 2 画分をそれぞれ DEAE sepharose fast flow と 2'5 ADPsepharose に供したところ、NAD(P)H を電子供与体として LOOH と CuOOH に対して還元活性を示す 45kDa、48kDa の酵素が精製された。この 2 種の酵素を BLAST 検索した結果、*E. coli* glutathione reductase と 43%、*Geobacillus stearothermophilus* dihydrolipoamide dehydrogenase と 45%の similarity を示した。これらの酵素が LOOH を還元するという報告は見いだせないため、2 種の精製酵素は NAD(P)H を電子供与体とする新規の過酸化脂肪酸還元機構を持つことが推定される。現在酵素学的検討を行っている。

1) 脂質過酸化を誘導したラットへの過酸化物還元活性を有する乳酸菌の投与効果　渡邊ら、本大会、2012 年
2) 過酸化物還元活性を有する乳酸菌の豚への投与効果　渡邊ら、第 65 回日本酸化ストレス学会学術集会　2012 年

Lactobacillus plantarum, linoleic acid hydrohydroperoxide, hydrogen peroxide

講演番号：3E2a05
講演日時：3 月 26 日 09:44～ 1 号館 E2 会場

ランダムおよび部位特異的変異導入による一価銅オキシダーゼ CueO の高活性化

Enhancement of catalytic activity of a cuprous oxidase, CueO by random and site-directed mutagenesis

○片岡 邦重、高田 修平、櫻井 武（金沢大理工）
○Kunishige KATAOKA, Shuhei TAKATA, Takeshi SAKURAI (Kanazawa Univ.)

【序論】ラッカーゼやビリルビンオキシダーゼなどのマルチ銅オキシダーゼ（MCO)は，分子内にタイプⅠ銅，タイプⅡ銅，複核タイプⅢ銅と呼ばれる分光学的・磁気的性質の異なる４つの銅を持つ酸化還元酵素で，基質を酸化して得た電子を用いて分子状酸素を水に還元する。我々は MCO の構造・機能の解析と機能改変を行っており，MCO の酵素活性がタイプⅠ銅の酸化還元電位に支配されていることを明らかにしている。更に我々は，大腸菌の一価銅オキシダーゼ CueO を対象に，タイプⅠ銅部位近傍の疎水環境や水素結合ネットワークを改変することでタイプⅠ銅電位を制御し，活性を増大させることにも成功している。本研究では，ランダム変異導入法と部位特異的変異導入法を組み合わせることで，CueO の高活性化を試みた。
【方法と結果】Error-prone PCR 法によりランダム変異を導入した CueO 遺伝子を pUC18 に連結した後，大腸菌を形質転換して約 3,000 個のコロニーからなる変異型遺伝子のライブラリーを作製した。4-Aminodiphenylamine（ADPA)を含む LB 平板培地を用いて，ADPA 酸化物による菌体の黒色化を指標にライブラリーをスクリーニングし，野生型 CueO (WT CueO)発現株と比較して黒色化が顕著な 5 個のコロニーを選抜した。これらのコロニーを小スケールで培養し，精製した変異型酵素を比較することで，最も高い活性を示す変異体 RCueO^{mut1} を得た。本変異体の DNA 配列を確認したところ，6 ヶ所のアミノ酸残基置換が確認され，変異部位のうち L502V はタイプⅠ銅近傍，残る 5 残基は分子表面付近またはシグナル配列に位置する残基であることがわかった。RCueO^{mut1} の反応性を WT CueO と比較すると，ADPA 酸化活性が 2 倍，ABTS 酸化活性では約 20 倍に増大しており，タイプⅠ銅の酸化還元電位は WT CueO より約 70 mV 正電位側にシフトしていた。Leu502 の主鎖アミドプロトンは，タイプⅠ銅配位子である Cys500 の S 原子と NH-S 水素結合を形成していることから，Val 置換による水素結合系の摂動が原因でタイプⅠ銅電位が正側にシフトし，活性が増大したと考えられる。そこで部位特異的変異導入法により L502V シングルミュータントと，439 位の Asp を Trp または Phe に置換した高活性化変異と L502V との二重変異型酵素を作製して性質を検討した。L502V の ABTS 酸化活性は RCueO ^{mut1} と比較すると低かったが，D439W/L502V および D439F/L502V 二重変異体では，タイプⅠ銅の酸化還元電位が大幅に正電位シフトし，60 倍以上の ABTS 酸化活性の増大に成功した。

multicopper oxidase, cuprous oxidase, laccase

発表責任者：片岡邦重（kataoka@se.kanazawa-u.ac.jp）

講演番号：3E2a06
講演日時：3 月 26 日 10:05～ 1 号館 E2 会場

担子菌 *Hericium coralloides* 由来 laccase 遺伝子の異宿主発現および物質生産への応用
Bioproduction of functional polyphenol compounds using *Hericium coralloides* laccase (Lcc2) expressed in *Aspergillus oryzae*.
○戸田 弘、三矢 満里奈、伊藤 伸哉（富県大生工研セ）
○Hiroshi TODA, Marina MITSUYA, Nobuya ITOH (Toyama Pref. Univ.)

《背景・目的》

ラッカーゼは活性中心に銅原子を含む multi copper oxidase ファミリーの一つであり、担子菌や微生物などに広く分布している。本酵素は繊維の脱色工程や排水中の色素分解、食品添加物など産業的に広く利用されており、またポリフェノールオキシダーゼとしての機能を利用して、各種化合物の酸化重合による有用物質生産も可能である。我々はこれまでに、担子菌 *Hericium coralloides* NBRC7716 より単離したラッカーゼ Lcc2 遺伝子 [1]を酵母などにより異宿主発現させ、組換え酵素の生産および紅茶ポリフェノールの一種であるエピテアフラガリン 3-O-ガレート(ETFGg)生産への応用を試みてきた。しかしながら、酵母における Lcc2 の発現量は低く、効率的な ETFGg 生産には至っていない。そこで本研究では、糸状菌 *Aspergillus oryzae* を宿主とした発現系を構築し、組換え Lcc2 の大量発現および ETFGg の効率的生産を試みた。

《方法》

H. coralloides より単離した Lcc2 遺伝子を SodM プロモーター下流に連結後、糸状菌 *Aspergillus* 用発現ベクターpPTR I にクローニングし、pPTRI-sodM-lcc2 を構築した。*A. oryzae* NBRC30113 へプロトプラスト PEG 法により形質転換し、ラッカーゼ発現組換え株を得た。培養条件、銅添加濃度、炭素源濃度などを検討し組換え Lcc2 発現量の最適化を検討した。得られた組換え酵素を用いてエピガロカテキン 3-O-ガレート(EGCg)および没食子酸の酸化重合反応を行い、ETFGg の生産を試みた。基質濃度、添加酵素量、反応 pH、添加有機溶媒などの条件を検討し、ETFGg 生産条件の最適化を試みた。また同様にイソオイゲノール、レスベラトロールの重合反応によるリカリン A および δ-ビニフェリンの生産を試みた。

《結果》

Lcc2 導入 *A. oryzae* 組換え菌体の液体培養上清中にラッカーゼ活性が得られことから、Lcc2 が分泌生産されていることが確認された。発現条件を最適化した結果、最大で 8 U/mL の組換え Lcc2 活性を得ることができた。本組換え酵素用いて ETFGg 生産条件を検討した結果、100 mM 酢酸ナトリウムバッファー(pH4.5)、EGCg 6 mg/mL、没食子酸 4.8 mg/mL、20%$_{(v/v)}$の酢酸エチル添加による二相系反応によりもっとも高い ETFGg 生産量が得られ、最終的に 6.33 mg/mL の ETFGg が酢酸エチル相に蓄積した。この際の変換効率は約 30%(モル収率)であった。また同様の条件により、イソオイゲノール二量体であるリカリン A やレスベラトロール二量体である δ-ビニフェリンを効率的に生産可能であることが明らかになった。

1) Itoh et al., Enz. Microbial Technol. 82: 125-132 (2016)

laccase, *Hericium coralloides*, ETFGg

発表責任者：戸田　弘（htoda@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：3E2a07
講演日時：3 月 26 日 10:16～ 1 号館 E2 会場

Methylobacterium sp. FD1 株由来ホルムアルデヒドジスムターゼ遺伝子（*fdm2*）の大腸菌での発現と Fdm2 の精製
Expression of formaldehyde dismutase gene (*fdm2*) of *Methylobacterium* sp. FD1 in *E.coli* and Fdm2 purification
○井元 誠志、坂地 陸斗、米光 裕 (和歌山高専)
○ Seiji IMOTO, Rikuto SAKAJI, Hiroshi YONEMITSU (National Institute of Technology, Wakayama College)

【背景および目的】
ホルムアルデヒド（FA）は工業原料として幅広く用いられており、化学工業において重要な化学物質である。しかし、FA は強い毒性を持つことから、工業廃水などの液相中の FA や気相中の FA は分解処理が必要となる。当研究室では、微生物あるいは酵素を用いた FA 分解処理技術の開発を目指し、既に FA 分解菌 *Methylobacterium* sp. FD1 株を分離した[1)]。また、FD1 株の FA 分解は主に、ホルムアルデヒドジスムターゼ（Fdm）によることを明らかにし[1)]、Fdm の FA 分解処理技術への応用が期待される。そこで、Fdm 遺伝子（*fdm1*）をクローニングし[2)]、遺伝子組換え大腸菌を用いて His タグ付き Fdm1 (Fdm1-6His) の精製を行った[3)]。一方、FD1 株の全ゲノム解析を行ったところ、*fdm1* 以外の Fdm 遺伝子（*fdm2*）の存在が明らかになった（未発表)。本研究では、*fdm2* をクローニングし、Fdm2-6His の精製を試みた。

【方法および結果】
fdm1 と *fdm2* より推定されるアミノ酸配列の相同性は 75 %で、いずれも NAD (H) および亜鉛結合領域が保存されていた。Fdm2-6His 遺伝子は FD1 株ゲノム DNA を鋳型に PCR 増幅し、Expresso™ Rhamnose Cloning and Expression System (Lucigen) を用いて大腸菌に導入した。なお、ベクターは pRham C-His Kan Vector で、大腸菌は *E. cloni* 10G である。ラムノースを含む培地で培養した Fdm2-6His 遺伝子を保持する大腸菌の休止菌体を用いて FA 分解を行ったところ、FA からメタノールとギ酸が等量生成したことから Fdm 活性が確認された。現在、金属（Co^{2+}）アフィニティクロマトグラフィによる精製を試みている。さらに、Fdm1-6His と Fdm2-6His の諸特性を調べる予定である。

1) Yonemitsu *et al.*, Biosci. Biotech. Biochem. (2016) **80**, 2264-2270.
2) Yonemitsu and Kikuchi, Biosci. Biotech. Biochem. (2018) **82**, 49-56.
3) Imoto and Yonemitsu, Abstract Book of the 4th International Biology Conference (IBOC) (2018) 168.

Methylobacterium, Formaldehyde dismutase, Gene cloning

発表責任者：米光裕（yonemitsu@wakayama-nct.ac.jp）

講演番号：3E2a08
講演日時：3 月 26 日 10:27～ 1 号館 E2 会場

アミノ酸置換による *Ochrobactrum* sp. AIU 033 由来アルコール酸化酵素のグリコール酸酸化活性向上
Enhancement of glycolic acid oxidase activity in alcohol oxidase from *Ochrobactrum* sp. AIU 033 by amino acid substitutions

○松村 健児、天野 一清、下飯 仁、山田 美和 (岩手大院総合科学)
○Kenji MATSUMURA, Issei AMANO, Hitoshi SHIMOI, Miwa YAMADA (Iwate Univ.)

【目的】幅広い分野で応用可能な有用物質であるグリオキシル酸の酵素合成を目指し、我々は、グリコール酸酸化能を有し、グリオキシル酸合成に最適な基質特異性を有する *Ochrobactrum* sp. AIU 033 由来アルコール酸化酵素（AOD）を見出してきた。しかしながら本酵素のグリコール酸酸化活性は低く、物質生産に利用するためには課題がある。そこで我々は AOD 活性向上を目的とし、AOD 遺伝子にランダム変異を導入することで、野生型と比較して活性が 1.2 倍向上した K11E/S76T 二重変異体をこれまでに取得した。本研究では K11E/S76T 変異体を鋳型としてランダム変異を導入し、さらなる AOD 活性向上変異体の取得、および新たに活性向上に寄与するアミノ酸置換の特定を目指した。
【方法】AOD は $\alpha_2\beta_2$ サブユニット構造を有し、α サブユニットが触媒機能を有すると予想されている。また、これまでの研究で見出した活性向上変異体 K11E/S76T は α サブユニットの 11 番目の Lys が Glu に、76 番目の Ser が Thr に置換されている。本実験では K11E/S76T 変異体の α サブユニットをコードする遺伝子領域に対して error-prone-PCR によるランダム変異を導入し、増幅された遺伝子断片をベクターにクローニングすることで変異体プラスミドライブラリを作製した。作製したライブラリを用いて形質転換した大腸菌 BL21(DE3)を全て液体培養し、IPTG による酵素発現誘導を行った後、集菌、破砕して粗酵素液を調製した。粗酵素液を用いて比色法によるグリコール酸酸化酵素活性測定を行い、活性向上変異体をスクリーニングした。取得された活性向上変異体の DNA シークエンス解析を行い、アミノ酸置換部位の特定を行った。
【結果・考察】AOD 変異体 752 株の活性測定の結果、野生型の 1.3～1.6 倍の活性を示す 4 株の変異体を取得した。各変異体は K11E/S76T に加えて、T69S、D375G、I385V もしくは D6E/K519R のアミノ酸置換が生じていた。T69S および D6E のアミノ酸置換は、以前の研究において活性向上に重要なアミノ酸領域であると予想されたフラビン結合モチーフ周辺に生じていた一方で、D375G、I385V および K519R のアミノ酸置換は GMC oxidoreductase C 末端保存領域周辺に生じていた。よって、フラビン結合モチーフ周辺に加え、新たに GMC oxidoreductase C 末端保存領域周辺のアミノ酸置換が AOD 活性向上に重要であることが示唆された。次に、特定された各変異点を単独に分離した一重変異体の活性測定の結果、T69S および D375G 変異体が野生型の 1.2～1.3 倍の活性を示した。このことから、K11E/S76T/T69S および K11E/S76T/D375G 変異体は、K11E/S76T と、T69S もしくは D375G の影響の相乗効果によって活性が向上したことが示唆された。

Alcohol oxidase, Glyoxylic acid, Glycolic acid

発表責任者：山田美和（myamada@iwate-u.ac.jp）

講演番号：3E2a09
講演日時：3 月 26 日 10:38～ 1 号館 E2 会場

Penicillium sp. KAIT-M-117 株由来γ - アミノ酪酸オキシダーゼの熱安定性が向上した変異酵素の取得

Acquisition of thermostable mutant enzyme of γ-aminobutyrate oxidase from *Penicillium* sp. KAIT-M-117

○涌嶋 朗[1]、谷 修治[1]、山村 晃[2]、炭谷 順一[1]、川口 剛司[1]([1]阪府大院・生環科、[2]神奈川工大・応用バイオ)

○ AKIRA WAKUSHIMA[1], SHUJI TANI[1], AKIRA YAMAMURA[2], JUN-ICHI SUMITANI[1], TAKASHI KAWAGUCHI[1] ([1]Grad. Sch. Life and Env. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Kanagawa Inst. Technol. dept. Appl. Biosci.)

【背景と目的】γ-アミノ酪酸（GABA）は，血圧降下，利尿作用，精神安定効果など多様な生理機能を有している。食品原料や生体内に含まれる GABA の測定は，品質管理や研究，開発を行う上で重要であると考えられる。現在，GABA の定量は主に HPLC によって行われているが，多検体測定には不向きであり，酵素的に測定することが出来れば，簡便に多検体測定が可能となる。これまで，土壌分離菌 *Penicillium* sp. KAIT-M-117 株から精製した GABA オキシダーゼの部分アミノ酸配列を基に単離した遺伝子を用いて大腸菌で生産した組換え酵素の諸性質を調べた結果，本酵素は非常に基質特異性が高い一方で，熱安定性に問題があることが分かった。そこで，本研究では本酵素遺伝子にランダム変異を導入することで，熱安定性の向上した変異酵素を取得することを目的とした。

【方法と結果】Error-prone PCR 法を用いて GABA オキシダーゼ遺伝子に変異導入を行い，pET16b に組み込み，*E. coli* JM109（DE3）を形質転換することで変異ライブラリーを作製した。熱安定性変異体の取得は以下の 2 つの方法で行った。第 1 の方法では，LB 培地上に載せたナイロンメンブレンに形質転換体を植菌し，メンブレンを Lysozyme による溶菌処理と，熱処理（60℃，2 時間）を行った後，GABA，Phenol，4-Aminoantipyrine，Peroxidase を含む反応溶液で湿らせたろ紙上にメンブレンを置くことで活性の残存を示す赤色変化する株を選抜した。第 2 の方法では，96 穴プレートで液体培養後，回収した菌体を Lysozyme による溶菌処理を行うことで，無細胞抽出液を調製し，熱処理（52℃，30 分）後の無細胞抽出液に反応溶液を添加し，赤色変化した株を選抜した。その結果，前者の方法では約 5500 株から，後者の方法では約 1800 株から，それぞれ 1 株の候補株を取得した。塩基配列解析によって，得られた変異酵素の置換アミノ酸はそれぞれ R166C/S245A，R122H であることが分かった。R166C/S245A については，どちらのアミノ酸置換が熱安定性に寄与しているかを明らかにするために，PCR メガプライマー法により R166C，S245A を作製した。野生型，R122H，R166C，S245A の精製酵素を用い，熱処理（50℃，30 分）を行った結果，野生型の残存活性が 66%であったのに対して，R122H は 84%，R166C は 95%，S245A は 93%であった。また，R122H，R166C，S245A の至適温度，至適 pH，pH 安定性，基質特異性は野生型と同様であった一方で，比活性は R122H のみ低下していた。現在，飽和変異導入によって各変異部位の最適アミノ酸の探索を行っており，最適なアミノ酸が確定でき次第，変異部位を組み合わせ，更に熱安定性が向上した変異酵素の作製を試みる予定である。

oxidase, GABA, thermostability

講演番号：3E2a10
講演日時：3 月 26 日 10:49～ 1 号館 E2 会場

好熱性真菌 D-アミノ酸オキシダーゼの耐熱性低下変異体スクリーニング法の開発と取得
Development of a screening method for and isolation of less thermostable mutants of a thermophilic fungal D-amino acid oxidase
○古市 剛大、七五三掛 湧也、阿部 勝正、解良 芳夫、高橋 祥司（長岡技大院工）
○ Takehiro FURUICHI, Yuya SHIMEKAKE, Katsumasa ABE, Yoshio KERA, Shouji TAKAHASHI (Nagaoka Univ. of Tech.)

【背景・目的】D-アミノ酸オキシダーゼ（DAO）は，中性・塩基性 D-アミノ酸の酸化的脱アミノ反応を触媒するフラビン酵素である．DAO はその立体選択性から D-アミノ酸の検出・定量，半合成セファム系抗生物質の原料である 7-アミノセファロスポラン酸や医薬品の原料となる α-ケト酸の生産に有用である．また近年，統合失調症や筋萎縮性側索硬化症などの神経疾患の診断・治療・予防への応用も研究されている．当研究室では，応用的利用に有用な DAO の取得を目的とし，D-アミノ酸資化能を有する好熱性真菌 *Rasamsonia emersonii* YA 株を堆肥から単離し，その DAO（ReDAO）の酵素学的諸特性を解析してきた．ReDAO は広基質特異性および高活性を示すとともに，既知の真核生物 DAO よりも著しく高い耐熱性を有しており，応用的に有用な DAO であった．しかし，この高い耐熱性を付与する構造的要因は現在のところ不明である．そこで本研究では，ReDAO の耐熱化機構の解明を目的とし，ランダム変異導入により耐熱性が低下した ReDAO 変異体のハイスループットなスクリーニング法の開発と本法を用いた耐熱性低下変異体の取得を目指した．
【方法・結果】耐熱性が低下した ReDAO 変異体のスクリーニング法の開発として，初めに大腸菌で発現させた ReDAO のメンブレンを用いた活性検出法の開発を検討した．LB 寒天培地上で生育させた ReDAO 遺伝子発現ベクターを有する *E. coli* BL21(DE3)pLysS のコロニーをニトロセルロース膜に写し取り，IPTG を含む 2xYT 寒天培地上で 30℃で 5 時間静置して ReDAO を発現させた．その後，メンブレン上に 1% Triton X-100 を含む溶菌液を滴下して大腸菌を溶菌させたのち，30 U/ml HRP を含む 1%アガロース溶液を滴下して固化させ，20 mM D-バリンと 0.02 mM ジアミノベンジジンを含む反応液を滴下し 40℃で 10 分間反応させた．その結果，コロニーが存在したメンブレン上に活性に伴う発色が観察され，メンブレンを用いて多数のコロニーの ReDAO 活性を検出できることが分かった．次に，耐熱性低下変異体の 1 次スクリーニング条件を決定するため，溶菌後のメンブレンを様々な温度で 1 時間保温した後の残存活性を同様に観察したところ，65℃までは強い発色が観察されたが，それ以上の温度では観察されなかった．このことから，65℃，1 時間の保温で野生型と耐熱性低下変異体を判別可能と考えた．さらに，ReDAO 発現大腸菌の粗抽出液を種々の温度で保温した後の残存活性を測定することで 2 次スクリーニング条件を検討し，42℃，1 時間の保温で耐熱性低下変異体の選抜が可能と考えた．現在，エラープローン PCR により ReDAO 遺伝子にランダム変異を導入し，開発したスクリーニング法を用いて耐熱性低下変異体の選抜と変異体のアミノ酸配列を解析している．

D-amino acid oxidase, thermotolerance, high throughput screening

発表責任者：高橋祥司（shoutaka@vos.nagaokaut.ac.jp）

講演番号：3E2a11
講演日時：3 月 26 日 11:10～ 1 号館 E2 会場

環状イミン構造を有するβ－カルボリンアルカロイド分解酵素の発見

Discovery of the ß-carboline alkaloid-degrading enzyme

永久保 利紀[1]、○熊野 匠人[1]、太田 雄大[2]、橋本 義輝[1]、小林 達彦[1]([1]筑波大院・生命環境、[2]山陽小野田市立山口東京理科大学・工学部)
Toshiki Nagakubo[1], ○Takuto Kumano[1], Takehiro Ota[2], Yoshiteru Hashimoto[1], Michihiko Kobayashi[1] ([1]Grad. School of Life and Environ. Sci., Univ. of Tsukuba, [2]Sanyo-Onoda City University)

【背景・目的】

β-カルボリンは、トリプタミンに由来する化合物であり、インドールアルカロイドに分類される。β-カルボリン骨格を有する化合物は自然界に普遍的に存在しており、その多くが顕著な生理活性を示す。例えば、β-カルボリン骨格を有する比較的単純な構造のアルカロイドの一種であるハルマリンは、ヒトを含む動植物に広く見出されており、モノアミンオキシダーゼの活性を阻害し向精神作用を示すことから、古来より世界各地で幻覚剤の成分として用いられてきた。しかしながら、自然界におけるその普遍性にもかかわらず、ハルマリンを含むβ-カルボリンアルカロイドの微生物による代謝経路は全く解明されておらず、また、β-カルボリンの部分構造である環状イミンの分解代謝も全生物を通じて分かっていない。そこで本研究では、ハルマリンを代謝する微生物を土壌からスクリーニングし、本代謝経路の解明および代謝酵素の取得と機能解析を目的とした。

【方法・結果】

ハルマリンは、蔓性植物 *Peganum harmala* の根および種子に特に多く含まれている。そこで、この植物の根付近の土壌より、ハルマリン代謝微生物の単離を試みた。具体的には、ハルマリンを単一炭素源または窒素源とする最少培地に上記の土壌を接種し、28℃で数日間振盪培養した。その後、新しい培地への植継ぎを繰り返して集積培養を行い、同組成の寒天培地に植菌した。生育してきたコロニーをさらに植継ぎ、菌の単離を行った。その内、1 株を選抜し、大量培養後、超音波処理により無細胞抽出液を調製し、各種クロマトグラフィーを用いて、ハルマリン代謝酵素を SDS-PAGE 上で単一になるまで精製した。N 末端部分アミノ酸配列を解析した結果、本酵素は銅含有アミンオキシダーゼと相同性を示すことが判明した。本酵素は活性中心に 2,4,5-トリヒドロキシフェニルアラニルキノン（TPQ）を有し、ハルマリンの環状イミン構造を酸化的に開裂した。本発表では本酵素の諸性質（酵素動力学定数など）および反応機構について考察する。本研究では、自然界に広くみられる環状イミン構造を開裂する酵素を初めて同定するとともに、細菌からヒトに至るまで、ほぼ全ての生物が有する銅含有アミンオキシダーゼの新規酵素活性を明らかにした。

（本成果は現在、*Nature communications* に投稿中）

cyclic imine, cupper amine oxidase, harmaline

講演番号：3E2a12
講演日時：3 月 26 日 11:21～ 1 号館 E2 会場

好熱性 *Bacillus smithii* 由来インジゴ還元酵素の機能・構造解析
Structure and functional analysis of indigo reductase from *Bacillus smithii*
○米田 一成[1]、吉岡 観紗[1]、櫻庭 春彦[2]、荒木 朋洋[1]、大島 敏久[3] ([1]東海大農、[2]香川大農、[3]大阪工大工)
○Kazunari YONEDA[1], Misa YOSHIOKA[1], Haruhiko SAKURABA[2], Tomohiro ARAKI[1], Toshihisa OHSHIMA[3] ([1]Tokai Univ., [2]Kagawa Univ., [3]Osaka Inst. Tech.)

【目的】
日本の伝統産業である藍染めは藍と呼ばれる蓼（タデ）科植物の葉を発酵させたスクモを原料に用いて、常温高アルカリ条件下で発酵還元により作られる。微生物によるスクモ還元は古来より行われていたが、その実態はほとんど不明であり、職人らの経験と勘に基づいて作業が続けられてきた。そのため同一原料・同一操作に因りながら還元力の異なる染色液ができ、その品質管理が困難な事が報告されている。これまでに藍染め染色液よりインジゴ還元酵素を生産する常温性の好アルカリ性菌の単離や精製酵素の機能解析例はあるが [1)]、酵素の不安定性の問題からインジゴ還元酵素の詳細な機能解析や応用には未だに至っていない。そこで、本研究ではインジゴ還元活性を有する好熱性 *Bacillus* 属細菌である、*B. smithii* に着目し、日本の伝統産業である藍建てにおけるインジゴの還元過程を生化学的視点から解明することを目的とした。
【方法・結果】
B. smithii のゲノム情報から耐熱性インジゴ還元酵素と予測される遺伝子（WP_003354211.1; FMN 依存性 NADH アゾ還元酵素）を同定し、コドンの最適化を行った遺伝子を合成した後、タンパク質発現用ベクターである pET15b ベクターにライゲーションを行った。その後、大腸菌 BL21codon plus (DE3)RIPL を用いて IPTG による遺伝子発現を行った。遺伝子発現産物は Talon コバルトアフィニティーカラムで精製を行い、N_2 ガスを用いた嫌気条件下におけるインジゴカルミン（水溶性インジゴ；インジゴ還元酵素のモデル基質）の還元活性を測定した結果、本酵素がインジゴカルミン還元活性を有すことを明らかにした。基質特異性を調べたところ、メチルレッド、メチルオレンジ、アシッドレッド 88、オレンジ II などのアゾ化合物に対しても反応性があることから、本酵素は広基質特異性酵素であることが明らかになった。さらに、100℃、10 分間の熱処理でも全く失活しない耐熱性の高いインジゴ還元酵素であることが明らかになった。結晶化を行うため、PEG600 を沈殿剤として酵素の結晶化を行ったところ、黄色の単結晶を得ることに成功した。得られた結晶を用いて KEK AR-NE3A ビームラインにおいて X 線回折実験を行ったところ、1.97 Å のデータを取得することができたため、分子置換および、モデル構築を行いインジゴ還元酵素-FMN 複合体の立体構造決定を行った。今後、本酵素の詳細な酵素化学的諸性質の決定および、立体構造の精密化を行う予定である。

1) Suzuki H, Abe T, Doi K, Ohshima T. *Appl Microbiol Biotechnol.* 102:9171-9181, 2018.

Indigo reductase, Thermostable enzyme, Aizome (indigo dyeing)

発表責任者：米田一成（kyoneda@agri.u-tokai.ac.jp）

講演番号：3E2a13
講演日時：3 月 26 日 11:32～ 1 号館 E2 会場

好熱性アーキアに存在する新規色素依存性 L-乳酸脱水素酵素複合体の解析

Evaluation of a novel dye-linked L-lactate dehydrogenase complex from thermophilic archaea.

○里村 武範[1,2]、宇野 紘平[1]、角間 真人[1]、黒沢 則夫[5]、櫻庭 春彦[3]、大島 敏久[4]、末 信一朗[1,2]([1]福井大工、[2]福井大ライフ、[3]香川大農、[4]大阪工大工、[5]創価大)
○Takenori SATOMURA[1,2], Kohei UNO[1], Masato KAKUMA[1], Norio KUROSAWA[5], Haruhiko SAKURABA[3], Toshihisa OHSHIMA[4], Shin-ichiro SUYE[1,2] ([1]Univ. Fukui, [2]Life Univ. Fukui, [3]Kagawa Univ, [4]Osaka Inst. Tech., [5]Souka Univ.)

【緒言】
色素依存性 L-乳酸脱水素酵素（LDH）は、2,6-ジクロロインドフェノール（DCIP）のような人工酸化還元色素存在下で L-乳酸からピルビン酸への酸化反応を触媒する酵素である。我々は、好熱性アーキアのゲノム情報から LDH をコードしていると予測される遺伝子を見出した。LDH をコードしていると考えられる遺伝子は、好熱性アーキアのゲノム内で鉄硫黄クラスター結合モチーフを有した機能未知遺伝子とクラスターを形成していた。本研究では、LDH ホモログの機能同定と本ホモログと遺伝子クラスターを形成している鉄硫黄クラスターモチーフを持つ機能未知遺伝子産物の解析を目的として研究を行った。

【方法・結果】
LDH ホモログをコードする遺伝子を含む遺伝子クラスターを発現するために好熱性アーキア組換えタンパク質発現用ベクターを構築した。 構築した組換えタンパク質発現用ベクターを用いて *S. acidocaldarius* の形質転換を行い、LDH ホモログ遺伝子クラスターの発現を行った。その結果、LDH ホモログタンパク質の発現に成功した。発現タンパク質を精製し、酵素活性を測定したところ LDH 活性を確認することに成功した。また、精製酵素は、LDH 遺伝子と遺伝子クラスターを形成していた遺伝子群の発現タンパク質とヘテロ複合体を形成していた。この複合体 LDH の詳細な機能解析を行ったところ、高い安定性を有する酵素であることが明らかとなった。さらに、本酵素の電子伝達経路を明らかにするために LDH 複合体を電極へ固定化しサイクリックボルタンメトリー解析を行った結果、DCIP のようなメディエーターを介さず直接基質の L-乳酸の電子を電極へ伝達できる直接電子移動（DET）を確認した。これまで DET 反応を行える LDH は、２種類しか報告がなく新規な LDH であることが明らかとなった。

Thermophilic archaea, FAD-dependent dehydrogenase, Direct electron transfer

発表責任者：里村武範（satomura@u-fukui.ac.jp）

講演番号：3E2a14
講演日時：3 月 26 日 11:43～ 1 号館 E2 会場

シアノバクテリアのビオチン生合成経路に見出された新規脱水素酵素の機能と構造に関する研究
Structural and functional analyses of a novel dehydrogenase involved in biotin biosynthesis of cyanobacteria

○榊 渓[1]、大石 恵太[1]、清水 哲[1]、小林 一幾[3]、富田 武郎[1,2]、田中 寛[3]、葛山 智久[1,2]、西山 真[1,2] ([1]東大・生物工学セ、[2]東大・微生物イノベ連携機構、[3]東工大・化生研)
○Kei SAKAKI[1], Keita OHISHI[1], Tetsu SHIMIZU[1], Ikki KOBAYASHI[3], Takeo TOMITA[1,2], Kan TANAKA[3], Tomohisa KUZUYAMA[1,2], Makoto NISHIYAMA[1,2] ([1]BRC, UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Lab. for Chem. Life. Sci, TITech)

ビオチンは水溶性ビタミンであり、生体内において糖や脂肪酸代謝に関与する複数のカルボキシラーゼの補酵素として機能し、全ての生物が利用している。ビオチンの生合成では出発物質が異なる 3 種類の経路が知られているが、経路の後半部は共通の酵素群 (BioF、BioA、BioD、BioB)が反応を触媒し、ビオチンを生合成する。ところが、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 では、ゲノム中に *bioF*、*bioD*、*bioB* は含まれるものの *bioA* が存在しない。我々は、機能未知タンパク質をコードする遺伝子 (*bioU*) が大腸菌 *bioA* の機能を代替すること、シアノバクテリアの *bioU* の破壊株がビオチン要求性を示すことなどを通して *bioU* がビオチン生合成に関与することを明らかにしてきた。BioA はビオチン生合成の後半部における 7-keto-8-aminopelargonic acid (KAPA) から 7,8-diaminopelargonic acid (DAPA) への変換反応を触媒する PLP 依存型アミノ基転移酵素である。我々はこれまでに BioU が BioA の代わりに KAPA から DAPA の反応を触媒するのではなく、NADH 存在下で Lys124 残基を介し KAPA と共有結合し BioU-DAPA 共有結合体を形成することを見出していた。BioU-DAPA 共有結合体を基質とした、BioU の次の反応を担う BioD との反応において dethiobiotin が生成したことから、BioU は BioU-DAPA 共有結合体形成後、NAD^+の作用によって DAPA ではない未知の生合成中間体を生成することを前回大会で報告した。BioD は DAPA から反応中間体 DAPA-carbamic acid を経由して dethiobiotin を生成することから、BioU が不安定な DAPA-carbamic acid を生合成中間体として生成することを予想していた。今回我々は、DAPA-carbamic acid のアナログ分子と BioU (K124A)変異体の複合体結晶構造解析及び変異体解析により、His233-Asp235 catalytic dyad が生合成中間体 DAPA-carbamic acid の生成に重要な残基であることを明らかにした。また、BioU と BioD のカップリング反応において、外因性のアミノ基供与体の非存在下で dethiobiotin が生成したことから、BioU の Lys124 残基の ε-アミノ基が生合成中間体へと供与されることが示唆されていた。この場合、反応後の Lys124 残基の ε-アミノ基はセミアルデヒドへと変化すると考えられるが、MS 分析の結果、Lys124 残基を含むペプチドフラグメントにおいて、セミアルデヒド化に相当する 1.03 Da の質量減少が検出された。従って、BioU の Lys124 残基の ε-アミノ基が生合成中間体への内因性のアミノ基供与体として機能し、自身はセミアルデヒド化することが明らかとなり、BioU が自殺酵素であることが判明した。以上のように、BioU は NAD(H)依存酵素でありながらも、既知の脱水素酵素とは全く異なる反応を触媒する新規の酵素である。

biotin biosynthesis, cyanobacteria, dehydrogenase

講演番号：3E2a15
講演日時：3 月 26 日 11:54～ 1 号館 E2 会場

リンゴ酸デヒドロゲナーゼの構造変化と基質認識メカニズムの関係
Relationship between structure change and substrate recognition mechanism of malate dehydrogenase
○下澤 勇弥[1,2]、西矢 芳昭[1]、佐々本 康平[1,2]、氷見山 幹基[2]、中村 努[2]([1]摂南大院　理工　生命、[2]国立研究開発法人産業技術総合所)
○Yuya SHIMOZAWA[1,2], Yoshiaki Nishiya[1], kouhei sasamoto[1,2], Tomoki Himiyama[2], Tsutomu Nakamura[2] ([1]Grad. School. Sci. Eng. Setsunan Univ., [2]AIST)

【背景・目的】リンゴ酸デヒドロゲナーゼ（MDH）は TCA サイクルなどの生物にとって重要な経路で働く NAD 依存性の酸化還元酵素である。一方で、AST 測定や重炭酸イオン測定などの臨床検査薬用酵素として利用されているほか、免疫検査用標識酵素やバイオセンサーへの応用も期待されている非常に用途の広い酵素である。

MDH は、Open 構造（Apo）に補酵素の NADH と基質であるオキサロ酢酸が結合することで Closed 構造（Holo）にコンフォメーションが変化することが知られている。また、野生型ではオキサロ酢酸と構造がよく似たピルビン酸などの類似物質に対する反応性がほとんどなく、さらに高い基質親和性も併せ持つ。基質特異性や基質親和性は、測定精度や感度に影響する重要な要因であるため、臨床検査薬用酵素として MDH は優れた特性を有する。しかし、それらの優れた酵素特性と構造変化との関係については詳しくわかっていない。そこで、現在市販されている MDH の中で熱安定性・基質親和性に優れた *Geobacillus stearothermophilus* 由来 MDH（gs-MDH）を用いて変異体を作成し、構造変化と基質認識メカニズムの関係の解明を試みた。

【方法・結果】MDH とオキサロ酢酸は、活性中心に存在する 3 つの R とオキサロ酢酸の 2 つのカルボキシル基が静電的に相互作用することで、安定に結合し触媒反応が進行することが知れられている。また、gs-MDH の予測立体構造モデルにより、Open 構造から Closed 構造へのコンフォメーション変化には、オキサロ酢酸の R86、R155 間の架橋が重要であると推察された。そこで基質との相互作用やコンフォメーション変化への影響が考えられる R86 の部位特異的アミノ酸置換変異体を作成し、オキサロ酢酸、ピルビン酸およびグリオキシル酸に対する反応性を比較した。その結果、野生型ではオキサロ酢酸以外の基質には反応性を示さなかったが、変異体ではピルビン酸およびグリオキシル酸に対しても反応性を示した。また、Open 構造（Apo）の結晶構造（1.94Å 分解能）を決定し、予測立体構造モデルと比較した結果、可動ループの高い柔軟性が推察された。

【結論】本研究結果から、gs-MDH の基質認識において活性部位ループ構造のコンフォメーション変化が重要な役割を持つことが示唆された。

malate dehydrogenase, substrate recognition, structure change

発表責任者：西矢芳昭（nishiya@lif.setsunan.ac.jp）

講演番号：3E2p01
講演日時：3 月 26 日 13:50～ 1 号館 E2 会場

土壌から単離した *Penicillium* sp. KU-1 株が生産する新規ポリオール酸化酵素を利用する希少糖 L-Gulose の生産

Production of rare sugar L-Gulose using a novel polyol oxidase produced by *Penicillium* sp. KU-1 isolated from soil

○黒石川 嵩幸[1]、渡邉 彰[2]、吉原 明秀[2,3]、何森 健[2,3]、麻田 恭彦[2]([1]愛媛大院連合農、[2]香川大農、[3]香川大国際希少糖研究教育機構)
○Takayuki KUROISHIKAWA[1], Akira WATANABE[2], Akihide YOSHIHARA[2,3], Ken IZUMORI[2,3], Yasuhiko ASADA[2] ([1]Ehime Univ. of Agric., [2]Kagawa Univ. of Agric., [3]Kagawa Univ. of Int. Inst. of Rare Sugar Res. and Edu.)

【目的】

希少糖とは、自然界に存在量が少ない単糖とその誘導体と定義されたものであり、その種類は多岐にわたる。一部の希少糖は、大量生産技術が確立されるとともに、血糖値上昇抑制作用（D-Psicose）や癌細胞増殖抑制作用（D-Allose）などの有用な生理活性を示すことが明らかとされた。その一方、大量生産技術が確立されておらず、生理活性などの化学的性質が未解明な希少糖が数多く存在している。希少糖である L-Gulose は異性化酵素を利用して L-Sorbose から生成することができるが、平衡比の影響により L-Gulose への変換率は約 10%であり、大量生産することは極めて困難である。そこで、当研究室では、基質から 100%の変換率で生成物が得られる酸化酵素の利用に着目した。本研究では、土壌から単離した *Penicillium* sp. KU-1 株が生産するポリオール酸化酵素を利用し、天然に多量に存在する D-Sorbitol から希少糖である L-Gulose の生産を行った。

【方法】

本菌株を小麦フスマ固体培地で培養し、培養後の培地から Glycine-NaOH 緩衝液（pH 9.0）を用いて粗酵素を抽出した。粗酵素は硫安分画、TOYOPEARL SuperButyl-550C カラムクロマトグラフィーおよび HiPrep DEAE FF カラムクロマトグラフィーにより精製し、部分精製酵素を得た。部分精製酵素は陰イオン交換樹脂 TOYOPEARL DEAE-650M に固定化し、酵素反応に用いた。反応生成物の分析は、HPLC、NMR、比旋光度の測定により行った。

【結果・考察】

本酵素の TOYOPEARL DEAE-650M への固定化率は 100%であり、活性発現率は約 60%であった。D-Sorbitol を基質とする反応における生成物は、HPLC 分析、NMR 分析および比旋光度の測定により、L-Gulose であることが明らかとなった。固定化酵素を用いる反応により、D-Sorbitol から 90%以上の変換率で L-Gulose を生成することに成功した。本酵素は多種類のポリオールに活性を示すことから、L-Gulose 以外にも複数種の希少糖の生産への応用が期待できる。また、生産した L-Gulose の生理活性（α-Glucosidase の阻害活性など）についても解析を行っている。

Rare sugar, Polyol oxidase, *Penicillium*

発表責任者：黒石川 嵩幸（kuroishikawa1217@gmail.com）

講演番号：3E2p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ 1 号館 E2 会場

Arthrobacter globiformis 由来トランスケトラーゼを用いたヘプトース生産
Production of heptose by transketolase from *Arthrobacter globiformis*
○山根 一倖[1]、久住 優花[1]、加藤 志郎[2]、望月 進[2]、吉原 明秀[2]、秋光 和也[2]、何森 健[2]([1]香大農、[2]香大・希少糖)
○ Kazuyuki YAMANE[1], Yuka KUSUMI[1], Shirou KATOU[2], Susumu MOTIDUKI[2], Akihide YOSHIHARA[2], Kazuya AKIMITU[2], Ken IZUMORI[2] ([1]Kagawa Univ., [2]Kagawa Univ. Rare Sugar Res. Educ.)

［目的］ トランスケトラーゼは、炭素数 5 のケトース(D-キシルロース-5-リン酸)から 2 つの炭素を受け取り、これを炭素数 5 のアルドース(D-リボース-5-リン酸)に転移させ、炭素数 7 のケトース(セドヘプツロース 7-リン酸)を生産する。リン酸化した糖に作用する酵素である。これまでの研究で *Arthrobacter globiformis* M30 由来のトランスケトラーゼは、リン酸化されていない炭素数 4 のケトース(L-エリスルロース)と炭素数 4 のアルドース(L-スレオ―ス)を基質とし炭素数 6 の L-ソルボースを生産することを明らかとした。本研究では同様の酵素を用いて、炭素数 7 のヘプトースを生産する可能性を検討した。

［方法］ *A. globiformis* M30 由来トランスケトラーゼを発現する組換え大腸菌を培養して、IPTG の添加により酵素の発現を誘導した。遠心分離により得られた菌体を超音波破砕し、酵素液を調製した。ドナー基質として L-エリスルロース、レセプター基質に炭素数 5 の 8 種類のアルドペントースを用い転移反応を試みた。反応は、トランスケトラーゼ 2 U、基質濃度を 1%として 30℃で行い、HPLC で酵素反応を追跡した。反応により新たに生ずる生産物の有無を検出することで、炭素数 7 のヘプトースを生産する可能性を検討した。また、新たな生産物について Hitachi gelpack GL-P2611 カラムを用いた HPLC により単離し、生産物の同定を試みた。

［結果］ 8 種類のアルドペントースを用いて *A. globiformis* M30 由来トランスケトラーゼによる酵素反応を行った結果、すべてのアルドペントースにおいて経時的に生産物の増加が確認された。
次に、生産物に関する検討を行った。D-リボースを基質として長時間反応させた場合に、生産物の転換率は 63.8%に達した。反応で得られた生産物を、HPLC を用いて単一に精製することが出来た。単離した生産物の各種機器分析により、ヘプトースであることが示唆された。これらの結果から、本トランスケトラーゼは、リン酸化していない炭素数 4 のケトース(L-エリスルロース)と炭素数 5 のアルドペントースから炭素数 7 のヘプトースを生産することが明らかとなった。
遊離のヘプトースは自然界にほとんど存在しない希少糖であり、多くのヘプトースを生産できる可能性が期待される。

Rare sugar, Transketolase, Heptose

発表責任者：山根一倖（s18g653@stu.kagawa-u.ac.jp）

講演番号：3E2p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ 1 号館 E2 会場

麹菌 hydrophobin RolA-cutinase CutL1 間の相互作用における親和性は N 末端側配列に依存する
Affinity of fungal hydrophobin RolA immobilized on solid surfaces for cutinase CutL1 depends on N-terminal sequence of RolA.

○佐藤 一[1]、田中 拓未[1]、寺内 裕貴[1]、高橋 徹[1]、七谷 圭[1]、吉見 啓[2]、阿部 敬悦[1,2]([1]東北大院・農、[2]東北大・未来研)
○Hajime Satou[1], Takumi Tanaka[1], Yuki Terauchi[1], Toru Takahashi[1], Kei Nanatani[1], Akira Yoshimi[2], Keietsu Abe[1,2] ([1]Grad. Sch. Agric. Sci. Tohoku Univ., [2]NICHe Tohoku Univ.)

[研究背景]

麹菌 *Aspergillus oryzae* は生分解性プラスチック polybutylene succinate-*co*-adipate (PBSA)を分解し，その際 hydrophobin RolA と PBSA 分解酵素 cutinase CutL1 を共発現する。[1)] hydrophobin は糸状菌に特有の両親媒性タンパク質で，PBSA に吸着した RolA は CutL1 と相互作用し，PBSA 表面に CutL1 を濃縮して分解を促進する。我々は以前の研究で，RolA の N 末端側領域に存在する正電荷残基と CutL1 分子表面に存在する負電荷残基が協奏的に作用するイオン的相互作用が，RolA-CutL1 間の相互作用に重要であることを見出した。また，高橋らによってモデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* の hydrophobin RodA も CutL1 とイオン的相互作用することが見出された。[2)] しかし，同研究において RodA-CutL1 間の結合解離定数は，RolA-CutL1 間との値と比べ約 40 倍大きく，相互作用が弱いことが示された。結合解離定数に大きな差を生じた要因には，hydrophobin N 末端側領域の二次構造やアミノ酸配列に加え，hydrophobin コア部分の高次構造の関与が考えられた。そこで本研究では，RolA - RodA 間で N 末端側領域の全域または部分的な配列を入れ替えたキメラ変異体を作製し，相互作用に hydrophobin 側のどの領域・アミノ酸配列が重要かを検証した。

[方法・結果及び考察]

作製したキメラ変異体の CutL1 に対する親和性を Quartz Crystal Microbalance 法で評価した。その結果、RolA WT 由来の N 末端を導入した RodA キメラ変異体では、RodA WT と比較して有意に親和性が上昇し、反対に RodA WT の N 末端配列を導入した RolA キメラ変異体では RolA WT よりも有意に親和性が低下した。このことから、RolA-CutL1 間相互作用には RolA コア部分の高次構造ではなく、主に N 末端側領域が寄与していることが明らかとなった。また、作製した変異体の中でも N 末端に正電荷密度の高い配列を有するキメラ変異体で特に親和性が上昇する傾向が見られたことから、相互作用においては一次配列よりも電荷密度の寄与の方が大きいことが示唆された。
さらに現在、相互作用に寄与する正電荷残基を非電荷残基に置換した変異体も作製しており、それら変異体の CutL1 WT に対する親和性の解析結果も併せて報告する予定である。

1）Takahashi T., et al. *Mol. Microbiol.* 57:1780–1798 (2005)
2）Takahashi T., et al. *Mol. Microbiol.* 96:14-27 (2015)

hydrophobin, interaction, Quartz Crystal Microbalance

発表責任者：佐藤一（hajime.satou0721@gmail.com）

講演番号：3E2p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ 1 号館 E2 会場

芳香族ジカルボン酸に対する新規可逆的脱炭酸酵素の探索

Screening of a novel reversible decarboxylase towards aromatic dicarboxylic acid

西田 穂高、○青野 陸、吉原 朋矢、木野 邦器（早大院・先進理工・応化）
Hotaka Nishida, ○Riku AONO, Tomoya Yoshihara, Kuniki Kino (Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

【背景・目的】近年、化石資源の燃焼により生じる二酸化炭素などの温室効果ガスが問題となっている。低炭素化社会の実現に向け、二酸化炭素の排出量を抑制するだけでなく、排出された二酸化炭素を固定して汎用性のある有用化合物を合成する技術の開発は有効であると考えられる。

芳香族カルボン酸は、医薬原料のほか化成品やポリマー原料として有用な化合物であり、工業的には主にアルキルベンゼンの酸化により化学合成されている。一方、微生物由来の可逆的脱炭酸酵素を用いて、γ-resorcylic acid や salicylic acid といった芳香族モノカルボン酸の合成法が報告されている。基質特異的に脱炭酸反応を触媒する酵素の中には、可逆的に炭酸固定活性を有するものが知られており、当該酵素を利用することで炭酸を固定して芳香族カルボン酸を効率的に合成することが可能になる。しかしながら、その報告例は依然として少なく、合成可能なカルボン酸の種類は限られている。また、これまでに報告されている可逆的脱炭酸酸酵素では対象となる脱炭酸反応の基質が芳香族モノカルボン酸であり、芳香族ジカルボン酸を基質とする酵素の報告例はない。そこで、本研究では芳香族ジカルボン酸が脱炭酸反応の基質となる可逆的脱炭酸酵素の探索を検討した。

【方法・結果】芳香族ジカルボン酸に対する可逆的脱炭酸酵素を取得するため、まず芳香族ジカルボン酸を資化する微生物の探索を試みた。各種土壌サンプルについて、芳香族ジカルボン酸である 3-hydroxyphthalic acid または 4-hydroxyisophthalic acid (4HIPA) を選択し、それらを唯一の炭素源とする培地を用いて集積培養を行った。その結果、4HIPA を炭素源として生育する微生物試料を取得することができた。得られた微生物試料について、4HIPA に対する可逆的脱炭酸活性を評価したところ、当該活性を有する微生物試料を 1 種類取得することができた。その試料から微生物株の単離操作を行い、目的活性を有する微生物株を 1 株得ることができ、HTK3 株と命名した。16S rRNA 解析の結果、HTK3 株は Ralstonia 属に分類される細菌であることが示唆された。

次に、HTK3 株の無細胞抽出液に対して 4HIPA 脱炭酸活性を指標として多段階のカラムクロマトグラフィーによる精製を行った。その結果、約 36 kDa のタンパク質を含む画分が得られた。この画分について活性評価を行ったところ、目的の可逆的脱炭酸活性を確認することができた。さらに、当該タンパク質画分の N 末端配列解析を行い、その 15 残基を明らかにした。

Reversible decarboxylase, Aromatic dicarboxylic acid, Screening

発表責任者：木野邦器（kkino@waseda.jp）

講演番号：3E2p05
講演日時：3 月 26 日 14:34～ 1 号館 E2 会場

4-hydroxyisophthalic acid に対する新規可逆的脱炭酸酵素の同定と遺伝子解析

Identification of a novel reversible decarboxylase towards 4-hydroxyisophthalic acid

○吉原 朋矢、青野 陸、木野 邦器（早大院・先進理工・応化）
○Tomoya YOSHIHARA, Riku AONO, Kuniki KINO (Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

【背景・目的】我々の生活を豊かにしている多様な機能性化成品製造の多くは、二酸化炭素の純増を招く化石資源を原料とする従来型の化学工業プロセスに依存しており、低炭素化社会への流れに逆行している。一方、バイオマス利用技術はセルロースやヘミセルロースからの糖化が主流で、アルコールや有機酸などの基幹物質を生産しているが、高機能性ポリマーの創出には芳香族骨格を有する化合物を原料として低炭素化に貢献する新たなバイオプロセスの開発が必要である。汎用ポリエステルの原料である terephthalic acid などの芳香族カルボン酸は、触媒空気酸化法によって製造されているが、微生物由来の脱炭酸酵素の中には、非酸化的に炭酸を固定して芳香族カルボン酸を合成する炭酸固定酵素が報告されている。しかしながら、既知の可逆的脱炭酸酵素では芳香族モノカルボン酸合成の報告しかない。我々は、当該プロセスの拡張を目指して、芳香族ジカルボン酸である 4-hydroxyisophthalic acid (4HIPA) に対して可逆的脱炭酸活性を示す *Ralstonia* sp. HTK3 株を取得し、そのタンパク質活性画分の N 末端 15 残基を明らかにした。本研究では当該酵素をコードする遺伝子の取得と解析を行った。

【方法・結果】取得したタンパク質活性画分の遺伝子配列を明らかにするため、まず *Ralstonia* sp. HTK3 株より RNA を抽出し、3’末端に PolyA 配列を付加した。その後、逆転写により当該タンパク質配列および PolyA 配列を含む cDNA を取得した。N 末端 15 残基に対応する縮重プライマーと PolyT 配列を有するプライマーを構築し、取得した cDNA を鋳型に PCR を行うことで当該タンパク質の遺伝子を含む配列を増幅した。さらに、この増幅産物を TA クローニングにより pANT ベクターへ導入した。当該プラスミドに対しシーケンス解析を行い、目的酵素をコードすると推定される配列を明らかにした。続いて、大腸菌のシステムを利用して当該遺伝子を高発現させた組換え型タンパク質を調製し、その活性評価を行った。その結果、当該組換え型タンパク質は 4HIPA に対する可逆的脱炭酸活性を示し、取得した配列が目的酵素をコードする遺伝子配列であることを確認することができた。この配列を既知の可逆的脱炭酸酵素と比較したところ、その相同性は 50%前後であった。本酵素は芳香族ジカルボン酸を基質とする初めての可逆的脱炭酸酵素であり、既知の可逆的脱炭酸酵素とは一次構造においても異なる新規酵素であることを明らかにした。

Reversible decarboxylase, 4-Hydroxyisophthalic acid

発表責任者：木野邦器（kkino@waseda.jp）

講演番号：3E2p06
講演日時：3 月 26 日 14:55～ 1 号館 E2 会場

植物における翻訳後セレン取り込みによる NAD 依存 GAPDH の活性化機構
Activation mechanism of NAD-dependent GAPDH by post-translational selenium incorporation in plant
高貝 俊生[1]、高山 せい花[2]、小竹 未季子[2]、廣瀬 啓自[2]、米田 大輝[2]、○武田 徹[1,2] ([1]近畿大院、[2]近畿大農)
Toshiki Takagai[1], Seika Takayama[2], Mikiko Kotake[2], Keiji Hirose[2], Daiki Yoneda[2], ○Toru Takeda[1,2] ([1]Kindai Univ. Graduate School, [2]Kindai Univ. of Agric.)

【目的】酸素や硫黄と同族のセレン（Se）は、ヒトや動物の体内で 21 番目のアミノ酸であるセレノシステインを活性中心に有する含 Se タンパク質の機能に大きく貢献していることから、生命維持において必須の元素である。同時に、Se は強い毒性を示す元素でもあり、高濃度 Se 蓄積は、セレノーシスと呼ばれる重篤な障害を引き起こす。一方、植物における Se は、植物には含 Se タンパク質が存在しないことと、ヒト同様にセレノーシスが確認されていることから、毒性元素であるとされてきた。しかし、植物には、土壌環境からの Se 吸収と、吸収後の Se 代謝機構が備わっており、環境中の Se 循環において、植物はヒトや動物への Se 化合物供給源として重要な役割を担っている。以上のことを踏まえ、本研究室では、モデル植物のシロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）を用いて、植物における Se の新規生理機能の解明を行ってきた。その結果、Se 添加によって、解糖系中のグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素（GAPDH）の活性部位である Cys のチオール基（-SH）への Se 挿入によって、セレノ―ル基（-SeH）が生成され、活性部位の求核性増大に起因する酵素活性の増加が明らかになった。そこで本研究では、Se による酵素タンパク質の機能向上のメカニズムをより詳細に解明することを目的に、高い Se 蓄積能を示すブロッコリー(*Brassica oleracea*)の NAD-GAPDH への翻訳後 Se 取り込みによる活性化機構について検討した。
【方法】ブロッコリー種子（タキイ種苗）を、1/2 ムラシゲスクーグ培地用混合塩類、及び各濃度のセレン酸を含む脱脂綿培地上に播種し、春化処理（4℃、48~72 時間)、および暗化処理（暗黒条件、48~72 時間）を経て、人工気象機にて 3 日間栽培（明期 14 時間、暗期 10 時間、25℃、）した。NAD-GAPDH 活性は、NADH の 340 nm における吸光度変化を分光学的に測定することにより求めた。
【結果】200 μM 以上の高濃度 Se 添加群において、地上部組織由来の GAPDH 活性が顕著に増加していることから、酵素タンパク質への翻訳後 Se 取り込みが推測された。そこで次に、Se 添加株とコントロール株からそれぞれ GAODH を電気泳動的に単一のバンドになるまで、精製倍率 956.9 倍および 1534 倍、回収率 1.785%および 1.256%で生成した。コントロール株から精製した GAPDH の Se による活性化は、in vitro でも確認されたことから、活性中心にセレノ―ル基が生成している可能性が強く示唆された。現在、それぞれの精製酵素を MALDI-TOF/MS で解析し、Se 添加株の GAPDH における Se 挿入形式の確認を行っている。また、GAPDH への Se 挿入におけるグルタチオン（GSH）の関与について、総 GSH 量、および GSH レドックスバランスより考察する。

selenium, post-translational modification, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

発表責任者：武田　徹（t_takeda@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：3E2p07
講演日時：3 月 26 日 15:06～ 1 号館 E2 会場

鉄型ニトリルヒドラターゼの翻訳後活性化因子の解析

Analysis of post-translational maturation of the nitrile-converting enzyme

○橋本 義輝、宇部 優子、熊野 匠人、小林 達彦（筑波大院・生命環境）
○Yoshiteru Hashimoto, Yuko Ube, Takuto Kumano, Michihiko Kobayashi (Univ. of Tsukuba)

[背景・目的]

ニトリルをアミドに変換するニトリルヒドラターゼ（NHase）には配位する金属が異なる２種類が存在する。かつて（アクリロニトリルからの）アクリルアミド工業生産の第二世代菌である *Pseudomonas chlororaphis* B23 株の NHase は Fe を、現在のアクリルアミド・ニコチンアミド工業生産 *Rhodococcus rhodochrous* J1 株の NHase は Co をそれぞれ含む。NHase はα，βサブユニットから構成されており、アポ酵素として生成した後、（αサブユニットに存在し金属に配位する）システイン残基の翻訳後酸化（システインスルフィン酸、システインスルフェン酸への酸化）・金属イオンの配位という翻訳後修飾を受け活性型酵素（ホロ酵素）となる。我々は、Co 型 NHase はこれまでに例のない新規かつユニークな機構で翻訳後活性化されることを発見し、本機構を“Self-Subunit Swapping”と命名した[(1-2)]。

本研究では､未だ分かっていない Fe 型 NHase の翻訳後活性化機構の解明を目指して実験を行った。

[方法・結果]

B23 株の Fe 型 NHase のα，β両サブユニット遺伝子（*nhpAB*）のすぐ下流に存在する NhpC は、（ウレアーゼ成熟過程で重要な Ni 取り込みに関わる）UreG、（ヒドロゲナーゼ成熟過程の Ni 取り込みに関わる）HypB、（Co 含有コバラミンの生合成に関わる）CobW と弱いながらも相同性を示す。NHase 構造遺伝子（*nhpAB*）のみを持つ DNA 断片、NHase および NhpC 遺伝子（*nhpABC*）を持つ DNA 断片を PCR によりそれぞれ増幅後、pET-24a(+)を使用して発現プラスミドを構築した。各々のプラスミドを大腸菌 BL21-CodonPlus(DE3)-RIL 株に導入し（以下、*nhpAB* 発現株および *nhpABC* 発現株とする）、Fe を含む栄養培地で、IPTG 添加により誘導発現させ、様々な温度で培養を行った。集菌した後、無細胞抽出液を調製し SDS-PAGE に供した結果、*nhpC* 遺伝子の有無に関わらず NHase のバンドが確認できた。しかし、いずれの条件においても NhpC のバンドは確認できなかった。ガスクロマトグラフィーによる活性測定を行った結果、*nhpABC* 発現株のみ NHase 活性が認められた。以上のことから、NhpC は本酵素の翻訳後の活性発現に関与するアクセサリータンパク質であり、B23 株では、Co 型 NHase の翻訳後成熟化に関わる Self-Subunit Swapping シャペロンとは異なる機構で NHase は翻訳後活性化されることが示唆された。

(1) ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA***, **105**, 14849 (2008); (2) ***J. Biol. Chem.*, 284,** 14930-14938 (2009)

nitrile, amide, holoenzyme

講演番号：3E2p08
講演日時：3 月 26 日 15:17～ 1 号館 E2 会場

メタロ-β-ラクタマーゼ IMP-1 における亜鉛結合解析
Analysis of Zinc binding in metallo-ß-lactamase IMP-1
○加藤 善輝、野澤 裕介、古川 那由太、井深 章子（新潟薬大・応生科）
○ Yoshiki KATO, Yusuke NOZAWA, Nayuta FURUKAWA, Akiko IBUKA (Niigata Univ. Pharm.Appe. Life Sci.)

【目的】
β-ラクタム系抗生物質は細菌の細胞壁合成酵素を阻害することで細菌の生育を阻害する。β-ラクタマーゼは、β-ラクタム系抗生物質のβ-ラクタム環を加水分解する。β-ラクタマーゼは、セリン残基を触媒残基とするセリン-β-ラクタマーゼと、活性中心に亜鉛イオンを有するメタロ-β-ラクタマーゼ(metallo-β-lactamase、MBL)に分類される。MBL はモノバクタム系以外のすべてのβ-ラクタム系抗生物質に活性を示し、臨床で有効な阻害剤が存在しないため、その拡散が特に問題となっている。MBL はさらに3つのサブグループ B1～B3 に分類され、サブクラスによって亜鉛結合数などが異なる。B1 酵素の活性部位には 2 つの亜鉛イオンが結合しており、 1 つ目の Zn^{2+}は 3 つのヒスチジンを有する 3H サイト(His116、H118、 H196)、 2 つ目の Zn^{2+}は DCH サイト(Asp120、 Cys221、 His263)に結合する。 本研究では、B1 酵素である IMP-1 を用い、その Zn^{2+}結合部位に変異を導入した変異型酵素を作成し、活性と亜鉛結合の関係を明らかにすることを試みる。
【方法】
IMP-1 において、1つ目の Zn^{2+}に配位する His116 と His118 をそれぞれ Ala に置換した H116A+H118A、His196 を Ala に置換した H196A、2つ目の Zn^{2+}に配位する Asp120、Cys221 をそれぞれ Ala、Gly に置換した変異体 D120A、C221G を大腸菌 BL21(DE3)pLysS で発現させた。HisTrap FF カラムを用いて精製後、His タグの除去を行い、速度論的解析を行った。
【結果および考察】
1 つ目の Zn^{2+}結合部位の二重変異体 H116A+H118A は、セフォタキシムに対して活性を示さなかった。H116A+H118A は、His タグの除去を行った後に HisTrap FF カラムに吸着する現象が確認された。これは、IMP-1 の亜鉛結合部位の構造に変化が生じたことによって、この部分で HisTrap FF カラムに吸着したのではないかと考えられる。H196A は IMP-1 野生型酵素と比べて高い活性を示した。また、H116A+H118A と H196A の 2 つの変異体では、安定性の低下が確認された。2つ目の Zn^{2+}結合部位に変異を導入した D120A は、セフォタキシムに対して活性を示さなかったが、同じ Zn^{2+}結合部位の変異型酵素 C221G はセフォタキシムに対して活性を示した。現在、残りの Zn^{2+}結合部位に変異を導入した変異型酵素を作成し、速度論的解析と金属含量の測定を行っている。

metallo-ß-lactamase, kinetics, Zinc protein

講演番号：3E2p09
講演日時：3 月 26 日 15:28～ 1 号館 E2 会場

ピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ 1 のアロステリック制御の解明

The allosteric regulation of pyruvate dehydrogenase kinase 1

○廣政 恭明、熊野 友里花、海谷 京香、西本 悦子（九大院農）
○ Yasuaki HIROMASA, Yurika KUMANO, Kyoka KAIYA, Etsuko NISHIMOTO (Kyushu University)

ヒトピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体(PDC)は、ミトコンドリア内に局在し、解糖系で生成されたピルビン酸をアセチル CoA に不可逆的に変換する。PDC の活性は、E1 から E3 の３種の構成酵素の連携反応により果たされる。この反応は、解糖生成物を TCA サイクルに運ぶ唯一の経路であるため、その反応調節は代謝制御において重要である。PDC の機能は、特異的酵素であるピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ(PDK)が触媒するリン酸化により制御される。PDK はこれまで、４種のアイソザイムが発見され、本研究では、がん細胞で特異的に発現量が多く観察される PDK1 の生化学的性質、PDC との相互作用について明らかにし、生体内で広く発現する PDK2 と比較した。

PDK1 は C 末端ドメインと N 末端ドメインの２つのドメインがあり２量体で存在する。N 末端ドメインには、ピルビン酸結合部位とリポイル基結合部位があり、C 末端ドメインには活性部位が存在する。さらに C 末端構造には、テール構造を有し、双方のテール構造は一方のサブユニットに結合する(クロスアーム構造)。まず、テール構造に存在する Trp の蛍光を指標にし、PDK1 の基質である ATP や ADP、ピルビン酸との相互作用を調べた。

その結果、基質とピルビン酸によるアロステリック効果について、ADP と PDK1 との相互作用は、ピルビン酸の PDK1 への結合により強くなった。一方、ATP と PDK1 との結合は、ピルビン酸により低下した。さらに、リガンド存在下における PDK1 とリポイルドメイン(PDC)の相互作用を分析用超遠心により測定すると、ピルビン酸とヌクレオチド存在下において解離することが分かった。これらのことから、ピルビン酸による PDK1 の活性阻害が、ヌクレオチドとの相互作用の変化、さらにはリポイルドメインとの解離により生じることが示唆された。さらに、リガンド結合による C 末端に存在する Trp の蛍光寿命変化や蛍光異方性より、構造変化が生じていた。

これらの結果より、PDK1 とリガンドとの結合によるアロステリック効果による構造変化は、PDK2 のそれと類似のものであることが分かった。しかし、PDK2 に比べアロステリック効果は弱いことが明らかとなった。

Allosteric regulation, protein complex, fluorescence

発表責任者：廣政恭明（hiromasasr@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3E2p10
講演日時：3 月 26 日 15:39～ 1 号館 E2 会場

放線菌トランスグルタミナーゼの基質認識部位の探索

Molecular insights into the mechanism of substrate recognition of *Streptomyces* transglutaminase

東海 彰太[1]、裏地 美杉[2]、○畑中 唯史[1] ([1]岡山生物研、[2]神戸大院・科技イノベ)
Shota Tokai[1], Misugi Uraji[2], ○Tadashi Hatanaka[1] ([1]RIBS, Okayama, [2]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov. Kobe Univ.)

[背景と目的] 放線菌由来トランスグルタミナーゼ（TGase）は、タンパク質中のグルタミンとリジンの側鎖間でペプチド結合を作り、タンパク質同士を架橋させる接着剤として広く使われている食品加工用酵素である。TGase の酵素反応では、アスパラギン酸残基がアシル基受容体リジンのアミノ基を活性化し、活性中心システインにトラップされたアシル基供与体グルタミンの側鎖とペプチド結合を形成する。しかしながら、これまで基質認識部位については明らかにされていない。本発表では、2 種の TGase 間で、キメラ酵素を作成し、基質認識を担う部位を特定するとともに、TGase の好適基質配列の同定を目的とする。

[結果と考察] *Streptomyces cinnamoneus* NBRC13864 株から、ゲノム DNA を調整し、MiniON シークエンサー（オックスフォードナノポア・テクノロジー社製）により、1 本のコンティグ配列につながったドラフトゲノム配列を得た。市販品である*S. mobaraensis* NBRC13819 株由来 TGase（SMTG）遺伝子の相同配列検索を行い、*S. cinnamoneus* NBRC13864 株由来 TGase（SCTG）遺伝子情報を得た。我々が見出した放線菌強発現プロモーターscmp の下流に、SCTG、SMTG、キメラ酵素遺伝子を挿入した発現ベクターを作成し、*S.lividans* 1326 株形質転換体を得た。これら形質転換体を、2%グリセロール, 0.8%K_2HPO_4, 0.05%$MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5% ポリペプトン, 0.5%酵母エキスを含む培地で、30℃, 150rpm, 5 日間培養を行い、培養上清を遠心にて回収した。SCTG、SMTG および N 末端側に SCTG,C 末端側に SMTG 配列をもつキメラ酵素（CM）の 3 者の培養上清に活性を認め、陰イオン交換体による簡易精製を行った。精製酵素について、アシルドナーとして Z-Gln-Gly を用い、カイネティクス・パラメーターを比較した。また、ウシ由来カゼインのトリプシン・キモトリプシン消化物を用い、LC-MS により、基質となる配列を探索し、2 種のペプチド（VLPVPQK および AVPYPQR）を同定した。キメラ酵素 CM の基質認識を含めた諸性質は、SMTG に類似していることから、放線菌 TGase の C 末端側に基質認識に関わる部位の存在が示唆された。

transglutaminase, *Streptomyces*

発表責任者：畑中　唯史（hatanaka@bio-ribs.com）

講演番号：3E2p11
講演日時：3 月 26 日 16:00～ 1 号館 E2 会場

タマネギ由来催涙因子合成酵素の触媒機構
Catalytic Mechanism of Onion Lachrymatory Factor Synthase
○佐藤 優太[1]、荒川 孝俊[1,2]、高辺 潤平[1]、青柳 守紘[3]、加藤 雅博[3]、鴨井 享宏[3]、正村 典也[3]、柘植 信昭[3]、今井 真介[3]、伏信 進矢[1,2] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]東大微生物連携機構、[3]ハウス食品・中央研究所)
○Yuta SATO[1], Takatoshi ARAKAWA[1,2], Jumpei TAKABE[1], Morihiro AOYAGI[3], Masahiro KATO[3], Takahiro KAMOI[3], Noriya MASAMURA[3], Nobuaki TSUGE[3], Shinsuke IMAI[3], Shinya FUSHINOBU[1,2] ([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Central R&D. Inst., House Foods Group Inc.)

【背景】催涙因子合成酵素 LFS は、タマネギの催涙因子 *syn*-プロパンチアール *S*-オキサイド(PTSO)を合成する反応を触媒する。タマネギの細胞に存在するシステイン誘導体イソアリインは、細胞が損傷を受けると 1-プロペンスルフェン酸(PSA)へと分解される。PSA は非酵素的に直ちに縮合する短命な化合物だが、LFS 存在下では一部が分子内水素転位により PTSO に変換され大気中へ飛散し催涙効果を発揮する。LFS は、スルフェン酸やチアール *S*-オキサイドという珍しい含硫官能基の反応を触媒することでタマネギの硫黄代謝経路に関わる、興味深い酵素である。しかし、LFS は既知タンパク質と明確な相同性を持たず基質・生成物も不安定なため、その触媒機構は明らかになっていない。本研究では、結晶構造解析と構造情報を元にした機能解析を行い LFS 触媒機構の解明を目指した。
【方法】大腸菌で異種発現したタマネギ LFS を Ni アフィニティおよびゲル濾過カラムクロマトグラフィによって精製した。PSA のアナログ分子であるクロチルアルコールと精製 LFS を共結晶化し、X 線回折実験によって複合体構造を決定した。また、野生型と同様に発現・精製した変異体 LFS を用い、酵素反応によって生成する PTSO 量を HPLC で測定した。アラニン変異体の PTSO 合成量を野生型と比較することで触媒反応に重要な残基を特定し、さらに側鎖の似たアミノ酸への変異体と比較することで残基の役割を推定した。
【結果】1.8 Å の分解能で LFS とクロチルアルコールの複合体構造を決定した。LFS 分子中央にあるポケット内に、PTSO に似た配向をとったクロチルアルコールの電子密度が観測された。クロチルアルコールはグルタミン酸と 2 つのチロシンの側鎖によって安定化されており、特にグルタミン酸残基は水素が転位する炭素とも近い位置に存在していた。これらの残基のアラニン変異体は活性が 1%未満に低下し、触媒反応への大きな関与が示唆された。更なる変異体の活性測定により触媒反応における役割を推定し、「LFS はグルタミン酸とチロシン側鎖による水素結合で PSA の配向を PTSO に似たものに強く限定し、グルタミン酸側鎖を中継した水素転位を促すことで PTSO を合成する」という、触媒機構を提唱した。
【展望】ネギ属植物の硫黄代謝物は様々な生理活性を持つ。中には抗酸化作用などヒトの健康に役立つ活性もあり、近年注目を集めている。本研究により二次代謝初期におけるタマネギ硫黄化合物の挙動が明らかとなったことで、健康効果の期待される硫黄化合物について、より詳細な生成過程やヒトが摂取した際の動態の理解、潜在的な健康効果の最大化につながると考えられる。

Crystal structure, Organosulfur compound, Plant enzyme

発表責任者：佐藤優太（sato-yuta463@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3E2p12
講演日時：3 月 26 日 16:11～ 1 号館 E2 会場

馬尿酸加水分解酵素の機能改良

Improvement of hippurate hydrolase

○今井 皐[1]、名越 健太郎[2]、新木 翔太[2]、馬場 利明[3]、西矢 芳昭[1,2] ([1]摂南大院理工生命科学専攻、[2]摂南大理工生命科学、[3]ニプロ総研第三研究開発)
○Satsuki IMAI[1], Kentaro NAGOSHI[2], Shota SHINKI[2], Toshiaki BABA[3], Yoshiaki NISHIYA[1,2] ([1]Grad. Sch. Sci. Eng., Setsunan Univ., [2]Life Sci., Setsunan Univ., [3]NIPRO R&D Lab.)

【背景および目的】
有機溶剤であるトルエンやキシレンは塗装業などで大量に取扱われており，暴露された作業者の体内への蓄積は様々な生体機能障害を引き起こすとされている。これら有機溶剤は吸入によって体内に取り込まれ、シトクロム P450 やアルコールデヒドロゲナーゼなどの作用を受けた後、最終的に馬尿酸やメチル馬尿酸として尿中に排出される。有機溶剤の暴露による健康被害を未然に防ぐため、有機溶剤取扱作業者には、尿中の有機溶剤代謝物量の測定などを含む特殊健康診断の受診が義務付けられている。現在の診断では HPLC を用いた測定が行われているが，操作が煩雑でスループットが低い．酵素的測定法が開発できれば，有機溶剤代謝物量の簡便かつ多検体迅速測定が可能となる．
当研究室では，スクリーニングにより馬尿酸およびメチル馬尿酸を加水分解する酵素（馬尿酸加水分解酵素）を新たに見出した．しかしながら，その反応性は低く，特にメチル馬尿酸に低反応であった．そこで，ランダムミュータジェネシス，ハイスループットスクリーニングにより馬尿酸およびメチル馬尿酸への反応性が向上した変異体を複数取得した．本研究では，本酵素を実用レベルとするため、モデル構造をもとに活性部位周辺の変異体を作成し，特性を評価した．

【結果および考察】
シロイヌナズナ由来 IAA-アミノ酸加水分解酵素の構造（PDB ID：1XMB）に基づき，ホモロジーモデリングにより馬尿酸加水分解酵素のモデル構造を作成した．メチル馬尿酸を活性中心と予測される領域にフィッテイングさせたところ，メチル基と W164 残基との距離が短く，立体障害が生じると予測された．この残基の変異最適化を検討したところ，メチル馬尿酸への反応性は A≧G＞L＞I＞V＞野生型の順で向上した．V や I の反応性向上レベルが低かったのは，Cα近傍の枝分かれが基質の活性部位への入り込みを阻害すると考えられる．
現在，メチル馬尿酸に最も反応性の高い W164A とランダムミュータジェネシスにより得られた反応性向上変異との多重変異体を作成中である．
今後，最適変異体を選定するとともに，測定系の確立を検討し，実用化レベルへさらに近づけたい．

hippuric acid, hydrolase, toluene

講演番号：3E2p13
講演日時：3 月 26 日 16:22～ 1 号館 E2 会場

バイオ研究者が考えた HI・AI 融合型人工タンパク質設計技術
Fusion of Human and Artifical Intelligence for Artifical Protein Design
○伊藤 創平、中野 祥吾（静県大 食栄）
○Sohei ITO, Shogo Nakano (Univ. of Shizuoka)

タンパク質は、配列相同性が 40%以上あればほぼ同一の立体構造と機能、わずか 20%程度の相同性でも似たような立体構造と機能を持ちます。多くのバイオ研究者は、この配列相同性が高い領域に保存された構造と機能の関係性に注目、時に合理的な改変を行い、人々の生活に資する技術を構築してきました。しかし、反応性や結合能などの機能が保存されていても、生産性や安定性などが異なるタンパク質は多数存在します。時に、活性部位や相互作用領域が完全に保存されていても、機能が異なることもあります。その理由を合理的に考え、改変、応用利用に結びつけることは困難でした。

8 年ほど前、大学院生だったN君は、50 程度の相同な酵素の配列と立体構造を比較、合理的な変異を考案、実験してみたところ、ほぼ失敗に終わり研究に嫌気が差しました。西に沈む夕日をぼーっと見つめていたところ、ふと、配列が 100、1000、10000 と増えても精確に比較できる画期的な方法を思いつきました。私達の研究チームでは、静岡に職を得た N 君を中心に、相同性の低い領域も含む、タンパク質分子全体を設計する技術の開発と検証を鋭意進めてきました。具体的には、10000 を超える相同な配列を AI(機械学習)により解析、様々な形で情報を抽出、タンパク質の設計に反映させます。また、相同性が低い領域に潜む規則性を抽出することで、進化速度が早いウィルスタンパク質、機能未知のタンパク質の機能的な分類も可能となりました。私達の研究チームによって設計、高機能化した人工タンパク質は、15 を超える大学・企業との共同研究において暗躍しており、来年度にはいくつかの大きな成果を報告できそうです。反応性や生産性の向上、基質選択性の拡張、相互作用の共進化の解析と求められる課題は様々ですが、課題を達成できる確率は、1 設計当たり最盛期のイチローの打率程度です。2〜3 個設計すれば 1 つは成功するような塩梅です。今後も打力の向上、ホームランも打てる技術に育てていく所存です。なお、N 先生はカープファンですが、玉を棒で打つのは苦手です。

本技術のもう一つの特徴は、AI に学習させるデータを揃えるのに苦労したり、AI に完全に依存し人間の出番がなくってしまうような技術ではないところです。バイオ研究者が苦労して発見・探求してきたタンパク質の知見(HI: Human Intelligence)無くして成立しない技術なので、互いの Intelligence を褒め合いながら美味しいお酒が飲める共同研究になります。技術と言えども生みの親に似るものなのでしょうか、研究とお酒が大好きな N 先生の遺伝子を受け継いだ研究者フレンドリーな技術です。本発表では簡単ではありますが、バイオ研究者が考えた、HI、AI 融合型の人工タンパク質設計技術について紹介させていただきます。

Artificial protein design, Artificial Intelligence, Machine Learning

発表責任者：伊藤創平（itosohei@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：3E2p14
講演日時：3 月 26 日 16:33～ 1 号館 E2 会場

機械学習に基づく新規配列データマイニング法の開発と高機能化人工酵素配列設計への応用
Development of novel sequence data mining method based on machine learning and application toward design of highly functional and artificial enzymes

○中野 祥吾[1]、本山 智晴[1]、宮下 由里奈[2]、石塚 由紀[1]、松尾 直也[2]、常盤 広明[2]、篠田 優[3]、浅野 泰久[3]、伊藤 創平[1] ([1]静岡県大食栄、[2]立教大理、[3]富山県大工)
○Shogo Nakano[1], Tomoharu Motoyama[1], Yurina Miyashita[2], Yuki Ishizuka[1], Naoya Matsuo[2], Hiroaki Tokiwa[2], Suguru Shinoda[3], Yasuhisa Asano[3], Sohei Ito[1] ([1]Univ. of Shizuoka, [2]Univ. of Rikkyo, [3]Toyama Pref. Univ.)

[背景・目的]

我々はデータベース上の酵素配列データを利用し、自然界由来の酵素機能を凌駕する、人工酵素配列の設計を可能とする新規手法開発を行ってきた。これまでにタンパク質可溶性が向上した人工酵素配列の設計に成功しているが、その比活性は自然界由来の酵素と比べ 1/10 程度と低く、更なる手法の改良が必要であった。本研究では人工酵素配列設計に適した配列をデータベースから選抜する、人工知能（AI）に基づく新規手法を開発した。本手法を用いてデータベース上より、NAD^+依存型酵素である L-スレオニン-3-脱水素酵素（TDH）を選抜し、完全コンセンサス法（FcTDH）及び祖先型設計法（AncTDH）により人工 TDH 配列を設計した。得られた人工 TDH について、耐熱性、酵素活性、NAD^+親和性などを評価し、自然界由来 TDH（*Cupriavidus necator* 由来 TDH［CnTDH］）の酵素機能と比較した。本発表では、これら結果に加えて、X 線結晶構造解析及び分子動力学シミュレーションに基づく人工 TDH の構造機能解析についても報告する。

[方法・結果と考察]

BLASTp サーチと AI に基づく配列選抜手法により、最終的に CnTDH のホモログ配列 87 配列を選抜した。これら配列を用いて INTMSAlign により FcTDH を、FastML により AncTDH を設計、それぞれ全遺伝子合成を行い、pET15b/BL21(DE3)にて発現・精製した。人工 TDH は CnTDH と比べて 100 点程度、変異が導入されていた。耐熱性について円二色性スペクトル測定にて評価したところ、変性温度は CnTDH と比べて FcTDH は約 10℃、AncTDH は約 5℃高いことが判明した。NAD^+親和性を等温滴定カロリメトリーにより評価したところ、解離定数は CnTDH と比べて FcTDH は約 2 倍、AncTDH は約 7 倍低い値を持つことが判明した。酵素活性の評価を行ったところ、30℃における酵素効率の値は CnTDH と比べて FcTDH は相同、AncTDH は約 1.4 倍低いことが判明した。FcTDH と AncTDH の X 線結晶構造を 2.8、2.1 Å で決定し、MD シミュレーションによる動的構造解析を行った。人工 TDH の全体構造は CnTDH と比べて相同である一方、NAD^+結合ドメインなど一部の構造の動きが変化することが判明した。このような動きの変化が酵素機能に影響を及ぼすことが示唆された。

人工 TDH の酵素機能は自然界由来 TDH と比べて、耐熱性・NAD^+親和性ともに向上した一方、酵素活性は同等に保持されており、これは新規開発した配列選抜手法により高機能な人工酵素配列の設計が可能なことを示している。設計に成功しているその他の人工酵素についても併せて紹介したい。

artificial intelligence (AI), artificial protein, sequence design

発表責任者：中野 祥吾（snakano@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：3E2p15
講演日時：3 月 26 日 16:44～ 1 号館 E2 会場

人工抗体設計技術の構築～細胞質内で発現する人工 VHH～

Design of artificial single domain antibody FcVHH expressed in cytoplasm

○三村 健太[1]、中野 祥吾[1]、宮下 由里奈[2]、鈴木 智英子[1]、常盤 広明[2]、伊藤 創平[1] ([1]静県大院・食栄、[2]立教大・理)
○Kenta MIMURA[1], Shogo NAKANO[1], Yurina MIYASHITA[2], Chieko SUZUKI[1], Hiroaki TOKIWA[2], Sohei ITO[1] ([1]Univ. Shizuoka, [2]Rikkyo Univ.)

【目的】ラクダ科動物は、軽鎖と CH1 ドメインを持たない単一ドメイン型の VHH 抗体を持つ [1)]。VHH は生産性・安定性に優れ、タンパク質工学的な改変も容易であるなどの特徴を有しており、次世代型抗体として注目されている。多様な標的に結合する VHH が開発されているが、そのほとんどは、ペリプラズム画分や菌体外に分泌することで調整されており、細胞質内で調整できれば、融合タンパク質としての生産が容易となる。また、アミノ酸配列をヒトの配列に置き換える技術が確立できれば、バイオ医薬品の製造の際に副作用の低減が期待できる。本発表では、本研究室で開発している人工タンパク質設計技術を VHH に適用、人工 VHH である FcAb、及び、配列をヒト化した人工ヒト化 VHH(FcAb2)を設計、更に抗原結合部位を移植し、機能的な人工 VHH が設計可能か試みた。
【方法】まず、*C. bactrianus* 由来 抗 PCV2 VHH 抗体（CbAb）のアミノ酸配列を鋳型として BLAST サーチを行い、10000 配列を取得した。Ec 値 [2,3)]を指標に、37 位が Phe、45 位が Arg である配列を選抜、全ての部位がコンセンサス残基から成る完全コンセンサス抗体(FcAb1)を設計した。また、*Lama glama* 由来 F-VHH4 を鋳型とし、BLAST サーチにより 10000 配列を取得した。Ec 値 [2、3)]を指標に、Leu11、Pro14、Gly44、Leu45、Thr69、Thr98 位である配列を選抜、FcAb2(ヒト型)を設計した。FcAb1 についてはペリプラズム移行シグナルによる発現確認も行った。また、F-VHH4、及び Ozoralizumab の抗原結合部位を FcAb1、FcAb2 に移植、それぞれ FcAb1-rsv、FcAb2-rsv、FcAb2-TNF-α とした。各種 FcAb の発現、精製を行った後、本抗体の CD 測定による熱安定性の物性測定、ELISA 法および等温滴定型カロリメトリー（ITC）による抗原との結合能の確認を行った。
【結果・考察】各種 FcAb1、FcAb2 を大腸菌 BL21(DE3)株にて発現を試みたところ、細胞質内において可溶性画分にバッチ培養で約 15～20 mg/L の発現を確認した。ペリプラズム移行シグナルを付与した FcAb1 の発現は確認出来なかった。FcAb1 の CD 値の温度変化を測定したところ、従来の VHH と同様に熱可逆変性を有していた。ELISA 法の結果、FcAb1-rsv は標的抗原に対する抗原認識能を有していたが、FcAb2-rsv は確認出来なかった。ITC の結果、FcAb2-TNF-α は抗原認識能を有していることが判明した。以上より、細胞質内で発現し、機能的な人工 VHH が設計可能であることが示唆された。本発表では、FcAb の設計方法、機能解析の詳細、臨床検査薬を志向し設計した融合用酵素について報告する。

（1）*Nature.*, 1993, 363, 446-448、（2）*Biochemistry.*, 2018, **57**, (26), 3722-3732 （3）*J. Mol. Biol.*, 2010, **399**, (4), 541-546

antibody, VHH, artificial protein

発表責任者：三村健太（mura36mura36@gmail.com）

講演番号：3E3a03
講演日時：3 月 26 日 09:22～ 1 号館 E3 会場

Eker rat の経時的代謝変動の解析

Analysis of chronological metabolism changes in the Eker rat

○松丸 公輔[1]、鈴木 司[1,2]、井上 順[1,2]、山本 祐司[1,2] ([1]東農大院・農・農化、[2]東農大・応生・農化)
○Kosuke MATSUMARU[1], Tsukasa Suzuki[1,2], Jun Inoue[1,2], Yuji Yamamoto[1,2] ([1]Tokyo Univ. Agric., Grad. Sch., [2]Tokyo Univ. Agric.)

【背景】がん抑制遺伝子として知られる TSC2 は、TSC1 と複合体を形成し下流の細胞増殖、細胞成長に関わる因子である mTORC1 を抑制している。しかし、TSC2 の変異に伴い mTORC1 の抑制能が失われた場合、細胞が過剰に成長・増殖し全身で腫瘍が形成される。こうしたメカニズムで結節性硬化症が発症する。

実際に全身の TSC2 に先天的な片アレル変異をもつ結節性硬化症モデルラットとして Eker rat が存在する。Eker rat は生後約 1 年までに TSC2 のヘテロ接合性欠損(LOH)を引き起こし、腎臓に腫瘍を多発することが確認されている。しかし、Eker rat において TSC2 の LOH を誘導する要因は未だ不明である。そこで我々は、代謝変動が TSC2 の LOH を誘導すると仮説を立て実験を行った。

当研究室の相澤ら[1)] により、20 週齢の Eker rat では糖質・脂質代謝異常を引き起こしていることが報告され、この代謝異常が LOH を誘導する引き金となっている可能性が初めて示唆された。

【目的】本研究では、20 週齢 Eker rat で生じている代謝変動が、それ以前や以降の週齢でどのように変動しているかを明らかにし、経時的な代謝変動が TSC2 の両アレル欠損に及ぼす影響について解析することとした。

【方法】野生型(WT)と変異型(Eker)に分け、それぞれ 7, 14, 28, 52 週齢になるまで飼育を行った。16 時間絶食後麻酔下にてサンプリングを行い、採取した血液、臓器を実験に用いた。腎臓の病理学的解析は各週齢ラットの腎臓の連続切片を作成し、それぞれ HE 染色、p-4EBP1 抗体を用いた免疫染色に供し、病変の個数を測定した。TNF-α のタンパク発現量の解析は Western blot 法を用いた。

【結果】まず、Eker rat の腎臓における病変形成の病理学的解析を行った。その結果、前がん病変は全ての週齢で確認できたが、腫瘍像は 28, 52 週齢 Eker の腎臓においてのみ確認することができた。また、前がん病変において LOH は確認できなかったものの、腫瘍では LOH が確認できた。

次に代謝変動の解析を行うために血漿の生化学的解析を行った。その結果、比較的若い 14 週齢の Eker rat においてのみ、血中グルコース、トリアシルグリセロール、総コレステロール濃度の上昇といった糖質脂質代謝異常を引き起こしていることが明らかとなった。また、糖質脂質代謝異常を惹起する因子としての報告がある TNF-α のタンパク発現量が 14 週齢において肝臓、筋肉、腎臓といった様々な器官で増加しており、これが糖質脂質代謝異常の原因となっている可能性が示唆された。

1) Aizawa. Y et al. *Arch Biochem Biophys.* 590. 48-55 (2016)

cancer, TSC2, metabolism change

講演番号：3E3a04
講演日時：3 月 26 日 09:33～ 1 号館 E3 会場

遺伝子改変動物を用いたインスリン中間因子 TSC1 の機能解析
Functional analysis of insulin intermediate factor TSC1 using genetically modified animals
○蔵前 和輝[1]、鈴木 司[1,2]、井上 順[1,2]、山本 祐司[1,2] ([1]東農大院・農・農化、[2]東農大・応生・農化)
○ Kazuki KURAMAE[1], Tsukasa Suzuki[1,2], Jun Inoue[1,2], Yuji Yamamoto[1,2] ([1]Tokyo Univ. Agric.Grad.Sch, [2]Tokyo Univ. Agric)

【目的】インスリンシグナルはタンパク質や脂質、糖代謝などの生体内の代謝を制御している。そのシグナルの中間因子である TSC1 と TSC2 は複合体を形成することで下流の mTORC1 を負に制御している。両因子の一方の機能が欠損すると mTORC1 の恒常的活性化が起き、異常な細胞成長、細胞増殖を引き起こす。これら一連のシグナル異常によって引き起こされる病態が結節性硬化症（Tuberous Sclerosis Complex；TSC）であり、腫瘍形成やてんかん、精神遅滞などを引き起こす疾患として認知されている。

一方で TSC 患者において TSC2 欠損時における病態が必ずしも TSC1 のそれと一致しないことが報告されていることから、TSC1 と TSC2 では異なる機能をもっていると予想した。当研究室ではこれまで、TSC2 片アレル欠損が糖代謝を変動させることを見出し、TSC2 の新たな役割について提案してきた。そこで我々は TSC1 に着目し、その独自の機能を明らかにすることを目的に以下の解析を試みたので報告する。

【方法】TSC2 欠損時における代謝変動が TSC1 欠損時においても同様に見られるか検証するため、全身性の TSC1 ヘテロ（$TSC1^{+/-}$）マウスを用い、10 週齢（若齢期）と 50 週齢（腫瘍形成期）での解析を行った。インスリンシグナルに及ぼす影響の解析を行うために、TSC1 の下流因子であるリン酸化 S6、S6 のタンパク質量、TSC1、TSC2 のタンパク質量、mRNA 量を Western Blotting 法と Real-Time PCR 法を用いて解析を行った。次に、糖代謝、脂質代謝に及ぼす影響の解析を行うために、血中グルコース濃度、肝臓中糖代謝関連酵素群、脂質代謝関連酵素群の mRNA 量、肝臓中 Acetyl-CoA 量、TG 量を解析した。

【結果・考察】$TSC1^{+/-}$マウスにおいて若齢期である 10 週齢では糖代謝への影響が見られなかったが、肝臓中の脂肪酸合成酵素群の mRNA 量の低下や TG 量の減少が見られ、脂肪酸酸化関連遺伝子である CPT1a の mRNA 量の低下が確認された。以上から TSC1 欠損は脂質代謝を変動させる可能性を示し、TSC2 欠損時とは異なる代謝変動を示すことを明らかにした。本発表では、一連の代謝変動が TSC1 欠損または TSC2 欠損時における TSC の病態の違いに関与する可能性を考察する。50 週齢における $TSC1^{+/-}$マウスの生体内代謝は現在解析中である。

lipid metabolism, insulin signaling, TSC1

講演番号：3E3a05
講演日時：3 月 26 日 09:44～ 1 号館 E3 会場

Ketogenic Diet による肝臓ケトン体合成の亢進が Eker rat の腎腫瘍形成に与える影響の解析
analysis of the effect accelerated hepatic ketogenesis by Ketogenic Diet has on the renal tumorigenesis

○上野 晋平[1]、鈴木 司[1,2]、井上 順[1,2]、山本 祐司[1,2]([1]東農大院・農・農化、[2]東農大・応生・農化)
○ Shinpei UENO[1], Tsukasa Suzuki[1,2], Jun Inoue[1,2], Yuji Yamamoto[1,2] ([1]Tokyo Univ.Agric.,Grad.Sch. of Agric., [2]Tokyo Univ.Agric.)

〔背景・目的〕 ”Ketogenic Diet(KD)”は、糖質を制限し、その代替エネルギー源を脂質にすることで血中のケトン体（アセト酢酸，β-ヒドロキシ酪酸，アセトンの総称）を増加させる食事療法である。糖尿病やてんかん、癌の治療食として広く利用されているが、癌の種類によっては KD が腫瘍形成を促進する報告もある。Eker rat は、がん抑制遺伝子“TSC2”の片アレルが全身で欠損したラットであり、生後約 1 年で腎臓において TSC2 の正常なアレルも後天的に欠損し腫瘍ができる。本研究では、Eker rat における TSC2 遺伝子の後天的な欠損を引き起こすリスク因子や腫瘍形成のメカニズムの一端を明らかにすることを目的としている。我々はこれまでに若齢期の Eker rat において、血中総ケトン体量が増加していることを明らかにしている。本研究では、ケトン体量の増加が Eker rat の腎腫瘍形成促進に繋がるのではないかと考え、Eker rat にケトン体量を増加させる KD を与え、その影響を解析した。

〔方法〕 エサについては、基本組成を“AIN-93M”、AIN-93M 中の糖質源全量をラードに置き換えたものを“Ketogenic Diet(KD)”としている。動物は Wild Type(WT)と Eker rat(TSC2 +/-)を用いた。AIN WT 群、AIN Eker 群、KD WT 群、KD Eker 群の 4 群（各群：5 匹）に分け、6 週間それぞれの餌を与えた後(終週齢：20 週齢)、非絶食・麻酔下にて、臓器と血液を採取しサンプルとした。血清中の成分、肝臓中の因子については mRNA 量を real-time PCR、タンパク発現・リン酸化レベルを Western Blotting を用いて、腎臓の組織形態は H&E 染色・免疫染色法を用いて解析した。

〔結果・考察〕 AIN Eker 群の血中ケトン体量は、AIN WT 群と比べ上昇しており、先行研究と同様の傾向を示した。また KD WT, KD Eker 群はそれぞれ AIN 群と比べ、血中のケトン体量が顕著に増加していた。肝臓中のケトン体合成関連因子の mRNA 量は、KD WT 群では AIN WT 群に対し増加したが、KD Eker 群では AIN Eker 群に対し変化は無かった。更に、KD Eker 群は他の 3 群と比べ、腎腫瘍の数が顕著に増加していた。本研究により、Ketogenic Diet (KD)が Eker rat の腎腫瘍形成のリスク因子になることを示し、Eker rat における血中ケトン体量の増加が腎腫瘍形成に関わる可能性を示した。

cancer, ketogenic diet, ketone body

講演番号：3E3a06
講演日時：3 月 26 日 10:05～ 1 号館 E3 会場

胆汁酸受容体 TGR5 が骨格筋代謝に及ぼす影響の解析

The effect of TGR5 on skeletal muscle metabolism

○佐々木 崇、久保山 文音、清水 誠、山内 祥生、佐藤 隆一郎（東大院農生科応生化）
○Takashi SASAKI, Ayane KUBOYAMA, Makoto SHIMIZU, Yoshio YAMAUCHI, Ryuichiro SATO (Dept. of Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. of Agr. and Life Sci., Univ. of Tokyo)

【研究の背景と目的】肝臓で合成され胆のうに蓄えられた胆汁酸は、摂食に応じて消化管に分泌され脂溶性栄養素の消化吸収を助けるばかりでなく、それ自体がシグナル分子として働くことで様々な代謝変動を引き起こすことが知られている。特に血中胆汁酸濃度は食後に大きく上昇することから、摂食シグナルを伝達する役割を担うと考えられる。我々は骨格筋における胆汁酸受容体 TGR5 の活性化が筋量および筋力の増大を誘導することを見出し、昨年これを報告した（J. Biol. Chem. 293:10322-10332. 2018）。本研究では引き続き骨格筋 TGR5 の機能解析を行い、糖・脂質代謝やエネルギー代謝に及ぼす影響の解明を試みた。

【方法と結果】当研究室で作製された骨格筋特異的 TGR5 トランスジェニック（Tg）マウスを呼気ガス分析に供し、酸素消費量および二酸化炭素排出量の測定を実施した。Tg マウスは野生型（WT）マウスに比べて呼吸交換比が有意に上昇しており、エネルギー源として糖の利用比率が増加していることが示された。一方でエネルギー消費量は WT マウスと Tg マウスとの間に差は認められなかった。続いて Tg マウスを長期高脂肪食飼育したところ、呼気ガス分析のデータから予想される通り摂食量や体重の増加量、および脂肪組織重量等に関しては WT マウスと同等であったが、Tg マウスは我々の過去の報告通り骨格筋重量が有意に増大しており、さらに糖負荷試験やインスリン負荷試験において良好な成績を収めた。

【考察】骨格筋は運動器のひとつであると同時に人体で最大の糖代謝器官でもあり、インスリンによる血糖低下作用の 80%程度は骨格筋が担うことが知られている。Tg マウスにおいて糖の利用率が増大し、肥満時のグルコースクリアランスが改善した理由の少なくとも一部は、骨格筋の肥大化による糖代謝キャパシティの増大により説明されると考えられる。我々は骨格筋 TGR5 が高齢者における筋量低下、すなわちサルコペニアの予防に有望な分子標的あると考えその応用展開を目指しているが、TGR5 の活性化は単に身体機能維持に貢献するばかりでなく、筋量減少を原因のひとつとする高齢者糖尿病の予防にも有効であると予想される。

Bile acid, Skeletal muscle, Sarcopenia

講演番号：3E3a07
講演日時：3 月 26 日 10:16～ 1 号館 E3 会場

新規筋萎縮関連遺伝子 Tmem100 の機能解析
Functional analysis of Tmem100, a novel gene related to skeletal muscle atrophy
○久保山 文音、佐々木 崇、清水 誠、山内 祥生、佐藤 隆一郎（東大院・農生科・応生化）
○Ayane KUBOYAMA, Takashi SASAKI, Makoto SHIMIZU, Yoshio YAMAUCHI, Ryuichiro SATO (Dept. of Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. of Agr. and Life Sci., Univ. of Tokyo)

【研究の背景と目的】Transmembrane protein 100（Tmem100）は脊椎動物種間で高度に保存された 2 回膜貫通型タンパク質である。肺や脂肪組織、骨格筋など幅広い組織に発現しており、胎生期の動脈形成や神経細胞における痛覚伝達に寄与することが知られる一方、骨格筋での機能は不明のままとなっている。近年、我々は胆汁酸受容体 TGR5 が筋肥大効果を有することを報告したが（Sasaki *et al.* 2018. *J Biol Chem.* 293(26): 10322–10332）、一連の実験の中で TGR5 トランスジェニックマウスの骨格筋では Tmem100 の発現が増大していることを見出した。そこで、本研究では筋量調節に関与しうる新たな遺伝子として Tmem100 に注目し、その機能解析に取り組んだ。

【方法と結果】Tmem100 の細胞内局在は神経細胞では細胞膜、血管内皮細胞では小胞体膜と細胞種によって異なるため、まずは培養細胞や骨格筋切片の免疫蛍光染色により骨格筋 Tmem100 が細胞膜に局在することを同定した。次に、様々な条件のマウス骨格筋サンプルを用いてリアルタイム qPCR を行ったところ、ギプス固定および坐骨神経切除による筋萎縮時に Tmem100 の発現が顕著に上昇することが明らかとなった。特に、坐骨神経切除を施したマウス骨格筋では Tmem100 のタンパク質レベルでの増加も確認された。続いて、*in vivo* エレクトロポレーション法を利用しマウス前脛骨筋に Tmem100 発現プラスミドを導入した結果、TNF-α、IL-1β など炎症関連遺伝子の mRNA レベルの低下が観察された。同時に、mock 群に比べプラスミド由来の外因性遺伝子の発現が著明に抑制されており、Tmem100 によってプラスミドが分解されていることが示唆された。

【考察】萎縮した骨格筋では筋核数の減少やミトコンドリアの形態・機能不全が生じることが知られており、このとき断片化した DNA の一部が細胞質に流出する可能性が考えられる。また、細胞質 DNA が炎症を惹起すること、さらに炎症が筋萎縮を進行させる要因の一つであることから、筋萎縮時に発現上昇した Tmem100 は核やミトコンドリアの崩壊により生じる細胞質中の不要な DNA 断片の分解を促進することで炎症の悪化あるいは慢性化を防ぎ、骨格筋を保護する働きを担っていると予想される。今後、骨格筋 Tmem100 の発現上昇機構ならびに DNA 分解促進作用の詳細を解析することで筋萎縮の新たな分子基盤が明らかとなり、高齢化が進む現代社会において急務とされる筋萎縮の予防・改善策の確立につながるものと期待される。

inflammation, cytosolic dna, skeletal muscle atrophy

発表責任者：佐藤隆一郎（aroysato@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3E3a08
講演日時：3 月 26 日 10:27～ 1 号館 E3 会場

絶食時の肝臓における胆汁酸受容体 TGR5 の発現制御機構解析
Regulatory mechanism of TGR5 expression in liver during fasting
○洪 子文、佐々木 崇、清水 誠、山内 祥生、佐藤 隆一郎（東京大学）
○Tzuwen Hong, Takashi Sasaki, Makoto Shimizu, Yoshio Yamauchi, Ryuichiro Sato (Univ. of Tokyo)

【研究の背景と目的】絶食ならびにその後の再摂食は、ヒトの生理的代謝において最も劇的な変動を引き起こす要因の一つである。摂食に応じた代謝調節機構に乱れが生じると、肥満や糖尿病などの生活習慣病の発症の原因となる。摂食刺激に応じて胆嚢より放出された胆汁酸は乳化剤として腸内での脂質の消化、吸収に重要な役割を果たすだけでなく、近年では摂食応答を制御するシグナル分子として働くことが知られており、いくつの生理機能が示されている。胆汁酸は G タンパク質共役受容体 TGR5 の内因性リガンドとして働き、多様な細胞応答を引き起こし、グルコースホメオスタシスの改善や、エネルギー代謝の促進に寄与する。肝臓において、抗癌、抗アポトーシス作用など様々な機能が報告されているが、発現制御に関する解析は進んでいない。興味深いことに、我々はマウスを絶食に供することにより肝臓での TGR5 発現が増加することを見出している。しかし､絶食により TGR5 発現が上昇する分子機構は未だ明らかでない。そこで本研究では、絶食による TGR5 の発現制御機構の解明を目指した。

【方法と結果】ヒト肝癌細胞 HepG2 を栄養枯渇条件（1mM Glc 、1% FBS）で培養すると TGR5 の発現量が増加した。これは絶食時の TGR5 発現上昇を再現するものと考えられた。これまで、p53 と絶食・ER ストレスの関連がいくつかの先行論文で報告されていることから、TGR5 のプロモータープラスミドを用いてレポーターアッセイを行った結果、p53 が TGR5 のプロモーター活性を上昇させることが明らかとなった。続いて、プロモーターに含まれる TGR5 上流配列を徐々に短くすることで p53 の制御領域の絞込みを行ったところ、p53 の結合に重要な CA/TA/TG シーケンスに 80%一致する配列を hTGR5 プロモーター上流に見出し、これが p53 による TGR5 プロモーターの活性化に必要であることを明らかにした。また、栄養枯渇処理による TGR5 発現上昇は p53 阻害剤の処理によってキャンセルされた。さらに、絶食させたマウス肝臓を用いたクロマチン免疫沈降解析を行った結果、TGR5 は p53 の新たな標的遺伝子であることが明らかになった。

【考察】絶食時の TGR5 発現増大は、続く再摂食時の胆汁酸シグナルを増幅する役割を担うことが予測される。これは摂食による生体応答機構の分子メカニズムを明らかにする上で重要な知見と考えられる。

bile acid, fasting, TGR5

講演番号：3E3a09
講演日時：3 月 26 日 10:38～ 1 号館 E3 会場

神経性疼痛物質オピオイドの腸管免疫における炎症抑制作用
Anti-Immunoinflammatory effects of opioids in the gut immunity
○長田 和樹[1]、三浦 亮介[1]、長瀬 博[2]、八代 拓也[1]、西山 千春[1]([1]東理大基礎工、[2]筑波大 IIIS)
○Kazuki Nagata[1], Ryosuke Miura[1], Hiroshi Nagase[2], Takuya Yashiro[1], Chiharu Nishiyama[1]
([1]Dept. of Biol Sci and Tech, Tokyo Univ. of Sci, [2]IIIS, Univ. of Tsukuba)

オピオイドとは麻薬性鎮痛薬に類似した精神作用を有する物質の総称で、麻薬として知られるモルヒネから、化学的に合成された鎮痛薬のフェンタニル、神経伝達物質であるエンドルフィンまで多種多様な物質が存在する。オピオイドは鎮痛、鎮静などの作用を示すため薬剤へ広く応用されており、その研究の焦点はオピオイドの受容体μ、δ、κの 3 種が強く発現している中枢神経系に当てられてきた。プラセボ効果として精神状態が末梢の炎症や免疫応答に影響を及ぼすことが知られているが、機構は不明である。加えて、近年、免疫細胞である樹状細胞やマクロファージにおいてもオピオイド受容体が検出され、μオピオイドであるモルヒネにより樹状細胞やマクロファージの機能が抑制されることが報告されている。しかし、δやκオピオイドが免疫細胞の機能や生体の免疫、炎症反応に及ぼす影響は不明である。本研究では、免疫細胞の炎症反応が病態に大きく寄与するマウス DSS 誘導性大腸炎モデルや *in vitro* 解析系を用いて、オピオイドによる免疫応答調節について明らかにすることを目指した。骨髄由来マクロファージ（BMDM）を作製し、オピオイド及びその受容体の発現レベルを調べた結果、特にδ受容体発現が高いことが判明した。そこでオピオイドδ受容体のアゴニストである KNT-127 をマウスに投与したところ、大腸炎による体重減少、下痢などの症状が改善し大腸の繊維化も抑制された。δ拮抗薬である NTI を事前投与すると症状改善が認められないことから、KNT-127 による大腸炎の病態改善がオピオイドδ受容体を介した特異的な作用によることが判明した。血液脳関門を通過しないアゴニスト YNT-2715 を腹腔投与したマウスでも病態改善が認められたことから、δオピオイドが脳外の細胞に作用する可能性が示された。DSS 誘導性大腸炎は DSS により傷害された腸管上皮細胞から細菌が浸潤し腸管の免疫細胞が過剰な炎症反応を誘導することで発症する。その原因細胞の一つであるマクロファージは TLR を介して病原体の存在を感知することで種々の炎症性サイトカイン、ケモカインを分泌して炎症反応を促進する。そこでマクロファージの炎症反応におけるδオピオイドの作用を解析した。BMDM を LPS で刺激すると、炎症性サイトカインである IL-6 や TNFαなどの遺伝子発現が顕著に誘導されるが、KNT-127 で処理しておくことでこの誘導が有意に抑制され、培養上清中に分泌されるタンパク質量も減少した。このことからδオピオイドによる DSS 誘導性大腸炎の症状改善にマクロファージの炎症反応の抑制が寄与することが示唆された。本研究により、中枢神経系へ作用するδオピオイドが免疫反応に起因する腸炎を抑制すること、その分子機構として末梢の免疫細胞に直接作用し活性化を抑制する仕組みがあることがはじめて明らかとなった。

Opioid, Immune, colitis

発表責任者：長田和樹（8318546@ed.tus.ac.jp）

講演番号：3E3a10
講演日時：3 月 26 日 10:49～ 1 号館 E3 会場

葉酸欠乏によるうつ症状のメカニズム解析 －神経成熟異常およびエピゲノム変動の関与－

Involvement of abnormal neuronal maturation and epigenetic modifications in folate deficiency-induced depressive symptoms.

○西田 将治、竹村 凌、橘 新、浅利 颯太、荒木 良太、矢部 武士 (摂南大薬・複合薬物解析学)
○Shoji NISHIDA, Ryo TAKEMURA, Shin TACHIBANA, Sota ASARI, Ryota ARAKI, Takeshi YABE (Lab. Funct. Biomol. Chem. Pharmacol., Fac. Phramaceut. Sci., Setsunan Univ.)

【背景・目的】葉酸は DNA やヒストンのメチル化といったメチル基転移反応の一端を担っており、生体機能の発達・維持において重要な栄養素である。これまでに疫学調査から、うつ病患者では血清葉酸濃度が低いこと（*J Altern Complem Med.*, 2008. etc.）が示されており、葉酸の欠乏がうつ病態のリスクファクターになるものと考えられる。そこで本研究では、葉酸の欠乏がうつ病態を誘発するメカニズムを明らかにすることを目的として、葉酸欠乏飼料で飼育したマウスの行動学的解析と神経科学的解析および葉酸欠乏培地で培養したマウス胎仔由来神経幹細胞のエピゲノム解析と遺伝子発現解析を行った。

【方法】葉酸欠乏マウスは、3 週齢の ddY 系雄性マウスに葉酸欠乏飼料を与えて 6 週間飼育することで作製した。9 週齢時に強制水泳試験によりうつ様行動を、免疫染色により海馬歯状回の神経新生および神経成熟関連遺伝子の発現を解析した。マウス胎仔由来神経幹細胞は neurosphere 法により調製し、葉酸欠乏培地にて 7 日間接着培養した後に、免疫染色により神経細胞の成熟度を、ドットブロットによりメチル化シトシン量を、ウエスタンブロットによりメチル化ヒストン量を、real-time PCR 法により神経成熟関連遺伝子の mRNA 発現量を解析した。

【結果及び考察】対照飼料で飼育したマウスと比べて葉酸欠乏飼料で飼育したマウスでは、強制水泳試験において無動時間が増加しており、うつ様行動が出現することを確認できた。また、葉酸欠乏マウスの海馬歯状回では、未熟神経細胞の増加や新生成熟神経細胞の減少が観察され、新生神経細胞の成熟異常が生じている可能性が示唆された。葉酸欠乏条件で分化させたマウス胎仔脳由来神経幹細胞においても、成熟神経細胞数の減少が観察されるとともに、メチル化シトシン量やメチル化ヒストン量の減少といったエピゲノム変動および神経成熟関連遺伝子群の mRNA 発現パターンに変動が認められた。なかでも発現減少が顕著であった NeuroD1 については、葉酸欠乏マウスの歯状回においても同様の現象が生じていることを確認することができた。葉酸欠乏条件下で観察される歯状回での NeuroD1 の発現減少、神経成熟異常およびうつ様行動は、メチルドナーである *S*-アデノシルメチオニン（50 mg/kg/day）を 2 週間投与することで改善した。以上の結果から、葉酸欠乏によるエピゲノム変動および神経成熟関連遺伝子群の発現パターン変動が神経成熟異常を引き起こし、うつ様行動を誘発するものと推察された。本研究成果は、体内葉酸量がうつ病態の発症において重要である可能性を示唆するものである。

folate, depression, mouse

発表責任者：荒木 良太（r-araki@pharm.setsunan.ac.jp）

講演番号：3E3a11
講演日時：3 月 26 日 11:10～ 1 号館 E3 会場

脳卒中発症ラット SHRSP の遅筋特異的発育低下における MuRF1 の発現上昇

MuRF1 overexpression in slow muscle-specific hypotrophy observed in stroke-prone spontaneously hypertensive rats

○井上 敬夫[1]、前西 修[1]、萩山 満[1]、水口 信行[2]、木村 竜一朗[1]、筑後 孝章[1]、木村 雅友[1]、伊藤 龍生[3]、佐藤 隆夫[4]、伊藤 彰彦[1] ([1]近大医病理、[2]近大ライフサイエンス研、[3]近大農食品栄養、[4]近大病院病理診断科)
○ Takao INOUE[1], Osamu MAENISHI[1], Mitsuru HAGIYAMA[1], Nobuyuki MIZUGUCHI[2], Ryuichiro KIMURA[1], Takaaki CHIKUGO[1], Masatomo KIMURA[1], Tatsuki Itoh[3], Takao SATOU[4], Akihiko Ito[1] ([1]Kindai Univ. Faculty of Med. Dep. of Pathol., [2]Kindai Univ. Life Sci. Res. Insi. In, [3]Kindai Univ. Faculty of Agric. Dep. Food Sci. Nutr., [4]Kindai Univ. Hosp. Dep. of Hosp. Pathol.)

【目的】自然発症的に脳卒中を発症するラット SHRSP は正常血圧ラットである WKY と比較して赤筋優位な骨格筋において発育低下が観察される。本研究では、この現象に関してタンパク質分解系に焦点を当てて解析を行った。

【方法】12 週齢の雄性 WKY 及び SHRSP よりヒラメ筋を採取し、Microarray に供した。カルパイン系、ライソソーム系、及びユビキチン-プロテアソーム系について遺伝子発現を調べた。更に発現差のみられる遺伝子(fold change : ≧2.0、≦－2.0、p<0.05)に対して Ingenuity Pathway Analysis (IPA) にて解析を行い、タンパク質分解系に関与する候補上流因子を選出した。

【結果】Microarray 解析より、カルパイン系やライソソーム系の遺伝子において SHRSP で発現が上昇しているものはなかった。一方、ユビキチン-プロテアソーム系においては筋特異的ユビキチンリガーゼである MuRF1 が SHRSP において有意に発現上昇していることが明らかとなった(fold change: 4.59 vs WKY, $p < 0.05$)が、Atrogin-1 に関しては発現上昇がみられなかった。更にウェスタンブロットによるタンパク質発現解析を行ったところ、遺伝子発現と同様の結果が得られた。この SHRSP における MuRF1 の発現上昇は、ヒラメ筋(遅筋)で認められたが、足底筋(速筋)ではみられなかった。IPA 解析は MuRF1 の発現上昇に関する上流因子として腫瘍壊死因子（TNF）を予測した。

【考察】SHRSP において遅筋特異的な骨格筋の発育低下と MuRF1 の発現上昇が一致することから、MuRF1 が遅筋の発育低下に関与している可能性が示唆された。しかしながら、上流因子とされる TNFα は SHRSP において血中濃度が高いことが報告されており、遅筋特異的に起こる MuRF1 発現上昇に関するメカニズムの解明が必要である。

skeletal muscle hypotrophy, slow-twitch muscle, muscle-specific ubiquitin ligase

発表責任者：井上敬夫（takao@med.kindai.ac.jp）

講演番号：3E3a12
講演日時：3 月 26 日 11:21～ 1 号館 E3 会場

ロスマリン酸摂食によるアルツハイマー病発症遅延に関与する血漿マイクロ RNA の探索とその機能の解析
Screening and target identification of plasma microRNA:biomarkers for inhibition Alzheimer's disease by intake of rosmarinic acid

○家山 智子[1]、長谷 知輝[1]、山下 玲[1]、嶋田 耕育[2]、濱口 毅[3]、篠原 もえ子[3]、山田 正仁[3]、阿部 啓子[1,2]、小林 彰子[1] ([1]東大院農、[2]産技総研、[3]金沢大医)
○ Tomoko KAYAMA[1], Tomoki HASE[1], Rei YAMASHITA[1], Kousuke SHIMADA[2], Tsuyosi HAMAGUCHI[3], Moeko SHINOHARA[3], Masahito YAMADA[3], Keiko ABE[1,2], Shoko KOBAYASHI[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]KISTEC, [3]Kanazawa Univ.)

【背景・目的】
アルツハイマー病(AD)の根本的な治療薬は存在せず、予防や早期発見が重要視されている。食品による AD 予防を目指すためには、認知症発症前のバイオマーカーが必要であるが、現在、予防効果が判断できるバイオマーカーは確立されていない。一方で我々のグループは、AD の主病態である脳内アミロイドβ(Aβ)の沈着を抑制するポリフェノールとして、独自にロスマリン酸(RA)を見出している。本研究では、RA の抗 AD 効果に呼応して変動する血漿中のマイクロ RNA(miRNA)を、AD 発症遅延反応性マーカーとして探索・解析することを目的とした。
【方法】
野生型(WT)および AD モデルマウス(Tg2576)をそれぞれ普通食(C)群と 0.5%RA 含有食(RA)群に分け、計 4 群(WT-C,WT-RA,Tg-C,Tg-RA)で 12 か月間飼育し、行動試験を行った。その後、血漿中 miRNA を次世代シークエンスで解析した。有意に変動した miRNA について、化学合成により miRNA mimic を作製し、マウス神経芽細胞腫細胞株 Neuro-2a にトランスフェクションした。24 時間後に total RNA を抽出し、ウェブ上の解析ツール TargetScan Mouse 7.1 により推定された miRNA の標的遺伝子の mRNA 量を、定量 RT-PCR により測定した。
【結果・考察】
行動試験では、Tg-C 群でのみ認知機能低下が観察された。WT-C 群に対し Tg-C 群で発現変動した miRNA は AD 進行による認知機能低下に伴い血中で変動する miRNA である可能性が考えられた。さらに、これらの miRNA の一部は、Tg マウスにおいて、RA 摂食により上記と逆向きの変動を示していた。従って、これらの miRNA は RA 摂食による AD 予防効果に伴い変動する可能性が考えられた。また Neuro-2a において、コントロール群に対して miRNA mimic 導入群では、アミロイド前駆体タンパク質遺伝子と Aβ産生に関わる酵素の活性化に関与する遺伝子が抑制傾向を示した。以上により、本研究で見出された miRNA は AD 発症遅延反応性マーカーとなり得る可能性が考えられた。

本研究の一部は、内閣府戦略的イノベーション創造プログラム(SIP)「次世代農林水産業創造技術」および国立研究開発法人 日本医療研究開発機構(AMED)の課題番号 18dk0207021h0003 の支援を受け実施された。

microRNA, rosmarinic acid, Alzheimer's disease

講演番号：3E3a13
講演日時：3 月 26 日 11:32～ 1 号館 E3 会場

RNA 干渉による害虫防除は有効か？

Is RNA interference effective for insect pest control?

○宮田 恵多[1,2]、小澤 壮太[3]、長谷川 浩一[4] ([1]川崎医福大臨床栄養、[2]中部大生命医科、[3]森林総研東北、[4]中部大環境生物)
○Keita MIYATA[1,2], Sota Ozawa[3], Koichi Hasegawa[4] ([1]Kawasaki Univ. of Med. Wel., [2]Chubu Univ. Life and Health Sci., [3]For. and For. Pro. Res. Ins., [4]Chubu Univ. Biosci. and Biotech.)

【背景・目的】RNA 干渉（RNA interference）は外来の二本鎖 RNA（double stranded RNA: dsRNA）が細胞内に侵入することがきっかけとなり始まる、負に遺伝子の発現を制御する機構で、様々な生物で起こることが確認されている。現在では逆遺伝学的アプローチをする際の安定したツールとして用いられている。生物に対して RNA 干渉を誘導するために dsRNA の導入する方法は、基本的には注射により直接導入することが一般的であるが、線虫 *C. elegans* に対しては dsRNA を経口的に摂取させることで RNA 干渉を誘導する（environmental RNA 干渉：e-RNA 干渉）ことが可能である。近年、数種類の昆虫に対しても dsRNA を経口的に摂取させることで RNA 干渉を誘導することが可能であることが明らかとなり、この現象を応用し、化学物質使用の抑制を目指した防除システムの確立に期待が高まっている。現在、e-RNA 干渉を応用した防除システムに関する研究が盛んに行われているが、その詳細なメカニズム、全ての昆虫が e-RNA 干渉を示すか否か等、不明な点が多く残されている。本研究では、農業害虫のオオタバコガ、建材害虫のイエシロアリ、衛生害虫のワモンゴキブリといった様々な昆虫をモデルに用いて e-RNA 干渉が種々の害虫防除に有効か否かを検討した。
【結果・考察】オオタバコガ幼虫、イエシロアリ対して dsRNA を含む餌を給餌し、その影響を調べた結果、いずれも給餌開始から 4 日後には標的遺伝子の発現の抑制が起こることが認められた。オオタバコガ幼虫においては、頭部、腸管および表皮で標的遺伝子の発現抑制が起こることが認められ、オオタバコガ幼虫の e-RNA 干渉は全身で起こることが考えられた。また、イエシロアリでは、いくつかの遺伝子に対して e-RNA 干渉を行うと、給餌開始から 3 週間後に約 80%の致死率を示したことから、速効性とういう点での殺虫効果は期待出来ないが、e-RNA 干渉の防除に対する有効性が示された。一方、ワモンゴキブリに対して dsRNA を経口的に摂取させた結果、標的遺伝子の発現の抑制は起こらなかった。その原因として、腸管内での dsRNA の安定性が考えられたので、dsRNA 発現大腸菌を作製し、その大腸菌をワモンゴキブリに給餌した結果、若干ではあるが RNA 干渉が誘導されていることが認められた。以上のことから、e-RNA 干渉を様々な害虫の防除に応用するためには、dsRNA の腸管内での安定化が必要であることが考えられ、今後、dsRNA の導入法の検討することで e-RNA 干渉を応用した害虫防除システムの開発につながることに期待する。

RNA interference, Oral ingestion, Pest management

講演番号：3E3a14
講演日時：3 月 26 日 11:43～ 1 号館 E3 会場

LC-MS/MS を用いたステロールプロファイリングによるカイコ組織のステロール動態の解析
Characterization of sterol dynamics in the silkworm tissues by sterol profiling using LC-MS/MS

○竹島 実加、片岡 宏誌（東大院・新領域）
○Mika TAKESHIMA, Hiroshi KATAOKA (Grad. Sch. of Fro. Sci., the Univ. of Tokyo)

【背景・目的】

ステロールは生物にとって必要不可欠な脂質である。特にコレステロールは細胞膜の構成成分やステロイドホルモンの原料として生命維持に重要である。しかし、昆虫は体内でステロールを生合成することができないため、食餌からステロールを得ている。植食性昆虫の場合、餌に含まれる植物ステロールを腸管でコレステロールに変換する。変換したコレステロールは餌由来の植物ステロールと共に昆虫のリポタンパク質であるリポホリン（Lp）と結合して血液中を循環し、必要な組織へ輸送される。昆虫の組織は Lp からコレステロールを取り込む必要があるが、各組織がどういった機構で取り込むのかは明らかになっていない。本発表では、カイコの様々な組織に蓄積しているステロール類の量を LC-MS/MS で測定し、組成変動を元に多変量解析することでそれぞれの組織におけるステロール動態の特性を見出すことを目的とした。

【方法・結果】

摂食期から前蛹期までのカイコ終齢幼虫の主要組織に含まれるステロールを LC-MS/MS で定量し、得られた結果を多変量解析の手法の一つである主成分分析を行った。その結果、ステロール構成と量は組織により大きく異なることを見出した。脱皮ホルモンを生合成する前胸腺には大量のコレステロールが存在していたが、昆虫の腎臓にあたるマルピーギ管ではコレステロールが少なく、植物ステロールが多く蓄積していた。また、これらの組織では異なる発育ステージでもステロール組成はほとんど変動しなかった。一方、脳は摂食期と前蛹期でステロール構成を大きく変える組織であることがわかった。摂食期の脳にはコレステロールのみが存在していたが、前蛹期にはコレステロールとともに植物ステロールも存在していた。脳は発育ステージによって取り込むステロールの種類を大きく変える組織であり、摂食期と前蛹期で取り込み機構も大きく変化すると考えられる。

また、ステロールの取り込みを担う Lp 受容体（Lipophorin receptor）と SCRB（Scavenger receptor class B type 1）の遺伝子発現解析をしたところ、組織によってそれぞれの遺伝子発現パターンが異なっていた。したがって、各組織のステロール構成はそれぞれの組織で異なり、それぞれの組織特異的な取り込み調節機構があることが示唆された。

insect tissues, sterol, principal component analysis

講演番号：3E3p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ 1 号館 E3 会場

Translational buffering: consequent to splicing inhibition

○Jagat Krishna Chhipi Shrestha[1,2], Tilman Schneider-Poetsch[1], Shintaro Iwasaki[3,4], Minoru Yoshida[1,2] ([1]Chem. Genomics Res. Gr., RIKEN CSRS, [2]Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo, [3]RNA Syst. Biochem. Lab., RIKEN, [4]Dept. Comput. Biol. and Med. Sci., GSFS, Univ. Tokyo)

Maintenance of proper gene expression is demanding task and indeed monitored by several layers of control mechanisms. Under most circumstances, errors in splicing such as intron retention are suppressed via the nonsense mediated decay (NMD) pathway. However, a substantial number of transcripts circumvents NMD and it has remained unclear how cells cope with these aberrant transcripts. Here we show that translation of improperly spliced transcripts leads to global reduction of protein synthesis. Genome-wide ribosome profiling upon splicing inhibition reveals the translation of intron until in-frame stop codon. The truncated proteins cause the proteotoxic stress response through JNK phosphorylation, inhibit mTOR pathway, and then reduce cellular translation. Our results suggest the novel layer of quality control mechanism to buffer the production of aberrantly truncated proteins.

ribosome profiling, spliceostatin A, translation regulation

講演番号：3E3p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ 1 号館 E3 会場

Prdm6 の心筋分化における機能解析

Functional analysis of Prdm6 in myocardial differentiation

○須和田 拓耶、馬場 映、土井 信太郎、久原 哲、田代 康介（九大院 生資環）
○ TAKUYA SUWADA, AKIRA BABA, SHINTARO DOI, SATORU KUHARA, KOUSUKE TASHIRO (Grad. Sch. Bioenv Sci., Kyushu Univ.,)

多細胞生物の複雑な体は 1 つの受精卵が増殖、分化を繰り返すことで形成される。これを構成する細胞の多種多様な形態や機能は細胞内で発現している遺伝子を制御することで決定される。本研究で注目した Prdm 遺伝子は N 末端側に PRDI-BF1-RIZ1 homologous(PR)ドメインを、C 末端側には複数の Zinc finger(ZF)ドメインを有しており、ドメインの数や位置によって特徴づけられている。PR ドメインはリジンメチル基転移酵素として知られる SET ドメインと相同な配列をもっており、ZF ドメインは DNA に結合する性質を持つため、Prdm 遺伝子はヒストンのメチル化に関与する転写因子であることが示唆されている。

本研究では神経細胞や心筋細胞への分化能をもつ P19 細胞を用いて、Prdm6 遺伝子の筋分化過程における機能を明らかにすることを目的としている。P19 細胞の心筋分化誘導実験では、haging drop 法を用いた 4 日間の浮遊培養により胚様体を形成させた後、5 日目以降は接着培養を行った。分化誘導因子としてジメチルスルホキシド(DMSO)を 1%で添加した。CRISPR-Cas9 を用いて Prdm6 を KO した P19 細胞株を作製し、心筋分化誘導を行ったところ WT 株において 6 日目以降に自律的に拍動する心筋細胞が確認されるのに対して KO 株においては拍動が確認されなかった。全 RNA を抽出して逆転写反応で cDNA を合成し、qPCR を用いた解析により心筋特異転写因子 NK2 homeobox 5 (NKx2.5)と心筋特異マーカーMyosin heavy chain-α (α-MHC)の発現を評価した。また、免疫組織化学染色により troponin T2, cardiac (cTnT)の発現を評価した。その結果、これらの発現が KO 株において減少していたことより KO 株は心筋へ分化しないことが明らかになった。以上より、Prdm6 が P19 細胞において心筋分化に重要な機能を持つことが示唆された。現在、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析データを用いて、Prdm6 作用の分子機構を解析中である。今後、Prrdm6 がどのように心筋分化を制御しているのかを明らかにすることが心筋分化の仕組みの解明に新たな知見をもたらすと期待される。

epigenetics, cell differentiation, cardiac muscle

講演番号：3E3p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ 1 号館 E3 会場

最終分化に空気暴露を必須とするヒト表皮立体培養細胞の性状解析
Characterization of 3D reconstructed human epidermis requires air-liquid interface to terminal differentiation
○手島 裕文、栗林 美樹、加藤 まなみ、辰川 英樹、人見 清隆（名大院創薬科学）
○Hirofumi TESHIMA, Miki KURIBAYASHI, Manami KATO, Hideki TATSUKAWA, Kiyotaka HITOMI (Nagoya Univ. Grad. Sch. Pharm. Sci)

【背景・目的】
表皮は皮膚深層の未分化な基底細胞から分化増殖し、いくつかの段階を経て最終的には角化細胞となってバリア機能を有する角化層を形成する。未分化な基底細胞は、下部から培地が浸潤する状態でフィルター上で重層培養し、高カルシウム含有培地で培養すると、最終分化して表皮同様の角化層形成が生じる。この過程で未分化な表皮細胞を角化層まで分化させるためには、さらに特別な培養条件が必要である。上述の培養条件に加えて、下層からは培地が浸潤する状態で、細胞に接触する培地を除いた「細胞を空気に暴露する」ことが必須となる。
このように細胞の生存の妨げともなりうる操作が培養表皮細胞の分化進行に必須な理由は、明確にされていない。我々はヒト表皮培養細胞系を対象として、このメカニズムの解明を最終目的とし、空気暴露が細胞分化に及ぼす効果について、既知の分化マーカーの発現パターンや形態学的観察によって検証した。
【方法・結果】
新生児由来のヒト表皮初代培養細胞を増殖用培地(低カルシウム)によって増殖させ、二重チャンバーディッシュに播種した。数日後、分化用培地（高カルシウム）に置換した後に、細胞を浸す培地を除去した場合（気相培養）と除去しない場合(液相培養)との違いを形態的に観察した。また培養の進行段階で網羅的に変動する分子群を検索するため、まず細胞内での分化マーカーの遺伝子発現やタンパク質発現について解析した。空気暴露の開始後に計日的に気相培養と液相培養のそれぞれの細胞からの抽出・解析を試みた。なお、既存のマーカーに加えて、我々がこれまで表皮角化形成に必須なタンパク質修飾酵素として研究対象としてきた、トランスグルタミナーゼ（架橋化酵素）の発現パターンについても解析した。
気相培養に比べて液相培養では処理後 2 日目から形態に違いが観察され、細胞層の薄さに加えて角化層の減少が見られた。また、角化層では通常消失する核が最外層にも見られた。表皮分化に伴う細胞内タンパク質群は発現レベルが抑制されるとともに、これらを架橋して角化を促進するトランスグルタミナーゼの発現パターンの分化時に観察される変動が抑制された。

keratinocyte, differentiation, epidermis

発表責任者：手島裕文（hirofumi.teshima1@gmail.com）

講演番号：3E3p05
講演日時：3 月 26 日 14:34～ 1 号館 E3 会場

再摂食時に発現が変動する遺伝子の網羅的解析

Comprehensive analysis of genes whose expression fluctuates during refeeding

○渡邉 杏子[1]、岩瀬 将盛[2]、鈴木 司[1,3]、山本 祐司[1,3]、井上 順[1,3]([1]東農大院・農・農化、[2]東大院・農生科・応生化、[3]東農大・応生・農化)
○ Kyoko WATANABE[1], Masamori IWASE[2], Tsukasa SUZUKI[1,3], Yuji YAMAMOTO[1,3], Jun INOUE[1,3] ([1]Tokyo Univ. Agric., Grad. Sch. of Agric, [2]The University of Tokyo, [3]Tokyo Univ. Agric.)

【背景・目的】生物は、栄養を摂取することで生命を維持しているが、エネルギー状態に応じて種々の遺伝子発現を変動させることによってその恒常性を維持することができる。絶食・摂食応答には遺伝子の発現変動が深く関わっており、転写因子による標的遺伝子の発現制御が生体内でおこる様々な代謝の調節に関与していることが知られている。絶食時には転写因子 CREB や PPARα の活性化に伴うそれらの標的遺伝子の発現上昇により糖新生やβ酸化の亢進がおこり、摂食時には LXR や SPEBP-1c の活性化に伴って脂肪酸やトリグリセリド合成が増加する。本研究では、摂食応答に関与する新規遺伝子を探索すること、またその転写制御メカニズムを明らかにすることで、生体内におけるエネルギー恒常性維持機構のさらなる理解を深めることを目的とした。
【方法】絶食・再摂食で発現が顕著に変化する遺伝子の探索を行うために、オスの 7 週齢 C57BL/6J マウスを①自由摂食群、②24 時間絶食群、③24 時間再摂食群（24 時間絶食後、24 時間再摂食させた群）、④48 時間再摂食群（24 時間絶食後、48 時間再摂食させた群）の 4 群に分けて検討を行った。肝臓から RNA を精製し、マイクロアレイにて遺伝子発現変動を網羅的に解析した。また、再摂食時の遺伝子発現変動のパターンによって遺伝子を分類した。
【結果】再摂食時に発現が上昇した遺伝子には SREBP-1c の標的遺伝子が、一方で発現が減少した遺伝子の中には CREB や PPARα の標的遺伝子がそれぞれ含まれており、これまでに報告されている絶食・再摂食時に観察される転写因子の活性上昇が確認された。また、再摂食時に発現が上昇した遺伝子を分類したところ、2 つのパターンに分けられた。一つは、②24 時間絶食群と比較して、③24 時間再摂食群で遺伝子発現が上昇し④48 時間再摂食群で変化がなくなった一過性のもので、もう一つは発現が③24 時間再摂食群、④48 時間再摂食群で持続的に発現が上昇したものである。一方、再摂食時に発現が低下した遺伝子の場合でも同様に 2 つのパターンに分けられた。
【展望】マイクロアレイと同様に遺伝子発現の変動がみられるかを Real-Time PCR で確認後、新規摂食応答遺伝子の発現制御メカニズムの解明を目指す。

refeeding, fasting, transcription

発表責任者：井上　順（ji206785@nodai.ac.jp）

講演番号：3E3p06
講演日時：3 月 26 日 14:55～ 1 号館 E3 会場

樹状細胞における免疫チェックポイント分子 PD-L2 の遺伝子発現制御機構の解明
The regulation of immune checkpoint PD-L2 gene expression in Dendritic cell

○稲葉 啓人[1,2]、渡辺 良介[2]、八代 拓也[2]、西山 千春[2] ([1]東大新領域、[2]東理大基礎工)
○Keito INABA[1,2], Ryouske WATANABE[2], Takuya YASHIRO[2], Chiharu NISHIYAMA[2] ([1]Grad Sch. of Front Sci., Tokyo Univ., [2]Dept. of Biol Sci and Tech., Tokyo Univ. of Sci)

免疫チェックポイント分子 PD-L2 は *Pdcd1lg2* 遺伝子にコードされ、PD-L1 と高い相同性を有し、PD-1 などの受容体と結合して T 細胞の機能を調節する。PD-L1 の発現が幅広い細胞種で認められるのに対し、PD-L2 は抗原提示細胞に発現が限られている。この特徴的な発現パターンから、抗原提示細胞特異的な遺伝子発現制御機構の存在が示唆されるが、その機構は未だ不明である。

我々は、マウス骨髄由来樹状細胞（BMDC）のマイクロアレイ解析において、転写因子 PU.1 のノックダウンにより、PD-L2 の mRNA 量が減少することを見出した。PU.1 は単量体としての働きに加え、IRF4 や IRF8 とヘテロ 2 量体を形成して転写活性化する機能も有する。本研究では、PU.1 や IRF4、IRF8 の *Pdcd1lg2* 遺伝子発現への関与を中心に、PD-L2 の遺伝子発現制御機構の解明を目的とした。

siRNA による PU.1、IRF4 および IRF8 のノックダウン試験の結果、PU.1 と IRF4 が PD-L2 の細胞表面発現と mRNA 発現を正に制御することが示唆された。データベース上にある DC の ChIP-seq データを検索したところ、*Pdcd1lg2* 遺伝子の上流領域およびイントロンにおいて、PU.1 と IRF4 の結合度が高く、かつ H3K27 ヒストンアセチル化が亢進している領域が 5 か所見出された。このうち 3 か所（CNS1、3、4 と命名）には PU.1 と IRF4 のヘテロ 2 量体が結合可能な EICE 配列が存在しており、ChIP assay と EMSA の結果、PU.1 と IRF4 は CNS1 と CNS3 に結合することが明らかとなった。現在、CNS1、3 領域を介して PU.1/IEF4 が転写活性化し得るか検証するため、これら遺伝子領域を導入したレポータープラスミドを構築し、PU.1 と IRF4 の転写活性化能を解析している。一方、PU.1 siRNA 導入時に CNS 領域の H3K27 ヒストンアセチル化レベルが低下することが ChIP assay により判明した。PU.1 はヒストンアセチル基転移酵素 p300 の染色体への結合に寄与することが報告されている。BMDC に p300 の siRNA を導入したところ、CNS 領域におけるヒストンアセチル化が低減し、PD-L2 の細胞表面発現量および mRNA 発現量が低下することが明らかとなった。刺激因子 GM-CSF は DC の分化や特徴的な遺伝子発現を誘導する。PD-L2 発現における GM-CSF の寄与と PU.1、IRF4、p300 との関連を調べるため、spleen $CD11c^+$ DC を用いて検討した。その結果、GM-CSF 刺激により PD-L2 の発現量は増加し、PU.1、IRF4、p300 のノックダウンにより、PD-L2 の発現量が低下することが判明した。

以上、本研究から、樹状細胞において PU.1 は IRF4 と共に *Pdcd1lg2* 遺伝子の CNS 領域に EICE 配列を介して結合することにより協調的に転写を正に制御し、さらに p300 を介したエピジェネティックな発現制御にも関与することが示唆された。

Immunity, Dendritic cell, Gene expression

発表責任者：稲葉啓人（k.inaba96@gmai.com）

講演番号：3E3p07
講演日時：3 月 26 日 15:06～ 1 号館 E3 会場

内因性 HIF-1α活性化因子 N-アシルドーパミンの生合成経路の解析
Analyses of biosynthetic pathways of endogenous HIF-1α activators, N-acyldopamines
○林 洋樹[1]、前本 佑樹[1]、吉田 稔[2,3]、伊藤 昭博[1,2]([1]東薬大・生命科学、[2]理研 CSRS・ケミカルゲノミクス、[3]東大院農・応生工)
○Hiroki HAYASHI[1], Yuki MAEMOTO[1], Minoru YOSHIDA[2,3], Akihiro ITO[1,2] ([1]Sch. of Life Sci., Tokyo Univ. of Pharm. and Life Sci., [2]Chem. Genomics, RIKEN CSRS, [3]Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo)

【背景】
HIF-1α は低酸素応答の中心的役割を果たす転写因子である。HIF-1α は通常酸素濃度下ではプロリン水酸化依存的にユビキチンープロテアソーム系により速やかに分解されるが、低酸素状態ではプロリン水酸化が阻害されることにより安定化し、低酸素ストレス応答に関わる様々な遺伝子の発現を誘導する。我々は、HIF-1α を活性化させる内因性の生理活性物質を探索し、神経伝達物質であるドーパミンと脂肪酸のアミドである *N*-アシルドーパミンを HIF-1α の活性化因子として見出し、当学会で報告した。*N*-アシルドーパミンは HIF-1α の水酸化を阻害することにより HIF-1α を安定化し、活性化する。一方、*N*-アシルドーパミンの生合成経路については不明な点がある。今回、HIF-1α の活性化に重要な *N*-アシルドーパミンの生合成経路について検討したので報告する。
【結果・考察】
N-アシルドーパミンはドーパミンを前駆体とし合成されることが想定される。一般的にドーパミンは、チロシンがチロシン水酸化酵素（TH）により水酸化され L-DOPA が生じ、芳香族 L アミノ酸脱炭酸酵素により脱炭酸され合成される経路が知られているが、一部はチラミンからシトクロム P450 ファミリーである CYP2D6 を介して TH 非依存的に生成される経路も報告されている。そこで、どちらのドーパミン生合成経路が HIF-1α の活性化に重要か調べるために、恒常的に HIF-1α が発現しているがん細胞を用いて、CYP2D6 あるいは TH の阻害剤処理による HIF-1α の発現量の減少について検討した。その結果、いくつかのがん細胞で CYP2D6 阻害剤によって HIF-1α の発現が減少することが示され、特定のがん細胞において、CYP2D6 が *N*-アシルドーパミンの生合成に重要であることが示唆された。一方、ドーパミンから *N*-アシルドーパミンの合成には脂肪酸アミド加水分解酵素が関与することが知られているが、その詳細な合成経路は明らかでない。我々は、ドーパミンのアシル基転移酵素が、タンパク質や低分子のアセチル化/アシル化を触媒する活性を有する GNAT（GCN5-Related *N*-Acetyltransferases）スーパーファミリーの中に存在するのではないかと考え、ヒトの GNAT に対する siRNA ミニライブラリーを用いて、HIF-1α の発現量を減少させる siRNA オリゴを探索した。その結果、ノックダウンにより HIF-1α の発現が減少する２種類の GNAT を見出した。本発表では、これらの２種類の GNAT のドーパミンに対するアシルトランスフェラーゼ活性について報告し、内因性 HIF-1α 活性化因子である *N*-アシルドーパミンの生合成経路とその生理的機能について議論したい。

HIF-1α, Dopamine, Acyltransferase

講演番号：3E3p08
講演日時：3 月 26 日 15:17～ 1 号館 E3 会場

光遺伝学的手法を用いた社会行動と社会的認知記憶に対する海馬の役割の解析
Understanding roles of Hippocampus in social behavior and recognition memory using optogenetics
○清田 啓輔、谷水 俊之、長葭 大海、石川 理絵、喜田 聡（東京農大院・農・バイオ）
○Keisuke KIYOTA, Toshiyuki TANIMIZU, Taikai NAGAYOSHI, Rie ISHIKAWA, Satoshi KIDA (Dept. of Bioscience, Tokyo Univ. of Agriculture)

他者を記憶する社会的認知記憶は社会生活を営む上で必須な能力であり、他者を既知であるかを識別するための不可欠な要素である。この社会的認知記憶の障害は発達障害等の精神症状と関係すると考えられている。マウスは社会行動を行うことで相手を認識し、新規遺伝子発現依存的な固定化のプロセスを経て社会的認知記憶を形成する。我々は社会的認知記憶制御機構の解明を進め、社会的認知記憶固定化には海馬、前頭前野、前帯状皮質、扁桃体における新規遺伝子発現が必要であること、さらに、脳領野間の機能的結合性の強さを指標とする *in silico* 解析から、海馬は社会的認知記憶形成時に脳領野間を繋ぐハブ領野として中心的な役割を果たすことを示唆してきた。しかし、社会行動発現から社会的認知記憶に至るプロセスにおける海馬の機能的役割は未だ実証されていない。そこで本研究では、光遺伝学的手法を用いて海馬を不活性化した影響を解析することで、海馬による社会行動と社会的認知記憶制御機構の解明を試みた。初めに、海馬不活性化が社会行動に及ぼす影響を解析した。光感受性タンパク質アーキロドプシン T(ArchT)を前脳特異的に発現するマウス(Tg)に幼若マウスを提示し、幼若マウス提示中に海馬を不活性化させた場合には、Tg では野生型マウス（WT）に比べて幼若マウスに接触する時間が有意に短くなり、海馬不活性化は社会行動を抑制することが示された。次に、3 分間の幼若マウス提示後 5 分間にわたり、Tg の海馬を不活性化した場合、24 時間後に同一の幼若マウスを 3 分間再提示しても、Tg では WT に観察される幼若マウスに接触する時間の減少は観察されず、社会的認知記憶形成が阻害されることが明らかとなった。さらにアデノ随伴ウイルスベクター(AAV5-αCaMKⅡ-ArchT-GFP)により海馬興奮性ニューロン特異的に ArchT を発現させたマウスを用いた解析においても、Tg を用いた解析と同様に、海馬不活性化による社会行動の抑制と社会的認知記憶形成の障害が観察された。以上の解析から、海馬は社会行動発現及び社会的認知記憶形成に必須であることが示された。さらに、社会行動及び社会的認知記憶を司る神経回路を同定するため、海馬不活性化による社会行動及び社会的認知記憶形成時の脳領野間の機能的結合性の変化を解析しており、これらの結果も含めて発表する。

memory, behavior, hippocampus

講演番号：3E3p09
講演日時：3 月 26 日 15:28～ 1 号館 E3 会場

光遺伝学的手法を用いた海馬恐怖記憶エングラム操作による想起後の記憶制御機構の解析
Understanding mechanisms of regulation of retrieved contextual fear by hippocampal memory engram using optogenetics
○長葭 大海、福島 穂高、喜田 聡（東農大院・農・バイオ）
○Taikai NAGAYOSHI, Hotaka FUKUSHIMA, Satoshi KIDA (Dept. of Bioscience, Tokyo Univ. of Agriculture)

記憶エングラムとは、学習時に獲得された記憶情報を貯蔵する細胞集団ネットワークであり、記憶貯蔵の実態である。この記憶エングラムを構成する細胞集団の再活性化は記憶を想起させる。恐怖記憶はヒトを含めた動物の本能的記憶であり、固定化のプロセスを経て記憶エングラムが形成される。また、恐怖記憶想起後には、再固定化が誘導されて恐怖記憶が維持または強化され、一方で、想起によって引き起こされる恐怖反応を減弱させる「消去（安全学習）」も誘導される。我々の恐怖条件づけ文脈課題を用いた解析では、恐怖記憶想起時間が短い場合には再固定化、一方、想起時間が長くなると消去が誘導される。さらに重要な点として、記憶中枢である海馬では、再固定化時には転写因子 CREB を介する転写が誘導され、この転写が再固定化に必須であるのに対して、消去が誘導されてしまうとこの転写活性化は中止されることが明らかにされている。以上の背景から、恐怖記憶が再固定化あるいは消去が誘導されるかを決定する中心的な役割を海馬が担っていることが考えられた。そこで、本研究では、この仮説を検証するため、光遺伝学的手法を用いて海馬の恐怖記憶エングラムの活性を制御することで、記憶エングラムの観点から想起後の恐怖記憶制御機構を解明することを目的とした。まず、トランスジェニックマウスあるいはアデノ随伴ウイルスを用いて光作動性イオンチャネルであるアーチロドプシン T（ArchT）あるいはチャネルロドプシン 2（ChR2）を海馬興奮性ニューロンに発現させて、恐怖条件づけ文脈記憶に対する想起時の海馬興奮性ニューロン活性化あるいは不活性化の効果を解析した。その結果、短時間（6 分間）の恐怖記憶想起中に海馬を不活性化すると、その後恐怖記憶が失われること、一方、長時間（30 分間）の想起中に海馬を活性化すると、消去が阻害されることが示された。続いて、c-fos タグシステムを用いて恐怖記憶エングラム細胞を ArchT あるいは ChR2 でラベルして、恐怖記憶想起中のエングラム細胞活性制御の影響を解析した。その結果、先の結果と同様に、記憶エングラム不活性化により恐怖記憶の喪失、一方、記憶エングラム活性化により消去の阻害（恐怖記憶想起による恐怖反応表出）が観察された。以上の解析結果から、想起中の海馬の恐怖記憶エングラム制御を介して再固定化あるいは消去を誘導するかが決定される、恐怖記憶の運命決定のメカニズムが示唆された。

fear memory, engram, optogenetics

講演番号：3E3p10
講演日時：3 月 26 日 15:39～ 1 号館 E3 会場

光遺伝学的手法を用いた恐怖条件付け文脈記憶消去に対する前頭前野の役割の解析
Understanding roles of mPFC in regulation of contextual fear memory extinction using optogenetics
○齋藤 翼、長葭 大海、喜田 聡（東京農大院・農・バイオ）
○ Tsubasa SAITO, Taikai NAGAYOSHI, Satoshi KIDA (Dept. of Bioscience, Tokyo Univ. of Agriculture)

心的外傷後ストレス障害（PTSD）はトラウマ体験の記憶、すなわち、トラウマ記憶が原因となって発症する精神疾患である。現在、トラウマ記憶の制御基盤に基づいた PTSD 治療方法の開発が試みられている。ヒトを含む動物に観察される恐怖条件づけ記憶はトラウマ記憶の代表的モデルであり、げっ歯類の恐怖条件づけ文脈記憶課題は世界的に用いられる恐怖記憶課題である。恐怖記憶は固定化のプロセスを経て、安定な記憶として貯蔵され、恐怖記憶が想起（思い出）されると恐怖反応が表出する。しかし、恐怖記憶を想起しても再び恐怖体験が起こらなければ、安全学習、すなわち、恐怖反応が減弱する恐怖記憶の消去が誘導される。我々の過去の解析から、消去記憶の固定化には前頭前野における新規遺伝子発現が重要であることが示されている。他グループの解析によっても恐怖記憶消去に対する前頭前野の重要性が示されているものの、前頭前野による恐怖条件づけ文脈記憶消去の獲得から消去記憶固定化に至る制御機構は未だ不明である。そこで、本研究では、光遺伝学的手法を用いて、消去獲得から消去記憶固定化に至るプロセスに対する前頭前野の役割の解析を試みた。前頭前野は Prelimbic region（PL）と Infralimbic region（IL）により構成されるため、前脳興奮性ニューロン特異的にチャネルロドプシン 2 (ChR2)を発現するトランスジェニックマウス（Tg）を用いて、PL あるいは IL を光操作によって活性化した影響を解析した。恐怖条件づけ文脈学習 24 時間後に、消去を誘導するために 30 分間電気ショックを受けたチャンバーにマウスを戻し（消去学習）、PL または IL をこの間活性化した。その 24 時間後に再度マウスをチャンバーに 5 分間戻し、消去記憶固定化を評価した（テスト）。消去学習中の IL 活性化は消去獲得と消去記憶には大きな影響を及ぼさなかった。しかし、消去学習中の PL 活性化は消去獲得には影響を及ぼさなかったものの、テストではすくみ反応を有意に増加させた。従って、PL 活性化は消去記憶の固定化を妨げることが示唆された。本研究の結果から、前頭前野 PL 領域の興奮性ニューロンは消去記憶固定化を負に制御することが示唆された。

Medial prefrontal cortex, Fear memory, Optogenetics

講演番号：3E3p11
講演日時：3 月 26 日 16:00～ 1 号館 E3 会場

HP1αクロモドメインを用いた新規蛍光プローブの開発とクロマチン動態観察

Development of fluorescent probes using HP1α chromodomain and imaging of chromatin dynamics

○佐々木 和樹[1]、鈴木 律裕[2]、中尾 洋一[2]、吉田 稔[1,3] ([1]理研 CSRS・ケミカルゲノミクス、[2]早稲田大・先端理工・化学・生命化学科、[3]東大院農・応生工)
○Kazuki SASAKI[1], Michihiro Suzuki[2], Yoichi Nakao[2], Minoru Yoshida[1,3] ([1]Chem. Genomics Res. Gr., RIKEN CSRS, [2]Dept. Chem. Biochem., Waseda Univ., [3]Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo)

エピジェネティクスは、遺伝子の塩基配列によらない発現制御機構である。その中心は、主にヒストンのアセチル化、メチル化、リン酸化や DNA のメチル化などの化学修飾が担っている。個体において、遺伝子の情報が共通しているにもかかわらず、器官ごとに異なる遺伝子の発現が活性化しているのは、細胞の分化の際にエピジェネティックな変化が起きているためだと考えられている。また、近年精力的に研究されている細胞のリプログラミングの過程において、細胞を初期化するために、エピジェネティックな変化が起きていると考えられている。しかし、ダイナミックに動いているヒストン修飾の変化を評価する方法は、一般に細胞を破砕もしくは固定する必要があるため、エピジェネティクスの変化がいつ起こっているのか、どのように起こっているのかといった詳細な解析は難しかった。そこで、ヒストン修飾を可視化検出するために、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を利用した蛍光プローブ Histac を開発し、生細胞内でのエピジェネティクスの変化をリアルタイムに解析することを可能にした。この蛍光プローブは、ヒストンとヒストン修飾結合ドメインをフレキシブルなリンカーで繋ぎ、その両端に FRET を起こす蛍光蛋白質のペアを繋いだもので、ヒストン修飾による結合ドメインとの分子内結合を FRET の変化によって検出する蛍光プローブである。ヒストン修飾結合ドメインにトリメチル化ヒストン H3K9 と結合する HP1αのクロモドメインを用いた。メチル化サイトのリジンをアルギニンに置換した蛍光プローブの応答から、作製した蛍光プローブがヒストン H3K9 のメチル化反応特異的に応答していることを確認した。作製した蛍光プローブを用いて、細胞分裂の際の応答を観察したところ、細胞分裂前期に急速な蛍光強度比の上昇が見られ、分裂前中期で一度減少した後、分裂中期で一度下げ止まり、分裂後期で再び減少し、分裂終期で間期と同じレベルに戻った。作製したヒストン H3K9 メチル化プローブは、ヒストン H3K9me3 と HP1αのクロモドメインとの結合に基づくものであり、この結合はメチル化サイトに隣接する H3S10 のリン酸化によって解離するため、分裂前中期での蛍光強度比の減少は H3S10 がリン酸化をされていく過程を示していると考えている。また、神経細胞の突起伸長を誘導した際のヒストン H3 トリメチル化の変動を観察した。癌、神経変性疾患、生活習慣病などの疾患に伴って、エピジェネティクスの異常が観察されており、疾患の原因となり得ると考えられている。そのため、生きた細胞内でヒストン修飾の変化を追うことが可能な検出技術は、薬剤スクリーニングや薬剤の細胞内での作用機序を調べる上での有効なツールになると期待している。

FRET, epigenetics, HP1α

講演番号：3E3p12
講演日時：3 月 26 日 16:11～ 1 号館 E3 会場

二重環状ペプチドを用いた INO80 クロマチンリモデリング複合体機能の人為制御
Operation of the actin family proteins in INO80 chromatin remodeling complex using bicyclic peptide
○原田 海[1]、秋山 祐亮[2]、高橋 裕一朗[2]、町田 奈々子[2]、HEINIS Christian[3]、原田 昌彦[1,2] ([1]東北大農、[2]東北大院農、[3]EPFL LPPT)
○Kai HARADA[1], Yusuke AKIYAMA[2], Yuitiro TAKAHASHI[2], Nanako MACHIDA[2], Christian HEINIS[3], Masahiko HARATA[1,2] ([1]Tohoku Univ. of Agric., [2]Grad. Sch. of Agric. Sci., Tohoku Univ., [3]EPFL LPPT)

真核生物の長大なゲノム DNA は、ヒストンとの複合体であるクロマチンとして核内に収納されており、クロマチンが動的な構造変換を受けることで様々なゲノム機能が制御されている。クロマチン構造変換因子の代表的なものとして、ヒストン修飾酵素やクロマチンリモデリング複合体が挙げられ、これらは単独もしくは協調的にクロマチン構造を変換することでゲノム機能を制御する。こレらの因子のうち、INO80 複合体によるクロマチン構造変換は、遺伝子発現や DNA 損傷修復など重要な機能を担っていることが知られている。また一部のがん細胞では INO80 複合体の制御が異常となっていることが見出されていることから、INO80 複合体と細胞がん化の関連性も注目されている。アクチン関連タンパク質（actin-related protein; Arp）は、多くのクロマチン構造変換複合体やヒストン修飾複合体に含まれていることが知られている。本研究では INO80 複合体のサブユニットである Arp5, Arp8 に着目して、INO80 複合体機能を人為的に操作する手法の開発を試みた。低分子ペプチドに二重環状構造を形成させた bicyclic peptide (BP)は、ターゲット分子に高親和結合することが知られている。我々は Arp5, Arp8 に高親和結合する BP をスクリーニング・合成した（Arp5-BP, Arp8-BP）。これらの BP を細胞内で Arp5, Arp8 に結合させることで、INO80 複合体機能を阻害できる可能性を考えた。そこで、エレクトロポレーション法により、生細胞内にこれらの BP を導入する方法を確立し、細胞中の INO80 複合体の機能評価を行った。INO80 複合体によって転写制御を受ける酸化ストレス応答遺伝子 heme oxygenease 1 (HO-1)の発現を解析したところ、Arp5-BP あるいは Arp8-BP を導入した細胞では HO-1 発現の低下が観察されたことから、これらの BP が INO80 複合体機能を阻害していることが示された。また Arp8-BP 導入細胞における INO80 複合体のクロマチン結合を評価したところ、INO80 複合体の一部がクロマチンから解離していることが明らかとなった。これらの結果から、核内の INO80 複合体の機能を制御する目的で、Arp5-BP、Arp8-BP が利用できる可能性が示された。現在、がん細胞に導入した Arp5-BP, Arp8-BP が、がん細胞の増殖にどのような影響を与えるかについて解析をさらに進めている。

Bicyclic peptide, INO80, Epigenetics

発表責任者：原田昌彦（masahiko.harata.b6@tohoku.ac.jp）

講演番号：3E3p13
講演日時：3 月 26 日 16:22～ 1 号館 E3 会場

脊椎動物ヒストンバリアント H2A.Z のアイソフォーム間での転写制御機構の差異の解析
Functional analysis of two isoforms of vertebrate histone variant H2A.Z in transcriptional regulation

○荻原 望[1]、高橋 大輔[2]、日下部 将之[3]、原田 昌彦[2] ([1]東北大農、[2]東北大院農、[3]神戸大バイオシグナル総合研究センター)
○ Noboru OGIHARA[1], Daisuke TAKAHASHI[2], Masayuki KUSAKABE[3], Masahiko HARATA[2] ([1]Tohoku Univ. of Agric., [2]Grad. Sch. Agric., Tohoku Univ., [3]Biosignal Res. Ctr. of Kobe Univ.)

真核細胞の核内で、DNA はヒストンに結合したクロマチンとして収納されている。このクロマチン構造は、転写、複製、修復といった様々なゲノム機能に影響与えており、クロマチン構造変換によるこれらのゲノム機能の制御はエピジェネティクスとよばれる。エピジェネティクスにより、細胞分化・発生・病態などの高次生命現象が発現するため、その機能解明が進められている。近年、コアヒストンに替わってヌクレオソームに導入されるヒストンバリアントが、エピジェネティック制御に重要な役割を果たすことが見出されている。H2A.Z はコアヒストン H2A のバリアントであり、転写制御をはじめとする様々なエピジェネティック制御に関与することが報告されている。脊椎動物 H2A.Z には二つのアイソフォーム（H2A.Z.1 と H2A.Z.2）が存在する。このうち、H2A.Z.2 の高発現と細胞がん化との関連性が報告されており、二つのアイソフォーム間の機能差が予想されているが、詳細な解析は行われていなかった。そこで本研究では H2A.Z.1 と H2A.Z.2 のアイソフォーム間の機能差を明らかにすることを目的とした。これまでに我々はニワトリ DT40 細胞を用いて、H2A.Z.1 欠損細胞（H2A.Z.1-KO）、H2A.Z.2 欠損細胞（H2A.Z.2-KO）、および両アイソフォームの欠損細胞(H2A.Z-DKO)を樹立している。H2A.Z-DKO 細胞を用いた解析から、H2A.Z がヒートショックや亜ヒ酸ナトリウムによる酸化ストレスに応答する *HSP25*、*EGR1* などの遺伝子の発現に関与することが示された。そこで、H2A.Z.1-KO および H2A.Z.2-KO 細胞を用いて、これらの遺伝子発現の比較解析を行った。その結果、*HSP25*、*EGR1* の発現は H2A.Z.2-KO でのみ大きく変化していることが観察され、二つの H2A.Z アイソフォームが遺伝子発現制御において異なった機能を持つことが示された。さらに、H2A.Z.1-KO および H2A.Z.2-KO 細胞を用いて、クロマチン免疫沈降や網羅的発現解析を行うことにより、二つの H2A.Z アイソフォームの転写制御機構の差異の解明を進めている。

Epigenetics, Chromatin, Histone variant

発表責任者：荻原望（noboru.ogihara.t5@dc.tohoku.ac.jp）

講演番号：3E4a02
講演日時：3 月 26 日 09:11～ 1 号館 E4 会場

Schizosaccharomyces 属におけるピルビン酸含有糖鎖の構造解析
Structural characterization of *N*-linked galactomannans in fission yeasts
○福永 嵩大[1]、樋口 裕次郎[1]、前川 裕美[1]、田中 直孝[2]、竹川 薫[1] ([1]九大院生資環、[2]香川大農)
○Takamasa FUKUNAGA[1], Yujiro HIGUCHI[1], Hiromi MAEKAWA[1], Naotaka TANAKA[2], Kaoru TAKEGAWA[1] ([1]Kyushu univ. of Biosci Biotechnol., [2]Kagawa Univ. of Agric.)

Schizosaccharomyces pombe において、細胞表層の酸性糖鎖は糖鎖末端のガラクトースにピルビン酸が付加している。ピルビン酸化糖鎖に関しては、原核生物には普遍的に見られるが、真核生物においては、一部の海洋生物以外にはほとんど報告がない。我々はこれまでに分裂酵母のピルビン酸含有糖鎖が非性的凝集などの細胞間の認識に重要な役割を果たすことを報告している(1, 2)。しかしながら、糖鎖へのピルビン酸の付加に必要なタンパク質については未だ不明な点が多い。そこで本研究では、ピルビン酸含有糖鎖合成酵素の機能解析を通して、生物種でのピルビン酸含有糖鎖の分布、細胞表層のピルビン酸含有糖鎖生合成機構の解明を目指している。

分裂酵母 *S. pombe* において、細胞表層にピルビン酸が付加されない変異株が取得され、4 つの *pvg*$^{+}$ 遺伝子が同定された(3)。その中で、Pvg1 はゴルジ体においてホスホエノールピルビン酸を基質とするピルビン酸転移酵素であることを当研究室で明らかにした(4)。また、Pvg2, 3, 5 はピルビン酸が付加する β1.3 結合したガラクトースの付加に関与することが構造解析から報告されているが(3)、詳しい生合成機構については明らかになっていない。これら 3 つの機能未知遺伝子について BLAST で相同性遺伝子を検索したところ、Pvg3 においては UDP-Gal を β1,3-結合で転移する酵素のファミリーである GT31(Glycosyl Transferase family 31)に共通して保存されている配列と相同性を有していることがわかった。しかし Pvg2 と Pvg5 に関しては、既知のタンパク質と高い相同性が見られなかったが、*S. pombe* 以外の３つの *Schizosaccharomyces* 属酵母ゲノムにもホモログ遺伝子が存在することがわかった。そこで、これら 4 つの遺伝子の発現を RT-PCR により確認したところ、いずれの種においても構成的な発現が確認された。この結果から *Schizosaccharomyces* 属内でピルビン酸化糖鎖の合成機構が保存されていることが予想されたため、*Schizosaccharomyces* 属酵母の *N* 結合型糖鎖を抽出し、構造解析を行った。その結果、*Schizosaccharomyces* 属 4 種の細胞表層糖鎖にはピルビン酸が付加されていることを明らかにすることができた。

1) Matsuzawa T et al. *FEMS Yeast Res.* 13, 259-266. (2013).
2) Matsuzawa T. et al. *Mol Microbiol.* 82, 1531-1544 (2011).
3) Andreishcheva E N et al. *J. Biol. Chem*. 279, 35644-35655 (2004).
4) Yoritsune K. et al. *FEBS Lett.* 587, 917-921 (2013).

Pyruvylated galactose, Fission yeast, *N*-glycan

発表責任者：竹川　薫（takegawa@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3E4a03
講演日時：3 月 26 日 09:22～ 1 号館 E4 会場

酵母細胞表層糖鎖の合成研究

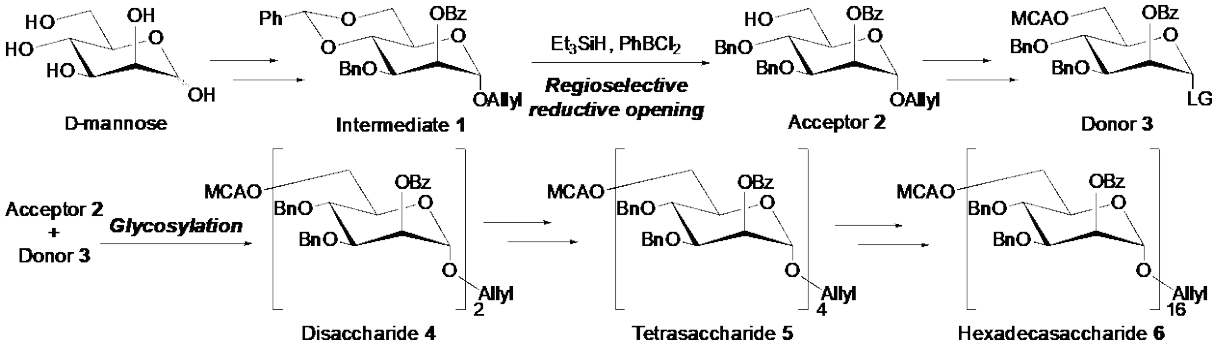
Synthetic study of yeast cell wall mannan

○矢野 佑介[1]、吉田 英恵[1]、勝田 亮[2]、矢島 新[2]、石神 健[2]、額田 恭郎[2] ([1]東農大院・農、[2]東農大・生命)
○Yusuke YANO[1], Hanae YOSHIDA[1], Ryo KATSUTA[2], Arata YAJIMA[2], Ken ISHIGAMI[2], Tomoo NUKADA[2] ([1]Graduate School of Agriculture, Tokyo Univ. of Agric., [2]Department of Chemistry for Life Sciences and Agriculture, Tokyo Univ. of Agric.)

酵母細胞表層は、内層と外層の二層からなる構造を持つ。中でも外層に存在するマンナンタンパク質は、酵母細胞特有の細胞壁構成成分であり、細胞壁重量の約半分を占める。マンナンは α(1→6)結合マンノースを主鎖とし、種々のマンノース側鎖を持ったハイマンノース型糖鎖である[1)]。これにより高度に修飾された糖鎖からなるマンナンは、非常に複雑な構造を持っており、酵母細胞壁から直接単離、精製をすることは困難である。

そこで我々は有機合成化学の手法を用いて構造の明確な糖鎖を合成し、その合成法を確立することと共にマンノース多量体についての新たな知見および配座の解析を目標に合成研究に取り組んだ。

当研究室ではこれまで二糖を糖供与体として二糖単位での糖鎖伸長を行うことで八糖までの合成に成功している。今回我々は、合成の効率化を目的とし、合成した多糖を糖受容体だけでなく糖供与体にも利用することとした。本合成戦略では、分子量の増加に伴い反応性の低下が考えられるものの、一度のグリコシル化反応で分子量を二倍に増やす収束型の合成が可能となり多糖合成の効率化、迅速化が見込める。D-マンノースより誘導した中間体 **1** に対して位置選択的なベンジリデンアセタールの還元的開環を行い糖受容体 **2** を得た。これを 3 工程で糖供与体 **3** へと誘導し、種々のグリコシル化反応に附すことで、二糖 **4** を得た。二糖 **4** を糖受容体、糖供与体へとそれぞれ誘導し、グリコシル化反応の条件に附すことで四糖 **5** を合成した。次に四糖 **5** から糖受容体、糖供与体を調正し八糖を、さらに合成した八糖を糖受容体、糖供与体へと誘導し、グリコシル化反応に用いることで十六糖 **6** の合成を達成した。これにより少なくとも八糖までが糖受容体、糖供与体として利用可能であることが明らかとなった。



1) Frans M. Klis, Andre Boorsma, Piet W. J. De Groot, *Yeast*, **2006**, *23*, 185.

cell wall sugar chain, mannan, glycosylation

発表責任者：額田　恭郎（t1nukada@nodai.ac.jp）

講演番号：3E4a04
講演日時：3 月 26 日 09:33～ 1 号館 E4 会場

Prevotella 属菌群の産生する糖タンパク質糖鎖遊離酵素の特異性と宿主糖タンパク質糖鎖遊離・分解酵素系の存在

Specificities of endo-β-*N*-acetylglucosaminidases and the evidence for the enzyme systems responsible for the release and degradation of *N*-glycans from host glycoproteins in genus *Prevotella*

森 真司[2]、竹内 朋史[1]、高谷 尚弥[1]、○伊藤 和央[1] ([1]阪市大・院理、[2]阪市大・理)
Shinji MORI[2], Tomofumi TAKEUCHI[1], Naoya TAKATANI[1], ○Kazuo ITO[1] ([1]Grad. Sch. of Sci., Osaka City Univ., [2]Fac. of Sci., Osaka City Univ.)

【目的】我々は、native な糖タンパク質からアスパラギン結合型糖鎖を遊離するエンド-β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ産生菌を各種動物から探索し、産生酵素の解析と産生菌における糖鎖異化機構を解析している。また、これらの酵素の糖鎖工学への応用開発を行っている。これまで、ヒトより糖鎖遊離酵素産生菌を分離し、そのうち同定した *Prevotella* 属菌の産生酵素をエンド PB、エンド Psp.、エンド PM と命名した。これらは菌体膜結合型酵素で、native な糖タンパク質から 2～4 本鎖の多分岐コンプレックス型糖鎖を遊離する。これらには糖鎖構造特異性の異なるアイソザイムが存在する。さらに、新たなエンド-β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ産生 *Prevotella* 属菌をヒトより分離した。本研究では、これまでに得られた *Prevotella* 属菌の産生するエンド-β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼの性質を比較した。また、菌体において native な糖タンパク質から遊離する糖鎖の解析を行った。
【方法】糖鎖遊離活性は、種々糖タンパク質を基質として測定した。糖タンパク質から遊離する糖鎖は、TLC および質量分析計によって解析した。
【結果、考察】分離した *Prevotella* 属菌株いずれも洗浄菌体からエンド-β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ活性が検出され、菌体膜結合型酵素と考えられた。これら *Prevotella* 属菌の酵素は、native なヒトトランスフェリンやヒトα_1酸性糖タンパク質から 2～4 本鎖コンプレックス型糖鎖を遊離するもの、さらにウシ RNase B からもハイマンノース型糖鎖を遊離するもの、コンプレックス型糖鎖は遊離せず RNase B からハイマンース型糖鎖を遊離するものの 3 群に大別された。このため、*Prevotella* 属菌は、種間によって異なる糖鎖構造特異性を示す菌体結合型エンド-β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼを発現しているものと考えられた。一方、これら *Prevotella* 属菌体では、菌体結合エンド-β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼによってヒトトランスフェリンあるいはウシ RNase B から遊離した糖鎖は、さらに逐次分解を受けていた。また、この逐次分解酵素活性は菌体破砕によって上昇した。以上の結果から、ヒト共生細菌 *Prevotella* 属菌には、菌体表層においてエンド-β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼが糖タンパク質からアスパラギン結合型糖鎖を遊離し、遊離した糖鎖を菌体内のエキソグリコシダーゼ群が逐次分解する、宿主糖タンパク質糖鎖の遊離・取込み・分解酵素系の存在が示唆された。さらに、これらの糖鎖構造特異性の異なるエンド-β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼおよびエキソグリコシダーゼ酵素群は、糖タンパク質のアスパラギン結合型糖鎖の遊離やリモデリングあるいはアスパラギン結合型糖鎖結合配糖体合成のための有用酵素と考えられた。

Prevotella, endo-β-*N*-acetylglucosaminidase

講演番号：3E4a05
講演日時：3 月 26 日 09:44～ 1 号館 E4 会場

β-1,3-グルカナーゼの加水分解特異性を評価するための FRET 型β-1,3-グルカンオリゴ糖誘導体の合成

Syntheses of FRET-type β-1,3-glucan oligosaccharide derivatives for evaluating β-1,3-glucanase hydrolytic specificity

宮川 淳、○金野 克博、山村 初雄（名工大院工）
Atsushi MIYAGAWA, ○Katsuhiro KONNO, Hatsuo TAMAMURA (Grad. Sch. Eng., Nagoya Inst. of Tech.)

近年、医療の高度化や患者の高齢化に伴い、免疫力が低下した易感染宿主の増加による深在性真菌感染症が問題となっており、代表的な深在性真菌として *Candida* と *Aspergillus* が挙げられる、その真菌類の細胞壁は主にβ-グルカンにより構成されているため、現在の真菌感染の検査は血中のβ-グルカンを測定することで行われている。しかし現在の方法はβ-グルカンによる汚染や医療材料に含まれるセルロースなどの物質に偽陽性を示してしまう。そこで、真菌が産生するがヒトには存在しないβ-1,3-グルカナーゼを真菌感染の検出対象とすることを考え、β-1,3-グルカナーゼの基質となる分子を合成し、その加水分解特異性を調べることにした。

まず、真菌由来のβ-1,3-グルカナーゼの基質となる、蛍光標識したβ-グルカン誘導体として、蛍光共鳴エネルギー移動（Fluorescence Resonance Energy Transfer; FRET）を起こすことのできるアゾベンゼンとクマリンを分子内に導入する。この分子はクマリンの蛍光は FRET により消光しており、β-1,3-グルカナーゼによって加水分解をうけることで、青色蛍光を観察できる。基質の合成において、反応段階数を減らし、効率良く合成を進めるために、グリコシルドナー、アクセプターに変換可能な共通中間体を合成した。グリコシドドナー、アクセプターの反応性を高めるため、共通中間体の 3 位には *tert*-ブチルジメチルシリル基、4 位にはベンジルエーテル基を用いることで、armed 効果により反応性を高めた。グリコシルドナー1 位をトリクロロアセトイミデート基に変換し、3 位のシリル基を脱保護したグリコシルアクセプターとグリコシル化を行った。その結果、単糖グリコシルドナーと 2 糖グリコシルアクセプターのグリコシル化による 3 糖合成は 87.5%で、3 糖グリコシルドナーと 2 糖グリコシルアクセプターの 5 糖合成は 54.2%の収率であった。本発表では、これらの合成の詳細およびβ-グルカン誘導体の主鎖の長さの違いによる FRET の効率、β-1,3-グルカナーゼに対する加水分解反応の違いを述べる。

β-glucan, β-1,3-glucanase, FRET

発表責任者：宮川淳（miyagawa.atsushi@nitech.ac.jp）

講演番号：3E4a06
講演日時：3 月 26 日 10:05～ 1 号館 E4 会場

cytosolic PNGase/ENGase を欠損した A. thaliana の構築と内在する遊離 N-グリカン構造解析
Construction of cytosolic PNGase/ENGase double knockout of A. thaliana and analysis of structural features of free N-glycans in the mutant line.
○白井 佐保子[1]、上村 亮太[2]、前田 恵[1,2]、三崎 亮[3]、藤山 和仁[3]、木村 吉伸[1,2] ([1]岡山大農、[2]岡山大院・環境生命、[3]阪大・生物工学国際交流センター)
○Sahoko SHIRAI[1], Ryota UEMURA[2], Megumi MAEDA[1,2], Ryo MISAKI[3], Kazuhito FUZIYAMA[3], Yoshinobu KIMURA[1,2] ([1]Faculty of Agic., Okayama Univ., [2]Graduate school of environmental and life science, Okayama Univ., [3]International center for biotechnology Osaka Univ.)

【背景・目的】真核生物において，新生タンパク質は小胞体（ER）でオリゴ糖転移酵素（OST）による *N*-グリコシル化を受け，オリゴ糖鎖 (Glc3Man9GlcNAc2) を付加され，フォールディングする。ミスフォールドした新生糖タンパク質は小胞体関連分解（ERAD）を受ける。植物細胞ではミスフォールド糖タンパク質上の *N*-グリカンの特定マンノース残基が除去された後，露出したα-1,6 マンノース残基がレクチン様受容体 OS9 により認識され，推定トランスロコンを介して細胞質へと逆輸送される。その後プロテアソームにより分解される。それに先立ち，糖タンパク質上の糖鎖は細胞質ペプチド:*N*-グリカナーゼ（cPNGase）により遊離し還元末端側に *N,N'*-ジアセチルキトビオース（GlcNAcβ1-4GlcNAc）構造を保持した GN2-ハイマンノース型遊離 *N*-グリカン（GN2-HMT-FNGs）が生成する。さらにエンド-β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ（ENGase）により GN2-HMT-FNGs から, GlcNAc1 残基のみを保持した GN1-HMT-FNGs が生成する。ミスフォールド糖タンパク質から生じたこれらの FNGs は植物生長に関わるシグナル分子としての機能が推定されている [1]。FNGs の生理機能解明研究の一環として当研究室では，FNGs の ENGase 遺伝子をダブルノックアウトした *A. thaliana* の構築に成功している[2]。そこで本研究では（１）cPNGase/ENGase 欠損株を構築し，（２）そこに発現される FNGs の化学構造解析を行った。【方法・結果】（１）*A. thaliana* の cPNGase 欠損株（SALK_098451）と，ENGase 二重欠損株（SALK_03210/SAIL_1157）を交配し，各遺伝子の欠損を確認した cPNGase/ENGase 欠損株を得た。（２）野生株（Col-0），ENGase 欠損株，cPNGase/ENGase 欠損株の地上部を液体窒素中で破砕後，0.1 N アンモニア水でオリゴ糖鎖を抽出した。抽出液を透析後，透析外液から中性糖鎖を陽イオン交換, 陰イオン交換, ゲルろ過に供し調製した。それらを蛍光標識（PA 化）後，ConA カラム，RP-HPLC，SF-HPLC により精製し，MS，MS/MS 分析および酵素消化により構造解析を行った。その結果，GN1-HMT-FNGs は野生株でのみ検出された（4.6 nmol/g）。一方，GN2-HMT-FNGs は，ENGase 欠損株では 10.6 nmol/g，cPNGase/ENGase 欠損株では 4.7 nmol/g 検出された。【考察】PNGase/ENGase 欠損株でも FNGs は完全消失せず GN2-HMT-FNGs が検出された。これにより OST を介する cPNGase 非依存的な GN2-HMT-FNGs の産生機構が存在し，それら生成物の一部が細胞質へ排出され ENGase により GN1-HMT-FNGs が生成していることが示唆された。

[1] Priem, B., *et al*., *Plant Physiol.*, ***98***, 399-401 (1992)　[2] Kimura, Y., *et al. Biosci. Biotechnol.Biochem.,* **75**, 1019-1021 (2011)

free N-glycan, cytosolic PNGase, ENGase

発表責任者：木村　吉伸（yosh8mar@okayama-u.ac.jp）

講演番号：3E4a07
講演日時：3 月 26 日 10:16～ 1 号館 E4 会場

酸性ペプチド *N*-グリカナーゼ（aPNGase）過剰発現トマト（T2 世代）の表現型解析および aPNGase 活性解析

Phenotype analysis and PNGase activity of acidic PNGase-overexpressed tomato line （T2 generation）

○山本 千晴[1]、小椋 美夏子[1]、前田 恵[1,2]、木村 吉伸[1,2]（[1]岡山大農、[2]岡山大学大学院環境生命科学研究科）

○Chiharu YAMAMOTO[1], Mikako OGURA[1], Megumi MAEDA[1,2], Yoshinobu KIMURA[1,2] ([1]Faculty of Agric., Okayama Univ., [2]Graduate school of environmental and life science, Okayama Univ.)

【目的・背景】植物特異的な酸性ペプチド：*N*-グリカナーゼ（aPNGase）は，キトビオースを有する遊離型 *N*-グリカン（FNGs）を生成する脱グリコシル化酵素の一つであり，液胞あるいは細胞外空間で糖タンパク質の分解系に関与している。分化生長中の植物組織には，aPNGase により生成したと考えられる植物複合型遊離 *N*-グリカン（PC-FNGs）が存在するが，その生理機能については未だ明らかにされていない。当研究室では，トマト aPNGase-Le を過剰発現させたマイクロトムを構築し，その T2 世代果実では aPNGase 活性の亢進及び FNGs 量の顕著な増加を確認するとともに，果実の成熟促進を観察した [1]。しかしながら T4 世代について同様の解析を行ったところ，T2 世代のような果実の成熟促進，酵素活性の顕著な亢進を確認することができなかった [2]。そこで本研究では，aPNGase により生成した FNGs による果実成熟促進への関与を追試するために，aPNGase-Le 過剰発現体を用い，（1）表現型解析，（2）新規活性測定法による aPNGase 活性解析を行った。

【方法・結果】（1）aPNGase-Le 過剰発現トマト（T2 世代）の葉からゲノム DNA を抽出後，PCR 法により T-DNA の挿入を確認し aPNGase-Le 過剰発現体と導入遺伝子を持たないアザイガスをコントロールとして用いた。次いで, aPNGase-Le 遺伝子の相対発現を解析するため, 葉から total RNA を抽出後，ゲノム DNA を除去し，cDNA を合成した。定量的 RT-PCR の結果，過剰発現体では aPNGase-Le の強い発現を確認した。表現型解析では，奇形が見られやすい第 1 花房を除き，第 2 花房，第 3 花房にそれぞれ 2 個ずつ,計 4 個の果実を残し，着花日から Breaker 期までの日数を測定した。同様の解析を 2 回繰り返した結果，1 回目は 1.1 日（$p=0.031$），2 回目は 1.9 日（$p=0.005$）の有意な果実の成熟促進が確認された。現在，3 回目の表現型解析を行っている。（2）aPNGase 活性測定解析を行うため，果実（Green）を用いて定量的 RT-PCR 法により個体を選抜した。現在，卵黄由来シアル酸含有 *N*-グリコペプチドを基質として用い，生成した糖鎖（NeuNAc2Gal2GlcNAc2Man3GlcNAc2）を蛍光標識後，DEAE-HPLC/RP-HPLC 系により分離・検出する新規活性測定法を用いて aPNGase 活性解析を行っている。

[1] 松丸ら 2016 年度日本糖質学会年会要旨集 p135. [2]小椋ら 農芸化学会中四国支部第 50 回記念講演会要旨集 p72（2018 年 1 月 広島）

acidic peptide: *N*-glycanase, free *N*-glycans, Micro-Tom

発表責任者：木村吉伸（yosh8mar@okayama-u.ac.jp）

講演番号：3E4a08
講演日時：3 月 26 日 10:27～ 1 号館 E4 会場

Endo-CC N180H を用いたフラボノイドへの糖鎖転移反応
Transglycosylation of glycans onto flavonoids by Endo CC-N180H
○藤澤 悠[1]、ハイエス マーク[2]、大橋 貴生[1]、三﨑 亮[1]、ペトルスカ ユルグ[2]、藤山 和仁[1]([1]阪大生国セ、[2]デュッセルドルフ大ユーリッヒ総合研究機構)
○Yu FUJISAWA[1], Marc Hayes[2], Takao OHASHI[1], Ryo MISAKI[1], Joerg Pietruszka[2], Kazuhito FUJIYAMA[1] ([1]ICBiotech, Osaka Univ., [2]FZJ, HHU Dusseldorf)

Endo-CC は *Coprinopsis cinerea* 由来のエンド-β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼであり、*N*-結合型糖鎖のキトビオース内のグリコシド結合を切断する加水分解酵素である。また Endo-CC N180H 変異体が *N*-結合型糖鎖のトランスグリコシル化活性を有する糖鎖転移酵素として開発された(Eshima et al. 2015)。この Endo-CC N180H はシアリルグリコペプチドやシアリルグリコオキサゾリンを供与体基質として、シアリルバイアンテナ糖鎖を 1,3-ジオールを有する化合物に転移させることが知られている。一方でフラボノイドは主要な植物二次代謝産物の一つであり、単糖および糖鎖が付加した配糖体として存在している。これら糖鎖構造は物性および生物学的特性に影響を与える。例えば、血流改善効果が認められているフラボノイド配糖体にグルコースをさらに付加したものでは体内への吸収率が改善された(Takumi et al. 2011)。同様の骨格を持つフラボノイド配糖体の糖鎖部分を改変したものについて、どのような物性および生物学的特性を持つのかは興味深い。そこで本研究ではこの Endo-CC N180H を用いて、*N*-結合型糖鎖のフラボノイド配糖体への転移反応を調べた。

市販の Endo-CC N180H を用いてシアリルグリコペプチドを供与体基質、フラボノイド配糖体であるプルニンを受容体基質として酵素反応を行った。酵素反応産物の逆相 HPLC 解析の結果、シアリルバイアンテナ糖鎖が付加したと考えられる生成物が初めて検出された。現在、本酵素の速度論的解析、および様々な配糖体に対する基質特異性を調査している。

Endo-cc n180h, flavonoid, transglycosylation

講演番号：3E4a09
講演日時：3 月 26 日 10:38～ 1 号館 E4 会場

グルコース・グルコサミン交互共重合体を用いたセルロースのアミノ化

Amination of cellurose with alternating copolymer of glucose and glucosamine

○上原 大輝、菅 大介、藤原 篤男、森 帆乃未、宇佐美 亮児、南雲 玲香、鈴木 市郎、武田 穣（横国大工）
○Daiki UEHARA, Daisuke KAN, Atsuo FUJIWARA, Honomi MORI, Ryouji USAMI, Reika NAGOMO, Ichirou SUZUKI, Minoru TAKEDA (Yokohama Natl. Univ.)

【背景・目的】植物の構造多糖であるセルロースと節足動物の構造多糖であるキチン（キトサン）は、ともに調達が容易な天然素材でありそれぞれ様々な用途がある。昨今の脱プラスチックの潮流によって、さらなる用途開発が加速しようとしている。両素材の短所を克服して新たな用途を開拓すべく、化学的手法ないし発酵法（セルロース産生菌）によるセルロースへのアミノ基ないしグルコサミン残基の導入ないし、糖転移酵素を用いた交互共重合体（グルコサミノグルカン、GG）の合成が試みられてきた。当研究室では糸状性硫黄酸化細菌を用いた GG の調製手順を独自の視点で確立し、GG の特徴づけを行っている。その過程で、セルロースに対する不可逆吸着現象により新素材（表面アミノ化セルロース）が得られることを見出した。今回は吸着に影響を及ぼす因子について報告する。
【方法】有機酸を炭素源として *Thiothrix nivea* を培養し、リゾチーム・水酸化ナトリウム・界面活性剤で細胞を取り除いて菌体外構造体（マイクロチューブ状の鞘）を回収した。塩酸処理によって鞘から遊離させた GG を有機溶媒沈殿と透析で回収した。GG を希塩酸に溶解し、ろ紙を浸漬することでろ紙の表面アミノ化を行った。その後、ろ紙を回収して希塩酸及び水での洗浄を経て乾燥して表面アミノ化ろ紙(GG ろ紙)を得た。表面アミノ化の度合いを調べるにあたっては GG ろ紙に蛍光標識化(FITC 化）を施し、紫外線照射下での蛍光強度（輝度）を測定した。輝度を指標として、浸漬時の GG 濃度、塩酸濃度、温度、浸漬時間の影響および各種塩の添加効果を検討した。さらに、セルラーゼ耐性（還元力上昇）とインベルターゼ固定化能（ショ糖分解能）による表面アミノ化効果の検証も行った。
【結果・考察】NMR スペクトルで調べた限り、単純な調製手順ながら得られた GG への著しい不純物の混入はないと判断した。ただし、培地 1 L あたりの GG 収量は 10-15 mg であり、特に培養条件の最適化が課題である。GG ろ紙の発する蛍光は、GG 濃度に応じて上昇する傾向が認められた。また、時間依存性も確認された。塩酸濃度については、少なくとも 50 mM 以下では濃度が高いほど GG の吸着が促進された。また 100℃以下であれば、温度上昇は吸着量の増大をもたらすことがわかった。塩化ナトリウムの添加効果は顕著で、50 mM では無添加に比べ約 10 倍の蛍光強度が観測された。塩化カリウムや硫酸マグネシウムでも同様の促進効果が認められた。より好ましい条件で作成した GG ろ紙のセルラーゼ耐性とインベルターゼ固定化能は、従来の条件で作成した GG ろ紙に比べ格段に勝ることが判明した。すなわち吸着条件を最適化すれば、キチン・キトサンケミストリーを展開可能なセルロース素材という表面アミノ化セルロースの特徴をさらに際立たせることができると期待される。

Thiothrix nivea, cellurose, amination

講演番号：3E4a10
講演日時：3 月 26 日 10:49～ 1 号館 E4 会場

シロイヌナズナ *PGE3* 遺伝子欠損変異体の単糖組成解析
Monosaccharide component analysis of *Arabidopsis thaliana PGE3* gene mutant
○橘 有咲、大橋 貴生、松下 宗義、三﨑 亮、藤山 和仁（阪大生国セ）
○ Arisa TACHIBANA, Takao OHASHI, Muneyoshi MATSUSHITA, Ryo MISAKI, Kazuhito FUJIYAMA (ICBiotech, Osaka Univ.)

高等植物においてペクチンはセルロース、ヘミセルロースと並ぶ主要な構成成分であり、一次細胞壁の約 30%を占めている。その構造は非常に複雑であり、ホモガラクツロナン (HG)、ラムノガラクツロナン I (RG-I)、ラムノガラクツロナン II (RG-II)の 3 つの構造領域に分類される。ポリガラクツロナーゼは HG の主鎖を構成するポリガラクツロン酸を加水分解する酵素である。モデル植物であるシロイヌナズナにおいて 69 種類のポリガラクツロナーゼが予測されているが、そのほとんどが酵素活性の有無や細胞内局在を含めて未解明である。一方で、百日草の ZePG1(Nakanishi et al. 2004)、およびエンドウ芽生え由来ポリガラクツロナーゼがゴルジ体に局在していることが報告されている(Ohashi et al. 2017)。既知のポリガラクツロナーゼは全て可溶性タンパク質であり、膜結合型として存在する可能性があることは非常に興味深い。そこで ZePG1 とアミノ酸配列相同性の高いポリガラクツロナーゼをシロイヌナズナから見出し、PGE3 と名付けた。

PGE3 遺伝子がポリガラクツロナーゼ活性を示しているかどうかを調べるため、分裂酵母を用いて組換えタンパク質を調製した。ポリガラクツロナーゼ活性を解析したところ、経時的な分解産物の増加が認められ、*PGE3* 遺伝子はポリガラクツロナーゼをコードしていることが明らかとなった。植物体での *PGE3* 遺伝子の機能を解析するため、シロイヌナズナにおいて *PGE3* 遺伝子に対する T-DNA 挿入変異体の解析を行った。単糖組成解析の結果、変異体は WT に比べ GalA、Rha、Xyl の割合が減少していた。Rha、Xyl はペクチンの RGI、RGII 領域や、ヘミセルロースに含まれる。これは *PGE3* 遺伝子の欠損は HG 領域だけでなく RGI と RGII 領域、さらにはヘミセルロースにも影響を与えることを示唆した。今後、ペクチンとヘミセルロース画分を分画することで、*PGE3* 遺伝子欠損のより詳細な影響の解析が可能となる。

pectin, polygalacturonase, *Arabidopsis thaliana*

講演番号：3E4a11
講演日時：3 月 26 日 11:10～ 1 号館 E4 会場

酵素法により調製した糖ペプチドを基質とした ENGase の活性測定

ENGase activity assay using glycopeptides prepared by enzymatic method

○高島 晶、黒河内 政樹、大隅 賢二、菅原 州一、森 昌子、水野 真盛、天野 純子、高田 美生、松田 昭生（（公財）野口研究所)
○Shou Takashima, Masaki Kurogochi, Kenji Osumi, Shu-ichi Sugawara, Masako Mori, Mamoru Mizuno, Junko Amano, Yoshio Takada, Akio Matsuda (The Noguchi Institute)

Endo-β-*N*-acetylglucosaminidase (ENGase)は、*N*-結合型糖鎖の還元末端側に存在する *N,N'*-ジアセチルキトビオースユニット間を切断する酵素である。近年、各種糖タンパク質の糖鎖リモデリング法として、ENGase およびその変異体を用いた方法が開発されたことにより、糖鎖関連分野において注目されている酵素の一つであるともいえる。本酵素の糖鎖切断活性の測定には、ribonuclease B などの糖タンパク質糖鎖、ピリジルアミノ(PA)化糖鎖、シアリルグリコペプチド(SGP)といった糖ペプチドなどが基質として用いられているが、それぞれの基質には一長一短がある。例えば、糖タンパク質基質は各種基質が入手可能であるが、一般に糖鎖構造がヘテロである。PA 化糖鎖は様々な糖鎖構造の市販品が入手可能であるが、還元末端の構造が天然型糖鎖とは異なっている。そのため、PA 化糖鎖に対する ENGase の切断活性が、必ずしも糖タンパク質糖鎖に対する切断活性を反映しない場合がある。また、糖ペプチド基質は天然型糖鎖をもち、SGP などが市販品として入手可能であるが、糖鎖構造のバリエーションは PA 化糖鎖にくらべると少ない。今回、本研究では SGP を出発原料として、これに各種の糖加水分解酵素や糖転移酵素を作用させて様々な糖鎖構造の糖ペプチドを調製し、ENGase の活性測定用基質として用いることにした。まず SGP にシアリダーゼ、ガラクトシダーゼを作用させて G0 型糖鎖を有する糖ペプチド(G0P)を調製した。これに HEK293 細胞に生産させたヒト GnT-III～V といった *N*-アセチルグルコサミン転移酵素を作用させ、3 本鎖糖鎖、4 本鎖糖鎖や bisecting GlcNAc 含有糖鎖を調製した。さらに、HEK293 細胞に生産させたガラクトース転移酵素(ヒト B4GalT1)を作用させ、これらの糖鎖にガラクトースを付加した。このようにして調製した糖ペプチドを基質として、マウス腸内細菌 *Muribaculum intestinale* 由来の新規 ENGase による糖鎖切断反応を行った。その結果、本酵素は複合型糖鎖のうち、糖鎖の非還元末端がガラクトースまたはシアル酸である糖鎖を好基質とする酵素であることが判明した。

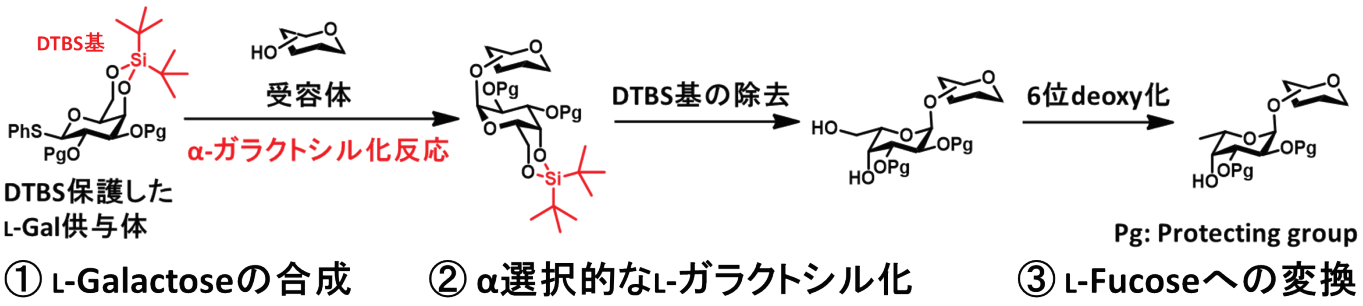
Endo-β-*N*-acetylglucosaminidase, glycopeptide, ENGase

講演番号：3E4a12
講演日時：3 月 26 日 11:21～ 1 号館 E4 会場

新規合成戦略に基づくフコース含有糖鎖の構築
An alternative synthetic strategy for alpha-fucopyranosides
○松橋 拓也[1]、今村 彰宏[1]、石田 秀治[1,2] ([1]岐阜大・応用生物、[2]岐阜大・G-CHAIN)
○Takuya MATSUHASHI[1], Akihiro IMAMURA[1], Hideharu ISHIDA[1,2] ([1]Gifu Univ., Faculty of Applied Biological Sciences, [2]Gifu Univ., G-CHAIN)

【目的】天然において、L-フコースは主に α 配向で結合した α-L-フコシドとして存在し、細胞接着に重要なルイス抗原糖鎖や抗腫瘍活性を持つ硫酸化多糖フコイダンなど、多様な生理活性糖鎖中に見られる。一方、α-L-フコシドを合成化学的視点から見ると、1,2-*cis* 配置の結合であるため化学的構築が難しく、これまでに汎用的かつ信頼性の高い合成方法は確立されていない。そこで本研究では、汎用性に富む新規 α-L-フコシド合成法の開発を目的とした。
【方法・結果】我々は、L-フコースの構造が 6-デオキシ-L-ガラクトースであるという構造的特徴に着目し、当研究室で開発した高収率かつ高立体選択的 α-D-ガラクトシル化（DTBS 効果）[1]を鍵反応とする新規合成戦略を立案した。すなわち、まず DTBS 効果により効率的に α-L-ガラクトシド結合を構築し、その後 6 位をデオキシ化することで α-L-フコシドへ導けると考えた。

まず、D-ガラクトースから L-ガラクトースを調製し、4,6 位を DTBS 基で保護した L-ガラクトース供与体へと誘導した。続いて、ルイス X,Y や *N*-グリカン糖鎖等の生理活性糖鎖の合成を指向した様々な糖受容体を合成し、L-ガラクトース供与体とのグリコシル化反応を検討した。その結果、高収率かつ高立体選択的に α-L-ガラクトシドを得ることに成功した。また、グリコシル化の際、立体異性体の生成は確認されなかった。続いて、モデルとして D-ガラクトースを用いて 6 位デオキシ化の最適化を行った。脱離基の種類や導入法および還元反応を検討した結果、Barton-McCombie Deoxygenation を利用した 6 位デオキシ化が最適であると分かった。次に、確立した方法を利用して、各種 α-L-ガラクトシドを α-L-フコシドへと変換した。その結果、目的とする種々のフコース含有糖鎖の合成に成功した。



本研究の概要

[1] (a) *Tetrahedron Lett*. **2003**, *44,* 6725–6728; (b) *J. Org. Chem*. **2016**, *81*, 9086–9104.

L-fucose, Glycosylation, Stereoselectivity

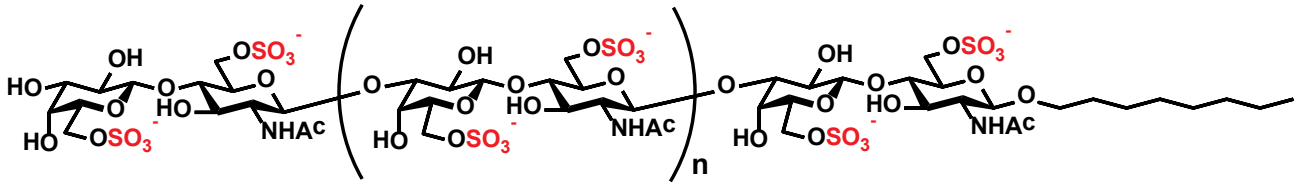
講演番号：3E4a13
講演日時：3 月 26 日 11:32～ 1 号館 E4 会場

ブロック合成法によるケラタン硫酸糖鎖の化学合成

Chemical synthesis of keratan sulfate glycans via block synthetic approach

○尾崎 隼人[1]、今村 彰宏[1]、石田 秀治[1,2]（[1]岐阜大・応用生物、[2]岐阜大・G-CHAIN）
○Hayato OZAKI[1], Akihiro IMAMURA[1], Hideharu ISHIDA[1,2]（[1]Gifu Univ., Faculty of Applied Biological Sciences, [2]Gifu Univ., G-CHAIN）

【目的】ケラタン硫酸糖鎖は、グリコサミノグリカンの一種である。その構造はガラクトース（Gal）と *N*-アセチルグルコサミン（GlcNAc）からなる *N*-アセチルラクトサミン二糖の繰り返し構造をもつ多糖であり、さらに GlcNAc の 6 位、もしくは Gal と GlcNAc 両方の 6 位が硫酸基で修飾されている。ケラタン硫酸糖鎖は、生体内で主に角膜、軟骨、中枢神経に存在しており、水分量の調節や軸索の伸長阻害活性などの生理機能を有する。これまでにケラタン硫酸糖鎖の化学合成例は数多く報告されているが、我々の知る限り、六糖を超える報告例はない。しかし、ケラタン硫酸の生理機能を分子レベルで解明するためには、より長い糖鎖の入手が必要不可欠である。そこで本研究では、過去最大長のケラタン硫酸糖鎖の化学合成を指向し、合成研究を行うこととした。
【方法・結果】ケラタン硫酸糖鎖を合成する上で課題となるのは、長大な糖鎖骨格の構築とポリ硫酸化である。前者の課題に対し本研究では、ブロック合成戦略を採用することとした。具体的には、ケラタン硫酸糖鎖の母核構造であるポリラクトサミンを構築するために、八糖ブロックを鍵化合物として、長鎖骨格の構築を試みることとした。まず、市販の Gal と GlcN 塩酸塩を出発物質としてラクトサミン二糖を合成した。これを供与体、受容体へと誘導し、グリコシル化させることで四糖ブロックを合成した。同様に四糖同士をグリコシル化させることで、八糖ブロックの合成を達成した。また、アグリコンとしてオクチル鎖を導入した還元末端六糖の合成も行った。次に、得られた合成ブロックを逐次グリコシル化反応に供し、現在までに二十糖を超えるポリラクトサミン骨格の構築に成功した。また、ポリ硫酸化の課題に対し、硫酸基の導入・脱保護の検討を四糖にて行い、ケラタン硫酸糖鎖四糖の合成を達成した。現在、より長鎖のポリラクトサミン骨格の硫酸基修飾を試みている。



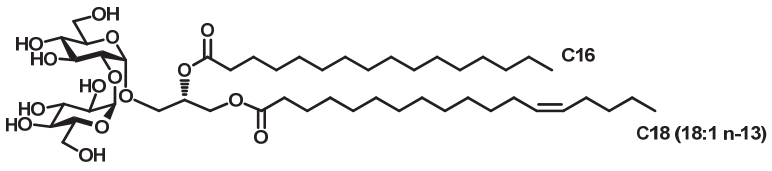
本研究で目指すケラタン硫酸糖鎖の構造

Keratan sulfate, Polylactosamine, Block synthesis

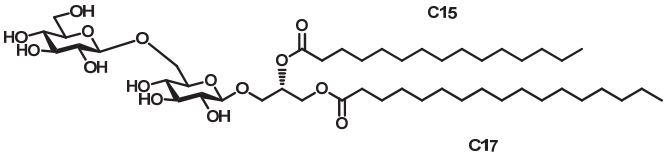
講演番号：3E4a14
講演日時：3 月 26 日 11:43～ 1 号館 E4 会場

細菌由来グリセロ糖脂質 SP-1, SPL-3 の化学合成
Chemical synthesis of bacterial glycoglycerolipids SP-1, SPL-3
○髙登 公一[1]、今村 彰宏[1]、石田 秀治[1,2] ([1]岐阜大・応用生物、[2]岐阜大・G-CHAIN)
○Koichi TAKATO[1], Akihiro IMAMURA[1], Hideharu ISHIDA[1,2] ([1]Gifu Univ., Faculty of Applied Biological Sciences, [2]Gifu Univ., G-CHAIN)

【研究背景】細菌感染症は全世界で最も多い死亡要因であり、現在有効な治療法は確立されていない。我々はこの現状を打破すべく、従来とは異なるアプローチによる新規治療薬の開発を目指し、Mincle と呼ばれる C 型レクチン受容体群に着目した[1]。病原性細菌が宿主に感染しようとする際、宿主は Mincle によって細菌上のグリセロ糖脂質を認識し免疫応答する。一方、細菌は自己のグリセロ糖脂質、脂質を酵素により分解することで宿主免疫系から巧みに逃れている。しかし、細菌がもつグリセロ糖脂質の分解代謝系の理解は十分には進んでいない。その理由の一つは、細菌がもつグリセロ糖脂質が極微量にしか存在しないため、研究に必要な標品が圧倒的に不足しているためである。そこで本研究では、細菌感染機序および細菌による自己のグリセロ糖脂質分解代謝系の機構解明を指向し、溶連菌由来グリセロ糖脂質 SP-1 および黄色ブドウ球菌由来 SPL-3 の全合成を行うこととした。
【方法・結果】本研究で鍵となるのは、各糖脂質に存在するグリコシド結合の立体選択的な構築である。特に、SP-1 は二つの α グルコシド結合を有しており、これらを如何に構築するかが全合成の成否を分ける。そこで我々は、2016 年に Heuckendorff らが報告した、DTBS 基保護を特徴とする α 選択的グルコシル化反応を活用することとした[2]。この選択には、DTBS 基の脱保護が脂肪酸エステル存在下でも容易に可能であることも考慮された。結果として、二箇所存在する α グルコシド結合はいずれも高い立体選択性にて構築することに成功し、脱保護も狙い通り遂行されたことで、SP-1 の全合成を世界で初めて達成した。また、SPL-3 は、昨年度大会にて当研究室の栗田(2A20p08)が全合成の達成を報告しているが、反応収率に改善の余地が残されていたため、本研究で反応条件を精査し、総合収率の改善を図った。詳細は本発表にて報告する。



SP-1



SPL-3

[1] S. Yamazaki, E. Ishikawa, M. Sakuma, H. Hara, K. Ogata, T. Saito, *Nat. Immunol.* **2008**, *9*, 1179-1188.
[2] M. Heuckendorff, H. H. Jensen, *Eur. J. Org. Chem.* **2016**, 5136-5145.

glycoglycerolipid, glycosylation, C-type lectin

発表責任者：石田　秀治（ishida@gifu-u.ac.jp）

講演番号：3E4a15
講演日時：3 月 26 日 11:54～ 1 号館 E4 会場

昆虫と脊椎動物におけるシアル酸 9-リン酸合成酵素の基質特異性の解析
Comparative study of the biosynthesis of sialic acids in insects and vertebrates
○北島 健[1,2]、石川 寛菜[1,2]、濵口 香代[1,2]、呉 迪[1]、佐藤 ちひろ[1,2] ([1]名大生物機能セ、[2]名大院生命農学)
○Ken KITAJIMA[1,2], Hirona Ishikawa[1,2], Kayo Hamaguchi[1,2], Di Wu[1], Chihiro Sato[1,2] ([1]Nagoya Univ. BBC., [2]Nagoya Univ. Grad. Sch. Bioagr. Sci.)

シアル酸は複合糖質の糖鎖の非還元末端を修飾する骨格炭素 9 個からなる単糖であり、*N*-アセチルノイラミン酸（Neu5Ac）、*N*-グリコリルノイラミン酸（Neu5Gc）、デアミノノイラミン酸（Kdn）の 3 大分子種からなる。シアル酸は脊椎動物において普遍的に存在する一方、無脊椎動物における存在は後口動物の原索動物と棘皮動物、前口動物の節足動物と軟体動物に限局される。この特徴から、シアル酸の起源を単純に系統樹から理解することは難しい。我々はシアル酸の進化の理解を深めることを目的として、シアル酸の代謝酵素の比較生化学的研究を行っている。Neu5Ac と KDN は同一酵素群によって生合成され、Neu5Gc は CMP-シアル酸レベルで Neu5Ac から転換される。シアル酸生合成において、シアル酸単糖合成の主反応はシアル酸 9-リン酸合成酵素 (SPS)が担っている。SPS はヘキソース 6-リン酸とトリオースのホスホエノールピルビン酸 (PEP)からノノースのシアル酸を合成する鍵酵素である。ヒト SPS は次の二つの反応を触媒することが知られている：反応 1，ManNAc-6-P + PEP → Neu5Ac-9-P + Pi； 反応 2，Man-6-P + PEP → KDN-9-P + Pi. 今回、SPS に着目して、生物種間での生化学的性質を比較検討することを目的として、以下の実験を行った。まず、脊椎動物 SPS としてヒト、マウス、メダカ、昆虫 SPS としてハエ（*Drosophila melanogaster*）、ガ（*Spodoptera frugiperda*）、コクヌストモドキ（*Tribolium castaneum*）について、酵素遺伝子クローニングを行った。次に、大腸菌発現系を用いて組換え体酵素を調製して酵素の性質を定量的に比較検討した。kcat/Km 値の比較から、昆虫 SPS の Neu5Ac-9-P 合成活性は脊椎動物 SPS の 10-100 倍低いことがわかった。一方、Kdn-9-P 合成活性については脊椎動物と昆虫 SPS 間でほぼ同等の比活性を示した。興味深いことは、Kdn と同じ 2-keto-3-deoxy 糖であるが骨格炭素数が異なる Kdo の生合成活性との関係である。骨格炭素 8 個からなる Kdo は、反応 3, Arabinose 5-phosphate (Ara-5-P) + PEP → Kdo-8-P + Pi によって、通常、SPS とは異なる酵素によって生合成される。しかし、本研究において、SPS も活性は低いものの Kdo-8-P 合成活性をもつこと、また、この活性は脊椎動物より昆虫 SPS の方が高いことが明らかになった。以上のことから、昆虫 SPS はシアル酸に加えて Kdo の生合成も可能であり、その生物学意義は興味深い。

sialic acid, sialic acid synthase, insect

講演番号：3E4p01
講演日時：3 月 26 日 13:50～ 1 号館 E4 会場

p27 機能制御の細胞種特異性の解析

Analysis on cell line specificity for p27 functional control

○河崎 優太郎、米谷 達哉、千葉櫻 拓（東農大院バイオ）
○Yutaro KAWASAKI, Tatsuya KOMETANI, Taku CHIBAZAKURA (Dept. bioscience, Tokyo Univ. of Agric.)

p27 は、CDK 阻害因子のひとつであり、cyclin－CDK 複合体に結合することで、細胞周期を負に制御することが知られている。正常細胞において細胞周期は厳密に制御されているが、細胞周期制御が破綻することで細胞のがん化などが引き起こされる。そこで当研究室では、マウス正常細胞株（NIH/3T3）と 2 種のヒトがん細胞株（U-2 OS, HT-1080）において Tet-on system を用いた p27 誘導発現株を作製し、p27 誘導発現下での細胞株の増殖検定を行ったところ、正常細胞株では増殖が停止するが、がん細胞株では増殖が停止しないことを見出した。しかし、この実験では、正常細胞株がマウス由来であるのに対し、がん細胞株はヒト由来であることと、がん細胞種での検証が、2 種の細胞種でしか行われていないという問題点が存在している。そこで本実験では、ヒト正常細胞株（MRC5）でも同様の解析を行うことで、この現象がマウス・ヒトの違いに起因するかどうかを検証した。また、すでに検証の行われた 2 種のがん細胞株に加えて、新たに 4 種のヒトがん細胞株（A431, DAOY, HepG2, MDAH041）でも同様の検証を行い、増殖が停止する細胞と停止しない細胞の共通性と特異性について解明することを目的とした。

これらの検証を行うために、上記 5 種のヒト由来細胞種（A431, DAOY, HepG2, MDAH041, MRC5）に Tet-on system を用いた p27-FLAG 誘導発現系を安定導入し、A431 を除く 4 種（DAOY, HepG2, MDAH041, MRC5）の誘導発現株を樹立した。この細胞株を用いて増殖検定を行ったところ、正常細胞株 MRC5 では NIH3T3 と同様に、p27 誘導発現により増殖が停止した。即ち、マウスのみならずヒト正常細胞においても人為的に誘導発現した p27 は正常に機能することが示された。一方、がん細胞株 DAOY, HepG2, MDAH041 では U-2 OS, HT-1080 と同様に p27 誘導発現下でも増殖が停止しないという結果が得られたが、増殖検定前には見られた p27 の誘導発現が、検定（7 日間培養）後には消失していた。このことから、DAOY, HepG2, MDAH041 では増殖に伴う p27 の分解が U-2 OS, HT-1080 よりも強く起きていることが示唆された。

p27, cell cycle, cell line specificity

発表責任者：河崎優太郎（kawasakizemiyou@gmail.com）

講演番号：3E4p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ 1 号館 E4 会場

がん抑圧因子 p27＜Kip1＞の細胞周期特異的な機能制御機構の解析

Analysis on cell cycle-specific mechanism regulating the function of tumor suppressor p27＜Kip1＞.

○美根 崇志、南部 なつき、米谷 達哉、千葉櫻 拓（東農大院バイオ）
○Takashi Mine, Natsuki Nambu, Tatsuya Kometani, Taku Chibazakura (Dept. Bioscience, Tokyo Univ. of Agric.)

細胞周期の進行は cyclin-CDK（cyclin dependent kinase）複合体が担っており、またそのブレーキ因子として CKI（CDK inhibitor）が存在する。CKI の一種である $p27^{Kip1}$ は cyclin-CDK 複合体に結合することでその活性を阻害する。そのためがん抑圧因子とも呼ばれ、多くのがん細胞でタンパクレベルでの発現量の低下が知られており、その発現量とがんの悪性化には負の相関性がある。我々は過去の研究で、低密度培養下の細胞でヒト $p27^{Kip1}$ を誘導発現させると、正常細胞である NIH 3T3 では細胞周期の停滞により増殖が抑制されたのに対して、がん細胞である U-2 OS や HT 1080 では増殖が抑制されないことを明らかにした。本研究ではがん抑圧因子である $p27^{Kip1}$ の細胞周期特異的な機能制御機構の解析を試みた。

私はがん細胞 U-2 OS において誘導発現させた $p27^{Kip1}$ と相互作用し、その機能を抑圧する因子が存在すると仮定し、通常培養下の U-2 OS より免疫沈降と質量分析法（MALDI TOF MS）を併用することで新規相互作用因子の網羅的な探索を試みた。その結果、3 つの新規相互作用候補因子が得られたが、再度免疫沈降により特異的な相互作用解析を行ったところ、それらは有意な $p27^{Kip1}$ との相互作用を示さず、やはり低密度培養下での解析が必要であると考えられた。

その端緒として，低密度培養下のがん細胞での $p27^{Kip1}$ の機能抑圧制御が細胞周期上のどの時期に起きているのかを検証した。cyclin, CDK には多くのの種類があり、様々な組み合わせにより細胞周期を制御している。また、細胞周期の各段階で働く cyclin, CDK の種類が決まっているため、低密度培養下での免疫沈降により p27 kip1 と各種 cyclin, CDK との相互作用解析を行った。その結果、U-2 OS 細胞では DNA の複製準備期である G1 期で働く cyclin D1-CDK4/6 複合体と $p27^{Kip1}$ との相互作用が正常細胞と比べて顕著に低下しており、$p27^{Kip1}$ がこの複合体の活性を阻害していないことが示唆された。がん細胞で $p27^{Kip1}$ と cyclin D1-CDK4/6 複合体との相互作用を抑圧することで、低細胞密度における G1 期進行を促進する機構があると考えられる。

p27, cell cycle, cancer cell

発表責任者：美根崇志（44218035@nodai.ac.jp）

講演番号：3E4p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ 1 号館 E4 会場

イロハモミジ発酵茶葉抽出物の成分分析とその抗骨粗鬆症効果について
Identification and evaluation of *Acer palmatum* tea extract on antiosteoporotic effects
○栗谷 健志[1]、西尾 昌洋[1]、和田 匠平[1]、西瀬 雅之[2]、岡本 宏之[3]、勝崎 裕隆[1]、梅川 逸人[1]([1]三重大院生資、[2]三重県大台町役場、[3]宮川森林組合)
○Kenji KURIYA[1], Masahiro Nishio[1], Shouhei Wada[1], Masayuki Nishise[2], Hiroyuki Okamoto[3], Hirotaka Katsuzaki[1], Hayato Umekawa[1] ([1]Mie Univ. of Bioresour., [2]Mie Pref. Odai-cho office, [3]Miyagawa Forest Assoc.)

【目的】本研究は地域資源の活用による健康増進および地域活性化に関わるものであり，三重県の山間部で植樹が進んでいる広葉樹の有効利用を目指している。広葉樹葉（イロハモミジ）を発酵させて一種の紅茶を作り，その成分の分析と骨粗鬆症に対する効果を培養細胞を用いて検討した。
【方法】広葉樹葉の発酵茶葉から熱水により成分を抽出し，イロハモミジ茶葉熱水抽出物（APE）の効果の検討及び分析を以下の手法を用いて行った。破骨前駆細胞（RAW264.7 細胞）に APE を添加し，TRAP 染色後の多核化破骨細胞数計測により，骨吸収能の評価を行った。骨芽前駆細胞（MC3T3-E1）細胞に APE を添加し， ALP 活性，ALP 染色，アリザリンレッド染色による骨形成能の評価を行った。HPLC および LC-MS 分析により，APE に含まれる物質の同定および分取を行った。分取した画分および同定した成分を，上述の培養細胞に添加し，それぞれ骨吸収能および骨形成能の評価を行った。
【結果】APE 添加による骨吸収能の評価を行った結果，APE の濃度依存的に骨吸収を抑制した。同様に骨形成能の評価を行った結果，APE の濃度依存的に骨形成を促進した。HPLC および LC-MS 分析により，APE に含まれている 4 つのフラボノイドを特定した。この画分の分取を行い細胞に添加した際に，骨吸収を抑制し，骨形成を促進した。また，これらのフラボノイドは単独ではなく 4 つのフラボノイドを組み合わせて添加した際に，その活性が増強された。以上の事から，APE の骨形成促進効果は，その含有成分であるフラボノイド類の複合的な作用によると考えられる。

Osteoclast, Osteoblast, Flavonoid

講演番号：3E4p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ 1 号館 E4 会場

マクロファージにおいて TLR4 シグナルは AKT/mTOR を介してオートファジーを調節することで炎症反応の減弱を制御する

TLR4 signaling controls attenuation of inflammatory response by regulating autophagy via AKT / mTOR signaling in macrophages

○米野 雅大、白木 琢磨、芦田 久（近畿大院・生物理工）
○Masahiro Komeno, Takuma Shiraki, Hisashi Ashida (Grad. Sch. of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai Univ.)

マクロファージは遊走性を有する食細胞で、生体防御に重要な細胞である。マクロファージは病原体に特徴的な分子を認識する TLR(Toll-like receptor)を有する。TLR4 は TLR の 1 つで、リポ多糖（LPS）やリポテイコ酸をリガンドとして認識する受容体である。LPS 刺激による TLR4 の活性化は、軽微なオートファジーを引き起こすことが知られている。オートファジーは細胞内の非特異的なバルク分解システムであるが、選択的な分解にも関わる。選択的分解に関しては、アダプタータンパク質である p62 によって標的タンパク質がオートファゴソーム(AP)に輸送されることがわかっている。しかし、細胞内のシグナル伝達に関わるタンパク質の選択的分解については、解明されていない点が多い。免疫系のシグナル伝達においては多くの伝達タンパク質が関与し、そのタンパク質の速やかな発現、分解が要求される。そこで我々は、選択的オートファジーが炎症反応においてどのように関与するのかを検討した。

炎症の各フェーズ(炎症惹起時、炎症物質除去時、炎症反応終了時)におけるオートファジーに関連するシグナル伝達系の活性化を調べたところ､炎症終了後１～２時間において AKT のリン酸化及び mTOR の脱リン酸化が確認された。このことから mTOR 依存的オートファジーが炎症終了時に活性化されていることが確認された。mTOR 依存的オートファジーはアミノ酸飢餓でも活性化される。そこで、アミノ酸飢餓によりオートファジーを活性化したところ、炎症性サイトカイン産生量が早期に減少した。

TLR シグナル経路のうち MyD88 依存型のものにおいて、TRAF6（TNF receptor associated factor 6)複合体は重要な役割を果たすことが知られている。炎症反応時に TRAF6 は p62 と結合すること、また TRAF6-K63 のポリユビキチン化が見られることなどが報告されている。実際に、p62 と TRAF6 の相互作用を免疫沈降法で確認したところ、炎症反応のどのフェーズにおいても結合していた。炎症の各フェーズにおいて総 TRAF6 量はあまり変わらなかったが、p62-TRAF6 複合体量は炎症反応が収まるにつれてその量が減少した。TLR4 シグナルは AKT/mTOR 経路を介してオートファジーを調節し、活性化したオートファジーによる p62-TRAF6 複合体分解が炎症シグナル伝達減弱に大きく関与している可能性が示唆された。

Autophagy, mTOR, TRAF6

講演番号：3E4p05
講演日時：3 月 26 日 14:34～ 1 号館 E4 会場

インスリン様分子の分泌制御を介して線虫の生育/休眠を制御する Rab family タンパクについて
Rab family proteins associated with development/diapause of *C. elegans* by regulating secretion of insulin-like molecules

長澤 守[1]、大西 潤実[2]、松永 洋平[3]、岩﨑 崇[1,2]、○河野 強[1,2]([1]鳥取大・農、[2]鳥取大院・農、[3]（株）HIROTSU バイオサイエンス)
Mamoru Nagasawa[1], Masumi Ohnishi[2], Yohei Matsunaga[3], Takashi Iwasaki[1,2], ○Tsuyoshi Kawano[1,2] ([1]Tottori Univ. Fac. of Agric., [2]Tottori Univ. Graduate School of Agr., [3]HIROTSU BIOSCIENCE)

【背景と目的】

モデル生物・線虫 *Caenorhabditis elegans* は生育環境の悪化（生育密度上昇・エサの枯渇・高温）に応答して、一時的に幼虫期で生育を停止し、休眠する。生育/休眠のスイッチングはインスリン様シグナルならびに TGF-β様シグナルによって制御される。発表者らは *C. elegans* の生育/休眠を制御するインスリン様ペプチド INS-35 を同定し、主に腸で産生される INS-35 の分泌方向は生育環境によって可逆的に変動することを発見した。本研究では、*C. elegans* をモデルとして腸ペプチドの分泌極性を制御する因子の同定と制御機構を明らかにすることを最終目的とする。本大会では、INS-35 の分泌を制御する Rab ファミリータンパク Rab6.2 の同定、ならびに、その機能解析等の結果について報告する。

【方法と結果】

膜輸送に関わる Rab ファミリータンパクに着目し、*C. elegans* に存在する Rab ファミリータンパク 31 種を標的とした RNAi スクリーニング（feeding RNAi）を行った。INS-35::VENUS を構成的に発現する線虫を作出し、体腔細胞（スカベンジャー細胞）への取り込み量を指標として INS-35::VENUS の分泌を評価した。その結果、*rab6.2* RNAi が INS-35::VENUS の体腔側への分泌を抑制することを見出した。期待通り、*rab6.2* 破棄線虫でも、INS-35::VENUS の体腔側への分泌が抑制された。また、*rab6.2* 破棄線虫は著しい休眠率上昇（生育停止）を示した。これは、INS-35 の分泌抑制によるインスリン様シグナル抑制に起因すると推定された。*Rab6.2* 破棄線虫の休眠率上昇は *ins-35* 破棄線虫の休眠率上昇を上回ったことから、Rab6.2 は他の生育/休眠制御因子の分泌にも関与することが推定された。そこで、生育/休眠のスイッチングに関与する TGF-β様タンパク DAF-7 とインスリン様ペプチド DAF-28（いずれも頭部神経細胞で産生）の分泌制御への関与を検証したところ、Rab6.2 は DAF-28 の分泌制御にも関与することが明らかとなった。現在、Rab6.2 の時空間的発現パターンの解析、ならびに、部位特異的（腸か頭部神経細胞か）レスキュー実験を進めており、これらの結果も併せて報告する予定である。

参考文献

Matsunaga, Y, Honda, Y, Honda S, Iwasaki, T, Qadota, H, Benian, GM, and Kawano, T: Diapause is associated with a change in the polarity of secretion of insulin-like peptides. Nat Commun, 7:10573 (2016).

insulin, secretion, Rab family proteins

発表責任者：河野　強（kawano@muses.tottori-u.ac.jp）

講演番号：3E4p06
講演日時：3 月 26 日 14:55～ 1 号館 E4 会場

Sf9 細胞を用いた昆虫嗅覚受容体のリガンド探索手法の開発
Development of a ligand search method for insect olfactory receptor using Sf9 cells
○布施 寛人[1]、宮田 佑吾[2]、コルネット リシャー[3]、黄川田 隆洋[3]([1]東京大学、[2]東京工業大学、[3]農研機構)
○ HIROTO FUSE[1], YUGO MIYATA[2], RICHARD CORNETTE[3], TAKAHIRO KIKAWADA[3] ([1]University of Tokyo, [2]Tokyo Inst. of Technology, [3]National Agriculture and Food Research Organization)

昆虫嗅覚受容体 Odorant receptor(OrX)は Odorant receptor co-receptor(Orco)と複合体を形成し、イオンチャネルとして機能することが知られている。モデル生物としてよく知られるショウジョウバエ（*Drosophila melanogaster*）は全ての嗅覚受容体が明らかになっており、それに反応する匂い物質も多く明らかになっている。これらの実験の多くは生体で実際に起こっている嗅覚受容体の反応をイメージングすることで評価することが多いが、生体を扱う手間や、個体差、状態によって結果にズレが生じたり、生体の他の活動によって結果に影響を受けたりするなどの問題点がある。そこで本実験ではより簡便で誤差の少ない嗅覚受容体の匂い物質への応答を評価する方法の開発を目指し、ショウジョウバエの OrX を Sf9 細胞に発現させ、匂い物質との応答性を調べ、既存の *in vivo* で行われた実験データと比較し、検討を行った。

OrcoやOrxはリガンドに反応すると、細胞内にカルシウムを流入させるため、カルシウム濃度が上昇することで蛍光を発するGCaMPの蛍光変化を匂い物質に対する嗅覚受容体の応答の評価とした。ショウジョウバエの成虫の頭部からRNAを抽出し、cDNAライブラリを作成し、*Orco, Or10a, Or22a, Or43b, Or47a, Or71a*をクローニングした。Sf9細胞にGCaMPとOrcoと同時にこれらのOrXを共発現させた。これらの細胞に、匂い物質を添加した時のGCaMPの発する蛍光強度の変化を測定した。

Sf9 細胞に嗅覚受容体を発現させたとき、匂い物質に対する応答性は既存の *in vivo* のデータと異なる結果を示した。例えば、*in vivo* の実験において嗅覚受容体が反応しない匂い物質であっても、今回の実験において応答性を示すものがあった。また嗅覚受容体が応答する匂い物質の強弱にも違いが見られた。本手法を用いることで嗅覚受容体に特異的に反応するリガンドをより簡単に、正確に明らかにすることが可能になるだろう。

Olfactory receptor, Insect cells, Calcium sensor

講演番号：3E4p07
講演日時：3 月 26 日 15:06～ 1 号館 E4 会場

腸管上皮細胞に対する IL-4 の影響 －オルガノイド培養系を用いた検討－

Effect of IL-4 on intestinal epithelial cells -Studies using an organoid culture system-

○齋藤 由季、佐藤 美佳、岩槻 健、只石 幹、服部 一夫、清水 誠（東農大院農）
○ Yuki SAITO, Mika SATO, Ken IWATSUKI, Miki TADAISHI, Kazuo HATTORI, Makoto SHIMIZU (Grad. Sch. of Tokyo Univ. of Agric.)

【背景・目的】腸管オルガノイドは、腸管幹細胞をはじめとして、そこから分化した成熟上皮細胞（吸収上皮細胞、杯細胞、内分泌細胞、パネート細胞、タフト細胞）で構成される腸管上皮細胞集合体である。腸管幹細胞の自己複製や成熟上皮細胞への分化は様々な生理活性物質によって制御されており、その生理活性物質として我々はインターロイキン 4（IL-4）に着目した。IL-4 は主に T 細胞、NK-T 細胞、好塩基球、肥満細胞から産生される多様な作用を持つサイトカインとして知られている。Th2 細胞から過剰に産生されると、IgE 産生上昇やアレルギーに関わる。腸管に関しては、寄生虫感染時に 2 型サイトカインとして誘導され、粘液産生を伴う杯細胞の過形成を引き起こし、寄生虫を排除する。さらに IL-4 は寄生虫感染に対する応答において重要な役割を担うタフト細胞の分化も促進すると言われている。IL-4 による腸管上皮細胞刺激は、杯細胞、タフト細胞への分化を促進することは知られているが、それ以外の腸管上皮細胞への影響は未だ知られていない。そこで、我々は腸管オルガノイドを用いて IL-4 添加による腸管上皮細胞への影響を確認することを目的として実験を行った。
【方法】C57BL/6J マウスあるいは Lgr5（幹細胞マーカー）を GFP で標識した遺伝子組み換え（Lgr5-EGFP）マウスの空腸よりクリプトを単離し、オルガノイド培養に供した。培養した空腸オルガノイドを継代した日を Day 0 とし、通常の培地で培養した後、Day 1, 3 にて IL-4（400 ng/mL）を添加した。Day 4 にて RNA 抽出、EdU assay を行った。Lgr5-EGFP 空腸オルガノイドの共焦点顕微鏡を用いた経時的観察は Day 3 から Day 4 にかけて行った。
【結果・考察】IL-4 を 72 時間添加し、リアルタイム RT-PCR にて各腸管上皮細胞マーカーの遺伝子発現量を測定した結果、Trpm5（タフト細胞マーカー）遺伝子発現量は IL-4 非添加であるコントロール（con）群に比して有意に増加、Lgr5、CD133（幹細胞と成熟上皮細胞の中間に位置する有限増殖細胞である TA 細胞マーカー）、ITF（杯細胞マーカー）遺伝子発現量は con 群に比して有意に減少した。細胞増殖能力を評価する EdU assay の結果、con 群に比して IL-4 添加群では増殖活性を有する細胞が減少していた。さらに、Lgr5-EGFP マウスから作製した空腸オルガノイドで 24 時間タイムラプス撮影を行った。その結果、con 群に比して IL-4 添加群で EGFP シグナルが減弱した。以上の結果より、空腸オルガノイドに対する IL-4 添加は、既存の事実であるタフト細胞への分化を促進することに加えて、腸管上皮細胞において幹細胞や TA 細胞といった増殖能を有する細胞の増殖を抑制することが示唆された。

IL-4, Intestinal epithelial cells, Organoids

講演番号：3E4p08
講演日時：3 月 26 日 15:17～ 1 号館 E4 会場

カルシウム応答性 NFAT レポーター測定による TRP チャネルの機能評価

Functional evaluation of TRP channels by measuring calcium-responsive NFAT reporter

阿知波 卓也、張 維、高原 照直、柴田 秀樹、○牧 正敏 (名大院生命農)
Takuya ACHIHA, Wei ZHANG, Terunao TAKAHARA, Hideki SHIBATA, ○Masatoshi MAKI (Nagoya Univ Grad Sch Bioagric Sci)

【背景と目的】 カルシウムイオン（Ca^{2+}）はセカンドメッセンジャーとして働き，その濃度変化情報はセンサータンパク質の活性化を介して細胞内の様々な反応調節に関与している．転写因子 NFAT は通常状態では高度にリン酸化されて細胞質に存在するが，細胞を刺激すると Ca^{2+}/カルモジュリンによって活性化される脱リン酸化酵素 calcineurin によって脱リン酸化され，核へ移行してサイトカイン遺伝子など標的遺伝子の発現を誘導する．我々は Nanoluciferase（Nluc）遺伝子を IL-8 遺伝子プロモーターに存在する疑似パリンドローム型 NFAT 応答配列（*IL8* NFAT-RE）と基本プロモーターにつないだレポーター測定系を構築した[(1)]．一般に用いられている IL-2 遺伝子プロモーター由来の非パリンドローム型 *IL2* NFAT-RE と異なり，このシステムは AP-1 (Fos/Jun)活性化剤の併用を必要とせず，Ca^{2+}応答のみを指標とした解析に有効であり，アセチルコリン受容体アゴニストに対して経時的，容量依存的に応答する[(1)]．本研究は，一過性受容器電位（Transient receptor potential，TRP）チャネルに対しても本レポーター測定系が有効であるか，これを検証することを目的とした．

【方法と結果】 TRP チャネルファミリーのうち，本研究では二つを選び検討した．一つは細胞膜に存在して辛味成分カプサイシン（Caps）に応答することが知られている TRPV1，そしてもう一つは，リソソーム膜に存在しムコリピドーシス IV 型の原因遺伝子である TRPML1 をそれぞれ HEK293 細胞に一過的に発現させた．なお，本測定系ではレポーター遺伝子発現プラスミドと一定の比率で NFAT4 発現プラスミドおよびトランスフェクション効率補正のため Fluc 発現プラスミドを用いた．TRPV1 を発現させると対照と比べ未刺激で Nluc の活性上昇が観察され，TRPV1 発現細胞に Caps 刺激をすると予想に反して Nluc 活性の顕著な低下が観察された．TRPV1 変異体では未刺激での Nluc 活性上昇は観察されなかった．また，Caps による非特異的 Nluc 活性阻害は観察されず，Caps が TRPV1 と長時間結合することによる未知の機構によって NFAT の活性化が抑制されると推察された．一方，TRPML1 を発現させると TRPML アゴニスト ML-SA1 刺激に対して容量依存的に Nluc 活性の上昇が観察された．TRPML1 は Ca^{2+}結合タンパク質 ALG-2 と相互作用することが報告されている[(2)]．現在，TRPML1 の ALG-2 結合変異体に対する応答性を解析中である．以上の結果，*IL8* NFAT-RE を用いたレポーター測定は，一部の TRP チャネルに対しては機能評価解析への応用が有効であると思われる．

参考文献: (1) Zhang *et al.* (2018) Int J Mol Sci 19(2), 605; (2) Vergarajauregui *et al.* (2009) J Biol Chem 284(52) 36357

calcium, TRP channel, capsaicin

発表責任者：牧 正敏（mmaki@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3E4p09
講演日時：3 月 26 日 15:28～ 1 号館 E4 会場

アミノ酸による mTORC1 活性化の新規メカニズムの解析
Analysis of a novel mechanism for mTORC1 activation by amino acids
○高原 照直、池田 奈央、石井 千愛、杉山 理紗、柴田 秀樹、牧 正敏（名大・生命農）
○ Terunao TAKAHARA, Nao IKEDA, Chiaki ISHII, Risa SUGIYMA, Hideki SHIBATA, Masatoshi MAKI (Grad. Sch. Biosci., Nagoya Univ.)

アミノ酸は細胞成長や増殖、オートファジーなどを制御する重要な栄養素である。アミノ酸は栄養源センサーであるキナーゼ複合体 mTORC1（mechanistic target of rapamycin complex 1）を活性化し、下流の S6 キナーゼ（S6K1）や 4E-BP1 のリン酸化などを亢進して細胞成長などを制御する。

当研究室では、アミノ酸飢餓した細胞にアミノ酸を投与すると細胞内 Ca^{2+}の濃度が上昇すること、また、この細胞内 Ca^{2+}濃度上昇が mTORC1 の活性化に関わることをこれまでに見出してきた。この Ca^{2+}濃度上昇による新しい mTORC1 活性調節機構は様々な病態での mTORC1 の活性異常に関わる可能性があり、mTORC1 の活性異常に起因する病態発症の理解やその予防を目指す上で、分子機構の解明は重要である。

既知の mTORC1 の活性化機構として 2 つのステップが提唱されている。すなわち、mTORC1 は、(1) Rag GTPases によりリソソーム膜表面へリクルートされた後、(2) 活性化因子である Rheb GTPase により活性化される、という機構である。これまでの解析により、アミノ酸依存的細胞内 Ca^{2+}濃度上昇は Rheb の上流経路に作用することで Rheb による mTORC1 活性化を調節していることが示唆されているが、その具体的な分子機構は不明である。そこで、本研究では Ca^{2+}濃度上昇がどのようにして mTORC1 活性制御につながるか、その具体的な分子機構の解明を目的とした。

種々の Ca^{2+}シグナル関連阻害剤を用いた結果、CaM（Calmodulin）阻害剤により、アミノ酸依存的な mTORC1 活性化が抑制されることがわかった。次に、細胞内で CaM を過剰発現させ、既知の mTORC1 経路因子との結合を検証したところ、Rheb GTPase の GAP として働く TSC2 と CaM が Ca^{2+}依存的に結合することが明らかとなった。さらに、CaM 阻害剤により CaM と TSC2 との結合量が低下していた。したがって、CaM 阻害剤により CaM が TSC2 と離れることで、TSC2 の活性が高まることで、Rheb の活性を抑制し、mTORC1 の活性を低下する可能性が考えられた。実際に、TSC2 ノックアウト（KO）細胞を樹立し、CaM 阻害剤の効果を調べた結果、TSC2 KO 細胞では、CaM 阻害剤による mTORC1 抑制がみられなかった。これらのことから、アミノ酸刺激による細胞内 Ca^{2+}濃度上昇は Ca^{2+}/CaM と TSC2 との結合を促進することで、TSC2 の活性を抑制し、Rheb GTPase による mTORC1 活性化を促進すると推察される。現在、TSC2 の GAP 活性に対する Ca^{2+}/CaM の影響などについて解析を進めている。

mTOR, amino acids, calcium

発表責任者：高原照直（takahara@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3E4p10
講演日時：3 月 26 日 15:39～ 1 号館 E4 会場

リソソーム傷害部位へのカルシウム結合タンパク質 ALG-2 の動員
Recruitment of the calcium-binding protein ALG-2 to damaged lysosomes
林本 敬大[1]、○柴田 秀樹[1]、川野 琢己[2]、高原 照直[1]、牧 正敏[1] ([1]名大院・生命農、[2]名大農・応生科)
Takahiro Hayashimoto[1], ○Hideki Shibata[1], Takumi Kawano[2], Terunao Takahara[1], Masatoshi Maki[1] ([1]Nagoya Univ., Grad. Sch. of Bioagric. Sci., [2]Nagoya Univ., Sch. of Agric. Sci., Dept. of Appl. Biosci.)

【背景と目的】
リソソームは細胞内消化を担う細胞小器官であるが、コレステロール結晶や尿酸結晶、アミロイド線維などがエンドサイトーシスされ、リソソームへと輸送されるとその限界膜が損傷する。リソソーム膜の損傷が重度、あるいは持続されると、細胞質の Galectin-3 がリソソーム内腔に流入し、選択的オートファジー（リソファジー）が起こり、損傷リソソームが除去される。一方、損傷が軽度の場合、リソソーム膜から細胞質へ放出されるカルシウムイオン(Ca^{2+})が引き金となり、細胞質から ESCRT（Endosormal sorting complex required for transport）装置が損傷部位に動員され、膜が修復されることが、最近、報告された。しかし、ESCRT 装置の構成タンパク質は、Ca^{2+}応答性の膜結合領域を有していないことから、損傷部位への動員の分子メカニズムは不明である。そこで、本研究では、ESCRT 装置の複数の構成タンパク質と Ca^{2+}依存的に結合する ALG-2 に着目し、ALG-2 とその結合タンパク質アネキシン A11 のリソソーム膜損傷修復への関与とその役割の解明を目指した。
【方法と結果】
緑色蛍光タンパク質 SGFP2 を融合した ALG-2(GFP-ALG-2)およびアネキシン A11(ANXA11-GFP)を HeLa 細胞に発現させ、培地に L-leucyl-L-leucine methyl ester (LLOMe) を添加してリソソーム傷害を誘発させたところ、1 mM の濃度で添加約 15 分後に、GFP-ALG-2 および ANXA11-GFP 陽性の蛍光シグナルの強いドットが現れはじめ、時間が経過するにつれて、ドットの数とそれらの蛍光強度が増加した。また、リソソーム膜タンパク質 LAMP-2 とリソファジーのマーカータンパク質 Galectin-3 の抗体を用いて、間接蛍光抗体法を行った。その結果、GFP-ALG-2 および ANXA11-GFP 陽性のドットは、LAMP-2 と Galectin-3 の蛍光シグナルとオーバーラップした。さらに、ゲノム編集により ALG-2 をノックアウトした HeLa 細胞に LLOMe によるリソソーム傷害を誘導したところ、親株の HeLa 細胞に比べて、Galectin-3 陽性のドットが早期に出現した。これらの結果は、ALG-2 のリソソーム膜の修復に必要である可能性を示している。さらに、ESCRT 装置構成タンパク質のリソソーム傷害部位への動員における ALG-2 およびアネキシン A11 の必要性について解析を進めている。

calcium, ESCRT, lysosome

講演番号：3E4p11
講演日時：3 月 26 日 16:00～ 1 号館 E4 会場

メチオニンはがん抑制タンパク質 TSC2 のメチル化を介してインスリンシグナルに影響を及ぼす
The influence of Methionine on Insulin Signal through Methylation of TSC2
○玄 成秀[1]、鈴木 司[1,2]、井上 順[1,2]、山本 祐司[1,2] ([1]東農大院・農・農化、[2]東農大・応生・農化)
○Seishu Gen[1], Tsukasa Suzuki[1,2], Jun Inoue[1,2], Yuji Yamamoto[1,2] ([1]Tokyo Univ. Agric., Grad. Sch. of Agric., [2]Tokyo Univ. Agric.)

[背景・目的]

インスリンシグナル中のがん抑制タンパク質 TSC2 は細胞増殖を司る mTORC1 を負に制御する。一方で、インスリンによって活性化した AKT は、TSC2 のリン酸化（T1462）による TSC2 の局在変化・不安定化を通じて、mTORC1 を活性化する。これまでに我々は、TSC2 タンパク質の安定性がメチル基転移酵素 PRMT1 による翻訳後修飾を介してメチオニン（Met）によって制御されることを示した。本研究では、Met を介した TSC2 メチル化が、その安定化機構や mTORC1 活性に与える影響の検証を目的とした。

[方法]

① メチル化 TSC2 ペプチド（R1457me/R1459me）を用い、in vitro kinase assay にて pTSC2 を解析した。
② 293T 細胞に PRMT1 阻害剤を添加し、脱メチル化状態における pTSC2（T1462）を解析した。
③ Met 欠乏培地を用いて脱メチル化 TSC2 の細胞内の局在変化を、免疫染色法に供して解析した。
④ Met 欠乏時の LY294002(インスリンシグナル阻害剤)添加が TSC2 安定化に及ぼす影響を解析した。
⑤ 293T 細胞に PRMT1 阻害剤を添加し、mTORC1 の活性指標である pS6K を解析した。

[結果]

TSC2 メチル化（R1457me/R1459me）は、AKT によるリン酸化（T1462）を in vitro と in vivo において妨害した（①②）。また、脱メチル化 TSC2 の局在を解析したところ、TSC2 のリソソーム局在が消失した（③）。そして、AKT によるリン酸化は TSC2 タンパク質の不安定化に寄与することが示された（④）。さらに、TSC2 メチル化は、TSC2 の安定化を通じて mTORC1 活性を抑制することが示唆された（⑤）。

[結論]

本研究は、がん抑制タンパク質 TSC2 の安定性が新規メチル化修飾によって制御されることを明らかにした。特に、TSC2 の脱メチル化は AKT 依存的なリン酸化を亢進し、TSC2 の局在変化・不安定化を通じて mTORC1 を活性化することを示した。また、インスリン（AKT 依存的リン酸化）と Met（PRMT1 依存的メチル化）は TSC2 においてクロストークすることを示した。つまり、本研究はメチル化を介した Met によるインスリンシグナルの新規制御メカニズムを示した。

Cancer, Methylation, Insulin signal

発表責任者：玄　成秀（44518001@nodai.ac.jp）

講演番号：3E4p12
講演日時：3 月 26 日 16:11～ 1 号館 E4 会場

インスリンシグナルを制御する有機化合物 SF231 の作用メカニズムの解明

Analysis of the action mechanism of organic compound SF231 that controls an insulin signal

○山本 佳明[1]、鈴木 司[1,2]、井上 順[1,2]、山本 祐司[1,2] ([1]東農大院・農・農化、[2]東農大・応生・生化)
○Yoshiaki YAMAMOTO[1], Tsukasa Suzuki[1,2], Jun Inoue[1,2], Yuji Yamamoto[1,2] ([1]Tokyo Univ. Agric., Grad. Sch. of Agric, [2]Tokyo Univ. Agric)

【目的】インスリンシグナルは細胞成長など生体内の代謝に深く関与しており、過剰な活性化がガンや代謝機能不全などを引き起こすことが知られている。これまでに我々は下流因子である S6 のリン酸化を指標とし、本シグナルを抑制する新たな化合物の探索を行い、SF231 を同定した。SF231 は本シグナルの中核を担う Raptor、mTOR のタンパク質量を低下させることにより、その効果を発揮していることをすでに示している。一方で興味深いことに、SF231 は本シグナルの抑制因子である TSC1/2 タンパク質を Raptor、mTOR より早い段階で低下させることを見出した。そこで本研究は、SF231 による TSC1/2 減少メカニズムの解析を目的とした。
【方法】SF231 による TSC1/2 のタンパク質低下が転写抑制によるものか確認するために、NIH3T3 細胞に SF231(15 μM, 30 分及び 2 時間)を添加し、TSC1/2 の mRNA 量を測定した。次にタンパク質分解が促進しているかを検討するために、翻訳阻害剤処理を行い、TSC1/2 のタンパク質量を測定した。更にプロテアソーム系阻害剤処理を行い、タンパク質分解系の検討を行った。また、SF231 の標的因子を明らかにするために SF231 固定化ビーズを作製し、NIH3T3 細胞のタンパク質抽出液と反応させた。これを SDS-PAGE で分離後、LC-MS/MS にて解析を行った。同定された因子が SF231 による TSC1/2 のタンパク質低下に関与しているかを、shRNA を用いてノックダウン細胞を作製し検討した。
【結果】SF231 添加により TSC1/2 の mRNA 量は低下しなかったことから、TSC1/2 のタンパク質低下は転写抑制によるものではないことが示された。また、翻訳阻害剤のみの添加に比べて、SF231 添加では TSC1/2 のタンパク質減少速度が速いことから、タンパク質の分解が促進していることが示された。SF231 添加による TSC1/2 のタンパク質分解は、プロテアソーム系阻害剤処理により一部抑えられたことから、SF231 はユビキチン・プロテアソーム系を介して TSC1/2 の分解を促進していることが示唆された。LC-MS/MS の解析により、SF231 と相互作用する因子として、Cct2 をはじめとした 22 種類のタンパク質を同定した。Cct2 ノックダウン細胞では TSC1 のタンパク質低下が示された。現在、SF231 による TSC1/2 のタンパク質減少に同定された因子が関与するか解析中である。

insulin signal, inhibitor, protein degradation

講演番号：3E4p13
講演日時：3 月 26 日 16:22～ 1 号館 E4 会場

グルココルチコイドは脱ユビキチン化酵素 USP19 の発現上昇を誘導し筋融合を抑制する
Glucocorticoid increases ubiquitin-specific peptidase 19 expression and inhibits myoblasts fusion

○下唐湊 一矢[1]、北野 剛大[1]、原田 直樹[1]、乾 博[2]、山地 亮一[1] ([1]大阪府大院・生命環境、[2]大阪府大・栄養)
○ Kazuya SHIMOTOSO[1], Takehiro KITANO[1], Naoki HARADA[1], Hiroshi INUI[2], Ryoichi YAMAJI[1] ([1]Dept. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Dept. Nutr., Osaka Pref. Univ.)

【目的】骨格筋は運動器としての役割以外に糖や脂質の代謝も担う。骨格筋量の減少（筋萎縮）は不活動を誘発するリスクを高めるだけでなく、肥満や糖尿病に罹患するリスクも高めるため、骨格筋量の維持・増加は生活の質（QOL）の向上にとって重要である。骨格筋は損傷を受けると、単核の筋芽細胞が分化し、その後、筋芽細胞同士が融合あるいは筋芽細胞が多核の筋管細胞と融合して筋管細胞を形成する筋再生過程を経て骨格筋は修復される。グルココルチコイドは筋芽細胞の分化を抑制するが、その詳細な機構は不明である。グルココルチコイドは、転写因子であるグルココルチコイド受容体（GR）に結合すると核内に移行して、標的遺伝子のグルココルチコイド応答配列（GRE）に結合して標的遺伝子の発現を調節する。グルココルチコイドによる筋分化抑制時に脱ユビキチン化酵素である Ubiquitin-specific peptidase 19（USP19）の発現を亢進し、USP19 のノックダウンはグルココルチコイドによる筋分化抑制を解除する。そこで本研究ではグルココルチコイドによる筋分化抑制機構の解明を USP19 の発現制御機構に着目し検討した。
【方法と結果】マウス由来筋芽細胞株 C2C12 細胞を合成グルココルチコイドであるデキサメタゾン（DEX）存在下で培養し筋管細胞に分化させた。蛍光免疫染色法にて筋構成タンパク質である Myosin heavy chain（MyHC）と核を染色した。全核数のうち、MyHC 陽性細胞に含まれる核数を計測し筋融合の指標である Fusion Index を算出した。その結果、DEX により有意に Fusion Index が減少し、また核数が 2 個の MyHC 陽性細胞の割合が著しく高かった。これらのことから、DEX は筋芽細胞同士の融合ではなく筋芽細胞と筋管細胞の融合を抑制することが示唆された。一方、USP19 をノックダウンすると DEX による Fusion Index の減少が解除されたことから、DEX による筋融合の抑制に USP19 の関与が示唆された。DEX による USP19 の発現上昇機構を検討するため、マウス *Usp19* 遺伝子のプロモーター領域を単離し、レポーター解析を行った。*Usp19* プロモーター領域において GRE と予測される塩基配列に変異を導入したところ、DEX によるレポーター活性の上昇が消失し、また ChIP 解析が予測した GRE への GR の結合を示したことから、*Usp19* の発現が GR によって制御されることが判明した。さらに筋分化中の筋融合に関わる因子（Myomaker、Myomerger）の発現に及ぼす DEX の影響を検討したところ、DEX により Myomerger の mRNA レベルが低下した。現在、DEX による筋融合抑制における Myomerger の役割と Myomerger に対する USP19 の作用について検討している。

glucocorticoid, Usp19, myoblast fusion

講演番号：3E4p14
講演日時：3 月 26 日 16:33～ 1 号館 E4 会場

β－カロテン代謝酵素 BCO1 ノックアウトマウスにおける褐色脂肪組織の特徴

Characterization of brown adipose tissue in BCO1 knockout mice.

○日野 李保[1]、北風 智也[2]、乾 博[3]、原田 直樹[1]、山地 亮一[1] ([1]大阪府大院・生命環境、[2]神戸大院・科技イノベ、[3]大阪府大・栄養)

○Riho HINO[1], Tomoya KITAKAZE[2], Hiroshi INUI[3], Naoki HARADA[1], Ryouichi YAMAJI[1] ([1]Dept. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Dept. Sci. Tech. and Innov., Kobe Univ., [3]Dept. Nutr., Osaka Pref. Univ.)

【目的】ビタミン A はさまざまな生理機能を発揮する重要な栄養素であるが、生体内で生合成できないため、我々高等動物はビタミン A 前駆体であるβ-カロテンなどの植物由来カロテノイドをビタミン A の供給源として摂取している。β-Carotene 15,15′-oxygenase 1 (BCO1) はβ－カロテンをレチナールへと代謝して必要量のビタミン A を生成する酵素として発見され、これまで BCO1 のカロテノイド代謝能に関する多くの研究がなされてきた。しかし、BCO1 ノックアウト (KO) マウスでは十分量のビタミン A 供給下にも関わらず、野生型マウスと比較してさまざまな表現型の違いが観察されることから、BCO1 がカロテノイド代謝以外の機能を有することが示唆されている。特に、BCO1 KO あるいは BCO1 の一塩基多型が脂質代謝へ影響をおよぼすことが数多く報告されていることから、本研究では BCO1 のカロテノイド代謝以外の機能を探索することを目的として脂肪組織に着目して検討を行なった。

【方法・結果】16 週齢の雄性 BCO1 KO マウスの脂肪組織を単離し解析を行なったところ、野生型マウスと比較して白色脂肪組織重量が有意に増加しており、また、褐色脂肪組織重量が増加する傾向を示した。そこで、組織切片を作製し形態学的に組織の解析を行なったところ、白色脂肪組織では細胞面積の違いはなく形態的な変化はみられなかった。一方で、褐色脂肪組織では細胞面積は変化しなかったが、野生型マウスと比較して BCO1 KO マウスでは細胞中の脂肪滴サイズの縮小が観察された。脂肪滴のサイズは細胞内への脂質の取り込みや、細胞内での脂質合成と分解による制御を受けるほか、脂肪滴同士の融合によって拡張する。褐色脂肪組織において、脂肪滴サイズの制御に関する遺伝子の発現レベルを解析した結果、細胞内への脂質の取り込みに関与する *Cd36* と *Lpl* の発現レベルおよび脂肪滴の融合に関与する *Fsp27*、*Cidea* や *Plin1* の発現レベルが BCO1 KO マウスで減少していた。褐色脂肪組織は主要な熱産生器官であることから、BCO1 を欠損することによる褐色脂肪組織の形態的な変化が熱産生におよぼす影響について検討を行なった。その結果、褐色脂肪組織におけるミトコンドリア DNA 量や熱産生の主要因子である *Ucp1* などの発現レベルに変化はなかったが、褐色脂肪細胞への分化に関与する因子である *Prdm16* の発現レベルが BCO1 KO マウスで有意に減少していた。そこで、熱産生能への影響を顕著にするためにマウスを寒冷条件下に暴露して評価を行なったところ、BCO1 KO マウスで寒冷耐性の低下傾向を示した。現在、BCO1 の欠損が熱産生能および褐色脂肪組織の機能におよぼす影響について詳細な検討を行なっている。

carotenoid, brown adipose tissue, themogenesis

講演番号：3E4p15
講演日時：3 月 26 日 16:44～ 1 号館 E4 会場

ストレプトゾトシンは REDD2 の発現増加を介して膵 β 細胞死を誘導する
Streptozotocin induces pancreatic ß-cell death through the increase of REDD2 expression

○田宮 央登[1]、原田 直樹[1]、乾 博[2]、山地 亮一[1] ([1]大阪府大院・生命環境、[2]大阪府大・栄養)
○Hisato TAMIYA[1], Naoki HARADA[1], Hiroshi INUI[2], Ryoichi YAMAJI[1] ([1]Dept. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Dept. Nutr., Osaka Pref. Univ.)

【背景と目的】

2 型糖尿病は、世界中で罹患者数が増え続けている生活習慣病である。重篤な合併症を引き起こし、生活の質を低下させることから、糖尿病の発症予防は重要な課題となっている。2 型糖尿病の発症には、インスリン分泌を担う膵 β 細胞の量の減少が強く影響する。肥満や過食などの生活習慣の悪化により、高血糖状態、高脂血漿状態が持続すると、酸化ストレスなどの細胞ストレスが引き起こされる。その結果、膵 β 細胞には細胞死（アポトーシス）が誘発され、膵 β 細胞量は減少する。regulated in development and DNA damage response 2（REDD2）は、膵 β 細胞特異的に酸化ストレスを誘導するストレプトゾトシン投与マウスの膵島において、発現が増加することが RNA-seq を用いた網羅的解析により明らかとなっている。しかしながら、膵 β 細胞における REDD2 の機能については不明である。そこで本研究では、膵 β 細胞の細胞死における REDD2 の役割について研究を行った。

【方法と結果】

ラット膵 β 細胞株 INS-1 を、高血糖/高脂血漿を模倣した高グルコース/パルミチン酸または、酸化ストレスを誘導するストレプトゾトシン存在下で培養した。その結果、高グルコース/パルミチン酸とストレプトゾトシン刺激の両方で REDD2 mRNA 発現は増加し、ストレプトゾトシン刺激後 6 時間で 44 倍増加した。また、REDD2 のホモログである REDD1 mRNA 発現については、ストレプトゾトシン刺激後 6 時間で 3 倍増加した。siRNA を用いて REDD2 ノックダウンし、アラマーブルーを用いて細胞生存率への影響を検討した。その結果、REDD2 ノックダウンによりストレプトゾトシンによる細胞生存率の低下は抑制された。さらに、REDD2 ノックダウンによる細胞死への影響を検討した。その結果、REDD2 ノックダウンはストレプトゾトシンによるアポトーシス関連因子 Poly ADP-ribose polymerase（PARP）の断片化を抑制し、アポトーシス特異的に観察される DNA の断片化も抑制した。FLAG タグ付加 REDD2 をトランスフェクションし、蛍光免疫染色法により局在の検討を行った。その結果、FLAG-REDD2 は細胞質に斑点状に局在し、ストレプトゾトシン処理により局在は変動しなかった。以上の結果から、REDD2 は酸化ストレスにより発現が増加し、細胞死（アポトーシス）を介して膵 β 細胞の量の減少に寄与することが示唆された。現在、REDD2 プロモーター領域を用いた発現制御機構の解明に取り組んでいる。

REDD2, pancreatic ß-cell, apoptosis

発表責任者：原田直樹（harada@biochem.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：3E5a01
講演日時：3 月 26 日 09:00～ 1 号館 E5 会場

マクロファージの炎症性物質に対するエミューオイルの効果

Effects of emu oil on inflammatory response of macrophages

○足立 卓哉、小倉 エレン、相根 義昌、南 和広、伊藤 実、丹羽 光一（東農大食品香粧）
○Takuya ADACHI, Eren OGURA, Yosimasa SAGANE, Kazuhiro MINAMI, Minoru ITOU, Koichi NIWA (Tokyo Univ. of Agric.)

【背景と目的】エミューは、オーストラリア原産の飛べない鳥で、ダチョウに次いで世界で２番目に大きい走鳥である。エミューは雑食性で何でもよく食べ、寒暖差にも強いため、北海道網走市ではエミューを飼育し、エミューの皮下脂肪から精製したエミューオイルを用いた化粧品を開発することで地域活性化を諮っている。エミューオイルはαリノレン酸、リノール酸による抗炎症効果、オレイン酸による高い皮膚浸透性、ビタミン E による酸化防止機能が期待されている。抗炎症効果については経験的に痛みや火傷に効果があることがわかっているが、その作用機序は未だ不明な点が多い。本研究では、エミューオイルの抗炎症メカニズムを解明することを目的とし、免疫担当細胞であるマクロファージを用いて実験を行った。

【材料と方法】エミューオイルは冷凍した皮下脂肪をミンチ状に刻み、フィルター及び遠心分離などの工程を得て精製したものを（株）東京農大バイオインダストリーから購入した。細胞はマウスマクロファージ株化細胞である RAW264 を用いた。エミューオイルを 0.001%、0.005%、0.01%の濃度で添加した培養液 (DMEM)で細胞を 24 時間培養し、LPS (100 ng/mL) を添加してさらに培養した。培養上清中のインターロイキン 6 (IL-6)とプロスタグランジン E2 (PGE2) 産生量を ELISA 法で測定した。細胞内の PGE2 合成酵素であるシクロオキシゲナーゼ 2 (COX2)とリン酸化 IκB (p-IκB) のタンパク発現量はウエスタンブロットで検出した。

【結果と考察】RAW264 を LPS で刺激すると IL-6 と PGE2 の産生量は増加した。エミューオイルを添加して培養した細胞では、LPS で刺激したときの IL-6 と PGE2 の産生量は減少した。LPS の添加により細胞中の COX2 発現量が増加し、エミューオイルにより有意に減少したことから、エミューオイルの PGE2 産生量の減少は COX2 の発現を阻害によるものであることが示唆された。

LPS の添加により細胞中の p-IκB の発現量は増加し、エミューオイルによって減少する傾向が見られた。IκB は細胞質で転写因子である NF-κB と結合しており、刺激により IκB がリン酸化することで NF-κB が乖離し、NF-κB が核へ移行して IL-6 や COX2 の遺伝子を発現させることが知られている。このことからエミューオイルは IκB のリン酸化を抑制することで NF-κB の核への移行とそれに続く IL-6 や PGE2 の産生量を減少させることが考えら得る。今後 NF-κB の核への移行がエミューオイルにより抑制されることを証明し、さらに IκB の上流にあるシグナルに対するエミューオイルの影響を検討する必要がある。

emu oil, inflammation, macrophages

発表責任者：丹羽光一（k3niwa@nodai.ac.jp）

講演番号：3E5a02
講演日時：3 月 26 日 09:11～ 1 号館 E5 会場

オリーブ果実の乳酸発酵におけるオリーブ葉の添加効果

The effect of the olive leaves addition in lactic acid fermentation of olive fruits

○岸本 憲人（小豆島ヘルシーランド株式会社　オリーヴ健康科学研究所）
○Norihito KISHIMOTO (Central Institute of Olive and Health Sciences)

【目的】近年、健康志向を背景にオリーブオイルの需要が増加している。当社はオリーブの自社農園を有しており、収穫したオリーブ果実からオリーブオイル（食用、化粧用）を搾油する。特に、化粧用オリーブオイルについては、収穫したオリーブ果実を塩水に漬け込み、乳酸発酵させてから搾油する。この発酵工程により、ポリフェノール含量の増加だけでなく、甘くフルーティーな香りをもつオイルに仕上がる。これまでにオリーブ果実の乳酸発酵のメカニズムについて明らかにしてきた。さらに、オリーブ果実を塩水に漬け込む際に、オリーブの葉を添加することにより乳酸発酵を促進する効果を見出した。本発酵プロセス及び果実と葉を同時に搾油することによって得られたオイルの特徴について報告する。

【方法】収穫後のオリーブの果実および葉（0～10%量）を同時に塩水に浸漬することによって乳酸発酵を行い、漬込み液中 pH を測定することにより乳酸発酵プロセスを評価した。さらに、乳酸発酵後のオリーブの果実と葉を同時に搾油することによってオイルを得た。オイル中の栄養成分の測定及びオイルの肌浸透性を調べた。

【結果】オリーブの果実と葉を同時に漬け込むことによって乳酸発酵を開始すると、オリーブ果実単独で乳酸発酵するよりも漬込み液中の pH の低下（発酵）が促進された。本発酵における添加する葉量を検討したところ、葉量の増加に伴い発酵が促進された。添加する葉の品種（Mission, Lucca, Nevadillo blanco, Manzanillo 種）についても検討したところ、Manzanillo 種の葉が最も発酵促進効果が高かった。次に、オリーブ果実を単独発酵させた場合とオリーブ葉と果実を混合発酵させた場合で得られたオイル中の栄養成分量を比較したところ、混合発酵させた場合の方が、ポリフェノール量、クロロフィル量およびビタミン A 量が有意に上昇していた。さらに、単独発酵および混合発酵由来のオイルの肌への浸透性を比較したところ、混合発酵由来のオイルの肌浸透性がよいことがわかった。以上の結果から、オリーブの葉を添加することによってオリーブ果実の乳酸発酵が促進されるだけでなく、発酵後に搾油して得られたオイルの栄養成分量及び美容機能が向上していることがわかった。

Olive oil, Lactic acid fermentation, Olive leaf

講演番号：3E5a03
講演日時：3 月 26 日 09:22～ 1 号館 E5 会場

全身麻酔薬はなぜ効くのか：ハエトリグサなど植物を用いた活動電位や細胞膜挙動の可視化

How general anesthesia works: Monitoring of action potentials in Venus flytrap and plant cell membrane

○陽川 憲[1]、蔭西 知子[1]、Andrej Pavlovic[2]、Stefano Mancuso[3]、Frantisek Baluska[4] ([1]北見工大、[2]パラツキー大学オロモウツ、[3]フィレンツェ大学、[4]ボン大学)

○Ken Yokawa[1], Tomoko Kagenishi[1], Andrej Pavlovic[2], Stefano Mancuso[3], Frantisek Baluska[4] ([1]Kitami Institute of Tech., [2]Palacky University Olomouc, [3]University of Florence, [4]University of Bonn)

全身麻酔薬の使用は、１９世紀のエーテル吸入による手術の試みが初めてである。それ以来、様々な化学物質が麻酔作用を有することが発見されてきた。そうして現在に至るまで、苦痛を伴う治療には麻酔は不可欠なものとなっている。それにも関わらず、麻酔がどのようなメカニズムで神経細胞に作用し、意識を失わせるかについては麻酔の発見以来１５０年間ほとんどが不明のままである。特に、最大の「謎」は、構造的に類似点を持たない異なる分子が、なぜ等しく麻酔作用を呈するのか、さらに、化学的に不活である希ガスのキセノンまでもが優れた麻酔効果を発揮することについて、これまでに明確な科学的回答を得ていない。その原因の１つは、麻酔下の脳などの器官において、インタクトな状態で細胞を観察することが困難であるということである。

今回、ハエトリグサやオジギソウなどの動く植物を用いて、動物に使用される麻酔（ジエチルエーテル、キセノン処理）を処理すると、接触刺激による葉の動きが止まり、それは活動電位の瞬時の消失によることを明らかにした。また、種子の休眠打破やクロロフィルの生合成も麻酔薬処理により阻害されることが分かった。インタクトなシロイヌナズナ根を用いた実験では、麻酔下でエンドサイトーシスに異常が見られた。植物をモデルとして得られた結果をもとに、全身麻酔の普遍的な作用機序についての考察を行う。

anesthesia, plants, action potentials

発表責任者：陽川憲（yokawaken@mail.kitami-it.ac.jp）

講演番号：3E5a04
講演日時：3 月 26 日 09:33～ 1 号館 E5 会場

表皮角化細胞単層培養系及び3次元皮膚モデルを用いた植物油の皮膚角層バリア形成促進機能の解析
Analysis of skin barrier formation promoting function of plant oil using keratinocyte monolayer culture and three-dimensional skin model

○三嶋 隆、鷲見 嘉奈子、児玉 千鶴子、唐木田 直矢、高橋 有志、井出 将博、吉田 泉、五十嵐 友二（日本食品分析セ）
○ Takashi MISHIMA, Kanako SUMI, Chizuko KODAMA, Naoya KARAKIDA, Yushi TAKAHASHI, Masahiro IDE, Izumi YOSHIDA, Tomoji IGARASHI (Japan Food Research Laboratories)

【目的】皮膚において，保湿や感染防御・アレルゲンへの曝露防止等，健康維持のため角層バリアは重要である。今般，スキンケアに関する製品には種々の天然植物油が利用されている。個別の天然物について研究が進んでいる例もあるが，皮膚に対する効果について生化学的な解析が詳細に行われているものは多くない。他方，化粧品開発には動物実験が利用できない状況になり，代替法として3次元皮膚モデルの重要性が増している。そこで，種々の植物油系油脂の網羅的な解析を目的として，表皮角化細胞単層培養系によるスクリーニング及び3次元皮膚モデルを用いた検証を行った。
【方法】市販の油糧種実類 13 種を室温で水分配した脂質相及び市販の植物油 4 種，計 17 種類を試料液とし，正常ヒト表皮角化細胞(NHEK)に刺激負荷した。刺激 1～3 日後， 脂肪染色 (Nile Red)や各種免疫染色による観察及び qRT-PCR による遺伝子発現解析を行った。次に分化促進作用の程度が大きかった試料液を選抜して，3 次元皮膚モデル(Advanced Skin™)に対する塗布試験を行った。刺激 4 日後，経皮水分蒸散量を測定後に皮膚を回収し，ヘマトキシリン・エオジン染色及び各種免疫染色による組織化学的解析及び LC-QTOF-MS を用いたタンパク質の網羅解析を行った。
【結果】NHEK では刺激 1 日後，多数の試料液において，分化に関わる転写因子である PPAR-α及び/又は PPAR-δの核移行の増強が免疫染色により観察された。あわせて脂質代謝酵素やインボルクリン等の分化マーカータンパク質，さらにタイトジャンクション関連タンパク質の遺伝子発現上昇が認められた。続いて 3 日後，細胞内の Nile Red 陽性脂肪球の増加や分化マーカーであるトランスグルタミナーゼ 1 陽性細胞の増加が観察された。NHEK を用いたスクリーニングでの評価において上位を占めたパインナッツ，ペカンナッツ，クルミ，及びヘンプシードの 4 種について 3 次元皮膚モデルに供した結果，いずれの試料液も 4 日後の経皮水分蒸散量は刺激前と同程度もしくは低下傾向を示し，かつ対照皮膚の値と比較して有意に低値を示した。組織学解析の結果，ケラトヒアリン顆粒を有する顆粒細胞層の増加及び角質層中セラミド量の増加が観察された。さらに LC-QTOF-MS によるタンパク質発現の網羅的解析の結果，各種分化マーカーの発現増加が示された。以上の結果より，植物油脂中の脂肪酸等の低分子化合物が PPAR-α 及び/又は PPAR-δ を活性化し，表皮角化細胞の分化促進及び有用なセラミドの産生増加を促すことで角質バリア形成を促進するカスケードが想定された。その結果，経皮水分蒸散量を抑制することが示唆された。このように，本評価系を用いて素材ごとの特徴を評価出来ると考えられた。

plant oil, three-dimensional skin model, PPAR-α,δ

発表責任者：三嶋　隆（misimat@jfrl.or.jp）

講演番号：3E5a05
講演日時：3 月 26 日 09:44～ 1 号館 E5 会場

東京湾岸江東地区での養蜂における蜜源解明の試み ー花粉 DNA のメタバーコーディング解析を用いてー

Trials to elucidate the nectar source for beekeeping in Tokyo Bay Area Koto district - Using pollen DNA metabarcoding analysis-

○野崎 旭惣[1]、田中 啓介[2]、志波 優[4]、中太 葉月[3]、門多 真理子[3,4] ([1]武蔵野大院環境、[2]東農大ゲノムセ、[3]武蔵野大環境、[4]東農大生命科学)
○ Akinobu NOZAKI[1], Keiske TANAKA[2], Yuh SHIWA[4], Hazuki NAKADAI[3], Mariko SHIMIZU-KADOTA[3,4] ([1]Graduate Scool, Environ. Sci., Musashino Univ., [2]NGRC, Tokyo Univ. of Agric., [3]Dept. Environ. Sci., Musashino Univ., [4]Fac. Life Sci., Tokyo Univ. of Agric.)

[背景・目的]
セイヨウミツバチ(*Apis mellifera*)の行動半径は巣から約 2km といわれている。また、ミツバチは花蜜だけでなく花粉も巣の中の巣房に貯蔵し、働きバチの餌とする習性がある。そこで、そのような花粉から植物種を識別することができれば、ミツバチが利用する蜜源植物を推定できると考えられ、養蜂や造園計画の発展に貢献できると期待される。本研究では東京湾岸の江東区有明地区における養蜂を対象に蜜源植物を推定することを目的とした。

[方法]
本研究はミツバチが巣に貯蔵する花粉の DNA を解析することで、その植物種を推定することとした。サンプリングは晴天の日に行い、巣箱の中で比較的新しい内容物(主に花粉と蜂蜜)を持つ巣房を色に基づき選び、ミクロスパーテルを用いて内容物を採取した。頻度は原則月 3 回(上・中・下旬)とし、期間は 2018 年 3 月中旬～10 月中旬とした。採取物に蒸留水を加えて蜂蜜を溶かし、遠心分離により花粉を含む沈殿物を集め DNA を抽出した。ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase /oxygenase 大サブユニット遺伝子(*rbcL*)のバーコード領域の一部を PCR 増幅し、次世代シーケンサーで配列を解読した。出力したペアリードを前処理後、一本のリードに統合した。BLAST を用いて 97%以上の相同性でヒットした配列を代表的な OTU として示した。

[結果・考察]
全体では30属以上の植物をほとんど完全一致によって検出することができた。開花時期の短い *Prunus*（サクラ）属は 3 月下旬～4 月中旬に検出された。一方、開花時期の長い *Lagerstroemia*（サルスベリ）属は 8 月上旬～10 月上旬に検出された。このように、開花時期とサンプリングした蜂蜜に含まれる花粉が合致しているものが多かった。以上の結果から、本研究で利用したバーコード領域では、少なくとも属レベルで識別することを可能とし、花粉 DNA のメタバーコーディング解析を行うことで養蜂における蜜源植物を効果的に推定できる可能性が示唆された。したがって、今後このような一連の解析技術の確立に向けて改善と調査を重ねれば、より高い検出力を持つ技術への展開、それに伴い季節に応じた蜜源植物を明らかにできると期待される。

Apis mellifera, Pollen DNA, Metagenome

発表責任者：門多　真理子（mskadota@musashino-u.ac.jp）

講演番号：3E5a06
講演日時：3 月 26 日 10:05～ 1 号館 E5 会場

空間・構造・運動性相関スペクトルを用いた複雑系代謝物群の俯瞰的プロファイリング技術の開発

Development of a comprehensive profiling method for complex mixtures of metabolites using position-structure-mobility correlation spectra

○伊藤 研悟[1,2]、坪井 裕理[1]、伊達 康博[1,2]、菊地 淳[1,2,3] ([1]理研 CSRS、[2]横市院生命医、[3]名大院生命農)
○ Kengo ITO[1,2], Yuuri TSUBOI[1], Yasuhiro DATE[1,2], Jun KIKUCHI[1,2,3] ([1]RIKEN CSRS, [2]Yokohama City Univ., [3]Nagoya Univ.)

【背景・目的】NMR は代謝混合物の包括的な検出が可能であり[1]、得られた実測値を量子化学に基づき算出された理論化学シフトと比較することにより、既知・未知代謝物群の同定及び構造評価が可能となってきている[2]。また、生物資源を有効活用する上では、NMR による代謝物群の包括的な検出と同定、構造評価に加え、物性評価や成分分布のプロファイリングも極めて重要であると考えられる。そこで本研究では、非侵襲的なシグナル分離や同定、物性評価に有用な拡散及び緩和 NMR 実験を代謝物群の解析に適用し、古典力学及び量子化学といった演繹的手法により、代謝混合物の *in silico* 同定及び物性評価を行った。さらに、新規 NMR パルス系列を開発するとともに、得られたインタクトな試料の空間・構造・運動性相関スペクトルの解析により、複雑系代謝物群の結合状態や運動性などの動的な現象と化学構造の俯瞰的評価が可能な手法の確立を目的とした。
【実験方法】本実験では、方法論構築用の生体試料としてスジエビ(*Palaemon paucidens*)を用いた。エビ試料は、凍結乾燥後に破砕し、プロテアーゼ処理を行った後、重水及び重メタノールで極性代謝物群の抽出を行い、溶液 NMR 計測に供試した。溶液中の代謝物群の拡散及び緩和現象を観測するため、PSYCHE-iDOSY[3]、IR、PROJECT、REST[4]の NMR 計測を行った。また、溶液中の運動性を理論的に評価するため、SEGWE 法[5]及び BRW 理論[6]から拡散係数及び緩和時間の理論値を算出した。エビ試料に含まれる高分子成分は固体 NMR を用いて評価した。さらに、エビ試料の部位における化学構造及び運動性を非侵襲的に評価するため、HR-MAS ローターに破砕等の処理を行っていないエビ試料を丸ごと封入し、改良した CSI-DOSY[7]の NMR 計測を行った。
【結果・考察】REST を含む緩和 NMR 実験では、類似の部分構造及び分子量を持つ代謝物群を運動性の違いによりシグナル分離することが可能であり、理論値と実測値の比較により、*in silico* 同定と物性評価が可能であった。改良した CSI-DOSY は、体の部位で異なる代謝物の運動性を非破壊的に評価することが可能であり、代謝動態の解明につながることが示唆された。
【参考文献】[1] Kikuchi, J., et al. *Prog. NMR Spectrosc.* 104, 56–88 (2018). [2] Ito, K., et al. *Chem. Sci.* 9, 8213–8220 (2018). [3] Foroozandeh, M., et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* 55, 15579–15582 (2016). [4] Dal Poggetto, G., et al. *Chem. Commun.* 53, 7461–7464 (2017). [5] Evans, R., et al. *Anal. Chem.* 90, 3987–3994 (2018). [6] Hogben, H. J., et al. *J. Magn. Reson.* 208, 179–194 (2011). [7] Krachkovskiy, S. A., et al. *J. Am. Chem. Soc.* 138, 7992−7999 (2016).

MOSY, chemical imaging, physical property evaluation

発表責任者：伊藤研悟（kengo.ito@riken.jp）

講演番号：3E5a07
講演日時：3 月 26 日 10:16～ 1 号館 E5 会場

山積される NMR 情報のデータクレンジング法検討およびツール開発

Data cleansing investigation and development of web tool for the stacked NMR big-data

○山田 隼嗣[1,2]、黒谷 篤[2]、近山 英輔[2,3]、菊地 淳[1,2,4] ([1]名大院・生命農、[2]理研・環境資源、[3]新潟国際大・情報文化、[4]横市院・生命医)
○ Shunji YAMADA[1,2], Atsushi KUROTANI[2], Eisuke CHIKAYAMA[2,3], Jun KIKUCHI[1,2,4] ([1]Grad.Sch. Bioagri. Sci., Nagoya Univ., [2]RIKEN CSRS, [3]Niigata Univ. Int. Inform. Stud., [4]Grad. Sch. Med. Life Sci., Yokohama City Univ.)

データ駆動型科学において、核磁気共鳴（NMR）分光法の適用が拡大している[1, 2]。長年の蓄積に由来する山積されるNMR情報（ビッグデータ）の活用は、医療、食品、材料、環境分野のイノベーションにとって重要な課題である。NMRのハードウェア開発も盛んであり、特に、低磁場の卓上NMRが将来的に現場での環境や健康の恒常性評価や農林水産業における品質管理で普及することにより、自由誘導減衰（FID）のビッグデータの蓄積が加速することが想定される。NMRによる知識発見や未来予測の戦略において、使用される生データ（FID）の質は、抽出される知識の価値に影響するため重要である。世界中からインターネットを介してデータが集積されるデータベースを湖に例えた「データレイク」は、FIDと関連情報（化学シフト、*J*値、サンプル名、状態、溶媒、温度、化学構造、日時、場所、生物種）の未整理による手間の増加や解析結果を不鮮明にする泥沼化を防ぐためにデータ整理が重要である。また、ノイズの存在も問題である。したがって、データ整理及びノイズ除去を意味する「データクレンジング」は、山積され得るFIDビッグデータ時代の基盤技術として重要である。

最近、FIDと化学構造を関連付けるフォーマットが提案された[3]。そこで、FIDと関連情報を整理し、効率的な検索及び多様な解析に対応するデータベースを提案する。また、FIDのノイズを除去し、信号対雑音比（S/N比）を改善する戦略は確立されていない[4]。

本研究では、FIDノイズ除去のためのデジタルフィルターとして、時間－周波数解析及び行列因子分解の適用[5]を検討する。NMRのFID処理ツールとして、機械学習の分野で主流なPythonパッケージが公開されている[6]。これらの技術に基づくウェブツールを開発し、簡便な手順でノイズを除去し、効率的に高品質なデータセットを得ることができるデータクレンジング環境整備を議論したい。

Ref: [1] J. Kikuchi and S. Yamada, *Analyst*, 2017, **142**, 4161-4172. [2] J. Kikuchi, K. Ito and Y. Date, *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*, 2018, **104**, 56-88. [3] M. Pupier, J. M. Nuzillard, J. Wist, N. E. Schlörer, S. Kuhn, M. Erdelyi, C. Steinbeck, A. J. Williams, C. Butts, T. D. W. Claridge, B. Mikhova, W. Robien, H. Dashti, H. R. Eghbalnia, C. Farès, C. Adam, P. Kessler, F. Moriaud, M. Elyashberg, D. Argyropoulos, M. Pérez, P. Giraudeau, R. R. Gil, P. Trevorrow and D. Jeannerat, *Magn Reson Chem*, 2018, **56**, 703-715. [4] W. J. Chen, H. Ma, D. Yu and H. Zhang, *Sensors*, 2016, **16**. [5] H. Liu, H. B. Dong, J. Ge, B. J. Bai, Z. W. Yuan and Z. Z. Zhao, *Measurement Science and Technology*, 2016, **27**. [6] J. J. Helmus and C. P. Jaroniec, *Journal of Biomolecular Nmr*, 2013, **55**, 355-367.

FID big-data, Time-frequency analysis, Matrix factorization

発表責任者：山田隼嗣（shunji.yamada@riken.jp）

講演番号：3E5a08
講演日時：3 月 26 日 10:27～ 1 号館 E5 会場

NMR を用いた魚肉の物理・化学プロファイルから見る魚類の多様性
NMR-based Physical and Chemical Characterization of Japanese Natural Fish
○魏 菲菲[1]、伊藤 研悟[1]、坂田 研二[1]、朝倉 大河[1]、伊達 康博[1,2]、菊地 淳[1,2,3] ([1]理研 CSRS、[2]横市大院・生命医、[3]名大院・生命農)
○Feifei WEI[1], Kengo Ito[1], Kenji Sakata[1], Taiga Asakura[1], Yasuhito Date[1,2], Jun Kikuchi[1,2,3] ([1]RIKEN CSRS, [2]Grad. Sch. Med. Life Sci., Yokohama City Univ., [3]Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ.)

現在の日本は領土が世界第 61 位なのに対して、領海や排他的経済水域の広さは世界第 6 位である。そのため、日本は海洋大国であり、豊富な水産資源を有している。これら水産資源の一部は食糧などの形で利用され、養殖技術が確立されているものもあるが、一方で市場に出回っている水産物以外にも日本には多くの未利用水産資源がある。これらの未利用水産資源には多種多様な魚類が含まれているものの、その水産資源としての価値はほとんど評価されていないのが現状である。一方、我々は日本各地の沿岸および河口域等から採集した魚類を研究対象とし、核磁気共鳴法(NMR)を基軸とした各種分析機器を用いて有機物群、無機物群および微生物群集のビッグデータを蓄積し、機械学習(1, 2)などのバイオインフォマティクスを駆使して生物ー環境システムの特徴抽出(3)を行う手法を構築してきた。この多様性豊かな水産資源の評価および利用を目指し、我々は魚類筋肉に含まれる低分子および高分子プロファイルの違いを NMR で評価し、水産資源の有効利用の観点から物性や環境因子との関連性を明らかにすることに着目した。

本研究では日本周辺の海から合計 200 種以上、1000 個体以上の魚を収集し、溶液（700 MHz）NMR を用いて多種な魚類の筋肉の低(2D-*J*)・高分子(diffusion-edited)をプロファイリングし、魚肉の食感や加工処理に重要なファクタとした切断応力をオートグラフで評価した。ピーク分離やマーケットバスケット分析などのデータマイニング手法を駆使し、魚肉の物理・化学の観点から多種多様な魚類の生息環境（塩濃度）、生態（回遊魚、深海魚、表層魚）などの特徴抽出を行った。また、魚肉における各種分析データの関連性を解明し、水産資源の評価および利用に新しい情報を打ち出す試みを本会にて議論したい。

参考文献
(1) Date, Y.; Kikuchi, J., Application of a Deep Neural Network to Metabolomics Studies and Its Performance in Determining Important Variables. *Anal. Chem.*, **2018**, 90(3), 1805-1810.
(2) Asakura, T.; Sakata, K.; Date, Y.; Kikuchi, J., Regional Feature Extraction of Various Fishes Based on Chemical and Microbial Variable Selection Using Machine Learning. *Anal. Methods*, **2018**, 10(18), 2160-2168.
(3) Wei, F.; Sakata, K.; Asakura, T.; Date, Y.; Kikuchi, J., Systemic Homeostasis in Metabolome, Ionome, and Microbiome of Wild Yellowfin Goby in Estuarine Ecosystem. *Sci. Rep.*, **2018**, 8:3478.

NMR, fish diversity, bioinformatics

発表責任者：Feifei WEI（feifei.wei@riken.jp）

講演番号：3E5a09
講演日時：3 月 26 日 10:38～ 1 号館 E5 会場

細径化ロングモノリスカラムによる SRM プロテオミクスの高感度化

Enhancement of detection sensitivity in SRM-based proteomics using meter-long monolithic columns with smaller diameter

○大谷 優太[1]、油屋 駿介[1,2]、水口 博義[3]、三浦 夏子[1]、青木 航[1,4,5]、植田 充美[1,4,5]（[1]京大院・農、[2]日本学術振興会、[3]株式会社京都モノテック、[4]CREST、[5]KIST-BIC）
○Yuta Ohtani[1], Shunsuke Aburaya[1,2], Hiroyoshi Minakuchi[3], Natsuko Miura[1], Wataru Aoki[1,4,5], Mitsuyoshi Ueda[1,4,5] ([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]JSPS, [3]Kyoto Monotech, [4]CREST, [5]KIST-BIC)

[背景と目的]
分析機器の発達により、ショットガンプロテオミクスを用いることで数千のタンパク質を 1 分析で同定できるようになった。しかし、プロテオームの複雑さとダイナミックレンジの広さにより、存在量の低いタンパク質をショットガンプロテオミクスで検出することは未だ難しい。これに対し、トリプル四重極型質量分析器による SRM 法（Selected Reaction Monitoring）を用いたターゲットプロテオミクスでは、事前に選択するペプチドのみを分析するため、高 S/N 比かつ高感度にペプチドを分析できる。しかし、極めて存在量が少ないタンパク質を同定するためには、さらなる検出感度の向上が求められている。
液体クロマトグラフィ（LC）–タンデム質量分析計（MS/MS）において検出感度を上昇させるには、カラムの分離性能の向上とカラムの細径化が必要である。カラムの分離性能が向上すれば、ピーク幅が細くなりイオン強度が上昇するため、検出感度の向上に繋がる。我々が開発を進めてきたモノリスカラムは、流路と骨格が一体となったネットワーク構造を持ち、通液性が高いためメートル長カラムを作製できるため、高い分離能を示す[1]。さらに、カラムの細径化により、サンプルが濃縮されるとともに、MS に導入される際の脱溶媒が促進されるため、検出感度が向上することが予測される。そこで、本研究ではメートル長の細径化モノリスカラムを SRM プロテオミクスに適用することで、ペプチド検出感度の向上を目指した。

[方法と結果]
本研究では、長さが 500 mm と 1000 mm、内径が 75 μm と 100 μm のモノリスカラムを調製し、そのピークキャパシティと感度を評価した。分析対象としては、BSA をトリプシン処理したペプチド断片の中からイオン化効率の高い 10 個のペプチドを選択した。分析の結果、カラム長を 500 mm から 1000 mm にすることでピークキャパシティは向上した。また、カラム内径を 100 μm から 75 μm にすることで感度がペプチドレベルで上昇した。これらの結果から、細径化ロングモノリスカラムを用いることで、より高感度なターゲットプロテオーム解析が可能になると期待される[2]。
[1] Morisaka *et al.*, *AMB Express*, 2, 1-5 (2012)
[2] Ohtani *et al.*, submitted.

Proteomics, Monolithic column, Nano LC-MS

講演番号：3E5a10
講演日時：3 月 26 日 10:49～ 1 号館 E5 会場

Agilent Hilic-Z カラムを用いた高極性化合物の一斉分析
Analysis method for highly polar compounds by Agilent Hilic-Z column
○軸丸 裕介、Hsiao Jordy、Van de Bittner Genevieve、Chu Te-Wei、Yin Hongfeng (アジレント・テクノロジー)
○Yusuke JIKUMARU, Jordy Hsiao, Genevieve Van de Bittner, Te-Wei Chu, Hongfeng Yin (Agilent Technologies)

LC-MS システムにおいて、金属のコンタミネーションはアニオン性物質のピーク形状や検出下限に著しくネガティブな影響を与えることが知られています。この問題を解決するために、強い金属キレート試薬である ethylenediaminetetraacetic acid をシステム洗浄液や移動相添加剤として用いる手法が報告されていますが、目的化合物に対して著しいイオン化抑制を起こすことも知られています。本報告では、移動相に添加する金属キレート試薬として medronic acid を用い Hilic カラムを用いて分析することで、高極性化合物の分析においてイオン化抑制の影響を最小化して優れたピーク形状と検出下限を実現できることを示します。

標準溶液を用いたピーク形状の確認の結果、核酸、有機酸において顕著なピーク形状の改善が認められました。次に、実試料での効果を確認するために、白血病モデル細胞である K562 細胞に細胞外 adenosine 濃度を上昇させることが知られている methotrexate 処理を行った結果、adenosine の顕著な上昇が認められた一方で pyruvate 濃度には変化が見られませんでした。この結果はこれまでの知見を支持するものであることから、本分析法が生体試料においても適用可能であることが示されました。

本法の適用範囲を調べるために逆相カラムを用いたリン酸化ペプチド分析においても試験を行った結果、ピーク形状の著しい改善が認められました。加えて高極性農薬の分析でも同様の改善が認められたことから、本法を用いることで、これまで困難であった様々な高極性物質の分析を改善できる可能性が示されました。

LC-MS, highly polar compounds, hilic column

発表責任者：軸丸　裕介（yusuke_jikumaru@agilent.com）

講演番号：3E5a11
講演日時：3 月 26 日 11:10～ 1 号館 E5 会場

高性能二段階孔構造精製担体を用いたペプチド・核酸の分離
Separation of peptides and nucleic acids using high performance Dual Pore structure purified carrier
○泊 直宏[1]、山本 佳宏[1]、宮本 利一[2]、白 鴻志[2]([1]地方独立行政法人　京都市産業技術研究所、[2]株式会社エスエヌジー)
○Naohiro TOMARI[1], Yoshihiro YAMAMOTO[1], Riichi MIYAMOTO[2], Bai HONGZHI[2] ([1]Kyoto Municipal Institute of Industrial Technology and Culture, [2]SnG Inc.)

【背景および目的】
生物の構成要素であるペプチド・核酸は医薬品市場において近年成長・拡大を続けている医薬品原料であるが，その分取精製プロセスでは液体クロマトグラフィー用シリカ粒子充填カラムが用いられている。これら従来技術の単一孔粒子充填カラムは，ペプチド医薬品製造において，分離性能が悪い，カラム背圧が高い，精製に時間がかかる，大量の有機溶剤を消費してコストもかかり環境負荷も大きい，といった問題がある。この問題を解決するため高品質／低コスト製造を可能にする革新的なクロマト精製の汎用化技術を提供することを目的とし，高性能二段階孔構造（Dual Pore）精製担体を用いたカラムを使用して，ペプチドサンプルの分離条件について従来構造の単一孔粒子充填カラムと比較し，大量精製可能な高性能の精製分取条件を検討した。
一方で，精製条件を確立するにあたり，これらカラムの評価に用いるペプチドサンプルについては分子量が大きければ大きいほど製造単価が高額で 1 グラムあたり数十万程度のコストがかかるため，カラム評価も容易ではない。そのため，本研究では低分子量タンパク質である塩化リゾチームをタンパク質分解酵素により分解しペプチド化したものをサンプルとして調製し，カラム評価に供するサンプルのコストを低減しつつ，ペプチド分離に適したカラムの分離条件の検討を実施した。
【結果および考察】
Dual Pore カラムについても従来技術である単一孔粒子充填カラムとの分離性能評価を実施しつつ，ペプチド分離条件を研究用途レベルでのカラムサイズから検討を開始し，製造スケールでの使用を想定した中型～大型カラムにおける分取・精製条件を検討した。製造レベルでの大型カラムによるペプチド精製では溶離液が多量となるため，1 測定あたりの溶媒使用及び排出される廃液処理に係るコストが実験室レベルでの使用と比較して多大なものとなるが，大型カラムで測定・精製を行う流速及びグラジエント時間の最適化を重点的に実施したことで，サンプルの精製時間，溶媒使用量を 55%短縮・削減し，製造レベルでのペプチド分取・精製条件を確立することができた。

Silica monolithe, peptide

講演番号：3E5a12
講演日時：3 月 26 日 11:21～ 1 号館 E5 会場

改良された次世代シーケンスによる逆転写酵素の正確性の解析

Fidelity analysis of the reverse transcriptase by a modified next generation sequencing

岡野 啓志[1]、馬場 美聡[1]、秀瀬 涼太[2]、飯田 慶[3]、李 瞳陽[1]、兒島 憲二[1]、滝田 禎亮[1]、柳原 格[4]、藤原 伸介[2]、○保川 清[1]([1]京大院農、[2]関西学院大、[3]京大院医、[4]大阪母子医療セ)
Hiroyuki OKANO[1], Misato BABA[1], Ryota HIDESE[2], Kei IIDA[3], Tongyang Li[1], Kenji KOJIMA[1], Teisuke TAKITA[1], Itaru YANAGIHARA[4], Shinsuke FUJIWARA[2], ○Kiyoshi YASUKAWA[1] ([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Kwansei-Gakuin Univ, [3]Grad. Sch. Med., Kyoto Univ., [4]Osaka Women's and Children's Hospital)

【目的】核酸合成酵素の正確性は、エラー率（誤ったヌクレオチドを取込む確率）で評価される。我々は、次世代シーケンス（NGS）により、逆転写酵素（RT）によるcDNA合成反応のエラー率を求める方法を開発した[1)]。この方法では、RNAとアニールする領域の5’側上流に14塩基のランダム配列をバーコードとして有するプライマーを用いてcDNA合成反応を行った。各反応に対して個別にNGS解析を行い、同一バーコードを有するリードのすべてに導入された変異はcDNA合成時のエラー、一部に導入された変異はNGSのエラーとみなした。今回、複数のcDNA合成反応に対して一回のNGS解析でエラー率を求められるよう、本方法を改良した。

【方法】１．酵素：5種類（ヒト免疫不全ウイルスⅠ型（HIV-1）由来 RT、4アミノ酸残基への変異導入で耐熱性が向上したモロニ―マウス白血病ウイルス由来RT変異体（MM4）、16アミノ酸残基への変異導入でRT活性を獲得した超好熱性アーキア*Thermococcus kodakarensis* 由来ファミリーB DNAポリメラーゼ変異体（RTX）、Leu329→AlaによりRT活性を獲得した好熱性細菌*Thermotoga petrophila* K4株由来ファミリーA DNAポリメラーゼ変異体（K4pol$_{L329A}$）、*T. kodakarensis*スーパーファミリー2 由来DNA/RNAヘリカーゼ（*Tk*-EshA））を大腸菌で発現させ菌体から精製した[1)]。

２．cDNA合成反応：RNAは、嘔吐型セレウス菌のセレウリド合成遺伝子*cesD*のmRNAの一部（419塩基）を合成したものをモデルとして用いた。プライマーは、14塩基のランダム配列の上流に、反応条件を識別するために反応条件ごとに異なる5塩基の配列を有するものを用いた。反応は30分間行った。

３．NGS：シーケンサーはIon Proton Sequencer（Thermo Fisher Scientific）を用いた。解析は、同一バーコードを有する配列が5個以上得られたリードを対象とした。

【結果と考察】酵素種（HIV-1、MM4、RTX、K4pol$_{L329A}$、「MM4、K4pol$_{L329A}$、*Tk*-EshAの混合物」の5種類）、dNTP濃度（20または200 μM）、$MgCl_2$または$Mn(OCOCH_3)_2$濃度（1または5 mM）、温度（40、50、60℃）が異なる44種類のcDNA合成反応を行いNGSで解析した。得られたリード全370万個のうち、解析対象は100万個（27%）であった。dNTPおよび$MgCl_2$または$Mn(OCOCH_3)_2$濃度が高くなるとエラー率が増加し、その傾向は①が最も顕著であった。本方法は各種条件下でのRTの正確性をNGSで効率よく評価するのに有用である[2)]。

【文献】1. K. Yasukawa et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **492**, 147-153 (2017)
2. H. Okano et al. *Enzyme Microb. Technol.* **115**, 81−85 (2018)

cDNA synthesis, error rate, next-generation sequencing

発表責任者：保川清（yasukawa@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3E5a13
講演日時：3 月 26 日 11:32～ 1 号館 E5 会場

信号累積型イオン感応性電界効果トランジスタを用いたラッカーゼ活性の検出
Detection of laccase activity using a signal accumulation type of ion-sensitive field-effect transistor
○西矢 芳昭[1]、上田 海夕[1]、泊 直宏[2]、山本 佳宏[2]([1]摂南大生命科学、[2]京都市産技研)
○Yoshiaki NISHIYA[1], Miyu UEDA[1], Naohiro TOMARI[2], Yoshihiro YAMAMOTO[2] ([1]Setsunan Univ. Life Sci., [2]Kyoto MIITC)

【背景および目的】
信号累積型イオン感応型電界効果トランジスタ（SA-ISFET）は、化学反応で生じるプロトンの増減を直接電気信号として累積し、取り出すことができるため、幅広い種類の酵素反応の計測に応用できるバイオセンサとなり得る。SA-ISFET はメディエーター等の仲介物質、あるいは光学検出法に要求される発色反応や蛍光標識を用いないので、測定対象が広範囲であり、前処理が簡単なものとなり簡便に測定できる。また、光路長を必要とする光学測定系を使用しないので装置の小型化に向いており、かつ大型機器に比べコストが低く、測定に高い技術力を必要としないといった数多くの特長を有している。
われわれはすでに、SA-ISFET を利用したクレアチニン、コレステロールエステル、尿素窒素、核酸などの酵素的測定法を開発し報告した。さらに、SA-ISFET を免疫測定に応用するため、標識酵素であるペルオキシダーゼ（HRP）やアルカリホスファターゼ活性測定法を開発し、SA-ISFET の応用範囲を拡げた。
今回、新規標識酵素としての応用を見据えて、ラッカーゼ活性の検出用として SA-ISFET の利用を検討したので報告する。
【結果および考察】
ラッカーゼ反応で微少プロトン量の変化を伴う系として、2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)（ABTS）を用いるシンプルな測定法を採用した。本測定法では過酸化水素を使用しないため、HRP よりも更に簡便に酵素活性を測定できる。試薬組成および測定条件を設定し、SA-ISFET にて信号累積回数 10 回での測定を実施した。結果として、ラッカーゼ反応の検出が可能なことを確認できた。数分間でのアッセイが可能であり、直線性も良好であった。また、再現性についてもバイオセンサとして問題無いレベルであった。ラッカーゼは標識酵素としての実績が無いが、HRP と異なり基質に過酸化水素を必要としない点が魅力的である。
さらに、天然メディエーターのスクリーニングへの本測定系の応用も可能であることを確認した。

Laccase, ISFET, Mediator

発表責任者：西矢芳昭（nishiya@lif.setsunan.ac.jp）

講演番号：3E5a14
講演日時：3 月 26 日 11:43～ 1 号館 E5 会場

バイオメカニカルモーターの開発に向けた走査型プローブ顕微鏡によるボルボックスの推進力の解析

Analysis of swimming force of Volvox by scanning force microscopy to develop biomechanical motor

○三留 規誉[1]、堀永 晃作[2]、新留 愛理[2]、伊藤 瑞希[2]、若林 憲一[3]、植木 紀子[3]、藤田 和孝[2]、島袋 勝弥[2] ([1]沼津高専、[2]宇部高専、[3]東工大化生研)
○NORIYO MITOME[1], Kosaku Horinaga[2], Airi Shintome[2], Mizuki Ito[2], Kenichi Wakabayashi[3], Noriko Ueki[3], kazutaka Fujita[2], Katsuya Shimabukuro[2] ([1]NIT, Numazu, [2]NIT, Ube, [3]Lab. of Chem and Life Sci., Tokyo Tech.)

【背景・目的】 近年，クリーンかつエコノミーなエネルギー源が求められている。本研究の目標は光，水および CO_2 から光合成で自らエネルギーを生成し運動する微生物を利用し，その群体の力で回転する装置を作り，メカニカルな歯車装置と複合して，使いやすい実用トルクと回転数を有するクリーンなモーターを開発することである。そのために，本研究では，ボルボックス科の中でも比較的細胞数の大きな *V. rousseletii* (約 5000 細胞) と *V. carteri* (約 2000 細胞) の二種類の推進力測定を行う。ボルボックス単体の推進力を調べるため，走査型プローブ顕微鏡を用いた新たな測定法の確立を行う。また，ボルボックスの大きさと遊泳速度からの推進力の解析を行い走査型プローブ顕微鏡の測定値の評価を行う。これらの推進力測定から得られた結果より，ボルボックス科微生物 2 種が生物モーターの動力源として用いることができるかどうかの考察を行い，走光性多細胞微生物の新たなエネルギー源，動力源としての可能性を検討する。
【方法・結果】 ボルボックスを 525 nm の LED ライトで集め，専用の測定容器に入れた。走査型プローブ顕微鏡のカンチレバーを水中に沈め，上から 525 nm の LED ライトで照らし走光中のボルボックスの測定を行った。レーザー光強度変化，カンチレバー縦方向変化 (フィードバック値)，カンチレバー横方向変化を波形データとして記録した。また，当たる瞬間を映像として捕えるために，横から顕微鏡でカンチレバー付近を撮影した。データの解析は，フィードバック値が変動した時間にレーザー光強度の変化が見られなかったものをボルボックスがカンチレバーに衝突したデータとした。さらに，波形の形からカンチレバーの当たり方を検証した。*V. rousseletii* の推進力は 7.5-10 nN，*V. carteri* の推進力は 3-4.5 nN であった。次に，ボルボックスの大きさと遊泳速度からの推進力の解析を行った。直径 5 mm のセルの中にボルボックスを入れ，顕微鏡でボルボックスが遊泳する様子を観察し 3 分間の動画を取り込んだ。画像解析ソフト ImageJ を用いて動画を画像化した。取り込んだ画像から，ボルボックスの大きさと，1 秒間に画面上を遊泳する距離測定した。ストークスの式を用いて，ボルボックスの大きさ，遊泳速度からボルボックスの推進力を算出した。その結果，*V. rousseletii* は，最大速度 700 μm/s；最大推進力 4.2 nN，*V. carteri* は，最大速度 250 μm/s；最大推進力 1.0 nN と走査型プローブ顕微鏡の値と同じオーダーの結果が得られた。以上より，走査型プローブ顕微鏡を用いて測定したボルボックスの推進力を測定することができること，単体の推進力では *V. rousseletii* がより強い推進力を出すことが確認できた。

Volvox, swimming force, Scanning Probe Microscopy

発表責任者：三留規誉（mitome@numazu-ct.ac.jp）

講演番号：3E5a15
講演日時：3 月 26 日 11:54～ 1 号館 E5 会場

抗体修飾磁性粒子を用いたカイコ体液から組換えタンパク質の精製
Efficient purification with antibody-conjugated nanoparticles from silkworm hemolymph
○鈴木 慎一朗[1]、ミンクナー ロバート[1]、徐 剣[1]、林谷 美貴子[1]、朴 龍洙[1,2] ([1]静大院・総科技・ 農、[2]静大グリーン科技研)
○Shinichiro Suzuki[1], Robert Minkner[1], Jian Xu[1], Mikiko Hayasidani[1], Enoch.Y Park[1,2] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Coll. Agric., Grad. Sch. Interg. Sci., & Technol., Shizuoka Univ., [2]Res. Inst. Green Sci. & Technol., Shizuoka Univ.)

【背景・目的】カイコ - バキュロウイルスを用いた発現系はタンパク質発現量がカイコ培養細胞や Sf 培養細胞を用いた場合と比較して、おおよそ 10 倍から 100 倍高く、目的タンパク質を効率的に発現することが可能である。しかし、高いタンパク質発現量に付随し、多くのカイコ由来のタンパク質が含まれているためタンパク質の精製が困難となる。目的タンパクの精製を短時間・高効率に行うことが可能となればカイコ - バキュロウイルス発現系の有用性は劇的に向上する。これを達成するために強い磁性を保つ特殊な素材である磁性粒子に着目した。磁性粒子は細胞・DNA・タンパク質などの分離や各種アッセイ、診断やドラッグデリバリーシステ ム(DDS)など幅広い領域に応用されている。タンパク質の精製では濾過、遠心分離などの前処理と複数のクロマトグラフィーが組み合わされるが、分離精製に長い時間がかかり、精製物質は低濃度となることが多い。そこで、磁性粒子を目的タンパクと吸着させることにより磁気分離を用いた短時間での精製と精製物の高濃度化が期待できる。本研究では、磁性粒子を用いて、カイコ体液からのタンパク質精製の効率化及び精製タンパク質の回収量の向上を目的とし、機能性磁性粒子のタンパク質吸着量及び精製効率について各種検討を行った。
【方法・結果】本研究の目的タンパク質の精製には粒子表面に抗 FLAG 抗体を修飾した抗 FLAG M2 抗体 - 磁気ビーズ(SIGMA-ALDRICH)を用いた。標的タンパク質には FLAG タグを融合した mCherry と FLAG タグを融合した Circumsporozoite protein(CSP)を用いた。両タンパク質はカイコ発現系を用いて発現し、本研究では標的タンパク質を含むカイコ体液を精製対象とした。磁性粒子 50 μg とカイコ体液 500 μl を共に振とうすることで標的タンパク質を磁性粒子に吸着させ、酸性バッファーで溶出した。精製タンパク質は、SDS-PAGE と BCA アッセイによる解析を行った。mCherry と CSP の両タンパク質は溶出分画で確認された。SDS-PAGE の結果から、カイコ由来タンパク質を大幅除去でき、標的タンパク質の濃縮が見られた。BCA アッセイの結果より、磁性粒子 1 μg 当たり 0.4 μg の標的タンパク質の分離精製が可能であった。この結果を従来の FLAG タグアフニテイ精製を含む複数段階の精製方法と比べた場合、カイコ由来タンパク質の除去率と標的タンパク質の回収率が高いことが明らかとなった。新たな精製の前処理方法として、ウイルス様粒子の精製に応用する予定である。

Magnetic beads, FLAG-tag affinity purification, Circumsporozoite protein (CSP)

講演番号：3E5p01
講演日時：3 月 26 日 13:50～ 1 号館 E5 会場

ピロリン酸型ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼの立体構造解析
Structure-based analysis of pyrophosphate-dependent phosphoenolpyruvate carboxykinase
○千葉 洋子[1]、宮川 拓也[2]、嶋根 康弘[1]、田之倉 優[2]([1]海洋研究開発機構、[2]東大院 農生化)
○Yoko CHIBA[1], Takuya MIYAKAWA[2], Yasuhiro SHIMANE[1], Masaru TANOKURA[2] ([1]JAMSTEC, [2]Univ. Tokyo)

【背景・目的】

Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)は PEP + CO_2、oxaloacetate 間の変換反応を可逆的に触媒し、解糖系・糖新生系と TCA 回路などの有機酸代謝系をつなぐ中央代謝系の Hub 酵素である。PEPCK は oxaloacetate に付与するリン酸基の供給源によって、3 種類に分類される。ひとつは無機ピロリン酸(PPi)を用いる PPi-PEPCK (EC 4.1.1.38)、残りのふたつはそれぞれ ATP, GDP を用いる ATP-PEPCK (EC 4.1.1.49)および GDP-PEPCK (EC 4.1.1.32)である。これら PPi, ATP, GTP-PEPCK のアミノ酸配列全体の類似性は非常に低く、互いに BLASTP 検索でヒットしない。しかし ATP-PEPCK と GTP-PEPCK のタンパク質立体構造は非常によく似ており、活性に直接関与する残基が保存されている。一方で PPi-PEPCK については 3 次構造が未解明であった。そこで本研究は PPi-PEPCK の X 線結晶構造解析を行い、ATP, GTP-PEPCK の立体構造と比較すること、および PPi 特異性を示す構造的基盤を明らかにすることを目的とした。

【結果・考察】

セレノメチオニン標識 PPi-PEPCK の結晶を用いて SAD 法により位相決定を行い、分解能 2.6 Åの回折データを用いて構造を決定した。得られた構造を Dali server に供したところ、既知のタンパク質立体構造の中で ATP-PEPCK と GTP-PEPCK のみが有意な値(Z score >10)でヒットし、PPi-PEPCK は ATP-, GTP-PEPCK と構造的類似性を有することが明らかとなった。約 1100 アミノ残残基からなる PPi-PEPCK は、約 600 アミノ酸残基からなる ATP-, GTP-PEPCK の構造と一致する core domain に加えて複数の付加構造を有していた。また立体構造を基にしたアミノ酸配列のアライメントを作成したところ、3 種類の PEPCK で重なり合う 2 次構造の順番は 1 次構造上で完全に保存されていること、PPi-PEPCK の付加構造は挿入配列として 1 次構造の複数の部分に分散して存在することが明らかとなった。ATP, GTP-PEPCK において ATP, GTP 以外の基質認識および活性に重要な残基は PPi-PEPCK において保存されていた。ATP-, GTP-PEPCK のプリン結合部位に相当する PPi-PEPCK 構造を確認したところヒスチジンの側鎖が存在し、これが ATP,GTP の結合を妨げていると推察された。さらに PPi 結合部位は上述の付加構造により裏打ちされており、これもプリンのような大きな分子が PPi-PEPCK 結合部位へアクセスすることを阻む要因となることが示唆された。すなわち、PPi-PEPCK 特異的な bulky なアミノ酸残基と活性部位を裏打ちする付加領域の存在が PPi 特異性を示す要因と考えられる。

crystal structure, central metabolism, enzyme

講演番号：3E5p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ 1 号館 E5 会場

多糖モノオキシゲナーゼ，CBP21 の構造安定性 ―金属イオンの効果―

Structural stability of a lytic polysaccharide monooxygenase, CBP21

○杉本 華幸[1,2]、中島 優一[1]、中村 禄朗[2]、渡邉 剛志[1,2]、鈴木 一史[1,2]([1]新潟大・農・応生化、[2]新潟大院・自然科学)

○Hayuki SUGIMOTO[1,2], Yuichi NAKAJIMA[1], Rokuro NAKAMURA[2], Takeshi WATANABE[1,2], Kazushi SUZUKI[1,2] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Facul. Agri., Niigata Univ., [2]Graduate School of Sci. and Tech., Niigata Univ.)

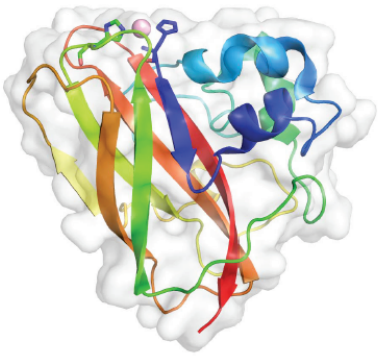


Fig. 1 Structure of CBP21
The metal ion is shown as a pink sphere. (PDB entry: 2bem)

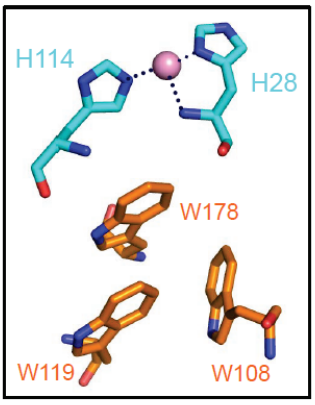


Fig. 2 Copper binding site (His brace) in CBP21 and three Trp residues in the vicinity of the binding site

Serratia marcescens 由来の多糖モノオキシゲナーゼ（CBP21）は，結晶性キチンのグリコシド結合を酸化分解する酵素で，CAZy データベースによる分類では Auxiliary Activities family 10 [AA10 (formerly CBM33)] に属する。本酵素の作用により，新たにキチン分子鎖末端が結晶性基質表面に生じるため，加水分解酵素であるキチナーゼが効率的に基質を分解することが可能となる。CBP21 はキチンバイオマス分解のブースター酵素として注目されている。

CBP21 は 170 アミノ酸残基からなる小型球状タンパク質で，触媒部位に銅イオンが配位している (Figs. 1, 2)。これまでに，断熱型示差走査熱量測定により，ホロ型 CBP21 ではアポ型に比べて熱安定性が 9℃増大し（pH 5.0），銅イオン（Cu^{2+}）が CBP21 の構造安定化において重要な因子であることがわかった。本研究では，Cu^{2+}が CBP21 の構造安定性におよぼす影響の詳細を，トリプトファン蛍光および円二色性（CD）を指標に変性剤変性反応を調べることで明らかにすることを試みた。また，亜鉛イオン（Zn^{2+}）の効果についても調べた。

233 nm における CD シグナルを指標として尿素による変性反応を調べたところ，変性の中点濃度はアポ型で 4.3 M であったのに対し，ホロ型では 6.8 M であった (pH 5.0, 25℃)。Cu^{2+}の結合による安定化は，変性剤変性の場合も観測された。また，Zn^{2+}とアポ型 CBP21 の結合（解離定数が 70 μM）は，Cu^{2+}の場合よりも弱かった（pH 5.0, 25℃)。Zn^{2+}結合型 CBP21 ではアポ型に比べて熱安定性がおよそ 2.5℃増大した。Zn^{2+}結合による CBP21 の構造安定化効果は，Cu^{2+}の場合よりも小さく，これは CBP21 と金属イオンの結合の強さに起因すると考えられた。

lytic polysaccharide monooxygenase, structural stability, metal ion

発表責任者：杉本華幸（hayuki@agr.niigata-u.ac.jp）

講演番号：3E5p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ 1 号館 E5 会場

Aspartate:Alanine 交換輸送体 AspT の構造解析に向けたモノクローナル抗体樹立と AspT-抗体複合体形成の評価
Establishment of Anti-AspT Monoclonal Antibodies and Evaluation of Antibody-AspT Complex-formation for Structural Analysis of Aspartate：Alanine Antiporter AspT
○國井 宏太[1]、小笠原 諭[2]、村田 武士[2]、七谷 圭[1]、阿部 敬悦[1] ([1]東北大院農、[2]千葉大院理)
○Kota KUNII[1], Satoshi OGASAWARA[2], Takeshi MURATA[2], Kei NANATANI[1], Keietsu ABE[1] ([1]Grad. Sch. Agri. Tohoku. Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Chiba. Univ.)

【研究背景・目的】 本研究では、乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* において同定された Aspartate：Alanine 交換輸送体 AspT に着目した。AspT は産業上有用な輸送体の多くが属するファミリーに属しており、物質生産効率化のモデルとして期待され、将来的に同じファミリーに属する輸送体への応用が可能になれば、食料品だけではなく医薬品や化成品の生産性向上にも幅広く貢献できることが期待される。我々は AspT の基質輸送機能の強化に向けた更なる研究のため、これまでの酵素学的知見と合わせ[1), 2)]、構造生物学的解析に着手し、原子レベルでの基質輸送メカニズムの解明を目指している。しかし、AspT のような膜タンパク質の構造解析が難しい理由の 1 つとして、結晶化が難しいことが挙げられる。その解決策として、抗体を利用した膜タンパク質-抗体複合体の共結晶化がある。抗体の結合により、『AspT が特定の立体構造に安定化される』、『AspT-抗体複合体として親水性表面が拡大し、結晶性が向上する』といったことが期待される[3)]。そこで本研究では、結晶化スクリーニングや電子顕微鏡観察による構造解析に向け、AspT と複合体を形成する機能性抗体の探索を試みた。
【方法・結果】 *Escherichia coli* C43 (DE3) 株を発現宿主とし、IPTG 添加による AspT 発現誘導と His-tag 精製により、1 L 培養液あたり約 5 mg の精製 AspT を取得した。次に、精製 AspT をリン脂質二重膜へ再構成して得られたプロテオリポソーム (PL) を、立体構造を保った状態でマウスに免疫し、ハイブリドーマ法により抗 AspT モノクローナル抗体の樹立を試みた。ハイブリドーマ培養上清は、PL を固相化させたリポソーム ELISA 法、変性 AspT を固相化させた変性 ELISA 法により評価し、同時にゲル濾過クロマトグラフィーを用いて精製 AspT との反応による複合体形成のスクリーニングを行った。その結果、精製 AspT と複合体形成可能な抗体を産生するハイブリドーマをクローニングし、12 種類の抗 AspT モノクローナル抗体の樹立に成功した。さらに、樹立した抗体と精製 AspT の反応液を Fluorescence-detection size-exclusion chromatography (FSEC) に供した結果、12 種類中 5 つの抗体で精製 AspT と複合体を形成していることが示唆された。現在、結晶化スクリーニングや電子顕微鏡観察での単粒子解析に向け、複合体形成能を確認した抗体にパパイン処理を施し、精製した Fab フラグメントと AspT との反応性を評価している。今回はその進捗について報告する。
1) Nanatani K., Abe K. *et al.*, *J. Bacteriol.* 2007; **189**: 7089-7097.
2) Nanatani K., Abe K. *et al.*, *J. Bacteriol.* 2009; **191**: 2122-2132.
3) Hino T., Iwata S. *et al., Curr Opin Struct Biol*. 2013; **136**(2): 179-84

membrane protein, amino acid antiporter, monoclonal antibody

発表責任者：國井 宏太（k.kota.0422@gmail.com）

講演番号：3E5p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ 1 号館 E5 会場

マガキにおけるカドミウム結合タンパク質の探索
Search for cadmium binding proteins from *Crassostrea gigas*.
○川上 和宏[1]、陳 嘉上[1]、根岸 瑠美[2]、永田 宏次[1]、吉村 悦郎[1,3]、鈴木 道生[1] ([1]東大院農、[2]東大定量研、[3]放送大教養)
○ Kazuhiro KAWAKAMI[1], Chia Shang CHIN[1], Rumi NEGISHI[2], Koji NAGATA[1], Etsuro YOSHIMURA[1,3], Michio SUZUKI[1] ([1]UTokyo, [2]UTokyo IQB, [3]The Open Univ.)

１．背景・目的
カキは「海のミルク」と言われているように、様々な栄養素を多く含んでいるため食用として重要な位置を占めている一方で、カドミウムなどの重金属を蓄積しやすいことが知られている。カドミウムはイタイイタイ病の原因となった強い毒性を有する代表的な重金属であり、ヒトにおいてはカドミウムに対する応答はよく研究されている。一般的な動物においてカドミウムの解毒に重要な役割を果たしている物質としては、メタロチオネインのような金属結合タンパク質が知られている。しかし、無脊椎動物であるカキがメタロチオネインを介し重金属を蓄積しているかどうかは未だに明らかになっていない。カキにおいてカドミウムが結合する物質を探索することで、食品としてのカキにおける重金属の化学形態を明らかにし、正確な安全性の評価を行うことを目的とした。本研究は、無脊椎動物中でのカドミウムへの防御機構の新たな知見につながる可能性も考えられる。
２．方法・結果
カキの個体を内臓、外套膜、エラ、貝柱の 4 つの組織に分離し、各組織について誘導結合プラズマ発光分光法（ICP-OES）を用いてカドミウム濃度を測定した。その結果、内臓に多くのカドミウムを蓄積していることが判明した。次に、カキの内臓を凍結粉砕して抽出バッファーを加えて超遠心を行ったところ、油層、上清、沈殿の 3 層に分かれた。この 3 層についてそれぞれ ICP-OES を用いてカドミウム濃度を測定した結果、上清に多くのカドミウムが存在していることが判明した。このため、内臓抽出液の上清を用いてカドミウム結合物質の探索を行うことにした。
得られた上清について TPPS（5,10,15,20-Tetraphenyl-21H,23H-porphinetetra sulfonicacid）とカドミウムの錯体を用いたポストカラムキレーター法でのカドミウム結合物質の探索を行った。TPPS はカドミウムを配位することで吸収波長が 414 nm から 432 nm に変化することが知られており、カドミウム結合分子が存在すると TPPS の波長変化で検出することができる。この結果、カドミウムと結合すると思われる高分子画分を得た。さらに、カドミウムをキレートしたアフィニティークロマトグラフィを行い、カドミウムと結合するタンパク質を抽出し、LC/MS/MS でタンパク質を同定した。大腸菌を用いてこの組換え体タンパク質を作製し、このタンパク質がカキの体内において、どの程度カドミウムを吸着し、保持する役割に貢献しているのか明らかにする実験を進めている。

Crassostrea gigas, cadmium, metal binding protein

発表責任者：鈴木　道生（amichiwo@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3E5p05
講演日時：3 月 26 日 14:34～ 1 号館 E5 会場

アコヤガイ真珠層における有機ナノファイバー形成に関与する基質タンパク質の解析

Mechanism of the formation of fine organic nanofiber in the shell of Pinctada fucata

○西村 亮[1]、窪田 一輝[1]、根岸 瑠美[2]、鈴木 道生[1] ([1]東大農、[2]東大定量研)
○Ryo NISHIMURA[1], Kazuki KUBOTA[1], Lumi NEGISHI[2], Michio SUZUKI[1] ([1]UTokyo, [2]IQB)

【目的】

アコヤガイ貝殻は、炭酸カルシウムを主成分とするバイオミネラルであり、内側の真珠層と外側の稜柱層、蝶番部の靭帯など様々な微細構造を一つの貝殻内に持つのが特徴である。この緻密な微細構造は単なる無機化学反応では形成されず、そこに少量含まれる有機基質が重要な役割を果たすことが示唆されてきた。これまでに炭酸カルシウム結晶の形成を制御する有機基質は多く同定されてきている一方で、有機基質が自己組織化し、ファイバー状の構造を貝殻の微細構造の中で形成する機構についてはほとんど明らかになっていない。そこで本研究では貝殻微細構造内で有機物ナノファイバーを形成する機構を明らかにするため、有機物ナノファイバーの形成に重要な基質タンパク質を探索し、その構造と機能の解析を行うことを目的とした。

【方法】

アコヤガイ貝殻の真珠層を酢酸で脱灰し、SDS/DTT 抽出を行い、不溶性画分に対して更に trypsin 消化処理を行った。得た抽出画分に対して LC/MS/MS にて分析を行ったところ、Mehionine (Met) –rich 配列を有するタンパク質を同定した。このタンパク質の Recombinant を作製し、動的光散乱法、走査電子顕微鏡により凝集活性を測定した。またこのタンパク質の機能解析を行うため、RNA 干渉を用いたノックダウン実験を実施した。ノックダウン実験により、この Met–rich タンパク質が石灰化に関与することが示唆された。次に、石灰化に関与するドメインを検出する為に Ca 結合ドメイン検出系の開発を行い、有機物ナノファイバー成分から Ca に結合する成分の分析を行った。

【結果、考察】

動的光散乱法により Met–rich タンパク質の Recombinant は海水と同 pH である pH8.0 において、Ca 存在下でのみ凝集活性を示した。また、RNA 干渉を用いたノックダウン実験により真珠層のタブレット構造に孔が空いたような特徴的な構造が見られた。この結果から M–rich タンパク質が有機気質の凝集性だけでなく、炭酸カルシウムの結晶形成に関与することが示唆された。更に Ca 結合ドメイン検出系による有機物ナノファイバーの分析では、Ca と強く結合するピークが検出され、実際に Ca と結合するドメインがあることが示唆された。質量分析などにより、このドメインの同定を行っている。

biomineralization, Pinctada fucata, self-aggregation protein

講演番号：3E5p06
講演日時：3 月 26 日 14:55～ 1 号館 E5 会場

アコヤガイ貝殻内の ACC 結合タンパク質の構造・機能解析
Structural and functional analyses of ACC binding protein in the shell of *Pinctada fucata*
○岩橋 晴香[1]、荒城 綾香[1]、永田 宏次[1]、根岸 瑠美[2]、降旗 一夫[1]、鈴木 道生[1] ([1]東大院農、[2]東大定量研)
○Haruka IWAHASHI[1], Ayaka ARAKI[1], Kouji NAGATA[1], Rumi NEGISHI[2], Kazuo FURIHATA[1], Michio SUZUKI[1] ([1]UTokyo, [2]IQB)

炭酸カルシウムは貝類や甲殻類が身を守るための殻や外骨格として利用しており、無脊椎動物における代表的な生体鉱物（バイオミネラル）の主成分である。バイオミネラルは単なる無機的な石灰化と異なり、有機物と相互作用した炭酸カルシウムが沈着することで緻密な微細構造を形成する。この微細構造を形成するためには炭酸カルシウムの結晶形成の初期の段階で、不定形の炭酸カルシウム（ACC: Amorphous Calcium Carbonate）と何らかの有機基質が相互作用することが重要であると考えられている。そこで、本研究では、日本で真珠養殖に利用される貝類として知られており、その石灰化機構の研究が盛んに行われているアコヤガイ（*Pinctada fucata*）を用いて、ACC に特異的に相互作用する有機基質を探索し、その構造と機能を明らかにすることを目的とした。

アコヤガイの内側に存在する真珠層を酢酸で脱灰し酸可溶性成分を得た。一方で不溶性の成分は SDS/DTT で成分を抽出した後、変性剤可溶性画分として集めた。両者の成分を、調製した ACC ナノクラスター溶液もしくはアラゴナイト結晶と混合することで、ACC ナノクラスターに特異的に結合するタンパク質の探索を、LC-MS/MS を用いた定量解析により行った。

その結果、ACC に結合したタンパク質としてパラミオシンやトロポミオシンといった筋肉タンパク質が同定され、それらのタンパク質にはグルタミン酸が多く含まれていることが分かった。特に定量解析の結果では、配列に EEAE というモチーフの数が多いほど、ACC により強く結合することが示唆された。しかしながら、筋肉タンパク質は細胞内のタンパク質であることから細胞外成分である真珠層には含まれないのではないかと考えた。そこで貝柱と接触した部位に作られる柱状の炭酸カルシウムのアラゴナイト結晶で構成される光輝層という微細構造に筋肉タンパク質が含まれるのではないかと考えた。光輝層を削り出し、酢酸による脱灰、SDS/DTT による不溶性成分の可溶化を行ったところ、光輝層には分解した筋肉タンパク質が多数含まれる可能性が示唆された。そのため EEAE という配列を有する筋肉タンパク質が光輝層の炭酸カルシウム結晶の形成に関与する可能性が考えられた。

そこで、EEAE のモチーフ配列についてペプチド合成を行い、炭酸カルシウムの結晶形成阻害実験、および NMR による炭酸カルシウムと相互作用した状態のペプチド構造決定によって、ACC への特異的結合と柱状のアラゴナイト結晶形成の機構を明らかにする研究を進めている。

biomineralization, ACC, peptide

講演番号：3E5p07
講演日時：3 月 26 日 15:06～ 1 号館 E5 会場

マガキチョーク層における扁平状カルサイト結晶の形成に関与する因子の探索

Search for organic matrices related to the formation of calcite crystal in chalky layer of Crassostrea gigas

○岩本 しほり[1]、近都 浩之[1]、根岸 瑠美[2]、鈴木 道生[1] ([1]東大院農、[2]東大定量研)
○Shihori IWAMOTO[1], Hiroyuki KINTSU[1], Rumi NEGISHI[2], Michio SUZUKI[1] ([1]Univ. Tokyo, [2]Univ. Tokyo of IQB)

【背景・目的】マガキ（*Crassostrea gigas*）は太平洋アジア沿岸に生息する二枚貝である。食用として用いられ、殻は肥料や漢方に利用されている。マガキの殻は約 99%が炭酸カルシウム、約 0.5%が有機物という組成になっている。貝殻中に存在する有機物は局所的に特定の方向へ結晶を成長させ、また必要に応じて成長を止めることができ、これによって三次元の結晶構造を作り出していると考えられている。マガキの殻は、外側には稜柱層、内側には葉状層、チョーク層といった炭酸カルシウムのカルサイト結晶から成るいくつかの層がみられる。特にチョーク層は厚さが数十 nm 程度の非常に薄い板状のカルサイトが互いにかみ合い、空洞を作っている。このような薄い扁平状のカルサイト結晶は、大きい表面積を持つことから高い物質への吸着性能や複合材料における混合効率の上昇などが期待される。しかし、チョーク層の形成メカニズムは不明であり、人工的に扁平状のカルサイト結晶を作ることは困難である。そこで、マガキのチョーク層から扁平状カルサイト結晶を形成する基質タンパク質を明らかにし、扁平状の炭酸カルシウムを効率的に合成する手法を開発することを目的とした。
【方法】電子顕微鏡でチョーク層を観察し、有機物と炭酸カルシウムの局在を解析した。貝殻の層ごとの元素組成を調べるため、それぞれの層ごとに削り出し、硝酸分解を行い、ICP で分析した。マガキの貝殻をそれぞれの層ごとに削り出し、酢酸で脱灰した。酢酸可溶画分に対して限外ろ過と脱塩を行った後、SDS-PAGE に供し、チョーク層にのみ局在する物質を探索した。組換え体の作製は pET-28a(+)に目的タンパク質の遺伝子配列を組み込み、大腸菌 BL21 株にヒートショックで導入して培養、IPTG による発現誘導を行い、菌体破砕を行い 8 M 尿素水溶液に溶解して得た。精製は、Ni カラムを用いて His タグ精製し、トロンビン処理にて His タグを切断、ゲル濾過を行い組換え体を得た。
【結果】電子顕微鏡による解析の結果、チョーク層は数十 nm の扁平状カルサイト結晶が互いに噛みあって空洞を作り、葉状層に割り込んで存在することを確認した元素分析では、チョーク層にのみ多く含まれる元素は発見されなかった。貝殻の内側を構成するチョーク層と葉状層の酢酸可溶画分を SDS-PAGE で比較した結果、25 kDa 付近においてチョーク層のみに出現するバンドを確認した。このバンドを、トリプシンを用いてゲル内消化し、LC-MS/MS 分析を行い、チョーク層に特異的に含まれるタンパク質を同定した。現在、組換えタンパク質を用いたタンパク質の機能解析を行っている。

biomineralization, calcite, extracellular matrix

講演番号：3E5p08
講演日時：3 月 26 日 15:17～ 1 号館 E5 会場

細菌の金属輸送に関わる EfeUOB 系構成アルギン酸結合タンパク質のレアメタル結合性
Rare metal binding by alginate-binding protein, a component of bacterial EfeUOB metal importer system

○奥村 憲史[1]、三上 文三[1]、村田 幸作[2]、橋本 渉[1] ([1]京大院農、[2]摂南大理工)
○Kenji OKUMURA[1], Bunzo MIKAMI[1], Kousaku MURATA[2], Wataru HASHIMOTO[1] ([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Fac. Sci. Eng., Setsunan Univ.)

【目的】グラム陰性 *Sphingomonas* 属細菌 A1 株は細胞表層に形成した体腔を介して、酸性多糖アルギン酸を取り込み、資化する。体腔におけるアルギン酸の結合（解離定数 K_d=0.036 μM）に関わるタンパク質 Algp7 は、鉄輸送 EfeUOB 系を構成する金属結合タンパク質である EfeO と相同性を示し、Fe^{3+} や Cu^{2+}など多様な金属と結合する。EfeUOB 系は大腸菌 O157 株と枯草菌で研究が進められており、遊離の Fe^{2+}を Fe^{3+}へと酸化させて鉄を細胞内に輸送するという機構が提案されている。アルギン酸は様々な金属に対して強いキレート能を示し、アルギン酸を主要構成糖とする褐藻類にはレアメタルを含む様々な金属が濃縮されていることが知られている。A1 株では、Algp7 を含む EfeUOB 系をコードする遺伝子クラスターはアルギン酸存在下で誘導発現することから、EfeUOB 系がアルギン酸にキレートされた金属の取り込みに機能することが示唆される。そこで、A1 株のアルギン酸を介した EfeUOB 系による金属取り込み機構を明らかにするため、EfeUOB 系構成タンパク質の一つである EfeB の構造と機能を解析した。また、Algp7 のレアメタルに対する結合能を評価した。
【方法・結果】組換え大腸菌で発現させ、精製した EfeB を 15% ポリエチレングリコール 400、100 mM 酢酸ナトリウム（pH 4.6）及び 100 mM $CaCl_2$ の条件下で結晶化し、X 線結晶構造解析を行った。分解能 2.06 Å まで得られた回折点から、大腸菌 O157 株の EfeB をサーチモデルとした分子置換法により、A1 株の EfeB の立体構造を決定した。ヘム分子が C 末端の DyP ペルオキシダーゼドメインの疎水性ポケットに結合していた。嫌気条件下で EfeB の鉄に対するペルオキシターゼ活性を測定したところ、A1 株の EfeB は Fe^{2+}を Fe^{3+}へと酸化させるペルオキシダーゼ活性を示すことがわかった。金属との結合による Algp7 の構造安定化を示差走査型蛍光定量法によって評価したところ、レアメタルである Sm^{3+}と Pr^{3+}存在下で Algp7 の構造が安定化し、変性温度が上昇した。レアメタルとの結合に伴うトリプトファンとチロシン残基に由来する蛍光の変化を分光蛍光光度計で測定することにより、Algp7 のレアメタル結合能を評価した。その結果、K_d 値が Sm^{3+}で 2.30 μM、Pr^{3+}で 5.46 μM と決定された。Algp7 が Fe^{3+}や Cu^{2+}のみならず、レアメタルを含む様々な金属に対して結合能を示すことが明らかになった。現在、12.5% ポリエチレングリコール 8000、100 mM クエン酸ナトリウム（pH 4.1）及び 200 mM NaCl の溶液で得た Algp7 結晶を、$Sm_2(SO_4)_3$ を含む同溶液にソーキングし、X 線結晶構造解析を進めている。本研究により、Algp7 をレアメタルの回収に応用できる可能性が示された。

本研究の一部はヤンマー資源循環支援機構の支援を受けて行われた。

Alginate, EfeUOB, Rare metals

発表責任者：橋本　渉（whasimot@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3E5p09
講演日時：3 月 26 日 15:28～ 1 号館 E5 会場

Bacillus cereus 由来銅含有酸化酵素の異種発現系構築と特性評価
Heterologous expression and characterization of copper containing oxidases from Bacillus cereus
○越智 祐太、藤枝 伸宇（阪府大院生還）
○YUTA OCHI, NOBUTAKA FUJIEDA (Osaka Prefecture Univ. of life and environ.)

銅酸化酵素は活性中心に一つから三つの銅イオンを持つことが知られており、その機能は有機物の酸化から、無機イオンのホメオスタシスまで様々である。複核銅中心をもつチロシナーゼやラッカーゼは多くの生物が持つ酵素であり、フェノール類の水酸化およびカテコール類の酸化を触媒する酵素である。活性中心の銅イオンは複数のヒスチジンによって保持されている。特にチロシナーゼは生体内で、メラニン合成の初発酵素としての働きを持ち、紫外線などの外部刺激から、細胞を守っていると言われている。また、ラッカーゼも植物や甲殻類の角皮硬化に関与し、細胞防御機構に寄与している可能性も示唆されている。そのため、 これら銅酵素の反応性を巧みに制御することができれば、新たな動植物の治療法や抗生物質の開発が可能になる。

こういった背景のもと、放線菌のチロシナーゼ配列を用いて相同性検索を行ったところ、*Bacillus cereus*のプラスミド上に分子量の小さなチロシナーゼ(melC1)とラッカーゼ(melC2)のホモログをコードする遺伝子からなるオペロンを発見した。そこで、本研究では、新規のチロシナーゼ、ラッカーゼとして*Bacillus cereus*由来のmelC1とmelC2を使用し、その異種発現系の構築と生化学的特性評価、活性確認を行うことで、それら銅酸化酵素の触媒機構、および新規遺伝子の機能についてのより詳細な考察を目指した。

まず、*Bacillus cereus*由来のチロシナーゼホモログ遺伝子(melC1)とラッカーゼホモログ遺伝子(melC2)を合成した。合成に際して、大腸菌のコドン使用率を最適化した。これら合成したDNAをサブクローニングによってpETDuet-1ベクターのNdeI-KpnIサイト、およびNcoI-EcoRIサイトにそれぞれ導入した。このベクターを大腸菌BL21(DE3)株に導入し、37 ℃でIPTG誘導をかけた。その後、菌体の破砕液を遠心分離で上清と沈殿に分け、SDS-PAGEにて発現を確認した。しかしながら、可溶性画分での発現が見られなかったため、誘導温度などの最適化を行い、25 ℃でIPTG誘導を行うと可溶性画分での発現が見られた。その後、変異導入によりヒスチジンタグを付与したDNAを合成し、大腸菌にて発現させた。その後、超音波処理し、その破砕液を遠心したのち、Niアフィニティークロマトグラフィーをおこなった。得られたチロシナーゼは陰イオン交換クロマトグラフィーに供したところ、melC1、melC2について、SDS-PAGE上で単一の状態まで精製することに成功した。本発表ではこれらタンパク質の特性について詳細に報告する。

Tyrosinase, Laccase, copper proteins

講演番号：3E5p10
講演日時：3 月 26 日 15:39～ 1 号館 E5 会場

海洋生物に分布する水溶性カロテノイド結合タンパク質の探索と同定

Investigation of water-soluble carotenoproteins in marine organisms

○金子 隆之[1]、淺野 朋美[1]、中野 杏香[1]、三上 茜[1]、高市 真一[1,2]、川崎 信治[1,2] ([1]東農大バイオ、[2]東農大微生物)
○ Takayuki KANEKO[1], Tomomi ASANO[1], Kyoka NAKANO[1], Akane MIKAMI[1], Shinichi TAKAICHI[1,2], Shinji KAWASAKI[1,2] ([1]TUA bio., [2]TUA microbiol.)

【背景】

カロテノイドは様々な色彩を有し、動物の体色を彩っている。カロテノイドは脂溶性であるが、タンパク質と結合して水溶性を示すものが知られている。水溶性のカロテノイド結合タンパク質は原核生物のシアノバクテリア類やカイコ、人の網膜などに分布が確認されている。当研究グループでは真核藻類の Scenedesmus 科に属する緑藻（*Coelastrella* sp. Ki-4 株）から新規の水溶性アスタキサンチン結合タンパク質を同定し、AstaP と命名した[1)]。 本タンパク質に相同性を示すタンパク質は全て機能未知タンパク質であったが、データベース解析の結果、興味深いことに海洋生物の刺胞動物などにも分布が推定された。海洋生物におけるカロテノイド結合タンパク質は、カニやロブスターなど甲殻類に分布するクラスタシアニン、サケの筋肉に分布するα-アクチンなどが知られているが、いずれも組織に強固に結合しており遊離状態で存在するカロテノイド結合タンパク質は報告例に乏しい。そこで当研究グループでは、刺胞動物を中心として水溶性のカロテノイド結合タンパク質の探索を行い、一定の成果を得たことから本学会にて発表する。

【方法・結果】

刺胞動物を中心として水溶性のカロテノイド結合タンパク質の探索を行った結果、一部の供試生物に分布が示唆される結果を得た。分布が推定された海洋生物を選抜し、さらなる調査を行うため色素タンパク質の精製を行った。その結果、1 種類の供試生物からの完全精製に成功した。この精製タンパク質の一次構造の取得を行うために cDNA ライブラリーの作製を行い、精製タンパク質をコードする cDNA の取得に成功した。また精製タンパク質の結合色素の同定を目的として、HPLC と MS 解析による色素同定とアポタンパク質及び色素との再構成試験を行った。その結果、精製タンパク質は主にアスタキサンチンを結合することが判明した。精製タンパク質の色調はカロテノイドと結合することで、カロテノイド本来の色とは異なる青色を呈することが観察された。

1) Kawasaki et al. Plant Cell Physiology,54(7) 1027-1040(2013)

carotenoprotein, astaxanthin, marine organisms

講演番号：3E5p11
講演日時：3 月 26 日 16:00～ 1 号館 E5 会場

低級アルカンモノオキシゲナーゼの単離と特性評価

Isolation and molecular characterization of short-chain alkane monooxygenase

○安部 欣高、井上 千裕、山之内 渉、永山 友紀、藤枝 伸宇（阪府大院生命環境）
○ Yoshitaka ABE, Chihiro INOUE, Wataru YAMANOUCHI, Yuki NAGAYAMA, Nobutaka FUJIEDA (Osaka prefecture Univ. of Life and Environ.)

[背景]

天然ガスの主成分であるメタン、エタン、プロパン等の低級アルカンはガス状分子であり貯蔵、運搬に多大なコストがかかる。これらの低級アルカンは反応性に乏しいが、水酸化し、アルコールに変換することで液体となり体積が減少する。さらに、ハブ化合物としての汎用性が増し、有用な化合物合成に用いることが可能となる。低級アルカンを水酸化する有力な方法の一つとして可溶性メタンモノオキシゲナーゼ（sMMO）が知られている。しかしながら、それらを保有するメタン資化性菌は増殖が非常に悪いことから、これらの生物種をそのまま利用するのは効率が悪い。そこで本研究では、sMMO ホモログタンパク質群を大腸菌内で共発現させ、活性のある異種発現系を獲得するとともに、水酸化酵素本体を精製・特性評価を行った。

[方法]

sMMO のαサブユニットのアミノ酸配列を用いて相同性検索を行った結果、好熱菌を含んだ幾つかの微生物に類似タンパク質をコードする遺伝子が見つかった。これらの sMMO ホモログタンパク質を含むオペロンには 8 種の一群タンパク質をコードする遺伝子が存在した。これらの遺伝子をプラスミドに導入後、大腸菌に形質転換し、発現させたタンパク質を SDS-PAGE で分析した。また、sMMO ホモログタンパク質群を共発現させた大腸菌を菌体のまま基質と反応させ、水酸化活性を確認した。さらに、水酸化酵素に His タグを付与し、水酸化酵素の単離、精製、特性評価を行なった。

[結果]

SDS-PAGE の結果から、大腸菌内で水酸化酵素と GroEL 様タンパク質を共発現させることで、水酸化酵素の可溶化が確認できた。このことから GroEL 様タンパク質は大腸菌内でシャペロンとして働き、sMMO ホモログタンパク質の折り畳みを補助することが示唆された。また基質と反応させたところ、大腸菌内で GroEL 様タンパク質を共発現させた菌体では水酸化活性があることが確認できた。またアフィニティークロマトグラフィーにより水酸化酵素本体の単離に成功した。この酵素を ICP 発光分析法により分析したところ、活性中心には鉄が配位していることが示唆された。

alkane monooxygenase, diiron monooxygenase, alkane hydroxylation

講演番号：3E5p12
講演日時：3 月 26 日 16:11～ 1 号館 E5 会場

低級アルカンモノオキシゲナーゼに関わる補助タンパク質の単離と特性評価

Isolation and molecular characterization of auxiliary proteins involved in the short-chain alkane monooxygenases

○山之内 渉、永山 友紀、安部 欣高、井上 千裕、藤枝 伸宇（阪府大院生命環境）
○ Wataru YAMANOUCHI, Yuki NAGAYAMA, Yoshitaka ABE, Chihiro INOUE, Nobutaka FUJIEDA (Osaka prefecture Univ. of Life and environ.)

[背景・目的]
メタンやエタン、プロパンなどの低級アルカンを含む天然ガスは重要な資源である。しかし、低級アルカンは常温で気体として存在しているため、保存や運搬の際に高圧下で反応させて液化させる必要があるなど、多大なエネルギーを要し、無駄が多い。そこで、温和な条件下でそれらを水酸化することができれば、液体燃料として保存することが可能になり、化学原料としての価値も高まると期待される。可溶性メタンモノオキシゲナーゼは、触媒活性点である二核鉄中心を含有するハイドロキシラーゼ、基質の取り込みを制御すると考えられている調節タンパク質、電子の運搬を担う NADH レダクターゼの少なくとも 3 つのタンパク質から構成され､活性を発揮すると考えられている｡しかし、グラム陽性細菌が持つ類似酵素のオペロン上には低級アルカンモノオキシゲナーゼを初めとし、8 種のタンパク質がコードされた一群の遺伝子が存在する。このオペロン上には前述の 3 つのタンパク質以外にもタンパク質が存在し、様々な補助機能が示唆されている。本研究では、他の auxiliary タンパク質の特性評価を行うことで、より活性が高い状態での低級アルカンモノオキシゲナーゼの異種発現系確立を目指した。
[結果・考察]
まず、調節タンパク質、NADH レダクターゼ、SufT ホモログ、金属加水分解酵素ホモログの計 4 種のタンパク質をコードする遺伝子をそれぞれプラスミドに導入後、大腸菌に形質転換し、発現させた。さらに、タンパク質を単離し、特性評価を行った。これらの遺伝子について、コドン使用率最適化を行い、ヒスチジンタグを付加した遺伝子を合成した。それぞれプラスミドの T7 プロモーター下流域に導入後、大腸菌 BL21(DE3)に形質転換し、発現させた。発現を IPTG 誘導後、25 °C で行ったところ、SDS-PAGE で確認すると、それぞれのタンパク質は可溶性画分に認められた。アフィニティークロマトグラフィーに引き続き、陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて単離・精製を行ったところ、それぞれ SDS−PAGE 上で単一の状態まで精製されていることを確認した。NADH レダクターゼにおいて、そのタンパク質が鉄・硫黄クラスター、フラビンを有していることが確認された。また、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いることにより、それぞれのタンパク質についてのサブユニット構造を得た。本発表ではこれらタンパク質の生化学的特性評価について詳細に報告する。

alkane monooxygenase, auxiliary protein, NADH reductase

講演番号：3E5p13
講演日時：3 月 26 日 16:22～ 1 号館 E5 会場

ポリヒスチジン（His16）修飾リソソームを利用したリソソーム病に対する新規治療法の開発

Development of new treatment for lysosomal storage disease using the His16 peptide-modified lysosome

○林 大輝[1]、岡本 陸[2]、河野 強[1,2]、岩﨑 崇[1,2]（[1]鳥取大院・持続、[2]鳥取大・農）
○Taiki HAYASHI[1], Riku OKAMOTO[2], Tsuyoshi KAWANO[1,2], Takashi IWASAKI[1,2] ([1]Grad. Shc. Tottori Univ., [2]Tottori Univ.)

【背景・目的】 これまでに我々は、ヒスチジンのみが 16 残基連続した細胞膜透過ペプチド：ポリヒスチジン（His16: HHHHHHHHHHHHHHHH-NH_2）を開発した。His16 は、高い細胞膜透過能を有し、ペプチド・タンパク質・リポソームといった様々な大きさの分子を細胞内のリソソームに輸送できる[1,2)]。すなわち、His16 はリソソーム標的型薬物輸送キャリアーとして優れたペプチドである。

そこで本研究では、His16 を用いてリソソーム病（LSD）の新規治療法の開発を目指した。LSD は、細胞内のリソソーム酵素が欠失することに起因する代謝異常である。現在、LSD に対する治療法として、欠失したリソソーム酵素を細胞内リソソームへ補充する酵素補充療法（ERT）が主流である。しかし、LSD に関連するリソソーム酵素は約 40 種類あるのに対して、ERT に利用できるリソソーム酵素はわずか 7 種類のみである。そこで我々は、正常リソソームに His16 を修飾することで、正常リソソームを丸ごと LSD 細胞内のリソソームに輸送する方法を考案した。この方法では正常細胞から単離した正常リソソームを用いるため、全てのリソソーム酵素を LSD 細胞内に輸送できると期待される。

【方法・結果】 リソソーム膜タンパク質（LAMP-1）と赤色蛍光タンパク質（RFP）を融合した LAMP-1-RFP を発現する細胞を構築し、RFP 発現リソソームを単離・調製した。この RFP 発現リソソームに対して、ステアリル基修飾したポリヒスチジン（STR-His16）を修飾することで、His16 修飾リソソーム（His16-Lyso）を調製した。まず、His16-Lyso をモデル細胞株（ヒト線維肉腫細胞 HT1080 細胞株）に添加し、細胞内取り込みおよび細胞内局在を解析した。その結果、His16-Lyso は HT1080 細胞内に取り込まれ、細胞内の内因性リソソームに局在することが確認された。次いで、His16-Lyso を LSD 患者由来線維芽細胞（LSD 細胞株）に添加し、同様に細胞内取り込みと細胞内局在を解析した。その結果、His16-Lyso は LSD 細胞株においても細胞内に取り込まれ、内因性リソソームに局在することが確認された。さらに His16-Lyso によるリソソーム酵素補充効果を検証するために、LSD 細胞株の細胞増殖率を定量した。LSD 細胞株は代謝異常を引き起こしているため、正常細胞株に比べて低い細胞増殖率を示す。しかし、His16-Lyso を添加した LSD 細胞株では、細胞増殖率が有意に上昇（回復）することが確認された。この結果は、His16-Lyso によって LSD 細胞株の内因性リソソームに欠失したリソソーム酵素が補充されたことを示唆すると同時に、本研究戦略の有用性を実証するものである。

1) Iwasaki T, et al. *J. Control. Release*, **210**, 115-124. (2015)
2) Hayashi T, et al. *Biochem. Biophys. Res. Comun.*, **501**(3), 648-653. (2018)

Cell-penetrating peptide, Lysosomal storage disease (LSD), Enzyme replacement therapy (ERT)

発表責任者：岩崎 崇（itaka@muses.tottori-u.ac.jp）

講演番号：3E5p14
講演日時：3 月 26 日 16:33～ 1 号館 E5 会場

ポリオキソメタレートによるシステイン検出とそのメカニズム
Detection of cysteine by polyoxometalate and investigation of its mechanism

○今野 博行、休石 悠人、矢野 成和（山形大院理工）
○Hiroyuki KONNO, Haruto YASUMIISHI, Shigekazu YANO (Yamagata Univ.)

[目的] ポリオキソメタレート (POM) は MO_6 を基本骨格とする酸化物クラスターアニオンでありこれまでに様々な構造体が報告されている．これらは構成元素や対カチオンを変化させることで酸化力や酸性能を精密に制御できることが特徴であり，それによって得られる誘導体には様々な機能性を付与できる可能性がある．我々のグループはこれらポリオキソメタレート誘導体の酸化反応に着目している．その結果，システイン水溶液に POM を添加すると水溶液が青色に変化することを見出した．現在まで POM はリンやケイ素の比色分析に用いられてきたが，タンパク質やペプチドの検出に用いた例は無かった．そこで POM を用いたシステイン含有ペプチドの検出とそのメカニズムならびにその応用について調査した．

[方法] 用いる POM は Keggin ならびに Dawson type とし，リンタングステン酸 $(P_xW_xO_z)^{n-}$ ならびにリンモリブデン酸 $(P_xMo_yO_z)^{m-}$ とした．またアミノ酸，様々な配列を有するジペプチド，トリペプチド，ペンタペプチドを用意した．さらに，グルタチオンや分子内にシステイン残基を複数持つ天然ペプチドを実験に用いた．実際の実験ではアミノ酸あるいはペプチドが溶解している溶液に POM を添加し，反応液の色調観察と吸光度測定を実施した．さらに HPLC や NMR でペプチドの構造変化について追跡した．

[結果] POM は Keggin ならびに Dawson type とし 8 種類用いたが、リンモリブデン酸 ($H_3[PMo_{12}O_{40}]nH_2O$)が最も反応性、発色性に優れていた。リンモリブデン酸は 20 種類のアミノ酸のうちシステインのみに選択的な発色を示した．また，システイン含有ペプチドに対しては配列によって大きな差異が生じることがわかった．すなわちシステイン両隣のアミノ酸残基が発色に大きな影響を与えていることが示唆された．この結果は立体障害によるものと考えている．この原理を利用してグルタチオンにおいて酸化型/還元型の定量化を行うことに成功し，効率的な分子内架橋反応にも応用可能であることを見出した．

polyoxometalate, cysteine detection, glutathione

発表責任者：今野博行（konno@yz.yamagata-u.ac.jp）

講演番号：3E5p15
講演日時：3 月 26 日 16:44～ 1 号館 E5 会場

ファージディスプレイ法を用いた新規プロスタグランジン代謝産物測定系の確立
Establishment of a measurement system for Prostaglandin metabolites based on a phage display technique

板倉 正典[1]、○川口 寧々[1]、佐々木 栄太[1]、柴田 貴広[2]、上田 宏[3]、内田 浩二[1]([1]東大院・農生科、[2]名大院・生命農、[3]東工大院・化生研)
Masanori ITAKURA[1], ○Nene KAWAGUCHI[1], Eita SASAKI[1], Takahiro SHIBATA[2], Hiroshi UEDA[3], Koji UCHIDA[1] ([1]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., The Univ. of Tokyo, [2]Grad. Sch. of Bioagric. Sci. Nagoya Univ., [3]Lab. for Chem. and Life Sci., Tokyo Tech.)

【背景】プロスタグランジン (PD) は、アラキドン酸から生成される脂質メディエーターであり、生理的もしくは病態生理的に重要な様々な生理活性をもつ。主要な PG のひとつであるプロスタグランジン D_2 (PGD_2) は、血小板凝集作用やガン増殖抑制作用、アレルギー性炎症に関与することが知られている。我々はこれまでに血清アルブミン存在下で PGD_2 から Δ12-PGD_2 が生成されること、またアレルギー疾患モデルにおいて肥満細胞から Δ12-PGD_2 が産生され、かつ長時間安定的に存在することを明らかにしている。以上の知見から、Δ12-PGD_2 をバイオマーカーとして高感度かつ特異的に検出できれば、アレルギー疾患の診断、治療に繋がると考え、ファージディスプレイ法に基づく新規 Δ12-PGD_2 測定系の確立を試みた。
【方法、結果および考察】抗 Δ12-PGD_2 抗体を産生するハイブリドーマから cDNA を調製し、抗体重鎖領域および軽鎖領域をクローニングし、Fab 提示システム (pDong vector)に導入した。ELISA 法により Fab 提示ファージの Δ12-PGD_2 付加 BSA への結合能を評価した結果、Fab 提示ファージが Δ12-PGD_2 を認識することが明らかとなった。さらに Δ12-PGD_2 付加 BSA を用いて Fab 提示ファージの選択・濃縮（パニング）を行った結果、より Δ12-PGD_2 への結合能が高い Fab 提示ファージの精製に成功した。また各種 PG を用いた競争的 ELISA により Fab 提示ファージの特異性を検討したところ、Fab 提示ファージは Δ12-PGD_2 に対し高い特異性を示すが、Δ12-PGJ_2 に対しても交差性を持つことが示された。今後は、Fab 提示ファージへの人為的遺伝子変異導入による結合能および特異性の変化を検討するとともに、オープンサンドイッチ法を用いた簡便な Δ12-PGD_2 測定法の確立を試みる。

Prostaglandin, Phage display

講演番号：3E6a01
講演日時：3 月 26 日 09:00～ 1 号館 E6 会場

アグロインフィルトレーションによる植物の乳液タンパク質の生産と抗昆虫活性の検討

Agroinfiltration-mediated production of plant latex proteins and analysis of their anti-pest activities.

○塩見 祐生[1]、秋野 順治[1]、三浦 謙治[2]、Savadogo Eric[1]、北島 佐紀人[1]([1]京工繊大・応用生物、[2]筑波大学生命環境)
○Yui SHIOMI[1], Toshiharu AKINO[1], Kenji MIURA[2], Eric Savadogo[1], Sakihito KITAJIMA[1] ([1]Kyoto Inst. Technol, [2]University of Tsukuba)

【背景と目的】

植物の乳管細胞は防御に特化した細胞であり、その細胞質成分である乳液は、キチナーゼ、プロテアーゼ、レクチンなどの抗昆虫・抗微生物タンパク質あるいはモルフィネのような毒性化合物を大量に含む。乳液のプロテオーム・トランスクリプトーム解析により、これらに加え機能未知のタンパク質遺伝子が高発現していることも明らかになった。本研究では、イチジク(*Ficus carica*)あるいはミドリサンゴ(*Euphorbia tirucalli*)の乳液より見出した機能未知タンパク質が抗昆虫活性を有するかを検証しようとする。そのために、三浦らが報告した植物における新しい一過的タンパク質発現系「つくばシステム」を用いてベンサミアナタバコ(*Nicotiana benthamiana*)を宿主とする乳液タンパク質生産を試みた。

【方法】

イチジクあるいはミドリサンゴの乳液中にタンパク質レベルあるいはRNA レベルで多く蓄積していた10種類の機能未知タンパク質のcDNAをHis-tag融合タンパク質となるように発現ベクターpBYR2HSに組み込み、アグロインフィルトレーション法によりベンサミアナタバコに感染させた。感染の成否は、同時に感染させた pRI201 由来の 2x35Spro:EGFP バイナリベクターの EGFP 蛍光により判断した。これらの感染葉を孵化直後のハスモンヨトウ(*Spodoptera litura*)幼虫に食餌させ、5 日後の体重を測定した。

【結果と考察】

EGFP を組み込んだ pBYR2HS をアグロインフィルトレーションにより感染し、その後の栽培日数と収穫後の葉の保管日数を変えて、EGFP 蛍光を調べた結果、感染 3 日後に葉を収穫して少なくとも 6 日間は EGFP 蛍光を安定に保ったまま 4℃で保存できることが分かった。10 種の機能未知乳液タンパク質をコードする発現ベクターをベンサミアナタバコに感染し、目的のタンパク質が発現していることを抗 His-tag 抗体を用いてウェスタンブロッティングにより確認した。それらのうち、2 種の乳液タンパク質を発現する葉をそれぞれハスモンヨトウ幼虫に摂食させたところ、いずれの場合においても EGFP 発現葉を与えた幼虫に比べ、5 日後の体重が有意に小さかった。以上より、これらの 2 種の乳液タンパク質は、ハスモンヨトウ幼虫の成長を阻害する機能を持つことが示唆された。

Ficus carica, *Euphorbia tirucalli*, insect

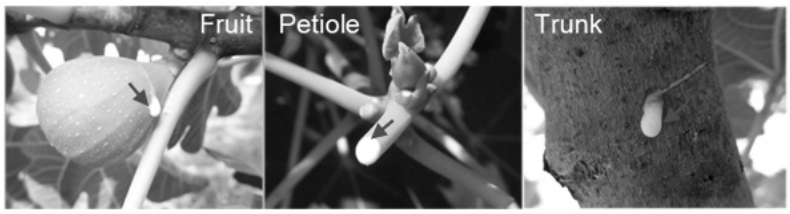
講演番号：3E6a02
講演日時：3 月 26 日 09:11～ 1 号館 E6 会場

Identification and evaluation of toxic proteins accumulated in *Ficus carica* and *Euphorbia tirucalli* latexes.

○Hyrmeya Eric SAVADOGO[1], Kazufumi Yazaki[2], Ryosuke Munakata[2,3], Masamitsu Yamaguchi[1], Hideki Yoshida[1], Takanari Umegawachi[1], Ryo Tanaka[1], Dan Ngoc Anh Suong[1], Toki Taira[4], Sakihito Kitajima[1] ([1]Kyoto Institute of Technology, [2]Kyoto University, [3]Universite de Lorraine /INRA, [4]University of the Ryukyus)

【Purpose】

Laticifer cells of plants are unique in shape, development, and function. Their cytoplasms are sticky white fluid called latexes, which are exuded when the plants are wounded. Laticifers contain various toxic proteins and compounds and are therefore supposed to play defensive roles against pest in plants. However, latex constituents are highly variable among species and even among organs in a single species. The purpose of this study is to identify in *Ficus carica* and *Euphorbia tirucalli* latexes proteins highly accumulated and having toxic functions.



【Method and results】

To gain insight into proteins accumulated in *F. carica* latexes, we conducted an RNA-seq analysis of latex exuded from immature fruit, petiole, and trunk, and we compared the expression levels of the unigenes in the three organs' latexes. The expression levels of some unigenes related to biotic stresses were significantly increased in trunk and petiole latexes, compared with in fruit latex, suggesting that petiole and trunk latexes contains great amounts of toxic proteins and therefore play a major role in the defense system of *F. carica.* Previously, RNA-seq analysis of *E. tirucalli* latex revealed the presence of unigenes related to biotic stress. To check the protein's toxicities, cDNAs of some unigenes highly expressed were reverse-transcribed, cloned into a vector and expressed in *Drosophila melanogaster* S2 cells. Among proteins expressed in S2 cells, some proteins have caused high mortalities of S2 cells, suggesting that they are toxic and might be involved in the defense system against pest. To confirm the idea, we introduced one gene from *Ficus carica* and another gene from *Euphorbia tirucalli* in *D. melanogaster* to express in eye imaginal disk using GMR-GAL/UAS system. Expression of these two genes in *D. melanogaster* eye imaginal disk induces rough eye phenotype probably due to their toxic effects.

Drosophila melanogaster, GAL4-GMR/UAS system, Toxicity

講演番号：3E6a03
講演日時：3 月 26 日 09:22～ 1 号館 E6 会場

細菌エンドファイトによるプライミング機構の誘導に働くシグナル物質の探索

Mechanism of disease resistance induced by an endophytic bacterium in rice.

○藤田 萌香[1]、草島 美幸[1,2]、仲下 英雄[1] ([1]福井県大院・生資、[2]東大院・農生科・応生化)
○Moeka Fujita[1], Miyuki Kusajima[1,2], Hideo Nakashita[1] ([1]Dept. Biosci., Fukui Pref. Univ., [2]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. of Tokyo.)

植物は、様々な病原体に晒されているが、それらに対する独自の防御機構を備えている。一方、植物共生微生物との相互作用が宿主植物の病害抵抗性の増強や生育促進に寄与することが知られている。そのメカニズムの 1 つであるプライミング機構では、防御関連遺伝子の発現を伴わないため植物の生育は抑制されないが、病原菌感染に対して通常よりも早くあるいは強く応答することにより病害抵抗性が発現することが明らかになっている。本研究では、細菌エンドファイト *Azospirillum* sp. B510 株の共生によるプライミング機構の誘導に関与するシグナル物質の特定を目的として、プライミング関連遺伝子の発現を指標とするアッセイ系の構築を行い、それを用いて *Azospirillum* sp. B510 株が定着したイネ幼苗の抽出液から活性物質の探索を行った。

24 穴プレートのウェルの中で海砂を用いて 7 日間生育させたイネ幼苗に試料を 2 日間処理し、第 2 葉葉身における 3 種のプライミング関連遺伝子の発現を解析することにより、プライミング誘導活性を評価した。シグナル物質の試料としては、播種 7 日目のイネに *Azospirillum* sp. B510 株懸濁液を処理して 7 日間栽培したものを用いた。イネの葉身および葉鞘から 100 % MeOH および 50 % MeOH で抽出を行い、さらに MeOH 抽出画分から酸性または塩基性条件での溶媒抽出を行って分画した後、活性を指標として精製を進めた。プライミング関連遺伝子の発現解析結果から、活性物質はイネ葉身よりも葉鞘に多く含まれていることが示唆された。酸性物質を含む酢酸エチル画分を陰イオン交換カラムクロマトグラフィーを用いて分画した結果、0.1M NaCl および 0.8～1.5M NaCl で溶出された画分に活性が検出された。現在、これらの活性画分について、さらに精製を進めるとともにプライミング誘導活性について解析を進めている。

priming, disease resistance, rice

発表責任者：藤田萌香（s1893001@g.fpu.ac.jp）

講演番号：3E6a04
講演日時：3 月 26 日 09:33～ 1 号館 E6 会場

植物培養細胞の活性酸素種生成を指標とした植物免疫を亢進する植物内生菌の探索
Screening of endophytes activating plant immune system based on production of reactive oxygen species by cultured plant cells

○黒川 摩利、中野 正貴、北畑 信隆、朽津 和幸、古屋 俊樹（東京理科大理工・応生）
○Mari KUROKAWA, Masataka NAKANO, Nobutaka KITAHATA, Kuchitsu KAZUYUKI, Toshiki FURUYA (Dept. Appl. Biol. Sci., Fac. Sci. Tec., Tokyo Univ. Sci.)

【背景・目的】近年、環境保全型農業の実現に向けて、植物免疫を活性化させる微生物農薬に関心が寄せられている。しかしながら、植物免疫活性化剤としての微生物農薬の実用化例は限られている。要因の一つとして、微生物は環境の変化の影響を受けやすく、植物に定着しにくいことが挙げられる。そこで本研究では、環境の変化の影響を受けにくく植物内に安定に定着する植物内生菌を微生物探索の対象とした。また、従来の探索手法は、長時間を要することも要因と考えられるため、微生物の植物免疫亢進活性の評価に植物培養細胞を利用する手法を考案し、探索の効率化を図り、植物の免疫を亢進する内生菌の取得を試みた。

【方法・結果】有機農法により栽培された小松菜から 31 株の内生菌を単離し、16S rRNA 遺伝子配列をもとに属種同定を行った。取得した株は Proteobacteria 門、Actinobacteria 門、Firmicutes 門に分類された。4 株は既報の微生物との相同性が 96%以下であり、属レベルで新規な微生物であることが示唆された。次に卵菌 *Phytophthora cryptogea* 由来のタンパク質性エリシターである cryptogein により誘導されるタバコ培養細胞 BY-2 の活性酸素種（ROS）の生成パターンと、感染防御応答の強さに相関がある（Kadota *et al*. 2005;2006）ことに着目し、この ROS を指標として、微生物を評価した。その結果、いくつかの取得株は、BY-2 細胞と共培養することにより、BY-2 細胞の cryptogein 誘導性の ROS 生成を亢進した。さらに、ROS 生成を亢進した株を、シロイヌナズナ植物体と軟腐病菌 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* を用いた耐病性試験に供した。その結果、*Delftia* sp. BR1R-2 と *Arthrobacter* sp. BR2S-6 はシロイヌナズナを矮化させずに内生し、シロイヌナズナに軟腐病菌に対する耐病性を付与した（図 1）。また、これらの内生菌で処理することにより、軟腐病菌感染時にシロイヌナズナの防御関連遺伝子の発現が亢進することも確認した。

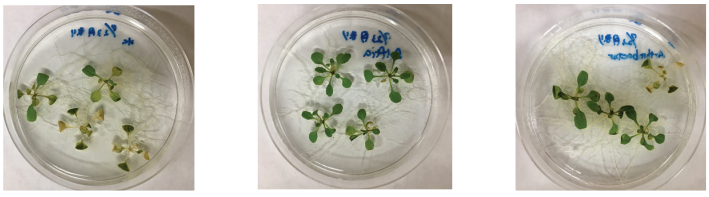


図 1　内生菌処理後に軟腐病菌を感染させたシロイヌナズナ

endophyte, biocontrol agent, reactive oxygen species

発表責任者：古屋俊樹（tfuruya@rs.tus.ac.jp）

講演番号：3E6a05
講演日時：3 月 26 日 09:44～ 1 号館 E6 会場

タバコ根圏におけるサントパイン資化菌の探索
Screening of santopine metabolizing microbes in the rhizosphere of *Nicotiana tabacum*
○島崎 智久[1]、川崎 崇[1]、青木 裕一[2]、矢崎 一史[1]、杉山 暁史[1] ([1]京大・生存研、[2]東北大学・東北メディカル・メガバンク機構)
○Tomohisa SHIMASAKI[1], Takashi KAWASAKI[1], Yuichi AOKI[2], Kazufumi YAZAKI[1], Akifumi SUGIYAMA[1] ([1]RISH, Kyoto Univ., [2]Tohoku Medical Megabank Organization., Tohoku Univ.)

アグロバクテリウムは T-DNA を植物体に移行させることで、植物を形質転換する。形質転換された植物では T-DNA にコードされたオパイン合成酵素の働きによりアミノ酸誘導体であるオパインが生合成されるが、アグロバクテリウムはオパイン代謝遺伝子を有しているため、生合成されたオパインを窒素及び炭素源として独占的に利用する。サントパインはオパインの一種であり、グルコースとグルタミンの縮合反応を触媒するサントパイン合成酵素の働きにより生合成される。近年、アグロバクテリウム からタバコ（*Nicotiana tabacum*）に水平伝搬により移行したと考えられるサントパイン合成遺伝子（*mas2*）が根特異的に発現し、根においてサントパインが生合成されていることが報告された。また、サントパイン代謝遺伝子はアグロバクテリウムだけでなく、根粒菌などの一部の細菌が有することも報告されており、サントパインがタバコと根圏微生物との相互作用に寄与していることが示唆されている。そこで本研究はタバコ根圏での植物微生物相互作用におけるサントパインの機能を明らかにすることを目的とした。

本実験では、国内栽培品種である *N. tabacum.* cv. Burley 21 を研究対象とした。根と葉における *mas2* 遺伝子の発現解析及び LC-MS によるサントパインの検出を行った。その結果、*mas2* 遺伝子の発現は根において認められたが葉では認められず、一方でサントパインは根及び葉において検出された。また、水耕栽培したタバコの培養液からもサントパインが検出され、サントパインが根圏へ分泌されることが示された。次にサントパインが土壌微生物に与える影響を評価するため、土壌に 3 種類の濃度のサントパイン溶液（50、250、1000 nmol/g soil）を 3 日毎に 5 回添加（計 15 日間培養）したのち、希釈平板法により生菌数を測定した。サントパイン 1000 nmol/g soil 添加区において Mock 処理区と比べ生菌数が約 9 倍に増加していたことから、サントパイン資化菌が増殖したと推測された。そこで 2 種類の異なる培地を用いてサントパイン添加土壌から土壌細菌を単離したところ、*Agromyces* 属や *Paenarthrobacter* 属などの放線菌が離された。これらの単離菌株をサントパインを唯一の炭素源とする培地で 2 日間培養したのち、培地上清に含まれるサントパインを LC-MS で測定した結果、*Agromyces*、*Paenarthrobacter*、*Pseudarthrobacter* 属菌株においてサントパインの分解が確認された。現在、サントパインが土壌微生物叢に与える影響を解析している。

Nicotiana tabacum, opine, horizontal gene transfer

講演番号：3E6a06
講演日時：3 月 26 日 10:05～ 1 号館 E6 会場

An elite probiotic *Bacillus* sp. strain formulated with Asteraceae plant additive enhanced biocontrol activities against bacterial fruit blotch

Yen-Yu Liu[1], Yi-Lin Chen[1], Sook-Kuan Lee[1], Wen-Chin Yang[2,3,4,5], ○Chi-Te Liu[1,2] ([1]Institute of Biotechnology, National Taiwan University, [2]Agricultural Biotechnology Research Center, Academia Sinica, [3]Department of Aquaculture, National Ocean University, Keelung, [4]Institute of Pharmacology, Yang-Ming University, [5]Department of Life Sciences, National Chung Hsing University)

Bacterial fruit blotch (BFB) is caused by *Acidovorax citrulli* (Aac) which is a seed-borne pathogen and cause serious threat in cucurbit industry worldwide. Although seed treatments like hydrochloric acid, and sodium hypochlorite can suppress Aac infection, they generally fail to eradicate the bacterium. A probiotic strain isolated from soil showed *in vitro* antagonistic activity against Aac. An Asteraceae plant (AP) containing varient secondary compounds shows potential antimicrobial activity. The aim of this study was to evaluate the synergistic effects of the probiotic strain and the AP on inhibition of BFB. Under *in vitro* antagonistic test, both probiotic strain and the combination of probiotic strain with AP additive could inhibit Aac. Besides, the supernatant of probiotic strain did not inhibit Aac, indicating only live bacteria had biocontrol efficacy. We further investigated the effects of AP on probiotic strain physiological activities. AP enhanced not only the biofilm formation but also the cell vitality. In pot experiments, treating single inoculation with the probiotic strain or with mixed treatment showed high inhibitory effect on BFB of melon. The complete genome of the probiotic strain was analyzed by next generation sequencing. The results of whole genome sequencing indicating that the probiotic strain has one circular chromosome that is around 4.00Mb with 3,900 protein-coding genes. Genome of the probiotic strain possesses biocontrol metabolites related genes involved in antimicrobial compounds synthesis. Accordingly, the bacterial inoculant probiotic strain with AP additive can act as a potential biocontrol agent against BFB.

Biocontrol, Bacillus amyloliquefaciens, Bidens pilosa

発表責任者：劉　啓徳（chiteliu@ntu.edu.tw）

講演番号：3E6a07
講演日時：3 月 26 日 10:16～ 1 号館 E6 会場

植物病原細菌 *Acidovorax avenae* 由来のエフェクタータンパク質 IPPT を介した過敏感細胞死誘導の分子機構
Induction mechanism of hypersensitive response cell death induced by effector protein IPPT derived from plant pathogenic bacteria *Acidovorax avenae*
○中村 みなみ[1]、近藤 真千子[2]、古川 岳人[2]、川口 雄正[1]、山田 孝樹[1]、蔡 晃植[1,2] ([1]長浜バイオ大院・バイオ、[2]長浜バイオ大・バイオ)
○Minami NAKAMURA[1], Machiko KONDO[2], Takehito FURUKAWA[2], Takemasa KAWAGUCHI[1], Kohki YAMADA[1], Fang-Sik CHE[1,2] ([1]Grad. Sch. of Bio., Nagahama Inst. of Bio. and Tech., [2]Bio., Nagahama Inst. of Bio. and Tech)

シコクビエを宿主とする植物病原細菌 *Acidovorax avenae* N1141 菌株は、非宿主であるイネに感染することができない。これは、イネが N1141 菌株を認識し、過敏感細胞死などの植物特有の免疫反応を誘導するためである。過敏感細胞死とは、病原性菌株を認識したときにのみ局所的に誘導される細胞死であり、細胞膜透過性の喪失や核 DNA の断片化などを伴う自発的なプログラム細胞死である。一般的に、過敏感細胞死は細菌の持つ TypeIII 分泌装置を介して植物細胞内に輸送されるエフェクタータンパク質によって誘導される。我々はこれまでに、*A. avenae* N1141 菌株を接種したイネ細胞で認められる過敏感細胞死も、この菌が持つエフェクターによって誘導されることを示した。そこで、イネの過敏感細胞死誘導に関与するエフェクタータンパク質を同定するため、N1141 菌株のゲノムにトランスポゾンを挿入した N1141 トランスポゾン挿入変異株ライブラリーを作製し、イネの過敏感細胞死誘導能を失っている変異株を選抜した。その結果、*Isopentenyl pyrophosphate transferase (IPPT)* 遺伝子にトランスポゾンが挿入された変異株はイネの過敏感細胞死誘導能を失っていることが示された。そこで、IPPT が実際に過敏感細胞死を誘導するエフェクターであるかを明らかにするため、N1141 菌株の *IPPT* 欠損株（NΔIPPT）を作製しイネに接種したところ、細胞死が誘導されないことが確認された。また、イネの過敏感細胞死を正に制御する転写因子をコードし、過敏感細胞死誘導時に発現量が増加する *OsNAC4* の発現について調べたところ、NΔIPPT を接種したイネ培養細胞では発現量の増加が認められなかった。次に、IPPT が TypeIII 分泌装置を介してイネ細胞内に輸送されているかどうかを CyaA の融合タンパク質を用いて調べたところ、IPPT はイネ細胞内に輸送されることが示された。さらに、イネプロトプラストに *IPPT* 遺伝子を PEG 法で導入し一過的に発現させたところ、細胞膜透過性の喪失が認められた。また、イネ培養細胞にパーティクルボンバードメント法により *IPPT* 遺伝子を導入すると、核 DNA の断片化を伴う細胞死が認められた。これらのことから、N1141 菌株の IPPT は細胞膜透過性の喪失と核 DNA の断片化を伴うイネの過敏感細胞死を誘導する新規のエフェクターであることが明らかになった。そこで、IPPT を認識するイネ側のタンパク質があると考え、Yeast two-hybrid 法により IPPT と相互作用するイネのタンパク質を探索した。その結果、IPPT は IP1、IP2、IP3 と名付けたタンパク質と相互作用することが示された。

hypersensitive response cell death, rice, pathogenic bacteria

講演番号：3E6a08
講演日時：3 月 26 日 10:27～ 1 号館 E6 会場

イネ免疫反応を誘導する EFa50 ペプチドの受容機構
Recognition mechanism of EFa50 peptide in rice

○古川 岳人[1]、松田 智裕[2]、千國 孝明[1]、平井 洋行[1]、蔡 晃植[1,2] ([1]長浜バイオ大バイオ、[2]長浜バイオ大院バイオ)
○ Takehito FURUKAWA[1], Tomohiro MATSUDA[2], Takaaki CHIKUNI[1], Hiroyuki HIRAI[1], Fang-Sik CHE[1,2] ([1]Dept. of Biosci., Nagahama Inst. of Bio-Sci. and Tech., [2]Grad. Sch. of Bio-Sci., Nagahama Inst. of Bio-Sci. and Tech.)

植物は、病原菌が共通して持つ分子群 pathogen associated molecular patterns（PAMPs）を認識し、活性酸素発生や免疫関連遺伝子の発現などを含む PAMPs triggered immunity（PTI）を誘導する。これまでに我々は、イネは、植物病原細菌 *Acidovorax avenae* N1141 菌株由来の翻訳伸長因子 EF-Tu（elongation factor thermo unstable）の EFa50 と名付けた中央領域ペプチドを認識し、PTI を誘導することを明らかにした。一方、シロイヌナズナは、EF-Tu の N 末端領域 elf18 ペプチドを EFR（EF-Tu receptor）という一回膜貫通型受容体キナーゼで認識し、PTI を誘導することが報告されている。このことは、イネとシロイヌナズナがそれぞれ異なる受容体を用いて EF-Tu を認識していることを示している。そこで我々は、イネの EFa50 受容体の同定を目的として研究を行なった。

これまでに、植物の PAMPs 認識受容体をコードする遺伝子は、PAMPs 認識後に発現誘導されることが複数報告されている。そこで、イネの EFa50 受容体を同定するために、イネに EFa50 を処理して発現上昇する遺伝子をイネ 44K オリゴマイクロアレイで解析した。その結果、10 個の一回膜貫通型受容体型キナーゼをコードする遺伝子が発現上昇することが明らかになり、これらの遺伝子を *EFa50 receptor candidates*（*ERCs*）と名付けた。次に、どの *ERC* 遺伝子が EFa50 認識に関与するか調べるために、EFa50 認識能を持たないシロイヌナズナに各 *ERC* 遺伝子を発現させ、シロイヌナズナ PTI 関連遺伝子 *AtWRKY29* のプロモーター活性を指標に EFa50 認識能について調べた。その結果、*ERC1* を発現させたシロイヌナズナにおいて EFa50 によって PTI が誘導されることが明らかになった。そこで、*ERC1* 遺伝子を過剰発現する形質転換イネを作製し、EFa50 を処理したところ、EFa50 によって発生する活性酸素の量がコントロール株に比べ増加した。また、ERC1 の細胞内キナーゼドメインを欠損させた ERC1_ΔKD と ERC1 のキナーゼ活性中心と考えられる 865 番目のアスパラギン酸をアラニンに置換した ERC1_D865A を発現させたイネプロトプラストでは EFa50 処理による PTI 誘導能の上昇は認められなかった。次に、ERC1 と EFa50 の相互作用を調べるため、この ERC1 過剰発現イネから抽出した膜画分と EFa50 を混合した後、ERC1 抗体を用いた共免疫沈降を行ったところ、ERC1 と EFa50 が相互作用することが明らかとなった。これらのことから、ERC1 は EFa50 の受容体として機能することが示された。

Plant immunity, Elongation factor-Tu, PAMPs

講演番号：3E6a09
講演日時：3 月 26 日 10:38～ 1 号館 E6 会場

転写因子 DPF のイネ本来のいもち病抵抗性への関与

Involvement of the transcription factor DPF in rice blast resistance

石川 一輝[1,2]、山村 千紘[1,2]、和田 美樹[3]、冨山 詩歩[3]、前田 哲[1]、岡田 憲典[3]、鎌倉 高志[2]、○森昌樹[1,2]（[1]農研機構・生物機能利用研究部門、[2]東理大院・理工、[3]東大・生物生産工学研究センター）
Kazuki Ishikawa[1,2], Chihiro Yamamura[1,2], Miki Wada[3], Shiho Tomiyama[3], Satoru Maeda[1], Kazunori Okada[3], Takashi Kamakura[2], ○Masaki Mori[1,2] ([1]NIAS, [2]Grad. Sch. Science and Tech., Tokyo Univ. of Science, [3]Biotechnology Research Center, The Univ. of Tokyo)

【目的】
我々はこれまでにイネのジテルペン型ファイトアレキシン（DP）生合成を制御する、bHLH 型転写因子 DPF（Diterpenoid Phytoalexin Factor）について研究を行っている。*DPF* 高発現（OX）イネでは 12 種の DP 生合成遺伝子の発現が顕著に増大し、モミラクトン、ファイトカサン等の DP の蓄積量が増大すること、逆に *DPF* ノックダウンイネでは生合成遺伝子の発現レベルが低下し、DP 蓄積量も低下することを報告している。また、*DPF* は通常、根及び出穂後の穂で高レベルに発現していること、葉ではいもち病感染、塩化銅処理、ジャスモン酸処理、UV 照射などのストレス処理により発現が誘導されることを明らかにしている。さらに *DPF* ノックアウト(KO)イネを用いた解析により、非生物的ストレス（塩化銅及び UV 照射)処理による DP 生合成遺伝子発現の誘導は DPF を介していることを示している。本年度は主にいもち病抵抗性と DPF、DP との関連を明らかにすることを目的に以下の研究を行った。

【方法・結果】
イネへのいもち病菌感染により DP 生合成遺伝子の発現が増大することが知られているので、2 種類の *DPF*-KO イネ(T2 世代)と WT イネにいもち病菌を噴霧接種し、3 日後の DP 生合成遺伝子の発現をリアルタイム PCR により比較した。すると KO イネではほとんど発現レベルが増大しなかったことから、いもち病菌感染による DP 生合成遺伝子の発現誘導も DPF に依存することが示された。つぎに *DPF*-KO イネと WT イネでいもち病抵抗性を比較した。植物体にいもち病菌液を噴霧接種し 6 日後に病斑数を計測したところ、WT イネに比べ KO イネでは病斑数が有意に増加していた。よって、DPF はいもち病菌に対するイネ本来の抵抗性に関与していることが明らかになった。さらに DPF によるいもち病抵抗性が DP に由来するかどうかを明らかにするために、DP 生合成遺伝子である *CPS2* 及び *CPS4* の KO イネを CRISPR/Cas9 法により作出した。

rice, phytoalexin, disease resistance

発表責任者：森昌樹（morimasa@affrc.go.jp）

講演番号：3E6a10
講演日時：3 月 26 日 10:49～ 1 号館 E6 会場

転写調節因子 OsNTF1 による *OsPR7* 遺伝子の発現誘導機構
Expression mechanism of *OsPR7* gene by transcription factor, OsNTF1
○平井 洋行[1]、西村 成史[2]、中塚 達人[1]、古川 岳人[1]、近藤 真千子[1]、桂木 雄也[1]、神村 麻友[1]、仲下 英雄[3]、蔡 晃植[1,2] ([1]長浜バイオ大・バイオ、[2]長浜バイオ大院・バイオ、[3]福井県大・生資)
○Hiroyuki HIRAI[1], Akifumi NISHIMURA[2], Tatsuto NAKATSUKA[1], Takehito FURUKAWA[1], Machiko KONDO[1], Yuya KATSURAGI[1], Mayu KAMIMURA[1], Hideo NAKASHITA[3], Fang-Sik CHE[1,2] ([1]Dept. of BioSci., Nagahama Inst. of Bio-Sci. and Tech., [2]Grad. Sch. of Bio-Sci., Nagahama Inst. of Bio-Sci. and Tech., [3]Dept. Biosci., Fukui Pref. Univ.)

これまでに我々は、イネは細菌の鞭毛タンパク質フラジェリンなどを認識すると、*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* の様な植物病原細菌の生育を抑制する活性があるシステインプロテアーゼ OsPR7 を細胞外に分泌し蓄積することを示した。また、*OsPR7* 遺伝子の発現は OsNTF1（NAM domain-containg transcription factor 1）と名付けた NAC グループに属する転写因子によって制御されることも明らかにした。そこで、OsNTF1 による *OsPR7* 遺伝子の発現誘導機構を明らかにすることを目的として研究を行った。まず、OsNTF1 が *OsPR7* 遺伝子の発現を誘導するために必要となるプロモーター領域を調べた。*OsPR7* 遺伝子からそれぞれ、2 kbp、1 kbp、0.5 kbp、0.27 kbp、0.15 kbp、0.1 kbp 上流の領域を PCR で増幅し、その下流にルシフェラーゼ遺伝子を連結したレポータープラスミドを作成した。これらのレポータープラスミドと OsNTF1 を過剰発現させるためのエフェクタープラスミドをイネプロトプラストに共導入し、ルシフェラーゼ由来の発光を指標にしたプロモーターアッセイを行なった。その結果、2 kbp、1 kbp、0.5 kbp 上流領域を組み込んだプラスミドを導入した場合、高い発光量が認められたが、0.27 kbp、0.15 kbp 領域を組み込んだプラスミドを導入した場合は弱い発光が認められ、0.1 kbp 領域を組み込んだプラスミドを導入した場合は発光が認められなかった。以上のことから、OsNTF1 が *OsPR7* 遺伝子の発現を誘導するためには *OsPR7* 遺伝子の上流 0.5 - 0.1 kbp の領域が必要であることが明らかとなった。次に、0.5 - 0.1 kbp の領域内に存在する NAC タイプの転写因子の結合領域を PlantPAN2.0 で予測したところ、この領域内には 3 個の結合領域が存在すると予測された（NBS1、2、3）。そこで、*OsPR7* 遺伝子の上流 0.5 kbp 内の NBS1、NBS2、NBS3 配列をそれぞれ欠失させたプロモーター配列にルシフェラーゼ遺伝子を連結したプラスミドを作成し、同様にプロモーターアッセイを行なった。その結果、NBS1、NBS2、NBS3 配列をそれぞれ欠失させた領域では、NBS 配列を欠失させていない領域に比べ発光量が低下しており、3 ヶ所の NBS 配列全てを欠失させたプロモーター領域では、発光が認められなかった。以上のことから、OsNTF1 による *OsPR7* 遺伝子の発現誘導には上流 0.5 -0.1 kbp 領域内に存在する 3 ヶ所の NBS 配列が重要な役割を担っていることが示された。

NAC, Transcription factor, Immune respons

講演番号：3E6a11
講演日時：3 月 26 日 11:10～ 1 号館 E6 会場

イネの過敏感細胞死誘導における OsHSP90 の役割
Role of OsHSP90 in induction of hypersensitive response (HR) cell death in rice
○三田 将大[1]、神村 麻友[2]、平井 洋行[2]、古川 岳人[2]、蔡 晃植[1,2] ([1]長浜バイオ大学大学院 バイオサイエンス研究科、[2]長浜バイオ大学 バイオサイエンス学部)
○Masahiro Sanda[1], Mayu Kamimura[2], Hiroyuki Hirai[2], Takehito Furukawa[2], Fang-Sik Che[1,2] ([1]Graduate School of Biosciences, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology, [2]Department of Bioscience, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology)

イネに対して非病原性である *Acidovorax avenae* N1141 菌株を接種すると、過敏感細胞死という植物の免疫反応のひとつが誘導される。過敏感細胞死は細胞膜透過性の喪失、核 DNA の断片化および核の凝集を伴う、プログラム細胞死の一種である。これまでに我々は、過敏感細胞死は植物独自の転写因子である OsNAC4 によって誘導されることを明らかにすると共に、*OsNAC4* によって小胞体局在型の分子シャペロンをコードする *OsHSP90* が転写誘導されることを示した。そこで、OsHSP90 が過敏感細胞死誘導に関与するのか、またそのときの誘導機構はどのようなものなのかについて研究を行った。まず、*OsHSP90* の発現誘導が過敏感細胞死を引き起こすのかどうかを明らかにするために、*OsHSP90* をイネプロトプラストで一過的に過剰発現させたところ、細胞膜透過性喪失が誘導された。また、OsHSP90 に存在する２つのドメイン（小胞体移行シグナル KDEL 配列と ATPase ドメイン）をそれぞれ欠損した OsHSP90-ΔKDEL と OsHSP90-ΔATPase をイネプロトプラストに一過的に過剰発現したところ、細胞膜透過性喪失が誘導されなかった。このことから、OsHSP90 が細胞膜透過性喪失を誘導するためには KDEL 配列と ATPase ドメインが両方とも必要であることがわかった。次に、*OsHSP90* を恒常的に過剰発現するイネ形質転換体を作成し、N1141 菌株を接種したところ、*OsHSP90* 過剰発現体ではコントロール株よりも早く細胞膜透過性の喪失が認められた。一方、過敏感細胞死のもう一つの指標となる核 DNA の断片化については、*OsHSP90* 過剰発現体とコントロール株共に同様な誘導が認められた。以上のことから、OsHSP90 の発現誘導は細胞膜透過性喪失を誘導するが核 DNA の断片化は誘導しないことが明らかとなった。次に、OsHSP90 を介した細胞膜透過性喪失の誘導機構について研究を行った。OsHSP90 は分子シャペロンであることから、細胞内で他のタンパク質と相互作用することで細胞膜透過性の喪失を誘導している可能性が考えられた。そこで、yeast two-hybrid 法を用いて OsHSP90 と相互作用するタンパク質を探索した結果、male meiocyte death 1 like protein と glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase というタンパク質が同定された。

hypersensitive response cell death, OsHSP90, plant

講演番号：3E6a12
講演日時：3 月 26 日 11:21～ 1 号館 E6 会場

イネ由来 GH18 キチナーゼ様タンパク質　riceXIP のキシラナーゼ阻害活性

Inhibitory activity of riceXIP against GH10 and 11 xylanases from *Rhizopus oryzae*.

○三井 圭吾、大沼 貴之（近大院農）
○Keigo Mitsui, Takayuki Ohnuma (Kindai Univ. of Agric.)

【緒言】

キチンのβ-1, 4 グリコシド結合を加水分解する酵素であるキチナーゼ（EC3.2.1.14）は糖質関連酵素のデータベース CAZy（http://www.cazy.org/）において，GH ファミリー18 と 19 に分類されている．植物は構成成分にキチンを有していないにもかかわらず多くのキチナーゼ遺伝子を発現していることから，その機能に興味が持たれている．主要作物であるイネのゲノム DNA 上には 35 個の GH18 キチナーゼ遺伝子が存在しているが，アミノ酸配列のアライメントの結果その内 8 個は活性中心付近のアミノ酸置換により，キチナーゼ活性を示さないキチナーゼ様タンパク質であることがわかった．近年このようなキチナーゼ様タンパク質の植物での役割は，植物病原菌が分泌するキシラナーゼを阻害する XIP（Xylanase Inhibitor Protein）であることが示唆されている．本研究ではイネの XIP の一つである riceXIP（Accession no. AK064356）を用いて，イネ立ち枯れ病菌 *Rhizopus oryzae* が生産する GH10 と GH11 キシラナーゼ（RXyn1 と RXyn2）に対する阻害活性評価を行った．

【結果と考察】

riceXIP の各キシラナーゼ阻害活性は, キシランを含む寒天プレートを用いたゲル内拡散法によって調べた．その結果，ハロー形成の阻害から riceXIP は RXyn1 と RXyn2 の両方を阻害するデュアル酵素インヒビターであることがわかった．RXyn1 と RXyn2 の基質として pNP-Xylobioside を用いて riceXIP の両キシラナーゼに対する阻害定数（K_i）を求めたところ，それぞれナノモーラー（nM）オーダーの値が得られた．当研究室でこれまでに研究を行った XIP ホモログである OsXIP（AK073843）は, GH11 のみを阻害するシングル酵素インヒビターであることから, イネは異なる特異性を示す XIP を発現していることがわかった．また，OsXIP は専ら病原菌の生産する GH11 キシラナーゼを阻害するのに対し，riceXIP は病原菌の GH10 と GH11 だけでなく，内在性 GH10 キシラナーゼの活性を調節する役割があることが示唆された．GH10 および GH11 キシラナーゼの活性を阻害する XIP の構造的要因を調べたところ，両キシラナーゼの活性中心付近に結合するアミノ酸残基の重要性が示唆された．

chitinase, xylanase inhibitor protein, plant-microbe interaction

発表責任者：大沼貴之（ohnumat@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：3E6a13
講演日時：3 月 26 日 11:32～ 1 号館 E6 会場

馬鈴薯病害抵抗性関連タンパク質のプロテオーム解析
Proteomics analysis of the pathogenesis-related protein in the potato
○荻原 淳、大工 創、寺尾 実紗、渡邉 泰祐（日大生物資源）
○Jun OGIHARA, Hajime DAIKU, Misa TERAO, Taisuke WATANABE (Nihon Univ. of Bioreso. Sci.)

目的）馬鈴薯そうか病は古くから知られている重要病害であり、数種の *Streptomyces* spp. によって引き起こされる。そうか病菌は塊茎が肥大化し始めたストロン先端部に感染、塊茎表面上に瘡蓋状の病斑を生じ、商品価値を著しく低下させる。その被害は世界の馬鈴薯生産地域に広がっており、効果的な防除法、新規抵抗性品種の開発が望まれている。
現在までに多くの病害抵抗性品種が開発され、各品種間の抵抗性の強弱が明らかになっている。しかし、品種間における抵抗性の強弱と抵抗性関連物質との相関に関する知見は得られていない。
そこで本研究では、各品種における馬鈴薯塊茎皮およびストロン由来タンパク質を網羅的に解析し、発現タンパク質、その量的変化を比較することにより、病原菌感染に対する抵抗性に関与する物質の推定、さらに抵抗性メカニズムの解明を目的とした。
方法及び結果）馬鈴薯塊茎皮を薄く剥き凍結乾燥した。またストロンは圃場の植物体より採取し、液体窒素処理後、凍結乾燥した。得られた凍結乾燥後の組織は、液体窒素中にてポリトロンで破砕した。破砕した各サンプルに Sample Buffer を加え煮沸抽出し、アセトン沈殿後、超音波破砕によりタンパク質懸濁液を得た。BCA 法によりタンパク質量を定量し、SDS-PAGE でタンパク質を分画し、銀染色法でゲルを染色した。2 mm 四方にゲルを網羅的に切り出し、還元アルキル化、トリプシンゲル内消化した。得られたペプチド断片を nanoLC-ESI-MS/MS 装置により分析した。得られた質量情報は SEQUEST HT を用いて NCBI nr.fasta のデータを、*Solanum tuberosum* をキーワードとして再構築したタンパク質アミノ酸配列情報に対して検索した。さらに、Proteome Discoverer 2.2 を用いて発現タンパク質のラベルフリー半定量解析を行った。これにより品種、熟期、既知の病害抵抗性に対する量的特異性を指標にタンパク質の検索を行った。その結果、いくつかの相関性が認められるタンパク質を確認した。

Poteto, Proteomics, pathogenesis-related protein

発表責任者：荻原　淳（j-ogihara@brs.nihon-u.ac.jp）

講演番号：3E6a14
講演日時：3 月 26 日 11:43～ 1 号館 E6 会場

植物のサリチル酸蓄積がタバココナジラミの産卵や生育に及ぼす影響
Accumulation of salicylic acid in plant under biological stress affects oviposition preference and growth of *Bemisia tabaci*

○植田 浩一、釘宮 聡一、田端 純、北本 宏子、光原 一朗（農研機構）
○Hirokazu UEDA, Soichi KUGIMIYA, Jun TABATA, Hiroko KITAMOTO, Ichiro MITSUHARA (NARO)

植物は、昆虫食害や病害など、複数の生物学的ストレスに同時にさらされる。植物 - 昆虫 - 病原体のように、複雑な生物間相互作用における植物の防御機構の研究は、緒についたばかりである。本研究では、トマト、タバココナジラミ（*Bemisia tabaci*）、およびトマトモザイクウイルス（ToMV）を用いた実験モデル三者系において、植物のウイルス罹病に対するストレス応答が、害虫の選好性に与える影響を明らかにすることとした。ToMV は、非昆虫媒介性ウイルスであるため、三者間相互の関係をシンプルに解析できる。

まず、ToMV の感染に対する植物の応答を確認したところ、植物の病害応答に関わるストレスホルモンであるサリチル酸（SA）の総蓄積量が顕著に増加するとともに、SA 応答性の防御関連遺伝子の発現が誘導された。タバココナジラミが、罹病植物と健全植物のどちらに好んで産卵するかを調査したところ、健全植物により多く産卵することが明らかとなった。また、健全、罹病植物それぞれの上での生育を調査したところ、ToMV に罹病している植物上では、孵化率や成虫までの生存率が低下していた。SA を処理した植物と非処理植物の間で産卵選好性を試験したところ、タバココナジラミは SA 非処理植物に多く産卵した。

植物の内在性 SA の重要性を調べるため、SA を蓄積できない NahG（SA 加水分解酵素）形質転換植物と対照植物との間で試験したところ、ToMV 感染の有無にかかわらず、タバココナジラミは産卵選好性を示さなかった。一方で、植物はタバココナジラミ食害によっても SA を蓄積するが、タバココナジラミは食害植物よりも非食害植物に有意に多く産卵した。

これらの結果から、タバココナジラミは、罹病や食害によって SA が蓄積した植物よりも健康な植物に好んで産卵することで、より質の良い餌を子に提供するとともに、他個体との競合を低減していると考えられる。

【参考文献】Ueda et al. “Accumulation of salicylic acid in tomato plant under biological stress affects oviposition preference of *Bemisia tabaci*” *J. of Plant Interact.* (*in press*)

whitefly, salicylic acid, non-vectored virus

講演番号：3E7a01
講演日時：3 月 26 日 09:00～ 1 号館 E7 会場

造精器特異的電位依存型イオンチャネルは苔類ゼニゴケの精子走化性および生殖に関与する

Voltage-gated Ion Channel of SPERm1 is involved for chemotaxis and reproduction of spermatozoa in liverwort

○十川 太輔[1]、末次 憲之[2]、河内 孝之[2]、大和 勝幸[1]（[1]近大・院・生物工学、[2]京大・院・生命）
○Taisuke TOGAWA[1], Noriyuki SUETSUGU[2], Takayuki KOHCHI[2], Katsuyuki YAMATO[1] ([1]Grad. Sch. Biol.-Oriented Sci. Tech., Kindai Univ., [2]Grad. Sch. Biostudies, Kyoto Univ.)

基部陸上植物一般に見られるように、苔類ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha* L.) は運動能を有する精子を形成する。近年、ゼニゴケ精子の発生に関与する遺伝子群が明らかにされたが (Higo et al., Plant Cell Physiol. 57:325-338, 2016)、その精子走化性に関与する知見は乏しい。動物モデルを用いた研究で精子走化性に各種イオンチャネルが関与することが示されており、蘚類ヒメツリガネゴケにおいてもグルタミン酸レセプター様チャネル GLR (GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE) が精子走化性および稔性に必須であることが報告されている (Carlos et al., Nature 549:91-95, 2017)。そこで、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集でゼニゴケにおける *GLR* 遺伝子オーソログ Mp*GLR* の機能を欠損させたが、精子誘引および稔性に異常は見られなかった。この結果を受けて、電位依存型イオンチャネルのホモログをコードし、造精器特異的に発現する遺伝子 Mp*VICSPER1* (Voltage-gated Ion Channel of SPERm 1) に着目した。さらに、Mp*VICSPER1* は、そのホモログが動物、緑藻類、基部陸上植物など精子あるいは鞭毛をもつ生物種に分布していることから、鞭毛運動や精子走化性への関与が期待された。この遺伝子の機能を明らかにするため、ゲノム編集で Mp*vicsper1*^{ge} 雄株を複数作出した。これらの Mp*vicsper1*^{ge} 雄株の葉状体は正常な形態と成長を示し、精子の形態および運動能についても野生株と同等であった。しかし、Mp*vicsper1*^{ge} 雄株の精子は単離した造卵器への走化性は示さなかった。さらに、Mp*vicsper1*^{ge} 雄株の精子を用いて野生型雌株 (Tak-2) と交配したところ、胞子は形成されなかった。以上の結果から、Mp*VICSPER1* はゼニゴケにおいて精子走化性および稔性に必須であることが示唆された。

liverwort, Spermatozoa, Voltage-gated Ion Channel

発表責任者：十川　太輔（1744710002v@waka.kindai.ac.jp）

講演番号：3E7a02
講演日時：3 月 26 日 09:11～ 1 号館 E7 会場

Comparative analysis of metabolite profiling of F1 hybrid and its parents in response of exogenous sucrose and photoperiods

○Thi Ngoc Quynh Le[1], Naoya Sugi[1], Miyako Kusano[1,2], Kazuki Saito[3], Hiroshi Shiba[1] ([1]Grad. sch. of Life and Environmental Sciences, Tsukuba Univ., [2]RIKEN, CSRS, [3]Chiba Univ.)

[Introduction]

Photoperiod and carbohydrate source are two important environmental factors controlling plant growth and development. The two widely used accessions, Columbia (Col) and C24, from different habitats such as their flowering time may affect the regulation of physiological traits to response daylight length and exogenous sucrose. Moreover, F_1 hybrids between Col and C24 showed a heterosis phenotype in early developmental stages. In this study, we evaluated to which extend metabolic changes between two ecotypes and their hybrid under different growth conditions. Usage of heterotic hybrid will facilitate our understanding of effect genetic response in environmental changes.

[Results]

In the early developmental stage, we showed that two reciprocal hybrids of Col and C24 combinations could be enhanced biomass over their parents under both of short day and long day conditions with/without exogenous sucrose. Fresh weight of F_1 hybrids were ranged 19% to 43% over better parent value in the same 10-leaf number stage. Next, by PCA score plots and clustering differential metabolite level, we demonstrated that genotype-specific mechanisms were mainly contributed to Col, C24 and their F_1 hybrid in primary metabolism. Interestingly, when sucrose was added in medium, Col was significantly increased in leaf area but C24 was not. Their reciprocal hybrids were trend similar to Col in response of sucrose addition. Besides, sugars were more accumulated in C24 in exogenous sucrose containing medium. Finally, previous studies reported that increases of carbon fixation activity and photosynthesis related categories might be involved in increased leaf area of hybrids. In this study, carbohydrate related metabolism pathway was checked; however, we found no significant differences between F_1 hybrid and its parents on sugar-related pathway. It suggested that changes of sugar levels might not be critical for enhanced biomass in F_1 hybrids.

Therefore, this study may provide useful information for assessing sucrose uptake strategies differ between accessions and hybrids for studying the controls of environmental responses in addition to genetic background.

growth conditions, hybrid, Arabidopsis

講演番号：3E7a03
講演日時：3 月 26 日 09:22～ 1 号館 E7 会場

シロイヌナズナ種内雑種における雑種強勢に特徴的な代謝物変化及びその制御機構の解析
Comparative analysis of metabolite changes in Arabidopsis intraspecific hybrids exhibiting heterosis and their parents

○杉 直也[1]、レ ティ ノ クィン[1]、草野 都[1,2]、斎藤 和季[2,3]、柴 博史[1]（[1]筑波大院・生命環境、[2]理研・CSRS、[3]千葉大・薬）
○Naoya Sugi[1], Thi Ngoc Quynh Le[1], Miyako Kusano[1,2], Kazuki Saito[2,3], Hiroshi Shiba[1] ([1]Univ. of Tsukuba, [2]RIKEN CSRS, [3]Chiba Univ.)

【背景・目的】雑種強勢は、異なる種間あるいは種内系統間の交配で得られた F_1 雑種において、その両親と比較してバイオマスの増大、ストレス耐性向上等により旺盛な生育を示す現象である。当該現象は農業分野において生産性向上に大きく貢献している重要な現象であることから盛んに研究されているが、過去の育種学・遺伝学的アプローチではその全容を明らかにすることは出来ていない。また近年、雑種強勢への時計遺伝子や光合成関連遺伝子の関与が指摘されているものの、未だ不明である。そこで、表現型に直結する中心代謝物のメタボローム解析を行うことで、雑種強勢メカニズム解明に向けた新規知見を得ることを目的とした。
【方法・結果】雑種強勢で見られるバイオマスの増大は多数の因子が複合的に作用する量的形質であり、栽培時の様々な環境要因から多大な影響を受けると考えられる。そこで栽培環境要因のばらつきを極力排除し、均一化された新規バイオマス測定系を確立した。上記系を用いて生育させた F_1 雑種はその両親系統と比較して有意なバイオマス増加を示した。これらを材料としてメタボローム解析を行った結果、237 種類の代謝産物を検出した。過去の雑種強勢研究において、F_1 雑種におけるクロロフィル濃度の増加及び糖類の増加とバイオマス増加の関連が報告されたことから、これら形質について確認したところ、両親系統と比較して F_1 雑種においてクロロフィル濃度の増加は認められず、さらにメタボローム解析の結果において F_1 雑種特異的な糖類の蓄積も見られなかった。その一方で、F_1 雑種特異的な増減パターンを示した代謝物も存在した。それらの中には、生長に直接つながる炭素・窒素代謝のクロストークで重要な代謝物も含まれていた。そこで、これら代謝物を触媒する酵素について、定量 PCR を用いた RNA レベルの評価、ウェスタンブロットを用いたタンパク質レベルにおける評価を行うと共に、生育環境を操作することによって当該代謝経路の活性を変化させた際の表現型の評価を進めている。これらの結果を元に、雑種強勢メカニズムについて考察したい。

hterosis, metabolomics, regulation of gene function

発表責任者：柴　博史（shiba.hiroshi.gm@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3E7a04
講演日時：3 月 26 日 09:33～ 1 号館 E7 会場

葯タペート組織のエピジェネティックな発生制御メカニズムの解明

Molecular mechanism of epigenetic regulation of the tapetum degradation in Arabidopsis

○川又 奨[1]、杉 直也[1]、レ ティ ノ クィン[1]、木本 剛彰[2]、清永 郁香[1]、岩野 恵[3]、岩井 宏暁[1]、佐藤 忍[1]、高山 誠司[4]、柴 博史[1]([1]筑波大院・生命環境、[2]奈良先端大、[3]京大院・生命科学、[4]東大院・農学生命科学)

○Tasuku Kawamata[1], Naoya Sugi[1], Thi Ngoc Quynh Le[1], Takaaki Kimoto[2], Ayaka Kiyonaga[1], Megumi Iwano[3], Hiroaki Iwai[1], Shinobu Satoh[1], Seiji Takayama[4], Hiroshi Shiba[1] ([1]Univ. of Tsukuba, [2]NAIST, [3]Kyoto Univ., [4]Univ. of Tokyo)

【背景・目的】タペート組織は葯壁の最も内側に存在し、花粉の発達に必要な様々な物質を供給する。この組織は花粉の成熟に伴いプログラム細胞死 (PCD) をおこし崩壊する事が報告されているが、どのようにして PCD が誘起してくるのか等、未だ不明な点が多い。また近年、タペート組織の崩壊に先立ち広範囲なゲノム DNA メチル化が報告されているが、葯の崩壊とゲノム DNA メチル化の関係についても不明である。演者らは、これまでタペート組織特異的かつゲノムワイドな H3K9 メチル化、sRNA 産生に関わる 2 本鎖 RNA 切断酵素 Dicer like 3 (DCL3) をコードする遺伝子の組織特異的な発現亢進、当該遺伝子の欠損株（*dcl3*）における H3K9 メチル化の消失を観察しており、自然受粉時に花粉管の伸長が減少し、その結果、種子形成の低下に繋がることを明らかにしている。本報では、エピジェネティックな制御機構が自然受粉時における受粉効率の低下とタペート組織の PCD に直接影響を与えていると考え、sRNA 産生、DNA メチル化、H3K9 メチル化に係るエピジェネティック制御因子欠損株におけるタペート組織の挙動について詳細に解析した。

【方法・結果】演者らは、まず *dcl3* 欠損株で見られた受粉効率低下が DNA メチル化、H3K9 メチル化の低下でも起こることを明らかにするため、維持型 DNA メチル化酵素欠損株 (*met1*)、H3K9 メチル化酵素欠損株 (*kyp*) を調べたところ、*dcl3* 欠損株と同等の受粉効率低下が観察された。また DCL3 の機能を補完する事が知られている DCL2 および DCL4 を含む *dcl* 三重欠損株 (*dcl2/dcl3/dcl4*) を調べたところ、*dcl3* 欠損株と同等の表現型が観察されたが、相加的な影響は見られなかった。次に、上記受粉効率低下が葯にどのような影響を与えた結果によるものかを検証するため、各欠損株の葯組織切片を作成し観察したところ、野生株ではタペート組織が完全に崩壊している開花直前の時期においても、タペート細胞が部分的に葯に存在している事が分かった。そこで、上記欠損株で見られたタペート組織崩壊遅延の原因として、タペート組織で起こる PCD のエピジェネティック制御の可能性を検証した。活性酸素種 (ROS) の発生による PCD は、タペート組織の崩壊に関わることが報告されている。*dcl* および *kyp* 欠損株の葯を Nitroblue Tetrazolium 染色し ROS を検出したところ、野生型に比べていずれの欠損株でも ROS の発生が低下していた。この結果は、ROS の発生を消去するスカベンジャー酵素がエピジェネティック制御を受けている可能性を示唆する。現在、タペート組織においてエピジェネティックな制御を受ける ROS スカベンジャー酵素遺伝子の特定を進めており、本報では、葯タペート組織で見られるエピジェネティック制御機構と PCD の関係について議論したい。

anther tapetum, epigenetic regulation, Programmed cell death (PCD)

講演番号：3E7a05
講演日時：3 月 26 日 09:44～ 1 号館 E7 会場

カラスビシャクの有用多糖アラバン合成関連遺伝子の探索

Search for genes involved in biosynthesis of araban, a useful polysaccharide from *Pinellia ternata*

○下川 響[1]、田中 宏幸[2]、江口 壽彦[3]、松岡 健[1,3,4]（[1]九大・院生資環、[2]九大・院薬、[3]九大・生環セ、[4]九大・院農）
○Hibiki SHIMOKAWA[1], Hiroyuki TANAKA[2], Toshihiko EGUTI[3], Ken MATUOKA[1,3,4] ([1]Kyushu Univ., Grad. Sch. Bio-Environ. Sci., [2]Kyushu Univ., Fac. Pharm., [3]Kyushu Univ., Biotron Appl. Ctr., [4]Kyushu Univ., Fac. Agr.)

【背景・目的】
カラスビシャク（*Pinellia ternata*）の塊茎は、「半夏」と呼ばれる生薬の原料である。半夏は制吐の効能を持ち、多くの漢方製剤に含まれる使用量の多い生薬であり、有用成分としてアラバンと呼ばれるアラビノースを主な構成糖とする多糖を持つ。カラスビシャクのアラバンは、アラビノースの他にも複数の糖を含む枝分かれ構造を持つと推定されているが、その生合成経路については全く分かっていない。そこで我々は、アラバン生合成系を解明するために、まず、カラスビシャクの各器官におけるアラバンの蓄積量と相関を示す、アラビノース転移酵素に対する cDNA を単離同定することを目標とした研究を進めた。
【方法】
我々のカラスビシャクコレクションから、Y 系統の植物を実験材料として研究を進めた。まず、この系統の各器官（葉、葉柄、根、塊茎）から抽出した画分における、抗アラバンモノクローナル抗体反応性多糖の存在とその量を、多糖の電気泳動による分離後免疫ブロッティングを行うことにより検討した。またそのシグナルの強度から、アラバンの定量を行った。中国産カラスビシャク塊茎の RNAseq データとハナタバコ（*Nicotiana alata*）のアラビノース転移酵素のアミノ酸情報をもとに、カラスビシャクのアラビノース転移酵素オルソログの全長 cDNA 候補配列を作成した。次いで、この配列をもとに作成したプライマーを用いて、上記各器官に由来する cDNA を鋳型にして、アラビノース転移酵素オルソログの全長 cDNA を単離しそれらの塩基配列を決定した。
【結果】
上記の電気泳動-免疫ブロッティング法により、各器官に存在するアラバンの定量を行ったところ、塊茎にはアラバンの存在が確認されたが、葉、葉柄、根の抽出液中には抗体反応性の多糖が検出されなかった。
推定アラビノース転移酵素は、およそ 518 アミノ酸残基からなるタンパク質をコードしていた。また中国産のものより Y 系統由来のものは全て 1 残基長いアミノ酸配列をコードしていた。さらに、葉、根、塊茎から単離したクローンの塩基配列を比較したところ、複数の塩基置換が認められた。現在、これらのクローンに対応するそれぞれの遺伝子の器官別の発現パターンと、アラバン蓄積パターンの比較を進めるために、個々の遺伝子の発現を特異的に検出する条件の設定を進めている。

medicinal plant, functional glycan

発表責任者：下川　響（2BE17404M@s.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3E7a06
講演日時：3 月 26 日 10:05～ 1 号館 E7 会場

野生イネにも保存されているファイトアレキシン生産制御因子 DPF の機能解析
DPF, a transcription factor regulating the biosynthesis of diterpenoid phytoalexins, is functionally conserved in wild rice
○冨山 詩歩[1]、川原 玲香[2]、宮本 皓司[3]、山根 久和[3]、豊増 知伸[4]、野尻 秀昭[1]、岡田 憲典[1]([1]東大・生物工学セ、[2]東農大・ゲノムセ、[3]帝京大・バイオ、[4]山形大・農)
○ Shiho TOMIYAMA[1], Ryouka KAWAHARA[2], Koji MIYAMOTO[3], Hisakazu YAMANE[3], Tomonobu TOYOMASU[4], Hideaki NOJIRI[1], Kazunori OKADA[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Tokyo Univ. of Agric., [3]Teikyo Univ., [4]Yamagata Univ.)

【背景と目的】栽培イネ *Oryza sativa* の防御応答のひとつに、モミラクトン類やファイトカサン類といったジテルペン型ファイトアレキシン（DP）の生産が挙げられる。これらの生合成遺伝子群は染色体上で遺伝子クラスターを形成する特徴を持ち、また、$CuCl_2$ 処理をはじめ様々なストレスに応答して同調的な発現誘導を示す。我々はイネにおける DP 生合成遺伝子クラスターの制御機構と進化起源を追究する目的で、野生イネに着目し研究を進めている。これまでに、野生イネのうち DP 生産能を有する種のみならず生産能を持たない種においても、栽培イネの DP 生合成遺伝子クラスターに相当する領域に DP 生合成遺伝子と相同性を持つ遺伝子が存在すること、さらにそれらがストレス処理により同調的に発現誘導を受けることを報告した。これは、イネ属が、DP 生産能を獲得する以前より遺伝子クラスターの同調的発現制御機構を有していたことを示唆する。野生イネにおける同調的発現制御機構の保存性に興味が持たれたことから、本年度は栽培イネで DP 生合成遺伝子クラスターのマスターレギュレーターと考えられている bHLH 型転写因子 DPF に着目し、野生イネの DPF ホモログ探索と機能解析を行った。
【方法と結果】進化的距離を保つ 4 種の野生イネ（*O. rufipogon*、*O. punctata*、*O. brachyantha*、*Leersia perrieri*）について、BLAST 検索および $CuCl_2$ 処理時の RNA-seq のデータの解析により、$CuCl_2$ 誘導性を示す *DPF* ホモログ遺伝子を見出し、それぞれ *OrDPF*、*OpDPF*、*ObDPF*、*LpDPF* とした。ゲノム情報からの推定および RACE 法により各遺伝子の CDS 全長の配列を決定し、トウモロコシユビキチンプロモーター下流で各遺伝子を恒常的に発現するコンストラクトを作製した。これらを栽培イネの葉身由来プロトプラストに導入し一過的に発現させたところ、4 種の DPF ホモログいずれを導入した場合にも、栽培イネの DPF を導入した場合と同様にプロトプラスト内の DP 蓄積量が顕著に増加した。この結果は、野生イネに保存されている DP 生合成遺伝子クラスター領域の遺伝子発現においても、DPF を介した制御機構が働く可能性を支持するものである。現在、これら 4 種の DPF ホモログについて、栽培イネの DP 生合成遺伝子のプロモーターに対するエフェクター活性をレポータージーンアッセイにより調べている。
【参考文献】Miyamoto, et al. (2016) The Plant Journal, 87(3), 293-304.

wild rice, phytoalexin, gene cluster

講演番号：3E7a07
講演日時：3 月 26 日 10:16～ 1 号館 E7 会場

大腸菌を用いたレタス由来ガラクチノール合成酵素遺伝子の機能解析

Functional analysis of galactinol synthase gene from *Lactuca sativa* in *Escherichia coli*

○木村 太喜[1]、黒川 将[1]、益田 時光[2]、本城 賢一[2]、宮本 敬久[2]([1]九大院生資環、[2]九大院農)
○ Taiki KIMURA[1], Masaru Kurokawa[1], Yoshimitsu Masuda[2], Ken-ichi Honjoh[2], Takahisa Miyamoto[2] ([1]Kyushu Univ., Grad. Sch. Bioenv. Sci., [2]Kyushu Univ., Fac. Agr.)

生食用野菜の主要品目であるレタスは特に凍結に弱く、低温応答に関する研究例が少ない。そこで、レタスに凍結耐性を付与することができれば、長期保蔵に資するところが大きく、価格や供給の安定化につながることが期待される。これまでに当研究室では、レタス由来の 48 種類の低温誘導性遺伝子を同定している。その中でも適合溶質として環境ストレス耐性の獲得に寄与するラフィノース属オリゴ糖の合成に重要な *Galactinol synthase*（*GolS*）遺伝子については全鎖長 cDNA が取得され、大腸菌の発現ベクターである pCold-TF ベクター（pCold）に導入されている。そこで本研究では、組換え大腸菌を用いた本 GolS 遺伝子（*LsGolS*）の機能解析を試みた。

まず、*LsGolS* が導入された形質転換体 *E. coli* DH5α/pCold-*LsGolS* において、N 末端に His-TF タグが付加された融合タンパク質として LsGolS を発現させ、カラム精製ならびにタグの切断除去により、LsGolS の推定分子質量に相当する約 38 kDa のタンパク質を精製した。精製後のタンパク質に GolS の基質となる UDP-ガラクトース、*myo*-イノシトールを加えて反応させ、示差屈折計を検出器とした高速液体クロマトグラフィーにより反応液を分析した。その結果、ガラクチノール標準品のピークと同一の保持時間でピークが検出されたことから、カラム精製により得られたタンパク質は GolS としての酵素活性を有することが示された。次に、同活性は融合タンパク質においても確認できたため、*LsGolS* 高発現大腸菌の凍結ならびに塩ストレス耐性を調べた。同大腸菌と *LsGolS* を導入していない大腸菌を-80˚C と 37˚C で凍結融解を繰り返す処理に供し、LB 寒天培地に塗抹後算出した生残率は *LsGolS* 高発現大腸菌の方が優位に高かった。この凍結処理後の菌液を CFDA-PI 二重染色し蛍光顕微鏡観察を行ったところ、*LsGolS* 高発現大腸菌の方が PI により染色されにくかった。また、0.2、0.4 M NaCl 含有 LB 寒天培地においても、*LsGolS* 高発現大腸菌の方が顕著な増殖速度の増加を示した。

ガラクチノールは細胞膜およびタンパク質の保護機能や浸透圧調節作用などによって植物を環境ストレスから守ることがよく知られている。したがって、LsGolS が菌体内においてもガラクチノールを合成し、細胞膜の損傷や増殖開始までの誘導期の延長を緩和することで大腸菌の凍結ならびに塩耐性向上に寄与したものと考えられた。ゆえに、レタス中の GolS もストレス条件下で他の植物中の GolS と同様に機能することが示唆された。

galactinol synthase, lettuce, *E. coli*

講演番号：3E7a08
講演日時：3 月 26 日 10:27～ 1 号館 E7 会場

Plant AT-rich sequence and zinc-binding protein(PLATZ)転写因子 7 および 8 は植物の形態形成に関与する
Plant AT-rich sequence and zinc-binding protein(PLATZ) transcription factor 7 and 8 are involved in plant morphogenesis
○瀬古 友梨恵[1]、田部 記章[2]、田茂井 政宏[1]、重岡 成[1] ([1]近畿大院農、[2]奈良先端大)
○Yurie Seko[1], Noriaki Tanabe[2], Masahiro Tamoi[1], Shigeru Shigeoka[1] ([1]Grad.Sch.Agr.,Kindai Univ., [2]NAIST)

【目的】
サツマイモの塊根形成機構を明らかにする過程で、不定根原基で特異的に発現する遺伝子として *Plant AT-rich sequence and zinc-binding protein*（*IbPLATZ*）を同定した。*PLATZ* 遺伝子はエンドウマメで初めて単離され、転写因子であることが予想されたが、生理機能についてはほとんど明らかにされていない。*IbPLATZ* をシロイヌナズナ野生株に恒常的に発現させたところ、*IbPLATZ* 恒常発現株の葉は歪曲し、生育阻害が見られた。このことは、IbPLATZ が形態形成に関わることを示唆した。一方、モデル植物であるシロイヌナズナのゲノムにも 12 種類の *PLATZ* 遺伝子（*AtPLATZ1～12*）がコードされているが、生理機能についての報告は少ない。そこで、本研究では、AtPLATZ 転写因子ファミリーの組織特異的発現解析と、それぞれ遺伝子の破壊株、恒常発現株および優性抑制株を作出した。特に、根で強い発現を示した AtPLATZ7 および 8 は形態形成に関与する転写抑制因子であることを明らかにした。
【方法・結果】
シロイヌナズナの葉および根における *AtPLATZ1～12* の発現を半定量的 RT-PCR により解析した。その結果、*AtPLATZ7* の発現は根特異的であり、*AtPLATZ8* の発現も葉と比較して根で強かった。一方、*AtPLATZ1*、*2*、*3*、*11*、および *12* は葉と根において恒常的に発現していた。また、*AtPLATZ4*、*5*、*6*、*9*、および *10* の発現は、いずれの組織においても低かった。次に、*AtPLATZ1～12* をそれぞれ恒常的に発現させた形質転換シロイヌナズナ（T_3）を作出した。その中で *AtPLATZ7* および *8* の恒常発現株は葉が歪曲したことから、これらは植物の形態形成に関わることが示唆された。そこで AtPLATZ7 および 8 の機能を明らかにするために、T-DNA 挿入による *AtPLATZ7* および *8* 破壊株を単離した。それぞれの単独遺伝子破壊株は野生株との間に表現型の差は認められなかったことから、AtPLATZ7 および 8 は互いに機能相補している可能性が考えられた。一方、*AtPLATZ7* および *8* 遺伝子の C 末端側に転写抑制ドメインである SRDX を融合したタンパク質をシロイヌナズナ野生株に恒常的に発現させた AtPLATZ7 および 8 優性抑制株では、葉が歪曲し、生育阻害がみられた。以上より、AtPLATZ7 および 8 が転写抑制因子であることが明らかになった。そこで、AtPLATZ7 および 8 による形態形成制御への関与を解析するため、酵母 two-hybrid 法を用いた AtPLATZ7 および 8 との相互作用因子の同定と、*AtPLATZ7* および *8* 遺伝子破壊株および恒常発現株において発現変動を示す標的遺伝子の探索を試みている。

Arabidopsis thaliana, transcription factor, plant morphogenesis

講演番号：3E7a09
講演日時：3 月 26 日 10:38～ 1 号館 E7 会場

葉緑体型アスコルビン酸ペルオキシダーゼ遺伝子(*APXII*)の選択的スプライシング制御因子の解析

Analysis of alternative splicing regulator in spinach chloroplastic *ascorbate peroxidese*(*APXII*)

○大原 晨亜[1]、田部 記章[2]、吉村 和也[3]、田茂井 政宏[1]、重岡 成[1] ([1]近畿大院農、[2]奈良先端大、[3]中部大応生)
○Shina OHARA[1], Noriaki TANABE[2], Kazuya YOSHIMURA[3], Masahiro TAMOI[1], Shigeru SHIGEOKA[1] ([1]Kinki Univ. of Agric., [2]NAIST, [3]Chubu Univ. of Sci.Coll.Biosci.Biotech)

【目的】

アスコルビン酸ペルオキシダーゼ(APX)は、アスコルビン酸を電子供与体として活性酸素種の一種である過酸化水素を消去する酵素である。ホウレンソウでは、葉緑体型 APX をコードしている遺伝子である *APXII* 遺伝子が、選択的スプライシング(AS)されることによりストロマおよびチラコイド膜に局在する 2 種類の APX アイソザイム(sAPX、tAPX)を生成する。この AS 機構は、*APXII* 遺伝子のイントロン 12 に存在するスプライシング制御配列(SRE)によって制御されており、SRE に結合する核タンパク質の存在が示唆されたが、未だ同定には至っていない。一方、シロイヌナズナでは *sAPX* 遺伝子および *tAPX* 遺伝子は別々の遺伝子にコードされているため、2 種類の APX 生成に AS を必要としない。しかし、シロイヌナズナにホウレンソウの *APXII* 遺伝子を導入したところ、*APXII* 遺伝子は正確に AS され、2 種類の APX アイソザイム mRNA が生成されたことから、AS 制御機構は植物間で広く保存されていることが示唆された。そこで本研究では、遺伝学的解析手法が確立されているシロイヌナズナを用いて、*APXII* 遺伝子の AS を制御するトランス因子の同定および解析を試みた。

【方法・結果】

ホウレンソウの *APXII* 遺伝子の AS に必須な領域をルシフェラーゼ(Fluc)遺伝子内部に挿入させた遺伝子をシロイヌナズナに導入し、*Fluc* 遺伝子が tAPX 型にスプライシングされた場合のみ Fluc 発光が見られる形質転換体を作出した。この形質転換体を EMS 処理して得られた株のスクリーニングを行ったところ、Fluc 発光が消失した変異株を 1 株単離した。この変異株では、tAPX 型 mRNA 量が減少していたことから、この変異株を *APXII alternative splicing inhibition 1* (*asi1*)とした。*asi1* 株における AS 効率変化の原因遺伝子を同定するために全ゲノム配列を解読したところ、1 つの RNA 結合タンパク質(RBP)をコードしている遺伝子のエキソン 1 の 3’側に存在する CAG(Gln)が TAG(stop)へと変異していた。この変異が *asi1* 株における AS 効率変化の原因であることを確認するために、*RBP* の変異型遺伝子および野生型遺伝子をそれぞれ *asi1* 株へ導入した。その結果、変異型 *RBP* 導入株では Fluc 発光は消失していたのに対し、野生型 *RBP* 導入株では Fluc 発光が回復した。さらに、変異型 *RBP* 導入株では tAPX 型 mRNA への AS は抑制されていたのに対して、野生型 *RBP* 導入株では tAPX 型 mRNA への AS が回復した。これらの結果は、RBP が *APXII* の AS 制御に機能していることを示唆している。現在、RBP による SRE への特異的結合能をゲルシフトアッセイにより解析している。

alternative splicing, spinach, *ascorbate peroxidese*

講演番号：3E7a10
講演日時：3 月 26 日 10:49～ 1 号館 E7 会場

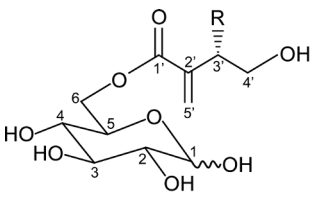
チューリップ栽培品種におけるジアシル型チューリッポシド類の存在

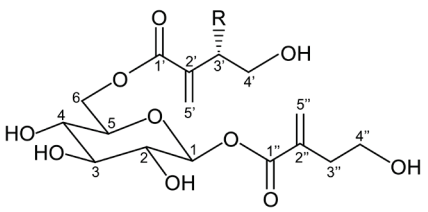
Occurrence of diacyl type of tuliposides in tulip cultivars

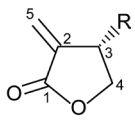
○野村 泰治[1,2]、山口 航平[2]、荻田 信二郎[3]、加藤 康夫[1,2] ([1]富山県立大・生工研セ、[2]富山県立大・生物工、[3]県立広島大・生命科学)
○Taiji NOMURA[1,2], Kohei YAMAGUCHI[2], Shinjiro OGITA[3], Yasuo KATO[1,2] ([1]Biotechnol. Res. Cent., Toyama Pref. Univ., [2]Dep. Biotechnol., Toyama Pref. Univ., [3]Dep. Life Sci., Pref. Univ. Hiroshima)

【目的】チューリップ栽培品種の組織中には 6-アシルグルコースである 6-チューリッポシド類（6-PosA、6-PosB）が二次代謝産物として著量含まれており、これらはチューリップ組織内在の PosA 変換酵素（tuliposide A-converting enzyme; TCEA）および PosB 変換酵素（TCEB）によって、抗菌活性物質であるアグリコンのラクトン化体、チューリッパリン（Pa）A および PaB へとそれぞれ変換される。一方で、チューリップ原種には、6-Pos 類に加えて 1,6-ジアシル型 Pos 類である PosD や PosF が比較的高濃度で存在している。本研究では、これまでに PosD および PosF の存在の報告がない栽培品種において、両化合物の有無ならびに含有量を組織別に精査した上で、それらの単離、同定を行うことを目的とした。

【方法と結果】無作為に選抜した 25 種類のチューリップ栽培品種を土耕栽培し、開花期の植物体を各組織（球根、根、茎、葉、花弁、めしべ、葯、花糸）に分離後、含水メタノールによる抽出液を逆相系 HPLC によって分析した。その結果、ほとんどの品種／組織において PosD、PosF は検出されなかったが、品種「オルカ」の花弁と「モンテカルロ」のめしべで PosD、「紫水晶」と「ヤンバンネス」のめしべで PosF の標品と同一の保持時間を与えるピークが微量成分として検出された。TCEA および TCEB がそれぞれ PosD および PosF の 6 位アシル側鎖に作用し、前者からは PaA と 1-PosA が、後者からは PaB と 1-PosA が生成するという、我々が最近見いだした知見[1)]に基づいて、組織粗抽出物を基質とした酵素反応を行ったところ、当該ピークの消失が確認された。そこで、「オルカ」花弁および「紫水晶」めしべ（各 1 kg）から、ODS カラムクロマトグラフィーおよび逆相系分取 HPLC によって PosD および PosF の単離をそれぞれ行った結果、前者からは 17 mg の PosD が、後者からは 8.9 mg の PosF が得られた。これは、チューリップ栽培品種からのジアシル型 Pos 類単離の初の例であり、原種に比べると含有量は少ないものの、栽培品種にもジアシル型 Pos 類が存在することが明らかとなった。







1) Nomura *et al*. (2018) *Appl. Biochem. Biotechnol.*, in press

tulipalin, tuliposide, tuliposide-converting enzyme

発表責任者：野村泰治（tnomura@pu-toyama.ac.jp）

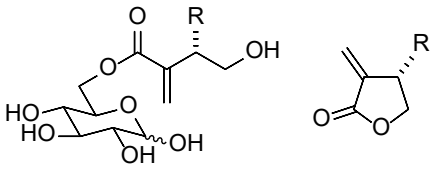
講演番号：3E7a11
講演日時：3 月 26 日 11:10～ 1 号館 E7 会場

アシル側鎖末端 deoxy 型基質によるチューリッポシド変換酵素の阻害

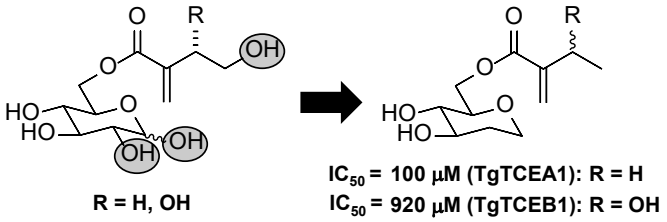
Inhibition of tuliposide-converting enzyme by substrate analogues having ω-deoxy acyl side chain

○二永 貴[1]、野村 泰治[1,2]、北岡 直樹[1,2]、加藤 康夫[1,2] ([1]富山県大院・工、[2]富山県大・生工研セ)
○Takashi FUTANAGA[1], Taiji NOMURA[1,2], Naoki KITAOKA[1,2], Yasuo KATO[1,2] ([1]Grad. School Eng., Toyama Pref. Univ., [2]Biotechnol. Res. Cent., Toyama Pref. Univ.)

【目的】チューリップ組織中に著量含まれるグルコースエステル、チューリッポシド(Pos) 類 (PosA、PosB) はチューリップの主要二次代謝産物であり、これらはチューリップ組織内在の PosA 変換酵素 (tuliposide A-converting enzyme; TCEA) および PosB 変換酵素 (TCEB) によって、抗菌活性物質であるアグリコンのラクトン化体、チューリッパリン (Pa) A および PaB へとそれぞれ変換される。TCE はカルボキシルエステラーゼファミリーに属するが、Pos 類の加水分解反応ではなく、分子内エステル転移によるラクトン形成反応のみを触媒するユニークな酵素である。その反応機構は、Pos 類と TCE がアシル酵素複合体を形成した後、水分子ではなく基質末端の水酸基の活性化と分子内求核反応を経ることで、Pa 類のラクトン構造を形成すると推定されている[1)]。本研究では TCE の X 線結晶構造解析のための安定な酵素-阻害剤複合体の調製を目指し、基質認識機構を加味した阻害剤をデザイン、合成することを目的とした。



【方法と結果】阻害剤のデザインに向けてアルコール部位改変基質を用いた基質認識機構の調査を行ったところ、dideoxy glucose (^{dd}Glc) を持つ類縁体で K_m 値が低下し、酵素との親和性の向上がみられた[2)]。しかし本類縁体の k_{cat} 値は天然型 Pos 類に対する値と同程度であったため酵素反応は進行し、阻害活性も確認されなかった。そこで更なる k_{cat} 値の低下による酵素反応の阻害を目指し、分子内エステル転移が進行しないような構造であるアシル側鎖末端 deoxy 型 Pos 類を用いて検討することとした。末端 deoxy 型アシル側鎖部分 (PosA/B 型) およびアルコール部位をそれぞれ合成し、縮合と脱保護を経て計 4 種の基質類縁体へと誘導した。これらを基質として、大腸菌で発現させた組換え TCE (TgTCEA1、TgTCEB1) を用いて酵素活性を測定したところ極微弱な加水分解活性のみを示した。反応速度論解析より、本酵素はこれらの類縁体に対し Pos 類や ^{dd}Glc 型 Pos 類よりも 1/50~1/4 程度の低い K_m 値および k_{cat} 値を示すことが明らかとなった。そこでこれら化合物の TCE に対する阻害活性を調べたところ、その半数阻害濃度 IC_{50} 値は 1 mM 以下であり強力に本酵素活性を阻害することが分かった。



1) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2017**, 81, 81-94.
2) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, in press

lactone-forming carboxylesterase, tuliposide, inhibition

講演番号：3E7a12
講演日時：3 月 26 日 11:21～ 1 号館 E7 会場

シコニンのアシル化に関与するムラサキのアシル基転移酵素 LeOAT の機能解析
Functional analysis of acyltransferases involved in shikonin acylation in *Lithospermum erythrorhizon*.

○押切 春佳[1]、渡辺 文太[2]、山本 浩文[3]、矢崎 一史[4]、高梨 功次郎[1,5]([1]信州大・総合理工、[2]京大・化研、[3]東洋大・生命科学、[4]京大・生存研、[5]信州大・理)
○Haruka OSHIKIRI[1], Bunta WATANABE[2], Hirobumi YAMAMOTO[3], Kazufumi YAZAKI[4], Kojiro TAKANASHI[1,5] ([1]Grad. Sch. of Sci. & Tech., Shinshu Univ., [2]ICR, Kyoto Univ., [3]Fac. of Life Sci., Toyo Univ., [4]RISH, Kyoto Univ., [5]Fac. of Sci., Shinshu Univ.)

【目的】

薬用植物ムラサキ (*Lithospermum erythrorhizon*) は根の表皮に紅色を呈するナフトキノン誘導体であるシコニンを生産する。シコニン類縁体のほとんどはアシル化修飾を受けアポプラストに輸送されるが、その生合成および輸送機構は未だ全容解明に至っていない。先行研究において、トランスクリプトーム解析および比較プロテオーム解析からシコニン生産時に発現が上昇する BAHD アシル基転移酵素 LeOAT が 5 分子種見出された（LeOAT1~5、以下 LeOATs とする）。本研究では LeOATs がシコニン類縁体の形成に寄与すると推測し、LeOATs の機能解析を行うことでアシル化シコニンの生合成反応を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

ムラサキ植物体の根およびシコニン生産条件の培養細胞から調製した cDNA を鋳型として BAHD アシル基転移酵素 2 分子 (LeOAT2, 3) をクローニングした。LeOAT2 のコドンを大腸菌発現に至適化し、コールドショック発現系の利用およびシャペロンとの共発現を行うことで LeOAT2 の大腸菌発現に成功した。His-tag による精製を行った LeOAT2 を用いて酵素活性測定を行ったところ、シコニンおよびアセチル CoA を基質とした際にアセチルシコニンが生成された。さらに、LeOAT2 はイソブチリル CoA およびイソバレリル CoA のいずれも基質として認識し、それぞれ対応するアシル化シコニンを生成した。一方、LeOAT2 はシコニンのエナンチオマーであるアルカニンを基質として認識しなかった。続いて、LeOAT3 の機能解析をタバコ葉を用いて行ったところ、LeOAT3 は LeOAT2 と異なりアルカニンを基質として種々のアシル化アルカニンを生成した。その一方で、LeOAT3 はシコニンを基質として認識しなかった。これらの結果から、LeOATs がシコニンやアルカニンのアシル化活性を有すること、および LeOATs が明確に機能分担していることが推測された。

Shikonin, *Lithospermum erythrorhizon*, Acyltransferase

発表責任者：高梨功次郎（takanashi@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3E7a13
講演日時：3 月 26 日 11:32～ 1 号館 E7 会場

トマト根からのトマチン分泌の解析
The analysis of tomatine secretion from tomato roots
○大野 滉平、中安 大、矢崎 一史、杉山 暁史（京大・生存研）
○Kohei OHNO, Masaru NAKAYASU, Kazufumi YAZAKI, Akifumi SUGIYAMA (RISH., Kyoto Univ.)

植物の根から影響を受ける土壌領域は根圏と呼ばれる。根圏には植物の根から、糖やアミノ酸、有機酸、二次代謝産物など様々な化合物が分泌されることが知られている。根分泌物と総称されるこれらの化合物は根圏微生物の栄養源となる他、根粒の形成や病害虫からの防御、無機栄養の吸収等、様々な現象に密接に関与し、植物生育に重要な役割を担う。ダイズ（*Glycine max*）においては、トリテルペノイド骨格に複数の糖が結合した構造を持ち、アレロケミカルとしての機能が示唆されてきたソヤサポニンが根から分泌されることを明らかにしたが（津野ら、日本農芸化学会 2018 年度大会、Tsuno et al., Plant Cell Physiol., 2018）、サポニン類の根圏における機能については大部分が未解明である。トマト（*Solanum lycopersicum*）はステロイド骨格に複数の糖が結合した構造を持つα-トマチンを生合成し、茎葉や花、未登熟果実、根などの各器官に蓄積する。トマチンは動物や昆虫、微生物に対して有毒であり、様々な生物活性が報告されているが根圏での機能は不明である。そこで、本研究ではトマトにおけるトマチンの根からの分泌と根圏における機能解明を目的とした。

ダイズ根からのサポニン分泌は、生育段階により量や組成が変動する。トマトにおいても生育過程を通じたトマチンの生合成及び分泌を解析するため、トマトを水耕栽培に供試し、2 週間ごとの器官別の蓄積量及び水耕液中への分泌量を調べることとした。トマチン及びそのアグリコンであるトマチジンの分析は LC-MS を用いて行った。測定の結果、播種後 3 週のトマトでは、一日当たり 0.65 nmol・plant^{-1} (50 nmol・g^{-1} root FW) 、播種後 5 週のトマトでは、一日当たり 2.5 nmol・plant^{-1} (11 nmol・g^{-1} root FW) のトマチンの分泌が確認された。個体当たりの分泌量は、播種後 5 週において播種後 3 週より多かったが、根の単位質量当たりの分泌量では播種後 3 週において播種後 5 週より多かった。分泌物中には、トマチンと比較して微量ではあるが、トマチジンも検出された。

また、傷害や病害に対する防御応答の誘導に関与するジャスモン酸メチルで処理することによって、トマト植物体でのトマチンの蓄積量が増加することが知られている。現在、植物ホルモン処理がトマチンの分泌に与える影響を調べるため、ジャスモン酸メチル等の処理によるトマチンの分泌量への影響についても測定を進めている。

tomatine, tomato, rhizosphere

発表責任者：大野滉平（ohno.kohei.38r@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3E7a14
講演日時：3 月 26 日 11:43～ 1 号館 E7 会場

Enhancer of Flavonoid Production（EFP）によるカルコン合成酵素の活性化メカニズムの解析

Analysis of molecular mechanism involved in activation of chalcone synthase by means of Enhancer of Flavonoid Production

○和氣 駿之、中野 拓也、宇野 海地、高橋 征司、中山 亨（東北大院・工）
○Toshiyuki WAKI, Takuya NAKANO, Kaichi UNO, Seiji TAKAHASHI, Toru NAKAYAMA (Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ.)

フラボノイドは陸上植物に普遍的に存在する植物特化代謝産物の一群であり，植物の生育に重要な役割を果たす．植物細胞内では，フラボノイド代謝経路を構成する酵素群のタンパク質間相互作用による多酵素複合体，メタボロンの存在が示されており[1,2]，これにより生合成の高効率化が図られていると想定されている．我々は近年，ダイズやキンギョソウ，トレニアを対象としたメタボロン形成の解析から，フラボノイド生合成の初発酵素であるカルコン合成酵素（CHS）がカルコン異性化酵素（CHI）フォールドファミリーのⅣ型に分類されるタンパク質（Enhancer of Flavonoid Production, EFP）と直接的に相互作用することを明らかにした．EFP は CHI と似た一次構造と立体構造を有するが，CHI としての触媒残基を持たない．しかし，EFP の欠失・発現抑制はアサガオやトレニア花弁のアントシアニン量の減少につながることから[3], EFP は何かしらの機構によりフラボノイド量に影響することが示唆されていた．我々は，EFP が CHS と相互作用することに着目し，EFP が CHS の *in vitro* アッセイに与える影響を解析した．その結果，EFP は CHS の比活性を大きく上昇させること，CHS の副生成物である coumaroyl triacetic acid lactone（CTAL）の生成を抑制し主生成物であるカルコンの生成量を増強させることを明らかにした．さらに，この CHS と EFP の相互作用や EFP の機能は，上述の双子葉植物だけでなく，シロイヌナズナやアサガオ，単子葉類のイネ，裸子植物のイチョウ，シダ植物のイヌカタヒバ, コケ植物のヒメツリガネゴケにおいても同様に観察され, 陸上植物における EFP の機能の普遍性・重要性を明らかにしてきた．

本研究では，EFP による CHS の活性化・生成物特異性制御の作用機序を明らかにすることを目的として，CHI と EFP の結晶構造が明らかとなっているシロイヌナズナの系を主な解析対象として，EFP の CHI ドメインスワップ変異体を作製し，Yeast two-hybrid 法による相互作用解析および CHS の *in vitro* アッセイにおける影響を解析した．その結果, EFP の機能（CHS の活性化・生成物特異性制御）の発現には CHS との直接的な相互作用が重要であることが示唆された．現在，EFP と CHS の相互作用様式の解析を進めている．

【文献】[1] Waki, T. *et al.*, *BBRC*, **469**, 546-551 (2016); [2] Fujino, N. *et al*., *Plant J*., **94**, 372-392 (2018); [3] Morita, Y. *et al*., *Plant J*., **78**, 294-304 (2014)

metabolon, chalcone synthase, enhancer of flavonoid production

講演番号：3E7a15
講演日時：3 月 26 日 11:54～ 1 号館 E7 会場

III 型ポリケチド合成酵素の生成物特異性制御に関する研究
Functional analysis of product specificity of type III polyketide synthase
○宇野 海地、中野 拓也、和氣 駿之、高橋 征司、中山 亨（東北大院・工）
○Kaichi UNO, Takuya NAKANO, Toshiyuki WAKI, Seiji TAKAHASHI, Toru NAKAYAMA (Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ.)

【背景および目的】フラボノイド生合成においては，代謝経路を構成する酵素間のタンパク質間相互作用による動的・可逆的な複合体（メタボロン）の形成により，タンパク質レベルでの代謝調節機構の存在が示されている．これまでに我々は，こうしたメタボロン形成の解析を通して，代謝関連酵素である Chalcone synthase（CHS）と Enhancer of Flavonoid Production（EFP）の相互作用が陸上植物において高度に保存されていることを明らかにした．CHS はフラボノイド生合成の初発酵素であり，*p*-Coumaroyl-CoA をスターター基質として 3 分子の Malonyl-CoA を縮合した後，環化反応を触媒することで Naringenin chalcone を生成する．また *in vitro* における反応では，反応中間体であるテトラケチド中間体がラクトン化した副生成物（*p*-Coumaroyl triacetic acid lactone，CTAL）も生じる．近年，我々は，EFP がこの CHS の副生成物の生成を抑制することを明らかにし，EFP は CHS の生成物特異性を制御することにより主生成物である Naringenin chalcone の生成量を増強させ，植物におけるフラボノイド生合成の高効率化に寄与することを明らかにした．

CHS が属する III 型 Polyketide synthase（PKS）ファミリーには，CHS と配列類似性が非常に高いが生成物特異性の異なる Stilbene synthase（STS）や *p*-Coumaroyltriacetic acid synthase（CTAS）が存在する．これら酵素は CHS と同様に *p*-Coumaroyl-CoA をスターター基質として 3 分子の Malonyl-CoA を伸長基質として用いるが，最終的な環化反応の様式の違いにより主生成物が異なる．これまでのところ，EFP-CHS 間の相互作用ドメインは未解明であり，EFP の機能にも不明な点が多い．そこで，本研究では，EFP による CHS の生成物特異性制御機構に関する理解を深めることを目的として，アジサイ（*Hydrangea macrophylla*）の CTAS（HmCTAS）およびブドウ（*Vitis vinifera*）の STS（VvSTS）に着目し，EFP との相互作用解析および酵素機能解析を行った．

【方法および結果】まず，アジサイの HmCHS および HmCTAS，HmEFP に着目し，Yeast two-hybrid 法およびバイオレイヤー干渉法による相互作用解析を行った．その結果， HmCHS-HmEFP 間において相互作用が確認され，K_D 値は 24.1 nM と算出された．一方，HmCTAS と HmEFP は相互作用が検出されなかった．また，大腸菌組換え酵素を用いた活性測定においては， HmCHS では HmEFP 存在下において Naringenin chalcone の生成量が増加し, CTAL の生成量は減少した一方, HmCTAS では HmEFP 濃度に依らず，主生成物である CTAL 濃度は一定であった．現在，VvSTS において同様の解析を行っており，本発表では VvSTS の解析結果を合わせて報告する．

polyketide synthase, chalcone synthase, enhancer of flavonoid production

講演番号：3E7p01
講演日時：3 月 26 日 13:50～ 1 号館 E7 会場

キンギョソウ由来アントシアニン生合成関連酵素の機能解析

Functional characterization of anthocyanin biosynthetic enzymes from *Antirrhinum majus*.

○古川 楓、石塚 匠、伊藤 圭亮、和氣 駿之、高橋 征司、中山 亨（東北大院・工）
○Kaede FURUKAWA, takumi ISHIZUKA, Keisuke ITO, Toshiyuki WAKI, Seiji TAKAHASHI, Toru NAKAYAMA (Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ.)

【背景・目的】キンギョソウ（*Antirrhinum majus*）は赤色，オレンジ色，黄色，白色などの花弁を有する園芸作物である．キンギョソウの花弁の発色は主にフラボノイド化合物に起因しており，アントシアニンやオーロン，フラボン，フラボノールなどのフラボノイドの蓄積バランスにより多彩な色調を示す．これらフラボノイドの生合成調節には，遺伝子レベルだけでなく，代謝酵素間の複合体（メタボロン）形成を介したタンパク質レベルでの調節機構の存在が示されている．これまでに我々は，キンギョソウにおけるアントシアニン生合成に関わる代謝酵素群のメタボロン形成として，ER 局在性のシトクロム P450 である Flavone synthase（FNS）や Cinnamate 4-hydroxylase（C4H）を足場タンパク質とするメタボロン形成の一端を明らかにした[1]．メタボロン形成の全貌を明らかにすることは，タンパク質レベルでのフラボノイド生産メカニズムを理解する上で非常に重要である．しかし，これまでのメタボロン形成の解析にはアントシアニンやフラボノールの生合成に関わる一部酵素を解析対象としていなかった．そこで，本研究では，メタボロン形成の全貌解明へ向けた解析対象をさらに拡大するため，キンギョソウにおける Anthocyanidin synthase（ANS）や Anthocyanidin 3-*O*-glucosyltransferase（3GT），Flavonol synthase（FLS）をクローニングし，フラボノイド代謝酵素群との相互作用解析および酵素機能解析を行った．

【方法・結果】キンギョソウの ANS，3GT，FLS の遺伝子配列情報は利用可能であったが，その詳細な酵素機能は明らかになっていなかった．そこで，まず，大腸菌組換え酵素を用いてこれら酵素の詳細な活性測定を行った．始めに FLS を His_6 タグ融合タンパク質として大腸菌に発現させ，精製酵素を用いて様々なフラボノイド基質に対して活性測定を行った．その結果，Dihydroquercetin を基質とした場合にフラボノールである Quercetin を生成することが示された．現在，ANS および 3GT を解析中であり，本発表ではこれら酵素の機能解析についても報告する．また，これら酵素と膜タンパク質である FNS および C4H との相互作用を split-ubiquitin system を用いた yeast two-hybrid 法により解析した結果も併せて報告する．

【参考文献】[1] Fujino, N. *et al*., *Plant J*., **94**, 372-392 (2018)

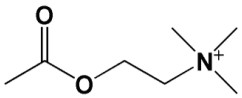
metabolon, anthocyanin, Antirrhinum majus

講演番号：3E7p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ 1 号館 E7 会場

植物のアセチルコリン生合成
Acetylcholine biosynthesis in plants
○村田 純[1]、渡辺 健宏[1]、高橋 俊雄[1]、佐藤 宏明[2]（[1]公益財団法人 サントリー生命科学財団、[2]奈良女子大学 理学部）
○Jun MURATA[1], Takehiro WATANABE[1], Toshio TAKAHASHI[1], Hiroaki SATO[2]（[1]Suntory Foundation for Life Sciences, [2]Nara Women's University）

【背景・目的】アセチルコリン（ACh）は、1914 年にイギリスのヘンリー・デール卿らによって、いわゆる神経伝達物質の最初の例として見いだされた。その後、動物神経組織における ACh の生合成、分解、受容、輸送等の分子機構の詳細が明らかにされてきた。一方、動物の非神経系の組織細胞ばかりか微生物、植物などからも ACh が検出されることから、近年では ACh は神経伝達以外にも様々な生理機能を持つと想定されるようになった**[1]**。実際、腸管上皮組織において ACh は幹細胞の機能維持に関与することが示された**[2]**。植物の場合、ACh は根毛伸長や重力屈性等へ関与する可能性薬理学的実験により示唆されている。しかし一般に動物神経組織よりも数オーダー低いとされる植物の ACh 検出に radio-immuno assay 法や電気化学検出法という間接的な検出系が主に用いられてきたこと、さらには動物では高度に保存されている ACh 合成酵素遺伝子の相同遺伝子の候補が植物に全く見当たらないことから、植物における ACh の存在について確定的な証拠を得る必要があると考えられた。

【結果・考察】そこで演者らは LC-MS/MS 並びに LC-Orbitrap-MS を用い、ACh 含量を直接かつ高速・高精度に定量する系を確立した**[3]**。これにより、シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）およびイラクサ（*Urtica thunbergiana*）組織を材料にした ACh 含量の測定を行った。その結果、これら植物種に ACh が存在することを高精度に確認することができた。またシロイヌナズナとイラクサとで ACh 含量に大きな差があることから、ACh は植物種によっては特徴的な生理機能を持つことも示唆された。以上を踏まえて、植物自身が ACh を生合成する可能性について検証したので報告する。



acetylcholine

[1] Horiuchi, Y. *et al.* (2003) *Life Sci.* 72, 1745.
[2] Takahashi, T., Shiraishi, A. and Murata, J. (2018) *Int. J. Mol. Sci.* 19, 738.
[3] Murata, J. *et al*. (2015) *Plant Signal. Behav.* 10 (10):e1074367

acetylcholine, biosynthesis, *Urtica thunbergiana*

発表責任者：村田純（murata-j@sunbor.or.jp）

講演番号：3E7p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ 1 号館 E7 会場

ダイズの発芽と生育にともなう、 L-アスコルビン酸と L-デヒドロアスコルビン酸の変動

Changes of L-ascorbic acid and L-dehydroascorbic acid during germination and seedling development of Soybean.

○間崎 剛、大谷 はるか、岸本 壮、岸本 未緒、豊場 夕菜、牧野 夏奈子 (名古屋学芸大学管理栄養)
○Takeshi MASAKI, Haruka OTANI, So KISHIMOTO, Mio KISHIMOTO, Yuna TOYOBA, Kanako MAKINO (Nagoya Univ. of Arts and Sci.)

【目的】ビタミンの一種である L-アスコルビン酸（AsA）は、補因子としてコラーゲンやカテコールアミンの合成に必要なだけでなく、活性酸素種の消去を通してがんや動脈硬化の予防にも働く。食品には、AsA が酸化した L-デヒドロアスコルビン酸（DAsA）も含まれている。DAsA は吸収後に体内で還元されて AsA となるため、その効力は AsA と同等とみなされている。そのため、食品成分表には AsA と DAsA の合算値がビタミン C 量として記載されている。食品成分表を読み解くと、大豆（ダイズ種子）にはビタミンCは含まれないが､大豆もやしにはビタミンCが含まれていることがわかる。したがって、種子が発芽してもやしとなる過程で AsA が合成されることがわかる。しかし、種子の発芽と芽生え個体の生育過程において、AsA の合成がいつ頃開始して、いつ頃まで継続するのかは不明である。我々は、ビタミン C を豊富に含む発芽食品（スプラウト）の製造に有用な情報の獲得を目指し、ダイズの発芽と生育にともなうビタミン C（AsA＋DAsA）の変動について調査することとした。

DAsA は熱や光により酸化されやすく、それにより 2,3-ジケト-L-グロン酸を経て分解される。そのため、DAsA よりも AsA を多く含む食材の方が加熱調理によるビタミン C の損失が少ないと言える。しかし、大豆もやしに含まれるビタミン C のうち、どの程度が AsA として、またどの程度が DAsA として存在しているのかは不明である。そこで我々は、DAsA よりも AsA の方を豊富に含む生育段階の特定を目標として、ダイズの発芽と生育にともなう AsA の変動についても調査することとした。

【方法】25℃、暗下に設定した人工気象器にて発芽させたダイズ個体を、2 日おきに回収した。そして、それらの個体から調製した抽出液を用いて、ダイズ 1 個体あたりの AsA 量と DAsA 量を DNPH・HPLC 法にて定量した。また、市販の大豆もやしのそれらとの比較も行なった。

【結果と考察】暗下にて発芽、生育させたダイズのビタミン C 量（AsA＋DAsA）は、播種直後から播種後 4 日目にかけて増加したものの、それ以降は顕著な増加を示さなかった。このことから、種子発芽時の AsA の合成は、発芽直後と芽生えの生長初期に限定されることが明らかとなった。また、ダイズに含まれる DAsA が播種後 8 日目まで継続して増加していたのに対して、AsA は 4 日目以降は減少の一途をたどった。このことから、本研究の生育条件下では DAsA の還元に必要な還元型グルタチオンや NADPH が不足していたものと思われる。また、市販の大豆もやしのビタミン C 量や AsA 量は、本研究にて生育させたダイズのそれらの数分の 1 であることも明らかとなった。このことから、市販の大豆もやしの製造条件では AsA 合成が不調で、酸化ストレスも誘発されていると示唆された。

ascorbate, seed, germination

発表責任者：間崎剛（tmasaki@nuas.ac.jp）

講演番号：3E7p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ 1 号館 E7 会場

オウトウの花芽および葉芽の成熟に伴う経時的な代謝物変動の解明

Metabolic dynamics in developing flower and leaf bud of sweet cherry

○佐藤 紗野[1]、佐々木 亮介[2]、及川 彰[1,2]（[1]山形大院農、[2]理研 CSRS）
○Saya SATO[1], Ryosuke SASAKI[2], Akira OIKAWA[1,2] ([1]Yamagata Univ., [2]RIKEN CSRS)

【背景】

オウトウはバラ科（*Rosaceae*）サクラ属（*Cerasus*）の果樹であり，主な栽培品種としてカンカオウトウ（*Prunus avium* L.），サンカオウトウ（*Prunus cerasus* L.）の二種が優位を占めている．なかでも日本国内で最も多く生産されているのはカンカオウトウであり，‘佐藤錦’‘紅秀峰’などの品種はこれに含まれる．カンカオウトウは腋生花芽型の結果習性を示しており，新梢の先端から数芽に葉芽，基部に近い部分に花芽がつく．4 月下旬に開花後，5 月中旬から 6 月中旬には収穫期を迎える．オウトウの果実には，トリプトファンやメラトニンなど睡眠に関わるとされる代謝物が含まれることが知られており，果実の成熟に伴う代謝物変動もすでに明らかにされている．しかしながら，オウトウの芽内に含まれる代謝物を経時的に解析した例は少ない．そこで本研究では，オウトウ‘佐藤錦’の花芽および葉芽に含まれる代謝物の経時変動を，メタボローム解析技術を用いて網羅的に明らかにすることを試みた．さらに，露地栽培区および促成栽培用加温ハウス栽培区の 2 区でサンプリングすることで，栽培条件の違いによる代謝物含量への影響も検討した．

【方法・結果】

供試材料には山形県寒河江市安達農園植栽のオウトウ‘佐藤錦’を用いた．露地栽培区，加温ハウス栽培区の 2 区に植栽されている複数の樹木から花芽および葉芽をそれぞれ 20 芽ずつ採取し，2018 年 10 月から 2019 年 3 月の 6 ヵ月間，毎月サンプリングを行った．芽はサンプリング後直ちに凍結破砕を行い，内部標準物質入り MeOH で抽出を行った．サンプルに含まれるアミノ酸や有機酸などのイオン性化合物は，液液抽出および限外濾過後，キャピラリー電気泳動質量分析装置（CE-MS）を用いたメタボローム解析により網羅的に分析した．さらにフラボノイドなどの二次代謝物含量を調べるため，抽出液をフィルターで濾過し，液体クロマトグラフィー質量分析装置（LC-MS）に供した．

現在までに 2018 年 10 月分のサンプルの分析が終了している．その結果，オウトウ‘佐藤錦’の花芽および葉芽内には，クロロゲン酸やカテキンなどが多く含まれていた．また，10 月の段階では花芽および葉芽に含まれる代謝物含量に大きな差は認められなかった．今後は 2018 年 11 月から 2019 年 3 月までの芽を同様のメタボローム解析に供することにより，開花期前の花芽および葉芽に含まれる代謝物の差異や，成熟段階における化合物動態の変化を明らかにしていく．

Metabolomics, Sweet cherry, Bud

講演番号：3E7p05
講演日時：3 月 26 日 14:34～ 1 号館 E7 会場

Jatropha curcas 種子に含まれる二次代謝物質の網羅的解析
Metabolic profiling of secondary metabolites in *Jatropha curcas* seeds.
○松久保 康輔、松川 哲也、梶山 慎一郎（近畿大学　生物理工）
○Kosuke MATSUKUBO, Tetsuya MATSUKAWA, Shin'ichro KAJIYAMA (BOST, Kindai Univ.)

[背景及び目的]
Jatropha curcas L. は中南米原産のトウダイグサ科の落葉低木樹であり、種子に重量比で約 50%の流動性に富む油脂を含む。本植物は他の植物の生育に向かない乾燥した荒地でも生育可能であると報告されていることからバイオマス燃料資源植物の候補として注目されている。しかし、植物体全てに発癌プロモーション活性のあるホルボールエステル類を含有するため生産者への健康被害や、環境残留などが懸念されている。*J. curcas* の系統にはホルボールエステルを含まない系統も見出されているが、これらの系統がホルボールエステルのどの段階に修飾を受けているかなど詳細は未だに不明である。そこで、本実験は LC/TOF-MS を利用した代謝産物の網羅的解析手法を用い、ホルボールエステル含有系統及び非含有系統の *J. curcas* の種子に含まれる二次代謝産物の比較を行い，違いの認められた物質についてホルボールエステル生合成との関連について考察することを目的として行った。
[方法及び結果]
植物材料として、*J. curcas* のホルボールエステル含有系統を 2 系統、及び非含有系統の 2 系統の種子を用いた。種子を破砕後，ヘキサンを用いて油脂を除去した。ヘキサン抽出後の残渣をアセトンで抽出し、粗抽出物を得た。粗抽出を C_{18} 逆相系カートリッジカラムに供し、メタノールで溶出することにより、低極性の夾雑物を除去し、分析試料とした。得られた試料を、LC-ESI-Triple TOF (ABSCIEX)に供した。得られたデータをデータマイニングソフト MZmine に供してアライメント等の処理を行い、ピークリストを作成した。作成したピークリストを主成分分析(PCA-X)及び判別分析(O2PLS-DA)に供した。主成分分析の結果、ホルボールエステル含有系統と非含有系統が異なるクラスターを形成した。次に、判別分析によって各系統間の偏差に寄与するピークを見出した。それを基に、各系統のピークエリアに関して t 検定による有意差検定を行った。その結果、有毒系統と無毒系統の間に有意差のある 28 ピークが見出された。現在，これらのピークの構造解析を進めている。

Metabolic profiling, secondary metabolites, *Jatropha curcas*

講演番号：3E7p06
講演日時：3 月 26 日 14:55～ 1 号館 E7 会場

生物の代謝産物として植物で初めて見つかったリボフラビン（ビタミン B2）誘導体（第 3 報）
Riboflavin (vitamin B2) derivatives found for the first time in plant metabolites. (The 3rd report)
○田中 啓介[1]、金子 元優[2]、橋口 純也[2]、佐藤 純一[2]、石井 達也[2]、武田 晃治[3]、吉村 悦郎[4]、新町 文絵[5]、志波 優[6]、川崎 信治[2]、新村 洋一[2]([1]東農大ゲノムセ、[2]東農大バイオ、[3]東農大教職、[4]放送大教養、[5]日大短大生資源、[6]東農大生命科学)
○Keisuke TANAKA[1], Motoyasu kaneko[2], Junya Hashiguchi[2], Junichi Satoh[2], Tatsuya Ishii[2], Kouji Takeda[3], Etsuro Yoshimura[4], Fumie Shinmachi[5], Yuh Shiwa[6], Shinji Kawasaki[2], Youichi Niimura[2] ([1]NGRC, Tokyo Univ. of Agric., [2]Dept. Biosci., Tokyo Univ. of Agric., [3]Education course, Tokyo Univ. of Agric., [4]The Open Univ. of Japan, [5]Dept. of Bioresource Sci., Junior College, Nihon Univ., [6]Fac. Life Sci., Tokyo Univ. of Agric.)

【背景・目的】

双子葉植物では鉄欠乏条件下で根の細胞外にフラビン化合物を分泌することが知られており、ウリ科キュウリ(*Cucumis sativus*)が最も多くフラビン化合物を分泌することが見いだされた(新町ら 1994)。我々は以前に、キュウリの鉄欠乏条件下の水耕液から 4’-keto riboflavin(4’-ketoRf)を見いだし[1)]、ウリ科での分布を報告した[2)]。そして、主にウリ科植物では 4’-ketoRf、一方でナス科植物では 2’-ketoRf の分泌が観察された。両化合物は、生物の代謝産物として植物で初めて見つかった riboflavin（Rf）誘導体である。そこで、本研究はそれら化合物の特性や誘導経路に関する知見を得るために、既知の Rf と酸化鉄の還元可溶化能を比較し、さらに RNA-Seq による解析を試みた。

【方法】

嫌気下、電子供与体 NADH, 各種フラビン類における、酸化鉄（Fe_2O_3）還元可溶化能を BPDS 法で測定した。キュウリを EDTA 鉄（可溶鉄）添加条件下、Fe_2O_3（不溶鉄）添加条件下に分けて育成し、経時的な flavin 濃度を吸光度および HPLC によって測定した。また、それら育成から 0、2、4、6 日目の根を採取して RNA-Seq 解析を行った。

【結果・考察】

観察された可溶化還元鉄 Fe^{2+}は、4’-ketoRf 、2’-ketoRf で、Rf より高く、4’-ketoRf が 2’-ketoRf より高い傾向が観察された。Flavin 濃度の測定では、両測定結果で共に、酸化鉄添加条件下において経時的に高くなることが示された。RNA-Seq 解析では、酸化鉄添加条件下の 4 日目において多くの遺伝子が高く発現していることが示された。さらに、Rf 合成経路では *GTP cyclohydrolase II* などが機能を果たす 5 か所の反応系において、条件間で異なる発現が示された。Flavin 濃度の測定では 6 日目で明らかな差異が生じた一方、RNA-Seq 解析では多くの遺伝子が 4 日目で顕著な発現差異を示すことを明らかにした。Rf を 4’-ketoRf の前駆体であると仮定すると、4’-ketoRf 合成に関与する遺伝子も発現していると考えられる。本研究は、Rf 合成経路の活性のほかに、酸化鉄添加条件下において非常に高い発現を示した 2 つの *alcohol dehydrogenase* が 4’-ketoRf の合成に関与している候補遺伝子として挙げた。

1) Satoh, J. et al. (2016) Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 80,1347-6947
2) 2018 年 日本農芸化学大会 金子ら

Riboflavin, Cucumber, Iron

発表責任者：新村洋一（niimura@nodai.ac.jp）

講演番号：3E7p07
講演日時：3 月 26 日 15:06～ 1 号館 E7 会場

ビワの(2-ニトロエチル)ベンゼン生合成経路の解明
Identification of a cytochrome P450 involved in (2-nitroethyl)benzene biosynthesis in loquat flower

○山口 拓也[1]、桑原 保正[2]、浅野 泰久[2]、春原 由香里[1]、松本 宏[1] ([1]筑波大・生命環境系、[2]富山県大・生工研セ)
○Takuya YAMAGUCHI[1], Yasumasa KUWAHARA[2], Yasuhisa ASANO[2], Yukari SUNOHARA[1], Hiroshi MATSUMOTO[1] ([1]Univ. of Tsukuba, [2]Toyama Pref. Univ.)

植物の生殖器官である花の香気成分は、花粉媒介昆虫の誘引や、植食性昆虫ならびに病原体に対する化学防御に関与している。花の香気成分はベンゼノイド、テルペノイド、脂肪酸誘導体から構成されることが多い。ビワ (バラ科; *Eriobotrya japonica*) の花は特徴的な成分として、(2-ニトロエチル)ベンゼンを放出する。(2-ニトロエチル)ベンゼンは静真菌作用を有していることから、化学防御物質であると考えられる。ビワにおいて、(2-ニトロエチル)ベンゼンは L-フェニルアラニンからフェニルアセトアルドキシムを介して生合成される (図; Kuwahara et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. (2018) **82**, 1855-1866)。前年度大会において我々は、CYP79D がフェニルアセトアルドキシムの合成に関与することを報告した。しかし、アルドキシムを酸化し、ニトロ基を生成する酵素は前例がなく未解明である。そこで本研究では、フェニルアセトアルドキシムを(2-ニトロエチル)ベンゼンに変換する新規酵素を探索し、同定したので報告する。

次世代シークエンサーを用いた発現差異解析により、ビワの花で高発現するシトクロム P450 を選抜し、これらをコードする cDNA をクローニングした。続いて、これらシトクロム P450 とレドックスパートナーであるシトクロム P450 レダクターゼの共発現系を出芽酵母において構築し、形質転換体のフェニルアセトアルドキシム代謝能を検討した。その結果、CYP94 がフェニルアセトアルドキシムを(2-ニトロエチル)ベンゼンに変換することを見出した。CYP94 は脂肪酸ω-水酸化酵素として知られており、植物表面のクチクラの構成成分であるクチンの生合成に関与していることから、陸上植物で保存されている (Nelson et al., Plant J. (2011) **66**, 194-211)。そこで、ウメ (バラ科)、ヤハズエンドウ (マメ科)、タバコ (ナス科) から *CYP94* をクローニングし、上述の方法でフェニルアセトアルドキシムの代謝能を検討した。その結果、ビワ由来 CYP94 と同様に(2-ニトロエチル)ベンゼンを合成した。以上のことから、ニトロ基を有する植物特化代謝物の分布は非常に限られているものの、ニトロ合成酵素は植物に広く保存されていると考えられた。

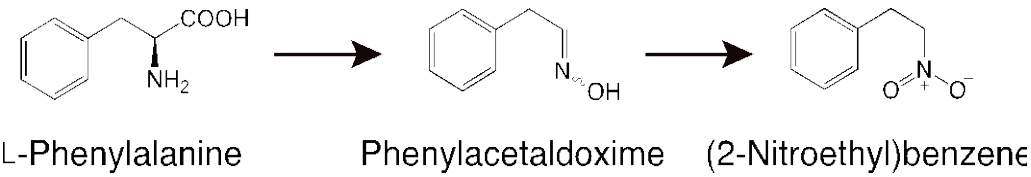


図. ビワの(2-ニトロエチル)ベンゼン生合成経路

Cytochrome P450, Nitro compound, Plant specialized metabolism

発表責任者：山口拓也（yamaguchi.takuya.gb@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3E7p08
講演日時：3 月 26 日 15:17～ 1 号館 E7 会場

光条件に応じたグルコシノレート代謝調節機構
Modification of glucosinolate metabolism by the light condition in *Arabidopsis* leaf
○一瀬 智美[1]、山崎 雄三[2]、三浦 大典[3]、金 善州[4]、丸山 明子[1] ([1]九州大 院農、[2]島津製作所、[3]産総研、[4]忠南大学)
○ Tomomi ICHINOSE[1], Yuzo Yamazaki[2], Daisuke Miura[3], Sun-Ju Kim[4], Akiko Maruyama-Nakashita[1] ([1]Fac.Agr.Kyushu Univ., [2]Shimadzu Corporation, [3]AIST, [4]Chungnam National Univ.)

【背景および目的】
アブラナ科植物では、含硫代謝物であるグルコシノレート (GSL)が生合成される。メチオニンから脂肪族 GSL が、トリプトファンからインドール GSL が生合成され、シロイヌナズナでは数十種類の化合物群として蓄積している。GSL は病虫害に対する防御物質として働くとともに、硫黄の貯蔵形態としても働くと考えられている。しかし、植物体内の代謝動態については不明な点が多い。そこで本研究では植物代謝を大きく変動させる条件として、暗処理が GSL の蓄積と空間分布におよぼす影響を解析した。
【方法および結果】
連続光条件下で生育させたシロイヌナズナ(Col-0) に 7 日間の暗処理を行い、葉をメタノール抽出した。LC-MS/MS を用いて 7 種類の GSL、GSL 生合成前駆体であるアミノ酸、他の含硫代謝物の定量を行ったところ、暗処理を施した試料ではグルコエルシン、グルコイベリン、グルコラファニン、グルコブラシシンといった代表的な GSL 分子種の蓄積量が顕著に減少した。これらの結果は、光条件に応じて GSL の生合成または分解が調節されることを示している。続いて同条件下の葉を用いて、マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析イメージング(MALDI-MSI)を行った。MALDI-MSI は生体分子の組織内分布の情報を非標識で取得可能な方法である。マトリックスに 9-アミノアクリジンを用いた。マトリックス塗布は汎用法である真空蒸着法に、組織上でのマトリックス再結晶化反応を付加した方法により行った。その結果、LC-MS 分析と同様、暗処理による GSL 量の減少が確認された。また、GSL 分子種の違いにより組織内分布が異なっていた。さらに GSL 代謝系で働く遺伝子の発現解析を行った結果、脂肪族 GSL の合成に働く *CYP79F2* 遺伝子、インドール GSL 合成に働く *CYP83B1* 遺伝子の発現量が暗処理により低下することが分かった。これらの解析結果をもとに光条件の違いによる GSL 代謝の調節機構について議論する。

Glucosinolate, Mass Spectrometry Imaging, *Arabidopsis*

講演番号：3E7p09
講演日時：3 月 26 日 15:28～ 1 号館 E7 会場

コーヒー原種 *Coffea stenophylla*、*C. millotii*、*C. pseudozanguebariae* からのカフェイン生合成系酵素遺伝子の単離と機能解析
Isolation and characterization of caffeine synthase genes from wild coffee.
○國久 葉月[1]、高木 駿[1]、倉田 陸朗[1]、Valerie Poncet[2]、Alexandre de Kochko[2]、水野 幸一[1]（[1]秋田県大生物資源、[2]IRD-Montpellier DIADE）
○ Hazuki KUNIHISA[1], Hayao TAKAGI[1], Rikuro KURATA[1], Valerie Poncet[2], Alexandre de Kochko[2], Kouichi MIZUNO[1] ([1]Akita Prefectural Univ. Faculty of Bioresource Sciences, [2]IRD-Montpellier DIADE)

［背景・目的］IRD-モンペリエで維持している *Coffea* 属原種コレクションの中で、主要３品種を含む 15 原種を研究材料として用いることとした。これらのコーヒー原種を材料として、これまでの研究で解析の進んでいる *Coffea arabica* 由来のカフェイン生合成系酵素遺伝子群に相当するものを単離し比較・解析する。以上より *Coffea* 属の中でどのようにしてカフェイン合成能が獲得され、発展してきたのか、その分子進化を探る。今回は、カフェイン含量が *C. arabica* と同程度である *C. stenophylla*、カフェイン含量がきわめて少ないことが知られている *C. millotii* および *C. pseudozanguebariae* より、カフェイン生合成系酵素遺伝子を単離したので報告する。
［方法］*Coffea* 属原種の若葉より全 RNA を抽出し、その一部から cDNA を合成した。これを鋳型とし、*C. arabica* のカフェイン生合成関連酵素の遺伝子情報と機能解析の結果をもとに設計したプライマーを用い、PCR にてそれらの遺伝子の単離を試みた。単離した遺伝子の配列を *C. arabica* 由来の既知遺伝子と比較し分類した。さらに大腸菌を用いた発現系を構築し、組換え型タンパク質を得た。これを用いてカフェイン前駆体である種々のキサンチン誘導体またはニコチン酸を基質として反応させ、生成物を液体シンチレーションカウンターまたは TLC にて検出した。
［結果・考察］*C. stenophylla* の若葉由来 cDNA よりカフェイン生合成関連酵素遺伝子と高い相同性を有する 5 種の遺伝子の単離に成功し、それぞれ *Cst-tmXRS1*、*Cst-tmXRS2*、*Cst-tTS*、*Cst-tCS1* および *Cst-tTgS1* と命名した。同様に *C. millotii* から 2 種(*Cmi-tTgS1* および *Cmi-tTgS2*)、*C. pseudozanguebariae* から 4 種(*Cps-tmXRS1*、*Cps-tCS1*、*Cps-tTgS1* および *Cps-tTgS2*)の単離に成功した。いずれも全長 1200 bp 程度であり、対応する *C. arabica* 由来の遺伝子との相同性は塩基レベルで 94%以上であった。しかし、*C. millotii* より *CmXRS*、*CTS*、および *CCS* に相当する、*C. pseudozanguebariae* より *CTS* に相当する酵素遺伝子が単離されなかったことから、カフェイン含量の低い品種ではそれらの遺伝子の発現量がきわめて低い、または発現していないと考えられた。さらに、単離遺伝子を含む、これまで知られているカフェイン生合成系酵素遺伝子を網羅した分子系統樹を作成したところ、想定される基質特異性の違いによって 4 つのクレードに分類された。つぎに単離した遺伝子の組換え型酵素の生産を試み、活性を調べたところ、Cps-tTgS2 以外は分子系統樹中の 4 つのクレードそれぞれに分類される基質特異性を主とした活性を有することを確認した。現在さらに詳しい解析を進めている。

coffee, caffeine, methyltransferase

発表責任者：水野幸一（koumno@akita-pu.ac.jp）

講演番号：3E7p10
講演日時：3 月 26 日 15:39～ 1 号館 E7 会場

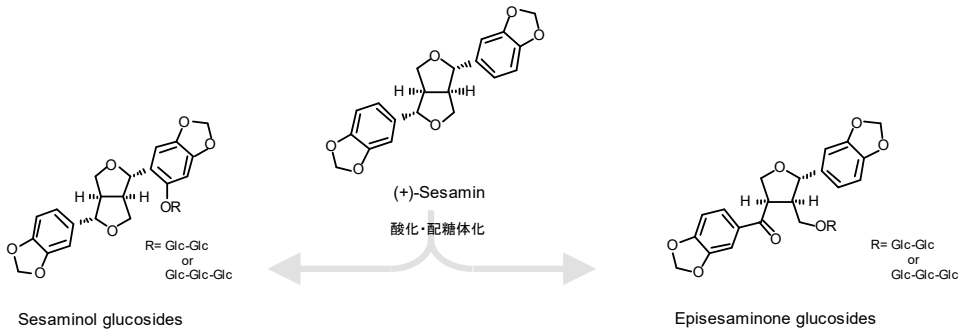
発芽後のゴマ種子におけるリグナン配糖体およびそれらの配糖体化酵素の同定

Isolation of sesame lignan glucoside in germinating sesame seed and enzymes catalyzed sesame lignan

○大場 幸江[1]、東 鋭明[1]、小埜 栄一郎[2]、豊永 宏美[2]、白石 慧[1]、原田 英里砂[1]、村田 純[1]、堀川 学[1] ([1](公財)サントリー生命科学財団、[2]サントリーグローバルイノベーションセンター（株））
○Yukie Ohba[1], Toshiaki Azuma[1], Eiichiro Ono[2], Hiromi Toyonaga[2], akira Shiraishi[1], Erisa Harada[1], Jun Murata[1], Manabu Horikawa[1] ([1]Suntory foundation for life sciences bioorganic research institute, [2]Suntory Global Innovation Center Ltd.)

【背景・目的】ゴマ（*Sesamum indicum*）の種子には coniferyl alcohol radical の 2 分子が Dirigent タンパク質をテンプレートとして縮合した pinoresinol を前駆体とするゴマリグナンと呼ばれる二次代謝物が蓄積している。sesamin をはじめとするゴマリグナンは、健康機能成分として注目され、ヒトに対する生理作用が研究されているのとは対照的に、ゴマ自身に対するゴマリグナンの生理的な役割は不明なままである。そこで我々は、主要なゴマリグナンである sesamin および sesamolin が種子の登熟とともに増加し、発芽後速やかに代謝されることに着目し、発芽後に生成する複数のリグナン配糖体およびそれらを生成する配糖体化酵素の同定を試みた。
【実験・結果】発芽ゴマ抽出物の LC-MS 分析を行った結果、sesamin の酸化物である sesaminol および episesaminone の配糖体と推測される化合物群を検出した。既報[1]では糖鎖の結合様式が未決定であったため、発芽ゴマからリグナン配糖体類を抽出し、ODS カラム等を用いて精製し、NMR 等により主要なリグナン配糖体の構造を決定した。また、発芽後の経時的なリグナン類の定量分析から、sesamin および sesamolin はほぼ全量が代謝され、各種の配糖体に変換されていることが分かった。次いで、ゴマ種子の RNASeq 解析より見出したゴマリグナン配糖体化酵素の候補タンパク質を大腸菌で発現させ、酵素活性を検討した。その結果、episesaminone monoglucoside の糖の 2 位水酸基の配糖化に新規酵素が触媒すること、一方で episesaminone aglycone の配糖体化および episesaminone monoglucoside の糖の 6 位水酸基の配糖化には、それぞれ既知の sesaminol 配糖体化酵素[2, 3]が触媒していることが分かった。現在、各酵素の触媒効率等を確認中である。

1. 栗山健一、土屋欣也、無類井建夫、*Nippon Nogeikagaku Kaishi* **69**, 658-693 (1995)
2. A. Noguchi, et al. *Plant J* ., **54**, 415–427, (2008),
3. 及川 大樹ら, 第 70 回日本生物工学会大会 (2018)



sesame lignan glucosides, episesaminone, UDP-glucosyltransferase

発表責任者：大場　幸江（ohba@sunbor.or.jp）

講演番号：3E7p11
講演日時：3 月 26 日 16:00～ 1 号館 E7 会場

タルウマゴヤシ由来のフラボノイド-*C*-配糖化酵素への点突然変異導入による配糖化活性変換の試み
Attempt of conversion of glycosylation activity by site-directed mutagenesis of flavonoid-*C*-glucosyltransferase from *Medicago truncatula*

○齋藤 友美[1]、山岸 由起子[1]、水藤 史明[2]、田口 悟朗[1,3] ([1]信州大院・総合理工、[2]東大院・新領域、[3]信州大・繊維)
○Tomomi SAITO[1], Yukiko YAMAGISHI[1], Fumiaki SUITO[2], Goro TAGUCHI[1,3] ([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Shinshu Univ., [2]Grad. Sch. Font. Sci., Univ. of Tokyo, [3]Fac. Textile Sci. Technol., Shinshu Univ.)

【研究背景・目的】フラボノイド-*C*-配糖体は、フラボノイド骨格と糖が炭素原子同士で直接結合した化合物であり、酸やグリコシダーゼによって分解されず、様々な生理活性を示すことから注目されている。我々はソバ由来の *C*-配糖化酵素である FeCGTa の X 線構造解析により、その立体構造と糖供与体基質との結合位置を明らかにしている[1]。その結果、*C*-配糖化酵素と *O*-配糖化酵素はかなり類似した構造であることが示唆された。タルウマゴヤシ(*Medicago truncatula*)の *C*-配糖化酵素 MtrCGT1 は FeCGTa と異なり、*C*-配糖化活性のほか、微弱な *O*-配糖化活性を示したことから FeCGTa の立体構造と MtrCGT1 のホモロジーモデルの比較をもとに MtrCGT1 に *O*-配糖化活性を向上させる可能性のある変異を導入し、*C*-配糖化と *O*-配糖化活性の変換を試みた。
【実験方法】MtrCGT1 に点突然変異を導入し、大腸菌で異種宿主発現させた。その粗抽出液を、アフィニティー精製して、酵素液とした。この酵素を、2-hydroxynaringenin または kaempferol を糖受容基質、UDP-glucose を糖供与基質として酵素反応を行い、HPLC で解析して活性を算出した。
【結果・考察】FeCGTa の立体構造と MtrCGT1 のホモロジーモデルの比較から、糖転移活性に影響を与える可能性のある残基、特に配糖化反応に関わることが推定されている基質ポケット付近の残基に注目して変異導入を行った。まず、配糖化反応に関わるとされている His_{18}、Asp_{80}、Asp_{385} をそれぞれ Ala に置換した酵素では *C*-及び *O*-配糖化の活性が共に減少した。次に、*C*-及び *O*-配糖化酵素のアライメントの比較から Arg_{281} を Val に置換したところ、*C*-配糖化活性は 1/70 に減少した一方で、*O*-配糖化活性は 3 倍に上昇した。このことから、Arg_{281} にあたる残基が *C*-配糖化と *O*-配糖化活性の違いに寄与していることが示唆された。さらに、*C*-配糖化酵素に特異的な基質ポケット入口付近にある Pro の連続した配列に注目し、この Pro を Asp に置換したところ、*O*-配糖化活性は変化せず *C*-配糖化活性が 5 倍に上昇した。このことは、Pro から Asp の変化が基質ポケット入口の柔軟性を向上させた結果、基質との相互作用がしやすくなったためであると推定され、*C*-配糖化に直接的には関与しないことが示唆された。
[1]小柳ら(2017)日本農芸化学会 2017 年度大会(京都)大会講演要旨集、2J31p09.

glucosyltransferase, flavonoid, site-directed mutagenesis

発表責任者：田口　悟朗（gtagtag@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3E7p12
講演日時：3 月 26 日 16:11～ 1 号館 E7 会場

タバコのフェノール性異物代謝に関わる二糖付加酵素の探索
Search for phenolic glucoside-glucosyltransferases involved in xenobiotics metabolism in *Nicotiana tabacum*

○佐藤 里佳[1]、下坂 誠[1,2]、田口 悟朗[1,2] ([1]信州大院・総合理工、[2]信州大・繊維)
○Rika SATO[1], Makoto SHIMOSAKA[1,2], Goro TAGUCHI[1,2] ([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Shinshu Univ., [2]Fac. Textile Sci. Technol., Shinshu Univ.)

【研究背景】　植物は農薬などのフェノール性異物にさらされると、配糖化などの修飾をしたのちに液胞に蓄積する異物代謝経路を持っている。フェノール性異物である 2-ナフトール(2-NA)をタバコ(*Nicotiana tabacum*)幼植物に投与すると、根から受動拡散的に吸収された異物は配糖化酵素によりグルコース配糖化された配糖体(2-NAG)となったのち、さらにマロニル化酵素 NtMaT1 によってマロニル化を受けたマロニルグルコシド(2-NAGM)となって液胞に輸送・蓄積される。さらにタバコでは糖が 1 つ付加した配糖体だけでなく、配糖体の糖部にもう 1 つ糖が付加した二糖配糖体(2-NAGG)の蓄積も確認されている。この二糖付加産物が蓄積する現象はシロイヌナズナなどでは観察されておらず、その意義に興味が持たれた。本研究はこの二糖配糖体生成に関与するタバコの配糖化酵素(NtGGT)の解析を行い、解毒機構への関与を探ることを目的とした。
【実験方法】　水耕栽培したタバコ(BY-4)幼植物および BY-2 培養細胞、およびそれらにおいてマロニル化酵素遺伝子(*NtMaT1*)の RNAi 抑制株にフェノール性異物として 2-NA を投与し、細胞に蓄積した物質を HPLC で解析した。さらに、タバコから精製した 2-NAGG を NMR 解析し、構造を決定した。また、ダイズ由来のフラボノールグルコシド 6′-*O*-グルコシルトランスフェラーゼのアミノ酸配列をもとにタバコゲノム配列に対して tBlastn 検索を行い、42 種の候補遺伝子を選抜した。
【結果・考察】　タバコ幼植物に 2-NA を投与したところ、根特異的に 2-NA に糖が 2 つ結合した物質(2-NAGG)が蓄積していることを確認した。同様に、BY-2 細胞においても、2-NA はその一部が 2-NAGG に変換された。それぞれの *NtMaT1* 抑制株に 2-NA を投与した場合、2-NAGM の蓄積が減少し、2-NAGG の蓄積が増加した。タバコに蓄積している 2-NAGG の 2 つ目の糖は C2'位または C6'位に結合していることが推測されたため、2-NA 投与したタバコ幼植物から 2-NAGG を精製し、二次元 NMR で解析した。その結果、C1″と C6′に相関関係が認められたことから、タバコに蓄積している 2-NAGG の 2 つ目のグルコースは C6′に結合していることが明らかとなった。この配糖化に関与する NtGGT の探索を行うため、42 種の候補遺伝子を選抜した。現在、これらの候補遺伝子について RT-PCR でタバコの各器官、組織での発現の有無を調べるとともに、大腸菌で異種宿主発現させた酵素を用いて 2-NAG に対する配糖化活性を調査している。

glucosyltransferase, xenobiotics metabolism, *Nicotiana tabacum*

発表責任者：田口悟朗（gtagtag@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3E7p13
講演日時：3 月 26 日 16:22～ 1 号館 E7 会場

ハナビシソウドラフトゲノムデータを利用したイソキノリンアルカロイド生合成関連遺伝子のマイニング

Mining of novel genes involved in isoquinoline alkaloid biosynthesis in California poppy using a draft genome sequence

○山田 泰之[1]、堀 健太郎[2]、士反 伸和[1]、佐藤 文彦[2,3]（[1]神戸薬大、[2]京大院・生命科学、[3]大阪府大院・理）
○Yasuyuki Yamada[1], Kentaro Hori[2], Nobukazu Shitan[1], Fumihiko Sato[2,3] ([1]Kobe Pharmaceutical Univ., [2]Kyoto Univ., [3]Osaka Prefecture Univ.)

【目的】ベルベリンやモルヒネに代表されるイソキノリンアルカロイド (IQA)は、その強い生物活性から医薬品等の原料として利用されている。しかし、IQA の供給は栽培が困難かつ自然環境の影響を受けやすい植物体からの抽出が主であり、安定した薬用資源の確保は喫緊の課題である。これらの課題を解決するためには、IQA 生合成系の全容を分子レベルで解明することが必須である。そこで我々は、sanguinarine や escholtzine などの IQA を産生するケシ科のハナビシソウをモデルにドラフトゲノムデータの取得・解析を進めてきた。本研究では、IQA 生合成に関わる新規生合成酵素や転写因子遺伝子を単離・同定するために、ハナビシソウドラフトゲノムデータを利用した候補遺伝子のマイニングとそれらの単離、および機能解析を行った。
【方法】ハナビシソウのドラフトゲノムデータより、IQA 生合成系の多様な反応を担うシトクロム P450 遺伝子や、植物の二次代謝を含む様々なプロセスの制御に関わる転写因子ファミリー遺伝子を抽出し、候補遺伝子の絞り込みを行った。さらに、候補となる P450 遺伝子をクローニングし、酵母を用いた酵素アッセイを行った。また、抽出した転写因子ファミリー遺伝子については、分子系統樹解析や遺伝子発現解析等による機能推定を行った。
【結果・考察】ハナビシソウドラフトゲノムデータから抽出した P450 ファミリー遺伝子群のうち、他の植物と比較して明らかにハナビシソウで存在数の多い CYP82 ファミリーに着目し、遺伝子発現解析等から、地下部で蓄積する IQA の 1 つ、macarpine の生合成に CYP82 酵素が関わると推察した。実際に、dihydrosanguinarine や dihydrochelerythrine を基質に酵素アッセイを行ったところ、10 位に水酸基が付加した反応生成物が検出され、今回単離した CYP82 酵素はベンゾフェナンスリジン型 IQA の 10 位を水酸化する酵素であることが示された。また、今回見出した CYP82 遺伝子の多くがゲノム上で遺伝子クラスターを形成しており、遺伝子重複による酵素機能の多様化が推定された[1)]。一方、転写因子遺伝子については、植物二次代謝の制御と関連の深い bHLH、WRKY、AP2/ERF ファミリー転写因子に着目し、それらの分子系統樹解析や、IQA 産生を誘導する MeJA に対する遺伝子発現応答解析を行った。さらに、一過的発現系を用いたレポーターアッセイによる転写活性化能の評価から、候補遺伝子をいくつか絞り込み、現在それらの発現を抑制した形質転換体の作出等の解析準備を進めている。

1) Hori et al., *Plant and Cell Physiology*, 59, 222-233 (2018)

Isoquinoline alkaloid, Eschscholzia californica (California poppy), draft genome sequence

発表責任者：山田泰之（yyamada@kobepharma-u.ac.jp）

講演番号：3E7p14
講演日時：3 月 26 日 16:33～ 1 号館 E7 会場

カロテノイド・クロロフィル簡便迅速測定法によるトマト品種の大規模スクリーニング
Large-scale screening of tomato cultivars for quantification of carotenoid and chlorophyll content using the simple, rapid and quantitative method
○青野 佑亮[1]、アシキン ヨナタン[1]、王 寧[1]、クリー ハリー[2]、草野 都[1,3]（[1]筑波大生物資源、[2]フロリダ大植物イノベーションセンター、[3]理研 CSRS）
○Yusuke Aono[1], Yonathan Asikin[1], Ning Wang[1], Harry Klee[2], Miyako Kusano[1,3] ([1]Univ. Tsukuba, [2]Univ. Florida, [3]RIKEN CSRS)

植物体内の代表的な脂溶性色素のひとつであるカロテノイドは、その健康作用の面から注目されており、遺伝子組換え等を用いた代謝改変や、代謝制御機構の解明などについての研究が進んでいる。トマトにおいては、果実中にカロテノイドを前駆体とする香気成分が存在し、それらが果実のフレーバーに大きく影響することが明らかになっている。加えて、それらの蓄積量は前駆体カロテノイド量と相関を示すことが知られている。このことから、様々な品種のトマト果実中のカロテノイド量と、それらに由来する香気成分量、および遺伝子発現情報を統合し解析することで、カロテノイド由来香気成分の生合成に関わる鍵酵素遺伝子の発見および生合成メカニズムの解明に繋がると考えられる。また、トマト果実中の香気成分は成熟段階に応じて変化することが知られているが、クロロフィルが減少しない、あるいは減少してもリコペンが蓄積しないなど、通常と異なる果実成熟を示す品種が存在する。したがって、カロテノイド量に加えて、品種間の成熟の差異を考慮する必要が生じる。

植物体中のカロテノイド分析は、液体クロマトグラフィーフォトダイオードアレイ検出器(LC-PDA)による定量分析が主流である。しかし、抽出操作が煩雑なことに加え、1 サンプルあたりの測定に時間を要するため、詳細な定量プロファイルが必要でない場合、あるいはスクリーニングに代表されるように、多くのサンプルを一度に測定する必要がある場合には不向きである。よって、本研究では、大規模スクリーニングに適したカロテノイド測定法を確立し、スクリーニングを行うことで、トマト果実中の香気成分の生合成メカニズムを解明する第一ステップとすることを目的とした。

本研究では、マイクロプレートリーダーを用いることにより、トマト果実中のカロテノイド総量、クロロフィルaおよびb、リコペンの含有量を簡便かつ迅速に測定可能にする定量解析法を確立した。本法の精度を評価するため、成熟段階および果皮色の異なるトマト果実の各色素含有量をそれぞれ分析したところ、各色素の定量値によってトマト果実の成熟段階を判別することができた。次に、本結果と、色彩度計を用いた果皮色の測定結果について、判別分析での寄与率の比較を行い、本法による果皮色の判別能力を評価した。その結果、本法での定量結果は、色彩度計よりも高い寄与率を示した。ゆえに、本法は従来法と比較して非常に短時間かつ精度の高い分析が可能であり、測定サンプル数が非常に多い場合のスクリーニングに適用できると判断した。
現在、実際に本法を用いてトマト 364 品種の色素測定によるスクリーニングを進めている。本発表では、その結果を報告する予定である。

tomato, metabolomics, secondary metabolites

講演番号：3E7p15
講演日時：3 月 26 日 16:44～ 1 号館 E7 会場

薬用植物ムラサキを用いた VIGS アッセイ系の確立

Establishment of virus-induced gene silencing system in *Lithospermum erythrorhizon*

○井坂 夏海[1]、草野 博彰[1]、増田 税[2]、下村 講一郎[3]、矢崎 一史[1] ([1]京大生存研、[2]北大院農、[3]東洋大院生命)
○Natsumi ISAKA[1], Hiroaki KUSANO[1], Chikara MASUTA[2], Koichiro SHIMOMURA[3], Kazufumi YAZAKI[1] ([1]RISH, Kyoto Univ., [2]Res. Faculty of Agriculture, Hokkaido Univ., [3]Graduate School of Life Sciences, Toyo Univ.)

ムラサキ (*Lithospermum erythrorhizon*) はムラサキ科の多年生草本で、古くから染料や薬品として利用されてきた。その薬効本体であるシコニン誘導体は、根で生産され、抗菌作用、止血作用、抗炎症等、多様な生理活性をもつ赤色の脂溶性ナフトキノン化合物である。これまでに、シコニンの生合成研究は主に培養細胞を用いて進められ、多くの生合成酵素遺伝子の単離や酵素化学的性質などが報告されてきた。しかし、生合成後半の重要な数ステップが未解明の状態である上、輸送・蓄積もどのようなマシナリーにより、どのようなプロセスを経て細胞外へ分泌されるのか、そのメカニズムはほとんど解明されていない。植物における内在性脂溶性物質の細胞外分泌機構については、メロテルペン類など他の植物脂溶性物質の分泌と共通性が高いと考えられる。そのため、この生物学的プロセスは、植物生命科学において解明すべき大きな課題として認識されている。これまでのマルチオミクス解析により、シコニン生合成や輸送・蓄積に関する遺伝子としてとして 20 個以上が解析対象としてリストアップされているが、ムラサキの形質転換は効率が低く、ハイスループットの評価系の確立が急務であった。

本研究では、候補遺伝子の解析手法として virus-induced gene silencing (VIGS) に着目した。この手法は、形質転換が困難な実用植物種に対しても遺伝子導入が可能な点に大きなメリットがある。本研究では国産ウイルスである点を踏まえ、キュウリモザイクウイルス (CMV) を用いた VIGS の系を確立することを目指した。また、感染させる植物材料としては、無菌系で大量培養が可能であるムラサキのシュートを用いた。シコニン生産に関わることが既に知られている LeDI-2 を対象に、ムラサキのシュートに対して VIGS を行ったところ、シコニン生産量が有意に減少した。さらに既知の生合成遺伝子 LePGT1 を用いたサイレンシングも現在行っており、大会ではその結果もあわせて報告する。

vigs, *Lithospermum erythrorhizon*, cucumber mosaic virus

講演番号：3E8a02
講演日時：3 月 26 日 09:11～ 1 号館 E8 会場

Biochemical characteristics of ovalbumin-related protein X in the chicken embryo
○Takashi AKAZAWA[1,2,3], Hiroyuki KOIKE[1], Katherine FU[3], Joy M. RICHMAN[3], Masahiro OGAWA[1], Shigeru HAYAKAWA[1] ([1]Kagawa Univ., [2]Ehime Univ., [3]University of British Columbia)

Background: A heparin binding protein ovalbumin-related protein X (OVAX) is 50kDa glycoprotein existing in chicken egg white. The physiological functions of OVAX are not known however it is predicted that the protein has functions associated with the binding with heparin. In the 2018 JSBBA annual meeting, we reported that OVAX is translocated from egg white to the chick embryo. The aim of this study is to identify biochemical characteristics of OVAX protein in the embryo to elucidate its physiological functions.
Results and Discussion: Immunofluorescence (IF) analyses of chicken embryos incubated for 10 days showed that OVAX antibody staining was localized in almost all tissues of HH36 embryo. The strongest OVAX signal was observed in the liver. Unexpectedly, *OVAX* mRNA was expressed in the liver of HH36 embryos, suggesting that the strong immunoreactivity for OVAX in the liver is due to endogenous synthesis, not translocation from the maternal-derived egg white. OVAX located in embryonic tissues other than liver might be translocated from the liver or from the maternal egg white. Western blots of liver lysate of HH36 embryos showed that the molecular mass of liver OVAX is 45kDa which is 5kDa smaller than OVAX derived from egg white. Deglycosylation treatment by pNGase F showed that liver OVAX is not modified by glycosyl chains, while egg white OVAX does (chain size estimated by SDS-PAGE is 5kDa). Heparin binding affinity of liver OVAX was assessed by heparin sepharose chromatography. Liver OVAX bound to heparin with similar affinity to egg white OVAX. Thus, the difference in the biochemical characteristics between the two sources of OVAX was only glycosylation. Heparin acts as a co-receptor for several growth factors and together growth factors-heparin regulate cell proliferation and differentiation during embryogenesis. To determine whether OVAX influences cell proliferation and differentiation we added purified protein to primary cells of the chick embryo. After incubation for four days, the number of fibroblast cells isolated from the skin of the embryo in OVAX-supplemented media was significantly lower than that in media without OVAX. Moreover, a high-density cell culture system which supports chondrogenesis showed that OVAX suppressed chondrocyte differentiation of facial and limb mesenchyme cells of the embryo. These results suggest that OVAX exists in the embryo to modulate cell proliferation and differentiation, possibly by binding to heparin. In summary we have discovered that there is an embryonic source of OVAX and that this endogenous protein may be important during development of the chicken embryo. Our findings provide insights into a novel function of egg white proteins.

egg white protein, Serpin, Heparin

発表責任者：赤澤隆志（6742001k@stu.kagawa-u.ac.jp）

講演番号：3E8a03
講演日時：3 月 26 日 09:22～ 1 号館 E8 会場

卵白アルブミンのポリマー化と凝集体形成

Polymerization of ovalbumin and aggregation of ovalbumin polymers.

○米倉 百音、西川 勇樹、恩田 真紀（大阪府立大・理・生物）
○Mone YONEKURA, Yuki NISHIKAWA, Maki ONDA (Dept. of Biol. Sci., Grad. Sch. of Sci., Osaka Pref. Univ.)

【背景と目的】卵白アルブミン（OVA）は、分子の構造上、セルピン（serpin: serine protease inhibitor）スーパーファミリーに属する。 このファミリーの蛋白質はポリマー化しやすく、生体内に蓄積して認知症（ニューロセルピン）や肝硬変（α_1-アンチトリプシン）が発症することが知られている。 OVA のポリマー化が原因で起こる疾患の報告例はないが、*in vitro* において OVA がアミロイド線維を形成することが確認されている（M. Noji *et al.*, *Biochemistry* 2018）。 セルピンのポリマー化機構については、X線結晶構造解析に基づいた domain-swap モデルなど詳細な研究がなされているが、ポリマーどうしが相互作用し、分解困難な凝集体を形成する過程はほとんど解析がなされていない。 本研究では、OVA のポリマー形成、およびポリマーからの凝集体形成について解析し、病原性の domain-swapped ポリマー（ニューロセルピン, α_1-アンチトリプシン）との比較を行った。

【方法と結果】セルピンの domain-swapped ポリマーは folding 中間体から形成される。そこで、OVA を加熱または尿素で部分的に unfolding させ、ポリマーの形成を試みた。 その結果、加熱法では得られなかったが、4 M 尿素中でインキュベーションした場合、病原性の domain-swapped ポリマーと似た特徴を有するポリマー（in-OVA ポリマー）が得られた。 次に、OVA（385AA）の Ala352-Ser353 間をエラスターゼで限定加水分解して得た cleaved 型 OVA（cl-OVA）と、その Gly1-Ala352 断片である H 鎖について、それぞれ尿素変性を利用してポリマーの形成を試みたところ、in-OVA ポリマーとは異なる構造を持つポリマー（cl-OVA ポリマー, H-OVA ポリマー）が得られた。 これら 3 種のポリマーについて、尿素濃度を 0.4 M 以下に減じてからインキュベーションし、光散乱およびチオフラビン T 蛍光により凝集体の形成を調べた。 その結果、in-OVA ポリマーでは、光散乱, チオフラビン T 蛍光共に経時的に増大する凝集体の形成が見られ、同様の変化が病原性 domain-swapped ポリマーでも観察された。 これに対し、H-OVA ポリマーでは光散乱, チオフラビン T 蛍光両者とも増大がほとんど見られず、cl-OVA ポリマーでは各々の増大が in-OVA ポリマーの半分以下であった。 この結果は、OVA の C 末側断片（L 鎖：Ser353-Pro385）が、ポリマーから凝集体が形成される過程で重要な役割を果たしていること示している。 セルピン C 末領域は、ポリマー化の際 domain-swap する領域の一つとして知られており、アミロイド線維の形成も含め、本解析結果を議論する。

ovalbumin, amyloid, aggregation

講演番号：3E8a04
講演日時：3 月 26 日 09:33～ 1 号館 E8 会場

PAI-1 阻害剤の作用機構
Acting mechanisms of PAI-1 inhibitors.
○田中 真帆、小林 誠、廣畠 早紀、恩田 真紀（大阪府立大・理・生物）
○Maho TANAKA, Makoto KOBAYASHI, Saki HIROHATA, Maki ONDA (Dept. of Biol. Sci., Grad. Sch. of Sci., Osaka Pref. Univ.)

【背景と目的】PAI-1（plasminogen activator inhibitor-1）は、セルピン・スーパーファミリーに属する蛋白質で、tPA（組織プラスミノーゲン活性化因子）を捕捉して不可逆的に阻害する。 tPA は、血栓溶解剤（製剤名：アルテプラーゼ）として急性心筋梗塞や脳卒中などの治療に使用されているが、その際、血中に存在する PAI-1 が tPA を阻害してしまい、治療の妨げとなる。この問題を解決する手段の 1 つとして、PAI-1 阻害剤の開発が盛んに行われている。本研究では、PAI-1 への阻害作用は確認されているが、その機構が不明である 2 つの薬剤（生薬由来の天然化合物 Embelin, および人工化合物 NZ29）の作用機構の解明を目的とする。両物化合物共、PAI-1 との複合体の結晶構造は決定済みである。

【方法】Embelin, NZ29 共に、tPA の活性には影響を与えないこと、PAI-1 に結合して凝集させる薬剤であることは確認済である。結晶構造を基に、Embelin はセルピンの構造維持に重要なシャッター領域の水素結合ネットワークに、NZ29 は PAI-1 の helix D, E, F に、それぞれ影響を与えていると推測した。そこで、水素結合ネットワークを強固にした PAI-1 変異体 Q322H（T_m = 65.4℃）と、helix D, E, F を安定化する変異を導入した変異体 N150H/K154T/Q319L（T_m = 55.9℃）および R76C/R118C（T_m = 62.9℃）を調製し、円偏光二色性や蛍光を指標として、薬剤による PAI-1 変性の速度論的解析や薬剤結合の解析を行った。

【結果】①Embelin による変性は、野生型（T_m = 50.9℃）では単相一次反応で進行したのに対し、Q322H では逐次一次反応で進み、中間体の存在が確認できた。また、Q322H の半減期は野生型のそれに比べて約 2 倍で、Embelin の作用機構が Gln322 近傍の相互作用の破壊である事が明確となった。②NZ29 による変性は、野生型, Q322H 変異体共に単相一次反応で進行し、速度定数もほぼ一致した。即ち、NZ29 は、Gln322 が関わらない部位で、Q322H の高い熱安定性を相殺する程の決定的なダメージを PAI-1 に与えている事が明らかとなった。そこで、N150H/K154T/Q319L および R76C/R118C を用いて解析を行ったところ、NZ29 は helix F よりも helix D, E 近傍に強く作用していることが示唆された。

【結言】シャッター領域の水素結合ネットワークの破壊は、セルピノパシー（セルピン蛋白質の異常凝集物が生体内に蓄積して発症する疾患群：認知症や肝硬変など）を誘引するが、シャッター領域の相互作用に関わらない部位で作用する NZ29 は、セルピノパシーのリスクが低い優れた薬剤である。

PAI-1, tPA, thrombosis

講演番号：3E8a05
講演日時：3 月 26 日 09:44～ 1 号館 E8 会場

天然化合物 Embelin のニューロセルピン阻害を介したアミロイドプラーク分解促進薬剤としての可能性

Potential of a natural compound Embelin for a drug to promote degradation of amyloid plaques via inhibition of neuroserpin.

○加藤 美有、原田 彰大、恩田 真紀（大阪府立大・理・生物）
○Miu KATOU, Akihiro HARADA, Maki ONDA (Dept. of Biol. Sci., Grad. Sch. of Sci., Osaka Pref. Univ.)

【背景と目的】ニューロセルピン（NS）は、組織プラスミノーゲン活性化因子（tPA）を特異的に阻害する蛋白質で、同じく tPA の阻害蛋白質として知られる plasminogen activator inhibitor-1（PAI-1）と同族（セルピン・スーパーファミリー）であるが、PAI-1 が血中を中心に全身で機能するのに対し、NS は脳に局在して発現する。tPA により活性化されるプラスミンは、血栓溶解酵素として知られているが、近年、アミロイドプラークを分解することが明らかとなった。そこで、NS を阻害することにより、血液凝固系には影響を与えず、アミロイドプラークを除去する薬剤の開発を目指し、探索を行ったところ、PAI-1 を阻害する Embelin に NS 阻害剤としての可能性を見出した。本研究では、Embelin の NS への結合および阻害効果を、生化学的手法により調べた。

【方法と結果】Embelin が NS の機能を阻害するかどうかを、tPA との複合体形成能を指標に調べた。その結果、IC_{50} = 9.1μM で NS-tPA 複合体の形成を阻害していることが分かった。また、Embelin が tPA の機能を阻害しないことを、合成基質を利用した tPA の活性測定により確認した。NS は分子内に 3 つの Trp 残基（Trp154, Trp190, Trp279）を有し、295 nm で励起すると強い Trp 蛍光を発するが、Embelin 存在下では Trp 蛍光の消光が起こった。そこで、Embelin が NS の Trp 近傍に結合していると推測し、Trp を Phe に置換した NS 変異体を調製して解析を行ったところ、helix F にある Trp154 近傍に $K_D = 4.7 \times 10^{-5}$ M の親和性で結合していることが明らかとなった。X線結晶構造解析により、Embelin が PAI-1 の helix F 近傍に結合していることが既に明らかにされており、その親和性が $K_D = 2.5 \times 10^{-5}$ M であることから、Embelin は PAI-1 と似た配位で NS にも結合していると思われる。そこで、Embelin の NS 阻害機序も、PAI-1 のそれと同様かどうか調べるために、Embelin とインキュベーションした際に起こる NS の構造変化を蛍光測定, Native-PAGE, 抗体との結合等の手法で解析した。その結果、NS は Embelin が結合することにより立体構造が破壊され失活するが、その変性機序は PAI-1 のそれとは異なることが明らかとなった。

【結言】Embelin は NS 阻害剤として作用し、その結合部位や親和性は PAI-1 のそれに近く、作用機序は異なるが、有望なリード化合物と言える。当研究グループは NS の X 線結晶構造解析の実績があり、現在、より良い化合物をデザインするために、ソーキング法による NS-Embelin 複合体の結晶構造解析を行っている。

amyloid, drug design, Alzheimer's disease

講演番号：3E8a06
講演日時：3 月 26 日 10:05～ 1 号館 E8 会場

デヒドロアスコルビン酸による血清アルブミンの自然免疫活性化機能の獲得
Dehydroascorbic acid-modified serum albumin activate innate immunity
○板倉 正典[1]、佐々木 栄太[1]、安達 貴弘[2]、内田 浩二[1] ([1]東大院・農生科、[2]東京医科歯科大・難治疾患研)
○Masanori ITAKURA[1], Eita SASAKI[1], Takahiro ADACHI[2], Koji UCHIDA[1] ([1]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., The Univ. of Tokyo, [2]Tokyo Med. Dent. Univ.)

【背景】アスコルビン酸（ビタミン C）は抗酸化剤として働き、自身はデヒドロアスコルビン酸（DHA）へと酸化される。反応性の高い DHA はタンパク質を糖化修飾することでその機能を変化させることが知られているが、免疫機能への関与については未だ不明な点が多く残されている。これまでの研究から DHA 修飾によりアルブミンが免疫グロブリン M （IgM）に認識されるようになること、さらにマウスへの DHA 修飾タンパク質免疫により血清中の IgM 量が増加することを明らかにしているが (Chikazawa *et al.*, *JBC*, 2013)、その詳細なメカニズムは未だ不明である。そこで本研究では、DHA によって新たに獲得されるタンパク質の機能として、自然免疫応答の活性化に焦点を当て、DHA 修飾タンパク質による IgM 分泌制御機構の解明を試みた。
【方法、結果および考察】単離したマウス脾臓細胞および腹腔細胞に DHA 修飾アルブミンを処置し 96 時間培養後、ELISA 法により分泌された IgM 量を測定した。その結果 DHA 修飾アルブミン処置により IgM 分泌量の有意な増加が認められた。ビオチン標識アルブミンを用いて DHA 修飾アルブミンの標的細胞をフローサイトメトリーにより評価したところ、アルブミンは DHA 修飾されることで細胞への結合能を獲得すること、さらにその結合は B 細胞への特異性が高いことが明らかとなった。DHA 修飾アルブミンによる細胞応答の詳細を明らかにするため、DHA 修飾アルブミンを免疫細胞に処置した際の細胞内カルシウム濃度を測定したところ、DHA 修飾アルブミン処置により細胞内カルシウム濃度の上昇が認められた。さらにカルシウムバイオセンサー (YC3.60)を発現する遺伝子改変マウスを用いた *in vivo* イメージングにおいても、DHA 修飾アルブミン処置による B 細胞内カルシウム濃度の上昇が観察された。
以上の結果より、DHA 修飾によりアルブミンは B 細胞への結合能を獲得し、カルシウムシグナル誘導および IgM 産生を促進することが明らかとなり、DHA 修飾アルブミンによる B 細胞を標的とした自然免疫活性化機構の存在が示唆された。

Dehydroascorbic acid, Innate immunity, IgM

講演番号：3E8a07
講演日時：3 月 26 日 10:16～ 1 号館 E8 会場

ピロール化タンパク質形成における酸化ストレスの関与

Involvement of oxidative stress in pyrrolyated protein formation

○吉武 淳[1]、柴田 貴広[2]、内田 浩二[3]（[1]名大未来社会、[2]名大院生命農学、[3]東大院農学生命）
○Jun YOSHITAKE[1], Takahiro SHIBATA[2], Koji UCHIDA[3] ([1]Institute of Innovation for Future Society, Nagoya Univ., [2]Grad. Sch. of Bioagric. Sci., Nagoya Univ., [3]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., The Univ. of Tokyo)

[**背景**] タンパク質は翻訳後修飾によって酵素活性やタンパク質との相互作用の変化など、様々な生理的機能を獲得することから、翻訳後修飾の形成メカニズムの解析は生体の恒常性の維持を解析する上で重要である。細胞膜の主要な構成成分である脂質は、活性酸素種との脂質過酸化反応によって多くの 2-アルケナールやケトアルデヒドなどの求電子性のアルデヒド類を形成する。これらアルデヒド類は、リジンやヒスチジンなどの求核性アミノ酸残基と非酵素的に反応し、タンパク質の翻訳後修飾の一翼を担っている。タンパク質ピロール化は、ケトアルデヒドの一種である 1,4-ブタンジアールがタンパク質のリジン ε 位のアミノ基と反応してピロール基を形成する非酵素的なタンパク質翻訳後修飾である。我々はこれまでに、タンパク質がピロール化されることにより、表面電荷の低下や DNA インターカーレーターとの結合能を有するなど、DNA 様の性質を獲得することを明らかにしてきた。さらに、自己免疫疾患モデルマウス血清に対して抗原性を示すことなど、自己免疫疾患への関与を示唆する結果も得ている。しかしながら、生体におけるピロール化タンパク質の形成メカニズムについてはよくわかっていない。そこで本研究では、酸化ストレスがピロール化タンパク質形成に与える影響を解析した。

[**方法および結果**] 過酸化水素処理によって酸化ストレスを暴露したマウス神経芽細胞腫由来 Neuro 2a 細胞を回収した後、超音波により破砕した。得られた細胞破砕液より抽出したタンパク質を、110 度で 15 時間、アルカリ溶液中で加水分解した。加水分解産物から固相抽出によってピロール化リジンを粗精製後、質量分析装置に供し、安定同位体希釈法によってピロール化リジンの同定・定量を行った。その結果、過酸化水素の処理時間と濃度に依存したピロール化リジンの形成の増加が認められた。これらの結果から、細胞内におけるピロール化タンパク質形成に酸化ストレスが関与している可能性が示唆された。

Oxidative stress, protein modification, Pyrrolated protein

講演番号：3E8a08
講演日時：3 月 26 日 10:27～ 1 号館 E8 会場

ハブクラゲ刺胞内液中 IgG 特異的結合性タンパク質の精製
Purification of IgG specific bonding protein from nematocysts extraction of *Chironex yamaguchii*
○鈴木 智也[1]、永井 宏史[2]、山下 光雄[1] ([1]芝浦工大院・応化、[2]東京海洋大・海洋環境)
○Tomoya SUZUKI[1], Hiroshi NAGAI[2], Mitsuo YAMASHITA[1] ([1]Shibaura Inst. Tech., [2]Tokyo Univ. Marine Sci. Tech.)

【目的】刺胞動物に属するクラゲは触手に刺胞と呼ばれるカプセル状の器官を無数に持ち，刺胞から毒液を注入して獲物を捕らえる．クラゲに刺されるのは小魚や動物性プランクトンだけではなく，遊泳客や漁業労働者が刺傷被害に遭う．クラゲ刺傷後の典型的な患部の症状は紅斑や硬結，再燃性皮膚炎であり，全身性の症状としては呼吸困難が挙げられる．これらの症状は毒による作用と免疫反応による作用であると考えられている．近年，クラゲ刺症原因物質に関する研究が進み，複数のクラゲ種においていくつかのタンパク質毒素が同定されている．しかしながら，アレルギー原因物質に関する知見はあまり得られておらず，刺傷後の症状を引き起こすメカニズムは明らかになっていない．そこで，本研究ではワクチンなどの有効的治療法確立に向けた第一歩として，クラゲの持つアレルギー原因物質を精製・単離することを目的とした．我々は国内において最も危険な海洋生物の一種であるハブクラゲ（*Chironex yamaguchii*）を研究対象とした．なお，ハブクラゲは既往の研究で刺胞内液中に IgE 特異的結合性アレルゲンタンパク質毒素 CqTX-A（45-kDa）を持つことが明らかになっている．
【方法】本研究で用いたハブクラゲは沖縄本島の沿岸から採集した．ストッキングを用いてハブクラゲ触手をろ過し，得られた懸濁液を繰り返し遠心分離することで刺胞を回収した．単離した刺胞をリン酸緩衝液（pH 6.0）で懸濁し，ガラスビーズを用いて刺胞を物理的に発射・破砕した．その後，懸濁液を遠心分離にかけ，上清をフィルターろ過することで粗刺胞内液を回収した．次に，得られた粗刺胞内液を陰イオン交換クロマトグラフィーに供したのち，限外濾過膜で分画濃縮した．得られたタンパク質溶液を用いて SDS-PAGE およびウェスタンブロッティングを行った．
【結果】本研究では平均的にハブクラゲ触手 15.1 g から刺胞約 1×10^8 個を回収でき，刺胞約 1×10^8 個からは粗刺胞内液タンパク質を 16.8 mg 回収することができた．
陰イオン交換クロマトグラフィーで分画されたタンパク質溶液を SDS-PAGE し，ゲルを CBB 染色したところ，4 つの主要タンパク質バンド（30-, 44-, 66-, 100-kDa 付近）が検出された．抗ヒト IgG 二次抗体を用いて同サンプルをウェスタンブロッティングしたところ，約 100-kDa タンパク質に発色が認められた．刺胞内液中に存在する 100-kDa の IgG 特異的結合性タンパク質は体液性免疫反応を引き起こし，再燃性皮膚炎などを含む遅発型アレルギー反応に関与する可能性があると示唆された．
以上のことから，本研究では既知の IgE 特異的結合性アレルゲンタンパク質毒素 CqTX-A とは異なる新たなハブクラゲ刺症原因アレルゲンタンパク質を精製することに成功した．

jellyfish, allergen, protein

発表責任者：鈴木　智也（mc18022@shibaura-it.ac.jp）

講演番号：3E8a09
講演日時：3 月 26 日 10:38～ 1 号館 E8 会場

二枚貝の貝殻稜柱層内に存在するキチン繊維の形成機構の比較

Comparison of the formation mechanism of chitin fiber included in the prismatic layer of bivalves

○近都 浩之[1]、奥村 大河[2]、根岸 瑠美[3]、中西 啓仁[1]、永田 宏次[1]、鈴木 道生[1] ([1]東大院農、[2]東大院理、[3]東大定量研)
○ Hiroyuki KINTSU[1], Taiga OKUMURA[2], Lumi NEGISHI[3], Hiromi NAKANISHI[1], Koji NAGATA[1], Michio SUZUKI[1] ([1]Tokyo Univ. Agric., [2]Tokyo Univ. Sci., [3]Tokyo Univ. IQB)

貝殻はおよそ 95%が炭酸カルシウムで構成され、その他の微量な有機物と炭酸カルシウムの相互作用が結晶成長を制御し、非常に緻密な微細構造を形成する。このような有機-無機相互作用で形成された構造は強度や柔軟性などに優れた機械的特性を持つ。貝殻の構造は分泌される有機物の成分によって異なるため、種の中で遺伝的に制御されている。二枚貝の貝殻は有機基質で覆われた柱状の炭酸カルシウムの単結晶が集積した稜柱層と呼ばれる構造を持つが、同じ構造であっても種によってその性質は異なる。アコヤガイの稜柱層結晶には、典型的な単結晶には見られない微小な結晶欠陥が多く含まれており、さらに結晶欠陥に沿って繊維状の有機物が局在化している。結晶欠陥は結晶のひび割れを防ぐことから、アコヤガイは結晶欠陥を形成し貝殻の強度を高めていると考えられる。我々は結晶欠陥形成に有機物ネットワークが関与していると考え、これまでの研究で [1]、ネットワークの構成成分として多糖のキチンとそれに結合しているキチン分解酵素を同定した。さらに炭酸カルシウム結晶形成実験から、分解酵素によって分解されキチン繊維が細くなると、結晶成長時にキチンが炭酸カルシウムと相互作用しやすくなり結晶欠陥が大きくなることを明らかにした。つまり、アコヤガイ稜柱層ではカルサイトの欠陥形成にはキチンの分解が非常に重要な役割を果たしていると考えられる。

一方、タイラギの稜柱層結晶は微小欠陥を含まない単結晶である。結晶欠陥を含まないためアコヤガイよりも硬度が低いことが知られている。そこで本研究では、なぜタイラギでは結晶欠陥が存在しないのかを調べた。結晶内にはアコヤガイと比べて、細く量の少ない繊維状のキチンが一様に存在することがわかり、この結果から、結晶欠陥の有無はこの繊維状キチンの様態（量、細さ、密度など）によるものだと考えられた。キチンの様態を制御する要因として(1) アコヤガイと同様にキチナーゼによるキチン分解、(2) キチン合成酵素の発現量が低くキチンの分泌量が少ないことの二点を検討した。本発表ではこれらの要因について解析し考察した結果を報告する。

(1) Kintsu, H., et al. (2017) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 489:89-95

chitin, mollusk, prismatic layer

発表責任者：近都浩之（nichtkind@gmail.com）

講演番号：3E8a10
講演日時：3 月 26 日 10:49～ 1 号館 E8 会場

モデル生物としてのメダカを用いた組織型タンパク質架橋化酵素の機能解析
Functional and biochemical analyses on transglutaminase (TG2) uisng medaka fish
渡邉 優子、鈴木 里沙、孟 斎、辰川 英樹、○人見 清隆（名大院創薬科学）
Yuko Watanabe, Risa Suzuki, Qi Meng, Hideki Tatsukawa, ○Kiyotaka Hitomi (Nagoya Univ., Grad. Sch. Pharm. Sci.)

【背景・目的】

タンパク質架橋化酵素・トランスグルタミナーゼ（以下 TGase と略記）は、カルシウム依存的に、異種または同種のタンパク質間のグルタミン残基とリジン残基間に不可逆なイソペプチド結合を形成させる。ヒトには 8 つのアイソザイム（Factor XIII, TG1～TG7）が組織特異的に存在し、死細胞処理や表皮形成、血液凝固をはじめ、多彩な生理機能を有している。この中でも TG2 は多くの組織に分布するものの、その機能は未知なところが多い。生理的意義を明らかにするためには、多様なモデル生物での発現様式解析や遺伝子変異体での表現型解析が有効である。

ニホンメダカ（*Oryzias latipes*）は、現在全ゲノム配列が決定され、繁殖やゲノム編集技術の容易さから創薬関係の研究においても近年注目されている。これまで我々はメダカにおいてヒト TGase に相当するオルソログの存在を見出している。本発表では、上に述べた TG2 のオルソログと考えられる OlTGT に対象に、関連疾患モデル系の確立を最終目的に、生化学的解析及びゲノム編集による変異体の作製を目的とした。

【方法・結果】

OlTGT の組換えタンパク質を用いて作製した特異的な抗体を用いて、イムノブロッティングにより初めて魚類での組織分布を明らかにした。これと並行して、TALEN および CRISPR/Cas9 法によって、OlTGT の遺伝子上に変異を生じさせて、酵素活性部位ドメインを有しない変異体 2 種類を作製した。

発現レベルの比較的高い組織として判明した小腸を対象に、特異的な抗体を用いて野生型のみで OlTGT を検出し、変異体での発現欠損を確認した。変異体メダカは正常な発生過程をして外見も正常で、明確な表現型は観察できなかった。しかしながら、遊泳行動が野生型に比して違いがあることを、Tank-diving test によって見出した。これは 50 ㎝立方体の容器内での一定時間での遊泳行動を、三方向からモニターして記録するものである。

その結果、2 種の異なる変異体のいずれもが、野生型に比して遊泳距離が短くなることを示した。そのメカニズムは現在不明であるが、特異的抗体によって脳・脊髄にとりわけ多くの発現がみられたことから、より詳細に脳内発現分布を検討した。変異体と野生型での免疫組織切片を比較した結果、脳内で脳室周囲層の特定の神経細胞に発現していることが判明した。

PLoSOne 10, 0144194; (2015) Biosci. Biotechnol. Biochem. 81, 469 (2017)

transglutaminase, medaka, brain

発表責任者：人見清隆（hitomi@ps.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3E8a11
講演日時：3 月 26 日 11:10～ 1 号館 E8 会場

ミトコンドリアマトリクスに局在するプロテアーゼ Lon によるタンパク質の可溶性制御
Functional analysis of LONP1 protease
○松島 雄一[1]、高橋 和也[1]、瀬戸山 大樹[2]、康 東天[1] ([1]九大医、[2]九大病院)
○Yuichi Matsushima[1], Kazuya Takahashi[1], Daiki Setoyama[2], Dongchon Kang[1] ([1]Med. Sci. Kyushu Univ., [2]Kyushu Univ. Hospital)

ミトコンドリアマトリクスには Lon、ClpXP、m-AAA の 3 種のプロテアーゼが存在し、これらはバクテリアからヒトまで広く保存されている。Lon、ClpXP はミトコンドリアマトリクスに局在し、m-AAA はミトコンドリア内膜の膜タンパク質でマトリクス側にプロテアーゼ活性を持つ。これらたった 3 種のプロテアーゼが全てのミトコンドリアマトリクスタンパク質を分解することで傷害タンパク質の蓄積などを防ぎ、ミトコンドリア機能を正常に保っていると考えられている。また近年、Lon の変異が CODAS 症候群の原因となることが示されるなど、各プロテアーゼの遺伝子変異が個別の疾患を引き起こすことも明らかになってきた。これらのことから、各プロテアーゼが互いにその機能を完全に補完することは出来ないことが示唆されている。

Lon、ClpXP、m-AAA をそれぞれノックダウンした HeLa 細胞を解析したところ、Lon をノックダウンした細胞においてのみ、不溶化したタンパク質(凝集タンパク質)の過剰な蓄積が確認された。質量分析装置を用いたプロテオーム解析の結果、コントロール細胞から得た凝集タンパク質ではミトコンドリア局在タンパク質がほぼ検出されないのに対し、Lon ノックダウン細胞から得た凝集タンパク質には多数のミトコンドリアマトリクス局在タンパク質が検出された。この中には多くのミトコンドリアリボソームタンパク質が含まれていた。一方、Lon ノックダウン細胞の可溶化画分におけるミトコンドリアリボソームタンパク質の量はコントロール細胞に比べ極端に減少していた。Lon をノックダウンした細胞では mtDNA の遺伝子発現が負に制御させることが知られているが、ミトコンドリアリボソームタンパク質の不溶化によるミトコンドリア翻訳の減少が原因の一つであることが示唆された。また、この Lon ノックダウン細胞から得られた凝集タンパク質の中にはミトコンドリア移行シグナル切断酵素などが含まれていた。ミトコンドリアリボソームタンパク質と同様にそれらの可溶性タンパク質が減少していること、さらにそれらが関連する機能が抑制されていることが確認された。また、HEK293 細胞と HeLa 細胞を用いて Lon ノックダウンに伴い増加する不溶タンパク質の比較を行った所、ほぼ同じタンパク質が不溶化することが示唆された。以上の結果は Lon が特定のミトコンドリアタンパク質の可溶性を変化させ、その機能を制御することを示唆している。また、Lon によるタンパク質の可溶性変化制御についても解析を行っている。

mitochondria, protease, aggregation

発表責任者：松島雄一（matsush5@cclm.med.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3E8a12
講演日時：3 月 26 日 11:21～ 1 号館 E8 会場

マウスキチナーゼの相互作用に関する研究
Study on mutual effects of mouse chitinases
○木村 将大、梅山 隆敏、脇田 悟誌、大川 一明、坂口 政吉、小山 文隆（工学院大・先進工）
○ Masahiro Kimura, Takatoshi Umeyama, Satoshi Wakita, Kazuaki Okawa, Masayoshi Sakaguchi, Fumitaka Oyama (Department of Chemistry and Life Science, Kogakuin University)

キチナーゼ (EC 3.2.1.14) は，キチンの β1,4 グリコシド結合を加水分解する酵素である。ほ乳類はキチンを合成しないにもかかわらず，キチナーゼを合成している。マウスとヒトでは，活性を持つキチナーゼとして chitotriosidase (Chit1) と acidic mammalian chitinase (AMCase) が同定されている。Chit1 と AMCase は異なる病態で発現量が増加することから注目されている。Chit1 は，ゴーシェ病，慢性閉塞性肺疾患 (COPD)，アルツハイマー病，アテローム性動脈硬化症，喫煙者などの疾患で発現が上昇する。他方，AMCase は喘息やアレルギーにおいて発現量が増加する。しかし，これらの疾患や病態における病態生理学的なほ乳類キチナーゼの役割は未だ明らかになっていない。Chit1 と AMCase は免疫細胞や組織において共に存在し，サイトカイン等によって発現量が変化する。両酵素が共に存在する条件での機能は分かっていない。本研究ではマウス Chit1 と AMCase を同条件で機能を比較することで，ほ乳類キチナーゼの特徴を評価した。大腸菌で発現したタンパク質は Protein A- Chit1-V5-His, Protein A- AMCase -V5-His からなる融合タンパク質である。各酵素の人工基質に対する活性を同条件下で測定した。 AMCase は pH 2 付近，Chit1 は pH 5~6 付近で最大活性を示した．両酵素を比較すると，AMCase は強酸性で高い活性を示し，pH 5~6 付近での活性も Chit1 と同程度であった。また， Chit1 と AMCase を混合した状態で Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE) 法を用いて活性を測定し，両酵素が共に存在する条件での機能を検証した。ほ乳類キチナーゼは生理的条件下で相乗効果を示さなかった。生体内で Chit1 と AMCase はそれぞれ独自の機能を有し，お互いに干渉せず，病態生理学的目的に合わせてそれらの発現量が変化している可能性がある。

Mammalian Chitinases, Chitinolytic activity, Mutual effect

発表責任者：木村　将大（bd17002@ns.kogakuin.ac.jp）

講演番号：3E8a13
講演日時：3 月 26 日 11:32～ 1 号館 E8 会場

エクソソームを基軸とした糖尿病性腎症の新規バイオマーカー探索

Novel exosome-based biomarkers for diabetic nephropathy

○神谷 孝平[1]、桑田 啓子[2]、吉武 淳[3]、内田 浩二[4]、柴田 貴広[1]（[1]名大院生命農、[2]名大 ITbM、[3]名大未来社会、[4]東大院農生）
○Kohei KAMIYA[1], Keiko KUWATA[2], Jun YOSHITAKE[3], Koji UCHIDA[4], Takahiro SHIBATA[1]
([1]Grad. Sch. of Bioagric. Sci, Nagoya Univ., [2]Institute of Transformative Bio-Molecules, Nagoya Univ., [3]Institute of Innovation for Future Society, Nagoya Univ., [4]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci, The Univ. of Tokyo)

【目的】
現在、糖尿病性腎症に対して尿中アルブミンや尿タンパクといった、病態が進行した結果変化する指標を臨床における診断基準としている。そのため、病態が進行する予兆を捉える新規の診断基準を確立することが出来れば、治療計画を早期に立てることが出来ると期待されている。こうした背景から我々は、体液中に存在するエクソソームという小胞に注目した。エクソソームは、①細胞から放出され、細胞内の情報を反映している、②放出されたのち、取り込まれた別の細胞に情報を伝える、という二つの性質を持っている。このことから、体液中エクソソームに含まれる分子を調べることによって、疾患の発症につながる細胞機能の不調を反映した早期バイオマーカーの開発や、細胞間の情報伝達を介した疾患の進行機構の解明につながるものと考えている。本研究では、尿中に腎臓由来エクソソームが豊富に含まれるということに着目し、尿中エクソソームから糖尿病性腎症に対する新規バイオマーカーとなる分子を同定することを目指している。
【方法】
健常者モデル(LETO)および 2 型糖尿病モデルラット(OLETF)を代謝ケージ中で飼育し、24 時間蓄尿したサンプルから、サイズ排除クロマトグラフィーによりエクソソームを回収した。得られたエクソソームよりタンパク質を抽出し、還元アルキル化、トリプシン消化を行ったのち、nano-LC MS/MS に供し、エクソソーム中に含まれるタンパク質の網羅的な解析を行った。既存のマーカーである尿中アルブミンを指標に、糖尿病モデルにおいて有意な腎障害が見られていない未病期と、糖尿病性腎症顕性期それぞれにおいて回収した尿中エクソソームを同週齢の健常者モデルの尿中エクソソームと比較した。
【結果】
タンパク質の網羅的な解析の結果、糖尿病および健常者モデルラットの尿中エクソソームから各群 1000 種類以上のタンパク質が検出された。そこで、糖尿病モデルにおいて健常者モデルと比べて未病期および糖尿病性腎症顕性期双方において存在量がともに増加あるいは減少している分子を選定した。その中でも、糖尿病モデルラットの腎組織中においても同様に存在量が変化しているものに絞り込み、新規バイオマーカーの候補となる数種類のタンパク質を同定した。現在、それらの候補タンパク質の発現変動を詳細に解析している。

exosome, proteomic analysis, diabetic nephropathy

講演番号：3E8a14
講演日時：3 月 26 日 11:43～ 1 号館 E8 会場

マラリア原虫ヒスチジンリッチタンパク質（PfHRP2）の細胞膜透過と細胞毒性に関する研究

Analysis of the cell penetration and cytotoxicity of *P. falciparum* malaria Histidine Rich Protein II (PfHRP2)

○下田 麻由、河野 強、岩崎 崇（鳥取大院・持続）
○Mayu SHIMODA, Tsuyoshi KAWANO, Takashi IWASAKI (Grad. Sch. Tottori Univ.)

【背景・目的】細胞膜透過ペプチド（CPPs）は細胞内への分子輸送キャリアーとして注目を集めている。これら CPPs は、アルギニンやリジンを豊富に含んだ特徴的なアミノ酸配列を有している。我々の研究室では、新規 CPP としてヒスチジンのみが連続したポリヒスチジンペプチド（PolyHis)を発見した。さらに、PolyHis を融合したタンパク質（例えば GFP::PolyHis や RFP::PolyHis など）も、細胞膜を透過することを確認した。PolyHis を融合することで人工的に調製した組換えタンパク質が細胞膜を透過するのであれば、元来ヒスチジンを豊富に含んでいる天然タンパク質も同様に細胞膜を透過するのではないかと考えた。そこで我々は、自然界に存在する熱帯熱マラリア原虫（*Plasmodium falciparum*）由来の Histidine Rich Protein Ⅱ（HRP2）に着目した。マラリア HRP2 は、熱帯熱マラリア原虫がヒトに感染した際にヒト血中に多量に放出される 30.6 kDa のタンパク質であり、極めて高いヒスチジン含有率（35.74%）を示す。しかし、ヒト体内におけるマラリア HRP2 の働きは未解明である。そこで本研究では、マラリア HRP2 の細胞膜透過の検証とその生理機能の解明を試みた。
【方法・結果】細胞膜透過を検証するために、緑色蛍光色素（FITC）を用いてマラリア HRP2 を修飾し、HT1080 細胞（ヒト線維肉腫細胞）に添加した（終濃度 1 μM)。次いで、37℃で 3 h インキュベーションした後、Flow cytometry および共焦点レーザー顕微鏡によりマラリア HRP2 の細胞膜透過を定量した。予想通り、マラリア HRP2 は細胞膜透過を示した。また、マラリア HRP2 の細胞膜透過は低温（4℃）条件で阻害されなかったことから、エネルギー依存的なエンドサイトーシス経路とは異なる経路が関与していることが示唆された。非常に興味深いことに、HT1080 細胞にマラリア HRP2（終濃度 1 μM）を添加後 24 h インキュベーションしたところ、細胞毒性が認められた。すなわち、マラリア HRP2 は HT1080 細胞に取り込まれた後に細胞毒性を示すことが明らかとなった。さらに、マラリア HRP2 の添加量を変動させた場合の細胞膜透過と細胞毒性を定量したところ、どちらも濃度依存的であることを確認した。また、血清タンパク質存在下と比較して、血清タンパク質非存在下ではマラリア HRP2 の細胞膜透過と細胞毒性はそれぞれ約 3 倍と約 2 倍に上昇した。この結果は、血清タンパク質濃度が低い状態（例えば栄養失調状態）では、マラリア HRP2 の危険性が高まる可能性を示唆している。本研究成果は、マラリア HRP2 の細胞膜透過と細胞毒性の関連性に関する初めての報告であり、さらには熱帯熱マラリアの致死性にマラリア HRP2 が関与している可能性を示唆するものである。マラリア HRP2 のさらなる研究を進めることで、熱帯熱マラリアの新たな治療法開発に貢献できると期待される。

Malaria, Histidine Rich Protein, Cell Penetration

発表責任者：岩崎崇（itaka@tottori-u.ac.jp）

講演番号：3E8a15
講演日時：3 月 26 日 11:54～ 1 号館 E8 会場

リン脂質輸送体 ABCB4 の第 4 膜貫通ヘリックスに存在するプロリンの機能解析
Functional analysis of proline residue located in transmembrane helix 4
○小川 峻[1]、末永 健人[1]、木岡 紀幸[1]、植田 和光[1,2]、木村 泰久[1] ([1]京大院農、[2]京大・iCeMS)
○ Shun OGAWA[1], Kento SUENAGA[1], Noriyuki KIOKA[1], Kazumitsu UEDA[1,2], Yasuhisa KIMURA[1] ([1]Grad sch. Agri. Kyoto Univ., [2]iCeMS. Kyoto Univ.)

<背景>ATP-Binding Cassette(ABC)B4 は胆管細胞の胆管側細胞膜に発現する ATP 依存的な 12 回膜貫通型輸送体である。ABCB4 は膜中のホスファチジルコリン(PC)を胆汁中に輸送し、胆汁酸の界面活性作用を弱めることで胆管細胞を保護する。ABCB4 は多剤排出ポンプ ABCB1(MDR1)と 86%のアミノ酸配列類似性を示すため、両者の基質輸送機構には共通点が多いと推測される。MDR1 の好熱性紅藻ホモログの CmABCB1 の構造解析(1)から、MDR1 では第 4 膜貫通ヘリックス(TM4)と第 10 膜貫通ヘリックス(TM10)の一部が柔軟に動き、脂質膜中から基質を取り込んでいる可能性が示唆された。実際、ヒト MDR1 の TM4 と TM10 の柔軟な領域をバリン置換によって固定化した変異体は、基質輸送能を失うことが先行研究により示唆されている。一方、ヒト ABCB4 では同様のバリン置換により TM4 を固定化することで PC 輸送活性が消失することを前年度大会で報告した。2018 年に報告されたクライオ電顕による MDR1 の構造解析(2)から、MDR1 の TM4 の柔軟な動きは膜貫通領域に存在するプロリンを起点とすることが示唆された。このプロリンは ABCB4 の TM4 においても保存されており、ABCB4 の TM4 の柔軟な動きに重要な役割を担っていると予想される。そこで、本研究では ABCB4 の TM4 に存在するプロリンの PC 輸送における働きを調べた。
<結果>ABCB4 の TM4 のプロリンをアラニンに置換することで TM4 の柔軟性が低下すると予想される変異体(TM4PA)を作製した。また、発現量や細胞内局在を評価するため C 末端に EGFP を付加した。野生型および TM4PA 変異体を HEK293 細胞に一過的に発現させ、細胞内局在を EGFP 蛍光によって評価した結果、TM4PA 変異体も野生型同様に細胞膜に局在が観察された。このことから TM4 のプロリンは細胞内局在やタンパク質の安定性には重要ではないことが示唆された。この変異体の PC 輸送活性を測定した結果、TM4PA 変異体を発現させた細胞からの PC 排出量は非発現細胞と同等であり、TM4PA 変異体は PC 輸送能を欠損していることが明らかとなった。本結果はプロリンの細胞内側に位置し、柔軟に動くと予想された GAA 配列をバリンに置換した変異体の結果とよく一致する。これらの結果からプロリンにおいて TM4 が屈曲し、その細胞内側の領域が柔軟に稼動することが ABCB4 の PC 輸送に必要であることが示唆された。

(1) Kodan A, PNAS 111, 4049-54, 2014
(2) Alam A, PNAS 115, E1973-E1982, 2018

ABCB4, MDR1, phospholipids

発表責任者：木村泰久（ykimura@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3E8p01
講演日時：3 月 26 日 13:50～ 1 号館 E8 会場

栽培イチゴにおけるポリガラクツロナーゼ遺伝子(*FaPG*)の多様性

Diversity of polygalacturonase gene (*FaPG*) in cultivated strawberry.

○小山 浩由、平野 泰志 (埼玉農技研)
○Hiroyoshi KOYAMA, Yasushi HIRANO (Saitama Agri. Tech. Res. Ctr.)

【背景および目的】

近年、育種の分野ではゲノム情報を利用した研究が進められている。しかし、八倍体のイチゴはそのゲノム構造の複雑さにより、育種のための遺伝子情報の利用が進んでいない。

イチゴの育種で重要な形質のひとつとして、輸送性・日持ち性が挙げられ、これには果実の硬度が関係すると考えられている。果実の硬度は、細胞壁を構成するペクチンの主要成分であるポリガラクツロン酸を分解するポリガラクツロナーゼの働きが関与すると推察される。

そこで、本試験ではイチゴの育種に活用するため、果実の輸送性・日持ち性に関与すると考えられるポリガラクツロナーゼ遺伝子（*FaPG*）について解析した。

【材料および方法】

栽培イチゴ（*Fragaria*×*ananassa* D.）3 品種（‘埼園い１号’，‘埼園い３号’，‘とちおとめ’）から DNA を抽出した。DDBJ より入手した *FaPG* 配列 (AF380299) をもとに作製したプライマーを用いて、増幅した *FaPG* 配列断片をダイレクトシーケンス、制限酵素処理、クローニングの解析に供試した。クローニングにより得られた配列を用いて、NJ 法により系統樹を作成した。

【結果および考察】

ダイレクトシーケンスの結果、すべての品種において複数個所で波形の重複が検出された。また、品種間で異なる 2 タイプの SSR 多型が認められた。PCR 産物を制限酵素処理した結果、同じ SSR 間でも制限酵素で切断される断片と切断されない断片が存在していた。これらのことから、供試した品種において、SSR 多型と制限酵素サイトの異なる 4 タイプの遺伝子型の存在が示唆された。

クローニングの結果、‘埼園い１号’で 6 サンプル、‘埼園い３号’で 9 サンプル、‘とちおとめ’で 5 サンプル、計 20 サンプルの *FaPG* 配列を決定した。得られた配列をもとに系統樹を作成したところ主に 3 クレードに分類された。各配列を比較したところ、クレードごとに共通したアミノ酸の置換を伴う SNP や、塩基挿入・欠失の変異が認められた。すべての品種由来の *FaPG* 配列が含まれるクレードに共通した変異ではアミノ酸置換やフレームシフトが起こり、活性を持たない FaPG をコードすることが推察された。

今後、今回得られた結果と果実の硬皮・軟皮形質の品種の *FaPG* を比較して、果実の硬軟との関連を明らかにする予定である。

strawberry, polygalacturonase, polyploid

発表責任者：小山 浩由（koyama.hiroyoshi@pref.saitama.lg.jp）

講演番号：3E8p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ 1 号館 E8 会場

モモ果肉色の多様化に向けた‘天津水蜜桃’の紅肉形質の解析と育種マーカー開発
Molecular analysis and marker development of blood-flesh trait of 'Tenshin Suimitsuto' toward diversification of peach flesh color
原 美由紀[1]、鵜木 悠治郎[2]、日原 誠介[2]、○小田 賢司[1]([1]岡山県農総セ生科研、[2]岡山県農総セ農研)
Miyuki Hara[1], Yuujiro Unoki[2], Seisuke Hihara[2], ○Kenji Oda[1] ([1]RIBS Okayama, [2]Res Inst Agric, Okayama Pref Tech Cent Agric Forest Fish)

現在日本で栽培されているほとんどの食用モモ品種は、明治 8 年に清国から導入された‘上海水蜜桃’を起源に育成されたと考えられている（J Japan Soc Hort Sci, 2003)。このため、いずれの品種も‘上海水蜜桃’と形質が非常によく似通っている。‘上海水蜜桃’と同時に日本に導入された‘天津水蜜桃’は果頂部が尖鋭、果肉が紅色など、現在の日本の栽培種には珍しい特徴を有している。このような新奇な形質に関わる遺伝子を取り込むことで、モモの多様化が図れると期待されことから、本研究では‘天津水蜜桃’の紅肉形質に関する解析を行い、育種選抜マーカーの開発を行った。

中国の紅肉品種‘Dahongpao’は、NAC 転写因子 *Blood*（*BL*）が紅肉化の原因と考えられている（Plant J, 2015)。‘天津水蜜桃’は、紅肉が遺伝的に優性であること、着色が果肉特異的であること、*BL* が過剰発現していることなどから、‘Dahongpao’と同様に *BL* 遺伝子が紅肉の原因でないかと推察された。‘Dahongpao’*BL* の変異に関する報告はないが、‘天津水蜜桃’*BL* の遺伝子構造を詳細に解析したところ、白肉種にはない唯一の変異として、プロモーター領域における長い挿入配列がホモで見出された。この挿入が紅肉化を引き起こしているのではないかと考えられる。‘天津桃太郎’の F1 交配樹を調べたところ、*BL* プロモーターの挿入配列の有無は果肉の着色と完全に一致し、白肉/紅肉の選抜マーカーとして利用できると考えられた。

BL の変異は転写因子 *MYB10.1* の発現を誘導し、その結果、アントシアニン合成酵素遺伝子が誘導されて紅色化する。我々はこれまでに、*MYB10.1* は果皮着色において主要な働きをする転写因子であること、発現型（*MYB10.1-1*）と非発現型（*MYB10.1-2*）の 2 つのアレルが存在し、*MYB10.1-2* ホモだとアントシアニンができずに果皮は非着色となり、*MYB10.1-1/ MYB10.1-2* ヘテロだとアントシアニンが少なく低着色になることを明らかにした（BMC Plant Biol, 2015)。紅肉果実における *MYB10.1* の遺伝子型の影響を調べたところ、*MYB10.1-1/ MYB10.1-2* ヘテロ型交配樹の果肉は *MYB10.1-1* ホモの交配樹に比べて紅味が低下し、*MYB10.1* のマーカーは紅味程度のマーカーになることが明らかとなった。

MYB10.1 の遺伝子型が同じ交配樹でも着色程度にはバラツキがあり、他の遺伝子や環境の影響が示唆される。果皮着色の場合、着色程度は光の影響を極めて強く受ける。そこで、果肉着色に対する光の影響を調べた。紅肉モモの果実に遮光率の異なる果実袋（オレンジ袋および白黒袋）を掛けて栽培し、収穫時の着色程度を調査したところ、果肉着色は光の影響を受けるが、果皮着色に比べ光の感受性が弱いことが明らかとなった。

peach, blood flesh, anthocyanin

講演番号：3E8p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ 1 号館 E8 会場

有用な二次代謝産物を高蓄積するセージを作製するための再分化系および形質転換系の確立

Establishment of redifferentiation and transformation methods to produce useful secondary metabolites-high production sage

○上ヶ平 柚歩[1]、平井 洋行[2]、古川 岳人[2]、蔡 晃植[1,2] ([1]長浜バイオ大院・バイオ、[2]長浜バイオ大・バイオ)

○Yuho KAMIGAHIRA[1], Hiroyuki HIRAI[2], Takehito FURUKAWA[2], Fang-Sik Che[1,2] ([1]Grad. Sch. of Bio-Sci, Nagahama Inst. of Bio-Sci. and Tech., [2]Dept. of Bio, Nagahama Inst. of Bio-Sci and Tech.)

シソ科のローズマリー（*Rosmarinus officinalis*）やセージ（*Salvia* sp.）に含まれるカルノシン酸は抗酸化作用、神経突起伸長の促進などの生理活性を有している。しかし、乾重量当たり 3%のカルノシン酸を含有するとされるローズマリーは個体が小さく、成長が遅いことから、カルノシン酸の大量生産には向いていない。一方、セージは大きく成長も早いが、カルノシン酸含有量はローズマリーの 1/3 以下となる。そこで本研究では、カルノシン酸を高蓄積するセージを遺伝子組換え技術を用いて作製し、カルノシン酸を大量に生産できる系を構築することを目指している。この系を構築するためには、まず、植物細胞にアグロバクテリウム法により遺伝子導入を行った後、遺伝子導入された細胞を選抜し、再分化させて遺伝子組換え植物体を得る必要がある。しかし、セージの再分化系や形質転換系は確立されていない。そこで、セージの再分化系と形質転換系を確立することを目的とした研究を開始した。まず、材料となるセージの栽培法を検討した。遺伝子組換えに必要な無菌植物の栽培のために様々な濃度の次亜塩素酸ナトリウムに種子を浸漬し、様々な培地に播種して 24 時間暗黒下、23℃で発芽させた。その結果、ホワイトセージ（*Salvia apiana*）種子は 0.4%次亜塩素酸ナトリウムに 15 分浸漬、クラリセージ（*Salvia sclarea*）種子は 0.3%次亜塩素酸ナトリウムに 15 分浸漬すると効率よく発芽することが明らかになった。発芽後は 16 時間明期、8 時間暗期条件、23℃で生育させることで無菌植物が得られることも明らかとなった。さらに、発芽にはスクロースを含まない 1/2MS 培地が適しており、生育には 20%スクロース含有 1/2MS 培地が適していることも明らかとなった。また、一般的にセージは挿し木によって増やすことが可能である。そこで、無菌で生育させたクラリセージ、ホワイトセージの側枝を切り 20%スクロース含有 1/2MS 培地に挿した。その結果、二週間ほどで切り口からの発根が確認できた。そこで、クラリセージの再分化法を検討するにあたり、節間からの直接的再分化法を試みた。20%スクロース含有 1/2MS 培地にクラリセージの節間を静置し、16 時間明期、8 時間暗期条件、23℃で生育させたところ、二週間ほどで不定芽、不定根の誘導が確認された。クラリセージの節間からの直接的再分化に成功したので、節間にアグロバクテリウムを感染させることで形質転換を試みた。切断した節間をアグロバクテリウム懸濁液に浸漬し形質転換マーカーとして GFP を導入したところ、節間細胞の一部で GFP 蛍光が確認された。しかし、GFP を発現する不定芽は得られなかったので、再分化と形質転換の条件を再検討することが必要であることが示された。

secondary metabolite, redifferentiation, transformation

講演番号：3E8p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ 1 号館 E8 会場

国内産生薬植物カラスビシャクの形質転換の試み

Trial of generation of transformants from a medicinal plant *Pinellia ternata* collected in Japan

○青木 達大[1]、下川 響[2]、江口 壽彦[3]、松岡 健[1,2,3,4] ([1]九大農、[2]九大院生資環、[3]九大生環セ、[4]九大院農)
○Tatsuhiro AOKI[1], Hibiki SHIMOKAWA[2], Toshihiko EGUCHI[3], Ken MATSUOKA[1,2,3,4] ([1]Kyushu Univ. Sch. Agr., [2]Kyushu Univ. Grad. Sch. Bio-Environ. Sci., [3]Kyushu Univ. Biotron Appl. Ctr., [4]Kyushu Univ. Fac. Agr.)

カラスビシャク(*Pinellia ternata*)の塊茎を加工した半夏はおよそ 23%の漢方処方に用いられる重要な生薬である。半夏は制吐性を有する多糖アラバンを有効成分の主成分として持つ。我々は、アラバンの生合成遺伝子の同定を目指した研究を進めており、この過程において、アラバン生合成遺伝子候補の抑制によりアラバン蓄積量が低下することを確認する実験が必須となると考えている。そこで我々は、国内産カラスビシャクを材料に、*in vitro* での個体再生系の確立およびアグロバクテリウム感染系の構築を進めたので報告する。

まず、最近報告された *in vitro* での個体再生系(Duan Y. *et al*., 2015 *Biologia* 70, 1351)を参考に、手持ちの Y 系統由来の組織片から個体再生が可能か検討した。100 mL 三角フラスコ内に 6-BA と IAA を含む MS 液体培地 40 mL を調製し、1 cm 大に切り分けたカラスビシャクの葉柄 8-10 断片を入れ、100 rpm, 明所 16 時間暗所 8 時間の光周期の下、23°C で培養した。培養後 2 週間程度で一部の外植片から不定胚が形成されはじめ、ほぼ 1 ヶ月後には全ての断片上に不定胚が形成され、さらにその 2, 3 週間後には不定胚からの発芽が認められた。発芽した断片を、プラントボックス内に作成した 6-BA と Kinetin, D-Glucitol, Phytagel を含む MS 固体培地上に移して連続光条件 25°C で培養すると、およそ 1 ヶ月後にガラス化した葉と葉柄が再生された。その後、ホルモンを含まない培地に移し替えるとおよそ 2 ヶ月後に発根が見られ、これらの発根個体を新しい培地に植え替えることで、ガラス化していない再生個体を得ることが出来た。

この実験と並行して、CaMV35S プロモーターの下流にイントロンを挿入したβ-グルクロニダーゼ遺伝子を持つプラスミド pIG121-Hm (Ohta S. *et al*., 1990 *Plant Cell Physiol*. 31, 805)を導入した *A. tumefaciens EHA105* 株を用いて、Y 系統への感染条件の検討を進めた。まず、温室で栽培した個体由来の葉、葉柄を上記アグロバクテリウムと共存培養したが、この際には感染が認められなかった。一方、*in vitro* での再生個体の葉, 葉柄, カルス由来の外植片を希釈した菌液に暗所 4 日間浸漬し、次いで 6-BA と 1-NAA を含む MS 固体培地上で暗所 1 日間静置培養し、その後外植片を GUS 染色液に浸して保温したところ、いずれの組織にも GUS 活性に由来する青い発色が認められた。このことは、上記アグロバクテリウムがカラスビシャク組織に感染したことを示している。現在、上記 2 条件を組み合わせることで、抗生物質耐性を持つ形質転換体の作製を試みている。

Pinellia ternata, plant regeneration, transformation

講演番号：3E8p05
講演日時：3 月 26 日 14:34～ 1 号館 E8 会場

植物色素フラボノイドに着目した変異誘発処理当代植物における突然変異検出
Mutation detection by focusing on flavonoid pigments in mutagenized Arabidopsis plants
○平田 翔也[1,2]、北村 智[2]、佐藤 勝也[2]、鳴海 一成[1]、大野 豊[2] ([1]東洋大院・生命科学、[2]量研・高崎研)
○SHOYA HIRATA[1,2], SATOSHI KITAMURA[2], KATSUYA SATOH[2], ISSAY NARUMI[1], YUTAKA OONO[2] ([1]Toyo Univ, [2]QST,TAKASAKI)

量子科学技術研究開発機構高崎量子応用研究所（量研・高崎研）では、イオンビームで誘発した突然変異を利用して、数多くの植物や微生物の有用品種を作出してきた。このような突然変異育種では、ランダムに生じた突然変異を有する多数の個体の中から、有用な形質を示す個体を選抜するのが一般的である。しかし、イオンビームやガンマ線によって生じる突然変異がランダムではない可能性が、植物を用いた研究で報告されている（Nagatomi *et al.*, 1997; Hase *et al.*, 2010)。放射線による突然変異の発生に係る法則性を明らかにできれば、特定の突然変異を効率よく発生させることも可能となるが、そのためには、多数の検体を簡便に試験できる実験系が不可欠である。そこで本研究では、変異誘発処理当代（M1）植物における突然変異を調査するために、モデル植物シロイヌナズナにおけるフラボノイド色素合成経路に着目した。

シロイヌナズナのフラボノイド色素合成は単一経路で支配され、その合成に関与する遺伝子群のうちの一つでも機能欠損となるとフラボノイド色素合成が遮断される。また、その遮断されるステップに依存して、異なるフラボノイド色素が蓄積する（Lepiniec *et al.*, 2006)。シロイヌナズナでは、フラボノイド色素は主に種皮で蓄積し、例えば *tt4* 変異体及び *tt8* 変異体は、それぞれ、薄黄色（*tt4*）及び薄茶色（*tt8*）といった、異なる色素を種皮に蓄積する。これらの F1 個体は二重ヘテロ（*TT4*/*tt4* *TT8*/*tt8*）となり、正常型アリルの機能によって、野生株と同じ褐色色素を種皮に蓄積する。そこで、この F1 個体において、ヘテロ遺伝子の正常型アリルに突然変異が起こった場合には、種皮の褐色色素の欠損として容易に検出され、さらに種皮の色調の違いから、*tt4* あるいは *tt8* の突然変異に起因することを簡便に識別できると考えた。本発表では、この二重ヘテロ植物を用いた突然変異検出系の構築や、イオンビームやガンマ線を照射した場合の突然変異出現頻度の調査結果などを中心に、これまで得られた結果について報告する。

本研究の一部は、平成 30 年度東洋大学井上円了記念研究助成を受けて実施された。

Nagatomi *et al.*, (1997) Gamma Field Symp. 35, 51.
Hase *et al.*, (2010) Plant Biotech. 27, 99.
Lepiniec *et al.*, (2006) Ann. Rev. Plant Biol. 57, 405.

ion beam, flavonoid, Arabidopsis

講演番号：3E8p06
講演日時：3 月 26 日 14:55～ 1 号館 E8 会場

翻訳エンハンサーdMac3 と薬剤誘導型プロモーターを利用した、高効率なゲノム編集をもたらす TALEN system の開発

Construction and evaluation of an improved TALEN system containing the translational enhancer dMac3 with inducible promoter that allows an efficient genome editing

○小野寺 瞳[1]、新宮 沙絵子[1]、大沼 万里子[1]、堀江 峻晃[1]、紀平 望帆[1,2]、草野 博彰[1,3]、寺村 浩[1]、島田 浩章[1] ([1]東京理科大・生物工、[2]現：奈良先端大・バイオサイエンス、[3]現：京都大・生存圏研)
○Hitomi ONODERA[1], Saeko SHINGU[1], Mariko OHNUMA[1], Takaaki HORIE[1], Miho KIHIRA[1,2], Hiroaki KUSANO[1,3], Hiroshi TERAMURA[1], Hiroaki SHIMADA[1] ([1]Dept. of Biol. Sci & Technol., Tokyo Univ. of Sci., [2]Grad. School of Biol. Sci., NAIST., [3]RISH., Univ. Kyoto.)

ゲノム編集技術の 1 つである TALEN は、1 対の TALEN タンパク質がゲノム DNA に結合し、DNA 切断ドメインが二量体を形成した時に標的配列を切断する。これにより変異が誘発される。TALEN は配列認識の特異性が高く、標的部位以外での off-target 変異がほとんど起こらない特徴を有する。

我々は、植物用 TALEN を容易に構築するためのシステムとして Emerald Gateway TALEN system（Kusano H. et al., Sci. Rep. 6., 30234(2016)）を開発している。本研究では、イネの *OsMac3* 遺伝子より得られた、植物で強力に機能する翻訳エンハンサーdMac3 をこのシステムに組み込むことで、ゲノム編集効率の向上を図った。これにより、dMac3 を有した高効率 TALEN を簡便に構築できる Emerald Gateway dx-TALEN system を開発した。このシステムを用いて、イネのプロテアーゼ遺伝子を標的とする TALEN を構築し、これをイネ細胞に導入して、変異体が作出される割合を調べた。形質転換した細胞からゲノム DNA を抽出し、CAPS（Cleaved Amplified Polymorphic Sequence）解析により標的部位における変異の有無を調べた。その結果、従来型の TALEN を用いた場合よりも dMac3 を組み込んだ dx-TALEN を用いた場合には変異体が生じた割合が大きく増加していた。このことから、TALEN によるゲノム編集効率の向上に dMac3 の利用が有効であることがわかった。

次に、薬剤（グルココルチコイド）の投与で一過的に強い発現をもたらす薬剤誘導型プロモーターを Emerald Gateway dx-TALEN system に組み込み、TALEN を一過的に発現させることができるシステム（Emerald Gateway dx-TALEN premium system）を構築した。このシステムでは、薬剤を投与した植物細胞で TALEN が働き、これによって標的配列での変異が誘発されることが期待された。このシステムを用いて同じ部位を標的とする TALEN を作製し、変異の誘発に関する性能評価を行ったところ、薬剤投与を行った細胞のみで高い割合で変異が生じることがわかった。

Plant, Genome editing, TALEN

発表責任者：島田浩章（shimadah@rs.tus.ac.jp）

講演番号：3E8p07
講演日時：3 月 26 日 15:06～ 1 号館 E8 会場

翻訳エンハンサーdMac3 を利用したゲノム編集による低アミロースジャガイモの作出
Evaluation of a genome editing system using the translational enhancer, dMac3
○寺村 浩[1]、草野 博彰[1,2]、無津呂(青木) 裕美[1]、大沼 万里子[1]、堀江 峻晃[1]、市野澤 大[1]、朝日 貴大[1]、浅野 賢治[3]、野田 高弘[3]、島田 浩章[1] ([1]東京理科大・基礎工・生物工、[2]現：京大・生存研、[3]農研機構・北海道農業研究センター)
○Hirishi Teramura[1], Hiroaki Kusano[1,2], Hiromi Mutsuro-Aoki[1], Mariko Ohnuma[1], Takaaki Horie[1], Dai Ichinosawa[1], Takahiro Asahi[1], Kenji Asano[3], Takahiro Noda[3], Hiroaki Shimada[1] ([1]Department of Biological Science and Technology, Tokyo University of Science, [2]RISH, Kyoto University, [3]Hokkaido Agricultural Research Center, NARO)

イネの OsMac3 の mRNA の 5’非翻訳領域に由来する dMac3 配列は、下流 ORF の翻訳量を顕著に高める翻訳エンハンサー活性を有する。本研究では、dMac3 をゲノム編集ツールである Emerald Gateway TALEN システムおよび CRISPR/Cas9 ベクターに組み込み、TALEN および Cas9 タンパク質の翻訳量を高めることで、ゲノム編集による変異導入効率の向上を図った。これらのゲノム編集ツールを用いて、ジャガイモの顆粒結合型デンプン合成酵素(*GBSS*)を標的とする TALEN 遺伝子および CRISPR/Cas9 遺伝子を作製した。これらのゲノム編集遺伝子を 4 倍体ジャガイモ「さやか」に導入し、形質転換植物を得た。形質転換体ゲノムに含まれる *GBSS* 遺伝子の標的部位を簡易的な手法（CAPS）で解析したところ、dMac3 を組み込んだ CRISPR/Cas9 を用いた場合では、得られた 26 個の再分化個体のうち 20 個で変異が検出された。このうち 9 個体では、4 つの対立遺伝子すべてに変異が導入されていた。これらの変異体ジャガイモの塊茎に含まれるデンプンのアミロース含量を調べたところ、野生型と比べて低アミロースの形質を有することが分かった。また、これと並行して、これらの 4 アリル変異体の変異導入部位の配列の解析を行った。

（本研究の一部は、内閣府戦略的イノベーション創造プログラム（SIP）「次世代農林水産業創造技術」（管理法人生研センター）によって実施された）

Genome editing, Starch, Potato

講演番号：3E8p08
講演日時：3 月 26 日 15:17～ 1 号館 E8 会場

多様な作物のゲノム編集研究に活用できる人工気象機を用いた簡便高密度水耕栽培法

High-density crop hydroponics in a plant incubator for genome editing research

○黒田 昌治 (農研機構中央農研)
○Masaharu Kuroda (NARO Cent. Agric. Res. Cent.)

我々は、以前に開発した制限酵素のみで遺伝子多重連結ができるバイナリーベクター[1]を基盤とした独自のイネ用ゲノム編集ベクターセットを作製し、ゲノム編集によるコメの品質改良を目指している。2018年度の大会では、登熟期の高温によるコメ品質低下に関わるアルファアミラーゼ遺伝子[2]を複数破壊する試みについて報告するとともに、遺伝子改変のためのガイドRNAが多重導入できる改良版ゲノム編集ベクターについても報告し、その後も研究を継続している。

一方で、ゲノム編集の途上にある植物は組換え植物と同様の扱いが求められ、一定の基準を満たした専用施設が必要となる。一般に作物は植物体が大きくて種子の収穫まで時間がかかるため、ゲノム編集研究を行うには隔離温室等の設備的ハードルが研究発展の阻害要因となる。そこで我々は、イネをモデルとして簡便に植物体を高密度に水耕栽培する方法（Single-tube hydroponics）を開発した[3][4]。この方法を使えば、1台の植物インキュベータを上下に2分割して生育段階の異なる植物体を配置する「庫内2分割栽培」も可能となる。その結果、床面積（50cm x 50cm）あたり144個体、上下合計で288個体を同時栽培できた。また、イネの場合ほど高密度にはできないものの、本方法によりダイズ（36個体x2段）、アズキ（36個体x2段）、トウモロコシ（庫内2分割栽培は不可能で24個体）が栽培できた。さらに野菜類についても検討した結果、ピーマン等のナス科野菜の栽培にも適用できることが確認できたので、今回はその概要を報告する。

本水耕栽培法は、ゲノム編集などの基礎研究や品種改良研究において、初期世代の選抜や冬場の世代促進など、多様な場面で極めて有用である。

[1] Kuroda M.(2010) Biosci. Biotechnol. Biochem.74, 2348-2351
[2] Hakata M.(2012) Plant Biotechnol. J. 10, 1110-1117
[3] Kuroda M.(2015) Biosci. Biotechnol. Biochem.79, 63-67
[4] http://www.naro.affrc.go.jp/project/results/laboratory/narc/2014/narc14_s11.html

水耕栽培法については、マニュアル等による技術移転にも対応しており、ご興味のある方は発表者（kurodama@affrc.go.jp）までお問い合わせください。

crop, hydroponics, genome editing

発表責任者：黒田昌治（kurodama@affrc.go.jp）

講演番号：3E8p09
講演日時：3 月 26 日 15:28～ 1 号館 E8 会場

ゲノム編集技術を用いた多重遺伝子破壊による単細胞性緑藻（*Coccomyxa*）の油脂生産性改良

A CRISPR/Cas9-mediated triple knockout mutant of the green alga *Coccomyxa* showed increased oil productivity

○井出 曜子[1]、早川 准平[2]、吉満 勇也[1]、糠塚 明[1]、小松 さと子[1]、今村 壮輔[2,3]、原山 重明[2]（[1]（株）デンソー、[2]中央大、[3]東工大）

○Yoko IDE[1], Jumpei Hayakawa[2], Yuya Yoshimitsu[1], Akira Nukazuka[1], Satoko Komatsu[1], Sousuke Imamura[2,3], Shigeaki Harayama[2] ([1]DENSO CORP., [2]Chuo Univ., [3]Tokyo Tech.)

日本の温泉地から単離された 2 種類の単細胞性緑藻コッコミクサ（*Coccomyxa* spp. Obi 株と KJ 株）は、窒素欠乏などのストレス環境下においてトリアシルグリセロールを主成分とした油脂を細胞内に蓄積する。これらの株は pH 3-4 の酸性培地での増殖が速いため、他の微生物の混入を最小限に抑えた屋外培養が可能である。我々は藻類バイオ燃料の実用化に向け、これらの株を遺伝的に改良することによって油脂生産性をさらに高める研究を行っている。Obi 株及び KJ 株を突然変異誘起物質であるニトロソグアニジンによって処理した後、低クロロフィル、強光耐性、高油脂生産、油脂分解抑制などの有用形質を持った突然変異体をそれぞれ複数単離し、次世代シーケンサーを用いたゲノム解析と網羅的な変異解析によって原因遺伝子候補を決定した。さらに、Cas9 タンパク質とガイド RNA の複合体をエレクトロポレーション法で細胞内に直接導入する CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集によってそれらの候補遺伝子を破壊し、形質を調べた。その結果、緑藻コッコミクサの 3 つの遺伝子が、それぞれ異なる経路で油脂生産性に関与することが示された。そこで、これら 3 つの遺伝子をターゲットとした KJ 株の 3 重遺伝子破壊株を CRISPR/Cas9 システムを用いて作製した。この 3 重遺伝子破壊株は、低クロロフィル、強光耐性、高油脂生産、油脂分解抑制の特徴を合わせ持っていた。この 3 重遺伝子破壊株の全ゲノム解析を行うことにより、この株には外来遺伝子が一切含まれず、また標的遺伝子以外にほとんど変異を持たないことが示された。この株を、屋外大量培養を模擬した室内培養システムで評価したところ、細胞内の油脂蓄積量が増加し、かつ藻体乾燥重量が増加したため、油脂生産性が KJ 株の 1.7 倍以上に増加した。この 3 重遺伝子破壊株でどのような遺伝子発現の変化が起こっているのかを解析し、さらにこの 3 重遺伝子破壊株を親株にして、別の遺伝子破壊や、油脂生産に関わる遺伝子のセルフクローニングによる過剰発現によって油脂生産性をさらに高めることを目指しており、それらの試みについても報告する。

CRISPR, algal biofuels, genome editing

発表責任者：井出曜子（YOKO_IDE@denso.co.jp）

講演番号：3E8p10
講演日時：3 月 26 日 15:39～ 1 号館 E8 会場

ポリフェノールを多く含む植物の培養細胞を用いた flavan-3-ol 誘導体合成

Analysis and efficient production research of functional flavan-3-ol derivatives

○小堀 亮[1]、西村 拓哉[1]、多賀 大輝[2]、橋本 誠也[2]、輿水 駿[2]、川崎 崇[3]、齊藤 安貴子[1,2] ([1]大阪電気通信大学大学院工学研究科先端理工学専攻、[2]大阪電気通信大学工学部環境科学科、[3]京都大学生存圏研究所)

○ Ryo KOBORI[1], Takuya NISHIMURA[1], Daiki TAGA[2], Seiya HASHIMOTO[2], Hayato KOSHIMIZU[2], Takashi KAWASAKI[3], Akiko SAITO[1,2] ([1]Advanced Science & Engineering, Graduate School of Engineering, OECU, [2]Department of Environmental Science, Faculty of Engineering, OECU, [3]Research Institute for Sustainable Humanosphere, Kyoto University)

【目的】

Flavan-3-ol 誘導体は様々な植物に含まれる機能性ポリフェノール化合物として知られ、様々な健康機能性が期待されている。しかし flavan-3-ol 誘導体は多くの構造異性体や修飾などにより多くの類縁体が存在し、それらが植物体内に同時に存在するため生物活性試験に十分量の各化合物を単離することが難しい。この化合物群の機能性の詳細を解明するためには、純粋な様々な化合物を入手することが必須である。そこで我々は、立体選択的な有機合成法などを開発することで様々な構造を持つ flavan-3-ol 誘導体を確保し構造-活性相関研究や分析・定量研究を進めてきた。同時に、生体触媒を用いた flavan-3-ol 誘導体合成法の開発も進め、昨年度の本大会にて、ブドウ培養細胞 *Vitis vinifera L.* VW 株（アントシアニンを生産しない株）により、(–)-epigallocatechin-3-*O*-gallate (EGCG) (**1**) から 2 量体である theasinensin A (**2**)が生成することを報告した。本発表では、*Vitis vinifera L.* VR 株（アントシアニン生産株)、および、多種類のポリフェノール化合物を生産するラズベリー培養細胞を用いた検討を行ったので報告する。

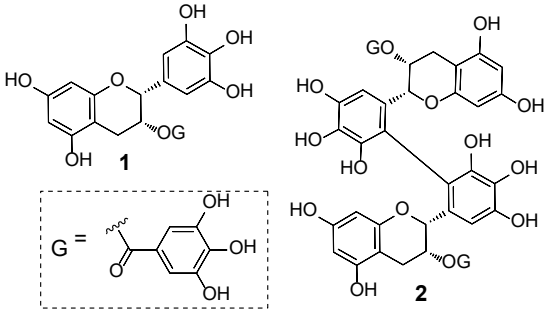


Figure 1. EGCG (**1**)と teasinensin A (**2**)の構造

【方法・結果】

Flavan-3-ol 誘導体を *Vitis vinifera L.* VR 株で変換を試みた。その結果、(–)-epicatechin (EC) (**3**)から procyanidin B2 (PC-B2) (**4**)が生成した。VW 株では PC-B2 (**4**)は得られなかった。また、PC-B2 (**4**)以外にも 2 量体が生成していることが確認されたため、現在、構造確認を行っている。また、ブドウと同様に多くのポリフェノール化合物を生産するラズベリーについて、未熟な青い果実で flavan-3-ol 誘導体が多く生産され、また、flavan-3-ol 誘導体生合成酵素群が多く発現していることを確認した。ラズベリー培養細胞でもブドウ培養細胞と同じような変換反応ができるのではないかと考え、文献[1)]に従い培養細胞系を構築し同様な変換反応を検討している。

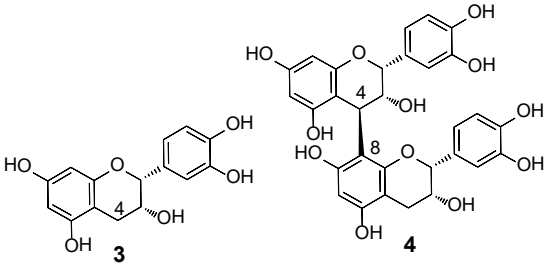


Figure 2. EC (**3**)と PC-B2 (**4**)の構造

1) A. Schmidt-Duran, *et al.,Springer Plus*., 5:1717 (2016)

polyphenol, flavan-3-ol derivatives, flavan-3-ol oligomer

発表責任者：齊藤安貴子（a-saito@osakac.ac.jp）

講演番号：3E8p11
講演日時：3 月 26 日 16:00～ 1 号館 E8 会場

青色 LED 光を使用して栽培したラズベリー中のポリフェノール成分変化

Polyphenol component change in raspberry cultivated using blue LED light

○橋本 誠也[1]、輿水 駿[1]、小堀 亮[2]、多賀 大輝[1]、辻 一成[1]、川崎 崇[3]、齊藤 安貴子[1,2] ([1]大阪電気通信大学工学部環境科学科、[2]大阪電気通信大学大学院工学研究科先端理工学専攻、[3]京都大学生存圏研究所)

○Seiya HASHIMOTO[1], Hayato KOSHIMIZU[1], Ryou KOBORI[2], Daiki TAGA[1], Issei tuji[1], Takashi KAWASAKI[3], Akiko SAITO[1,2] ([1]Department of Environmental Science, Faculty of Engineering, OECU, [2]Advanced Science & Engineering, Graduate School of Engineering, OECU, [3]Research Institute for Sustainable Humanosphere, Kyoto University)

【目的】

ラズベリー(*Rubus ideaus*)の果実や葉には、フラバン-3-オール誘導体、縮合型タンニンであるプロシアニジン類、加水分解型タンニンであるエラグ酸誘導体、ケルセチンなどのフラボノール類、色素として知られるアントシアニン類、また、それらの配糖体など、多種類のポリフェノール化合物が豊富に含まれている。果実だけでなく葉もお茶として飲用されており、植物体全体の利用が可能な作物である。我々はこれまで、フラバン-3-オール誘導体の機能性に興味を持ち、プロシアニジンなどのオリゴマーを含む様々な化合物の有機合成を行い、構造-活性相関研究を行ってきた。機能性が高いポリフェノールを栽培条件制御により人工的に増加させることができれば、作物としての付加価値が向上すると考え検討を行っている。本研究では、ラズベリーに含まれるポリフェノール化合物の含有量が、栽培条件によってどのように変化するか興味を持ち検討を行った。植物工場ユニット中でラズベリーの栽培を行い、青色 LED を用いて栽培したときのラズベリー果実、および、葉においてポリフェノール含有量、および、ポリフェノール生合成に関与する酵素の発現量に変化が確認されたので報告する。

【方法・結果】

ラズベリー（ヒンボートップ種、RAFZAQU）を一定環境下に保った植物工場ユニット中、根の保持剤として砂を用いて液肥で栽培を行った。栽培に用いる光を、蛍光灯のみで栽培した場合、蛍光灯に青色 LED を追加した場合、青色 LED のみで栽培した場合など条件を変えて検討を行った。栽培した果実・葉は、それぞれメタノール抽出を行って濃縮乾固した後、LCMS を用いた各種定量分析・ラジカル消去活性測定などを行った。その結果、蛍光灯や白色 LED で栽培している環境下で青色 LED 光を追加して栽培した場合、総ポリフェノール量、総プロアントシアニジン量が増加し、ラジカル消去活性が高くなった。詳細な分析の結果、フラバン-3-オール 2 量体である procyanidin B4 が相対的に増加していた。一方で、青色 LED 光のみで栽培した場合、葉における総ポリフェノール量は増加したが、加水分解タンニン系化合物やフラバン-3-オール誘導体である(+)-catechin、(–)-epicatechin、procyanidin B4 が大幅に減少した。このときの葉におけるフラバン-3-オール生合成に関与する酵素の発現量を半定量 PCR で確認したところ、カルコン合成酵素 CHS の発現が低下していることが示唆された。本発表では、化合物の増減や生合成酵素発現量についての詳細を報告する。

raspberry, polyphenol, blue LED light

発表責任者：齊藤　安貴子（a-saito@osakac.ac.jp）

講演番号：3E8p12
講演日時：3 月 26 日 16:11～ 1 号館 E8 会場

カルビン回路およびワックスエステル発酵経路の律速酵素遺伝子を同時導入したユーグレナの分子育種

Molecular breeding of Euglena introducing the genes involved in late-limiting steps in the Calvin cycle and wax-ester biosynthesis

○田茂井 政宏[1,2]、西川 由依菜[1]、井上 勝太[1]、岡村 桃子[1]、作山 治美[1]、石川 孝博[3]、重岡 成[1]([1]近畿大農、[2]近畿大アグリ技研、[3]島根大生物資源)
○Masahiro TAMOI[1,2], Yuina NISHIKAWA[1], Sshota INOUE[1], Momoko OKAMURA[1], Harumi SAKUYAMA[1], Takahiro ISHIKAWA[3], Shigeru SHIGEOKA[1] ([1]Fac. Agri., Kindai Univ., [2]ATIRI, Kindai Univ., [3]Fac. Life Environ. Sci., Shimane Univ.)

【目的】真核藻類であるユーグレナは、好気条件下では光合成産物としてパラミロンを蓄積し、嫌気条件下に移行するとパラミロンを分解してミリスチン酸（C14）とミリスチルアルコール（C14）からなるミリスチルミリステート（C28）を主成分とするワックスエステルを高生産する特徴を有する。C14 の脂肪酸はジェット燃料の成分に近いことから、大量生産による実用化が期待されている。我々はこれまでに、ラン藻のカルビン回路構成酵素である FBP/SBPase 遺伝子をユーグレナに導入することで、光合成機能が強化され、パラミロンおよびワックスエステル量が増加することを明らかにした（*Biotechnol. Biofuels* 8; 80)。一方、ワックスエステル発酵経路の律速因子の一つと考えられるトランスエノイル CoA 還元酵素（EgTER1）をユーグレナに導入することによって、嫌気処理時のパラミロン分解速度が向上し、ワックスエステル量が増大した。そこで本研究では、独立栄養条件下でのユーグレナでのワックスエステル生産性をさらに向上させることを目的に、これら 2 つの遺伝子を同時に導入した形質転換ユーグレナを作出し、バイオマス生産性の評価を行った。
【方法と結果】ユーグレナ由来 β-tubulin プロモーターに FBP/SBPase を、NAD^+-GAPDH プロモーターに EgTER1 遺伝子を連結したベクターを構築し、NEPA21 エレクトロポレーターを用いてユーグレナ野生株へ導入した。パロモマイシン添加 CM 培地によるスクリーニングを繰り返し、8 株の薬剤耐性株を取得した。薬剤耐性株からゲノムを抽出し、導入遺伝子に特異的なプライマーを用いて PCR を行った結果、4 株に FBP/SBPase 遺伝子および EgTER1 遺伝子の両方が導入されていることを確認した（EgFS:TER1 株)。さらにウエスタンブロッティングにより、EgFS:TER1 株では導入した遺伝子由来の FBP/SBPase および EgTER1 タンパク質が発現していることを確認した。強光、高 CO_2 条件下（350 μmol photon/m^2/s、0.3% CO_2）で定常期まで培養した EgFS:TER1 株の光合成 CO_2 固定活性は、いずれの株も野生株と比較して低値を示した。この時の EgFS:TER1 株細胞内には、野生株と比較して非常に多量のパラミロン顆粒が観察されており、パラミロン定量の結果 EgFS:TER1 株では野生株の 2～3 倍のパラミロンが蓄積していることを確認した。このことから、光合成活性の上昇に伴って多量に蓄積したパラミロンにより、定常期では光合成能がフィードバック阻害を受けている可能性が考えられた。現在、顕著なパラミロン蓄積が見られない培養初期の細胞を用いて、光合成活性、パラミロン量さらには嫌気処理時のワックスエステル含量の比較を行っている。

Euglena, photosynthesis, biofuel

発表責任者：田茂井政宏（tamoi@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：3E8p13
講演日時：3 月 26 日 16:22～ 1 号館 E8 会場

日本生まれのフレーバーホップ「ソラチエース」の交配株における高ゲラン酸ホップの探索

Searching for hops with higher geranic acid levels than the Japanese flavor hop ‘ SORACHI ACE’

○久慈 正義[1]、實方 綾子[2]、谷川 篤史[1]、蛸井 潔[1]、大串 憲祐[1]、須田 成志[1] ([1]サッポロビール(株)、[2]サッポロホールディングス(株))
○Seigi KUJI[1], Ayako SANEKATA[2], Atsushi TANIGAWA[1], Kiyoshi TAKOI[1], Kensuke OGUSHI[1], Narushi SUDA[1] ([1]SAPPORO BREWERIES LTD., [2]SAPPORO HOLDINGS LTD.)

ホップ(*Humulus lupulus* L.)はアサ科蔓性の雌雄異株植物であり、雌株に形成される球果はビールの原料として用いられる。近年のクラフトビールブームで、様々な個性的なビールが醸造される中、フレーバーホップと呼ばれるホップ品種が、ビールに特徴的な香りを与える原料として重要となっている。

「ソラチエース」はサッポロビールが育種したホップで、他の品種にほとんど含まれない「ゲラン酸」を多く含んでいる。我々の研究で、ゲラン酸は他のホップの香気成分と相互作用し、ソラチエース特有のレモングラス様の香りを形成することを明らかにした。そこで、本研究では、より特徴的な香りを作り出す可能性のある、高ゲラン酸含有ホップ品種の開発を目的として、ソラチエースを親株とする交配集団を作製し、各個体におけるゲラン酸含量の測定を行った。

【方法・結果】

雌株であるソラチエースと任意の雄株 3 種類との交配を行い、3 集団のソラチエースの交配集団を得た。これらの集団の雌株 189 個体について球果を収穫し、ゲラン酸含量を測定した。

その結果、いずれの交配集団においてもゲラン酸がソラチエースを超える個体は無く、ソラチエースの含量を大きく下回った。ソラチエースに特異的に含まれるゲラン酸は、ソラチエースを交配親に用いただけでは得ることができず、高ゲラン酸系統は単純な交配設計では得られないこと、ソラチエースの高ゲラン酸特性は容易に達成できないユニークな特性であることが示唆された。

hop, geranic acid, flavor

発表責任者：久慈　正義（Seigi.Kuji@Sapporobeer.co.jp）

講演番号：3E8p14
講演日時：3 月 26 日 16:33～ 1 号館 E8 会場

Pseudomonas putida 由来 *enoyl-CoA hydratase/aldolase* を導入したタケ培養細胞の作出
Stable expression of *Pseudomonas putida enoyl-CoA hydratase/aldolase* in bamboo cells
○北岡 直樹[1,2]、中畑 未来[2]、野村 泰治[1,2]、荻田 信二郎[3]、加藤 康夫[1,2] ([1]富山県立大・生工研セ、[2]富山県立大・生物工、[3]県立広島大・生命科学)
○Naoki Kitaoka[1,2], Miku Nakahata[2], Taiji Nomura[1,2], Shinjiro Ogita[3], Yasuo Kato[1,2] ([1]Biotechnol. Res. Cent., Toyama Pref. Univ., [2]Dep. Biotechnol., Toyama Pref. Univ., [3]Dep. Life Sci., Pref. Univ. Hiroshima)

【背景と目的】植物培養細胞を用いた物質生産に関する研究例は数多く存在する。当研究室では、細胞内での活発な代謝経路から分岐する生合成経路を植物培養細胞に導入することにより目的化合物の効率的な生産を行う「合理的代謝フロースイッチング」[1)]を用い、タケ・ササ類の培養細胞を物質生産宿主として確立することを目指し研究を進めている。タケ亜科に属するハチク（*Phyllostachys nigra*）筍由来の培養細胞は木化誘導条件において主要代謝産物として feruloylputrescine を高蓄積し、同培養細胞においてはフェニルプロパノイド代謝系およびポリアミン代謝系が活発であることが推定された。この知見を踏まえて、オオムギ由来の agmatine coumaroyltransferase を導入した組換えハチク細胞を作出したところ、代謝フロースイッチングによって目的化合物である *p*-coumaroylagmatine が高蓄積したことから、ハチク細胞の物質生産宿主としての潜在能力の高さが示された[1)]。本研究では、ハチク培養細胞の物質生産宿主としての汎用性を確かめるとともに、香料として利用されている化合物の生産へのハチク培養細胞の応用を目指し研究を行った。
【方法と結果】Feruloylputrescine の生合成中間体でもある feruloyl-CoA もしくは *p*-coumaroyl-CoA を基質とし、それぞれ vanillin と 4-hydroxybenzaldehyde への変換を触媒する酵素遺伝子である *Pseudomonas putida* KT2440 *enoyl-CoA hydratase/aldolase* (*PpECoH/A*)を導入した組換えハチク培養細胞を、パーティクルボンバードメント法を用いて作出した。ベクターが有するハイグロマイシン耐性遺伝子による一次選抜を行なった後に、ゲノムへの *PpECoH/A* の導入を PCR にて確認した。作出した *PpECoH/A* 導入株カルスにおける代謝物を解析した結果、4-hydroxybenzoic acid glucose ester、4-hydroxybenzoic acid glucoside、および vanillic acid glucose ester の新たな蓄積が確認された。組換え細胞を懸濁培養した結果、*PpECoH/A* 導入株において前述の 3 化合物の細胞内における蓄積がみられ、4-hydroxybenzoic acid glucose ester と vanillic acid glucose ester はその蓄積量が木化誘導条件で顕著に増加した。*PpECoH/A* 導入株から調製した粗酵素を用いて酵素活性を調べたところ、feruloyl-CoA と *p*-coumaroyl-CoA から、それぞれ vanillin と 4-hydroxybenzaldehyde へと変換する酵素活性が検出された。以上の結果から、組換え細胞においては導入遺伝子が適切に発現しており、ハチク培養細胞の「合理的代謝フロースイッチング」による vanillin 類縁体の生産が可能であることが示された。
1) Nomura T *et al.*, *Sci. Rep.*, **2018**, 8, 13203.

bamboo cells, enoyl-CoA hydratase/aldolase, vanillin

講演番号：3E8p15
講演日時：3 月 26 日 16:44～ 1 号館 E8 会場

アブシジン酸はタバコ BY-2 細胞の増殖と細胞死を共に抑制するがタンパク質の分泌は妨げない
Abscisic acid inhibits both proliferation and cell death of tobacco BY-2 cells but does not prevent protein secretion

○井上 智晴[1]、ガリス イヴァン[2]、小田 大和人[3]、松岡 健[1,2,3,4]（[1]九大農、[2]理研植物センター、[3]九大院生資源、[4]九大院農）
○Tomoharu INOUE[1], Ivan GALIS[2], Yamato ODA[3], Ken MATSUOKA[1,2,3,4] ([1]Kyushu Univ. Sch. Agr, [2]RIKEN PSC, [3]Kyushu Univ. Grad. Sch. Bio-Environ. Sci, [4]Kyushu Univ. Fac. Agr)

【背景・目的】

植物の多くの組織はある一定の段階まで成長・分化すると、細胞分裂を停止し、そのままの状態で数ヶ月以上の長期間にわたり活動を続ける。タバコ BY−２細胞は、合成オーキシンである 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸（2,4-D）の存在下に継代培養されている細胞株であり、その高い増殖性と容易に遺伝子導入が可能な性質から、組換えタンパク質生産のためのホストとしての利用も進みつつある。一方、細胞増殖には多大なエネルギーを要するため、分裂せずに長い期間活動を続けるという組織中の植物細胞の状態をタバコ培養細胞 BY-2 株でも再現することができれば、物質生産の際のコスト低下を図れる可能性がある。この細胞を 2,4-D 非存在下、アブシジン酸(ABA)またはジャスモン酸(JAS)存在下で培養すると細胞周期が停止することが報告されている(Swiatek, A. et al., Plant Physiol. 128:201-211, 2002)。そこで我々はこの情報を参考にしながら、どの植物ホルモンの存在下に細胞分裂と細胞死が共に抑制されるかを検討した。次いで、この検討により見出した ABA 存在下において、どれだけの期間細胞が生育可能か、またその条件でモデルタンパク質の分泌能が保たれているかについて、検討を進めた。

【方法・結果】

2,4-D の存在下に定常期まで生育させた細胞を、2,4-D の代わりに各種ホルモンを含む培地で洗浄後、その培地中で 90 時間培養を行い、生細胞の割合をエバンスブルーによる染色性を指標として、また細胞の増殖を細胞塊中の細胞数を指標として検討した。その結果、ABA、JAS またはメチル JAS 存在下において、細胞死と細胞増殖が共に抑えられることを見出した。次いで、ABA 培地中でどれだけの期間細胞死を抑制した条件で培養が可能か検討した。その結果、2,4-D を含む通常培地では２週間程度で死滅する BY−２細胞が、ABA 培地中では１ヶ月以上死亡率を上昇させずに培養可能なことを見出した。

この状態の細胞が物質生産に使えるかどうかを調べるため、サツマイモ貯蔵タンパク質スポラミンを分泌する形質転換 BY-2 株を用い、培地画分中のスポラミンの存在を免疫ブロッティングにより検討した。その結果、検討した 7 日間までの培養期間中、培地中のスポラミン量が経時的に増加することを見出した。このことは、ABA 培地中において増殖を停止したタバコ BY-2 細胞は、組換えタンパク質の分泌能を維持していることを示している。

cell death, secretion, plant cultured cell

発表責任者：井上 智晴（1AG15028P@s.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：4B1a01
講演日時：3 月 27 日 09:00～ 1 号館 B1 会場

加工により水溶性食物繊維比率を変化させた昆布が食餌性肥満に及ぼす影響

Effects of processed Kombu which was changed in the ratio of soluble dietary fiber, on mice with diet-induced obesity

○紙谷 年昭[1]、東条 由花[1]、岡田 香[1]、鈴木 利雄[1]、山中 千恵美[2]、戸田 登志也[3]、青江 誠一郎[2]
([1]フジッコ株式会社、[2]大妻女子大学、[3]武庫川女子大学)
○Toshiaki KAMITANI[1], Yuka TOJO[1], Kaori OKADA[1], Toshio SUZUKI[1], Chiemi YAMANAKA[2], Toshiya TODA[3], Seiichirou Aoe[2] ([1]Fujicco Co., Ltd., [2]Otsuma Women's Univ., [3]Mukogawa Women's Univ.)

【目的】昨年度に演者らは昆布の水溶性食物繊維含量が食餌性肥満モデルマウスの脂質代謝改善に関与している可能性について報告した（日本農芸化学会 2018 年度大会)。本研究では昆布の加熱加工処理の違いが食物繊維の水溶性比率に及ぼす変化を確認し、さらに食餌性肥満モデルマウスに与える影響について調べた。

【方法】昆布（大船産 2 等マコンブ）を 95℃、60 分間水煮して液を切り、水煮昆布を作成した。次いで水煮昆布に対してオートクレーブで加圧加熱処理を加え、加熱昆布 A（121℃、15 分)、加熱昆布 B（130℃、60 分）を作成した。各種昆布は乾燥後、0.5 mm 以下に粉砕し試験に供した。試料中の水溶性および不溶性食物繊維量は､MES-TRIS バッファーを用いた Prosky 変法(AOAC 公定法 991.43)によって求めた。試料より抽出した多糖の分子量は GPC 法により測定し、プルランを標準として平均分子量を算出した。AIN-93G 組成を基本とした飼料にラードを配合した高脂肪食に、飼料あたり総食物繊維量が 5%となるように水煮昆布粉末を添加した。その他の加熱昆布粉末は水煮昆布群と同量添加し、総食物繊維量が等しくなるようにセルロースで調整した。 4 週齢 C57BL/6J 雄性マウスを 7 日間市販固形飼料で予備飼育したのち、4 群（1 群 8 匹）に分けて 10 週間試験飼料を自由摂取させた。解剖は 8 時間絶食後にイソフルラン/CO2 で安楽死後、肝臓、腹腔内脂肪、盲腸を摘出し、重量を測定した。血清脂質は酵素法、肝臓脂質は，Folch 法にて抽出後、酵素法で分析した。糞便中脂質は酸性下で Folch 溶液にて抽出後、重量法で分析した。

【結果および考察】試料中の水溶性および不溶性食物繊維量、抽出多糖分子量（Mp）は、乾燥粉末あたり原料昆布（水溶性食物繊維、不溶性食物繊維、抽出多糖分子量＝6.8%、31.4%、2.4×10^6)、水煮昆布（14.8%、61.3%、1.5×10^6)、加熱昆布 A（22.3%、50.8%、3.7×10^5)、加熱昆布 B（38.6%、33.9%、3.7×10^4）であり加熱により水溶性比率は高まる一方分子量は低下した。動物実験では全ての群間で摂餌量に差はなかった一方で、対照食群で観察された体重、腹腔内脂肪重量の増加は、昆布摂取により抑制傾向が確認され、特に加熱昆布 A では有意に抑制した。血清総コレステロール及び LDL-コレステロール濃度の増加も同様に、昆布摂取により抑制傾向が確認され、特に加熱昆布 A では有意に抑制した。以上から、昆布水煮の摂取により食餌性肥満が抑制されること、その抑制作用には加工処理条件が影響する可能性が示唆された。加えて加工処理による水溶性食物繊維増加量と作用とには高い相関はなく、最適な物性の範囲を有すると考えられた。

Kombu, Soluble dietary fiber, Anti-obesity

発表責任者：紙谷　年昭（t-kamitani@fujicco.co.jp）

講演番号：4B1a02
講演日時：3 月 27 日 09:11～ 1 号館 B1 会場

モリンガ葉抽出物を用いた抗肥満効果
Anti-obesity effect of Moringa leaf extract
○耿 紅敏、中村 唱乃、山津 敦史、坂下 真耶、金 武祚（株式会社ファーマフーズ）
○Hongmin GENG, Utano NAKAMURA, Atsushi YAMATSU, Maya SAKASHITA, Mujo KIM (Pharma Foods International Co., Ltd.)

【目的】
我々はモリンガの成長力や生命力がヒトの健康長寿に寄与できる可能性に着目し、モリンガ葉抽出物の様々な生理機能に関する探索を行っている。これまでに、ヒト培養肝細胞を用いて、モリンガ葉抽出物が FGF21 やその他の糖・脂質代謝関連遺伝子の発現に及ぼす効果および FGF21 の遺伝子転写量を増加させる有効成分としてイソチオシアネート類（ITCs）を同定し、報告した。そこで、ITCs 含有量の異なるサンプルを作製し、ITCs 含有量の違いが抗肥満効果に影響するか in vivo において検証したので、報告する。
【方法】
モリンガ葉抽出物の調製　モリンガの生葉または乾燥葉を水抽出後、濃縮・凍結乾燥し、モリンガ葉水抽出物を調製した。乾燥葉水抽出物については続いてミロシナーゼで処理し、このものを酵素処理物とした。これらの抽出物を以下の試験に供した。
in vivo 試験　以下の 5 つの群分け（n=10）において、抗肥満効果を動物試験にて検証した。①標準食群（STD 群）②高脂肪食群（HFD 群）③モリンガ生葉水抽出物 5%混餌高脂肪食群（生葉群）④モリンガ乾燥葉水抽出物 5%混餌高脂肪食群（乾燥葉群）⑤乾燥葉水抽出物酵素処理物 5%混餌高脂肪食群（酵素処理群）。各サンプルを 1 ヶ月間マウスに投与し、毎週体重と摂餌量を測定した。1 ヶ月後に、解剖を行い、下大静脈からの採血および臓器重量の測定を行った。また、血中マーカー解析を行った。
【結果・考察】
各水抽出物の ITCs 含有量は、生葉水抽出物では 15.3 mg/g、乾燥葉水抽出物酵素処理物では 3.4 mg/g、乾燥葉水抽出物では 0.08 mg/g であった。1 ヶ月間の摂餌量に関して、生葉群は HFD 群より有意に多く、その他の各モリンガ摂餌群は HFD 群に対して差がなかった。また、マウスの体重増加量および 1 ヶ月目の精巣周囲脂肪は各モリンガ摂餌群においては、HFD 群に比べて有意に低値を示し、特に生葉水抽出物群で最も減少していた。血液マーカーを測定した結果、最も体重減少が認められた生葉群で総コレステロールが HFD 群に比べて有意に低値を示した。
本試験の結果より、モリンガ葉の水抽出物は抗肥満効果を有することが認められた。特に、ITCs 含有量が最も多い生葉群において、抗肥満効果が強かった。また、乾燥葉に注目すると、酵素処理群の体重増加量は酵素未処理群と比べて低値を示し、ITCs の寄与が示唆された。

Moringa, anti-obesity, isothiocyanate

講演番号：4B1a03
講演日時：3 月 27 日 09:22～ 1 号館 B1 会場

ツバキ *Camellia japonica* 種子抽出物による抗肥満作用
Anti-obesity effect of the seed extract from *Camellia japonica*
○落合 優[1]、野崎 勉[2]、加藤 正樹[2]、石原 健夫[2] ([1]北里大獣医、[2]ビーエイチエヌ株式会社)
○Masaru OCHIAI[1], Tsutomu Nozaki[2], Masaki Kato[2], Ken-o Ishihara[2] ([1]Veterinary medicine, Kitasato Univ., [2]BHN Co., Ltd.)

【背景】
ツバキ（*Camellia japonica*）はツバキ科ツバキ属の植物で、ツバキ油は食用油や整髪料として使われているが、脱脂部分の有効活用については検討が進んでいない。先行研究にて、ツバキの脱脂種子から抽出したツバキサポニンを 25%以上規格した抽出物（ツバキ種子抽出物、以下 CJ とする）には、線維芽細胞賦活作用、シワ改善および肌修復作用、血流改善作用および抗糖化作用を有することが見出されているが、抗肥満作用については報告されていない。本研究は、高脂肪高ショ糖食給餌マウスにおける抗肥満作用およびその機序の一端についての検討を行った。
【方法】
5 週齢の雄性 ICR マウスに AIN-93 準拠の普通（LF）食、高脂肪高ショ糖（HF）食および HF 食に CJ を 1%含有した食餌を 53 日間自由摂取させ、絶食後に血漿、組織および臓器の回収を行った。また、脂質排泄に及ぼすツバキ種子抽出物の影響を検討するため、飼育最終週に排泄された糞を回収した（実験 A)。次に、脂質（大豆油 5 mL/kg）負荷後の血中中性脂肪濃度上昇に及ぼす CJ（500 mg/kg）の影響について ddY マウスを用いて検討した（実験 B)。さらに、消化管における食餌通過速度に及ぼす CJ（500 mg/kg）の影響について、エバンスブルーで染色した流動食を ddY マウスに投与する手法を用いて検討した（実験 C)。
【結果】
実験 A において、糞便中の脂質排泄量（中性脂肪およびコレステロール）は CJ 食摂取群で多くなり、体重増加、腹腔内脂肪組織重量、血中総コレステロール濃度、および肝臓脂質含量（中性脂肪およびコレステロール）は CJ 食摂取群で有意に低値を示した。また、CJ 食摂取群の絶食時血中インスリン濃度が顕著に低値を示し、インスリンの抵抗性および分泌指数も有意に改善する結果となった。実験 B において､脂質負荷後の血中中性脂肪濃度は投与 1 時間後において CJ 投与群で有意に低値を示し、同濃度上昇が遅延することが示唆された。実験 C において、単位時間当たりの小腸通過距離は CJ 投与群が有意に長くなったが、胃内滞留物重量は CJ 投与群で高値傾向となった。
【結論】
CJ は食餌由来の脂質の吸収を遅延させ、食餌誘発性肥満の予防に効果的である可能性が示唆されたが、その機序の詳細やツバキサポニンの生理作用の解明などについては現在検討中である。

Camellia japonica, Anti-obesity, Saponin

発表責任者：落合優（mochiai@vmas.kitasato-u.ac.jp）

講演番号：4B1a04
講演日時：3 月 27 日 09:33～ 1 号館 B1 会場

メタボローム解析を用いたきのこの抗肥満効果の検証
Verification on the anti-obesity effects of Japanese mushrooms using metabolomic analysis.
○清水 崇光[1]、森 光一郎[1]、小林 仁[1]、都築 毅[2] ([1]ホクト株式会社、[2]東北大院・農)
○Takamitsu SHIMIZU[1], Koichiro MORI[1], Hitoshi KOBAYASHI[1], Tsuyoshi TSUDUKI[2] ([1]Hokuto Corp., [2]Grad. Sch. of Agri. Sci., Tohoku Univ.)

【目的】日本人は様々な種類のきのこを食べており、きのこは 1 日の食事全体量の 0.7 %を占めている。きのこは食物繊維やビタミン類が含まれ、栄養的にも有能な食材である。近年の日本の食生活は、動物性脂肪の多い食事を摂取することが増え、肥満による生活習慣病が急増している。これまでの我々の研究により、高脂肪食負荷マウスに日本で多く食べられている複数のきのこを含む食餌を摂取させた結果、内臓脂肪蓄積抑制効果による抗肥満効果および腸内細菌叢の改善効果が見られた（T. Shimizu et al., Nutrients, 2018.）。しかし、きのこの摂取による抗肥満効果の詳細なメカニズムは明らかになっていない。本研究は、きのこを摂取したときの抗肥満効果のメカニズムを明らかにすることを目的とし、メタボローム解析を用いた検討を行った。
【方法】日本で多く生産されているエノキタケ、ブナシメジ、シイタケ、マイタケ、エリンギを凍結乾燥し、これらきのこ凍結乾燥物を日本のきのこ生産量の割合に従って混合した。高脂肪食にきのこ凍結乾燥混合物を 3.0 % 加え、試験食を作製した。C57BL/6J マウス（5 週齢、雄性）に試験食を 4 週間自由摂食させ、4 週間後の臓器、血液および糞便中の成分を LC-QTOF-MS を用いて解析した。また、脂肪組織中の脂質代謝関連遺伝子発現量の変化を検討した。
【結果】得られた結果に対して多変量解析を行ったところ、きのこを摂取することで血清、肝臓、脂肪組織、盲腸内容物、大腸および糞便の成分組成が大きく変化した。変化した成分は、脂質が多く認められた。脂肪組織の成分を解析した結果、きのこの摂取により、ジアシルグリセロール（DG）の増加が顕著に見られた。また、きのこの摂取により脂肪組織中の脂肪酸合成に関わる Srebp-1c は減少し、脂肪分解に関わる Hsl は増加した。盲腸内容物および糞便中の成分解析では、きのこの摂取により、リン脂質やトリアシルグリセロール（TG）の増加が顕著に見られた。
【考察】きのこの摂取により体内成分組成の変化が見られ、特に脂質組成が変化したことから脂質代謝に影響を及ぼすことが考えられた。脂肪組織で見られたきのこの摂取による DG の増加および脂質代謝関連遺伝子発現量の変化から、脂肪組織内の TG の分解が活発に行われている可能性が考えられた。また、糞便中ではきのこの摂取により脂質の増加が見られたことから、きのこに含まれる成分が食事で摂取した脂質の排出を促していることが示唆された。以上のことから、きのこの摂取による抗肥満効果は、内臓脂肪の分解を促すことならびに食事中の脂質の排出を促すことが考えられた。

Mushroom, Metabolomic analysis, Obesity

発表責任者：清水崇光（takamitsu.shimizu@tohoku.ac.jp）

講演番号：4B1a05
講演日時：3 月 27 日 09:44～ 1 号館 B1 会場

ピセアタンノール摂取が閉経後モデルマウスの肥満に及ぼす影響

The effect of Piceatannol on obesity in ovariectomized mice

○塩越 美春[1]、川和 理恵[2]、石川 朋子[3]、森 貞夫[5]、守田 稔[5]、市 育代[3,4]、藤原 葉子[3,4]（[1]お茶大院・ライフサイエンス、[2]お茶大・食物、[3]お茶大・HLI 研、[4]お茶大・基幹研究院、[5]森永製菓（株））
○Miharu SHIOKOSHI[1], Rie KAWAWA[2], Tomoko ISHIKAWA[3], Sadao MORI[5], Minoru MORITA[5], Ikuyo ICHI[3,4], Yoko FUJIWARA[3,4] ([1]Ochanomizu Univ. Grad.Life Sci., [2]Ochanomizu Univ. Food and Nutr., [3]Ochanomizu Univ. Inst. HLI, [4]Ochanomizu Univ. Fac. Core Res., [5]MORINAGA and CO., LTD.)

【背景・目的】
女性は閉経後のエストロゲン欠乏により脂質異常症や耐糖能異常などが亢進するだけでなく、肥満にもなりやすく、このことがさらに生活習慣病のリスクを増大する可能性がある。ピセアタンノール（piceatannol：PIC）はレスベラトロールの類縁体であり、雄性マウスにおいては抗肥満効果を有することが報告されているが[1)]、PIC の閉経後モデルマウスに対する影響を検討した報告はない。そこで本研究では、閉経後モデルマウスにおける PIC 摂取の抗肥満作用を検討することとした。
【方法】
10 週齢の C57BL/6J 雌性マウスに卵巣摘出手術（OVX）を施し、以下の 3 群に分けて、AIN-93G 組成に準じた高脂肪食（脂肪 45%, エネルギー比）を自由摂食で与え、12 週間飼育した（各群 8 匹）。1) Control 群：高脂肪食, 2) 0.05%PIC 群：PIC 0.05%含有高脂肪食群, 3) 0.25%PIC 群：PIC 0.25%含有高脂肪食群。体重測定は毎週、μCT 腹部撮影は 4 週に 1 回行い、撮影結果を用いて内臓脂肪量および皮下脂肪量を経時的に評価した。μCT 撮影にはコーンビーム X 線μCT 装置 Rigaku CosmoScan FX（リガク株式会社）、画像解析には 3 次元画像解析ソフトウェア Analyze 12.0 (AnalyzeDirect) を用いた。解析部位はマウスの第 1 腰椎（T1）から第 5 腰椎（T5）の脂肪量は全身の脂肪量に比例することから[2)]、T1~T5 間を採用した。解剖後、血清中トリグリセリド、総コレステロール、および遊離脂肪酸濃度、肝臓中トリグリセリド濃度を測定した。
【結果】
実験食開始後 4 週までに、摂食量に 3 群間で有意な差は認められなかった。Control 群と比較して、PIC 摂取群では、いずれも実験食開始後 4 週までの体重増加量が少ない傾向が観察された。μCT 腹部撮影による脂肪量解析においても、PIC 摂取群は、Control 群より内臓脂肪、皮下脂肪共に脂肪蓄積が抑制される傾向にあり、この傾向は、内臓脂肪において皮下脂肪より顕著に観察された。実験食開始 8 週、12 週後の腹部 CT 撮影、および解剖後の評価項目については現在解析中である。

1) Tung YC et al. Molecules (2016), 21, E1419

2) Luu et al. Med Eng Phys. (2009), 31 (1) , 34–41

Piceatannol, obesity, ovariectomy (OVX)

発表責任者：藤原　葉子（fujiwara.yoko@ocha.ac.jp）

講演番号：4B1a06
講演日時：3 月 27 日 10:05～ 1 号館 B1 会場

大豆加水分解物は PKA 経路の活性化に寄与することで脂肪細胞でのイソプロテレノール刺激による脂肪分解を亢進する

Soy hydrolysate enhances isoproterenol-stimulated lipolysis in adipocytes via modulation of the PKA pathway

○ン スーピン[1]、野村 亘[1,2]、高橋 春弥[1]、毛利 晋輔[1]、ジェン フェイフェン[1]、荒 武[1]、永井 宏幸[3]、伊藤 哲朗[3]、河田 照雄[1,2]、後藤 剛[1,2]（[1]京都大学　大学院農学研究科　食品生物科学専攻、[2]京都大学　学際融合教育研究推進センター　生理化学研究ユニット、[3]岐阜県保健環境研究所）

○Su Ping NG[1], Wataru NOMURA[1,2], Haruya TAKAHASHI[1], Shinsuke MOHRI[1], Huei-Fen JHENG[1], Takeshi ARA[1], Hiroyuki NAGAI[3], Tetsuro ITO[3], Teruo KAWADA[1,2], Tsuyoshi GOTO[1,2]（[1]Division of Food Science & Biotechnology, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, [2]Research Unit for Physiological Chemistry, Kyoto University, [3]Gifu Prefectural Research Institute for Health and Environmental Sciences）

豊富な栄養素を含む豆類には機能性成分が多く含まれており、生活習慣病などの予防・改善に関与することが指摘されている。これまでに、大豆およびその成分が血中のトリグリセライドやコレステロールの減少に寄与することが報告されており、大豆成分と脂質代謝との関連が示唆されている。しかしながら、細胞レベルにおいて、大豆成分が脂質代謝に寄与する作用機序については良くわかっていない部分が多い。脂肪組織は、体内の脂質恒常性を保つ主要な組織であり、脂肪細胞における脂質の生合成および分解のプロセスはホルモンによる制御を受ける。今回我々は、大豆加水分解物が脂肪細胞に及ぼす影響について、特に脂肪分解の経路に着目して解析を行った。

β-アドレナリン受容体作動薬であるイソプロテレノールは、β-アドレナリン受容体を介したプロテインキナーゼ A（PKA）の活性化を介して、脂肪分解を亢進する。大豆加水分解物が脂肪分解に及ぼす影響について、グリセロールおよび遊離脂肪酸レベルを指標に検討したところ、大豆加水分解物の存在下で分化させた脂肪細胞（3T3-L1）において、イソプロテレノール刺激による脂肪分解活性が大豆加水分解物の非存在下で分化させた細胞と比べて有意に上昇した。また、イソプロテレノール刺激時における PKA の標的分子である hormone sensitive lipase（HSL）や perilipin のリン酸化レベルについても、大豆加水分解物で分化させた脂肪細胞において有意に増加した。これらのことから、脂肪細胞において大豆加水分解物はイソプロテレノール刺激による PKA 経路の活性化の亢進に寄与すると考えられた。また、我々は大豆加水分解物と脂肪分解経路を繋ぐメカニズムとして、脂肪細胞分化に伴うβ-アドレナリン受容体の発現上昇が大豆加水分解物により亢進することを新たに見出した。以上のことから、脂質代謝における大豆加水分解物の生理機能として、β-アドレナリン受容体の発現上昇による脂肪分解経路の亢進作用の存在が強く示唆された。

Soy, Adipocyte, Lipolysis

講演番号：4B1a07
講演日時：3 月 27 日 10:16～ 1 号館 B1 会場

Evaluation on anti-obesity potential of Thai medical plants with *in vitro* methods
○Wijitrapha RUANGARAM, Eisuke KATO (Hokkaido Univ., Grad. school of Agric., Lab. of Food Biochem.)

Background and objective
There is a rise in overweight and obesity population. Obesity is considered as a serious issue as it may develop severe disorders such as type 2 diabetes and other metabolic related disorders. In this study, 70 Thai medicinal plants, which are used as a traditional remedy against numerous diseases, are studied for their anti-obesity related *in vitro* bioactivity in order to select a potent candidate for prevention and treatment of obesity.
Methods
In vitro anti-obesity related assays, pancreatic lipase inhibitory test (PL), adipocyte lipid accumulation reduction test (LA), and adipocyte lipolysis enhancement test (LE) were performed on dried Thai medicinal plants. The plants were extracted with 50% (v/v) aq. methanol to prepare the samples. In enzymatic assay, pancreatic lipase inhibition of the sample was measured from the reduction of liberated free fatty acids at 0.5 mg/mL concentration, with Cetilistat as the positive control. In cell-based assays, 3T3-L1 preadipocytes were cultured and differentiated in 96 well plates. The cells were then stimulated with samples at 0.05 mg/mL to evaluate the enhancement of lipolysis and the reduction of lipid accumulation. The lipolysis was measured through the amount of glycerol released in the medium, and the lipid accumulation was assessed by staining the lipid droplets. Results are expressed as percentage compared to control.
Results
The result exhibited that out of 70 Thai medicinal plants, 7 samples have at least dual activities among 3 assays. Those samples are *Morus alba* (leaves) (PL 87±2%, LA 10±2%); *Tiliacora triandra* (roots) (LE 74±2%, LA 14±3%); *Cymbopogon nardus* (leaves) (PL 85±4%, LE 48±25%); *Eurycoma longifolia* (roots) (LE 85±4%, LA 12±2%); *Cyperus rotundus* (rhizomes) (PL 68±4%, LE 59±22%, LA 15±3%); *Acacia concinna* (pods) (PL 100±0.2%, LE 48±5%); and *Caesalpinia sappan* (trunks) (PL 74±1%, LA 12±2%). This study reveals 7 Thai medicinal plants to be considered as potent anti-obesity candidates with more than two activities among 3 assays. Especially, *Cyperus rotundus,* showed activity in all 3 assays, which should be selected as the most favourable candidate for anti-obesity treatment.

obesity, lipase, 3T3-L1 adipocyte

発表責任者：KATO Eisuke（eikato@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：4B1a08
講演日時：3 月 27 日 10:27～ 1 号館 B1 会場

低栄養状態がマウス由来前駆脂肪細胞の脂肪蓄積と MMPs 発現に及ぼす影響

Effects of undernutrition on lipid accumulation and MMPs expression of mouse-derived preadipocyte

○岩本 和子[1]、吸原 慧紀[1]、財満 信宏[1,2]、森山 達哉[1,2]([1]近畿大農、[2]近畿大アグリ技研)
○Kazuko IWAMOTO[1], Satoki SUIHARA[1], Nobuhiro ZAIMA[1,2], Tatsuya MORIYAMA[1,2] ([1]Kindai Univ., [2]Kindai ATIRI)

【目的】

腹部大動脈瘤(Abdominal Aortic Aneurysm; AAA)とは、血管壁の脆弱化により腹部大動脈の一部分が拡張する疾患である。現在、この疾患における薬物療法や食品による予防は確立されておらず、予防・治療法の確立が強く望まれている。これまでに本研究室では、ヒト AAA の病理解析の結果より、AAA を発症した血管の拡張部において、正常部と比較して血管壁中の栄養血管が狭窄していたことを明らかにした。また、栄養血管の狭窄を再現した血管壁循環不全誘導ラットを用いて、栄養血管の狭窄を起点とする血管壁の血流低下が AAA の形成に関与する可能性を示した。さらに、我々は血管壁に異常出現する脂肪細胞が AAA 破裂に関与する可能性についても報告しているが、その詳細については解明されていない。そこで本研究では、栄養血管の狭窄による血管壁内の低栄養状態に着目し、脂肪細胞の異常出現との関連を明らかにすることを目的とした。

【方法】

FBS とグルコース添加量が異なる 5 種類の Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)を用いてマウス線維芽細胞(3T3-L1 細胞)を培養し、播種後 4 日目と 9 日目の細胞のタンパク質量および TG 量を測定した。また、繊維破壊マーカーの一つであるマトリックスメタルプロテアーゼ(matrix metalloproteinase; MMP)-2 と MMP-9 の発現への影響について、ウエスタンブロッティングとゼラチン・ザイモグラフィーより確認した。

【結果・考察】

コントロール培地と比較して、グルコース濃度が低い培地では播種後 4 日目、9 日目ともに生細胞数、タンパク質量、TG 量で差は見られなかったが、FBS 濃度が低い培地では、播種後 9 日目において生細胞数とタンパク質量で濃度依存的に顕著な減少が見られ、TG 量では濃度依存的に顕著な増加が見られた。この結果より、3T3-L1 細胞において、分化誘導時の FBS 濃度が脂肪蓄積に影響を及ぼすことが示唆された。播種後 9 日目における MMP-2、MMP-9 の発現量、分泌量ともに、異なる培地間で差は見られなかった。現在、分化誘導時における MMP-2、MMP-9 の発現量、分泌量の影響について検討中である。

Undernutrition, 3T3-L1, MMPs

講演番号：4B1a09
講演日時：3 月 27 日 10:38～ 1 号館 B1 会場

マウス骨髄由来間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化に及ぼす乳脂肪球皮膜摂取の影響

The effect of ingestion of milk fat globule membranes on the differentiation of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells into adipocytes

○菊池 優貴[1]、佐野 あかり[1]、山田 潔[1]、東 徳洋[1]、元島 英雅[2] ([1]宇大農、[2]よつ葉乳業)
○ Yuki KIKUCHI[1], Akari SANO[1], Kiyoshi YAMADA[1], Norihiro AZUMA[1], Hidemasa MOTOSHIMA[2] ([1]Utsunomiya Univ., [2]Yotsuba Milk Products Co.,Ltd)

【目的】近年社会問題となっている肥満は、骨髄細胞が置かれる環境にも影響を及ぼしていることが最近の研究で明らかになっている。また、食品の摂取によって、幹細胞の分化に影響を与え、加齢や脂肪の多い食生活による幹細胞の応答変化を抑制できる可能性が示唆されている。我々は、これまでにバター製造における副産物であるバターミルク中に含まれる膜物質、乳脂肪球皮膜（MFGM）が *in vitro, in vivo* において、脂肪滴の蓄積や肥満による慢性炎症に対する抑制効果を示すことを報告してきた。そこで本研究においては、この MFGM の継続的な経口摂取が、骨髄中の微細環境の変化を抑制し、マウス間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化にどのような変化をもたらすかについて検討した。
【方法】C57BL／6 J 雄性マウス 4 週齢を用いて、通常食群(CON 群)、高脂肪食群(HF 群)、MFGM を 4%含む高脂肪食群(MFGM 群)の 3 群に分け、12 週間の飼育後、内臓脂肪組織の採取、大腿骨からの幹細胞の採取、採血を行った。リアルタイム PCR による骨髄細胞の脂肪細胞分化マーカーの発現解析、骨髄由来の幹細胞から分化誘導させた脂肪細胞のオイルレッドO染色による脂肪滴の定量、血清中の遊離脂肪酸量・中性脂肪量・レプチン量・アディポネクチン量の測定、採取した内臓脂肪組織における重量の測定、また、脂肪細胞分化マーカーとしての各遺伝子の発現量の変動の測定を行い、脂肪細胞への分化・脂肪蓄積におよぼす MFGM の影響を検討した。
【結果】HF 群と MFGM 群では、体重及び腎臓周囲・腸間膜周囲・精巣周囲の脂肪組織重量には差が認められなかった。しかし、オイルレッドO染色により骨髄由来の幹細胞から分化誘導させた脂肪細胞の脂肪蓄積量を分析した結果、HF 群と比較して、MFGM 群で蓄積が抑制される傾向が認められた。脂肪細胞分化マーカーとなる遺伝子の発現について現在解析中である。
【考察】高脂肪食が骨髄由来間葉系幹細胞から分化した脂肪細胞において促進する脂肪蓄積を、MFGM の経口摂取が抑制する可能性が示された。今回の結果から、MFGM は、高脂肪食によって変化した骨髄中の微細環境にも何らかの影響を与えている可能性が示唆され、骨髄細胞レベルにおいても、肥満やメタボリックシンドロームに対しての治療や予防にも効果的な作用が期待される。

Milk fat globlue membrane, Mesenchymal stem cell, Adipocyte differentiation

講演番号：4B1a10
講演日時：3 月 27 日 10:49～ 1 号館 B1 会場

マウス骨髄由来造血幹細胞の破骨細胞への分化に及ぼす乳脂肪球皮膜摂取の影響
Effect of milk fat globule membrane intake on differentiation of mouse bone marrow derived hematopoietic stem cells into osteoclasts.
○佐野 あかり[1]、菊池 優貴[1]、北島 元樹[1]、山田 潔[1]、元島 英雅[2]、東 徳洋[1]([1]宇都宮大農、[2]よつば乳業)
○ Akari SANO[1], Yuki KIKUCHI[1], Motoki KITAJIMA[1], Kiyoshi YAMADA[1], Hidemasa MOTOJIMA[2], Norihiro AZUMA[1] ([1]Utsunomiya Univ., [2]Yotsuba Milk Products Co,Ltd)

【目的】近年、食餌による骨髄内環境変化が骨髄中の幹細胞の分化能に影響を及ぼすという報告がいくつかなされており、高脂肪食を摂取することで骨髄幹細胞の一つである造血幹細胞から破骨細胞への分化が促進されることが明らかになった。また、ある種の食品によって高脂肪食摂取がもたらした破骨細胞への分化の偏りが抑制されることも報告されている。そこで、本研究では、バター製造過程で排除される乳脂肪球皮膜(MFGM)に着目した。そして、MFGM 摂取が、高脂肪食による骨髄中の微細環境の変化を改善し、破骨細胞への分化に抑制効果をもたらすかどうかを検討した。
【方法】C57BL/6J マウス雄 4 週齢を 1 週間予備飼育後、通常食群(CON 群)、高脂肪食群(HF 群)、高脂肪食+MFGM 群(MFGM 群)の 3 群に分けて 12 週間飼育を行った。飼育期間終了後、大腿骨から採取した骨髄幹細胞を 20ng/mL M-CSF と 50ng/mL RANKL 存在下で培養し、破骨細胞に分化誘導した。そして、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ(TRAP) 染色による TRAP 陽性破骨細胞の計数、リン酸カルシウムコーティングプレートを用いた骨吸収活性測定、リアルタイム PCR によるカテプシン K 遺伝子発現の定量を行うことにより、破骨細胞への分化誘導および多核化について評価した。
【結果】骨髄細胞及び骨髄細胞から分化誘導した破骨細胞におけるカテプシン K 遺伝子の発現量、骨吸収活性には、HF 群と MFGM 群間で有意な差は認められなかった。分化誘導した TRAP 陽性破骨細胞のうち、単核の細胞の占める割合は、HF 群に対して MFGM 群で多い傾向にあり、多核化した細胞数には有意な減少が認められた。
【考察】破骨細胞は単核の細胞が融合して多核化し、巨大化することによってより強力な骨吸収作用を持つようになる。本研究により、MFGM は、高脂肪食の摂取により促進される破骨細胞の多核化を抑制することが明らかになった。これまでの研究により、*in vitro* において、RAW264.7 マクロファージ様細胞の破骨細胞分化および多核化の抑制効果が認められており、MFGM の摂取は破骨細胞の多核化を阻害することで骨吸収作用を抑制する可能性がある。また、MFGM が脂肪滴の蓄積や肥満による慢性炎症に対する抑制効果を持つことも認められている。今回の結果から、MFGM は、高脂肪食によって変化した骨髄中の微細環境にも何らかの影響を与えている可能性が示唆され、肥満やメタボリックシンドロームに対してだけではなく、骨粗鬆症などの疾患の予防にも効果的な作用が期待される。

milk fat globule membrane, osteoclast, hematopoietic stem cell

発表責任者：佐野あかり（MA188117@utsunomiya-u.ac.jp）

講演番号：4B1a11
講演日時：3 月 27 日 11:10～ 1 号館 B1 会場

ブラジル生薬アンディローバ（*Carapa guianensis*）由来リモノイド成分の脂肪代謝促進作用およびその作用機序の解明

Effects of Limonoids from Andiroba (*Carapa guianensis*) on Lipid Metabolism in HepG2 and Their Mode of Action

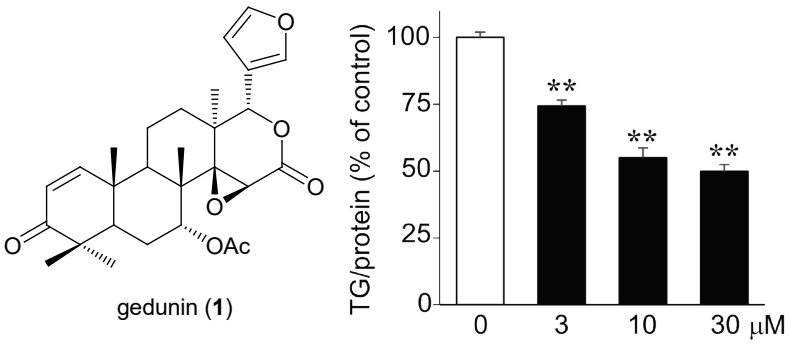
○長友 暁史[1]、二宮 清文[1,2]、丸本 真輔[3]、酒井 千恵[1]、村岡 修[1,2]、菊池 崇[4]、山田 剛司[4]、田中 麗子[4]、森川 敏生[1,2]（[1]近畿大・薬総研、[2]近畿大・アンチエイジングセ、[3]近畿大・共同利用セ、[4]大阪薬大）

○ Akifumi NAGATOMO[1], Kiyofumi NINOMIYA[1,2], Shinsuke MARUMOTO[3], Chie SAKAI[1], Osamu MURAOKA[1,2], Takashi KIKUCHI[4], Takeshi YAMADA[4], Reiko TANAKA[4], Toshio MORIKAWA[1,2] ([1]Kindai Univ. Pharm. Res. Technol. Inst., [2]Kindai Univ. Antiaging Centre, [3]Kindai Univ. Joint Res. Centre, [4]Osaka Univ. of Pharm. Sci.)

【目的】アマゾンの熱帯雨林に分布するセンダン科 (Meliaceae) の常緑樹 *Carapa guianensis* (アンディローバ) は, 材木として利用されるほかに, 種子や花部を圧搾して得られる油が炎症, マラリア, アレルギー, 虫除けおよび防腐剤として民間で用いられている．我々は生活習慣病の予防・改善に寄与する物質を天然から広く探索しており，これまでに，アンディローバの種子および花部から得たリモノイド成分が，肝保護作用やマウス腹腔マクロファージからの一酸化窒素産生抑制作用を示すことを明らかにしている．今回，ヒト hepatoblastoma 由来 HepG2 細胞を用いて，アンディローバ由来リモノイド成分が細胞内中性脂肪 (TG) 含量に及ぼす影響を検討した．

【方法】HepG2 細胞を 1×10^5 cells/well の濃度で 48 穴マイクロプレートに播種し，高濃度グルコース (4500 mg/L) 含有 DMEM で 6 日間培養し，細胞内に TG を蓄積させた．6 日目に培養液を被験物質を添加した低濃度グルコース (1000 mg/L) 含有 DMEM に交換し，20 時間培養した．培養終了後に超音波処理により細胞を破砕し, 得られた細胞破砕液中の TG 濃度およびタンパク質濃度を定量した．作用機序に関する知見を得るため，高濃度グルコース含有 DMEM にて培養し TG を蓄積させた HepG2 細胞に被験物質を作用させ，細胞を回収してトータル RNA を抽出し，リアルタイム PCR 法にて脂肪代謝に関連する各種 mRNA の発現を解析した．

【結果】Gedunin (**1**) を始めとした複数のアンディローバ由来リモノイド成分は，HepG2 細胞内に蓄積した TG を有意に低減させた. この作用は脂肪代謝のレギュレーターである AMPK を阻害すると減弱したことから，作用機序に AMPK の活性化が関与していることが示唆された. リアルタイム PCR による mRNA 発現解析の結果，PPARα および ACOX1 mRNA の発現増加が認められた．以上の結果から，アンディローバ由来リモノイド成分は肝細胞において脂肪酸の代謝を促進させることが明らかになり，脂肪肝の予防・改善に寄与するシード化合物として有用であると考えられた．



Each bar represents the mean with S.E.M. (N=8 or 4).
Asterisks denote significant differences from control group, $^{**}p<0.01$.

Figure. Effect of gedunin (**1**) on TG content in high glucose-pretreated HepG2 cells.

Carapa guianensis, limonoid, HepG2

発表責任者：森川敏生（morikawa@kindai.ac.jp）

講演番号：4B1a12
講演日時：3 月 27 日 11:21～ 1 号館 B1 会場

茶カテキン（EGCG）による低密度リポタンパク質受容体活性化に 67 kDa ラミニン受容体は関与しない

EGCG induced low density lipoprotein receptor activation is not related to 67 kDa laminin receptor

○残華 久美子、川口 勇矢、岡田 雄大、長岡 利（岐阜大自然科学）
○Kumiko ZANKA, Yuya KAWAGUCHI, Yudai OKADA, Satoshi NAGAOKA (Gifu Univ. Nat. Sci. Tech.)

【目的】

世界の主要な死因である動脈硬化関連疾患は、血中の低密度リポタンパク質（LDL）レベルの増加が原因で発症する。当研究室では、緑茶に含まれる主要なカテキンである Epigallocatechin gallate（EGCG）が LDL 受容体（LDLR）を活性化することで抗動脈効果作用を発揮することを報告した 1)。しかし、その詳細な作用機構は未だ不明な点が多く残されている。また、近年 EGCG の受容体として 67 kDa Laminin Receptor（67LR）が発見された。そこで本研究では、EGCG の LDLR 活性化機構の解明の一環として、67LR を媒介する経路の関与の有無を検討した。

【方法・結果】

＜実験 1＞67LR siRNA をトランスフェクションしたヒト培養肝臓細胞 HepG2 に、EGCG を添加した。その後、【A】RT-PCR を用いて EGCG の抗ガン作用および抗アレルギー作用関連因子レベルを、【B】RT-PCR によって LDLR を含むコレステロール代謝関連因子の mRNA レベルを、ウェスタンブロットによって LDLR タンパク質レベルを、それぞれ測定した。＜実験 2＞抗 67LR モノクローナル抗体で前処理した HepG2 細胞に、EGCG を添加した。その後、RT-PCR を用いて LDLR mRNA レベルを、ウェスタンブロットによって LDLR タンパク質レベルをそれぞれ測定した。その結果、＜実験 1＞【A】67LR ノックダウンにより、EGCG の MYLK mRNA レベルおよび MRLC リン酸化レベル低下作用が有意に抑制された。【B】67LR ノックダウンの有無に関わらず、EGCG は LDLR mRNA および成熟体 LDLR タンパク質レベルを有意に増加させた。＜実験 2＞抗 67LR モノクローナル抗体処理の有無に関わらず、EGCG は LDLR mRNA レベルおよび成熟体 LDLR タンパク質レベルを有意に増加させた。

以上より、EGCG の LDLR 活性化作用には 67LR は関与しないことを発見した。

1) Mol. Nutr. Food Res. 61, 1600836 (2017)

EGCG, LDL receptor, Laminin receptor

発表責任者：長岡利（nagaoka@gifu-u.ac.jp）

講演番号：4B1a13
講演日時：3 月 27 日 11:32～ 1 号館 B1 会場

オートファジーを指標にした食品の機能性評価に関する研究

Study on functional evaluation of food function by autophagic response

○山越 正汰[1]、諸富 勝成[2]、有賀 幸[2]、原 太一[1]([1]早稲田大学 人間科学学術院健康福祉科学科　細胞制御学・食品生命科学研究室、[2]天真堂株式会社)
○Shota YAMAKOSHI[1], Katunari MORODOMI[2], Miyuki ARIGA[2], Taichi HARA[1] ([1]Lab. of Cellular Regulation/Food and Life Science, Faculty of Human Sciences, Waseda University, [2]Tenshindo CO., LTD.)

[目的]

オートファジーは細胞内の大規模分解系であり、飢餓時におけるアミノ酸供給などにおいて、重要な役割を果たしている。また、細胞内の異常タンパク質や損傷オルガネラの除去にも関与しており、その破綻が神経変性疾患やがんなどの様々な疾患の発症と関連していることが明らかとなっている。オートファジーは疾患予防への応用が期待されるが、食品成分によってオートファジーがどのように応答するかについては不明な点を多く残している。そこでわれわれは、細胞のオートファジー応答を指標に、様々な食品成分の機能性について評価を行った。

[方法]

マウス胚性線維芽細胞（MEF）は、10% FBS を加えた DMEM を用いて 37℃、5%CO_2 存在下で培養した。オートファジーの評価は、オートファジー関連タンパク質の動態を Western blotting 法を用いて検討した。また、オートファゴソームマーカーの蛍光融合タンパク質の顕微鏡観察により、食品成分のオートファジーフラックスに及ぼす影響を検討した。

[結果・考察]

様々な食品成分のオートファジーへの影響について解析を行った結果、オートファジーに顕著な影響を示す食品素材としてニンニクを見出した。現在、ニンニク成分がオートファジーにどのように作用しているのか（オートファジーを抑制するのか、分解を促進するのか)、またその分子機構について検討進めているので、本発表においてあわせて議論したい。

Food function, autophagy, garlic

発表責任者：山越正汰（shota0108@fuji.waseda.jp）

講演番号：4B1a14
講演日時：3 月 27 日 11:43～ 1 号館 B1 会場

セリン欠乏による Phgdh KO マウス線維芽細胞でのミトコンドリア機能異常の誘発

Mitochondrial abnormalities in Phgdh deficient MEF cells under L-serine depleted condition

○松尾 優樹[1]、原口 祐里奈[1]、濱野 桃子[1]、尾上 詩織[1]、片倉 喜範[1]、古屋 茂樹[1,2] ([1]九大農、[2]九大イノベイティブバイオアーキテクチャーセンター)
○Yuki MATSUO[1], Yurina HARAGUCHI[1], Momoko HAMANO[1], Shiori ONOUE[1], Yoshinori KATAKURA[1], Shigeki FURUYA[1,2] ([1]Kyushu Univ. of Agric., [2]Kyushu Univ. Innovative Bio-Arch. Center)

de novo セリン合成経路の初発酵素である Phgdh (3-Phosphoglycerate dehydrogenase)遺伝子を全組織で不活性化したノックアウト（以下 KO）マウスは胎生 13.5 日以降に脳形態形成異常及び全身における成長遅滞を伴って胎生致死に至る (Yoshida et al, 2004)。我々はセリン欠乏による特徴的な表現型の詳細な分子メカニズム解明のため、胎生 13.5 日の *Phgdh* KO マウス胚より樹立した不死化マウス線維芽細胞（以下 KO-MEF）を用いて細胞レベルでのセリン欠乏応答経路の解析を進めてきた。KO-MEF はセリン制限培地で培養することにより、KO マウス組織と類似した特徴的な遺伝子及びタンパク質の発現変化を伴って細胞増殖が停止し、その後細胞死に至る。セリンは生体内で様々な物質に代謝され、この代謝物の一つであるグリシンは、ミトコンドリア内で TCA サイクルの中間代謝物であるスクシニル CoA と縮合してアミノレブリン酸に代謝され、ヘム合成の前駆体となる。ヘムは電子伝達系における必須の補欠分子族であり、その欠乏により複合体 IV の機能不全から ROS 産生に至ることが知られている。我々はセリン制限条件下の KO-MEF でのセリン及びグリシンレベルの減少（Sayano et al, 2013）、活性酸素種（以下 ROS）産生増大(Hamano et al, 2018)とストレスキナーゼ類の活性化を見いだした（Sayano et al, 2016）。これらの結果から、我々はセリン欠乏に起因した ROS 産生増大が細胞障害性の最上流因子である可能性を推定している。本研究では、セリン欠乏による ROS 発生源としてミトコンドリアの機能変化を想定し、関連機能分子の発現解析からその検証を行った。

セリン制限条件の KO-MEF においてミトコンドリア生合成関連遺伝子群及びヘム合成経路酵素群遺伝子が発現上昇していた。Western blot 解析により、セリン制限群においてミトコンドリア電子伝達系複合体 IV サブユニットの一つである Cox5a が顕著に減少していた。これらの変化はヘム合成中間体であるアミノレブリン酸の添加により正常化した。また、ミトコンドリア特異的蛍光色素のフローサイトメトリー解析により、セリン制限群におけるミトコンドリア量及びミトコンドリア膜電位の低下を確認した。以上の結果より、細胞外からのセリン供給が低下した場合に細胞内での *de novo* セリン合成経路はヘム並びに複合体 IV の維持に必須であり、その欠乏はミトコンドリア電子伝達系の機能不全による ROS 産生を惹起し、一方でその代償応答として生合成関連遺伝子を転写活性化している可能性が示唆された。

L-Serine, Mitochondrial dysfunction, ROS

発表責任者：松尾優樹（2BE18426T@s.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：4B1a15
講演日時：3 月 27 日 11:54～ 1 号館 B1 会場

コラーゲン由来ペプチドの投与がマウスの皮膚創傷治癒に与える影響の解析

Analysis of the effect of administration of collagen-derived peptide on wound healing in mouse skin

○佐藤 侑紀、須永 真実、水重 貴文、蕪山 由己人（宇都宮大農）
○Yuki SATO, Masami SUNAGA, Takafumi MIZUSHIGE, Yukihito KABUYAMA (Utsunomiya Univ. of Agric)

コラーゲンを低分子化したものをコラーゲンペプチド（以下 CP）という。コラーゲンは 3 重らせん構造をとり、水に溶解しづらく体内に吸収されにくい。一方、CP は水に溶解しやすく、食品素材としての利用が注目されている。これまでの研究から、経口投与した CP の一部はペプチドとして血液中に移行することが判明している。CP 消化吸収後の主要成分として、ペプチドとしては prolyl-hydroxyproline（以下 PO）、hydroxyprolyl-glycine（以下 OG）が同定されている。また、CP を摂取することで皮膚の水分量や弾性を上昇させることなど、皮膚細胞に影響を与えることがわかっている。

本研究では CP 摂取が皮膚創傷治癒に与える影響を解析した。皮膚創傷治癒を評価する方法として、創傷面積を経時的かつ正確に測定する実験系を確立した。生検パンチを用いて背部の皮膚を切除した後、創傷近傍の皮膚収縮を抑えるため、シリコンリングで創傷周辺の皮膚を固定した。マウスが創傷部に触れないよう、ガーゼ、カテリープ、テーピングテープの順でシリコンリングの上を覆った。創傷部は毎日撮影し、Image J により創傷面積を数値化した。この方法を用いて CP をマウスに経口投与したところ、創傷治癒 2 日目で CP 投与により創傷面積が有意に減少することが明らかとなった。

この結果と、前述した CP の一部がペプチドとして血中移行している報告から、CP 消化吸収後の主要成分が皮膚細胞に働きかけ、創傷治癒を促進している可能性が考えられた。そこで、皮膚創傷治癒に関与すると考えられる角化細胞、線維芽細胞、色素細胞を解析対象とし、PO、OG などが各細胞の挙動やコラーゲン代謝に関与する因子の発現にどのような影響を与えるか解析した。

PO、OG あるいは hydroxyproline（O）の添加は細胞増殖や遊走に影響を与えなかった。一方 PO 投与により線維芽細胞におけるゲル収縮能の有意な上昇が認められた。コラーゲンの分解に関わるマトリックスメタロプロテイナーゼ 2 および 9（MMP-2,9）の発現には大きな影響は認められなかった。以上より CP の主要な標的として線維芽細胞が考えらえた。

現在、線維芽細胞の活性化の指標となるα-smooth muscle actin（αSMA）の発現や共培養系の解析を進めているので、合わせて報告する。

Collagen, Skin wound healing, Collagen gel contraction assay

発表責任者：蕪山　由己人（kabuyama@cc.utsunomiya-u.ac.jp）

講演番号：4B2a06
講演日時：3 月 27 日 10:05～ 1 号館 B2 会場

新規な迅速スクリーニング法によるポリフェノールー金属イオン間相互作用の網羅的解析
Comprehensive analysis of interaction between polyphenolic compound and metal ion by novel high-throughput screening method
藤本 和史、守岩 友紀子、森岡 和大、東海林 敦、○柳田 顕郎（東薬大薬）
Kazufumi FUJIMOTO, Yukiko MORIIWA, Kazuhiro MORIOKA, Atsushi SHOJI, ○ Akio YANAGIDA (Tokyo Univ. of Pharm. & Life Sci.)

【目的】 植物体に吸収された金属イオンの輸送や貯蔵に関与する植物成分の種類やメカニズムは，今なお明確ではなく多くの関心が集まっている．一方，我々はこれまでに，水溶液中における被検化合物と金属イオン間相互作用の有無や強度を一斉に比較可能な，（固相抽出媒体を用いる）迅速・簡便なスクリーニング法を構築済である．そこで今回，植物固有の二次代謝産物のうち，金属錯体形成可能な水溶性配位子である「水酸基」を多数有するポリフェノール化合物（特にカテキン類やフラボノイド類）について，金属イオン（12 種類）との相互作用を網羅的に解析したので報告する．
【実験】 被検ポリフェノール化合物 (24 種類) : 市販試薬より，フェノールカルボン酸類 (8 種類)，カテキン単量体類（4 種類)，フラボノイド類（8 種類）を購入した．この他に，重合度の異なるエピカテキン（EC）オリゴマー（2～4 量体）を，リンゴ未熟果実抽出物から分離・精製した．被検金属イオン（12 種類）：Mg^{2+}，Al^{3+}，Ca^{2+}，Cr^{3+}，Mn^{2+}，Fe^{2+}，Fe^{3+}，Co^{2+}，Ni^{2+}，Cu^{2+}，Zn^{2+}，Mo^{5+}の各塩化物を使用した．ポリフェノール化合物と金属イオン間の相互作用解析：固相抽出媒体として，イミノ二酢酸基をシリカモノリスに修飾した遠心用スピンカラム MonoSpin® ME（GL サイエンス製）を使用し，まず，同カラムへ金属イオン溶液を遠心通液（2,300×g，1 min）してキレートさせてから，被検化合物溶液を通液し，素通り液中の被検化合物を HPLC/UV 検出法により確認・定量することで，各被検化合物と金属イオン間の相互作用の有無や強度を数値化した．
【結果と考察】 24 種類のポリフェノール化合物と 12 種類の金属イオン間相互作用をスクリーニングした結果，全てのポリフェノール化合物が Fe^{3+}と強く相互作用（錯生成）することが確認できた．塩化第二鉄試液によるフェノール性水酸基の呈色は古典的な定性反応であるが，本スクリーニングでは被検化合物の半数以上が，12 種類の金属イオン種のうち「Fe^{3+}のみ」と錯生成しており，Fe^{3+}イオンに対する高い選択性を示した．このことは，高等植物の二次代謝産物であるポリフェノール化合物が，植物体内のみならず，地上の生態系内の物質循環において，水溶性 Fe^{3+}イオンの選択的なキャリア物質として機能している可能性を強く示唆している．また，単量体カテキン類の大半や EC オリゴマーも同様の Fe^{3+}イオンに対する高い選択性を示したが，重合度の増加に伴い結合が強まる傾向が認められた．一方，一部のカテキン，フラボノイド，フェノールカルボン酸類からは，多様な金属イオン種との強い相互作用が確認された．これらの化合物の重合体，エステル体，配糖体はさらに水溶性が高まるため，液胞中への各種金属イオンの送達・貯蔵や排泄に関与しているかもしれない．

Polyphenolic compound, Proanthocyanidin, Metal ion

発表責任者：柳田顕郎（yanagida@toyaku.ac.jp）

講演番号：4B2a07
講演日時：3 月 27 日 10:16～ 1 号館 B2 会場

ツタンカーメンエンドウの抗酸化成分の同定および調理による抗酸化性の変化
Identification of an antioxidative component from Tutankhamen pea and effect of cooking on its antioxidant activity
○近藤（比江森） 美樹、上原 穂野香、新家 大輔（徳島文理大人間生活）
○Miki Hiemori-Kondo, Honoka Uehara, Daisuke Shinya (Tokushima Bunri Univ.)

【目的】 エンドウ(*Pisum sativum* L.)の原種とされる通称ツタンカーメンエンドウは、未熟な豆を食する実エンドウであり、花弁は淡い赤紫色、莢は濃紺色、実は緑色を呈する。当該エンドウは、一般的な栽培種と比べて高い DPPH ラジカル消去活性を示すが、その活性成分は不明である。また、当該エンドウの調理による抗酸化性の変化に関する情報も乏しい。本研究では、ツタンカーメンエンドウの抗酸化成分の同定を試みるとともに、各種調理が抗酸化性に及ぼす影響について検討した。
【方法】 2016 年 5 月に和歌山県で収穫されたツタンカーメンエンドウ及び対照としてウスイエンドウを莢付きで購入後、莢を除いて凍結保存し、実験直前に解凍して用いた。抗酸化成分の局在性の検討にあたり、両エンドウの全粒、皮、胚乳から調製した水抽出物の DPPH ラジカル消去活性を測定した。ツタンカーメンエンドウの皮に全粒の 98%の活性が認められたため、前処理カラムを用いて皮抽出物を濃縮後、DPPH ラジカル消去活性を指標に HPLC にて目的成分を単離し、タンデム四重極型質量分析計(ACQUITY® TQD, Waters)を使用して LC-MS/MS 分析を行った。一方、調理による抗酸化性の変化の検討は、ツタンカーメンエンドウを「煮る（煮含めあり)」、「煮る（煮含めなし)」、「茹でる」、「蒸す」、「オーブン加熱」および「レンジ加熱」の計 6 種類の加熱方法で調理した。次いで、調理済みおよび非加熱のエンドウを凍結乾燥・粉砕後、アセトン/蒸留水/エタノールの混合溶媒を用いて抽出物を調製し、それらの DPPH ラジカル消去活性およびポリフェノール量を測定した。
【結果および考察】各種クロマトグラフィーによって単離した主要な抗酸化成分の MS 分析において、質量イオン$[M-H]^-$=609.2 および$[M+H]^+$=611.2 が検出された。さらに、それらのフラグメントイオンとして、$[M-H]^-$＝303.5、305.2、441.1 および 483.2、$[M+H]^+$＝305.5、307.2 および 443.3 が検出された。これらのプロファイルは、既報のカテキンの二量体のプロファイルと一致したことから、当該成分は（エピ）ガロカテキンの二量体であることが示唆された。さらに、ツタンカーメンエンドウの調理後の抗酸化性は、「レンジ加熱」、「煮る（煮含めあり)」、「オーブン加熱」、「蒸す」、「煮る（煮含めなし)」、「茹でる」の順に低く、「茹でる」ではエンドウよりも茹で汁の方が高い活性を示した。これらの結果から、抗酸化性は加熱によって一部低下するが、主な低下の要因は茹で汁への成分の流出によることが明らかになった。さらに、各抽出物の DPPH ラジカル消去活性はポリフェノール量と高い相関を示した。この事実は、ツタンカーメンエンドウの抽出物の抗酸化性がカテキン類に起因することを支持するものである。本研究は、JSPS 科研費 17K00838 の助成を受けて実施した。

Tutankhamen pea, antioxidative component, cooking

発表責任者：近藤　美樹（m-kondo@tks.bunri-u.ac.jp）

講演番号：4B2a08
講演日時：3 月 27 日 10:27～ 1 号館 B2 会場

コーヒー飲料の品質劣化に対する乳化型抗酸化製剤の作用

Effect of Antioxidative Formulation against Quality Degradation of Coffee Drink

清水 育実、○門脇 章夫、大久保 泰宏（太陽化学株式会社）
Ikumi SHIMIZU, ○Akio KADOWAKI, Yasuhiro OKUBO (TAIYO KAGAKU Co. Ltd.)

【目的】飲食品の製造および販売の場面において、熱や光が食品にダメージを与え、食品の嗜好的品質や栄養価値の低下を引き起こすことが知られている。このような食品の変化は、食品中に含まれる脂質やフレーバー成分の酸化劣化が原因の一つとなっている。酸化防止剤は飲食品の風味劣化を防止する添加物として幅広く使用されており、目的に応じて水溶性、油溶性のものが用いられるが、油溶性の酸化防止剤を水系飲食品へ直接添加することは困難であるため、界面活性剤を用いて水中に分散可能な乳化組成物として調製を行う。我々はこれまでに、独自の乳化技術で油溶性酸化防止剤と水溶性酸化防止剤を一剤化した乳化型抗酸化製剤を開発するとともに、乳製品や果汁飲料など各種飲食品において効率的な酸化防止効果の発現を報告してきた [1-5]。しかしながら、飲食品の種類や保管条件等によって酸化劣化の進み方は大きく異なることが明らかとなっており、未だに十分な酸化防止技術が確立していない飲食品も存在する。そこで本年度はコーヒー飲料中での酸化劣化物質の分析を行い、乳化型抗酸化製剤による酸化防止効果について検証を行った。

【方法】油溶性酸化防止剤と水溶性酸化防止剤を界面活性剤により一剤化し、乳化粒子径を制御した微細乳化品（平均粒子径：0.1 μm）、および通常乳化品（平均粒子径：0.5 μm）を調製した。各乳化型抗酸化製剤をコーヒー飲料に添加して加熱殺菌処理を実施し、光照射あるいは加熱保管による虐待試験を行った。試験飲料は官能評価および各種機器分析により、酸化劣化物の測定を行った。

【結果】コーヒー飲料の加熱殺菌時、およびその後の虐待試験中において、コーヒー油分や香気成分に酸化反応による変化が認められた。各種コーヒー飲料に各種酸化防止剤を添加したところ、乳化粒子径を微細に制御した乳化型抗酸化製剤において最も良好な酸化防止効果の発現を確認した。

1) 日本農芸化学会 2013 年度大会 要旨集 2A16p20
2) 日本農芸化学会 2014 年度大会 要旨集 2B03p03
3) 日本農芸化学会 2015 年度大会 要旨集 2F26a02
4) 日本農芸化学会 2016 年度大会 要旨集 2E023
5) 日本農芸化学会 2017 年度大会 要旨集 3A04a08

antioxidant, emulsion, coffee

講演番号：4B2a09
講演日時：3 月 27 日 10:38～ 1 号館 B2 会場

味センサーを用いた碁石茶の味の可視化と解明
Visualization and elucidation of Goishi tea's taste using taste-sensing system
○大塚 祐季[1]、森山 洋憲[2]、下藤 悟[2]、有田 光[1]、阪地 満帆[1]、柏木 丈拡[1]、島村 智子[1]、受田 浩之[3]([1]高知大・農、[2]高知県工技セ、[3]高知大・地域創造セ)
○ Yuuki Otsuka[1], Hironori Moriyama[2], Satoru Shimohuji[2], Hikaru Arita[1], Michio Sakaji[1], Takehiro Kashiwagi[1], Tomoko Shimamura[1], Hiroyuki Ukeda[3] ([1]Faculty of Agriculture and Marine Science, Kochi University, [2]Kochi prefectural industrial technology center, [3]Center for Regional Sustainability and Innovation, Kochi University)

【目的】碁石茶は、高知県長岡郡大豊町において好気発酵と嫌気発酵を経て生産される世界的に見ても珍しい二段階発酵茶である。その味は特徴的であり、際立った酸味とマイルドな苦味を呈する。酸味は嫌気発酵中に生じる乳酸に起因すると考えられるが、苦味因子に関しては不明な点が多い。一方、食品の味に関するこれまでの評価方法は官能試験が主流であったが、近年では技術の進歩に伴い、味センサーを用いた客観的な味の数値化が可能となった。そこで本研究では、味センサーを用いた碁石茶と市販飲料との味の比較、及び碁石茶製造工程中の味の変化の可視化を試みると共に、碁石茶の味の特徴、及び製法と呈味成分の関係について考察した。

【方法】分析試料として、碁石茶と市販飲料（烏龍茶 2 種類、緑茶 2 種類、麦茶 1 種類)を用いた。碁石茶に関しては、製造工程（蒸後、好気発酵 1-6 日後、嫌気発酵後、天日乾燥後）毎にサンプリングしたものについても分析試料とした。乾燥茶葉粉末 2 g に 200 g の熱湯を加え、10 分間撹拌後にろ過したものを各種茶抽出液とし、分析に供した。味分析には味認識装置（TS-5000、Intelligent Sensor Technology, Inc.製）を用いた。総ポリフェノール量はフォーリンチオカルト法にて定量した。碁石茶抽出液中のアミノ基量は TNBS 法にて測定した。

【結果及び考察】碁石茶と市販飲料間での比較の結果、碁石茶は渋味値、旨味値、塩味値が低く、酸味値が際立って高く、苦味値も高いことが明らかとなった。加えて、碁石茶の各味値は好気発酵、嫌気発酵、天日干しの工程の進行に伴い、変化することが明らかとなった。特に、酸味値は、好気発酵 2 日目から大きく増加し、嫌気発酵後にさらに増加した。このことから、碁石茶の酸味の形成には嫌気発酵中に生成する乳酸のみでなく、前段階の好気発酵で生成する酸味成分が関与していると推察された。また、苦味値に関しては、酸味値と同様に製造の進行に伴い増加することが明らかとなった。製造工程中のアミノ基量の変化を調べたところ、アミノ基量は好気発酵の途中から嫌気発酵まで増加する傾向を示した。この傾向は碁石茶における苦味値の変化と類似していたことから、好気発酵、及び嫌気発酵に関与する微生物によるタンパク質の分解が碁石茶の苦味の増加に一部起因していると推察された。従って、碁石茶特有の際立った酸味とマイルドな苦味を形成するためには、二段階の両発酵が共に必要であることが示唆された。

Post-fermented tea, taste analysis, bitterness

発表責任者：島村 智子（tomokos@kochi-u.ac.jp）

講演番号：4B2a10
講演日時：3 月 27 日 10:49～ 1 号館 B2 会場

徳島県伝統後発酵茶阿波番茶の年次傾向について

Year's tendency of 'Awabanch y a', traditional post fermented tea in Tokushima

○内野 昌孝[1]、越智 晶子[2]、小山 翔大[3]、辻井 良政[2]、高野 克己[2] ([1]東農大生命、[2]東農大応生、[3]東農大院農学)
○Masataka Uchino[1], Akiko Ochi[2], Shota Koyama[3], Yoshimasa Tsujii[2], Katsumi Takano[2] ([1]Tokyo Univ. of Agric., [2]Tokyo Univ. of Agric., [3]Grad. Tokyo Univ. of Agric.)

【目的】

阿波晩茶は徳島県の上勝町および那賀町で製造される後発酵茶である。この茶は 7 月頃に茶樹より青葉を刈取り、釜茹で後に揉捻し、樽にて数週間発酵させて乾燥させて製造する。この風味形成は阿波番茶の発酵過程で主に乳酸菌による乳酸発酵で醸し出されるとされている。これまでに我々は発酵過程で乳酸菌と雑菌が共存し、乳酸菌による適切な発酵促進と雑菌の生育抑制に茶葉由来のポリフェノールであるカテキンが関与していることを明らかにした。

今回は 2018 年度の発酵過程における発酵液を経時的にサンプリングし、微生物数とポリフェノール量やその種類を調べ、いくつかの知見が得られたので報告する。

【方法】

試料として 2018 年に上勝町でサンプリングした２樽の阿波晩茶発酵液を用いた。一般生菌数は標準寒天培地で、乳酸菌はアジ化ナトリウム、シクロヘキシミド、炭酸カルシウムを含む MRS 寒天培地を利用した。常法に従い培養後、一般生菌数はコロニー数より、乳酸菌数は周囲にクリアゾーンを形成するコロニー数から求めた。ポリフェノールの定性と定量は LC-MS にて分析した。

【結果】

桶①は発酵 3 日目でポリフェノール量が最大の約 70μmol/ml となり、その後日数とともに減少した。発酵初期には乳酸菌が多く確認され、雑菌の生育はみられなかった。一方、9 日目でポリフェノール量が約 5μmol/ml となり、10^3cfu/ml 程度の雑菌の生育が確認された。桶②は 1 日目でポリフェノール量約 55μmol/ml であり、その後日数とともに減少し、9 日で約 5μmol/ml であり、10^3cfu/ml 程度の雑菌のコロニーが観察された。

これまでの研究で乳酸菌が十分に生育する一方、雑菌が抑えられるポリフェノール濃度は 10μmol/ml であり、今回の結果はそれを反映したものと考えられる。これに加え、桶②では 13 日でポリフェノール濃度が約 20 mmol/ml に上昇しているが、これは予め取り置いた煮汁を加えたためである。しかし、雑菌が抑制されていないことから、ポリフェノールに主に含まれているピロガロールは殺菌効果が弱いことに起因すると考えられる。

Awabanchya, post fermented tea, lactic acid bacteria

発表責任者：内野昌孝（muchino@nodai.ac.jp）

講演番号：4B2a11
講演日時：3 月 27 日 11:10～ 1 号館 B2 会場

青山緑水に含まれるモノテルペン配糖体による白血球型 12-リポキシゲナーゼの不可逆的阻害

Irreversible Inhibition of Leukocyte-type 12-Lipoxygenase by Monoterpene Glycosides Contained in Qing Shan Lu Shui Tea

○川上 祐生、大槻 朱美、森 香子、神崎 圭太、山本 登志子、伊東 秀之、高橋 吉孝（岡山県大）
○ Yuki KAWAKAMI, Akemi OTSUKI, Yoshiko MORI, Keita KANZAKI, Toshiko SUZUKI-YAMAMOTO, Hideyuki ITO, Yoshitaka TAKAHASHI (Okayama Pref. Univ.)

リポキシゲナーゼは、不飽和脂肪酸に 1 分子の酸素を添加する酵素である。哺乳類では、酸素の添加部位の異なる 5-、8-、12-、15-リポキシゲナーゼが存在する。12-リポキシゲナーゼは白血球型、血小板型、皮膚型のアイソザイムが知られている。この中で、白血球型 12-リポキシゲナーゼは広い基質特異性をもち、LDL に含まれるコレステロールにエステル結合した不飽和脂肪酸にも直接酸素を添加できることから酸化 LDL の生成にも関与すると考えられている。我々はこれまでに苦丁茶の 1 つである青山緑水中に白血球型 12-リポキシゲナーゼを阻害できる成分として liguroside A と liguroside B の 2 種類の新規モノテルペン配糖体を見出してきた(1)。本研究では、青山緑水に含まれる白血球型 12-リポキシゲナーゼ阻害成分を逆相 HPLC を用いた分画により単離し、本化合物による白血球型 12-リポキシゲナーゼの活性阻害機構への影響を検討した。白血球型 12-リポキシゲナーゼを阻害するモノテルペン配糖体はヒドロペルオキシ基をもつ特徴的な構造を示し、白血球型 12-リポキシゲナーゼの触媒活性を不可逆的に阻害した。一方、ヒドロペルオキシ基を持たないモノテルペン配糖体ならびにヒドロペルオキシ基をヒドロキシ基に還元したモノテルペン配糖体では、白血球型 12-リポキシゲナーゼの阻害はほとんど認められなかった。このことから、青山緑水に含まれるモノテルペン配糖体による白血球型 12-リポキシゲナーゼの活性阻害は、ヒドロペルオキシ基が重要な働きをしていることが示唆された。

(1) Ito et al. *Molecules*, **18**, 4257-4266 (2013).

hydroperoxy group, leukocyte-type 12-lipoxygenase, irreversible inhibition

講演番号：4B2a12
講演日時：3 月 27 日 11:21～ 1 号館 B2 会場

Identification of novel S-conjugates generated between thiol compounds and oxidized betacyanins from Basella alba L. fruits
○Agnieszka KUMORKIEWICZ, Slawomir WYBRANIEC (Cracow University of Technology)

Medicinal plants are regarded as a major source of therapeutic agents capable of curing human diseases. *Basella alba* L. (Basellaceae) is a fast-growing plant commonly cultivated in Asian subtropical regions especially for its leaves being consumed as spinach but also because of pro-health properties which are attributed to this plant. Due to the presence of bioactive compounds such as betalains, *Basella alba* L. fruit extracts exhibit antioxidant, chemopreventive properties as well as cytotoxic activity against human cervical carcinoma cells. The 6-*O*-glycoside of betanidin (gomphrenin) belonging to the group of betalains is a basic pigment identified in *Basella alba* L. fruits. Studies in food chemistry indicate that conjugation may block the thiol groups in food proteins contributing to improved food quality. In light of the foregoing, adducts formed between thiols and quinones may be regarded as protective factors against disulfide formation. This is also worth exploring in the case of betalains since betanin (5-*O*-glycoside of betanidin) was successfully applied for protection of meat from discoloration and extention of its shelf-life instead of using artificial colorants.
According to our research, short-lived, reactive quinones derived from oxidized betalains form stable adducts with sulfhydryl-based scavengers which can be detected and characterized using MS/MS and NMR techniques. Our main efforts were focused on reactions of gomphrenin from *Basella alba* L. fruits, betanin as well as betanidin with different thiol compounds e.g. cysteamine and DL-dithiothreitol. In addition, determination of molecular formulae as well as research on the fragmentation paths of the conjugates were performed by LCMS-IT-TOF. Besides the presence of the expected S-conjugates with oxidized betalains, other sulfur-containing adducts with decarboxylated and dehydrogenated betalain derivatives formed during the oxidation of the starting pigment were also detected. The structures of the most stable conjugates were studied by NMR method for the first time. It was reported that thiols react with quinones at carbon C-4 of betanidin ring. Obtained results are promising, however further studies, especially on quinones impact on human health, should be conducted.
The conference participation was financed by the ESF funds of the European Union within the PROM programme.

betalains, natural pigments, Basella alba L.

発表責任者：KUMORKIEWICZ Agnieszka（akumorkiewicz@chemia.pk.edu.pl）

講演番号：4B2a13
講演日時：3 月 27 日 11:32～ 1 号館 B2 会場

Thermal degradation and antioxidant potential of major betacyanin pigments in extracts of red Gomphrena globosa L. flowers

○Natalia SZMYR, Slawomir WYBRANIEC (Cracow University of Technology)

Betacyanins are a red-violet subgroup of betalains – nitrogenous plant pigments from Caryophyllales order. These dyes paid researcher's attention due to their numerous pro-health properties presumably owing to phenolic groups in their chemical structures. They have great ability to scavenge free radicals preventing oxidative stress which is responsible for number of diseases including cancer and Alzheimer's disease. Therefore, natural antioxidant products implemented into a daily diet can effectively support the body in neutralization of the free radicals to remove the harmful effects of oxidative stress. *Gomphrena globosa* L. (Globe amaranth) is an annual, herbaceous, edible plant belonging to the Amaranthaceae family. It is widely cultivated in China and in the tropical regions of Central America. Dried flowers of Gomphrena are commonly used for preparation of tea infusions in China. These compounds can be potentially used in the pharmacy and food industry on commercially scale, unfortunately, as most of natural products, betacyanins are not stable in certain conditions. Elevated temperature influences negatively on betalains stability before all else. Therefore, determination of degradation products as well as comparison of the antioxidant properties of extracts and isolated pigments before and after heating is relevant. This work aimed to investigate the stability of dominant betacyanin pigments (amaranthin as well as celosianin II – feruloylated derivative of amaranthin) present in red *G. globosa* extract during thermal processing, identification of betacyanins degradation products and determination of the antioxidant properties of aqueous extract before and after heating. Samples of the extract were subjected to thermal processing in aqueous and ethanolic solutions. The samples were collected for analyses during the 60 min of heating at temperature in the range of 60-90 ^{0}C. Decomposition of amaranthin and celosianin II resulting in generation of mainly decarboxylated compounds including 17-decarboxy-, 2-decarboxy- as well as 2,17-decarboxy-derivatives was monitored by high performance liquid chromatography coupled with optical and mass spectrometric detection. In order to determine antioxidant properties, the Ferric Reducing Antioxidant Power Assay was performed.

The conference participation was financed by the ESF funds of the European Union within the PROM programme.

betacyanins, Gomphrena globosa L., natural pigments

発表責任者：Natalia Szmyr（nszmyr@chemia.pk.edu.pl）

講演番号：4B2a14
講演日時：3 月 27 日 11:43～ 1 号館 B2 会場

ポリ-γ-グルタミン酸の発酵生産においてカルシウムイオンが分子量に与える影響
Effect of Ca^{2+} in molecular mass of poly-gamma-glutamic acid in fermentative production
○岩本 七虹[1]、山口 良弘[1,2]、荻田 亮[1,3]、田中 俊雄[1]、藤田 憲一[1] ([1]阪市大院・理、[2]阪市大・複合先端、[3]阪市大・健康研セ)
○Nanako IWAMOTO[1], Yoshihiro YAMAGUCHI[1,2], Akira OGITA[1,3], Toshio TANAKA[1], Ken-ichi FUJITA[1] ([1]Grad. Sch. Sci. Osaka City Univ., [2]OCARINA, Osaka City Univ., [3]Res. Center. Urban Health & Sports, Osaka City Univ.)

【背景】 納豆の粘性成分の一つであるポリ-γ-グルタミン酸 (PGA) は、長期間室温にて放置すると分子量が徐々に低下していき、また 100°C の熱処理によってその低分子量化は加速される。熱処理による低分子量化は EDTA やクエン酸など二価金属イオンのキレート剤の共存によって抑制されることがわかっている。加えて、このキレート剤による抑制効果は BAPTA や EGTA など Ca^{2+} に選択性の高いキレート剤によって高められた。このことから PGA の低分子量化、さらには生合成されるときに起こる高分子量化に Ca^{2+}が関わっている可能性が示唆された。今回、Ca^{2+}不含の合成培地を用いて PGA を発酵生産させ、取得した PGA の分子量について調べた。
【方法および結果】PGA の発酵生産が確認できた合成培地から、Ca^{2+}を除いたものを準備して、PGA 高生産株 *Bacillus* sp. F-2-01 株由来の PGA 合成遺伝子発現系を有する形質転換株を培養した。その結果、興味深いことに培養液に粘性は認められず、PGA を主成分として含む 70% エタノール沈殿画分も少ししか得ることができなかった。アガロースゲル電気泳動で本画分の分子量を調べたところ、Ca^{2+}含有培地で発酵生産させ取得した PGA より低分子量を示すことがわかった。本実験で用いた合成培地は大腸菌用のものであり、PGA の生産量が低かったと考えられるため、次いで枯草菌用の合成培地で培養し、得られた PGA の分子量を調べている最中である。本発表では、枯草菌用の合成培地をベースに Ca^{2+} 有無の培養条件下で PGA を発酵生産させ、得られた PGA の分子量を比較した結果について報告する。

poly-γ-glutamic acid, *Bacillus subtilis*, Ca^{2+}

発表責任者：藤田憲一（kfujita@sci.osaka-cu.ac.jp）

講演番号：4B2a15
講演日時：3 月 27 日 11:54～ 1 号館 B2 会場

高圧処理によるレスベラトロールの反応生成物とその生理活性

Reaction products of resveratrol by high pressure processing and its biological activity.

○本田 沙理[1]、田口 修己[1]、鹿島 康浩[2]、松川 泰治[2]、熊澤 茂則[1] ([1]静県大院薬食、[2]UHA 味覚糖(株))
○Sari HONDA[1], Yoshiki TAGUCHI[1], Yasuhiro KASHIMA[2], Yasuji MATSUKAWA[2], Shigenori KUMAZAWA[1] ([1]Univ. Shizuoka of Pharm. Nutr. Sci., [2]UHA Mikakuto Co. Ltd.)

【背景・目的】

従来、一般的な食品研究では、研究対象を食品原料（いわゆる食材）とするものが多く、加工された食材（食品）に関する研究は少ない状況にある。例えば、ブドウに含まれる食材成分・ポリフェノールがワインへと加工される工程において、その加工過程でどのような成分変化が起こるかについてはあまり知られていない。赤ワインに含まれるポリフェノールであるレスベラトロールは、抗酸化、抗ガン、抗肥満作用などを有することが知られており、食材であるブドウ中に存在している。レスベラトロールの化学反応性については、ワインへと加工される過程でレスベラトロール自身または他ポリフェノールと反応し、重合化することが報告されているが、詳細については明らかにされていない。本研究では、食品の加工法のうち加圧処理に着目し、レスベラトロールとカフェ酸の重合生成物 RK4 に関して、加圧処理による生成量の変化およびその生理活性機能を調べることを目的とした。

【方法】

（1） 加圧処理による RK4 の定量

レスベラトロールとカフェ酸の混合溶液を、加圧（100 MPa）の有無、反応温度、時間を変えながら処理した。各反応溶液を LC-MS/MS で分析し、RK4 の生成量を調べた。

（2） キサンチンオキシダーゼ（XOD）阻害活性の測定および阻害メカニズムの検討

基質のキサンチンが XOD によって酸化されて生成する尿酸を定量し、阻害率を算出した。また、RK4 の阻害様式を Line Weaver Burk Plot によって解析し、ドッキングシミュレーションで RK4 と XOD との間の相互作用についても推察した。

【結果】

（1） 高圧処理した試料において顕著な RK4 の生成が認められた。また、RK4 生成量は反応温度の上昇および反応時間の増加に伴い増加することも判明し、常圧においても加熱および反応時間を調整することで RK4 が生成することが明らかになった。

（2） RK4 はレスベラトロールより高い XOD 阻害活性を示し、阻害の様式は混合型阻害であることが示唆された。ドッキングシミュレーションによって RK4 と XOD との間の相互作用を解析したところ、RK4 は XOD の活性部位 FAD の近くで最も安定に結合するが、触媒活性部位であるモリブドプテリン補因子においても安定に結合し、阻害を示すことが推察された。

pressure processing, polyphenol, xanthine oxidase

発表責任者：本田沙理（s-honda@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：4B3a01
講演日時：3 月 27 日 09:00～ 1 号館 B3 会場

海藻アカモク粉末添加による製パン性への影響

Effect of Akamoku Powder enriched Breads on Their Physical Characteristics

○村上 香、平山 祐貴、黒石 唯人（広島工大生命）
○Kaori Murakami, Yuki Hirayama, Yuito Kuroishi (Hiroshima institute of technology)

【目的】

我々はこれまでに、海藻アカモク*Sargassum horneri* (Turner) C. Agardhは、ミネラルや食物繊維を豊富に含むこと、湯通し凍結乾燥粉末の経口摂取によるラットの腸内環境改善や血中コレステロール上昇抑制効果を有することを確認し、機能性食品素材としての可能性を示した*。アカモクはフコイダンやアルギン酸などの保水力のある粘質多糖質を含むため、パン生地に加えることで品質の向上が期待できる。そこで、本研究では、アカモク粉末をパン生地に添加することにより、カルシウムや鉄などのミネラルや食物繊維が強化されたパンの作成を試み、その製パン性への影響を調べた。

【方法】

アカモク粉末をベーカーズパーセントで、1および3%添加して材料を計2分20秒間混捏し、30℃、40分間一次発酵させた。ガス抜きして分割し、20分間ベンチタイム後、成型し、ミニ食パン型（15×8×8 cm：0.75斤）に入れ、40℃、30分間二次発酵して、180℃、35分間で山形食パンを焼成した。放冷後、重量および体積を測定し、2 cm間隔にカットし、ポリエチレン袋に入れ25℃で保存した。食パンは、カット後（0日）、保存1、2、3および4日後にテンシプレッサーを用いてテクスチャーを測定した。

【結果】

比容積はコントロール食パン（Cont.）5.01±0.07 ml/gと比べて、3%アカモク粉末添加食パンは3.93±0.32 ml/gと有意に低くなった（p<0.01）。この結果は、容積はアカモク粉末添加により低くなる傾向は見られたものの有意差は認められなかったのに対して、質量はアカモク添加により有意に重くなったことに関連しており、3%アカモク粉末の添加による発酵力への影響が考えられた。一方、硬さ、凝集性、ガム性および弾力性の経日変化は、Cont.と比較してアカモク粉末添加による影響はあまり認められなかった。本実験の条件では、アカモク粉末添加による物性の向上は確認できなかったが、Cont.と同等の物性を保持できることが確認された。

* 5th International Dietary Fibre Conference (2012) p.159, International Conference and Exhibition on Nutraceuticals and Functional Foods 2012 (2012) p.155, *J Food Compost Anal*, 24 (2011) 231–236, 2013 年度日本農芸化学会大会要旨集 (2013) 3A20p01

Sargassum horneri, Bread, Physical Characteristics

発表責任者：村上　香（k.murakami.tf@it-hiroshima.ac.jp）

講演番号：4B3a02
講演日時：3 月 27 日 09:11～ 1 号館 B3 会場

セルラーゼ製剤中に存在する新規凝乳酵素の同定およびアプリケーション

Identification and an application of a novel milk-clotting enzyme in a cellulase preparation.

○小笠原 準季、吉川 潤、堀口 博文（合同酒精(株)）
○Junki OGASAWARA, Jun YOSHIKAWA, Hirofumi HORIGUCHI (GODO SHUSEI CO., LTD.)

【背景】

チーズ製造では、仔牛由来キモシンを組換え微生物で生産される発酵生産キモシンや、糸状菌が生産する微生物性レンネットが広く使われている。しかしながら、それら凝乳酵素が作用した乳製品は苦味が生じるという問題がある。そこで、既存のものに代わる新たな凝乳酵素を探索したところ、当社製 *Trichoderma reesei* 由来食品用セルラーゼ製剤である「GODO-TCF」（以下、TCF）が、凝乳作用を有することを見出した。そこで本研究では、TCF 中の凝乳因子を精製・同定し、その特性を解析した。さらに、TCF を添加した発酵乳を試作し、その力学的特性と味覚の変化を評価した。

【方法と結果】

TCF を出発原料として、限外濾過濃縮ののち強陰イオン交換、疎水性相互作用、ゲル濾過の各種カラムクロマトグラフィーによって凝乳活性を有する因子を精製した。精製で得られた凝乳活性を有する画分について SDS-PAGE 分析した結果、約 33 kDa の単一バンドとして検出された。得られたバンドについて LC-MS/MS 解析および Mascot search プログラムによる同定を実施した結果、*T. reesei* QM6a 由来の未同定タンパク質と推定された。そこで、当該タンパク質のアミノ酸配列について Blastp により相同性を検索した結果、*Trichoderma* 由来 Protease A（以下、PrA）と非常に高い相同性であったことから、TCF 中の凝乳因子は PrA であると推察された。本酵素の酵素化学的特性を解析した結果、凝乳活性の最適温度は 60℃、最適 pH は 5.5 以下（測定不能）であった。また、本酵素は 60℃、2 時間の保温で 80%以上、pH 3.5～6.5 の範囲で 6 時間まで 80%以上の残存活性を保持した。一般的に、発酵乳の製造は 40～45℃で行われることが多く、発酵中の pH は 6.5 から 4.5 付近まで下降する。このことを考慮すると、TCF 中の PrA の特性は発酵乳製造時の条件と合致することが分かった。そこで、TCF を添加した発酵乳を試作し、クリープメーターを用いて破断強度解析を実施した。その結果、TCF を添加した発酵乳は無添加品に比べてカード表面強度が増加する変化を確認した。また、同装置を用いたテクスチャー解析では、酵素無添加の発酵乳はカード内部の不均一性を示す波型の波形が見られたが、TCF 添加品には認められず、より均一なカード構造となっていることが分かった。さらに、味覚センサーを用いて TCF 添加発酵乳の味質を分析した結果、TCF 添加品は他プロテアーゼにみられる苦味が検出されなかった。これらの結果より、TCF 中の PrA は発酵乳をはじめとする乳製品の物性改変剤として使用できる可能性が示された。

protease A, milk-clotting, *Trichoderma reesei*

講演番号：4B3a03
講演日時：3 月 27 日 09:22～ 1 号館 B3 会場

LC-MS/MS によるノコギリヤシエキスの分析と同等性評価
Analysis and equivalence evaluation of saw palmetto extract by LC-MS/MS
○関川 貴寛[1]、木澤 有希[1]、李 艶梅[2] ([1]BGG Japan、[2]BGG)
○Takahiro SEKIKAWA[1], Yuki KIZAWA[1], Yanmei LI[2] ([1]BGG Japan, [2]BGG)

【目的】アメリカの先住民であるインディアンは古くからノコギリヤシを薬草として活用していた。ノコギリヤシ果実由来のエキスは頻尿の改善効果が期待されており、複数のメーカーが製品化している。ノコギリヤシ果実の主成分はラウリン酸やオレイン酸などの脂肪酸であり、微量ではあるが植物ステロールを含んでいる。現在、ノコギリヤシエキス製品は主に欧米や日本で流通しており、安価な動植物油で希釈されたエキスやパーム油をカロテノイドで着色した偽物原料も市場に流通していることが報告されている。エキス製品に含まれている脂肪酸とステロールの濃度は製品の規格値として設定されているが、偽物原料の脂肪酸組成がノコギリヤシ規格値と同様に調製された場合、従来の分析法だけでは偽物原料の判別が困難である。本研究では、ノコギリヤシ果実由来エキスの同等性評価法の確立を目的とし、複数製品を用いたエキス成分の比較分析および果実由来成分の同定を行った。

【方法】分析試料として複数メーカーのノコギリヤシ果実由来のエキス製品および粉砕した果実を用いた。各試料を含水メタノール/ヘキサンを用いて液液分配し、メタノール層を濃縮乾固後、ジメチルホルムアミドに溶解し、超高速高分離液体クロマトグラフ(ACQUITY UPLC, Waters) で測定した。各エキス製品と果実から得られたクロマトグラムを比較し、特徴的なピークの有無を評価した。また、果実由来の特徴的なピークの同定は質量分析計 (ACQUITY/SynaptG2-S, Waters)で行った。

【結果】各試料を紫外可視検出器で測定した結果、波長 212、280、412 nm において特徴的なピークが検出された。メーカーは異なるがノコギリヤシ果実の収穫地エリアが同じ製品を比較したところ、各波長におけるクロマトグラムのピーク形状はほぼ一致した。他の試料とピーク形状が一致せず、さらに果実由来成分のピークが検出されない試料も確認された。本液液分配法を用いることでエキス原料由来の微量な高極性成分の検出に成功し、各エキス製品と果実由来成分との比較および同等性の評価を行うことができた。また、果実由来成分の特徴的な 3 つのピークについては分子式の推定を行った。測定波長 212 nm のピークは推定分子式が $C_{18}H_{30}O_2$ であり、標品とピークの保持時間も一致したことから、リノレン酸であると推定した。他の 2 つのピークについても分子式を同定するため、LC-MS および LC-MS/MS による分析を行った。

saw palmetto, equivalence evaluation, LC-MS/MS

講演番号：4B3a04
講演日時：3 月 27 日 09:33～ 1 号館 B3 会場

保存期間および加熱温度が異なる豚肉の呈味および加熱香気成分のメタボロ―ム解析
Metabolomic analysis of taste- and flavor-related metabolites in pork meat under the conditions of different storage time and roasting temperature

○田村 祥雄[1,2]、岩藤 伸治[1]、宮浦 一騰[1]、Asikin Yonathan[2]、草野 都[2,3] ([1]JA 全農、[2]筑波大院・生命環境、[3]理研・CSRS)
○Yoshio Tamura[1,2], Shinji Iwatoh[1], Kazutoshi Miyaura[1], Yonathan Asikin[2], Miyako Kusano[2,3] ([1]ZENNOH, [2]Univ. Tsukuba, [3]RIKEN CSRS)

【目的】豚肉は焼く，茹でる，揚げる等加熱調理し食すため，味だけでなく香りも「おいしさ」を形成する重要な因子となる．現在，食肉 (牛肉等) の香りに関する報告はあるものの，いずれも香気成分のみに着目した実験系が殆どであり，呈味成分との関連性を示したものは皆無である．本研究では，呈味成分の量的変動が予想される保存期間の異なる豚肉を題材とし，生肉の呈味成分については GC-MS を，ローストした肉の香りについては HS-SPME-GC-MS を用いたメタボローム解析を行い，畜産物の呈味および加熱香気の総合的評価法の開発を目的とした．
【材料および方法】豚肉サンプルは，通常飼育した肥育豚 6 頭を屠畜後，胸最長筋 (ロース部) を 2cm の厚さに切り出し，温度 4°C ，湿度 30%の条件で 7 日および 14 日保存した．また，保存を経ない豚肉サンプルをコントロールとした．呈味成分分析のため，各豚肉サンプルを凍結粉砕し乾燥後，化合物群の抽出を行い，GC-MS を用いて分析した．また，呈味成分分析に用いた同一サンプルから加熱香気成分を得るため，凍結粉砕済み豚肉サンプルの一部をガラスバイアルに封入し，140°C または 180°C に加熱したヒートブロックでバイアルごとローストした．バイアル上層 (HS) の加熱香気成分を SPME ファイバーで捕集後，GC-MS を用いて分析した．各分析で得られた化合物データは多変量解析をはじめとした統計解析に供し，保存に伴う生肉中の呈味成分ならびにローストした肉の香気成分の量的変動パターンを解析した．
【結果】生肉の呈味成分分析の結果，保存に伴いアミノ酸，単糖および核酸が増加することが判明した．これは熟成による筋タンパク質や ATP，グリコーゲンの分解で生じるものだと考えられた．次に，2 段階の温度で加熱調理したロースト肉に対する香気成分分析の結果から，加熱温度の上昇に伴いアルデヒド類は減少するのに対しピラジン類は増加した．この中で，メイラード反応産物であるアルデヒドおよびピラジン化合物は保存に伴い増加傾向にあり，それぞれ前駆物質である生肉中のフェニルアラニン， リジンおよびロイシンと量的相関 ($p < 0.05$) を示すことが明らかとなった．このことから，生肉のメタボローム解析により保存期間の異なる豚肉における呈味成分の変動を捉えることができた．今後，本研究で行った呈味成分および香気成分データの統合解析により，生肉からローストした肉の特徴的な香気成分の変動予測に活用できる可能性を見出した．

pork meat, metabolomic analysis, flavor

講演番号：4B3a05
講演日時：3 月 27 日 09:44～ 1 号館 B3 会場

魚肉加工品メタボローム解析のための前処理方法の検討

Pretreatment of fish paste products for metabolome analysis

○小倉 立己[1,2]、芦野 祐尋[1,2]、門脇 里恵[1]、佐藤 美夢[1]、曽我 朋義[1]、冨田 勝[1]、若山 正隆[1]([1]慶應義塾大学 先端生命科学研究所、[2]公益財団法人 庄内地域産業振興センター)
○Tatsuki Ogura[1,2], Yujin Ashino[1,2], Rie Kadowaki[1], Miyu Sato[1], Tomoyoshi Soga[1], Masaru Tomita[1], Masataka Wakayama[1] ([1]Inst. Adv. Biosci. Keio Univ., [2]Shonai Regional Ind. Promotion Ctr.)

近年の分析装置の機能向上により、微量成分の測定が可能となっている。網羅的解析法であるメタボローム解析では、ノンターゲットで解析を行うことから、サンプルの成分的特徴を捉えることが出来る反面、正確な情報を得られているかの精査は常に必要である。そのため食品のメタボローム解析において、抽出効率に影響を与える前処理の検討は重要な課題である。例えば凍結乾燥後に破砕処理を行い、成分の抽出を行うことは一般的ではあるが、処理工程を経るごとに本来の成分と異なった成分が生成され正しい結果からかけ離れる危険性を伴っている。本研究では魚肉加工品であるカマボコとその原料に対し、前処理による成分抽出効率とそれぞれの加工品の特徴をメタボローム解析によって評価することを目的とした。

原料としてチダイのすり身を用い、これから製造される蒸しおよび揚げカマボコを材料とした。上記 3 種の材料について、メタノールを加えた状態での液相破砕、または凍結乾燥後に気相状態での破砕を行い、上清液および懸濁液について低分子成分を、CE-MS および LC-MS を用いて測定した。測定データから各成分の濃度値を算出し、JMP ソフトウェアを用いて主成分分析（PCA）および階層的クラスター解析（HCA）を行った。

PCA の結果、PC２方向で凍結乾燥の有無による影響が大きく寄与していることが示唆された。ローディングプロットから、凍結乾燥によって Homoserine や Creatine、Fructose、Glutamate といった成分が大きく影響を受けることが明らかとなった。加熱による影響については、凍結乾燥の有無よりも影響が小さいことが示された。HCA の結果から、懸濁液のほうが上清液よりも抽出効率が高いことが示され、加えて懸濁液および凍結乾燥後の抽出法のそれぞれで異なるクラスターとなった。前処理による各成分の抽出効率については、凍結乾燥処理を行った抽出法では、Methylguanidine や Putrescine、Malonate、Cytidine が検出されなくなり、Aspartate、Allantoin、Citrate、Fructose、Maltose の抽出効率が大きく変化していた。一方、液相破砕の懸濁液抽出は高濃度に抽出ができ、また凍結乾燥では検出されなくなった成分が測定できていることが確認された。以上のことから、カマボコのメタボローム解析において、凍結乾燥を用いた抽出法は、本来とは異なる成分の増加、または過剰な抽出につながるものと考えられた。またメタノール等の溶媒で反応を停止させた状態での液相破砕抽出法を実施することで、サンプルの正確な成分情報を基にしたメタボローム解析が可能となると考えられた。

Marine metabolome analysis, Fish paste products, CE-MS

発表責任者：若山　正隆（wakayama@ttck.keio.ac.jp）

講演番号：4B3a06
講演日時：3 月 27 日 10:05～ 1 号館 B3 会場

キャピラリー粘度計と精密密度計を用いた糖アルコールの水和パラメータ h
Analysis of hydration parameter h for sugar alcohol in water using a capillary viscometer and an oscillation density meter
○佐藤 之紀[1]、宮脇 長人[2] ([1]弘前大農生科、[2]石川県大生資環)
○Yukinori Sato[1], Osato Miyawaki[2] ([1]Hirosaki Univ., [2]Ishikawa Pref. Univ.)

【目的】単糖は水中でアノマーにたえず変換しているが，アルドースやケトースのカルボニル基が還元されて糖アルコールとなった場合の水和状態を調べることが単糖をはじめとする糖類の水和機構を解明するために有効と思われる。そこで，代表的な糖アルコールのパラメータ h を糖アルコール水溶液の粘度と密度から求めて，糖アルコールの水和数を比較した。
【方法】キシリトール,D-グルチトール,D-マンニトールの糖アルコール水溶液をそれぞれ 0-0.5 mol/L の濃度になるように調製し，キャノンフェンスケ粘度計と精密密度計（DMA 4500, Anton Paar）を用い，25℃でそれらの水溶液の粘度（η）と密度（ρ）から粘度 B 係数(-)と部分モル体積 V_2 (ml/mol)を求めた。常法にしたがい，粘度 B 係数は糖アルコール水溶液の η と蒸留水の粘度 η_0 の比と質量モル濃度 m の関係式から求め，見かけのモル体積（ϕv）の算出式を c→0 に外挿して V_2 とした。B と V_2 値から，糖アルコールの水和パラメータ h を h (mol/mol) = (1000B/2.5－V_2) /18 の式から求めた。
【結果】水和数を示す水和パラメータ h は，粘度 B 係数と部分モル体積 V_2 の関数である。そこで，まず，粘度 B 係数を調べたところ，D-グルチトールや D-マンニトールの粘度 B 係数はキシリトールの粘度 B 係数よりも大きく，D-グルチトールの粘度 B 係数は D-マンニトールの粘度 B 係数とほぼ同じレベルであった。単糖の環状構造の水和への寄与を推定するために D-キシロースのパラメータ h を求めたところ，D-キシロースの粘度 B 係数はキシリトールの粘度 B 係数よりもやや小さかった。一方，D-グルチトールと D-グルコースの粘度 B 係数はほぼ同程度であったに対し，D-マンニトールの粘度 B 係数は D-マンノースの粘度 B 係数よりもやや高い値を示した。キシリトールの部分モル体積 V_2 はキシロースよりも 5%大きくなり，D-グルチトールの部分モル体積 V_2 は D-グルコースの部分モル体積 V_2 よりも 7%大きかった。D-マンニトールの部分モル体積 V_2 も D-マンノースの部分モル体積 V_2 よりも７％大きくなっていた。これらのことから，糖アルコールの部分モル体積 V_2 は，還元される前の糖の V_2 と比べると大きくなることが共通してみられたが，粘度 B 係数には共通してみられる現象はなかった。最終的に求められたパラメータ h は，キシリトールよりは D-グルチトールや D-マンニトールのほうが大きかった。また，糖が糖アルコールに変換すると，ほぼ同程度かややパラメータ h が大きくなる場合（キシリトール，D-マンニトール）とほぼ同程度かやや低いパラメータ h が算出される場合（D-グルチトール）があり，糖が環状構造をとらなくなると単に水和数の増減のどちらか一方を示すわけではなく，水分子と糖アルコールの位置関係が糖アルコールの種類によって微妙に異なると推定された。

sugar alcohol, hydration, water

発表責任者：佐藤之紀（yukisato@hirosaki-u.ac.jp）

講演番号：4B3a07
講演日時：3 月 27 日 10:16～ 1 号館 B3 会場

自己駆動型クーロメトリーを用いたアスコルビン酸測定法の開発

Development of ascorbic acid measurement method using self-driven coulometry

○三木 功次郎、多田 佳奈枝、石丸 裕士、北村 誠、直江 一光（奈良工業高等専門学校）
○Kojiro MIKI, Kanae TADA, Hirohito ISHIMARU, MAKOTO KITAMURA, Kazumitu NAOE (NIT, Nara College)

【目的】クーロメトリーは，電解反応によって流れた電気量を測定することで目的物質の絶対量を測定できる方法である。さらに，作用極に注入した試料物質と対極に含まれる電池活物質との酸化還元電位の差を駆動力として，電池と同様に自発的に放電電流を発生させ，電解に電源を必要とせずに測定ができる自己駆動型クーロメトリー法が報告されている[1)]。本研究では，この自己駆動型クーロメトリーを用いたアスコルビン酸の測定法の検討を行った。測定には次式のような過酸化水素を生成するアスコルビン酸オキシダーゼ（ASO）を用いた。この反応で生成したH_2O_2量を自己駆動

$$\text{L-Ascorbic acid} + O_2 \xrightarrow{\text{ASO}} \text{L-Dehydroascorbic acid} + H_2O_2$$

型クーロメトリーで測定を行い，アスコルビン酸量を求めた。

【実験】アクリル樹脂性の透析セルを加工して自己駆動型クーロメトリックセルとして用い，作用極および対極にはカーボンフェルト（約5 cm^3）を用い，陽イオン交換膜で両極を隔てた。作用極にはリン酸緩衝液（pH6.0），対極にはNADH，ジアホラーゼ（DI）およびDIの電子受容体として2,3-ジメトキシ-5-メチル-*p*-ベンゾキノン（UQ_0）を含むリン酸緩衝液（pH6.0）を用いた。作用極と対極の間に抵抗を接続して，デジタルボルトメーターを用いて電流を測定して，電気量を求めた。

【結果・考察】対極ではNADHがジアホラーゼにより酸化されて，還元型のUQ_0が生成する。ここで作用極に$K_3[Fe(CN)_6]$を含む溶液を10 μL添加すると，$[Fe(CN)_6]^{3-}$と還元型UQ_0の酸化還元電位の差による自己駆動によって電解電流が流れ，添加した$K_3[Fe(CN)_6]$のモル数によく一致した電気量が得られた。パーオキシダーゼ存在下で，$K_4[Fe(CN)_6]$はH_2O_2により$K_3[Fe(CN)_6]$に酸化されることが知られている[2)]。そこで，$K_4[Fe(CN)_6]$およびパーオキシダーゼを含む溶液にH_2O_2を添加して，30℃で一定時間反応させて$K_3[Fe(CN)_6]$を生成した。反応が終了した溶液をクーロメトリックセルの作用極に10 μL添加したところ，その電解電流より$K_3[Fe(CN)_6]$量を測定することができ，添加したH_2O_2量を求めることができた。ASOをアスコルビン酸水溶液に作用させてH_2O_2を生成させた後，パーオキシダーゼと$K_4[Fe(CN)_6]$を添加して，同様に自己駆動型クーロメトリーでアスコルビン酸濃度を測定することができた。飲料水などのアスコルビン酸測定を試みている。本法は濁度や着色の影響を受けないため，迅速・簡便・安価な測定法として期待できる。

1）内山俊一 編，高精度基準分析法クーロメトリーの基礎と応用，学会出版センター，1998
2）T. Ikeda, T. Shiraishi and M. Senda, *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 3187, 1988

Self driven coulometry, Ascorbic acid, Hydrogen peroxide

発表責任者：三木功次郎（miki@chem.nara-k.ac.jp）

講演番号：4B3a08
講演日時：3 月 27 日 10:27～ 1 号館 B3 会場

錠剤の嚥下性評価のためのヒトを介さない評価手法の検討

Study on non-sensory evaluation method for tablet swallowability

○根岸 辰成[1]、竹井 裕介[2]、森川 琢海[1]、阪田 哲郎[1]、山口 和也[1]、下山 勲[3]([1]株式会社東洋新薬、[2]産業技術総合研究所、[3]東京大学)
○ Tatsunari NEGISHI[1], Yusuke TAKEI[2], Takumi MORIKAWA[1], Tetsuo SAKATA[1], Kazuya YAMAGUCHI[1], Isao SHIMOYAMA[3] ([1]TOYOSHINYAKU Co., Ltd., [2]AIST, [3]Univ. of Tokyo)

【背景・目的】錠剤は健康食品（サプリメント）の市場規模の約 3 割を占める。配合可能な有効成分は多岐に渡るものの、錠剤が大きく、かつ摂取粒数が多い商品もあり、負担軽減の観点から嚥下しやすい錠剤の開発は期待されている。しかしながら、嚥下性の評価はヒトを介したものが主流で、被験者の負担となる。一方、ヒトを介さない評価は非常に少なく、例えば、チューブを用いた応力測定試験などあるが、ヒトを介した評価との比較には至っていない。そこで本研究では、ヒトを介さない錠剤の嚥下性評価系の確立を目的とし、さらにその妥当性を検証するために、従来のヒトを介した評価との比較を実施した。

【方法】本研究において、喉を通過する際の錠剤と喉壁面の摩擦力を疑似的に再現し計測するために、湿らせた錠剤が床材の上を移動する際の動摩擦力を計測可能な実験系を構築した。実験系は、①喉壁面に相当する電動水平移動ステージ上に固定された摩擦面、②錠剤、そして③錠剤を摩擦面に押し付ける力と動摩擦力を計測するためのセンサ部、で構成される。錠剤押しつけ力および動摩擦力を計測するためのセンサとして、錠剤と同スケールの非常に小型な 3 軸力センサ（SP22-FFC15；タッチエンス）を用いた。3 軸力センサを 3D プリンタで作製した治具を介して錠剤に取り付け、錠剤が摩擦面に接触するように静置した。小型センサの上部から一定の力を加え、摩擦面を電動水平移動ステージでスライドさせた時に錠剤に発生するせん断応力（動摩擦力）を測定した。検体として、錠厚、曲率半径、錠径の異なる 4 種の錠剤および処方の異なる錠剤（イージータブ®：表面が濡れるとぬめりが発現する錠剤）の計 5 種の錠剤を用いた。また、せん断応力の測定結果を評価するために、同じ錠剤を用いヒトによる嚥下性の評価（VAS）を実施した。

【結果】セットアップ条件を検討した結果、摩擦面としてレジン製のシート素材を用い、上部から 1 N の力を加える条件において、錠剤のせん断応力を安定的に測定できることが分かった。その条件において、5 種の錠剤のせん断応力測定では、錠厚および曲率半径が小さい錠剤が、せん断応力が小さいことが確認された。また、ヒトによる嚥下性の評価においては錠厚、曲率半径が小さい錠剤およびイージータブ®は、嚥下性に優れた様子が確認できた。せん断応力とヒトによる嚥下性の評価結果を比較したところ、嚥下性に優れる錠厚、曲率半径が小さい錠剤およびイージータブ®は、せん断応力が小さい事が確認された。一方、錠径が小さい錠剤は、嚥下性に優れるものの、せん断応力が大きい結果となった。以上の結果から、錠剤の形状や表面状態を安定的に測定できる本評価系は、未だ改善の余地はあるものの、ヒトを介さない錠剤の嚥下性評価方法として有用であると考えられた。

tablet swallowability, non-sensory evaluation

発表責任者：根岸辰成（negishit@toyoshinyaku.co.jp）

講演番号：4B3a09
講演日時：3 月 27 日 10:38～ 1 号館 B3 会場

ナスコリンエステル非破壊定量法の開発

Development of non-destructive determination method of Choline ester in Eggplant Fruit.

○鈴木 美穂[1]、猪野 亜矢[2]、和具 なおみ[1]、原田 裕斗[1]、野澤 周吾[1]、深谷 茜音[1]、石井 敬子[2]、高橋 昭彦[2]、中村 浩蔵[1]([1]信州大農、[2]高知県農業技術センター)
○Miho SUZUKI[1], Aya INO[2], Naomi WAGU[1], Yuto HARADA[1], Shugo NOZAWA[1], Akane HUKAYA[1], Yukiko ISHII[2], Akihiko TAKAHASHI[2], Kozo NAKAMURA[1] ([1]Shinshu Univ., [2]Kochi Prefectural Agricultural Technology Center)

【背景・目的】近年、我々は、アセチルコリン（ACh）を豊富に含むナスが、高血圧自然発症ラット（SHR）で降圧作用を引き起こすことを明らかにし、高血圧予防・改善を目的とした新たな機能性食品として期待できることを示した[1]。ナスを生鮮機能性食品として実用化するためには、機能性関与成分である ACh 含量を規定しなければならないが、ナス果実中の ACh を迅速に定量する方法は存在しない。そこで近赤外分光法を用いたナス果実中 ACh の非破壊定量法を検討した。
【方法】フルーツセレクター（クボタ計装）を用いて、高知ナス果実（土佐鷹、慎太郎、竜馬）の近赤外スペクトルを取得し、サンプルの一部を切り出して糖度（Brix）測定、LC-MS/MS を用いた従来法での ACh 定量を行った後、近赤外吸光度を用いて糖度検量式を較正した。その後、他の説明変数を適宜組み合わせて ACh 検量式を較正した。
【結果】ナス果実の糖度非破壊測定法検討の結果、相関係数（R）>0.8、標準誤差（SEC）<0.5 を満たす精度の高い検量式を求めることができ、高知ナス糖度非破壊測定が可能となった。糖度と ACh 含量に相関がみられたため、糖度を説明変数に加えた検量式を作成し、やや精度は劣るものの実用検討可能な ACh 検量式が得られた。サンプルの条件設定などによって精度のさらなる向上の可能性があり、実機への応用も期待される。なお、本研究は農研機構生研支援センター「革新的技術開発・緊急 展開事業（うち経営体強化プロジェクト)」の支援を受けて実施した。

[1] Yamaguchi, S., et al, (2019) Food Chemistry, 376-382.

Eggplant, Acetylcholine, Non-destructive determination

発表責任者：中村浩蔵（knakamu@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：4B3a10
講演日時：3 月 27 日 10:49～ 1 号館 B3 会場

ナスコアコレクション中のコリン化合物含有量調査
Acetylcholine and choline in core collection of eggplant
○深谷 茜音[1]、宮武 宏治[2]、齊藤 猛雄[2]、和具 なおみ[1]、原田 裕斗[1]、中村 浩蔵[1]([1]信州大学、[2]農研機構 野菜花き研究部門)
○Akane FUKAYA[1], Koji MIYATAKE[2], Takeo SAITO[2], Naomi WAGU[1], Yuto HARADA[1], Kozo NAKAMURA[1] ([1]Shinshu Univ., [2]Institute of Vegetable and Floriculture Science (NIVFS), National Agriculture and Food Research Organization (NARO))

【目的】神経伝達物質であるアセチルコリン(ACh)は、非神経細胞や植物にも広く存在する。我々は、生鮮農産物（野菜・果実）19 種の ACh 含量調査で、ナスが他の生鮮農産物の 1000 倍以上の ACh を含むことを発見した。また,同じナス科のトマトの ACh 含量は非常に低く、ACh はナス特有の成分だと示唆された。そこで、本研究ではナスの保存遺伝子資源の中から選定した代表的な品種・系統を持つナスコアコレクション（完熟果）中の ACh を定量し、ナス品種での ACh 分布とレベルを調査した。
【方法】ACh 含量は、ナスサンプルを凍結乾燥及び粉砕、振盪抽出、陽イオン交換樹脂による固相抽出で精製後、LC-MS/MS を用いた標準添加法で得られた測定値を内部標準回収率で補正し、新鮮重量 100 g 当たり含量（100 g F.W）で示した。コリン（Ch）も同様にして定量した。サンプルは農研機構野菜花き研究部門から提供されたナスコアコレクション 100 品種・系統の各 2 株に由来する独立した 3 つの果実を用い、3 果実の平均値を 1 品種の定量値とした。
【結果】全てのナスサンプル中に ACh が存在することが確認された。ACh 含量は、最高値が 48.9(mg/100 g F.W)、最小値が 10.1(mg/100 g F.W)であった。また、一般的なナスの凍結乾燥収率は約 7%だが、ナスコアコレクションでは 7%～20%であり、 ACh 含量と凍結乾燥収率の相関係数は正の相関（0.633）がみられ、Ch 含量と ACh 含量にも正の相関（0.530）がみられた。ナスコアコレクションの原産地における ACh 含量は、東南アジア、南アジア、東アジア地域で ACh 高含有ナスが多かった。本試験では、完熟果を用いたが、市場に出回る適熟果と比較し、ACh 含量が高い傾向にあった。以上の結果から、ナス果実中の水分が少なく Ch 含量が高く、アジア地域由来の完熟ナスで、ACh 含有が高いと推測された。なお、本研究は農研機構生研支援センター「革新的技術開発・緊急 展開事業（うち経営体強化プロジェクト)」の支援を受けて実施した。

Eggplant, Acetylcholine, Core collection of eggplant

発表責任者：中村浩蔵（knakamu@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：4B3a11
講演日時：3 月 27 日 11:10～ 1 号館 B3 会場

国産各種ブランド米の食味評価方法の開発

Development of palatability evaluation method for various domestic high-quality rice cultivars

○大坪 研一、朝妻 聖、中村 澄子（新潟薬大）
○Kenichi Ohtsubo, Satoru Asazuma, Sumiko Nakamura (Niigata University of Pharmacy and Applied Life Sciences)

【目的】全国で良食味米の開発が進み、分析評価技術の進歩と社会的ニーズに応じた新しい米の食味評価方法の開発が必要とされている。本研究においては、全国の各種の市販ブランド米を対象に、食味の物理化学的評価方法の改善を図り、それらの新規理化学的測定に基づく、各種のブランド米の客観的かつ普遍的な食味特性評価方法を開発することを目的とした。
【方法】平成２９年産のコシヒカリ（新潟県魚沼産等)、新之助、ゆめぴりか、ななつぼし、つや姫、彩のきずな、みずかがみ、ハナエチゼン、夢しずく、ヒノヒカリ、さがびより、森のくまさん等、全国の各種市販ブランド米を試料とした。（１）ヨード呈色多波長走査分析[1)]、（２）RVA による糊化特性試験[2)]を行い、当研究室の中村らの開発した下記の既報に従って試料米の澱粉特性を評価した。また、（３）炊飯後の澱粉の老化による米飯の物性変化についても、炊飯後 2 時間および 16 時間で測定したテンシプレッサー（低圧縮・高圧縮試験法）による測定結果をもとに検討した。（４）（株）サタケ製の穀粒判別器および（株）ケット科学研究所製の成分分析計 AN-820 を用いて、外観品質と成分に関する分析・評価も併用した。（５）タンパク質の食味への影響を調べるため、SDS-PAGE による総タンパク質量及びプロラミンの定量分析を行った。（６）米飯の外観光沢について、東洋ライス（株）製の味度メーターによる味度を測定した。最後に、（７）食味の官能検査を行った。（８）澱粉特性測定値の多変量解析により、米飯物性の推定式の開発に取り組んだ。
【結果】（１）および（２）より、各試料米のアミロース含量、難消化性澱粉含量、アミロペクチン中長鎖含量が推定され、彩のきずな、ゆめぴりか等の老化しにくい特性が示された。（３）により、ななつぼし、魚沼産コシヒカリ等は、炊飯後 16 時間後においても米飯物性が硬化しにくく、耐老化性が推定された。（４）により、魚沼コシヒカリ等のタンパク質含量が低いことが示された。（５）により、魚沼コシヒカリは総タンパク質及びプロラミンが少なく、良食味性が推定された。（６）により、つや姫、魚沼コシヒカリ、さがびより等の米飯光沢の優れていることが示された。（７）により、各種試料米の食味特性を官能検査で評価した。（８）ヨード呈色多波長走査分析[1)]の結果および各種理化学測定結果に基づいて、米飯の硬さや粘りなどの物性を推定できる可能性が示された。
本研究の一部は、科研費 A(17H01491)および科研費 C(17K00829)の支援を受けて実施された。
１）Nakamura,S et al., Biosci.Biotechnol.Biochem.,79,443-455,2015.
２）Nakamura,S et al., Biosci.Biotechnol.Biochem.,80,329-340,2016.

rice, palatability, physico-chemical measurement

発表責任者：大坪研一（ohtsubok@nupals.ac.jp）

講演番号：4B3a12
講演日時：3 月 27 日 11:21～ 1 号館 B3 会場

良食味米飯の咀嚼筋筋電図における品種と摂食条件の影響

Effects of cultivars of cooked rice and the eating conditions on masticatory electromyography

○神山 かおる（農研機構食品研究部門）
○Kaoru KOHYAMA (Food Res. Inst., NARO)

【目的】高齢社会において、喫食者の咀嚼機能に配慮してテクスチャーを調整した食品の必要性が高まっている。ところがテクスチャーは摂食中に大きく変化するため、食前の物性の機器分析だけでは、評価が不十分である。米飯は、日本人の主食として毎日大量に食べられており、もっとも習慣的な咀嚼挙動が現れやすく、米飯の咀嚼性が食事全体の咀嚼性に及ぼす影響もあると考えられる。そこで、咀嚼筋筋電図を用いて、日本人に好まれる米飯の咀嚼特性を数値化することを目的とする。筋電図等の生理的な方法を用いて人の咀嚼挙動を解析する際には、食べ方を指定する場合が少なくない。本研究では、発表者が従来行ってきた一口に入れる食品量（以下、一口量）を平均的なものに固定する場合と、全く自由に摂食させる場合との比較を行う。
【方法】人試験については、農研機構食品研究部門の人対象研究倫理審査委員会の承認を受けた。被験者は米飯官能評価の経験者を年齢と性別を考慮して選定し、インフォームドコンセントを得た。米飯試料は、「コシヒカリ」ほか数種類の良食味水稲品種から、標準的な炊飯法で調製し、炊き上がり後 4 時間以内に筋電位測定を行った。被験者の左右の咬筋および舌骨上筋群に表面電極（バイオパック製 EL503）を装着し、バイオパック製 MP150 システムと Acq*Knowledge*® (Ver.4.4) を用いて筋電位を測定した。米飯試験の前に、チューインガム（ロッテ製キシリトールガム）を咀嚼側を指定して咀嚼させるとともに、少量の水の嚥下を行わせ、各被験者の咀嚼・嚥下のパターンを得た。実験者がスプーンで一口量 9g を与える場合と、茶碗と箸を渡された被験者が自ら自由に一口量を取って摂食する条件とで行った。米飯試料は、被験者および計測者には試料名を伏せランダム順に供試し、被験者には通常通りの咀嚼を行わせた。筋電図から、嚥下回数、咀嚼回数、咀嚼時間、筋活動量（積分筋電位）、一咀嚼動作当たりの平均筋活動量、最大振幅、筋活動時間、咀嚼周期、これらの咀嚼全体あるいは第一嚥下までの平均値、さらに咀嚼初期における値など 50 余りの変数を求め比較した。
【結果および考察】自由摂取した米飯の一口量は個人で平均値が 4.9g から 22.3g までと大きく異なったが、同一個人内で米飯試料による有意な差は認められなかった。筋電図から得た変数は、一口量を 9g に固定した場合自由にした場合とも、個人差は数倍程度の差があるものがほとんどであったが、同一被験者内での試料差は小さかった。自由一口量が 9g より少ない被験者は自由な咀嚼をした方が一口当たりの咀嚼の量は少なく、9g より多い被験者は逆となった。良食味品種の米飯は食べ慣れているため、各被験者の習慣的な咀嚼挙動があり、試料によっては変わらないことが示唆された。

texture, cooked rice, mastication

発表責任者：神山かおる（kaoruk@affrc.go.jp）

講演番号：4B3a13
講演日時：3 月 27 日 11:32～ 1 号館 B3 会場

米菓咀嚼中の食塊物性変化と口どけ感の経時的官能評価の関係

Temporal evaluations of bolus properties and melt-in-mouth sensory characteristics during mastication of rice crackers

○細井 友加里[1]、山谷 健太[2]、竹井 亮[2]、鷲尾 英明[2]、勝野 那嘉子[3]、西津 貴久[3]([1]岐阜大院、[2]亀田製菓株式会社、[3]岐阜大)
○ Yukari HOSOI[1], Kenta YAMAYA[2], Ryo TAKEI[2], Hideaki WASHIO[2], Nakako KATSUNO[3], Takahisa NISHIZU[3] ([1]Grad. Sch. of Natl. Sci.&Tech, Gifu Univ., [2]KAMEDA SEIKA CO., LTD., [3]Gifu Univ.)

【目的】食品の口どけ感はおいしさに関わる重要な因子の一つである. チョコレートのような油脂性食品では油脂含量や融点が口どけ感に関与するという報告がある. 一方, 米菓の口どけ感に関する報告はほとんどなく, その支配因子は未だ明らかになっていない. 当研究室のこれまでの研究から, 咀嚼初期において唾液が吸収され, 食塊中の固形粒子の粒径が減少し, 酵素による消化が進行し食塊粘度が低下することを明らかにした [1)]. そのため咀嚼中に米菓の口どけ感の官能特性も変化すると考えられる. 本研究では米菓咀嚼中の食塊物性と官能特性の関係について考察することを目的として, 米菓の口どけ感の経時的官能評価を行い, 咀嚼中の官能特性と食塊物性の経時的変化の関係について検討を行った.

【方法】試料はうるち米, もち米を主原料とした米菓, 澱粉を混合した米菓から 5 品種を選択し, 口どけ感の評価を既報の順位法 [2)]により行った. 官能評価は, 米菓を口に入れ, 咀嚼を開始したときから飲み込むまでの「食塊を噛み砕く」「食塊がまとまる」「食塊が消えてなくなる」という感覚の強度変化を Temporal Dominance of Sensations(TDS)法（使用ソフト：Magic sense）によって測定した. 得られた結果と既報 [1)]の食塊物性値を主成分分析に供した.（使用ソフト：R）.

【結果】TDS の結果,「食塊を噛み砕く」「食塊がまとまる」「食塊が消えてなくなる」の 3 つの属性は, 口どけ感の良い米菓ほど, 支配率(dominance rate)がピークになるまでの時間が短くなった. TDS の評価パラメーターと食塊物性値を主成分分析した結果, 因子負荷量から第 1 主成分（PC1）は「食塊が消えてなくなる感覚と食塊粒度」, 第 2 主成分（PC2）は「食塊のまとまり」を表していると推定された. 得点をグラフにプロットするとすべての米菓試料が咀嚼の進行に伴って第三, 第二, 第一, 第四象限の順に移動した. 咀嚼時間 5 秒ではいずれの試料も第三象限に位置し, 咀嚼時間 30 秒では口どけ感の良い米菓は第四象限に移動し, 口どけ感の悪い米菓は第一象限に留まった. 以上の結果から, 米菓の食塊は咀嚼初期において食塊の破砕とともに唾液酵素による消化が進み, 口どけ感の良い米菓ほど, 唾液を吸収し食塊が細かく破砕されてから, 食塊が消えてなくなるまでの時間が短くなることが明らかとなった.

1）細井友加里ら, Proceedings of 32nd EFFoST International Conference
2）細井友加里ら, 日本食品科学工学会誌, 65（12）, 573-582, 2018.

Rice cracker, TDS, Bolus properties

講演番号：4B3a14
講演日時：3 月 27 日 11:43～ 1 号館 B3 会場

脱アセチル化と加熱操作がコンニャクの冷凍劣化に及ぼす影響

Effects of deacetylation and heating processes on freeze-thaw deterioration of konjac gel

○宝門 祐樹、勝野 那嘉子、西津 貴久 (岐阜大学大学院)
○YUKI HOMON, NAKAKO KATSUNO, TAKAHISA NISHIZU (Gifu University)

【目的】コンニャクは，冷解凍により組織がスポンジ状となり食感が著しく低下することが知られている。これまでの当研究室の研究から，脱アセチル化度（DD）と，アルカリ溶液のカチオン種が冷凍障害の程度に影響を及ぼすことを明らかにした[1)]。本研究では，DD と加熱操作の違いが冷解凍後の物性及び構造特性変化に及ぼす影響について検討した。

【方法】アルコール精製コンニャクグルコマンナン(KGM)(清水化学製，プロポール A，平均分子量 1.36×10^6）5 g に対して水 175 g 加え，5 分間撹拌・脱泡して室温で 1 時間膨潤させることでゾルを作製した。ゾルに $Ca(OH)_2$ 水溶液を添加し DD を 5 段階に調製し，よく混捏したものを整形して加熱した。加熱条件は以下の 2 つの方法を用いた。
①加熱温度の影響　未加熱(25 ℃)及び加熱中にコンニャクの中心部が 50 ℃，70 ℃，90 ℃，99 ℃に達した時に取り出したものを試料として用いた。
②加熱時間の影響　90 ℃の湯浴中で 15 min，60 min，180 min 加熱したものを試料として用いた。
冷凍試料は－20 ℃で 24 時間冷凍後，水道水中に 1 時間，室温に 1 時間放置して解凍した。冷解凍前後の物性変化は球状プランジャーの押し込みによる破断試験，離水率及び官能評価により評価し，構造特性変化はフーリエ変換赤外分光光度計分析，X 線回折法(Cu-Kα線)，走査型電子顕微鏡(SEM)，位相差顕微鏡を用いて評価した。

【結果と考察】加熱温度が高い試料（冷凍前）ほど，いずれの DD でも破断強度は大きくなった。SEM と位相差顕微鏡画像より加熱温度が高い試料ほど KGM のネットワーク構造がより明瞭になったことから，加熱によって KGM のネットワーク構造が強固になり，破断が生じたと考えられる。解凍後の試料では，未加熱の試料の破断強度と離水率は加熱後と比較して有意に低かった。
加熱時間が長い試料（冷凍前）ほど，いずれの DD でも破断強度は増加し，また位相差顕微鏡画像から KGM のネットワーク構造がより明瞭になった。解凍後の試料では，加熱時間が長くなるほど破断強度及び離水率が増加した。
以上の結果から，加熱温度と時間の制御は冷凍障害の抑制に有効であることが明らかとなった。

1）宝門祐樹ら,32nd EFFoST International Conference, 2018

konjac, freeze-thaw, heating

講演番号：4B3a15
講演日時：3 月 27 日 11:54～ 1 号館 B3 会場

ゴボウの加熱による軟化し難さとペクチンの関係
Relationships between Resistance of Thermal Softening and Pectin in Burdock
○井上 竜一（（公財）東洋食品研究所）
○Ryuichi INOUE (Toyo inst. food technol.)

【目的】ゴボウなどの野菜は 120℃程度の高温で長時間加熱を行っても一定以上軟化しないことから、硬さに関与する耐熱性成分が存在すると考えられる。これまでに、加熱しても軟化し難いゴボウにおいて、高温長時間加熱後の硬さにアラビナンが関与することを報告した。今回、ゴボウにおける側鎖のアラビナン、ガラクタンを含むペクチンと高温長時間加熱後の硬さの関係を調べ、軟化し難さについて一定の知見を得たため報告する。
【方法】ゴボウは、5 mm 厚で斜め切りにしたものを 100℃-5 分間、121℃-33 分間の加熱を順次行った後、冷凍して使用した。ゴボウ中の各種多糖の分解は、精製酵素を含む 50 mM の酢酸緩衝液（pH4.2）100 ml に冷凍ゴボウ 20 g を入れて減圧処理（凍結含浸法）後、40℃-24 時間の反応によって行った。酵素は、Megazyme 社製の endo-1,4-β-Galactanase（GNase）、α-L-arabinofuranosidase（AFase）、endo-Polygalacturonanase M2（PGase）の 3 種を用い、単独使用時は 200 U、併用時は各 200 U ずつ添加した。硬さは、小型卓上試験器 Ez test（島津製作所製）を用い、φ20 mm のプランジャーで速度 600 mm/min、歪率 60%まで圧縮した時の最大荷重として求めた。ペクチンは定法に従い、アルコール不溶性固形物を調製後、水、ヘキサメタリン酸、塩酸、水酸化カリウムを用いて分画した。多糖類中の糖組成は、トリフルオロ酢酸もしくは Pectinex Ultra（novozyme 製）による単糖化処理後、ABEE 誘導体化を行い HPLC で分析した。
【結果】GNase、AFase 処理による軟化率はそれぞれ 40%、35%であり、GNase と AFase の併用処理では 63%となった。分画した多糖の糖組成は、ガラクトース（Gal）、アラビノース（Ara）含量の減少以外に、ガラクツロン酸（GalA）が塩酸溶性画分で減少し、水溶性画分で増加した。ペクチンは側鎖のアラビナン、ガラクタンを介してセルロース微繊維を架橋すると言われていることから、側鎖の分解によってセルロース微繊維との結合が外れ、ペクチンが水溶化したと考えられた。
PGase 単独処理に比べ、GNase、AFase の 3 種併用処理では各画分の GalA、Gal、Ara が減少したにも拘わらず、単独および併用処理で軟化率にほぼ差は見られなかった（それぞれ 89%、91%）。主鎖が分解された段階でセルロース微繊維の架橋が外れたため、さらに側鎖を分解しても軟化率が変化しなかったと考えられる。また、塩酸溶性画分の GalA 量と硬さに R^2=0.95 と高い相関が見られた。
以上の結果を踏まえ、ゴボウの加熱による軟化し難さにおいて、セルロース微繊維を架橋するペクチンが重要な役割を担うことが予想された。

pectin, softening, texture

発表責任者：井上竜一（ryuuichi_inoue@shokuken.or.jp）

講演番号：4B4a02
講演日時：3 月 27 日 09:11～ 1 号館 B4 会場

破骨細胞および骨芽細胞の分化に及ぼす PQQ およびキノン化合物の影響

Effects of PQQ and quinone compounds on osteoclast and osteoblast differentiations

○小林 未侑[1]、外山 博英[2]、橘 信二郎[2] ([1]鹿大院・連合農、[2]琉球大・農)
○Miyu KOBAYASHI[1], Hirohide TOYAMA[2], Shinjiro TACHIBANA[2] ([1]Kagoshima Univ., Grad Sch Agric Sci, [2]Univ. Ryukyus, Fac Agric)

【目的】微生物によって作られるピロロキノリンキノン（PQQ）は、酸化還元酵素の補酵素として働き、ビタミン B 群に類似の生理活性を有する。また、PQQ は、野菜や飲料、発酵食品などの身近な食品にも含まれ、経口摂取後は速やかに腸管吸収され、そのほとんどが腎臓を経由して尿中に排出される。そのため、血中および各臓器における PQQ 濃度は、数十 nM と極めて低く保たれているが、ヒトの母乳中からは 140～180 ng/mL（0.4～0.5 μM）もの PQQ が報告されている。我々は、母乳中の PQQ 蓄積が新生児の成長・骨格形成に関与すると仮定した。さらに、PQQ が母乳中に多く蓄積される現象は、水溶性の酸化型で血中に存在する PQQ が、何らかの代謝により蓄積性の形態に変化している可能性があると考えた。そこで本研究では、PQQ またはキノン類縁化合物のトリメチル化体 PQQ（PQQ-TME）、コエンザイム Q_{10}（CoQ_{10}）による破骨細胞分化と骨芽細胞分化に及ぼす影響を明らかにすることを目的とする。
【方法】骨代謝における骨吸収モデルとして、マウス腹膜マクロファージ様細胞（RAW264.7）、骨形成モデルとしてマウス骨芽細胞前駆細胞（MC3T3-E1）をそれぞれ用いた。RAW264.7 細胞は 10% ウシ胎仔血清（FBS）および 1% ペニシリン-ストレプトマイシン（PCG-SM）を含む DMEM 培地を生育培地として用い、37℃、5% CO_2 条件下で培養した。破骨細胞の分化誘導は、生育培地に分化誘導因子である RANKL と M-CSF を添加して培養した。その後、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ（TRACP）活性測定により、破骨細胞の分化率を算出した。一方、MC3T3-E1 細胞は 10% FBS および 1% PCG-SM を含む αMEM 培地を生育培地に用い、37℃、5% CO_2 条件下で培養した。骨芽細胞への分化は、β-グリセロリン酸と L-アスコルビン酸リン酸塩を生育培地に添加して行った。Alizarin red S 石灰化染色とアルカリホスファターゼ（ALP）活性測定によって、骨基質の石灰化および骨芽細胞分化を評価した。PQQ･2Na の溶媒に滅菌超純水を用い、PQQ-TME と CoQ_{10} は 1% DMSO（終濃度 0.1%以下）を添加した PBS を溶媒に用いた。いずれも終濃度 10^{-7}、10^{-5}、10^{-3} mM に調整した培地を使用した。
【結果】PQQ･2Na、PQQ-TME および CoQ_{10} の存在は RAW264.7TRACP 活性を阻害し、破骨細胞分化を抑制した。MC3T3-E1 に対しては、PQQ･2Na および PQQ-TME は石灰化のリン酸供給に働く ALP 活性を増大させたが、石灰化は抑制した。その一方で、CoQ_{10} は ALP 活性の増大なしに石灰化を促進した。これらの結果は、PQQ･2Na、PQQ-TME および CoQ_{10} が骨吸収を抑制し、骨芽細胞の分化初期応答を刺激することを示唆した。

PQQ, Quinone, Bone metabolism

講演番号：4B4a03
講演日時：3 月 27 日 09:22～ 1 号館 B4 会場

ヒト小腸由来コンジュガーゼ組換え酵素の調製と葉酸定量への応用

Preparation of recombinant human folate conjugate and its application for food folate assay

○小関 喬平[1]、小川 雄司[2]、美藤 友博[1,2]、薮田 行哲[1,2]、渡邊 文雄[1,2] ([1]鳥取大院持続性社会創生科学研究科、[2]鳥取大農)
○ Kyohei KOSEKI[1], Yuzi OGAWA[2], Tomohiro BITO[1,2], Yukinori YABUTA[1,2], Fumio WATANABE[1,2] ([1]Tottori Univ. Graduate school of Sustainability Science, [2]Tottori Univ. of Agric.)

【背景と目的】
葉酸は B 群ビタミンの 1 種で DNA 合成や細胞分裂に必須のビタミンである。食品中の葉酸の形態は、プテロイン酸にグルタミン酸が多数結合したプテロイルポリグルタミン酸($PteGlu_n$)として存在している。食品中の葉酸の定量では、*Lactobacilus rhamnosus* ATCC27773 を用いた微生物学的定量法が用いられており、γ-グルタミルヒドロラーゼ(いわゆるコンジュガーゼ)で前処理することで、$PteGlu_n$ はプテロイルモノグルタミン酸（$PteGlu_1$）やプテロイルジグルタミン酸（$PteGlu_2$）へと変換する必要がある。現在、ブタ腎臓アセトン粉末、ニワトリ膵臓凍結乾燥粉末、ラット血清が葉酸定量用のコンジュガーゼとして用いられている。これら試薬に含まれるコンジュガーゼは動物種や臓器種によって比活性や酵素化学的性質が異なることや、葉酸定量時に内在性の葉酸を取り除く必要があるといった問題がある。そこで本研究ではヒト小腸由来組換えコンジュガーゼの調製を行い、使用実績のある３種のコンジュガーゼと酵素化学的性質や葉酸定量に及ぼす影響を比較検討した。
【方法と結果】
ヒト小腸由来組換えコンジュガーゼは、大腸菌にヒト小腸細胞のリソソーム由来のコンジュガーゼを導入し TARON®（cobalt）レジンを用いて生成した。市販のブタ腎臓アセトン粉末、トリ膵臓凍結乾燥粉末及びラット血清は透析により内在性の葉酸を除去した後、コンジュガーゼ粗酵素として使用した。グルタミン酸が 7 個結合した $PteGlu_7$ と各酵素を 37 ℃で酵素反応させ、生成物である $PteGlu_1$ 量または $PteGlu_2$ 量を高速液体クロマトグラフィーで定量することで酵素活性を求めた。
【考察】
$PteGlu_7$ を基質として酵素活性を測定した結果、ヒト小腸由来組換え酵素、ラット血清、ブタ腎臓のコンジュガーゼの最終生成物は $PteGlu_1$ であったが、ニワトリ膵臓のコンジュガーゼは $PteGlu_2$ であった。ヒト小腸由来組換え酵素とブタ腎臓コンジュガーゼはエキソペプチダーゼ活性を示し、ラット血清とニワトリ膵臓のコンジュガーゼはエンドペプチダーゼ活性を示した。ヒト小腸由来組換え酵素は内在性の葉酸を取り除く必要がなく、非常に高い比活性を有することから微生物学定量法での使用に適していることが示唆された。

Folate conjugase, γ-Glutamyl hydrolase, Folate assay

講演番号：4B4a04
講演日時：3 月 27 日 09:33～ 1 号館 B4 会場

選択的沈殿法を用いた大豆全粒粉末からの DDMP 型大豆サポニンの単離ならびに亜鉛トランスポーターZIP4 誘導活性の検証

A solubility-based separation of DDMP type soyasaponins from whole soybean flour

○高橋 正和[1]、金田 啓太郎[1]、髙田 佳尭[1]、神戸 大朋[2]、片野 肇[1] ([1]福井県大生物資源、[2]京大院生命)
○Masakazu TAKAHASHI[1], Keitarou KANEDA[1], Yoshiaki TAKATA[1], Taiho KAMBE[2], Hajime KATANO[1] ([1]Fukui Pref. Univ., [2]Kyoto Univ.)

【目的】亜鉛はタンパク質構成因子や酵素の補因子，細胞内シグナル因子など多彩な役割を持つ必須金属元素である．これまでに我々は，亜鉛の腸管取込に必須なトランスポーターZIP4 のタンパク質誘導活性を示す化合物として，大豆サポニン分子を粗精製サポニン標品（サポニン含量：約 50%）から単離・同定した（Biochem. J., 472, 183-193 (2015)）．大豆サポニンには主要分子種でも多数知られ，A・B・DDMP 型などに分類されている．中でも B 型は比較的高い ZIP4 誘導活性を示したことから，我々は水-有機混合溶媒への溶解度の違いを利用し，大豆粗精製サポニン標品（サポニン含量：約 50%）から Bb を迅速・高収率に精製する方法を構築してきた（Anal. Sci., 31, 85-89 (2015)）．さらに我々は，ホウ砂を利用することで分子内に cis 型 diol 構造を持つ大豆サポニンを選択的に単離できる溶解度分別法を開発し，大豆全粒粉末（サポニン含量：～0.4%）から活性大豆サポニンを得る迅速精製法を開発することに成功した．本研究では，このホウ砂を利用した選択的沈殿法を利用して，大豆全粒粉末から他の大豆サポニン分子の単離を試みた．
【方法】精製度の確認は，ODS カラムを用いた逆相 HPLC により行った．また ZIP4 誘導活性については，Hepa 細胞培養系を利用し，ZIP4 特異抗体を用いた Western blotting 法によって確認した．
【結果】大豆全粒粉末からメタノール抽出物を調製（画分 1）して逆相 HPLC 解析に供し，大豆サポニン Bb や Bc の他，極性度の低いピークを多数確認した．大豆サポニン Bb や Bc は水に難溶だが，ホウ砂水溶液にはホウ酸エステルを生成して溶解し，さらに酸性溶液にするとエステル加水分解により再沈殿する．この性質を利用して画分 1 を 20 mM ホウ砂水溶液と混合し，その遠心上清に塩酸を加え，生じた沈殿を遠心回収した（画分 2）．画分 2 を逆相 HPLC で解析したところ，主要ピークとして大豆サポニン Bb, Bc の他, 大きな 2 本のピークを確認した. その実体は LC-MS 分析から DDMP 型ソヤサポニン βg・βa と推定された．これまでに DDMP 型に関する生理活性については知見が少ないことから，preparative 逆相 HPLC にてこれらの精製を試みた．その過程で，単離フラクション中の DDMP 型ソヤサポニン βg・βa は低温保存中に加水分解されやすい傾向が観察された．これは酸性展開溶媒の影響と考えられたため，分取後迅速に凍結乾燥に供することとした．最終的に Bb, Bc と共に数 mg の DDMP 型ソヤサポニン βg・βa 粉末を得ることに成功した．これら精製標品について，Hepa 細胞を用いて ZIP4 発現増強活性を検討したところ，Bb と Bc にはほぼ同等の ZIP4 発現増強活性が確認された．2 種の DDMP 型大豆サポニンについては，現在検討中である．

soybean, saponin, purification

発表責任者：高橋正和（mastak@fpu.ac.jp）

講演番号：4B4a05
講演日時：3 月 27 日 09:44～ 1 号館 B4 会場

鉄欠乏が肝臓中銅制御分子群の発現に及ぼす影響
The effects of iron deficiency on regulating transport of copper ions associated molecules in the liver
○塙 信彰、井上 博文、勝間田（坪井） 理恵、高橋 信之、上原 万里子（東農大院農）
○Nobuaki HANAWA, Hirofumi INOUE, Rie KATSUMATA - TSUBOI, Nobuyuki TAKAHASHI, Mariko UEHARA (Tokyo Univ. of Agric.)

【背景/目的】鉄は全身の組織の正常な機能維持に関与する必須微量元素であるが、飽食の時代を迎えている我が国においても、鉄の摂取量は十分でない。鉄欠乏状態に陥った場合、貧血や心肥大以外にも様々な代謝異常を引き起こすことが報告されており、我々の研究グループにおいても、実験動物を用いた結果から、肝臓及び血中過酸化脂質量が増加することを見出している。加えて、正常群に対し鉄欠乏群の肝臓では銅が蓄積することを明らかにしており、その結果、遊離銅が増加してヒドロキシラジカルを生成し、生体膜の脂質過酸化が亢進されていることを推測しているが、鉄欠乏時の肝臓への銅蓄積機構については未だ明らかではない。これまでに細胞内の銅恒常性に関わっている分子として、取込みを制御する copper transporter 1 (CTR1), 銅輸送担体である anti-oxidant 1 (ATOX1), 細胞外排出に関わる ATP7B, 銅を細胞外に分泌する ceruloplasmin (Cp)が報告されている。本研究では、鉄欠乏時に肝臓へ銅が蓄積するメカニズムについて明らかにすることを目的とし、実験１として段階的な鉄欠乏状態のモデル動物、実験２としてラット肝臓由来細胞株 FAO 細胞と鉄キレート剤 deferoxamine (DFO)を用い、鉄欠乏状態が肝臓中銅制御分子群に与える影響について検討を行った。【方法/結果】4 週齢 Wistar 系雄性ラットを用い、鉄正常食(CTL)群と鉄欠乏食(ID)群の２群に分け、1-3 週間の経時的な飼育観察を行った。CTL 群に比し、血中 hemoglobin 値は 1 週目以降 ID 群で有意に減少、一方で心臓重量は 1 週目以降 ID 群で有意に増加した。肝臓中鉄濃度は CTL 群に比し、2 週目から ID 群で有意に減少したが、銅濃度は 2 週目から ID 群で有意に増加した。肝臓中銅制御分子群の mRNA 発現量は、CTL 群に比し、*CTR1, Cp* は 1 週目のみ ID 群で有意に増加し、*ATP7B* は 3 週目で有意に減少した。*ATOX1* についてはいずれの週においても CTL 群と ID 群間で有意差が見られなかった。血中 Cp 濃度は 3 週目のみで CTL 群に比し ID 群で有意に減少した。続いて、FAO 細胞に DFO 処理を行うことで鉄欠乏状態を作製し、鉄が直接的に銅制御分子群を変動させているのかを明らかにするために、DFO 単独および $CuSO_4$ との併用添加処理を行った。その結果、DFO と $CuSO_4$ 併用処理は $CuSO_4$ 単独処理に対して、有意に細胞内銅濃度を上昇させた。銅制御分子群の mRNA 発現は、DFO 単独処理によって有意に低下した一方で、$CuSO_4$ 単独処理の濃度依存的な影響は認められなかった。【結論】以上の結果より、鉄欠乏による銅の蓄積については、早期の *CTR1* 発現の上昇と共に銅の取り込みが増大し、その後、*ATP7B* 発現が低下することにより、細胞外への排出が障害されることで引き起こされる可能性が示唆された。また銅制御分子の発現制御は鉄依存的である可能性が示唆された。

iron deficiency, copper metabolism, liver

講演番号：4B4a06
講演日時：3 月 27 日 10:05～ 1 号館 B4 会場

乾燥粉末化によるコマツナのルテイン含量変化

Change in lutein content of Komatsuna (*Brassica rapa* var. *perviridis*) following hot-air drying and grinding

○石本 太郎[1]、馬場 隆[2]、野田 誠司[1] ([1]東京都立食技セ、[2]東京都農総研)
○Taro ISHIMOTO[1], Takashi BABA[2], Seiji NODA[1] ([1]Tokyo Metro. Food Tech. Res. Ctr., [2]Tokyo Metro. Agri. Forest. Res. Ctr.)

【背景】 コマツナ（*Brassica rapa* var. *perviridis*）は、クセが無く食べやすい風味と適度な歯ごたえが人気の東京の特産野菜である。近年では生鮮野菜としてのみならず、飲料、麺、菓子など加工食品の原料としても利用されている。また、コマツナが含有するカロテノイドの一種であるルテインは、目の疾患である加齢黄斑変性を予防する物質として注目されている。我々はコマツナのルテイン含量や加工時の挙動の把握に取り組んでおり、2018 年度の農芸化学会では、コマツナ生葉の品種・葉長・部位等によるルテイン含量の差異と SPAD 値（葉緑素量）との関係について報告を行った。本大会では、乾燥粉末化によるルテイン含量の変化について報告する。
【方法】 江戸川区の試験圃場で栽培したコマツナ品種「いなむら」を原料として、ブランチングの有無・乾燥温度などの条件を変えて乾燥粉末を試作し、水分・色調・カロテノイド含量を測定した。対照区とした粉末化条件は以下のとおりである。すなわち、生葉を 5 cm 程度にカットして沸騰水中で 2 分間ブランチングし、庫内温度を 60℃に設定した通風乾燥器で質量変化が平衡に達するまで乾燥させた後に、スクリーン目開き 250 μm のローターミルで粉砕した。乾燥粉末のカロテノイドは、HEAT 混液（ヘキサン:エタノール:アセトン:トルエン=10:7:6:7）で抽出し、逆相 HPLC により測定した。また、食品原料等の用途で市販されているコマツナ乾燥粉末 5 品を入手し、同様にカロテノイド含量を測定してラボ試作品との比較を行った。
【結果・考察】 条件を変えてコマツナ乾燥粉末を試作した結果、ブランチング工程を省略した粉末は、色調が黄色寄りでルテイン含量が低い傾向にあった。また、低温で乾燥させた粉末はルテイン含量が高い傾向にあった。ラボ試作品のルテイン含量が 61～85 mg/100 g であったのに対し、市販 5 品のルテイン含量は 9～33 mg/100 g と低く、ルテイン含量に対するβ-カロテン含量の比も低かった。市販品の製造では微生物数低減を目的とした加熱を行う場合がある。また、ラボ試作品に比べて長期間保存されていたと推測される。これらの加熱工程や保存期間が、カロテノイド含量低下の要因となっている可能性がある。

lutein, Komatsuna, age-related macular degeneration

発表責任者：石本太郎（taro-ishimoto@food-tokyo.jp）

講演番号：4B4a07
講演日時：3 月 27 日 10:16～ 1 号館 B4 会場

線虫 C.elegans を用いたタンパク質凝集を抑制するアーユルヴェーダハーブの探索

Screening for ayurvedic herbs that prevent protein aggregation in C. elegans

○夏井 真衣子[1]、西本 暢尭[2]、高氏 裕貴[2,3]、山上 義巳[2]、ホサイン モハマド[2,3]、三木 健輔[2,3]、鮎沢 大[2,3]、藤井 道彦[1,2]([1]横浜市大国際総合、[2]横浜市大生命ナノシステム、[3]イチバンライフ（株））
○Maiko NATSUI[1], Nobuaki NISHIMOTO[2], Yuki TAKAUJI[2,3], Yoshimi YAMAKAMI[2], MN HOSSAIN[2,3], Kensuke MIKI[2,3], Dai AYUSAWA[2,3], Michihiko FUJII[1,2] ([1]Yokohama City Univ. Int'l Col. of Arts and Sci., [2]Yokohama City Univ. Grad. Sch. of Nanobiosci., [3]Ichibanlife Corp.)

生命の維持には生体や細胞機能の恒常性の維持が欠かせない．タンパク質の恒常性（proteostasis）の維持には，必要な量のタンパク質が適切なタイミングで合成され，適切なタイミングで分解される必要がある．タンパク質の恒常性維持の破綻は，様々な疾患につながると考えられる．例えば，アルツハイマー病やハンチントン病などの各種神経変性疾患では，タンパク質の異常な凝集が原因となるとされる．したがって，タンパク質の異常な凝集を抑制する機能性物質は，人々の健康維持に有用であると考えられる．当研究室では，インド地方の健康維持や不老長寿を目的とした伝統医学であるアーユルヴェーダに用いられるハーブを材料に，人々の健康増進に有用な物質のスクリーニングを行ってきた．本研究では，モデル生物の線虫 *Caenorhabditis elegans* を用いて，タンパク質の凝集抑制効果を示す物質候補のスクリーニングを，約 200 種類のアーユルヴェーダハーブの中から行った．

C. elegans の HE250 株は，高温下ではタンパク質恒常性の異常により運動異常（麻痺）を引き起こすと考えられている温度感受性突然変異体株である．HE250 株は許容温度下（16℃）では正常に生育できるが，非許容温度下（25℃）では麻痺を引き起こし，正常な運動ができなくなる．この線虫を様々なハーブ抽出液を添加した培地上で培養し，麻痺を抑制する効果のあるハーブ，つまり，タンパク質恒常性の異常に対して抑制効果を示すハーブを探索した．次いで，得られた抽出液の候補に対し，高温下ではアミロイドβ ペプチドが産生され，蓄積する *C. elegans* の CL4176 株，および凝集性タンパク質の一種であるポリグルタミンを含むタンパク質を発現する *C. elegans* の OG412 株を用いて，抽出液の効果を確認した．本発表では，これらのハーブ抽出液のスクリーニング結果について報告する．

Ayurvedic herbs, Alzheimer, Protein aggregation

講演番号：4B4a08
講演日時：3 月 27 日 10:27～ 1 号館 B4 会場

異物抱合酵素発現酵母菌体を用いたスチルベン化合物の抱合代謝物の酵素合成
Enzymatic synthesis of conjugate metabolites of stilbene compounds using xenobiotic metabolizing enzymes expressing yeast

○中山 舞[1]、西川 美宇[2,3]、安田 佳織[2]、鎌倉 昌樹[1]、深谷 圭介[1]、占部 大介[1]、榊 利之[2]、生城 真一[1] ([1]富山県大・工・生工、[2]富山県大・工・医工、[3]TOPU バイオ研究所)
○ Mai NAKAYAMA[1], MIYU NISHIKAWA[2,3], KAORI YASUDA[2], MASAKI KAMAKURA[1], KEISUKE FUKAYA[1], DAISUKE URABE[1], TOSHIYUKI SAKAKI[2], SHINICHI IKUSHIRO[1] ([1]Dep. of Biotech., Fac. of Eng., Toyama Pref. Univ, [2]Dep. of Phram.Tech., Fac. of Eng., Toyama Pref. Univ, [3]TOPUBIO Research Co., Ltd)

生体外異物である医薬品や食品成分の多くは、ヒト体内に取り込まれた後に第Ⅰ相反応であるシトクロム P450 による水酸化、第Ⅱ相反応である UDP-グルクロン酸転移酵素(UGT)によるグルクロン酸抱合や硫酸基転移酵素(SULT)による硫酸抱合を受け、水溶性が高まり体外に排出される。一部の化合物についてはこのような異物代謝を受ける過程で、化学構造や体内動態の変化により生理活性を発揮する場合があり、代謝物の同定および機能解析が必要とされる。本研究室では医薬品や食品中機能性成分の代謝物を工業的に生産することを目的としてヒトを含めた哺乳動物由来異物代謝酵素発現酵母を用いた代謝物生産システムを構築した。本実験では食品中機能性成分のひとつであるスチルベン系化合物のピセアタンノールとそのメチル化誘導体（ラポンチゲニンおよびイソラポンチゲニン）の抱合体代謝物同定を目的として UGT 及び SULT 発現酵母菌体を用いて代謝解析を行った。

ヒト及びラット由来の肝臓、小腸ミクロソームを用いてグルクロン酸抱合反応を行い、代謝物を解析したところ、いずれの化合物においても 2 種の抱合体(G1、G2)の生成が確認された。また、S9 画分を用いた硫酸抱合反応の代謝物解析の結果より、いずれの化合物においても 3 種の抱合体(S1～S3)の生成が確認された。さらに、抱合代謝物の生成パターンは発現している分子種に依存して動物種で異なることが示された。哺乳動物由来 UGT 発現酵母菌体(69 種)を用いて代謝物解析を行ったところ、嗅覚上皮細胞での発現が高いヒト UGT2A1 においていずれの基質に対しても高い抱合能を示した。ヒト由来 SULT 6 種発現酵母株による硫酸抱合代謝解析では、SULT1 ファミリーに属する複数の分子種について部位特異的な硫酸抱合体の生成が確認された。適切な抱合酵素発現酵母株を用いることにより、部位特異的な抱合体を高効率で合成することが可能となった。

今後、それぞれの化合物に対する抱合体の大量調製における最適条件を検討し抱合体精製標品を用いてグルクロン酸及び硫酸基の抱合化部位を同定する予定である。

stilbene compounds, conjugate metabolites, yeast

発表責任者：中山　舞（t516025@st.pu-toyama.ac.jp）

講演番号：4B4a09
講演日時：3 月 27 日 10:38～ 1 号館 B4 会場

ラットにおけるフェノフィブラート投与による外因性酸化コレステロールの抱合化と排出の変動
Effect of fenofibrate on conjugation and elimination of exogenous oxysterol
○加藤 慧士、中堀 紘花、石川 航也、長田 恭一 (明治大農)
○SATOSHI KATO, HIROKA NAKAHORI, KOYA ISHIKAWA, KYOICHI OSADA (Meiji Univ. of Agric.)

【目的】食品中のコレステロールは、加熱等の加工や長期間の保存により酸化され、酸化コレステロール（OXC）が生じる。摂取した OXC は生体内に徐々に蓄積され、動脈硬化性疾患、アルツハイマー病、癌、あるいは骨粗鬆症といった種々の疾患発症に寄与する可能性が指摘されている。これまでに、いくつかの OXC は硫酸転移酵素（SULT）及びグルクロン酸転移酵素（UGT）によって硫酸あるいはグルクロン酸抱合化体になることが示唆されており、抱合化された OXC は生体から排出されやすくなることが考えられる。そこで本研究では、SULT 及び UGT の遺伝子発現を高める Fenofibrate をラットに投与し、OXC の排出及び毒性発現に対する影響について検討した。

【方法】8 週齢の Wistar 系雄ラットを 1 週間予備飼育した後、AIN76 飼料組成に基づき 0.5%のコレステロールを添加したコレステロール群 (C 群 ; n=5)、0.5%の OXC を添加した飼料を与えた OXC 群（O 群 ; n=5)、及び O 群に 10 mg/kg/day のレベルで Fenofibrate を 1 週間投与した Fenofibrate 群（F 群 ; n=6）の 3 群に分け、3 週間の飼育後、解剖を行った。血液、肝臓、腎臓、動脈、尿及び糞を採取し、分析まで-80℃で保存した。各組織の OXC レベル及び OXC 抱合化体レベルを GC-MS 分析で測定し、LC-MS 分析で抱合化された分子種について解析を行った。

【結果・考察】血漿及び肝臓のトリアシルグリセロールレベルは、O 群に比べて F 群で有意に低下した。OXC は脂質代謝攪乱作用が報告されており、Fenoeibrate 投与によって改善される可能性が示唆された。また、肝障害パラメータも O 群に比べて F 群で有意に低下し、OXC による毒性が緩和される可能性が考えられた。血漿、肝臓、腎臓、動脈中の OXC レベルは C 群に比べて O 群で有意に高くなり、O 群に対し F 群で有意に低くなった。特に動脈では細胞毒性の強い 7β-hydroxycholesterol と 7-ketocholestanol のレベルが O 群に対し F 群で顕著に低下したので、動脈硬化発症リスクが低減したと予想された。さらに、血漿、尿及び糞中の OXC の抱合化体レベルを解析したところ、O 群に比べて F 群で有意に高くなり、特に 7-ketocholestanol 及び側鎖が酸化した Oxc 分子種のレベルが高くなった。よって、Fenofibrate の投与で OXC の抱合化体のレベルが増加し、各組織中の OXC の蓄積が低下することで、OXC 摂取による動脈硬化や肝疾患等のリスクが低減する可能性が示唆された。

Oxysterol, Fenofibrate, conjugation

講演番号：4B4a10
講演日時：3 月 27 日 10:49～ 1 号館 B4 会場

ヒト腸内細菌によるクルクミン代謝に関する化学的研究（２）
Metabolism of curcumin by human feces. Part 2.
○丹羽 利夫[1]、横山 慎一郎[2]、望月 美佳[3]、大澤 俊彦[3] ([1]修文大健康栄養、[2]岐阜県産業技術セ、[3]愛知学院大心身科学)
○Toshio Niwa[1], Shio-ichiro Yokoyama[2], Mika Mochizuki[3], Toshihiko Osawa[3] ([1]Shubun Univ., [2]Ind. Technol. Cent., Gifu Pref., [3]Aichi Gakuin Univ.)

【目的】われわれは昨年の本大会において、クルクミンが１C と名付けたヒト由来腸内細菌群により 3-hydroxy-1,7-bis(3,4-dihydroxyphenyl)heptane に変換されることを報告した。しかしながらその 2 級アルコールの絶対立体構造については不明であったことからその解明を行うこととした。

【方法】クルクミン代謝産物を TMS ジアゾメタンで処理することにより得られるテトラメチル化物を化学合成により調製した。すなわちヘキサハイドロクルクミンの脱水により得られるエノン体の二重結合およびカルボニルの還元後、メチル化処理することにより 3-hydroxy-1,7-bis(3,4-dimethoxy-phenyl)heptane を得た。この物を CHIRALCEL OZ-RH カラムにより分析したところ等しい面積の二つのピークを得ることができた。そこでこの HPLC 条件により、ハンノキより得られる 3*R*の立体を有する rubranol(*1*)およびクルクミン代謝物それぞれから得られたテトラメチル化物の分析を行った。

【結果と考察】HPLC においてクルクミン代謝産物由来のものは光学活性を有していたが(＞85%e.e.)、その主要ピークは rubranol 由来のものとは異なるピークであった。このことから得られたクルクミン代謝産物は rubranol の鏡像異性体を主体とすることが明らかとなった。またクルクミン代謝産物の光学活性は、大豆イソフラボノイド代謝産物で見られるものに比べ低かった。現在もちいているヒト由来腸内細菌群１C は複数の微生物を含むことがわかっており、このような複数の微生物の混在により光学活性が低くなった可能性も考えられる。今後 2 級アルコール生成に関与する微生物を単離するなどして、立体選択性についてさらに解明したいと考えている。

参考文献
1) *Biol. Pharm. Bull.*, **35**, 2036 (2012).

curcumin, metabolite, human

発表責任者：丹羽　利夫（nbononaka@hotmail.co.jp）

講演番号：4B4a11
講演日時：3 月 27 日 11:10～ 1 号館 B4 会場

鉄欠乏マウスにおける酸味細胞の変化
Alteration in sour taste cells by iron deficiency in mice
○奥野 葉月、藍原 祥子（神戸大農）
○Hazuki OKUNO, YOSHIKO AIHARA (KobeUniv. of Agric.)

【目的】味を正常に感知できなくなった状態を味覚障害といい、原因として老化や薬剤による副作用、亜鉛欠乏などが挙げられる。これらの場合、味覚系の末梢組織である味蕾の分化・増殖が低下することが知られている。貧血状態においても味覚障害が生じることが報告されており、体内の鉄量が味の感受性に影響することが示唆されている。これまでに我々は、鉄欠乏マウスにおいて酸味と塩味に対する応答が低下することを報告した。本研究では、体内鉄の減少による味覚感受性の低下の要因を明らかにするため、鉄欠乏マウスの味蕾における組織学的、分子生物学的な解析を行った。【方法】AIN93G 組成からクエン酸鉄を除いた飼料を雄性 C57BL/6J マウスに 5 週齢から 8 週間与えて鉄欠乏マウスを作出し、その後 4 週間は AIN93G 組成の通常食を与えた。週に一度、尾静脈から採血し血中ヘモグロビン濃度を測定した。味覚嗜好性を、実験開始 8 週目の鉄欠乏状態と、12 週目の回復後に評価した。味覚嗜好性試験は、甘味、旨味、苦味、酸味、塩味に対し一定時間内に舐める回数を計測することで評価した。組織学的解析として、舌の先端より約 1 mm の範囲の薄切切片をヘマトキシリン - エオジン染色に供し、味蕾を含む茸状乳頭の数を計数した。また、茸状乳頭の味蕾を含む舌上皮から抽出した RNA を用いて、覚関連遺伝子の発現解析を行った。【結果】血中ヘモグロビン濃度は実験開始 3 週目から徐々に低下し、8 週目には対照群の約半分にまで減少したが、通常食を与えて 2 週間で回復した。味覚嗜好性試験の結果、酸味と高濃度の塩味に対しては鉄欠乏群で忌避応答が低下していた。体内鉄の回復後の試験では、酸味と高濃度の塩味に対する応答は対照群と同程度になった。組織学的解析の結果、鉄欠乏状態では茸状乳頭の味蕾が約 10%減少し、回復後は対照群と同程度の数になった。遺伝子発現解析の結果、鉄欠乏状態において甘味・旨味・苦味（タイプ II）細胞に発現する遺伝子の一部の発現が上昇し、酸味（タイプ III）細胞に発現する遺伝子である AADC（芳香族アミノ酸脱炭酸酵素）の発現が減少していた。AADC は酸味細胞から放出されるシグナル伝達物質の合成酵素であるため、酸味細胞の応答に変化が生じている可能性がある。以上の結果から、鉄欠乏に伴う AADC の発現低下により酸味と高濃度塩味に対する感受性の低下に寄与することが示唆された。

taste disorder, iron deficiency

講演番号：4B4a12
講演日時：3 月 27 日 11:21～ 1 号館 B4 会場

Tas2r125 はマウス口腔内においてカテキンの苦味を検出する主要な味覚受容体として機能する

Tas2r125 functions as the main receptor for detecting bitterness of tea catechins in the oral cavity of mice

○成川 真隆、三坂 巧（東大院農生科・応生化）
○Masataka NARUKAWA, Takumi MISAKA (The University of Tokyo)

【目的】近年、味覚受容体が口腔以外の組織でも発現し、味の検出のみならず、生体の恒常性維持において役割を担っていることが示唆されている。したがって、食品成分と味覚受容体との相互作用を解析することは、食品成分の持つ機能を明らかにする上で有用な情報になり得ると考えられる。これまでに我々は機能性食品成分を受容する味覚受容体の同定を試みてきた。その過程で、カテキンが特定のヒト苦味受容体を活性化することを見出した。一方、食品の機能性研究は主にげっ歯類を用いて検討されている。すでにマウスがカテキン溶液を濃度依存的に忌避することを行動学的解析により明らかにしているものの、マウスにおいてカテキンがどの苦味受容体を活性化させるのか、その詳細は明らかでない。そこで、本研究ではカテキンを受容するマウス苦味受容体の同定を試みた [1)]。

【方法】マウスゲノムから苦味受容体遺伝子 35 種類をクローニングし、動物細胞発現用ベクターに組み込んだ。これをキメラ G タンパク質とともに HEK293T 細胞に共発現させ、カテキン応答を記録した。カテキン応答の有無は細胞内 Ca^{2+}濃度の変化を指標とした。ここでは代表的なカテキンの中でマウスが最も強く忌避したエピカテキンガレート（ECg）をサンプルとした。

【結果】一次スクリーニングとして、300 μM ECg に対する応答を記録した。35 種類の苦味受容体のうち、5 種類の受容体（Tas2r108、110、113、125、144）で mock 細胞と比較し、有意に高い ECg 応答が確認された。ついで、これらの受容体を用いて、ECg に対する濃度応答関係を評価したところ、上述のいずれの受容体でも濃度依存的なカテキン応答が観察された。特に、Tas2r125 の ECg 応答は他の受容体に比べ、非常に大きな応答であった。これらの結果は、カテキンの味受容に 5 種類の苦味受容体が関与すること、その中でも Tas2r125 が主要なカテキン受容体として機能する可能性を意味する

本研究の一部は総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」によって実施された。

[1)] Narukawa M and Misaka T. ***Biochem. Biophys. Res. Commun.*** **503**, 2301-2305 (2018)

taste, bitter taste receptor, catechins

発表責任者：成川真隆（amstknrk@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4B4a13
講演日時：3 月 27 日 11:32～ 1 号館 B4 会場

高脂肪食摂取マウスにおける社会記憶の低下と末梢オキシトシン投与による社会記憶改善効果
Defect of social memory in mice fed a high-fat diet and improvement of social memory by peripheral oxytocin administration.

○林 遼太郎[1,2]、日出間 志寿[2]、福光 聡[1]、仲川 清隆[2]、西森 克彦[2]([1]日本製粉(株)、[2]東北大院農)
○ RYOTARO HAYASHI[1,2], SHIZU HIDEMA[2], SATOSHI FUKUMITSU[1], KIYOTAKA NAKAGAWA[2], KATSUHIKO NISHIMORI[2] ([1]Nippon Flour Mills Co., Ltd., [2]Tohoku Univ.)

【背景・目的】
脂肪の過剰な摂取が心疾患等の生活習慣病の主要なリスク要因であることは広く知られているが、近年高脂肪食の摂取が物体認知機能、鬱様行動などの脳機能にも影響を与えることが明らかになりつつある。社会記憶とは「誰」という記憶情報であり、コミュニケーション障害を中核症状の１つとする自閉症患者では社会記憶低下していることが知られている。高脂肪食摂取により社会行動が低下することは報告されているが、報告例が少なくそのメカニズムも不明である。そこで本研究では高脂肪食摂取が社会記憶に与える影響を解析しそのメカニズムの解析を行った。また自閉症患者への投与により社会記憶の改善が報告されているオキシトシンが高脂肪食摂取状態における社会記憶に与える影響を検討することで、高脂肪食摂取状態におけるオキシトシンの社会記憶改善効果を検討した。
【方法】
６週令の C57BL6/J オスマウスに 60kcal%高脂肪食及びコントロール食を 10 週間投与し食餌性肥満マウスを作出した。処理群はコントロール食+生理食塩水投与群、高脂肪食+生理食塩水投与群、高脂肪食+オキシトシン投与群の 3 群を設定した。Open filed test で自発行動量、Olfactory habituation/dishabituation test で嗅覚機能、Three chamber test で社会記憶を評価した。各試験の 45 分前に生理食塩水若しくはオキシトシンを 1mg/kgBW で腹腔内投与した。
【結果】
高脂肪食+生理食塩水投与群でコントロール食群に比べて社会記憶の低下が認められた。また、高脂肪食投与マウスへのオキシトシンの投与により社会記憶の回復が認められた。Open field test の結果、自発行動量が高脂肪食摂取により低下していたが、オキシトシンによる影響はなかった。Olfactory habituation/dishabituation test の結果、嗅覚が高脂肪食摂取により低下していたが、オキシトシン投与による影響はなかった。Three chamber test の結果、高脂肪食投与マウスでは社会記憶の低下が認められ、オキシトシンの投与により社会記憶は回復した。
【結論】
高脂肪食の摂取により社会記憶が低下し、オキシトシンの末梢投与により社会記憶が回復することが示された。高脂肪食投与マウスにおけるオキシトシンの社会記憶改善メカニズムは嗅覚系の回復以外のメカニズムであると推測された。

High fat diet, Social memory, Oxytocin

発表責任者：林　遼太郎（r-hayashi@nippn.co.jp）

講演番号：4B4a14
講演日時：3 月 27 日 11:43～ 1 号館 B4 会場

マウスを用いた食品の嗜好形成過程における報酬効果を評価するオペラント試験の確立
a operant task to assess the food reward during acquisition of the preference in mice.
○安田 文香、米田 武志（畿央大院 健康科学研究科）
○Fumika YASUDA, Takeshi YONEDA (Kio Univ Grad Sch)

【目的】
当研究室では、食嗜好形成の初期段階に着目し、嗜好形成を促進する食品因子の探索を行っている。食経験の無い食品に対し、速やかに高度な嗜好を形成することができれば、健康的な食選択を受諾する可能性を高めることができる。嗜好形成を促す食品因子の探索には、嗜好形成過程における動物の欲求行動を経日的に評価する試験系が不可欠である。本研究では動物のドアくぐり行動を条件付けし、食品に対する高度な嗜好形成を行動学的に評価する系として確立することを目的とした。
【方法】
ddY 雄性マウス（6 週齢）を用いて嗜好形成評価試験を行なった。使用する行動実験装置は 1 つの大部屋に 2 つの小部屋が連結されている。大部屋と 2 つの小部屋の間には、それぞれ一方通行の開閉式ドアがついている。小部屋のどちらかには食品を置き、マウスはドアをくぐって入室すれば摂取できる。大部屋をスタート地点とし、マウスを自由に行動させる。マウスが小部屋に入室後、食品を 5 秒間摂取させた後、スタート地点に戻す。これを繰り返し、10 分間のドアくぐり行動を記録した。1 日 1 回 7 日間行い、食品の置かれた小部屋への入室回数の変化を観察した。被験物には濃度依存的に報酬効果を有することが報告されている油脂（乳化大豆油）を用いた。
【結果】
20%乳化大豆油、5%乳化大豆油ともに、経日的に入室回数が増加していった。 1 日目の 20％乳化大豆油と 5％の乳化大豆油の平均入室回数は 4.4 回と 4.1 回とほぼ変わらなかったが、2 日目以降は 5％乳化大豆油に比して 20%乳化大豆油を用いた際の入室回数が多くなり、4 日目以降は有意に多い回数を示した。
【結論】
嗜好形成評価試験において、動物の油脂獲得行動は経日的に増加した。また、強化子の価値を評価する累進比率試験の結果と同様に、嗜好性評価試験の油脂獲得行動は油脂の濃度が高いほど増加した。以上のことから、嗜好形成評価試験は動物の嗜好形成過程において、欲求の高まりを経日的かつ定量的に評価可能な試験であると考えられる。

reward, operant, mice

講演番号：4B4a15
講演日時：3 月 27 日 11:54～ 1 号館 B4 会場

抹茶の継続摂取がマウスの社会心理的ストレス負荷後の情動応答に与える影響

Influence of continued ingestion of matcha on emotional behaviors after social stress on mice

○物部 真奈美、野村 幸子、江間 かおり、堀江 秀樹（農研機構）
○Manami MONOBE, Sachiko NOMURA, Kaori EMA, Hideki HORIE (NARO)

抹茶は新芽の生育期に 20 日間以上遮光して栽培した茶葉（*Camellia sinensis* L.）を蒸した後，乾燥させた「碾茶」を茶臼等で粉末化したものであり，煎茶に比べてアミノ酸（特にテアニン），カフェイン，エピガロカテキンガレート（EGCG）含量が高いことを特徴とする。中でも，テアニンにはリラックス作用やストレス軽減作用が報告されており，テアニンの効能を期待したテアニン含有食品も販売されている。しかし，これらの報告ではテアニンを 1 回あたり 200 mg 摂取する必要があり，比較的テアニンが多い抹茶であっても 200 mg を摂取することは難しい。

最近，Unno ら（1）は，動物試験およびヒト介入試験でエピガロカテキンとアルギニンがテアニンと共同的に作用すること，そして，テアニンのストレス軽減作用をカフェインと EGCG が抑制することを見出し，その結果，浸出液中のカフェインと EGCG を低減させた緑茶を摂取することによりストレス軽減効果が得られることを見出した。さらに，抹茶粉末中の（カフェイン+EGCG）/（テアニン+アルギニン）のモル比が 2 未満の抹茶を摂取することによりストレス軽減効果が得られることも報告している（2)。しかし，抹茶のテアニン含量は価格により大きく異なる。

Horie ら（3）の報告では，テアニンは 10,000 円/kg（碾茶乾物重量）までは価格の上昇に伴い含量が増加する。碾茶中のテアニン含量は，低いもので約 1％（w/w 乾物重量比），高いものでは 3%（w/w）を超えるものがある。一方，カフェインと EGCG は価格に関係なく，カフェインは約 4%，EGCG は 6-7%であることが報告されている。この結果から，茶葉中の（カフェイン+EGCG）/（テアニン+アルギニン）のモル比が 2 未満の抹茶は比較的高価格帯の抹茶であり，市場に出回る全ての抹茶でストレス軽減効果を見いだすことは難しいことが推察される。

そこで本報では，ストレス軽減効果が期待できないと推察される（カフェイン+EGCG）/（テアニン+アルギニン）のモル比が 2 以上の抹茶を継続摂取したマウスの社会心理的ストレス負荷後の情動応答に与える影響を調査した。その結果，オープンフィールド試験におけるストレス負荷後の後肢立ち回数の減少および高架式十字迷路試験におけるストレス負荷後のセンター＋オープンアームへの滞在時間率の減少が，抹茶の継続摂取により抑えられる傾向が観察された。

（1）Unno K et al. Phytomedicine 23, 1365-1374 (2016)　（2）Unno K, et al. Nutrients 10, 1468 (2018)（3）Horie H et al. 日本調理科学会誌 50, 182-188 (2017)

matcha, psychosocial stresses, emotional behaviors

講演番号：4B5a02
講演日時：3 月 27 日 09:11～ 1 号館 B5 会場

種々の濃度の PMA および ionomycin 処理による T 細胞の活性化およびアナジー化の誘導
Induction of T cell activation and anergy by various concentration of PMA and ionomycin

○平野 裕子、服部 誠、好田 正（東農工大）
○Yuko HIRANO, Makoto HATTORI, Tadashi YOSHIDA (Tokyo Univ. of Agriculture and Tech.)

【背景と目的】
T 細胞アナジーは、長期にわたって維持される抗原刺激に対する不応答あるいは低応答状態であり、経口免疫寛容の誘導においても重要な役割を果たしている。しかし、T 細胞アナジーの誘導機構についての詳細は明らかになっていない。食品アレルギーの発症は経口免疫寛容の破綻が原因の一つであると考えられていることから、T 細胞アナジーの誘導機構を解明することは、食品アレルギーの治療法や予防法の確立につながる重要な課題といえる。これまでの研究により、T 細胞のアナジー化および活性化の誘導を決定づけるのは、CD28 を介したシグナルの有無であると考えられてきた。しかし、我々はこれまでの研究において、CD28 シグナル単独ではなく CD3（TCR）を介したシグナルとのバランスが鍵となっていることを示唆するいくつかの結果を得ている。この仮説を分子レベルで実証するために、様々な強度の CD28 シグナルおよび TCR シグナルを *in vitro* において T 細胞に薬剤を用いて擬似的に導入し、T 細胞に誘導される活性化およびアナジー化の程度を解析した。
【方法】
ヒト T 細胞由来の細胞株である Jurkat 細胞に対して、ionomycin および phorbol 12-myristate 13-acetate（PMA）を用いて TCR および CD28 シグナルを擬似的に導入した。様々な ionomycin および PMA 濃度条件下において Jurkat 細胞を一日間刺激した後に、条件ごとに細胞を回収・洗浄し、細胞数をそろえて播種し直して、全群に対し同一濃度の ionomycin および PMA を用いて再刺激した。一日後に培養上清を回収し、IL-2 産生量を ELISA 法により測定することで細胞の刺激応答性を解析した。
【結果と考察】
PMA 非存在下において ionomycin で前処理した群では ionomycin の濃度依存的にアナジー化のみが誘導されたが、PMA 存在下では、ionomycin 低濃度条件で活性化が誘導され、濃度が高くなるにしたがって活性化が弱まり、高濃度条件ではアナジー化が誘導された。また、高濃度の PMA 存在下では、低濃度の PMA 存在下に比べて、アナジー化が誘導されるためにより高濃度の ionomycin 処理が必要であった。本結果は、より強い CD28 シグナルが導入されると、アナジー誘導のためにより強い TCR シグナルの導入が必要であることを示唆している。本研究により、T 細胞アナジー誘導の決定には CD28 シグナルの有無ではなく CD28 シグナルおよび TCR シグナルの強度のバランスが重要な役割を担っていることが示された。

T cell anergy, TCR signal, CD28 signal

発表責任者：好田　正（tyoshi@cc.tuat.ac.jp）

講演番号：4B5a03
講演日時：3 月 27 日 09:22～ 1 号館 B5 会場

レチノイン酸合成酵素 RALDH2 を介したフラボノールによる腸管免疫の恒常性維持

Flavonols contribute to homeostasis of gut immune system via RALDH2 expression.

○八代 拓也、綿貫 優実、山口 昌樹、西山 千春（東理大基礎工）
○Takuya YASHIRO, Yumi WATANUKI, Masaki YAMAGUCHI, Chiharu NISHIYAMA (Tokyo Univ. Sci.)

Retinaldehyde dehydrogenase 2 (RALDH2)は、*Aldh1a2* 遺伝子にコードされ、腸管に局在する樹状細胞 (DCs; dendritic cells)に特異的に発現するレチノイン酸合成酵素の一種として、食餌由来のビタミン A をレチノイン酸に変換する。小腸においてレチノイン酸は、T 細胞と B 細胞の小腸特異的なホーミングを促すことや、制御性 T 細胞 (Treg; Regulatory T cell)の分化を促すことが知られており、腸管免疫の恒常性維持において極めて重要な分子である。本研究では、腸管の感染防御機能の強化や経口免疫寛容への応用を目指し、DC において RALDH2 の発現を亢進する食品成分の探索を行った。

マウス骨髄細胞を GM-CSF 存在下で培養することで誘導した Bone marrow-derived DC (BMDC)を、様々な食品成分で処理した後、*Aldh1a2* mRNA 量を定量した。その結果、フラボノール類に属する Kaempferol や Fisetin、Galangin が有意に *Aldh1a2* の発現を上昇させることが判明した。フラボノール類の受容体として Aryl hydrocarbon receptor (AhR)を想定し、AhR siRNA を DC に導入した結果、*Aldh1a2* mRNA 量は上昇し、Kaempferol による *Aldh1a2* 発現亢進作用が消失した。このことから、AhR は *Aldh1a2* 遺伝子発現の負の転写因子であり、Kaempferol は AhR の機能抑制を介して *Aldh1a2* 発現を亢進することが示唆された。BMDC を AhR のアゴニスト Tetrachlorodibenzo-para-dioxin (TCDD)で処理したところ、RALDH2 の発現量、酵素活性共に減少し、AhR アンタゴニストである CH223191 の処理では Kaempferol と同様に増加することが判明した。マウス腸管膜リンパ節の CD103 陽性$^{+}$DC において Kaempferol の作用を評価した結果、RALDH2 酵素活性増加が認められた。最後に、Treg 誘導に対する Kempferol の効果を OT-II マウスの脾臓由来ナイーブ CD4 陽性 T 細胞を用いて解析した。OVA を取り込ませた DC で CD4 陽性 T 細胞の活性化を行ったが、Kaempferol が存在した場合、対照群と比べて有意に Treg の誘導が促進されることが確認された。

以上まとめると、DC の *Aldh1a2* 発現において AhR は負の転写因子であり、フラボノールは AhR の機能阻害によって *Aldh1a2* の発現を上昇させることが明らかとなった。すなわち、ダイオキシンなどの環境ホルモンは RALDH2 発現低下を引き起こして腸管免疫系の破綻を招くが、ダイオキシンと拮抗するフラボノールの摂食は、DC における RALDH2 活性上昇、ひいては腸管免疫系の恒常性維持に有効であると考えられた。

RALDH2, Dendritic cells, Retinoic acid

講演番号：4B5a04
講演日時：3 月 27 日 09:33～ 1 号館 B5 会場

サントル（*Sandoricum koetjape*）から単離したセンチュール酸の抗炎症作用
Sentulic acid isolated from *Sandoricum koetjape* Merr attenuates lipopolysaccharide and interferon gamma co-stimulated nitric oxide production in murine macrophage RAW264 cells
○伊藤 智広[1]、桂山 航輔[2]、二ノ宮 真之[3]、纐纈 守[3]([1]三重大院生資、[2]三重大資、[3]岐阜大工)
○Tomohiro ITOH[1], Kosuke KATSURAYAMA[2], Masayuki NINOMIYA[3], Mamoru KOKETSU[3]
([1]Mie Univ. Graduate School of Bioresources, [2]Mie Univ., [3]Gifu Univ.)

【目的】生体における炎症反応は外界からの細菌やウイルスの侵入，化学物質等の刺激を受けた際の自己防御反応である。この炎症反応が生体内で過剰に起きると，慢性炎症を誘発する。熱帯果樹で「wild mangosteen」とも呼ばれるサントル（*Sandoricum Koetjape*）には，既に抗炎症作用を発揮するテルペノイド 3-oxoolean-12-en-27-oic aid（以下 3o12e）が含まれていることが報告されており，今回サントルから 3o12e の構造に類似したとりテルペノイド sentulic asid（以下 SA）を単離したことから，SA の抗炎症作用とその作用機序について検討を行った。
【方法】抗炎症評価は，LPS/INFγ の共刺激したマウスマクロファージ RAW264.7 細胞から産生する一酸化窒素（NO）の濃度を指標に Griess 試薬を用いて行った。SA や類似構造物質の処理は，LPS/INFγ の共刺激前 2 時間行った。SA による抗炎症機構の解析は，Toll like receptor 4（TLR4）を介した炎症シグナル経路におけるシグナル分子の活性化状況をウエスタンブロット法にて検討した。また，一酸化窒素合成酵素（iNOS）や炎症性サイトカインの mRNA 発現量については，定量的リアルタイム PCR 法にて検討した。SA による LPS の TLR4 受容体への結合阻害については，Alexa Fluor 488-蛍光標識 LPS を用いた蛍光顕微鏡観察により評価した。
【結果および考察】NO 産生量の測定結果から，SA は既に報告されている 3o12e と同等の抗炎症作用を示すことが分かった。iNOS および炎症性サイトカイン（TNF-α, IFNγ， IL-6, IL-12）の mRNA 発現量は，SA 処理 RAW264.7 細胞で有意に低下した。次に，この SA 処理細胞における TLR4 を介した NO 産生機構を解析したところ， iNOS 合成に関わる上流分子である MAP キナーゼ（ERK, p38, JNK）や PI3K/Akt, NF-κB, STAT1 等の活性化（リン酸化）が低下していた。また，Hemeoxygenase-1（HO-1）が TLR シグナルを抑制することが知られていることから，2 時間の SA 前処理による RAW264.7 細胞での HO-1 の発現誘導を検討したが，この HO-1 の発現誘導は認められなかった。NO 産生シグナル経路の上流分子の活性化が阻害されていることから，SA が刺激剤である LPS と TLR との結合阻害が NO 産生シグナルを減弱化させているのではないかと推察し，蛍光標識 LPS を用いて TLR4 との結合状態を観察した。その結果，SA が LPS の TLR4 受容体との結合を阻害している様子を確認した。
　これらの結果から，SA による LPS/INFγ の共刺激誘導一酸化窒素産生阻害は，AW264.7 細胞膜表面の TLR と LPS の結合阻害が一要因として考えられた。この抗炎症機構は，既報の類似構造物であるトリテルペノイドのウルソール酸の抑制機構と同様のメカニズムであった。

sentulic acid, nitric oxide production, RAW264.7 cells

発表責任者：伊藤智広（titoh@bio.mie-u.ac.jp）

講演番号：4B5a05
講演日時：3 月 27 日 09:44～ 1 号館 B5 会場

大腸炎モデルマウスにおけるライチ由来低分子プロシアニジン化合物 Oligonol®の大腸炎予防効果

Elucidation of anti-inflammatory effect of Oligonol®, an oligomerized litchi fruit-derived procyanidins, on colitis mouse model

○依田 浩樹[1]、林 洪太[1]、長田 恭一[1]、高成 準[2]、北館 健太郎[2]([1]明治大院農、[2]株式会社アミノアップ化学)
○Hiroki Yoda[1], Kouta Hayashi[1], Kyoichi Osada[1], Jun Takanari[2], Kentaro Kitadate[2] ([1]Meiji Univ. of Agric., [2]Amino Up Chemical Co.)

【目的】
炎症性腸疾患（IBD）は先進国を中心に世界中で罹患者数が増加している慢性炎症疾患であり、その治療法としては副作用の強い薬剤や外科的手術等による対症療法が中心となっている。そのため、食品機能性成分による IBD 予防に期待が集まっており、本研究では低分子プロシアニジン化合物を豊富に含む機能性食品素材である Oligonol®の摂取による大腸炎予防効果を検証することを目的とした。
【方法】
4 週齢の雄性 ICR マウスを 7 日間予備飼育し、AIN93G 基準食及び水道水を摂取させる C 群、AIN93G 基準食及び 2.5%デキストラン硫酸ナトリウム（DSS）含有水を摂取させる D 群、0.1%Oligonol®食及び 2.5%DSS 含有水を摂取させる L 群、0.5%Oligonol®食及び 2.5%DSS 含有水を摂取させる H 群の 4 群に分けた。21 日間の本飼育期間の内、最初の 7 日間は食餌のみを試験食に置き換え、残りの 14 日間で 2.5%DSS 含有水の投与により大腸炎を誘発させ、臨床学的評価を行った。本飼育終了後に解剖し、採取した試料を種々の分析に供し、Oligonol®の抗大腸炎作用を評価した。
【結果】
DSS の投与によりマウスに血便および軟便が観察され、それぞれのスコアと Disease Activity Index（DAI）が顕著に上昇した。さらに、D 群に対して Oligonol®を高用量投与した H 群で有意に血便・軟便スコアおよび DAI が上昇した。同様にして、大腸の組織学的スコアや炎症性サイトカインの mRNA 発現量および糞中への胆汁酸排泄量（特にデオキシコール酸排泄量）なども DSS の投与で上昇し、高用量の Oligonol®を併用摂取させるとさらに顕著な上昇が観察された。
【考察】
当初の仮説に反して、Oligonol®の摂取による大腸炎予防効果は観察されず、むしろ高用量投与した群では大腸炎を促進するような結果が得られた。このようになった原因の 1 つとして、Oligonol®摂取による胆汁酸排泄の増加に伴う酸化ストレスの増大が考えられる。特に、本研究で顕著な排泄増加となったデオキシコール酸は強い細胞毒性を示すことが報告されており、大腸炎促進の重要な因子となった可能性が考えられた。また、糞中のコプロスタノール濃度の変化等から、大腸内の細菌叢が変化した可能性が示唆されており、今後は大腸炎促進に関わる因子を特定するためのさらなる検証が必要であると考えられる。

Mouse, Colitis, Procyanidin

講演番号：4B5a06
講演日時：3 月 27 日 10:05～ 1 号館 B5 会場

食用菊「阿房宮」および「延命楽」花弁ヘキサン抽出物のミクログリアにおける TNF-α産生に及ぼす影響の比較

Comparison of the effects of microglial TNF-α production by Chrysanthemum extract from cultivars Aboukyu and Enmeiraku

○若生 豊[1]、佐川 保乃香[1]、米内 真里奈[1]、馬 東建[2]、仁科 淳良[3] ([1]八工大工、[2]新疆大生命、[3]日大理工)
○Yutaka WAKOU[1], Honoka SAGAWA[1], Marina YONAI[1], Dongjan MA[2], Atuyoshi NISHINA[3] ([1]Hachinohe Inst. Tech., [2]Xinjiang Univ. of Life Sci., [3]Nihon Univ. of Sci. and Tech.)

【目的】 菊花は漢方薬においては欠かせない配剤であり，解熱，抗炎症，抗アレルギーなどの作用がある。食用菊にも同様な生理作用があるとされ健康に役立てることが期待される。しかし，品種によりその機能は異なると考えられるが，未だ十分な知見は得られていない。食用菊の生産は，食彩用のつま菊を除くと山形・新潟と青森の各県で多く，我々はそれぞれの地域を代表する延命楽と阿房宮に着目し，中枢神経保護作用に関する比較を行ってきた[1)]。近年，中枢における免疫機構の要であるミクログリアに注目が集まっている。

本研究では，ミクログリアの TNF-α および GDNF 放出に対する菊花抽出物の作用を，阿房宮と延命楽で比較し，抽出物中のトリテルペノイドの組成比との関連より考察した。

【方法】 菊花試料は同農地で栽培した阿房宮および延命楽を用い，乾燥花弁より調製したヘキサン抽出物を被験試料とした。各抽出物の 100 μg を TLC で展開し liebermann burchard 試薬で発色後，各スポットのデンシティー強度から成分の組成比を検討した。また抽出物の TMS 化誘導体を GCMS 分析し，TIC およびスペクトルから化合物の組成比と同定を試みた。ミクログリア細胞；MG5（IFO50520）株化細胞は A1 細胞で conditioning した 10% FBS を含む DMEM で培養した。細胞を 2×10^5 cells/mL でプレートへ播種し一晩培養後，菊花試料を含む培地に置換して前処理した。サイトカインおよび神経栄養因子の放出は，LPS（10 ng/mL）および ATP (1mM) 刺激により細胞を活性化させ誘導した。培養上清の TNF-α 量は L929 を用いたバイオアッセイ法により，GDNF 量は EIA により測定し，NFκB 等はウエスタンブロッティングにより検討した。

【結果】TLC および GCMS 分析より，両者のトリテルペノイド組成は類似しているが，ファラジオールおよびヘリアントリオール C の脂肪酸エステルと推測されるトリテルペノイドの組成比は延命楽に比べ阿房宮の抽出物で低くい可能性が示唆された。延命楽の抽出物は，LPS 刺激で誘導される TNF-α の放出を濃度依存的に抑制したが，ATP 刺激で誘導される TNF-α の放出に対する作用は認められなかった。これに対し，阿房宮の抽出物は，LPS 刺激で誘導される TNF-α の放出を抑制しなかったが，ATP 刺激で誘導される TNF-α の放出を高めた。従って，延命楽の成分は LPS 刺激に対し免疫抑制的に作用し，阿房宮の成分では ATP の TNF-α 放出に対し免疫賦活的に作用し質的に異なっている可能性が考えられた。また，菊花抽出物は TNF-α 放出に対し単独で誘導し，そのレベルは 0.37～0.57 ng/mL 程度で 1mM の ATP で誘導されるレベル（約 0.38 ng/mL）と同レベルであり，TNF-α 放出を適度に亢進させることにより神経細胞を保護している可能性が示唆された。

1）Ma, D. and Wako, Y. *Food Sci. Technol. Res.*, 23, 457-467(2017).

chrysanthemum, microglia, TNF-α

発表責任者：若生豊（wako@hi-tech.ac.jp）

講演番号：4B5a07
講演日時：3 月 27 日 10:16～ 1 号館 B5 会場

乾癬モデルマウスは腸管のバリア損傷と炎症を引き起こす
Regulation of intestinal barrier and inflammation in a murine model of psoriasis
○中野 智裕、山本 祥也、鈴木 卓弥（広大院生物圏）
○Tomohiro NAKANO, Yoshimari YAMAMOTO, Takuya SUZUKI (Hiroshima Univ. Grad. Sch. of Biosphere Sci.)

【背景・目的】乾癬は、皮膚の赤い発疹や鱗屑（角質細胞の剥離）を典型的な特徴とする、慢性的な非伝達性皮膚疾患である。乾癬患者は世界的に増加しているものの、根治治療法は開発されていない。その病態には、皮膚組織でのインターロイキン(IL)-17 や 23 などの産生が深く関わることが知られ、Th17 疾患と考えられているが、その原因や発症メカニズムは十分には解明されていない。一方で近年、乾癬の病態と腸管機能との連環が提案されており、これまでに私たちも乾癬マウスへのプレバイオティクス投与が腸管バリア損傷を軽減するとともに、乾癬症状を緩和させることを報告している（2016 年度大会）。しかしながら、乾癬における腸管機能の関わりはほとんどわかっていない。そこで本研究では、腸管機能の調節を通して乾癬を軽減する食品成分の開発を目指す一環として、乾癬の発症と進展時における腸管バリアや炎症への影響を探索した。
【方法・結果】マウス（BALB/c、雌性、7 週齢）の背部皮膚にイミキモドクリームを塗布することにより、乾癬モデルマウスを作成した。2、4、6 日目に解剖を実施し、各種解析を実施した。乾癬モデルマウスでは、皮膚の症状スコアや肥厚度、脾細胞からの IL-17 産生量が 6 日目まで経日的に上昇した。皮膚組織の Th17 関連サイトカイン（IL-17A、-22、-23 など）の遺伝子発現は、2 日目に最大となり、その後ゆるやかに減弱した。このとき乾癬マウスの大腸組織では、Th17 関連サイトカインの遺伝子発現に明確な変動は確認されなかったが、炎症性サイトカイン IL-6、TNF-α発現が 2 日目に上昇し、さらに腸管バリア損傷の指標である血清中の LPS 結合タンパク質濃度も上昇した。乾癬マウスの大腸組織では、腸管バリア機能に重要な役割を持つタイトジャンクション分子の発現変動は確認されなかったが、マクロファージのマーカーF4/80 発現量が経日的に上昇し、F4/80 陽性細胞数が正常マウスに比べて高値を示した。
【考察・まとめ】乾癬モデルマウスでは、イミキモド塗布 2 日目から皮膚の病態関連遺伝子の発現が増加し、このとき大腸組織の炎症やバリア機能の低下が示唆された。大腸のバリア損傷の直接的な要因はわからなかったが、大腸の炎症には少なくともマクロファージの集積が一部関与している可能性が提案された。乾癬の進展には、腸管由来の LPS や炎症性サイトカイン産生が関与しているかもしれない。現在、大腸の炎症の要因を調べる一環として、乾癬マウスから採取した糞の解析を実施している。

psoriasis, intestinal barrier, intestinal inflammation

発表責任者：鈴木卓弥（takuya@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：4B5a08
講演日時：3 月 27 日 10:27～ 1 号館 B5 会場

慢性腎臓病における腸管バリア損傷の作用機序の探索

Regulation of intestinal barrier in chronic kidney disease

赤谷 俊亮、山本 祥也、○鈴木 卓弥（広大院生物圏）
Shunsuke Akaya, Yoshinari Yamamoto, ○ Takuya Suzuki (Hiroshima Univ., Grad. Sch. of Biosphere Sci.)

【背景・目的】慢性腎臓病（CKD）は、腎臓の機能障害が慢性的に続く状態と定義され、その高い罹患率が社会的にも問題となっている。CKD の発症と進展には種々の要因が関わるが、近年、腸内環境の変化や腸管バリアの損傷、そしてそれに続く全身性の炎症状態が重要な役割をもつことが提案されている。しかしながら、CKD における腸管バリアの損傷の詳細はほとんどわかっていない。これまでに私たちは、CKD モデルマウスが腸管バリアの損傷とともに、糞中の硫酸還元菌の増加を引き起こしていることを見出した。そこで本研究では、硫酸還元菌が産生する硫化水素による腸管バリア損傷への影響とその作用機序を探索することを目的とした。
【方法・結果】マウス（C57BL/6J、雄性、7 週齢）に 0.2%アデニン含有 AIN93G 準拠飼料を 4 週間摂取させ、CKD モデルマウスを作成した。CKD マウスの糞中の硫化水素と血液中の LPS 結合タンパク質（腸管バリア損傷の指標）の濃度は、正常マウスに比べて高値を示した。また、ヒト腸管上皮 Caco-2 細胞を Transwell システムに培養し、硫化水素ドナーである GYY4137 を作用させたところ、腸管バリアの指標である経上皮電気抵抗値が低下した。このとき GYY4137 は、腸管バリアにおいて重要な役割を持つタイトジャンクション構造の ZO-1 タンパク質の発現量を低下させた。さらに、硫化水素によって変動する遺伝子を網羅的に解析するため、Caco-2 細胞の Total RNA を回収し、DNA マイクロアレイ解析を実施した。GYY4137 は、ZO-1 の遺伝子レベルには影響していなかったが、細胞増殖や細胞周期に関わる遺伝子群の発現を減少させた。それら遺伝子のうち、Cyclin D2、Cyclin F、CDK2、CDK4 の発現低下は、定量 PCR 法においても確認された。
【考察・まとめ】CKD モデルマウスにおいて、腸管内の硫化水素の増加がバリア損傷に一部関与している可能性が示唆された。この分子機序の１つとして、タイトジャンクション分子の ZO-1 がタンパク質レベルで減少することが提案された。さらに、上皮細胞の適正な増殖は、腸管バリアの完全性に重要であることから、硫化水素による細胞増殖の抑制も、腸管バリア損傷の要因の一つと考えられた。現在、硫化水素による細胞増殖や細胞周期への影響を検討している。

Chronic kidney disease, Hydrogen sulfide, Intestinal barrier

発表責任者：鈴木卓弥（takuya@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：4B5a09
講演日時：3 月 27 日 10:38～ 1 号館 B5 会場

アントシアニジン類による GPR35 の活性化
Anthocyanidins act as ligands for GPR35
○若林 万由香[1]、ロー ウェイチー[1]、下村 沙也子[1]、中島 史恵[1]、井上 飛鳥[2]、青木 淳賢[2]、内田 浩二[3]、柴田 貴広[1] ([1]名大院生命農、[2]東北大院薬、[3]東大院農生科)
○Mayuka WAKABAYASHI[1], Wei Qi LOH[1], Sayako SHIMOMURA[1], Fumie NAKASHIMA[1], Asuka INOUE[2], Junken AOKI[2], Koji UCHIDA[3], Takahiro SHIBATA[1] ([1]Grad. Sch. of Bioagric. Sci. Nagoya Univ., [2]Grad. Sch. of Pharm. Sci. Tohoku Univ., [3]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., The Univ. of Tokyo)

【背景・目的】
G タンパク質共役型受容体（GPCRs）は神経伝達物質やホルモンなどの細胞外分子を受容し、細胞内へと情報を伝達する重要な細胞膜タンパク質である。近年、食品由来成分やその代謝物などをアゴニストとする代謝物感受性 GPCRs が同定され、様々な生体機能を調節していることが明らかにされつつあり、注目を集めている。こうした背景から、GPCRs のアゴニストとなりうる食品成分の探索と生理作用の評価は、疾患の予防や改善といった食と健康の関わりを解明するために重要であると考えられる。そこで本研究では、特に食品成分の感知に関与すると考えられる腸管に発現し、炎症性腸疾患にも関与するとの報告がある GPR35 に着目し、GPR35 を活性化する食品成分の探索を行った。
【方法・結果】
様々な食品成分について、GPCR の活性化を高感度かつ高精度に検出するトランスフォーミング増殖因子α（TGFα）切断アッセイを利用し、GPR35 に対する活性化能を評価した。その結果、シアニジンが GPR35 に対して高い活性を示すことが判明した。この活性はシアニジン処理濃度依存的に上昇すること、また GPR35 のアンタゴニストである CID2745687 によって阻害されることが確認された。さらに、GPR35 を発現させた HEK293 細胞に対しシアニジンを投与した後、免疫染色によって GPR35 の細胞内局在を観察したところ、シアニジン処理によって GPR35 が細胞膜からサイトゾルに移行することが明らかとなった。続いて、シアニジン以外のアントシアニジン類に関して、TGFα切断アッセイにより GPR35 活性化能を評価したところ、活性化の程度に差はあったものの、他のアントシアニジン類も GPR35 を活性化することが明らかとなった。これらの結果から、GPR35 はシアニジンを含むアントシアニジン類の受容体として作用する可能性が示唆された。

GPR35, Anthocyanidin, anti-inflammatory

講演番号：4B5a10
講演日時：3 月 27 日 10:49～ 1 号館 B5 会場

Identification of GPR35 agonist in common herbs and spices

○Wei Qi LOH[1], Mayuka WAKABAYASHI[1], Sayako SHIMOMURA[1], Fumie NAKASHIMA[1], Inoue ASUKA[2], Junken AOKI[2], Koji UCHIDA[3], Takahiro SHIBATA[1] ([1]Grad. Sch. of Bioagric. Sci. Nagoya Univ., [2]Grad. Sch. of Pharm. Sci. Tohoku Univ., [3]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., The Univ. of Tokyo)

G-protein coupled receptors (GPCRs) are important pharmacological targets that regulate various physiological processes. In this study, we focus on GPR35, a metabolite-sensing GPCR that is known to regulate immune responses. Based on the fact that GPR35 is highly expressed in the gastrointestinal tract, we hypothesized that there may be functional food components in diet that are capable of acting as GPR35 agonists. Our objective is therefore to screen across a variety of common culinary herbs and spices for potential agonists of GPR35.

We first prepared extracts from 19 common herbs and spices with organic solvents hexane and ethyl acetate. Using the method TGF-alpha shedding assay on HEK293 cells that were transiently transfected with GPR35 expression vector, we screened the extracts for activation of GPR35. In the course of this study, we found that the ethyl acetate extract of thyme showed remarkable activation of GPR35. Furthermore, the ethyl acetate extract of thyme was able to significantly activate GPR35 in a dose-dependent manner.

To identify the active component(s) responsible for the activation of GPR35, we performed activity-guided separation of principal agonist(s) from the thyme ethyl acetate extract. We fractionated the extract into six fractions by silica gel chromatography and found that the 1:1 hexane to ethyl acetate fraction exhibited the most potent activity. We further analyzed the 1:1 hexane to ethyl acetate fraction by reverse-phase HPLC and detected some chromatographic peaks. Currently, we are attempting to isolate and identify the active compounds.

GPR35, thyme, anti-inflammatory

講演番号：4B5a11
講演日時：3 月 27 日 11:10～ 1 号館 B5 会場

タモギタケ中β1,6 グルカンの M2 マクロファージ分化誘導作用
Pleurotus citrinopileatus glucan stimulates anti-inflammatory properties during monocyte-to-macrophage differentiation
○湊 健一郎（名城大院農）
○Kenichiro MINATO (Meijo Univ.)

自然免疫系での重要なエフェクター細胞であるマクロファージ（Mφ）には，異なる機能を有する亜群が存在することが明らかとなっている。細菌やウイルス感染により分化して，それらを排除するために局所に流入してくるマクロファージはM1マクロファージと呼ばれる。また，Th2細胞やマスト細胞などが産生したIL-4やIL-13により活性化されたものはM2マクロファージと呼ばれ，寄生虫感染からの防御や免疫抑制作用を示す。さらには，動脈硬化の発症にはCXCL4分泌型M4マクロファージへの分化が関与していることも示唆されている。そのため我々は，マクロファージを標的として，感染症，アレルギー性疾患，および各種生活習慣病の予防・改善を試みようと考えた。発表者はこれまでに，食用きのこタモギタケ中の機能性β1,6-グルカンは，THP-1細胞株を用いた実験により，単球-マクロファージ分化の初期過程においてM2 Mφ分化の誘導を促すことを明らかにした。本実験ではさらにヒト末梢血単核細胞(PBMC)から分離した初代培養細胞(CD14$^+$)を用いて，同様にM2分化が誘導されるかどうか確かめた。
[方法および結果]
本実験で用いた β グルカンの構造については既報により報告していたが，今回さらに詳細な NMR 解析（HSQC-NMR）によって，その構造を調査した。その結果，本グルカンはβ-1,6-を主鎖として，側鎖にβ-1,3-グルコシド結合をもつことが示された。
本実験では，ヒト PBMC より分離された CD14+細胞を，正常ヒト血清(NHS)を含んだ培地中で 6 日間培養し，マクロファージへの分化を誘導した。本グルカンを培養前の CD14+細胞に添加したところ，細胞の運動性が抑制されるという炎症促進性の作用が認められた。しかしながら，培養開始後 1 日間および 6 日間連続して刺激したところ，いずれの成熟マクロファージにおいても TNF および IL-6 といった炎症性マーカーの産生が顕著に抑制され，IL-10 の産生も著しく亢進された。また，本グルカンの刺激はグルカンレセプターである Dectin-1 を介して，そのシグナルが伝達されることが示唆されたが，TLR-2 および 4 シグナル伝達経路の顕著な関与は認められなかった。これらの結果は，炎症促進作用における本グルカンと TLR-2/4 との関連性とは異なった結果である。
以上の結果から，タモギタケ中β-1,6-グルカンは単球-マクロファージ分化において，一定期間刺激し続けることで単球上の Dectin-1 を介したシグナル伝達経路に作用して，M2 マクロファージ分化を促すことが示唆された。

β-glucan, macrophage, anti-inflammation

発表責任者：湊　健一郎（minato@meijo-u.ac.jp）

講演番号：4B5a12
講演日時：3 月 27 日 11:21～ 1 号館 B5 会場

Lactobacillus plantarum OLL2712 株が腸管免疫系樹状細胞および脂肪組織由来間質血管細胞群に与える影響

Effect of *Lactobacillus plantarum* OLL2712 strain on dendritic cells in intestinal immune system and adipose tissue-derived stromal cells

○王 イバイ、高野 智弘、遠藤 龍之助、足立（中嶋） はるよ、八村 敏志（東大院農生科・食の安全研セ）

○ Yimei WANG, Tomohiro TAKANO, Ryunosuke ENDO, Haruyo ADACHI, Satoshi HACHIMURA (Res. Cent. Food Safety, Univ. Tokyo)

【目的】乳酸菌には、免疫調節、炎症抑制作用などの保健機能が報告されている。乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* OLL2712 株（OLL2712）の加熱菌体はインターロイキン-10（IL-10）の産生を誘導する能力が高く、これまで我々は、BALB/c マウス樹状細胞の IL-10 産生を誘導できることを報告してきた。IL-10 は抗炎症性サイトカインとして知られ、慢性炎症や代謝疾患の抑制が期待される。本研究では、C57BL/6 マウスを用い、腸間膜リンパ節（mesenteric lymph node; MLN）、パイエル板（Peyer's patch; PP）由来の樹状細胞（dendritic cells; DC）および、精巣上体脂肪組織（epididymal adipose tissue; EAT）、腸間膜脂肪組織（mesenteric adipose tissue; MAT）由来の間質血管細胞群（stromal vascular fraction: SVF)を用いて、OLL2712 の腸間膜免疫系と脂肪組織における IL-10 の産生誘導作用および、脂肪組織マクロファージに対する影響についてさらに検討した。

【方法】C57BL/6 マウスの MLN、PP から MACS 法より $CD11c^+$ 細胞を分離し、MLN DC、PP DC として用いた。また、EAT、MAT から SVF 細胞を調製した。MLN DC、PP DC、EAT SVF、MAT SVF、を OLL2712 加熱菌体存在下で培養し、各細胞の IL-10 mRNA 発現量を qPCR 法により定量した。また、EAT SVF、MAT SVF を OLL2712 加熱菌体存在下で培養後、フローサイトメトリーにより細胞表面分子を解析し、マクロファージにおける M1 マクロファージおよび M2 マクロファージの割合を調べた。

【結果】OLL2712 加熱菌体存在下で培養することによって、MLN DC、EAT SVF における IL-10 mRNA 発現量の増加が見られ、EAT SVF における炎症性を示す M1 マクロファージの割合の減少が観察された。本研究により、OLL2712 の加熱菌体による腸管免疫系 DC と脂肪組織における IL-10 産生誘導および脂肪組織における M1 マクロファージの減少が示され、本乳酸菌が腸管免疫系および脂肪組織の免疫細胞を介して慢性炎症や代謝疾患を改善できる可能性が示唆された。

Interleukin-10, macrophages, *Lactobacillus plantarum*

発表責任者：八村敏志（ahachi@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4B5a13
講演日時：3 月 27 日 11:32～ 1 号館 B5 会場

母親の高脂肪食摂取が子の Paneth 細胞α-defensin による腸内環境制御に与える影響
The influence of maternal high-fat intake on the regulation of intestinal environment by Paneth cell α-defensin in offsprings

○杉本 理菜[1]、中村 公則[1,2]、嶋 七海[1]、清水 由宇[1]、横井 友樹[1]、綾部 時芳[1,2] ([1]北大・生命科学・自然免疫、[2]北大・先端生命・細胞生物科学・自然免疫)
○Rina SUGIMOTO[1], Kiminori NAKAMURA[1,2], Nanami SHIMA[1], Yu SHIMIZU[1], Yuki YOKOI[1], Tokiyoshi AYABE[1,2] ([1]Innate Immunity Lab., Grad. Sch. of Life Sci., Hokkaido Univ, [2]Dept. of Cell Biol. Sci., Faculty of Adv. Life Sci., Hokkaido Univ)

【背景・目的】

ヒトは約 100 兆個もの腸内細菌と共生している。近年、腸内細菌叢の破綻（dysbiosis）が肥満症や自閉症をはじめとした様々な疾患に関与することが報告されている。さらに、妊娠期に高脂肪食を摂取した母親から生まれた子は dysbiosis を引き起こすことが報告されているが、その機序はいまだ不明である。

小腸陰窩基底部の Paneth 細胞は細胞質顆粒中の抗菌ペプチドα-defensin を分泌する。α-defensin は、病原菌は殺すが常在菌は殺さない選択的殺菌活性を有し、腸内細菌叢を制御している。

これらのことより、母親の高脂肪食摂取が子の Paneth 細胞の発達やα-defensin の産生に悪影響を与えることで腸内細菌叢の破綻を引き起こすのではないかと考えた。本研究は、母親の高脂肪食摂取が次世代の Paneth 細胞の発達や腸内環境制御機能にどのように影響を与え、生体恒常性に関与するかについて、機序を解明することを目的とした。

【方法・結果】

6 週齢の ICR マウス（雌）に高脂肪食（脂肪分 60 kcal%）もしくは通常食（脂肪分 10 kcal%）を 5 週間自由摂食で負荷した後、通常食を摂取した雄と交配して子マウスを作出した。高脂肪食を摂取した親由来の子マウスを MHFD（Maternal high-fat diet）群、通常食を摂取した親由来の子マウスを MRD（Maternal regular diet）群とし、両群ともに離乳後は通常食を投与した。6 週齢の MHFD 群と MRD 群のα-defensin 分泌量を評価するために、乾燥糞便を採取し、粉砕後、便中α-defensin を sandwich ELISA 法で測定すると、MHFD 群で有意に低下していた（MRD 群 137.6±31.8 ng/mL、MHFD 群 47.1±6.1 ng/mL、$p<0.05$）。さらに、Paneth 細胞の組織学的評価を行うために、6 週齢の MHFD 群および MRD 群の小腸組織を透明化免疫蛍光染色すると、1 陰窩あたりに含まれる Paneth 細胞（α-defensin 陽性もしくは細胞質顆粒を有する）の数は MHFD 群と MRD 群で違いはなかったが、Paneth 細胞の顆粒径が MHFD 群において低下していた。

【結論】

母親の高脂肪食摂取が次世代の Paneth 細胞α-defensin の分泌能を低下させ、Paneth 細胞の腸内環境制御に悪影響を与える可能性が示された。

α-defensin, Paneth cell, maternal diet

発表責任者：綾部時芳（ayabe@sci.hokudai.ac.jp）

講演番号：4C1a01
講演日時：3 月 27 日 09:00～ 1 号館 C1 会場

低用量のこんにゃくセラミド摂取による肌機能改善効果の検証

Skin symptom improvement test by intake of konjac ceramide-containing food

○高橋 香織[1,2]、三上 大輔[2]、向井 克之[1]、五十嵐 靖之[2] ([1]（株）ダイセル、[2]北大)
○Kaori TAKAHASHI[1,2], Daisuke MIKAMI[2], Katsuyuki MUKAI[1], Yasuyuki IGARASHI[2] ([1]Daicel Corporation, [2]Hokkaido Univ.)

【目的】
こんにゃく芋由来グルコシルセラミド（こんにゃくセラミド）は、特定保健用食品や機能性表示食品の関与成分として許可や届出がされている。その根拠とされるヒト試験の論文では、1 日当たり 1.8 mg を含む食品を、12 週間毎日摂食する健常人試験で、経皮水分蒸散量が改善されることが報告されている。しかしながら、それよりも低用量での Random Controlled Trail (RCT)試験については報告がない。そこで我々は、皮膚機能改善効果が得られる最低限のこんにゃくセラミド含量を明らかにすべく、ヒト試験を実施した。
【方法】
35 歳以上 59 歳以下の皮膚の乾燥、肌荒れやたるみを自覚する健常人男女を対象として、12 週間の無作為化二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験により、肌検査（皮膚水分量、皮膚水分蒸散量、皮膚弾力性、皮膚 pH、肌色測定、角層解析、肌状態解析、自覚症状アンケート、皮膚科医による所見）を行った。また、その作用機序解明のため、ケラチノサイトに終濃度 5 μM となるようにこんにゃくセラミドを添加し、24-120 時間インキュベート後、定量 PCR により分化マーカーおよびスフィンゴ脂質合成遺伝子の mRNA 量を比較した。
【結果】
経皮水分蒸散量の差分値が、0.6mg 摂食群で右頬部と右肘部、さらに 1.2mg 摂食群では、右頬部と上背部、右足背部で、プラセボ群に対して有意に改善することが確認された。また、アンケート調査でも、1.2 mg 摂食群で、「肌の潤い」と「肌のきめ」の改善が実感できることが示された。さらに、安全性に関しても副作用、有害事象調査について、試験期間中に問題となるような事象は確認されなかった。また、ケラチノサイトを用いた細胞試験によりこんにゃくセラミドは分化マーカーであるインボルクリンの mRNA 量を増加させたことから、ケラチノサイトの分化を促進させることが分かった。
以上のことから、こんにゃくセラミドは、1 日の摂食量が 0.6 mg、1.2 mg の低用量でも、肌状態（バリア機能や保湿作用）を改善し、1.2 mg 摂取群では、その効果を実感できることが確認された。さらに、経口摂取したこんにゃくセラミドが吸収されて血中移行した植物型セラミドがケラチノサイトの分化を促進することがその作用機序の一部であることが確認された。

ceramide, konjac

講演番号：4C1a02
講演日時：3 月 27 日 09:11～ 1 号館 C1 会場

モリンガエキス配合化粧品塗布による肌機能改善効果

Effect of cosmetics containing Moringa extract on skin health

○中村 唱乃[1]、庄屋 雄二[1]、山津 敦史[1]、坂下 真耶[1]、齋藤 洋子[2]、玉城 美根子[2]、金 武祚[1]([1]（株）ファーマフーズ、[2]（株）シャルレ)
○Utano NAKAMURA[1], Yuji SHOYA[1], Atsushi YAMATSU[1], Maya SAKASHITA[1], Yoko SAITO[2], Mineko TAMASHIRO[2], Mujo KIM[1] ([1]Pharma Foods International, Co., Ltd., [2]CHARLE Co., Ltd.)

【背景・目的】

我々はモリンガ（*Moringa oleifera* の高い成長力や生命力がヒトの健康長寿に寄与できる可能性に着目し、モリンガ葉抽出物（モリンガエキス）の生理機能に関する探索を行ってきた。その中でも肌の抗老化作用について研究を行い、モリンガエキスが *in vitro* および人の腕においてターンオーバーを改善することを見出した（2018、日本農芸化学会)。本試験では、モリンガエキスを配合した化粧品が肌機能改善効果を有するか検証したので報告する。

【方法】

40 歳以上の健康な女性で、普段美容液を使用していない 22 名を対象に試験を行った。顔全体に対して、モリンガエキス 0.01%配合美容液を朝、夜の 2 回塗布することとし、通常のスキンケアに追加した。被験者は指定洗顔料にて洗顔した後、タオルにて水分を払拭し、測定室（室温 20±2℃、相対湿度 50 ± 10%）に入室した。入室後、15 分間測定環境に馴化させた後、皮膚計測を実施した。計測項目は、客観的評価として肌の状態、真皮の評価、角層診断、主観的評価としてアンケートを行った。検査回数は試験前、試験 4 週間後、試験 8 週間後の計 3 回とした。本試験は 1 月～3 月に実施し、評価は美容液使用前後で比較を行った。

【結果・考察】

モリンガエキス配合美容液塗布により、塗布前と比べて、真皮におけるコラーゲンスコアが 7.3%増加し、老化ダメージ（Age band）が 10.5%減少した。加齢によってコラーゲンスコアは減少し、Age band は増加することから、モリンガエキス配合美容液は加齢に伴う肌機能の低下を抑制する可能性が示唆された。また、これまでの研究結果より、モリンガエキスはサーチュイン遺伝子を活性化し、セルサイクル機能を正常化することが明らかになっている。このことからも、セルサイクル機能の正常化により、老化によりダメージを受けた細胞が減少し、正常な真皮細胞の割合が増加したことで、コラーゲン産生量が増加し、コラーゲンスコアの改善につながったと考えられる。本試験期間中、モリンガエキス配合美容液を塗布することによる有害事象の報告はなかった。以上の結果より、モリンガエキス配合化粧品は加齢に伴い低下する肌機能を向上させることから、肌の老化抑制、若返りを期待できると考えられる。

Moringa, skin, collagen

講演番号：4C1a03
講演日時：3 月 27 日 09:22～ 1 号館 C1 会場

藻類含有人工飼料給餌によるカイコ生育への影響および絹糸の化粧品素材としての可能性
An influence on growth of silkworms by fed algae-containing artificial diet and possibility of silk as cosmetic material.
○杉本 良太、阿閉 耕平、三輪 由布子、橋本 祐佳、中島 綾香、岩田 修、鈴木 健吾（株式会社ユーグレナ）
○Ryota SUGIMOTO, Kohei Atsuji, Yuko Miwa, Yuka Hashimoto, Ayaka Nakashima, Osamu Iwata, Kengo Suzuki (euglena Co., Ltd.)

カイコ（*Bombyx mori*）に与えられる飼料は、第 1 齢 ～ 上蔟から営繭に至る過程に及ぶまで極めて重要な要素となる。従来、桑葉や桑葉を主とした人工飼料が用いられているが、カイコへの給餌を目的とした桑葉の栽培には地理的・環境的制約が存在する。従って、桑葉の安定供給や価格が蚕業農家の課題となっている。エクスカバータ属に類するユーグレナ（*Euglena gracilis*）やクロレラ属に類するクロレラ（*Chlorella solokiriana*）は葉緑体を持つ単細胞の藻類であり屋外大量培養系が確立されており、健康食品としての利用が展開されている。

本研究では、藻類、特にユーグレナやクロレラを由来とする乾燥粉体を桑葉の一部として代替した人工飼料を用いた際の、カイコ生育に与える影響を観察し従来の人工飼料との代替可能性を検証すること、さらにその絹糸の化粧品としての機能性を評価することを目的とした。

既存の人工飼料重量に対して 5%、10%, 20% をユーグレナあるいはクロレラ乾燥粉末で人工飼料を代替した藻類含有人工飼料を作成し、5 齢カイコに給餌した際の摂食や体重および体長増加に与える影響を 1 日毎に観察した。その結果、既存の人工飼料と同等に全給餌区において藻類含有人工飼料は摂食されたことから接触忌避を誘発する物質は存在しないことが示唆された。さらに、カイコ体重および体長の増加も既存人工飼料に対して変化がなかったことから、ユーグレナおよびクロレラ乾燥粉末による人工飼料の代替可能性が示唆される結果を得た。また、これら藻類乾燥粉末の含有量依存的に、上蔟に入り営繭する個体数が増えたことから、絹の生産効率上昇が期待できるだろう。

絹糸は不溶性タンパク質のフィブロインを水溶性タンパク質のセリシンが覆うことで構成されており、セリシンは化粧品素材として利用されている。そこで、藻類含有人工飼料で生育したカイコから得た絹糸からセリシン層を抽出した後、LC-MS/MS によるサルファーインデックス解析を行ったところ、セリシン層抽出液中にセリンや尿素等の含硫化合物がコントロールと比較して増加していた。これらの結果を受け、ヒトの表皮多角化細胞培養液中に藻類含有人工飼料区由来セリシン層抽出液を添加したところ、ヒアルロン酸産生に関与する *HAS3* 遺伝子やセラミド産生に関与する *SPTLC1* 遺伝子の発現レベルが促進されることを示唆する結果を得た。これらの結果から、藻類含有人工飼料区由来のセリシン層抽出液は、肌にハリや潤いをもたらしうることが期待された。

本発表では、ユーグレナおよびクロレラ乾燥粉末の人工飼料の代替によってカイコ個体生育に与える影響だけでなく、得られた絹糸の利用可能性に関して提案したい。

Bombyx mori, Silk, *Euglena gracilis*

発表責任者：鈴木健吾（suzuki@euglena.jp）

講演番号：4C1a04
講演日時：3 月 27 日 09:33～ 1 号館 C1 会場

トマト種子抽出物および含有サポニンの皮膚細胞外マトリックスに及ぼす効果

Effect of tomato seed extract and its major saponins on extracellular matrix in skin

○竹田 翔伍[1]、山田 和佳奈[1]、中村 誠宏[2]、松田 久司[2]、下田 博司[1] ([1]オリザ油化(株) 研究開発本部 食品開発部、[2]京薬大 生薬)
○ Shogo TAKEDA[1], Wakana YAMADA[1], Seiko NAKAMURA[2], Hisashi MATSUDA[2], Hiroshi SHIMODA[1] ([1]Food Development Dpt., R&D Center, Oryza Oil & Fat Chemical Co., Ltd., [2]Kyoto Pharmaceutical Univ., Pharmacognosy)

【目的】皮膚は外側から表皮層，真皮層で構成されており，このうち肌のハリや弾力を主に担うのは真皮層である。真皮層は線維芽細胞と細胞外マトリックス（extracellular matrix，ECM）で構成されており，特に ECM は肌の弾力に大きく影響を及ぼすコラーゲンやエラスチンの繊維で構成されているため，ECM の異常はしわ・たるみの原因となる。演者らは，トマト種子の抽出物（TSE）にスピロソラン型サポニンである lycoperoside A および H が主要成分として含有されていることを見出した。サポニンの中には，コラーゲンの増殖活性を示すものが報告されていることから，本研究では TSE および含有サポニンの ECM に及ぼす作用を評価した。
【実験方法】ヒト皮膚線維芽細胞（TIG-103）に TSE（1, 3 および 10 μg/mL），lycoperoside A および H（0.1, 0.3, 1 μg/mL）を添加して 1 日間培養し，コラーゲン産生量を測定した。同様に，TIG-103 細胞に TSE（1, 3 および 10 μg/mL），lycoperoside A および H（1, 3, 10 μM）を添加し，エラスチン産生量を評価した。また，線維芽細胞においてコラーゲンおよびエラスチンの産生にそれぞれ関与する smad および fibulin 遺伝子の発現をリアルタイム定量 PCR によって評価した。同様に，コラーゲンおよびエラスチン分解産物の線維芽細胞への取り込みにそれぞれ関与する endo180 および neuraminidase-1 の遺伝子発現も評価した。さらに，線維芽細胞において老廃物の取り込みに関与する lysosomal-associated membrane protein-1（LAMP-1）の存在量に対する効果を免疫染色によって評価した。
【結果および考察】TSE（3 μg/mL）および lycoperoside A（0.3 および 1 μg/mL）の添加は，TIG-103 細胞のコラーゲン産生量を有意に増加させた。また，TSE（10 μg/mL），lycoperoside A（3 および 10 μM）および lycoperoside H（1 μM）の添加により，有意なエラスチン産生量の増加が確認された。リアルタイム定量 PCR の結果，lycoperoside A の添加により，smad（3 および 10 μM），fibulin（10 μM），endo180（1 μg/mL）および neuraminidase-1 遺伝子（3 μM）の発現量が有意に増加した。さらに，免疫染色により，TSE（3 μg/mL），lycoperoside A および H（10 μM）の添加によって，TIG-103 細胞中の LAMP-1 の存在量が増加していることが確認された。以上の結果より，TSE およびその含有サポニンは，コラーゲンおよびエラスチンの産生および分解物の取り込みを促進し，ECM を常に正常な状態に保つ作用があることが示唆された。

tomato seed, lycoperoside, extracellular matrix

講演番号：4C1a05
講演日時：3 月 27 日 09:44～ 1 号館 C1 会場

肝臓遺伝子発現による自然薯ムカゴ粉末および抽出物摂取効果の検証
Effects of whole powder and extract from Japanese yam propagules on hepatic trasncriptome
○篠崎 文夏[1]、山下 治之[1]、亀井 飛鳥[1]、嶋田 耕育[1]、野原 正勝[1]、荒井 綜一[1,2]、阿部 啓子[1,3]
([1]KISTEC、[2]東農大、[3]東大院農生科)
○ Fumika SHINOZAKI[1], Haruyuki YAMASHITA[1], Asuka KAMEI[1], Kousuke SHIMADA[1], Masakatsu NOHARA[1], Soichi ARAI[1,2], Keiko ABE[1,3] ([1]KISTEC, [2]Tokyo Univ. Agri., [3]The Univ. of Tokyo)

【目的】自然薯 *Dioscorea japonica* の葉の根元にできる栄養繁殖器官“ムカゴ”は可食性である。我々はこれまでに自然薯ムカゴは抗酸化能が高いことを見出し、生理的機能性を検証してきた。本研究では、ムカゴ全体の粉末およびムカゴよりポリフェノール含有画分を濃縮したものの摂取効果を比較した。

【方法】自然薯ムカゴは皮ごとスチーム加熱した後凍結乾燥し、粉末とした。また、抽出物はムカゴ粉末 1(g)に対してエタノール 10(ml)を用い 4 回抽出後乾固することで調製した。ムカゴ粉末はα―コーンスターチと置換で全体の５％となるように添加し、抽出物もそれと相当量を添加した。動物はマウス(C57BL/6、雄、3 週齢)を用いた。1 週間馴化後、試験食としてエネルギー比 10%の通常脂肪餌、脂質割合がエネルギー比 45%の高脂肪餌、および高脂肪餌に加熱ムカゴ粉末を添加した餌（粉末群）または抽出物を添加した餌（抽出物群）を与え、4 週間飼育した。

摘出した肝臓からトータル RNA を抽出し、DNA マイクロアレイによって遺伝子発現を解析し、変動遺伝子を得た。そこから、高脂肪の影響がムカゴ摂取によって改善方向に変動する遺伝子を抽出し、GOTERM に基づいた機能性分類を行った。得られた変動遺伝子について、粉末群と抽出物群で比較し、共通性を調べた。

【結果】高脂肪の影響が改善した遺伝子は粉末群と抽出物群で共通して変動をしているものはごくわずかであり、各々異なる遺伝子が改善していた。共通して高脂肪の影響が改善した遺伝子の GOTERM 分類を行うと、これらはコレステロール代謝関連であり、高脂肪負荷で発現が上昇した遺伝子が、ムカゴ摂取で低下する方向に改善した。IPA を用いて上流因子解析をしたところ、粉末群と抽出物の両群で高脂肪負荷によるコレステロール生合成活性化を抑制すると推察された。また、高脂肪負荷による炎症関連因子の活性化は、粉末群でのみ抑制されると推察された。

以上の結果から、自然薯ムカゴの粉末および抽出物ともに高脂肪負荷時のコレステロール生合成の乱れを改善すると示唆された。免疫関連への影響は粉末でしか認められないことから、抽出物には含まれない成分が効果の主体である可能性が高いことがわかった。

本研究の一部は、総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」によって実施されました。

transcriptome, food function, high-fat

講演番号：4C1a06
講演日時：3 月 27 日 10:05～ 1 号館 C1 会場

高脂肪食マウスの血中コレステロールおよび中性脂肪に及ぼす微細藻類 *Nannochloropsis* 摂取の影響

Effects of feeding *Nannochloropsis* dry cells on cholesterol and triglyceride concentration in blood of mice fed high-fat diet

○石田 財、滝口 泰之（千葉工大工）
○Takara ISHIDA, Yasuyuki TAKIGUCHI (Chiba Institute of Technology.)

【背景・目的】

微細藻類は古くから餌料として主に水産業で利用されてきた。*Nannochloropsis* 属微細藻類が生産する脂肪酸には EPA やパルミトレイン酸といった有用な脂肪酸が多く、アミノ酸やタンパク質などの栄養素もバランスよく含まれていることから、健康食品としての利用が期待される。また、EPA には血液の中性脂肪値を低下させる効果、パルミトレイン酸には肝臓の脂肪蓄積を低下させる効果が認められている。本研究ではこの藻類をマウスに摂取させることで、血液と肝臓への影響を観察し、人間の健康食品としての利用を検討することを目的とした。

【方法】

海産微細藻類用ダイゴ IMK 培地 10.08g、人工海水調製塩 1400g およびイオン交換水 20L を加えた耐熱性プラスチック容器を滅菌して *Nannochloropsis* sp.((有)生物工学研、*Nannochloropsis* Green Water)を接種し、30℃、光強度 140 μmol・m^{-2}・s^{-1}で通気培養した。培養約 20 日目に菌体を遠心分離で回収し、凍結乾燥させた。高齢(38～57 週齢)の BALB/cAJcl マウス(日本クレア（株)) を用いて高脂肪飼料(HFD-60)を摂取させる群(コントロール群)と高脂肪飼料に乾燥 *Nannochloropsis* を混ぜ合わせた飼料を摂取させる群(藻類摂取群)の 2 つの群(n=4)に分けて 90 日間の飼育を行った。3 日おきに電子天秤を用いて体重の測定を行った。また、30 日おきに採血を行い、血清中総コレステロール値測定(コレステロールオキシダーゼ-DAOS 法)、血清中中性脂肪値測定(GPO-DAOS 法)を行った。90 日目に解剖を行い、肝臓を取り出した。取り出した肝臓は肝臓重量の測定と Folch 法を用いて肝油の抽出に利用した。

【結果・考察】

90 日目の総コレステロール値測定でコントロール群が 179.4mg/dl、藻類摂取群が 120.3mg/dl となった。また、中性脂肪値測定ではコントロール群が 547.8mg/dl、藻類摂取群が 274.9mg/dl となった。Folch 法を用いた肝油量の測定は肝臓重量に対する肝油の含有率がコントロール群は 3.00%、藻類摂取群は 1.50%となった。これら 3 つの測定全てで藻類摂取群がコントロール群と比べて値が低くなるという結果を得られた。この結果は藻類に含まれていた EPA やパルミトレイン酸などの脂肪酸の働きにより生じたと考えられる。現在は若齢マウスを用いて藻類に含まれる脂肪酸が与える中性脂肪値の影響について検討を行っている。

Nannochloropsis, triglyceride, cholesterol

発表責任者：滝口　泰之（takiguchi.yasuyuki@p.chibakoudai.jp）

講演番号：4C1a07
講演日時：3 月 27 日 10:16～ 1 号館 C1 会場

GABA 摂取による持久運動能力増強効果
Enhancement of exercise endurance capacity by GABA intake

○山田 裕晃[1]、ホッサイン マッドサダム[1]、ウォン カールーン[1]、嵯峨根 里穂[1]、山津 敦史[1]、金 武祚[1]、青井 渉[2]([1]株式会社ファーマフーズ、[2]京都府立大学大学院生命環境科学研究科)
○Hiroaki YAMADA[1], Md Saddam HOSSAIN[1], Kah Loon WONG[1], Riho SAGANE[1], Atsushi YAMATSU[1], Mujo KIM[1], Wataru AOI[2] ([1]Pharmafoods International Co., Ltd., [2]Graduate School of Life and Environmental Sciences Kyoto Prefectural University)

【目的】γ-アミノ酪酸（GABA）はアミノ酸の一種であり、野菜、穀物、発酵食品等に広く含まれる成分である。GABA 摂取による血漿中成長ホルモン量上昇効果、睡眠改善効果、ストレス緩和効果が報告されており、現在では、機能性表示食品等の健康食品の生理活性成分として注目を集めている。しかし、睡眠やストレスなどのメンタルへの作用は多数報告されている一方で、フィジカルへの作用について、特に運動能力への作用についての具体的な報告はまだない。ペルオキシソーム増殖因子活性化レセプターγ 共役因子-1α（PGC-1α）は、骨格筋ミトコンドリア量や毛細血管密度増加といった遅筋特性を獲得させるなど、持久運動と密接な関係があるといわれている。PGC-1α を過剰発現させたマウスの骨格筋中 GABA 量は通常マウスに比べ、顕著に増加することが報告されており、PGC-1α、持久運動能力、GABA それぞれが密に関連していることが考えられた。そこで本研究ではマウスを用いて GABA 摂取による持久運動能力に与える効果について検証した。
【方法】 10 週齢 ICR 雄性マウスを対象とし、コントロール群（n=8）、GABA 摂取（G）群（n=9）、トレーニング（T）群（n=9） トレーニング＋GABA 摂取（TG）群（n=9）の 4 群に分けた。コントロール群、T 群には AIN-93G を、G 群、TG 群には GABA0.5%混餌 AIN-93G を自由摂取させた。摂取期間中、T 群、TG 群には週 3 回のトレッドミル走行運動（25 m/min の速度で 1 時間走行）を負荷した。摂取開始時、摂取開始 2 週間後、摂取開始 4 週間後に、走行試験を実施した。走行試験はマウスが疲労困憊になるまでの時間を測定した。
【結果・考察】コントロール群、T 群、G 群、TG 群の摂取開始 2 週間後における試験開始時からの走行時間変化量はそれぞれ-89 秒、-400 秒、1687 秒、3248 秒であった。コントロール群と G 群の間に有意差はみられなかった。T 群および TG 群はコントロール群と比較して有意差（$p<0.05$）がみられ、トレーニング効果が認められた。また、TG 群における走行時間は T 群と比較して有意に長く（$P<0.05$）、GABA はトレーニングによる持久運動への適応効果を増強させた可能性が示唆された。

GABA, endurance exercise capacity

発表責任者：山津敦史（a-yamatshu@pharmafoods.co.jp）

講演番号：4C1a08
講演日時：3 月 27 日 10:27～ 1 号館 C1 会場

モリンガ種子抽出物の抗疲労効果の検証

Anti-fatigue effects of Moringa oleifera seed extract

○清水 一雄[1]、杉浦 和彦[1]、中田 理恵子[2]、井上 裕康[2]([1]太陽化学(株)、[2]奈良女子大学・食物栄養)
○Kazuo SHIMIZU[1], Kazuhiko SUGIURA[1], Rieko NAKATA[2], Hiroyasu INOUE[2] ([1]Taiyo Kagaku Co., Ltd., [2]Nara Women's Univ. Department of Food Science and Nutrition)

【目的】

疲労は、身体的・心理的ストレスによって引き起こされる症状である。現代社会において疲労は人の健康や仕事の効率、生活の質に影響を及ぼすほどの深刻な問題になっているため、薬理学的な治療以外にも抗疲労効果を有する食品成分の利用も検討されている。モリンガ（*Moringa oleifera*）は、インド北西部を原産とし、熱帯・亜熱帯地域で広く栽培され、若い果実や葉などが野菜として食されている。近年その薬理特性も注目され、広く研究対象とされつつある。本研究では、モリンガ種子抽出物を調製し、細胞試験と動物試験で得られた抗疲労効果の検証について紹介する。

【方法】

細胞試験：モリンガ種子から既報に従い、グルコモリンギン（GMG）を精製した。また精製 GMG に市販の分解酵素を反応させてイソチオシアネート体であるモリンギンを調製した。ウシ血管内皮細胞に PPAR 応答性エレメントを持つレポーターベクターと、ヒト PPARα、β／δ、γのいずれかの発現ベクターを共導入し、24 時間後にモリンギンを添加した。24 時間反応後にルシフエラーゼ活性を測定した。βガラクトシダーゼ発現ベクターを同時に導入し、その酵素活性で遺伝子導入効率を補正した。

動物試験：モリンガ種子を水で抽出し、モリンガ種子エキスを調製した。モリンガ種子エキスを水へ溶解し、9 週齢オスの BALB/c マウスに体重 1kg あたり 2.0 あるいは 100mg の投与量になるようにゾンデを用いて 4 週間連続で経口投与した。コントロール群のマウスには水を同期間投与した。4 週間後にマウスへ体重の 5%に相当する錘を付けて泳がせ、溺れるまでの時間を測定し、遊泳時間とした。

【結果・考察】

細胞試験についてモリンギンによる PPAR 活性化を検討した結果、0.1%より低い濃度域で濃度依存的に PPARβ／δを活性化した。PPARαおよびγについても程度の差はあるが同様の活性化が認められた。また動物試験では、モリンガ種子エキスを 4 週間投与した結果、水投与群と比較して 100mg/kg 投与群で遊泳時間の有意な増加を確認した。また 2.0mg/kg 投与群においても有意な差ではないものの増加傾向を示し、遊泳時間の実測値および変化率において 100mg/kg 投与群と同程度の作用を示した。以上のことから身体的疲労の軽減や回復に対してモリンガ種子エキスが有用である可能性が示唆された。現在、動物組織中での PPAR 活性化への影響を検討中であり、今後はヒトでの有効性も検討していく予定である。

Moringa, Glucosinolate, Isothiocyanate

発表責任者：清水一雄（kashimizu@taiyokagaku.co.jp）

講演番号：4C1a09
講演日時：3 月 27 日 10:38～ 1 号館 C1 会場

マルトビオン酸は卵巣摘出マウスの骨量減少を抑制する
Maltobionic acid suppresses bone loss in ovariectomized ddY mice
○西尾 彩花[1]、中村 保奈美[2]、中川 大[2]、渡辺 章夫[3]、米澤 貴之[3]、禹 済泰[2]、末廣 大樹[4]、阿部 秀飛[4]、深見 健[4]、大西 素子[1,2]([1]中部大院応生、[2]中部大応生、[3]中部大生機研、[4]サンエイ糖化（株））
○Ayaka NISHIO[1], Honami NAKAMURA[2], Hiroshi NAKAGAWA[2], Akio WATANABE[3], Takayuki YONEZAWA[3], Je-Tae WOO[2], Daiki SUEHIRO[4], Shuto ABE[4], Ken FUKAMI[4], Motoko OHNISHI[1,2]
([1]Grad. Sch. Applied Biosci. and Biotech., Chubu Univ., [2]Dept. Bio. Chem., Chubu Univ., [3]Res. Inst. Biol. Funct., Chubu Univ., [4]San-ei Sucrochemical Co., Ltd)

【目的】グルコン酸にグルコースがα-1,4 結合したマルトビオン酸(MB)は、古来より食経験の豊かなハチミツに含有する成分であり、甘味が極めて弱くまろやかな酸味を呈する。MB は、無機カチオンと安定な塩を形成する特徴を持ち、MB にカルシウム(Ca)がイオン結合したマルトビオン酸 Ca(MBCa)は、水に対する溶解度が極めて高く、腸管からの Ca 吸収を促進することが報告されている。Ca の貯蔵庫である骨は、破骨細胞による骨吸収と、骨芽細胞による骨形成の繰り返しによって維持されている。そこでこれらの細胞に対する MB の作用を検討した結果、我々はこれまでに MB が骨芽細胞分化には影響を与えないものの、マウス単球・マクロファージ由来 RAW264 細胞の破骨細胞分化を抑制すること、その際 RAW264 細胞の生存率には影響しないことを見出した。さらにマウス大腿骨から採取した骨髄細胞を用いた初代培養細胞分化系においても、MB は破骨細胞分化を抑制することを明らかにした。そこで本研究では閉経後骨粗鬆症の動物モデルである卵巣摘出（OVX）マウスを用いて、骨代謝における MB および MBCa の影響を検討するとともに、Western Blot 法による破骨細胞分化抑制メカニズムを解析することを目的とした。
【方法】≪試験①≫AIN-93G 飼料組成を一部改変し、5% MB を含んだ MB または MBCa 含有飼料をそれぞれ調製し、卵巣摘出した 4 週齢 ddY マウス（1 群 7 匹）に与え、80 日間飼育を行った。飼料中の Ca 含量はすべての群で等しくなるよう、炭酸 Ca で調整した。マウス大腿骨は乾燥重量を計量するとともに、Ca 量を o-クレゾールフタレイン・コンプレクソン法によって決定した。さらに μCT による大腿骨の３次元解析を行った。≪試験②≫RAW264 細胞は 4×10^4 cells/well で 12 well plate に播種をし、α-MEM10%FBS で 20 時間培養した。MB または MBCa を添加し、4 時間培養後、終濃度 50 ng/mL で sRANKL(receptor activator of NF-κB ligand)を添加した。一定時間培養後に細胞を回収し、Western Blot 法による解析を行った。
【結果】≪試験①≫偽手術群と比較して OVX 群では、大腿骨の乾燥重量および骨中 Ca 量の有意な減少が確認された。しかしながら MB または MBCa 給餌群では、偽手術群と比較して大腿骨の乾燥重量および骨中 Ca 量に差は見られなかった。また OVX 群では大腿骨の骨密度減少が見られたが、MB または MBCa を与えた群では骨密度減少の抑制傾向が見られた。≪試験②≫MB および MBCa を添加することで、破骨細胞分化に必須の転写因子として知られる NFATc1 の発現が抑制された。以上より、MB は破骨細胞による骨吸収を抑制し、骨密度や骨中 Ca 量の減少を抑制する可能性が示唆された。

oligosaccharide, osteoporosis, osteoclast

発表責任者：大西素子（mohnishi@isc.chubu.ac.jp）

講演番号：4C1a10
講演日時：3 月 27 日 10:49～ 1 号館 C1 会場

骨代謝細胞に対するクベバコショウ由来リグナン化合物の作用

Effects of lignan compounds-derived from *Piper cubeba* on bone cells

○米澤 貴之[1]、宇田 初音[2]、戸井田 佳子[2]、林 忍弥[2]、遠藤 由貴[3]、渡辺 章夫[1]、禹 済泰[2,3] ([1]中部大生機研、[2]中部大応生、[3]中部大院応生)
○Takayuki YONEZAWA[1], Hatsune UDA[2], Yoshiko TOIDA[2], Touya HAYASHI[2], Yuki ENDO[3], Akio WATANABE[1], Je-Tae WOO[2,3] ([1]Res. Inst. Biol. Func. Chubu Univ., [2]Biol. Chem. Chubu Univ., [3]Grad. Sch. Biosci. Biotech. Chubu Univ.)

【背景・目的】骨は破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成のバランスにより恒常性が維持されている。したがって、骨代謝を担う破骨細胞および骨芽細胞の分化や機能を調節する天然化合物は骨粗鬆症や歯周病などの骨減少性疾患の予防や改善用途に有用である可能性がある。

クベバコショウ(学名：*Piper cubeba*)はインドネシア原産のコショウの一種で、熱帯アジア地域で広く栽培されている。クベバコショウの果実には主要なリグナン化合物としてクベビンおよびヒノキニンが含まれるが、その生理機能についてはあまり研究が進んでおらず、骨代謝に対する作用については知られていない。そこで、本研究では骨代謝を調節する破骨細胞および骨芽細胞の分化に対するクベビンおよびヒノキニンの作用について検討した。

【方法】クベバコショウの果実をエタノールで抽出し、各種分配操作及びクロマトグラフィーによって、クベビン及びヒノキニンを単離し、NMR などの機器分析により同定した。

マウスマクロファージ系細胞株である RAW264 細胞を用いて、破骨細胞分化誘導因子である RANKL（receptor activator of NF-κB ligand）存在下で３～４日間培養することで破骨細胞分化を誘導した。また、ICR マウスの大腿骨及び脛骨から骨髄細胞を採取し、M-CSF 存在下で培養することで骨髄由来マクロファージ（BMM）を調製し、さらに、M-CSF 及び RANKL 存在下 3-4 日間培養することで破骨細胞分化を誘導した。培養後、WST-8 を用いて細胞生存率を測定後、破骨細胞の分化マーカー酵素として知られる酒石酸耐性酸性ホスファターゼ(TRAP)活性の測定と染色を行った。

骨芽細胞分化に対する作用は、マウス頭頂骨由来前骨芽細胞株である MC3T3-E1 細胞を用いて、化合物存在下で 6～12 日間培養後、初期分化マーカー酵素として知られるアルカリフォスファターゼ（ALP）活性の測定とアリザリンレッド染色による石灰化を指標に評価した。

【結果・考察】RAW264 細胞において、クベビン及びヒノキニンは、細胞毒性を示さない濃度において、濃度依存的に RANKL による TRAP 活性の上昇を抑制し、多核破骨細胞形成数も減少させた。また、BMM を用いた破骨細胞分化においても、同様に、クベビン及びヒノキニンの添加によって TRAP 活性の抑制と多核破骨破骨形成数の減少が確認された。一方、骨芽細胞分化においては、クベビン及びヒノキニンは MC3T3-E1 細胞の ALP 活性を亢進させるとともに、石灰化も促進した。これらの結果から、クベビン及びヒノキニンは破骨細胞分化抑制作用と骨芽細胞分化促進作用に基づいて骨吸収と骨形成のバランスを調節し、骨量の維持や改善に役に立つ可能性が明らかになった。

Piper cubeba, osteoclast, osteoblast

講演番号：4C1a11
講演日時：3 月 27 日 11:10～ 1 号館 C1 会場

エクオール産生におよぼす胆汁酸の影響

Effects of bile acids on isoflavone metabolism

○吉岡 寛子[1]、渡辺 真通[2]、難波 文男[2]、鈴木 利雄[2]、吹谷 智[3]、横田 篤[3]、戸田 登志也[1]([1]武庫川女子大、[2]フジッコ株式会社、[3]北大院農)
○ Hiroko YOSHIOKA[1], Masamichi WATANABE[2], Fumio NANBA[2], Toshio SUZUKI[2], Satoru FUKIYA[3], Atsushi YOKOTA[3], Toshiya TODA[1] ([1]Mukogawa Women's Univ., [2]Fujicco Co. Ltd., [3]Hokkaido Univ.)

【目的】

エクオール (Eq) は、大豆イソフラボンの一種ダイゼイン (De) の腸内細菌による代謝産物であり、大豆食品の摂取による多くの生理作用に寄与することが知られている。Eq の産生は、食事因子をはじめとした様々な要因に影響を受けると考えられている。しかし、それらの要因と Eq 産生との関連性はいまだに明らかとなっていない。近年、脂質の過剰摂取により増大した胆汁酸が、その殺菌活性により腸内菌叢のバランスを変化させることが報告されている。そこで本研究では、胆汁酸が Eq 産生能を破綻させる可能性について検討することを目的とした。

【方法】

8 週齢の雄性 C57BL/6 マウスに、0.2%イソフラボン混合物添加飼料 (IS) あるいはイソフラボン無添加飼料 (CO) を与え、それぞれに 0.3%コール酸溶液 (CA) あるいは蒸留水 (DW) を 14 日間自由飲水させた。それぞれの群を CO+DW 群、CO+CA 群、IS+DW 群ならびに IS+CA 群とした。飼育期間終了後、盲腸内容物および血液を採取し、LC-MS/MS により、盲腸内容物中胆汁酸、さらに血液中 De および De 代謝産物である Eq、ジヒドロダイゼイン (DHD) ならびに *O*-デスメチルアンゴレンシン (*O*-DMA) を定量した。

【結果および考察】

飼育期間終了時の体重において、いずれの群においても有意な差は認められなかった。盲腸内の胆汁酸は、CA 投与により二次胆汁酸の増加を示し、特にデオキシコール酸 (DCA) の顕著な増加が認められた。血液中 De 代謝産物は、IS+DW 群においていずれも一定量の産生が認められた。一方で、IS+CA 群においては、Eq は定量限界以下、DHD は有意に低値ならびに *O*-DMA は低下傾向を示した。血液中 De は IS+DW 群と比べ IS+CA 群において有意に高値を示した。DCA は二次胆汁酸の中でも強い毒性を有することから、胆汁酸投与により増加した DCA が De の代謝を抑制することで、Eq の産生量が減少していることが示唆された。このことから、脂質の過剰摂取による胆汁酸分泌量の増大は Eq 産生能を低下させる可能性が考えられた。

equol, bile acids, gut microbiota

講演番号：4C1a12
講演日時：3 月 27 日 11:21～ 1 号館 C1 会場

G protein-coupled receptor を介した curcumin のシグナル伝達機構について
G protein-coupled receptor-mediated signal transduction by curcumin
○奥山 真衣[1]、寺岡 佳晃[1]、原田 直樹[1]、五島 直樹[2]、乾 隆[1]、乾 博[3]、山地 亮一[1]([1]大阪府大院・生命環境、[2]産総研、[3]大阪府大・栄養)
○Mai OKUYAMA[1], Yoshiaki TERAOKA[1], Naoki HARADA[1], Naoki GOSHIMA[2], Takashi INUI[1], Hiroshi INUI[3], Ryoichi YAMAJI[1] ([1]Dept. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]AIST, [3]Dept. Nutr., Osaka Pref. Univ.)

【目的】ヒトゲノム上に約 800 種類存在する G タンパク質共役型受容体（GPCR）は、共役するヘテロ三量体 G タンパク質の種類により Gs、Gi、Gq、G12/13 の 4 つのファミリーに分類され、リガンド結合後にシグナルを伝達することで、血糖調節を含む様々な生理作用調節に関与する。GPCR とそのリガンドとして作用する食品成分の組合せを見出すことは、食品成分の生理作用機構の発見や日々の食事による健康増進への応用につながると考えられる。そこで、GPCR シグナルの下流の転写因子の活性を指標として GPCR の活性化を評価し、GPCR とそのリガンドとなる食品成分の組合せの探索を行った。スクリーニングの結果、ウコン（*Curcuma longa*）に含まれるクルクミノイドである curcumin がある GPCR（GPCRX とする）を活性化させる可能性を見出した。そこで、curcumin の GPCRX を標的とした生理作用機構の解明を本研究の目的とした。
【方法・結果】ヒト胎児腎臓由来 HEK293FT 細胞に SRE 応答ルシフェラーゼ発現ベクターと GPCRX 発現ベクターをトランスフェクションし、curcumin 存在下で 4 時間培養した。ルシフェラーゼレポーターアッセイの結果、curcumin が濃度依存的に SRE を介した転写を活性化させた。また、同様にクルクミン関連化合物の影響について評価した結果、curcumin による作用が最も強く、bisdemethoxycurcumin にも活性化作用が認められた。一方で、tetrahydrocurcumin と ferulic acid には活性促進作用は認められなかった。SRE を介した転写は Gi、Gq、G12/13 の下流で活性化する。Gq の下流のシグナル因子である MAPK の inhibitor である U0126、G12/13 の下流の ROCK の inhibitor である Y-27632 を用いたレポーターアッセイを行った。その結果、Y-27632 存在下で curcumin の作用は消失し、GPCRX と共役する G タンパク質である G12/13 の活性化に起因することが示唆された。また、G12/13 の活性化で見られる serum response factor response element（SRF-RE）を介した転写活性の上昇も確認できた。一方、forskolin による cAMP response element（CRE）を介した転写活性の上昇に対して Gi の活性化で見られる活性抑制は見られなかった。さらに、curcumin が GPCRX のリガンドである可能性を検討するために、GPCRX の立体構造をモデリングし、AutoDuck Vina を用いて curcumin とのドッキングシミュレーションを行った。Lig Plot により curcumin と GPCRX の結合反応に関与する hot spots を推定した結果、いくつかのアミノ酸残基が curcumin と GPCRX の結合に関与する可能性を見出した。GPCRX は glucagon-like peptide-1（GLP-1）産生細胞で高発現していることが認められたため、curcumin の GPCRX を介した GLP-1 分泌促進作用について検討中である。

G protein-coupled receptor, functional food, docking simulation

発表責任者：原田直樹（harada@biochem.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：4C1a13
講演日時：3 月 27 日 11:32～ 1 号館 C1 会場

ウィンターセイボリー摂取後のヒトの体温変化への口腔・咽頭内刺激の影響
Effect of oral stimulation for changes in temperature after ingestion of Winter savory in human
○森 紀之[1,2]、増田 秀樹[3]、深尾 奈央[2]、小林 里穂[2]、蜂須賀 祥子[3] ([1]同女大・生活科学、[2]滋賀県大・人間文化、[3]小川香料株式会社・舞浜研究所)
○ Noriyuki MORI[1,2], Hideki MASUDA[3], NAO FUKAO[2], Riho KOBAYASHI[2], Shoko HACHISUKA[3] ([1]DWCLA of Life Sci., [2]Univ. of Shiga Pref. School of Human Culture, [3]Ogawa & Company Ltd.)

【背景と目的】 冷え性は，通常の人が苦痛を感じない程度の温度環境下において，身体の一部，特に四肢末端や腰部などが他に比べて異常に冷たく感じる症状であり，末梢血管の収縮による末梢部の皮膚血流量減少が主因と考えられている．ウィンターセイボリー（*Satureja montana L.*）はシソ科植物の一種であり，料理の香味づけやセイボリー茶として利用されている．我々はこれまでにウィンターセイボリーエキス（WS：ウィンターセイボリー乾燥葉の熱水抽出物）のカプセル形態での摂取が，ヒトの四肢末梢部の体表温低下抑制，額，首の体表温上昇，深部温の上昇をもたらすことを報告し，さらに WS に含まれるカルバクロール（CAR），チモール（THY）が，それぞれ，体深部での熱産生，体深部から体表面への熱移動に寄与することを示唆している．WS を飲料として飲用するには，口腔内や咽頭内での神経刺激についても考慮する必要があるが，それらの体温変化への影響についてはこれまで不明であった．そこで本研究では，WS 含有飲料の冷え抑制効果について，ウィンターセイボリーによる口腔・咽頭内での刺激の強弱との関連に着目した検討をおこなった．

【方法】 冷え性の調査用問診表を用いたアンケート調査により，冷え性と判断された女子学生を対象とした．試験 1 では，WS 含有飲料（DK）100ml，試験 2 では,WS カプセル（DK 相当量の WS 含有）と湯 100ml，試験 3 では WS 含有飲料 DK5（(DK と同量の CAR，THY を含有するが濃度が 5 倍の飲料）20ml を用いた．試験 1，試験 2 では単回摂取，ダブルブラインド，クロスオーバー，無作為化，プラセボ比較法，試験 3 は，オープンラベル，クロスオーバー，プラセボ比較法で行った．試験は日常の生活条件下（少し肌寒い環境で徐々に手足の温度が低下していく環境）にて，被検物の摂取前後の深部温（鼓膜温），体表温，末梢部血流量の変化の解析を行った．

【結果と考察】 WS 含有飲料 DK 摂取により，手首，手指、足首，足指の体表温低下が抑制され，首の体表温が上昇した（試験 1）． WS カプセルの摂取後は，手首，手指のみ体表温低下が抑制された（試験 2）．さらに，WS 含有飲料 DK5 の摂取は，体表温（手首，手指，足首，足指，額，首），深部温に影響を及ぼした（試験 3）．以上の結果から，WS は飲料形態での摂取においても冷え抑制作用が認められ，さらに，CAR，THY による口腔・咽頭内の刺激が体温に影響を及ぼし，冷え抑制効果を増強する可能性が考えられた．現在，さらに詳細な解析を進めている．

winter savory, body temperature, oral stimulation

講演番号：4C1a14
講演日時：3 月 27 日 11:43～ 1 号館 C1 会場

サツマイモ焼酎及び焼酎油におけるアミロイドβ誘発記憶障害モデルマウスに対する改善作用

Improvement effect on amyloid beta-induced memory impairment model mouse in weetpotato shochu and weetpotato shochu oil

○章 超、河野 邦晃、岩井 謙一 (霧島酒造)
○Cho SHO, Kuniaki KAWANO, Ken-ichi IWAI (Kirishima Shuzo Co., Ltd.)

【背景・目的】
サツマイモ焼酎はサツマイモを主原料とした本格焼酎であり、高級アルコール、脂肪酸エステル、モノテルペンアルコール等の成分を含んでいる。サツマイモ焼酎には自律神経に働く香り成分であるリナロール等が含まれ、ストレスを軽減させる作用が報告されている。また、サツマイモ焼酎の香りが血栓を溶解する酵素を活性化させることも報告されている。これらのストレス改善効果や血行促進効果等活性に繋がり、脳機能改善が期待される。本研究では、アミロイドß誘発自発的交替行動障害モデルマウスに対するサツマイモ焼酎成分の改善作用について検討し、遺伝子発現解析によりその作用機序を考察した。
【方法】
試験試料はサツマイモ焼酎及び焼酎油を使用した。焼酎油はサツマイモ焼酎原酒を冷却し、表面に浮いた物質を採取して液液分離し、油脂成分 (焼酎油)を得た。マウスにサツマイモ焼酎 (Alc.25%)及び焼酎油は 2000mg/kg の用量にて 15 日間経口投与し、投与 8 日目にアミロイド $ß_{25\text{-}35}$ を 10 nmol/mouse を左側脳室内に投与した。試料にはエタノールが含まれているので、アルコールによる感覚神経及び運動神経への直接的な影響を避けるため、最終投与の 24 時間後に Y 字迷路試験によりマウスの自発的交替行動を測定した。自発的交替行動の測定終了後にマウスを海馬及び大脳皮質を採取後、RNAlater に浸漬して処理し冷凍保管した。その後に RNA を抽出し、DNA マイクロアレイでの網羅的遺伝子発現解析を実施した。文献検索等のインフォマティクスを駆使して関与遺伝子を特定し、作用機序を考察した。
【結果・考察】
アミロイド $ß_{25\text{-}35}$ の投与により惹起された自発的交替行動変化率の減少に対してサツマイモ焼酎及び焼酎油は有意な増加を示したことから、マウスの自発的交替行動の障害を改善することが明らかとなった。DNA マイクロアレイでの網羅的遺伝子発現解析結果は、サツマイモ焼酎及び焼酎油を投与することにより記憶・学習機能低下の改善作用機序としては、炎症による機能障害の緩和、異常タンパク質蓄積の改善、免疫応答の制御ならびにタウタンパク質リン酸化の緩和を介して、アミロイド $ß_{25\text{-}35}$ 投与で惹起した脳・神経細胞障害が緩和され、記憶・学習の機能低下を改善することが示唆された。

sweetpotato shochu oil, amyloid beta-induced memory impairment, spontaneous alternation behavior

発表責任者：岩井　謙一（k-iwai@kirishima.co.jp）

講演番号：4C1a15
講演日時：3 月 27 日 11:54～ 1 号館 C1 会場

糸状菌の菌体破砕処理が菌体内二次代謝産物の人工消化液による抽出性に及ぼす影響

The effect of fungal disruption treatment on the extraction of intracellular secondary metabolites *in vitro* digestion

○高橋 勇太郎、李 宗霏、早川 徹、若松 純一、玖村 朗人（北大院農）
○Yutaro TAKAHASHI, Zongfei LI, Toru HAYAKAWA, Jun-ichi WAKAMATSU, Haruto KUMURA (Hokkaido Univ. of Agric.)

【背景】*Monascus* 属の一部は、二次代謝産物として紅色色素を産生することから紅麹菌とも称され、アジア圏で古くから主な米の発酵に利用されてきた。紅麹菌は機能性を有する多様な代謝産物産生する場合があることから、当研究室では乳タンパク質ベース（ホエイタンパク質）の固形培地に紅麹菌を播種してホエイ麹を調製し、これをチーズに添加することで紅麹菌由来の機能性を付与したチーズの製造に関する研究を行っている。現時点の製法ではチーズ中の紅麹菌は生菌の状態にあり、このまま経口摂取したとしても、紅麹菌の菌体内部に留まっている二次代謝産物は生体内で充分に作用し得ない可能性がある。そこで本研究ではホエイ麹上の紅麹菌体に破砕処理を施し、人工消化を行った。代表的な紅麹菌の機能性二次代謝産物であるロバスタチン（Lov）を指標として、人工消化液中に溶出する Lov の量に菌体破砕処理が与える影響を検討した。

【方法】乳糖を分解した 25% WPC80 溶液を pH 4.0 に調整し、オートクレーブすることでホエイ固形培地を調製した。ホエイ固形培地上にナイロン膜を敷き、その上から *M. ruber* NBRC 32318 の胞子を播種して 25℃、10 日間の培養を行った。培養後、ナイロン膜によって分離された菌糸および培養物を別々に回収し、HPLC を用いて Lov を定量した。ナイロン膜上の菌糸を液体窒素中で凍結（F）、液体窒素で凍結後に乳鉢で破砕（FD）、凍結乾燥（L）、凍結乾燥後に乳鉢で破砕（LD）の方法でそれぞれ破砕し、破砕した菌糸をカルコフラワーホワイトによって染色し、観察した。その後、未処理の状態の菌糸（Int）と F、FD、L、LD 処理を施した菌糸をペプシン溶液と混合して消化を行い、引き続き水酸化ナトリウム溶液で pH 6.8 に調整してパンクレアチン溶液を加えて消化を行った。これら人工消化後の上清を回収して凍結乾燥した後、HPLC に供して Lov を測定した。

【結果】破砕処理を施した菌糸を蛍光顕微鏡で観察したところ、Int、F、L では成長した菌糸が観察された。一方で FD、LD では細かい断片に破砕されていた。人工消化試験後、上清中に回収された Lov については Int を含めたすべての破砕処理の間で有意差はみられなかった。すなわち破砕処理の有無に関わらず菌体由来 Lov の大部分は上部消化管内では溶出せず、他の菌体成分とともに下部消化管に流出するものと考えられる。

Monascus, Lovastatin, Whey

講演番号：4C2a01
講演日時：3 月 27 日 09:00～ 1 号館 C2 会場

メチオニン代謝が関与する GTP 生合成の新規な制御機構の解析
Novel regulatory mechanism of Methionine metabolism involved in GTP biosynthesis
○大坂 夏木[1]、高田 啓[2]、兼崎 友[3]、門屋 亨介[4]、田口 精一[1]、吉川 博文[1]、朝井 計[1]([1]東農大院、[2]Umea Univ. MIMS、[3]静岡大 グリーン科学技研、[4]東大・農生科)
○NATSUKI OSAKA[1], HIRAKU TAKADA[2], YU KANESAKI[3], RYOSUKE KADOYA[4], SEIICHI TAGUCHI[1], HIROFUMI YOSHIKAWA[1], KEI ASAI[1] ([1]Tokyo Univ. of Agric., [2]Umea Univ. MIMS, [3]Shizuoka Univ. Res. inst. of green sci. and tech., [4]Tokyo Univ. Grad. Sch. of Agrc. and life sci.)

【背景・目的】細菌の栄養状態に応じた代謝変化には、細胞内の GTP 量が深く関与しており、特にアミノ酸飢餓条件では、細胞内の GTP 量を低下させることが生存に必須であることが知られている。細菌一般において警告物質として知られる核酸小分子(p)ppGpp は、特にアミノ酸飢餓時に顕著に合成・蓄積され、DNA 複製、翻訳といった、あらゆる生体反応に関わる因子に多面的に働き、生体分子の無駄な消費を抑制するが、グラム陽性細菌における主たる標的は、GTP 生合成経路の酵素であることが判明している(Kriel et al. 2012)。 こうした(p)ppGpp による GTP 量の制御については詳細な研究が進められてきているが、制御される GTP の生合成が、他の細胞内のどのような代謝と共役して変化し、アミノ酸飢餓への適応に関与しているのかは、あまり理解されていない。枯草菌において(p)ppGpp 合成酵素遺伝子を全て欠失させた株（ppGpp^0 株）はアミノ酸飢餓時に GTP 量を制御できないため、最少培地において生育が阻害される。その生育阻害を抑圧する変異はこれまでに、*de novo* GTP 生合成に直接関与する遺伝子群に生じることが知られていた。しかし、そのスクリーニングには(p)ppGpp によって生合成が促進されるアミノ酸の一つであるメチオニンを添加した最少培地が用いられていた。本研究では、栄養状態に応じた GTP の量的制御に関与する新たな経路・機構の探索を目的とし、メチオニン非添加の最少培地から ppGpp^0 株の生育阻害を抑圧する変異株の取得と解析を行ってきた。
【方法・結果】取得した抑圧変異株について次世代シーケンサーを用いたマッピング解析を行った結果、RNA ポリメラーゼコア酵素をコードする *rpoB/C* といった、GTP 生合成経路に直接関与しない新規抑圧変異遺伝子を多数同定した。さらに、新規に同定した変異による最少培地における生育阻害抑圧効果は、メチオニン添加によって阻害されることを見出した(メチオニン感受性)。このことから、メチオニンが GTP の量的変化に関与しているのではないかと考え、*rpoB* に変異点を同定した抑圧変異株(*rpoB1*)を用いて、メチオニン感受性と GTP 量との関係性を検証した。*de novo* GTP 合成に関わる GMP 合成酵素 GuaA の阻害剤 Decoyinine を最少培地に添加したところ、*rpoB1* 変異株のメチオニン感受性は解消された。さらに、メチオニン添加・非添加条件における細胞内 GTP 量を HPLC にて解析したところ、野生株では変化が見られなかったのに対し、*rpoB1* 変異株では、添加条件において GTP 量の上昇が見られた。以上の結果から、(p)ppGpp を欠失させた background では、メチオニンが GTP 生合成を活性化させ、アミノ酸飢餓への適応性に影響を及ぼすことが示唆された。本大会では、栄養状態に応じてメチオニン代謝が GTP 量を制御するメカニズムと、その生理的意義について議論したい。

GTP biosynthesis, stringent response, Bacillus subtilis

発表責任者：大坂夏木（44317002@nodai.ac.jp）

講演番号：4C2a02
講演日時：3 月 27 日 09:11～ 1 号館 C2 会場

枯草菌 RNAP の iNTP に対する嗜好性の解析

Analysis of RNA polymerase mutations related to adaptation to amino acid starvation in Bacillus subtilis

○渡辺 愛美[1]、円谷 優佑[1]、大坂 夏木[1]、吉川 博文[1]、朝井 計[1]、兼崎 友[2]([1]東農大農、[2]静岡大・グリーン科学技術)

○Megumi WATANABE[1], Yusuke TSUBURAYA[1], Natsuki OSAKA[1], Hirofumi YOSHIKAWA[1], Kei ASAI[1], Yu KANESAKI[2] ([1]Tokyo Univ. of Agric, [2]Research Institute of Green Science and Technology,Shizuoka Univ)

【背景・目的】

微生物一般において、アミノ酸飢餓時に核酸小分子(p)ppGpp が合成・蓄積し、GTP 生合成を直接阻害することで GTP/ATP 量比が低下する。枯草菌では多くの遺伝子の転写効率が転写開始点の一番目（+1）の塩基に依存しているため、この量比が低下すると、転写開始点+1 の塩基が G である rRNA オペロン等の発現が抑制される。その一方で、転写開始点+1 の塩基が A であるアミノ酸生合成関連遺伝子等の発現が促進される。(p)ppGpp 合成能欠損株(以下(p)ppGpp^{0}株)は、アミノ酸飢餓時に GTP/ATP 量比の制御ができず、最少培地で生育阻害を示す。この生育阻害を抑圧する変異株を取得したところ、RNA ポリメラーゼ(RNAP)コア酵素をコードする *rpoB*、*rpoC* に変異を同定した(以下 *rpoB/C*)。次に HPLC を用いて、細胞内 ATP・GTP 量を解析したところ、アミノ酸飢餓時における *rpoB/C* 抑圧変異株での GTP 量は野生株と比較し低下しない事が分かった。本研究では *rpoB/C* 抑圧変異株が(p)ppGpp^{0}株の最少培地での生育阻害を回避する機構を解明することで、アミノ酸飢餓応答の未知なる生理的意義を理解する事に繋がると考え以下の実験を行った。

【方法・結果】

RNA-seq により抑圧変異株においてアミノ酸飢餓時における遺伝子発現を解析した。その結果、アミノ酸飢餓時に ATP/GTP 量比の上昇によって発現促進されることが知られている+1 が A の遺伝子の発現量は、(p)ppGpp^{0}株と比較し野生株並みに上昇していることが分かった。一方で、アミノ酸飢餓時に発現抑制されることが知られている+1 が G の遺伝子の発現量は、(p)ppGpp^{0}株と比較し野生株並みに抑えられていることが分かった。そこで、*rpoB/C* 抑圧変異株において転写開始点の塩基の違い（+1A 又は+1G）が転写活性に与える影響を *lacZ* assay により野生株と比較したところ、+1A に対し+1G の転写活性が低下した。

以上の結果から、抑圧変異 *rpoB/C* により RNAP の転写開始点+1G におけるヌクレオチドに対する嗜性性が低下したことで、GTP レベルに依存せずアミノ酸飢餓に適応したと考えている。

現在は *in vitro* で抑圧変異 *rpoB/C* により RNAP の転写開始点の塩基（+1A, +1G）におけるヌクレオチドに対する嗜好性があるか検証している。

Bacillus subtilis, Transcription

講演番号：4C2a03
講演日時：3 月 27 日 09:22～ 1 号館 C2 会場

大腸菌高保存性レスポンスレギュレーターファミリーの適応増殖能における役割

Contribution of conserved response regulator family for adaptive growth of *Escherichia coli*

○三宅 裕可里、菅原 真悟、山本 兼由（法政大院理工, 生命）
○Yukari MIYAKE, Shingo SUGAWARA, Kaneyoshi YAMAMOTO (Dept. of Front. Biosci. Grad. Sch. of Sci. & Eng. Univ. of Hosei)

細菌は外環境の変化の感知、感知したシグナルに対する応答、そして環境への適応の 3 つの段階を経て、環境下で最適な増殖を実現する「適応増殖」能をもつと考えられる。この「適応増殖」は、環境に依存した増殖サイクルの安定化に寄与し、細菌生存に不可欠な能力である。細菌情報伝達システム二成分制御系（TCS）は、センサーキナーゼ（SK）とレスポンスレギュレーター（RR）の二つのタンパク質によって形成され、多くの RR はゲノム上の転写を制御する。ほとんどの細菌ゲノムには RR 遺伝子が保存され、アミノ酸配列の類似性から複数のファミリーに分類される。本研究では、細菌 TCS による適応増殖における役割を明らかとすることを目的とした。

細菌のゲノムサイズと COG 上の RR カテゴリー数を調べた結果、ゴンペルツ曲線で近似する相関関係を見出した。5 Mb までの細菌ゲノムではゲノム 1 Mb 当たり 2 個、5 Mb 以上のゲノムサイズの細菌では 8 個の RR カテゴリーを持つことが明らかとなった。この内、OmpR ファミリーはほとんどの細菌に保存されていた。ゲノムサイズ 4.6 Mb の大腸菌は 8 個の RR カテゴリーを持ち、これは 5 種類の RR ファミリーに分類される。全 34 種類の RR は 14 種類の OmpR ファミリー、10 種類の NarL ファミリー、3 種類の NtrC ファミリー、2 種類の CriR ファミリー、2 種類の LytT ファミリーに分類される。このうち、大腸菌細胞内で増殖相を通して安定的に存在し、かつポジティブフィードバック調節を行う RR は OmpR ファミリーの PhoP、PhoB、OmpR の 3 種類であった。そこで、PhoP、PhoB、OmpR の大腸菌細胞における適応増殖への寄与を調べるために、顕微鏡観察によって得られる一細胞分析データについて統計的な解析を行った。

CRISPR-Cas9 システムを用いた大腸菌ゲノム編集により、3 種の RR とその特異的 SK（PhoQ、PhoR、EnvZ）について標的遺伝子への終止コドン挿入実験を行い、各種遺伝子機能欠失株を単離した。単離した菌株を用いて、(1)他の TCS 遺伝子発現への影響、(2)一細胞レベルでの分裂開始までにかかる時間、(3)分裂開始後の増殖速度の 3 点について解析を行った。その結果、RR 遺伝子および SK 遺伝子の機能欠失の組み合わせにより増殖初期の細胞は異なる影響を受け、さらに RR-SK 特異的ペアについて、対応する遺伝子欠失株における増殖初期の表現型は必ずしも一致しないことが示された。加えて 3 つの RR 全てを欠失した株では基準株と同じ増殖初期の表現型を確認した。これらの結果は、大腸菌の適応増殖には TCS が関与するものの、それは複数 TCS システムによるエピスタシスである可能性を示唆するものである。

two-component system, *Escherichia coli*, adaptive growth

発表責任者：山本兼由（kanyamam@hosei.ac.jp）

講演番号：4C2a04
講演日時：3 月 27 日 09:33～ 1 号館 C2 会場

深海好圧性細菌 *Shewanella violacea* ゲノムにコードされた 4 種のペプチド輸送体の大腸菌内発現と機能解析

Functional analysis of 4 peptide transporters from a deep-sea piezophile *Shewanella violacea* in an *Escherichia coli* expression system

○根來 将吾[1]、吉村 歩佳[1]、翠川 雄斗[1]、加藤 千明[2]、阿部 文快[1] ([1]青山学院大理工、[2]海洋研究開発機構)

○Shogo NEGORO[1], Ayuka YOSHIMURA[1], Yuto MIDORIKAWA[1], Chiaki KATO[2], Fumiyoshi ABE[1] ([1]Aoyama Gakuin Univ., [2]JAMSTEC)

【目的】深海は高水圧と低温にさらされ、かつ栄養源の乏しい極限環境である。高水圧と低温は一般に、大気圧下で棲息する生物の膜輸送体の機能を損ない、従属栄養細菌の増殖を制限する。こうした極限環境で窒素源を獲得するため、深海微生物は膜輸送体機能を特殊化している可能性が考えられる。私たちはその手段の一つとしてペプチド輸送体に着目した。深海性好圧性細菌 *Shewanella violacea* のゲノム上で、常圧菌 *Shewanella oneidensis* のペプチド輸送体 $PepT_{So}$ のホモログを検索したところ、4 つのペプチド輸送体が見いだされ、それらを $PepT_{Sv1}$、$PepT_{Sv2}$、$PepT_{Sv3}$、および $PepT_{Sv4}$ と名付けた。興味深いことに、$PepT_{Sv1}$ の膜貫通領域 (TMD) 3 と 4 をつなぐ細胞外領域には、常圧菌のホモログには見られない約 30 アミノ酸残基からなる長いループの存在が予測された。そこで本研究では、各ペプチド輸送体を大腸菌内で発現させペプチド輸送活性を調べるとともに、$PepT_{Sv1}$ のループの役割や TMD 内の重要なアミノ酸残基の同定を目的として機能解析を行った。

【方法】*S. violacea* DSS12 株のゲノム DNA を鋳型として各ペプチド輸送体遺伝子を PCR で増幅し、その断片を pCold TF ベクターに導入して発現プラスミドを構築した。得られたプラスミドを大腸菌 C43 株に導入し、15°C で IPTG による発現誘導を行った後、蛍光ペプチドβ-Ala-Lys (AMCA) を用いた大気圧下での取り込みアッセイを行い、ペプチド輸送能を検証した。$PepT_{Sv1}$ については、[^{3}H]-Ala-Ala を用いた取り込みアッセイも同様に行い、機能評価した。

【結果】GFP 融合型ペプチド輸送体の局在を観察したところ、いずれも大腸菌の細胞膜と菌体の両極に局在することがわかった。大気圧下でβ-Ala-Lys (AMCA) を基質とした輸送能を調べたところ、$PepT_{Sv2}$ 発現株でのみ高い活性がみられた。*S. violacea* は大気圧下でも生存可能なことから、大気圧下では $PepT_{Sv2}$ を利用し、4 つの輸送体を環境に応じて使い分けている可能性が示唆された。次に固有のループ構造を有する $PepT_{Sv1}$ について、基質として[^{3}H]-Ala-Ala を用い輸送活性を調べたところ取り込みが確認された。そこで、他のペプチド輸送体で保存された機能部位の変異体、およびループ構造の欠失体を作製し同様のアッセイを行ったところ、いずれも輸送活性が著しく低下することがわかった。このことから $PepT_{Sv1}$ はペプチド輸送体も基質輸送能を有しており、ループ構造は基質の取り込みや構造の安定性に寄与している可能性が示唆された。

Shewanella violacea, Peptide transporter, Piezophile

講演番号：4C2a05
講演日時：3 月 27 日 09:44～ 1 号館 C2 会場

Methylobacterium extorquens AM1 の環境温度変化適応における時計遺伝子ホモログ KaiC の関与
Involvement of KaiC proteins in adaptation to temperature shift of *Methylobacterium extorquens* AM1

○吉田 裕介、由里本 博也、阪井 康能（京大院農）
○Yusuke YOSHIDA, Hiroya YURIMOTO, Yasuyoshi SAKAI (Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【緒言】植物葉上は温度、湿度、光量等が日周変動する環境であり、葉上に棲息する微生物群はこれらの環境変動に適応しながら生存していると考えられる。葉上微生物の優占種として知られる *Methylobacterium* 属細菌は、葉面に存在するメタノールを炭素源・エネルギー源として利用し、植物に対する生長促進効果を持つ菌株も報告されている。我々はこれまでに、*Methylobacterium extorquens* AM1 において、シアノバクテリアにおける概日時計タンパク質である KaiC のホモログ (KaiC1/KaiC2) が植物への定着に関与し、培養温度によってリン酸化レベルと発現量を制御して UV 耐性に寄与することを報告した [1)]。しかし、環境温度の変化が *Methylobacterium* 属細菌の生育や生理機能に与える影響に関しては知られていない。本研究では、生育中の温度変化が *M. extorquens* AM1 に与える影響とこのときの KaiC1/KaiC2 の機能について調べた。

【方法・結果】*M. extorquens* AM1 を、メタノールを単一炭素源とする最少培地にて OD_{600} が 1.0～1.5 になるまで培養し、培養温度を生育許容温度範囲内である 24～32℃で変化させ、更に培養を継続した場合の生育を調べた。培養温度を 32℃から 28℃ (至適生育温度) 及び 24℃に変化させた場合、生育が一時的に停止し、その後、再開した。生育が停止していた時間は温度によって異なり、24℃では約 8 時間、28℃では約 4 時間であった。一方、24℃から 32℃に変化させた場合の生育は、培養温度を変えずに培養した場合と差がなかった。これらの結果から、低温へのわずかな培養温度の変化が、生育を阻害することが明らかとなった。コハク酸を炭素源とした場合には、このような生育阻害は観察されなかった。メタノール培養時に低温側に変化させた場合、代謝中間体であるホルムアルデヒドの培養液中の濃度が上昇したことから、低温側への温度シフトにより C1 代謝のバランスが崩れて生育阻害が起こっていることがわかった。最後に、*kaiC1/kaiC2* 及びこの制御下にあるレギュレータ *labA* の遺伝子破壊株について、温度変化による生育への影響を調べた。*kaiC1/kaiC2* 破壊株では、32℃から 24℃に変化させた場合、生育が回復しなかった。28℃に変化させた場合も、生育は 7 時間以上停止したが、その後、回復した。*labA* 破壊株では、32℃から 28℃及び 24℃に変化させると生育が 24 時間以上停止した。これらの結果から、KaiC1/KaiC2 及び LabA が外界の温度変化への適応に重要な働きを持つことが明らかとなった。

1) Iguchi *et al*., *Environ Microbiol Rep* 10: 634-643 (2018).

Methylobacterium extorquens AM1, temperature downshift, circadian clock

発表責任者：吉田裕介（yoshida8@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4C2a06
講演日時：3 月 27 日 10:05～ 1 号館 C2 会場

二重層マイクロカプセルを用いた細菌集団の細胞分布制御

Control cell distribution of bacteria population using bilayer microcapsule

○髙橋 晃平[1]、豊福 雅典[2,3]、小川 和義[2]、野村 暢彦[2,3]、Utada Andrew[2,3] ([1]筑波大学・生命環境学群、[2]筑波大学・生命環境系、[3]筑波大学・微生物サスティナブル研究センター)
○Kohei TAKAHASHI[1], Masanori Toyofuku[2,3], Kazuyoshi Ogawa[2], Nobuhiko Nomura[2,3], Andrew Utada[2,3] ([1]Sch. of Life and Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [3]MiCS, Univ. Tsukuba)

【目的】
自然界において細菌は複数種が共存する複合系として存在する。こうした微生物複合系の構成や細菌分布を制御することで、細菌の機能を最大限に発揮させられる可能性がある。例えば生物による排水処理においてはグラニュールと呼ばれる複合微生物凝集体を利用することで効果的な処理が行われている。グラニュールの内部と外部には異なる細菌種が局在しており，その局在性によって活性が高まっていることが知られている。しかしながら、複合細菌の局在がどのように凝集体の活性に影響を与えるか詳細なメカニズムと空間的な解析はなされていない。そこで、本研究では細菌分布の局在の活性影響を解析するため、顕微鏡下での作成・観察が可能なマイクロ流路を用いてゲル化させた二重層のカプセル内に異なる菌体を包括するモデルの作成を行った。
【方法・結果】
近年、生体制御の手法としてマイクロ流路を用いた菌体のカプセル化技術が確立されつつある。菌体を包括するカプセルはアルギン酸溶液を、カルシウムイオンの溶けたオイルによってマイクロ流路中で乳化(エマルション)させドロップレッドを形成した。その後、アルギン酸溶液とオイルに含むカルシウムイオンによりゲル化した。本手法は 50 μm 程度の大きさのカプセルをハイスループットに作成することを実現した。包括された菌体はカプセル中で凝集するように増殖した。さらにモデルとして脱窒細菌をカプセル中に包括すると、好気条件においても脱窒活性を示した。カプセル中で脱窒細菌が凝集体を形成するように増殖し、この凝集体内で形成される酸素勾配により、好気条件でも脱窒活性を高めたと考えられる。
次に人工的な細菌分布の制御のため、二重層（マイクロ）カプセルの作製を行った。前述した方法に加え潤辺の大きい流路を用いて、一度作成したカプセルを再包括することで二重層のカプセルを作成した。二重層マイクロカプセルは内側が 50 μm、外側が 30 μm となりそれぞれに異なる菌体を包括することで細菌分布の制御を可能にした。
今後は内側に嫌気条件下で活性をもつ細菌、外側に好気条件で活性をもつ細菌の分布を制御しながら包括することで、効果的に活性を高められる系を確立していく。

Microfluidics, Encapsulated cell, Aggregated bacteria

発表責任者：高橋晃平（kotrpho1996@gmail.com）

講演番号：4C2a07
講演日時：3 月 27 日 10:16～ 1 号館 C2 会場

マイクロ流体デバイスを用いたプロバイオティクス細菌のカプセル包括法の開発

Microfluidic encapsulation of live bacteria for delivery of probiotic microcapsules

○釣流 香織[1]、尾花 望[2,3]、小川 和義[4]、野村 暢彦[3,4]、Andrew S. UTADA[3,4] ([1]筑波大学・生命環境、[2]筑波大学・医学医療系・トランスボーダー医学研究センター、[3]筑波大学・微生物サステイナビリティ研究センター、[4]筑波大学・生命環境系)
○Kaori TSURYU[1], Nozomu OBANA[2,3], Kazuyoshi OGAWA[4], Nobuhiko NOMURA[3,4], Andrew S. UTADA[3,4] ([1]Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Transborder Medical Research Center, Fac. of Medicine, Univ. Tsukuba, [3]MiCS, Univ. Tsukuba, [4]Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

プロバイオティクスは Fuller（1989）により「腸内フローラのバランスを改善することによって宿主の健康に好影響を与える生きた微生物」と定義されている。例えば、*E. coli.* Nissle 1917 においては、経口摂取により潰瘍性大腸炎の治療に効果があることが報告されている。このような理由から近年プロバイオティクスに注目が集まり、現在プロバイオティクスを直接摂取することで宿主の健康に好影響を得る試みが多くなされている。またこれまでに、嫌気性細菌が多いプロバイオティクス細菌について、生存させたまま保管や、極めて低い pH 環境である胃を介した腸管内への運搬には、様々な包括法が試されている。プロバイオティクス細菌の生存率改善を目的とした様々なカプセルの開発では、カプセル包括による菌の腸内への生存到達率の向上やストレスに対する生存率向上が示されている。しかしこのような生存率の向上には、使用菌株、カプセルの素材・濃度・サイズ、カプセル中の菌の濃度、カプセル中での菌の分布などの複数の因子があり、その関係性は明らかになっておらず、改善の余地があると考えられる。本研究では、マイクロ流体デバイスを用いてプロバイオティクス細菌を包括したマイクロカプセルを作成し、これらの要因の関係性を明らかにすることでプロバイオティクス細菌の生存率向上の可能性を探ること目的とする。

まず初めに、カプセル中の菌の分布のコントロールやカプセルサイズのコントロールを容易に行うため、マイクロ流体デバイスを使用して数 10 μm 程度のアルギン酸カルシウムマイクロカプセルを作成した。続いて、マイクロカプセル中に *E. coli* Nissle 1917 を包括し液体培地中での菌密度の経時変化を調べた。顕微鏡観察の結果、時間経過によりマイクロカプセル中で菌の増殖と凝集体形成を確認し、マイクロカプセル内の菌の濃度・分布制御が可能であると考えられる。今後は、カプセル内の菌の濃度・分布が人工胃液および腸液中や様々なストレス条件下での菌の生存率へ及ぼす影響を調べていく。

Probiotics, Microencapsulation, Microfluidics

講演番号：4C2a08
講演日時：3 月 27 日 10:27～ 1 号館 C2 会場

ミニセルからの大腸菌の再生
Regeneration of E. coli cell from mini-cells
○小林 英城 (海洋機構)
○Hideki KOBAYASHI (JAMSTEC)

【緒言】、大腸菌の分裂変異株から生産されるミニセル（mini-cell）は、ゲノムを含まない大腸菌細胞の一部である。ミニセルはタンパク質合成能が確認され、内膜・外膜が存在するため、エネルギー獲得に必要な呼吸鎖も存在する。一方、ミニセルは自己増殖できず、生物としての条件を満たしていない。そこで、ミニセルにゲノムを挿入し、「生物」として再生することを本研究の目的とした。
【実験方法と結果】大腸菌ミニセル生産変異株 ME8077 株を培養し、フィルター濾過にてミニセルを精製した。精製したミニセル画分は、16SrDNA に対する PCR 法と LB 培地での培養法にて、生細胞の混入が無いことをそれぞれ確認した。なお ME8077 株はマーカーとして pTSMb1（Km 耐性）を保持し、ミニセルにも本プラスミドは含まれている。ミニセルへのゲノム挿入は接合を利用した。ME8077 株は F-株であり、本株由来のミニセルも F-の形質を示す。そこで Hfr 株を用いて大腸菌のゲノムの挿入を試みた。接合後、フィルターにて Hfr 株を除き、ミニセル画分を M9+Km 培地に塗布して、培養をおこなった。Hfr 株のゲノム挿入は、その挿入点、接合条件等を検討した。その結果、0 分付近からそれぞれ時計回り、反時計回りにゲノムを挿入する ME8162 株と RC30 株を用いた場合のみ、４株の再生大腸菌の取得に成功した。再生大腸菌株はそれぞれ R1-R4 として、各種遺伝子マーカーの検証を行った。その結果、R1-4 株はプラスミド由来の Km 耐性を示す一方、ミニセル生産株 ME8077 株が持つ Sm 耐性は無くなっていた。同様にアミノ酸要求性マーカーについてもまた、同様に ME8077 株と R 株は異なっていた。ゲノム構造解析を行うため、ミニセル生産株、ゲノムドナー株、R 株のゲノムを抽出し、PmeI または AscI で切断後、パルスフィールド電気泳動にて切断パターンの解析を行った。その結果、R 株のゲノム切断パターンは、ゲノム供与株である ME8162 株と RC30 株のパターンと類似していた。さらに、各株のゲノムドラフトシーケンスより、多くの部位で転座が起き、R 株間でも異なっていた。
【考察】人工細菌は *Mycoplasma* 属の細菌で行われてきた(1)。*Mycoplasma* 属の生菌を用いて、人工ゲノムに入れ替えという手法が用いられている。今回、成功した方法は生菌ではなく、ミニセルという無生物から、生菌を合成したという点で異なる手法である。また、変異株と接合という細菌従来の振る舞いを利用した方法で成功しているため、自然界でも起きている可能性があるだろう(2)。
【引用文献】
(1)Gibson, DG, et al. *Science* (2010):1190719.
(2)Kobayashi, H. J. Bacterial (2018): JB-00630

Synthetic life, mini-cell, conjugation

発表責任者：小林英城（hi911kobayashi@yahoo.co.jp）

講演番号：4C2a09
講演日時：3 月 27 日 10:38～ 1 号館 C2 会場

金属イオンがバクテリアスフェロプラストの巨大化に与える影響
Influence of metal ions on enlargement of bacterial spheroplasts

○西田 洋巳、西野 弘起（富山県大工）
○Hiromi NISHIDA, Koki NISHINO (Toyama Pref. Univ.)

放射線耐性バクテリア *Deinococcus grandis* はグラム陰性の桿菌である。本バクテリアをリゾチーム処理してスフェロプラストを作製し、細胞壁合成阻害剤を加えたマリン培地でインキュベーションすることによって、巨大化する。培地成分が巨大化に関与していると考え、様々な条件で巨大化の有無を調べたところ、*D. grandis* スフェロプラストの巨大化には、カルシウムイオンあるいはマグネシウムイオンのいずれかが必要であることを明らかにした（Nishino et al., 2018)。これらの金属イオンは外膜の構造安定化に寄与していると考えられた。そこで、これらのイオン濃度を変えて巨大化への影響を調べたところ、333 mM の塩化ナトリウムあるいは塩化カリウムの存在下で、200 mM の塩化カルシウムの場合において、スフェロプラストの連続的な融合が生じ、直径が 0.5 mm を超える超巨大化細胞が生じることを明らかにした（Nishino and Nishida, in press)。興味深いことに、この超巨大化は、マグネシウムイオンではいかなる濃度においても生じなかった。また、この細胞融合は外膜融合によって生じ、内膜は融合せず、その結果、この肉眼でも確認できる超巨大化細胞は、外膜およびペリプラズム空間を共有し、内膜で囲まれた細胞質は、外膜に結合する状態で、数百が独立して存在していることがわかった（Nishino and Nishida, in press)。従来、バクテリアの構造は、細胞壁が担っていると考えられてきたが、外膜も同等あるいはそれ以上の重要な役割を持っていることが明らかになりつつある。*D. grandis* で得られた結果は、その外膜構造が、カルシウムイオンやマグネシウムイオンの影響を強く受けていることを示している。われわれの研究室では、バクテリアのスフェロプラストあるいはプロトプラストの巨大化インキュベーションにおける金属イオンの組成を調整することによって、マイクロインジェクションに適した細胞を創り出すことにも成功している（Takahashi and Nishida, 投稿中)。

引用文献：
Nishino et al. (2018) Enlargement of *Deinococcus grandis* spheroplasts requires Mg^{2+} or Ca^{2+}. Microbiology 164:1361-1371.
Nishino and Nishida (in press) Calcium ion induces outer membrane fusion of *Deinococcus grandis* spheroplasts to generate giant spheroplasts with multiple cytoplasms. FEMS Microbiology Letters

Deinococcus grandis, Spheroplast enlargement, Metal ions

発表責任者：西田洋巳（hnishida@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：4C3a01
講演日時：3 月 27 日 09:00～ 1 号館 C3 会場

糸状菌胞子の新規な高生産プロセスの開発

Development of a novel high production process of fungal spores

○杉本 恭子、小田 忍（金沢工大ゲノム研）
○Kyoko SUGIMOTO, Shinobu ODA (Kanazawa Inst. Technol)

【目 的】

カビの胞子は様々な代謝物の発酵生産や酵素生産、微生物変換のための種菌として有用であり、さらには生物防除剤としての用途もある。このように有用なカビの胞子を安価に大量生産する技術は工業的に重要であり、技術のさらなる革新が強く望まれている。最近演者らは、カビ胞子の新たな用途として固定化胞子による非水系微生物変換システム[1)]や、疎水的な環境における胞子生産性の大幅な向上を報告した[2)]。本研究では、従来より知られている培地中窒素源の低減とカルシウム塩の添加による胞子生産性の向上と、上記の疎水的環境下での胞子生産との相乗効果について検討することを目的とした。

【方 法】

240 株の標準カビと分離カビを対象に、サブロー培地中のペプトン量の半減と塩化カルシウム添加の胞子生産に与える影響を調べた。次に、寒天平板調整容器の疎水性効果を調べるために、ガラスシャーレ、ポリスチレンシャーレ、ポリプロピレン容器間で胞子の生産量を比較した。さらに、寒天平板中へのテフロンネットの埋設効果についても検討した。胞子量の計測は目視観察と Thoma 血球計算盤を用いて行なった。

【結 果】

培養 5 日間でサブロー寒天平板培地全面に胞子を生産した株が供試株全体の約 10%であったのに対し、ペプトン量を半減(0.5%)させた培地では全体の約 30%の株が寒天平板全面に大量の胞子を生産した。一方、カルシウム塩の添加効果は認められなかった。培養器の疎水性効果に関しては、ポリプロピレン容器に調整した寒天平板上で大量の緑色胞子（成熟胞子）の形成が認められた。一方、親水性の高いガラスシャーレに調製した寒天平板上では、ポリプロピレン容器、ポリスチレンシャーレと比較すると成熟胞子の生産量が少なかった。サブロー寒天平板培地中へのテフロンネットの埋設効果と培地組成による胞子生産効果との相乗効果についても興味ある知見が得られた。

1) Oda S, et al., J. Oleo Sci., 67, 1123-1129 (2018).
2) Oda S and Kido R, Fungal Biol., in press.

fungal spore, spore production, hydrophobic polymer

発表責任者：小田 忍（odas@neptune.kanazawa-it.ac.jp）

講演番号：4C3a02
講演日時：3 月 27 日 09:11～ 1 号館 C3 会場

Discovery of a novel gelsolin-like protein regulating septum formation in filamentous fungi
○ Md. Abdulla Al MAMUN[1], Takuya KATAYAMA[1,2], Jun-ichi MARUYAMA[1,2] ([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, The Univ. of Tokyo)

Septum divides the hyphae into individual compartments in filamentous fungi, and cell-to-cell communication depends on the septal pore, which allows the exchange of cytoplasmic constituents between adjacent cells. Septum is formed by constriction of contractile actin ring (CAR), and CAR formation involves regulatory components such as formin conserved both in yeast and filamentous fungi. However, the specific machineries regulating actin dynamics in septum formation is unknown in filamentous fungi. In this study using BLAST and gene ontology-based selection for Pezizomycotina-specific actin regulators, we found an uncharacterized gelsolin-like protein, GelA. Gelsolin is known as an actin-modulating protein with severing activity. GelA has three gelsolin domains and a domain of unknown function (Pfam: DUF4045). Phylogenetic analysis with gelsolin superfamily members exhibited that GelA forms an independent clade consisting of Pezizomycotina orthologs.

We generated a *gelA* deletion strain in *Aspergillus oryzae*, one of the filamentous fungi extensively characterized with fungal septal pore regulation, resulting in moderate growth defect. In particular, *gelA* deletion caused unusually larger interval of septa in all part of the hypahe and abnormal septum morphology. To evaluate the septal pore function, intercellular communication via the septal pore was analyzed by tracking cell-to-cell translocation of Dendra2, a green-to-red photoconvertible fluorescent protein. Upon cold stress in which Dendra2 translocation via the septal pore was ceased in wild type due to septal pore closure, the protein was still translocated to the next cell in Δ*gelA*. Upon hyphal tip bursting by hypotonic shock, Δ*gelA* showed the inability to prevent excessive cytoplasmic loss at the septal pore, similar to the strain deficient in a septal pore-plugging organelle Woronin body. Taken together these results indicated that the regulation of septal pore closure was defective in Δ*gelA*.

When observing actin dynamics with actin marker Lifeact-GFP during septum formation, Δ*gelA* showed improper CAR formation with actin accumulation only at one cortical site or abnormal orientation of CAR, finally not forming a septum. Localization of GelA was found at the site of ongoing septum formation similarly to CAR formation. The present study elucidated a novel actin modulating component, which specifically participates in septum formation by regulating CAR formation in filamentous fungi.

septum, actin, *Aspergillus oryzae*

発表責任者：Jun-ichi MARUYAMA（amarujun@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4C3a03
講演日時：3 月 27 日 09:22～ 1 号館 C3 会場

麹菌 *Aspergillus oryzae* の持つ PQ-loop タンパク質の機能解析
Functional analysis of PQ-loop proteins in *Aspergillus oryzae*

○冨田 直治[1]、吉田 稔[1,2,3]、有岡 学[1,2] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]東大・微生物連携機構、[3]理研環境資源セ)
○Naoya TOMITA[1], Minoru YOSHIDA[1,2,3], Manabu ARIOKA[1,2] ([1]Dept. Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]RIKEN CSRS)

麹菌 *Aspergillus oryzae* のゲノム中には G タンパク質共役型受容体 (GPCR) をコードする遺伝子が 16 個存在する。このうち Class IV に分類される 4 つ (AoGprF、AoGprG、AoGprJ、AoGprS) は PQ-loop タンパク質としても分類されている。PQ-loop タンパク質は膜貫通領域を 7 個持ち、保存されたプロリン-グルタミン連続 2 残基配列を含む PQ-loop モチーフを 2 か所に持つタンパク質群の総称である。その機能として、ヒトのシスチノシン (CTNS) と PQLC2 についてはそれぞれシスチンと塩基性アミノ酸の輸送に関与することが報告されている。また、PQLC2 と高い相同性を示す出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の Ypq タンパク質についても、*ypq1*Δ*ypq2*Δ 株において液胞に塩基性アミノ酸が蓄積することから、液胞膜で塩基性アミノ酸の輸送に機能すると予想されている。以上の知見から、*A. oryzae* が持つ PQ-loop タンパク質もアミノ酸トランスポーターである可能性が考えられた。

そこで本研究では、*A. oryzae* が持つ PQ-loop タンパク質の生理機能を明らかにするため、まず各 PQ-loop タンパク質に EGFP を融合して *A. oryzae* で発現させ、その細胞内局在を観察した。その結果、AoGprF と AoGprG は出芽酵母の Ypq1、Ypq2、Ypq3 と同様に液胞膜に局在することがわかった。一方、AoGprJ は細胞膜や隔壁に局在する様子が観察されたが、AoGprS についてはおそらく分解が起こったため液胞内部にのみ蛍光が見られ、正確な局在を判断するに至らなかった。

S. cerevisiae においては *ypq2*Δ 株でアルギニンのアナログで毒性を示すカナバニンに対して耐性になることが分かっている。そこで *A. oryzae* の PQ-loop タンパク質を *S. cerevisiae ypq2*Δ 株へ導入し、そのカナバニン耐性を観察した。その結果、他の PQ-loop タンパク質を発現させた株と比べ、AoGprG を発現させた株ではカナバニン培地での生育が悪化した。このことから AoGprG は Ypq2 と同様に液胞膜アミノ酸トランスポーターである可能性が示唆された。

興味深いことに、当研究室で行われたマイクロアレイのデータから、オートファジーコア遺伝子である *S. cerevisiae ATG8* 遺伝子のオルソログである *Aoatg8* 破壊株で *AogprG* の発現量が 10 倍近く上昇することが明らかになっている。このことは AoGprG がオートファジーと関連して機能することを示唆する。定量 RT-PCR の結果、別のオートファジーコア遺伝子である *Aoatg1* 破壊株においても同様に *AogprG* の発現量が上昇することが示された。オートファジーとの関連を調べるため、*AogprG* のゲノム上に *egfp* を挿入した株の顕微鏡観察を行った。その結果、野生型株の気中菌糸と比べ、Δ*Aoatg8* 株では培地外側にある菌糸において強い蛍光が観察された。このことから、オートファジーコア遺伝子破壊株で見られる *AogprG* の発現量上昇には、培地外側の菌糸における *AogprG* の発現量上昇が大きく寄与していることが示唆された。

Aspergillus oryzae, Vacuole, Transporter

発表責任者：有岡学（arioka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4C3a04
講演日時：3 月 27 日 09:33～ 1 号館 C3 会場

麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるヌクレオファジーの分子機構の解析
Analysis of molecular mechanisms underlying nucleophagy in *Aspergillus oryzae*
○湯浅 晶[1]、菊間 隆志[2]、吉田 稔[1,3,4]、有岡 学[1,3] ([1]東大院・農生科、[2]立命館大・生命科、[3]東大・微生物連携機構、[4]理研環境資源セ)
○ Aki YUASA[1], Takashi KIKUMA[2], Minoru YOSHIDA[1,3,4], Manabu ARIOKA[1,3] ([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]Dept. of Biotechnol., Ritsumeikan Univ., [3]CRIIM, UTokyo, [4]RIKEN CSRS)

真核生物ではオートファジーにより様々なオルガネラが分解されるが、多核細胞からなる糸状菌においては核全体がオートファジーにより分解されるヌクレオファジーが報告されている。なかでも麹菌 *Aspergillus oryzae* では核全体をオートファゴソームで取り囲み，液胞へ輸送し分解する過程が観察されている。我々は以前、炭素源または窒素源飢餓条件がヌクレオファジーを誘導することを明らかにしたが、本研究では *A. oryzae* におけるヌクレオファジーの分子機構の解明を目指し、以下の 3 点から解析を行った。

1）核膜の分解　現在、*A. oryzae* においてヒストン H2B-EGFP 融合タンパク質発現株を用いたヌクレオファジーの評価系が確立されているが [1)]、本研究ではヌクレオファジーによる核膜の分解を評価する系の確立を目指した。この評価系には核内膜局在タンパク質 AoSrc1 と EGFP の融合タンパク質発現株を用いた。AoSrc1-EGFP 発現株を炭素源や窒素源飢餓培地で培養した後、抗 EGFP 抗体を用いた Western Blotting に供したところ、AoSrc1-EGFP が分解され、液胞プロテアーゼに耐性を持つ EGFP のみのバンドが認められるようになった。以上からヌクレオファジーでは核質のみでなく核膜も分解されることが示された。

2）DNA 損傷による誘導　栄養源飢餓以外のヌクレオファジー誘導条件を探索した。哺乳類でのヌクレオファジーの意義は染色体の統合性維持と考えられていることから、*A. oryzae* のヌクレオファジーが変異誘発剤メチルメタンスルホン酸 (MMS) による DNA 損傷によって誘導されるかを検討した。その結果、MMS 処理によって麹菌の *ATG8* オルソログである *Aoatg8* 依存的にヌクレオファジーが誘導された。また、MMS の添加濃度に応じて誘導されるヌクレオファジーも増加した。この分解が非選択的なバルクオートファジー由来であるかを検討するため、細胞質局在タンパク質 PgkA-EGFP 発現株を用いて評価を行った。その結果、MMS 処理により PgkA-EGFP の分解も亢進した。これらの結果から、MMS 処理は細胞全体に損傷を与え、バルクオートファジーの活性を上昇させること、また核 DNA の損傷はヌクレオファジーを含むオートファジーの誘導条件になり得ることが示唆された。

3）受容体の探索　*A. oryzae* におけるヌクレオファジーの受容体タンパク質を探索した。一般に選択的オートファジーにおいては分解する基質を認識し受容体として機能するタンパク質が存在する。酵母などではこの受容体タンパク質はオートファジー誘導時に隔離膜に局在する Atg8 に結合することが知られていることから、*A. oryzae* のヌクレオファジーにおいても AoAtg8 に結合する受容体タンパク質が存在するものと想定した。Tandem Affinity Purification (TAP) タグを付加した AoAtg8 を発現する *A. oryzae* を炭素源飢餓条件で培養し、AoAtg8 に結合するタンパク質をアフィニティー精製した。現在、MS 解析結果から得られた推定受容体タンパク質の候補について、局在解析と破壊株作製を試みている。1)Kikuma et al., J. Gen. Appl. Microbiol., 63, 139-146 (2017)

Autophagy, *Aspergillus oryzae*, Nucleophagy

発表責任者：有岡学（arioka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4C3a05
講演日時：3 月 27 日 09:44～ 1 号館 C3 会場

Corynebacterium glutamicum NCgl1221 メカノセンシティブチャネルの細胞内局在
Intracellular localization of *Corynebacterium glutamicum* NCgl1221 mechanosensitive channel
○飯塚 有紀、小槌 龍介、岩井 伯隆、和地 正明（東工大生命）
○ Yuki IIZUKA, Ryosuke KOZUCHI, Noritaka IWAI, Masaaki WACHI (Tokyo Tech, of biotechnology)

コリネ型細菌 *Corynebacterium glutamicum* は 1956 年にグルタミン酸生産菌として単離され、工業的発酵生産に用いられてきた。2007 年にメカノセンシティブチャンネル NCgl1221 がグルタミン酸排出担体として機能していることが明らかになった。しかしながら本菌がなぜ大量のグルタミン鎖を細胞外に排出するのかは未だに謎である。そこで *C. glutamicum* における NCgl1221 の生理的な機能を解明するために、本研究では NCgl1221 の細胞内局在性を調べた。

全長 533 アミノ酸残基からなる NCgl1221 は、N-末端側に 3 回膜貫通ドメインと C-末端側に 1 回膜貫通ドメインをもち、その間に長い細胞質ドメインを有している。様々な位置の C 末端側に GFP 遺伝子を融合させた NCgl1221’-GFP 融合遺伝子を作製した。まずこれらを NCgl1221 欠損株に形質転換し、グルタミン酸排出活性を調べた。その結果、NCgl1221 全長に GFP を融合せさせたもの（Full）と細胞質ドメインの後に GFP を融合させたもの（Long）は、グルタミン酸排出能を有していた。しかし、3 回膜貫通ドメインの後（Short）と一つ目の膜貫通ヘリックスの後に GFP を融合させたもの（TM1）は、グルタミン酸排出能を失っていた。次に、超解像蛍光顕微鏡により細胞内局在を観察したところ、Full は蛍光シグナルを観察することができなかったが、Short と TM1 では、細胞膜全体に局在している様子が観察された。一方、Long は、細胞全体にわたってドット状に局在する様子が観察された。また、抗 GPP 抗体を用いたウェスタンブロットでは、Long、Short、TM1 は細胞膜画分に検出できたが、Full はバンドを検出することができなかった。おそらく Full では、C-末端の膜貫通ドメインが膜通過する際に GFP が切断されたと考えられる。これらのことから、グルタミン酸排出活性を持つ NCgl1221 は、細胞全体にドット状に広がるように局在していると考えられる。N 末の 3 回膜貫通ドメインのみではそのような局在を示さなかったことから、細胞質ドメインに局在を決定する部位が存在すると思われる。

Corynebacterium glutamicum, glutamate production, NCgl1221

発表責任者：飯塚有紀（iizuka.y.ad@m.titech.ac.jp）

講演番号：4C3a06
講演日時：3 月 27 日 10:05～ 1 号館 C3 会場

低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 におけるエイコサペンタエン酸修飾タンパク質の探索

Exploration of proteins modified with eicosapetaenoic acid in a psychrotrophic bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10

○米田 雄紀、徳永 智久、川本 純、小川 拓哉、栗原 達夫（京都大学　化学研究所）
○Yuki Yoneda, Tomohisa Tokunaga, Jun Kawamoto, Takuya Ogawa, Tatsuo Kurihara (Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.)

【目的】エイコサペンタエン酸（EPA）やドコサヘキサエン酸（DHA）は、抗炎症作用や抗腫瘍作用を有する生理活性物質であり、細菌から高等生物に至る多様な生物種の生体膜を構成するリン脂質のアシル鎖として存在する。現在、多様なタンパク質が飽和脂肪酸により修飾されることが知られているが、EPA や DHA によるタンパク質の修飾に関する報告例はない。本研究では、脂肪酸鎖のオメガ末端にエチニル基を導入した EPA アナログ（eEPA）を用い、EPA が共有結合的に付加した EPA 修飾タンパク質の探索を試みた。
【方法】EPA 生産性細菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 の EPA 生合成遺伝子を破壊した EPA 非生産株を、eEPA もしくは天然型 EPA を添加した培地で培養し、細胞膜画分を調製した。細胞膜画分をアジドビオチンで標識し、ストレプトアビジンビーズを用いたアフィニティー精製に供した。eEPA 依存的に回収されたタンパク質群は、ペプチドマスフィンガープリンティングで同定した。eEPA 修飾タンパク質と予想される Omp74 について、C 末端 His タグ融合型 Omp74 (Omp74His) 生産株を作製した。上記と同様に、eEPA 修飾されたタンパク質をアフィニティー精製し、細胞膜画分とともに western blot 解析 (一次抗体：抗 Omp74 抗体) に供し、eEPA 修飾されたと予想される Omp74 His 量を定量した。
【結果・考察】eEPA 依存的にアフィニティー精製されたタンパク質群を解析した結果、2 種のペプチダーゼ (Dcp, PepO)、輸送タンパク質 (AcrA)、外膜ポーリン (Omp74)、シャペロン様タンパク質 (FkpA) が同定された。Dcp, PepO, AcrA の N 末端領域には、細菌の脂肪酸修飾タンパク質に保存されるリポボックス配列が存在し、EPA がこれらのタンパク質の修飾に関与していることが示唆された。一方、Omp74 と FkpA にはリポボックス配列が存在しなかったことから、これらのタンパク質には従来知られていなかった様式で EPA が付加していることが示唆された。Omp74 の EPA 修飾について、詳細に解析するために、Omp74His 生産株を作製した。Omp74His 生産株ついて上述のアフィニティー精製を行った結果、eEPA 依存的に Omp74His が回収され、C 末端に His タグを導入した Omp74 も EPA で修飾されるものと考えられた。また、western blot 解析で検出された eEPA 修飾型の Omp74His のバンド強度から、Omp74His の約 4% に eEPA が付加していることが明らかとなった。以上の結果から、本菌において、EPA がリン脂質のアシル鎖に加えて、タンパク質に付加した状態で存在するものと考えられた。

eicosapentaenoic acid, click chemistry, outer-membrane porin

講演番号：4C3a07
講演日時：3 月 27 日 10:16～ 1 号館 C3 会場

有機塩素系殺虫剤の微生物分解に関わる MCE superfamily タンパク質 LinM はホモオリゴマー複合体を形成する

MCE superfamily protein LinM involved in biomineralization of organochlorine pesticide forms homooligomer

○尾形 拓哉、中鉢 千尋、佐藤 優花里、大坪 嘉行、津田 雅孝、永田 裕二（東北大学）
○Takuya OGATA, CHIHIRO CHUBACHI, YUKARI SATO, YOSIYUKI OHTSUBO, MASATAKA TSUDA, YUJI NAGATA (Tohoku Univ)

【背景・目的】

Sphingobium japonicum UT26 株は難分解性の有機塩素系殺虫剤γ-HCH を唯一の炭素源として生育する。推定ペリプラズムタンパク質 LinM は、UT26 株のγ-HCH 最小培地での生育に必須な ABC トランスポーター（LinKLMN）の 1 サブユニットとして同定された。LinM はアミノ酸配列上、MCE（mammalian cell entry)ドメインを有する MCE superfamily タンパク質に属する。MCE superfamily タンパク質は、真核生物や細菌が広く有しており、病原細菌の宿主への感染や真核生物のコレステロールなどの脂質輸送に関与するが、基質輸送の詳細な機構は不明である。本研究では、LinM 及び LinKLMN の立体構造に基づいて MCE superfamily タンパク質を含む ABC トランスポーターの作用機構及び生物学的機能を解明することを最終目標とし、その第一歩として LinM の大腸菌での発現・精製方法を確立することを目的とした。

【方法・結果】

まず、発現ベクターpRSF1b を用いて、推定分泌シグナル配列を除いた LinM の N 末に His タグを融合した LinM（His-LinMs）発現用プラスミドを構築した。本プラスミドで形質転換した大腸菌 BL21(DE3)株を 37℃で 1 時間培養したのち、最終濃度 0.5 mM となるよう IPTG を添加し、更に 18℃で 24 時間培養した。菌体破砕上清から His-LinMs を Ni アフィニティーカラムに吸着してイミダゾールを用いて溶出した。溶出画分をゲル濾過カラムへ流すと約 70%の His-LinMs が不均一な凝集体を形成していると示唆される排除体積に検出された。そこで溶出画分を 5 倍に濃縮してゲル濾過カラムへ流すと His-LinMs は排除体積にほとんど検出されなくなり、100 kDa 以上の分子量の位置に主要なピークとして検出された。この結果から His-LinMs がホモオリゴマー複合体を形成すると推察された。更に、発現ベクターpTXB1 を用いて、タグ非融合の LinM（LinMs）の発現・精製系も確立した。LinMs の分子量をゲル濾過クロマトグラフィーで解析した結果、LinMs のピークが His-LinMs のピークとほぼ同じ位置に検出された。すなわち、ホモオリゴマー複合体形成は His-tag 付与による artifact ではなく、LinMs 自身の性質と考えられる。

ABC transporter, outer membrane, oligomerization

発表責任者：尾形拓哉（t.ogata@ige.tohoku.ac.jp）

講演番号：4C3a08
講演日時：3 月 27 日 10:27～ 1 号館 C3 会場

クテドノバクテリア *Dictyobacter aurantiacus* S27 株の形態分化とゲノム及び二次代謝の特徴
Morphological, genomic, and secondary metabolic features of *Dictyobacter aurantiacus* S27 belonging to the class Ktedonobacteria

○鄭 宇[1]、王 瓊渼[1]、齋藤 彩菜[2]、酒井 康輝[1]、阿部 敬悦[1]、横田 明[1]、矢部 修平[1] ([1]東北大院農、[2]東北大学農学部)
○Yu ZHENG[1], Chiung-Mei WANG[1], Ayana SAITOU[2], Yasuteru SAKAI[1], Keietsu ABE[1], Akira YOKOTA[1], Shuhei YABE[1] ([1]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., [2]Fac. Agric., Tohoku Univ.)

【背景 · 目的】

胞子嚢は古くから真菌や植物特有の形態分化かと考えられてきた。1949 年に初めて胞子嚢を形成する原核生物（放線菌 *Actinoplanes* 属）が発見され、胞子嚢形成は放線菌の代表的な形態学的特徴の 1 つとなった。最近、演者らは Chloroflexi 門・クテドノバクテリ綱に属する新しい科"*Dictyobacteraceae*"のいくつかの菌種が胞子嚢を形成する事を見出した。放線菌以外の原核生物で胞子嚢形成が確認された初めての例である。

クテドノバクテリア綱はグラム陽性、好気性の系統で既報の 3 科は共通して放線菌のような分岐菌糸に胞子を形成し、種々の生物活性を示す菌群である[1-4]。それらのゲノムサイズは大きく（5～13Mb）、放線菌に匹敵するほど多くの新規性の高い二次代謝物生合成遺伝子群を保有する。本報では、既報 3 科とは明かに形態が異なる"*Dictyobacteraceae*"科の胞子嚢形成菌 *Dictyobacter aurantiacus* S27 株のライフサイクルやゲノムの特徴を調べた。

【方法 · 結果】

S27 株のライフサイクルを電子顕微鏡にて観察したところ、分岐した基底菌糸が形成され、やがて胞子嚢柄が気中に向けて伸長し、内部の細胞が胞子嚢胞子へと分化し、柄細胞は膨らんで円形または楕円形（5～10μm）の胞子嚢が形成される。その中には最大で 30 個程度の円形、楕円形または不規則な形態を示す胞子様細胞を含んでいた。S27 株のゲノムを解読した結果、そのサイズは 8.81 Mbp であり、放線菌や真核生物と同様線状ゲノムを有し、2 つ存在することが分かった。antiSMASH v3.0 を用いて二次代謝物生合成遺伝子群を探索した結果、Non-Ribosomal Peptide Synthase (NRPS)、Polyketide Synthase (PKS)、Lantipeptide など、計 13 個の新規性の高い遺伝子群が存在した。各種抗菌活性を調べたところ、グラム陽性菌だけでなく大腸菌、緑膿菌、サルモネラ菌などのグラム陰性菌に対しても強く抗菌活性を示した。その他のゲノムの特徴として、還元的 TCA 回路に必要なほとんどの酵素の相同遺伝子を保持していたため、炭酸固定の可能性の示唆された。

[1] Cavaletti, L. *et al*., Appl Environ Microbiol, 72, 4360-9, 2007 [2] Yabe, S. *et al*., IJSEM, 60, 1794-801, 2010 [3] Yabe, S. *et al*., IJSEM, 61, 903-10, 2011 [4] Xu, B. *et al*., Chem Sci, 9, 7311-7317, 2018

Ktedonobacteria, Sporangium forming morphology, Huge genome and Novel secondary metabolites

発表責任者：矢部修平（shuhei.yabe.b2@tohoku.ac.jp）

講演番号：4C3a09
講演日時：3 月 27 日 10:38～ 1 号館 C3 会場

発酵食品に関する微生物のメンブランベシクルの特性の解明
Characterization of membrane vesicles of microorganisms involved in fermented foods.
○倉田 淳志[1]、清原 昇悟[1]、宮崎 綾乃[1]、三好 柚紀[2]、山崎 思乃[3]、今井 友也[4]、栗原 達夫[5]、上垣 浩一[1]([1]近大農、[2]関西大院理工、[3]関西大化生工、[4]京大生存研、[5]京大化研)
○ Atsushi KURATA[1], Shogo KIYOHARA[1], Ayano MIYAZAKI[1], Yuki MIYOSHI[2], Shino YAMASAKI-YASHIKI[3], Tomoya IMAI[4], Tatsuo KURIHARA[5], Kouichi UEGAKI[1] ([1]Kindai Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Eng. Kansai Univ., [3]Kansai Univ., [4]RISH Kyoto Univ., [5]Inst. Chem. Res. Kyoto Univ.)

環境中の多くの細菌は、ナノサイズの細胞外膜小胞（メンブランベシクル）を生産する。メンブランベシクルは球状の構造体であり、その内部には細菌由来のタンパク質や核酸が含まれる。メンブランベシクルの機能として免疫応答機能や細胞間情報伝達機能などが注目されている。

発酵食品は、細菌を活用して得られる伝統的食品群である。その発酵工程では、細菌群が様々な代謝産物を放出しており、嗜好性に富んだ発酵食品が醸成される。一方、動物の腸管には特徴的な細菌が細菌叢を形成しており、多様な代謝産物を放出することで宿主の生理機能へ深く影響を与えている。

現在、多様な細菌叢が認められる腸管や発酵食品において、メンブランベシクルの存在や機能について不明な点が多い。本研究では、発酵食品や腸管のメンブランベシクルの検出を試みた。さらに、乳酸菌やビフィズス菌由来のメンブランベシクルの検出を試み、その特性を検討した。

メンブランベシクルの定量には脂質特異的な蛍光色素 FM4-64 を用いて、メンブランベシクルの観察には透過型電子顕微鏡を用いた。まず発酵乳や酒粕、味噌などの発酵食品、ラット腸管からメンブランベシクル画分を調製した。これらの画分を分析した結果、多量のメンブランベシクルを検出できた。次にラット腸管から *Lactobacillus johnsonii* を分離して検討したところ、その培養液からメンブランベシクルを検出できた。

一方、メンブランベシクルを高生産した *Lactobacillus acidophilus* を用いて、メンブランベシクル画分に含まれるタンパク質と核酸を分析した。その結果、GroEL や GroES、リボソームタンパク質などを見いだした。一方、核酸を定量した結果、RNA 量は DNA 量の 14 倍であった。RNA-seq 分析の結果、主にリボソーム RNA 由来の GU rich な短鎖 RNA（平均 30 bp）を見いだした。さらにマクロファージやパイエル板細胞を用いて、*Lactobacillus acidophilus* や *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* のメンブランベシクル画分による影響を検討した。

membrane vesicles, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*

発表責任者：倉田淳志（kurata090401@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：4C3a10
講演日時：3 月 27 日 10:49～ 1 号館 C3 会場

深海底泥由来単離株 51-CS のメンブランベシクルの特性解明

Characterization of membrane vesicles of a bacterial isolate 51-CS from deep-sea sediment

○福井 瑞季[1]、倉田 淳志[2]、三好 柚紀[3]、山崎 思乃[4]、今井 友也[5]、栗原 達夫[6]、上垣 浩一[2]([1]近大院農、[2]近大農、[3]関西大院理工、[4]関西大化生工、[5]京大生存研、[6]京大化研)
○Mizuki FUKUI[1], Atsushi KURATA[2], Yuki MIYOSHI[3], Shino YAMASAKI-YASHIKI[4], Tomoya IMAI[5], Tatsuo KURIHARA[6], Kouichi UEGAKI[2] ([1]Grad. Sch. of Agric. Kindai Univ., [2]Kindai Univ., [3]Grad. Sch. Sci. Eng. Kansai Univ., [4]Kansai Univ., [5]RISH Kyoto Univ., [6]Inst. Chem. Res. Kyoto Univ.)

細胞外膜小胞（メンブランベシクル）は、細菌が生産する主に細胞膜からなる構造体であり、その内部にタンパク質や核酸などが含まれる。近年、メンブランベシクルが遺伝子伝播に関与し、免疫細胞に影響を与えることが明らかになりつつある。海洋では、表層から深度 500 m までメンブランベシクルが存在するが、これまで海洋由来のメンブランベシクル生産菌はほとんど探索されておらず、メンブランベシクルの特性については検討されていない。

本研究では、深海底泥由来の細菌群集を単離源に、メンブランベシクル生産菌を探索した。得られた単離株のメンブランベシクルを用いて、特性の解明を試みた。

まず、相模トラフ（深度 246 m – 928 m）由来の細菌群集 61 種類を単離源に、培養液中にメンブランベシクルを生産する細菌を探索した。蛍光色素 FM4-64 を用いて培養液上清中のメンブランベシクル生産量を比較した結果、メンブランベシクル生産菌として単離株 51-CS 株、51-WL 株を見いだした。51-CS 株は、51-WL 株よりメンブランベシクル生産能に優れていたため、本菌株の生産するメンブランベシクルを用いた。

次に 51-CS 株のゲノム DNA（4,095,040 bp）を解析したところ、16S rRNA 遺伝子の配列（1551 bp）から、本菌株は *Bacillus subtilis* に分類できた。続いて、本菌株の生産するメンブランベシクル量を検討した。培養液からメンブランベシクル画分を調製して、さらにゲルろ過クロマトグラフィーによる分画を行い、電気抵抗ナノパルス法によって、ゲル濾過画分のメンブランベシクルの大きさと個数を検討した。その結果、本メンブランベシクルの直径は平均 85.8 nm（485 nm – 51 nm）であった。各画分には、1.2×10^{9} 個～2.6×10^{11} 個のメンブランベシクルが含まれていたことから、少なくとも本培養液には 3.8×10^{10} 個/mL のメンブランベシクルが含まれると示唆された。

メンブランベシクル画分を分析した結果、タンパク質、DNA、RNA を検出できた。メンブランベシクル画分中には 11,309 bp とスメアー状の DNA を検出できた。一方、SDS-PAGE を行い、主なタンパク質（それぞれ 75 kDa、60 kDa、30 kDa 付近）がメンブランベシクル画分に含まれていることを見いだした。さらに、マウスパイエル板細胞を用いて、51-CS 株のメンブランベシクル画分による IgA 産生の促進作用の検討を試みた。

membrane vesicles, deep-sea sediment, *Bacillus subtilis* 51-CS

発表責任者：福井瑞季（1833670013j@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：4C3a11
講演日時：3 月 27 日 11:10～ 1 号館 C3 会場

枯草菌における membrane vesicle の生産制御機構

Mechanism of membrnae vesicle produciton in Bacillus subtilis

○安部 公博[1]、尾花 望[2]、豊福 雅典[1]、野村 暢彦[1] ([1]筑波大 生命環境、[2]筑波大 医学医療)
○Kimihiro ABE[1], Nozomu OBANA[2], Masanori TOYOFUKU[1], Nobuhiko NOMURA[1] ([1]Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]TMRC, Fac. Med., Univ. Tsukuba)

Membrane vesicle は、細菌が菌体外へ放出する球状の膜小胞であり、DNA・RNA やシグナル物質の細胞間輸送に寄与することが知られている。グラム陰性細菌では、細胞外膜が菌体表面から剥離することで形成されるため、outer membrane vesicle とも呼ばれるが、近年、グラム陽性細菌においても、membrane vesicle が生産されることが明らかとなってきた。しかしながら、グラム陽性細菌における membrane vesicle 生産の分子機構については、不明な点が多い。現在までに、枯草菌における membrane vesicle 生産は、PBSX 領域にコードされる溶菌酵素が担っていることが報告されている (Toyofuku *et al*., 2017)。枯草菌をファージ誘発剤(mitomycin C)で処理すると、PBSX 由来の溶菌酵素の発現が誘導される。そして、PBSX 由来の溶菌酵素の作用により細胞壁が溶解されると、細胞膜が外へ飛び出て membrane vesicle として放出される。一方、枯草菌を BHI (Brain Heart Infusion)培地で培養すると、mitomycin C の非存在下でも、membrane vesicle が作られることがわかっている。本研究は、枯草菌の prophage 非依存的な membrane vesicle 生産のメカニズムの解明を目的とした。

一般的に、真正細菌は prophage 等の外来因子由来だけではなく、菌体の分離や細胞壁の turnover に関与する多数の細胞壁溶解酵素を有する。そこで今回、枯草菌固有の細胞壁溶解酵素が、membrane vesicle 生産に関与するかを調べた。枯草菌 168 株の細胞壁溶解酵素をコードする遺伝子群の欠損株を作製し、その各変異体において BHI 培地中に産生された membrane vesicle 量を定量した。その結果、主に σ^D によって転写制御される細胞壁溶解酵素遺伝子の欠損株において、membrane vesicle の生産量の低下がみられた。このことから、枯草菌は prophage 由来の溶菌酵素のみならず、枯草菌が元来持つ細胞壁溶解酵素を利用して、membrane vesicle を生産することが示唆された。

Bacillus subtilis, membrane vesicle, autolysin

講演番号：4C3a12
講演日時：3 月 27 日 11:21～ 1 号館 C3 会場

Corynebacterium glutamicum における membrane vesicles 産生メカニズムの解析
Investigation of the mechanism of membrane vesicles production in Corynebacterium glutamicum
○永久保 利紀[1]、野村 暢彦[1,2]、豊福 雅典[1,2] ([1]筑波大・生命環境系、[2]筑波大学・微生物サステイナビリティ研究センター)
○Toshiki NAGAKUBO[1], Nobuhiko NOMURA[1,2], Masanori TOYOFUKU[1,2] ([1]Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, [2]MiCS, University of Tsukuba)

【背景・目的】
Membrane vesicle (MV)は、生体膜からなる直径 20～400nm 程度の球状構造体であり、近年、世界中で大きな注目を集めている。微生物は普遍的に MV をつくることが知られており、その生物学的役割が明らかにされつつある。これらの MV の特性は、新しい微生物制御法や細胞間のドラッグデリバリーなどへの応用が期待されているが、それには MV の産生メカニズムを明らかにすることが必要不可欠である。これまでに、2 種のモデル微生物(グラム陰性菌 *P. aeruginosa* とグラム陽性菌 *B. subtilis*)においては、ファージ由来細胞壁分解酵素が関与する普遍的 MV 産生メカニズムが明らかにされている(Turnbull, L. *et al. Nature Commun.* [2016]; Toyofuku, M. *et al. Nature Commun.* [2017])。どちらの菌でも、ファージ放出に関わる酵素による細胞壁の分解が引き金となり、MV が形成される。一方で、重厚な細胞表層構造を有するミコール酸含有細菌の MV 形成過程を明らかにした例は皆無であり、MV 産生メカニズムに残された大きな謎の一つである。そこで、我々は、細胞表層にミコール酸を含む放線菌の一種であり、グルタミン酸などの有用物質の生産菌として知られる *Corynebacterium glutamicum* を対象として、MV 形成メカニズムの解明を進めた。
【方法・結果】
まず、*C. glutamicum* が MV を産生する条件の特定に取り組んだ。その結果、本菌がグルタミン酸過剰生産条件において MV を細胞外に放出することを発見した。さらに、培地に mitomycin C を添加し、本菌に DNA ストレスを与えた条件においても、本菌が MV を産生することも明らかにした。次に、密度勾配遠心により、各条件における MV を精製した。そして、精製後の MV を各種クロマトグラフィーおよび質量分析に供し、各 MV を構成する生体分子（脂質、タンパク質等）の組成が互いに大きく異なることを明らかにした。また、*C. glutamicum* における MV 形成過程を可視化することにも成功した。さらに、以上の実験結果に基づき、本菌において MV 産生に関わる遺伝子を推定し、当該遺伝子の破壊および相補によりその機能を調べた。
本研究により、*C. glutamicum* が MV を産生する際の経路が複数存在することが示唆された。今後、それらの機能についても解析を進めていく予定である。

Membrane vesicles, *Corynebacterium glutamicum*, Mycolic acid-containing bacteria

発表責任者：永久保　利紀（nagakubo.toshiki.gp@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：4C3a13
講演日時：3 月 27 日 11:32～ 1 号館 C3 会場

細菌 *Clostridium thermocellum* のメンブランベシクル生産とセルロース分解能への寄与
Contribution of membrane vesicle from a cellulolytic bacterium *Clostridium thermcellum* for the cellulolytic ability

○市川 俊輔[1]、小川 覚[2]、西田 郁美[3]、小林 柚姫[1]、黒澤 俊人[4]、苅田 修一[5]（[1]三重大教、[2]三重大医、[3]三重大院教、[4]三重大先端、[5]三重大院生資）
○ Shunsuke Ichikawa[1], Satoru Ogawa[2], Ayami Nishida[3], Yuzuki Kobayashi[1], Toshihito Kurosawa[4], Shuichi Karita[5] ([1]Fac. Edu., Mie Univ., [2]Fac. Med., Mie Univ., [3]Grad. Sch. Edu., Mie Univ., [4]Adv. Sci. Res. Prom. Cent., Mie Univ., [5]Grad. Sch. Bio., Mie Univ.)

セルロース分解細菌は、土壌・温泉・牛のルーメン・シロアリの腸・人間の腸管などの多様な環境から単離されている。グラム陽性好熱嫌気性土壌細菌 *Clostridium thermocellum* はセルロース分解能が特に高いため、セルロース系バイオマス利活用の候補微生物とされている(Akinosho *et al.* 2014. Front Chem. 2: 66., Ichikawa *et al.* 2015. FEMS Microbiol. Lett. 362: fnv202.)。*C. thermocellum* を含むいくつかのセルロース分解細菌は、糖質関連酵素酵素複合体セルロソームを形成し、これにより効率的にセルロース系バイオマスを分解・資化する(Doi *et al.* 2004. Nat. Rev. Microbiol. 2: 541.)。

クオラムセンシングに代表される細胞間コミュニケーションは、*C. thermocellum* のセルロース分解活性にとっても重要であると予想される。細菌が放出する脂質二重層膜からなる小胞（Membrane vesicle: MV）は、タンパク質・核酸・シグナル伝達化合物などの様々な分子を運ぶことによって、細胞間コミュニケーション・毒性発現・抗生物質耐性・遺伝子水平伝搬などに寄与する(Brown *et al.* 2016. Nat. Rev. Microbiol. 13: 620.)。

C. thermocellum を 0.5%セルロース（Avicel）で 3 日培養し、細胞を酢酸ウラニル染色して TEM で観察したところ、*C. thermocellum* 細胞の周囲に小胞状の構造が観察された。*C. thermocellum* 培養液の遠心分離後上清を 0.22μm フィルターでろ過し、ろ液を超遠心分離（195,000xg, 1h）した後の沈殿をリンタングステン酸染色して TEM で観察することで、*C. thermocellum* が直径 50-500nm 程度の MV を培養液中に放出していることを確認した。セルロソームに特異的に結合する一次抗体と、一次抗体に結合する金コロイド標識二次抗体を用いて、MV 表面 1μm^2 あたりに 25 個のセルロソームが存在することを明らかにした。培養液から回収した MV 画分に Avicel 分解活性があることを確認した。細菌由来界面活性化合物であるサーファクチンは、MV の破砕効果を有する(Brown *et al.* 2014. Mol. Microbiol. 93: 183–198.)。サーファクチン処理によって、MV 画分の可溶性セルロース（Carboxymethyl cellulose）の分解活性に影響はなかったが、Avicel の分解活性は有意に低下した。以上の結果より、セルロース分解細菌 *C. thermocellum* は MV を培養液中に分泌し、そこにセルロソームを局在させることで、セルロースの分解活性を向上させているものと予想された。

membrane vesicle, cellulase, cellulolytic bacterium

発表責任者：市川俊輔（ichikawa@edu.mie-u.ac.jp）

講演番号：4C3a14
講演日時：3 月 27 日 11:43～ 1 号館 C3 会場

細胞外環境に応答した推定センサータンパク質を介する細菌のベシクル生産制御
Regulation of bacterial vesicle production via a putative sensor protein in response to the extracellular environments
○横山 文秋[1]、川本 純[1]、陳 晨[1]、今井 友也[2]、栗原 達夫[1] ([1]京大・化研、[2]京大・生存研)
○Fumiaki YOKOYAMA[1], Jun KAWAMOTO[1], Chen CHEN[1], Tomoya IMAI[2], Tatsuo KURIHARA[1] ([1]Institute for Chemical Research, Kyoto Univ., [2]Research Institute for Sustainable Humanosphere, Kyoto Univ.)

【背景】
多くの細菌がナノ粒子であるベシクルを細胞外に分泌している。タンパク質や核酸を内包するベシクルを利用した細胞間コミュニケーションやバイオフィルム形成などを介し、細菌は生育環境における生存を図っている。それゆえ、ベシクルの生産量や内包物は環境条件に応じて調節されていると考えられる。しかし現在、いくつかのベシクル生産機構は示されているが、細胞外環境に応答した細菌のベシクル分泌制御についてはその多くが明らかとなっていない。

グラム陰性細菌である *Shewanella* sp. HM13 はベシクル研究モデルとして優れた 2 つの特徴を有している。一つは、大腸菌と比較して脂質量換算で 9 倍となる高いベシクル生産能であり、ベシクルの生化学的な解析などが比較的容易にできると考えられる。もう一つは、ベシクルに高純度で内包されたタンパク質（P49）であり、タンパク質の選択的ベシクル移行機構の解析およびベシクル基盤型外来タンパク質生産系への応用に適している。P49 遺伝子やその上流に存在する II 型分泌装置構成タンパク質 PulD ホモログ遺伝子の欠損はベシクル生産量に影響しない。そこで、ベシクル中のマイナータンパク質を解析するために、*pulD* 欠損株が分泌する P49 を欠いたベシクルに対して二次元電気泳動を用いたプロテオミクス解析を行い、センサータンパク質ホモログ（HM1275）などを同定した。

【結果と考察】
HHpred や BLAST を用いた解析から、HM1275 は小分子などの結合領域として知られる PAS ドメインとメチル受容走化性タンパク質(MCP)センシングドメインを有していることが推定された。HM1275 は、細菌生育環境に存在する分子の PAS ドメインへの結合によって生じたシグナルを MCP センシングドメインによって下流の経路に伝達していることを仮説として、このタンパク質のベシクル生産への関与を解析した。貧栄養完全合成培地である M79 に含まれるカザミノ酸濃度を 2 倍にすると、野生株のベシクル生産量は増加したが HM1275 欠損株のそれは変化しなかった。センサータンパク質と推定される HM1275 はカザミノ酸中に含まれる分子をシグナルとして認識し、その濃度に応じて未知の経路を介してベシクル生産量の制御に関わっていることが考えられる。現在、シグナル分子を同定するために、M79 培地に 2 倍濃度のカザミノ酸に相当するアミノ酸を数種類添加し、抗 LPS 抗体によるドットブロットによって培養上清中のベシクル量を解析している。

Membrane vesicle, Sensor protein, Sensing

発表責任者：横山 文秋（yokoyama@mbc.kuicr.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4C3a15
講演日時：3 月 27 日 11:54～ 1 号館 C3 会場

低温菌 *Pseudoalteromonas* sp. Sq02 株を宿主としたタンパク質低温分泌生産システムの構築と応用

Construction and application of a low-temperature secretory production system of recombinant proteins by using a psychrotrophic bacterium, *Pseudoalteromonas* sp. Sq0

○河合 総一郎、Puti Wanguyu Aken、川本 純、小川 拓哉、栗原 達夫（京大化研）
○Soichiro KAWAI, Aken Puti Wanguyu, Jun KAWAMOTO, Takuya OGAWA, Tatsuo KURIHARA (Institute for Chemical Research, Kyoto Univ.)

【目的】低温菌を宿主としたタンパク質低温生産系は、目的タンパク質の熱変性が緩和される生産系として有用である。また、目的タンパク質の活性が抑制されることで、宿主細胞への毒性が軽減されることが期待される。本研究では、ハマチ (*Seriola quinqueradiata*) の腸管由来の低温適応性グラム陰性細菌 *Pseudoalteromonas* sp. Sq02 を宿主とした低温でのタンパク質生産システムの開発に取り組んだ。

【方法】ハマチ腸管の内容物を 3%の塩化ナトリウムを含有した Luria Broth (3% LB)寒天培地に塗布して、4 °C で良好に生育する菌体を単離した。それらを 3% LB 液体培養に供して、分泌タンパク質生産能に優れた菌体を選抜し、16S rRNA 解析により同定した。分泌生産能に優れた菌体として単離した菌株、*Pseudoalteromonas* sp. Sq02 の主要な分泌タンパク質 (P320) の N 末端アミノ酸配列と本菌の全ゲノム配列を照合し、P320 遺伝子を同定した。本遺伝子の 5' 非翻訳領域よりプロモーターと推定される領域を見いだし、広宿主域プラスミド pJRD215-Cm に導入した。その下流に、*Pseudomonas syringae* 由来のβ-ラクタマーゼ、好冷菌 *Desulfotalea psychrophila* DSM12343 由来の熱感受性の高い 4 種のタンパク質、PepF、LAP、PepQ、BglA の遺伝子を導入し、それらの生産を試みた。発現用プラスミドは *Escherichia coli* S17-1/λ*pir* からの接合伝達により *Pseudoalteromonas* sp. Sq02 に導入した。低温で培養後、細胞抽出液中の外来タンパク質を定量し、既存のタンパク質生産システムとの発現量の比較を行った。また、P320 の C 末端に PepF、LAP、PepQ、BglA を融合したタンパク質の発現用プラスミドを *Pseudoalteromonas* sp. Sq02 に導入し、本菌を用いた異種タンパク質分泌生産系の開発を試みた。培養後の上清を TCA 沈殿に供し、分泌タンパク質を回収した。回収した分泌タンパク質を SDS-PAGE により検出し、融合タンパク質の生産量を解析した。

【結果】ハマチの腸管から 18 ºC 及び 4 °C での生育速度と分泌タンパク質生産能に秀でた低温菌 *Pseudoalteromonas* sp. Sq02 を単離した。本菌を様々な塩濃度の LB 培地にて培養を行った結果、終濃度 3%の塩化ナトリウムを含む LB 培地で 18 °C から 4 °C で良好に生育し、培養上清に機能未知の分泌タンパク質 P320 を分泌することが見出された。P320 遺伝子の上流より見いだされたプロモーターと推定される領域の制御下でβ-ラクタマーゼを発現した結果、その比活性は、18 °C で 23.8 U/mg、4 °C で 13.8 U/mg であり、既存の低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 を宿主とするタンパク質低温生産系と比較して、18 °C で 1.8 倍、4 °C で 2 倍高い比活性を示した。熱感受性の高い好冷菌 *D. psychrophila* DSM12343 由来の好冷性タンパク質 PepF、LAP、PepQ、BglA については、*S. livingstonensis* Ac10 の低温生産系と比較して、18 °C ではそれぞれ 1.0 倍、5.2 倍、1.2 倍、3.2 倍、4 °C ではそれぞれ 5.3 倍、4.1 倍、7.1 倍、10 倍高い生産量を示し、既存の生産系に対する優位性が認められた。また、分泌タンパク質である P320 の C 末端に PepF、LAP、PepQ、BglA を融合したタンパク質の遺伝子を組み込んだプラスミドを導入した *Pseudoalteromonas* sp. Sq02 では、培養液上清に融合タンパク質が分泌されることが確認された。検出された各タンパク質の生産量を定量した結果、18 ºC において PepF では 55.4 mg/L、LAP では 79.4 mg/L、PepQ では 31.2 mg/L、BglA では 76.5 mg/L であった。一方、4 ºC においても PepF では 22.1 mg/L、LAP では 36.9 mg/L、PepQ では 15.2 mg/L、BglA では 37.2 mg/L の生産量を確認できた。以上の結果から、P320 の分泌能を利用することで、低温における異種タンパク質の分泌生産が可能であることが示された。

cold-adapted microorganism, protein expression, secreted protein

発表責任者：河合　総一郎（kawai@mbc.kuicr.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4C4a01
講演日時：3 月 27 日 09:00～ 1 号館 C4 会場

超低栄養性細菌におけるアルデヒド脱水素酵素遺伝子(*aldA*)の発現制御

Transcriptional regulation of *aldA* encoding an aldehyde dehydrogenase in extreme oligotrophs

○池ヶ谷 凌士[1]、加藤 弘将[2]、新谷 政己[1,2]、吉田 信行[1,2] ([1]静大院・総合科技、[2]静大・工)
○Ryoji IKEGAYA[1], Hiromasa KATO[2], Masaki SHINTANI[1,2], Nobuyuki YOSHIDA[1,2] ([1]Grad. Sch. Shizuoka Univ., [2]Shizuoka Univ.)

【目的】備蓄原油中から単離された *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株は、炭素源およびエネルギー源無添加の無機培地で良好に生育し、大気中の CO_2 を利用して生育するという超低栄養性を示す。本菌の炭素代謝については不明な点が多いが、栄養が乏しい条件下で生育するための独特なシステムを持っていると予想している。これまでの研究で、NAD 依存性のアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする *aldA* が本菌の低栄養生育に必須であり、低栄養条件下（BM 培地）では富栄養条件下（LB 培地）に比べ、その転写量が 200 倍にも増加することが明らかになっている。そこで本研究では，N9T-4 株の低栄養条件応答性システムの解明を目的とし、*aldA* の上流にあると想定される，低栄養条件応答性プロモーター領域を探索するとともに、*aldA* とその上流領域のどちらが、本菌の持つ超低栄養性に大きく寄与しているのかを検討した。

【方法および結果】*aldA* のプロモーター領域を同定する手法として、ルシフェラーゼアッセイを用いた。目的のプロモーター領域は *aldA* の上流 1,000 bp 以内にあると想定し、レポータープラスミドである pKLA1 上のルシフェラーゼをコードする遺伝子である *luxAB* 上流に、200 bp～1000 bp の長さの異なる *aldA* 上流配列を組み込んだ。これらのプラスミドを導入した N9T-4 株を BM 培地と LB 培地で培養後、菌体液をルシフェラーゼアッセイの反応液に加え、発光強度を測定した。その結果、プロモーター領域は、*aldA* 上流 200 bp 以内にあることが明らかとなった。

次に、*Rhodococcus* 属の中で N9T-4 株よりも低い低栄養性を示す *R. josti* RHA1 株を比較対象とし、N9T-4 株と RHA1 株の *aldA* およびその上流 200 bp の配列を比較したところ、*aldA* の相同性は 88 %であるのに対し、上流 200 bp の相同性は 37 %と非常に低いことが明らかになった。そこで、*aldA* 上流 200 bp が低栄養性に大きく寄与しているという予想のもと、相補実験を行った。N9T-4 株と RHA1 株由来の *aldA* 及びその上流 200 bp をそれぞれ増幅し、組み合わせたものを大腸菌-*Rhodococcus* のシャトルプラスミド pNit-RC2 に組み込み、４種類のプラスミドを構築した。これらのプラスミドを N9T-4Δ*aldA* 株に導入し、BM 培地における生育を比較した。その結果、４種の形質転換体には生育の差がみられなかったことから、N9T-4 株と RHA1 株由来のどちらの *aldA* 及びその上流 200 bp とも、N9T-4 株において低栄養生育を発揮するに十分であることが分かった。これらの結果より、N9T-4 株の低栄養性の強さの要因は、*aldA* およびその調節領域の配列以外にあることが示唆された。

oligotroph, aldehyde dehydrogenase, *Rhodococcus erythropolis*

講演番号：4C4a02
講演日時：3 月 27 日 09:11～ 1 号館 C4 会場

Comamonas testosteroni TA441 における好気呼吸の末端酸化酵素の発現制御
Regulation of the terminal oxidase genes for aerobic respiration in *Comamonas testosteroni* TA441
○新井 凌、亀谷 将史、石井 正治、新井 博之（東大院・農生科）
○Ryo ARAI, Masafumi KAMEYA, Masaharu ISHII, Hiroyuki ARAI (The University of Tokyo)

【背景・目的】

Comamonas testosteroni はグラム陰性の土壌細菌種であり、フェノールをはじめとした多くの芳香族化合物を資化する能力を持つ菌株が知られている。*C. testosteroni* TA441 株のドラフトゲノム配列から、本菌は好気呼吸の末端酸化酵素を 4 種（cbb_3型、aa_3型、*bd*型、bo_3型）持っていることが推測された。過去の研究において本菌は栄養状態や生育段階によってこれら 4 種の末端酸化酵素を使い分けている可能性が示唆されている。さらに本菌の好気呼吸において主要に働く bo_3型キノール酸化酵素の遺伝子下流には、二成分制御系の転写調節因子をコードする遺伝子 *roxSR* が存在する。RoxSR は *Rhodobacter* 属の光合成細菌においてエネルギー代謝関連遺伝子の発現制御を行う RegBA（PrrBA）と類似しており、細胞膜中の電子伝達系の酸化還元状態を感知すると考えられる。一方で *Pseudomonas* 属細菌において RoxSR は、好気呼吸の末端酸化酵素遺伝子の発現制御に関わることが知られている。

本研究では *roxSR* の本菌における役割、並びに bo_3型キノール酸化酵素の欠失が他の末端酸化酵素の発現に与える影響を検証し、本菌における末端酸化酵素の発現制御を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

bo_3型キノール酸化酵素をコードする遺伝子の破壊株（Δbo_3）と、その下流にあるレギュレーター遺伝子 *roxSR* の破壊株（Δ*roxSR*）を LB 培地で培養し、対数期と定常期でそれぞれ菌体を回収、RNA 抽出、逆転写の後にリアルタイム定量 PCR を行った。結果として、Δbo_3では cbb_3型、*bd*型の発現量がそれぞれ有意に上昇した。また、Δ*roxSR* では bo_3型の発現が消失し、他の酵素遺伝子の発現パターンは Δbo_3と同様の結果となった。

以上のことから、bo_3型キノール酸化酵素の欠失は cbb_3型と *bd*型酵素の発現により相補される可能性が示唆された。RoxSR は bo_3型の発現を正に制御する可能性が示唆され、Δ*roxSR* において cbb_3型と *bd*型が上昇しているのは bo_3型の発現抑制の間接的影響によるものである可能性が考えられた。

Comamonas testosteroni, terminal oxidase, aerobic respiration

講演番号：4C4a03
講演日時：3 月 27 日 09:22～ 1 号館 C4 会場

Shewanella oneidensis のバイオフィルム形成と電流生成を制御する ECF シグマ因子の同定
Identification of an ECF sigma factor that regulates biofilm formation and current generation in *Shewanella oneidensis* MR-1

○古賀 亮太、高妻 篤史、渡邉 一哉（東薬大生命）
○Ryota KOGA, Atsushi KOUZUMA, Kazuya WATANABE (Tokyo Univ. of Pharm. Life sci.)

電気化学活性細菌（electrochemically active bacteria, EAB)は細胞外の物質（電極や金属化合物等）と電気化学的な相互作用を行うことができる微生物であり、様々な環境に生息していることが知られている。EAB は微生物燃料電池や微生物電気合成等の微生物電気化学システム（bioelectrochemical system, BES）への応用が期待されているが、これらの細菌と電極との相互作用には未だ不明な点が多い。*Shewanella oneidensis* MR-1 株は最もよく研究されている EAB のモデル菌株であり、流水条件下では電極表面にバイオフィルムを形成することで電極との電子授受を行う（Kitayama et al. 2017. *Appl Environ Microbiol* 83: e00903-17)。しかし、本株の電極へのバイオフィルム形成やバイオフィルム内での電流生成に関与する分子メカニズムは未解明である。そこで本研究では、流水発電条件下における MR-1 株の遺伝子発現変動を解析し、本株の電極バイオフィルム形成及び電流生成に関与する因子を同定することを目的とした。

MR-1 株を電気化学フローセル（electrochemical flow cell, EFC; Kitayama et al. 2017）を用いて培養し、流水および非流水条件下における電極付着菌体の遺伝子発現プロファイルを比較した。その結果､流水条件下では細胞外ストレス応答に関与すると考えられている extracytoplasmic function (ECF）シグマ因子遺伝子 SO_3096 が著しい発現上昇を示すことが明らかとなった。SO_3096 遺伝子の破壊株（ΔSO_3096）を作製し、EFC におけるバイオフィルム形成と電流生成量を野生株と比較した結果、ΔSO_3096 株は野生株よりも粗なバイオフィルムを形成し、電流生成量も低下していた。次に流水発電条件下におけるΔSO_3096 と野生株の遺伝子発現を比較したところ、ΔSO_3096 では電極への電子伝達に関与する細胞外膜シトクロム遺伝子（*mtrC*）や、バイオフィルム形成に関与すると考えられる c-di-GMP 合成系遺伝子（SO_3556）の発現量が低下していた。以上の結果から、SO_3096 は流水条件において固体電子受容体（電極）表面へのバイオフィルム形成と細胞外電子伝達に関連する遺伝子の発現を包括的に制御する役割を果たしており、BES のおける電流生成において極めて重要な因子であることが示唆された。SO_3096 のオルソログは *Shewanella* とその近縁属細菌に広く保存されており、これらの細菌の環境適応において重要な役割を果たしていると予想される。今後は SO_3096 が関与するシグナル伝達系と遺伝子発現カスケードについて詳細な解析を行い、本 ECF シグマ因子の生理機能を明らかにしていく予定である。

Shewanella, biofilm, ECF sigma factor

講演番号：4C4a04
講演日時：3 月 27 日 09:33～ 1 号館 C4 会場

pH sensitive transcriptional regulator in acetic acid bacteria

○Afi Candra TRINUGRAHA[1], Yuri ISHII[1], Yuki SHIGE[1], Naoki AKASAKA[2], Wakao FUKUDA[1], Shinsuke FUJIWARA[1] ([1]Kwansei Gakuin Univ. of Grad. Sch. Sci. Technol., [2]Marukan Vinegar Co., Ltd.)

[Introduction] Binding affinity of proteins to charged substrates, such as DNA, seems to be affected by intracellular pH. The intracellular pH in *Komagataeibacter europaeus* was decreased from pH 6.3 to 4.7 in parallel with acetic acid production (1). In contrast, intracellular pH in *Escherichia coli* was maintained at around pH 7.0 throughout cell growth. In the present study, we compared the regulatory mechanism of leucine responsive-regulator proteins (Lrp) between *E. coli* (*Ec*Lrp) and *K. europaeus* (*Ke*Lrp) (2).
[Results and Discussion] Histidine-tagged *Ec*Lrp and *Ke*Lrp were obtained as a recombinant form. It is known that Lrp regulates transcription of the *ilvIH* operon. In order to evaluate DNA binding property of Lrps, operator regions of *ilvIH* were respectively isolated from *K. europaeus* and *E. coli*, and obtained DNA fragments were labeled with IRD700. The series of gel-shift assay were performed to evaluate the binding affinities at different pH conditions (from pH 4.0 to 8.0). The results indicated that *Ec*Lrp binds to its operator DNA with higher affinity at pH 7.0 than other pH condition. On the other hand, *Ke*Lrp binds to its operator DNA with higher affinity at pH 5.0 than neutral pH condition. Structural analyses were performed by CD spectrum between *Ec*Lrp and *Ke*Lrp at various pH conditions for understanding its structure-function relationship. The highest α-helical content of *Ec*Lrp at pH 7.0. On the contrary, *Ke*Lrp showed the highest α-helical content at pH 5.0. Isoelectric focusing was performed to determine the isoelectric points (pI values) of *Ke*Lrp. The pI values of *Ec*Lrp assigned at 9.2 (3). Otherwise, *Ke*Lrp exhibited the pI values at 6.9. Combining these data, *Ke*Lrp is most stable at pH 5.0 and it functions effectively in the stationary phase (acidic condition) of *K. europaeus*. These findings suggest that *Ke*Lrp is a pH sensitive transcriptional regulator in *K. europaeus*.
[References] (1) 繁ら 第 69 回日本生物工学会大会 (2017), (2) Ishii *et al.*, J.Biossci.Bioeng.125, 67-75 (2018), (3) Willians *et al.*, J. Biol. Chem.266, 10768-10774 (1991)

leucine-responsive regulatory protein, cytoplasmic pH, acetic acid bacteria

発表責任者：FUJIWARA Shinsuke（fujiwara-s@kwansei.ac.jp）

講演番号：4C4a05
講演日時：3 月 27 日 09:44～ 1 号館 C4 会場

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* を用いた異種タンパク質発現システム

Heterologous expression system using thermophilic bacterium, *Thermus thermophilus*

○末松 佑梨、藤野 泰寛、土居 克実（九大院農）
○Yuri SUEMATSU, Yasuhiro FUJINO, Katsumi DOI (Kyushu Univ. of Agric.)

【目的】

好熱菌由来の酵素はその熱安定性から産業利用において重要である。一般的にこれらの耐熱性酵素は大腸菌などの常温菌の異種タンパク質発現系を用いて大量調製されるが、耐熱性酵素は正しい構造を保持できないまま発現されることが多く、好熱菌を宿主とするタンパク質発現系の構築が望まれている。我々の研究グループでは、高度好熱菌細菌である *Thermus* 属細菌を過飽和シリカに曝露することで鉄結合性 ABC transporter が著量発現されることを見出した。そこで、この強力なシリカ誘導性プロモーターを利用した、*Thermus* 属細菌を宿主とする異種タンパク質発現系の構築を試みた。

【実験方法】

T. thermophiles HB27 及びハイグロマイシン耐性遺伝子を保持したプラスミド pYK596 を使用し、pYK596 にシリカ誘導性タンパク質(*sip*)の推定プロモーター領域 *Psip*(600 bp)、及びマルチクローニングサイトを挿入した発現ベクターpSix1 を構築した。次いで、pSix1 のプロモーター直下にレポーター遺伝子として *Thermus* sp. A4 由来β-galactosidase (β-gal)遺伝子を挿入した。また、本プラスミドを用いて、推定プロモーター領域を段階的に短くした deletion mutant を作製した。これらの形質転換体を 100 μg/mL ハイグロマイシンを含む TR 培地または 600 ppm シリカ含有 TR 培地にて、70℃で振盪培養した。これらの培養液から経時的に一部を採取し、β-gal 活性を Miller Unit(MU)にて測定した。

【結果および考察】

β-gal/pSix1 を持つ HB27 株を TR 培地で培養した場合、empty vector よりわずかに高いβ-gal 活性が見られ、若干 leaky な発現が起こっていることが明らかとなった。一方、600 ppm シリカ含有 TR 培地で培養した場合、24 時間後のβ-gal 活性は約 200 MU となり、シリカ非添加時に比べておよそ 10 倍増大した。このシリカ曝露による発現誘導は、培養 2 時間後には確認され、本プロモーターはシリカ曝露に迅速に応答すると思われる。一方、対数増殖期まで培養後シリカ含有 TR 培地に培地交換を行ったところ、2 時間後のβ-gal 活性は低く留まった。これは、TR 培地での増殖中に細胞が鉄を貯蔵し、シリカ添加による鉄欠乏の影響が低減されたためであると考えられる。また、pSix1 の *Psip*(600bp)を段階的に短くした結果、*sip* 上流 100 bp が誘導発現に必要な領域であることが分かった。さらに興味深いことに、*Psip*(100 bp)の β-gal 活性は *Psip*(600 bp)に比べて約 5 倍高かった。これは、プロモーター領域を最小化したことによりプラスミドの安定性が高くなったためであると推察している。

silica, *Thermus thermophilus*, expression

発表責任者：藤野泰寛（fusion@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：4C4a06
講演日時：3 月 27 日 10:05～ 1 号館 C4 会場

酵母 D-アスパラギン酸オキシダーゼ遺伝子発現における酸性アミノ酸パーミアーゼの機能解析

Functional analysis of acidic amino acid permeases in the gene expression of D-aspartate oxidase in yeast

○今西 大生、阿部 勝正、解良 芳夫、高橋 祥司（長岡技大院工）
○Daiki IMANISHI, Katsumasa ABE, Yohio KERA, Shouji TAKAHASHI (Nagaoka Univ. of Tech.)

【背景・目的】 D-アスパラギン酸オキシダーゼ（DDO）は，酸性 D-アミノ酸の酸化的脱アミノ反応を触媒する FAD を補酵素とするフラビン酵素である．真菌において，DDO は酸性 D-アミノ酸の資化や解毒の役割を担っている．我々は，DDO を多量に生産する酵母 *Cryptococcus humicola* UJ1 株を土壌から単離し，その DDO（ChDDO）の酵素学的諸特性や生理機能について解析を進めてきた．本酵素は，D-Asp に対して高い特異性および触媒活性を有し，培養液中の D-Asp の存在により特異的に誘導発現され，L-Asp の共存により誘導発現が抑制される．このことから，D-Asp 特異的な遺伝子誘導発現機構が存在していると考えられるが，そのメカニズムはほとんど明らかにされていない．酵母 *Cryptococcus neoformans* ではアミノ酸パーミアーゼ Aap4（CnAap4）が L-Asp の輸送を担うことから，*ChDDO* 遺伝子の誘導発現に Aap を介した D-Asp の輸送が関与している可能性が考えられた．これまでに，当研究室では *C. humicola* UJ1 株に CnAap4 相同体として 2 つの Aap（ChAap4，ChAap5）を見いだしている．そこで本研究では，*ChAAP* 遺伝子の機能解析や遺伝子破壊を通して，Aap と *ChDDO* 遺伝子発現との関係を明らかにすることを目的とした．

【方法・結果】 *C. humicola* UJ1 株に見いだしたこれら 2 つの ChAap と D-Asp による *ChDDO* 遺伝子誘導発現との関係を明らかにするため，UJ1 株のウラシル栄養要求性変異株である UM3 株を用いて *ChAAP* 遺伝子破壊株を作製した．つぎに種々のアミノ酸を単一窒素源とする，pH 7.0 の培地において，*ChAAP* 遺伝子破壊株の生育能を評価した．その結果，*ChAAP4* 遺伝子破壊株は L, D-Asp，L, D-Phe，*ChAAP5* 遺伝子破壊株は L, D-Phe を単一窒素源とする培地において生育が顕著に遅延した．一方，pH 10.0 の培地では *ChAAP4* 遺伝子破壊株は，L, D-Asp における生育能を完全に失い，L-Glu における生育が顕著に遅延した．また D-Asp を用いた誘導解析では，*ChAAP4* 遺伝子破壊株の ChDDO 活性が pH 上昇に伴い大きく減少した．このことから，*ChAAP4* 遺伝子が特に高 pH 条件下での酸性アミノ酸輸送における重要な遺伝子であり，*ChDDO* 遺伝子誘導発現に対する関与が強く示唆された．現在，*ChAAP* 遺伝子破壊株における Aap の機能と *ChDDO* 遺伝子発現の詳細な関係について解析を進めている．

D-aspartate oxidase, *Cryptococcus humicola* UJ, acidic amino acid permease

発表責任者：高橋 祥司（shoutaka@vos.nagaokaut.ac.jp）

講演番号：4C4a07
講演日時：3 月 27 日 10:16～ 1 号館 C4 会場

酵母 *Komagataella phaffii* の一細胞解析によるメタノール誘導性遺伝子発現制御機構の解析

The regulatory mechanism of methanol-inducible gene expression in the yeast *Komagataella phaffii* analyzed at the single-cell level

○竹谷 友之、由里本 博也、阪井 康能（京大院農）
○Tomoyuki TAKEYA, Hiroya YURIMOTO, Yasuyoshi SAKAI (Kyoto Univ.)

【目的】メタノール資化性酵母 *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) は、メタノールによって特異的かつ強力に誘導される遺伝子プロモーターを有しており、異種タンパク質の生産宿主として汎用されている。このプロモーターからの遺伝子発現は、グルコース培地では完全に抑制されるが（グルコース抑制）、細胞をメタノール培地に移すと、グルコース枯渇（消費）に伴うメタノール非依存的な抑制解除（脱抑制）とメタノール依存的な発現誘導（メタノール誘導）の二段階の制御を経て転写活性化される。我々はこれまでに、メタノール誘導性のジヒドロキシアセトンシンターゼ遺伝子プロモーター（P_{DAS2}）の支配下に蛍光タンパク質を発現させ、その細胞集団をフローサイトメトリー（FACS）による一細胞解析に供することで、μM レベルのメタノールを検出可能なメタノールセンサー細胞の開発に成功した [1)]。一方、本センサー細胞を用いるとメタノール誘導性遺伝子の発現レベルを一細胞レベルで可視化できる。本研究では、*K. phaffii* のメタノール誘導性遺伝子の発現制御機構を本センサー細胞で一細胞解析により理解することを目的とした。

【方法・結果】濃度の異なるグルコースを単一炭素源とする最少培地にメタノールセンサー細胞を等量植菌し、一定時間前培養することで、グルコースを枯渇させた細胞と残存させた細胞を得た。前培養終了時点では、どちらの細胞集団も同様に低い蛍光強度の分布を示していた。一方、これらの細胞をメタノール培地に移すと、グルコース枯渇細胞の蛍光強度の分布が 1 時間後に高い方に移動し始めたのに対し、グルコース残存細胞は 1 時間後でも低い蛍光強度に分布していた。メタノール培地に移して 4 時間後にはグルコース残存細胞も蛍光強度の分布が高い方に移動し始めていたが、グルコース枯渇細胞は既に集団全体が蛍光強度の高い方に分布しており、その後、それ以上は変化しなかった。これらのことから、前培養中にグルコースが枯渇すると、脱抑制が引き起こされ、培地シフト時により迅速にメタノール誘導へと移行できるようになるのではないかと考えられる。現在、グルコース抑制、脱抑制、メタノール誘導のそれぞれに関わる転写因子（Mig1, Mxr1, Trm1, Mpp1, Hap3）の遺伝子破壊株を用いた解析を進めている。

1) Takeya et al. (2018) Appl Microbiol Biotechnol 102:7017-7027

methylotrophic yeast, single-cell analysis, gene regulation

講演番号：4C4a08
講演日時：3 月 27 日 10:27～ 1 号館 C4 会場

糸状菌 *Trichoderma reesei* における分泌プロテアーゼの発現制御機構の解析
Analysis of the regulatory mechanism of the secretory protease expression in *Trichoderma reesei*
○鈴木 義之[1]、ダラナガマ ナヤニ[1]、志田 洋介[1]、森 一樹[2]、油谷 幸代[3]、小笠原 渉[1]([1]長岡技科大、[2]鹿児島高専、[3]産総研)
○ Yoshiyuki SUZUKI[1], Nayani DARANAGAMA[1], Yosuke SHIDA[1], Kazuki MORI[2], Sachiyo ABURATANI[3], Wataru OGASAWARA[1] ([1]Nagaoka Univ. of Tech., [2]Kagoshima Natl. Col. of Tech., [3]AIST)

セルラーゼ高生産糸状菌である *Trichoderma reesei* は、細胞外のセルロース・ヘミセルロースやその誘導体に応答して誘導的にセルラーゼを大量に生産する。培養上精中の分泌セルラーゼは、分泌プロテアーゼによって分解されることが知られているが（Hagspiel et al.、1989)、分泌プロテアーゼの発現調節機構はほとんど知られていない。これまでに我々は、*T. reesei* の主要な分泌プロテアーゼである Trichodermapepsin（TrAsP）について、その酵素学的諸性質、セルラーゼ活性に与える影響を明らかにすると共に、その発現に最適な誘導炭素源がガラクトースであることを明らかにしてきた。そこで本研究では、TrAsP を代表とする分泌プロテアーゼ群の転写調節機構の解明を目的として、TrAsp 発現の炭素源への応答と既知の転写調節因子との関係および TrAsp のプロモーター構造についての解析を行った。

既知転写調節因子と TrAsp 発現の関係性を調べるために、種々のセルラーゼ転写調節因子遺伝子破壊株を用いたて qRT-PCR による発現解析を行った。その結果、セルラーゼ転写調節における中心的な転写調節因子 Xyr1、炭素源異化抑制因子 Cre1、セルラーゼ発現抑制因子 Ace1 および pH 応答因子 Pac1 による TrAsp の発現抑制ならびに窒素源資化調節因子 Are1 による TrAsp の発現活性化が示唆された。これらの転写調節因子による TrAsp 発現制御機構を明らかにするために、レポーター解析法を用いた TrAsp のプロモーター削除解析を実施した。TrAsp の上流 1080bp から約 200bp ずつ削除したプロモーターの支配下にレポーター遺伝子群を導入した株をそれぞれ構築し、結晶性セルロースおよびガラクトースを炭素源とする培養を行ったところ、両炭素源に応答する発現抑制領域および活性化領域ならびに主にガラクトースに応答する発現抑制領域が見いだされた。両炭素源に応答する TrAsp 発現活性化領域には Are1 と Xyr1 の推定結合配列がそれぞれ 3 と 2 カ所存在していた。そこで、この推定結合配列への部位特異的変異解析行った結果、Are1 および Xyr1 推定結合配列の変異株では、TrAsp のプロモーター強度がそれぞれ低下および向上していた。さらにこの推定結合配列を用いたゲルシフトアッセイを行った結果、この推定結合配列への Are1 および Xyr1 の結合が示唆された。以上より、TrAsp プロモーターのグルコースおよびガラクトースに応答して TrAsp 発現を活性化する本領域では、Are1 が活性化因子として、Xyr1 が抑制因子として TrAsp の発現を制御していると示唆された。

Trichoderma reesei, the regulatory mechanism, the secretory protease expression

発表責任者：小笠原渉（owataru@vos.nagaokaut.ac.jp）

講演番号：4C4a09
講演日時：3 月 27 日 10:38～ 1 号館 C4 会場

二量体化タグを用いた糸状菌転写因子の結合部位のゲノムワイド解析

Genome-wide analysis of the binding sites of a fungal transcription factor using a dimerization tag

○石原 悠平[1]、岡 大椰[1]、丸山 潤一[2,3]、兒島 孝明[1]、中野 秀雄[1] ([1]名大院・生命農、[2]東大院・農生科・応生工、[3]東大・微生物連携機構)
○Yuhei Ishihara[1], Hiroya Oka[1], Jun-ichi Maruyama[2,3], Takaaki Kojima[1], Hideo Nakano[1] ([1]Grad. Sch. Bioagric. Sci. Nagoya Univ., [2]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [3]CRIIM, UTokyo)

【背景と目的】 転写因子は、標的 DNA 配列に特異的に結合し、遺伝子の発現を制御するタンパク質群の総称であり、生体内の様々な機能に関与している。gSELEX-Seq(genomic Systematic evolution of ligands by exponential enrichment)は、生細胞から抽出したゲノム DNA より作製したライブラリーから標的タンパク質に結合できる DNA 領域を選択濃縮することのできる手法 genomic SELEX (gSELEX)と、高速シークエンシング技術を組み合わせた転写因子結合配列のハイスループット解析法である。gSELEX 法の手順は(1) ゲノムライブラリーと標的転写因子の *in vitro* 結合反応、(2) 転写因子-DNA 複合体を形成、(3) 担体を用いた複合体の回収、(4) PCR による選択的に濃縮された結合 DNA の回収、からなる。この手法を駆使して、本研究グループではこれまでに様々な種類の転写因子の結合部位の同定に成功している。

一般に転写因子は細胞内でホモ多量体、特にホモダイマーを形成するケースが多くみられ、その多量体形成は DNA 結合活性に影響を及ぼす。例えば、Zn_2Cys_6型転写因子は細胞内で二量体を形成し、標的遺伝子の発現制御に関与することが知られている。一方、gSELEX に用いる転写因子を大腸菌による組み換え発現によって調製した場合、転写因子複合体が必ずしも適切に形成されているとは限らない。そこで本手法のさらなる標準化のため、転写因子調製用のタグとして GST を導入することを試みた。細胞内で安定な二量体を形成する GST を標的転写因子に融合させることにより、その二量体形成の促進が期待できる。

【結果】 N 末端側に GST、C 末端側にポリヒスチジンタグを配置したベクターに、*Aspergillus oryzae* における菌核形成に関与する Zn_2Cys_6型転写因子、AO090009000520(trsA)遺伝子を導入し、GST との融合タンパク質発現プラスミドを調製した。この発現プラスミドを大腸菌 BL21(DE3)に導入し、GST-trsA の組み換えタンパク質発現及び精製を行い、得られた精製 GST-trsA を Blue Native-PAGE に供したところ、GST-trsA が二量体を形成していることを確認した。次に、この二量体化 GST- trsA と *A. oryzae* ゲノムライブラリーを用いた gSELEX を 3 ラウンド実施し、リアルタイム PCR によって GST-trsA に結合する DNA が選択的に濃縮されていることを確認した。二量体化タグを用いた本手法によって、転写因子複合体を用いた *in vitro* 結合 DNA のハイスループット解析が可能となると考えられる。

尚、現在、上記 gSELEX によって得られた選択 DNA プールの高速 DNA シークエンシングによる解析を行っている。

Aspergillus oryzae, transcription factor, gSELEX

発表責任者：兒島 孝明（kojimat@nuagr1.agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：4C4a10
講演日時：3 月 27 日 10:49～ 1 号館 C4 会場

麹菌のオリゴペプチドトランスポーターの同定と発現制御機構の解析
Identification and distinct regulation of oligopeptide transporter genes in *Aspergillus oryzae*
○田中 瑞己[1]、伊藤 圭祐[1]、河原崎 泰昌[1]、五味 勝也[2] ([1]静県大食栄、[2]東北大農)
○Mizuki TANAKA[1], Keisuke Ito[1], Yasuaki Kawarasaki[1], Katsuya Gomi[2] ([1]Univ. Shizuoka, [2]Tohoku Univ.)

麹菌（*Aspergillus oryzae*）は 130 個以上のプロテアーゼ遺伝子を有しており、これらが清酒・味噌・醤油などの醸造において重要な役割を担っている。麹菌のプロテアーゼ遺伝子の発現は、大豆ペプチドなどにより誘導されることが知られている。出芽酵母においては、proton-dependent oligopeptide transporter（POT）である Ptr2p によってジ・トリペプチドが取り込まれる。一方、麹菌のゲノム配列中には Ptr2p と高い相同性を有するトランスポーター遺伝子が 15 個存在するが、いずれも機能が明らかとされていない。本研究では、ジ・トリペプチド取り込み能を有する麹菌のトランスポーターを 3 個同定し、その発現制御機構を解析した。
15 個のトランスポーター遺伝子の発現を RT-PCR により調べた結果、4 遺伝子が大豆ペプチド存在下で強く発現していた。これらのトランスポーター遺伝子を、ロイシン要求性を示す出芽酵母 BY4742 株を親株とした *ptr2* 破壊株で発現させ、機能相補性を調べた。その結果、3 個のトランスポーターについてはジ・トリペプチド取り込みを相補したことから、これらの遺伝子を *potA*, *potB*, および *potC* とそれぞれ命名した。定量 PCR によってそれぞれの遺伝子の発現量を調べた結果、*potB* と *potC* は構成的に発現しているのに対し、*potA* は大豆ペプチド非存在条件下ではほとんど発現していなかった。出芽酵母においては、*ptr2* の発現は転写因子 Cup9 によって抑制されており、ジペプチドが存在するとユビキチンリガーゼ Ubr1 依存的に Cup9 が分解され、*ptr2* の発現が誘導されることが知られている。Cup9 オーソログと Ubr1 オーソログの遺伝子破壊株を作成して発現解析を行った結果、いずれのトランスポーター遺伝子も *cup9* オーソログの破壊では発現が増加しなかった。一方、*ubr1* オーソログ破壊株では、*potA* と *potC* の大豆ペプチド存在条件下における発現量が減少した。麹菌の主要な分泌型プロテアーゼ遺伝子の発現を制御する転写因子（PrtR）の破壊株における発現を調べた結果、*potA* と *potB* の大豆ペプチド存在条件下における発現量が減少した。また、*prtR* を強制発現させると、大豆ペプチド非存在条件下でも *potA* と *potB* の発現が強く誘導された。一方、*potC* の発現は、*prtR* の破壊および強制発現による影響を受けなかった。以上の結果から、ペプチドトランスポーター遺伝子の発現制御機構は麹菌と出芽酵母で異なっており、さらに麹菌における個々のペプチドトランスポーター遺伝子の発現はそれぞれ異なる制御機構によって制御されていることが示唆された。

Aspergillus oryzae, Peptide transporter, Gene regulation

発表責任者：田中瑞己（mizuki.tanaka@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：4C4a11
講演日時：3 月 27 日 11:10～ 1 号館 C4 会場

麹菌 Aspergillus oryzae と Aspergillus nidulans 間におけるエノラーゼ遺伝子の異なる選択的転写開始点使用法
Different usage of alternative TSSs in enolase-encoding gene between Aspergillus oryzae and Aspergillus nidulans
○井上 大志、新谷 尚弘、五味 勝也（東北大農）
○Taishi Inoue, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi (Tohoku Univ. of Agric)

麹菌 *Aspergillus oryzae* は、日本酒や味噌、醤油などの伝統的な発酵食品の製造や、タンパク質、有機酸などの有用物質の生産に利用される産業用真菌である。麹菌は、他の *Aspergillus* 属の近縁種と比べ、グルコースなどの糖をより素早く消費する特徴を有することが知られる。例えば、我々が行ったバッチ培養条件での生育比較解析では、麹菌はモデルコウジカビ *Aspergillus nidulans* よりも 3 倍高いグルコース消費速度を示した。このような資化様式の違いが生み出される分子メカニズムを理解することは、麹菌の高度産業利用や *Aspergillus* 属糸状菌の進化研究において重要であると思われるが、その詳細は明らかではない。

エノラーゼは解糖と糖新生、両代謝系での可逆反応の一つを触媒する酵素である。我々はこれまでに 5′SAGE や 5′RACE 等の転写開始点解析や定量 PCR 解析から、エノラーゼ遺伝子における 2 つの転写開始点（TSSs）の使用法が、麹菌 *A. oryzae* と *A. nidulans* 間で異なることを見出した。*A. oryzae* のエノラーゼ遺伝子 *enoA* では、開始コドン上流 36 nt（-36）と-510 の位置に 2 つの TSS が存在し、グルコースやフルクトースなど糖炭素源存在下で下流側の-36 の TSS、酢酸やエタノールなど非糖炭素源存在下で上流側の-510 の TSS が選択的に使用されていた。一方、*A. nidulans* のエノラーゼ遺伝子 *acuN* でも-19～-60 と-440 付近に 2 つの TSSs が存在していたが、糖炭素源と非糖炭素源の両炭素源存在下で上流側の-440 の TSS が優先的に使用されていた。また、グルコースやフルクトース、グリセロール、酢酸、エタノールの 5 種の異なる炭素源存在下におけるエノラーゼ遺伝子の総転写産物量を調べた結果、*enoA* はグルコース存在下で最も高発現する一方、*acuN* は酢酸やエタノール存在下で高発現することが示された。以上の結果から、*A. oryzae* と *A. nidulans* 間では、2 つの TSSs の使用法が変化することで異なるエノラーゼ遺伝子発現パターンが獲得されたと考えられた。

本研究成果は、*Aspergillus* 属糸状菌において基幹代謝系の一つである解糖系の遺伝子発現制御が転写段階で多様化している可能性を示すものであり、炭素源の資化様式の違いを説明する上で重要な知見であると考えられる。また、真菌類において選択的 TSSs に基づく遺伝子発現多様化機構が存在することに関して初めて報告するものである

Aspergillus oryzae, glycolysis, transcription start sites

発表責任者：井上大志（taishi.inoue.t3@dc.tohoku.ac.jp）

講演番号：4C4a12
講演日時：3 月 27 日 11:21～ 1 号館 C4 会場

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるペプチダーゼの機能分化とその転写調節に窒素源が与える影響

Effects of nitrogen source on functional differentiation of peptidase and its transcriptional regulation in *Aspergillus oryzae*

○白石 敦士、前田 浩、山形 洋平（東農工大農）
○ATSUSHI SHIRAISHI, HIROSHI MAEDA, YOHEI YAMAGATA (Tokyo Univ. Agric. Technol.)

【背景と目的】黄麹菌 *Aspergillus oryzae* のゲノム上にはセリンタイプカルボキシペプチダーゼ (CPase) をコードする遺伝子が 12 種存在している。それらのアミノ酸配列に基づいた系統解析の結果、液胞局在型、ゴルジ体局在型、菌体外分泌型 2 つ、計 4 つのグループに分類されている。*A. nidulans*、*A. fumigatus* の CPase をコードすると推定される遺伝子とともに系統樹を作成したところ *A. oryzae* は相同性の高いパラログの組を持っていた。パラログの一方は *A. nidulans*、*A. fumigatus* のゲノムにコードされている CPase オルソログであり、もう一方は *A. oryzae* 特異的であることが分かった。このことから、*A. oryzae* は複数のパラログを使い分ける機能分化が進んでいるものと推定された。そこで、どのように使い分けがされているかを明らかにするために、培養条件を変更して、各 CPase 遺伝子の転写の変化を検討することとした。今回は、*A. oryzae dppB* の転写が周囲の窒素源の状況に応答して制御されている可能性が示唆されていたことから [1)]、培養中の窒素源変化に対する転写の変動を検討した。
【方法と結果】 *A. oryzae* RIB40 株を、硝酸ナトリウムを窒素源として 48 時間培養した後、窒素源を切り替えて 4 時間培養した。切り替え後の窒素源として硝酸ナトリウム、硫酸アンモニウムなどの無機窒素、各種アミノ酸、牛血清アルブミンや大豆タンパクなどのタンパク質を用いた。この条件下で CPase をコードする遺伝子群の転写量を定量 PCR によって調べたところ、各遺伝子ごとに様々な変動パターンがみられ、窒素源の違いによって各 CPase 遺伝子の転写量が変動していることが確認された。また同一グループに属する遺伝子であってもその変動は遺伝子特異的であった。例えば主要菌体外分泌型 CPase である OcpO を含むグループでは、AO090010000534 では窒素源が大豆タンパクに変化した場合において *ocpO* と同様に転写量の増加がみられたが、 AO090120000232 では減少していた。
以上のことから *A. oryzae* 周囲の窒素環境に応じて複数のペプチダーゼの選択を転写レベルで行っていることが示唆された。
本研究の一部は（公財）野田産研研究助成の支援によって実施したものである。
1）Maeda H, *et al*., *App. Microbiol. Biotech.*, 100 (11), 4947-4958 (2016)

Aspergillus oryzae, transcriptome, nitrogen source

発表責任者：白石敦士（s188456s@st.go.tuat.ac.jp）

講演番号：4C4a13
講演日時：3 月 27 日 11:32～ 1 号館 C4 会場

共ゲノム編集法を利用した麹菌の有用二次代謝産物（コウジ酸）の生産制御

Production control of useful secondary metabolite (kojic acid) in *Aspergillus oryzae* by co-genome editing

○弓場 一輝[1,2]、織田 健[2]、和田 悠作[3]、岩下 和裕[1,2]（[1]広大院先端研、[2]酒総研、[3]株式会社ファスマック）
○Kazuki Yumiba[1,2], Ken Oda[2], Yusaku Wada[3], Kazuhiro Iwashita[1,2] ([1]AdSM Hiroshima Univ., [2]Natl. Res. Inst. Brew., [3]fasmac co.,Ltd)

【背景・目的】麹菌（*Aspergillus oryzae*）は、高い酵素生産性などから醸造産業や医療分野で幅広く活躍している微生物で、近年では、多種多様な二次代謝産物（SM）生産のホストとしても利用されている。 そのため、麹菌の SM の生産制御技術の開発は、SM の生産性向上や新規化合物の発見など、麹菌の産業価値の向上に資すると考え研究を行った。我々は、麹菌の SM の一つで、メラニン合成酵素（チロシナーゼ）の活性を阻害するコウジ酸に着目した。本研究では、コウジ酸の生産制御を Cas9 タンパク質直接導入によるゲノム編集技術をベースとした共ゲノム編集法を用いて以下の 3 つの系で実施した。第 1 の系は、コウジ酸等の SM 生産を抑制制御している *hstD* 遺伝子の破壊による正の生産制御、第 2 の系は、コウジ酸の生合成・生産制御遺伝子群と転写活性化遺伝子（*kojR*）を含む約 6kb のコウジ酸合成遺伝子クラスターの領域欠失による負の生産制御、第 3 の系は、*kojR* 遺伝子直前に制御可能なプロモーターを挿入し、任意の培地条件下で、正、負の両方向の生産制御を行う実験を行った。
【方法・結果】3 つの実験系において親株は RIB40 株、マーカー遺伝子にはウラシル生合成に必要かつ 5-Fluoroorotic acid(5-FOA)耐性でカウンターセレクション可能な *pyrG* を用いた。まず、*hstD* の破壊については使用する sgRNA を、1～3 本用い、sgRNA の数の違いによるゲノム編集効率の差の検討も行った。5-FOA で選抜した *hstD* 破壊候補株のコウジ酸の生産性をプレートアッセイ、定量実験により確認し、生産性が向上している株のシークエンス解析により *hstD* の領域内に欠損を確認した。以上の事から、*hstD* のゲノム編集による破壊でコウジ酸の生産性が向上することを確認した。コウジ酸合成遺伝子クラスターの欠失実験では、クラスター領域の上流と下流、また転写活性化遺伝子である *kojR* のイントロン領域に複数の sgRNA を設計し、領域欠損を試みた。*hstD* 破壊の実験系と同様の定性実験、シークエンス解析により、クラスター領域が欠失した株を 6 株得た。このことから、ゲノム編集により約 6kb の領域を欠失させることができること、コウジ酸クラスターの欠失により、コウジ酸の生産性が低下することを確認した。最後に、*kojR* のプロモーター挿入実験については、ターゲットとした領域に *amyB* プロモーター、*xylanaseG2* プロモーターの配列を挿入した。現在、C 源を変えた培地を用い、コウジ酸の生産性を検討中である。上記の 3 つの実験により、麹菌の有用二次代謝産物であるコウジ酸の生産性をゲノム編集により、制御することが可能であることが示唆された。

co-genome editng, *Aspergillus oryzae*, kojic acid

講演番号：4C4a14
講演日時：3 月 27 日 11:43～ 1 号館 C4 会場

麹菌 *Aspergillus oryzae* の染色体重複株ライブラリーの作製と表現型の解析
Analysis of phenotypes of chromosomal duplication strains in *Aspergillus oryzae*
○高橋 理、小山 泰二（野田産研）
○Tadashi TAKAHASHI, Yasuji KOYAMA (NISR)

我々は麹菌の染色体を Mb レベルで部分重複させ、安定的に維持する技術を確立した（1)。これまでの研究で、麹菌の染色体が部分重複した領域に位置する遺伝子の多くは、gene dosage 効果により発現が上昇し、結果として表現型が変化することが示された（2)。麹菌の染色体の部分重複方法にはタンデム重複と重複転座の 2 種類がある。これまでに全ゲノムの 75%以上の領域について重複株を作製し、二次代謝産物生合成遺伝子クラスターの新たな制御因子などを見出してきた（3)。今回は、作製したライブラリーの重複株に対し、生育に着目してスクリーニングを行った。通常の培養条件下では、染色体の重複により生育が良くなった株は、これまでのところ得られていないが、ストレス条件下では、染色体が重複したことによる優位性が生育時の表現型として現れるのではないかと考え、浸透圧ストレス条件下におけるスクリーニングを試みた。5%あるいは 10%NaCl 含有 CZ プレート上で生育を見たところ、5 つの株ではコントロール（野生型 RIB40）に比較して明らかに生育が良いことが判明した。これら 5 株の染色体上の重複領域は、いずれも異なっていたことから、複数の遺伝子が NaCl に対する耐性に関与しているものと考えられた。さらに NaCl 含有フスマ培地でこれらの株の生育および酵素活性を調べたところ、そのうちの 1 株ではコントロールに比較して 2 倍以上のプロテアーゼ活性を示すことが判明した。この株の重複領域には、rDNA 領域が含まれ、rDNA のコピー数がコントロールの 2 倍以上になっていることが確認されており、このことがストレス耐性に影響を与えている可能性もあるため、詳細な解析を進めている。

1) Takahashi et al. Targeted tandem duplication of a large chromosomal segment in *Aspergillus oryzae*. 2014. Appl Environ Microbiol **80**:4547-58.
2) Takahashi et al. Translocated duplication of a targeted chromosomal segment enhances gene expression at the duplicated site and results in phenotypic changes in *Aspergillus oryzae*. 2018. Fungal Biol Biotechnol **5**:17.
3) 麹菌の染色体重複株から見出した二次代謝系クラスター制御因子の解析　農芸化学会 2018 年度大会

chromosomal duplication, gene dosage effect, phenotype

発表責任者：高橋　理（ttakahashi@mail.kikkoman.co.jp）

講演番号：4C4a15
講演日時：3 月 27 日 11:54～ 1 号館 C4 会場

マコモタケの共生・不稔に関わる遺伝子および化合物の探索
Analysis of the molecular mechanism of coexistence and sterility of Makomotake, *Zizania latifolia* infected with *Ustilago esculenta*.

○青木 大地[1]、謝 肖男[2]、崔 宰熏[3,4]、河岸 洋和[3,4]、鈴木 智大[2]([1]宇都宮大学院・農、[2]宇都宮大・バイオ、[3]静岡大・農、[4]静岡大・グリーン研)
○Daichi AOKI[1], Xiaonan XIE[2], Jae-Hoon CHOI[3,4], Hirokazu KAWAGISHI[3,4], Tomohiro SUZUKI[2] ([1]Graduate School of Agriculture, Utsunomiya University, [2]Center for Bioscience Research and Education, Utsunomiya University, [3]Department of Agriculture, Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka University, [4]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University)

【目的】
イネ科の植物であるマコモ（*Zizania latifolia*）に、黒穂菌（*Ustilago esculenta*）が感染すると共存が始まり、茎部に異常な肥大が生じる。この肥大した茎部は菌えいと呼ばれ、マコモタケと称する。菌が感染し植物にこぶ状の組織を作る例は数多あり、その組織肥大を惹起するのはほとんどの場合インドール酢酸（IAA）であることが定説である。そこで本研究では、マコモタケ（植物-菌共存体）の共存・不稔の分子機構を解明するため、1）不稔・共存に関わる植物体および黒穂菌のそれぞれの遺伝子を区別した網羅的遺伝子発現差解析を行うこと、2）各生育段階・各部位における既知植物ホルモンの存在確認定および定量、作用機序の解明を行うことを目的とした。
【方法・結果】
1）黒穂菌の ITS2（internal transcribed spacers 2）領域でプライマーを設計し、リアルタイム PCR を用いて、定植期から 1 か月ごとにマコモタケをサンプリングし、本方法を用いてマコモタケの各生育段階（活着・分げつ期：6 月～成熟期：10 月）の菌えい部における黒穂菌の存在量を定量した。その結果、黒穂菌の存在量は分げつ盛期（7 月）から緩やかに増加を開始し、分げつ停止期（8 月）から収穫適期（9 月）にかけて最も増加することが明らかになった。そこで、各生育段階のマコモタケ（植物-菌共存体）から取得した total RNA より、次世代シーケンサーを用いた RNA-Seq 解析を行った。
現在、取得したデータから植物体および黒穂菌のそれぞれの遺伝子を区別した遺伝子発現差解析を行うため、マコモ（植物体）および黒穂菌それぞれのゲノム情報を参照配列とした遺伝子発現差解析を行っている。
2）各生育段階・各部位のマコモタケ検体に、メタノール（1%酢酸添加）を添加後、内部標準物質（インドール酢酸、アブシジン酸、サリチル酸およびジャスモン酸）を添加し、破砕・抽出を行った。その後、遠心分離したのち上清を回収し、LC-MS/MS（QTRAP 5500）に供することで各植物ホルモンの同時定量を行った。現在、得られたデータを詳細に解析中である。

Makomotake, *Zizania latifolia* infected with *Ustilago esculenta*

発表責任者：鈴木　智大（suzukit@cc.utsunomiya-u.ac.jp）

講演番号：4C5a02
講演日時：3 月 27 日 09:11～ 1 号館 C5 会場

アカパンカビにおける *ERCC1* ホモログ *mus-44* の機能解析 －DNA 鎖間架橋剤感受性と光回復能の異常の関連性－

A functional analysis of *ERCC1* homolog *mus-44* in *Neurospora crassa* -The relationship between the sensitivity of DNA inter-strand crosslinking agent and abnormality of photoreactivation-

○塚田 耕太郎[1]、一石 昭彦[2]、吉原 亮平[1]、畠山 晋[1]、田中 秀逸[1] ([1]埼玉大院・理工、[2]東洋大・生命科学)
○ Kotaro TSUKADA[1], Akihiko ICHIISHI[2], Ryouhei YOSHIHARA[1], Shin HATAKEYAMA[1], Shuuitsu TANAKA[1] ([1]Grad. Sch. of Sci. & Eng., Saitama Univ., [2]Life Sci., Toyo Univ.)

【研究目的・背景】

生命の遺伝情報を司る DNA は，環境中で様々な損傷を受け続けている。細胞がこれらを修復できない場合，突然変異や細胞死へとつながる。そのため，全ての生物はこれらの損傷に対応するために，多様な DNA 修復機構を獲得してきた。損傷の外的要因として代表的な紫外線は，隣接するピリミジン塩基同士の共有結合によるシクロブタン型ピリミジンダイマー（CPD）や（6-4）光産物［(6-4) PP］を誘発することで知られている。アカパンカビ（*Neurospora crassa*）におけるこれらの紫外線損傷は，ヌクレオチド除去修復（NER），紫外線損傷特異的除去修復（UVER），光回復といった複数の経路で修復されることがわかっており，これらの修復経路は独立して機能していると考えられている。しかし，一部の NER 関連遺伝子や損傷乗り越え合成に関わる遺伝子の欠損株で，部分的な光回復能の欠損（partial photoreactivation defect: PPD）が起こることが見出されているが，その原因は解明されていない。アカパンカビ *mus-44* 遺伝子は，NER 関連遺伝子であるヒト *ERCC1*，出芽酵母 *RAD10* のホモログとして同定され，この遺伝子の欠損株（*Δmus-44*）は，紫外線に高い感受性を示す上に，PPD 表現型を示すことが知られている。そこで本研究では，PPD の原因究明を目的として，*mus-44* の機能解析を行っている。

【結果・考察】

アカパンカビの光回復酵素 PHR は CPD を特異的に修復するため，(6-4) PP が PPD の原因となっているのではないかと考え，(6-4) PP 特異的な光回復酵素であるシロイヌナズナ UVR3 を発現させたが，*Δmus-44* 株の PPD は解消されなかった。また，*ccg-1* プロモーターによる PHR の過剰発現株を作製したが，発現増加による光回復能の上昇は見られなかったため, PPD は光回復活性の程度に依存したものではないことが示唆された。アカパンカビにおいては, CPD や（6-4）PP といった紫外線損傷は，MUS-18 が関与する UVER 経路によって，これらの多くが修復されるという報告がある。ヒトや出芽酵母において，ERCC1 や Rad10 が DNA 鎖間架橋修復（inter-strand crosslink repair: ICLR）に関与していること，紫外線によっても DNA 鎖間架橋損傷が生じることがわかっており，アカパンカビにおいて *Δmus-44* 株が示す PPD は，ICLR 活性の欠損による可能性が考えられる。すなわち，紫外線によるピリミジンダイマー以外の損傷修復能の欠損によって，見かけ上の光回復能の異常が生じている可能性がある。そこで，*Δmus-44* 株について，DNA 鎖間架橋剤である 1, 2, 7, 8-diepoxyoctane (DEO) に対する感受性を調べたところ，強い感受性を示した。この感受性は，*mus-40*（*XPG* ホモログ）欠損株や *mus-43*（*XPA* ホモログ）欠損株といった他の NER 関連遺伝子欠損株に比べ顕著であったことから，MUS-44 が NER とは別の経路で ICLR に関与していることが示唆された。現在, NER 活性の欠損を示す *mus-44*$^{\Delta NER}$, ICLR 活性の欠損を示す *mus-44*$^{\Delta ICLR}$ といった *mus-44* 機能分離（separation-of-function）変異株の作製を進めている。

Neurospora crassa, NER, ICLR

発表責任者：塚田 耕太郎（kotaro.t_0411@outlook.jp）

講演番号：4C5a03
講演日時：3 月 27 日 09:22～ 1 号館 C5 会場

Sphingobium 属細菌のリグニン・β-aryl ether 代謝に関与する glutathione *S*-transferase 遺伝子の同定と機能解析

Identification and characterization of the glutathione *S*-transferase genes involved in catabolism of arylglycerol-ß-aryl ether in *Sphingobium* sp. strain SYK-6

○佐藤 大輔、樋口 雄大、上村 直史、政井 英司（長岡技科大・生物）
○Daisuke SATO, Yudai HIGUCHI, Naofumi KAMIMURA, Eiji MASAI (Nagaoka Univ. Tech.)

【背景・目的】*Sphingobium* sp. SYK-6 株は、植物細胞壁の主要成分であるリグニンに由来する様々な二量体及び単量体化合物を単一炭素源・エネルギー源として生育することができる。SYK-6 株は、リグニン由来化合物の代謝過程において工業的に有用な原料化合物を産生するため、本株の代謝系を利用したリグニンからの有用物質生産が注目されている。リグニンの分子間結合の内、β-aryl ether 結合は約 50%を占める最も主要な結合様式であり、本結合の開裂はリグニンの微生物分解においてきわめて重要な反応段階であると考えられる。SYK-6 株において、β-aryl ether の二量体モデル化合物である guaiacylglycerol-β-guaiacyl ether は立体選択的な酵素群によって、Cα位の酸化及びエーテル開裂を受けて、α-glutathionyl-β-hydroxypropiovanillone (GS-HPV)へと変換される (Masai et al., 2003; Sato et al., 2009)。GS-HPV には、β*R* とβ*S* の 2 つの立体異性体が存在し、両者は glutathione *S*-transferase (GST)により glutathione の脱離を受けてβ-hydroxypropiovanillone に変換される。その内、(β*R*)-GS-HPV は LigG により変換されると考えられているが、GS-HPV 両異性体の変換に実際に関与する酵素遺伝子は明らかとなっていない (Masai et al., 2003)。本研究では、SYK-6 株における GS-HPV 両異性体の変換に関与する酵素遺伝子の同定及び機能解明を目的とした。
【方法・結果・考察】SYK-6 株ゲノム中に存在する全 18 個の GST 遺伝子から、*ligG* に加え系統解析等により 3 個の GST 遺伝子を GS-HPV 変換酵素遺伝子の候補として選抜した。これら遺伝子を発現させた *E. coli* の細胞抽出液を調製し、GS-HPV 変換能を調べた。その結果、LigG 及び LigQ が GS-HPV 変換能を持つことが示された。精製した LigG 及び LigQ を用いて GS-HPV 変換活性を調べた結果、LigG は(β*R*)-GS-HPV に対して、(β*S*)-GS-HPV より約 700 倍高い活性を示した。一方、LigQ は(β*S*)-GS-HPV に対して、(β*R*)-GS-HPV より約 6 倍高い活性を示した。SYK-6 株の GS-HPV 代謝に *ligG* 及び *ligQ* が関与するか否かを明らかにするために、相同組換えにより遺伝子破壊株を作製し、各破壊株の細胞抽出液を用いて GS-HPV 変換能を調べた。その結果、*ligG* 破壊株では、(β*R*)-GS-HPV 変換能のみ低下が観察された。それに対し、*ligQ* 破壊株では、(β*R*)-GS-HPV 変換能が低下し、(β*S*)-GS-HPV 変換能がほとんど欠損した。さらに、*ligG ligQ* 二重破壊株では、GS-HPV 両異性体に対する変換能が完全に欠損した。以上の結果から、SYK-6 株において、(β*R*)-GS-HPV の変換は *ligG* 及び *ligQ* に、(β*S*)-GS-HPV の変換は *ligQ* のみに担われることが示された。

lignin, ß-aryl ether, glutathione *S*-transferase

講演番号：4C5a04
講演日時：3 月 27 日 09:33～ 1 号館 C5 会場

Sphingobium sp. SYK-6 株におけるフェニルクマラン型化合物代謝に関与する lignostilbene α,β-dioxygenase 遺伝子の同定（第 2 報）
Identification of the lignostilbene α,β-dioxygenase genes involved in the catabolism of dehydrodiconiferyl alcohol in *Sphingobium* sp. strain SYK-6 (part II)
○増羽 龍斗[1]、廣瀬 優作[1]、高橋 健司[1]、上村 直史[1]、菱山 正二郎[2]、政井 英司[1] ([1]長岡技科大・生物、[2]森林総研)
○Ryuto MASUBA[1], Yusaku HIROSE[1], Kenji TAKAHASHI[1], Naofumi KAMIMURA[1], Shojiro HISHIYAMA[2], Eiji MASAI[1] ([1]Nagaoka Univ. Tech., [2]FFPRI)

【目的】*Sphingobium* sp. SYK-6 株は、様々なリグニン由来二量体化合物を分解することが可能であり、本株のリグニン由来化合物の代謝系遺伝子が多数単離、解析されてきた。これら代謝系遺伝子はリグニンからの有用物質生産に有用であると期待される。本研究では、高分子リグニン中で約 3–10%を占めるβ-5 結合をもつフェニルクマラン型二量体化合物である dehydrodiconiferyl alcohol (DCA)の代謝系遺伝子に着目した。SYK-6 株において DCA は、両芳香環の側鎖アルコールがカルボン酸に酸化された後、A 環側鎖の脱炭酸を受けて stilbene 構造を有する DCA-S を生成し、芳香環を連結する二重結合の開裂を受けて vanillin と 5-formylferulate に変換される。これまでに DCA から DCA-S への代謝に関与する酵素遺伝子を明らかにしてきた (Takahashi et al., 2018, *Environ Microbiol* 他)。また、DCA-S の変換には SYK-6 株が有する 8 個の lignostilbene α,β-dioxygenase (LSD)様遺伝子のうち *lsdB*、*lsdD*、*lsdE* が関与することを示唆する結果を得ている (廣瀬ら, 2016 年度本大会)。本研究では、化学的に不安定な DCA-S の HPLC 分析を改良して各 LSD 様遺伝子産物と遺伝子破壊株の DCA-S 変換活性を再評価するとともに、DCA-S 変換に伴う酸素消費活性を測定することで、SYK-6 株の DCA-S 変換に真に関与する酵素遺伝子を同定することを目的とした。
【方法】SYK-6 株及び各 LSD 様遺伝子破壊株の休止細胞および細胞抽出液を用いて DCA-S 変換活性を調べた。また、pET-16b 及び pJB864 をベクターに用いて各 LSD 様遺伝子を *E. coli* または *Pseudomonas putida* PpY1100 株で発現させ、His-tag 精製の後、各遺伝子産物の DCA-S 変換活性を調べた。DCA-S 変換活性は、基質の不安定性や分離液への可溶性を考慮し、分析条件を最適化した HPLC 分析及び反応液中の溶存酸素消費量を酸素電極で測定することにより調べた。
【結果】LSD 様遺伝子破壊株の DCA-S 変換活性を HPLC 分析により再測定したところ、野生株と比較して *lsdB*、*lsdD*、*lsdE* に加え *lsdG* 破壊株において変換能の低下が見られ、これら遺伝子の二重及び三重破壊株ではさらに変換能が低下した。また各破壊株の DCA-S 変換能は、酸素消費速度で評価した時にも同様の傾向が示された。精製した各 LSD 様遺伝子産物の DCA-S 変換活性を測定した結果、LsdD と LsdG はそれぞれ 4.6 μmol·min^{-1}·mg^{-1} 及び 9.5 μmol·min^{-1}·mg^{-1} の比活性を示し、これらに加えて LsdA と LsdC も変換活性を有していた (それぞれ LsdG の 36%と 18%)。一方、LsdB と LsdE には DCA-S の変換活性は見られなかった。現在、*lsdB* と *lsdE* の DCA-S 変換への関与の有無を明らかにするために、各遺伝子破壊株の相補実験を行なっている。

lignin, dioxygenase, stilbene

講演番号：4C5a05
講演日時：3 月 27 日 09:44～ 1 号館 C5 会場

Sphingobium 属細菌における β-1 型リグニン由来化合物の立体選択的代謝システム
Stereoselective catabolism of ß-1 type lignin-derived aromatic isomers in *Sphingobium* sp. strain SYK-6

○前川 滉大[1]、小林 将大[1]、樋口 雄大[1]、上村 直史[1]、菱山 正二郎[2]、政井 英司[1] ([1]長岡技科大・生物、[2]森林総研)
○Kodai MAEKAWA[1], Shota KOBAYASHI[1], Yudai HIGUCHI[1], Naofumi KAMIMURA[1], Shojiro HISHIYAMA[2], Eiji MASAI[1] ([1]Nagaoka Univ. Tech., [2]FFPRI)

【緒言】 リグニンには多くの不斉炭素が存在するため、リグニンに由来するβ-O-4 型やβ-1 型の二量体化合物は *erythro* と *threo* のジアステレオマーを有し、さらにこれらにはそれぞれ鏡像異性体が含まれる。様々なリグニン由来の芳香族化合物を分解する *Sphingobium* sp. SYK-6 株において、β-O-4 型化合物は、立体選択的な Cα-dehydrogenase (LigD, LigL, LigN)により酸化を受けた後、エーテル開裂を受けて代謝される (Sato et al., 2009, *Appl Environ Microbiol*)。一方、β-1 型化合物である 1,2-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-propane-1,3-diol (HMPPD)の *threo* 体 (HMPPD I/II)も側鎖 Cα位の酸化を受けて HMPPD-keto I/II に変換されて代謝され、HMPPD I の変換は LigD と LigO が担い、HMPPD II の変換は LigL が主要な役割を持つことが明らかになっている (小林ら, 2016 年度本大会)。しかし、HMPPD-keto 以降の代謝経路は不明である。本研究では SYK-6 株における HMPPD の立体選択的代謝システムの解明を目的とした。

【実験・結果・考察】 HMPPD 代謝に関与するすべての Cα-dehydrogenase 遺伝子を明らかにするために、*ligD, ligL, ligN, ligO* と系統的に近縁な 3 つの遺伝子を大腸菌で発現させ、休止細胞を 200 μM *threo*-HMPPD と反応させた。反応液をキラル-HPLC 分析した結果、SLG_12640 導入株だけが HMPPD I を HMPPD-keto I に変換することが示された。SLG_12640 破壊株を相同組換えによって作製し、破壊株の休止細胞を 200 μM *threo*-HMPPD と反応させた。その結果、HMPPD-keto II の顕著な蓄積が観察され、HMPPD-keto II の変換に SLG_12640 の関与が示唆された。SYK-6 株の細胞抽出液を 500 μM NADH/NADPH の存在下又は非存在下で 100 μM HMPPD-keto I/II と反応させたところ、HMPPD-keto は NADPH の存在下で *erythro*-HMPPD に還元されることが示唆された。*ligD, ligL, ligN, ligO* を含む計 7 つの Cα-dehydrogenase 遺伝子をそれぞれ発現させた大腸菌の細胞抽出液と 100 μM HMPPD-keto I/II とを反応させて変換能を調べた。その結果、SLG_12640 粗酵素においてのみ NADPH 存在下で HMPPD-keto II に対する還元活性が観察され、本酵素が HMPPD-keto II の *erythro*-HMPPD (HMPPD IV)への変換を担うことが示唆された。SYK-6 株の細胞抽出液は補酵素の非存在下で HMPPD I/II をほとんど変換しなかったのに対して、HMPPD IV は HMPPD-keto を経由せずに速やかに vanillin へと変換された。以上の結果から、SYK-6 株において *threo*-HMPPD は Cα位の酸化と還元によって *erythro* 体へと立体化学を反転させることで代謝が進行することが示唆された。

lignin, diarylpropane, alcohol dehydrogenase

講演番号：4C5a06
講演日時：3 月 27 日 10:05～ 1 号館 C5 会場

Lactococcus lactis subsp. *cremoris* に感染する溶菌ファージ Q1 の特性およびゲノム解析
Characterization and genome analysis of *Lactococcus* lytic phage Q1
○木室 綾華、山迫 彩華、藤野 泰寛、廣政 恭明、土居 克実（九大院農）
○Ayaka Kimuro, Ayaka Yamasako, Yasuhiro Fujino, Yasuaki Hiromasa, Katsumi Doi (Kyushu Univ. of Agric.)

【目的】
バクテリオファージ（ファージ）は細菌に感染するウイルスの総称で、ファージディスプレイなどの遺伝子工学ツールとして、また、ligase、endolysin 等の酵素の供給源としての利用が期待されている。一方、発酵過程におけるファージ混入は生産の遅延や製品の品質低下といった障害を引き起こす。このようなファージの混入は、発酵食品の一つである乳酸発酵食品においても世界中で頻繁に報告されている。本研究では、乳酸球菌に感染するファージを単離し、その性状、およびゲノム構造について解析することを目的とした。
【方法および結果】
Lactococcus lactis subsp. *cremoris* Q1 株を指示菌とした二重寒天法によりファージ Q1 を単離した。本ファージは直径 1 mm のクリアープラークを形成し、直径約 69 nm の正二十面体様の頭部、全長約 228 nm、幅約 16 nm の非収縮性尾部を有しており、*Siphoviridae* 科に分類された。ファージ Q1 は *L. lactis* subsp. *cremoris* Q1 株とその派生株 Q4 株のみに感染する狭い宿主域を示し、潜伏期 20 分、増殖期 30 分で、バーストサイズは 80 PFU/infected cell であった。また、ファージ Q1 は 4 ~ 40 ℃で 90%以上、pH5 ~ 9 で 80%以上の生残率を示した。
次に、ファージ粒子を塩化セシウム密度勾配超遠心分離法によって精製後、ゲノム DNA を抽出し、得られたゲノムの塩基配列を PacBio RS Ⅱ にて決定した。その結果、ファージ Q1 ゲノムのサイズは 59,833 bp、GC 含量は 34%で、86 個の ORF、70 個の RBS、5 種の tRNA が推定された。推定された遺伝子のうち、溶菌酵素 endolysin は *N*-acetylmuramoyl-L-alanine amidase に分類され、この他に endonuclease や protease、peptidase 等の分解酵素遺伝子の存在も示唆された。また、相同性検索の結果、ファージ Q1 は P335、936、c2 といった乳酸発酵現場で高頻度に検出されるファージグループとは相同性を示さず、報告例の些少な P087 グループに属する P087、LW31、LW33 とそれぞれ 90%以上の高い相同性が認められた。一方、ファージ Q1 と P087 は安定性や宿主域の広さに違いが見られた。両者の宿主域の差は、ファージの receptor-binding protein と宿主の細胞壁多糖の種類と構造の違いに起因するものと推察した。

bacteriophage, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Siphoviridae*

講演番号：4C5a07
講演日時：3 月 27 日 10:16～ 1 号館 C5 会場

Lactobacillus nodensis における D-arabinose 代謝経路の解析
Analysis of metabolic pathway of D-arabinose in *Lactobacillus nodensis*
○堀江 絢子、奥村 友梨、ジョ ミン、荒添 貴之、鎌倉 高志（東理大）
○Ayako Horie, Yuri Okumura, Min Jo, Takayuki Arazoe, Takashi Kamakura (Tokyo Univ. of Sci)

乳酸菌は糖を発酵し、対糖収率 50%以上の乳酸を産生するグラム陽性菌の総称であり、宿主に有益な効果を与えるプロバイオティクスとしても注目されている。糠床から単離された新種の乳酸菌 *Lactobacillus nodensis* は希少糖の一つである D-arabinose を資化できるという珍しい特性を有している（Kashiwagi, 2005）。希少糖は現在 50 種類以上確認されており、一部の希少糖では脂肪の蓄積防止やがん細胞の増殖抑制などの有用性が報告されているが、自然界における存在量が少ないためにそれらを資化できる微生物も少ない。本研究では D-arabinose の生産効率の向上やより有用な希少糖への変換など、医薬品や機能性食品への応用を視野にいれ、*L. nodensis* が有する D-arabinose 代謝機構を解明することを目的とした。

L. nodensis における D-arabinose 代謝関連遺伝子を特定するために、MMS 処理によるランダム変異導入によって D-arabinose 資化能が失われた変異株を 3 株取得した。同時に、野生株のゲノム DNA 断片を挿入したゲノムライブラリーを作製し、得られた変異株に導入することで D-arabinose 資化能の回復が確認された相補株 16 株を取得した。相補株からプラスミド DNA を回収し、D-arabinose 代謝関連遺伝子の同定を試みたが、得られた相補株は野生株ゲノム DNA 断片を含まないプラスミド DNA を保持しているものや、プラスミド DNA を保持していない株であったため、関連遺伝子の同定には至らなかった。そこで野生株（1 株）、変異株（3 株）、相補株（2 株）の全ゲノムシークエンスを行い、比較ゲノム解析を行った。野生株及び相補株ゲノムと比較して、変異株 3 株のゲノムに共通して変異が確認された *HTH-type transcriptional regulator (CbbR)*、*Inner membrane transporter*（*YjeM*）、*Uncharacterized zinc-type alcohol dehydrogenase-like protein*（*AdhB*）及び *Aerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase* の 4 遺伝子を候補としてピックアップした。

現在、変異相補実験と野生株における候補遺伝子の改変により、遺伝子機能の解析ならびに D-arabinose 資化能への関与を調査している。

lactic acid bacteria

講演番号：4C5a08
講演日時：3 月 27 日 10:27～ 1 号館 C5 会場

Identification of the electron transport components of the carbazole 1,9a-dioxygenase from the marine carbazole-degrading bacterium *Erythrobacter* sp. KY5

○ Felipe VEJARANO[1], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1,2], Yoshiyuki OHTSUBO[3], Masataka TSUDA[3], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1,2] ([1]BRC, UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Tohoku University)

[Background and objectives] Bacterial degradation of carbazole has been thoroughly studied in strains isolated from soil and activated sludge (Nojiri et al. 2001. J. Bacteriol. 183; Inoue et al. 2006. Appl. Environ. Microbiol. 72) and preliminary studies on marine carbazole degraders suggests potential for novel organizations and previously uncharacterized electron transport components of the carbazole 1,9a-dioxygenase (CARDO) (Maeda et al. 2009. Curr. Microbiol. 59; Maeda et al. 2010. Biotechnol Lett. 32), which is responsible for the first reaction in the carbazole degradation pathway. Our previous determination of the draft genome sequences of 32 carbazole-degrading strains showed that some of our marine isolates had contigs containing all the genes involved in the upper degradation pathway of carbazole, but the gene for the ferredoxin component *carAc*, one of the two necessary electron transport proteins of CARDO, was absent. In this study, we selected *Erythrobacter* sp. KY5 as a model marine carbazole degrader and set out to complete its genome sequence. Furthermore, we aimed to identify the functional constituents of CARDO from this marine strain.

[Methods and results] We determined the complete genome sequence of *Erythrobacter* sp. strain KY5 (Vejarano et al. 2018. Microbiol Resour Announc 7:e00935-18). Our analysis showed that its carbazole-degrading (*car*) gene cluster lacks *carAc*, suggesting either that KY5's CARDO doesn't require a ferredoxin to shuttle electrons from the reductase, CarAd, to the terminal oxygenase, CarAa, or that CarAc is coded by a gene located far from the *car* gene cluster. A heterologous expression experiment with *E. coli* JM109 and a resting cell biotransformation assay in 100 ppm carbazole-containing mineral medium was used to test both hypotheses. Functionality of a re-constituted system composed of only CarAd and CarAa was tested using a pBluescript II SK(-)-derived expression vector (pBKY5carAaAd). Additionally, two putative ferredoxin genes that are located at 465 and 323 kb from the *car* gene cluster were individually inserted into the plasmid for *carAa* and *carAd* expression. The results showed that only the recombinant JM109 strain expressing the ferredoxin gene located at 465 kb from *car* gene cluster was able to degrade carbazole almost completely after 24 hours of incubation. Furthermore, the production of ABP-diol, the hydroxylation product, was also unique to this sample. These results show that CARDO from strain KY5 consists of three components: CarAa and CarAd encoded by genes of the *car* gene cluster, and CarAc by a gene located at 456 kb from it. Expression of this distantly located ferredoxin gene is currently being analyzed by RT-PCR experiments.

Carbazole, Ferredoxin, Rieske non-heme iron oxygenase

発表責任者：NOJIRI Hideaki（anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4C5a09
講演日時：3 月 27 日 10:38～ 1 号館 C5 会場

紅麹 3 種の比較ゲノム解析から明らかになった Monascus pilosus NBRC4520 の食品応用有用性について

Comparative genome analysis of three Monascus strains elucidate the usefulness of food application of Monascus pilosus NBRC4520

○比嘉 悠貴[1]、金谷 重彦[2]、金 英寿[1]、小野 直亮[2]([1]小林製薬中央研究所、[2]奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科)

○Yuki HIGA[1], Shigehiko Kanaya[2], Young-Soo Kim[1], Naoaki Ono[2] ([1]R&D Center, Kobayashi Pharmaceutical Co., Ltd, [2]Graduate School of Science and Technology, Nara Institute of Science and Technology)

【背景と目的】

Monascus 属の紅麹菌を米などの穀類に生育させた紅麹米は、中国では古くから生薬として、台湾や日本では食品用途として使われてきた。近年、紅麹の持つ薬理活性が注目され、コレステロール低下作用、血圧低下作用などが報告されている。紅麹菌は、一般的に中国では *M. purpureus*、台湾では *M. ruber*、日本では *M. pilosus* が主に使われている。現在、*M. purpureus*、*M. ruber* の全ゲノム解析の報告はあるが、*M. pilosus* のゲノム情報の報告はない。本研究では、*M. pilosus* NBRC4520、*M. purpureus* NBRC4478、*M. ruber* NBRC4483 のゲノム情報から比較解析を行い、各菌株の特徴を評価する。

【方法】

紅麹菌 3 株を製品評価技術基盤機構より購入し、ゲノムを抽出後、次世代シークエンサー Miseq(illumina)を用いてゲノム情報を取得した。得られたドラフトゲノムを *M. purpureus* NRRL 1596 をリファレンスとしてアッセンブリーし、DAIMOND ultrafast BLAST を用いてアノテーションを行った。紅麹がもつ 2 次代謝物質生産に関わる遺伝子は、antiSMASH による網羅的な予測解析を行った。また、ゲノム解析を行った紅麹菌をポテトデキストロース液体培地に添加し、TAITEC BR-23FP を用いて 30℃、140rpm、7 日間培養を行った。この培養液を凍結乾燥機で粉末にし、メタノールで抽出した。この抽出液を SHIMADZU LCMS-8040 質量分析計、カラムは ODS カラムを用いて比較解析を行った。

【結果と考察】

紅麹 3 株のゲノム情報が良好に得られた。得られたゲノム情報を用いた antiSMASH の解析結果から、菌株共通の 2 次代謝に関わる遺伝子群、またそれぞれの菌株が独自の 2 次代謝に関わる遺伝子群を有することがわかった。中でも *M. pilosus* は特徴的にコレステロール低下作用で医薬品となっている Monacolin K(Lovastatin)の合成遺伝子群を有するが、腎毒性のあるカビ毒の Citrinin 合成遺伝子群は有していないことが判明した。対して *M. purpureus* は Monacolin K 合成遺伝子群が機能していない可能性があり、Citrinin 合成遺伝子群を有していた。M. pilosus は毒性のある Citrinin を作らず、機能性成分である Monacolin K を作ることがゲノム情報から明らかとなった。また、LCMS を用いた解析結果から *M. pilosus* は *M. purpureus*、*M. ruber* と比べて色素成分の種類および量が多いことが示唆された。以上のことから、紅麹菌 *M. pilosus* は機能性、安全性、色合いにおいて *M. purpureus*、*M. ruber* よりも有用であると考えられる。

Monascus, Comparative genome, Bioinformatics

発表責任者：比嘉　悠貴（y.higa@kobayashi.co.jp）

講演番号：4C5a10
講演日時：3 月 27 日 10:49～ 1 号館 C5 会場

熱ストレス下における *Zymomonas mobilis* の細胞伸長の解明
The elucidation of filament cells under heat stress in *Zymomonas mobilis*.
○遠藤 慧[1]、水木 徹[3]、三浦 健[1,2] ([1]東洋大院・生命科学、[2]東洋大学・生命科学、[3]東洋大学・バイオナノエレクトロニクス研究センター)
○Kei ENDO[1], Toru MIZUKI[3], Takeshi MIURA[1,2] ([1]Graduate School of Life Sciences, Toyo University, [2]Faculty of Life Sciences, Toyo University, [3]Bio-Nano Electronics Research Centre, Toyo University)

【背景・目的】
エタノール生産菌である *Zymomonas mobilis* は糖の資化速度が速く、高いエタノール生産性を示すためバイオエタノール生産菌株として期待されている。一方、発酵熱により、生育が低下し、さらに培養温度を上昇していくと菌の分裂が阻害され細長い糸状の形態をとることで知られている。我々は *Zymomonas mobilis* NBRC13756（W）に対して 1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine を用いてランダム的に遺伝子変異を誘発させ、熱ストレス下にて細胞伸長抑制する *Z. mobilis* ZEM1390（Z）作出した。本研究では、次世代シーケンスを用いた変異箇所解析と熱ストレス有無におけるタンパク質の発現パターンを二次元電気泳動解析で伸長現象を究明した。
【結果】
次世代シーケンスによる変異箇所解析では、*Z. mobilis* ZEM1390 を *Z. mobilis* NBRC13756 と比較した結果、12 箇所の塩基の置換と 1 箇所の挿入が確認された。しかしながら、細菌の分裂を行う機能を持つ遺伝子等の変異は確認されなかった。一方で遺伝子変異箇所のほとんどは代謝に関わる遺伝子であった。
2 次元電気泳動では、野生株 30℃培養時（30W）の泳動結果を基準としたときに全てのサンプルにてタンパク質の発現の差異が認められた。特に野生株 37℃培養時（37W）のタンパク質の発現が低かった。一方、37℃培養時の変異株（37Z）では 37W と比較したところ、タンパク質の発現低下は抑制されていた。さらに野生株、変異株間で明らかに異なるスポットが 5 個確認された。
【考察】
次世代シーケンスによる解析結果より、*Zymomonas mobilis* ZEM1390 は遺伝子変異が直接、熱ストレス下の細胞伸長抑制に影響しないことが示された。
野生株と ZEM1390 株の 2 次元電気泳動の結果では熱ストレス下の野生株と ZEM1390 株にて明らかなタンパク質の発現の差異が示された。電気泳動と電子顕微鏡の結果から熱ストレス下の *Z. mobilis* は細胞伸長が生じるとタンパク質の発現に影響を及ぼすことが推察された。現在、我々は 2 次元電気泳動にて発現されたスポットのタンパク質同定を行っている。
なお、本研究において平成 30 年度東洋大学井上円了記念研究助成を受けて行われた。

Zymomonas mobilis, 2D electrophoresis analysis, Heat stress

発表責任者：遠藤　慧（k.tugm30@gmail.com）

講演番号：4C5a11
講演日時：3 月 27 日 11:10～ 1 号館 C5 会場

陸棲藍藻の紫外線防御に関わる遺伝子と関連機能物質
Genes and functional substances related to protection against UV radiation in terrestrial cyanobacteria
○加藤 浩[1]、オン 碧[2]、木村 駿太[2]、富田-横谷 香織[2] ([1]三重大、[2]筑波大)
○Hiroshi KATOH[1], Midori ONG[2], Shunta KIMURA[2], Kaori TOMITA-YOKOTANI[2] ([1]Mie Univ., [2]Univ. Tsukuba)

【背景・目的】紫外線は地球を取り巻くオゾン層で大部分が吸収されるが、一部は地表に到達する。従って、地表の生物は、紫外線を防御する様々な機能を具備する必要がある。藍藻（シアノバクテリア）は、地球上で最初にオゾン層形成に深く関わる酸素を作り出したとされる光合成生物で、水棲種と陸棲種が存在するが、陸棲種は地表で光を直接受けることから、水棲種と比較すると、紫外線に対してより高い防御機構が存在すると予測できる。我々は、陸棲種の中でも、これまでに高い環境耐性を備えていることがわかってきた *Nostoc* 属を中心に、これまでに公開されている水生と陸棲両種の藍藻ゲノムデータベースから、地表で生活する陸棲藍藻に特有の遺伝子の存在の比較を、紫外線吸収物質に関わる遺伝子から探り、特に陸棲藍藻が具備する遺伝子の存在と、各種藍藻の環境耐性との関係を明らかにすることを目的とした。
【方法】公開されている陸棲種、水棲種の計 7 種類の藍藻ゲノムを用いて紫外線吸収に関わる遺伝子を検索した。紫外線吸収物質として既にその存在が明らかにされている藍藻に特異的なスキトネミンとカビや藻類および藍藻で検出されることが知られているマイコスポリン様アミノ酸(MAAs)の合成酵素遺伝子オペロンを各藍藻種ゲノムに対して検索した。また、陸棲藍藻 *Nostoc* 属で、特に高い環境耐性が報告されている *Nostoc* sp. HK-01 の紫外線吸収物質生産機能を併せて探索し、見出したゲノムとの関係を考察した。
【結果および考察】検索されたスキトネミン合成酵素遺伝子オペロンと MAAs 合成酵素遺伝子オペロンは、双方とも陸棲種には存在したが、水棲種では検出されなかった。MAAs 合成酵素遺伝子オペロンについて、陸棲種 *Nostoc* 属の 3 種中のゲノム構造を比較したところ、①染色体で検出される種、②プラスミドで検出される種および③検出されない種に分けられた。染色体とプラスミドの MAAs 合成酵素遺伝子オペロンの遺伝子産物の相同性を比較すると部分的に異なっていたことから、それぞれが別の機能をしているのではないかと予想された。検出されない種（③）は、それが陸棲種であるにもかかわらず水棲環境で単離されていることから、遺伝子の必要性が失われ遺伝子欠損を引き起こしたと推測される。これらの結果から、陸棲藍種は、紫外線吸収物質としてスキトネミンとマイコスポリン様アミノ酸を合成する酵素双方の遺伝子を具備することで、高い紫外線防御力機能を備えることを、ゲノムデータから示した。一方、環境耐性の高い *Nostoc* sp. HK-01 は、広い波長の紫外線に対する吸収物質生産機能を備えている可能性も確認した。本株の耐性関連物質生産機能と共に考察する。

cyanobacteria, UV, gene

発表責任者：加藤　浩（katohiro@gene.mie-u.ac.jp）

講演番号：4C5a12
講演日時：3 月 27 日 11:21～ 1 号館 C5 会場

サンゴ共在細菌の環境因子予測に向けた *Endozoicomonas* 属の系統解析
Phylogenetic analysis of genus *Endozoicomonas* for environmental response prediction of coral co-localized bacteria

○井手 圭吾[1,3]、伊藤 通浩[2]、藤村 弘行[2]、中野 義勝[2]、細川 正人[4,5]、竹山 春子[1,3]（[1]早大院・先進理工、[2]琉球大、[3]産総研・早大 CBBD-OIL、[4]JST・さきがけ、[5]早大・理工総研）
○Keigo IDE[1,3], Michihiro Ito[2], Hiroyuki Fujimura[2], Nakano Yoshikatu[2], Masahito Hosokawa[4,5], Haruko Takeyama[1,3] ([1]Dept. Life Sci., Waseda Univ. Advanced Sci and Eng, [2]Univ of Ryukyu, [3]CBBD-OIL, AIST, [4]PRESTO, JST, [5]Res. Inst. Sci. & Eng., Waseda Univ.)

【背景・目的】近年、サンゴ礁の白化が世界的な課題として注目されている。
それらにかかわる生物因子として、サンゴ共在微生物の解析がすすめられている（。特にサンゴ共在細菌叢の大部分を占める *Endozoicomonas* 属はサンゴの生存において重要な働きをすることが報告されている。本研究では、サンゴ共在 *Endozoicomonas* 属の環境因子に対する応答を共相関ネットワーク解析手法を用いて解析することで、*Endozoicomonas* 属のサンゴホロビオントにおける機能解明の一助とすることを目的とした。【方法】沖縄県瀬底島の特定サンゴ群体から、定期的に採取したサンゴ（ウスエダミドリイシ *Acropora tenuis*）の枝よりサンゴ組織を回収し、メタゲノム抽出を行った。メタゲノム抽出物に対して細菌 16S rRNA 遺伝子塩基配列を対象としたアンプリコンシーケンスおよびデジタルドロップレット PCR を行い、共在細菌叢の定量データを獲得した。また、8 種の環境因子（水温、光量、pH、塩濃度、濁度、全藻類量、クロロフィル量、蛍光有機物量）もロガーを設置することで経時的に計測した。得られた共在細菌叢データに対して共相関ネットワーク解析を適用し、微生物間で相関の高いものをモジュールとして推定した。推定したモジュール中で Endozoicomonas 属が有意に優占し、かつ、環境因子と関連の深いモジュールの抽出を行った。また、それぞれのモジュール中の Endozoicomonas 属の系統解析を行い、環境因子への応答と系統の関連を統合的に解析した。
【結果・考察】サンゴ共在細菌叢に対する共相関ネットワーク解析の結果、30 個のモジュールが推定された。そのうち、7 個のモジュールで *Endozoicomonas* 属が優占し、これらのモジュールは pH および溶存酸素に関連するモジュールと海水温に関連するモジュールに分けられた。また、それぞれのモジュールに含まれる *Endozoicomonas* 属の系統と環境因子で分けられたモジュールが強く関連していることが示唆された。
先行研究により、*Endozoicomonas* 属は海水温と関連して増減することが報告されていたが、他の環境因子と関連して増減する系統が存在することが示唆された。また、どのような環境因子に対して反応するかは系統特異的に獲得した機能であることが推測された。

Marine Microbiology, Coral associated bacteria, Network analysis

発表責任者：井手 圭吾（ide_0109@outlook.jp）

講演番号：4C5a13
講演日時：3 月 27 日 11:32～ 1 号館 C5 会場

ヒト毛根及び毛幹に付着する細菌の存在形態及び群集構造の解明
Mode and structure of bacterial community found on human scalp hair root and shaft
○渡辺 康太[1]、西 英二[2]、田代 幸寛[1]、酒井 謙二[1] ([1]九大院・生資環、[2]大分科捜研)
○Kota WATANABE[1], Eiji NISHI[2], Yukihiro TASHIRO[1], Kenji SAKAI[1] ([1]Grad. Sci Bioresour. Bioenviron.Sci. Kyushu. Univ., [2]Oita. Pref. Police. HQ.)

【背景・目的】
人体には多くの種類の細菌が存在し、部位により多様な細菌群集構造を形成している。我々はこれまでに、Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP)法により、一定量の細菌がヒト毛髪に存在しその群集構造の違いから異動識別が可能であることを示唆した (Nishi, Watanabe et al., Legal Medicine, 2017)。更に電子顕微鏡による毛髪表面の細菌観察・計測および qPCR 法による細菌数の計測、MiSeq を用いた群集構造解析を行なってきた。本研究では、更に例数を広げより詳細にヒト毛髪の毛根および毛幹に付着する細菌の群集構造の関係を明らかにすることを目的とした。
【方法】
被験者 9 名(男性 5 名、女性 4 名)から毛髪の提供を受け、毛根および毛幹 (基底部・中間部・先端部)の 4 つの断片に切断しサンプルを調製した。調製後、各毛髪サンプルを低真空・無蒸着下で電子顕微鏡を用いて毛髪表面 1 cm^2 当たりに付着する細菌の存在量の定量および形態を観察した。また、qPCR 法にて毛髪 1 cm^2 当たりの 16S rRNA 遺伝子コピー数を定量した。さらに、次世代シーケンサーによる 16S アンプリコン解析を行い、得られたデータを USEARCH、QIIME を用い細菌群集構造を解析した。
【結果】
qPCR 法によるコピー数計測の結果、毛幹部ではいずれの部位でも平均 10^5～10^6 copies/cm^2、毛根部では平均 10^7 copies/cm^2 の細菌を計測した。これらの結果は SEM 観察による細菌数計測の結果とよく一致していた。細菌群集構造解析の結果、主要細菌門は全ての被験者の毛根および毛幹において Proteobacteria、Actinobacteria、Firmicutes 門であった。Observed OTUs、PD whole tree による α 多様性解析の結果、毛幹では毛根よりも有意に多様度が大きいことが確認されたが、毛髪部位間で Weighted UniFrac distance を用いた β 多様性解析に有意差はなく、細菌群集構造が類似した。OTU レベルでの解析の結果、主要細菌種はいずれの被験者、更に毛根部と毛幹部で共通していることが明らかとなった。また、個々の被験者で主要細菌の占有率は有意に異なっていたが、同一被験者内では毛根と毛幹に付着する主要細菌の占有率が類似していた。以上の結果から、ヒト毛髪の毛根および毛幹には共通した細菌種が定着しており、毛幹定着細菌は毛根に由来する可能性が示唆された。

human hair, bacterial community structure, miseq

発表責任者：酒井謙二（kensak@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：4C5a14
講演日時：3 月 27 日 11:43～ 1 号館 C5 会場

メタゲノミクスによって機能的に差別化される南北太平洋低緯度域の微生物叢
Microbiota in the low-latitude regions of the Pacific Ocean functionally discriminated by metagenomics

○高見 英人[1]、多田 雄哉[1]、荒井 渉[1]、大久保 卓[1]、小椋 義俊[2]、林 哲也[2]、鈴木 翔太郎[3]、浜崎 恒二[3] ([1]海洋機構横浜研、[2]九大医、[3]東大大海研)
○ Hideto Takami[1], Yuya Tada[1], Wataru Arai[1], Takashi Okubo[1], Yoshitoshi Ogura[2], Tetsuya Hayashi[2], Shotaro Suzuki[3], Koji Hamasaki[3] ([1]JAMSTEC, [2]Kyushu Univ. Med., [3]Univ. of Tokyo AORI)

【目的】

南北太平洋亜熱帯貧栄養海域および赤道湧昇域を対象として、微生物群集の生理代謝機能ポテンシャルに基づいた海域の特徴付けを目的とした。また、海水中の微生物叢は、海洋の懸濁粒子に付着した群集と自由遊泳群集からなるため、各画分における微生物群集の機能とそれに寄与する生物種組成の特徴付けを目的とした。

【方法】

サンプルとして、2011~2012 年にかけて白鳳丸により行われた調査航海で取得した海洋表層水より回収した微生物バイオマスを用いた。各海域から得られた 3 サンプルをサイズ分画により自由遊泳画分と付着画分に分けた計 18 サンプルからメタゲノム DNA を抽出し、MiSeq により配列決定した。300 塩基以上の(paired-end)100～250 万配列を Metabolic and physiological potential evaluator (MAPLE)に供試し、KEGG モジュールに対する充足率(MCR)が 100%を示したモジュールのアバンダンス、リボソームタンパク質に基づく菌叢組成などを算出した。また、各サンプルでのモジュールアバンダンスと菌叢組成のパターンを用いた多次元尺度法(NMDS)による解析を行い、付着と自由遊泳画分、各画分における海域間の違いの有意性を統計的に検証した。

【結果】

リボソームタンパク質に基づく菌叢解析において、自由遊泳画分は殆ど真核生物が未検出であるのに対し、付着画分では全菌叢の 6~8%を占めていた。自由遊泳画分では 95~96%をバクテリアが占め、アーキアの割合は一般に 2~3%と低く、特に南太平洋貧栄養海域では~0.6%未満と極めて低かった。海洋のアーキアは Marine Group II がその大半を占めるが、これまでメタゲノム的に再構築された複数のドラフトゲノム配列との類似性の低さから、未知なるアーキアワールドの存在が示唆された。付着と自由遊泳画分の原核生物由来のモジュール機能のアバンダンスには明確な違いが認められ、統計的にも支持された。南北貧栄養海域では自由遊泳画分と比べ付着画分のアバンダンスが 2 倍以上高い機能に共通点が多く、それらの機能を担う微生物組成も類似性が高いため、貧栄養海域の特徴と思われる。その一方、一部機能には、微生物種組成に違いも見られるため、同じ機能を担う微生物にも多様性の存在が明らかとなった。また、同じ画分での海域間にも赤道域の一部を除き機能的有意差が見られ、統計的にも支持されたことから、単に菌叢組成ではなく微生物叢の機能的違いに基づく海区分けが可能であることが分かった。

functional metagenomics, MAPLE system, microbiota of Pacific Ocean

発表責任者：高見英人（takamih@jamstec.go.jp）

講演番号：4C5a15
講演日時：3 月 27 日 11:54～ 1 号館 C5 会場

マルチオミクス解析によって明らかになった自然環境下での木材分解の多様性
Multi-omics analyses of extensively decayed Pinus contorta
○堀 千明[1,2]、ジル ガスケル[2]、大井 俊彦[1]、松本 謙一郎[1]、ダン カレン[2] ([1]北海道大学、[2]USDA Forest Products Laboratory)
○Chiaki HORI[1,2], Gaskel Jill[2], Toshihiko Ooi[1], Ken'ichiro Matsumoto[1], Cullen Dan[2] ([1]University of Hokkaido, [2]USDA Forest Products Laboratory)

［研究背景］ 木材腐朽菌の多くは担子菌に属し、植物細胞壁の主要成分であるセルロース・ヘミセルロース・リグニンを効率的に分解できることが知られている。これまで植物分解に関わる酵素に関しては、実験室内条件では無数の報告がなされているが、実際の環境下については、土壌などからのサンプルに限られており、木の分解に着目して行われていない。最近になって多数の菌類のゲノム情報が蓄積され、マルチメタ解析を行うのに十分なプラットフォームが構築されつつある。したがって本研究では、コントルタ松を対象としてメタゲノム・メタトランスクリプトーム・メタプロテオーム解析を行い、実際の腐朽環境下で植物を分解する菌や酵素を明らかにすることを目的とした。

［方法・結果及び考察］ 木粉からゲノム DNA、ポリ A 付加 RNA、タンパク質を各々抽出した。抽出した DNA を鋳型に ITS 領域を増幅し、次世代シーケンサーで解析した結果、担子菌（3.9–56%）よりも子嚢菌（45–95%）の方が多く検出された。一方で、抽出した RNA やタンパク質を次世代シーケンサーおよび LC–MS を用いて解析した結果、その多くは担子菌由来であり、木材分解酵素についてはほとんどが担子菌由来であった。このことは、自然界での植物の分解者として木材腐朽菌が重要な役割を果たしていることが示された。また、木材分解酵素の中でも発現量が多いものはセルロース分解酵素であり、これまでに調べられている既知の様々なセルラーゼが多くを占めていた。一方でリグニン分解については、試験管内で調べられてきた酵素のと照らし合わせて、一部のものしか検出されなかった。以上から、自然界での様々な微生物が協調して木材を分解していることが明らかにされた。1) Hori et al. Multi–omics analyses of extensively decayed Pinus contorta reveal expression of diverse array of lignocellulose degrading enzymes. Appl. Environ. Microbiol. In press

metaomics, glycoside hydrolase, wood decay

講演番号：4C7a01
講演日時：3 月 27 日 09:00～ 1 号館 C7 会場

富有柿幼果の振とう発酵および発酵にともなう機能性の変化

Shaking fermentation of young persimmon using *Aspergillus awamori* increased functionalities

○折居 千賀（（公財）東洋食品研究所）
○Chika ORII (TOYO INSTITUTE of FOOD TECHNOLOGY)

【背景】これまで我々は黒麹菌を用いた富有柿幼果の固体発酵および発酵にともなう機能性の増強について報告してきた[1)]。しかし、麹菌は液体発酵で発現する酵素が固体発酵時とは異なるとされている。そこで、柿の発酵について液体もしくはそれに準ずる発酵法を検討することで、新たな発酵形態の確立および固体発酵とは別の機能性成分が得られることが考えられた。本報告では細断した富有柿幼果を水に浸漬し、振とうしながら発酵を行う振とう発酵法について検討したので報告する。
【方法】滅菌済みのバッフルフラスコに細断した富有柿幼果 40 g と水 90 ml を投入した。黒麹菌の胞子懸濁液を添加したのち 35℃で 7 日間、100 rpm で振とう培養を行った。発酵終了後、培養液を回収し、フィルターろ過したのち減圧乾固した。得られた抽出物を 10%(w/v)となるように水に再溶し、試料液とした。得られた試料液を用いて、β-リパーゼ阻害活性、ACE 阻害活性、DPPH ラジカル消去活性、総ポリフェノール量を測定し、固体発酵と比較した。また、LC/MS 分析を行い、発酵生成物の比較を行った。そのほか味認識装置を用いて固体発酵物抽出液との風味比較を行った。
【結果】振とう発酵において、黒麹菌は富有柿幼果を唯一の栄養源として良好な生育を示し、果肉が軟化したが固体発酵のような色の変化や不快な臭いは認められず、胞子の形成は見られなかった。予備検討時はβ-リパーゼ阻害活性、ACE 阻害活性、総ポリフェノール量および DPPH ラジカル消去活性において固体発酵よりも高い値を示した。そこで、本試験として再現性を確認したところ、β-リパーゼ阻害活性は IC_{50}=1.9±0.6 μg/ml で固体発酵とほぼ同等の阻害活性の増強が見られた。一方、ACE 阻害活性では IC_{50}＝393.7±51.3 μg/ml で阻害活性の増強が見られたが、固体発酵のほうが高い阻害活性を示した。総ポリフェノール量および DPPH ラジカル消去活性もまたそれぞれ増加したが固体発酵の方が高い値を示した。LC/MS 分析を行ったところ、それぞれの抽出液においてクロマトグラムに相違が見られた。特徴的なのは没食子酸の生成で、本試験時の試料では没食子酸の生成が顕著な発酵物とそうでないものとに分かれた。没食子酸が生成した試料は各種機能性試験において他よりも高い値を示した。これらのことより、振とう発酵では没食子酸が生成する発酵状態であることが機能性の増強に重要である可能性を示唆した。また、味認識装置による風味の比較では振とう発酵は酸味および渋味刺激が増強し、旨味が減少した。これらの結果は振とう発酵が外見の改善も含め、柿の新たな発酵形態となりうることを示した。

1)日本栄養・食糧学会誌、Vol. 68、p225-232(2015)

young persimmon, *Aspergillus awamori*, shaking fermentation

講演番号：4C7a02
講演日時：3 月 27 日 09:11～ 1 号館 C7 会場

竹粉を利用した乳酸菌の増殖と筍発酵食品の開発

Growth of lactic acid bacteria and production of fermented bamboo shoots using bamboo powder

○前田 勇[1]、沢谷 実里[1]、太田 宏美[1]、根岸 潤実[1]、若山 太郎[2] ([1]宇都宮大農、[2]若山農場)
○Isamu MAEDA[1], Minori SAWAYA[1], Hiromi OTA[1], Hiromi NEGISHI[1], Taro WAKAYAMA[2] ([1]College of Agric., Utsunomiya Univ., [2]Wakayama Farm)

竹粉は竹稈を数百マイクロメートル程度の大きさに粉砕したものである。竹の常在乳酸菌を含み、これまでは家畜の飼料や肥料などに利用されている。近年、竹の材料としての需要低下から竹林の荒廃が全国的に進んでいる。竹は地下茎の広がりが早いため間伐されない場合には周縁部への侵食被害等も生じるため間伐材の新たな有効利用法の開発が急務となっている。一方、筍は様々な調理法で食される。メンマは筍の発酵食品の一つであり、現在日本で消費されるメンマのほとんどは中国・台湾からの輸入品である。このため国産メンマに関して一定の需要が見込まれるが、中国・台湾からの輸入品の原料は日本で繁殖していないマチクの筍であるため、国産メンマを製造する場合は原料を日本で繁殖するモウソウチクやマダケの筍に代替した上で新たな製造法の開発が求められる。そこで本研究では、モウソウチク筍を原料とした新たな筍発酵食品の開発を目的として、竹や筍に関連した材料からの乳酸菌の単離・同定を試みた。単離された乳酸菌の中から竹粉中での増殖速度が高いものを選抜し、竹粉中での増殖条件の最適化を図ることで竹粉を発酵床とした筍発酵食品の開発を目指す。

竹粉はモウソウチクを原料として用い、栃木県茂木町の美土里館で製造あるいは製造・販売されたものを使用した。筍や竹チップ、竹粉、メンマからの乳酸菌の単離は、MRS 平板培地上におけるコロニー形成により行った。乳酸菌の同定は 16S rRNA 遺伝子の部分配列を PCR により増幅し、それらの塩基配列を決定し、NCBI の BLAST 検索により行った。増殖は濁度測定あるいは平板培養による生菌数測定で、D-/L-乳酸の測定は酵素法でそれぞれ行った。

単離された乳酸菌は、*Lactobacillus* 属、*Leuconostoc* 属、*Weissella* 属の細菌であり、これらの中では *Lactobacillus* 属の細菌が多く見出された。竹粉中での増殖速度が高い乳酸菌として、*Lactobacillus casei*（Lc）と *Lactobacillus plantarum*（Lp）を選抜した。竹粉を発酵床とした場合、竹の C/N が高いためこれら乳酸菌の増殖が抑えられることが判明した。そこで窒素源として米糠の添加割合を検討した。その結果、質量比で米糠を竹粉の 2 割以上加えることで Lc、Lp 共に竹粉中における増殖速度と乳酸生成、pH の低下が大幅に増加することが明らかとなった。米糠の割合を増やしていくことで緩衝作用により pH の低下が緩やかになる傾向が認められた。また、竹粉・米糠への NaCl の添加は Lc、Lp 共に増殖と乳酸生成に抑制的に働いた。最適化した条件でモウソウチク筍を発酵させたところ 24 時間で筍表面における pH の低下が認められ、酸味の効いた筍発酵食品を製造できることが示された。

bamboo powder, lactic acid bacteria, bamboo shoot

発表責任者：前田勇（i-maeda@cc.utsunomiya-u.ac.jp）

講演番号：4C7a03
講演日時：3 月 27 日 09:22～ 1 号館 C7 会場

紀州なれずしの発酵工程における乳酸菌の役割
The role of Lactic acid bacteria of kishu-narezushi in the process of its fermentation
○久保 実希、丹羽 諒、大野 智生、水野 智文、ヨラニ シャプトリ、中川 智行、岩橋 均 (岐大応生)
○Miki KUBO, Ryo NIWA, Tomoki ONO, Tomohumi MIZUNO, Syaputri Yolani, Tomoyuki NAKAGAWA, Hitoshi IWAHASHI (Gifu Univ. of A.B.B.)

１．目的

紀州なれずしは和歌山県の郷土料理として知られ，現代の寿司の元祖ともいわれている。開いて塩漬けにした鯖を飯に乗せ，あせの葉で包み，発酵させることで食酢を使用せず酸味や風味を出す。発酵させる為に独特の香りをもち，「くさりずし」と呼ばれることもある。発酵に関わる菌として，これまでに主に乳酸菌を分離した例が報告されている。本研究では，より詳細に発酵過程を検討するため，次世代シーケンサーを用いて，原核微生物および真核微生物を対象とした菌叢解析を行った。また，紀州なれずし及びなれずしを包むために使用するあせの葉から，乳酸菌の分離を試みた。

２．方法

和歌山県和歌山市の弥助寿司から購入した紀州なれずし，及びなれずしを包むために使用するあせの葉(漬け込み前のもの)を試料とした。紀州なれずしについて，米部分，魚部分および両部分からDNAを抽出し，次世代シーケンサー（illumina MiSeq）による16S rRNAおよびITS領域のメタゲノム解析を行った。また，MRS寒天培地を用いて紀州なれずしの米部分，魚部分，およびあせの葉から細菌を分離し，16S rRNAの配列比較により菌種を同定した。

３．結果

次世代シーケンサーによる16S rRNAメタゲノム解析の結果，米部分，魚部分，両部分のすべてから*Lactobacillus*属が最もよく検出された。またITS領域では*Aspergillus*属が検出された。

分離された細菌の16S rRNAの配列比較では，米部分から*L.plantarum*，*L.fermentum*，*L.paracasei*の乳酸菌3種が同定された。魚部分については *L.plantarum*，*L.fermentum*が同定された。，また，紀州なれずしを包む前のあせの葉からも*L.plantarum*，*L.fermentum*，*L.paracasei*の3種が同定された。現在，これら乳酸菌の発酵工程における役割について検討している。

fermented food, Lactic acid bacteria, NGS

発表責任者：岩橋均（h1884@gifu-u.ac.jp）

講演番号：4C7a04
講演日時：3 月 27 日 09:33～ 1 号館 C7 会場

阿波晩茶の製造工程における乳酸菌の動態

Dynamics of lactic acid bacteria in the production process of Awa-bancha

○西岡 浩貴[1]、水野 智文[2]、岩橋 均[2,3]、堀江 祐範[3,4] ([1]徳島県工技セ、[2]岐阜大院・自然科技、[3]岐阜大院・連合農学、[4]産総研・健康工学)
○ Hiroki NISHIOKA[1], Tomofumi MIZUNO[2], Hitoshi IWAHASHI[2,3], Masanori HORIE[3,4] ([1]Tokushima Prefectural Industrial Technology Center, [2]Graduate School of National Science and Technology, Gifu Univ., [3]Graduate School of Agricultural Science, Gifu Univ., [4]Health Research Institute, AIST)

１．目的

阿波晩茶は後発酵茶のひとつであり、徳島県の上勝町と那賀町で製造されている。阿波晩茶の製造工程は、収穫した茶葉を茹で（殺青）、2～4週間程度漬込んだ後に天日で乾燥させて製品となる。漬込み工程は乳酸菌を主とした嫌気発酵で行われ、製品の品質を左右する重要な工程であるが、発酵に関わる乳酸菌の菌種や占有率、由来の詳細は不明である。阿波晩茶の製造工程における乳酸菌の動態を明らかにすることができれば、阿波晩茶の品質安定化や製造技術向上への貢献が期待される。そこで、本研究では阿波晩茶の製造工程ごとに茶葉をサンプリングし、それぞれの試料について乳酸菌の遺伝子解析を行い、菌種や占有率を調査した。

２．方法

上勝町及び那賀町の阿波晩茶生産者から採取した各製造工程の茶葉（原料茶葉、殺青後茶葉、漬込み後茶葉）を試料とした。各試料について、次世代シーケンサー（illumina MiSeq）による16S rRNAメタゲノム解析を行った。また、試料からMRS寒天平板を用いて乳酸菌を分離し、16S rRNAの配列比較により菌種を同定した。さらに、*Lactobacillus plantarum*グループに同定された菌株に対しては、*recA*遺伝子によるmultiplex PCRにより近縁種の分離を行った。

３．結果

次世代シーケンサーによる16S rRNAメタゲノム解析の結果、原料茶葉および殺青後茶葉では*Aerosakkonema*属などが優勢であったが、漬込み後の茶葉はどの生産者も*Lactobacillus*属が最も優勢であった。また、分離された乳酸菌について16S rRNA の配列比較を行った結果、原料茶葉や殺青後茶葉からは多様な菌種の乳酸菌が同定されたが、漬込み後茶葉からはどの生産者も*L.plantarum*が最も頻繁に分離された。さらに、*L.plantarum*グループに対するmultiplex PCRを行った結果、*L.pentosus*と*L.plantarum*が同定され、ほとんどの生産者で*L.pentosus*が優勢であった。これらの結果より、阿波晩茶の製造工程において、漬込み前の茶葉の菌叢は乳酸菌が優勢ではないことに加え乳酸菌種も多様であるが、漬込み工程により*Lactobacillus*属に選抜され、特に*L.pentosus*が優勢になることが示唆された。

Awa-bancha, Post fermented tea, Lactic acid bacteria

発表責任者：西岡　浩貴（nishioka@itc.pref.tokushima.jp）

講演番号：4C7a05
講演日時：3 月 27 日 09:44～ 1 号館 C7 会場

仕込み年度の異なる山廃酛における菌叢変遷および化学成分変化の比較

Comparison of microbial flora and chemical composition change in the *Sake* starter *Yamahai-Moto* fermentation between different years of preparation

○辻 篤史[1]、児沢 美幸[2]、徳田 耕二[2]、小柳 喬[3] ([1]石川工試、[2](株)車多酒造、[3]石川県大食科)
○ Atsushi TSUJI[1], Miyuki KOZAWA[2], Koji TOKUDA[2], Takashi KOYANAGI[3] ([1]Industrial Research Inst. of Ishikawa, [2]Shata Shuzo co., ltd., [3]Ishikawa Pref. Univ. of Food Science)

【目的】これまで、伝統的な日本酒スターターである山廃酛の製造（発酵）過程で *Lactobacillus sakei* 等の乳酸菌が優勢化する現象が報告されてきた。しかし、自然発酵である山廃酛の発酵過程は、原料の微生物叢や製造環境の影響が大きく、未だ十分に理解されたとは言い難い。そこで本研究では、酒蔵で製造された山廃酛について、経時的に次世代シーケンサーによる細菌叢解析と有機酸、糖、遊離アミノ酸等の化学成分分析を同時に実施し、細菌叢変遷と化学成分変化の関連について考察を行った。また、同一酒蔵で仕込み年度の異なる山廃酛における菌叢変遷の比較を行った。

【結果と考察】16S リボソーム RNA 遺伝子の V4 領域の次世代シーケンシングの結果、山廃酛における発酵初期の硝酸還元菌（*Pseudomonas* 属）や乳酸球菌（*Leuconostoc* 属）を含む雑多な細菌叢は、発酵中期（6-7 日目）に *L. sakei* が優勢の細菌叢へと急激に変遷した。また同タイミングで、pH の減少と乳酸菌生菌数の増加が生じていた。興味深いことに、*Lactobacillus acidipiscis* が優勢であった 2 年前の仕込みと今回の初期の細菌叢は明確に異なるにも関わらず、最終的に *L. sakei* が優勢となる点は共通していた。このことは、山廃酛の仕込み条件に、*L. sakei* が他の細菌種よりも優位に増殖可能な要因が存在することを示唆している。化学成分変化としては、発酵過程全体を通じて *L. sakei* やコウジカビ（*Aspergillus oryzae*）の代謝物と推察される乳酸、酢酸、ブドウ糖、イソマルトース、大部分の種類の遊離アミノ酸の増加が認められた。他方、発酵中期から後期にかけ、一旦は増加したアルギニンの減少とそれに伴うオルニチンの増加という特筆すべき成分変化が認められた。同山廃酛から単離した *L. sakei* の 38%がアルギニンからのオルニチン生成能を示したことから、本成分変化には *L. sakei* による低 pH 環境下への耐性機構として報告されているアルギニンデイミナーゼ経路が関与することが示唆された。

Tsuji, A, et al. *Curr. Microbiol.* 75.11 (2018): 1498-1505.
Koyanagi, T, et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 80.2 (2016): 399-406.

sake, microbiome, lactic acid bacteria

発表責任者：辻　篤史（tsuji@irii.jp）

講演番号：4C7a06
講演日時：3 月 27 日 10:05～ 1 号館 C7 会場

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* におけるリジン高含有機構の解析
Analysis of the high-containing mechanism of L-lysine in *Saccharomyces cerevisiae*
今西 浩之、○豊川 洋一、KOONTHONGKAEW Jirasin、杉本 幸子、那須野 亮、渡辺 大輔、高木 博史（奈良先端大バイオ）
Hiroyuki IMANISHI, ○Yoichi TOYOKAWA, Jirasin KOONTHONGKAEW, Yukiko SUGIMOTO, Ryo NASUNO, Daisuke WATANABE, Hiroshi TAKAGI (NAIST of Biol. Sci.)

【目的】リジンは必須アミノ酸の中でも充足率が低いアミノ酸であり、生体内でのタンパク質利用効率に影響を与えることが知られている。従って、安全性の高い酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いてリジン高含有株を取得または作製し、その機構を解明することで、食品産業への利用だけでなく、さらなる高含有株育種への応用が期待できる。本研究では沖縄の伝統的焼酎「泡盛」の蒸留粕に着目した。泡盛の醸造過程で副生成物として生じる蒸留粕は、栄養素を豊富に含むため家畜飼料としての再利用が期待されている。しかし、アミノ酸バランスの観点からリジンを添加する必要がある。また、これまでに酵母細胞内においてリジン高含有の原因となる遺伝子変異の報告はあるが、これらの変異の組み合わせが細胞内リジン含量に及ぼす影響についての報告はない。そこで本研究では、泡盛の醸造に用いられる泡盛酵母（101-18 株）を用いてリジン高含有株を取得し、得られた株のリジン高含有機構を解析した。また、酵母におけるリジン高含有機構の基盤情報の獲得を目指し、リジン高含有が見込まれる既知の変異を同時に導入した酵母を作製し、細胞内リジン含量に及ぼす影響を解析した。
【方法・結果】泡盛酵母のリジン高含有変異株を取得するため、リジンの毒性アナログである *S*-アミノエチルシステイン（AEC）を用いてスクリーニングを行った。その結果、親株である 101-18 株の約 1.9 倍のリジンを含む変異株（101-18-27 株）を取得した。本変異株の遺伝子を解析した結果、リジン生合成の鍵酵素であり、リジンによるフィードバック阻害を受けるホモクエン酸シンターゼ（HCS）をコードする *LYS20* 遺伝子に、アミノ酸置換（S385F）を伴うヘテロな変異を見出した。また、この変異型遺伝子（$lys20^{S385F}$）を導入した株では、野生型遺伝子（*LYS20*）の導入株と比べて、細胞内リジン含量が約 4.3 倍に増加した。この結果から、HCS 内の S385F 置換は細胞内リジン高含有に寄与していることが示された。現在、S385F 置換が HCS の酵素活性（特にリジンによるフィードバック阻害）に及ぼす影響を解析している。さらに、今回確認された HCS の S385F 置換のほか、これまでに R276K 置換によるフィードバック阻害感受性の低下、Lyp1（リジンパーミアーゼ）のアミノ酸欠失（2-61 残基目）による細胞膜上での安定化、Lys14（リジン合成関連遺伝子群の転写活性化因子）のアミノ酸欠失（298-317 残基目）による恒常的発現などが報告されている。そこで、これら三つの変異型遺伝子を導入した形質転換体を作製したところ、野生型株と比べて約 3.7 倍の細胞内リジン含量を示した。現在、それぞれの変異型遺伝子の組み合わせが細胞内リジン含量に及ぼす影響について詳細な解析を行っている。

Saccharomyces cerevisiae, L-lysine

発表責任者：高木博史（hiro@bs.naist.jp）

講演番号：4C7a07
講演日時：3 月 27 日 10:16～ 1 号館 C7 会場

微生物発酵酒かすの成分解析
Component analysis of microbial fermented sake lees.
○鍋倉 義仁、佐藤 圭吾、金桶 光起（新潟県醸造試験）
○ Yoshihito Nabekura, Keigo Sato, Mituoki Kaneoke (Niigata Prefectural Sake Research Institute)

【目的】清酒製造より生成する酒かすは、多数の栄養成分、および機能性を有しているが、その消費量は近年減少している。そこで酒かすを各種微生物で再度発酵することにより、食材としての高付加価値化ができるのではないかと考えた。我々は、酒かすを乳酸菌、あるいは酢酸菌で発酵してその成分変化を測定し、有用成分の増加を確認したので報告する。

【実験方法】酒かすを蒸気で 30 分蒸してアルコール分を除去した。この酒かすに *Lactobacillus paracasei* NPSRIk-4 , *Gluconobacter oxydans* NBRC 3189, *Komagataeibacter xylinus* NBRC 16644 の 3 株を液体培養して、その 1 ml を接種した。蒸留水 1 ml を接種した酒かすを対照とした。30℃、2 日間静置培養した後、10,000 rpm, 20 分の条件で遠心分離して液相部分を回収した。これを、0.45 μm メンブレンフィルターでろ過して定量試料とした。糖、有機酸、アミノ酸含有量を HPLC で定量した。グルコン酸の定量を F-Kit で行った。遊離フェルラ酸の定量を、メタノール・酢酸溶液で液相より抽出し、p-アニス酸を内部標準として HPLC で定量した。ビタミン類、および生体アミン類の定量を日本食品分析センターに依頼した。

【結果】乳酸菌、および酢酸菌で発酵した酒かすの成分変化をヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ社に依頼して網羅的に解析したところ、酢酸菌を用いた発酵酒かすでは、スペルミン、ピリドキサール、フェルラ酸が対照と比較して顕著に増加していた。網羅的成分解析結果を基に、発酵による各種成分の定量を行った。その結果、生成した有機酸は発酵菌の特徴をよく示していた。一方、スペルミジンを含む生体アミン類は検出されず、水溶性ビタミン類の発酵による変化は認められなったが、*Komagataeibacter xylinus* NBRC 16644 を用いて発酵した酒かすでは、0.31 μg/100g のビタミン B12 が含まれていた。さらに、遊離フェルラ酸量は、乾燥重量 1g 当たり原料酒かすは 36 μg であったが、酢酸菌により発酵した酒かすには 264 μg 含まれており約 7 倍増加した。

以上の結果から、酒かすを微生物で 2 次加工することにより、新しい付加価値を有する酒かすの生産が可能であることが明らかとなった。

sake lees, *Lactobacillus paracasei*, ferulic acid

講演番号：4C7a08
講演日時：3 月 27 日 10:27～ 1 号館 C7 会場

嫌気処理による清酒粕葉酸減少抑制の培養酵母モデル構築と解析

Construction and analysis of folate retention models of *sakekasu* under anaerobic condition.

○村上 葉月[1,2]、原田 春佳[1,2]、濱田 涼子[1]、金井 宗良[1]、藤井 力[1,2]（[1]酒総研、[2]広島大院生物圏）
○ Hazuki MURAKAMI[1,2], Haruka HARADA[1,2], RYOKO HAMADA[1], Muneyoshi KANAI[1], Tsutomu FUJII[1,2] ([1]NRIB, [2]Hiroshima Univ.)

【目的】葉酸は、不足すると心筋梗塞や認知症、胎児の神経管閉鎖障害の発症リスクが高まることが知られているビタミンである。清酒粕は葉酸を高含有し、葉酸不足を補う食品として有効と考えられるが、保存中に減少してしまうことが欠点であった。我々は嫌気処理が清酒粕中葉酸含量減少を抑制することを明らかにするとともに、嫌気処理で葉酸含量減少が抑制される酵母培養モデルを構築、機構解明を目指した実験を行っている。本発表では、清酒粕中により近い状態の酵母の代謝産物の違いや遺伝子発現の違いを解析するため、前培養を嫌気的にしたモデル（嫌気前培養モデル）と清酒もろみから単離した酵母を用いたモデル（もろみ酵母モデル）を構築し、解析した。
【方法】各モデルでは、YPD 寒天培地に酵母が増殖しない密度で塗布、嫌気条件と好気条件での代謝産物や遺伝子発現を解析した。嫌気処理は脱酸素剤を用いて行った。
【結果】嫌気前培養モデルでは予想に反し、前培養を好気的にしたモデル（好気前培養モデル）に比べ、葉酸含量の抑制効果が小さく、葉酸合成経路等の遺伝子発現の傾向は似ているものの、嫌気処理による発現量の変化は好気前培養モデルに比べ小さかった。そこで、もろみ酵母モデルを構築し解析した。もろみ酵母モデルでは、清酒粕や好気前培養モデルと同様に、嫌気処理による葉酸含量の減少抑制が観察された。一方、清酒粕では好気条件でも嫌気条件でも減少するグリセロホスホコリン含量はもろみ酵母モデルで減少しないなど、清酒粕の代謝産物の挙動と完全には一致しなかった。これまでに構築した３つのモデルを解析することで、嫌気処理による清酒粕の葉酸含量減少の抑制機構の一端が明らかにできると考え、さらに解析を進めている。
本研究の一部は、SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」により実施した。

sakekasu, folate, anaerobic condition

発表責任者：村上　葉月（m173290@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：4C7a09
講演日時：3 月 27 日 10:38～ 1 号館 C7 会場

清酒もろみで米麹酵素との共同作用によりフェルラ酸とフェルラ酸エチルの生成を促進する *Trichoderma* 属由来酵素の同定

Identification of an enzyme from genus *Trichoderma* that can accelerate formation of ferulic acid and ethyl ferulate in collaboration with rice *koji* enzyme in sake mash.

伊藤 俊彦[1]、佐藤 杏奈[1]、高橋 樹[1]、伊藤 貴人[1]、高野 康人[1]、野下 浩二[1]、奥田 将生[2]、○橋爪 克己[1] ([1]秋田県大生物資源、[2]酒総研)
Toshihiko Ito[1], Anna Sato[1], Itsuki Takahashi[1], Takahito Ito[1], Kouto Takano[1], Koji Noge[1], Masaki Okuda[2], ○Katsumi Hashizume[1] ([1]Akita Prefectural Univ., [2]NRIB)

【目的】フェルラ酸（FA）及びフェルラ酸エチル（FE）は、苦味や渋味などを呈し、清酒の官能的品質に影響を及ぼしている。FA 及び FE は、原料米に由来し、麹の酵素により生成される[(1)]。FA の原料米からの移行率は 20%程度であるが、この低い移行率は清酒の官能的品質に好ましい影響を及ぼしていると考えられる。これまでの検討から、清酒麹のセルロース及びキシラン分解酵素活性は極めて低くいため[(2)]、清酒もろみにおける FA 及び FE 生成は、フェルロイルエステラーゼの基質となる前駆体の生成段階で律せられていることが推定された。そこでこの前駆体生成に関与する酵素を明らかにすることを目的として、フェルロイルエステラーゼ活性は微弱であるが、比較的強いキシラン分解酵素活性を持つ *Trichoderma* 属由来のセルラーゼ剤を用いて検討を行った。
【実験方法】FA 前駆体の生成力を清酒もろみに擬した条件下で測定するため、α-米粉を基質として pH4.3、30℃、1000rpm 振とう条件下で反応を行い、生成物をフェルロイルエステラーゼ処理して FA を測定する活性測定法を用いて検討した。
【結果】①清酒米麹の FA 前駆体の生成力は極めて微弱で、清酒もろみでは FA 及び FE の生成は FA 前駆体の生成が律速している可能性を確認した。②清酒もろみに *Trichoderma* 属由来のセルラーゼ剤を添加すると、FA 及び FE レベルが上昇するとことを確認した。③*Trichoderma* 属由来のセルラーゼ剤から、各種クロマトグラフィーにより FA 前駆体生成活性を示すタンパク質を精製し、2 種類の標品を得た。精製標品をピログルタミルアミノペプチダーゼ処理して、N 末端アミノ酸配列を分析し、Blastp 検索した結果、得られた標品は、GH family10 キシラナーゼ及び GH family11 キシラナーゼと同定された。④GH10 キシラナーゼは GH11 キシラナーゼと比較して米からの FA 前駆体生成活性が高かった。⑤精製標品を清酒もろみに添加したところ FA 及び FE レベルが上昇した。 このとき GH10 キシラナーゼが GH11 キシラナーゼよりも大きな効果を示した。以上の検討から、清酒もろみにおけるキシラナーゼ、とりわけ GH10 キシラナーゼによる FA 前駆体（フェルロイルオリゴ糖）生成反応が清酒の FA 及び FE レベルに影響を及ぼしている可能性が示された。

参考文献（1）Suzuki *et al. J. Biosci. Bioeng.,* 121, 281-285 (2016)
（2）Yamane *et al. J. Biosci. Bioeng.*, 93, 9-14 (2002)

sake, ferulic acid, xylanase

講演番号：4C7a10
講演日時：3 月 27 日 10:49～ 1 号館 C7 会場

長鎖アルコールは低溶解度のために生物作用を示さない
Long-chain alcohols do not exhibit biological effects due to low solubility
○松本 惇志、寺島 一郎、上園 幸史（東大院理）
○Atsushi MATSUMOTO, Ichiro TERASHIMA, Yukifumi UESONO (The Univ. of Tokyo)

エタノールをはじめとするアルコールは、微生物の増殖阻害作用や動物の麻酔作用を示す。どちらの作用もアルキル鎖長（C_n≒疎水性）の増加に伴い増強するが、一定鎖長（C_{13}）以上の長鎖アルコールはどれだけ加えても作用を示さない。これはカットオフと呼ばれる 80 年以上未解明の現象である。これまで、タンパク質のポケットや脂質膜の相転移など様々な仮説で説明が試みられたが、統一的な見解は得られず議論が続いている。

本研究では、タンパク質や脂質などの生物側の性質に着目した従来の視点とは異なり、アルコール自体の物性に着目し、微生物を用いてカットオフ現象の原因解明を試みた。長鎖アルコールは高融点、低密度、高疎水性という物性により低溶解度となる。そこで出芽酵母と好熱細菌を用いて、長鎖アルコールの溶解度と増殖阻害作用との因果関係を調べた。25℃で固体の長鎖アルコール（≧C_{14}）は増殖阻害を示さずカットオフとなるが、高温で融解させ溶解度を増加させると、出芽酵母（39.8℃）では C_{14}、好熱細菌（67.5℃）では C_{16} でも増殖阻害が、それぞれ初めて検出できた。さらに高疎水性や低密度により凝集したアルコールを超音波で分散させ溶解度を増加させても、増殖阻害作用は増強した。したがって、物理的な溶解度を増加させることで長鎖アルコールの増殖阻害作用は検出できることがわかった。一方、長鎖アルコールの溶解度を変えなくても、出芽酵母の多剤排出ポンプを欠損し多剤感受性である *pdr1 pdr3 pdr5* 三重破壊株では、25℃で C_{14} が増殖を阻害した。逆に、C_{12} は野生株の増殖は阻害するが、*PDR5* を多コピーで導入した多剤耐性株の増殖は阻害せずカットオフとなった。これらの結果からカットオフ現象は、長鎖アルコールの物性による溶解度が、生物側の作用濃度に達しないために起こると結論した。

cutoff, structure activity relationship, solubility

講演番号：4C7a11
講演日時：3 月 27 日 11:10～ 1 号館 C7 会場

ビール発酵中におけるホップ添加が酵母へ及ぼす影響について
Effect on yeast of adding hops to the fermentation tank
○土屋 友理[1]、太田 拓[1]、小林 統[2]、善本 裕之[1]、稲留 弘乃[1] ([1]キリン・酒類研、[2]キリン・基盤研)
○Yuri TSUCHIYA[1], Taku OTA[1], Osamu KOBAYASHI[2], Hiroyuki YOSHIMOTO[1], Hironori INADOME[1] ([1]Kirin Co. Ltd., Res. Lab. for Alcoholic Beverage Tech., [2]Kirin Co. Ltd., Central Lab. for Key Tech.)

【背景】ビール製造において、酵母は発酵中に麦汁の糖分を分解してアルコールと炭酸ガスを発生する。発生した炭酸ガスは、溶存炭酸ガス（DCO_2）として麦汁中に溶け込み、酵母の増殖に影響を示す。炭酸ガスが微生物へ及ぼす増殖と抑制に関しては広く研究されており、その中で、DCO_2の過飽和が酵母の増殖を阻害することが報告されている。また、発酵液中に固形剤(例えば、活性炭等)を添加することにより酵母数の増加が見られることが知られている。これは、過飽和のDCO_2が添加した固形剤の疎水基により減少し、過飽和状態のDCO_2による酵母の増殖阻害が解除されたものと考えられている。一方、通常、ホップは仕込み段階で使用するが、ホップを発酵中に浸漬することで、ホップの香気を際立たせることができる。この製法を「ディップホップ製法」と呼んでいる。「ディップホップ製法」において、発酵中にホップからの香気成分が抽出されると共に、ホップと酵母が共存することで、ホップと酵母との相互作用が推察される。本研究では、ビールの発酵液中に固形剤としてホップを添加することによる酵母への影響を調査した。
【方法・結果】ビールの発酵液中にホップを添加することによる酵母への影響を調査するために、ホップは仕込み段階で使用する場合をコントロールとして、ホップを固形剤として発酵タンクに添加する試験を行い、ホップ添加有無による発酵経過(糖消費速度、浮遊酵母数、香気成分、DCO_2濃度等)の比較を行った。その結果、ホップを添加することにより、糖消費速度が上昇し、浮遊酵母数の増加が見られ、発酵が促進された。また、発酵由来の硫黄系オフフレーバー（不快臭味）の生成の抑制が観察された。その際、発酵液中のDCO_2濃度の低下も確認された。このような発酵促進効果は、ホップを煮沸して用いても認められたことから、ホップに由来する酵素活性の寄与は少ないと考えられた。次に、これらの効果がホップに特異的であるかどうかを調査するために、活性炭が酵母へ及ぼす影響を調査した。その結果、発酵タンクへの活性炭の添加によっても、同様に糖消費が促進され、硫黄系オフフレーバーが低減することが確認された。このことから、発酵タンクへのホップ添加による発酵促進効果は、ホップの酵素活性や成分によるものではなく、上述した固形剤添加によるDCO_2減少効果に起因するものと示唆された。
以上のとおり、ビールの発酵液中に固形剤としてホップを添加することは、ホップの香気成分が際立つだけでなく、発酵液中のDCO_2濃度を低下させ、浮遊酵母数の増加で発酵を促進させると共に、発酵由来の硫黄系オフフレーバーを低減し、より良好なビール香味の醸成に寄与することができることを見出した。

brewer's yeast, fermentation, hop

発表責任者：土屋　友理（Tsuchiya_Yuri@kirin.co.jp）

講演番号：4C7a12
講演日時：3 月 27 日 11:21～ 1 号館 C7 会場

自然界より単離した酵母の醸造特性評価

Evaluation of brewing characteristics of yeasts isolated from nature sources

○松家 彩恵[1]、阪本 鷹行[2]、岡久 修己[3]、櫻谷 英治[2] ([1]徳島大院・先端技術、[2]徳島大・生物資源、[3]徳島県工技セ)
○Ayae MATSUKA[1], Takaiku SAKAMOTO[2], Naoki OKAHISA[3], Eiji SAKURADANI[2] ([1]Fac. Eng., Tokushima Univ., [2]Fac. Sci. Technol., Tokushima, [3]Tokushima Pref. ITC)

【背景・目的】 酵母は酒造りにおいて香りや風味を左右する重要な因子であり、多くの酒蔵では市販の酵母や「きょうかい酵母」といった育種選抜株が使用されている。一方、近年では花や果実から単離された酵母が酒に新たな香りや味わいを付加するとして、野生酵母を用いた酒造りも行われている。我々は、主に徳島県内の花や果実を中心にサンプルを採取し、それらを微生物単離源として醸造酵母の取得を試みた。徳島県内のクラフトビールメーカーにおいて、得られた酵母の試験醸造を行い、ビールの特性を評価した。ここでは、自然界より取得した酵母の醸造特性について報告する。
【方法・結果】 自然界から採取した花や果実（計 269 サンプル）を 3、7、または、10%エタノール含有液体培地で集積培養し、エタノール耐性を示す酵母様微生物を計 656 株取得した。得られた菌株についてスクロースを炭素源としたエタノール生産性を評価したところ、実際の醸造に用いられるビール酵母や清酒酵母と同等のエタノール生産性を示す株を 8 株選抜した。さらに、これらの株について遺伝子配列による菌種簡易同定を行った結果、いずれも *Saccharomyces cerevisiae* であることが示された。これら 8 株の糖資化性および発酵能を評価したところ、菌株間で有意な差が確認された。ビール醸造で重視される凝集性については、市販のビール酵母には及ばないものの、清酒酵母より優れた凝集性を示した。現在、麦汁発酵試験による糖資化性評価および香気成分分析を行っている。

Saccharomyces cerevisiae, ethanol fermentation

講演番号：4C7a13
講演日時：3 月 27 日 11:32～ 1 号館 C7 会場

醸造工程における醪中の清酒酵母の圧力不活性化挙動
Pressure inactivation behavior of *sake* yeast in fermentation mash during brewing process
○野村 一樹[1]、片岡 ちひろ[1]、池﨑 南[2]、堀 沙織里[1]、井口 晃徳[1,2]、重松 亨[1,2]（[1]新潟薬大・応生科、[2]新潟薬大院・応生科）
○Kazuki NOMURA[1], Chihiro KATAOKA[1], Minami IKEZAKI[2], Saori HORI[1], Akinori IGUCHI[1,2], Toru SHIGEMATSU[1,2] ([1]Fac. Appl. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., [2]Grad. Sch. Appl. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci.)

【背景】 圧力技術とは、1,000 気圧 (約 100 MPa) 以上の非常に高い圧力 (静水圧) 処理により、非熱的に微生物を殺菌 (不活性化) する食品加工技術の一つである。我々は、生酒や活性にごり酒に着目し、圧力技術により清酒酵母を不活性化させて非熱的に過発酵を制御する (Pressure Regulated Fermentation) 技術の確立を目指している[1]。しかし、日本酒の醪成分は複雑であり、醸造条件が一般的な培養条件とは異なる等、醸造工程の醪中における清酒酵母の圧力不活性化挙動は明らかになっていない。本研究では、醸造工程を模した低温条件にて小仕込み試験を実施し、醪中の清酒酵母の圧力不活性化挙動を解析した。これまでに圧力感受性に寄与する *COX1* 遺伝子[2]を明らかにしており、実験室酵母株由来の *COX1* 遺伝子欠損株と清酒酵母株を接合させた圧力感受性清酒酵母 KE45 株を作出した[3]。そこで *COX1* 遺伝子欠損が醪中の不活性化挙動に及ぼす影響ついても併せて解析した。
【方法・結果】本研究では、清酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* Sake yeast Kyokai No. 7 株 (K7 株)、圧力感受性清酒酵母 KE45 株および対照株として実験室酵母 BY4743 株を用いた。小仕込み試験の醸造は「三段仕込み」を模して実施した。醪温度は、初添 15°C、仲添 9°C、留添 7°C とし、留添を 0 day としてそれ以降は 1 日 1°C ずつ温度を上げ、15°C に到達後は 15°C 一定で 28 days まで管理した。2~3 days 毎に醪重量減少量および発泡の有無により発酵の状態を評価した結果、6~13 days において活発な発酵が観察された。7~28 days における各菌株の醪を 7 days 毎に回収し、200 MPa、室温、10 min の条件で圧力処理に供した結果、7 days の全ての株において 4~5 log 程度の生菌数 (CFU) の顕著な減少が認められた。14 days 以降も K7 株および KE45 株の生菌数は圧力処理により顕著な減少を示し、特に K7 株は 3~4 log reduction を示した。その一方で KE45 株は醸造期間に依存して圧力処理による生菌数の減少割合が低下し、14 days は 3 log reduction 程度だったが、28 days では 1 log reduction 程度であった。実験室酵母 BY4743 株は、14 days 以降に圧力処理による生菌数の顕著な減少は認められず、醪中において圧力耐性を示した。以上の結果をまとめると、醪中においては清酒酵母である K7 株は実験室酵母 BY4743 株よりも圧力感受性を示し、*COX1* 遺伝子を欠損した実験室酵母と清酒酵母の接合株である KE45 株は K7 株よりも圧力耐性を示した。すなわち実験室酵母由来の遺伝特性が醪中の圧力不活性化において、圧力耐性に寄与していることが示唆された。本研究は、生研支援センターの「革新的技術開発・緊急展開事業 (地域戦略プロジェクト)」により実施した。 [1] Nomura and Iwahashi, Rev. Agri. Sci., 2014. [2] Nomura *et al.*, J. Food Sci., 2015. [3] Nomura *et al.*, High Pressure Res., 2018.

sake yeast, high hydrostatic pressure, pressure regulated fermentation

発表責任者：重松 亨（shige@nupals.ac.jp）

講演番号：4C7a14
講演日時：3 月 27 日 11:43～ 1 号館 C7 会場

清酒酵母から取得した圧力感受性清酒酵母株の圧力不活性化挙動の解析
Pressure inactivation behavior of the piezosensitive *sake* yeast strain from *sake* yeast
○池崎 南[1]、野村 一樹[2]、片岡 ちひろ[2]、堀 沙織里[2]、青木 俊夫[3]、栗林 喬[3]、金桶 光起[3]、井口 晃徳[1,2]、重松 亨[1,2] ([1]新潟薬大院・応生科、[2]新潟薬大・応生科、[3]新潟県醸造試験場)
○Minami IKEZAKI[1], Kazuki NOMURA[2], Chihiro KATAOKA[2], Saori HORI[2], Toshio AOKI[3], Takashi KURIBAYASHI[3], Mitsuoki KANEOKE[3], Akinori IGUCHI[1,2], Toru SHIGEMATSU[1,2] ([1]Grad. Sch. Appl. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., [2]Appl. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., [3]Niigata Prefectural Sake Research Institute)

【背景】一般的な日本酒において、火入れは過発酵の抑制に有効な殺菌（不活性化）技術である。その一方で、火入れを行わない生酒や活性にごり酒はフレッシュな風味が特徴であるが、残存微生物の過発酵等による品質劣化により保存・流通期間が短い。我々は、火入れの代替として圧力技術を応用することで 4,000 気圧（約 400 MPa）の圧力処理により非熱的に微生物を不活性化し、生酒の風味を保ちつつ過発酵を抑制することに成功した。しかし、圧力処理は圧力レベルに依存して処理コストが上昇するという問題がある。これまでに実験室酵母においてミトコンドリア DNA（mtDNA）の *COX1* 遺伝子欠損に起因する呼吸欠損（Respiratory deficiency；RD）が、圧力感受性に寄与することを報告した [1]。この報告から、我々は清酒酵母においても *Δcox1* にすることで圧力感受性株の作出、圧力レベルの低減が可能であることを着想した。そこで本研究では、新潟清酒酵母 *Saccromyces cerevisiae* S9arg 株に対し、突然変異の導入により圧力感受性株を作出し、圧力不活性化挙動を解析した。
【方法】本研究では、*S. cerevisiae* S9arg 株を親株にして UV 照射等により突然変異を導入した変異処理株から、2, 3, 5-Triphenyl-*2H*-tetrazolium-chloride（TTC）染色法により RD 候補株をスクリーニングした。候補株を純化した後に再度 TTC 染色法を用いて RD 株を 5 株選抜した。増殖挙動は YPD 培地（2%yeast extract, 2%peptone, 1%glucose）により 30℃の条件で評価した。圧力不活性化挙動は 200 MPa, 室温, 0～360 s の条件で速度論的に解析した。各 RD 株から DNA を抽出し、ミトコンドリア機能に関連する主要な遺伝子を対象として、各遺伝子の欠失を PCR 法により評価した。
【結果・考察】TTC 染色法により選抜した各 RD 株およびその親株に対して圧力処理した結果、親株の生菌数は減少しなかったが、各 RD 株の生菌数は 2.6～3.1 log CFU の顕著な減少が認められた。算出した圧力不活性化速度定数 k は 0.018～0.021 s^{-1} であり、既報 [2] の圧力感受性株（*Δcox1*, k＝0.012 s^{-1}）よりも高かった。mtDNA の遺伝子を評価した結果、全ての株において *COX1* 遺伝子および *COB* 遺伝子の欠失が認められた。以上の結果から、これらの株の圧力感受性は *Δcox1*, *Δcob* に起因している可能性が示された。従って、本研究で取得した圧力感受性清酒酵母株は、より低い中高圧条件での圧力発酵制御に対して有望な株であることが示唆された。今後は、小仕込み試験を行いヘッドスペース型 GC/MS（島津製作所）を用いて、これらの醸造特性などを解析する予定である。本研究は、生研支援センターの「革新的技術開発・緊急展開事業（地域戦略プロジェクト）」により実施した。[1] Nomura *et al.*, J. Food Sci., 2015. [2] Nomura *et al.*, Biophys. Chem., 2017.

piezosensitive *sake* yeast, *sake* yeast, high hydrostatic pressure

発表責任者：重松 亨（shige@nupals.ac.jp）

講演番号：4C7a15
講演日時：3 月 27 日 11:54～ 1 号館 C7 会場

清酒酵母酢酸イソアミル高生産変異株の取得と解析
Isolation and characterization of *sake* yeast mutants with improved isoamyl acetate production
○小野塚 悠[1]、池﨑 南[1]、野村 一樹[1]、青木 俊夫[2]、栗林 喬[2]、金桶 光起[2]、井口 晃徳[1]、重松 亨[1]、山崎 晴丈[1]、高久 洋暁[1] ([1]新潟薬大・応生科、[2]新潟醸試)
○ Haruka Onozuka[1], Minami IKEZAKI[1], Kazuki NOMURA[1], Toshio AOKI[2], Takashi KURIBAYASHI[2], Mitsuoki KANEOKE[2], Akinori IGUCHI[1], Toru SHIGEMATSU[1], HARUTAKE YAMAZAKI[1], Hiroaki TAKAKU[1] ([1]Niigata Univ. Pharm Appl. Life Sci., [2]Niigata Pref. Sake Res. Inst.)

清酒産業は、古くから多くの人々に親しまれてきた日本の重要な産業である。しかし、近年では、酒離れによって酒類消費量は年々減少傾向にあり、清酒も例外ではない。清酒に限ると 1970 年代をピークに 2017 年ではその売り上げは約 40%まで低下している。一方でリキュール類は消費量が増加傾向にあり、若い世代の嗜好の変化が起きていると考えられる。清酒産業は消費量の減少に伴い経営不振や酒造りを担う杜氏の後継者問題などが発生している。しかし、海外では近年、日本酒の人気が高まってきており、特に香港や台湾、アメリカへの輸出量は増加傾向にある。ユネスコによる和食の無形文化遺産登録を皮切りに始まった海外での和食ブームが後押しする形となって日本酒の需要は高まっている。海外では主に吟醸酒や大吟醸酒などの香り高く、飲み口の爽やかな特定名称酒が好まれ、これらは国内でも徐々に消費量が増加しており、多少値段が高くても質の良い酒が選ばれる傾向がある。その需要に応答するため、酵母の育種や原料米の品種改良などによる清酒の高付加価値化のための研究が盛んに実施されており、新潟県醸造試験場で取得された新規醸造酵母 S9arg 株も非尿素生産性、カプロン酸エチル高生産性を有した清酒の高付加価値化に成功した株である。以上のような背景の中、本研究では、清酒の香りの高付加価値化のため、この S9arg 株から取得された圧力感受性変異株 UV1 株を親株として、酢酸イソアミル高生産性を付与することによる吟醸香が強化された変異株の取得とその特性解析を目的とした。UV1 株に突然変異誘発を行い、ロイシンアナログの 5, 5, 5-トリフルオロロイシンへの耐性株を取得後、耐性株の麹汁培地における酢酸イソアミル生産性のスクリーニングを実施し、UV1-TFL1、UV1-TFL8、UV1-TFL20 の 3 株を酢酸イソアミル高生産株として取得した。上記 3 株は清酒小仕込み試験で親株と比較して、日本酒度、アミノ酸度、酸度、アルコール度はほとんど変わらなかったが、酢酸イソアミル/イソアミルアルコール比は親株の 2～3 倍を示した。酵母において酢酸イソアミル合成に必須であるロイシン合成は、*LEU4*、*LEU9* 遺伝子がコードするα-イソプロピルリンゴ酸合成酵素（α-IPMS）の活性がロイシンによるフィードバック阻害を受けている。このことから、変異株の *LEU4*、*LEU9* 遺伝子配列比較解析を実施したところ、*LEU4*、*LEU9* 遺伝子にアミノ酸置換の変異が見られた。さらに、変異株のα-IPMS 活性を測定したところ、その活性は野生株よりも上昇しており、アミノ酸置換によるフィードバック阻害解除が、酢酸イソアミル生産性の向上に繋がったことが示唆された。本研究は、生研支援センターの「革新的技術開発・緊急展開事業（地域戦略プロジェクト）」により実施した。

sake yeast, isoamyl acetate, isopropylmalate synthase

発表責任者：高久洋暁（htakaku@nupals.ac.jp）

講演番号：4D1a02
講演日時：3 月 27 日 09:11～ 1 号館 D1 会場

Euglena gracilis におけるワックスエステル代謝調節因子 WSRK の機能解析
Characterization of WSRK, a key regulatory factor of anaerobic wax ester metabolism in *Euglena gracilis*

○石井 侑樹[1]、木村 光宏[1]、小川 貴央[1]、丸田 隆典[1]、森 大[2,3]、石川 孝博[1] ([1]島根大・生資科、[2]慶應大・先端生命研、[3]慶應大・政策・メディア)
○Yuuki ISHII[1], Mitsuhiro KIMURA[1], Takahisa OGAWA[1], Takanori MARUTA[1], Masaru MORI[2,3], Takahiro ISHIKAWA[1] ([1]Dept. Life Sci. Biotechnol., Shimane Univ., [2]Inst. for Adv. Biosciences, Keio Univ., [3]SFC Grad. Sch. of Media and Governance, Keio Univ.)

微細藻類ユーグレナ (*Euglena gracilis*)は、好気条件下において貯蔵多糖パラミロン (β-1,3-グルカン)を合成・蓄積し、嫌気条件下ではパラミロンからミリスチルミリスチン酸 (C28)を主成分とするワックスエステルへと代謝変換する。我々は嫌気条件に応答したユーグレナのワックスエステル代謝調節機構の解明を目指しており、これまでにリン酸化プロテオーム解析によりその制御因子として WSRK (Wax Ester Synthesis Regulation Kinase)を同定している。本研究では嫌気に応答したワックスエステル代謝調節機構の解明を目的に、WSRK の機能解析を実施した。WSRK の二本鎖 RNA を合成し、エレクトロポレーションによりユーグレナ細胞に導入することで、WSRK 遺伝子の発現抑制細胞(WSRK_KD)を作出し、RT-PCR と WSRK 特異抗体により WSRK の発現抑制を確認した。従属栄養条件下定常期まで培養した WSRK_KD を嫌気 24 時間処理し、各種代謝物を測定した結果、野生株と比較してパラミロンの蓄積および分解には影響が見られなかったが、嫌気処理後の C12～C15 までの各種脂肪酸およびアセチル CoA の蓄積が顕著に抑制されていた。リン酸化プロテオーム解析結果より予測された Thr186 および Tyr188 を含む WSRK の部分ペプチドに対して、リン酸化ペプチド抗体を作製し、嫌気応答時における WSRK のリン酸化状態について評価したところ、WSRK のリン酸化レベルは、嫌気に応答して低下し、細胞を再び好気条件に戻すことで回復した。そこで WSRK のリン酸化状態とキナーゼ活性の関係を明らかにするために、野生型 WSRK (WT)および Thr186 と Tyr188 をそれぞれ Asp に置換した変異型 WSRK (T186D/Y188D) を大腸菌で発現させ、精製酵素を用いてキナーゼ活性を評価した。その結果、WT で観察された自己リン酸化活性は、T186D/Y188D において抑制されていたことから、WSRK は嫌気応答時の脱リン酸化により活性化することが示唆された。現在さらに詳細な WSRK の機能解析を進めている。

Euglena gracilis, wax ester metabolism, protein kinase

発表責任者：石井侑樹（a179601@matsu.shimane-u.ac.jp）

講演番号：4D1a03
講演日時：3 月 27 日 09:22～ 1 号館 D1 会場

Euglena gracilis におけるワックスエステル分解酵素 WEH パラログの機能評価
Evaluation of wax ester degradation enzyme WEH paralogs in *Euglena gracilis*
○駒井 陽輔、小川 貴央、丸田 隆典、石川 孝博 (島根大・生資科)
○Yosuke KOMAI, Takahisa OGAWA, Takanori MARUTA, Takahiro ISHIKAWA (Dept. Life Sci. Biotechnol., Shimane Univ.)

微細藻類ユーグレナ（*Euglena gracilis*)は、嫌気条件下において、貯蔵多糖パラミロン（β-1,3-グルカン）から発酵経路により、最終的に貯蔵脂質としてミリスチルミリスチン酸(C28)を主成分とするワックスエステルを合成する。このワックスエステルは、細胞が再び好気状態に戻ることで急速に分解される。最近我々の研究グループでは、このワックスエステルの分解に関わる酵素としてトリアシルグリセロールリパーゼ様タンパク質を見出し、WEH1(Wax ester hydrolase)と命名している。ユーグレナの発現遺伝子情報には、他に２つの WEH パラログ(WEH2, WEH3)が存在しており、今回 WEH1 と併せて WEH2 および WEH3 のワックスエステル分解への関与について遺伝子サイレンシングを中心に機能評価した。各 WEH 特異的な領域を鋳型に二本鎖 RNA を合成し、エレクトロポレーションによりユーグレナ細胞に導入して各 WEH パラログ発現抑制細胞(WEH1_KD, WEH2_KD, WEH3_KD)および各組合せのダブル(WEH1/2_KD, WEH1/3_KD, WEH2/3_KD)あるいはトリプル(WEH1/2/3_KD)発現抑制細胞を作出した。定常期まで培養した各発現抑制細胞は、嫌気 24 時間処理して充分にワックスエステルを蓄積させた後、再び好気条件に戻した 6 時間後の C28 量を測定することで、ワックスエステルの分解率を評価した。その結果、Mock コントロールおよび WEH1_KD, WEH2_KD, WEH3_KD の各発現抑制細胞における C28 の分解率は、それぞれ 89%, 0%, 36%, 20%であり、いずれの WEH パラログ発現抑制細胞もワックスエステルの分解を顕著に抑制することが示された。また、各組合せのダブルおよびトリプル発現抑制細胞のワックスエステル分解はいずれも完全に抑制されたことから、ワックスエステル分解にはこれから３つの WEH の存在が不可欠であることが示された。特異抗体によるイムノブロットの結果、少なくとも WEH1 および WEH3 は膜各分に局在することが示唆された。

Euglena gracilis, wax ester, wax ester hydrolase

発表責任者：駒井陽輔（a152018@matsu.shimane-u.ac.jp）

講演番号：4D1a04
講演日時：3 月 27 日 09:33～ 1 号館 D1 会場

油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* 油脂低蓄積変異株の原因遺伝子の同定と解析
Identification and analysis of genes that cause oleaginous yeast *Lipomyces starkeryi* mutants with low lipid accumulation

○酒井 里佳子[1]、阿部 紗也[1]、荒 学志[1]、山崎 晴丈[1]、志田 洋介[2]、小笠原 渉[2]、矢追 克郎[3]、森 一樹[4]、油谷 幸代[4]、荒木 秀雄[5]、田代 康介[6]、高久 洋暁[1]（[1]新潟薬大・応生科、[2]長岡技科大・工、[3]産総研生物プロセス、[4]産総研 CBBD-OIL、[5]不二製油グループ本社、[6]九州大 院生資環 遺伝子制御）
○Rikako SAKAI[1], Saya ABE[1], Satoshi ARA[1], Harutake YAMAZAKI[1], Yousuke SHIDA[2], Wataru OGASAWARA[2], Katsurou YAOI[3], Kazuki MORI[4], Sachiyo ABURATANI[4], Hideo ARAKI[5], Kosuke TASHIRO[6], Hiroaki TAKAKU[1] ([1]Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., [2]Nagaoka Univ. Tech., [3]AIST, [4]Natl. Inst. Adv. Ind. Sci. & Tech., [5]FUJI OIL HOLDINGS INC., [6]Kyushu Univ., Fac., Agri., Mol.Gene Tech.)

近年の急激な世界人口増加に伴い、食・工業・エネルギー分野の油脂需要が高まり、油脂の競合が懸念される中、日本の油脂自給率はわずか 13%で輸入に依存している状況である。さらに自然災害や異常気象による不作で輸入相手国からの供給が滞る可能性もあり、油脂需要が高まっている中、日本の油脂低自給率は早急に解決しなければならない課題である。そこで本研究では、菌体内に油脂を蓄積する油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* に注目した。*L. starkeyi* は、非可食バイオマス由来の様々な糖を油脂に変換でき、その油脂は植物油に類似した脂肪酸組成を有するため植物代替油脂として利用できる。また、培養槽で油脂を生産するため、気候、天候に左右されず、さらに広大なスペースを必要としない。このように *L. starkeyi* による油脂生産は多くの利点を持つが、産業化へ向け、育種や遺伝子工学的技術による油脂生産性の向上が必要である。しかし、*L. starkeyi* の油脂合成・分解・蓄積機構についての知見は少なく、産業利用していく上ではその機構の知見は必要である。本研究では、油脂低蓄積変異株の原因遺伝子の同定・解析を行い、油脂生産機構の知見を得ることを目的とした。

本研究室は、以前の大会で報告したように、油脂分解能が向上したと考えられる m45、m47 株、油脂蓄積速度が低下した sr5、sr17 株の合計 4 株を獲得している。野生株と油脂低蓄積変異株 4 株のゲノム比較解析の結果、複数のナンセンス変異、ミスセンス変異、フレームシフト変異、スプライス部位変異が見出された。これらの変異遺伝子の正常型遺伝子を油脂低蓄積変異株に導入し、油脂蓄積性を調査した結果、m45、m47 株では *LsREG1*、sr5、sr17 株では *LsSAP185* を導入したときに油脂の蓄積性が野生株と同等となる表現型を示した。すなわち、m45、m47 株の低蓄積性の原因因子は、*LsREG1* であり、本遺伝子へのナンセンス変異の導入による機能欠失又は低下が低蓄積性の原因であると考えられた。また、sr5、sr17 株の油脂低蓄積性の原因因子は、*LsSAP185* であり、本遺伝子へのミスセンス変異の導入による機能欠失又は低下が油脂低蓄積性の原因であると考えられた。次にそれぞれの遺伝子の油脂生産性への関与を明らかにするため、*LsREG1* 高発現株と *LsSAP185* 高発現株を作製し、油脂生産性を調べた。その結果、野生株と比較して、油脂生産性は向上し、特に *LsREG1* 高発現株の方が顕著であった。また、*LsREG1* 遺伝子破壊株を作製し、その油脂生産性を検討したところ、m45、m47 株と同等の油脂低蓄積性を示した。すなわち、*LsREG1* は、油脂生産に関与する重要な遺伝子であることが明らかとなった。

本研究は NEDO「植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発」の支援を受けて行われた。

oleaginous yeast, *Lipomyces starkeyi*, lipid

発表責任者：高久洋暁（htakaku@nupals.ac.jp）

講演番号：4D1a05
講演日時：3 月 27 日 09:44～ 1 号館 D1 会場

皮膚菌叢をコントロールするパルミトレイン酸を高濃度含有する油脂の *Saccharomyces cerevisiae* による生産
Production of palmitoleic acid-rich triacylglycerols by *Saccharomyces cerevisiae* to control of skin microbiome.

○永尾 寿浩[1]、成廣 和枝[2]、田中 重光[1]、木村 和義[3]、山下 和彦[2]、神坂 泰[3]([1]大阪技術研、[2]ヤエガキ発酵技研、[3]産総研)
○ Toshihiro Nagao[1], Kazue Narihiro[2], Shigemitsu Tanaka[1], Kazuyoshi Kimura[3], Kazuhiro Yamashita[2], Yasushi Kamisaka[3] ([1]ORIST, [2]YAEGAKI Bio-industry, [3]AIST)

【背景・目的】アトピー性皮膚炎(Atopic dermatitis, AD)は、炎症悪化と皮膚バリア破壊に関与する *Staphylococcus aureus* の顕著な増加を始めとする様々な要因で発症・増悪化する。一方、健常者では *S. aureus* の生育抑制作用等がある *Staphylococcus epidermidis* が *S. aureus* より多い。皮脂中のサピエン酸(6-*cis*-C16:1, SA)は健常者において *S. aureus* に対して強く *S. epidermidis* に対して弱い選択的抗菌活性を示すが、SA は天然油脂中に存在しない。そこで永尾らは、SA と同じ選択的抗菌活性があり、一部の植物油中のパルミトレイン酸(9-*cis*-C16:1, POA)に関する研究を行なってきた。一方、神坂らは *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 (*Δdga1+DGA1*)の構築と培養条件の改変より、POA 含量の高いトリアシルグリセロール(TAG)の生産に成功した。しかし、酵母 TAG 中には POA の選択的抗菌活性を妨害するオレイン酸(9-*cis*-C18:1, OA)が多い。本研究では、種々の *S. aureus* 株における OA による POA の抗菌活性妨害作用の違い、リパーゼによる酵母 TAG 中の OA 含量の低下、*S. cerevisiae* の遺伝子改変による OA 含量の低下、について検討した。

【方法・結果】POA と OA を混合し、種々の *S. aureus* 株に対する抗菌活性を調べたところ、OA による POA の抗菌活性妨害作用は菌株により異なっていた。皮脂中には SA と OA, OA 異性体(6-*cis*-C18:1)が存在することから、特定の *S. aureus* 株が AD 炎症部で生育しやすく、これに SA の減少、SA/C18:1 比の変化、フィラグリン変異等が加わり、AD で *S. aureus* が増えるという可能性が示唆された。一方、皮脂中に多く存在し化粧品等に多用されているパルミチン酸(C16:0)は POA の抗菌活性を妨害しなかった。酵母 TAG の 2 位脂肪酸分析を行ったところ、*sn*-1,3 位に POA が多く(POA, 59%; OA, 17%)、*sn*-2 位に OA が多く(POA, 31%; OA, 62%)結合していた。そこで、*sn*-1,3 位優先リパーゼを用いて *sn*-1,3 位を遊離脂肪酸(FFA)に変換したところ、*S. aureus* NBRC13276 に対する抗菌活性は、TAG を FFA に変換した場合よりも高められたが、OA による抗菌活性妨害作用が最も強い *S. aureus* NBRC14462 に対する抗菌活性は弱かった。そこで、Δ9 不飽和化酵素(*ole1*)の破壊とパルミトレイン酸合成特異的Δ9 不飽和化酵素(*cFAT*)の発現等を行った *S. cerevisiae* 形質転換株を構築したところ、先の菌株よりも脂質生産量が低いものの、OA とバクセン酸(11-*cis*-C18:1)の合計含量が 3.4%まで低下し、POA 含量が 69%であった。この油脂を FFA に変換したところ、*S. aureus* NBRC14462 を含む検討した全ての *S. aureus* 株に対する抗菌活性が強かった。なお、本研究の成果の一部は国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)の事業において得られたものである。

palmitoleic acid, *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces cerevisiae*

発表責任者：永尾寿浩（nagao@omtri.or.jp）

講演番号：4D1a06
講演日時：3 月 27 日 10:05～ 1 号館 D1 会場

糸状菌由来オレイン酸水和酵素遺伝子の機能解析

Functional analysis of an oleic acid hydratase gene derived from a filamentous fungus

○村川 直美[1]、上野 このみ[2]、阪本 鷹行[1]、安藤 晃規[3]、岸野 重信[3]、相馬 悠希[4]、和泉 自泰[4]、馬場 健史[4]、小川 順[3]、櫻谷 英治[1] ([1]徳島大院・先端技術、[2]徳島大・生物資源、[3]京大院農・応用生命、[4]九大・生医研)

○Naomi MURAKAWA[1], Konomi UENO[2], Takaiku SAKAMOTO[1], Akinori ANDO[3], Shigenobu KISHINO[3], Yuki SOMA[4], Yoshihiro IZUMI[4], Takeshi BAMBA[4], Jun OGAWA[3], Eiji SAKURADANI[1] ([1]Fac. Eng., Tokushima Univ., [2]Fac. Sci. Technol., Tokushima Univ., [3]Grad. Sch. Agri., Kyoto Univ., [4]Med. Inst. Bioreg., Kyusyu Univ)

【背景・目的】 水酸化脂肪酸(HFA)は，分子内に水酸基とカルボキシ基をもつことから，化粧品や医薬品，ポリマー原料としてさまざまな分野で注目されている。10-ヒドロキシステアリン酸[10(OH)-18:0, HYB]は自然界に存在する HFA のひとつである。乳酸菌やルーメン細菌などの嫌気性バクテリアにおいて，オレイン酸(18:1ω9)の水和反応による HYB 生合成経路とその反応に関わる水和酵素 MCRA(myosin-cross-reactive antigen)の解析が行われている。

本研究室ではこれまでに，自然界から HYB 生産性を示すユニークな糸状菌 D2 株を単離した。また，本菌株が静置培養（微好気条件）でのみ HYB を生産したことから，酸化反応ではなくバクテリアと同様の水和反応を有することが推測された。ここでは本菌株における MCRA ホモログ遺伝子のクローニングおよび機能解析の結果について報告する。

【方法・結果】 これまでに既知の水和酵素のアミノ酸配列をもとに糸状菌データベースから MCRA ホモログ遺伝子の相同性検索を行った。この情報をもとに本菌株から MCRA と推測される候補遺伝子を 2 つ取得し、MCRA1 と MCRA2 とした。2 つの遺伝子の発現解析を行ったところ、HYB 生産が行われる条件において、MCRA2 遺伝子が転写されていることを確認した。そこで，MCRA2 を大腸菌にて異種発現させ,そのライセートを用いてオレイン酸に対する水和活性を評価したところ HYB の生成が確認された。また，基質にリノール酸（18:2ω6）を用いた場合，HYA[10(OH)*c*12-18:1]の生成が確認された。MCRA2 遺伝子全長の配列決定を行った結果，MCRA2 のアミノ酸配列はバクテリア由来水和酵素と 30%程度の相同性しか示さなかったことから，MCRA2 が真菌由来のユニークな酵素であることが示唆された。

hydroxy fatty acid, fungus, lipid

講演番号：4D1a07
講演日時：3 月 27 日 10:16～ 1 号館 D1 会場

ラビリンチュラ類を用いた外来遺伝子の導入による n-3 系高度不飽和脂肪酸代謝物の生産
Production of n-3 PUFA metabolites by foreign gene expression using thraustochytrids
○沖野 望[1]、花田 理沙[2]、重常 公彦[3]、堤 圭一郎[3]、石橋 洋平[1]、有田 誠[4]、伊東 信[1]([1]九大院農、[2]九大院生資環、[3]九大農、[4]理研 IMS)
○Nozomu OKINO[1], Risa HANADA[2], Kimihiko SHIGETSUNE[3], KEIICHIROU TSUTSUMI[3], Youhei ISHIBASHI[1], Makoto ARITA[4], Makoto ITO[1] ([1]Fac. of Agric. Kyushu Univ., [2]Grad. Sch. of Biore. Bioenviron. Sci. Kyushu Univ., [3]School of Agric. Kyushu Univ., [4]RIKEN IMS)

n-3系高度不飽和脂肪酸（n-3 PUFA）に分類されるエイコサペンタエン酸（EPA,20:5n-3）やドコサヘキサエン酸（DHA, 22:6n-3）には、心血管疾患のリスク低下や関節リュウマチ症状の緩和などの機能性が広く認められている。PUFAはリポキシゲナーゼ（LOX）、シクロオキシゲナーゼ（COX）、シトクロムP450（CYP）等の酸化酵素によって様々なPUFA代謝物に変換される。近年、レゾルビンやプロテクチンなどのEPAやDHAに由来するn-3 PUFA代謝物が抗炎症作用や血管収縮抑制作用を持つことが明らかとなり、医薬品やサプリメントの新しいターゲットとして期待されている。ラビリンチュラ類は、DHA等のn-3 PUFAを大量に生産し、細胞内の油滴に蓄積する海洋性単細胞真核生物である。我々は、脂質メタボローム解析により、ラビリンチュラ類がn-3 PUFAのみならず、それらの代謝物を生産していることを見出している。本研究では、ラビリンチュラ類を用いて有用なn-3 PUFA代謝物を生産することを目的として、n-3 PUFA代謝物を生産するラビリンチュラ類の作製とその代謝物の解析を試みた。

ラビリンチュラ類の一種である*Aurantiochytrium limacinum* のn-3 PUFA代謝物を解析したところ、CYP由来の代謝物を幾つか有しているが、LOX由来の代謝物はほとんど生産していないことが明らかになった。そこで、*A. limacinum* にゼニゴケの一種である*Marchantia polymorpha* 由来のLOX（MpLOX3）遺伝子を導入することでその過剰発現株を作製し、LOXの酵素活性、および脂肪酸代謝物を解析した。その結果、MpLOX3の過剰発現株では15-LOX活性が大幅に増加すると共に、野生株に殆ど存在しないDHA由来の15-LOX産物である17-hydroxy DHA（17-HDoHE)が蓄積していることが明らかになった。17-HDoHEはインフルエンザウイルスの増殖を抑制することが知られているプロテクチンD1の前駆体であり、発酵生産が期待されているn-3 PUFA代謝物の一つである。また、過剰発現株のリン脂質のLC-MS/MS分析により、生産された17-HDoHEの一部がホスファチジルコリン（PC）に組み込まれていた。以上の結果は、ラビリンチュラ類に外来遺伝子を導入することで、17-HDoHEや17-HDoHE含有PCの発酵生産が可能であると共に、ラビリンチュラ類がn-3 PUFAのみならず、それらの代謝物の生産源としても有用であることを示している。

n-3 PUFA metabolites, Thraustochytrids, Lipoxygenase

発表責任者：沖野　望（nokino@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：4D1a08
講演日時：3 月 27 日 10:27～ 1 号館 D1 会場

光駆動 ATP 再生系を導入した Vmax 細胞の開発
Development of photo-energetic cell factory
弘埜 陽子[1]、戸谷 吉博[2]、石井 純[3]、柘植 謙爾[3]、松田 史生[2]、○原 清敬[1] ([1]静岡県大院・食品栄養環境・環境科学、[2]阪大院・情報・バイオ情報、[3]神戸大院・先端バイオ工学)
Yoko HIRONO[1], Yoshihiro TOYA[2], Jun ISHII[3], Kenji TSUGE[3], Fumio MATSUDA[2], ○Kiyotaka HARA[1] ([1]Dept. Environ. Sci., Gra. Sch. Nutri. Environ. Sci, Univ. Shizuoka, [2]Dept. Bioinfo. Eng., Grad. Sch. IST, Osaka Univ, [3]Eng. Biol. Cent., Grad. Sch. Kobe University)

大腸菌や酵母などの微生物に代謝工学的な改良を施し、医薬品や食品、化粧品、燃料、ポリマー原料等の様々な有用物質の発酵生産性を向上させる研究が行われている。しかし、目的物質の生産性が向上するにつれ、微生物が細胞内エネルギー不足に陥り、生育の低下や目的物質の生産性の頭打ちに直面することが少なくない。これは、発酵そのものが、インプットである炭素源を、「細胞自身の材料（Cell mass）」、「目的生産物」、「細胞内エネルギー」の 3 つのアウトプットに振り分けるプロセスであり、これらがトレードオフの関係にあることに、根本的な原因が存在すると考えられる。そこで我々は、この三つ巴の状態にある発酵プロセスから「細胞内エネルギー」を切り離すべく、本来は光エネルギーを利用できない微生物に、光リン酸化能を賦与することで、光エネルギーを利用可能にする新しい光駆動エネルギー再生型有用物質生産宿主（Vmax 細胞）の開発を目指している。

具体的には、高度好塩菌 Haloterrigena turkmenica が有する光駆動プロトンポンプであるデルタドプシンを、微生物細胞に発現させた。生化学的手法および生物物理化学的手法により、デルタロドプシンが微生物細胞内で機能していることを確認した。また、Vmax 化することによって細胞内の ATP 濃度が光依存的に高まった。本発表では、我々の開発した Vmax 細胞を利用した有用物質生産の可能性について報告する。

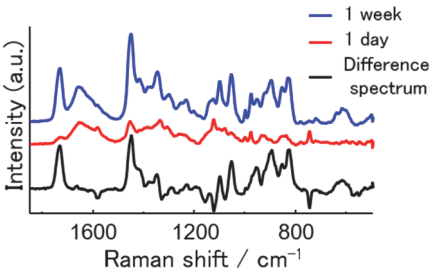
ATP, Bioenergy, Smart Cell

発表責任者：原　清敬（k-hara@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：4D1a09
講演日時：3 月 27 日 10:38～ 1 号館 D1 会場

顕微ラマン分光法を用いたバイオフィルム中の PHA の非破壊解析
Nondestructive analysis of PHA in biofilms using confocal Raman microspectroscopy
○重吉 康平[1]、尾花 望[2]、重藤 真介[1] ([1]関学大院理工、[2]筑波大院生命環境科学)
○ Kohei SHIGEYOSHI[1], Nozomu OBANA[2], Shinsuke SHIGETO[1] ([1]Kwansei Gakuin Univ., [2]Tsukuba Univ.)

【目的】数多くの種類の微生物が炭素源、エネルギー源としてポリエステルの一種である PHA（polyhydroxyalkanoate）を蓄積することが知られている。PHA はバイオプラスチックとしても注目されている。最近、我々は、ステンレス鋼の腐食を示す *Aestuariibacter* 属細菌 FT01[1]のバイオフィルムを顕微ラマン分光を用いて研究しているが、その過程で PHB（poly-3-hydroxybutyrate）に由来すると考えられるラマンバンドを観測した。本発表では、FT01 のバイオフィルム形成過程の様々な段階におけるラマンスペクトル測定に基づいて、PHA 蓄積とバイオフィルム形成との相関を非破壊的に解析した結果について報告する。
【実験】前培養した FT01 をステンレス鋼（SUS304）と共に様々な培養時間で培養し、ステンレス鋼表面に形成されたバイオフィルムをステンレス鋼ごと液体培地から取り出した。これにカバーガラスをかぶせた後、正立型共焦点顕微ラマン分光装置（励起波長 532 nm）を用いてバイオフィルムの空間分解ラマンスペクトル測定を行った。
【結果・考察】得られた FT01 のバイオフィルムのラマンスペクトルを、培養時間が 1 日の場合と 1 週間の場合とで比較したものを図に示す。1734, 1450, 1055, 829 cm^{-1} のピークは PHB が示すラマンバンドと一致している[2]ことから、FT01 バイオフィルム中に PHB が存在することが確かめられた。1 週間培養したバイオフィルムの方が遥かに強い PHB のラマンバンドを示しており、バイオフィルムの成長に伴い PHB が蓄積されることがわかった。1 週間培養したバイオフィルムのラマンスペクトルから 1 日培養のそれを引いた差スペクトルを見ると, PHB のラマンバンドがいずれも正の方向に現れているのに対し、細胞内のミトコンドリアに多く含まれるシトクロム c に帰属されるピーク（例えば 745, 1125 cm^{-1}）は負の方向に現れている。このことは、PHB とシトクロム c の濃度がともに FT01 バイオフィルムの形成に伴って変化し、互いに負の相関を示すことを意味している。顕微ラマン分光を用いることにより、これらの分子情報を、バイオフィルムを破壊することなく取得することが可能である。



図、1dayおよび1week培養のFT01
のラマンスペクトルとその差スペクトル

[1]宮野, 稲葉, 野村, 材料と環境, **2015**, *64*, 492.
[2]O. Samek *et al.* Sensors, **2016**, *16*, 1808

biopolyester, biofilms, chemical imaging

発表責任者：重藤 真介（shigeto@kwansei.ac.jp）

講演番号：4D1a10
講演日時：3 月 27 日 10:49～ 1 号館 D1 会場

大腸菌による植物アルカロイド生産を題材とした人工代謝経路の実証
Novel metabolic pathways for production of plant alkaloid in *Escherichia coli*
○金 達英[1]、土金 恵子[1]、宮澤 せいは[1]、細山 哲[1]、中川 明[2]、南 博道[2]、白井 智量[3]、川﨑 浩子[1] ([1]製品評価技術基盤機構、[2]石川県立大学、[3]理化学研究所)
○ Daryong KIM[1], Keiko TSUCHIKANE[1], Seiha MIYAZAWA[1], Akira HOSOYAMA[1], Akira NAKAGAWA[2], Hiromichi MINAMI[2], Tomokazu SHIRAI[3], Hiroko KAWASAKI[1] ([1]NITE, [2]Ishikawa Pref. Univ., [3]RIKEN)

【背景と目的】近年、微生物を利用したものづくりの分野において、代謝関連の各種データベースとコンピュータを利用して、目的物質の生産に適した代謝経路を人工的にデザインすることを目的としたツールが開発されている。荒木らが開発した M-path[1)]や白井らが開発した BioProV[2)]は、既知の酵素反応情報に依存せず、宿主の代謝物から目的化合物に至るまでの可能な代謝経路を予測・提示するツールであり、全く新しい人工代謝経路のデザインをも可能とするものである。本研究では、これら代謝設計ツールを用いてデザインされた人工代謝経路と、多様な生物のゲノム情報や酵素情報を組み合わせることにより、中川ら[3)]が報告した大腸菌を用いた植物アルカロイド (S)-レチクリンの生産に適用し、デザインされた人工代謝経路が菌体内で実際に機能するかを検証した。

【方法と結果】(S)-レチクリン合成の重要な中間化合物である 3,4-ジヒドロキシフェニルアセトアルデヒド（3,4-DHPAA）を目的物質として、代謝設計ツールによる人工経路デザインを行った。デザインされた人工経路のうち、二段階の反応を経て 3,4-DHPAA を合成する人工経路２通りを対象として、(S)-レチクリンの合成を試みた。まず、予測された人工経路の各酵素反応を担う遺伝子候補を種々の生物種より選定し合成した。次に、チロシン合成系を強化した大腸菌への合成遺伝子の導入と、その代謝産物の分析により予測反応において有効に機能する遺伝子を探索した。２つの人工経路ともに各反応段階で有効に機能する遺伝子を見つけ、予測経路を介した（S）-レチクリンの生産を確認した。これにより、設計された人工経路が有効に機能することが示された。本研究の一連の手順（代謝設計ツールによる人工経路デザイン、遺伝子の選定・合成・機能性確認、予測経路の構築）は、微生物を利用したこれからのものづくり手法として有効であると考えられる。

1) Araki, M. et al.: Bioinformatics, 31, 905 (2015).
2) 白井智量, 日本農芸化学会 2018 年度大会 4SY20-5
3) Nakagawa, A. et al.: Nat. Commun. 2, 326 (2011).

この成果は、国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（ＮＥＤＯ）「植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発」プロジェクトの委託業務の結果得られたものです。

Escherichia coli, alkaloid, metabolic engineering

発表責任者：川崎浩子（kawasaki-hiroko@nite.go.jp）

講演番号：4D1a11
講演日時：3 月 27 日 11:10～ 1 号館 D1 会場

アブラナ科の根で誘導される放線菌の二次代謝とその遺伝子クラスターの同定

Brassicaceae roots induced secondary metabolism and identification of its gene cluster in the actinomycete

○石垣 祐二[1]、尾納 隆大[2]、橋本 恵[1]、佐藤 繭子[1]、山口 勝司[2]、長谷部 光泰[2]、豊岡 公徳[1]、重信 秀治[2]、白須 賢[1] ([1]理研 CSRS、[2]基生研)
○ Yuji Ishigaki[1], Takahiro Bino[2], Kei Hashimoto[1], Mayuko Sato[1], Katsushi Yamaguchi[2], Mitsuyasu Hasebe[2], Kiminori Toyooka[1], Shuji Shigenobu[2], Ken Shirasu[1] ([1]RIKEN CSRS, [2]NIBB)

【背景と目的】

シロイヌナズナから分離された放線菌 *Streptosporangium* sp. AEG048 株は、その根の存在下で赤色色素と抗生物質を生産する。そのため、AEG048 株は植物から何らかのシグナルを受けていると予想され、赤色色素で二次代謝産物の生産が容易に判別可能な AEG048 株は放線菌と植物の相互作用を明らかにする良いモデルとなる。今回、二次代謝を誘導する植物の根の特異性を明らかにし、その生合成遺伝子クラスターを同定したので発表する。

【方法と結果】

アブラナ科やナス科の植物の根の破砕液を調製し、これらの破砕液を含む培地で AEG048 株を生育させて赤色色素の生産量を比較した。その結果、ナス科の *Nicotiana benthamiana* やトマトの根では赤色色素の生産が誘導されなかったが、シロイヌナズナと同じアブラナ科のダイコンやキャベツの根は赤色色素の生産を誘導した。さらに、シロイヌナズナと AEG048 株を共培養して走査型電子顕微鏡（SEM）で観察したところ、根の表面に AEG048 株が定着している様子が観察された。

次に、赤色色素は II 型ポリケタイド合成酵素（PKS）で生合成されると予想されたため、ポリケタイド骨格を合成する ketosynthase（KS）と chain length factor（CLF）をコードする遺伝子を同時に破壊して赤色色素や抗生物質の生産量を野生株と比較したところ、KS と CLF の二重遺伝子破壊株では根の存在下でも赤色色素や抗生物質の生産が消失していた。これにより、赤色色素は抗生物質であり、II 型 PKS によって生合成されることが強く示唆された。

また、赤色色素の生合成遺伝子クラスターには SARP ファミリーの転写活性化因子をコードする遺伝子が存在する。この SARP 遺伝子を破壊したところ、SARP 遺伝子破壊株では赤色色素や抗生物質の生産が消失していた。さらに、SARP 遺伝子を過剰発現させたところ、SARP 過剰発現株では根の非存在下でも赤色色素を生産し、抗生物質の生産量が増大した。以上の結果から、赤色色素の生合成遺伝子クラスターの活性化には SARP が必要であり、アブラナ科の根で誘導されることが強く示唆された。

actinomycetes, plant-microbe interaction, secondary metabolism

講演番号：4D1a12
講演日時：3 月 27 日 11:21～ 1 号館 D1 会場

シアノバクテリアを用いたストリゴラクトン生産系構築の試み
The construction of a Strigolactone production system in cyanobacteria
○坂巻 裕、伊藤 晋作、渡辺 智（東京農大）
○Yutaka SAKAMAKI, Shinsaku ITO, Satoru WATANABE (Tokyo Univ. of Agric.)

植物ホルモンであるストリゴラクトン（SL）はアフリカで農業生産上、最も問題となっている根寄生雑草 Striga の発芽刺激物質として知られており、圃場試験から Striga の駆除に高い効果が認められている。しかし、天然 SL は分解されやすく植物からの分泌量も微量であるため、SL を安価かつ大量に生産する系の確立が求められている。SL は植物においてβ-carotene を出発物質として D27、CCD7、CCD8、および P450 ホモログである MAX1 の 4 酵素により主に葉緑体で合成される。シアノバクテリアは葉緑体の祖先生物であり、葉緑体と酷似した代謝機能、細胞内環境を有しており、β-carotene を高蓄積している。このような特徴をもつシアノバクテリアを SL 生産のホストとして用いれば、細胞内で SL 生産までの代謝系を構築することができると考え、シアノバクテリア *Synechococcus elongates* PCC 7942（*S.* 7942） への SL 合成遺伝子の導入と機能化を試みている。これまでに D27 および MAX 1 導入株を構築し発現を確認した。また高コピープラスミド p24Ex の IPTG 依存的誘導プロモーター下に D27, CCD7, CCD8 を集積させ *S.* 7942 へ導入した。この株において IPTG を添加し発現を誘導したところ成育の遅延が確認された。現在、代謝産物や活性試験を行うと共に、4 酵素導入株の作製を進めている。

Cyanobacteria, Strigolactone, material production

発表責任者：坂巻　裕（44218015@nodai.ac.jp）

講演番号：4D1a13
講演日時：3 月 27 日 11:32～ 1 号館 D1 会場

Aspergillus terreus のイタコン酸生産に及ぼす金属イオンの影響（第 2 報）
Effect of metal ion on itaconic acid production in *Aspergillus terreus* (2nd report)
南 智之[1]、横井 諒[2]、○梛野 準希[1]、金政 真[2] ([1]中部大院・応生、[2]中部大・環生科)
Tomoyuki MINAMI[1], Ryo YOKOI[2], ○Junki NAGINO[1], Shin KANAMASA[2] ([1]Grad. Sch. Biosci. Biotech., Chubu Univ., [2]Dept. Envi. Biol., Chubu Univ.)

【背景・目的】イタコン酸は不飽和基を有する二価の水溶性有機酸である。その構造から重合や共重合によって線状高分子を形成できる特性があり、合成樹脂や合成繊維、接着剤や印刷インキ等、工業製品の原料や添加剤として幅広く利用されている。また、その安全性から食品添加物としても使用されている。イタコン酸は、*Aspergillus terreus*、*Aspergillus itaconicus* などの糸状菌や、*Candida tsukubaensis* のような酵母による生産が知られており、近年は高等生物においても生産されると考えられている。イタコン酸の工業生産には生産速度の観点からもっぱら *A. terreus* が使用されている。我々は、これまでに本菌においてイタコン酸はクエン酸回路において生成するシス・アコニット酸を基質としてシス・アコニット酸デカルボキシラーゼ（CAD）により生成されることを、CAD をコードする *CAD1* 遺伝子の解析を通じて明らかにした。イタコン酸の工業生産に関する研究は数多く行われ、培養条件の最適化によるイタコン酸の生産性向上が試みられてきた。*A. terreus* におけるイタコン酸生産性は培地の pH、金属イオンや塩類の濃度に影響されることが知られている。また、*A. niger* では鉄イオン濃度を制限した培地において、クエン酸を多量に生産することが知られている。これは、鉄イオンが欠乏状態では、鉄イオンをクエン酸がキレートして効率よく生体内に取り込むためであると考えられている。しかし、*A. terreus* においては、未だにイタコン酸の生物学的機能には不明な点が多く、その生合成制御が明らかになればイタコン酸の機能の一端を解明できると期待される。我々は、イタコン酸と金属イオンの関係に着目し、昨年度の本大会にて成果を発表した。本研究では、イタコン酸がキレート等による生体防御機能を有していると仮定し、各種金属イオンがイタコン酸生産性に与える影響を調べた。
【方法・結果】前培養した *A. terreus* を、ポテトデキストロース培地を基本とし、酸性および中性の pH にて、鉄およびマンガン、銅、コバルトの各金属イオンを含む培地にシフトして培養を行った。培養後、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて培養液のイタコン酸濃度を定量した。その結果、本来イタコン酸の生産性が大幅に低下する中性条件において、1mM のコバルトイオンが存在する条件では、培地に金属イオンを含まない条件と比べ、培養液のイタコン酸濃度が増加した。現在、金属イオンが *CAD1* 遺伝子の発現に与える影響についても測定を行っているので併せて報告する。

itaconic acid, *Aspergillus terreus*, metal ion

発表責任者：金政 真（kanamasa@isc.chubu.ac.jp）

講演番号：4D1a14
講演日時：3 月 27 日 11:43～ 1 号館 D1 会場

豆類および豆麹における適合溶質の分析に関する研究
Study on analysis of compatible solute in beans and bean kojis
○村田 紋奈[1]、加治 晴奈[1]、三浦 章寛[2]、榔野 準希[2]、堤内 要[3]、金政 真[1]([1]中部大・環生科、[2]中部大院・応生、[3]中部大・応生化)
○ Ayana MURATA[1], Haruna KAJI[1], Akihiro MIURA[2], Junki NAGINO[2], Kaname TSUTSUMIUCHI[3], Shin KANAMASA[1] ([1]Dept. Envi. Biol. Chubu Univ., [2]Grad. Sch. Biotech.Chubu Univ., [3]Dept. Biol. Chem. Chubu Univ.)

【目的】生物は様々な環境ストレスから細胞を保護するために、ストレスの種類に応じた防御機構を有している。浸透圧ストレスは塩や糖などが高濃度の環境や低水分活性環境に生物が暴露されることによって引き起こされ、細胞外に水が移動するのと同時にナトリウムイオンなどホメオスタシスに必要な無機イオンの流出を促し、死に至らしめる。これを防ぐため、生物は様々な適合溶質(compatible solute）を細胞に蓄積することで浸透圧耐性を実現している。原核生物では、好塩細菌 *Ectothiorhodospira halochloris* 等においてエクトイン（1,4,5,6-tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid）が適合溶質として知られている。エクトインは環状アミノ酸構造の双性イオンであり、細胞外の塩濃度依存的に細胞内エクトイン濃度が調整されることで浸透圧耐性に貢献している。また、タンパク質、核酸、細胞膜等の生体高分子を安定化することにより、ストレスから細胞を保護すると考えられている。エクトインはその特性を活かして、タンパク質安定剤、PCR エンハンサー、化粧品添加物などにも応用されている。現在、エクトインの工業生産には好塩細菌 *Halomonas elongata* が用いられているが、高塩濃度での培養による生産設備の劣化や、生育速度の遅さなどが課題となっている。そこで、我々は新たな商業用エクトイン生産ツールとなる生物を探索してきた。我々は昨年度の本大会にて、真核微生物として初めて糸状菌 *Aspergillus terreus* がエクトインを生産することを報告した。しかし、その他の生物におけるエクトイン生産の知見はない。そこで、今回我々は植物、なかでも主要な食品原料である豆類を対象として LC-MS/MS による高感度定量分析を行い、エクトインの存在を初めて確認したことと根粒菌が与える影響について考察したことを報告する。
【方法と結果】市販の 8 種類の乾燥豆（大豆、小豆、赤えんどう、青えんどう、いんげん、黒豆、金時豆）にそれぞれ米麹を添加し反応させて豆麹を作製した。豆麹中のエクトインを定量分析するために、豆麹の破砕及びメタノール抽出を行い、これに我々が合成した重水素化エクトイン添加して LC-MS/MS 分析を行った。その結果、8 種類全ての乾燥豆からエクトインが検出され、特に大豆において含量が多かった。また、8 種類の豆から作製した豆麹のうち、赤えんどうおよび青えんどうは豆麹にすることでエクトイン含量が顕著に増加した。このことから、豆類はエクトインを有していることが明らかとなった。また、麹菌 *A. oryzae* や根粒菌についても並行して分析した結果についても併せて報告する。

compatible solute, koji, ectoine

発表責任者：金政 真（kanamasa@isc.chubu.ac.jp）

講演番号：4D2a02
講演日時：3 月 27 日 09:11～ 1 号館 D2 会場

ツルムラサキ葉より放出される揮発成分の解析
Analysis of volatile compounds released from Malabar spinach
○戸田 綾香、芦谷 竜矢、村山 哲也、網干 貴子（山形大農）
○Ayaka TODA, Tatsuya ASHITANI, Tetsuya MURAYAMA, Takako ABOSHI (Yamagata Univ. of Agric.)

【目的】植物から放出されている揮発成分のなかには、昆虫に対して忌避作用を示すものがある。ツルムラサキ（*Basella alba*）は、昆虫被害が少ない植物であり、キュウリの畑に間作することで、キュウリへのコナジラミの発生が抑制されたと報告されている。ツルムラサキの葉からはコナジラミに対して忌避作用を示す化合物として geranyl nitrile が報告されているが、揮発成分生成の詳細については不明である。そこで本研究では、ツルムラサキ葉から放出される揮発成分の詳細を調べることにした。
【方法】ハスモンヨトウ幼虫にツルムラサキ葉を一定時間自由に食害させ、その後、食害された葉から放出される揮発成分を吸着剤（MonoTrap）で 1 日捕集した。吸着剤をジクロロメタンに浸漬し、抽出液を GC/MS で測定した。また、ツルムラサキ葉に植物病原菌の感染や植物ホルモン処理を施し、その後、吸着剤で揮発成分を捕集し、GC/MS で測定した。
【結果】ツルムラサキ葉をハスモンヨトウ幼虫に食害させたところ、数種の揮発成分が生成した。検出された揮発成分のうち最も強度の強い成分（化合物 A）は、シミラリティ検索で geranyl nitrile と推定されたが、マススペクトルと保持時間が標品と一致せず、geranyl nitrile ではないと考えられた。化合物 A は分子量から C11 のホモテルペンと予想され、食害葉からは化合物 A より分子量がイソプレン単位 1 個分多い C16 の化合物のピークも検出された。なお、本化合物は無処理の葉からは、ほとんど検出されなかった。また、ジャスモン酸処理を施した葉でも、同様の揮発成分が生成したのに対し、サリチル酸処理や灰色カビ病の感染では検出されなかった。ジャスモン酸は傷害時に増加する植物ホルモンであることから、傷害によるジャスモン酸の増加に誘導され本化合物が生成することが考えられた。

volatile compounds, Malabar spinach, repellent semiochemicals

講演番号：4D2a03
講演日時：3 月 27 日 09:22～ 1 号館 D2 会場

花香分析と RAPD 解析によるササユリ（ *Lilium japonicum*）系統間の多様性解析
Analysis of chemical and genetic diversity in *Lilium japonicum* population using floral scent composition and RAPD markers

○藤澤 瑞希[1]、荒井 滋[2]、松川 哲也[1]、瀧川 義浩[3]、秋野 順治[4]、梶山 慎一郎[1]([1]近畿大院・生物理工、[2]大神神社、[3]近畿大学先端研、[4]京都工繊大・DBFS)
○ Mizuki FUJISAWA[1], Shigeru ARAI[2], Tetsuya MATSUKAWA[1], Yoshihiro TAKIKAWA[3], Toshiharu AKINO[4], Shin'ichro KAJIYAMA[1] ([1]BOST, Kindai Univ., [2]Omiwa Shrine, [3]Plant center, Kindai Univ., [4]DBFS, Kyoto Inst., Technol.)

【背景および目的】

ササユリ(*Lilium japonicum*)は，ユリ科ユリ属に属する日本固有の球根植物であり，西日本に広く分布する植物種である。古くから観賞用，薬用，食用として利用されており，また，1300 年前から続く疫病神祓いの神事にも使用され，奉納されたササユリを持ち帰り飾ると疫病除けになると言い伝えられるなど日本文化に深い関わりのある植物種である。しかし，本植物は獣害や乱獲による個体数の減少に加えて，播種から初回の開花まで長い期間を要することから，絶滅の危機に瀕しており，種の保存が求められている。ササユリはササに似た葉をもち，淡い桃色の花を咲かせるユリであるが，葉形や花色などの形態的特徴は極めて多様性が高く，自生地により異なる形質を示すことが知られている。一方で，ササユリは個体数に限りがあることから，研究対象としてあまり利用されておらず，生物有機化学的知見および分子生物学的知見が乏しいのが現状である。そこで今回の発表では，ササユリの多様性を化学的観点から評価することを目的として，本植物の重要な形質の一つである花香に着目し，異なる自生地から採取されたササユリの香気成分を網羅的に分析するとともに、RAPD 解析により遺伝的多型について知見を得る事を目的とした。

【方法および結果】

植物材料は大神神社で管理・栽培されている北陸地方から中国地方で採取されたササユリを用いた。植物体長，葉形および花の色などを記録し，形態的特性の評価を行った。次に，活性炭と ODS から構成される吸着材を環状に組み合わせ，ササユリの花被内の生殖器官に引っ掛け一晩吸着させることにより香気成分を捕集した。内部標準を添加したジクロロメタンで溶出し，GC/MS 分析に供した。MS スペクトルおよび保持時間を標品と比較し，香気成分の同定を行うとともに、組成を比較するため，ピークデータを多変量解析に供した。その結果,関西地域とその周辺地域では組成が異なり，これには香気成分の主要化合物である Linalool およびその類縁化合物が大きく影響していることが示唆された。また，ササユリの香気成分の組成の違いと形態の間に相関が認められ，ササユリの香気成分がササユリの多様性を示す表現型の一つであることが示された。現在、RAPD 解析の結果との関連を調べており、それも併せて報告する。

Lilium japonicum, floral scent composition, chemical and genetic diversity

発表責任者：藤澤瑞希（1833710013g@waka.kindai.ac.jp）

講演番号：4D2a04
講演日時：3 月 27 日 09:33～ 1 号館 D2 会場

ミヤコグサの 5DS および lotuslactone 生合成における MAX1 下流経路の解析
Investigation of 5DS and lotuslactone biosynthetic pathways downstream of MAX1 in *Lotus japonicus*

○森 愛美[1]、謝 肖男[2]、米山 香織[3]、野村 崇人[2]、米山 弘一[2]、秋山 康紀[1]([1]阪府大院・生命環境、[2]宇都宮大・バイオ、[3]愛媛大・農)
○Narumi MORI[1], Xiaonan Xie[2], Kaori YONEYAMA[3], Takahito NOMURA[2], Koichi YONEYAMA[2], Kohki AKIYAMA[1] ([1]Grad. Sch. Life & Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Ctr. For Biosci. Res. & Educ., Utsunomiya Univ., [3]Fac. Agric., Ehime Univ.)

【目的】ストリゴラクトン（strigolactone, SL）は植物が生産する根圏情報物質であり，枝分かれを抑制する内生ホルモンでもある。SL 生合成において，オロバンコール型 SL の生合成経路は明らかになったが，ストリゴール型 SL の骨格を形成する経路は未だ解明されていない。我々はストリゴール型 SL である 5-deoxystrigol（5DS）を主に生産するミヤコグサ（*Lotus japonicus*）を用いて，その生合成経路の解析を行ってきた。これまでにミヤコグサにおける CYP711A ファミリーの MAX1 組換え酵素が carlactone（CL）を 18-hydroxycarlactonoic acid（18-HO-CLA）にまで変換するが，5DS 骨格を形成できないこと，また，MAX1 の下流に存在する 2-オキソグルタル酸依存性デヒドロゲナーゼの LBO が 5DS の生産に関わらないことを明らかにした。これらのことは，5DS の BC 環の形成を行う経路には未知の遺伝子が関わっていることを示唆している。最近，典型的 SL である 5DS に加え，ミヤコグサが非典型的 SL である lotuslactone（LL）を根圏情報物質として生産することが明らかになった。LL は C20 の基本骨格を有するため MeCLA を中間体とする新しい複雑な生合成経路により生産されると考えられる。今年度の本大会では 5DS および LL を生成する MAX1 下流の生合成経路を明らかにするために，MAX1 欠損変異体を用いた安定同位体標識中間体の変換実験を行ったので報告する。

【結果と考察】*LORE1*（Lotus Retrotransposon 1）ミヤコグサ内在性レトロトランスポゾンを利用した遺伝子タギング集団から MAX1 欠損変異体を得，その 5DS および LL 生産について調べた。その結果，*max1* 変異体はどちらの SL も生産していないことが明らかになった。

この *max1* 変異体を用いて根に対する取込実験を行った。[10-^{13}C]-18-HO-MeCLA を投与した *max1* 変異体は，^{13}C-18-HO-CLA，^{13}C-5DS および ^{13}C-LL を生成した。このことから，18-HO-CLA の下流には MAX1 が関与していないことが確定し，同時に 2 つのミヤコグサ SL は 18-HO-CLA または 18-HO-MeCLA を前駆体とすることがわかった。[1-$^{13}CH_3$]-CLA の取込実験でも ^{13}C-5DS および ^{13}C-LL が生成したことから，CLA から 18-HO-CLA への変換は MAX1 を含む重複した経路であることが明らかになった。現在，18-HO-CLA を化学合成し取込実験を行っている。

strigolactone, biosynthesis, Lotus japonicus

講演番号：4D2a05
講演日時：3 月 27 日 09:44～ 1 号館 D2 会場

植物における内生ヒドロキシカーラクトン酸メチルの同定
Identification of endogenous methyl hydroxycarlactonoates in plants
○高島 岬[1]、米山 香織[2]、謝 肖男[3]、野村 崇人[3]、米山 弘一[3]、秋山 康紀[1] ([1]阪府大院・生命環境、[2]愛媛大・農、[3]宇都宮大・バイオ)
○Misaki Takashima[1], Kaori Yoneyama[2], Xiaonan Xie[3], Takahito Nomura[3], Koichi Yoneyama[3], Kohki Akiyama[1] ([1]Grad. Sch. Life & Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Fac. Agric., Ehime Univ., [3]Ctr. for Biosci. Res. & Educ., Utsunomiya Univ.)

【目的】ストリゴラクトン（strigolactone, SL）は植物の枝分かれを抑制する内生ホルモンである。SL は主に根で生産され、地上部に移行して枝分かれ抑制ホルモンとして働くと考えられている。しかし、活性型ホルモンとして働く SL の構造はこれまでに明らかにされていない。SL には 3 環性ラクトン（ABC 環）とブテノライド（D 環）がエノールエーテル結合した 4 環性構造を持つ典型的 SL と、カーラクトン（carlactone, CL）のように ABC 環のうちいずれかの環を欠いた構造を持つ非典型的 SL の 2 種類が存在する。これまでに、シロイズナズナの道管液から典型的 SL であるオロバンコールが検出されたという報告があるが、他の研究グループによる確認はなされていない。一方、CL は道管液で検出されることから、CL が根から地上部に移行可能な中間体である可能性が強く示唆されている。CL はシトクローム P450 である MAX1 によってカーラクトン酸（carlactonoic acid, CLA）に酸化された後、メチル基転移酵素によりカーラクトン酸メチル（methyl carlactonoate, MeCLA）に変換される。この下流に存在する SL 生合成酵素である LBO は 2-オキソグルタル酸依存性オキシゲナーゼであり、活性型ホルモンの生成に関与することが示唆されている。これまでに、我々は LBO の基質候補となる SL を探索し、シロイヌナズナの *lbo* や *d14* 変異体の地上部において 4-および 16-ヒドロキシカーラクトン酸メチル（HO-MeCLA）と推定される SL が蓄積していることを見出している。本研究では、4-および 16-HO-MeCLA の化学合成法を確立し、それら SL のシロイヌナズナおよびミヤコグサでの存在について検証した。
【方法・結果】2,6-ジメチルシクロヘキサノンを出発物質として、TBS 保護ヒドロキシ C_{13} カルボン酸メチルのフォルミル化－D 環カップリング、最後に脱保護を行う従来法（Abe *et al*. *PNAS* (2014)）により 16-HO-MeCLA を合成できた。また、最近発表された Dieckmann らの Stille カップリングを用いる方法 (*J. Org. Chem* (2018))を適用することによっても 16-HO-MeCLA を合成できた。4-HO-MeCLA は従来法では反応基質の分解により合成できなかったが、Dieckmann らの方法では合成可能であった。シロイヌナズナ *lbo* 変異体の地上部基部抽出物中の推定 16-HO-MeCLA について化学合成標品と LC-MS/MS 分析により比較を行ったところ両者は一致した。またミヤコグサの *d14* 変異体の茎抽出物においても 16-HO-MeCLA の存在を確認することができた。現在，ミヤコグサで検出された 16-OH-MeCLA の 1 位および 11 位の立体配置の決定を試みている。

strigolactone, methyl hydroxycarlactonoate, LBO

講演番号：4D2a06
講演日時：3 月 27 日 10:05～ 1 号館 D2 会場

イネにおけるフラボノイド型ファイトアレキシン、サクラネチンの蓄積に関するナチュラルバリエーション

Natural variation in accumulation of flavonoid phytoalexin,sakuranetin in rice

○村田 晃一[1]、高田 諒[2]、宇部 尚樹[3]、上野 琴巳[4]、寺石 政義[2]、奥本 裕[2]、森 直樹[2]、石原 亨[1]
([1]鳥大院持続性社会、[2]京大院農、[3]鳥大院連農、[4]鳥大農)
○Koichi MURATA[1], Ryo TAKATA[2], Naoki UBE[3], Kotomi UENO[4], Masayoshi TERAISHI[2], Yutaka OKUMOTO[2], Naoki MORI[2], Atsushi ISHIHARA[1] ([1]Grad. Sch. Sustainability Sci., Tottori Univ., [2]Grad. Sch. Agr., Kyoto Univ., [3]United Grad. Sch. Agr. Sci., Tottori Univ., [4]Fac. Agr., Tottori Univ.)

【背景と目的】植物は、病害応答の一つとして抗菌性二次代謝産物、ファイトアレキシンを生産する。イネのファイトアレキシンには、フラボノイド型のサクラネチンやテルペノイド型のモミラクトンなどが知られる。これまでの研究から、日本晴はサクラネチンを高濃度に蓄積するが、カサラースはサクラネチンをあまり蓄積しないことが見出されている。サクラネチンはナリンゲニンから naringenin-7-*O*-methyltransferase（NOMT）によって生合成される。本研究では、イネの様々な品種を対象にサクラネチンの蓄積量に関する多様性を明らかにするとともに、その原因を明らかにすることを目的とした。

【方法】農業生物資源ジーンバンクから分譲された世界のイネ・コアコレクションを植物材料に用いた。播種後 14 日目の幼苗から得た第 3 葉の切片を 1 mM のジャスモン酸（JA）溶液に浮かべ、JA 処理とした。一定時間後、80%メタノールで抽出し、サクラネチンとナリンゲニンを LC-MS/MS で定量した。一方、葉を緩衝液中で磨砕して調製した粗酵素を用いて、*S*-アデノシルメチオニンとナリンゲニンを反応させ、NOMT 活性を測定した。*NOMT* 転写産物の蓄積量は、定量的 RT-PCR により測定した。日本晴およびカサラース由来の *NOMT* 遺伝子を大腸菌に発現させ、組換え NOMT を調製し、NOMT 活性を測定した。

【結果】 世界のイネ・コアコレクション 69 品種についてサクラネチンの蓄積量を測定したところ、サクラネチンを多く蓄積する品種、ナリンゲニンを多く蓄積する品種、どちらも蓄積しない品種が存在した。また、サクラネチンを多く蓄積する品種では、NOMT 活性が高く、*NOMT* 遺伝子の発現量も大きいことがわかった。一方、ナリンゲニンを多く蓄積する品種では、NOMT 活性はほとんど検出されず、*NOMT* 遺伝子の発現量は低レベルであった。続いて、*NOMT* 遺伝子を大腸菌で発現させ、組換え NOMT タンパク質を調製し、酵素活性を測定した。カサラース由来の NOMT は日本晴由来の NOMT と比較して k_{cat} が約 10 分の 1 であった。これらの結果から、*NOMT* 遺伝子の発現量と NOMT の酵素活性の両方がサクラネチンの蓄積に関する種内多様性に関わっていると推定された。

rice, phytoalexin, sakuranetin

発表責任者：石原　亨（aishihara@tottori-u.ac.jp）

講演番号：4D2a07
講演日時：3 月 27 日 10:16～ 1 号館 D2 会場

イネにおけるテルペノイド型ファイトアレキシン、オリザレキシン A の蓄積に関するナチュラルバリエーション
Natural variation in accumulation of terpenoid phytoalexin, oryzalexin A in rice.
○仮谷 佳祐[1]、村田 晃一[2]、宇部 尚樹[3]、上野 琴巳[1]、寺石 政義[4]、奥本 裕[4]、森 直樹[4]、石原 亨[1] ([1]鳥取大農、[2]鳥大院持続性社会、[3]鳥取大院連農、[4]京都大学院農)
○Keisuke KARIYA[1], Kouichi MURATA[2], Naoki UBE[3], Kotomi UENO[1], Masayoshi TERAISHI[4], Yutaka OKUMOTO[4], Naoki MORI[4], Atsushi ISHIHARA[1] ([1]Fac. Agr., Tottori univ., [2]Grad. sch. Sustainability Sci., Tottori Univ., [3]United Grad. Sch. Agr Sci., Tottori univ., [4]Grad. Sch. Agr., Kyoto univ.)

【背景と目的】植物は病原菌の感染に応答して、抗菌活性を有する低分子化合物ファイトアレキシンを蓄積する。イネでは、フラボノイドのサクラネチン、テルペノイドのモミラクトン類やオリザレキシン類、ファイトカサン類など 15 種類以上のファイトアレキシンが報告されている。これまでに、世界のイネ・コアコレクションを用いた分析から、サクラネチン、モミラクトン類およびオリザレキシン類の蓄積に種内多様性が存在することを見出した。本研究では、テルペノイド型ファイトアレキシンの一つであるオリザレキシン A に着目し、オリザレキシン A を蓄積する品種と蓄積しない品種が存在する原因を明らかにすることを目的とした。

【方法】オリザレキシン A を蓄積する日本晴と蓄積しないカサラース、これらの品種から作出された染色体断片置換系統と戻し交雑自殖系統、ならびに農業生物資源ジーンバンクから分譲された世界のイネ・コアコレクションを用いて実験を行った。ファイトアレキシンの蓄積を誘導するために、それぞれの系統を播種後 14 日間生育させた後、第三葉に 10 分間紫外線照射を行った。さらに 72 時間インキュベートした後、80%メタノールで抽出し、オリザレキシン A を LC-MS/MS を用いて定量した。また、紫外線照射 24 時間後にオリザレキシン生合成遺伝子の転写産物蓄積量を定量的 RT-PCR により測定した。

【結果】染色体断片置換系統、および戻し交雑自殖系統を使用したマッピングの結果、12 番染色体長腕上にオリザレキシン A の蓄積量に大きな影響を及ぼす領域が見出された。この領域には *ent*-sandaracopimara-8(14),15-diene synthase をコードする *KSL10*(0s12g0491800)が座上していた。*KSL10* は、オリザレキシン類の生合成に関与する酵素遺伝子である。そこで、日本晴とカサラースの幼苗に紫外線照射し *KSL10* の発現に及ぼす影響を調べた。日本晴では、紫外線照射による *KSL10* 転写産物の顕著な増加が見られたが、カサラースでは転写産物の蓄積は検出されなかった。続いて、世界のイネ・コアコレクションを用いて紫外線を照射した葉におけるオリザレキシン A と *KSL10* 転写産物の蓄積量を調べた。オリザレキシン A を蓄積する系統では *KSL10* 転写産物の蓄積が認められたのに対し、オリザレキシン A を蓄積しない系統では *KSL10* 転写産物は検出できなかった。以上の結果から、*KSL10* の発現の有無がオリザレキシン A の蓄積を決定していることが示唆された。

rice, phytoalexin, oryzalexin A

発表責任者：石原亨（aishihara@tottori-u.ac.jp）

講演番号：4D2a08
講演日時：3 月 27 日 10:27～ 1 号館 D2 会場

イネ（*Oryza sativa*）における酢酸/プロピオン酸処理による乾燥耐性獲得時の代謝変化

The Metabolic Change of Acquiring Drought tolerance by Acetic acid/Propionic acid Treatment in *Oryza sativa*

○手嶋 萌映[1]、伊左治 俊策[1]、中田 隆[1]、土生 芳樹[2]、吉永 直子[1]、寺石 政義[1]、奥本 裕[1]、森 直樹[1] ([1]京大院農、[2]農研機構)

○Moe TEJIMA[1], Shunsaku ISAJI[1], Ryu NAKATA[1], Yoshiki HABU[2], Naoko YOSHINAGA[1], Masayoshi TERAISHI[1], Yutaka OKUMOTO[1], Naoki MORI[1] ([1]Kyoto Univ., of Agric., [2]NARO)

【背景と目的】

近年, 我々はイネ（*Oryza sativa*）において酢酸処理により乾燥耐性が付与されると報告した [1)]. この乾燥耐性とは, 乾燥時に枯死したように見えるが水を与えれば再び新しい葉を出す現象である. これまでに, イネ体内に取り込まれた酢酸がα―ケトグルタル酸を経由してγ―アミノ酪酸（GABA）に代謝されることを明らかにした [2)]. そこで我々は GABA の蓄積と乾燥耐性獲得の関係に注目している. 本研究では, さらに酢酸から炭素鎖が一つ伸びたプロピオン酸でも, 酢酸と同様に乾燥耐性が付与されるかを確認し, GABA 蓄積についても比較検証した.

【方法と結果】

播種後 2 週間生育させたイネ（日本晴）を, 水道水（対照区）, 酢酸水溶液（20 mM, 処理区）およびプロピオン酸水溶液（20 mM, 処理区）で 6 日間処理し, 4 日間乾燥させた. その後 7 日間再吸水させ生存率を調べた. その結果, 対照区に比べ酢酸およびプロピオン酸処理区では生存率が高く, プロピオン酸処理でも乾燥耐性が付与された. GABA 蓄積量を調べたところ, 酢酸およびプロピオン酸処理区で地上部と根の両方で有意に増加していた. 現在, イネの部位ごとにおける GABA 蓄積量を分析している.

【参考文献】

1) J-M.Kim, et al. (2017) “Acetate-mediated novel survival strategy against drought in plants.” *Nature Plants* 3(7) nplants201797.
2) Isaji et al. (2018) “Biosynthesis and accumulation of GABA in rice plants treated with acetic acid.” *Journal of Pesticide Science*. 43-3, 214-219

drought tolerance, Oryza sativa, Propionic acid

発表責任者：手嶋 萌映（tejima.moe.68m@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4D2a09
講演日時：3 月 27 日 10:38～ 1 号館 D2 会場

コナダニ類に警報フェロモン neryl formate 分子を形成するギ酸の生合成

Biosynthesis of formic acid to from neryl formate as alarm pheromone astigmatid mites

○森山 太介、吉田 直樹、清水 伸泰（京都学園大）
○Daisuke MORIYAMA, Naoki YOSHIDA, Nobuhiro SHIMIZU (Kyoto Gakuen Univ.)

【背景】

コナダニ類のフェロモン研究は、今から約 40 年前にケナガコナダニの警報フェロモンとして neryl formate が同定されたものを皮切りに進展してきた。モノテルペンの neryl formate は数種ダニの警報フェロモンでもあり、近年では家塵性チリダニ科ダニの集合フェロモンとして報告された。生物活性が不明な種を含めると実に多くのダニが本化合物を分泌していることが分かる [1)]。Neryl formate は nerol のギ酸エステルであり、nerol から誘導されるサトウダニの警報フェロモン neral はメバロン酸経路で合成される。コナダニ類に由来するテルペンはこの経路で合成されると推察できるが、nerol と縮合するギ酸の生合成の由来は不明である。本研究では neryl formate を分泌するクヌギジュエキダニ *Hericia sanukiensis* を用いてギ酸の生合成前駆体を探索した。クロオオアリの防御物質であるギ酸はグリシン、セリン、ヒスチジンが生合成前駆体であると報告されている [2)]。この知見をもとにダニに安定同位体ラベル化アミノ酸を餌に混ぜて摂食させ、neryl formate 分子が同位体でラベル化されるかを検証した。

【方法と結果】

^{13}C でラベル化されたグリシンと、3 位のメチレン炭素のみがラベル化されたセリンを用いた摂食実験をクヌギジュエキダニに対して行った。通常ダニは人工樹液と乾燥酵母を与えて継代飼育しており、摂食実験の際は乾燥酵母にラベル化アミノ酸を 25%混合したものを継続的に適量与えて体内に取り込ませた。2~3 週間後にダニ分泌物のヘキサン抽出物を GC-MS 分析し、マススペクトルから neryl formate 分子がラベル化されているかを調べた。その結果、両方のアミノ酸ともホルミル化テトラヒドロ葉酸の合成に関与することで、ギ酸の前駆体となっていることが明らかとなった。一方、カルボキシ基のみが ^{13}C でラベル化されたセリンを与えたときも neryl formate 分子が ^{13}C でラベルされたことから、クロオオアリとは異なるギ酸の生成経路が存在すると考察した。

1) Kuwahara Y. Advance in insect chemicalecology (Ring T. C., Jocelyn G. M. edited). 76-109. (2004)
2) Hefetz, A., and M. S. Blum. *Science.* 201:454–455 (1978)

Astigmatid mite, Monoterpene, Biosynthesis

発表責任者：清水伸泰（shimizu@kyotogakuen.ac.jp）

講演番号：4D2a10
講演日時：3 月 27 日 10:49～ 1 号館 D2 会場

昆虫におけるインドール酢酸生合成酵素の同定
Identification of indole-3-acetic acid biosynthesis enzyme in insects
○武井 麻美[1,2]、小暮 奨太[1]、伊藤 晋作[3]、鈴木 義人[1] ([1]茨城大・農、[2]東京農工大・連合農学、[3]東農大・バイオ)
○Mami Takei[1,2], Shota Kogure[1], Shinsaku Ito[3], Yoshihito Suzuki[1] ([1]Ibaraki Univ., [2]Tokyo Univ. Agric. Technol., [3]Tokyo Univ. of Agric.)

【目的】
ある種の昆虫は摂食や産卵を機に植物にゴールという異常な組織を形成する。ゴール形成昆虫にはオーキシンやサイトカイニンが高濃度に含まれるため，ゴール形成に重要な因子として示唆されている。ゴール形成昆虫であるハバチ（*Pontania* sp.）はトリプトファン（Trp）からインドール-3-酢酸（IAA）を生成する活性があり，ゴール非形成昆虫であるカイコ（*Bombyx mori*）においても同様の活性を有する。昆虫における IAA 生合成経路は Trp→インドール-3-アセトアルドキシム（IAOx）→インドール-3-アセトアルデヒド（IAAld）→IAA と推定されており，ゴール形成能に関わらず共通である。また，カイコでは Trp→IAOx の変換が律速となる一方，ハバチではその変換活性が相対的に高いため，進化的に高い変換能を獲得してきたと考えられる。
本研究では昆虫における IAA 生合成酵素を同定することを目的としている。我々はこれまでに IAAld→IAA の変換をする *Bombyx mori* IAAld oxidase 1（BmIAO1）を同定した。BmIAO1 は補因子として含まれる FAD によって非酵素的に Trp→IAAld に変換する活性があり，IAOx→IAAld→IAA に変換する酵素活性がある。しかし，その他の変換に関わる酵素は明らかとなっていない。
【結果・考察】
昆虫における IAA 生合成で重要な反応と考えられる Trp→IAOx の変換に関わる酵素の同定を行なった。ハバチの遺伝子配列情報を RNA-seq 解析により入手し，Trp→IAOx 変換活性のある Actinomyces flavin-dependent monooxydase（FMO）と相同性の高い遺伝子を探索したところ，カイコから 3 遺伝子（*BmFMO1～3*），ハバチから 3 遺伝子（*PonFMO1～3*）を得られた。これらの候補遺伝子を大腸菌において組換えタンパク質として発現させて活性を測定したところ，PonFMO1 に Trp→IAOx の変換活性が認められた一方で，カイコから得られた候補タンパク質には変換活性がなかった。また，植物において Trp→IAAld 変換活性がある Aromatic acetaldehyde synthase（AAS）と相同性の高い遺伝子に関しても昆虫における IAA 生合成に関与するか検討を行なっている。

insect, indole-3-acetic acid, gall

講演番号：4D2a11
講演日時：3 月 27 日 11:10～ 1 号館 D2 会場

昆虫由来エリシターFACs の生合成酵素の探索
Identification of insect elicitor FACs synthase
○野村 泰介、義本 裕介、宮下 正弘、吉永 直子、森 直樹（京大院農・応生）
○Taisuke NOMURA, Yusuke YOSHIMOTO, Masahiro MIYASHITA, Naoko YOSHINAGA, Naoki MORI (Kyoto Univ.)

【背景】
FACs（Fatty acid - Amino acid Conjugates）は植物に食害応答を引き起こし、揮発成分の放出を誘導する昆虫由来エリシターである。FACs は食害応答を引き起こす点で昆虫にとって不利益な化合物だが、昆虫がわざわざ FACs を持つ理由は明らかにされてこなかった。我々はこれまでの知見により、FACs が昆虫体内で積極的に合成され、FACs の合成が昆虫の窒素代謝の効率化に関わっていることを示した。FACs 生合成系のノックアウトによりさらなる FACs の機能解析を行うため、本研究ではこれまで未知であった FACs 合成酵素の特定を試みた。

【方法・結果】
対象生物としてゲノムが解読され、FACs 生合成が確認されているヤガの一種ハスモンヨトウ *Spodoptera litura* を用いた。ハスモンヨトウ終齢幼虫の中腸組織 200 頭分を破砕・遠心して粗酵素液を得た。これを種々のカラムに供し、得られた各フラクションの FACs 合成活性（リノレン酸とグルタミンの縮合活性）を LC-MS で測定した。精製酵素は SDS-PAGE および Native-PAGE で確認し、バンド中のタンパク質を MALDI-TOF/TOF-MS を用いた MS/MS Ion Search によって同定した。その結果、FACs 合成酵素の候補タンパク質として、acetylcholinesterase-like としてデータベース上に登録されている機能未知のカルボキシルエステラーゼファミリーのタンパク質を同定した（以下 *Sl*AChE-like）。*Sl*AChE-like が FACs 合成活性を持つか確認するため、ハスモンヨトウ中腸組織より mRNA を抽出し、*Sl*AChE-like の完全長 cDNA を得た。これを大腸菌に発現させたところ、発現タンパク質のほとんどが不溶性画分に存在した。昆虫細胞 Sf9 による発現結果も踏まえて報告する。

Spodoptera litura, Fatty acid - Amino acid Conjugates, Carboxylesterase

発表責任者：野村泰介（nomura.taisuke.57n@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4D2a12
講演日時：3 月 27 日 11:21～ 1 号館 D2 会場

クチナシ毒 gardenoside に対するハスモンヨトウ幼虫の解毒応答メカニズム
Mechanisms of Detoxification Response in *Spodoptera litura* against Gardenoside toxicity
○吉岡 英晃[1]、岩井 崇晃[2]、吉永 直子[2]、森 直樹[2] ([1]京大農、[2]京大院農)
○Hideaki YOSHIOKA[1], Takaaki IWAI[2], Naoko YOSHINAGA[2], NAOKI MORI[2] ([1]Kyoto Univ. Faculty of Agriculture, [2]Kyoto Univ. Graduate School of Agriculture)

[研究背景]

クチナシ *Gardenia jasminoides* はイリドイド配糖体 gardenoside を葉に蓄えており，昆虫による食害を防いでいる．昆虫の食害を受けると gardenoside は葉に含まれる β-glucosidase により加水分解されアグリコンとなり，昆虫の腸管内のタンパク質と結合して生育を阻害する．

鱗翅目昆虫ハスモンヨトウ *Spodoptera litura* は広く農作物を食害する重要害虫であるが，クチナシを摂食しない．クチナシ葉を人為的に摂食させた場合，あるいは gardenoside アグリコンを添加した飼料を摂食させた場合には生育阻害を受け，死に至る．我々は，ハスモンヨトウがクチナシ葉摂食時に腸管内に β-alanine を誘導し，gardenoside アグリコンの活性部位に結合させることで一時的に身を守ることを発見した．しかし，この応答がどのように引き起こされているのかは未だ明らかになっていない．本実験ではクチナシの葉の抽出物から，ハスモンヨトウの β-alanine 誘導を引き起こす物質を探索した．

[方法・結果]

クチナシ葉を MeOH で抽出した抽出液を有機層と水層に分液し，各層を 5 齢のハスモンヨトウ幼虫に摂食させると水層に強い β-alanine 誘導活性が確認できた．そこで水層を逆相 ODS カラムクロマトグラフィーで分画し，分画した MeOH 0, 10, 50, 100%の各画分を 5 齢のハスモンヨトウ幼虫に摂食させたところ，gardenoside を含んでいる MeOH 10%画分には β-alanine 誘導活性はなかった．これに対し，MeOH 0%画分にはクチナシ葉と比べると少ないながらも β-alanine 誘導活性を認めた．0%画分の β-alanine 誘導量を指標に MeOH 0%画分中に含まれる誘導活性成分を探索し，D-glucose, D-mannitol を同定した．これらの糖をそれぞれ単独に摂食させた際の β-alanine 誘導量はクチナシ葉摂食時の誘導量と比べると少なかった．そこで gardenoside と糖とをそれぞれ葉当量ずつ合一して摂食させたところ，クチナシ葉摂食時と同程度に β-alanine が誘導された．

以上より，ハスモンヨトウ幼虫はクチナシ葉中の gardenoside と D-glucose, D-mannitol などの糖を同時に認識することで β-alanine を誘導すると示唆された．

Spodoptera litura, *Gardenia jasminoides*, iridoid

発表責任者：吉岡英晃（yoshioka.hideaki.72c@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4D2a13
講演日時：3 月 27 日 11:32～ 1 号館 D2 会場

リンゴ果実における傷害応答性トリテルペン類の生理活性
Bioactivity of the triterpenoids in apple fruit induced by injury

○大畑 勇統[1]、森田 沙代[1]、吉永 直子[1]、石栗 陽一[2]、森 直樹[1] ([1]京大院・農、[2]青森産技セ リンゴ研)
○Yuto OHATA[1], Sayo MORITA[1], Naoko YOSHINAGA[1], Yoichi ISHIGURI[2], Naoki MORI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]AITC, Apple Research Institute)

【目的】

リンゴ果実は様々な害虫による食害を受ける. モモシンクイガ*Carposina sasakii* はリンゴ果実の重要害虫として知られている. 2015年度と2017年度の本大会で, モモシンクイガによる果実食害部の近傍でトリテルペン 3α,19α-dihydroxy-3-oxo-12-ursen-28-oic acid (3-oxo-TA) と2β,3β-3,25-epoxy-2,3,19-trihydroxy-urs-12-en-28-oic acid (pomaceic acid) が誘導されると報告した. [1),2)]. トリテルペン類は様々な生理活性を持つことが知られており, リンゴ果皮に含まれるトリテルペンursolic acid にも抗菌活性や昆虫への摂食阻害活性が報告されている[3)]. 食害部で新たに誘導されるトリテルペンもリンゴ果実内で何らかの生理的な役割を担っていると考えられる. そこでリンゴ害虫への生理活性を調べ, 傷害応答性トリテルペンが誘導される生態学的意義の解明を試みた.

【方法・結果】

リンゴ幼果傷害部の MeOH 抽出液から 3-oxo-TA と pomaceic acid を精製し, これを含む寒天飼料を作成した. これを広食性害虫ハスモンヨトウ *Spodoptera litura* の 3 齢幼虫とリンゴ果実の害虫であるモモシンクイガ 3 齢幼虫に摂食させ, 体重変化と摂食量を測定した. その結果, 3-oxo-TA ではハスモンヨトウ幼虫には摂食阻害活性があったが, モモシンクイガ幼虫に対して活性は確認できなかった.

さらに, ほかのリンゴ害虫に対する傷害応答性トリテルペン類の生理活性を調べるため, モモシンクイガと同様に果実を食害するナシヒメシンクイ *Grapholita molesta* と葉を食害するリンゴコカクモンハマキ *Adoxophyes orana fasciata* に対する生理活性について検討した. これらの結果からリンゴ果実における傷害応答性トリテルペンの生態学的意義について報告する.

1) 森田ら, 2015 年度日本農芸化学会要旨集, 2016
2) 大畑ら, 2017 年度日本農芸化学会要旨集, 2018
3) Shukla, Y. N., Rani, A., Tripathi, A. K., Sharma, S. Antifeedant activity of ursolic acid isolated from *Duboisia Myoporoies*. *Phytother Res.*, **10**, 359-360 (1996).

apple fruit, insect damage, induction

発表責任者：大畑勇統（oohata.yuuto.87e@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4D2a14
講演日時：3 月 27 日 11:43～ 1 号館 D2 会場

カイコ *Bombyx mori* における DHCR24 の酵素特性の解析
Enzymatic properties of DHCR24 in the phytophagous silkworm *Bombyx mori*
○藤盛 春奈、永田 晋治（東大院・新領域・先端生命科学）
○HARUNA FUJIMORI, SHINJI NAGATA (Grad, Sch. of Fro. Sci., The Univ. of Tokyo)

【背景・目的】ステロール化合物はほとんどの生物に必須な物質であり、多くの生物種はコレステロールを要求する。哺乳類などのコレステロールの *de novo* 生合成経路では、最終中間体であるデスモステロールの 24 位の二重結合が還元されることでコレステロールが産生されるが、この還元反応は、24-dehydrocholesterol reductase (DHCR24)が担う。DHCR24 は、哺乳類や植物など、多くの生物種で認められる酵素である。一方で、コレステロールを生合成できない節足動物でも、植食性昆虫のように DHCR24 の相同遺伝子が染色体 DNA 上で認められる種がある。この植食性昆虫種における DHCR24 は、食餌から取り込んだ植物ステロールをコレステロールへの酵素的な変換経路の最終ステップで機能することが知られている。たとえば、鱗翅目昆虫のカイコ *Bombyx mori* やタバコスズメガ *Manduca sexta* には、DHCR24 様のタンパク質をコードした遺伝子が見出され、それらの幼虫の腸管に DHCR24 の酵素活性が認められる。そこで本研究では、カイコ *Bombyx mori* の DHCR24 の酵素活性を詳細に調べることを目的とし、カイコ幼虫の腸管由来の酵素液における DHCR24 活性の至適 pH および至適温度など酵素活性の反応条件に関する特性を検討した。

【方法・結果】摂食期のカイコ終齢幼虫の中腸をホモジナイズした粗抽出液を、遠心分離による分画法でミクロソームを含む画分を調製した。これを粗酵素液として、DHCR24 の酵素活性の反応条件を検討した。酵素活性は、重水素標識したデスモステロールを基質とし、反応後の重水素標識されたコレステロールを GC/MS にて検出することで測定した。先ず、補酵素の必要性を検討したところ、NADPH が反応に必須であることが明らかとなった。次に、至適 pH を検討するため、反応溶液を pH2、4、6、7、8、10 の 5 つの pH で酵素活性を測定した。その結果、pH6 から 8 の中性付近でのみ、DHCR24 活性が検出された。また、pH7 の反応溶液において、最も多く反応産物が検出された。つまり、カイコ DHCR24 は細胞質から小胞体の pH で触媒能が最大になると考えられ、DHCR24 が小胞体に局在することと矛盾しない。次に、反応の至適温度を検討した。4℃、10℃、25℃、37℃、50℃、70℃の温度条件で酵素活性を調べた。その結果、25℃から 50℃の温度条件で反応産物である重水素標識コレステロールが検出された。また、37℃の温度条件で最も多く反応産物が検出された。以上より、カイコ DHCR24 はヒトをはじめ哺乳類の DHCR24 で見られる至適反応条件とほぼ同様であることが示された。

Bombyx mori, DHCR24, Desmosterol

講演番号：4D2a15
講演日時：3 月 27 日 11:54～ 1 号館 D2 会場

カイコ幼虫におけるアラトトロピンと short neuropeptide F の拮抗的な摂食行動制御

Antagonistic effects of allatotoropin and short neuropeptide F on feeding behavior of the silkworm

○松本 澄洋、藤永 大輝、永田 晋治（東大院・新領域）
○Sumihiro MATSUMOTO, Daiki FUJINAGA, Shinji NAGATA (The Univ. of Tokyo)

【目的】

カイコ(*Bombyx mori*)幼虫は、一定環境下で飼育すると、およそ 2 時間の規則的な摂食周期が観察される。これまで我々は、この周期的な摂食行動の制御には、中枢神経系や末梢器官である腸管などから分泌される様々なペプチド性因子が関わることを明らかにしてきた。カイコ幼虫の中腸からは、摂食行動の始動を遅らせる生理活性ペプチドとして、アラトトロピン(AT)を精製単離し同定した。一方、昆虫の神経ペプチドとして知られる short neuropeptide F (sNPF)は、AT の生理活性とは逆の摂食行動の始動を惹起する活性を示す。これら 2 つのペプチドを混合してカイコ幼虫に投与すると、AT による摂食行動の始動遅延活性が減弱された。先行研究では、このような AT と sNPF の協働的な機能による拮抗的な作用機序は明らかにされていない。そこで、本研究では、カイコ幼虫の摂食行動における AT と sNPF の拮抗作用を、中腸での細胞内情報伝達経路に着目して検討することとした。

【方法・結果】

先ず、カイコ幼虫の中腸に AT および sNPF が発現していることを、RT-PCR および *in situ* hybridization により確認した。また、中腸粗抽出物を RP-HPLC に供した後に MALDI-TOF-MS で分析することで、AT および sNPF のペプチドレベルでの存在も確認した。次に、sNPF の細胞内情報伝達経路における細胞外シグナル制御キナーゼ(ERK)のリン酸化に対する、AT の混合による影響を検討した。すなわち、AT と sNPF の混合液をカイコ幼虫に投与後、脳や中枢神経系、中腸を対象に、抗 ERK 抗体および抗リン酸化 ERK (p-ERK)抗体を用いた Western blotting 法により ERK のリン酸化レベルを調べた。その結果、中腸では、sNPF のみの投与により p-ERK レベルが上昇したが、AT と sNPF の混合投与では、中腸での p-ERK レベルが減弱した。なお、AT 単独の投与だけでも p-ERK レベルが上昇したため、AT と sNPF の混合により細胞内情報伝達経路が拮抗的に阻害されることが示された。一方、脳や中枢神経系では、AT、sNPF、AT と sNPF の混合物の投与では p-ERK レベルは変化しなかった。以上の結果から、体液中に分泌された AT および sNPF により、中腸において ERK を経由した細胞内情報伝達経路を介して周期的な摂食行動が調節されていることが分かった。

Allatotropin, short neuropeptide F, feeding behavior

講演番号：4D3a02
講演日時：3 月 27 日 09:11～ 1 号館 D3 会場

細胞外 ATP 濃度の上昇によるヒト皮膚菲薄化への関与及びペパーミント葉抽出物の菲薄化抑制効果
Involvement of extracellular ATP concentration in human skin thinning and suppression of thinning by peppermint leaf extract

○藤田 幸子、坂元 孝太郎、ビスワス カザール ボロン、高山 悟、桝谷 晃明（一丸ファルコス株式会社）
○Yukiko Fujita, Kotaro Sakamoto, Kazal Boron Biswas, Satoru Takayama, Teruaki Masutani (ICHIMARU PHARCOS CO.,Ltd.)

【背景・目的】

皮膚の菲薄化は、加齢により表皮および真皮が薄くなる肌老化の代表的な現象の一つである。しかし、菲薄化はマトリックスメタロプロテアーゼ（MMPs）による細胞外マトリックスの分解亢進を特徴としているが、その詳細なメカニズムについては分かっていない。一方、老化した皮膚では細胞老化関連分泌現象（SASPs）因子の産生亢進が知られている。そこで我々は、老化による SASPs の産生亢進が菲薄化の増悪に関与していると考えた。しかし、菲薄化を抑制するために SASPs 因子の全てを直接的に抑制することは難しいため、SASPs を誘導する主要因子の一つとして、細胞外 ATP に着目をした。そこで本研究では細胞外 ATP 濃度の上昇による SASPs 因子の産生促進ならびに菲薄化への関与を評価した。さらに我々は、これまでに複数種の植物抽出物を用いて菲薄化抑制素材の探索を実施しており、本研究では加齢に伴う細胞外 ATP の上昇に対する植物抽出物の有効性についても検討を行なった。

【方法・結果・考察】

SASPs 因子による菲薄化の関与を評価するため、正常ヒト皮膚繊維芽細胞を用いて SASPs 因子（IL-1β、TNFα）による MMPs の産生能を評価した結果、顕著な産生亢進が認められた。次に、SASPs 因子と細胞外 ATP の関与を評価するため、正常ヒト表皮角化細胞を用いて ATP 添加による SASPs 因子（IL-1β、IL-6、IL-8）の産生能を評価した結果、顕著な産生増加が認められた。さらに、生理的老化による細胞外 ATP 濃度の上昇を評価するため、新生児由来と成人由来の正常ヒト表皮角化細胞における細胞外 ATP 濃度を比較した結果、成人由来の細胞で細胞外 ATP 濃度の顕著な上昇が認められた。そこで、生理的老化に伴う細胞外 ATP 上昇を抑制する植物抽出物の評価を実施した結果、ペパーミント（*Mentha x piperita* L.）葉抽出物に顕著な有効性が認められた。本研究に用いたペパーミント葉抽出物は含水有機溶媒で抽出を行なった後、カラムを用いて活性フラクションを取得した。ペパーミント葉抽出物の添加により、成人由来の細胞において細胞外 ATP 濃度が顕著に低下し、その濃度は新生児細胞と同等レベルであった。以上の結果からペパーミント葉抽出物は細胞外 ATP を介した SASPs 産生抑制による抗菲薄化素材としての効果が示唆された。現在、有効性が認められたペパーミント葉抽出画分中に含まれる成分を同定中である。さらに今後、ペパーミント葉抽出物の皮膚菲薄化抑制効果について *in vivo* での評価を検討している。

Skin, Anti-aging, Atp

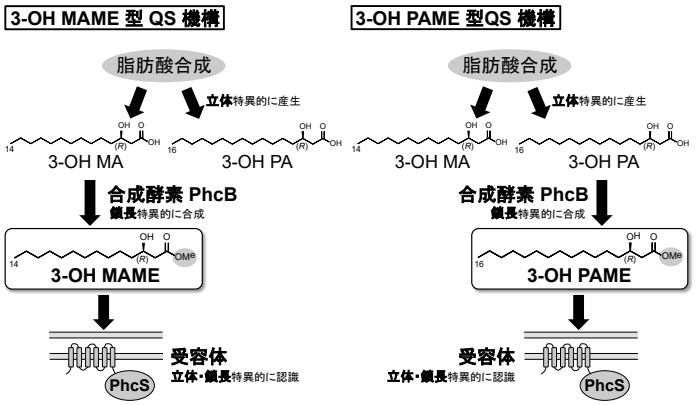
発表責任者：藤田　幸子（fujita-yukiko@ichimaru.co.jp）

講演番号：4D3a03
講演日時：3 月 27 日 09:22～ 1 号館 D3 会場

青枯病菌クオラムセンシングシグナル分子の合成と応答の特異性
Signal production and response specificity in quorum sensing of *Ralstonia solanacearum*

○甲斐 建次、氏田 夢斗（阪府大院・生命環境）
○Kenji KAI, Yumeto UJITA (Osaka Prefecture University)

【目的】青枯病菌は，クオラムセンシング（QS）シグナル分子として(*R*)-methyl 3-hydroxy-myristate（3-OH MAME）を産生する株と(*R*)-methyl 3-hydroxypalmitate（3-OH PAME）を産生する株に分けられる．どちらの分子を産生するかは，合成酵素である PhcB の基質特異性に依存していることが予想される．本研究では両株が持つ PhcB の基質特異性を比較することで，この仮説が正しいかどうかを検証する．加えて，3-OH MAME と 3-OH PAME に対する応答特異性（受容体 PhcS の特異性）についても，各種バイオアッセイと RNA-Seq による発現解析で評価した．



【方法・結果】PhcB は，3-OH MAME 産生型と 3-OH PAME 産生型の株由来の酵素を大腸菌で His タグ融合タンパクとして発現・精製した．基質として C12−C18 の 3-hydroxy fatty acid を用意し，PhcB 酵素アッセイに供した．その結果，3-OH MAME 型は C14 の 3-OH MA に，3-OH PAME 型は C16 の 3-OH PA に対して高い活性を示すことが判明した．一方，各 PhcB 酵素の基質の立体化学認識は曖昧であることが判明した．この結果は，青枯病菌が *R* 体の QS シグナル分子しか産生していない事実と矛盾していた. 青枯病菌が産生する 3-OH MA と 3-OH PA の立体を調べたところ，ほぼ *R* 体であること分かった．つまり、厳密な立体特異性が PhcB 酵素には必要でないことが明らかになった．次に，3-OH MAME を QS シグナル分子として利用する OE1-1 株の *phcB* 遺伝子欠損株（Δ*phcB*）に対して, 3-OH MAME あるいは 3-OH PAME を処理し，各種 QS 制御下にある病原力因子の誘導能を比較したところ，自身の QS シグナル分子である 3-OH MAME には強く応答するものの，3-OH PAME への応答能は明らかに弱いことが分かった．これは 3-OH PAME 株を産生する K60 株においても同様で，自身の QS シグナル分子に特異的に応答して，QS 機構を活性化した．RNA-Seq を用いた発現解析もこれらの結果を支持した.

以上の結果から，青枯病菌は基質供給と PhcB 酵素の特性を組み合わせることで QS シグナル分子を特異的に合成し, 自身の QS シグナル分子に対し特異的に応答していることが判明した. 本研究は，QS シグナル分子の立体特異的な生合成の詳細を明らかにした初めての例でもある.

quorum sensing, *Ralstonia solanacearum*, biosynthesis

発表責任者：甲斐建次（kai@biochem.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：4D3a04
講演日時：3 月 27 日 09:33～ 1 号館 D3 会場

殺虫性ペプチド LaIT1 の光親和性プローブの合成と活性評価

Synthesis of photoaffinity probes of the insecticidal toxin LaIT1 and evaluation of their activity

○田中 宏明、太田 喜之、宮下 正弘、中川 好秋、宮川 恒（京大院農）
○Hiroaki TANAKA, Yoshiyuki OHTA, Masahiro MIYASHITA, Yoshiaki NAKAGAWA, Hisashi MIYAGAWA (Kyoto Univ.)

【目的】
サソリ毒液には、殺虫活性を示すペプチドが多数含まれている。この中には昆虫特異的な作用を示すものも存在し、それらは新たな殺虫剤の開発に有用な情報を与えるものと期待されている。我々はこれまでに日本生息種のヤエヤマサソリ（*Liocheles australasiae*）の毒液から殺虫性ペプチド LaIT1 を同定している。LaIT1 の殺虫活性発現機構は不明であるが、これまでに報告されている殺虫性ペプチドとは異なる分子構造を持つため、未知の標的分子に作用している可能性がある。そこで本研究では、LaIT1 の標的分子の同定を目的として、これまでに行った LaIT1 の構造活性相関の知見をもとに LaIT1 の光親和性プローブを合成し、その生物活性評価を行った。さらに、この光親和性プローブを用いて特異的結合分子の検出を試みた。
【方法】
LaIT1 の光親和性プローブの合成は Fmoc 固相法を用いて行い、逆相 HPLC によって精製した。^{125}I による放射性同位体標識には iodogen 法を用いた。生物活性評価は、カイコ（*Bombyx mori*）を用いて行い、腹部に注射してから 2 日後の症状を判定した。特異的結合を示すタンパク質の検出には、カイコの中枢神経由来の膜タンパク質画分を用いた。
【結果および考察】
殺虫性ペプチド LaIT1 類縁体の活性と立体構造の関係から、活性発現に影響を与えないと考えられた 2 番目の Phe 残基を 4-azidophenylalanine に置換することで光親和性基を導入した。さらに、この類縁体の 8 番目の Tyr 残基に対して ^{125}I を導入した類縁体を合成した。また、16 番目の Lys 残基を *N*ε-biotinyllysine に置換した類縁体も合成した。これらの類縁体を殺虫活性試験に供した結果、いずれも野生型の 0.3～0.7 倍程度の活性を保持していたことから、これらの構造改変が活性に大きな影響を与えないことが分かった。続いて、^{125}I 標識した光親和性プローブをカイコ中枢神経由来の膜タンパク質画分に処理して紫外線照射し、これを SDS-PAGE によって分析したところ、特異的な結合を示すタンパク質が検出された。また、biotin 標識した光親和性プローブを同様に膜タンパク質画分に処理し、ストレプトアビジンビーズによる精製を行ったところ、同じ質量のタンパク質が検出された。

peptide, synthesis, evaluation of activity

発表責任者：宮下正弘（miyamasa@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4D3a05
講演日時：3 月 27 日 09:44～ 1 号館 D3 会場

シアノバクテリオクロムを基盤にした 6 種類の光変換を示す分子の創出
Creation of sextuple photoconvertible molecules based on a cyanobacteriochrome
○伏見 圭司[1]、長谷川 万純[2]、榎本 元[3]、ニーニー ウィン[4]、池内 昌彦[4]、成川 礼[1]([1]静大・理学、[2]東大・大気海洋研、[3]フライブルグ大、[4]東大院・総合)
○Keiji FUSHIMI[1], Masumi HASEGAWA[2], Gen ENOMOTO[3], Win Ni-Ni-[4], Masahiko IKEUCHI[4], Rei NARIKAWA[1] ([1]Shizuoka Univ., Science, [2]The Univ. of Tokyo, Atmosphere and Ocean, [3]Uni. Freiburg, [4]The Univ. of Tokyo, Art and Science)

【目的】光合成生物を始めとする様々な生物は「光受容体」と呼ばれる色素タンパク質を有する。光受容体が特定の光質（波長）や光量（強度）の光を吸収すると、その分子構造が可逆的に変化する。この「光変換」と呼ばれる分子機構により、生物は光を感知することができる。シアノバクテリアにのみ存在する「シアノバクテリオクロム（CBCR）」は、開環テトラピロール構造をもつビリン色素と結合し、光変換を示す。これまでに多種多様な CBCR が単離・同定され、その諸性質が解明されている。中でも、ビリン色素と安定的に共有結合を形成する第一の Cys 残基に加えて、光変換過程で可逆的に共有結合を形成する第二の Cys 残基を有するサブファミリーが豊富に存在する。また、第二の Cys 残基は結合したフィコシアノビリン（長波長吸収型色素、PCB）をフィコビオロビリン（短波長吸収型色素、PVB）に異性化する機能も持つ。これら二つの機能のどちらかを欠いたものも進化の過程で生じている。本研究では、進化の過程で第二の Cys 残基を失った *Acaryochloris marina* に由来する AM1_1499g1 に着目し、この分光的な解析と変異導入による吸収波長の改変を試みた。
【方法】AM1_1499g1 を色素産生大腸菌で発現・精製後、光化学的、生化学的な解析を行った。配列比較と分子構造情報を基に部位特異的変異導入を施し、同様の解析を行った。
【結果】AM1_1499g1 は PCB を結合し、橙色光と緑色光で光変換を示した。先行研究[1-3]との比較から、第二の Cys 残基を失いているため色素との可逆的な結合と異性化が起こらず、緑色光吸収型では色素の一部が高度に捩れることで吸収波長が短波長シフトしていることが示唆された。そこで、第二の Cys 残基を導入した結果、黄色光と青緑色光で光変換を示した。両吸収型の吸収波長が共に短波長シフトしていることから、導入した Cys 残基によって PVB への異性化のみが起きたことが示唆された[1-3]。次に、第二の Cys 残基が色素と可逆的に脱着する近縁分子[1-3]に特異的に保存されている Tyr 残基を導入した結果、青色光と青緑色光で光変換を示した。この結果から、青色光吸収型では導入した Cys 残基が色素と可逆的に脱着することで吸収波長が短波長シフトしていることが示唆された。さらに、先行研究を基に色素の高度な捩れを解消する Val 残基を各分子に導入した結果、それぞれ橙色光と黄色光、黄色光と緑色光、青色光と緑色光で光変換を示した。結果として、1 つの分子から段階的な変異導入を施すことで 6 種類の光変換分子の創出に成功した。以上の解析結果と分子構造の情報を照らし合わせ、各々の保存されたアミノ酸残基の作用機構を考察した。
1. Hasegawa, M. et al., *J. Biol. Chem.*, 2018.: **2, 3.** Rockwell, N. C. *et al.*, *Biochemistry*, 2012a and b.

Cyanobacteriochrome, Photoconversion, Protein engineering

講演番号：4D3a06
講演日時：3 月 27 日 10:05～ 1 号館 D3 会場

ケミカルライブラリーを用いた human ENaC 活性化剤のスクリーニング
Chemical library-aided screening of human ENaC activators

○笠原 洋一[1]、松田 龍星[1]、成川 真隆[1]、安岡 顕人[1]、森 直紀[1]、阿部 啓子[1,2]、三坂 巧[1]、朝倉 富子[1] ([1]東大院農生科 応生化、[2]神奈川県立産業技術総合研究所)
○Yoichi Kasahara[1], Ryusei Matsuda[1], Masataka Narukawa[1], Akihito Yasuoka[1], Naoki Mori[1], Keiko Abe[1,2], Takumi Misaka[1], Tomiko Asakura[1] ([1]Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Japan, [2]Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology (KISTEC), Japan)

【背景・目的】上皮性ナトリウムチャネル(ENaC)は、腎臓を含む多くの組織で Na^+の恒常性維持の中心的な役割を果たす。偽性低アルドステロン症 I 型をはじめとする human ENaC(hENaC) αβγ の変異による遺伝疾患が報告されており、hENaC αβγ 活性を調節する治療薬の開発は、疾病を緩和しうる可能性がある。本研究では、ケミカルライブラリーを用いて hENaC αβγ の活性化分子を同定し、その活性機構を解明することを目的とした。
【方法】ケミカルライブラリーは、東京大学薬学部創薬機構(DDI)が所有するライブラリーを用いた。効率的にスクリーニングを行うために以下の 2 段階のスクリーニングを行った。
・一次スクリーニング：hENaCαβγ の三量体を一過的に発現させた HEK293T 細胞に膜感受性色素（FLIPR Membrane Potential (Blue) Assay Kit, Molecular Device 製）を負荷した。サンプル添加によって hENaC を介した Na^+流入量が変化すると培養細胞の膜電位が変化する。この膜電位の変化を膜感受性色素による蛍光強度の変化として測定を行った。各サンプルの活性化能は、既知の hENaC 活性化剤である S3969 添加時の値との比率で評価した。
・二次スクリーニング：hENaCαβγ の三量体イオンチャネルを機能的に発現させた。二電極膜電位固定法を用いてサンプル添加によって細胞内に流入する Na^+の変化を電流値として測定した。
【結果】総計 6100 化合物から、11 の候補化合物を同定した。これらの化合物はインドール環またはベンゾチオフェン環を有するという共通性がみられた。更に選抜した 5 化合物を用いて、濃度依存性の評価と活性化サブユニットを hENaC αβγ のキメラ変異体を用いて推定した。結果、濃度依存性では、B-1001 が既知の活性化剤である S3969 を超える最大応答値を示した。活性化サブユニットの推定では、5 化合物すべてが β サブユニットの活性化に必須であり、A-1006 を除いて γ サブユニットの活性化にも関与した。
【謝辞】本研究の一部は、AMED 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業に支援により行った。

Kasahara et al. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* (2018)

ENaC (epithelial sodium), chemical library, sodium channel

発表責任者：朝倉富子（asakura@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4D3a07
講演日時：3 月 27 日 10:16～ 1 号館 D3 会場

Searching for Microbial Metabolites Active Against Plasmodium falciparum Dihydroorotate Dehydrogenase as Antimalarial Lead Compounds

○ Amila PRAMISANDI[1,2], Evita Chrysnayanti[2], Kesi Kurnia[2], Jun-ichi Hasegawa[3], Mari Hontoku[3], Kazuyuki Dobashi[4], Mihoko Mori[1,4], Daniel Ken Inaoka[5], Tomoyoshi Nozaki[6], Satoshi Omura[4], Kazuro Shiomi[1,4] ([1]Grad. School of Infection Control Sciences, Kitasato University, Japan, [2]Laboratory for Biotechnology, BPPT, Indonesia, [3]School of Science, Kitasato University, Japan, [4]Kitasato Institute for Life Sciences, Japan, [5]School of Tropical Medicine and Global Health, Nagasaki University, Japan, [6]Dept. of Biomedical Chemistry, Grad. School of Medicine, The University of Tokyo, Japan)

[Introduction] Malaria is one of the most prevalent parasite infection in the world. The emerging of resistant parasite to the existing drugs and the lack of diversity of antimalarial agents drive the need to develop drugs with specific mode of action. *Plasmodium falciparum* dihydroorotate dehydrogenase (*Pf*DHODH) is an attractive target for malaria chemotherapy, because this mitochondrial enzyme is essential in *de novo* pyrimidine biosynthesis pathway of the parasite. Since microbes are potential bioresource of various therapeutic metabolites, it is a worth to explore their productivity of antimalarial agents. This study aims to find microbial metabolites active against *Pf*DHODH, as antimalarial lead compounds.

[Method] *Pf*DHODH inhibitory activity was measured using recombinant *Pf*DHODH. Microbial extracts were prepared and their *Pf*DHODH inhibitory activity was measured in Indonesia. *Pf*DHODH inhibitors were purified by activity-guided fractionation using several column chromatography. The isolated compounds were analyzed using MS and NMR to determine their chemical structure. The activities against *Pf*DHODH and the *P. falciparum* cell culture were measured.

[Results and discussion] Fungal broth extracts, F15.3082 and F15.1158 showed *Pf*DHODH inhibitory activity. The producing strains were recultured in a 5 L scale using 500-ml Erlenmeyer flasks and the culture broth was centrifuged. Obtained supernatant and mycelia were extracted with 1-BuOH and MeOH, respectively. Each extract was purified using both silica gel column chromatography and Sephadex LH20 column chromatography. Two relative small molecules with molecular weights of 140 and 154 were obtained and clarified as gentisyl alcohol and gentisic acid, respectively. Gentisyl alcohol exhibited a dose dependent inhibition with an IC_{50} value of 11.4 μM against *Pf*DHODH. It has similar order of inhibition as a known mitochondrial enzyme inhibitor, 2-heptyl-4-hydroxyquinoline N-oxide (HQNO) which exhibited an IC_{50} value of 17.7 μM against *Pf*DHODH. On the other hand, gentisic acid exhibited no significant inhibition at the same order, it only inhibited 23% of the enzyme at 9.7 mM concentration. Two isolated compounds were tested to the *P. falciparum* 3D7 cell culture. Both compounds did not exhibit any suppressing activity against the cell growth.

gentisyl alcohol, Indonesian microbes, *Plasmodium falciparum* dihydroorotate dehydrogenase

発表責任者：Kazuro Shiomi（shiomi@lisci.kitasato-u.ac.jp）

講演番号：4D3a08
講演日時：3 月 27 日 10:27～ 1 号館 D3 会場

イネいもち病菌のネクトリアピロン類の生産誘導と生理機能解析

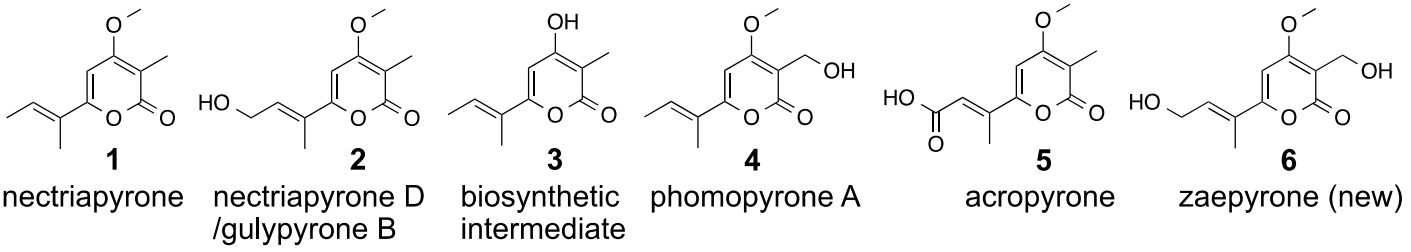
Nectriapyrones from the rice blast fungus: Induced production and analysis of physiological functions

○本山 高幸、野川 俊彦、長田 裕之 (理研 CSRS・ケミカルバイオロジー)
○Takayuki MOTOYAMA, Toshihiko NOGAWA, Hiroyuki OSADA (Chemical Biology, RIKEN CSRS)

【目的】イネいもち病菌 *Pyricularia oryzae*（syn. *Magnaporthe oryzae*）のゲノム中には約 50 個の二次代謝遺伝子クラスターがあるが、生産物が報告されているのはメラニン、テヌアゾン酸、及びピリクロール類のみであった。我々は、二成分情報伝達系を撹乱することにより nectriapyrone（1）及び水酸化類縁体である nectriapyrone D/gulypyrone B（2）の生産誘導を引き起こし、生合成遺伝子クラスターを同定することに成功した。1 は、エンドファイト（植物内生菌）や植物病原菌を主とした様々な糸状菌が生産する化合物として知られるが、その生理作用は不明である。今回、nectriapyrone 類の生理機能を明らかにするため、生合成遺伝子の破壊株と大量発現株を用いた解析を行った。

【方法と結果】nectriapyrone 類の生合成遺伝子クラスターは *NEC1*（polyketide synthase をコード）と *NEC2*（*O*-methyltransferase をコード）からなる。*NEC1* の大量発現株では生合成中間体 **3** が蓄積し、*NEC1* と *NEC2* の大量発現株では **1**-**6** の大量生産が認められた。**4**-**6** を精製し、質量分析及び NMR により構造決定したところ、**4** と **5** は既知の類縁化合物であり、**6** は新規化合物（zaepyrone）であることが明らかになった。**2** 及び **4**-**6** の生合成に関与する酸化酵素は遺伝子クラスター内には存在しなかった。Δ*nec1* 株のイネへの病原性を評価したが、病斑数の低下は認められず、nectriapyrone 類は感染には必要とされないことが示唆された。一方、nectriapyrone 類の構造は放線菌（*Streptomyces* spp.）が生産する自己生育阻害物質 germicidin 類と構造が類似している。*Streptomyces* spp. に対する活性を評価したところ、*NEC1* と *NEC2* の大量発現株は、*Streptomyces griseus* に対して生育阻害活性と色素生産阻害活性を示した。本阻害活性について **1**-**6** の関与を評価したところ、**1** が活性を示した。**1** が微生物間相互作用に関与し、**2** 及び **4**-**6** は不活性化された化合物であることが示唆された。

なお、本研究は農研機構生研支援センター「イノベーション創出強化研究推進事業」の支援を受けて行った。



Secondary metabolism, Symbiosis, Plant pathogen

講演番号：4D3a09
講演日時：3 月 27 日 10:38～ 1 号館 D3 会場

Pyricularia oryzae における pyriculol 類生合成に関わる NADPH-dependent aldo/keto reductase (PYR7) の研究

Analysis of NADPH-dependent aldo/keto reductase (PYR7) involved in the biosynthesis of pyriculols by *Pyricularia oryzae*

○古山 祐貴[1,2]、本山 高幸[1]、野川 俊彦[1]、清田 洋正[3]、鎌倉 高志[2]、長田 裕之[1] ([1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー、[2]東理大院理工・応生、[3]岡山大院・環境生命)
○Yuki FURUYAMA[1,2], Takayuki MOTOYAMA[1], Toshihiko NOGAWA[1], Hiromasa KIYOTA[3], Takashi KAMAKURA[2], Hiroyuki OSADA[1] ([1]Chem. Biol., RIKEN CSRS, [2]Tokyo Univ. of Science, Applied Bioscience, [3]Okayama Univ.)

【背景と目的】

Pyriculol はイネいもち病菌 *Pyricularia oryzae* が生産するポリケチド化合物である。Pyriculol (**1**) はイネの葉に壊死斑形成を誘導することから病原性との関連が示唆されてきたが、自然界における生理機能は不明である。また、本菌は複数の pyriculol 類縁体 (Fig. 2, **2-4**) を生産することが報告されているが、これら類縁体の生合成機構も不明である。我々はこれまで pyriculol 類生合成機構および pyriculol 類の生物学的役割を明らかにするために生合成遺伝子の解析を行ってきた。昨年度までの大会において、pyriculol 類生合成遺伝子クラスター (Fig. 1) 中の FAD-dependent monooxygenase 遺伝子である *MGG_15114* (*PYR6*) および aldo/keto reductase 遺伝子である *MGG_16813* (*PYR7*) の破壊株では WT 株と比較して生産される類縁体が変化したことを報告した。今回は生合成経路においてこれら 2 つの遺伝子がどのような反応に関与しているのかを明らかにすることを目的に *in vitro* での解析を行ったので報告する。

【方法と結果】

これまでの研究結果から、中間体 (**5**) が PYR7 により変換されることが推定されたため、その検証を行った。PYR7 タンパク質は小麦胚芽無細胞発現系を用いることで取得した。取得した PYR7 を **5** と混合して反応させた結果、**5** の減少が確認された。NADPH を添加し同様の反応を行ったところ完全に **5** が消失し **6** が生産されることが確認された。このことから、PYR7 が NADPH-dependent aldo/keto reductase であることが示された (Fig. 2)。また、Δ*pyr6* 株において **6** の蓄積が認められたことから、**6** が PYR6 の基質であることが推定された (Fig. 2)。現在、PYR6 タンパク質を取得し、**6** が PYR6 の基質となり得るか *in vitro* での解析を行っている。

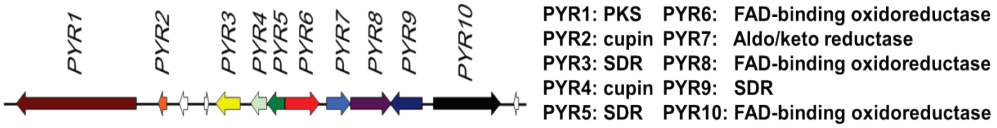


Fig. 1 Pyriculol 類生合成遺伝子クラスター

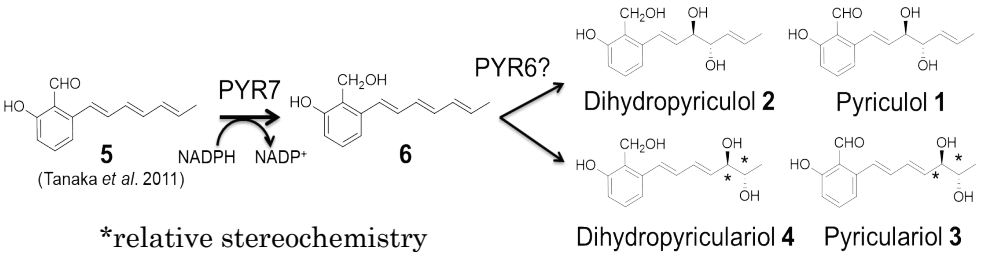


Fig. 2 PYR6 および PYR7 の pyriculol 類生合成における推定機能

Pyricularia oryzae, Secondary metabolism, Polyketide

講演番号：4D3a10
講演日時：3 月 27 日 10:49～ 1 号館 D3 会場

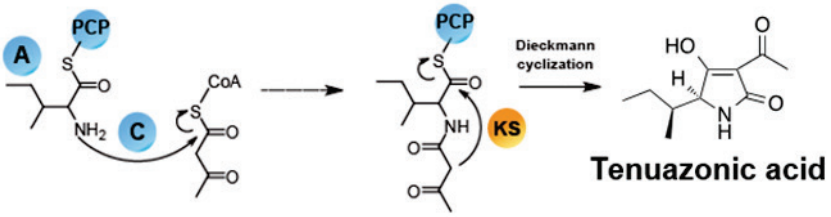
環化反応を触媒する新規ケトシンターゼドメインの X 線結晶構造解析

Crystallization analysis of cyclization reaction conducting novel ketosynthase domain

○尹 忠銖[1]、西本 一希[2]、本山 高幸[1]、日野 智也[2]、永野 真吾[2]、長田 裕之[1] ([1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー、[2]鳥取大院・工・化学生物)

○ChoongSoo YUN[1], Kazuki NISHIMOTO[2], Takayuki MOTOYAMA[1], Tomoya HINO[2], Shingo NAGANO[2], Hiroyuki OSADA[1] ([1]Chem. Biol., RIKEN CSRS, [2]Grad. School of Eng., Tottori Univ.)

【背景及び目的】テヌアゾン酸は *Pyricularia oryzae*（イネいもち病菌）や *Alternaria* sp.などの植物病原性糸状菌が生産するかび毒の一種である。我々は以前の大会で今まで不明であったテヌアゾン酸の生合成遺伝子 (*TAS1*) を *P. oryzae* より初めて同定し、テヌアゾン酸の生合成及び制御機構について報告した[1,2]。TAS1 は糸状菌では初めて見出した NRPS-PKS hybrid 酵素であり、PKS 部分はケトシンターゼ (KS) ドメインのみで構成されている。この KS ドメインはアミノ酸を含むイソロイシン・ジケチドを基質とする KS であり、基質伸長反応は触媒せずに環化反応のみを触媒する新規の酵素である。今回、その反応メカニズムを明らかにするため KS ドメインの立体構造解析を行った。



【方法と結果】TAS1 の KS ドメインタンパク質を大腸菌を宿主として取得し、X 線結晶構造解析法により 1.80Å の分解能で立体構造を決定した。決定した全体的構造は type I PKS の KS と類似しているが基質ポケットの構造が大きく異なっている。一般的 type I PKS の KS は α-helix が基質ポケットの上部を覆うように存在しているが TAS1 の KS にはこの α-helix がないため基質ポケットが大きく広がっている。この構造は他のアミノ酸を含む基質をロードする oxazolomycin 生合成酵素 (OzmQ) の KS でも報告されている。現在までに PKS の KS は二量体として機能していることが報告されているがゲルろ過の結果から TAS1 の KS は溶液中で単量体として存在することが示唆された。TAS1 KS ドメインの活性残基として予測された Cys203, His346, Asn400 及び Type1 KS ドメインとは異なる特異的残基である Ser348, Glu402 の変異体解析と基質であるイソロイシン・ジケチドをリガンドとしたドッキングシミュレーションの結果からリガンド結合部位の近傍に存在する His346 がプロトンを引き抜くことで環化反応が誘起されると推定している。

本研究の一部は，科研費及び農研機構生研支援センター「イノベーション創出強化研究推進事業による支援を受けた。

1) CS Yun, T Motoyama & H. Osada. 2015. *Nature communications* 6:8758.

2) CS Yun, T Motoyama & H. Osada. 2017. *ACS Chemical Biology* 12:2270

tenuazonic acid, ketosynthase, crystallization

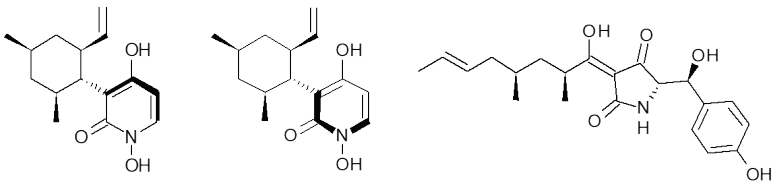
講演番号：4D3a11
講演日時：3 月 27 日 11:10～ 1 号館 D3 会場

Tolypocladium album において NPD938 によって生産誘導される pyridoxatin と F14329 の生合成と生産制御の解析

Analysis of biosynthesis and production regulation of pyridoxatin and F14329 which are induced by NPD938 in *Tolypocladium album*

○石井 友彬[1,2]、本山 高幸[1]、野川 俊彦[1]、鎌倉 高志[2]、長田 裕之[1]（[1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー、[2]東理大院理工・応生）
○Tomoaki ISHII[1,2], Takayuki MOTOYAMA[1], Toshihiko NOGAWA[1], Takashi KAMAKURA[2], Hiroyuki OSADA[1] ([1]Chem. Biol. , RIKEN CSRS, [2]Tokyo Univ. of Sci.)

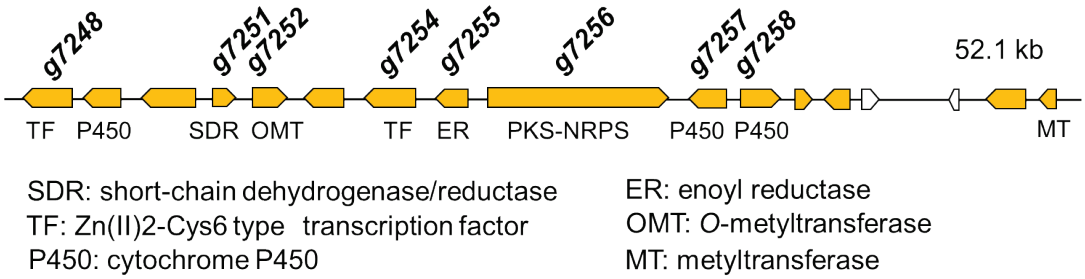
【目的】昨年度の大会において、糸状菌の二次代謝を制御する低分子化合物 NPD938 について以下のことを報告した。1）イネいもち病菌（*Pyricularia oryzae*）では、テヌアゾン酸の生産を誘導するとともにメラニンの生産を抑制した。2）糸状菌 *Tolypocladium album* では、テルペンドール類および、pyridoxatin（**1**, **2**）と F14329（**3**）の生産を誘導した。本発表では、NPD938 添加時に発現量が増加した PKS-NRPS（polyketide synthase-Nonribosomal peptide synthetase hybrid enzyme）がどのように **1**-**3** の生合成に関わっているのか解析を行ったので報告する。



(P/M)-pyridoxatin (**1**, **2**)　　F14329 (**3**)

【方法と結果】NPD938 によって、生合成遺伝子クラスターに含まれる 15 個の遺伝子の発現量が増加していた。まず、これら 15 個の遺伝子の機能と相同性から、各遺伝子が、推定生合成モデル（Du et al., 2014）のどの反応を触媒するのか予測した。その結果、15 個の内 6 個の遺伝子（*g7251*, *g7252*, *g7255*, *g7256*, *g7257*, *g7258*）が触媒する反応を予測することができた。その内の 1 個の遺伝子（*g7252*）の破壊株は、**1**, **2** を生産できなくなり、中間代謝物とみられる化合物が検出された。このことから、*g7252* は生合成に関与していることが示唆された。15 個の遺伝子の内、Zn(II)2-Cys6 型転写因子をコードすると予想される遺伝子が 2 個含まれていた（*g7248*, *g7254*）。*g7248* の遺伝子破壊株は NPD938 を添加しなくても **1**-**3** の生産が誘導されるようになるだけでなく、**1**-**3** の生産量が大幅に増加していた。一方で、*g7254* の破壊株は NPD938 を添加しても **1**-**3** の生産が誘導されなくなっていた。このことから、NPD938 による二次代謝制御に、Zn(II)2-Cys6 型転写因子が関与している可能性が示唆された。

なお、本研究は農研機構生研支援センター「イノベーション創出強化推進事業」の支援を受けて行った。



Tolypocladium album, Secondary metabolite, Pyridoxatin

講演番号：4D3a12
講演日時：3 月 27 日 11:21～ 1 号館 D3 会場

タンパク質合成阻害剤による糸状菌への二次代謝産物生産の誘導
Protein synthesis inhibitors activate secondary metabolism in fungi
○加藤 翔[1,2]、本山 高幸[1]、二村 友史[1]、浦本 昌和[1]、長田 裕之[1,2] ([1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー、[2]埼玉大学)
○Sho Kato[1,2], Takayuki Motoyama[1], Yushi Futamura[1], Masakazu Uramoto[1], Hiroyuki Osada[1,2] ([1]Chemical biology, RIKEN CSRS, [2]Saitama University)

【背景と目的】
微生物はゲノム中に多くの二次代謝関連遺伝子を有していることが明らかとなってきたが、実験室環境下では利用できる遺伝子は少なく、新たな手法による未利用の遺伝子の活性化やそのメカニズムの解析が今なお望まれている。我々は真菌 *Fusarium* sp. RK97-94 株が生産するルシラクタエンの生合成研究において、ハイグロマイシン B 耐性をマーカーとして遺伝子破壊株のセレクションを行っていた。その際、ハイグロマイシン B 添加による *Fusarium* sp. RK97-94 株のルシラクタエンの増産や赤色色素生産といった、二次代謝の誘導を見出した。本研究では *Fusarium* sp. RK97-94 株においてハイグロマイシン B が生産誘導する二次代謝産物の同定と、ハイグロマイシン B 以外のタンパク質合成阻害剤に同様の活性があるか明らかにすることを目的とした。
【結果】
本菌をハイグロマイシン B 添加した培地で培養し、代謝物を分離精製した。赤色色素は *Fusarium* 属が生産する二次代謝産物 fusarubin であることを MS と NMR 解析により同定した。次に RNA-seq による遺伝子発現解析の結果より、推定 fusarubin 生合成遺伝子クラスターの発現がハイグロマイシン B 処理により上昇していることから、転写レベルでの誘導が起きていることが示唆された。更にいくつかの培養条件を検討したところ、ルシラクタエンと fusarubin 以外に 4 つの代謝物の生産が誘導されていることが、UPLC/MS 分析を用いた代謝物の解析により示唆された。そのうち二つは *Fusarium* 属の生産する二次代謝産物であり、HMG-CoA 合成酵素阻害活性を有する 1233A とその類縁体であることが、MS と NMR による構造解析の結果明らかとなった。この現象の更なる理解のために、タンパク質合成阻害剤を 2 種類(ブラストサイジン S、G418)添加したところ、ハイグロマイシン B 処理の場合と同様の生産誘導が観察された。この結果から、タンパク質合成阻害剤による二次代謝の誘導が強く示唆された。以上の結果より、ハイグロマイシン B は fusarubin や 1233A など複数の二次代謝産物の生産を誘導すること、および二次代謝誘導はタンパク質合成阻害に共通して起きる現象であることが示唆された。
なお、本研究は農研機構生研支援センター「イノベーション創出強化研究推進事業」の支援を受けて行った。

chemical biology, secondary metabolism, biosynthesis

講演番号：4D3a13
講演日時：3 月 27 日 11:32～ 1 号館 D3 会場

リベロマイシン生合成に関わるサクシニル化酵素群の相互作用解析

Interaction analysis of succinylation enzymes involved in reveromycin biosynthesis

○鬼頭 奈央子[1]、佐藤 裕美[1]、奥村 英夫[2]、熊坂 崇[2]、長田 裕之[3]、高橋 俊二[1] ([1]理研 CSRS・天然物生合成、[2]高輝度光科学研究センター、[3]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー)
○Naoko KITO[1], Yumi SATO[1], Hideo OKUMURA[2], Takashi Kumasaka[2], Hiroyuki OSADA[3], Shunji TAKAHASHI[1] ([1]Nat. Prod. Biosynth., RIKEN CSRS, [2]JASRI, [3]Chem. Biol., RIKEN CSRS)

【目的】Reveromycin A (RM-A)は、破骨細胞選択的に低濃度でアポトーシスを誘導する活性を有する。RM-A 生合成の最終過程には、強い生物活性の付与に重要である 3 級水酸基のサクシニル化反応が存在する。有機合成反応では、1.5 Gpa を必要とする困難な反応であるが、RM 生産菌は酵素を用いて効率的に生合成することが出来る。これまでに、遺伝子破壊株の代謝産物解析から、RevK、RevL、RevM による酵素反応を明らかにしている。また、生化学解析によって、RevL はフマル酸と ATP から fumaroyl-AMP を生成すること、RevM は fumaroyl-AMP の還元反応に関わること、RevK は RM-T1 へのサクシニル基転移に関わることを明らかにしている。さらに、非常に不安定な酵素反応中間体は RevL 上に保持されていることから、効率的な還元と転移反応を可能にする分子機構の存在が予想される。そこで、本研究では、各酵素間の相互作用を解析することによって、複合酵素反応の全貌を解明することを目的とした。
【方法および結果】これまでに、Biacore を用いた表面プラズモン共鳴（SPR）による RevL-RevM 相互作用解析の結果、NADH の存在に関わらず結合することを明らかにしている。RevL は CM5 の Chip 上にアミンカップリングで固定化することが可能である。固定化した RevL を用いて、RevL-RevK 相互作用解析を行った結果、RevK に RM-T1 を添加した場合に RevL に対する親和性が向上することを見出した。また、RevM と RevK は各種 Chip 上に安定的に固定化することが困難であるために、Biacore システムでは RevM-RevK 相互作用解析が実現できなかった。そこで、固定化を必要としない Microscale Thermophoresis (MST) 解析を行ったところ、結合親和性を確認することに成功し、解離定数 K_D は 3.1nM であった。以上の成果と生化学解析の結果を総合し、三級水酸基のサクシニル化反応に関わる酵素分子の反応順序及び挙動を推定した結果について報告する。

Reveromycin A, Interaction analysis, Biosynthesis

講演番号：4D3a14
講演日時：3 月 27 日 11:43～ 1 号館 D3 会場

リベロマイシン生合成に関わる RevK の結晶構造解析
Crystal structure of RevK involved in reveromycin biosynthesis
○奥村 英夫[1]、鬼頭 奈央子[2]、佐藤 裕美[2]、熊坂 崇[1]、長田 裕之[3]、高橋 俊二[2] ([1]高輝度光科学研究センター、[2]理研 CSRS・天然物生合成、[3]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー)
○Hideo OKUMURA[1], Naoko KITO[2], Yumi SATO[2], Takashi KUMASAKA[1], Hiroyuki OSADA[3], Shunji TAKAHASHI[2] ([1]JASRI, [2]Nat. Prod. Biosynth., RIKEN CSRS, [3]Chem. Biol., RIKEN CSRS)

【目的】生合成中間産物である RM-T1 から RM-A を生成する反応は、有機合成困難なサクシニル化反応であるが、RM-A 生産菌は RevL、RevM、RevK の 3 つの酵素を用いて容易に反応を行うことが出来る。本研究では、推定中間産物である succinyl-AMP から RM-T1 へのサクシニル基の転移を行う鍵酵素 RevK に着目し、その反応機構を共結晶構造から解明することを目的とする。
【方法および結果】RevK の構造は X 線結晶構造解析法で決定した。大腸菌 BL21 (DE3) star に pET28b-His8-revK を導入した。形質転換体を LB 培地で前培養後、TB 培地中で O.D. 600 nm が 0.5 になるまで培養し、0.5 mM IPTG を添加し 37℃、6 時間発現誘導を行った。その後、大腸菌を回収し、超音波処理により破砕・抽出後、遠心分離上清を Ni-NTA カラムに添着し精製を行った。引き続き、MonoQ カラム精製を行い、主ピークを回収した。精製 RevK と、RM-A の前駆体である RM-T1 を 1:1 で混合した溶液を使用し結晶化スクリーニングを行ったところ、PEG を沈殿剤とした条件で結晶が得られ、条件最適化を行った。引き続き、放射光施設 SPring-8 BL41XU にて回折測定を行い、1.2 Å 分解能の回折データを収集した。本結晶は空間群 $P2_12_12$ に属し、格子定数 a = 75 Å, b = 95 Å, c = 43 Å を有していた。位相決定は Streptococcus 由来 malonyl-CoA-acyl carrier protein をモデル分子とした分子置換法にて行った。構造構築と精密化を進めた結果、RevK と基質である RM-T1 の複合体構造が得られた。RevK の全体構造としては、小ドメインと大ドメインで構成される malonyl-CoA-acyl carrier protein transacylase に類似する構造をしており、αヘリックス、βシートおよびαヘリックスからなる 3 層サンドイッチ構造を有していた。複合体結晶構造中では、基質である RM-T1 が結合しており、RM-T1 の反応水酸基と His 199 が相互作用することが示唆された。また、もう一つの基質であるサクシニル化した AMP とのドッキングシミュレーションから得られた触媒アミノ酸残基について推測した。一方、RevK における RM-T1 と malonyl-CoA-acyl carrier protein transacylase における malonyl-CoA では、その結合様式がそれぞれ異なっていることが明らかとなった。

Natural product biosynthesis, succinylation of tertiary alcohol, X-ray crystallography

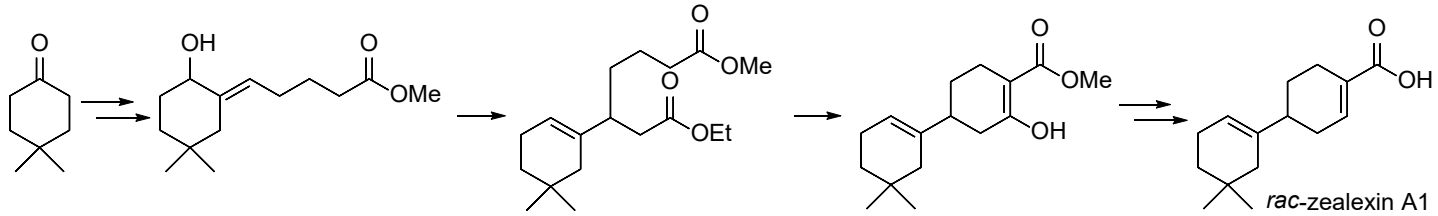
発表責任者：奥村英夫（okumrah@spring8.or.jp）

講演番号：4D4a01
講演日時：3 月 27 日 09:00～ 1 号館 D4 会場

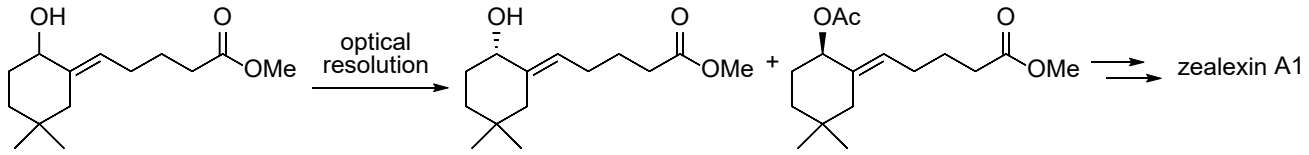
Zealexin A1 の合成研究
Synthetic studies of zealexin A1
○志村 美夏帆[1]、矢島 新[2]、勝田 亮[2]、石神 健[2]、額田 恭郎[2] ([1]東農大院・農、[2]東農大・生命)
○Mikaho SHIMURA[1], Arata YAJIMA[2], Ryo KATSUTA[2], Ken ISHIGAMI[2], Tomoo NUKADA[2] ([1]Graduate School of Agriculture, Tokyo Univ. of Agriculture, [2]Department of Chemistry for Life Science and Agriculture, Tokyo Univ. of Agriculture)

【背景・目的】Zealexin 類はトウモロコシ *Zea mays* より単離されたファイトアレキシンであり、赤カビ病菌 *Fusarium graminearum* などに対する抗菌活性を持つことが報告されている[1)]。Zealexin A1 の両鏡像体を合成出来れば今後構造活性相関へと展開できる可能性もある。よって我々は、植物の病害防除へ利用できる可能性をもつ zealexin A1 の光学活性体の合成法を開発することを研究の目的とした。

【結果】既知のケトンより誘導したアリルアルコールに対し、Johnson-Claisen 転位と続く Dieckmann 縮合により zealexin A1 の骨格構造を構築した。続く 2 工程の官能基変換の後、最後にメチルエステルを加水分解し、全 8 工程で zealexin A1 のラセミ体の合成を達成した(Scheme 1)。また合成中間体であるアルコールを光学分割し、両鏡像体を最高 96% e.e.で得た(Scheme 2)。現在は光学活性な中間体を用い、zealexin A1 の光学活性体を合成するべく研究を進めている。



Scheme 1. Zealexin A1 ラセミ体の合成



Scheme 2. 光学活性体の合成

1) Huffaker, A.; Kaplan, F.; Vaughan, M. M.; Dafoe, N. J.; Ni, X.; Rocca, J. R.; Alborn, H. T.; Teal, P. E. A.; Schmelz, E. A. *Plant Physiol.* **2011**, *156*, 2082-2097.

Zea mays, phytoalexin, sesquiterpene

講演番号：4D4a02
講演日時：3 月 27 日 09:11～ 1 号館 D4 会場

Fischerellin 類の合成研究

Synthetic studies of fischerellins

○白川 和泉[1]、矢島 新[2]、勝田 亮[2]、石神 健[2]、額田 恭郎[2] ([1]東農大院農、[2]東農大生命)
○Izumi SHIRAKAWA[1], Arata YAJIMA[2], Ryo KATSUTA[2], Ken ISHIGAMI[2], Tomoo NUKADA[2] ([1]Graduate School of Agriculture, Tokyo Univ. of Agric., [2]Department of Chemistry for Life Scieces and Agriculture, Tokyo Univ. of Agric.)

【背景・目的】光化学系Ⅱの阻害活性を有する fischerellin A (**1**)は、シアノバクテリアの一種である *Fischerella muscicola* より単離されたテトラミン酸誘導体であり、他に類を見ないテトラミン酸とピロリジン環が二重結合で連結した二環性骨格を有している(Figure 1)[1)]。また、*F. muscicola* からは同時に類縁体である fischerellin B (**2**) が単離されている。我々は fischerellin 類のユニークな構造に着目し、合成研究を行うこととした。

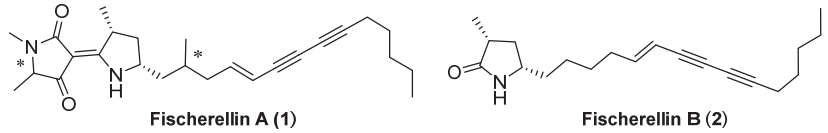
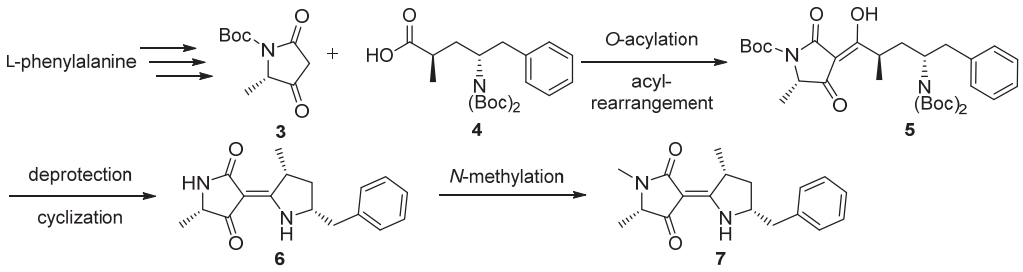
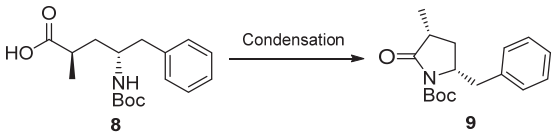


Figure 1. Fischerellin A (**1**)及び B (**2**)の構造

【結果】まずモデル化合物を用いて骨格構築法を確立することとした。既知のテトラミン酸 **3**[2)]と L-フェニルアラニンより立体選択的に合成したカルボン酸 **4** の縮合と、連続するアシル転位により環化前駆体 **5** を得た[2)3)]。続いて **5** をトリフルオロ酢酸を用いて脱保護すると、同時に環化が進行し、目的とする二環性テトラミン酸構造を構築することが出来た。最後に環化体 **6** を位置選択的にメチル化することによりモデル化合物 **7** の合成を達成した(Scheme 1)。また、カルボン酸 **8** の分子内縮合により fischerellin B 型の骨格の構築に成功しており、現在は fischerellin B の合成も試みている(Scheme 2)。



Scheme 1. Fischerellin A のモデル化合物の合成



Scheme 2. Fischerellin B 型骨格の構築

1) Hagmann, L.; Juttner, F., *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 6539-6542. 2) Tanaka, A.; Usuki, T. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 5036-5038. 3) Yajima, A.; Kawajiri, A.; Mori, A.; Katsuta, R.; Nukada, T. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 4350-4354.

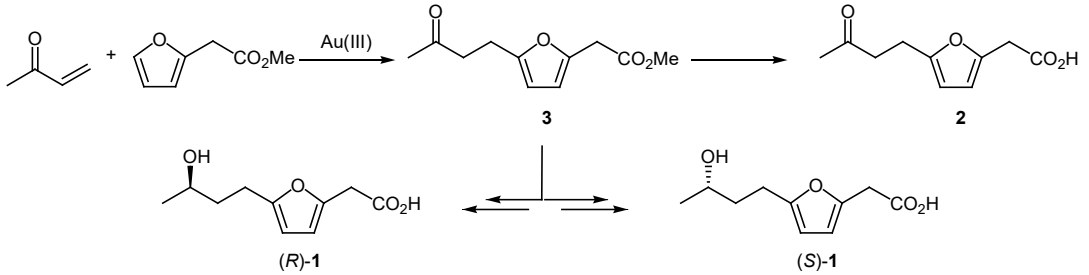
Syntesis, tetramic acid, fischerellin

講演番号：4D4a03
講演日時：3 月 27 日 09:22～ 1 号館 D4 会場

Cordyceps 属菌が産生するフラン誘導体の合成
Synthesis of *Cordyceps* derived furyl compounds
○勝田 亮[1]、神田 拓磨[2]、矢島 新[1]、石神 健[1]、額田 恭郎[1] ([1]東農大・生命、[2]東農大・応生)
○Ryo KATSUTA[1], Takuma KANDA[2], Arata YAJIMA[1], Ken ISHIGAMI[1], Tomoo NUKADA[1] ([1]Dept. of Chem. for Life Sci. and Agric., Faculty of Life Sci., Tokyo Univ. of Agric., [2]Faculty of Appl. Biosci., Tokyo Univ. of Agric.)

サナギタケ(*Cordyceps millitaris*)はチョウ目昆虫に寄生して幼虫やサナギなどの体表から子実体を形成する昆虫病害糸状菌である。一方で本菌からなる虫草は滋養強壮などに効能を示す漢方薬として利用されることから、代謝産物について多くの研究が行われてきた。本菌からは抗がん、抗菌作用を有する cordycepin のほか、抗脂質異常症作用を示す 4-(3-hydroxybutyl)furan-2-yl acetic acid (**1**)が単離された。また *C. millitaris* と *C. cicadas* からなる雑種細胞からは 4-(3-oxobutyl)furan-2-yl acetic acid (**2**)の産生が報告されている。下図に示す通り化合物 **1** はフランの 1,4-位に置換基を有する構造的特徴を有するが、2 級アルコール部分の立体化学は未決定であった。演者らは本会 2015 年度大会において *Beauveria bassiana* 由来の化合物 **1** が *S* 配置と予想されることを報告した。この際化合物 **1** を 10 員環ラクトン decarestrictine G を合成する際の副産物として得ていたことから、合成法としては改良の余地があり、立体配置についても詳細な検証が必要であった。以上のことから本研究では 4-(3-hydroxybutyl)furan-2-yl acetic acid (**1**)の両鏡像異性体の改良合成法の開発並びに類縁化合物 **2** の合成を行った。

以下に合成の概略を示す。メチルビニルケトンに対して金(III)触媒存在下 2-フリル酢酸メチルを付加させて化合物 **3** を合成した。化合物 **3** のエステル部分をけん化することにより、4-(3-oxobutyl)furan-2-yl acetic acid (**2**)を 2 段階で合成することに成功した。一方、**3** のカルボニル基の還元後、リパーゼによる光学分割を用いて高い鏡像体過剰率でアルコールおよびアセタートを合成した。これらをそれぞれ加水分解することにより 4-(3-hydroxybutyl)furan-2-yl acetic acid (**1**)の両鏡像体を合成することに成功した。合成品と天然物との比旋光度の比較により *Beauveria bassiana* 由来の化合物 **1** が *S* 配置であることを確定したので報告する。



furan, Cordyceps, Synthesis

発表責任者：勝田　亮（r3katsut@nodai.ac.jp）

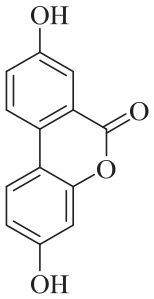
講演番号：4D4a04
講演日時：3 月 27 日 09:33～ 1 号館 D4 会場

フラン類の Diels-Alder 反応を用いたウロリチン A 誘導体の合成研究
Synthesis of Urolithin A derivatives via Diels-Alder reaction of furans

○高橋 広光[1]、園田 素啓[1]、本多 有佳里[1]、池田 安裕[1]、谷森 紳治[1]、川口 真一[2] ([1]阪府大院生命環境、[2]佐賀大農)
○ Hiroaki TAKAHASHI[1], Motohiro SONODA[1], Yukari HONDA[1], Ayu IKEDA[1], Shinji TANIMORI[1], Shin-ichi KAWAGUCHI[2] ([1]Osaka Pref. Univ., [2]Saga Univ.)

【背景・目的】

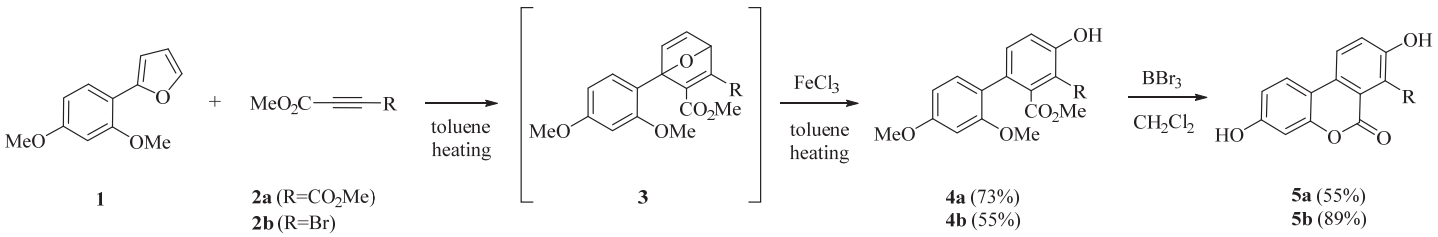
ウロリチンは、ザクロやレッドラズベリーなどのベリー類、クコやクルミなどナッツ類に多く含まれているエラグタンニンの腸内代謝産物であり、ジベンゾ−α−ピロンを母核とするポリフェノールである。最近、その中のウロリチン A がマイトファジーを誘導し線虫の寿命を延ばす効果のあることが報告され、抗老化物質として注目を浴びており、化粧品や機能性食品、医薬品などへの利用が期待されている。一方、当研究室ではフラン類とアルキンとの Diels–Alder 反応とそれに続く開環芳香族化により、水酸基を含めた異なる官能基を有する多置換ベンゼン誘導体のワンポット合成を報告している[1,2]。そこで本研究では、フェニルフラン類を出発物質に用いて多置換ビフェニルを合成し、そこからの分子内環化によるウロリチン A 誘導体の簡便な合成法の開発を目的とした。



Urolithin A

【方法・結果】

2−ブロモフランと 2,4−ジメトキシフェニルボロン酸との鈴木ー宮浦カップリングにより合成したフェニルフラン **1** を出発物質に用いて、トルエン溶媒中、アセチレンジカルボン酸ジメチル(**2a**)との Diels–Alder 反応を行った。付加体 **3** の生成を確認した後、触媒量の塩化鉄を加えることによって開環芳香族化が進行し、ビフェニル体 **4a**（収率 73%）をワンポットで得た。続いて、**4a** に三臭化ホウ素を作用させたところ、脱メチル化とラクトン化が起こり、ウロリチン A 誘導体 **5a**（収率 55%）を得ることに成功した。同様に、3−ブロモプロピオール酸メチル(**2b**)を基質に用いた場合、ウロリチン A 誘導体 **5b** が全収率 49%で得られた。また、メトキシ基の置換位置の異なるフェニルフラン類を基質に用いることにより、ウロリチン A 類縁体の合成についても検討した。



1　**2a** (R=CO_2Me)　**2b** (R=Br)　**3**　**4a** (73%)　**4b** (55%)　**5a** (55%)　**5b** (89%)

1) Shinohara, H.; Sonoda, M.; Atobe, S.; Masuno, H.; Ogawa, A. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 6238.
2) Shinohara, H.; Sonoda, M.; Hayagane, N.; Kita, S.; Tanimori, S.; Ogawa, A. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 5302.

Urolithin A, Diels-Alder reaction, furan

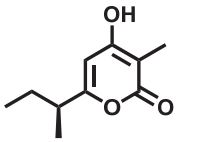
発表責任者：園田素啓（sonoda@bioinfo.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：4D4a05
講演日時：3 月 27 日 09:44～ 1 号館 D4 会場

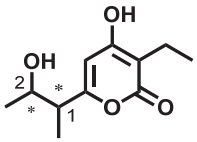
放線菌の生産する抗酸化性ピロンの合成と立体配置の決定

Synthesis and structure determination of pyrone compound with antioxidant activity produced by Actinomycetes

○堂地 剛司[1]、園田 素啓[1]、杉山 靖正[2]、谷森 紳治[1] ([1]阪府大院生命環境、[2]実践女子大生活科学)
○Tsuyoshi DOCHI[1], Motohiro SONODA[1], Yasumasa SUGIYAMA[2], Shinji TANIMORI[1] ([1]Osaka Pref. Univ., [2]Jissen Women's Univ.)



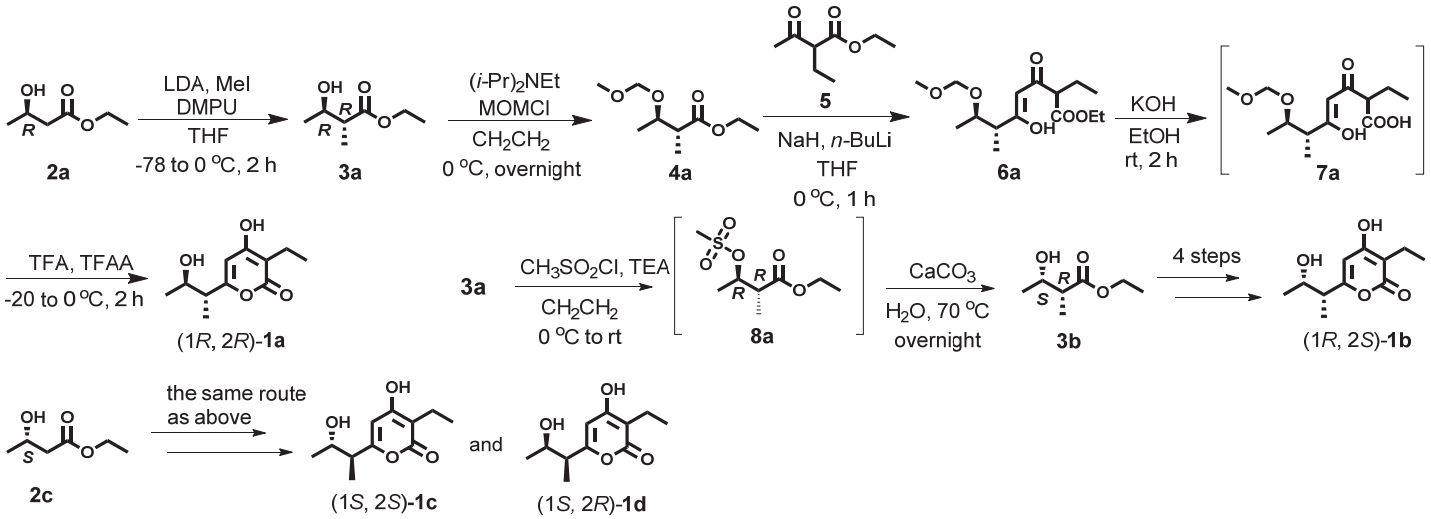
surugapyrone B



3-ethyl-4-hydroxy-6-(2-hydroxy-1-methylpropyl)-2*H*-pyran-2-one (**1**)

【目的】我々は以前、静岡県駿河区の土壌から分離した放線菌より DPPH ラジカル捕捉活性を有する surugapyrone 類の単離・構造決定と生合成について報告した[1)]。また、新たに海綿から分離した放線菌より類縁体として側鎖部に隣接した不斉炭素原子を有するピロン **1** を単離し、化学構造を図のように決定したが、立体配置は不明であった。そこで今回、可能な 4 種の立体異性体を合成し、その立体配置を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】まず市販の(*R*)-3-ヒドロキシ酪酸エチル **2a** を低温下で *anti* 選択的にメチル化することで、*anti* エステル **3a** を得た。続いて水酸基の MOM 化、2-エチルアセト酢酸エチル **5** とのクライゼン縮合、加水分解・環化により、*anti* 体の(1*R*, 2*R*)-**1a** を得た。*syn* 体の(1*R*, 2*S*)-**1b** は、**3a** の水酸基をメシル化、アルカリ処理によって *syn* 体エステル **3b** とした後、同様の経路で合成した。(1*S*, 2*S*)-**1c** ならびに(1*S*, 2*R*)-**1d** は、**2c** を出発物質とすることで、同様に合成することができた。合成した 4 種類の化合物の各種 NMR データの結果より、天然物 **1** は *anti* 体と *syn* 体の混合物であることが明らかになった。絶対立体配置の決定については現在検討中である。



1）天然有機化合物討論会講演要旨集,49 巻 (2007) p.323.

structure determination, pyrone, antioxidant

発表責任者：谷森紳治（tanimori@bioinfo.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：4D4a06
講演日時：3 月 27 日 10:05～ 1 号館 D4 会場

2-ピロンの分子内 Diels-Alder 反応を鍵とする強心ステロイド骨格の新規構築法の開発

A new synthetic approach to cardiotonic steroidal skeleton through intramolecular Diels-Alder reaction using 2-pyrone

○渡邉 正悟、西川 俊夫、中崎 敦夫（名大院生命農）
○Shogo Watanabe, Toshio Nishikawa, Atsuo Nakazaki (Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University)

digoxin[1] や uscharin[2] に代表される強心ステロイドは、自己免疫疾患や神経変性疾などの特定の疾患に対する医薬シーズの候補物質として、近年、再注目されている(Figure 1)。これらの化合物に共通する、C14 位に酸素官能基を持ち *cis* 縮環した CD 環を含むステロイド骨格に着目すると、このコア骨格を基本とした多様な類縁体の自在合成法を確立することは、創薬や生命科学等の幅広い研究分野への化合物供給により基礎研究の推進に貢献し得ることが期待できる。そこで我々は、多彩な構造修飾を可能とする強心ステロイド関連化合物の新規自在合成法の開発に着手した。

我々は、2-ピロンを利用した溝呂木-Heck 反応と分子内 Diels-Alder 反応によるステロイド骨格の新規な構築法を立案し、これまでに A 環が芳香環化したエストロゲン様化合物 **4** の合成を達成した(Scheme 1)[3]。今回は、同じく 2-ピロンの反応性を活かし、共通する中間体イノン **3** を起点として、アリルアルコール **5** の分子内 Diels-Alder 反応により架橋エステル **6** の合成に成功した。得られた架橋エステル **6** は、ステロイド骨格上の酸化段階の調節と C17 位の不飽和ラクトンの導入を経て強心ステロイドに誘導可能であると期待できる。講演では、この分子内 Diels-Alder 反応の基質や反応条件を精査した結果と立体選択性についても議論する。

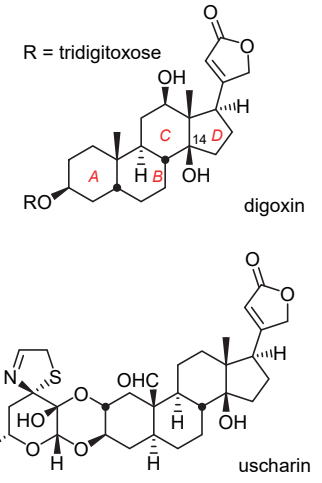
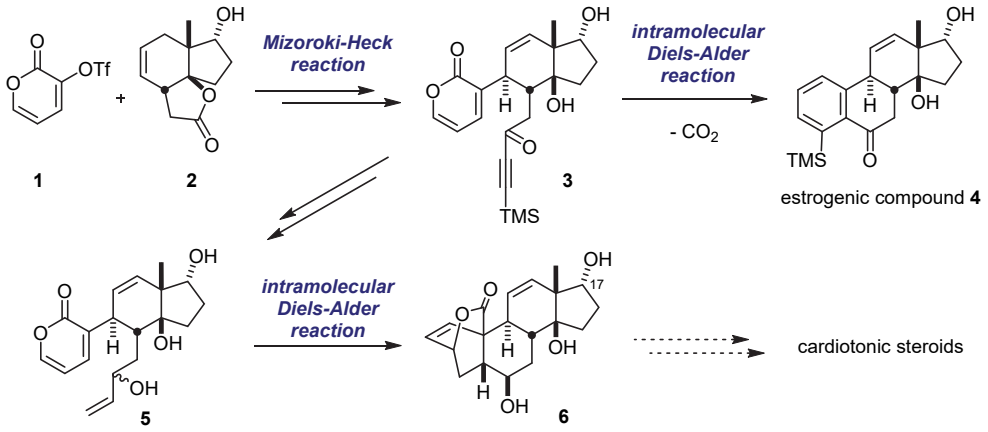


Figure 1



Scheme 1

References: [1] Huh, J. R. *et al. Nature* **2011**, *472*, 486. [2] Arai, A. M.; Ishibashi, M. *et al. J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 2453. [3] 渡邉正悟、西川俊夫、中崎敦夫 日本農芸化学会 2018 年度大会, 3A16a08.

cardiotonic steroid, 2-pyrone, intramolecular Diels-Alder reaction

講演番号：4D4a07
講演日時：3 月 27 日 10:16～ 1 号館 D4 会場

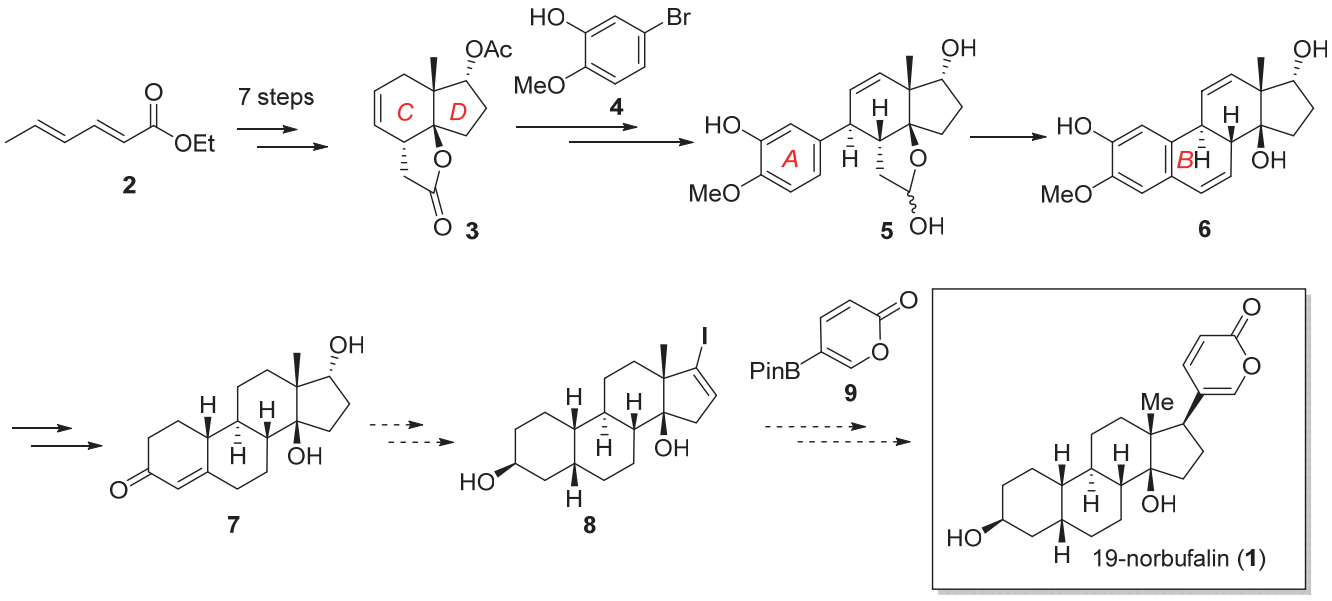
19-ノルブファリンの合成研究

Synthetic studies on 19-norbufalin

○松村 泰志、西川 俊夫、中崎 敦夫 (名大院生命農)
○Taishi MATSUMURA, Toshio Nishikawa, Atsuo Nakazaki (Nagoya Univ)

内因性ジギタリス様物質（Endogenous digitalis-like factor, EDLF）は、植物や両生類由来の強心ステロイドと類似の生物活性と構造を持つ、哺乳類から単離された化合物群である。EDLF は疾患のあるヒトからも微量単離されているが、病気との因果関係は分かっていない。今回我々は、白内障患者の水晶体から単離された、EDLF 候補化合物である 19-norbufalin (**1**)の提唱構造の妥当性を検証するために、**1** の合成を検討したので報告する。

本合成では、市販の **2** から 7 段階で合成した三環性ラクトン **3**[1]とブロモアレーン **4** の Mizoroki-Heck 反応と、エステル部位の還元で得られるラクトール **5** の Friedel-Crafts 型脱水環化反応を鍵反応として用いて、四環性化合物 **6** の合成を達成した。さらに、フェノール性水酸基の還元的除去と、A、B および C 環の還元により、エノン **7** を単一のジアステレオマーとして得た。



Reference: [1] Nakazaki, A.; Hashimoto, K.; Ikeda, A.; Shibata, T.; Nishikawa, T. *J. Org. Chem.* **2017**. *82*, 9097.

total synthesis, cardiotonic steroid, endogenous digitalis-like factor

発表責任者：松村 泰志（matsumura.taishi@b.mbox.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：4D4a08
講演日時：3 月 27 日 10:27～ 1 号館 D4 会場

Pd 触媒を用いた環化反応によるペルヒドロフェナントレン骨格の新規構築法の開発

A new synthetic approach to functionalized perhydrophenanthrene skeleton through Pd-catalyzed cyclization

○中神 展馬、西川 俊夫、中崎 敦夫 (名大院生命農)
○Temma NAKAGAMI, Toshio NISHIKAWA, Atsuo NAKAZAKI (Grad. Sch. of Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

多環式テルペノイドには抗腫瘍活性や抗原虫活性などの有用な生物活性を有する化合物が多数存在し、それらは医薬シーズとして重要である。合成化学的には、それら多環式テルペノイドの各不斉炭素の立体化学を含む骨格構築とともに、適切な位置に酸素官能基を導入できる汎用性の高い合成法の開発が求められている。我々は、フリーデラン型またはカウレン型テルペノイドが共通して持つペルヒドロフェナントレン骨格の立体選択的構築法の開発を目指し研究を開始した(Figure 1)。今回、Pd 触媒による分子内 Mizoroki-Heck 反応を基盤として、酸素官能基化されたペルヒドロフェナントレン骨格の構築を試みたので報告する。

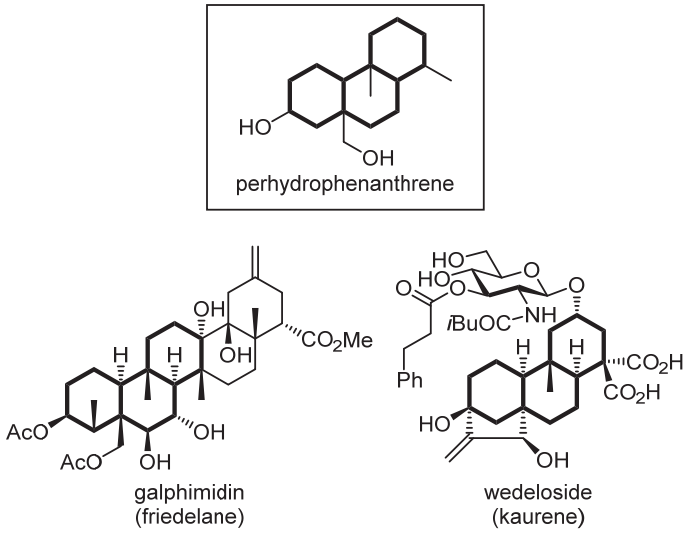
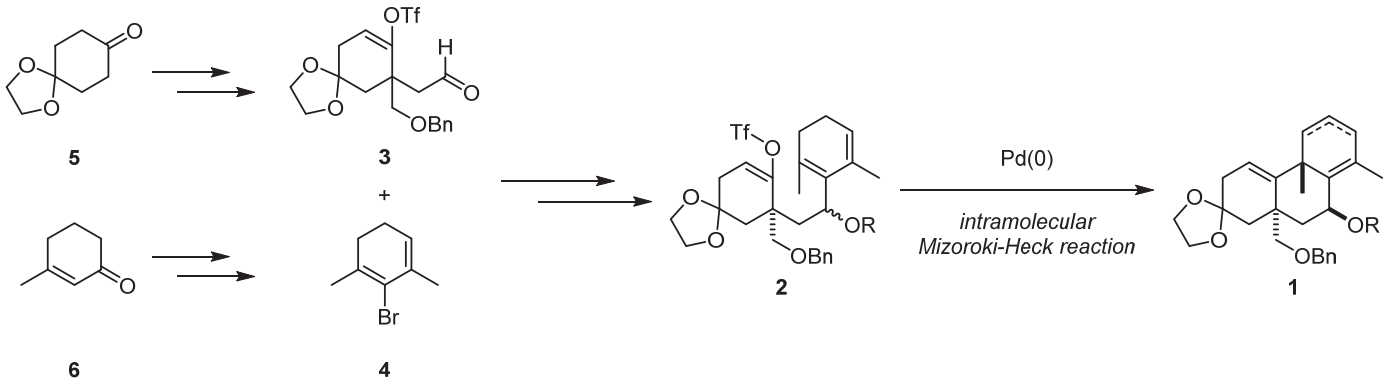


Figure 1

環化前駆体となるトリフラート **2** は、市販のケトン **5** およびエノン **6** からそれぞれ数段階で合成可能なアルデヒド **3** とブロマイド **4** のカップリングで調製した(Scheme 1)。トリフラート **2** に対し Pd(0) 錯体を作用させたところ、官能基化されたペルヒドロフェナントレン **1** を合成することができた。本講演では、各変換反応と本環化反応の詳細について議論する。



Scheme 1

perhydrophenanthrene, polycyclic terpenoids, Mizoroki-Heck reaction

発表責任者：西川　俊夫（nisikawa@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：4D4a09
講演日時：3 月 27 日 10:38～ 1 号館 D4 会場

塩化アルミニウムによるメチオニン誘導体の分子内環化反応の検討
Intramolecular cyclization of methionine derivatives with aluminium chloride
○所 百合花[1]、黒川 菜摘[2]、橋床 泰之[2]、橋本 誠[2] ([1]北大農、[2]北大院農)
○Yurika TOKORO[1], Natumi KUROKAWA[2], Yasuyuki HASHIDOKO[2], Makoto HASHIMOTO[2]
([1]Hokkaido Univ. Sch. Agr., [2]Hokkaido Univ. Grad. Sch. Agr)

研究背景・目的） ホモシステインチオラクトン（HTL）は、医薬品の合成中間体や生体分子架橋剤としての利用、またオートインデューサーなどの生理活性を持つことが知られている環状チオエステル化合物である。これまでの合成では液体アンモニア中の金属ナトリウムの強塩基条件や、強酸存在下加熱条件等の反応条件が用いられてきたため各種誘導体の合成に適した温和な条件の合成法の確立が求められている。本研究ではメチオニン誘導体を利用した Lewis 酸である塩化アルミニウム($AlCl_3$)による HTL 合成を検討した。

方法・結果） N 末端を $AlCl_3$ 酸性で安定な trifluoroacetyl(TFA)基で保護するため ethyl trifluoroacetate-TEA 系により TFA-Met を合成した。温和な条件での分子内チオエーテル結合形成のため、C 末端を HOSu-WSCD･HCl 系による *N*-hydroxy succinimide エステル並びに、Vilsmeier 試薬による酸クロライドへと変換した。

TFA-Met-OSu の反応性を検討した所、ベンゼン溶媒中で $AlCl_3$ 3 等量、70℃、2 時間の条件において分子内反応生成物である HTL と分子間 Friedel-Crafts アシル化反応の生成物が 3:1 の割合で得られる事が明らかとなった。$AlCl_3$ を 6 等量に変更すると 1.7:1 に割合が変化したことから $AlCl_3$ 等量を減らすことで環化生成物 HTL の割合が増加する傾向にあることが分かった。この環化反応では S-アルキル基の脱離が必要であるため、TFA-Met のかわりに S-ethyl 基をもつ TFA-ethionine を使用すると期待通り速やかに環化反応が優先的に進行し(24:1)、$AlCl_3$ の等量に関して Met と同じ傾向が認められた。反応温度に関しては、低いほど分子間 Friedel-Crafts アシル化反応が進行する傾向にあることが明らかとなった。CS_2 溶媒中で $AlCl_3$ 3 等量、70℃、6 時間の条件で TFA-HTL のみが得られた。室温での条件下でも CS_2、CCl_4 を溶媒に用いることにより TFA-HTL のみが得られることを明らかとした。

より反応性が高いと考えられる TFA-Met-Cl では、$AlCl_3$ 12 等量、室温、40 分ベンゼン溶媒中の条件下で Friedel-Crafts アシル化反応のみが進行した。しかし、$AlCl_3$ 3 等量、70℃、2 時間、ベンゼン溶媒中においては HTL のみが優先的に合成する事が明らかとなり、ここでも $AlCl_3$ の等量を減らし、温度を高く設定することで HTL 合成の割合が高くなることが示唆された。また、CS_2 を溶媒に用いる事で、TFA-HTL のみが得られることを明らかとした。現在、TFA の脱保護による HTL への変換を検討中である。

intramolecular cyclization, methionine, dealkylation

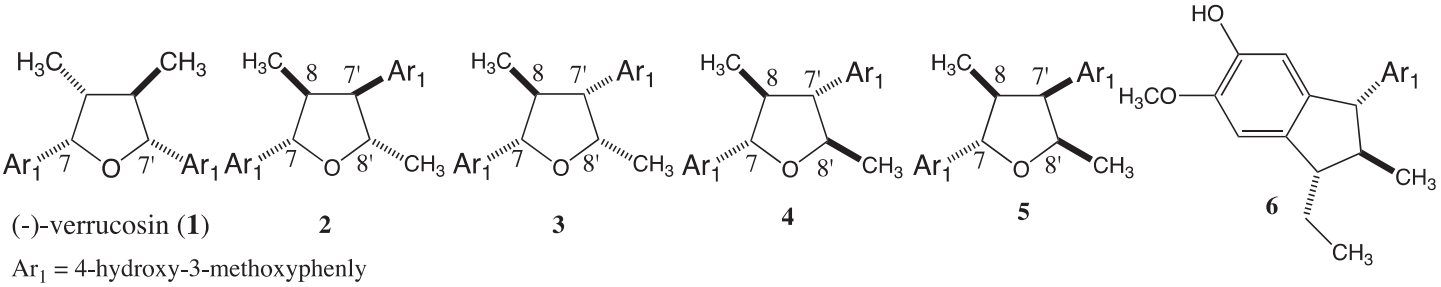
講演番号：4D4a10
講演日時：3 月 27 日 10:49～ 1 号館 D4 会場

phenylpropanoid の 8 位と 7'位が結合した四置換テトラヒドロフラン型リグナンの立体異性体とγ-diisoeugenol の両鏡像異性体の合成

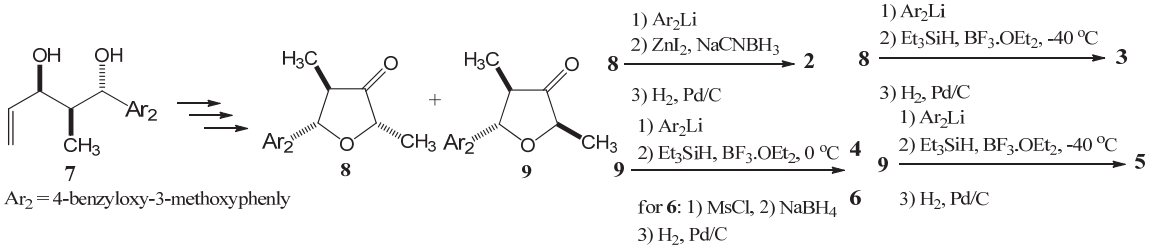
Synthesis of stereoisomers of tetrasubstituted tetrahydrofuran type lignan with 8-position and 7'-position of phenylpropanoide and γ-diisoeugenol both enantiomers

○田窪 竜明、西脇 寿、山内 聡（愛媛大院農）
○Tatsuaki TAKUBO, HISASHI NISIWAKI, SATOSHI YAMAUCHI (Ehime Univ. of Agric.)

目的）8 位と 8'位が結合した四置換テトラヒドロフラン型リグナンの立体構造と活性との関係を調べたところ、ベンゼン環が 4-hydroxy-3-methoxyphenyl 基の場合、(-)-verrucosin (**1**)が最も高い細胞毒性活性、抗かび活性、植物生長抑制活性を示した。そこで、二つのメチル基、aryl 基の位置と活性との関係を調べることを目的として、phenylpropanoid 単位の 8 位と 7'位が結合して、7 位と 8'位がエーテル結合した四置換テトラヒドロフラン型リグナンの立体異性体の合成研究を始めた。今回は立体異性体 2～5 の両鏡像異性体と、予期せず得られたγ-diisoeugenol (**6**)の両鏡像異性体の合成について発表する。



方法、結果）*S*-体の Evans の不斉補助基を用いた *anti* アルドール縮合を行った後、5 工程で diol **7** へ導いた。さらに、ヨードエーテル化、還元、allyl 位の水酸基の酸化を行って ketone **8**, **9** とした後、それぞれと(4-benzyloxy-3-methoxyphenyl)lithium との反応を行った。ketone **8** から得られた化合物の三級水酸基の還元的除去を ZnI_2, $NaCNBH_4$ 存在下 $Cl(CH_2)_2Cl$ で加熱還流によって行うと、熱力学的に安定な **2** の立体が得られ、-40 ºC でシラン還元を行うと熱力学的に安定でない **3** の立体が得られた。また、ketone **9** から得られた化合物の三級水酸基のシラン還元を 0 ºC で行うと熱力学的に安定な 4 の立体とγ-diisoeugenol の基本構造が得られ、-40 ºC で行うと **5** の立体が得られた。同様にして鏡像異性体の合成も行った。最終化合物 **2**～**6** および鏡像異性体の光学純度は 98～100% ee であった。



γ-diisoeugenol, verrucosin, lignan

講演番号：4D4a11
講演日時：3 月 27 日 11:10～ 1 号館 D4 会場

鈴木カップリングによる多置換ビヘテロ芳香族化合物の効率的合成
Efficient synthesis of the substituted biheteroaromatics by Suzuki coupling

○藤本 亮太[1]、濱田 昌弘[1,2]、中島 範行[1,2] ([1]富山県大工、[2]富山県大生工研セ)
○Ryota FUJIMOTO[1], Masahiro HAMADA[1,2], Noriyuki NAKAJIMA[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]Toyama Pref. Univ. BRC)

【目的】ヘテロ芳香族化合物を用いた Pd 触媒鈴木-宮浦クロスカップリング反応は、医薬品や生理活性物質の合成に広く用いられている。本反応において、無置換のヘテロ芳香族化合物を用いた場合、クロスカップリング体が良好な収率で得られる。一方、置換基を有するヘテロ芳香族化合物のクロスカップリング反応は、報告例が少なく、また、低収率であることが多い。今回、インドールカルボン酸と、多置換ピリジンおよびキノリンとのクロスカップリング反応について検討した。

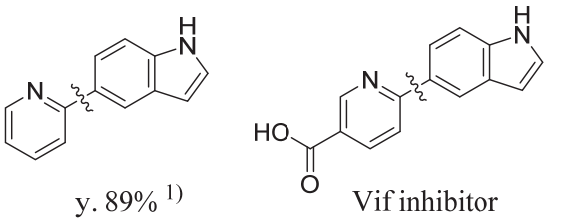


Fig 1. Suzuki coupling of heteroaromatics.

【方法・結果】5 当量の Na_2CO_3 存在下、 6 mol% の $Pd(PPh_3)_4$ と 2.5 時間反応させると、クロスカップリング体が 43%の収率で得られた (**Table 1**, Entry 1)。より反応性の高い $PdCl_2(dppf)$ を用いたところ収率は 51%と微増した (Entry 2)。カップリング体の加水分解物の存在が確認されていたことから、塩基の当量数を 3 当量に減らし、10 mol% の触媒を用いて 1 時間反応させたところ、収率は 70%と向上した (Entry 3)。これを最適条件とし、Vif inhibitor の合成に適用したところ、カップリングの収率が 82%と大幅に向上した (**Fig 1**)。他の置換ピリジルブロミドおよびキノリルブロミドとの反応もあわせて報告する。

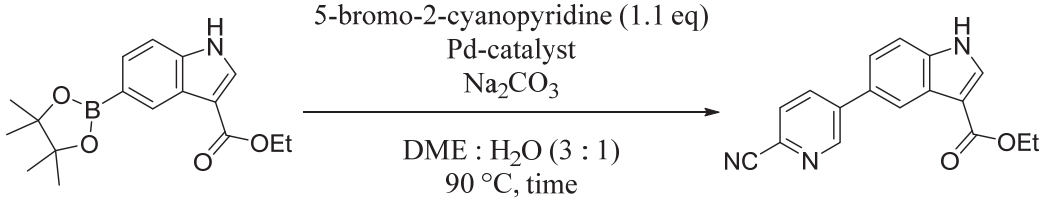


Table 1. Cross coupling reaction of indole boronate with bromo pyridine.

Entry	Catalyst (mol%)	Time (h)	Na_2CO_3 (eq)	Yield (%)
1	$Pd(PPh_3)_4$ (6)	2.5	5	43
2	$PdCl_2(dppf)$ (6)	2.5	5	51
3	$PdCl_2(dppf)$ (10)	1	3	70

【参考文献】1) N. Kudo, M. Perseghini, G. C. Fu, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, *45*, 1282–1284.
2) C. Pu, R.-H. Luo, M. Zhang, X. Hou, G. Yana, J. Luo, Y.-T. Zheng, R. Li, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2017**, *27*, 4150-4155.

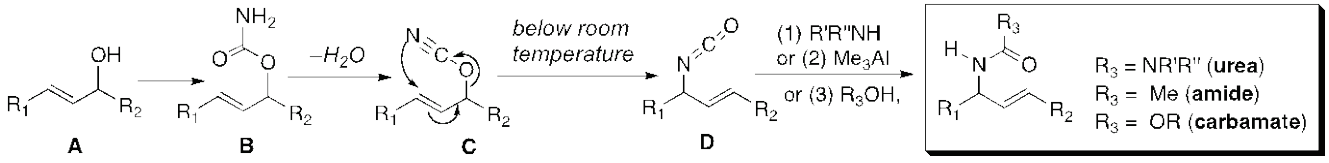
Suzuki coupling, biheteroaromatics, indole

講演番号：4D4a12
講演日時：3 月 27 日 11:21～ 1 号館 D4 会場

転位反応を活用した天然物の合成
Natural Product Synthesis Employing Sigmatropic Rearrangement

○市川 善康、森本 裕詞、山﨑 季樹（高知大理工）
○Yoshiyasu Ichikawa, Hirofumi Morimoto, Toshiki Yamasaki (Kochi Univ.)

協奏的な機構で進行する転位反応は，天然物合成において重要な地位を占めている。例えば Cope 転位や Claisen 転位反応は，炭素–炭素結合を立体選択的に構築するために欠かせない手法として汎用されている。これに対して炭素–窒素結合を形成する転位反応として，演者はアリルシアナートの転位反応を開発した（Ichikawa, Y. *Synlett* **2007**, 2927）。アリルアルコール **A** からアリルカルバメート **B** を調製する。アリルカルバメート **B** を脱水すると発生するアリルシアナート **C** は，短寿命の活性種である。このためアリルシアナート **C** は単離されることなく，室温以下でアリルイソシアナート **D** に転位する。高い反応性をもつイソシアナート **D** の特徴を活かして，そのまま反応系中に（1）アミンを加えれば**ウレア**を，（2）トリメチルアルミニウムを用いればアミドを，（3）適当なアルコールと処理すれば所望の**カルバメート**を**自在につくり分ける**ことができる。このアリルシアナートの転位反応は協奏的に進行するので，出発原料の不斉中心を完璧に窒素原子が結合した不斉炭素上に転写する。



転位反応は**立体障害が顕著な位置でも結合形成できる利点**がある。すなわち，立体障害が顕著な窒素原子が結合した不斉四級炭素を構築することができる。この利点を活用して，含窒素天然物の合成に成功した。

natural product, organic synthesis, sigmatropic rearrangemet

講演番号：4D4a13
講演日時：3 月 27 日 11:32～ 1 号館 D4 会場

殺虫性毒素 LaIT3 由来の N 末端部分ペプチドの合成および抗菌活性評価

Synthesis of the N-terminal domain peptide of the insecticidal toxin LaIT3 and evaluation of its antibacterial activity

○堺 祥一、宮川 恒、宮下 正弘、中川 好秋（京大院農）
○Shoichi SAKAI, Hisashi MIYAGAWA, Masahiro MIYASHITA, Yoshiaki NAKAGAWA (Kyoto Univ.)

【目的】サソリ毒液には、ジスルフィド結合によって架橋された構造を持つペプチドが含まれており、その多くはイオンチャネルに作用する。また、ジスルフィド結合を持たないペプチドも存在し、αヘリックス構造を形成することで主に抗菌活性を示す。LaIT3 は日本生息種のヤエヤマサソリ（*Liocheles australasiae*）から単離された 84 残基のペプチドであり、殺虫活性ならびに抗菌活性を示す。LaIT3 は上に示した 2 種類の構造的特徴を合わせ持つペプチドであり、αヘリックスを形成する N 末端側と 3 つのジスルフィド結合によって架橋された C 末端側の 2 つのドメイン構造で構成される。さらに興味深いことに、毒液中には LaIT3 の N 末端あるいは C 末端ドメインのみからなる部分ペプチドも存在することが明らかとなっているが、これらの生理的役割については不明である。そこで本研究では、LaIT3 の N 末端ドメインペプチド（N-LaIT3）の生理活性を明らかにすることを目的として、その化学合成ならびに抗菌活性の測定を行った。
【方法】N-LaIT3 は 41 残基からなるペプチドで、通常の逐次延長法による合成は難しいと考えられたため、フラグメント縮合法の一つである native chemical ligation (NCL) 法を用いた。NCL では、N 末端側フラグメントの末端チオエステルと C 末端側フラグメントの Cys 残基側鎖との間の選択的な反応を利用するが N-LaIT3 の配列中には Cys が含まれていないため、最初に 15 番目の Ala を Cys に置換したペプチドを合成し、その後の脱硫反応によって N-LaIT3 を得ることとした。縮合に用いる N 末端側フラグメント(1-14)チオエステル体と C 末端側フラグメント(15-41)は Fmoc 固相合成法により調製した。
【結果】チオエステル化試薬として MeNbz を用いてフラグメント(1-14)チオエステル体を調製しようと試みたところ、Asp 残基の側鎖カルボキシル基に由来する副反応が優先し目的物を収率よく得ることが難しかった。そこで側鎖カルボキシル基をベンジル基で保護し、ヒドラジド中間体を経由してチオエステルを合成する方法を試みた。その結果、目的のフラグメント(1-14)チオエステル体を純度よく得ることができ、これを C 末端側フラグメント(15-41)と縮合させた。得られたペプチドの Asp 側鎖を脱保護した後、ラジカル開始剤（VA-044）、還元剤（TCEP）およびグルタチオンを用いた脱硫反応に供して Cys 残基を Ala に変換し、N-LaIT3 を得た。N-LaIT3 の抗菌活性を 2 種のバクテリア（*S. aureus* および *B. subtilis*）を用いて測定した結果、いずれに対しても 25 μM の処理濃度で活性を示さなかった。このことから N-LaIT3 の抗菌活性は弱く、他の生理活性を持つことが示唆された。

peptide, synthesis, evaluation of activity

講演番号：4D4a14
講演日時：3 月 27 日 11:43～ 1 号館 D4 会場

エラスチン架橋部位の生体模倣反応の開発
Biomimetic Synthesis of Elastin Cross-linking
○田中 尚、臼杵 豊展（上智大学)
○Nao TANAKA, Toyonobu USUKI (Sophia Univ.)

【目的】 エラスチンは、靭帯や血管、肺胞等に豊富に含まれる弾性線維タンパク質である。その架橋アミノ酸 isodesmosine (**IDE**)および desmosine (**DES**)は、それぞれ 1, 2, 3, 5 位、1, 3, 4, 5 位にアミノ酸基を有する四置換ピリジニウムであり、エラスチンのアラニン豊富な領域におよそ 1 対 1 の比で存在している。これらは、リシンの酸化的脱アミノ化によって生じるアリシン 3 残基とリシン 1 残基の連続的な縮合反応により生合成される。一方、合成化学的にアルデヒド 3 分子とアンモニア 1 分子を原料とした 2,3,5 位三置換ピリジンの形成（Chichibabin ピリジン合成）が報告されている。当研究室で Chichibabin ピリジニウム合成を鍵反応とした **IDE** の全合成が達成された際、**DES** 型もわずかながら得られた。本研究では、収率・再現性の向上および **IDE** 型と **DES** 型の選択的合成を目的として、Chichibabin ピリジニウム合成の反応条件を検討した。また、生体に類似したアラニンを一つ付与した基質を用いることで、生体模倣 Chichibabin ピリジニウム合成を試みた。

【実験・結果】 ①選択的合成…4 当量の allysine と 1 当量の lysine を用いて、50 mol% $Pr(OTf)_3$ 存在下で反応条件を検討した。従来法では、allysine の水溶媒への溶解性の低さに起因する低再現性が問題であった。そこで、リン酸緩衝溶液/CH_2Cl_2 二層系を試したが、**IDE** 型と **DES** 型の生成比がおよそ 1 対 1 となった。次に、H_2O/CH_2Cl_2 (1/6)溶媒系を検討すると、興味深いことに **DES** 型を 27%の収率で選択的に得た。この反応は、「isoChichibabin ピリジニウム合成」とも言える。H_2O/dioxane (1/6)中では収率は低下したが、**DES** 型を特異的に合成できた。一方、混合比を H_2O/dioxane (2/1)と逆転させると、選択性が完全に **IDE** 型へ傾いた。さらに、H_2O/DMF (2/1)溶媒にて 35%で **IDE** 型を得た。

②生体模倣反応…アラニンを一つ付与した allysine-Ala および lysine-Ala を用い、先に確立した **IDE** 型および **DES** 型の選択的合成の条件で Chichibabin ピリジニウム合成を遂行した。驚くべきことに、H_2O/CH_2Cl_2 (1/6)、H_2O/DMF (2/1)のいずれの条件においても **IDE** 型と **DES** 型の生成比がおよそ 1 対 1 であった。これは、基質の溶解性や水素結合能が生成比に影響を与えたことが示唆された。また、天然のトロポエラスチンに類似したペプチド基質を用いることによって、生体内のエラスチン架橋形成を模倣できた。最後に、全ての保護基を TFA により除去することで、**IDE**-$(Ala)_4$ および **DES**-$(Ala)_4$ の合成を完了した。

Biomimetic synthesis, Elastin, Selective synthesis

発表責任者：臼杵豊展（t-usuki@sophia.ac.jp）

講演番号：4D4a15
講演日時：3 月 27 日 11:54～ 1 号館 D4 会場

Diphenyl Phosphorazidate を活性化剤かつアジド源として用いたケトキシムから 1,5-二置換テトラゾールの合成

A Synthesis of 1,5-Disubstituted Tetrazoles from Ketoximes using Diphenyl Phosphorazidate as Both Activator and Azide Source

○石原 稿太朗、塩入 孝之、松儀 真人（名城大農）
○Kotaro ISHIHARA, Takayuki SHIOIRI, Masato MATSUGI (Meijo Univ.)

五員環性の芳香族複素環式化合物であるテトラゾールは、様々な分野で利用されている。中でも、1,5-二置換テトラゾール骨格を有する化合物には生物活性を示すものがあり、カルジアゾールや、シロスタゾールなどが知られている。

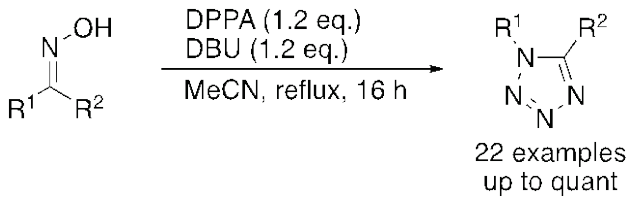
1,5-二置換テトラゾールの合成法として、ケトキシムエステルから Beckmann 転位を介する方法[1)]や、ケトンから Schmidt 転位を介する方法[2)]が報告されているが、いずれの方法も毒性や爆発性を有する試薬が用いられている。

これまでに、我々は安定なアジド化試薬であるジフェニルリン酸アジド (DPPA) を活性化剤かつアジド源として利用したアルドキシムからの 5-置換-1*H*-テトラゾール合成を見出している。[3)]今回我々は、ケトキシムを基質に DPPA を作用させることで、Beckmann 転位を進行させることができれば、1,5-二置換テトラゾールが合成できると考えた。

モデル基質としてアセトフェノンオキシムを用い、DPPA と処理することで 1,5-二置換テトラゾール合成を試みた。種々検討した結果、DPPA の存在下、塩基として DBU を用い、アセトニトリル中で還流することにより Beckmann 転位が進行し、目的生成物を収率良く得ることに成功した。

続いて、様々な置換基を有するケトキシムを用いて基質の適用範囲を調べた。芳香族・脂肪族の置換基が隣接するケトキシムにおいて、いずれも反応は進行した。しかしながら、電子求引基やヘテロ環を有する基質では、反応性の低下が見られた。本反応では、水酸基に対してトランス位の置換基が転位した生成物のみが得られたことから、反応中に異性化は生じないと考えている。さらに、本条件下ではメチル基の転位は起らないことがわかった。

本手法は、毒性や爆発性を有する試薬を必要とせず、安全かつ簡便に 1,5-二置換テトラゾールを合成することが可能である。



【References】
1) Nishiyama, K. *et al*. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1985**, *58*, 2419.
2) (a) Suzuki, H. *et al*. *Synthesis* **1993**, 1218. (b) El-Ahl, A. S. *et al*. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 7337. (c) Motiwala, H. F. *et al*. *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 1593.
3) (a) Ishihara, K *et al*. *Synlett* **2016**, *27*, 2225. (b) Ishihara, K. *et al*. *Synthesis* **2018**, *50*, 1293.

diphenyl phosphorazidate, Beckmann Rearrangement, tetrazole

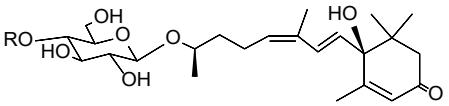
講演番号：4D5a01
講演日時：3 月 27 日 09:00～ 1 号館 D5 会場

疫病菌無性生殖阻害物質 lycoside 類に関する研究

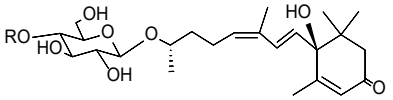
Study on lycosides, asexual reproduction inhibitors of *Phytophthora*

○加藤 史華、岩井 里佳、小鹿 一 (名大農)
○Fumika KATO, Rika IWAI, Makoto OJIKA (Nagoya Univ.)

【背景・目的】



lycoside A：R=β-Glc　lycoside C：R=H



lycoside B：R=β-Glc　lycoside D：R=H

当研究室では、これまで疫病菌 (*Phytophthora* 属植物病原糸状菌) の無性生殖を阻害する物質の探索を行っている。このような生理活性物質は疫病菌の感染拡大を防ぎ、農業への貢献を期待できる。探索の過程で、培地として用いた野菜ジュースから無性生殖を阻害する物質 lycoside 類 (Fig. 1) を発見し、ジュース原料野菜のうちトマトに含まれることが判明した [1)]。そこで、本物質を効率的に取得できる材料をナス科野菜から探索すること、および lycoside 類より活性が高いことが分かっているアグリコンの合成を通じて得られる類似化合物の活性を調査することを目的とする。

【方法・結果】

活性検定は次のように行った。PS 培地で *P. capsici* を 8 日間前培養した後、サンプルの DMSO 溶液を加えた V8 培地に前培養した菌を接種し、6 日間培養した。培地を菌体ごと直径 1.3 cm の円状にくり抜き、遊走子嚢 (無性胞子) を顕微鏡下で数え活性の評価を行った。lycoside 類の定量はトマト、ジャガイモ、パプリカ、ピーマン、ナス、シシトウの果実、地上部など 35 種類の材料をメタノール抽出し、LC/MS により行った。トマト実 (17 検体) で 0.083~0.36 μmol/kg、トマト茎葉部 (10 検体) で 0.056~0.30 μmol/kg、ジャガイモ茎葉部 (2 検体) で 0.11~0.17 μmol/kg であった。最も含有量が高い 0.36 μmol/kg は、従来の材料を大きく上回るものではなかった。そこで次に lycoside アグリコンの合成に取り掛かった。Abscisic acid を出発物質としてアルデヒドに導き、アセトンとのアルドール縮合により合成できると考えた。現在、合成を進めているが、合成の過程で得られる中間体・副生成物の活性も調べる予定である。

【参考文献】

1）Iwai, R., Han, C., Govindam, S. V., & Ojika, M. *J. Agric. Food Chem.*, **66**, 163-169 (2017).

Lycosides, *Phytophthora*, Asexual reproduction

発表責任者：加藤史華（kato.fumika@c.mbox.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：4D5a02
講演日時：3 月 27 日 09:11～ 1 号館 D5 会場

ダキバアレチハナガサ（ *Verbena xincompta* ）からのイネ根に対する生長阻害活性物質の同定
Identification of a growth inhibitor against rice root from *Verbena xincompta*
伊達 友亮[1]、重野 叶夢[1]、○手林 慎一[1]、佐藤 正資[2] ([1]高知大農、[2]香川大農)
Yu-usuke Date[1], Kanamu Shigeno[1], ○Shinichi Tebayashi[1], Masashi Satou[2] ([1]Univ. Kochi of Agric., [2]Univ. Kagawa of Agric.)

【目的】
演者らは高知県に自生する野生植物からアレロパシー物質のスクリーニングを行ってきた。今回、南アメリカからの帰化植物であるクマツヅラ科ダキバアレチハナガサ（*Verbena xincompta*）に、イネ種子に対する発根抑制活性を確認し、活性物質を Verbascoside と同定したことから、その詳細を報告する。
【材料と方法】
物部川河川敷（高知県南国市）に自生するダキバアレチハナガサの地上部を 990g 採集し、MeOH で浸漬抽出した。植物残差を濾別後に粗抽出物を調整し、イネに対する生長阻害活性を評価した。阻害活性の評価は、試料（生鮮重 1g 相当量）をろ紙（70 mm）に塗布・風乾した後に、予め催芽したイネ種子（日本晴）を播種したのち潅水し、人工気象器中（25℃，L：D＝16：8）で 5 日間栽培し観察することで行った。機器分析は以下の器機を用いて定法により実施した。UV: Jasco V630 bio, LC-MS: Shimadzu LCMS-8030 (LC-20AD system), NMR: Jeol JNM-ECA600。
【結果及び考察】
ダキバアレチハナガサの MeOH 抽出物はイネの根に対して強い生長阻害活性（Inhibition rate (IR): 84.1%）を示した。そこで、この粗抽出物を液-液分配分画で分画すると、活性は H□O 画分(IR:71.5%)に回収された。次に ODS カラムを用いて水-MeOH 系の溶媒系にて分画すると、40% MeOH-H_2O fr のみに阻害活性(IR:76.3%)が回収されたため、この画分をさらに精密に ODS カラムを用いて精製すると 30% MeOH-H_2O fr に主活性(IR:75.9%)が回収された。これを逆相系分取 HPLC にて精製を行い、活性物質 (IR:68.25%)を単離した。
単離物質を機器分析に供すると、UV スペクトルから芳香族化合物の存在が判明し、LC-MS 分析からは分子量が 624 であることが予想された。さらに、各種 NMR スペクトルとマススペクトルのフラグメントパターンから、活性物質はグルコース、ラムノース、カフェイン酸、ヒドロキシチロソールの 4 つの部分構造から成ることが推定され、HMBC および HMQC の測定結果から、Verbascoside と同定した。

growth inhibitor, verbascoside, Verbena xincompta

発表責任者：手林慎一（tebayasi@kochi-u.ac.jp）

講演番号：4D5a03
講演日時：3 月 27 日 09:22～ 1 号館 D5 会場

Tyrosinase inhibition and kinetics of silydianin that is the most abundant phenolic metabolite in milk thistle

○Yeongjun BAN, Ji Yeong Kim, Jeong Ho Kim, Ki Hun Park (Division of Applied Life Science (BK21 plus), IALS, Gyeongsang National University, Jinju, 52882, Republic of Korea)

Silybum marianum has been used as a popular medicinal herb since the ancient time. This plant is known as milk thistle and belongs to the family of Asteraceae. Silydianin (caged flavonolignan) from milk thistle showed a significant inhibition to tyrosinase with both monophenolase (IC_{50} = 2.6 μM) and diphenolase (IC_{50} = 16.5 μM). It inhibited monophenolase and diphenolase mixed type I (K_I = 1.1 and 12.3 μM < K_{IS} = 3.2 and 29.5 μM) manner which inhibitor prefer to bind free enzyme than enzyme-substrate complex. The long lag time with a decrease of the static state activity of enzyme proved that silydianin formed E_{met}·I effectively. The UPLC-ESI-TOF/MS analysis showed that silydianin is the most abundant metabolite (36%) in ethylacetate fraction of target plant.

Silybum marianum, Tyrosinase, silydianin

発表責任者：Ki Hun Park（khpark@gnu.ac.kr）

講演番号：4D5a04
講演日時：3 月 27 日 09:33～ 1 号館 D5 会場

DNA damage protective effect of phenolic metabolites from *Ikonnikovia kaufmanniana* (regel) lincz. based on antioxidant activity

○Aizhamal Baiseitova, Janar Jenis, Jeong Yoon Kim, Da Hyun Jang, Ki Hun Park (Division of Applied Life Science (BK21 plus), IALS, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Republic of Korea)

Ikonnikovia kaufmanniana (regel) lincz. is medicinal herb, endemic to Kazakhstan. There is no report about examination of antioxidant properties in individual chemical level. In primarily test, *I. kaufmanniana* methanol extract showed antioxidant potential with total phenolic (332.83 mgGAE/g) contents and DPPH scavenging activity (IC_{50} = 11.20 μM). We isolated the phenolic metabolites (**1-12**) responsible to antioxidant activity. Flavonoids **1-10** was powerful to quench DPPH radical in a range 5.90-36.16 μM, ferric reducing power (FRAP) in a range 66.89-310.53 mM$FeSO_4$/g and ORAC values from 2.8 μMTE/g to 21.9 μMTE/g evaluated using UV-vis spectroscopic equipment. All flavonoids presents OH radical scavenging effect between 2.4-38.9 μM estimated be ESR spectroscopic method. Additionally LDL oxidation induced by cuprous ion was decreased with compounds **1-11** in a range 0.22-56.1 μM. On the basis of this results, we examine the most powerful compounds **1, 5, 7, 8** among of antioxidant metabolites to be found as inhibitor DNA damage mediated by Fenton's reaction. Also the antioxidant secondary metabolites content of ethyl acetate extract was conducted by HPLC-ESI MS/MS. Results obtained in the present study demonstrated clearly that extracts and isolated compounds of *I. kaufmanniana* which showed variable and powerful antioxidant and antiradical scavenging activities is related to the potent flavonoids.

Ikonnikovia kaufmanniana, antioxidant, phenolic metabolites

発表責任者：Ki Hun Park（khpark@gnu.ac.kr）

講演番号：4D5a05
講演日時：3 月 27 日 09:44～ 1 号館 D5 会場

Competitive bacterial neuraminidase inhibitor of philippin F from *Flemingia philippinensis*

○Jeong Yoon Kim, Yan Wang, Zuo Peng Li, Ki Hun Park (Division of Applied Life Science (BK21 plus), IALS, Gyeongsang National University, Jinju, 52882, Republic of Korea)

Bacterial neuraminidase (NA) plays a pivotal role in a cellular interaction including pathogenesis of bacterial infection and subsequent inflammation. This study found that chromenedione derivatives had a significant inhibition to bacterial neuraminidase with 0.54 μM of IC_{50}. The isolated inhibitor was new compound and identified as 6-(1-hydroxy-3-(4-methoxyphenyl)-propylidene)-2,2-dimethyl-8,8-bis(3-methylbut -2-en-1-yl)-2H-chromene-5, 7(6H,8H)-dione named philippin F. In kinetic study, philippin F was competitive inhibitor, which was simple reversible slow binding against NA with following parameters: K_i^{app} = 0.6064 μM, k_3 = 0.0818 $\mu M^{-1}s^{-1}$, and k_4 = 0.0496 min^{-1}. The binding affinity (K_{SV}) of philippin F to enzyme was evaluated by fluorescence quenching effect. The binding site of philippin F to neuraminidase was also evaluated by molecular docking experiment.

Flemingia philippinenesis, Bacterial neuraminidase, Chromenediones

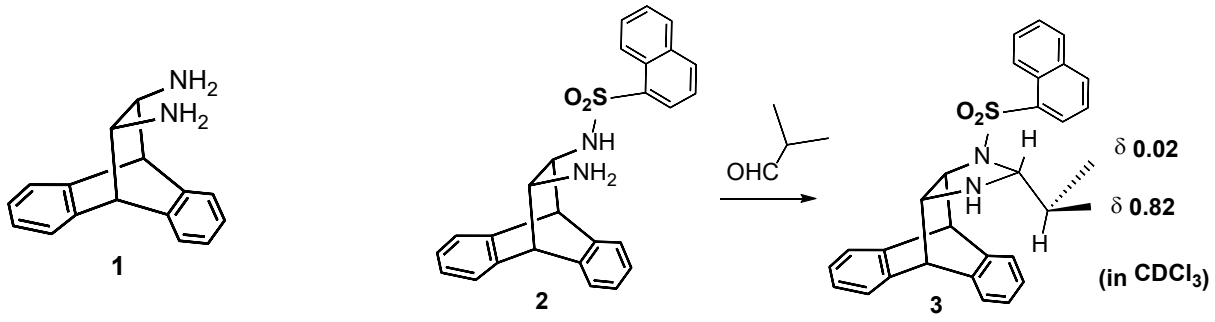
発表責任者：Ki Hun Park（khpark@gnu.ac.kr）

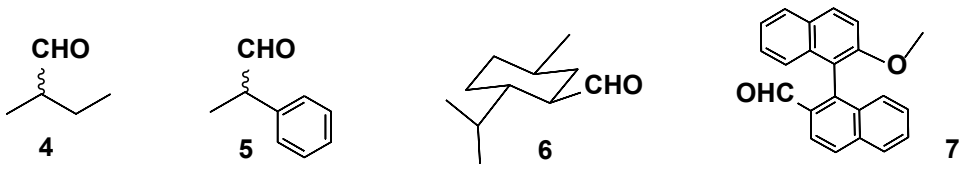
講演番号：4D5a06
講演日時：3 月 27 日 10:05～ 1 号館 D5 会場

新規なアルデヒドの光学分割と NMR による絶対配置決定法
New method of optical resolution and determination of absolute configuration for aldehydes
○福士 幸治[1]、ラクサナ アヌグラ アディ[1]、福田 怜[2] ([1]北大院農、[2]北大地環研)
○Yukiharu FFUKUSHI[1], Anugerah Adhi LAKSANA[1], Satoshi FUKUDA[2] ([1]Hokkaido Univ. Agr., [2]Hokkaido Univ. Env. Sci.)

目的 キラルアルデヒドは天然生理活性物質や薬学的標的分子の調製のための貴重な合成中間体である。また、酸化や還元反応により容易にカルボン酸やアルコール・アミンに導くことができる。本研究は、ラセミのアルデヒドを新規なmonoarylsulfonyl *cis*-diamine試薬との5員環のアミナール（imidazolidine）に誘導することで、アルデヒドの光学分割および両エナンチオマーの絶対配置決定することを目的とする。

方法と結果 *cis*-diamine **1** の各種誘導体を合成し、（ラセミの）アルデヒドとの5員環のアミナール誘導体を調製した。その結果、monoarylsulfonyl *cis*-diamne **2** とアルデヒド (**4**-**7**)から得られたジアステレオマー混合物は、全てシリカゲルTLC上でよい分離を示した。また、NMR分析に供したところ試薬の芳香族環の磁気的異方性効果を受けアルデヒド部分のプロトンシグナルは大きく高磁場シフトした。これらのデータを解析することでアルデヒドの絶対配置が決定できた。現在、試薬の最適化を進めている。





1）農化大会 2017 年要旨 3C12a03

monoarylsulfonyl cis-diamine, optical resolution, preparation of chiral aldehydes

発表責任者：福士 幸治（y-fuku@abs.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：4D5a07
講演日時：3 月 27 日 10:16～ 1 号館 D5 会場

和種ハッカほくとの消臭効果に関する研究

Study on deodorizing effect of Japanese peppermint Hokuto

○澤田 慎之介、戸枝 一喜、堀 容嗣、妙田 貴生（東農大）
○Shinnosuke Sawada, Kazuki Toeda, Youji Hori, Takao Myoda (Tokyo Univ. of Agric.)

【目的】ハッカは、精油中に多量のメントールを含有することから、香料や生薬の原料として利用される。通常は、水蒸気蒸留により精油を取り分け、そこからメントールのみが精製されるが、蒸留の際に生じる残渣はほとんどが活用されることなく破棄されている。そこで我々は、ハッカ蒸留残渣の有効活用を検討するために、残渣の有する機能性について解析を進めている。現在までに、歯周病の原因菌であるジンジバリス菌に対しての活性を明らかにしているが、本研究では悪臭成分に対する消臭効果に関する結果ついて報告する。
【方法】北海道北見市で栽培されたハッカ地上部の水蒸気蒸留残渣を試料とした。乾燥した残渣物を 50%のアセトンに浸漬して抽出物を得た。これを酢酸エチル画分と水画分に分画して、それぞれの悪臭成分に対する消臭試験を行った。評価は、分画物の 1%調整物と悪臭成分 3 種類の濃度調整物を等量混合し、官能評価と HS - SPME 法による GC－MS で実施した。水画分を Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーに供して 5 画分を得た。
【結果】蒸留残渣より分画した水画分および酢酸エチル画分を悪臭成分にスパイクして官能評価した。その結果、水画分においてイソ吉草酸に対するマスキング効果を示すことが明らかとなった。次に、HS - SPME 法によりバイアルの気相にある香気成分を捕集して GC-MS で分析したところ、水画分の添加により、イソ吉草酸の揮発量が減少した。この結果より、ハッカ蒸留残渣にはイソ吉草酸の揮発を抑制する成分の含有することが示唆された。現在は、この画分をさらに分画してマスキング寄与成分の特定を試みている。

Mint, Hokuto, Deodorant effect

発表責任者：澤田慎之介（47718007@nodai.ac.jp）

講演番号：4D5a08
講演日時：3 月 27 日 10:27～ 1 号館 D5 会場

ピーナッツ種皮に含まれる機能性ポリフェノールの探索

Functional polyphenols from peanut skins

○細川 夏菜乃、岩岡 裕二、伊東 秀之（岡山県大保福）
○Kanano HOSOKAWA, Yuji IWAOKA, Hideyuki ITO (Okayama Pref. Univ.)

【目的】

ピーナッツ（*Arachis hypogaea*）はマメ科マメ亜科ラッカセイ属に分類され，落花生とも呼ばれる南米原産の植物である。ピーナッツ種皮はピーナッツの製品加工の段階で除去され，種子を食すことが多いが，一方でピーナッツ種皮には，proanthocyanidin 類を中心としたポリフェノール成分が多く含まれることが知られている。これらポリフェノール成分は強力な抗酸化作用を示し，血清や肝臓の LDL レベルの低下作用や LDL の酸化抑制作用を有することから，心血管疾患などの予防へ寄与することが示唆されている。従って，ピーナッツ種皮は廃棄物利用の観点からも機能性ポリフェノールの良好かつ安価な供給源として有用であると考えられる。本研究ではピーナッツ種皮に含まれるポリフェノール成分の機能性を検討するため，ピーナッツ種皮中のポリフェノール成分の分離，精製を行い，得られた成分について抗糖化作用を評価した。

【方法】

ピーナッツ種皮を 70%含水アセトン中でホモジナイズし，ろ過後，得られたろ液を濃縮乾固し，ピーナッツ種皮エキスを得た。得られたエキスを Diaion HP-20 および Toyopearl HW-40C カラムクロマトグラフィーに付し，ポリフェノール成分の分離，精製を行った。次に分離したポリフェノール成分およびピーナッツ種皮エキスの Diaion HP-20 による分画サンプルについて，Advanced Glycation End Products (AGEs) 生成阻害試験法により抗糖化作用を評価した。

【結果】

ピーナッツ種皮エキスの成分を各種クロマトグラフィーにより分離，精製した結果，2 種の化合物を単離し，NMR，MS の構造解析の結果から Catechin および Proanthocyanidin A1 と同定した。また，同定した 2 種の化合物とは異なる精製画分に着目してゲル浸潤クロマトグラフィー分析を行った結果, 高分子化合物の存在を確認した。塩酸ブタノール反応の結果, その高分子化合物は proanthocyanidin オリゴマーと同定した。ピーナッツ種皮エキスの Diaion HP-20 による分画サンプル，単離した 2 種の化合物および proanthocyanidin オリゴマーの AGEs 生成阻害活性を評価した結果，proanthocyanidin オリゴマーが最も強い AGEs 生成阻害作用を示し，その阻害活性はポジティブコントロールのアミノグアニジンよりも強かった。以上の結果，ピーナッツの種皮が抗糖化素材として有用である可能性が示唆された。

peanut skins, proanthocyanidin, anti-glycation effect

発表責任者：伊東秀之（hito@fhw.oka-pu.ac.jp）

講演番号：4D5a09
講演日時：3 月 27 日 10:38～ 1 号館 D5 会場

合成生物化学的アプローチによる新規ジテルペン創製

New diterpene development by synthetic biochemical approaches

○小嶋 柚、夏目 雅裕、川出 洋（東京農工大院農）
○Yuzu KOJIMA, Masahiro NATSUME, Hiroshi KAWAIDE (Tokyo Univ. of Agri. and Tech.)

【目的】テルペン／テルペノイドは天然有機化合物の中でも多彩な生物活性を有する化合物の一群であり，構造の多様性とともに医農薬，食品，工業用として私たちの生活の中で重要な役割を担っている。私たちは，炭素数２０のジテルペノイド化合物の生合成研究を展開する過程で，酵素構造と酵素機能の相関関係を調べてきた。π-カチオン相互作用や活性中心のキャビティの変化により環化反応メカニズムを合理的に理解すべく，下等な陸上植物から高等植物に至るジテルペン環化酵素について多くの知見を得てきた。今回，高等植物のジテルペン環化酵素を鋳型にして合成生物化学的アプローチから新たなジテルペン骨格を創製する新規酵素の作出を試みた。

【方法と結果】ナンヨウアブラギリ（*Jatropha curcas*, トウダイグサ科植物）からクローニングしたカスベン合成酵素（JcCSH）をモデルにして、既に X 線結晶構造解析がなされており、アミノ酸配列の相同性が高い Aristolochene 合成酵素を用いたホモロジーモデリングを実施した。モデリングの結果から、活性中心におけるπ-カチオン相互作用を担う芳香族アミノ酸や空間支配を担う疎水性アミノ酸を複数特定し、JcCSH のアミノ酸点変異体を作製した。変異体プラスミドを大腸菌 JM109 株に導入して組換え JcCSH 変異酵素を得た。変異酵素は精製した後，JcCSH の基質となるゲラニルゲラニル二リン酸（GGPP）と反応させ、反応終了後に酵素生成物をヘキサンで抽出し， GC/MS で分析した。その結果、JcCSH 493 番目のイソロイシンをアラニンに変異させた JcCSH-I493A 変異体において、本来の反応生産物であるカスベンとは異なるジテルペンのマススペクトルが確認された。今後は、^{13}C-NMR を用いた構造決定を目指して JcCSH-I493A 変異体反応生産物の完全 ^{13}C 標識体を酵素合成し、生成物の構造解析を進めると共に、イソプレンユニットアイソトポマーの合成により反応機構を明らかにする。

cyclase, homology modeling, casbene synsthase

発表責任者：小嶋 柚（s180971w@st.go.tuat.ac.jp）

講演番号：4D5a10
講演日時：3 月 27 日 10:49～ 1 号館 D5 会場

ゼニゴケ（*Marchantia polymorpha*） の精子誘引物質の探索
Purification and structure estimation of a putative sperm chemoattractant in the liverwort *Marchantia polymorpha*
○山崎 由美子[1]、竹村 美保[2]、松川 哲也[1]、大和 勝幸[1]、梶山 慎一郎[1] ([1]近畿大院・生物理工、[2]石川県大生資研)
○Yumiko YAMASAKI[1], Miho TAKEMURA[2], Tetsuya MATSUKAWA[1], Katsuyuki YAMATO[1], Shinichiro KAJIYAMA[1] ([1]BOST, Kindai Univ., [2]Ishikawa Pref. Univ.)

【背景と目的】
受精における卵との融合に先立ち、精子は卵に誘引される。この現象を精子走化性と呼び、精子を誘引するために用いられる物質を精子誘引物質という。これまで主にウニやヒトデといった海産動物などを用いて、この現象の解明が試みられてきた。しかしながら、精子走化性の分子生物学的なメカニズムについては未解明の部分が多く、生物種間にみられる多様性に関する知見も限定的である。そこで、我々は分子遺伝学的リソースが充実しているゼニゴケに注目した。ゼニゴケは、ヒトと同様に精子と卵による受精を行い、それらの採取も容易である。また、全ゲノムが解読されていること、ゲノム編集を含む形質転換法が確立されていること、生活環のほとんどを半数体で過ごすために表現型の観察が容易であること、栽培も容易であることから、ゼニゴケは精子走化性の分子機構および多様性を明らかにするモデルとして期待できる。
今回、ゼニゴケの精子誘引物質の単離および同定を目的とし、その候補物質を単離したので報告する。

【方法と結果】
凍結保存されたゼニゴケの雌生殖器である、雌器托を試料とし、これをアセトンに 1 週間浸漬後、上清を粗抽出液とした。粗抽出液を精子誘引活性試験に供し、活性物質の有無を検討した。誘引活性に用いる精子は、雄器床に蒸留水を垂らし 1 分静置したのち回収することで得た。粗抽出液と 2%アガロースゲルの混合物をガラスキャピラリーに充填し、その先端を精子懸濁液に挿入し、先端における精子の集合の有無について顕微鏡を用いて観察することにより活性を評価した。その結果、粗抽出液に顕著な精子誘引活性が認められた。そこで、活性を指標として粗抽出物を順相クロマトグラフィーおよび逆相クロマトグラフィーを組み合わせ精製することを試みた。その結果得られた画分を紫外可視分光法、LC-ESI-MS および核磁気共鳴スペクトルにより構造解析に供したところ、主としてフラボンの特徴を有する化合物が 2 種認められた。現在、さらなる精製および活性評価を行っている。

Bryophyto, sperm chemotaxis, sperm chemoattractant

発表責任者：山崎　由美子（1833710017j@waka.kindai.ac.jp）

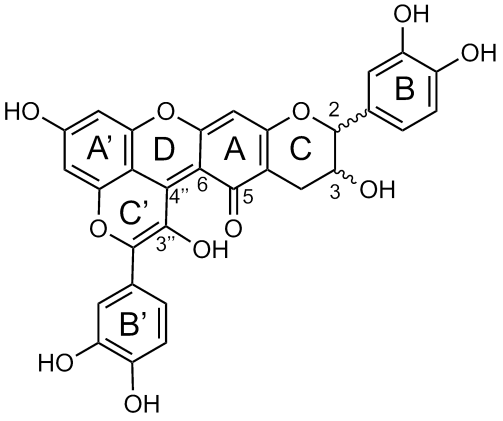
講演番号：4D5a11
講演日時：3 月 27 日 11:10～ 1 号館 D5 会場

赤アズキ種皮に含まれ餡に移行する紫色色素の絶対立体配置の決定
Absolute stereo structure of purple pigments of red adzuki bean

○吉田 久美[1]、井内 哲[1]、橋本 勝[3]、清水 俊順[1]、永井 伸和[2]、近藤 忠雄[1]([1]名大院情報学、[2]名大院情報科学、[3]弘前大農生)
○Kumi YOSHIDA[1], Satoru IUCHI[1], Masaru HASHIMOTO[3], Toshimichi SHIMIZU[1], Nobukazu NAGAI[2], Tadao KONDO[1] ([1]Sch. Info, Nagoya Univ., [2]Grad. Sch. Info. Sci., Nagoya Univ., [3]Fac. Agr. Life Sci., Hirosaki Univ.)

【目的】赤小豆（*Vigna angularis*）は、製餡加工されて和菓子等に用いられるのが主な用途である。煮熟中に種皮色素が餡粒子へと移行し、餡が紫色となる。我々はこれまで、赤小豆種皮に含まれる紫色色素の構造研究を行っており、昨年度の本大会で、２種類の色素、カテキノピラノシアニジン A(**1**)及び B(**2**)の単離と相対構造を報告した。これらはカテキンとシアニジンが縮合した新規骨格を持つことが明らかになった[1,2]。しかし、カテキン部分の絶対立体配置は不明であった。今回、計算化学的手法を用いて絶対立体配置の決定を行った。

【方法・結果】北海道産赤小豆（品種　エリモショウズ）を溶媒抽出し、抽出液を各種クロマトグラフィーで精製し、**1** と **2** を単離した。これらを種々の機器分析と分解反応、誘導体化に付し、**1** 及び **2** の平面構造を決定した。**1** は、カテキン部分の 2, 3 位の立体がトランス配置、**2** はシス配置であることが、NMR の結合定数から推測され、両者はこの位置の立体に関するジアステレオマーであると考えられた。**1** と **2** はいずれも可視吸収スペクトルで 560 nm 付近に極大を持ち、円二色性（CD）においてはこの位置に **1** は正の、**2** は負のコットン効果を示した。**1** と **2** のコンフォメーション解析を行い、さらに 2,3 位の置換基を水素に変えたモデル分子を構築して CD の計算を行ったところ、560 nm 付近のコットン効果の正、負は 6 位付近のヘリシティーによって決定されることがわかった。しかし、ヘリシティーが異なるコンフォメーション間のエネルギー差は極めて小さく両方が共存すると考えられ、**1** 及び **2** においてこのヘリシティー由来のコットン効果はキャンセルされることがわかった。そこで、**1** 及び **2** の安定配座から計算した CD の値からそれぞれのモデル分子の CD を差し引くこととした。すると、ポテンシャルエネルギーが低い順に選んだ 13 配座（化合物 **1**）と 11 配座（化合物 **2**）の安定コンフォーマー全てにおいて、2*R*, 3*S* 体は正の、2S, 3*S* 体は負のコットンが生じることがわかった。以上から、**1** が(+)-カテキン型、**2** が(–)-エントエピカテキン型の立体配置を持つと決定した。現在、**1** のメチル化体への誘導と改良 Mosher 法の適用に向けた実験を進めている。



スキーム：1、及び 2 の構造

1）第 59 回天然有機化合物討論会要旨集（2017. 9、札幌）
2）日本農芸化学会 2018 年度大会（2018. 3、名古屋）

catechinopyranocyanidin, circular dichroism, Vigna angularis

発表責任者：吉田久美（yoshidak@i.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：4D5a12
講演日時：3 月 27 日 11:21～ 1 号館 D5 会場

シーベリー(*Hippophae rhamnoides*)葉の機能性に関する研究

Study on the functionality of Sea berry (*Hippophae rhamnoides*) Leaves

○軍司 真究[1]、妙田 貴生[1]、堀 容嗣[1]、戸枝 一喜[1]、橋本 朋子[2] ([1]東農大農、[2]士幌町)
○Masami GUNJI[1], Takao MYODA[1], Youji HORI[1], Kazuki TOEDA[1], Tomoko HASHIMOTO[2] ([1]Tokyo Univ. of Agric., [2]Town of shihoro)

【目的】

シーベリー (*Hippophae rhamnoides*) はグミ科の落葉低木で雌雄異株の植物である。果実はオレンジ色を呈し、リコピンやカロテン、ケルセチン、ビタミン C などを含有することが報告されている。抗酸化を始め様々な機能性を有することから、食品素材や化粧品素材など幅広く用いられている。一方、葉はヨーロッパの一部でお茶として利用されているが、日本では未利用資源の 1 つとなっている。そこで本研究は、シーベリー葉の機能性を評価し化粧品・食品素材としての可能性を検討した。

【方法・結果】

北海道士幌町にて栽培されるシーベリー雄株の葉を試料とし、乾燥葉からエタノール抽出物を調製した。これを DPPH ラジカル消去活性、コラゲナーゼ阻害活性、チロシナーゼ阻害活性、α-グルコシダーゼ阻害活性、膵リパーゼ阻害活性および抗菌活性試験に供して、各種機能性の程度を評価した。その結果、DPPH ラジカル消去活性、コラゲナーゼ阻害活性、チロシナーゼ阻害活性および α-グルコシダーゼ阻害活性試験において活性が認められ、粗抽出物の IC 50 値は 1mg/ml 以下であった。そこで、SephadexLH-20 カラムクロマトグラフィーによる分画を行った。DPPH ラジカル消去活性能を指標として、活性フラクションが得られたことから、現在は化合物の単離を進めている。

Sea Berry, *Hippophae rhamnoides*, antioxidant

講演番号：4D5a13
講演日時：3 月 27 日 11:32～ 1 号館 D5 会場

高ケルセチン含有レッドオニオン抽出液における核内受容体 PPARγ活性化物質の探索
Search for nuclear receptor PPARγ agonist in high quercetin-containing red onion extraction
○土居 幹生[1]、森田 直樹[2]、岡本 大作[3]、橋床 泰之[4] ([1]北海道大学農学院、[2]産業技術総合研究所、[3]株式会社植物育種研究所、[4]北海道大学院農学研究院)
○Mikio Doi[1], Naoki Morita[2], Daisaku Okamoto[3], Yasuyuki Hashidoko[4] ([1]Graduate School and Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University, [2]National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, [3]Plant Breeding Institute Co., Ltd., [4]Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University,)

【背景と目的】核内受容体であるペルオキシソーム増殖因子活性化受容体γ（PPARγ）は、リガンド応答性の転写因子であり、脂肪生成、グルコースや脂質の恒常性、ならびに炎症応答に重要な役割を果たしている。PPARγのリガンドポケットは著しく大きいことが知られており、脂肪酸やエイコサノイドをはじめ分子構造の異なる様々な化合物と相互作用することが報告されている。PPARγを含めた核内受容体に対するリガンドは、機能性食品の有望な機能性成分の開発につながるとの期待があり、現在、精力的な研究が行われている。今回、我々は育種により開発されたケルセチン高含有量レッドオニオン「さらさらレッド」の水抽出液が PPARγの活性を上昇させることを見出したので、PPARγを活性化する化合物本体の単離同定を試みた。
【方法と結果】核内受容体である PPARγの活性は、ルシフェラーゼを用いたレポーターアッセイにより、発光強度として測定した。抽出材料であるレッドオニオン「さらさらレッド」をスライス後に凍結乾燥し、乾燥重量で 2 g を 20 ml の超純水で 1 日間振とう抽出後、遠心およびろ過し、水抽出液を調製した。この「さらさらレッド」水抽出液を 0.5%、2%、あるいは 5%添加した水溶液を PPARγレポーターアッセイにかけ、発光強度を測定したところ、濃度依存的に活性の上昇を認めた。「さらさらレッド」は quercetin を多く含有するため、標品の quercetin およびその配糖体について PPARγ活性化能を検定するため、quercetin（0.16 μg/ml-0.02 mg/ml）、quercetin-4'-*O*-β-glucoside（4 μg/ml-0.2 mg/ml）ならびに quercetin-3,4'-*O*-di-β-glucoside（4 μg/ml-0.5 mg/ml）を添加し、同じ検定に供した。その結果、quercetin と上記２つの quercetin 配糖体はほとんど活性を示さなかった。そのため、活性が認められる粗抽出液を親水性相互作用クロマトグラフィーカラムによる HPLC 分取にかけ、16 画分を分取した。各画分それぞれについて PPARγ活性化能を測定したところ、極性の高い第 2 画分のみに高い PPARγ活性化作用が認められた。本画分を濃縮し、TLC により確認した結果、ニンヒドリンで薄い赤色を示し、バニリン硫酸で白色に抜ける特徴的なスポットを検出した。このスポットを指標として試料のスケールアップを図り、凍結乾燥した「さらさらレッド」300 g（タマネギ新鮮重約 3 kg 相当）を 2 L の超純水で 1 日間振とう抽出し、同様に遠心・ろ過後、これを逆相カラムおよびイオン交換カラム等の各種クロマトグラフィーで分画し、目的物を精製した。活性本体と思われる化合物について MALDI-TOF-MS および ESI-MS 精密質量分析、さらには核磁気共鳴解析等による構造決定を試み，これが構造未知の含硫アミノ酸であるとの結論に達した。現在、構造解析を進めているところである。

pparγ, agonist, structure determination

発表責任者：土居幹生（doimikio@abs.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：4D5a14
講演日時：3 月 27 日 11:43～ 1 号館 D5 会場

LC-APCI-MS/MS による黄色花弁中の Neoxanthin ester と Violaxanthin ester の迅速識別

Rapid identification of Neoxanthin and Violaxanthine ester in the yellow flowers using LC-APCI-MS/MS

○渡辺 健宏、東 鋭明、堀川 学、村田 純、山垣 亮 (サントリー生命科学財団)
○ Takehiro WATANABE, Toshiaki AZUMA, Manabu HORIKAWA, Jun MURATA, Tohru YAMAGAKI (Suntory Foundation for Life Sciences)

黄から橙色系統の花弁や果実には多くのカロテノイド色素およびそれらの誘導体が含まれ、それらの詳細な解析は交配の履歴などを知る重要な手掛かりとなる。トマトの花は、Violaxanthin や Neoxanthin ester などのカロテノイドが含有されることが報告されているが、これらのカロテノイドエステルの分析には、容易に酸化や異性化が起こる、解析の妨害になるトリアシルグリセロールが含まれているなどの問題がある。そのため、抽出から機器分析までのサンプル調製の慎重さと迅速な手順で(1)HPLC-フォトダイオードアレイ検出器(PDA)による花弁を特徴付けるシグナルの探索、(2)骨格を明確にするためケン化処理を行ったプロトン核磁気共鳴スペクトル(^{1}H-NMR)、(3)高分解能質量分析スペクトル(HRMS)からカロテノイドエステルの分子量決定といった構造解析の戦略を進めなければならない。一方で、HPLC-PDA-APCI-MS/MS 法でそれぞれのカロテノイドエステルの特徴的な吸収スペクトルや MS 値、MS/MS のフラグメントパターンを得ることが出来れば、少量で迅速なカロテノイドエステルの簡易識別法となる。

黄色色素成分の抽出はアセトンで行い、LC-PDA-APCI-MS/MS 測定を行った。精密質量分析は APCI イオン化を用いて正イオン測定モードで行った。UV-vis、NMR、MS 解析から Neoxanthin および Violaxanthin diester と明らかにされている MS クロマトグラム中のピークのプロトン付加イオンとそれらの APCI イオン化時に形成される脱水イオンをプレカーサーイオンとした MS/MS 断片化を行った。それぞれのプロトン付加イオンの断片化パターンからは違いは観られなかったが、脱水イオンの断片化パターンに違いが観られた。Dehydrated violaxanthin myristate - palmitate の MS/MS スペクトルでは、C_7H_8 に相当する 92u の脱離イオンが比較的強い強度で観測されたが、これは電子環状反応を経て脱離する断片化イオンである。一方、Neoxanthin は、骨格中にアレン構造(C=C=C)があり、気相中の電子環状反応が起こる距離までのπ電子近接を抑制していると考えられ、92u の脱離イオンはほとんど観測されなかった。 この結果から CID 断片化パターンの解析は、同一分子量のカロテノイドを簡易に識別する手段となり得る。

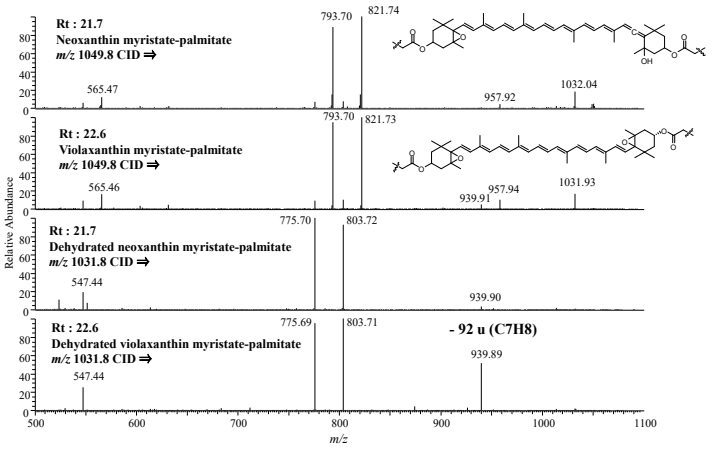


Fig. LC-APCI-MS/MS spectra of neoxanthin and violaxanthin diesters

LC-APCI-MS/MS, Neoxanthin diester, Violaxanthin diester

講演番号：4D5a15
講演日時：3 月 27 日 11:54～ 1 号館 D5 会場

オタネニンジンからの育毛活性物質の探索
Seach for bioactive compounds involved in hair growth from *Panax ginseng*
○繁森 英幸[1]、鈴木 葵[2]、松山 茂[1]、松浦 大輔[3]、金谷 裕敏[3]、谷野 伸吾[3]、綱川 光男[3]([1]筑波大生命環境、[2]筑波大院生命環境、[3]（株）バスクリン)
○ Hideyuki SHIGEMORI[1], Aoi SUZUKI[2], Shigeru MATSUYAMA[1], Daisuke MATSUURA[3], Hirotoshi KANATANI[3], Shingo YANO[3], Mitsuo TSUNAKAWA[3] ([1]Univ of Tsukuba, Fac. Life and Environ. Sci., [2]Univ of Tsukuba, Grad. Sch. Life and Environ. Sci., [3]Bathclin Corp.)

【目的】日本人の４人に１人が脱毛や薄毛で悩んでおり、育毛に有効な素材の探索や、より良い育毛剤の開発が求められている。代表的な脱毛症である男性型脱毛症（AGA）は、男性ホルモンの影響で脳由来神経栄養因子（Brain-derived Neurotrophic Factor、BDNF)が産生され、受容体である TrkB と結合した結果、毛包が退縮することで引き起こされることが知られている。オタネニンジン（*Panax ginseng*）は、古くから様々な薬効が知られており食用・薬用に利用されてきたほか、育毛効果についても注目されている。

そこで本研究では、BDNF 受容体結合阻害活性を指標にしてオタネニンジンエキスから活性物質を探索し、動物モデルを用いた育毛効果についても調べ、*P. ginseng* エキスの育毛活性を総合的に評価することを目的とした。

【方法および結果】生物活性については、ELISA 法を用いて BDNF の受容体である TrkB を ELISA プレートにコーティングし、サンプル添加後に BDNF を添加し、BDNF と TrkB の結合の度合いを測定することで評価した。また、β-NGF とその受容体である p75-NTR の阻害活性についても、同様の手法で評価した。まず、オタネニンジンを含水有機溶媒で抽出し、BDNF 受容体結合阻害活性を指標にして、活性の認められた画分について種々のクロマトグラフィーを用いて活性物質の分離・精製を行った。NMR や MS 等の機器分析を用いて得られた化合物の構造解析を行った結果、6 種のポリアセチレン化合物を同定した。次に、得られた化合物について BDNF 受容体結合阻害活性を調べたところ、酸素官能基が多い化合物ほど強い活性を示したが、β-NGF 受容体結合阻害活性については一様に活性が認められた。さらに男性型脱毛症モデルマウスを用いてオタネニンジンのヘキサン抽出物および 70%エタノール抽出物の育毛活性試験を行った結果、ポリアセチレン化合物を多く含むヘキサン抽出物（PGHE-ext）に男性型脱毛症モデルマウスの背部皮膚において有意な毛再生率の増加が認められた。

これまでオタネニンジンの育毛作用の主な有効成分はサポニン類であると考えられてきたが、本研究により新たにポリアセチレン化合物の有効性を示すことができた。今回活性の認められたポリアセチレン化合物を多く含むエキスを作製することにより、より効果の高い育毛剤の開発が期待される。

Panax ginseng, polyacetylene, hair growth

発表責任者：繁森英幸（shigemori.hideyuk.fn@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：4D7a06
講演日時：3 月 27 日 10:05～ 1 号館 D7 会場

Pyruvate dehydrogenase 複合体過剰発現による遺伝子組換え Cyanobacteria の isopropanol 生産向上

Improvement of isopropanol production of engineered cyanobacteria by overexpression of pyruvate dehydrogenase complex

○花井 泰三、久保 武史、広川 安孝（九大農）
○Taizo HANAI, Takeshi KUBO, Yasutaka HIROKAWA (Kyushu Univ.)

【目的】

シアノバクテリアに、異種生物由来の酵素遺伝子群からなる合成代謝経路を導入することで、CO_2 から直接的な物質生産が可能となる。この合成代謝経路の出発物質としては、解糖系下流に位置する Pyruvate、Acetyl-CoA が用いられることが多い。当研究室でも *Synechococcus elongatus* PCC 7942 を用いて、Acetyl-CoA を出発物質とした Isopropanol(IPA)生産に成功している。しかし、その生産量は 0.55 mM と低く(Hirokawa et al., 2017)、さらなる生産性の向上が望まれている。この原因として、細胞内 Acetyl-CoA 量が他の代謝物と比較して低いことが指摘されている。一方で、細胞内 Pyruvate 量は Acetyl-CoA の約 100 倍であるという報告がある(Dempo et al., 2014)。そこで、本研究では、Pyruvate dehydrogenase 複合体(PDH)を過剰発現させ、Pyruvate から Acetyl-CoA への代謝流束を増大させることで IPA 生産性の向上を目的とした。

【実験方法と結果】

PDH の遺伝子である *pdhABCD* を *S. elongatus* PCC 7942 のゲノム上に相同組み換えにより導入し、過剰発現させ、PDH 活性と中間代謝物量を測定した。また、IPA 生産株に PDH を過剰発現させ、IPA の生産量を比較した。なお、IPA は揮発性のため、1% CO2 通気培養を 10 日間行った後、菌体を密栓フラスコに移し、さらに 10 日間培養することで IPA 生産実験を行った。この時、炭素源として 2 日毎に 10 mM $NaHCO_3$ を添加し、pH 調整は毎日行った。

PDH の過剰発現により、顕著な PDH 活性の向上を示した。また、細胞内 Acetyl-CoA 量は、2.65 倍と増加した。IPA 生産合成代謝経路を構成する酵素遺伝子の組み合わせ、および遺伝子発現プロモーターの最適化を行ったところ、その最大生産量は 4.87 mM(292 mg/L)となった。

【考察】

シアノバクテリア内で PDH を過剰発現させ、IPA 生産合成代謝経路を構成する酵素遺伝子の最適化、プロモーターの変更を検討した結果、従来の IPA 生産株の 8.85 倍に生産量が増加した。PDH の過剰発現は、細胞内の Acetyl-CoA を出発材料とする *S. elongatus* PCC 7942 を用いた物質生産（例えばブタノールなど）の生産性向上に有用であると考えられた。ただし、培地中には、IPA に変換可能な Acetate が多く残存しており、IPA 生産合成代謝経路の改変により、さらなる生産量の向上が考えられた。

Cyanobacteria, bio-production, synthetic metabolic pathway

発表責任者：花井泰三（taizo@brs.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：4D7a07
講演日時：3 月 27 日 10:16～ 1 号館 D7 会場

C5C6 発酵酵母による廃菌床由来バイオエタノールの発酵生産
Ethanol production from waste mushroom bed biomass by xylose-fermenting yeast
○小林 洋介[1]、藤森 一浩[2]、西島 拓人[1]、杉本 直久[1]、藤野 尚人[1]、栗原 大樹[3]、今井 史規[3]、金松 雅俊[3]、山田 憲治[3]、荒井 進[3]、吉田 浩爾[1]、佐賀 清崇[1]、泉 可也[1]([1](株) Biomaterial in Tokyo、[2]産総研・生物プロセス、[3]三友プラントサービス (株))
○ Yosuke Kobayashi[1], Kazuhiro E. Fujimori[2], Hiroto Nishijima[1], Naohisa Sugimoto[1], Naoto Fujino[1], Daiki Kurihara[3], Fuminori Imai[3], Masatoshi Kanematsu[3], Kenji Yamada[3], Susumu Arai[3], Kouji Yoshida[1], Kiyotaka Saga[1], Yoshiya Izumi[1] ([1]Biomaterial in Tokyo Co., Ltd, [2]AIST. BPRI, [3]Sanyu Plant Service Co., Ltd)

【背景】食用キノコの栽培に用いられた菌床（廃菌床）は残渣として処理されてきたが、我々はセルロース系エタノールへ転換が可能な未利用バイオマスの一つになり得る原料として着目してきた(小林他、第 70 回日本生物工学会大会)。廃菌床は高い有機酸濃度の他、様々な発酵阻害物質を含有し、他のバイオマス原料に比べて Xylose の糖含有率が高いため、Xylose を効率的に Ethanol に変換可能な発酵微生物が必要不可欠である。我々はこれまで *Saccharomyces cerevisiae* IR-2 株を宿主とし、種々の Xylose 資化性の改良を行い、アルカリ浸漬爆砕バガスおよび希硫酸浸漬爆砕バガスから高効率でセルロース系エタノール生産が可能な C5C6 同時発酵酵母の開発を行ってきた(藤森他、第 69 回日本生物工学会大会)。本研究では、これまで開発してきた酵母の中から、廃菌床糖化液を用いたエタノール発酵に最も適した酵母株を選抜し、将来の商業化発酵プロセスを考慮して、最適株の植菌量について検討を行った。
【方法・結果】廃菌床の前処理は、連続水蒸気爆砕装置を用いて行った。糖化は、乾燥重量当たり廃菌床爆砕物濃度 25% (w/w)、pH5.0, 50℃, 48 h により複数回行った。その結果、70 g/L Glucose 及び 25 g/L Xylose 以上の糖を含む糖化液を得ることができた。得られた糖化液の糖含有量は同一サンプル、同一条件前処理による Lot.間でほとんど差は生じなかったが、Formic acid と Furfural については、濃度に大きなばらつきが生じた。これらの糖化液に対して、アルカリ浸漬爆砕バカスまたは希硫酸浸漬爆砕バガスにおいて高い発酵性能を示した酵母株の前培養液を 1/10 量(初発植菌量: 約 OD600=約 4.0)添加することにより 38℃、微好気条件下でエタノール発酵を試みた。これまで最も高いエタノール収率を記録した B16 株は発酵に著しい遅延が生じたが、発酵阻害物質耐性を付与した株、特に C15 株は糖化液中の Glucose 及び Xylose のほとんどを 72 h 以内に消費し、投入した全糖から Ethanol への変換効効率は 90%以上を示した。この結果から、C15 株が検討した株の中で最も爆砕廃菌床のエタノール発酵に適していることが明らかになった。次に、植菌量を変化させたところ、1/20 量(初発植菌量:約 OD600=約 2.0)まで減らしても十分発酵可能であることを明らかにした。本研究により、廃菌床はセルロース系エタノール生産に適した基質であることをはじめて明らかにした。
※本研究はバイオマスエネルギー技術研究開発/セルロース系エタノール生産システム総合開発実証事業/パルプを用いた水蒸気爆砕法によるバイオエタノール生産に関する技術開発および事業性評価(NEDO) による成果である。

Ethanol, Saccharomyces cerevisiae, Xylose

発表責任者：小林洋介（kobayashi.y@biomt.onmicrosoft.com）

講演番号：4D7a08
講演日時：3 月 27 日 10:27～ 1 号館 D7 会場

リグニン由来フェノール類からのプロトカテク酸の生産

Protocatechuic acid production from lignin-derived phenols

○後藤 杏香[1]、上村 直史[2]、稲垣 翔[3]、宮本 正紀[3]、政井 英司[2]、園木 和典[1]（[1]弘前大院・農学生命、[2]長岡技大院・工・生物、[3]DIC 株式会社）
○Kyoka GOTO[1], Naofumi KAMIMURA[2], Sho INAGAKI[3], Masanori MIYAMOTO[3], Eiji MASAI[2], Tomonori SONOKI[1]（[1]Hirosaki Univ. of Grad. Sch. Agric. Life Sci., [2]Nagaoka Univ. Tech. of Grad. Sch. Eng., [3]DIC Corp.）

【目的】我々はこれまでに、*Pseudomonas putida* KT2440 株の代謝経路を利用することで、スギを化学分解して得られるフェノール類の混合物から、基幹化合物である *cis,cis*−ムコン酸 (ccMA) を効率よく生産できることを報告した[1)]。この微生物株は、G-リグニンと H-リグニン由来の様々なフェノール類をプロトカテク酸 (PCA) へと収束した後、ccMA へと変換する。ccMA 生産条件の検討過程において、フェノール類の供給速度を大きくすると代謝中間体である PCA が細胞外へ排出されることが確認された[2)]。PCA は化成品原料やその抗酸化作用に注目した用途などが提案されている[3) 4)]。そこで本研究では *P. putida* KT2440 株の代謝経路を利用して、リグニン由来のフェノール類から PCA を生産できる微生物株の作出を検討した。

【結果】PCA 3,4-dioxygenase 遺伝子 (*pcaH*, *pcaG*) を破壊した IDP 株は、G-リグニンモデルであるバニリン酸 (VA) と H-リグニンモデルである 4-ヒドロキシ安息香酸 (HBA) の資化能を失った。この IDP 株を用いて VA と HBA からの PCA 生産を評価した結果、変換速度が小さく、VA と HBA の細胞内への取込みや、ゲノム DNA 上の VA *O*-demethylase 遺伝子 (*vanA*, *vanB*) 、HBA 3-monooxygenase 遺伝子 (*pobA*) の発現が十分に誘導されていないことが示唆された。そこでラクトースプロモーター配列の制御下に *vanA*、*vanB* そして *pobA* を連結したプラスミドを作成し、同プラスミドを組込んだ形質転換体の PCA 生産能を評価した結果、VA と HBA の変換速度が 7 倍以上に上昇した。ミニジャーファーメンターを用いて、PCA 生産能をさらに評価した結果、同株はスギの化学分解物に含まれる主なフェノール類で構成したスギリグニン分解物モデルから 15 g/L 以上の PCA を理論収量で生産できることを明らかにした。

本研究の一部は JST-ALCA (JPMJAL1506) の支援を受けて実施した。

[1)]園木ら、BIO INDUSTRY (2018). [2)]栗本ら、日本農芸化学会 2018 年度大会. [3)]Wang J et al, Appl Microbiol Biotechnol (2017). [4)]An LJ et al、Food Chem Toxicol (2006).

Lignin, Protocatechuic acid, *Pseudomonas putida*

発表責任者：園木 和典（sonoki@hirosaki-u.ac.jp）

講演番号：4D7a09
講演日時：3 月 27 日 10:38～ 1 号館 D7 会場

Isobutylene production via biological conversion by wood-rot fungus *Fomitopsis palustris*

○Jeong-Jun YOON[1], Do-Hyung KIM[1], Yong-Cheol PARK[2] ([1]Kor. Inst. of Industri. Technol. (KITECH), [2]Kookmin Univ.)

Isobutylene (2-methyl propene) is an industrially significant hydrocarbon. It is an alkene with four branched carbons, and it is a colorless flammable gas at standard temperature and pressure (STP) with a characteristically unpleasant smell. In chemical reactions, it is a suitable monomer for addition polymerization owing to its carbon-to-carbon double bond. Generally, isobutylene is produced by petroleum-derived chemical processes, but manufacturing methods using renewable sources, such as biomass, have been considered because of limited amounts of fossil fuel and environmental issues. In this study, isobutylene was obtained from isobutanol through dehydration by hydrogen ions generated from oxalic acid and the Fenton reaction during the fermentation of wood-rot fungus, *Fomitopsis palustris*. For isobutylene conversion, isobutanol and air were introduced into the fermenter. The medium and isobutanol, which were evaporated during fermentation, were condensed by the coil reflux condenser and refluxed into the fermenter. The air passed through the condenser and adsorption column in turn. At this time, converted isobutylene gas contained in the air was adsorbed on the cells inside the adsorption column, and this column was analyzed by GC-FID. Isobutylene was obtained from the synthetic mechanism, and it was confirmed by gas chromatography (GC). The maximum production rate of isobutylene was 34.7 nmol h^{-1} g_{cell}^{-1}. This was approximately 5.9 times more than a previous study of isobutylene production using *Saccharomyces cerevisiae* mevalonate diphosphate. Unlike previous biological production studies of isobutylene, our findings showed that isobutylene was converted through the dehydration of isobutanol during fermentation of *F. palustris*. The conversion rate of isobutylene in this study was insufficient for mass production, however, the conversion rate may be improved via optimization and genetic engineering of *F. palustris*.
This work was supported by the Technology Innovation Program (10048684, Bio-based production of isobutylene) funded by the Ministry of Trade, Industry, Energy (Korea).

biological conversion, Fomitopsis palustris, Isobutylene

発表責任者：Jeong-Jun YOON（jjyoon@kitech.re.kr）

講演番号：4D7a10
講演日時：3 月 27 日 10:49～ 1 号館 D7 会場

分離菌群による光学活性 L-乳酸生産のためのメタ発酵プロセスの再構築

Reconstruction of meta-fermentation process by isolated strains for optically pure L-lactic acid production

○田代 幸寛[1]、溝口 尊春[1]、古原 俊哉[1]、宮本 浩邦[2,3]、酒井 謙二[1]([1]九大院・農、[2]千葉大・園、[3]サーマス)

○ Yukihiro TASHIRO[1], Takaharu MIZOGUCHI[1], TOSHIYA KOHARA[1], Hirokuni MIAYAMOTO[2,3], Kenji SAKAI[1] ([1]Fac. Agr., Kyushu Univ., [2]Fac. Horticul., Chiba Univ., [3]Sermas)

我々は、複合微生物系による未利用資源からの有価物生産のための発酵法として『メタ発酵』を提唱している[1)]。単一微生物が資化できない複合基質（廃棄物など）を複合微生物系では資化できる、殺菌が不必要、雑菌混入に対して強い、設備やエネルギーコストが低いなどがメリットに挙げられる。しかしながら、デメリットとしては、単一基質の変換が非効率的、生成物が複雑（ヘテロ発酵となりやすい）、微生物解析が複雑、発酵制御が困難、などがある[2)]。すなわち、単一微生物を用いた純粋発酵に比べて、メタ発酵における理論の体系化や制御技術に関する知見は著しく少ない。これまでに、堆肥を種菌とした糖化生ゴミからのメタ発酵において、発酵温度制御による L-乳酸生産の高光学純度化[3)]および新規な pH 切替制御法による L-乳酸生産の高速化[4)]に成功している。さらに、体系的フィードバック分離法により、6 種の優占細菌を分離した[5)]。本研究では、分離菌群による非糖化生ゴミからのメタ発酵プロセスの再構築を行い、L-乳酸生産の効率化・制御化を目指した。

未利用海洋資源の高温発酵物を種菌として、未糖化または糖化した標準生ゴミ培地にて、pH を 24 h 毎に 7.0 に振動制御しながら、温度 50ºC でメタ発酵を行った。その結果、未糖化の場合でも同等の L-乳酸生産濃度（光学純度 100%）を得たことから、L-乳酸生産菌に加えて多糖類分解菌の存在が示唆された。さらに、次世代シーケンサーにて細菌群集構造を解析した結果、*Bacillus coagulans*（L-乳酸生産菌：C 菌）と *B. thermoamylovorans*（デンプン分解菌：T 菌）または *B. hisashii*（多糖類分解菌：H 菌）が優占であった。次に、先行研究[5)]で分離した C 菌 7 株[5)]、T 菌 5 株[5)]および H 菌 2 株[6)]を用いて、メタ発酵の再構築を検討した。その結果、全 14 株を用いた場合に、高温発酵物種菌に匹敵する最大 L-乳酸生産濃度（光学純度 100%）を得た。さらに、最適化を検討した結果、C 菌 1 株、T 菌 1 株および H 菌 2 株による最少菌株数でも同等の L-乳酸生産濃度が得られた。特に、*B. hisashii* は発酵後期に *B. coagulans* が分解・利用できない多糖類を分解し、乳酸生産濃度の向上に寄与していることが予測された。以上から、数株の分離菌の選択によってメタ発酵を再構築できる可能性が示唆された。

(1) 田代、酒井, バイオインダストリー, 72, 486-487, 2014. (2) 田代、酒井, 環境バイオテクノロジー, 16, 11-15, 2016. (3) Tashiro et al., Bioresour. Technol., 146, 672-681, 2013. (4) Tashiro et al., Bioreour. Technol., 216, 52–59, 2016. (5) Poudel, Tashiro et al., J. Biosci. Bioeng., 123, 63‐70, 2017. (6) Miyamoto et al., Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 65, 3944-3949, 2015.

Meta-fermentation, Optically pure L-lactic acid, Isolates

発表責任者：酒井　謙二（kensak@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：4D7a11
講演日時：3 月 27 日 11:10～ 1 号館 D7 会場

イチジク由来天然ゴムの TEM 観察とタンパク質分析
TEM observation and protein analysis of natural rubber from *Ficus carica*
○横田 早希[1]、千田 進介[2]、鈴木 健裕[3]、堂前 直[3]、後藤 猛[1]([1]秋田大院理工、[2]秋田大バイオセ 分子医学部門、[3]理研 CSRS)
○Saki Yokota[1], Shinsuke Chida[2], Takehiro Suzuki[3], Naoshi Dohmae[3], Takeshi Gotoh[1] ([1]Grad. Sch. Eng. Sci., Akita Univ., [2]Biosci. Edu. Res. Ctr., Akita Univ., [3]RIKEN CSRS)

【目的】パラゴムノキ（*Hevea brasiliensis*）由来天然ゴムはタイヤなどの原料として使用される天然資源である。天然ゴムは乳管細胞におけるラテックス中で，ゴムの主骨格である *cis*-1,4-ポリイソプレンがリン脂質一重膜で囲まれ，その周りに複数のタンパク質が結合したゴム粒子として存在する。パラゴムノキ由来天然ゴムは合成ゴムでは達成できない優れた物性を有するが，これはゴム粒子表面のタンパク質をはじめとする非ゴム成分のナノマトリックスにゴム成分が分散したナノマトリックス構造に起因すると報告されている。一方，パラゴムノキの栽培は熱帯の一部地域に限定されることから代替資源の開発が求められており，タンポポ（*Taraxacum brevicorniculatum*）などさまざまな未利用ゴム資源の研究が進められているが，それらの天然ゴムの相分離構造は明らかになっていない。我々は日本で生育可能なゴム生産植物であるイチジク（*Ficus carica*）に着目してきたが，イチジク由来天然ゴムはパラゴムノキに比べて物性が劣る。そこで本研究ではイチジク由来天然ゴムの相分離構造を明らかにすることを目的とした。

【方法と結果】イチジクの葉柄よりラテックスを採取した後アンモニアを添加し，遠心分離して得られたゴムを乾燥させることでイチジク天然ゴムを調製した。また，比較として市販のアンモニア含有パラゴムノキラテックス（HA-NR Latex，レヂテックス）を用い，これを乾燥させてパラゴムノキ天然ゴムを調製した。得られたゴム片はグルタルアルデヒドと四酸化オスミウムで固定および染色し，樹脂で包埋した後超薄切片を作製して，透過型電子顕微鏡（TEM）により観察した。その結果，パラゴムノキ天然ゴムではこれまでに報告されているようなナノマトリックス構造が明確に観察された。一方，イチジク天然ゴムはゴム粒子間の非ゴム成分相の厚さがランダムで，パラゴムノキ天然ゴムとは異なる相分離構造を有することが分かった。また，これまでにパラゴムノキ天然ゴムのナノマトリックス構造の形成にはタンパク質が重要であることが報告されている。そこでパラゴムノキおよびイチジク天然ゴムに含まれるタンパク質量および，主要なゴム粒子結合タンパク質として知られる Rubber elongation factor/ Small rubber particle protein (REF/SRPP) ファミリーの存在を分析した。その結果, イチジク天然ゴムにおける窒素含有率はパラゴムノキの約 2 倍の値を示すものの, REF/SRPP ファミリータンパク質はほとんど存在しないことが示唆された。

natural rubber, phase separated structure, rubber particle protein

講演番号：4D7a12
講演日時：3 月 27 日 11:21～ 1 号館 D7 会場

CE-C4D を用いた土壌抽出液中のアニオン分析のための前処理法の検討
Pretreatment method for anion analysis in soil extracts using capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detector
○栂 俊太朗[1]、植山 智紗[1]、長谷部 誉人[1]、蜷木 朋子[2]、藤井 紳一郎[3]、竹迫 紘[2]、小沢 聖[2]、安保 充[1] ([1]明治大農・農化、[2]明治大・黒川農場、[3]産総研・物質計測標準)
○Shuntaro TOGA[1], Chisa UEYAMA[1], Takato HASEBE[1], Tomoko NINAGI[2], Shinitiro FUJII[3], Hiroshi TAKESAKO[2], Kiyoshi OZAWA[2], Mitsuru ABO[1] ([1]Meiji Univ., [2]Meiji Univ. Kurokawa Farm, [3]AIST)

【背景目的】
土壌中の無機成分の組成比は土壌の使用履歴によって異なることから，各土壌に応じた施肥が求められる。実際の現場では電気伝導度（EC）を計測しながら施肥を行う栽培法もあるが，EC では無機成分の種類が分からず，特に硝酸イオンと塩化物イオンなどを区別できる分析手法が望まれる。この目的では従来イオンクロマトグラフィー（IC）が用いられるが，当研究室では将来的に装置の小型化が期待されるキャピラリー電気泳動（CE）-非接触型電気伝導度検出器（C4D）を用いた検討を行ったところ [1)]， IC と CE- C4D で定量結果に差がある土壌抽出試料が存在した。そこでアニオン組成の類似した模擬試料を作製し，1）誤差要因の特定，および 2）前処理法の検討を行った。
【方法・結果】
模擬試料として硝酸イオン，硫酸イオン，リン酸イオン（各 10 ppm）と塩化物イオン（10、100、1000 ppm）の計 3 種類の混合物を適宜希釈し，CE（P/ACE™ システム MDQ； Beckman Coulter）- C4D（ET-120; eDAQ）で分析した。使用キャピラリーはフューズドシリカ（内径 50 μm、有効長 45 cm），泳動バッファーは 80 mM リンゴ酸-10 mM ヒスチジン(pH 2.6)、印加電圧-25 kV で分析を行った [1)]。各イオンが同濃度の試料については，適切な希釈倍率によりピーク分離に問題はなく定量可能であったが，塩化物イオンが相対的に多量に含まれる試料に関しては，CE-C4D では硝酸イオンのピークに干渉してうまく測定できないことが分かった。一方，リン酸イオンは干渉を受けることなく測定できることが分かった。
次に前処理法の検討として，市販のハロゲン除去カートリッジ（Dionex OnGuard™II Ag）を用いたところ，塩化物イオンの干渉を受けていた硝酸イオンが定量可能となった。ただし，リン酸イオンはカートリッジによって共沈することが分かっているため，まずはリン酸イオンを定量した後，塩化物イオンが他のアニオンに比較して多量に含まれている試料の場合には，カートリッジによるハロゲン除去を行うという前処理が必要であることがわかった。
【参考文献】
1）栂ら (2018) CSJ 化学フェスタ 講演要旨 P6-018

Capacitively coupled contactless conductivity detector, Anion analysis, Soil extracts

発表責任者：安保充（abo@meiji.ac.jp）

講演番号：4D7a13
講演日時：3 月 27 日 11:32～ 1 号館 D7 会場

森林の物質循環におけるリター分解と土壌環境の関係解析
Effects of leaf litter decomposition and soil environments on nutrient cycling efficiencies in forests
○荒木 希和子、連 綾香、久保 幹（立命館大・生命）
○Kiwako S. ARAKI, Ayaka MURAJI, Motoki KUBO (Ritsumeikan Univ. of Life Sci.)

【背景・目的】 近年、森林資源の利用価値の低下や人手不足による森林の管理放棄に伴う、森林の持つ機能および健全性の低下が問題となっている。森林機能を回復するためには、産出される森林資源の持続的な利用を通じて、森林の管理を促す必要がある。森林生態系では、土壌から植物に吸収された養分は、落葉落枝として土壌に還元され土壌微生物による分解を経て、再び植物に吸収されるといった内部循環が存在する。したがって、森林の物質循環がどのような状態にあるかを把握したうえで、森林生態系における物質循環を適切に維持した森林管理を行う必要がある。特に、管理放棄された森林では、過剰な落葉落枝の蓄積によって、物質循環が阻害されていると推測される。本研究では、複数の森林環境において落葉の分解速度を測定・比較することで、樹木と土壌を介した物質循環の特徴を把握し、適切な森林管理とバイオマス利用につなげることを目的とした。
【方法】 滋賀県内に存在する管理体制の異なる二次林を対象に実験を行った。はじめに各森林より土壌を採取し、その成分を分析した。次に各森林土壌における落葉の分解速度の違いをリターバッグ法によって測定した。森林に優占する樹種もしくは特徴的な種を選定し、そのリター をメッシュ袋に入れて、その木の根元に埋め約 5 ヶ月間静置した。リター の分解に伴う成分組成の変化を調べるために、実験開始時に採取した落葉および回収したリターバッグ中の落葉について、成分分析を行った。
【結果】 土壌の成分分析の結果、炭素量は平均 73,000 mg/kg、窒素量は平均 2,400 mg/kg、リン量は平均 300 mg/kg、カリウム量は平均 3,900 mg/kg、総細菌数は 4.2 ~ 18.9 $\times 10^8$ cells/g-soil であり、いずれの森林環境でも炭素量が高く、リン量が低いことが分かった。分解前のリター中の窒素量は、同じ樹種でも森林によって大きく異なった。このことから、樹葉の養分濃度は、土壌の養分特性を反映していると推察される。リターの残存率は、57~83 %であり、リターの C/N 比が高いほど残存率が高い傾向が見られた。分解後のリター中の成分を分析した結果、リン残存率は平均 73.5%であり、リターの分解が進んでも、リンはリター中に残留することが分かった。一方、リター中のカリウム残存率は平均 27.7%であり、速やかに溶脱することが分かった。この結果から、分解に伴うリター中の養分の溶脱は、元素によって速さが異なることが明らかとなった。よって森林における落葉の分解過程と速度は、樹種組成と土壌環境によって異なり、森林ごとに微生物による物質循環を促進させる環境を維持する必要がある。

forest biomass, nutrient cycle, soil environment

講演番号：4D7a14
講演日時：3 月 27 日 11:43～ 1 号館 D7 会場

循環水耕液中の銅イオンの濃度管理に関する考察

Consideration on concentration control of copper ion in the hydroponic culture in plant factory

○酒井 秀太[1]、柳川 省吾[1]、松本 浩平[2]、手塚 理紗子[2]、伊藤 善一[2]、岡部 勝美[2]、安保 充[1]([1]明大農、[2]明大 黒川農場)
○Shuta SAKAI[1], Shogo YANAGAWA[1], Kohei MATSUMOTO[2], Risako TEZUKA[2], Yoshikazu ITO[2], Katsuyoshi OKABE[2], Mitsuru ABO[1] ([1]Meiji Univ., [2]Meiji Univ. Kurokawa Farm)

【背景目的】

植物工場における循環水耕液において，施肥時の必須（微量）元素濃度は一定に保たれている。水耕液の電気伝導度（EC）計測により肥料不足をモニターして，必要に応じて一定組成の肥料を供給するシステムを採用しているところもある。このような循環水耕液において微量元素のバランスが保たれているか調べたところ，銅イオン濃度が設定濃度である約 40 ppb から、栽培が進むにつれ上昇することがわかった。因みに，水道水の水質基準における銅イオンの基準は 1000 ppb であり，計測された銅イオン濃度は植物の生育阻害が起きる濃度ではないが，適正な水耕液管理を行う観点から、この原因解明を試みた。

【方法・結果】

まず，銅イオン濃度上昇が植物の吸収と供給のバランスにおいて生物的に起きているものなのか，使用水道水や器具に由来する無機的な原因であるか明らかにするため，栽培に使用している水道水，および貯蔵されている水耕液の微量金属分析を ICP-MS(PerkinElmer 社製 NexION 300D)を用いて行った。その結果，水道管からの水道水に含まれる銅イオンは 10 ppb 以下であった。従って，この水道水を使用して水耕液を作製しても水耕液の銅イオン濃度上昇に影響する濃度ではないと考えられる。

一方，貯蔵されている水耕液中の銅濃度は 40 ppb 以上になっていることから，無機的な要因の影響が示唆された。水耕液の貯蔵タンクは，液肥送液が行われない時には，均質に保つ目的で循環させることから，実際の装置の 1/3 スケール(300L タンク)で再現した装置を製作し、タイマー(オーム電機 HS-AT02)によりポンプ(エバラ製、25HPE0.25S)を 15 分に 1 回駆動させ水を循環させることを繰り返し、定期的に約 1 ヶ月に渡ってサンプリングを行った。また，実験スケールを縮小し，実験室内でビーカーに黄銅部品を入れ，水道水あるいは肥料液成分に浸漬し，攪拌子で溶液の流れを作り，腐食状況をモニターする系を擬似的に作製した。経時的に水溶液成分をサンプリングし，ICP-MS による銅イオン分析を行い，腐食に寄与する成分を特定を試みた結果を報告する。

copper, hydroponic culture, corrosion

発表責任者：安保充（abo@meiji.ac.jp）

講演番号：4D7a15
講演日時：3 月 27 日 11:54～ 1 号館 D7 会場

高性能ネブライザーを用いた殺菌デバイスの有効性の検証
Evaluation of sterilization efficiency by high performance nebulizer
○野尻 深優[1]、村上 周一郎[1]、宮下 振一[2]、藤井 紳一郎[2]、稲垣 和三[2]、安保 充[1] ([1]明大農、[2]産総研)
○Mihiro NOJIRI[1], Shuichiro MURAKAMI[1], Shinichi MIYASITA[2], Shinichiro FUJII[2], Kazumi INAGAKI[2], Mitsuru ABO[1] ([1]Meiji Univ., [2]AIST)

【背景目的】
殺菌技術には，低毒性，残留性の低さ，均一な効果が求められる。例えば，ホルムアルデヒド燻蒸等は，その毒性が指摘されており，低毒性，残留性の低さの観点から過酸化水素が望まれる。さらに，過酸化水素を用いた市販のソニケーターを応用した殺菌装置も市販されているが，ここでは熱源を用いない高性能ネブライザーを用いて殺菌性の溶液(H_2O_2 等)を菌体に噴霧することにより、効率的な殺菌を行うことができるデバイスの開発を目指す。

【方法・結果】
実験には産業総合技術研究所で作製された(高性能)ネブライザーを用い，比較のため ICP-OES 用のネブライザー（TR-30-A2, MEINHARD 製）を用いた。ネブライザーのキャリアガス流量は約 1 L/min でコンプレッサー(AC700. Makita 製)を用いて空気を送り，流量計(CU-2130, HIRIBA 製)を通して流量を一定に調節した。過酸化水素の流量は HPLC の送液用プランジャーポンプ(L-7100, 日立製)を用いて 1 mL/min に設定した。

まず，噴霧した液滴の大きさ，および均質性を，感水紙を用いて確認した。噴霧する空間は 22 x 22 x 30 (cm)の段ボール箱をくり抜いて，上面にサランラップを張り，その中央から液滴を噴霧した。この空間内に，ネブライザーの霧の射出方向の正面，側面に感水紙を置いて霧の噴霧状況を確認した。その結果，通常ネブライザーを用いた場合の方が細かな水滴痕が現れ，高性能ネブライザーでは正面に於いて通常のものより大きな液滴が少ない頻度で現れた。これは，細かい霧上の液滴同士が凝集して発生したものと思われる。

次に，これらの液滴を大腸菌プレートに吹き付けて，その後形成されるコロニー数をカウントすることで評価した。大腸菌は DH5α 株を LB 液体培地で 37 度，129 rpm で振とう培養し，10 倍希釈時の濁度が 0.5 程度になったものを、生理食塩水で 10^4-10^5 倍希釈して使用した。この菌体懸濁液 50 uL をシャーレに撒いたものを先ほどの殺菌空間に貼り付け，過酸化水素を 5-15 秒噴霧後，1 分間放置した後，37 度のインキュベーターでインキュベートし，コロニー数をカウントした。高性能ネブライザーの特徴および殺菌特性について報告する予定である。

Nebulizer, sterilization

発表責任者：安保　充（abo@meiji.ac.jp）

講演番号：4E1a07
講演日時：3 月 27 日 10:16～ 1 号館 E1 会場

人工タンパク質設計による *Streptomyces* sp. NT1 株由来 L-グルタミン酸オキシダーゼの耐熱化
Enhancing the thermostability of L-glutamate oxidase from *Streptomyces* sp. NT1 by artificial protein design

○杉森 大助[1,2]、林 優花[2]、齋藤 貴広[1]、久保田 瞳[1]、酒瀬川 信一[3]、中野 祥吾[4]、伊藤 創平[4]、浅野 泰久[5]([1]福島大理工、[2]福島大院理工、[3]旭化成ファーマ、[4]静県大食栄、[5]富山県大生工研セ)
○Daisuke Sugimori[1,2], Yuka Hayashi[2], Takahiro Saito[1], Hitomi Kubota[1], Shin-ichi Sakasegawa[3], Syogo Nakano[4], Sohei Ito[4], Yasuhisa Asano[5] ([1]Fac. Symbio. Syst. Sci., Fukushima Univ., [2]Grad. Sch. Symbio. Syst. Sci., Fukushima Univ., [3]Asahi Kasei Pharma Corp., [4]Sch. Food Nutr. Sci., Univ. Shizuoka, [5]Biotechnol. Res. Center, Toyama Pref. Univ.)

【背景・目的】

L-グルタミン酸定量キットやバイオセンサーとして産業応用が期待されている L-グルタミン酸オキシダーゼ（LGOX）は耐熱性向上が求められている。耐熱性を向上させる手法の一つに、配列データベースの情報を用いた人工タンパク質設計法があり、大きく分けると祖先型設計法とコンセンサス設計法がある。しかし、どちらの手法が優れているかには議論の余地がある[1)]。そこで我々は、人工タンパク質設計法により *Streptomyces* sp. NT1 株由来 LGOX（$LGOX_{NT1}$）の耐熱化を目指し、完全コンセンサス型（Fc_LGOX）と祖先型（Anc_LGOX）に加え、一定の閾値を超えた部分のみ相同アミノ酸に置換する部分コンセンサス型（Pc_LGOX）の 3 種類の人工設計 LGOX を作製し、耐熱性と諸特性を評価した。

【方法・結果と考察】

まず、$LGOX_{NT1}$ と類似性を示す 4919 配列を公共データベースから収集し、Ec 値[1,2)]を指標とした配列選抜（88N-173W-274M-308H-576Y-606R-613E）を行い、人工設計を行うライブラリーとした。Fc_LGOX はライブラリー中の相同配列において出現頻度が高いコンセンサスなアミノ酸を $LGOX_{NT1}$ にすべて適用（$LGOX_{NT1}$ のアミノ酸配列のうちライブラリー中の相同配列では出現頻度が低いアミノ酸を高出現頻度のアミノ酸にすべて置換）することにより設計した。Pc_LGOX についてはライブラリー中で一定の閾値を超えた部分のみ相同アミノ酸に置換・設計した。Anc_LGOX については系統樹解析を適用しながら耐熱化が期待できる位置に枝を形成するようにアミノ酸配列を設計した。設計したアミノ酸配列をコードする遺伝子を大腸菌発現に最適化して全合成し、*E. coli* BL21（DE3）で発現させた。3 種類の人工設計 LGOX はすべて細胞質内に可溶性発現でき、無細胞抽出液（cfe）中の LGOX 活性は 20～40 U/mL、比活性 3～4 U/mg-potein と良好な酵素生産性を示した。Fc_LGOX と Pc_LGOX は cfe 状態で 65℃、30 min まで活性低下が一切認められず、野生型組換え発現 $LGOX_{NT1}$（$rLGOX_{NT1}$）と比較して 10℃耐熱性が向上した。一方、Anc_LGOX は逆に耐熱性が約 15℃低下した。しかしながら、30℃以下の低温域では活性が向上し、20℃において $rLGOX_{NT1}$ および Fc_LGOX の活性と比較して約 30%活性が向上した。発表では 3 種類の人工設計 LGOX の耐熱性のほか諸特性について比較した結果を報告する。

【参考文献】

1) Nakano S. *et al.*, *Biochemistry* 2018, 57(26), 3722-3732. 2) Jäckel C. *et al.*, *J. Mol. Biol.* 2010, 399(4), 541-546.

L-glutamate oxidase, artificial protein design, thermostability enhancement

発表責任者：杉森大助（sugimori@sss.fukushima-u.ac.jp）

講演番号：4E1a08
講演日時：3 月 27 日 10:27～ 1 号館 E1 会場

好熱性真菌 *Rasamsonia emersonii* YA 株由来 D-アミノ酸オキシダーゼの広基質特異性に重要な構造因子の解明
Identification of a structural factor crucial for the broad substrate specificity of D-amino acid oxidase of thermophilic fungus *Rasamsonia emersonii* strain YA

○七五三掛 湧也[1]、古市 剛大[1]、鈴木 秀之[1]、阿部 勝正[1]、後藤 勝[2]、解良 芳夫[1]、高橋 祥司[1] ([1]長岡技大院工、[2]東邦大理)
○Yuya SHIMEKAKE[1], Takehiro FURUICHI[1], Hideyuki SUZUKI[1], Katsumasa ABE[1], Masaru GOTO[2], Yoshio KERA[1], Shouji TAKAHASHI[1] ([1]Nagaoka Univ. of Tech., [2]Toho Univ.)

【背景】 D-アミノ酸オキシダーゼ（DAO）は，中性および塩基性 D-アミノ酸の酸化的脱アミノ反応を触媒する FAD 酵素であり，これまでに細菌からヒトに至る多様な生物種に見いだされている．DAO は抗生物質原料である 7-アミノセファロスポラン酸の生産や D-アミノ酸の検出・定量に有用なだけでなく，統合失調症や筋萎縮性側索硬化症などの神経性疾患の診断・予防・治療への応用も期待されている．当研究室ではこれまでに，応用的利用に有用な DAO の取得を目的とし，D-アミノ酸資化能を有する好熱性真菌 *Rasamsonia emersonii* YA 株を発酵堆肥から単離し，その DAO（ReDAO）の酵素学的諸特性を明らかにした．また，真菌ゲノムデータベースにおける解析から，好熱性真菌 *Thermomyces dupontii* NRRL 2155 株に ReDAO に対して 77%のアミノ酸配列同一性を示す DAO（TdDAO）を見いだした．これら好熱性真菌 DAO の酵素学的諸特性の解析から，ReDAO は高活性かつ高安定性であり，また他の DAO が基質としない酸性 D-アミノ酸の D-Glu を含む多様な D-アミノ酸に高い活性を示す新奇な広基質特異性 DAO であることが分かった．一方，TdDAO の基質特異性は非常に狭いことが分かった．そこで本研究では，DAO の基質特異性に関わる構造因子に関する知見を得るため，ReDAO と TdDAO の基質特異性の相違に寄与する構造的要因を明らかにすることを目的とした．
【方法・結果】 ReDAO と TdDAO のアミノ酸配列をアライメントしたところ，TdDAO のアミノ酸配列中に ReDAO には見られないアミノ酸残基（Tyr57 - Gly61：YVLQG）の挿入が観察された．これらアミノ酸残基は，常温性真菌由来の広基質特異性 DAO においても観察されなかった．ReDAO と TdDAO の三次元構造モデルを I-TASSER により作成し，TdDAO における挿入アミノ酸残基の三次元構造上の位置を確認したところ，YVLQG は TdDAO の活性部位近傍に存在することが推定された．そこで，ReDAO の対応する位置に YVLQG を挿入した ReDAO 挿入変異体を作製し，*E. coli* BL21(DE3)pLysS で発現させ，その精製酵素を用いて基質特異性を解析したところ，挿入変異体の基質特異性は野生型に比べて著しく狭くなっており，野生型 TdDAO の基質特異性の狭さと同等であった．反対に，TdDAO から挿入アミノ酸残基 YVLQG を欠失させた変異体も作製し同様に解析したところ，欠失変異体の基質特異性は野生型に比べて著しく広くなっており，野生型 ReDAO の基質特異性の広さと同等であった．現在，ReDAO と TdDAO 変異体の種々の D-アミノ酸に対する反応速度論パラメーターを解析している．また，基質特異性に寄与する構造的要因を正確に考察するため，ReDAO の結晶構造解析を目指し，結晶化を進めている．

D-Amino acid oxidase, Substrate specificity, Thermophilic fungi

発表責任者：七五三掛湧也（S143309@stn.nagaokaut.ac.jp）

講演番号：4E1a09
講演日時：3 月 27 日 10:38～ 1 号館 E1 会場

高基質特異性酵素 L-リシンα-オキシダーゼの基質認識機構の解析

Analysis of substrate recognition mechanism of L-Lysine α-oxidase having high substrate specificity

○松本 侑也[1]、天野 万里[1]、北川 雄輝[2]、今田 勝巳[2]、根本 理子[1]、日下部 均[3]、田村 隆[1]、稲垣 賢二[1]([1]岡山大院・環境生命、[2]阪大院・理、[3]（株）エンザイム・センサ)
○ Yuya MATSUMOTO[1], Marie AMANO[1], Yuki KITAGAWA[2], Katsumi IMADA[2], Michiko NEMOTO[1], Hitoshi KUSAKABE[3], Takashi TAMURA[1], Kenji INAGAKI[1] ([1]Grad. Sch. Environ. & Life Sci., Okayama Univ., [2]Grad. Sch. Sci., Osaka Univ., [3]Enzyme Sensor Co. Ltd.)

【目的】糸状菌 *Trichoderma viride* 由来 L-リシン α-オキシダーゼ（LysOX）は， L-Lys の酸化的脱アミノ化反応を触媒する FAD 依存性の L-アミノ酸オキシダーゼ（LAO）の一種である。本酵素は，腫瘍細胞に強い抗腫瘍性を有し，医療分野での活用が期待される他，当研究室で同じく研究を進めてきた *Streptomyces* 属放線菌由来 L-グルタミン酸オキシダーゼ（LGOX）同様に基質特異性が厳格であるため L-Lys の微量定量に有用であり，バイオセンサー等として活用されている有用酵素である。本酵素についてはこれまでに放線菌において異種発現系が構築され，Native 酵素の X 線結晶構造解析に成功しており[1)]，大腸菌における発現，精製系も最近確立した。また，同じ高基質特異性 LAO である LGOX 同様に LysOX もホモ二量体構造の前駆体として発現した後，プロペプチド部分が切断され活性型酵素となることを明らかにした。更に，基質複合体の X 線結晶構造解析に成功し D212 および D315 残基が基質と相互作用していることが明らかになった。今回は，基質認識に関与していると考えられるこれら両残基等に変異導入を行い，LysOX の基質認識機構の解析を目指した。
【方法】部位特異的変異は変異導入用プライマーを用いたクイックチェンジ法により行った。また活性測定は，反応産物である過酸化水素を 4-アミノアンチピリン法を用いて測定することにより行った。
【結果と考察】D212A, D315A 変異酵素では野性型 LysOX と比較して L-Lys に対する比活性や k_{cat}/K_m 値の減少が確認されたものの，基質特異性には極端な変化が現れなかった。 一方で，D212 および D315 残基の両方に Ala 変異を導入した二重変異酵素では片方の変異導入酵素よりも顕著な活性と k_{cat}/K_m 値の減少が確認されたのみならず，基質に対する厳格性が大きく低下し，元の酵素が活性を示さない芳香族アミノ酸をはじめとして多くのアミノ酸に対する酸化活性が検出された。また，D212 残基をアスパラギン酸と同じ電荷を持つグルタミン酸に置換した D212E 変異酵素では，野生型 LysOX とほぼ同程度の L-Lys に対する比活性，基質親和力が確認され，電荷が反対のアルギニン残基に置換した D212R 変異体では L-Lys に対する大幅な活性低下と低基質特異性化が確認された。D212 と D315 両残基への変異導入により活性と基質特異性に顕著な影響が現れたことから両残基は LysOX の基質認識に密接に関与している残基であることが明らかとなり，加えて D212 残基の持つ負電荷が LysOX の L-Lys に対する高い基質親和力に寄与していることが示唆された。現在，精製した二重変異酵素の X 線結晶構造解析を進めるとともに，他の変異導入による基質特異性への影響を解析中である。

1) Amano, M., *et al., J. Biochem.*, **157**, 549-559 (2015)

L-Lysine α-oxidase, Site directed mutagenesis, substrate specificity

発表責任者：稲垣賢二（kinagaki@okayama-u.ac.jp）

講演番号：4E1a10
講演日時：3 月 27 日 10:49～ 1 号館 E1 会場

大腸菌由来アミノアシル- t RNA 合成酵素のピロリン酸増幅反応を用いた新規な L-ヒスチジン及び L-チロシンの測定法

New measurement method for L-histidine and L-tyrosine using pyrophosphate amplification reaction of histidyl- and tyrosyl-tRNA synthetase from Escherichia coli

○中柄 朋子[1]、青木 秀之[1]、喜田 幹子[1]、佐藤 大祐[1]、山田 健太[1]、釘宮 章光[2] ([1]池田食研株式会社、[2]広島市立大学)
○Tomoko NAKATSUKA[1], Hideyuki AOKI[1], Mikiko KIDA[1], Daisuke SATO[1], Kenta YAMADA[1], Akimitsu KUGIMIYA[2] ([1]Ikeda Food Research Co., Ltd., [2]Hiroshima City Univ.)

【背景】L−アミノ酸は生体内のたんぱく質の構成成分として重要な役割を担っており、食品、医薬品など様々な産業で使用されている。また、近年、疾病により血液中のＬ−アミノ酸濃度が変化することが見出され、アミノ酸代謝異常やがんなどの診断を可能とするバイオマーカーとしても活用されている。現在、アミノ酸分析は主にＨＰＬＣを用いて行われているが、操作に手間が掛かり、高価で設置場所も必要とする。一部のアミノ酸では、酵素を用いた測定キットが市販されているものもあるが、測定できるアミノ酸の種類は限定されている。一方、アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ａａＲＳ）はタンパクの生合成経路において、対応するＬ−アミノ酸とｔＲＮＡの結合を触媒する酵素であり、タンパクを構成する２０種の各Ｌ−アミノ酸に特異的に反応する２０種の酵素が存在する。従って、ａａＲＳを用いて血中等のアミノ酸を測定することにより、アミノ酸代謝異常やがんなどの診断を従来法に比べて簡便に行うことができる可能性がある。しかし、これまでの報告より、ａａＲＳはアミノ酸と１対で結合すると、ｔＲＮＡ非存在下では反応が停止することが知られており、ａａＲＳによるアミノ酸を測定する際の課題となっていた。そこで本研究では大腸菌由来のヒスチジル−ｔＲＮＡ合成酵素（ＨｉｓＲＳ）及びチロシル−ｔＲＮＡ合成酵素（ＴｙｒＲＳ）を用いて、ａａＲＳの酵素反応を促進させる条件について検討した。

【方法及び結果】ａａＲＳ酵素反応は、ｔＲＮＡ非存在下で大腸菌由来のＨｉｓＲＳ又はＴｙｒＲＳにＡＴＰ、マグネシウムを添加し、緩衝液中で行った。反応生成物であるピロリン酸の生成量はモリブデンブルー法により測定した。酵素反応条件は、ＡＴＰやマグネシウム濃度、反応温度などについて検討した。その結果、酵素反応により生じるピロリン酸量は、ＡＴＰやマグネシウム濃度依存的に増加した。また、ピロリン酸は、酵素反応液中の基質であるＬ−Ｈｉｓ又はＬ−Ｔｙｒよりも多く生成されており、ｔＲＮＡ非存在下で酵素が繰り返し基質であるＬ−アミノ酸と反応する、新たなピロリン酸増幅反応を見出した。ピロリン酸増幅反応条件下において各種Ｌ−アミノ酸と反応させた結果、Ｌ−Ｈｉｓ又はＬ−Ｔｙｒへの特異性の高さは維持されていた。さらに生成するピロリン酸は、Ｌ−アミノ酸濃度依存的に増加して直線性を示し、Ｌ−Ｈｉｓ又はＬ−Ｔｙｒが定量可能であった。従って、本研究で新たに見出した、ａａＲＳのピロリン酸増幅反応により生成されたピロリン酸を検出することで、Ｌ−Ｈｉｓ又はＬ−Ｔｙｒの測定が可能であることが示された。

aminoacyl-tRNA synthetase, L-amino acids, measurement

講演番号：4E1a11
講演日時：3 月 27 日 11:10～ 1 号館 E1 会場

超好熱性古細菌由来システイン合成酵素 *O*-phospho-L-serine sulfhydrylase の 1 次基質認識機構解析
Analysis of the primary substrate recognition in *O*-phospho-L-serine sulfhydrylase from hyperthermophilic archaeon

○中村 卓[1]、中林 誠[2]、石川 一彦[3] ([1]長浜バイオ大バイオサイエンス、[2]産総研　機能化学、[3]産総研　バイオメディカル)
○ Takashi NAKAMURA[1], Makoto NAKABAYASHI[2], Kazuhiko ISHIKAWA[3] ([1]Institite of Nagahama Bio. of Biosci., [2]AIST. of ISC, [3]AIST. of BMD)

[研究背景・研究目的]

ヒトに対する病原菌として結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* や赤痢アメーバ *Entamoeba histolytica* などが知られ、これら病原菌に対する感染症治療薬は存在するものの、薬剤耐性菌が出現している現状があり、新たな作用機構の感染症治療薬の開発が求められている。我々は、ヒトと微生物で生合成経路が異なるシステイン生合成経路を新たな作用機構薬のターゲットとして着目した。微生物のシステイン合成酵素は 1 次基質として *O*-acetyl-L-serine (OAS)または *O*-phospho-L-serine (OPS)を、2 次基質には硫黄源を使用する。1 次基質に OAS を用いる酵素が *O*-acetyl-L-serine sulfhydrylase (OASS)、1 次基質に OPS を用いる酵素が *O*-phospho-L-serine sulfhydrylase (OPSS)と名付けられている。特殊な例として超好熱性古細菌 *Aeropyrum pernix* K1 とトリコモナス原虫 *Trichomonas vaginalis* のシステイン合成酵素は OAS と OPS 両方を 1 次基質として用いることができる。システイン合成酵素の 1 次基質の認識機構についてはこれまで、OPS の認識に活性部位の Arg や Lys が関わることが知られているが、OAS についてはわかっていない。システイン合成酵素における、OAS と OPS それぞれに対する認識残基を知ることが出来れば、上記の病原菌による感染症の治療薬開発につながることが期待される。そこで、本研究では *A. pernix* K1 由来システイン合成酵素(ApOPSS)を用いて、微生物由来システイン合成酵素の 1 次基質の認識に関わる残基の推定を試みた。

[方法、結果]

様々な微生物由来のシステイン合成酵素と ApOPSS のアミノ酸配列の比較から、活性部位入り口付近にある ApOPSS の F225 と R297 に対応する残基が Tyr と Arg であることがシステイン合成酵素の OPS の認識に、また、これらの残基が Phe と Gln であることが OAS の認識に重要であると思われた。そこで、ApOPSS の F225Y、F225Y/R297A、R297A、R297Q 等の変異体酵素を作製し、Cys 合成活性、一次基質と酵素で形成されるアミノアクリレート中間体形成の生成能力を比較した。また、F225Y、F225Y/R297A 変異体酵素と OPS との複合体の X 線結晶構造解析により、OPS と相互作用する残基や立体構造変化を確認した。その結果、ApOPSS F225Y 変異酵素の実験結果より OPS の認識に Tyr も重要であることが示唆された。一方 OAS の認識に関わると予想した Gln では、その重要性は確認できなかった。また、これまで報告されている病原菌由来システイン合成酵素とその阻害剤の複合体構造において、我々の注目した Phe と阻害剤との間に CH-π相互作用を確認した。

O-phospho-L-serine sulfhydrylase, cysteine synthesis, substrate recognition

発表責任者：中村　卓（t_nakamura@nagahama-i-bio.ac.jp）

講演番号：4E1a12
講演日時：3 月 27 日 11:21～ 1 号館 E1 会場

好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 における硫酸同化及びシステイン合成についての解析
Studies on sulfate assimilation and cysteine synthesis in a thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium, *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6
○中山 宗一郎、小倉 一将、亀谷 将文、新井 博之、石井 正治 (東大院・農生科)
○Soichiro Nakayama, Kazumasa Ogura, Masafumi Kameya, Hiroyuki Arai, Masaharu Ishii (The Univ. of Tokyo)

【背景・目的】*Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 は、伊豆の峰温泉付近の土壌から単離された好熱性独立栄養性の水素細菌であり、16S rRNA 系統解析において、進化的に最も古いとされる *Aquificae* 門に属することが明らかになっている。本菌はエネルギー源として水素またはチオ硫酸を利用し、硫黄源としては硫酸とチオ硫酸を用いることができる。本菌は全ゲノムが解読されており（1.74 Mbp）、硫黄源獲得機構として硫酸同化経路を有することが示唆されている。硫酸同化経路とは後生動物以外に幅広く分布する硫黄源獲得機構であり、種々の酵素によって硫酸イオン（+VI）を硫化物イオン（+II）まで還元する経路である。生成する硫化物イオンは含硫アミノ酸の合成などに利用される。細菌においては、創薬及び含硫アミノ酸発酵生産の観点から研究が進められてきたが、本菌の属する *Aquificae* 門においてはほとんど知見がない。本菌の硫黄源獲得機構を明らかにすることは、硫酸同化経路の新たな知見、及び硫黄源獲得代謝の進化についての知見を得ることに繋がると期待される。そこで本研究では、本菌の硫酸同化経路中の各酵素及びシステイン合成酵素に着目し、その性質を明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】同化的硫酸還元の代謝系を構成する各酵素について、ゲノム情報から情報学的解析を行い、大腸菌を宿主として異種発現させた酵素の生化学的解析を行った。まず、HTH0447 を酵素活性測定に供したところ、硫酸イオンから adenosine-5'-phosphosulfate（APS）への反応を担う ATP sulfurylase であることが確認された。またこの逆反応の比活性値の方が高い値となり、これは同じ科に属するが完全な同化的硫酸還元系を有さないとされる *Aquifex aeolicus* と同様の結果であった。HTH0443 はゲノム情報より APS から亜硫酸イオンの還元を担う APS reductase 及び亜硫酸イオンから硫化物イオンの還元を担う sulfite reductase の融合酵素であると予測され、これは本菌及び近縁の 1 属のみに見られた。酵素活性測定により APS 還元能及び亜硫酸還元能の両方をもつことが示唆された。HTH0951 においても同様に解析を行い、システイン合成酵素であることを確認した。特徴的な結果として、多くの生物でシステイン合成の際の炭素骨格であるとされている *O*-acetyl-L-serine よりも *O*-phospho-L-serine をより反応性の高い基質とすることが示された。また HTH0951 は硫黄源基質として硫化物イオンだけでなくチオ硫酸も利用することも確認された。

sulfate assimilation, cysteine synthesis, Aquificae

発表責任者：中山宗一郎（snutrc@gmail.com）

講演番号：4E1a13
講演日時：3 月 27 日 11:32～ 1 号館 E1 会場

好気性光合成細菌 *Roseobacter denitrificans* の alternative oxidase による酸化ストレス耐性に関する研究
Study on oxidative stress resistance by alternative oxidase in *Roseobacter denitrificans*
○吉田 昇平、山本 麻衣子、亀谷 将史、石井 正治、新井 博之（東大院・農生科・応生工）
○Shohei YOSHIDA, Maiko YAMAMOTO, Masafumi KAMEYA, Masaharu ISHII, Hiroyuki ARAI (The Univ. of Tokyo)

【背景・目的】alternative oxidase(AOX)は、高等植物のミトコンドリアにおいて発見された好気呼吸の末端酸化酵素の一種で、当初は、シアン存在下で酸素を消費する酵素として発見された。AOX は、他の末端酸化酵素とは異なり、プロトン排出能を持たず、エネルギー生産には寄与しないが、高等植物では、酸化ストレスの低減、熱産生等に寄与していることが報告されている。バクテリアにおいては、多くの海洋環境中に生息する種で *aox* の存在が確認されているが、その機能の多くは未解明のままである。好気性光合成細菌 *Roseobacter denitrificans* OCh114 では、過去の研究において、低温条件下で、*aox* 破壊株の生育が遅れることが示されている。そこで、本研究では、低温条件下における AOX の機能を、酸化ストレスに着目しながら、明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】(1)低温条件下での生育差の原因を探るため、*R. denitrificans* OCh114 の野生株と *aox* 破壊株において、低温条件下で細胞内の活性酸素種(ROS)の定量を行った。その結果、*aox* 破壊株では低温条件下での細胞内の ROS の量が高くなることがわかった。(2)培養液中に ROS 発生剤の一つであるメチルビオロゲンを加えた条件で生育試験を行い、常温で生育差が見られるかどうか確認したところ、*aox* 破壊株では、低温条件下と同様にその生育が遅れることがわかった。(3)*R. denitrificans* OCh114 においては、マイクロアレイの結果から、至適条件下では *aox* がほとんど発現しないことがわかっている。そこで、野生株と *aox* 破壊株の生育に差がある、ROS が発生しやすい条件下で、実際に *aox* が発現しているかどうか確認するため、qRT-PCR によって、至適条件下、低温条件下、メチルビオロゲン添加条件下における *aox* の発現量を確認した。そして、至適条件下では *aox* の発現が確認できず、低温条件下及びメチルビオロゲン添加条件下では *aox* が発現していることが確認された。
以上の結果から、*R. denitrificans* OCh114 の AOX は、酸化ストレスが高い条件で発現し、ROS による酸化ストレスの低減に寄与していることが明らかになった。

alternative oxidase, aerobic photosynthetic bacteria, reactive oxygen species

発表責任者：吉田昇平（yoshida-shohei793@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4E1a14
講演日時：3 月 27 日 11:43～ 1 号館 E1 会場

Electron transfer mechanisms among the ferredoxin and α3β3-type oxygenase component of Rieske non-heme iron oxygenase

○ Pi-Cheng TSAI[1], Joydeep CHAKRABORTY[1], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1,2], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1,2] ([1]BRC, UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

[Background] Cumene dioxygenase (CDO) from *Pseudomonas fluorescens* IP01 is a member of Rieske non-heme oxygenase (RO) which catalyzes the initial step of cumene (isopropylbenzene) degradation and composes of two electron transfer components, viz. reductase (Red) and ferredoxin (Fd) and one catalytic component (terminal oxygenase, Oxy). The degradation is triggered by electrons which are received from NAD(P)H, and are transferred through Red and Fd to the Oxy. The binding site of Fd of carbazole 1,9a-dioxygenase (CARDO_Fd), which is the only determined structure of Fd-Oxy complex in ROs, is on the hydrophobic groove at the interface of adjacent α-subunits of the CARDO_Oxy.

Unlike CARDO_Oxy, which is a α_3 homotrimer, CDO_Oxy is a $\alpha_3\beta_3$ heterohexamer. However, both ROs have similar Rieske-type Fds as electron donor. The objective of this study is to determine the binding site(s) of CDO_Fd to $\alpha_3\beta_3$-type CDO_Oxy and compare the mode(s) of Fd-Oxy binding in both ROs.

[Methods] The residues at the two potential binding sites (viz. top and side-wise) on CDO_Oxy were substituted with alanine, separately. To determine the electron transfer efficiency, the absorbance at 457 nm, which was known to be different between oxidized and reduced forms of Oxy, was measured. CDO_Red, Fd and Oxy were mixed in anaerobic condition and the change of absorbance at 457 nm was measured after NADH added. The residues involved in the interaction between Fd and Oxy were determined by comparing the efficiency between wild-type and alanine-substituted Oxy.

[Results] The two potential binding sites, viz. side and top-wise (similar to CARDO), of CDO_Fd on CDO_Oxy were predicted by molecular docking and homology studies, respectively. The electron transfer efficiency of 9 single alanine-substituted Oxys were determined. The efficiency of Lys_117 on α-subunit and Arg_65 on β-subunit substitutions, which were corresponded to the side-wise site, had dramatically decreased. The efficiencies of the double alanine-substitutions were measured at the top-wise or side-wise, separately. The efficiency of double alanine-substituted Oxy showed that Lys_117 on α-subunit and Arg_65 on β-subunit had high correlation in terms of electron transfer between CDO_Oxy and CDO_Fd. Furthermore, these two positively charged residues were structurally conserved in most $\alpha_3\beta_3$-type Oxy. These results of the electron transfer efficiency of alanine substitutions suggest that the Oxy_Fd has higher possibility of binding at the side-wise position of CDO_Oxy.

Rieske-type oxygenase, electron transfer, cumene dioxygenase

発表責任者：Hideaki NOJIRI（anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4E1a15
講演日時：3 月 27 日 11:54～ 1 号館 E1 会場

Substrate Binding and Product Formation in the Terminal Oxygenase Component during Angular Dioxygenation of Carbazole 1,9a-Dioxygenase

○ Yixia WANG[1], Jun MATSUZAWA[1], Joydeep CHAKRABORTY[1], Zui FUJIMOTO[2], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1,3], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1,3] ([1]BRC, UTokyo, [2]AAC, NARO, [3]CRIIM, UTokyo)

Objective: Carbazole (CAR) is a recalcitrant *N*-heterocyclic aromatic compound with mutagenicity and toxicity, which is predominant in coal tar creosote. To achieve the bioremediation of CAR, various CAR-degrading bacteria that use it as sole source of nitrogen, carbon and energy have been isolated and the corresponding catabolic gene (*car*) clusters from these bacteria have also been identified and characterized. Carbazole 1,9a-dioxygenase (designated as CARDO), a three-component Rieske non-heme iron oxygenase consisting of ferredoxin reductase, ferredoxin and homo-trimeric terminal oxygenase (Oxy), has been reported to initiate the degradation of CAR by angular dioxygenation to yield 2'-aminobiphenyl-2,3-diol (ABP-diol). Two pathways have been proposed in the catalytic cycle of CARDO according to the binding sequence of substrate and O_2: in one pathway, substrate is available to the non-heme iron prior to O_2; in the alternate pathway, O_2 binds to the iron ahead of substrate. To illustrate the mechanism of angular dioxygenation in CARDO, the structures of substrate binding and product formation have been solved at 2.2 Å resolution in this study, revealing the conformational changes of Oxy occurring during substrate transformation in the catalytic cycle of CARDO.

Results: The structure of CAR-bound reduced Oxy shows that the substrate binds at the active site in such a conformation that the carbon atoms at the angular (C9a) and its adjacent (C1) are exposed to attack by O_2. Compared to the substrate-free reduced Oxy, binding of CAR at the active site results in a closure of catalytic pocket by the movements of residues L202-T214 and D229-V238, especially the significant shifts of residues F204 and I231. The structure of O_2-exposed Oxy shows no significant conformational changes caused by O_2 binding compared to the substrate-free reduced Oxy. However, dioxygen (O_2 or superoxo) binds skewed side-on to the non-heme iron, which is assumed to play a key role in attacking the substrate. To obtain structure of product formation, the crystals of CAR-bound reduced Oxy were incubated with pure O_2. The structure obtained from these crystals shows that a presumed tricyclic alkylperoxo intermediate binds to the non-heme iron in subunit A, while in subunits B and C, the bicyclic products (ABP-diol) bind at the active sites with both oxygen atoms coordinated to the iron. The formation of alkylperoxo intermediate initiates the opening of the previously well-closed catalytic pocket caused by the binding of substrate. Furthermore, generation of ABP-diol has resulted in wide re-opening of the catalytic pocket by movements of residues L202-T214 and D229-V238 (especially F204 and I231) back to the initial positions, through which the product is ready to be released from the active site.

Oxidation-reduction, carbazole 1,9a-dioxygenase, angular dioxygenation

発表責任者：NOJIRI Hideaki（anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4E2a01
講演日時：3 月 27 日 09:00～ 1 号館 E2 会場

Luteolibacter algae H18 由来フコイダン低分子化酵素によって生成するフコイダン分解産物の解析

Degradation products of fucoidan formed by fucoidanase from *Luteolibacter algae* H18

○荒井 良仁[1]、長尾 達彦[2,3]、八木 寿梓[2]、鈴木 宏和[2]、大城 隆[2] ([1]鳥取大院・持社創科、[2]鳥取大院・工、[3]日本ジッコウ(株))

○Yosihito ARAI[1], Tatsuhiko NAGAO[2,3], Hisashi YAGI[2], Hirokazu SUZUKI[2], Takashi OHSHIRO[2] ([1]Dept. Eng., Grad. Sch. Sustain. Sci., Tottori Univ., [2]Dept. Chem. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Tottori Univ., [3]Nippon Jikkou Co, Ltd.)

【目的】 フコイダンとはコンブ、モズクなどの褐藻の粘質成分に含まれている硫酸化多糖の一種で、L-フコースが α1-3、α1-4 結合で数万個も繋がった化合物であり、分子量は 100,000～1,000,000 とされている。フコイダンには、抗ウィルス作用、抗がん作用、抗血液凝固作用などの様々な生理活性があり、健康食品、医薬品としての期待がもたれている。しかし、これらの生理活性がフコイダン分子中のどの構造に起因するかは不明な点が多く、構造と生理活性の相関性は未だ解明されていない。

当研究室では、オキナワモズク由来フコイダンにおける構造活性相関の解明を目的とした研究を行っており、それには規則的な分解産物を生成することができる酵素的な低分子化が有効と考えた。我々は既に、オキナワモズク由来フコイダン資化性細菌 *Luteolibacter algae* H18 から、フコイダンのアセチル基を遊離するフコイダンデアセチラーゼの酵素遺伝子、endo 型でフコイダンを低分子化するフコイダナーゼの酵素遺伝子(*fct114*)の同定、異種発現、酵素化学的性質の検討を行った。

Fct114 は、既知の endo 型フコイダン低分子化酵素と一次構造の相同性を比較すると 25%以下と低いため、新規酵素であると考えられた。また、Fct114 はオキナワモズクフコイダンの低分子化も触媒できるが、酵素的に脱アセチル化したフコイダンに対する活性の方が高かった。今回、脱アセチル化フコイダンに Fct114 を作用させて生成する分解産物について解析することを目的とした。

【方法・結果】 脱アセチル化フコイダンを調製するために、0.25%のフコイダン溶液にフコイダンデアセチラーゼを添加し、30℃で 48 h、800 mL スケールで酵素反応を行った。その後、80℃, 10 min の熱処理と遠心分離により不純物を取り除き、濃縮、超純水に対する透析、凍結乾燥を行うことによって 1 g の脱アセチル化フコイダン粉末を調製した。酵素反応後の生成物の分子量は反応前とほぼ同じであり、硫酸基の含量も反応前の 19%と比べ、減少は認められなかった。

得られた脱アセチル化フコイダンを 2%の濃度にした溶液に Fct114 を作用させ、35℃で 48 h、10 mL スケールで酵素反応を行った後、80℃, 10 min の熱処理と遠心分離により不純物を取り除いた。次いで、分画分子量 50,000、10,000 および 2,000 の限外ろ過膜により高分子量化合物と低分子量化合物とに分け、低分子量化合物画分を凍結乾燥後、TLC 分析を行ったところ、オリゴ糖を検出することができた。現在、分解産物の調製方法に改良を加えており、得られた産物について MALDI-TOF-MASS による解析を行う予定である。

Fucoidan, Algae, Glycoside Hydrolase

講演番号：4E2a02
講演日時：3 月 27 日 09:11～ 1 号館 E2 会場

緑藻ウルバン資化細菌の持つウルバン分解遺伝子群の進化解析
Evolutional analysis of ulvan-degrading enzymes in the ulvan-utilizing bacteria
○大西 浩平、籾山 健太、小林 慎太郎（高知大農林海洋）
○Kouhei OHNISHI, Kenta MOMIYAMA, Shintaro KOBAYASHI (Kochi Univ. of Agric.)

【目的】ウルバンは 3 位が硫酸化された L-ラムノースにグルクロン酸、イズロン酸、キシロースのいずれかが結合した二糖を構成単位とする硫酸化多糖であり、大型緑藻類のアオサ属に含まれている。これまでにウルバンを資化する細菌の単離を行ってきた。多糖分解関連酵素遺伝子は Polysaccharide Utilization Loci (PUL) としてゲノム上に存在している。本研究では、ウルバンを資化する海洋細菌を多数単離し、それらの細菌が持つ PUL の構造を比較することでウルバン分解遺伝子群の進化を考察することを目的とした。【方法】２種類の異なる緑藻ミナミアオサとミナミアオノリを網に入れ、海中で 1~2 週間放置した後、それぞれのアオノリ由来のウルバンを炭素源とする人工海水培地に加え、資化菌を集積培養した。同じ条件の寒天培地を用いてウルバン資化細菌のスクリーニングを行い、ウルバン分解能を持つと思われる菌株を単離した後、菌株の 16S rRNA の解析によって種の同定を行った。単離した菌株のウルバン分解活性を、アオノリウルバンゲルを利用して評価し、活性の強い資化菌を選抜した。ウルバン含有の培地で培養した培養上清を調製し、SDS-PAGE に供し活性染色を行うことで、ウルバン分解酵素の確認を行った。さらに、選抜菌のドラフトゲノム解析を行い、分解酵素遺伝子を解析した。【結果及び考察】ミナミアオサ・ミナミアオノリの残滓からウルバン資化細菌を多数単離し、その中で高い分解能を持つ株を選抜した。それらは *Alteromonas* 属、*Pseudoalteromonas* 属、*Vibrio* 属、*Tenacibaculum* 属に属していた。ミナミアオノリ資化菌の菌体外タンパク質には 2~4 種類のウルバン分解関連酵素が存在していた。ミナミアオサ資化菌の菌体外タンパク質からも複数のウルバン分解関連酵素が確認できた。多くの株は分子量的に共通した分解酵素を持っていたが菌株によって活性の大きさに違いが見られた。これらの資化菌のドラフトゲノム解析を行ったところ、最大で 6 種類の PL24、PL25 ファミリーに属するウルバンリアーゼの存在が確認できた。これらのウルバンリアーゼの系統解析を行ったところ PL25 ファミリー酵素は菌株間での相同性が 98%と非常に高かった。一方 PL24 ファミリー酵素の系統関係は、16S rRNA による系統関係とは一致しなかった。このことはウルバン分解遺伝子が PUL として、環境中で水平伝播していることを強く示唆している。

ulvan, PUL, polysaccharide

発表責任者：大西浩平（kouheio@kochi-u.ac.jp）

講演番号：4E2a03
講演日時：3 月 27 日 09:22～ 1 号館 E2 会場

海藻分解好熱菌に特徴的な糖加水分解酵素の特性評価

Characterization of glycoside hydrolases unique in a seaweed-degrading thermophile

○鈴木 宏和[1]、李 原圭[2]、藤井 健太[3]、八木 寿梓[1]、大城 隆[1] ([1]鳥取大工、[2]鳥取大院・持社創生、[3]鳥取大院・工)
○Hirokazu Suzuki[1], Wongu Li[2], Kenta Fujii[3], Hisashi Yagi[1], Takashi Ohshiro[1] ([1]Eng., Tottori Univ., [2]Grad. Sch. Sust. Sci, Tottori Univ., [3]Grad. Sch. Eng., Tottori Univ.)

【目的】海藻バイオマスの高度利用を目的とし，我々は海藻分解好熱菌（*Geobacillus thermodenitrificans* OS27）を鳥取県沿岸から単離した。本菌は海藻分解能をもち，様々な海藻多糖類を資化することもできる。ドラフトゲノム配列を解析したところ，28 個の糖加水分解酵素遺伝子が見出され，そのうち 2 個（*GT3485* と *GT3489*）は本好熱菌に特徴的であった。本大会では，これら酵素の諸性質ならびに新奇性について報告する。

【GT3489 について】大腸菌 pET システムを用いて GT3489 組換え体を調製し，IMAC 法で精製した。本酵素はホモ二量体を形成し，pNP-β-D-xylopyranoside やキシロオリゴ糖を良好な基質とした。本酵素の一次配列は，GH1 ファミリーのものと N 末端領域において相同性を示したが，C 末端領域については如何なるタンパク質とも配列類似性を示さず，二次構造予測からは新規なドメインであることが示唆された。GH1 ファミリーの C 末端領域に保存されている酸性触媒残基も見出されなかったが，アラニンスキャンニング解析から Glu188 と Glu318 が触媒残基候補として見出された。C 末端領域を削った変異酵素を調製したところ，いずれの酵素も不溶性画分に産生された。微量に生産された変異酵素は野生型と同じく二量体を形成し，pNP-β-D-xylopyranoside を分解したが，キシロオリゴ糖に対する活性は大きく減少していた。本結果は，GT3489 の C 末端領域が二量体形成や触媒機能に関与しない一方で，酵素の可溶化やキシロオリゴ糖認識に重要であることを示めしている。

【GT3485 について】一次配列から，GT3485 は GH3 ファミリーに分類された。GT3485 組換え体は，GT3489 とは異なり熱安定性が低かったが，メタノールやエタノールなどの有機溶媒に対して高い耐性を示した。pNP-β-D-xylopyranoside や pNP-α-L-arabinofranoside を良好な基質とし，天然基質としてはキシロオリゴ糖を分解したが，アラビノオリゴ糖は分解しなかった。興味深いことに，本酵素は pNP-α-L-arabinopyranoside に対しても高い活性を示した。Arabinopyranoside 分解酵素に関する報告はほとんどなく，この活性は GT3485 の大きな特徴といえる。pNP-α-L-arabinopyranoside を糖供与体，アルコールを糖受容体とした糖転移反応を検討したところ，糖アルコールと思われる反応生成物が薄層クロマトグラフィー上で検出された。よって GT3485 は，arabinopyranoside 転移触媒として有用かもしれない。

Glycosidase, Xylosidase, Thermophile

発表責任者：鈴木宏和（hirokazusuzuki@tottori-u.ac.jp）

講演番号：4E2a04
講演日時：3 月 27 日 09:33～ 1 号館 E2 会場

シロイヌナズナ由来 GH1 β-グルコシダーゼ AtBGlu42 の酵素化学的諸性質と立体構造の解析

Enzymatic and structural characterization of *Arabidopsis thaliana* GH1 ß-glucosidase AtBGlu42

○堀越 秀[1]、佐分利 亘[1]、于 健[2]、姚 閔[2]、森 春英[1] ([1]北大院農、[2]北大院生命)
○Shu HORIKOSHI[1], Wataru SABURI[1], Jian YU[2], Min YAO[2], Haruhide MORI[1] ([1]Grad. Sch. Agric., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Life Sci., Hokkaido Univ.)

【背景と目的】糖質加水分解酵素ファミリーGH1 に属す β-グルコシダーゼ（BGlu）は主に β-グルコシドに作用するが，D-フコシド，ガラクトシドおよびマンノシドに作用するものもあり，グライコン特異性は多様である．植物の GH1 BGlu はオリゴ糖や種々の配糖体に作用して細胞壁代謝や生理活性物質の活性化などを行うとされ，アグリコン特異性も多岐にわたる．40 種類のシロイヌナズナ由来 GH1 BGlu のうち，AtBGlu42 はシグナルペプチドを持たない数少ない BGlu であり，細胞質に局在すると予想される．AtBGlu42 遺伝子は鉄欠乏条件下で強く発現し，スコポリンの加水分解を担うとされる．本研究では組換え AtBGlu42 の酵素化学的諸性質と立体構造を明らかにした．

【方法，結果および考察】N 末端に Trx タグおよび His タグを付加した AtBGlu42 組換え酵素を大腸菌で生産して Ni-アフィニティークロマトグラフィーにより精製した．培養液 1 L から精製標品 8 mg を得た．分子質量は SDS-PAGE により 69.9 kDa と求められた．本酵素は 35°C 以下（pH 7.0，15 分間処理），pH 6.3－9.3（4°C，24 時間処理）で安定であった．また，至適条件は 40°C，pH 6.8 であった．この至適 pH は，多くの既知植物 GH1 BGlu と比較して高く，細胞質での活性発現に適する．様々な β-グリコシドに対する k_{cat}/K_m を求めた．*p*-ニトロフェノール（*p*NP）配糖体（グルコシド，D-フコシド，ガラクトシド，マンノシドおよびキシロシド）のうち，グルコシドを最も良い基質とした（59.5 $s^{-1}mM^{-1}$）．グルコ 2 糖ではラミナリビオースおよびソホロースを良い基質とした（それぞれ 94.6 $s^{-1}mM^{-1}$，13.8 $s^{-1}mM^{-1}$）．セロオリゴ糖に対しては 3 糖特異性を示した（2 糖 1.58 $s^{-1}mM^{-1}$，3 糖 85.8 $s^{-1}mM^{-1}$，4 糖 44.7 $s^{-1}mM^{-1}$）．一方，ラミナリオリゴ糖は 2 糖特異性を示した．天然配糖体のサリシン，ヘリシン，サリチル酸グルコシド，エスクリンおよびフロリジンに対して加水分解活性を示し，ヘリシンに最も良く作用した（134 $s^{-1}mM^{-1}$）．SPring-8 において X 線回折データを収集し，リガンドフリー構造を分解能 1.7 Å で決定した．全体構造は既存の GH1 酵素と同様の $(\beta/\alpha)_8$ バレルフォールドで，サブサイト-1 を形成するアミノ酸残基および触媒残基は空間的によく保存されていた．長鎖セロオリゴ糖に特異的な Os3BGlu7 の基質結合ポケットと比較した．Os3BGlu7 においてサブサイト+1 および+2 を形成する Trp358 は AtBGlu42 で保存されていた．一方，サブサイト+3 を形成する Tyr341 は AtBGlu42 において Arg343 であり，これが AtBGlu42 のセロトリオース特異性に関与すると考えられた．

β-glucosidase, glycoside hydrolase family 1, X-ray structure

講演番号：4E2a05
講演日時：3 月 27 日 09:44～ 1 号館 E2 会場

大腸菌で高発現させた麹菌由来の GH1 に属する新規β-グルコシダーゼ(BglU/Bgl5)の酵素学的諸性質

Enzymatic properties of a novel ß-glucosidase (BglU/Bgl5) from *Aspergillus oryzae* overexpressed in *Escherichia coli*

○渡部 昭、新谷 尚弘、五味 勝也（東北大院農・生物産業創成）
○Akira WATANABE, Takahiro SHINTANI, Katsuya GOMI (Div. Biosci. Biotechnol. Future Bioind., Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

【目的】我々は、麹菌(*Aspergillus oryzae*)ゲノム情報を元に未解析の新規β-グルコシダーゼの機能解明をこれまで行ってきており、作製したβ-グルコシダーゼ遺伝子の網羅的高発現株から新規なβ-グルコシダーゼを精製しその酵素学的諸性質を報告してきた（１、２、３、４）。今回は、麹菌の推定β-グルコシダーゼの内､菌体内に局在すると考えられているGlycoside hydrolase family 1(GH1)に属する新規β-グルコシダーゼ(BglU/Bgl5)の大腸菌での発現に成功したので、その酵素学的諸性質について報告する。
【方法】麹菌ゲノムデータベース(DOGAN: http://www.bio.nite.go.jp/dogan/top、AspGD: http://www.aspgd.org/) 及びCarbohydrate-Active Enzymes Database(CAZy: http://www.cazy.org/)を用いて探索し、麹菌 mRNA から逆転写した cDNA を鋳型とした PCR 反応で目的 DNA 断片を増幅後、大腸菌発現用ベクター(pCold II)に組み込んだ推定β-グルコシダーゼ遺伝子(*bglU/bgl5*)を *E. coli* Rosetta2(DE3)に導入して高発現させ､TALON クロマトグラフィーに供して精製しその酵素学的諸性質を調べた。
【結果】BglU/Bgl5 は、他の GH1 に属する多くのβ-グルコシダーゼのように広い範囲の基質に特異性を示し、合成基質の *p*-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside(pNPG)の他、*p*-nitrophenyl-β-D-fucopyranoside(pNPFuc)、*p*-nitrophenyl-β-D-lactopyranoside(pNPLac)、*p*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside(pNPGal) 、*p*-nitrophenyl-β-D-cellobioside に対して加水分解活性を有していた。また、β-グルコシダーゼはその多くが反応生成物であるグルコースによって活性が阻害され酵素反応に影響が出るため、グルコースに対する耐性を調べたところ、本酵素は反応系にグルコースを含まない場合の活性を 100%とした際の相対活性では、200mM のグルコースを含んだ場合に約 80%、500mM のグルコースを含んだ際には約 50%の活性を示し、麹菌由来の酵素の中ではグルコースに対してかなり高い耐性を有していた。この他、BglU/Bgl5 の他の諸性質を合わせて報告する。

本研究は科学研究費助成事業（基盤研究(C)（一般)）の補助を受けて実施された。
（１） 工藤ほか、2010 年度日本農芸化学会大会講演要旨集、ｐ２５６
（２） 工藤ほか、2011 年度日本農芸化学会大会講演要旨集、ｐ４４
（３） 工藤ほか、2012 年度日本農芸化学会大会講演要旨集、ｐ７９
（４） 渡部ほか、2014 年度日本農芸化学会大会講演要旨集、ｐ９２

β-glucosidase, *Aspergillus oryzae*, Glycoside Hydrolase Family 1

講演番号：4E2a06
講演日時：3 月 27 日 10:05～ 1 号館 E2 会場

好熱嫌気性細菌 *Clostridium thermocellum* 由来セルロソーム構成セルラーゼの結晶性セルロース分解に対する相乗効果

Synergistic effect of the cellulosomal cellulases from thermophilic anaerobe *Clostridium thermocellum* on the degradation of crystalline cellulose

○齊藤 翼、髙橋 美帆、富田 渓介、篠田 優、平野 勝紹、春木 満、平野 展孝（日大・工・生命応用化）
○Tsubasa SAITO, Miho TAKAHASHI, Keisuke TOMITA, Suguru SHINODA, Katsuaki HIRANO, Mitsuru HARUKI, Nobutaka HIRANO (Nihon Univ., College of Eng., Dept. of Chem. Biol. & Appl. Chem.)

好熱嫌気性細菌 *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 株が生産するセルラーゼ・ヘミセルラーゼ超分子複合体（セルロソーム）は、結晶性セルロースに対して高い分解活性を示す。セルロソームは、骨格タンパク質と多種多様な糖質加水分解酵素が、微生物種特異的に結合した分子量数百万の超分子複合体である。骨格上に多種多様な糖質加水分解酵素が集積することで、酵素活性間に相乗効果が生じるため、高い結晶性セルロース分解活性を発揮する。これまでに、無細胞タンパク質合成した 40 種類のセルロソーム構成因子を用いて、段階的に構成因子を増やした複合体の試験管内再構成を行った結果、構成因子の種類が増えるに従って、結晶性セルロース分解活性が上昇することを示した。本研究では、セルロソーム構成セルラーゼ 22 種類を対象に、結晶性セルロース分解活性に対する相乗効果の解析を目的とした研究を行った。

酵素活性の相乗効果を解析する場合、単独の酵素活性の和と、酵素を混合した際の酵素活性を比較することが一般的であるが、酵素 1 種類から成るセルロソーム複合体の結晶性セルロース分解活性は極めて低く、酵素活性の検出が困難なため、本研究では、22 種類のセルラーゼから成る複合体から、1 種類ずつ酵素を除いた酵素複合体を構築し、結晶性セルロースの効率的分解に必要十分な構成因子の同定を試みた。その結果、酵素 22 種類から成る複合体から 1 種類ずつ構成因子を除いた際に、90%以下に酵素活性が低下した構成因子は、エキソ型セルラーゼでは Cel48S、Cbh9A、エンド型セルラーゼでは Cel9R、Cel5G、Cel9/44J、Cel9W、Cel5L、Lec9B、Cel5/26H であった。これら 9 種類の構成因子は、他の構成因子では代替不能の作用を持つことから、結晶性セルロースの効率的分解に対して重要な役割を果たしていることが示唆された。次に、これら 9 種類の構成因子のみから成る複合体の結晶性セルロース分解活性を測定したところ、22 種類の構成因子から成る複合体と比較して、90%以上の分解活性を維持していた。これら 9 種類の構成因子は、切断様式が多様であることから、結晶性セルロースの効率的分解には、切断様式の異なる酵素種から成る複合体の形成が必要と考えられる。今後、結晶性セルロースの効率的分解への寄与が大きいと考えられる、これら 9 種類の構成因子の相乗効果について解析してゆく予定である。

cellulosome, *Clostridium thermocellum*, crystalline cellulose

講演番号：4E2a07
講演日時：3 月 27 日 10:16～ 1 号館 E2 会場

全アミノ酸スキャニング変異導入法による耐熱型 *Bacillus* sp. 41M-1 株由来キシラナーゼの取得とその性状解析

Isolation of thermostable GH11 xylanase XynJ from *Bacillus* sp. strain 41M-1 using a site saturation mutagenesis library and its characterization

○滝田 禎亮[1]、中谷 滉太[1]、片野 裕太[1]、鈴木 愛美[1]、兒島 憲二[1]、坂 直樹[1]、三上 文三[1]、八波 利恵[2]、中村 聡[2]、保川 清[1] ([1]京大農、[2]東工大生命理工)

○Teisuke Takita[1], Kota Nakatani[1], Yuta Katano[1], Manami Suzuki[1], Kenji Kojima[1], Naoki Saka[1], Bunzo Mikami[1], Rie Yatsunami[2], Satoshi Nakamura[2], Kiyoshi Yasukawa[1] ([1]Kyoto Univ, [2]Tokyo Institute of Technology)

【目的】キシラナーゼは第二世代バイオエタノール生産への応用が期待されており、反応効率向上のため、更なる耐アルカリ化および耐熱化が望まれている。我々は、全アミノ酸スキャニング変異導入法を用いて糖質加水分解酵素ファミリー（GH）10に属する*Bacillus* sp. TAR-1株由来キシラナーゼ（XynR）の耐熱型変異体S92Eを取得した[1)]。本研究では、GH11に属する*Bacillus* sp. 41M-1株由来キシラナーゼ（XynJ）の耐熱型変異体の取得を試みた。

【方法】1. ライブラリーの作製：XynJ 遺伝子が挿入された pET-21b(+)を鋳型として QuikChange HT Protein Engineering System（アジレントテクノロジー）により、Finger 領域とその一次構造上の近傍の 118 アミノ酸残基（Y13–R104、G169–Y194）のうちの 1 残基のコドンを他の 19 種類のコドンに置換し、大腸菌 BL21(DE3)に導入した。2. 発現：形質転換菌を 37℃で培養し、IPTG で誘導した。3. 耐熱型変異体の選抜：超音波処理した菌体の可溶性画分を 65℃15 分間の熱処理後、RBB-xylan を基質として pH 7.8、37℃で 15 分間反応させ、上清の 540 nm の吸光度を測定し、残存活性（熱処理前に対する熱処理後の活性の相対値）を求めた。4. 酵素の精製：菌体の可溶性画分から陰イオン交換およびゲル濾過クロマトグラフィーにより精製した。5. 速度論的解析：反応は精製酵素（0.1 μM）を用いて Beechwood xylan を基質として pH 7.8、37℃で行った。経時的に反応液を採取し、還元末端を 3,5-ジニトロサリチル酸によって定量し、K_m と k_{cat} を求めた。6. X 線結晶構造解析：結晶化は蒸気拡散法（シッティングドロップ法）にて行った。回折データは大型放射光施設 Spring-8 の BL26B1 と BL44XU で収集し、XDS でプロセスした。分子置換は CCP4 の MOLREP を用い、構造のモデリングと精密化には COOT と PHENIX を用いた。

【結果】熱処理後の野生型酵素（WT）の残存活性は5%であった。576クローンのうちT82Aの残存活性（90%）が最も高かった。T82を他の19種類のアミノ酸残基に置換したところ、残存活性は、Gでは75%、F、Y、W、K、R、H、E、D、Nでは5%未満、他は6~25%であった。このことから、82位に位置するアミノ酸残基が耐熱性に深く関与している可能性が示唆された。WTおよびT82Aの、65℃の熱処理で活性が50%に低下する時間はそれぞれ2.5分と38分、15分間の熱処理で活性が50%に低下する温度はそれぞれ61.8ºCと65.5ºCであった。WTおよびT82AのK_m値はそれぞれ16.4、13.2 mg/mL、k_{cat}値はそれぞれ131、113 s^{-1}で、いずれも同程度であった。WTとT82AのX線結晶構造の比較から、T82Aの耐熱性の向上は、T82の側鎖と周辺残基との立体障害の解消に起因することが示唆された。

【文献】1. K. Nakatani et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **82**, 1715-1723, 2018

xylanase, random mutagenesis, crystal structure

講演番号：4E2a08
講演日時：3 月 27 日 10:27～ 1 号館 E2 会場

Bacteroides thetaiotaomicron 由来α-galactosidase（BtGal97a）の天然基質に関する研究
Searching natural substrate of α-galactosidase from *Bacteroides thetaiotaomicron*
○中川 雄登、松永 夏奈、菊池 麻子、奥山 正幸、田上 貴祥、木村 淳夫 (北大院農)
○Yuto NAKAGAWA, Kana MATSUNAGA, Asako KIKUCHI, Masayuki OKUYAMA, Takayoshi TAGAMI, Atsuo KIMURA (Hokkaido Univ.)

【背景と目的】我々は *Bacteroides thetaiotaomicron* がコードする BT1871 が *p*-nitrophenyl（*p*NP）α-D-galactopyranoside を加水分解する α-galactosidase（*Bt*Gal97a）であることを明らかにした. また, *Bt*Gal97a の求核触媒残基変異体 D415G は，外用性求核試薬 sodium formate 存在下で α-D-galactosyl fluoride（α-GalF）を供与体とし，各種の受容体に α-galactosyl 基を効率よく転移する反応も解明した．一方で本酵素が天然において作用する基質は不明であり, 酵母の細胞壁を構成する α-mannan の末端 α-galactoside[1] および guar gum などに含まれる galactomannan の分岐 α-galactoside が候補と考えられる．本研究では *Bt*Gal97a の天然基質の究明を最終目的とする．D415G の糖転移反応で調製した α-ガラクトシルオリゴ糖に対する *Bt*Gal97a の基質特異性を評価し，推察を行った.

【方法と結果】野生型 *Bt*Gal97a および D415G を大腸菌により生産し，Ni^{2+}-アフィニティークロマトグラフィーで精製した．D415G の糖転移反応を，α-GalF と sodium formate に，受容体の *p*NP α-D-mannopyranoside（*p*NPαMan），*p*NP β-D-mannopyranoside（*p*NPβMan）もしくは β-1,4-mannobiose を加えて行った．生成物をメチル化分析し，形成された糖残基の結合位置を決定した．いずれの場合も 1,6-結合により α-galactosyl 基が転移した *p*NP α-Man-(6←1)-α-Gal（*p*NPαMan-Gal），*p*NP β-Man-(6←1)-α-Gal（*p*NPβMan-Gal）および α-Gal-(1→6)-β-Man-(1→4)-Man（GMM）が得られた．それぞれの合成収率を HPLC および HPAEC-PAD により算出すると，92%（*p*NPαMan-Gal），73%（*p*NPβMan-Gal）および 54%（GMM）であった．これら 3 種類の α-ガラクトシルオリゴ糖を用い，*Bt*Gal97a による加水分解速度パラメーター（K_m, mM; k_{cat}, s^{-1}; k_{cat}/K_m, $s^{-1}mM^{-1}$）を求めると，*p*NPαMan-Gal（0.36 mM, 93 s^{-1}, 259 $s^{-1}mM^{-1}$）および *p*NPβMan-Gal（0.59 mM, 115 s^{-1}, 194 $s^{-1}mM^{-1}$）であった．一方，GMM を基質とした場合, 測定範囲内で反応速度の飽和が認められなかったので, 低基質濃度における反応速度から k_{cat}/K_m（51 $s^{-1}mM^{-1}$）とした．得られた k_{cat}/K_m 値から特異性を比較すると，*p*NPαMan-Gal＞*p*NPβMan-Gal＞GMM であった.

以上の結果から, *Bt*Gal97a は天然において酵母細胞壁の α-mannan に存在する α-Gal-(1→6)-α-Man 構造に対し高い作用を示す可能性が示唆された.

【文献】1) Cuskin, F., *et al*. (2015) Nature, 517, 165-169

alpha-galactosidase, glycoside hydrolase family 97, substrate specificity

発表責任者：中川雄登（ny0621@abs.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：4E2a09
講演日時：3 月 27 日 10:38～ 1 号館 E2 会場

GH87 型α-1,3-グルカナーゼの担子菌類プロトプラスト形成への影響

Effect of GH87 type α-1,3-glucanase for protoplast formation in Basidiomycetous fungi.

○福田 泰久、佐藤 魁、鍋谷 海、白坂 憲章 (近大農)
○Yasuhisa FUKUTA, Kaito SATO, Kai NABETANI, Norifumi SHIRASAKA (Kindai Univ. of Agric.)

【背景と目的】担子菌には，商業的価値の高い種が多数存在しているが，その多くの遺伝子は機能が解明されていない。遺伝子機能解析の手法として一般的に用いる遺伝子欠損株の作出では，効率的なプロトプラスト形成が重要とされる。しかしながら，担子菌の細胞壁は，水溶性β-グルカンを有する外層，アルカリ可溶性α-1,3-グルカンを有する第 2 層，およびキチン細毛繊維を包埋したβ-1,3 およびβ-1,6 結合を有する高度に分岐したアルカリ不溶性のグルカンである内部層の 3 層からなり，その構造の複雑さからセルラーゼまたはキチナーゼを主成分とした細胞壁分解酵素では，種によりプロトプラスト化が困難なものも存在する。一方，スエヒロタケ（*Schizophyllum commune*）において *Bacillus circulans* KA-304 株由来α-1,3-グルカナーゼを用いることで，プロトプラスト形成率が上昇したという報告がある。[1)]そこで本研究では，触媒ドメインにより分類された異なる GH87 型α-1.3-グルカナーゼ遺伝子をそれぞれ *E. coli* 内で発現させ、組換え酵素を用いて担子菌におけるプロトプラスト形成への影響を検証した。

【材料と方法】活性試験の基質として，*Streptococcus mutans* 由来グルコシルトランスフェラーゼ B によって作成した mutan（α-1,3-グルカン）を使用した。異なる触媒ドメインをもつα-1,3-グルカナーゼ遺伝子は *Paenibacillus alginolyticus* NBRC15375 (Pa-Agl) および，*P. glycanilyticus* NBRC16618 (Pg-Agl) よりクローニングした。プロトプラスト形成の対象担子菌類には，*Tricholoma matsutake*(マツタケ)，*Laetiporus sulphureus* (マスタケ)，*Pleurotus salmoneostramineus* (トキイロヒラタケ) を用いた。1% Yatalase (TakaraBio)もしくは，1.0% Lysing enzyme (Sigma Aldrich) を基本の細胞壁消化液とし，Pa-Agl および Pg-Agl それぞれを混合してプロトプラスト形成への影響を評価した。

【結果と考察】Pa-Agl は *E. coli* 内で封入体を形成し不溶化タンパクとして生産されたため，GST タグ融合タンパクとして用いた。先行実験により，Pa-Agl と 1.0% Lysing enzyme を複合した細胞壁消化液では，マツタケとマスタケのプロトプラスト形成が基本の細胞壁消化液と比較して，プロトプラスト数が増加した。発表では，今回検討したそれぞれのα-1,3-グルカナーゼの酵素化学的諸性質についても報告する。

1) Shigekazu Yano et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 1754-1763, 2006

α-1,3-glucanase, protoplast, Basidiomycetous fungi

講演番号：4E2a10
講演日時：3 月 27 日 10:49～ 1 号館 E2 会場

植物トレハラーゼ間の機能比較とα11→α12 ループ上に保存された Thr の Tre6*P*分解活性への寄与
Functional comparison of two plant trehalases and contribution of Thr conserved on α11→α12 loop to activity on Tre6*P*

○田口 陽大、佐分利 亘、森 春英（北大院農）
○Yodai TAGUCHI, Wataru SABURI, Haruhide MORI (Hokkaido Univ.)

【背景】α,α-トレハラーゼは，非還元性糖トレハロース（Tre: Glcα1-α1Glc）を加水分解する酵素である. Tre は一般には, 高等植物において花成や糖代謝を司る生理活性物質として働くトレハロース 6-リン酸（Tre6*P*）の脱リン酸により生合成される．高等植物は Tre6*P*合成酵素および脱リン酸酵素のアイソザイムを複数持つが，一方でトレハラーゼを 1 つしか持たない．このトレハラーゼは糖質加水分解酵素ファミリー37 に属する. 発表者らは, これまでにシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)のトレハラーゼ（AtTRE1）の生化学的性質を解析し，Tre に対する k_{cat} がベル型の pH 依存性を示さずに pH 3.7 と pH 6.9 で極大値を示すこと，Tre の他，Tre6*P*, Glcα1-α1Xyl，Glcα1-α1Gal および Glcα1-4-L-Ara に活性を示すことを明らかにした．本研究では，単子葉植物のモデルであるイネ（*Oryza sativa*）のトレハラーゼ（OsTRE1）の酵素化学的諸性質を解析し，AtTRE1 と比較した．また，植物トレハラーゼにおいて，基質結合部位の構造に関与すると考えられる α11→α12 ループ上に保存される Thr に注目し，他の界の生物のトレハラーゼに保存される酸性アミノ酸残基に置換した AtTRE1 変異酵素（T600D）を解析した.

【方法・結果】OsTRE1 組換え酵素には，pPICZα 誘導体による *Pichia pastoris* 変異体により培養上清に生産させ，Ni-アフィニティカラムクロマトグラフィーにより精製したものを使用した．比活性（基質は 10 mM Tre）は 174 U/mg であった．本酵素の pH-k_{cat} 曲線は AtTRE1 とは異なり，pH 4.5 を最大値とするベル型となった．本酵素は試験した 12 種類の α-グルコシドのうち，Tre，Tre6*P*, Glcα1-α1Xyl，Glcα1-α1Gal および Glcα1-4-L-Ara を基質とし，AtTRE1 と同様の基質特異性を示した．Tre および Tre6*P*に対して k_{cat}/K_m はそれぞれ 767 s^{-1} mM^{-1}，0.237 s^{-1} mM^{-1} であった．植物由来のトレハラーゼでは，基質結合への関与が推測される α11→α12 ループ上に Thr が保存される．これに注目し，細菌および他真核生物由来トレハラーゼによくみられる酸性アミノ酸残基に模し，AtTRE1 変異酵素 T600D を調製して解析を行った．T600D は野生型比 72%の比活性を保持した．Tre6*P* の k_{cat}/K_m は対 Tre 比 0.0112%であり，野生型の 0.0208%よりも一層の低下が確認された．ブタ由来トレハラーゼ（該当残基は Glu）では，分解速度比から Tre6*P*への基質特異性の一層の低さが確認されている．以上より，植物トレハラーゼの α11→α12 上の Thr（AtTRE1 Thr600 に該当）は，反応速度は低いながら Tre6*P*加水分解に関与する残基の一つであると判断された.

Trehalase, Trehalose, Trehalose 6-phosphate

発表責任者：田口陽大（yodai@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：4E2a11
講演日時：3 月 27 日 11:10～ 1 号館 E2 会場

Functional analysis of maltose phosphorylase MalE from *Bacillus* sp. AHU2001 and synthesis of oligosaccharides and sugar phosphates with the enzyme

○Yu GAO, Wataru SABURI, Haruhide MORI (Hokkaido Univ.)

Background: Maltose phosphorylase (MP, EC 2.4.1.8), belonging to Glycoside Hydrolase family (GH) 65, catalyzes the reversible phosphorolysis of maltose to β-D-glucose 1-phosphate (β-Glc1*P*) and D-glucose. MP has a broad acceptor specificity in the reverse phosphorolysis, and produces various oligosaccharides. Previously, we found a putative MP gene (*malE*) downstream of the GH31 α-glucosidase gene (*Bsp*AG31A) in *Bacillus* sp. AHU2001. In this study, enzymatic characteristics of MalE were investigated, and oligosaccharides and sugar phosphates, β-Glc1*P* and D-glucose 6-phosphate (Glc6*P*), were synthesized by the enzyme.

Results and discussion: Recombinant MalE was produced in *Escherichia coli*, and purified by Ni-affinity column chromatography. The purified enzyme showed the phosphorolytic activity 15.9 U/mg to 4 mM maltose in 10 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0). The highest activity was observed at pH 8.1 and at 45˚C. The enzyme was stable in a pH range of 4.5–10.4 (4˚C, 24 h) and at ≤42˚C (pH 8.0, 15 min). MalE obeyed a sequential bi bi mechanism in the phosphorolysis of maltose, and kinetic parameters were determined as follows: k_{cat}, 31.3 s^{-1}; K_{mA}, 0.860 mM; K_{mB}, 0.334 mM; and K_{iA}, 22.4 mM (A, phosphate; B, maltose). In the reverse phosphorolysis with 10 mM Glc1*P* as the donor substrate, MalE utilized D-glucose, D-glucosamine, *N*-acetyl-D-glucosamine, D-xylose, 2-deoxy-D-glucose, 3-deoxy-D-glucose, 6-deoxy-D-glucose, kojibiose, D-mannose, 1,5-anhydroglucitol, L-fucose, methyl α-glucoside, D-allose, D-lyxose and L-sorbose as acceptor substrates and produced oligosaccharides. The disaccharides, produced from D-xylose, D-mannose, D-glucosamine, *N*-acetyl-D-glucosamine, D-allose, D-lyxose, and 2-deoxy-D-glucose, were purified by gel-filtration column chromatography, and their structures other than the product from 2-deoxy-D-glucose were determined to be α-(1→4)-D-glucosides. α-(1→3)-Glucoside was formed in the reaction with 2-deoxy-D-glucose. β-Glc1*P* and Glc6*P* were enzymatically synthesized from maltose. In the synthesis of β-Glc1*P*, addition of yeast, which consumed D-glucose generated by the phosphorolysis of maltose, increased the yield of β-Glc1*P*. The yield of β-Glc1*P* from 100 mM maltose and 400 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) reached 62%. Glc6*P* were produced by the coupling reaction of MalE and β-phosphoglucomutase in the presence of yeast, and the yield of Glc6*P* was 80%.

maltose phosphorylase, oligosaccharide, sugar phosphate

講演番号：4E2a12
講演日時：3 月 27 日 11:21～ 1 号館 E2 会場

ブタ血清由来マルターゼ-グルコアミラーゼを形成する酵素ユニットの機能
Characterization of the N- and C-terminal components of porcine serum maltase-glucoamylase
○渡邊 憲、田上 貴祥、奥山 正幸、木村 淳夫（北大院農）
○Ken WATANABE, Takayoshi TAGAMI, Masayuki OKUYAMA, Atsuo KIMURA (Hokkaido Univ.)

【目的】マルターゼ–グルコアミラーゼ（MGAM）は 2 つの α-グルコシダーゼ・ユニットからなるタンパク質である．ヒトの小腸刷子縁膜に局在する MGAM（hi-MGAM）は，デンプンの代謝酵素として腸管内で機能することが知られている．一方，ブタの血清に含まれる MGAM（ps-MGAM）は，血清中で高い活性が認められるが, その機能は明らかでない. 今回, 両酵素の構造および機能を比較し，ps-MGAM を構成する 2 つのユニットの酵素学的諸性質を解明した.
【方法・結果】ps-MGAM は hi-MGAM と 83%のアミノ酸配列類似性を示した．hi-MGAM は，N 末端側のマルターゼ･ユニットと C 末端側のグルコアミラーゼ･ユニットが連結した構造を持つ. ps-MGAM では，Ser54-Trp921 と Asp927-Ser1826 が hi-MGAM の各ユニットに対応したため，それぞれマルターゼ・ユニット（Nt-ps-MGAM）とグルコアミラーゼ・ユニット（Ct-ps-MGAM）を形成すると推定された. 各ユニットに相当する領域を, *Pichia pastoris* を用いて組換え酵素として生産した. Nt-ps-MGAM および Ct-ps-MGAM は α-グルコシダーゼ活性を示した．それぞれの至適 pH は 7.2 および 7.0，pH 安定域は pH 3.2−9.5 および pH 3.2−10，温度安定域は 68°C および 50°C 以下であった．両ユニットの各種基質に対する加水分解速度を測定した結果，ともにマルトオリゴ糖および可溶性デンプンによく作用したが，イソマルトース，スクロース，*p*-nitrophenyl α-グルコシドおよびグリコーゲンをほとんど分解しなかった．重合度 2−5 のマルトオリゴ糖（G2−G5）および可溶性デンプンの加水分解における k_{cat}/K_m を比較すると，Nt-ps-MGAM は G3 および G4 に対して最も高く，G5 および可溶性デンプンに対する値は低くなり, 短鎖基質への特異性が観察された. 一方で Ct-ps-MGAM は, G4 に最も高い k_{cat}/K_m を示し，G5 および可溶性デンプンに対しても高い値を与えたが，G2 はこれらの 1/10 程度であった．すなわち，Ct-ps-MGAM に長鎖基質の強い分解能が認められた．hi-MGAM のグルコアミラーゼ・ユニットは，活性部位付近において 21 アミノ酸残基によるループ構造およびフェニルアラニン残基を有する．これらの構造因子がサブサイト+2 および+3 を形成し, 長鎖基質に対する特異性に寄与することが報告されている．当該因子は, Nt-ps-MGAM では観察されず，Ct-ps-MGAM に認められた．従って Ct-ps-MGAM において, 同一の構造因子が長鎖のマルトオリゴ糖および可溶性デンプンに対する高い特異性に貢献することが推察された.

α-glucosidase, Pichia pastoris

発表責任者：渡邊 憲（ken14@abs.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：4E2a13
講演日時：3 月 27 日 11:32～ 1 号館 E2 会場

Expression, purification, and some properties of a GH13 enzyme from *Rhodothermus marinus*
○PU QU, Mika Nagaya, Yoshiharu Fujii, Atsushi Nishikawa, Takashi Tonozuka (School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology)

INTRODUCTION

Glycoside hydrolase family (GH) 13 is one of the largest glycoside hydrolase families in the CAZy (Carbohydrate-Active enZymes) database. Most members of GH13 are starch-acting enzymes, which catalyze hydrolysis and transglucosylation at α-1,4- and α-1,6-glucosidic linkages through a retaining mechanism. GH13 is divided into more than 40 subfamilies, and enzymes belong to some subfamilies are characterized by multi-domain structures.

Rhodothermus marinus is a thermophilic Gram-negative bacterium that was isolated from submarine alkaline hot springs in Iceland. The whole genome of *R. marinus* has been sequenced, and 5 enzymes, Rmar_0285, _0286, _1813, _1885, and _1886 have been identified. In this study, we focus on Rmar_0285. The enzyme consists of 990 amino acid residues, and the entire sequence shows low identity with some characterized GH13 enzymes, for example, a branching enzyme from *Escherichia coli* (22%), although the subfamily number has not been given to Rmar_0285 yet. Here we constructed the heterologous expression system in *E. coli*, and investigated some of properties of the enzyme.

METHODS AND RESULTS

A DNA fragment encoding residues from 15 to 886 was amplified by PCR with the genomic DNA from *R. marinus,* and the amplified fragment was subcloned into pET32a. The resulting plasmid, pET32a-Rmar_0285, was transformed into *E. coli* BL21(DE3), and the *E. coli* cells were cultivated. The cells were collected and disrupted by sonication to obtain the crude enzyme. The enzyme was purified using Ni-NTA affinity chromatography, and some properties of Rmar_0285 enzyme fused with thioredoxin were analyzed.

The enzyme did not act on maltose, maltotriose, and *p*-nitrophenyl α-D-maltoside. For maltotetraose, maltopentaose, maltohexaose, and maltoheptaose, the enzyme catalyzed disproportionation reaction to produce a mixture of maltooligosacchairdes lager than maltose. The enzyme hydrolyzed pullulan, and the product was identified as panose.

GH13, disproportionation, maltooligosaccharides

発表責任者：殿塚隆史（tonozuka@cc.tuat.ac.jp）

講演番号：4E2a14
講演日時：3 月 27 日 11:43～ 1 号館 E2 会場

Rhodothermus marinus 由来耐熱性エキソ-1,4-β-マンノビオヒドロラーゼの機能解析
Functional analysis of thermostable exo-1,4-β-mannobiohydrolase from *Rhodothermus marinus*
○佐分利 亘[1]、中澤 篤志[1]、福井 健介[2]、伊吹 昌久[3]、津村 和伸[2]、森 春英[1]([1]北大院農、[2]不二製油グループ本社(株)、[3]不二製油(株))
○Wataru SABURI[1], Atsushi Nakazawa[1], Kensuke Fukui[2], Masahisa Ibuki[3], Kazunobu Tsumura[2], Haruhide Mori[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Fuji Oil Holdings, [3]Fuji Oil)

【背景と目的】β-(1→4)-マンノビオース（Man_2）は，難消化性のオリゴ糖であり，ビフィズス菌や乳酸菌の生育を促進するプレバイオティクス効果や優れた免疫調節機能を有する．養鶏では，腸管免疫の賦活化，マクロファージ細胞のサルモネラ菌殺菌能の向上，腸管による栄養素の吸収能の向上といった機能により，抗生物質代替品と期待されている．β-(1→4)-マンナンを非還元性末端から二糖単位で加水分解する exo-1,4-β-mannobiohydrolase（MBHase; EC 3.2.1.100）は，Man_2 の効率的生産に有用と考えられる．本研究では，好熱性細菌 *Rhodothermus marinus* に見出した MBHase 様タンパク質 Rmar_0467 の機能を解析し，ガラクトマンナンのローカストビーンガム（LBG）からの Man_2 の生産を検討した．
【結果と考察】既知の MBHase は糖質加水分解酵素ファミリー26（GH26）に分類され，$(\beta/\alpha)_8$ バレルからなる触媒ドメインの β→α ループ 2 にエキソ型反応に重要な Asp を有する．また，MBHase はセロビオース 2 エピメラーゼと 4-*O*-β-D-マンノシル-D-グルコースホスホリラーゼ（MGP）による Man_2 代謝において Man_2 の供給を担うとされており，CE と MGP を保有する菌株に MBHase の存在が期待される．そこで，CE および MGP の存在が明らかな耐熱性細菌 *R. marinus* が持つ GH26 タンパク質のうち，上記 MBHase の配列的特徴を持つ Rmar_0467 に注目した． N 末端側 17 残基からなる推定シグナル配列を除いた成熟タンパク質部分を大腸菌 *Escherichia coli* BL21(DE3)により生産し，Ni アフィニティーカラムクロマトグラフィーにより精製した．得られた Rmar_0467 は，平均重合度 15 の直鎖 β-(1→4)-マンナン(還元物；以下 β-(1→4)-マンナンとして使用)に対する反応において Man_2 を特異的に生成した．すなわち，MBHase 活性を示した．Man_2 生成活性に基づき，最適 pH は 5.6，pH 安定域は pH 3.4 以上（11.7 まで分析；4˚C，24 時間），温度安定域は 80˚C 以下（pH 5.6，20 分間）と求められた．三糖から五糖までの β-(1→4)-マンノオリゴ糖（Man_3-Man_5）と β-(1→4)-マンナンに対する速度パラメータを求めた．Man_3，Man_4，Man_5 および β-(1→4)-マンナンに対する k_{cat}/K_m 値はそれぞれ 991 $s^{-1}mM^{-1}$，1630 $s^{-1}mM^{-1}$，1360 $s^{-1}mM^{-1}$，および 1100 $s^{-1}mM^{-1}$ であった．Man_4 に対する値が最も高かったが，Man_4 より長鎖の基質に対し，重合度の増加に伴う k_{cat}/K_m 値の低下が既知酵素より緩やかであった．
100 mg/mL LBG を基質とし，Rmar_0467 と *Thermotoga maritima* 由来耐熱性α-ガラクトシダーゼ(TM1192) を 80˚C にて作用させた．その結果，反応液中の生成 Man_2 濃度は 64.3 mg/mL に達した．LBG のガラクトースとマンノースの比率 1:4 を考慮に入れると，Man_2 生成収率は 76%と見積もられた．

exo-1,4-β-mannobiohydrolase, *Rhodothermus marinus*, GH26

発表責任者：佐分利 亘（saburiw@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：4E2a15
講演日時：3 月 27 日 11:54～ 1 号館 E2 会場

糸状菌由来 6-*O*-α-L-ラムノシル-β-D-グルコシダーゼ（ルチノシダーゼ）の基質特異性

Substrate specificity of fungal 6-*O*-α-L-rhamnosyl-β-D-glucosidase(rutinosidase)

○廣田 瑠花、川﨑 真由、石川 真衣、塩野 義人、小関 卓也（山形大農）
○ Ruka Hirota, Mayu Kawasaki, Mai Ishikawa, Yoshihito Shiono, Takuya Koseki (Fac. Agric.,Yamagata Univ.)

【背景】

ルチノシダーゼは、フラボノイドに 6-*O*-α-L-ラムノシル-β-D-グルコシド（ルチノース）がグリコシド結合したフラボノイド配糖体をアグリコンとルチノースに分解する、GH5 サブファミリー23 に分類される加水分解酵素である。柑橘類の苦味や白濁化の原因であり、ワインやお茶の香りの前駆体であるフラボノイド配糖体を分解することで、飲料の苦味低減や清澄化、香りの向上さらに機能性を持つフラボノイドの回収などに産業利用が可能である。我々はこれまでに麹菌 *Aspergillus oryzae* RIB 40 由来のルチノシダーゼをコードしている遺伝子を特定し、*Pichia pastoris* でのリコンビナント酵素の特徴づけを行った[1)]。本研究では、*A. oryzae* 由来のルチノシダーゼ（AoRut）と糸状菌由来で報告されている他のルチノシダーゼとの基質特異性を比較し、AoRut の特性の検討を行った。

【結果・考察】

A. oryzae 由来のルチノシダーゼをケンフェロール-3-*O*-ルチノシド、ルチン、ヘスペリジン、ジオスミン、ナリンギン、ラミナリンを基質として活性測定を行い、逆相 HPLC を用いて基質特異性解析を行った。K_m 値はジオスミンで最も小さく、ルチンで高かった。k_{cat} 値はケンフェロール-3-*O*-ルチノシドで最も高く、次いでルチン、ヘスペリジン、ジオスミンの順であった。総合的に触媒効率の高さも k_{cat} 値の順に一致した。一方、ナリンギンやラミナリンに対しては活性を示さなかった。

以上の結果から AoRut は、二糖ルチノースを特異的に認識していることが示唆された。また触媒効率の相対活性から、AoRut はアグリコンにフラボノール骨格を持ち、3 位にルチノース結合様式を持つ基質を好むことも考察された。

また糸状菌で報告されている *Aspergillus niger* 由来のルチノシダーゼとはルチンに対する触媒効率が高い点で類似の基質特異性を有するが、*Acremonium sp.* 由来のルチノシダーゼはルチンに活性を示さないこと、AoRut では活性の低い基質に対して特異性をもつことなどから基質特異性が異なることがわかった。

現在同じファミリーの加水分解酵素の多くが糖転移活性を持つことから、本酵素の糖転移活性においても検討を行っている。

1) Ishikawa et al. Appl.Microbiol.Biotechnol.,102,3193-3201(2018)

rutinosidase, *Aspergillus oryzae*, substrate specificity

発表責任者：廣田瑠花（hirotaluka.1995@gmail.com）

講演番号：4E3a01
講演日時：3 月 27 日 09:00～ 1 号館 E3 会場

NSY マウスの 2 型糖尿病遺伝子座（*Nidd1nsy*）のコンジェニックマウスを用いた解析
Congenic analysis of type 2 diabetes QTL (*Nidd1nsy*) of diabetic NSY mouse
○長田 裕太郎[1]、小林 美里[1]、田中 沙良[1]、大野 民生[2]、村井 篤嗣[1]、堀尾 文彦[1] ([1]名古屋大院・生命農、[2]名古屋大学・医学系)
○Yutaro OSADA[1], Misato KOBAYASHI[1], Sara TANAKA[1], Tamio OHNO[2], Atsushi MURAI[1], Fumihiko HORIO[1] ([1]Nagoya Univ. Bioagricultural Sciences, [2]Nagoya Univ. Medicine)

【目的】
2 型糖尿病はインスリン分泌不全とインスリン抵抗性とが組み合わさって発症し、これらは遺伝因子と環境因子とに影響を受ける。NSY マウスは肥満とインスリン抵抗性、インスリン分泌不全を発症する 2 型糖尿病モデルである。NSY の遺伝解析（QTL 解析）により、第 11 番染色体（Chr.11）に糖尿病遺伝子座（*Nidd1nsy*）が検出され、対照系統の C3H/HeN（C3H）マウスの Chr.11 を NSY の Chr.11 に置換したコンソミック系統で糖尿病形質が確認されている。本研究では、このコンソミック系統から作出された 8 種類のコンジェニック系統を用いて、*Nidd1nsy* の責任遺伝子の糖尿病作用の解析とその存在領域の限局を行うことを目的とした。
【方法】
8 種類のコンジェニック系統（R1、R2、R2B、R2C、R2E、R2F、R2H、R2J）と対照系統の C3H の雄性マウスを、4 週齢から 11 週間、通常飼料（日本クレア（株）、CE2）または高脂肪食で飼育した。飼育期間中に、血糖値測定、耐糖能試験、インスリン分泌能試験を行った。また、高脂肪食群ではインスリン負荷試験も加えて行った。
【結果および考察】
通常飼料群では C3H と比較して R1（セントロメア～25.96Mb が NSY）、R2E（セントロメア～40.05Mb）、R2F（セントロメア～33.19Mb）は耐糖能低下とインスリン分泌不全を示した。高脂肪食群では R1、R2E、R2F に加えて R2C（35.69～71.70Mb）でも耐糖能低下が観察されたが、R2C はインスリン分泌不全ではなくインスリン抵抗性が観察された。R2B（48.49～71.70Mb）、R2H（35.69～44.45Mb）、R2J（25.96～40.05Mb）では通常飼料群、高脂肪食群ともに糖尿病形質は検出されなかった。これらのことから、*Nidd1nsy* の責任遺伝子は、R1、R2E、R2F の R2J と重複しない領域（セントロメア～25.96Mb）と、R2C の R2B、R2H と重複しない領域（44.45～48.49Mb）に、それぞれ 1 つ以上存在し、前者はインスリン分泌不全に後者はインスリン抵抗性に関与していることが示された。現在、これらの候補遺伝子の探索を進めている。

NSY mouse, Type 2 diabetes QTL, Congenic mouse

発表責任者：長田裕太郎（osada.yutaro@i.mbox.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：4E3a02
講演日時：3 月 27 日 09:11～ 1 号館 E3 会場

糖・脂質代謝を制御する転写因子 ChREBP の活性を抑制する食品成分の探索

Screening of food factors that inhibit the transcriptional activity of ChREBP, a key regulator of carbohydrate and lipid metabolism

○吉満 和、清水 誠、山内 祥生、佐藤 隆一郎（東大院・農生科・応生化）
○Nodoka YOSHIMITSU, Makoto SHIMIZU, Yoshio YAMAUCHI, Ryuichiro SATO (Tokyo Univ.)

【研究の背景・目的】Carbohydrate-responsive element-binding protein (ChREBP)は、糖に応答して解糖系・脂質合成系酵素の発現を誘導する転写因子であり、糖・脂質代謝のキーレギュレーターの一つである。これまでに、ChREBP ノックアウトマウスでは解糖系・脂質合成系酵素の発現低下により高糖質食摂取時の肝脂肪蓄積が抑制されること、shRNA により肝臓の ChREBP をノックダウンした *ob/ob* マウスでは、脂肪肝の改善とともに、脂質異常症やインスリン抵抗性、高血糖が改善すること等の報告がなされている。さらに我々の研究室では、近年発見された新規アイソフォームである ChREBP β がフルクトース誘導性脂肪肝の形成に寄与することを明らかにしている。したがって、ChREBP の活性を抑制できれば、脂肪肝の進行を阻止できると考えられる。そこで、脂肪肝等の糖質過多を起因とする代謝疾患の発症・進行の予防を目指して、ChREBP 活性の評価系を新たに構築し、ChREBP の活性を抑制する食品成分の探索を行った。
【方法・結果】ChREBP 結合配列(ChoRE)を含むレポータープラスミドを用いたアッセイにより、約 300 種類の食品成分から、ChREBP の活性を変動させるものをスクリーニングした。まず、低グルコース培地と比較して、高グルコース培地による Luc 活性の上昇を確認した。また、リン酸化の亢進あるいは *O*-GlcNAc 化抑制により ChREBP 活性をそれぞれ抑制することが知られる Forskolin, Azaserine の添加により、高グルコースによる Luc 活性の上昇がキャンセルされた。以上の検証より、構築した評価系は ChREBP 活性を評価することが可能であると判断した。1st スクリーニングでは、数十種類の食品成分が Luc 活性を変動させた。続いて、内因性 ChREBP に対する食品成分の効果を検証するため、高グルコース培地で培養したラット初代培養肝細胞に食品成分を添加し、ChREBP 標的遺伝子の発現を測定した。その結果、ChREBP 標的遺伝子の発現を低下させる食品成分が複数見出された。一部の食品成分は ChREBP 自体の発現を低下させたことから、複数の経路で ChREBP を抑制する可能性が示唆された。食品成分によっては、低グルコース培地で培養した群の値付近まで ChREBP 標的遺伝子の発現を低下させるものがあり、糖質の過剰摂取により誘導される解糖系・脂質合成系の亢進を強力に阻止することで、脂肪肝の発症・進行を予防できると大いに期待される。また、既知アイソフォームの ChREBP α よりも高い転写活性を持つ ChREBP β を特異的に抑制している可能性のある食品成分も見出され、食品成分による ChREBP 抑制を介した脂肪肝の予防のみならず、アイソフォーム特異的な制御による代謝疾患の予防・改善という新たなアプローチに有用な知見を提供することができた。

ChREBP, NAFLD, food factors

講演番号：4E3a03
講演日時：3 月 27 日 09:22～ 1 号館 E3 会場

フルクトース誘導性脂肪肝におけるセリン合成酵素の発現制御
Regulation of the Serine Synthase in Fructose-induced Fatty Liver
○不野 歩美、清水 誠、佐藤 隆一郎（東京大）
○Ayumi FUNO, Makoto SHIMIZU, Ryuichirou SATO (Tokyo Univ)

【背景】脂肪肝は、肝臓に過剰な脂質が蓄積した状態であり、肝硬変や肝臓がんといった重大な疾病につながる。特に非アルコール性脂肪肝は、近年患者数が増大している疾病である。非アルコール性脂肪肝は食生活の乱れや、エネルギーの過剰摂取に加え、タンパク質やアミノ酸の摂取不足によっても引き起こされる。我々はこれまでに、フルクトース誘導性の非アルコール性脂肪肝において、セリンの合成酵素 Phgdh (phosphoglycerate dehydrogenase)、Psat1 (phosphohydroxythreonine aminotransferase1)、Psph(Phosphoserine phosphatase)の遺伝子発現が亢進することを見出した。しかし、非アルコール性脂肪肝とセリンの関係性については分かっていない。そこで本研究では、非アルコール性脂肪肝におけるセリンの働きを明らかにするべく、特にセリン合成酵素に着目し、解析を行った。
【方法・結果】野生型マウスに 30%フルクトース水を二週間与えると、通常飼育の野生型マウスに比べ肝臓中のトリグリセリド量が上昇し、非アルコール性脂肪肝を誘発していることを確認した。続いて肝臓中の遺伝子発現とタンパク質発現を解析したところ、全てのセリン合成酵素(Phgdh、Psat1、Psph)の遺伝子発現が亢進していたが、タンパク質レベルの増加が見られたのは、Psph でのみであった。
これまでに我々は、インスリンシグナルがセリン合成酵素の発現制御に重要であることを見出している。レポーターアッセイによる解析の結果、インスリンシグナルに関与する転写因子 Foxo ファミリー(Foxo1、Foxo3a、Foxo4)が Psat1 の発現制御に影響を及ぼすことも明らかにした。したがって、Psat1 と同じくセリン合成酵素である Psph も、Foxo ファミリーによって発現制御されていることが考えられる。そこで、マウス Psph 遺伝子のプロモーター領域を挿入したレポータープラスミドを HEK293T 細胞に導入し、Foxo ファミリーが、Psph のプロモーター活性に及ぼす影響を解析した。その結果、Foxo ファミリーが、Psph のプロモーター活性を抑制することを見出した。さらに、5`末端から段階的にプロモーター領域を欠失させたところ、Foxo ファミリーの中で生体にとって最も重要なアイソフォームである Foxo1 の結合配列様が存在することを見出した。
【結論】マウスのフルクトース水摂取実験の結果から、セリン合成酵素 Psph の発現亢進は、Foxo により転写制御され、肝臓中トリグリセリド量の変動に関与する可能性が示された。現在はアデノウイルスを用いて Psph を肝臓に発現させ、脂質代謝における機能解析を行っている。

NAFLD, aminoacid, synthetic

講演番号：4E3a04
講演日時：3 月 27 日 09:33～ 1 号館 E3 会場

3 重結合を有する脂肪酸 6-ODA・9-ODA による FFA1 依存的インスリン分泌促進効果
FFA1-dependent Potentiation of Insulin Secretion by 6-ODA or 9-ODA

○西野 勝俊[1]、上杉 晴香[1]、平澤 明[2]、Mohamed Neffati[3]、宮前 友策[4]、増田 誠司[1]、神戸 大朋[1]、礒田 博子[5]、入江 一浩[6]、永尾 雅哉[1]([1]京大院・生命、[2]京大院・薬、[3]IRA・Tunisia、[4]筑波大・生命環境、[5]筑波大・地中海・北アフリカ研究センター、[6]京大院・農)
○Katsutoshi NISHINO[1], Haruka UESUGI[1], Akira HIRASAWA[2], Neffati Mohamed[3], Yusaku MIYAMAE[4], Seiji MASUDA[1], Taiho KAMBE[1], Hiroko ISODA[5], Kazuhiro IRIE[6], Masaya NAGAO[1] ([1]Grad Sch Biostudies, Kyoto Univ, [2]Grad Sch Pharmacol, Kyoto Univ, [3]Arid Zone Res Inst, Tunisia, [4]Facul Life and Environ Sci, Univ Tsukuba, [5]ARENA, Univ Tsukuba, [6]Grad Sch Agric, Kyoto Univ)

【目的】シソ科植物であるニガハッカ（*Marrubium vulgare*）から単離・同定した 6-octadecynoic acid（6-ODA）は、PPARγリガンドとして作用する脂肪酸で、6 位に 3 重結合を有する。一般に三重結合を有する脂肪酸の機能はあまり解析が進められていない。そこで、6-ODA ならびに 9 位に 3 重結合を持つ 9-octadecynoic acid (9-ODA)が、中・長鎖脂肪酸の G タンパク質共役型受容体である FFA1(GPR40)もしくは FFA4（GPR120）を活性化するか、またこれらの脂肪酸が GPR40 を介したグルコース依存性インスリン分泌の促進効果を有するかに関して検討した。
【方法と結果】Dox 添加により FFA1 もしくは FFA4 が誘導発現されるように作製した T-REx™-GPR40、-GPR120 細胞を用いて、6-ODA、9-ODA が FFA1、FFA4 依存的に MAPK 経路の細胞外シグナルキナーゼ（ERK）をリン酸化するか検討した。その結果、両脂肪酸は共に FFA 1 を介して ERK のリン酸化を促進したが、FFA4 を介してのリン酸化をほとんど活性化しなかった。このことから 6-ODA および 9-ODA は、FFA1 に特異的なアゴニストであると考えられた。

そこで、マウス膵β細胞株 MIN6 を用いて、6-ODA と 9-ODA によるインスリン分泌誘導活性について調べた。その結果、両脂肪酸は用量依存的にインスリン分泌を促進した。さらにその分泌にはグルコース依存性が認められた。この分泌促進は、FFA1 アンタゴニストである GW1100 添加により抑制されたことから、6-ODA と 9-ODA は FFA1 依存的にインスリン分泌を促進することが明らかとなった。また、これら脂肪酸は刺激後 10 分以内の早い第一相の分泌ではなく、それより少し遅い第二相の分泌を促進した。

膵β細胞内での第二相のインスリン分泌は、アクチンのリモデリングを介して、細胞膜から少し離れたところにある分泌顆粒が移動して分泌されるとされている。そこで 6-ODA、9-ODA のアクチンへの効果を調べたところ、両脂肪酸の刺激により細胞膜周辺にファロイジンで染色される F-アクチンが観察されたが、GW1100 共存下では観察されなかった。このことから、FFA1 依存的なアクチンリモデリングのインスリン分泌への関与が確認された。

以上の結果から、6-ODA および 9-ODA は FFA1 のアゴニストとして機能し、FFA1 活性化を介したインスリン分泌誘導活性を有することが明らかとなった。

【謝辞】 本研究は JST / JICA の地球規模課題対応国際科学技術協力プログラム（SATREPS）の支援により実施しました。

acetylenic fatty acid, insulin secretion, FFA1

発表責任者：西野　勝俊（nishino.katsutoshi.7x@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4E3a05
講演日時：3 月 27 日 09:44～ 1 号館 E3 会場

等カロリー摂取条件下での食餌脂肪の量と質の違いがエネルギー代謝、腹腔内脂肪蓄積、肝臓中性脂肪濃度に与える影響 -C57BL/6J マウス-

Effects of isocaloric low and high fat diets on energy metabolism, visceral fat deposition and hepatic triacylglycerol concentration in C57BL/6J mice

○池田 郁男[1]、韮野 美咲[2]、小川 裕香里[2]、林 中佳[3]、井上 奈穂[4] ([1]東北大未来科学技術共同研究センター、[2]東北大農、[3]東北大院農、[4]山形大農)
○Ikuo Ikeda[1], Misaki Nirano[2], Yukari Ogawa[2], Chyuuka Rin[3], Nao Inoue[4] ([1]NICHe at Tohoku Univ., [2]Fac. Agric. Tohoku Univ., [3]Grad. School Agric. Tohoku. Univ., [4]Fac. Agric. Yamagata Univ.)

【目的】一般的に高脂肪食とくに高飽和脂肪食は肥満しやすいと言われ、動物試験では高飽和脂肪食で肥満させる試験がよく行われる。しかし、等カロリー摂取条件下で、食事脂肪および炭水化物含量の違い、あるいは、食事脂肪の質の違いが腹腔内脂肪蓄積にどの程度影響するかは十分には理解されていない。本研究では、低脂肪高炭水化物食と高脂肪低炭水化物食を C57BL/6J マウスに pair-feeding で与えることで、等カロリー摂取条件下での各種食餌脂肪の量と質の影響を調べた。食餌脂肪は大豆油、ラードおよび魚油添加大豆油を用いた。低脂肪食と高脂肪食の脂肪含量は 7%重量および 21%重量とし、高脂肪食での脂肪の増加分は炭水化物を減量した。それぞれの食餌のエネルギー量は低脂肪食 4.03kcal/g、高脂肪食 4.73kcal/g である。
【実験方法】6 週齢雄性 C57BL/6J マウスを 1 週間程度予備飼育後、摂食試験を行った。7 週目に生体ガス質量分析装置を用いてエネルギー代謝の測定を行った。9 週間飼育後絶食なしで屠殺した。実験 1、2 および 3 でそれぞれ、大豆油、ラードおよび魚油添加大豆油を食餌脂肪とし、7%脂肪食と 21%脂肪食で比較した。
【結果と考察】飼育 7 週目に測定したエネルギー消費量は、低脂肪食群と高脂肪食群で大豆油と魚油では差がなく、ラードでは高脂肪食でわずかではあるが有意に低かった。9 週間での体重増加量は、低脂肪食群に比べ高脂肪食群で、大豆油では有意な増加、ラードでは増加傾向、魚油では差がなかった。腹腔内脂肪重量はいずれの食事脂肪でも高脂肪食で有意な増加が見られた。高脂肪食での腹腔内脂肪重量の増加量は 100g 体重当りで 1g 程度であり、食餌脂肪の違いの影響はなかった。高脂肪食での(腹腔内脂肪重量増加量)／(体重増加量)の割合は、大豆油では 23%、ラードでは 17%、魚油では 56%であり、大豆油およびラードでは皮下脂肪を含めた除脂肪体重の増加が大きいことが示唆された。肝臓トリアシルグリセロール(TAG)濃度は、低脂肪食群に比べ高脂肪食群で、大豆油では有意に高く、ラードでは高い傾向、魚油では有意に低かった。従って、肝臓 TAG 濃度の変動は、必ずしも腹腔内脂肪重量の変化と関係しないと考えられた。糞便への見かけの脂肪酸カロリー排泄量は、大豆油とラードでは、低脂肪食群に比べ高脂肪食群で 0.5%前後高く、一方、魚油では 1.7%高かった。
以上の結果から、高脂肪食では低脂肪食に比べ、腹腔内脂肪重量の有意な増加が認められるものの、その差はわずかであり、エネルギー代謝測定で検知することは困難であると考えられた。また、腹腔内脂肪重量の蓄積に食餌脂肪の質の違いの影響は認められないと考えられた。

energy metabolism, high fat diet, visceral fat deposition

発表責任者：池田郁男（ikuo.ikeda.b4@tohoku.ac.jp）

講演番号：4E3a06
講演日時：3 月 27 日 10:05～ 1 号館 E3 会場

フタホシコオロギ *Gryllus bimaculatus* の脂質分解酵素が体液中の脂肪酸組成へ与える影響
Effects of lipases on heamolymph fatty acid composition in the two-spotted cricket *Gryllus bimaculatus*
○福村 圭介、永田 晋治（東大院・新領域・先端生命科学）
○Keisuke FUKUMURA, Shinji NAGATA (Grad. Sch. of Fro. Sci., the Univ. of Tokyo)

【目的】脂質動員ホルモン Adipokinetic hormone (AKH)は、長期の飛翔や生殖に必要なエネルギーを供給する生理活性を有する昆虫のペプチドホルモンである。AKH が生理活性を発現する際、脂質貯蔵器官である脂肪体内のトリアシルグリセロール(TAG)は、ジアシルグリセロール(DAG)と遊離脂肪酸に分解され、体液中に放出される。そこで、フタホシコオロギ *Gryllus bimaculatus* を用いて、AKH が脂肪体に作用する際に、脂肪体中の TAG を DAG と遊離脂肪酸に変換する脂質分解酵素を同定することを目的とした。
【方法・結果】フタホシコオロギの脂肪体における脂質分解酵素には、Hormone-sensitive lipase (Hsl)と、Brummer (bmm)がある。先ず、体内の栄養状態が脂質分解酵素に与える影響を検討するため、絶食状態および再給餌後のフタホシコオロギの脂肪体における *Hsl* および *bmm* の転写量を定量 PCR で測定した。その結果、脂肪体の *Hsl* の転写量は、24 時間の絶食状態および 9 時間の再給餌後では、顕著な差は認められなかった。また、脂質分解酵素である *bmm* の転写量は、再給餌後と比べ、絶食状態で顕著に高かった。これらの結果から、*bmm* は栄養状態に応答し、転写レベルで活性化する脂質分解酵素であることが分かった。一方、Hsl が AKH シグナルの下流で機能しているかを検討するため、RNA 干渉法(RNAi)で *Hsl* をノックダウンした個体(Hsl^{RNAi})を用いて以下の実験をした。先行研究から、AKH 投与により、体液中の飽和脂肪酸が減少し、不飽和脂肪酸が増加することが分かっていたため、Hsl^{RNAi} の体液由来の脂肪酸を分析することで検討した。その結果、Hsl^{RNAi} の体液では、パルミチン酸(16:0)およびステアリン酸(18:0)の割合が増加し、オレイン酸(18:1)およびリノール酸(18:2)の割合は減少した。それに対し、Hsl^{RNAi} における AKH 投与後の体液では、飽和脂肪酸の割合の減少および不飽和脂肪酸の割合の増加は認められなかった。つまり、AKH 刺激に応答し、体液中の飽和および不飽和脂肪酸の組成が変化する現象には、Hsl が関与していることが明らかとなった。

Gryllus bimaculatus, Adipokinetic hormone, lipase

講演番号：4E3a07
講演日時：3 月 27 日 10:16～ 1 号館 E3 会場

Endocrine network "Endocrinet" upon feeding behavior in insects by real hormone network and virtual bibliometric network

○Yijun ZHOU, Shinji NAGATA (Grad. Sch. of Fro. Sci., the Univ. of Tokyo)

【Background & Aim】Insect neuropeptides are involved in a variety of host functions. The orchestration of multiple neuropeptides and bioactive peptides determines a repertoire of biological processes including energy metabolism, growth and development, reproduction, osmoregulation and feeding behavior. Knowledge of the regulatory peptidyl factors in insects has reached at a saturation to be countable factors due to the contribution of super-progresses in the transcriptomic and genomic analyses. Along with the increasing number of studies and publications dealing with identification and characterization of neuropeptides and bioactive compounds through any comprehensive analytic information, sometimes we might lose the true interactions and relationship among those factors, which are of great meaning and can enlighten orientations. To address the interaction of those factors, we here present the network draft generated by the endocrinal nodes in insects.

【Methods & Results】In this study, we summarized the endocrine network based on co-occurrence in different publications by VOSviewer to realize the interaction among neurohormones and bioactive compounds. In total, 1132 publications from 1990 to 2018 in PubMed are selected for bibliometric analysis. To date, available bibliometric interactions revealed that FMRFamide and AKH exhibited the strongest interaction or communication with other neuropeptides, following by Neuropeptide F and insulin, possibly becoming the hub neuropeptides in the endocrine network. Also, the influence of neuropeptides on the feeding behavior in cricket was analyzed in the view of food intake, feeding pattern. In brief, synthesized neuropeptides were subjected to feeding-related behavioral and metabolic assays. Consequently, most of neuropeptides in crickets were involved in energy homeostasis by altering feeding behavior. Among them, AKH exhibited the strongest contributions to inhibiting the food intake and delaying first bite time, eventually responding to its oriented roles in bibliometric network. However, this generated bibliometric network encountered the resolving issue with the presence of variants such as Allatostatin B-1 to B-11, which influence differently on feeding behavior, but none of them show positive effects (elevation of food intake). We concluded that various neuropeptides' regulatory roles exert at any phases for modification of feeding behavior in the cricket. This study is the first step to get close to understand the overview of the endocrine network "Endocrinet".

Endocrine, Feeding behavior, Bibliometric

発表責任者：Yi-Jun Zhou（0228757079@edu.k.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4E3a08
講演日時：3 月 27 日 10:27～ 1 号館 E3 会場

高トリグリセリド・低 HDL コレステロール血症マウスの遺伝解析による原因遺伝子の探索

Genetic analysis of responsible gene for hypertriglyceridemia and low HDL hypocholesterolemia in mice

○坪内 宏樹、石井 玲佳、石川 明、村井 篤嗣、堀尾 文彦、小林 美里（名大生命農）
○Hiroki TSUBOUCHI, Reika ISHII, Akira ISHIKAWA, Atsushi MURAI, Humihiko HORIO, Misato KOBAYASHI (NAGOYA Univ.)

【背景・目的】
脂質異常症は、心血管疾患や脳血管疾患の危険因子である動脈硬化と密接に関わる疾患である。我々は、S 社の C3H /HeN マウス（C3H-S）が高 TG 血症および低 HDL コレステロール（HDL-C）血症を呈することを見出した。本研究では、高 TG 血症・低 HDL-C 血症の原因遺伝子を探索するため、C3H-S マウスと正常な血中脂質濃度を示す C57BL /6J（B6）マウスとの交配群による遺伝解析を行い、候補遺伝子を選抜することを目的とした。
【方法】
C3H-S マウスと B6 マウスを交配して F1 マウスを得た後、F1 同士の兄妹交配から F2 交雑マウス（200 匹）を作出した。雄性の F2 マウスを通常食（日本クレア（株）、CE2）にて飼育し、8 週齢時に血中脂質濃度測定および解剖を行った。F2 マウスの肝臓からゲノム DNA の抽出を行い、血中 TG 値の上位と下位の各 15 匹の DNA を等濃度でプールし、57 個のマイクロサテライトマーカーにて遺伝子型を判定することで高 TG 値に寄与する染色体部位を決定した（バルク法）。
【結果・考察】
F2 の表現型解析において、C3H-S タイプ（高 TG 群）と B6 タイプ（低 TG 群）の個体が出現した。バルク法により、C3H-S の高 TG 血症の原因遺伝子は第 2 番染色体上の 149Mb～173Mb の領域に存在すると示唆された。血中脂質濃度の主成分分析結果から、第 1 主成分は表現型への寄与率が 68.9%であり、高 TG 個体では HDL-C、TC、リン脂質（PL）が低値の傾向を示すことを明らかにした。また、このマウス第 2 番染色体の 149Mb～173Mb 領域内に存在する脂質代謝関連遺伝子 *Pltp* を候補遺伝子として選抜した。血清中 PLTP 活性測定と肝臓および精巣上体脂肪での mRNA 発現レベルを正常な脂質濃度を示す C 社の C3H マウス（C3H-C）と C3H-S との間で比較した結果、どちらも C3H-S で低値を示した。これらのことから、第 2 番染色体の *Pltp* 遺伝子が C3H-S マウスの TG、TC、PL の代謝に寄与する遺伝子である可能性が示された。

triglyceride, cholesterol, lipid metabolism

発表責任者：小林美里（misatok@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：4E3a09
講演日時：3 月 27 日 10:38～ 1 号館 E3 会場

発酵前後の味噌がマウスの運動能に与える影響

The effect of non-fermented and fermented miso on the motility in mice

○大河内 蘭、山本 和史、都築 毅（東北大院農）
○Ran Okochi, Kazushi Yamamoto, Tsuyoshi Tsuduki (Grad. Sch. of Agri. Sci., Tohoku Univ.)

【目的】近年、食生活は豊かになり飽食の時代と言われる反面、栄養バランスの偏りや食習慣の乱れなど様々な要因により生活習慣病に罹患する人が増加している。そんな中、古くから伝承されてきた伝統食品には、その栄養的価値や嗜好的価値ばかりでなく、人の健康を維持・増進する機能性が示唆されている。日本では伝統的に味噌や醤油、納豆などの大豆の発酵食品を摂取してきており、発酵により機能性が高まることが示唆されている[1]。我々は先の研究で、2010 年および 1975 年日本食における味噌の摂取量の違いが肥満の進展に与える影響を検討したところ、1975 年味噌食が内臓脂肪蓄積を抑制し脂肪細胞のサイズを小さくした。またこの味噌の効果は、運動を負荷することにより増強した[2]。このように、運動と味噌は相互作用を発揮することが考えられたが、味噌が運動機能にどのような影響を与えるか、さらには発酵の有無は重要なのかは明らかになっていない。そこで本研究では、味噌の発酵の有無が、運動機能にどのような影響を与えるかを検討した。
【方法】C57BL/6J マウス（9 週齢、雄性）を、control 食群、高脂肪食群、高脂肪食を与え運動させる群、発酵前の味噌を 2.6%添加した高脂肪食を与え運動させる群、発酵後の味噌を 2.6%添加した高脂肪食を与え運動させる群の 5 群に分け、8 週間飼育した。飼育最終日にドレッドミルを用いた運動能力試験を行い、血清や臓器を採取し各種分析に供した。
【結果】control 群と比べ、大豆の発酵により持久力の増強が見られた。以上より、大豆を発酵させることにより、運動機能の増加が示された。メカニズムを解明するために、腓腹筋における遺伝子発現解析を行ったところ、グルコース輸送に関わる *Glut4* の発現量が、味噌の摂取と運動により有意に増加した。よって、味噌の摂取により骨格筋において効率的にグルコースが取り込まれるために持久力が上昇したことが示唆された。実際に、味噌の摂取は糖代謝を改善していた。また、肝臓における組織学的観察では、運動をさせた群で肝細胞内の油滴の減少が確認できた。メカニズムを解明するために、肝臓における遺伝子発現解析を行ったところ、運動により脂肪酸合成に関わる分子が抑制されていた。よって、運動により肝臓への脂質蓄積が低下することが示された。以上により、味噌は発酵により有益な効果が増強し、特に骨格筋へのグルコース取込を促進することでエネルギー供給を手助けし、運動機能を増強することが示唆された。

[1] M. Kushida, R. Okouchi, T. Tsuduki, et al., Mol. Nutr. Food Res. 2018.
[2] 都築毅. 日本醸造協会誌. 2017.

miso, Fermented soybean food, motility

講演番号：4E3a10
講演日時：3 月 27 日 10:49～ 1 号館 E3 会場

FGF21 が表皮角化細胞に及ぼす影響
Effects of FGF21 on epidermal keratinocytes
○金野 凌介、岩槻 健、大石 祐一、山根 拓実（東農大院農）
○Ryosuke KONNO, Ken IWATSUKI, Yuichi OISHI, Takumi YAMANE（Graduate school of Agric,Tokyo Univ.of Agric.）

【背景】
Fibroblast growth factor (FGF) 21 は主に肝臓で産生され、標的組織にエンドクライン様に作用することが報告されているが、創傷治癒との関係は未だ不明である。これまでに我々は、野生型（WT）マウスに比べ FGF21 遺伝子欠損（KO）マウスでは創傷治癒が遅延することを報告している（金野ら、第 48 回日本創傷治癒学会、2018)。先行研究より、FGF21 が皮膚線維芽細胞の遊走を促進することが報告されているが、表皮角化細胞に及ぼす影響は不明な点が多い。そこで本研究では、ヒト表皮角化細胞株（HaCaT 細胞）を用い、FGF21 が表皮に及ぼす影響について検討した。
【方法】
HaCaT 細胞をスクラッチ後、培地を FGF21 添加培地（0、200 ng/mL）に交換し、経時的に撮影、創面積を測定した。FGF21 は MAPK (Mitogen-activated Protein Kinase) 経路を活性化することが報告されている。そこで、p-38、c-Jun N-terminal Kinase (JNK) 、Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) 経路の阻害剤を用いて、各経路阻害時の FGF21 添加による細胞遊走の変化を測定した。p-38 経路の阻害剤として SB203580 (3 μM) 、JNK 経路の阻害剤として SP600125 (1 μM) 、ERK 経路の阻害剤として PD98059 (1 μM) を用いた。HaCaT 細胞をスクラッチ後、培地を Vehicle 培地、FGF21 添加培地、FGF21＋各阻害剤添加培地、各阻害剤添加培地に交換した。各培地に交換した後、撮影、創面積を測定した。
【結果及び考察】
スクラッチ後 6、12、24、48 時間において Vehicle 群に比べ、FGF21 添加群では創面積の収縮が有意に促進された。SB203580 添加では、FGF21 添加による細胞遊走促進に変化はなかった。SP600125 添加では、FGF21 添加による細胞遊走の促進が消失した。また、PD98059 添加でも同様に、FGF21 添加による細胞遊走の促進が消失した。これらのことから、FGF21 は、JNK、ERK 経路を介してシグナルが伝達され、細胞遊走を促進し、創傷治癒に作用している可能性が示唆された。

FGF21, wound healing, epidermal keratinocyte

発表責任者：山根 拓実（ty204887@nodai.ac.jp）

講演番号：4E3a11
講演日時：3 月 27 日 11:10～ 1 号館 E3 会場

カルパインの制御異常は乾癬発症に関与する

Aberrant calpain activation is involved in development of psoriasis.

○秦 勝志[1]、西藤 泰昌[2]、土井 奈穂子[1]、北村 ふじ子[1]、反町 洋之[1]、小野 弥子[1] ([1]都医学研・カルパイン PJ、[2]都医学研・基盤技術研究センター)
○Shoji HATA[1], Yasumasa Nishito[2], Naoko Doi[1], Fujiko Kitamura[1], Hiroyuki Sorimachi[1], Yasuko Ono[1] ([1]Calpain PJ, Tokyo Metro. Inst. Med. Sci., [2]Center for Basic Tech. Res., Tokyo Metro. Inst. Med. Sci.)

乾癬は、表皮細胞の過増殖と角化異常を所見とする難治性の慢性皮膚疾患であり、発症に T 細胞性の免疫応答の関与が知られている。最近、我々は、乾癬発症の新規増悪因子として、Ca^{2+}依存性細胞内プロテアーゼであるカルパイン(CAPN)を発見した。カルパインは、Ca^{2+}によって活性制御され、基質の機能や性質を限定分解(プロセシング)により調節する細胞内システインプロテアーゼである。哺乳類には様々な発現組織、構造上の特徴を有する 15 種の分子種(CAPN1～3, 5～16)が存在する。近年の遺伝子改変マウス樹立やプロテオーム解析の進歩により、分子種固有の機能が明らかになりつつある。

我々は、消化管特異的分子種 CAPN8 の機能解析の過程で、CAPN8 全身過剰発現 Tg マウスが乾癬様皮膚炎を呈することを見出した。ところが、*Capn8*KO マウスに乾癬を誘導しても症状が緩和しないことから、実際の病態形成における他の分子種の関与が示唆された。分子種を特定するため、乾癬モデルマウス皮膚におけるカルパイン遺伝子群の発現変動を調べたところ、CAPN8 発現量に有意な変動が見られなかった一方、皮膚特異的分子種 CAPN12 に有意な発現上昇が見られた。*Capn12*KO マウスを作出し乾癬誘発すると症状が抑制されたことから、乾癬病態形成への CAPN12 の関与が明らかとなった。

乾癬の発症は、γδT 細胞と Th17 細胞の連鎖的かつ恒常的な活性化とそれに伴うサイトカイン(IL-17、IL-22)産生の増加を主原因とする免疫応答によるという説が有力である。現在、病態形成機序について解析を進めているが、これまでに CAPN12 が γδT 細胞の分化亢進に作用する可能性を見いだした。これらの知見から、CAPN12 活性異常による乾癬発症機序について考察したい。

calpain, skin

講演番号：4E3a12
講演日時：3 月 27 日 11:21～ 1 号館 E3 会場

ブタ酸性キチナーゼは，消化器系プロテアーゼに耐性で，キチン分解酵素として機能する
Porcine acidic chitinase is stable in the presence of digestive proteases and functions as chitinolytic enzyme under the gastrointestinal conditions

○小山 文隆[1]、樫村 昭徳[1]、脇田 悟誌[1]、菅原 康里[1]、田畑 絵理[1,2] ([1]工学院大生命化学科、[2]日本学術振興会特別研究員（DC1））
○Fumitaka OYAMA[1], Akinori Kashimura[1], Satoshi Wakita[1], Yasusato Sugahara[1], Tabata Eri[1,2] ([1]Kogakuin Univ., [2]Japan Society for the Promotion of Science (DC1))

キチンは，*N*-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc) のポリマーで，甲殻類，昆虫，真菌類などのキチン含有生物の主要な構成成分である。ほ乳類は二種類の活性を有するキチナーゼ，キトトリオシダーゼと，酸性キチナーゼ (acidic chitinase, Chia)，を発現している。我々は，まず，qPCR システムを用い，ブタの組織において，キチナーゼと対照遺伝子の発現レベルを定量した。Chia mRNA は胃で特異的に発現しており，そのレベルはハウスキーピング遺伝子よりも顕著に高かった。ブタ Chia は pH 2.0~4.0 付近で活性が最も高く，pH 7.0 まで活性を保持していた。また，Chia は，pH 2.0 でペプシン，pH 7.6 でトリプシン・キモトリプシンの強力なプロテアーゼ活性に対し耐性を有していた。Chia は，高分子量キチン，ミールワーム幼虫の殻に含まれるキチンを分解し，(GlcNAc)2 を生成した。従って，ブタ Chia は，胃のみならず，腸における幅広い pH において，プロテアーゼ耐性のキチン分解酵素として働くことが出来る。

acidic chitinase, pig, chitinolytic enzyme

発表責任者：小山文隆（f-oyama@cc.kogakuin.ac.jp）

講演番号：4E3a13
講演日時：3 月 27 日 11:32～ 1 号館 E3 会場

オキシトシン受容体欠損マウスで観察される嗅覚行動異常に対する修飾因子について

The modification factors of the abnormal olfactory behavior observed in the Oxtr-Venus knockin mice

○長田 和実[1]、太田 亨[1]、高井 理衣[1]、宮園 貞治[2]、西森 克彦[3]、柏柳 誠[2]([1]北医療大歯、[2]旭川医大医、[3]東北大農)

○Kazumi Osada[1], Tohru Ohta[1], Rie Takai[1], Sadaharu Miyazono[2], Katsuhiko Nishimori[3], Makoto Kashiwayanagi[2] ([1]Health Sci Univ. of Hokkaido, [2]Asahikawa Med. Univ., [3]Tohoku Univ. of Agric.)

オキシトシン（OXT）およびオキシトシン受容体（Oxtr）は分娩・射乳などの生殖生理学的調節を行うと共に、社会的行動の調節、すなわち生殖行動や既知の同種動物の認識などに関連する行動も調節することが示唆されている。近年発表者らは OXTR-Venus knockin マウスを用い、社会的脈絡のない条件においても、不快臭物質（酪酸）に対する忌避行動に関して、嗅覚鈍麻と嗅覚過敏が共存する異常行動が見られ、その行動様式は自閉症スペクトラム患者に見られる感覚障害と共通点が見られることを報告した。本発表では、本マウスの嗅覚異常行動を改善あるいは修飾する分子遺伝学的、嗅覚生理学的及び栄養学的要因を見出すことを目的として以下の実験を行った。

OXTR-Venus knockin heterozygous マウス （以下ヘテロマウス）40 匹を用意した。実験①ではヘテロマウスのうち、父欠損と母欠損のヘテロマウスをそれぞれ 8 匹（♂4 匹、♀4 匹）ずつ用意し、Y 字型迷路を用い、10μL の水と 50%酪酸水溶液をそれぞれ濾紙（2.5cmX2.5cm）に添付し、迷路の両短腕に置き、両短腕へのマウスの滞在時間を 1 日 4 分間 3 日間にわたって連続的に観察し、忌避反応の経時的変化を測定した。実験終了後マウスを屠殺し、直ちに脳を取り出して嗅球、視床下部、扁桃体の各部位を採取し、各中枢の Oxtr の発現量を定量 PCR で測定した。

その結果、父欠損ヘテロマウスではヘテロマウス特有の嗅覚反応不全が見られたものの、母欠損では正常マウスに近い行動を示した。定量 PCR の結果、いずれのヘテロマウスも正常マウスに比較して脳内の Oxtr 発現量は半分程度に低下していたが、父欠損マウスでは母欠損マウスに比べ、嗅球における Oxtr 発現量が有意に低く、視床下部や扁桃体と比べて Oxtr の発現量がアンバランスであることが見出された。そこで、父欠損マウスの♂に対して、2 週間にわたるオオカミカイロモンによる嗅覚トレーニング(n=6)、または b-carotene の経口投与(n=6)を行った。その結果、嗅覚忌避行動および Oxtr m-RNA 発現量に特徴的な変化が見られたのでその内容についても報告する。

Oxytocin Receptor, Olfaction, Wolf Kairomone

講演番号：4E3a14
講演日時：3 月 27 日 11:43～ 1 号館 E3 会場

SIRT1 による単純糖質嗜好性の制御を担うのは、PVN の OXT ニューロンである
Oxytocin neuron in the paraventricular nucleus of the hypothalamus regulates SIRT1-based simple sugar preference in mice
○松居 翔、佐々木 努、河野 大輔、橋本 博美、小林 雅樹、北村 忠弘（群大生調研）
○ Syo MATSUI, Tsutomu SASAKI, Daisuke KOHNO, Hiromi HASHIMOTO, Masaki KOBAYASHI, Tadahiro KITAMURA (Gunma Univ.)

【背景】これまでに我々は、単純糖質の摂取により肝臓から Fibroblast growth factor 21 (FGF21) が分泌され、視床下部にある Oxytocin (OXT) ニューロンに作用し、単純糖質に対する嗜好性や摂取を抑制する「ネガティブフィードバック機構」が存在し、長寿遺伝子 SIRT1 が FGF21-OXT axis を促進することで単純糖質嗜好性を抑制することを明らかにした (Matsui S et al. *Nat Commun.* 2018)。他方、SIRT1 による単純糖質嗜好性制御の脳内メカニズムは、未解明である。
【目的】本研究では、SIRT1 による単純糖質嗜好性を制御する OXT ニューロンの局在はどこなのかを明らかにする。
【方法】OXT ニューロンは、視床下部の室傍核 (PVN) と視索上核 (SON) に存在する。そこで、Cre 依存的に SIRT1 (WT or 不活性型) の発現を増加できるアデノ随伴ウイルス (AAV) 用い、定位脳手術により、OXT-Cre マウスの PVN or SON 特異的に SIRT1 (WT or 不活性型) AAV ウイルスを感染させ、PVN or SON OXT ニューロン特異的 SIRT1 (WT or 不活性型) 過剰発現マウスを作製した。作製したマウスを用い、2 ボトルテスト (水 vs. スクロース (単純糖質)、デキストリン (複合糖質)、アスパルテーム (人工甘味料)、キニーネ (苦味)) を行い、PVN と SON のどちらに SIRT1 による単純糖質嗜好性抑制効果を担う OXT ニューロンが局在するのかを検討した。また、OXT ニューロン特異的 SIRT1 過剰発現マウスに対して、薬理遺伝学（DREADD システム）を利用した OXT ニューロンの活性抑制操作を行い、糖質嗜好性試験を行った。
【結果】2 ボトルテストの結果、PVN-OXT ニューロン特異的 SIRT1 (WT) 過剰発現マウスでは、FGF21 分泌を促すスクロースに対する嗜好性の抑制が認められたが、SON-OXT ニューロン特異的 SIRT1 (WT) 過剰発現マウスでは、スクロースに対する嗜好性の変化が認められなかった。また、PVN or SON 特異的に SIRT1 (WT) を過剰発現させても、FGF21 分泌を促さないデキストリンとアスパルテーム、苦味物質であるキニーネに対する嗜好性の変化は認められなかった。さらに、OXT ニューロン特異的 SIRT1 過剰発現マウスで低下する糖質嗜好性は、DREADD システムを利用した OXT ニューロンの活性抑制操作によりキャンセルされた。
【結論】SIRT1 による単純糖質嗜好性の制御を担うのは、PVN の OXT ニューロンである。

SIRT1, FGF21, Oxytocin

講演番号：4E3a15
講演日時：3 月 27 日 11:54～ 1 号館 E3 会場

社会的敗北ストレスはマウス小腸下部上皮細胞のフコシル化糖鎖を減少させる
Reduced fucosylation in the distal intestinal epithelium of mice subjected to chronic social defeat stress

小又 尉広[1]、青木 玲二[1]、青木 綾子[2]、比江森 恵子[3]、豊田 淳[4,5]、舘野 浩章[3]、○鈴木 チセ[1]、高山 喜晴[1] ([1]農研機構・畜産部門、[2]日本女子大、[3]産総研、[4]茨城大農、[5]農工大院連農)
Yasuhiro OMATA[1], Reiji AOKI[1], Ayako AOKI-YOSHIDA[2], Keiko HIEMORI[3], Atsushi TOYODA[4,5], Hiroaki TATENO[3], ○Chise SUZUKI[1], Yoshiharu TAKAYAMA[1] ([1]NARO, [2]Japan Women's Univ., [3]AIST, [4]Ibaraki Univ., [5]TAT)

慢性社会的敗北ストレス（Chronic Social Defeat Stress; CSDS）はうつ病のマウス（またはラット）モデルとして広く用いられており、居住者と侵入者のパラダイム、あるいは雄の縄張りの習性に基づいた実験系である。これまでに CSDS 負荷が腸管に及ぼす影響を調べるために行った回腸末端のマイクロアレイ解析では、CSDS を負荷したマウス（以下 CSDS マウス）においてフコース転移酵素(*Fut2*)の発現がコントロールマウスと比べて有意に低下することを見出した(J Proteome Res, 2016; 15, 3126)。本研究では、CSDS が腸管粘膜の糖鎖構造に及ぼす影響を明らかにするため、コントロールマウスおよび CSDS マウスの小腸上部、小腸下部および大腸の粘膜のレクチンマイクロアレイ解析を行った。その結果、96 種類のレクチンのうち、9 種類のレクチン（うち 8 種類はフコース結合性レクチン）の反応性が CSDS 負荷により小腸下部において有意に低下した。この低下は、小腸上部や大腸では観察されなかった。*Fut2* および *Fut1* の遺伝子発現の低下もこの現象と一致した。さらにフローサイトメトリーにより、小腸下部の腸管上皮細胞とフコース結合性レクチン TJA-II の結合性を調べた結果、TJA-II と結合を示す蛍光強度は CSDS マウスではコントロールマウスの 40%以下であった。以上の結果より、CSDS 負荷は小腸下部のフコシル化糖鎖の減少をもたらすことが明らかになった。腸内細菌の接着部位や炭素源としての役割を果たすフコシル化糖鎖の減少は、ストレスが腸内菌叢に影響を及ぼす一因と考えられる(Sci Rep, 2018; 8:13199) 。本研究の一部は、内閣府総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略イノベーション創造プログラム）「次世代農林創造技術」により実施された。

lectin microarray, intestinal epithelium, fucosylation

発表責任者：鈴木チセ（csuzuki@affrc.go.jp）

講演番号：4E4a01
講演日時：3 月 27 日 09:00～ 1 号館 E4 会場

多機能性トランスポーターBCRP1 の活性制御タンパク質の探索

Screening for proteins which control multi-functional transporter BCRP1 (ABCG2)

○田口 善智、梶 友里恵、岡迫 知弘、藤垣（山﨑） 静香、福島 翔理、川邊 智史、岡本 沙樹、戸木 夢香、浅井 咲嬉、佐伯 和弘、三谷 匡 (近畿大 生物理工 遺伝子)
○Yoshitomo TAGUCHI, Yurie KAJI, Tomohiro OKASAKO, Shizuka FUJIGAKI (YAMASAKI), Shouma FUKUSHIMA, Tomofumi KAWABE, Saki OKAMOTO, Yumeka TOGI, Saki ASAI, Kazuhiro SAEKI, Tasuku MITANI (Div. Genet. Eng., Kindai Univ)

【目的】BCRP1(Breast Cancer Resistance Protein1/ABCG2)は、ABC(ATP Binding Cassette)トランスポーターの一つで、1 個の ATP 結合ドメインと 6 個の膜貫通ヘリックスから成る細胞膜局在タンパク質である。二量体で機能し、多種の抗がん剤、尿酸、ポルフィリン化合物などの様々な物質を細胞内から外へ能動輸送する。BCRP1 は、がんの抗がん剤耐性の獲得、光線過敏症、痛風の発症に関与する他、ES 細胞や造血幹細胞などの幹細胞活性の維持にも関係する多機能性のトランスポーターである。BCRP1 は、転写・翻訳後、細胞膜上に発現してトランスポーターとして機能するまでの間に、細胞内のおける局在・発現の制御を受ける。様々な疾病と関連する BCRP1 の細胞内局在や活性を制御するタンパク質を同定する目的で、BCRP1 の発現するマウス ES 細胞において、BCRP1 と相互作用するタンパク質を Yeast Two Hybrid 法によって探索した。

【方法・結果】マウス ES 細胞に由来する cDNA を prey、マウス BCRP1 の第 2 膜貫通ヘリックスと第 3 膜貫通ヘリックスの間の細胞内ループ領域を bait として、BCRP1 と相互作用するマウス ES 細胞に発現するタンパク質を Yeast Two Hybrid 法によって探索した。

スクリーニングの結果、がん抑制遺伝子産物の LKB1、および細胞内情報伝達を担う MEK1 の 2 つのタンパク質キナーゼが BCRP1 と相互作用する可能性が示唆された。RT-PCR による発現解析の結果、LKB1 は未分化状態のマウス ES 細胞で強く発現するが、分化誘導されると発現が大きく低下することがわかった。一方、MEK1 は分化誘導の有無にかかわらず発現していた。HEK293 細胞に発現ベクターの導入により発現させた BCRP1 と LKB1、および MEK1 は、それぞれ共免疫沈降することが判明し、これらのタンパク質が相互作用することが示唆された。これらの 2 つのタンパク質キナーゼがトランスポーターである BCRP1 の細胞内局在や活性にどのような影響を与えるのかについてもあわせて報告する。

BCRP1, ABC transporter, protein kinase

発表責任者：田口 善智（taguchi@waka.kindai.ac.jp）

講演番号：4E4a02
講演日時：3 月 27 日 09:11～ 1 号館 E4 会場

亜鉛を活性部位に持つタンパク質の活性化機構～亜鉛トランスポーターの種間保存性～

Activation mechanism of zinc-requiring enzymes～Conserved roles of zinc transporters between human and chicken～

○鈴木 英介、神戸 大朋（京大院生命）
○Eisuke SUZUKI, Taiho KAMBE (Kyoto Univ.)

【目的】必須微量元素である亜鉛は様々な働きを持つ。亜鉛の機能に関してはこれまで横断的に解析されてくる事は無かったため,複合的に要因が組み合わさって重症化する亜鉛欠乏症などのメカニズムはまだ不明瞭な所が多い。しかし近年亜鉛とタンパク質についての重要な報告なされ,生体内での亜鉛代謝メカニズムに対する理解は進んでいる。当研究グループでは亜鉛をその活性中心にもつタンパク質（亜鉛要求性酵素）と亜鉛を細胞膜や細胞小器官の膜などを貫通して輸送するタンパク質（亜鉛トランスポーター）についての解析を行ってきた。タンパク質生合成の場である小胞体やゴルジ体（以下,早期分泌経路）において亜鉛要求性酵素は亜鉛を獲得し,活性化されると考えられている。実際,ニワトリ DT40 細胞を用いた解析において,亜鉛要求性酵素である組織非特異的アルカリホスファターゼ(TNAP)は,早期分泌経路に存在する亜鉛トランスポーターである ZnT5-ZnT6 ヘテロダイマーと ZnT7 ホモダイマーによって亜鉛を特異的に供給される事で活性化される事が明らかとなった。今回の研究では,これまでニワトリ DT40 細胞で得られた亜鉛を活性部位にもつタンパク質の活性化機構を,ヒト細胞を用いて再現する。トランスポーターを介したタンパク質の非種依存的な活性化機構の解明は生物学的な知見だけで無く,亜鉛欠乏症の包括的な解明に寄与するという生理学的意義も大きい。
【方法】ヒト慢性骨髄性白血病細胞由来である HAP1 を用いて CRISPR/Cas9 system により ZnT5,ZnT7 欠損株を作製した。二重欠損株にヒトとニワトリの ZnT5,ZnT7 を再発現させ,pNPP を基質とした TNAP 活性測定を行った。TNAP タンパク質の発現については,細胞から膜タンパク質を調製し,Western Blot 解析も行い, 確認した。TNAP の活性低下が亜鉛依存的か確認するため,亜鉛欠乏培地を用いた解析も合わせて行った。
【結果・考察】ZnT5 もしくは ZnT7 単独欠損株では,DT40 細胞の結果と異なり,TNAP 活性は低下しなかったが,ZnT5,ZnT7 二重欠損株では活性が低下した。この活性低下は ZnT5 もしくは ZnT7 再発現株で回復し,回復に伴いタンパク質発現も回復した。またこれはニワトリの ZnT5 と ZnT7 のホモログを HAP1 の二重欠損株に再発現させた株でも同様であった。亜鉛欠乏培地を用いた解析において,WT は欠乏培地での培養時間に応じて活性が低下し,培地への亜鉛添加により活性が回復したが,二重欠損株では培地への亜鉛添加によっても活性は回復せず,トランスポーター依存的な活性化制御機構が示された。これまでの DT40 細胞で得られていた知見がヒト由来の細胞においても確認され,また亜鉛トランスポーターの種を超えた高い機能相同性が示された。

zinc transporter, TNAP, early secretory pathway

発表責任者：鈴木英介（eisuke.suzuki0910@gmail.com）

講演番号：4E4a03
講演日時：3 月 27 日 09:22～ 1 号館 E4 会場

抱合型プロスタグランジン代謝体の調製と受容体を介する作用解析

Preparation of conjugated prostaglandins and effects of the conjugated prostaglandins on

○児玉 直輝[1]、黒木 勝久[1]、Liu Ming-Cheh[2]、水光 正仁[1]、榊原 陽一[1] ([1]宮崎大農、[2]トレド大薬)
○Naoki Kodama[1], Katsuhisa Kurogi[1], Ming-Cheh Liu[2], Masahito Suiko[1], Yoichi Sakakibara[1] ([1]Univ. of Miyazaki Agric., [2]Univ. of Toledo Pharmacol.)

プロスタグランジン(PG)は睡眠作用や胃粘膜の分泌による腸管保護、炎症や免疫を制御するなど多様な機能を有する生理活性脂質である。その中の一つである PGE_2 は、体内で速やかに代謝され、不活性化されるが、その一つに非酵素的反応によって産生されるシクロペンテノン構造を持つ PGA_2 がある。この PGA_2 には、抗炎症作用や抗腫瘍作用など PGE_2 とは異なる生理作用をもつことが知られているが、その活性制御機構(代謝経路)はよく明らかにされていない。この PGA_2 は、解毒代謝第二相反応酵素である硫酸転移酵素 SULT7A1 およびグルタチオン S 転移酵素 GST によって更なる抱合型代謝反応(硫酸化とグルタチオン化)を受けるが、その代謝の生理機能は良く分かっていない。PGE_2 から、PGA_2、そして抱合型代謝物へと複雑な代謝によるプロスタグランジンの生理機能制御機構を理解することが求められている。

そこで本研究では、PGA_2 の代謝とその代謝体が有する生理機能を解明するため、プロスタグランジン受容体に対するリガンド作用評価を行った。

PGA_2 のグルタチオン代謝体と硫酸代謝体は、リコンビナント酵素(SULT7A1 と GST)を用いて酵素的に合成後、固層抽出及び HPLC にて調製を行った。調製した PGA_2 代謝体の構造は質量分析計で確認した。プロスタグランジン受容体に対するリガンド活性評価には、cAMP-Glo Max assay による cAMP 産生能と、ルシフェラーゼアッセイを用いた G タンパク質シグナル経路活性化能の解析により行った。

調製した PGA_2 代謝体は、グルタチオンおよび硫酸基を有することが確認された。リガンド活性評価の結果、PGA_2 代謝体は PGE_2 受容体アイソフォーム(EP1-4)に対しては、アゴニスト活性もアンタゴニスト活性も示さなかった。このことから、グルタチオン化や硫酸化には、PGA_2 の PGE_2 受容体作用をアゴニスト活性を軽減させる機能をもつことが明らかとなった。現在は、PGD_2 や PGI_2 といったほかのプロスタグランジン受容体に対する作用を解析している。

prostaglandin, sulfate conjugation, glutathione conjugation

講演番号：4E4a04
講演日時：3 月 27 日 09:33～ 1 号館 E4 会場

ヒト血漿中セラミド及びセラミド 1-リン酸の分子種組成と動物細胞へ作用

Molecular species of ceramide and ceramide 1-phosphate in human plasma and their effects on animal cells

○森戸 克弥[1]、島田 明奈[1]、宮﨑 徹[1]、清水 良多[1]、髙橋 尚子[1]、下澤 伸行[2]、東 桃代[3]、小山 壱也[3]、西岡 安彦[3]、福田 達也[1]、小暮 健太朗[1]、田中 保[1]（[1]徳島大院・医歯薬・衛生薬学分野、[2]岐阜大・生命科学総合研セ・ゲノム研究分野、[3]徳島大院・医歯薬・呼吸器膠原病内科学分野）

○ Katsuya MORITO[1], Akina SHIMADA[1], Toru MIYAZAKI[1], Ryota SHIMIZU[1], Naoko TAKAHASHI[1], Nobuyuki SHIMOZAWA[2], Momoyo AZUMA[3], Kazuya KOYAMA[3], Yasuhiko NISHIOKA[3], Tatsuya FUKUTA[1], Kentaro KOGURE[1], Tamotsu TANAKA[1] ([1]Dept. of Pharm. Health Chem., Tokushima Univ. Grad. Sch. of Biomed. Sci., [2]Div. of Genomics Res., Life Sci. Res. Ctr., Gifu Univ., [3]Dept. of Respir. Med. Rheumatol., Tokushima Univ. Grad. Sch. of Biomed. Sci.)

スフィンゴ脂質は細胞膜構成成分として存在するほか、シグナル伝達物質としても機能する。外部刺激に応じて細胞内で生じたセラミド（Cer）はアポトーシスシグナルとして機能する一方で、そのリン酸化体であるセラミド 1-リン酸（C1P）はアポトーシスを抑制すると報告されているが、そのメカニズムは明確ではない。また、これらは血中にも存在するが、その濃度や組成、病態とのかかわりは不明である。本研究ではヒト血漿中に存在する Cer 及び C1P の分子種組成及び濃度を液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析（LC-MS/MS）を用いて調べ、その主要な分子種の動物細胞への作用について調べた。

健常者の血漿 0.1mL から Bligh&Dyer 法によって脂質を抽出し、LC-MS/MS にて Cer、C1P 量を測定した。Cer、C1P ともに極長鎖脂肪酸を *N*-アシル基に持つ分子種が多く、Cer は C24:0（4 nmol/mL）、C24:1（2 nmol/mL）、C22:0（1 nmol/mL）を、C1P は C24:0、C24:1（ともに 50 pmol/mL）を有する分子が主要であった。これらの血漿中濃度は食事による影響を受けなかった。また、C1P 分子種のうち、血漿中に最も豊富に存在した C24:0-C1P のマウス神経芽細胞腫（Neuro2a）による取り込みを調べた結果、添加した C24:0-C1P の約 30%が 6 時間で取り込まれた。このとき細胞内 C24:0-Cer 量の変動はなかったことから、取り込まれた C24:0-C1P はほとんど C24:0-Cer へは代謝されていないと思われた。さらに、C24:0 脂肪酸、C24:0-Cer、及び C24:0-C1P で処理したチャイニーズハムスター卵巣細胞は、UV 誘導性アポトーシスを有意に抑制した。以上より、血漿中に存在する Cer 及び C1P は極長鎖脂肪酸を有する分子種が主要であり、細胞のアポトーシス傾向を制御している可能性が示唆された。

ceramide 1-phosphate, ceramide, LC-MS/MS

発表責任者：森戸克弥（c401741008@tokushima-u.ac.jp）

講演番号：4E4a05
講演日時：3 月 27 日 09:44～ 1 号館 E4 会場

マクロファージに発現するシアル酸認識レクチン・シグレックの解析
Analysis of Siglec-F in mouse macrophages that recognizes sialic acids
稲坂 唯、立山 博之、樋口 廣士、村瀬 佑介、金岡 英徳、飯島 信司、○西島 謙一 (名大工)
Yui Inasaka, Hiroyuki Tateyama, Hiroshi Higuchi, Yusuke Murase, Hidenori Kaneoka, Shinji Iijima, ○Ken-ichi Nishijima (Nagoya Univ.)

【目的】我々の細胞表面を覆う糖鎖層の末端は主にシアル酸であり、マイナス荷電により細胞や分子相互の結合を調節している。シアル酸は下等生物にはまれで、古くから免疫系が自己を識別するための SAMP (self-associated molecular patterns)の一つと考えられてきた。シアル酸を認識するレクチンであるシグレックは主に免疫細胞に発現し、多くは細胞内に抑制性のモチーフを持つことから SAMP レセプターであると考えられている。我々は、自然免疫を担う一方、抗原提示を介して獲得免疫系をも活性化する細胞であるマクロファージに着目し、シグレックの機能について研究してきた。これまでに、RAW264 モデル系を用いてヒトシグレック 9 がマクロファージの炎症性サイトカイン産生を抑制する一方で、抗炎症性サイトカイン IL-10 の産生を促進することを報告している。本研究では、これまで好酸球や肺胞マクロファージにおいてのみ発現が報告されていたマウスシグレック F の末梢マクロファージにおける機能解明を目的とした。

【方法・結果】8 週齢の C57BL/6 マウスの大腿骨、脛骨より骨髄細胞を調製し、M-CSF 存在下 7 日間培養することで分化したマクロファージを得た。各種刺激時におけるシグレックの発現量を定量 RT-PCR によって解析したところ、シグレック F の発現量は、LPS により発現が低下する一方、GM-CSF により増加することが分かった。GM-CSF により活性化される STAT5、MAPK、PI3K のシグナルをそれぞれ特異的阻害剤で抑制したところ、STAT5 のリン酸化がシグレック F 発現に重要であることが示唆された。このことは STAT5 のノックダウン実験によっても確認された。さらに GM-CSF 受容体と共通の common β c ユニットを受容体に持つ IL-3 によってもシグレック F の発現が誘導されることが示された。

次に、マクロファージにおける生理的意義を解明するために、シグレック F のノックダウン実験を行った。その結果、GM-CSF 及び IL-3 刺激により誘導されるマクロファージの増殖がシグレック F ノックダウンにより増加することが認められた。このことから、シグレック F は末梢におけるマクロファージの増殖を抑制的に制御していることが示唆された。GM-CSF 及び IL-3 は敗血症などにおいても産生されショック症状に関連することから、シグレック F の炎症応答調節への関与が推定された。

Siglec, sialic acid, macrophage

発表責任者：西島謙一（nishijima@chembio.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：4E4a06
講演日時：3 月 27 日 10:05～ 1 号館 E4 会場

DHA による RACK1-PKC 相互作用抑制
DHA inhibits the interaction of RACK1 and PKC
○山田 秀俊、植村 亜衣子、箱崎 真友佳（岩手生工研）
○Hidetoshi YAMADA, Aiko Uemura, Mayuka Hakozaki (IBRC)

我々は脂肪酸の構造と作用メカニズムの解明を目指し、飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸で相反する表現系が観察されるメラノーマ細胞株を対象に研究を行なっている。メラノーマ細胞はメラニン産生細胞であるメラノサイトががん化した細胞であり、メラニン産生と腫瘍増殖、高い転移能という特徴を持つ。これまでに我々は、DHA が複数のメラノーマ細胞株に対して細胞増殖抑制に働くことを見出してきた。

本研究では DHA によるメラノーマ細胞増殖抑制メカニズムの解明に取り組んだ。細胞内で DHA の標的となっている蛋白質を明らかにする目的で、DHA 結合蛋白質の探索を行い、Receptor for Activated C kinase 1 (RACK1)と DHA の相互作用を新たに見出した。RACK1 は 7 つの Typ-Asp 40（WD40） repeat を有する分子量 38kDa の蛋白質で、活性型 Protein kinase C (PKC)結合蛋白質として同定された。RACK1 は Scaffold protein の一種であり、活性型 PKC と基質蛋白質の結合を促進することで PKC シグナルを正に制御する分子である。PKC は細胞増殖促進に働くことから、DHA が RACK1 に作用することで RACK1-PKC 相互作用を阻害し、メラノーマ細胞増殖抑制に働いているのではないかと考え、生物発光共鳴エネルギー転移（NanoBRET）法を用いて、RACK1-PKC 相互作用に対する DHA の作用を解析した。解析の結果、マウスにおいて 9 種類ある PKC アイソフォームの中でも、PKCβおよび PKCθと RACK1 の相互作用を DHA が抑制することを見出した。

DHA, RACK1, PKC

発表責任者：山田秀俊（hyamada@ibrc.or.jp）

講演番号：4E4a07
講演日時：3 月 27 日 10:16～ 1 号館 E4 会場

マウス神経細胞 HT22 における酸化ストレス依存的な細胞外分泌因子の制御 ~酸化ストレス依存的な細胞外マトリクスと細胞外小胞の制御~

Oxidative stress modulates extracellular secreted factors in HT22 cells. ~ Focus on extracellular matrix and extracellular vesicles~

○田辺 岳海、吉田 純平、鵜飼 智文、水木 徹、根建 拓 (東洋大学)
○Takemi TANABE, Jumpei YOSHIDA, Tomofumi UKAI, Toru MIZUKI, Taku NEDACHI (Toyo University)

多細胞生物の個々の細胞に様々なストレスが生じると、ストレス依存的な細胞間コミュニケーションが誘起され、恒常性を保つことが知られている。例えば、神経細胞では、酸化ストレスによって増殖因子である Progranulin (PGRN)の分泌量が増加し、細胞間の協調作用によって組織保護が行われる可能性が示唆されている。この他にも様々なストレス応答性増殖因子に関する知見が集積されてきているが、ストレス依存的な細胞外マトリクスの発現変動、さらには細胞外小胞のひとつであるエクソソームの動態については不明な点が多い。本研究では、マウス海馬由来神経細胞株 HT22 に酸化ストレスが生じた際、細胞が産生する細胞外マトリクスやエクソソームがどのように変化するのかを解明することを目的とした。

まず、細胞外マトリクスの一つである Collagen に着目し、酸化ストレスによる発現変動を解析した。その結果、HT22 細胞に酸化ストレスが負荷されると *Col3a1* と *Col1a1*、*Col1a2* の遺伝子発現量が有意に減少することが分かった。一方、同様の処理による *Col6a1*、*Col6a2*、*Col6a3* 発現変動は観察されず、酸化ストレスによって特定の Collagen のみが発現変動することが明らかとなった。すなわち、酸化ストレスは、線維性 Collagen のみに影響し、非線維性 Collagen の産生には影響しない可能性が考えられる。

次に、同様に HT22 細胞を用いて、酸化ストレス依存的なエクソソームの動態変化を調べた。まず、HT22 細胞に酸化ストレスが生じると、エクソソームの放出量が有意に増加することが分かった。また、酸化ストレスはエクソソーム分泌量のみならずエクソソーム含有タンパク質のプロファイルにも影響を与えることが明らかとなったため、現在、これら酸化ストレスによって発現変動するエクソソーム内タンパク質の同定を行なっている。

以上の結果より、HT22 細胞に酸化ストレスが生じると、増殖因子だけではなく、細胞外マトリクス(Collagen)やエクソソームなどの細胞間コミュニケーション分子にも大きな変化が観察された。すなわち、このような酸化ストレスに応答して発現する分泌因子群は、それぞれ単独あるいは相互作用しながら神経細胞間に新しい細胞間コミュニケーションを構築し、総合的な脳神経保護を実現している可能性がある。

Ht22 cells, Cell communication, Extracellular secreted factors

発表責任者：根建　拓（nedachi@toyo.jp）

講演番号：4E4a08
講演日時：3 月 27 日 10:27～ 1 号館 E4 会場

連続的翻訳後修飾による DNA 修復タンパク質 DDB2 の制御

Sequential Post-translational Modifications Regulate Damaged DNA-binding Protein DDB2

○金岡 英徳[1]、荒川 和彦[1]、小川 大輝[1]、西島 謙一[1]、飯島 信司[2]（[1]名大院・工・生命分子工、[2]愛工大・工・応化）
○Hidenori KANEOKA[1], Kazuhiko ARAKAWA[1], Daiki OGAWA[1], Ken-ichi NISHIJIMA[1], Shinji IIJIMA[2] ([1]Dept. Biomol., Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., [2]Fuculty Eng., Aichi Inst. Tech.)

【背景と目的】

生体内には紫外線や放射線、化学物質等による DNA 損傷を修復する様々な修復機構が存在する。その１つであるヌクレオチド除去修復(nucleotide excision repair: NER)は紫外線やシスプラチンなどによる DNA 鎖にゆがみを生じる損傷を修復する機構である。NER では主に XPA から XPG タンパク質が連動して働き、この機能連携にはタンパク質の翻訳後修飾が重要な役割を持っている。

タンパク質翻訳後修飾は活性制御、細胞内の局在、DNA やタンパク質間の相互作用の変化など、複雑な生体反応を制御する重要な役割を担っている。DNA 修復機構においても、様々な修復因子がリン酸化やユビキチン化により修飾されることがわかっている。近年、タンパク質翻訳後修飾の１つである SUMO 化が DNA 修復機構に必要である事が報告されてきており、NER においても SUMO 化の重要性が指摘されている。

【方法･結果】

NER 機構において UV-DDB と XPC 複合体の２つが DNA 損傷の認識を行う。さらに、UV-DDB はユビキチン化酵素である CUL4 複合体と CUL4-DDB 複合体を形成し、その活性により XPC や自身をユビキチン化することで NER 効率を高めていると考えられている。我々のこれまでの研究により、UV-DDB のサブユニットである DDB2 (XPE)は、ユビキチン化以外に SUMO 化修飾されることが明らかとなっているが、その機能は不明であった。そこで DDB2 SUMO 化の機能を解析するために、SUMO 化されない変異体の作製を試みた。数種の変異体を作製し検討した結果、DDB2 の N 末端が SUMO 化されることがわかった。この領域はユビキチン化されることがわかっているので、SUMO 化とユビキチン化の関係を解析することとした。紫外線照射後のこれらの翻訳後修飾の経時変化や DDB2 の SUMO 化状態が変化した時のユビキチン化 DDB2 の検出により、DDB2 の SUMO 化はユビキチン化に先行して起こり、ユビキチン化を促進する役割がある可能性が示唆された。DNA 修復を効率的に行うために複数の翻訳後修飾が連続的に起こり、タンパク質相互作用などの制御を行う可能性がある。

DNA repair, UV radiation, SUMO

発表責任者：金岡 英徳（kaneoka@chembio.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：4E4a09
講演日時：3 月 27 日 10:38～ 1 号館 E4 会場

がん細胞の足場非依存的増殖にポリアミン代謝とコレステロール代謝がおよぼす影響

Effect of polyamine and cholesterol metabolism on anchorage independent cancer cell growth

○田中 亜路、柿本 未来、奥野 世理奈、小西 恵理香、立本 青空 (安田女子大薬)
○Arowu TANAKA, Miku Kakimoto, Serina Okuno, Erika Konishi, Aoi Tachimoto (Yasuda Women's Univ. of Pharm.)

コレステロールの主要代謝産物のひとつである 25-hydroxycolesterol(25-HC)は、近年さまざまな生理作用が報告されている。大腸癌由来培養細胞(DLD-1,HT-29 など)の足場非依存的増殖能を選択的に阻害する作用(選択的アノイキス誘導作用)もそのひとつであるが、そのメカニズムはわかっていない。25-HC のメカニズムを解明するために、DLD-1 のスフェロイド培養系を用いてケミカルライブラリによる選抜をおこなった。25-HC の作用を阻害する分子のひとつとして、ポリアミン合成の律速酵素オルニチンデカルボキシラーゼの阻害剤 Difluoromethylornithine(DFMO)が選抜された。ポリアミン合成系の下流に位置するスペルミン合成阻害剤である APCHA も同様の効果を示した。このとき APCHA 処理によって、コレステロール合成の律速酵素である SREBP2 の発現量および活性化量が濃度依存的に増大していることが明らかになった。SREBP2 の活性化酵素である Site-1 プロテアーゼを阻害したところ、25-HC 誘導性アノイキス誘導作用のポリアミン合成阻害によるレスキュー作用は消失した。すなわち、細胞内ポリアミン(スペルミン)の減少がコレステロール合成を活性化させ、25-HC の効果が相対的に減少すると考えられた。これらのことはポリアミン代謝とコレステロール代謝が協調して、癌細胞の足場非依存的増殖に影響を与えている可能性を示唆している。

cholesterol, polyamine, cancer

発表責任者：田中亜路（tanaka-a@yasuda-u.ac.jp）

講演番号：4E4a10
講演日時：3 月 27 日 10:49～ 1 号館 E4 会場

上皮間葉転換（EMT）における RhoE の役割と機能の解析

The role of RhoE on EMT

○西塚 誠[1]、駒田 莉奈[2]、今川 正良[2] ([1]弘大農生、[2]名市大薬)
○Makoto NISHIZUKA[1], RINA KOMADA[2], MASAYOSHI IMAGAWA[2] ([1]Hirosaki Univ, [2]Nagoya city Univ)

【目的】RhoE は低分子量 G タンパク質 Rho family の Rnd サブクラスに属しており、細胞骨格や細胞増殖を制御することが知られている。がん細胞の浸潤・転移には上皮間葉転換 epithelial to mesenchymal transition (EMT)が関わっている。EMT とは上皮系細胞が細胞の運動性を高め、アクチン骨格のリモデリングにより、紡錘状の形態をした間葉系細胞へと変化する現象であり、がん細胞は EMT により高い移動能および浸潤能、さらに抗がん剤に対する抵抗性を獲得することにより、悪性度がより高くなると考えられている。RhoE ががん細胞の浸潤や転移に関与するとの報告はあるものの、EMT における役割については不明である。そこで本研究では、TGF-β1 誘導性 EMT における RhoE の役割とその機能について検討した。
【方法】本研究では、悪性化が EMT の誘導と密接に関わっていることが報告されているヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞を用いた。HeLa 細胞に TGF-β1 を添加し、EMT を誘導した。RhoE を標的とした siRNA を用いて RhoE の発現を抑制し、EMT や移動能に与える影響を検討するとともに、RhoE がどのような細胞内シグナル伝達機構を介して EMT を制御するのかについて検討した。
【結果・考察】まず EMT 過程における RhoE の発現を検討した結果、HeLa 細胞の TGF-β1 誘導性 EMT 過程において、RhoE の発現量が増加することが明らかとなった。次に RhoE の発現抑制が EMT に与える影響を評価した。その結果、RhoE の発現抑制により、細胞の伸長ならびに EMT マーカーの発現の顕著な増加が観察された。このことから、RhoE の発現抑制は HeLa 細胞の EMT を亢進することが明らかになった。次に、RhoE が EMT 誘導後の HeLa 細胞の移動能に影響を与えるか否か検討した。トランズウェルを用いた検討により、RhoE 発現抑制細胞では、EMT を起こした後の移動能が亢進することが明らかになった。

次に、RhoE がどのような細胞内シグナル伝達機構を介して EMT を制御するのか検討した。その結果、RhoE の発現抑制により、EMT に重要な役割を担う Smad3 のリン酸化レベルが増加していること、Snail や Slug などの転写因子の発現も増加することが明らかになった。さらに、RhoE 発現抑制細胞では、TGF-β1 刺激による RhoA の活性化が強く亢進されていることがわかった。

以上の結果より、RhoE は、TGF-β1 誘導性の EMT を抑制しうる新規因子であることが明らかになった。

metastasis, EMT, Rho family

発表責任者：西塚　誠（nishizuka@hirosaki-u.ac.jp）

講演番号：4E4a11
講演日時：3 月 27 日 11:10～ 1 号館 E4 会場

オルガノイド培養系を用いた抗菌ペプチドの産生に関する研究

Studies on the production of antimicrobial peptides using an organoid culture system

○佐藤 美佳、稲葉 明彦、岩槻 健、只石 幹、服部 一夫、清水 誠（東農大院農）
○Mika SATO, Akihiko INABA, Ken IWATSUKI, Miki TADAISHI, Kazuo HATTORI, Makoto SHIMIZU (Grad. Sch. of Tokyo Univ. of Agric.)

【背景・目的】腸は食物を消化し、栄養成分や水分を吸収する機能を持つが、外界から侵入する微生物、ウイルス、有害物質などから自己を守るバリア機能も有する。腸のバリアには、免疫細胞や様々な因子(IgA、粘液、抗菌ペプチドなど)が関与しているが、我々はその中で抗菌ペプチドである Reg3βに着目した。Reg3βは IL-22 により産生が促進されるが、どの腸管上皮細胞が Reg3βの産生に関与しているのかについては不明な点が多い。そこで、我々は腸管オルガノイド培養系を用いて、Reg3βの主要な産生細胞について検討した。
【方法】C57BL/6J マウスの空腸よりクリプトを単離し、オルガノイド培養に供した。培養したオルガノイドを継代した日を Day0 とした。Day3 まで培養したオルガノイドを通常培地あるいは IL-22(10ng/ml)を加えた培地で 24 時間培養した後、Reg3βの mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR で測定した。また、同様に培養後、幹細胞および分化細胞(パネート細胞、Transit-amplifying(TA)細胞、内分泌細胞、杯細胞、タフト細胞)マーカーの遺伝子発現量も測定した。Reg3βタンパク質の産生については、Day2 にオルガノイドをチャンバーに移し替え、IL-22(10ng/ml)を添加し 24 時間培養した後、蛍光免疫染色で確認した。また、同様に培養後、Reg3βと各分化細胞のマーカータンパク質に対して、蛍光二重染色も行った。幹細胞に対しては、Lgr5(幹細胞マーカー)-EGFP マウスから作製した空腸オルガノイドを用いて、同様に培養後、Reg3βの蛍光免疫染色を行った。
【結果・考察】培地への IL-22 添加(IL-22(+))により、オルガノイド中の Reg3βmRNA 発現量の顕著な増加が認められた。また、蛍光免疫染色においても、通常培地で培養したオルガノイド(control)より、IL-22(+)において Reg3β-positive な細胞が増加していた。次に、Reg3β産生細胞を同定する為、control ならびに IL-22(+)培地中での各細胞のマーカー遺伝子の発現量を比較した結果、control に比して IL-22(+)では Lyz(パネート細胞)、CD133(TA 細胞)、ChgA(内分泌細胞)の有意な増加が認められた。一方、Reg3βと各細胞マーカータンパク質の存在を蛍光二重染色または蛍光免疫染色により解析した結果、Reg3βと Lyz および Lgr5 が重なっていた。IL-22(+)で Lyz の遺伝子発現量が増加していたこと、Lyz が Reg3βの染色と重なっていたことから、Reg3βの産生にはパネート細胞が関与していることが強く示唆された。一方、小腸組織を用いた Reg3βの蛍光免疫染色ではクリプトから絨毛の根元部分にもその存在が確認された。その為、その領域に存在する幹細胞や TA 細胞からの Reg3β産生についても検討中である。

Antimicrobial peptides, Intestinal organoids, Intestinal epithelial cells

講演番号：4E4a12
講演日時：3 月 27 日 11:21～ 1 号館 E4 会場

バキュロウイルス-昆虫細胞発現系におけるイズロン酸-2-スルファターゼ(IDS)生産
Production of iduronate-2-sulfatase in baculovirus-insect cell expression system
○中島 慎太朗、小幡 佑季、三﨑 亮、大橋 貴生、藤山 和仁 (阪大生国セ)
○Shintaro NAKAJIMA, Yuki OBATA, Ryo MISAKI, Takao OHASHI, Kazuhito FUJIYAMA (ICBiotech, Osaka Univ.)

近年、バイオ医薬品の市場規模拡大が著しく、難病指定されているムコ多糖症 (MSD) の治療に用いられる酵素製剤も、細胞を用いて生産されたバイオ医薬品のひとつである。MSD は、グリコサミノグリカンの一種であるムコ多糖の分解酵素に異常が生じることでムコ多糖が細胞内に蓄積することにより発症する。この疾患は、患者に投与する組換え酵素製材が哺乳類細胞により生産されており、細胞のメンテナンスにおけるコストなどにより高価であることが問題である。本研究では、MSD のひとつであるハンター症候群の原因となる分解酵素である、イズロン酸-2-スルファターゼ(IDS)の酵素製剤に着目している。IDS 酵素製剤生産の哺乳類細胞の代替となる宿主として、昆虫細胞 Sf9(Spodoptera frugiperda 由来)を用いた生産系の確立を目指した。昆虫細胞を用いた組換えタンパク質生産には、培養における操作が簡便であること、タンパク質発現において使用するバキュロウイルスはヒトには感染しないため、安全性を有しているといった利点がある。また、IDS を始めとするスルファターゼがムコ多糖を分解できる活性型になるためには、自身の 84 番目のシステイン残基がホルミルグリシン構造となる翻訳後修飾が必要となる。この反応は、Folmylglycine generating enzyme(FGE)と呼ばれる酵素によって触媒される。これと IDS を昆虫細胞 Sf9 において共発現させることで、活性型 IDS 発現を行った。

本研究において、ヒト由来の cDNA から IDS、及び FGE 遺伝子を単離した。これらの目的遺伝子を発現させるためのバキュロウイルスを Bac-to-bac™システムによりそれぞれ作製した。この組換えウイルスを Sf9 細胞に感染させ、組換え IDS 及び FGE との共発現による活性型 IDS 生産を行った。感染細胞を破砕して得られたタンパク抽出サンプルに対するウエスタンブロット解析の結果、IDS 及び FGE の特異的なバンドを確認することができ、共発現に成功した。FGE 発現用バキュロウイルスの添加量を振り分けた際のタンパク素抽出サンプルについて活性測定を行った結果、FGE 発現用のバキュロウイルスの添加量増加に伴い、共発現サンプルにおいて検出される活性が IDS 単独発現サンプルの 3.3 培にまで増大することが分かった。

IDS が有している N-結合型糖鎖構造、共発現条件の最適化等さらなる解析により、昆虫細胞-バキュロウイルス発現系により有用タンパク質生産の可能性を探っていく。

Iduronate-2-sulfatase, baculovirus-insect cell expression system, co-expression

講演番号：4E4a13
講演日時：3 月 27 日 11:32～ 1 号館 E4 会場

ミニサークル DNA ベクターを用いた逐次遺伝子組込み法による CHO 細胞染色体への遺伝子導入

Transgene integration into CHO cell gemone by accumulative gene intagration system using minicircle DNA vector

○上平 正道、汪 雪、久野 晶生、河邉 佳典、井藤 彰（九大工）
○Masamichi KAMIHIRA, Xue WANG, Akio KUNO, Yoshinori KAWABE, Akira ITO (Kyushu Univ.)

【目的】我々は、Cre-*loxP* システムをベースとした細胞染色体への逐次遺伝子組込みシステム（AGIS）の開発を行っている[1]。この方法は、変異 *loxP* による反応制御性を利用しており、あらかじめ染色体に組込んだ変異 *loxP* 部位に繰返し目的遺伝子を導入することができる。目的遺伝子のベクターにこれまで通常のプラスミドベクターを用いてきたが、プラスミドベクターからバクテリア由来の配列をのぞいたミニサークル DNA ベクターの使用が導入効率の改善に有効であった[2,3]。本発表では、CHO 細胞の *hprt* 遺伝子座への AGIS による遺伝子組込みによって作製したモデル抗体生産細胞の増殖と抗体生産について、プラスミドベクターとミニサークル DNA ベクターとの比較とミニサークル DNA ベクターの調製法について報告する。
【方法】ミニサークル DNA ベクターの調製は、市販の調製キットを用いて行った。このキットでは、大腸菌内での φC31 リコンビナーゼの誘導発現によってプラスミドからミニサークル DNA ベクターを生成させるものであり、その後、ミニサークル DNA ベクターを大腸菌より抽出・精製した。あらかじめ *hprt* 遺伝子座に目的遺伝子を導入するための起点となる変異 *loxP* を組込んだ CHO 細胞に、リポフェクションあるいはエレクトロポレーションによって、Cre 発現ベクターとともに目的遺伝子の発現ユニットを有するプラスミドベクターあるいはミニサークル DNA ベクターを遺伝子導入した。
【結果】AGIS による CHO 細胞の *hprt* 遺伝子座へ遺伝子導入において、ミニサークル DNA ベクターを用いた方が、プラスミドベクターを用いた場合より約２倍標的部位への遺伝子組込み効率が高くなった。それぞれの方法で目的遺伝子を *hprt* 遺伝子座へ組み込んだ細胞クローンを樹立して増殖速度とモデル抗体生産性を比較したところ、生産性は両方の方法で得られたクローン間で同等であったが、増殖速度はプラスミドベクターを用いた場合に若干低下していた。また、ミニサークル DNA ベクター調製の効率化のために開発している、Cre を用いた調製法についても報告する予定である。

[1] Y. Kameyama et al., *Biotechnol Bioeng*, **106**, 1106-1114 (2010).
[2] X. Wang et al., *J Biosci Bioeng*, **124**, 583-590 (2017).
[3] X. Wang et al., *Biotechnol J*, **13**, e1800063 (2018).

CHO cell, accumulative gene integration, minicircle DNA vector

発表責任者：上平正道（kamihira@chem-eng.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：4E4a14
講演日時：3 月 27 日 11:43～ 1 号館 E4 会場

筋肉特異的巨大タンパクキナーゼの酵素活性とミトコンドリア形態制御との関連性

Relationship between giant protein kinase and mitochondria in muscle cells

○松永 洋平、ベニアン ガイ (エモリー大学病理学部)
○Youhei MATSUNAGA, Guy Benian (Emory Univ. of Patho.)

【背景】

筋肉細胞において、巨体タンパクキナーゼ群（～700kDa）は広く保存されている。この巨大タンパクキナーゼは、① N 末端～C 末端領域に Immunoglobulin(Ig)、ならびに Fibronectin (Fn)ドメインリピート、② C 末端領域にキナーゼドメインを保有する。Ig/Fn ドメインリピート領域は分子バネとして機能すると考えられているが、キナーゼドメインの生理機能は不明なままである。

本研究では、線虫 *C. elegans* の巨大タンパクキナーゼ（UNC-89）を題材に、キナーゼドメインの生理機能解析を行った。

【方法・結果】

ゲノム編集 CRISPR を用いて酵素不活性株を作出したところ、運動性の向上を確認した。UNC-89 は、筋肉細胞特異的に発現することから、筋繊維の構造、ならびに細胞小器官の形態を評価した。抗ミオシン抗体などを用いて筋繊維の構造を観察したところ、野生株と酵素不活性株との間に差は認められなかった。一方で、ミトコンドリアの形態観察を行ったところ、酵素不活性化株において、断片化されたミトコンドリアの割合が減少した。

ミトコンドリアはエネルギー源である ATP 合成を行っていることから、個体／細胞内 ATP 量の評価を行った。個体から抽出した ATP 量を測定したところ、酵素不活性株は野生株よりも多く ATP を保有していた。次に、ATP:ADP 比プローブである Perceval を筋細胞特異的に発現させ、細胞内 ATP:ADP ratio を測定したところ、酵素不活性株は野生株よりも高い ATP:ADP ratio を示した。今回の結果から、UNC-89 のキナーゼ活性は筋構造の制御に関与しないことが明らかとなった。一方で、UNC-89 のキナーゼ活性は、ミトコンドリアの形態制御に関与し、細胞内 ATP 量が変化することも明らかとなった。これら、細胞内 ATP レベルの上昇が、運動性の向上に寄与したと考えられる。

ミトコンドリアの形態制御には、ダイナミン様タンパク DRP-1（分裂）、ダイナミン様 GTPase OPA-1(融合)などが関わっている。現在、UNC-89 とこれら因子との関連性を検証している。これらの研究成果から、筋細胞におけるミトコンドリア形態制御メカニズムの一端の解明が期待できる。

muscle, Giant protein kinase, mitochondria

講演番号：4E4a15
講演日時：3 月 27 日 11:54～ 1 号館 E4 会場

筋形成型オリゴ DNA はマウス多能性幹細胞の心筋分化を誘導する

Myogenetic oligodeoxynucleotide induces myocardial differentiation of murine pluripotent stem cells

○石岡 美奈[1]、二橋 佑磨[2]、鏡味 裕[1,2]、下里 剛士[3]、高谷 智英[1,2]（[1]信州大農、[2]信州大院総合理工、[3]信州大菌類・微生物セ）
○Mina ISHIOKA[1], Yuma NIHASHI[2], Hiroshi KAGAMI[1,2], Takeshi SHIMOSATO[3], Tomohide TAKAYA[1,2] ([1]Fac. Agric., Shinshu Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Tech., Shinshu Univ., [3]CFMD, Shinshu Univ.)

【背景・目的】

我々は最近、筋芽細胞の分化を著名に誘導する筋形成型オリゴ DNA として iSN04 を見出した。筋芽細胞は骨格筋への分化が決定しており、iSN04 はその筋分化プログラムを亢進すると考えられている。しかし iSN04 が、ES 細胞や iPS 細胞など多能性幹細胞の運命決定に及ぼす影響は不明である。本研究では、iSN04 がマウス多能性幹細胞の筋分化を促進するかを検証した。

【方法】

未分化のマウス iPS 細胞株 20D17（*Nanog*-GFP）、あるいはマウス ES 細胞株 hCGp7（*Nkx2-5*-GFP）を、ゼラチンコートした 3 cm ディッシュに 3×10^4 個播種し、分化培地で培養し、多能性幹細胞の自発的な細胞分化を誘導した。分化誘導 5 日目から 10 μM の iSN04 を投与した。また、未分化のマウス ES 細胞をゼラチンコートした 96 穴プレートに各ウェル 2000 個播種して同様に分化を誘導し、分化誘導 3 日目から 10 μM の iSN04 を投与した。いずれの実験でも 2 日ごとに培地を交換した。これらの細胞を顕微鏡下で継時的に観察し、定量 PCR による遺伝子発現解析を行った。

【結果・考察】

3 cm ディッシュで分化誘導 5 日目から iSN04 を投与した 20D17 細胞では、分化誘導 9 日目から自律的に拍動する心筋様のコロニーが見られた。対照群では、拍動コロニーの出現が iSN04 投与群に比べて 1 日以上遅く、コロニーの直径も最大で 300 μm 程度であり、iSN04 群で観察された直径 1 mm 以上のコロニーと比較して顕著に小さかった。hCGp7 細胞による心筋特異的遺伝子 *Nkx2-5* の発現観察では、iSN04 投与群で分化誘導 8 日目に *Nkx2-5*-GFP の蛍光を認め、拍動コロニーが分化した心筋細胞で形成されていることが明らかになった。定量 PCR の結果、iSN04 投与群では対照群と比較し、心筋特異的転写因子である *Nkx2-5* と *Tbx5*、および心筋型ミオシン重鎖 *Myh6* の発現が上昇していた。

同様に、96 穴プレートで分化誘導 5 日目から iSN04 を投与した hCGp7 細胞では、分化誘導 8 日目に拍動コロニーが観察された。分化誘導 4 日目から iSN04 を投与した群では、さらに早く 7 日目から拍動を認めたが、分化誘導 3 日目から iSN04 を投与した群では拍動コロニーは全く出現しなかった。

以上の結果から、筋芽細胞の骨格筋分化を促進する iSN04 は、マウス多能性幹細胞においては心筋分化を誘導することが明らかになった。また、iSN04 の投与時期、すなわち多能性幹細胞の分化段階によって、iSN04 の心筋分化誘導効果は逆転することが示された。

myocardial differentiation, oligodeoxynucleotide, pluripotent stem cell

発表責任者：高谷智英（ttakaya@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：4E5a01
講演日時：3 月 27 日 09:00～ 1 号館 E5 会場

マイクロ流路を利用したハイスループット機能的 GPCR アッセイの開発

Development of a High-throughput Functional GPCR Assay System Using Microfluidics

○青木 航[1,2,3]、柳沼 謙志[1]、三浦 夏子[1,2]、小川 雅人[5]、西川 洋平[5]、細川 正人[4,6]、竹山 春子[5]、植田 充美[1,2,3]（[1]京大院・農・応用生命、[2]JST-CREST、[3]京都バイオ計測セ、[4]JST-さきがけ、[5]早大院先進理工、[6]早大理工総研）

○Wataru AOKI[1,2,3], Kenshi Yaginuma[1], Natsuko Miura[1,2], Masato Ogawa[5], Yohei Nishikawa[5], Masahito Hosokawa[4,6], Haruko Takeyama[5], Mitsuyoshi Ueda[1,2,3] ([1]Dept. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]JST-CREST, [3]Kyoto Indust. Sci. & Tech Innov. Center, [4]JST-PREST, [5]Grad. Sch. Biomol. Eng., Waseda Univ., [6]Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ.)

G タンパク質共役受容体（GPCR）は、生体内で重要な生理活性機能を担っている。そのため、GPCR に対する新規リガンドの発見は、多くの生理機能の解明やそれに起因する疾患メカニズムの解明、さらには医薬開発にも繋がると期待される。

本研究では、ペプチド分泌酵母、GPCR 発現レポーター哺乳類培養細胞、および Droplet microfluidics を組み合わせることによって、特定の GPCR の新規リガンドをハイスループットに探索できるシステムを構築した。まず、当研究室で構築した「GPCR functional assay system」[1]の改良を行い、哺乳類培養細胞上に発現した GLP1R（Glucagon-like peptide-1 receptor）の活性を、蛍光で測定可能なシステムを構築した。次に、GLP1R のアゴニストやランダム化ペプチドリガンドを分泌する酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を構築した。その後、これらの細胞と Droplet microfluidics を用いてハイスループットアッセイ系の開発を行った。すなわち、一つのドロップレット内にペプチドリガンドを分泌する酵母とレポーター培養細胞を同時に封入し、共培養を行った後に、レポーター培養細胞の活性測定を行い、機能的リガンドの同定も行った。これらの結果をまとめて報告する [2]。

[1]Shigemori *et.al*. J. Biotechnol., 209, 96-101, 2015
[2]Yaginuma *et.al.* submitted

GPCR, Droplet microfluidics, Functional assay

発表責任者：青木　航（aoki.wataru.6a@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4E5a02
講演日時：3 月 27 日 09:11～ 1 号館 E5 会場

微細藻類の実用培養を指向した原生動物による捕食リスクの評価と低減の試み
The risk assessment and mitigation of bacterivorous predation for the practical cultivation of microalgae

○戸田 成美[1]、神原 亮大[2]、本村 圭[2,3]、石田 丈典[2]、池田 丈[2]、舟橋 久景[2]、黒田 章夫[2,3]、廣田 隆一[2,3] ([1]広島大学工学部第三類、[2]広島大学院先端物質、[3]JST-ALCA)
○Narumi TODA[1], Akihiro KANBARA[2], Kei MOTOMURA[2,3], Takenori ISHIDA[2], Takeshi IKEDA[2], Hisakage FUNABASHI[2], Akio KURODA[2,3], Ryuichi HIROTA[2,3] ([1]Faculty of engineering Hiroshima University, [2]Graduate School of Advanced Sciences of Matter Hiroshima University, [3]JST-ALCA)

【目的】微細藻類は、光合成により CO_2 から有用物質を生産できるため、環境低負荷型の物質生産ホストとして期待されている。実用化における微細藻類の培養は、コストのかからない屋外開放型の培養が望まれるが、屋外の培養環境は実験室内とは大きく異なるため、期待されるパフォーマンスが安定して発揮されないことが実用化の障壁となっている。その主要な原因のひとつとして、コンタミネーションによる生産性の低下が挙げられるが、藻類培養におけるコンタミネーションそのものについて焦点が当てられた研究は少なく、その実体は不明な点が多い。本研究では、藍藻培養における主要な捕食者として同定された原生動物による捕食現象の解析と、培養への影響評価を行った。また、捕食者による培養汚染を低減するためのリスク評価と、当研究室で開発している亜リン酸を利用した培養の効果を調べた。
【方法・結果】東広島市の河川・湖沼から採取した複数の水を添加した BG-11 培地に藍藻（*Synechococcus elongatus*）を植菌し、光照射下/2%CO_2 供給条件で増殖をモニタリングすることで原水中に含まれる微生物の藍藻増殖に対する影響を調べた。その結果、採水地により差異が認められたものの、すべての原水で藍藻の増殖抑制が認められた。顕微鏡観察により、原生動物による藍藻の捕食現象が確認され、これらの捕食性原生動物が増殖抑制の原因であると考えられた。培地に使用する原水の割合を低下させると、捕食による被害が低減し、培養を完遂する（Full-growth させる）ことが可能であった。このことから、原水中に含まれる捕食者数と捕食被害の程度に相関があることが示唆された。捕食が観察された培養液の 18S rDNA 解析の結果、*Ochromonas*（黄金色藻）や *Nuclearia*（アメーバ）, *Cyclidium*（繊毛虫）などが主要な捕食者として同定された。この中で最も頻繁に出現し、強く藍藻の増殖を抑制した *Ochromonas* について、18S rDNA をターゲットとした定量 PCR による検出系を構築し、原水中の *Ochromonas* の数量把握が捕食被害の予防的診断法として有効であるか検討した。また、亜リン酸資化能を付与した藍藻を用いて同様の実験を行った結果、リン濃度を高めることにより、一定の捕食抑制効果が認められた。

microalgae, predation, protozoa

発表責任者：戸田成美（b151952@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：4E5a03
講演日時：3 月 27 日 09:22～ 1 号館 E5 会場

疑似的な dFBA を用いた微生物による有用物質生産の改善方策の探索とその有効性の検証

Searching method of improvement strategies for Bio-production of valuable chemicals using pseudo dFBA

○厨 祐喜[1]、大山 彰[2]、白井 智量[3]、荒木 通啓[1,4] ([1]京都大院・医、[2]インシリコバイオロジー、[3]理研・CSRS、[4]神戸大院・科技イノベ)
○Yuki KURIYA[1], Akira OHYAMA[2], Tomokazu SHIRAI[3], Michihiro ARAKI[1,4] ([1]Grad. Sch. Med., Kyoto Univ., [2]in silico biology, Inc., [3]CSRS, RIKEN, [4]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)

【背景・目的】

近年、様々な微生物による多種多様な有用物質生産の研究が盛んにおこなわれている。このような研究において、主だった改善方策は代謝工学、培養工学の２つの分野からなり、これらのいずれか単独あるいは複合して物質生産の改善・最適化が試みられている。代謝工学においては、ゲノムスケールモデル(GSM)を用いた FBA(Flux balance analysis)や微分方程式モデルなどのシミュレーションによる代謝改変方策の探索が実施されており、その有効性が示唆されている。また、培養工学の分野においても微分方程式モデルや dFBA(dynamic flux balance analysis)などを用いた培養条件の最適化などがシミュレーションにより実施されており、その有効性が示唆されている。そこで本研究では、代謝モデルとシミュレーションを利用した有用物質生産の改善方策を探索する方法として、実際に実験的に得られた培養のタイムコースデータの一部を利用した疑似的な dFBA を使用し、その有効性を検証することを目的とした。

【方法】

ケーススタディとして物質生産の宿主はデータが豊富な大腸菌 *E. coli* を使用した。またシミュレーションに使用する代謝モデルは GSM iJO1366 を使用した。物質生産のターゲットは、微生物代謝における基礎的な生成物である酢酸、乳酸、コハク酸などを想定した。シミュレーションには主に文献から取得した基質と菌体濃度のタイムコースデータを補間やスムージングにより変換した基質と菌体増殖の比速度を使用した。シミュレーションは、基質と菌体増殖の比速度にある程度の幅を持たせた値を入力値とし、FBA を逐次繰り返す疑似的な dFBA により実施した。

【結果】

基質と菌体増殖の比速度を用いた疑似的な dFBA の結果、実際に培養により得られたターゲット生産の結果とシミュレーションにより得られた結果とではいずれのターゲットについてもある程度の乖離が見られた。これは培養条件または輸送系の改変による物質生産の伸びしろと考えられた。そのため、実験値とシミュレーション値との比較により、培養条件または輸送系をどのように改変すればターゲットの生産が改善するかという方策の手掛かりが得られることが示唆された。今後は *E. coli* での様々な有用物質生産への適用や別の宿主での有用物質生産にこの手法を適用し、その妥当性・汎用性を検証したいと考えている。

metabolic model, dynamic flux balance analysis, bio-production

講演番号：4E5a04
講演日時：3 月 27 日 09:33～ 1 号館 E5 会場

亜リン酸依存性による生物学的封じ込めを搭載した藍藻への水平伝播抵抗性付与

Conferring resistance to horizontal gene transfer on cyanobacteria applied the biological containment by phosphite dependency

○佐野 公亮[1]、本村 圭[1,2]、神原 亮大[1]、渡辺 智[2,3]、池田 丈[1]、石田 丈典[1]、舟橋 久景[1]、黒田 章夫[1,2]、廣田 隆一[1,2] ([1]広島大院先端物質、[2]JST-ALCA、[3]東京農大生命科学)

○Kosuke SANO[1], Kei MOTOMURA[1,2], Akihiro KANBARA[1], Satoru WATANABE[2,3], IKEDA Takeshi[1], Takenori ISHIDA[1], Hisakage FUNABASHI[1], Akio KURODA[1,2], Ryuichi HIROTA[1,2] ([1]Grad. Sch. AdSM, Hiroshima Univ, [2]JST-ALCA, [3]Fac. Life Sci., Tokyo Univ. of Agri)

【目的】現在、高度な遺伝子組換え技術によって、様々な物質を合成できる有用微細藻類の作出が可能になっている。しかし、組換え藻類の開放系での使用はカルタヘナ法により制限されており、オープンポンドのような開放条件での培養に適用する事は困難である。当研究室では、通常の生物が利用できないリン源である亜リン酸に生育を依存するようにリンの代謝を改変する技術を開発している。亜リン酸は環境中にはほとんど存在しないため、本手法は組換え体の拡散を防ぐ生物学的封じ込め手法として利用できる。本手法を搭載した藍藻は突然変異によるエスケープ株（封じ込めから逃れる株）の出現頻度は極めて低い。しかし、藍藻が本来有する自然形質転換能により、環境 DNA が取り込まれることでエスケープ株が出現することが懸念される。そこで本研究は藍藻封じ込め株の外来 DNA 取り込み系破壊によりエスケープ株の出現を抑えることを目的とした。

【方法・結果】実験のモデルとして本封じ込め手法を適用した *Synechococcus elongatus* PCC 7942 株を用いた。亜リン酸依存性を与えるためには①亜リン酸酸化酵素 PtxD の発現による亜リン酸資化能の付与、②リン酸を取り込まない亜リン酸特異的輸送体 HtxBCDE の機能的発現、③内在性リン酸輸送体遺伝子の同定と破壊が必要である。本封じ込め手法の PCC 7942 における封じ込め効果の検証を行うため、突然変異によるエスケープ株が出現するかを調べたところ、エスケープ株は出現せず、その検出限界値は 3.6×10^{-11} 以下であった。次に、自然形質転換能を抑えるために、外来 DNA 取り込みに関与すると考えられている Hfq ホモログの破壊を行った。Hfq は大腸菌では RNA 結合タンパク質として知られているほか、*Synechocystis* sp. PCC 6803 ではⅣ型線毛の形成と自然形質転換への関与が認められ、その破壊株は自然形質転換能が喪失し、増殖能にも大きな影響が無いことが知られている。そこで、PCC 7942 において Hfq ホモログ遺伝子（Synpcc7942_1926）の破壊株を作製したところ、自然形質転換効率が著しく低下することが確認された。現在、Hfq ホモログを破壊した封じ込め株と野生株との共培養で水平伝播によるエスケープ株の出現が抑えられるかを確認している。

Biological containment, Cyanobacteria, Horizontal gene transfer

講演番号：4E5a05
講演日時：3 月 27 日 09:44～ 1 号館 E5 会場

Enhanced colorimetric detection of Hepatitis E virus-like particles using a new immunoassay approach.

○Indra Memdi Khoris[1], Tetsuro Suzuki[2], Tian-Cheng Li[3], Enoch Y. Park[1,4] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. Sci. Technol., Shizuoka Univ., Japan, [2]Dept. Infect. Dis, Hamamatsu Univ. Sch. Med., Japan, [3]Dept. Virol. II, Nat' l Inst. Infect. Dis., Japan, [4]Res. Inst. Green Sci. Technol. Shizuoka Univ., Japan)

Hepatitis E Virus (HEV) infection has become a serious public health concern due to increasing zoonotic transmission, especially in developed countries. Hepatitis E is associated to liver failure and chronic liver disease, with higher mortality during the pregnancy. As recently, HEV antigen-targeting detection platform is still developing, this shows there is increasing necessity to develop a highly sensitive biosensor. In this study, an antibody-specific to HEV was conjugated to gold nanoparticle (AuNP). Au NPs exhibit enhanced peroxidase-like activity and can substitute horseradish peroxidase (HRP) for its application in immunoassay. HEV-like particles (HEV-LPs) was captured by anti-HEV antibodies, which were immobilized on the surface of a 96-well microtiter plate and formed a sandwich structure among anti-HEV Ab, HEV-LPs and Ab-Au NP. However, the signal amplification is not high enough to increase the sensitivity of the colorimetric immunoassay. To overcome this issue, a novel strategy was used to enhance the signal amplification by *in situ* deposition of silver shell on Au NPs. After the sandwich immunocomplex was formed, Ag ion-containing hydroquinone was added to form Au/Ag core/shell NPs. When H_2O_2/3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) solution was added to the wells, Ag ions were liberated from the surface of Au/Ag NPs and enhanced the oxidation of TMB. These reactions enhanced the oxidation of TMB and developed an intense blue color. The Au/Ag NPs were shown to exhibit higher affinity and catalytic efficiency for H_2O_2 and higher catalytic velocity based on the k_{cat} of up to 7-fold compared with Au NPs. In this work, the proposed colorimetric immunoassay can detect HEV-LPs in wide linear range of 10 pg/ml to 100 ng/ml with detection limit is 9.19 pg/ml HEV-LPs. This immunoassay represents a workable detection assay for low concentrations of HEV-LPs that is applicable for early-stage diagnosis in monitoring HEV infection.

Colorimetric immunoassay, Peroxidase-like activity, Gold/silver nanohybrid

発表責任者：Enoch Y. Park（park.enoch@shizuoka.ac.jp）

講演番号：4E5a06
講演日時：3 月 27 日 10:05～ 1 号館 E5 会場

定量的レポーター遺伝子を用いた酵母 two-hybrid 法による新規 FRB 相互作用蛋白質の単離と解析

Quantitative Y2H：screening and analysis of a novel FRB domain-binding protein

○渡部 瑠名、薗田 拓実、内田 由乃、伊藤 圭祐、田中 瑞己、河原崎 泰昌（静県大食栄）
○Runa WATABE, Takumi SONADA, Yoshino UCHIDA, Keisuke ITO, Mizuki TANAKA, Yasuaki KAWARASAKI (Univ. Shizuoka)

【背景と目的】酵母 two hybrid 法（Y2H）は蛋白質間相互作用解析および新規相互作用蛋白質のスクリーニングに広く用いられている。しかし、従来型レポーター遺伝子（*lacZ*）発現量によって算出する定量的解析は、宿主酵母細胞の破砕などの煩雑な操作を伴うため誤差を含みやすい。本研究室はこれまでに、糸状菌から単離した高分泌型βガラクトシダーゼ遺伝子（*LacA3*）を用いた新規 Y2H 法の開発を行ってきた。本研究では、その有用性評価を目的とし、寿命延伸因子ラパマイシンの標的分子 TOR の FRB ドメインと相互作用する新規蛋白質の探索および性質決定を行った。
【方法と結果】Y2H 宿主株として市販 AH109（*MATa*）および Y187（*MATα*）、または改変型レポーター遺伝子 LacA3 を発現する YB101（*MATα*, Y187 *aur::AUR-LacA3*）株を用いた。ベイト-プレイ間の相互作用は、基質として X-gal を加えた選択培地（SDX-LWH）における接合体の生育および青色ハロー形成により可視化した。相互作用強度の定量的評価は、培地上清中のβ-ガラクトシダーゼの活性を合成基質 ONPG を用いて定量することで行った。FRB ドメインをベイト、ヒト cDNA ライブラリー（HeLa 細胞由来）をプレイとしてスクリーニングを行ったところ、FRB ドメインと相互作用する蛋白質として新たに低酸素誘導性転写因子である HIF2α（870 アミノ酸）の C 末端領域（HIF2α(588-870)；283 アミノ酸）の遺伝子断片を得た。さらに HIF2α断片の段階的欠失変異体群を新規 Y2H によって解析したところ 、相互作用は N 末端（588 位）側からの欠失では漸減する一方、C 末端からの欠失では 66 アミノ酸の欠失で激減した。エラープローン PCR により、相互作用能を保持した HIF2α断片欠失変異体の高頻度塩基置換体ライブラリを作製した。そして、FRB ドメインとの相互作用能を保持したクローンを調べたところ、アミノ酸置換は 588-809 の領域でのみ検出され、C 末端 810-870 領域が FRB ドメインとの結合に直接的な役割を果たしていると予想された。
【考察】新規レポーター遺伝子 LacA3 による定量的スクリーニングにより、新規相互作用蛋白質の探索・単離、および単離後の性質決定を簡易化できることが示された。HIF2α の FRB ドメインとの相互作用領域を新規 Y2H によって解析した結果、C 末端 810-870 領域に相互作用部位が存在しており、588-809 の領域は相互作用部位の安定化に関与すると考えられた。現在、792-870 領域に変異導入したクローン群の相互作用能を上記レポーター遺伝子により評価し、相互作用部位の精密化を行っている。大会ではこれらの結果も併せて報告する。

yeast two-hybrid, FRB binding protein, quantitative screening

発表責任者：河原崎泰昌（kawarsky@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：4E5a07
講演日時：3 月 27 日 10:16～ 1 号館 E5 会場

β-カロテンオキシゲナーゼ変異体を用いた非天然レチノイドの大腸菌生産

Escherichia coli production of non-natural retinoids using ß-carotene oxygenase mutants

○斉藤 遥平、河合（野間）繁子、斎藤 恭一、梅野 太輔（千葉大院・工・共生応化）
○Yohei SAITO, Shigeko KAWAI-NOMA, Kyoichi SAITO, Daisuke UMENO (Dept. Appl. Chem. Biotech., Chiba Univ.)

【目的】 β-カロテンオキシゲナーゼ（BCO)は、β-カロテンを基質としてレチナールを合成する酸化酵素である。レチナールの還元型であるレチノールはビタミン A として知られており、視覚、骨格形成、細胞分裂および増殖、免疫、肌の健康、抗がん作用など、さまざまな生物の機能にかかわる栄養素である。カロテノイドは自然界に約 750 種存在しており、その中でもキサントフィル類などは、β-カロテンにさまざまな修飾が施されることで、多様な機能を示している。そのため、これらのカロテノイドを BCO の基質とすることができれば、天然には存在しない多様な機能を持った非天然レチノイドの合成が可能となる。本研究では、BCO を用いた非天然レチノイドの合成を目指す。

【方法・結果】 *Mus Musculus* のβカロテンモノオキシゲナーゼ１（BCMO1）および Uncultured marine bacterium 66A03 のβ-カロテンジオキシゲナーゼ（BCDO）の２つの BCO を選び，それらのプラスミド発現系を組んだ。これらのプラスミドを，様々なカロテノイドの生合成遺伝子をコードしたプラスミドと大腸菌に共導入して形質転換した。得られた形質転換体の蓄積するカロテノイドの低下から，それぞれのカロテノイドの基質として消費される効率を見積もるとともに，極性画分に現れる新規ピークの吸光スペクトルや分子量などから，非天然レチノイドの生成，蓄積を確認した。BCMO1 はリコペン、カンタキサンチン、およびゼアキサンチンを基質とした非天然レチノイドの生産が確認された。一方で、BCDO の基質寛容性は広く， ε-カロテン、カンタキサンチン、ゼアキサンチン、およびアスタキサンチンを基質とした非天然レチノイドの生産が確認された。
しかしながら、 BCDO はε-カロテンの一部を酸化するにとどまり，また，βカロテンをカンタキサンチン合成酵素などと取り合うため，非天然レチノイド経路としては，多くの改善の余地が認められた。そこで，反応特異性の分子進化工学を行うことにした。BCDO の遺伝子全域にエラープローン PCR によってランダム変異を導入し，ライブラリを作製した。蓄積するカロテノイドによるコロニー色の消失を指標として，BCDO のカロテノイド消費活性をスクリーニングしたところ，これらを基質として消費する能力を向上させたと思われるクローンを複数取得できた。

directed evolution, ß-carotene oxygenase, reitnoid

講演番号：4E5a08
講演日時：3 月 27 日 10:27～ 1 号館 E5 会場

酵素を用いたヒスチジン測定法の構築～食品や生体試料中のアミノ酸測定に向けて～

Novel enzymatic histidine assay for amino acid analysis in food or biological sample

○山口 浩輝、中田 國夫、巽 萌美、髙橋 一敏、杉木 正之、水越 利巳、宮野 博 (味の素株式会社)
○Hiroki YAMAGUCHI, Kunio NAKATA, Moemi TATSUMI, Kazutoshi TAKAHASHI, Masayuki SUGIKI, Toshimi MIZUKOSHI, Hiroshi MIYANO (Ajinomoto Co., Inc.)

アミノ酸は生命にとって必須の化合物である。食事や代謝反応によって得られたアミノ酸はタンパク質合成に用いられるだけではなく、様々な生体分子の前駆体として用いられることで生命活動を維持している。生体内のアミノ酸濃度は、食事や様々な疾患によって変動することが知られており、アミノ酸濃度を測定することは食品科学や臨床分野、生理学研究において重要な意義を有する。

従来、アミノ酸測定には液体クロマトグラフィー法や質量分析法などが広く用いられてきた。これらの方法は生体試料や食品中のアミノ酸を高い精度と正確性で網羅的に測定できる一方で、大型かつ高額な装置とそれを扱える高い専門性を有する研究者を必要とするため、アミノ酸測定の機会は非常に限られていた。この課題を解決するために我々は、簡便かつ迅速に試料中の対象化合物を測定できる酵素法に着目して検討を進めているが、天然のアミノ酸代謝酵素の中には活性や特異性、長期保存安定性など性質が不十分な酵素も多く、実用化への課題となっている。そこで我々は、天然から見出したアミノ酸代謝酵素を酵素工学により改良することで、高い活性や基質特異性、保存安定性を持つアミノ酸代謝酵素の創出を行っている。本発表ではヒスチジン測定用酵素を一例として紹介する。

ヒスチジンは近年、血中濃度と潰瘍性大腸炎の関連性が報告されており[1)]、簡易な測定法のニーズが高いが、酵素を用いた測定についてはほとんど報告例がない。そこで我々は、ヒスチジン脱炭酸酵素とヒスタミン脱水素酵素を組み合わせた測定法を構築した。ヒスチジン脱炭酸酵素は長期保存安定性に課題があったため、長期保存安定性を部位特異的変異導入法によって改善を試みた。その結果、野生型が 4°C 保存で 50 日以内に完全に失活するのに対し、200 日以上安定な変異体を創出した。この変異体を用いてヒト血漿中のヒスチジン濃度を定量したところ、機器分析の測定値と比較した際の乖離率は 5.8%以下であり、ヒスチジン測定用酵素として有用であることを確認した。

1) T. Hisamatsu *et al.,* PloS one, 7 (2012) e31131

Amino acid analysis, enzymatic assay, protein engineering

発表責任者：山口浩輝（hiroki_yamaguchi@ajinomoto.com）

講演番号：4E5a09
講演日時：3 月 27 日 10:38～ 1 号館 E5 会場

Encapsulin を用いた外来タンパク質を内包可能なナノ粒子の調製

Preparation of protein nano-particles encapsulating exogenous proteins.

石原 沙季、立田 祐琳亜、岡 拓二、○平 大輔（崇城大・生物生命）
Saki ISHIHARA, Yuria TATTA, Takuji OKA, ○Daisuke HIRA (Sojo Univ. of Bio. life.)

【目的】ナノ粒子タンパク質 Encapsulin は、1 種類のタンパク質が多量体形成することにより出来るナノカプセルである。60 量体もしくは 180 量体のものが知られており、直径 20～30 nm 程度の正二十面体粒子が形成されることが報告されている。また、Encapsulin は、その粒子内部に特異的に別のタンパク質（荷物タンパク質）を内包する性質を有している。内包される荷物タンパク質は、その N 末端もしくは C 末端に特有の十～数十残基程度のアミノ酸配列（ターゲットペプチドと呼ぶ）を有している。そのターゲットペプチドが認識されることで、荷物タンパク質が特異的に Encapsulin 粒子内に取り込まれ、取り込まれた荷物タンパク質が粒子内で機能することで、鉄貯蔵や活性酸素の除去等の働きを担っていると考えられている。一方、近年のゲノム解析の進展により、Encapsulin および荷物タンパク質が有するターゲットペプチドについて、アミノ酸配列が大きく異なる複数のものが予測されているが、それらの構造的・機能的な違いはほとんどわかっていない。また、Encapsulin を用いたドラッグデリバリーシステム等への応用が試みられているが、粒子サイズ制御や荷物タンパク質内包量の制御などが実現されていない。そこで本研究では、好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* 由来の Encapsulin (GkEnc)について、異種発現およびナノ粒子形成について検討した。さらに、ミオグロビン、緑色蛍光タンパク質（GFP）、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)等を外来荷物タンパク質のモデルとして、これら遺伝子を共発現することで、GkEnc 粒子に内包させることが可能かを検討した。
【方法】GkEnc 遺伝子をプラスミド pET20b に組み込み、大腸菌を用いて発現させた。発現タンパク質を Ni アフィニティー及びゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。また、GkEnc 単独発現用のプラスミドを改変して、ターゲットペプチドを付加したミオグロビン、GFP、SOD 遺伝子をそれぞれ共発現させた。これらも同様に発現・精製した。
【結果および考察】GkEnc を単独で発現・精製した試料を SDS-PAGE に供したところ、GkEnc の遺伝子から推定される分子量と合致する位置に単一バンドが確認された。さらに、得られた試料を電子顕微鏡で観察したところ、直径 40 nm 程度のナノ粒子形成が確認できた。また、ミオグロビン、GFP、SOD それぞれを GkEnc と共発現したものを SDS-PAGE で確認したところ、GkEnc に加えて、外来タンパク質のバンドも明瞭に確認された。これらより、GkEnc ナノ粒子内に外来荷物タンパク質を高効率に内包させることが可能と考えられた。現在、付加するターゲットペプチドを改変することで、GkEnc への外来タンパク質の内包量制御が可能か、検討している。

Nanoparticle, Encapsulin, Protein expression

発表責任者：平大輔（hira@life.sojo-u.ac.jp）

講演番号：4E5a10
講演日時：3 月 27 日 10:49～ 1 号館 E5 会場

The production and refolding of Fab antibody fused with NanoLuc expressed in *Escherichia coli*

○Almasul Alfi[1], Shunta Ogawa[1], Takaaki Kojima[1], Teruyo Ojima-Kato[1,2], Jasmina Damnjanovic[1], Hideo Nakano[1,2] ([1]Grad. Sch. Bioagric., Nagoya Univ., [2]iBody Inc.)

Antibody-enzyme fusion proteins are important glycoproteins that have been widely used for various biomedical and immunological detection techniques. Genetically-fused antibody-enzyme complexes are simpler and more practical to use than chemically-conjugated antibody-enzyme fusion. In our study, we used *E. coli* BL21(DE3) and SHuffle T7 Express as host to examine the expression system of Fab-NanoLuc fusion. Leucine Zipper (LZ) in C-terminus of light chain (Lc) and heavy chain (Hc) were used to increase the correct association of Lc and Hc. In addition, N-terminal Ser-Lys-Ile-Lys (SKIK) was attached to the fusion proteins, resulting in a high expression of the fusion protein as previously reported. Since the majority of the expressed fusions were produced in insoluble fraction, the fusions were solubilized and refolded by a dialysis method. The refolded Fab-NanoLuc fusions had both binding activity to the antigen (*E. coli* O157) and luciferase activity. The fusion was successfully used to detect antigens by one-step ELISA with luciferase activity.

Antibody engineering, Leucine Zipper, NanoLuc

発表責任者：Hideo Nakano（hnakano@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：4E5a11
講演日時：3 月 27 日 11:10～ 1 号館 E5 会場

進化分子工学による大腸菌フィターゼ AppA の低温高活性化

Improving the cold-activity of *E.coli* phytase AppA by directed evolution

○和田 愛未、林 勇樹、新井 宗仁（東大・総合文化・生命環境）
○Manami WADA, Yuuki HAYASHI, Munehito ARAI (Dept. Life Sci., Univ. Tokyo)

現代農業において、リン肥料は植物の効率的な生育に重要である。しかし、リン肥料の原料であるリン鉱石の品質低下と約 300 年後の枯渇が予測されている。そのため、持続的に食料生産を行っていくためには、リン肥料の効率的利用と使用量削減が必要である。現在のリン肥料の使用における大きな問題点は、リン肥料中に含まれるリンの植物による吸収効率が低いことである。これは、リン肥料中のリンが土壌中でフィチン酸という形態で蓄積してしまうことが原因である。フィチン酸は有機態リンの一つであり、有機態リンは土壌のリン存在量の 80%を構成する。その有機態リンの存在量のうち、土壌の種類にもよるがフィチン酸は最大で 80%を占める。

よって本研究では、フィチン酸を加水分解し、植物の利用可能な無機リンを遊離する酵素フィターゼに注目した。特に、大腸菌由来フィターゼ AppA は高い活性を有し、その活性は AppA と同様に産業利用されている *Aspergillus niger* 由来フィターゼの約 8 倍に相当する。しかし、土壌栽培または養液栽培で植物を生育する環境は、AppA の至適温度 60℃と比べかなり低温である。例えば日本の土壌の平均温度である 15℃では、AppA は本来の 20%未満の活性しか発揮できない。土壌中の低温条件下で AppA が効率良くフィチン酸から無機リンを遊離させるためには、AppA の低温高活性化が必要となる。そこで本研究では、土壌温度 15℃における AppA の低温活性を向上させることを目的とした。

AppA の低温高活性化のため、大腸菌を用いた AppA 発現系を構築し、進化分子工学的手法を用いて AppA 変異体のスクリーニングを 2 段階で行った。まず、大腸菌 BL21(DE3)株から取得した *appA* 遺伝子を用いて AppA 発現プラスミドを作製した。AppA の発現を大腸菌 BL21(DE3)株と BL21(DE3)pLysS 株を用いて行ったところ、後者の株における発現がより優れていたため、AppA 発現株として採用した。

appA 遺伝子にランダム変異を導入することで AppA 変異体を作製した後、2 段階スクリーニングを行った。1 段階目は、AppA を発現させた大腸菌コロニーを用いてろ紙上で酵素反応、発色反応を行った後、コロニーと発色スポットの画像解析をすることで AppA 活性の著しく低い変異体を除いた。2 段階目では、1 段階目の選抜を通過した AppA 変異体を液体培養し、菌体破砕上清を用いた活性測定と、SDS-PAGE 解析から得られる AppA バンド強度による規格化を行うことで野生株 AppA より低温高活性化した AppA 変異体の取得を試みた。今回は、スクリーニングから得られた低温高活性化 AppA 変異体に関する結果を報告する。今後、取得した低温高活性化 AppA の詳細な特徴づけを行う予定である。

本研究で得られる低温高活性化 AppA の使用により、植物の生育促進に寄与することが期待される。

E.coli phytase, directed evolution, phytic acid

発表責任者：新井宗仁（arai@bio.c.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4E5a12
講演日時：3 月 27 日 11:21～ 1 号館 E5 会場

酵素による poly(ethylene terephthalate)分解反応を加速する手法の開発

Development of a method for accelerating the enzymatic degradation of poly(ethylene terephthalate)

○古川 洵、川上 了史、富沢 温、宮本 憲二 (慶大理工)
○Makoto FURUKAWA, Norifumi KAWAKAMI, Atsushi TOMIZAWA, Kenji MIYAMOTO (Faculty of Science and Technology, Keio Univ.)

【背景・目的】

Poly(ethylene terephthalate) (PET)のバイオリサイクルに向けて、我々のグループでは、PET 資化菌 *Ideonella sakaiensis* から、新規 PET 分解酵素(PETase)の同定に成功した[1)]。さらに最近では、本酵素の活性が微量の界面活性剤の添加によって 100 倍以上改善できる手法の開発にも成功している[2)]。ここで添加した界面活性剤は、反応の律速段階である、酵素-PET 間の相互作用を加速することで効率的な PET 分解をもたらす。しかし、本手法によって改善された活性であっても、最大の活性を示す Leaf branch compost cutinase (LCC)の約 20%程度であり、PETase の応用利用には未だ数多くの課題が残されている。

一方で、我々が構築した手法は、酵素そのものには手を加えず添加物によって活性を改善するため、既存酵素に対しても応用できる可能性がある。そこで本研究では、LCC および、耐熱性酵素である *Theremobifida fusca* cutinase (TfC)に対して様々な界面活性剤を添加し、活性が向上するか否かを検討し、同時にその活性向上メカニズムの解明を目的とする。

【結果】

まず、LCC、TfC の活性が界面活性剤の添加によって向上するか否かについて、界面活性剤存在下、40℃で PET 分解反応を行った。正に帯電している PETase(pI=9.4)の場合、アニオン性界面活性剤で大幅に活性が向上したことから、LCC、TfC に関しても電荷を考慮した界面活性剤を使用した。その結果、正に帯電している LCC (pI=9.1)はアニオン性界面活性剤によって 3.3 倍、負に帯電している TfC (pI=6.3)はカチオン性界面活性剤によって 43 倍活性が向上した。この結果は、界面活性剤によって、PET との相互作用が改善されたことを示している。そこで、PET 表面に吸着した酵素量を SDS-PAGE を用いて分析したところ、どちらの酵素も界面活性剤存在下で顕著に吸着酵素量の増加が見られた。

またそれぞれの酵素に関して、最適条件下で 48 時間反応を行ったところ、LCC は基質に用いた PET の重量を 90%以上、TfC は約 20%分解することが明らかになったので報告する。

参考文献: 1) Yoshida et al., *Science* 2016. 2) Furukawa et al., *ChemSusChem* 2018.

Hydrolase, Poly(ethylene terephthalate), Surfactant

講演番号：4E5a13
講演日時：3 月 27 日 11:32～ 1 号館 E5 会場

合理的変異導入法を用いるβ-シート構造中の不溶性発現に関与するアミノ酸残基の探索―ランダム変異との比較―

Screening of aggregation hot-spot in ß-sheet using rational or random mutagenesis

○篠田 優、浅野 泰久（富山県大・生工研セ）
○Suguru SHINODA, Yasuhisa ASANO (Toyama Pref. Univ.)

【目的】異種発現系を用いた組換えタンパク質の生産において、大腸菌は安価で生産性が高いことから有用な宿主である。しかし、発現したタンパク質が封入体を形成し、不溶化・不活性化することが大きな問題の一つである。これまでに当研究室では、大腸菌で不溶性発現するタンパク質に対して、不溶性発現に関与するアミノ酸残基（ホットスポット）を予測する 2 つの方法「α-helix rule」と「Hydropathy contradiction rule」を開発し、それらの有用性を示してきた[1]。α-helix rule は二次構造である α-ヘリックスの構造的特徴に着目し、効率良くホットスポットを予測できる方法であるが、α-ヘリックス以外の二次構造については検討されていない。そこで本研究では、二次構造の一つである β-シート構造に着目し、β-シート構造中のホットスポットの探索を試みた。
【方法・結果】本研究では β-シート構造に富み、大腸菌で不溶性発現するタンパク質である *Elizabethkingia meningoseptica* 由来 Peptide: *N*-glycosidase F（PNGase F）をモデルとし、合理的な変異導入により可溶性発現変異体のスクリーニングを行い、ランダム変異の結果と比較した。合理的変異導入については Hydropathy contradiction rule[1] を用いて β-シート構造中のホットスポットを予測し、部位特異的に変異を導入した遺伝子を大腸菌で発現させ、SDS-PAGE にて可溶性発現の評価を行った。ランダム変異導入ではエラープローン PCR を用いて変異導入遺伝子を作製し、大腸菌にて発現させ、可溶性発現したタンパク質をドットブロット法にて検出することでスクリーニングを行った。その結果、合理的変異より 1 種類（N17L）とランダム変異より 1 種類の可溶性発現量が向上した変異体を得ることができた。これらの変異体について酵素活性を評価したところ、N17L 変異体からは酵素活性が検出されたのに対し、ランダム変異より得られた変異体からは酵素活性が検出されなかった。次にシーケンス解析を行ったところ、ランダム変異より得られた変異体では 5 ヶ所のアミノ酸残基が置換されており、その内 N17I は合理的変異より得られた N17L 変異体と全く同じ位置に変異が導入されていた。ランダム変異より得られた変異体の不活性化は、集積した変異が原因であると考えられる。本研究では、合理的変異導入を用いたスクリーニングにより β-シート構造中のホットスポット（Asn17）を見出すことができ、ランダム変異によりその有効性を確認できた。この変異は親水性から疎水性アミノ酸への置換であることから、β-シート構造においても α-helix rule と同様にアミノ酸残基の親水性・疎水性が重要な因子であると考えられる。
【参考文献】1) D. Matsui and S. Nakano, *et al*., *Sci. Rep*., **7**, 9558-9569 (2017).

aggregation, ß-sheet, PNGase F

講演番号：4E5a14
講演日時：3 月 27 日 11:43～ 1 号館 E5 会場

Engineering by Proxy: Monobody-mediated alteration of enzyme specificity

○ Shunichi TANAKA[1,2,3], Tetsuya Takahashi[4], Akiko Koide[1,5,6], Riki Iwamoto[7], Hiroyoshi Matsumura[7], Takuya Yoshizawa[7], Kazufumi Takano[3], Satoshi Koikeda[4], Shohei Koide[1,5,8] ([1]Department of Biochemistry and Molecular Biology, The University of Chicago, Chicago, IL 60637, United States., [2]Ritsumeikan Global Innovation Research Organization, Ritsumeikan University, 1-1-1 Noji-higashi, Shiga 525-8577, Japan., [3]Department of Biomolecular Chemistry, Kyoto Prefectural University, Hangi-cho, Shimogamo, Sakyo-ku, Kyoto 606-8522, Japan., [4]Frontier Research Department, Gifu R&D Center, Amano Enzyme, Inc., Gifu 509-0106, Japan., [5]Perlmutter Cancer Center, New York University Langone Medical Center, New York, NY 10016, United States., [6]Department of Medicine, New York University School of Medicine, New York, NY 10016, United States., [7]Department of Biotechnology, College of Life Sciences, Ritsumeikan University, 1-1-1 Noji-higashi, Shiga 525-8577, Japan., [8]Department of Biochemistry and Molecular Pharmacology, New York University School of Medicine, New York, New York 10016, United States.)

Current standard approaches for engineering enzymes modify enzymes themselves. However, the approaches are often impeded by unavailability of a detailed understanding of the structure-function relationship or an appropriate high-throughput assay. We have recently developed a strategy that overcomes these current limitations. In this approach, catalytic properties of enzymes are precisely modulated with proxy molecules in the form of synthetic binding proteins, termed monobodies, directed to an unmodified enzyme [1][2]. We generate monobodies that bind in the close vicinity to the active site of an enzyme but do not inhibit the catalytic activity, through phage and yeast surface display technologies. This strategy enriches the type of monobodies that are likely to alter the substrate specificity of the targeted enzyme, enabling us to identify "modulator" monobodies by screening a small number of candidates. Using this strategy, we successfully altered substrate specificity of two enzymes with distinct active-site architecture. Our work provides a new paradigm for engineering enzymes and expands enzyme engineering technologies.

[1] Tanaka et al. (2015) Nature Chem. Biol. **11**, 762-764.
[2] Tanaka et al. (2018) ACS Chem. Biol. **13**, 1487-1492.

Enzyme engineering, Enzyme specificity, Synthetic binding protein

発表責任者：田中俊一（stanaka1@kpu.ac.jp）

講演番号：4E5a15
講演日時：3 月 27 日 11:54～ 1 号館 E5 会場

指向性進化による転写制御因子 XylS のリガンド認識能の改変
Alteration of Ligand-Specificity of XylS through Directed Evolution

○小川 友希[1]、勝山 陽平[1,2]、大西 康夫[1,2] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]東大微生物イノベ連携機構)
○Yuki OGAWA[1], Yohei KATSUYAMA[1,2], Yasuo OHNISHI[1,2] ([1]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM)

【背景・目的】バイオセンサーは生体内の分子認識機構を利用して対象物を検出するセンサーであり、環境中や生体内の化合物量を簡便に測定できる有用なツールである。しかし、天然のバイオセンサーが目的の化合物を認識するとは限らず、リガンド認識能を改変し目的化合物を認識するバイオセンサーを開発する必要がある。本研究では指向性進化を利用して *Pseudomonas putida* 由来の転写制御因子 XylS が、本来のリガンドである *m*-トルイル酸 (*m*-TA) ではなく *p*-トルイル酸 (*p*-TA) を特異的に認識するように改変することを目指した。野生型 XylS は *m*-TA と複合体を形成し Pm プロモーター (P_{Pm}) 下流遺伝子の転写を促進する。これまで発表者らは P_{pm} の下流に ampicillin (Amp) 耐性遺伝子と TetR 遺伝子を持つとともに、TetR で抑制されるプロモーターの下流に chloramphenicol (Cm) 耐性遺伝子を持つプラスミド (pUKN009) を利用し、XylS リガンド存在下における Amp 耐性と非存在下における Cm 耐性を利用した選抜を繰り返すことで、偽陽性を排除しつつ目的リガンドを認識する変異 XylS を Error prone PCR により構築したライブラリーから選抜する手法を開発し、*m*-TA 認識能と同程度の *p*-TA 認識能を保持する変異 XylS の取得に成功した。[1]この変異 XylS には 5 種類のアミノ酸置換変異 (N7S, T74A, K83E, I205V, N227D) が導入されていた。[1]

【方法・結果】上記 5 種類のアミノ酸置換変異と *p*-TA 認識能の関連を調べるため、点変異を導入した XylS を作製し、P_{Pm} 下流に mCherry 遺伝子を配置したプラスミドとともに大腸菌に導入した。この大腸菌を種々のリガンド濃度で培養し、細胞の蛍光強度によりリガンド認識能を評価した。N7S, T74A, I205V の各変異 XylS は微弱な *p*-TA 認識能を示したが、XylS_N7S はリガンドなしでもある程度の転写を誘導した（高基底発現型）。さらに N7S, T74A, I205V を組み合わせた二重変異体と三重変異体を作製しリガンド認識能を評価した。その結果、XylS_T74A_I205V の *m*-TA と *p*-TA に対する認識能は同程度であったが、その他の変異 XylS は高基底発現型であり、*p*-TA よりも *m*-TA に対する認識能が高かった。次に *p*-TA 認識能への関与を示した 3 ヶ所 (7, 74, 205) に同時に飽和変異を導入したライブラリーから上記の手法を用いた選抜を 3 回繰り返した結果、3 種類の変異 XylS が濃縮された。そのうち XylS_N7R_T74P_I205S は野生型 XylS の *m*-TA 認識能の約 70%の *p*-TA 認識能と約 10%の *m*-TA 認識能を示し、目的の特異性により近づいたリガンド認識能を獲得していた。今後、この改変 XylS に更にランダム変異を導入し、野生型 XylS の *m*-TA 認識能と同程度の *p*-TA 認識能を持つように改変する計画である。

[1] 小川ら, 2017 年度日本農芸化学会 (京都), 2J30p10, 2017 年 3 月

directed evolution, XylS

講演番号：4E7a01
講演日時：3 月 27 日 09:00～ 1 号館 E7 会場

プロヘキサジオンによるイネ除草剤抵抗性付与酵素 HIS1 の活性阻害

Inhibitory effect of prohexadione on HIS1, which confers herbicide resistance to rice

○高村 夏生、戸澤 譲（埼玉大院理工）
○NATSUKI TAKAMURA, YUZURU TOZAWA (Saitama Univ.)

【目的】 日本型イネより発見された *HIS1* は、植物の酵素 4HPPD 阻害剤であるベンゾビシクロン(BBC)等の種々のトリケトン系除草剤に対する抵抗性付与遺伝子であり、新規の二価鉄イオン/2-オキソグルタル酸(2OG)依存性ジオキシゲナーゼをコードしている。これまでに、HIS1 タンパク質の三次元構造予測と HIS1 ホモログのイネ HSL1 の HIS1 型変異導入解析によって、HIS1 のトリケトン系除草剤に対する基本的な酵素活性機能を明らかにしてきた。また、シロイヌナズナの *HIS1* 過剰発現株が複数の除草剤に対して抵抗性を付与する一方で、イネ *HSL1* 過剰発現株が一部の除草剤にしか抵抗性を付与せず、*HIS1* 型変異を加えると *HIS1* 同様に多剤抵抗性となる等、新規の育種開発において非常に有用な結果を示してきた。本研究では、HIS1 の酵素活性機能の解明に向け阻害剤の探索を行った。
【材料及び方法】 Prohexadione は活性化ジベレリン生合成酵素 GA3ox をはじめとする種々の二価鉄イオン/2OG 依存性ジオキシゲナーゼの阻害剤であり、植物成長調整剤として広く利用されている。Prohexadione が HIS1 に対しても阻害剤として機能するか検証するため、コムギ胚芽試験管内翻訳系を用いて HIS1 タンパク質を調整し、BBC の活性本体である加水分解体(BBC-OH)を基質とした酵素反応液に Prohexadione を添加して酵素活性解析を行った。代謝物の解析には高速液体クロマトグラフィーを用い、基質修飾率は残存基質ピーク面積から算出した。
【結果及び考察】 酵素活性解析から、Prohexadione 添加濃度依存的に BBC-OH の酸化修飾率が低下することを確認し、Prohexadione が HIS1 タンパク質の阻害剤としても機能することを明らかにした。

シロイヌナズナ *HIS1* 過剰発現株は BBC の他 4 種のトリケトン系除草剤に抵抗性を示す。現在、今回発見した HIS1 酵素阻害剤の添加条件下における各種除草剤への抵抗性に関する調査を進めている。

rice, Fe2+/2OG dipendent dioxygenase, prohexadione

講演番号：4E7a02
講演日時：3 月 27 日 09:11～ 1 号館 E7 会場

イネ除草剤抵抗性遺伝子 *HIS1* およびその相同遺伝子の系統解析

Phylogenetic analysis of herbicide resistance gene, *HIS1* , and its related genes

○佐久間 望[1]、吉田 均[2]、戸澤 譲[1,3] ([1]埼玉大理分子生物、[2]農研機構・生物機能部門、[3]埼玉大院理工)
○Nozomi SAKUMA[1], Hitoshi YOSHIDA[2], Yuzuru TOZAWA[1,3] ([1]Saitama Univ., [2]NARO NIAS, [3]Grad.sch,Saitama Univ.)

【目的】　これまでの研究で、4-HPPD 阻害型除草剤に耐性を持つ日本型イネから、Fe(Ⅱ)/2-OG 依存型オキシゲナーゼをコードする *HIS1* 遺伝子が見出された。また、ゲノム情報解析により、イネ科植物に複数の *HIS1* 相同遺伝子 *HIS1*-like(*HSL*)の保存が確認された。*HIS1* とその関連遺伝子の発生の系譜や、遺伝子が保存されている意義を明らかにするために、本研究では系統学的な解析を行った。
【材料及び方法】 ゲノムデータベース Ensembl Plants や BLAST 検索により *HSL* 遺伝子の塩基配列を入手した。CLC workbench で *HSL* 遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列解析を行い、HIS1 タンパク質と植物に保存される HSL タンパク質を比較する系統樹を数種類作成した。また、野生のイネ属のゲノムや、栽培品種としてのジャポニカ米やインディカ米のゲノムを解析し、*HIS1*、*HSL* 遺伝子の保存様式を調査した。
【結果及び考察】　系統樹解析により、*HSL* 遺伝子はイネ科単子葉類のみならず双子葉類にも保存されていることを明らかにした。また、イネ科 HSL タンパク質群は HIS1 タンパク質との相同性が高い順に HSL1～HSL6 のグループに分けることができ、イネ以外のコムギ、オオムギ、トウモロコシ、ソルガムなどといった主要穀物がイネと類似する複数の *HSL* 遺伝子グループを保存していることを確認した。
HIS1 および *HSL* 遺伝子を持つ日本晴ゲノムを解析したところ、*HIS1* 遺伝子は第 2 染色体上に、*HSL* 遺伝子群は第 6 染色体上にそれぞれ座乗しており、特に *HSL* クラスターは第 6 染色体上で重複していることを明らかにした。しかし、同じジャポニカ米の古い系統である神力と愛国、インディカ米のカサラスにはこの重複は見られなかった。
野生のイネ属と、イネ属に近縁種のアシカキ近縁種のゲノム解析では、ほとんどの野生のイネ属には *HIS1* と *HSL1* の両方が保存され、アシカキには *HSL1* のみが保存されていることがわかった。
これらの結果は、HSL1 は植物に普遍的に存在する Fe(Ⅱ)/2-OG 依存型オキシゲナーゼファミリーのタンパク質の 1 つとして、重要な生物学的機能を持つこと、さらに、*HIS1* 遺伝子はイネ属での種分化が進むうちに *HSL1* の duplication により獲得されたもので、育つ環境により保存が進んだことを示唆している。大会では、RT-PCR により得られた遺伝子発現解析の結果についても合わせて紹介する予定である。

rice, Fe(II)/2OG-dependent oxygenase, phylogenetic analysis

講演番号：4E7a03
講演日時：3 月 27 日 09:22～ 1 号館 E7 会場

イネ種子発芽期における貯蔵タンパク質分解機構の解析

Analysis of storage protein degradation mechanism during rice seed germination

○栗田 辰乃佑[1]、山口 雅祥[1]、沼本 穂[1]、森田 重人[1,2]、増村 威宏[1,2] ([1]京都府立大学・生命環境、[2]京都府農技セ・生資セ)
○Shinnosuke KURITA[1], Masayoshi YAMAGUCHI[1], Minori NUMAMOTO[1], Shigeto MORITA[1,2], Takehiro MASUMURA[1,2] ([1]Kyoto Pref. Univ. Life Env.Sci., [2]Kyoto Prefect. Agri. Forest. Fish. Technol.Cent., Biotechnol. Res. Dept.)

【研究背景と目的】

植物種子は，発芽時の栄養源としてデンプンや貯蔵タンパク質を蓄積している．発芽時における貯蔵物質分解についてはオオムギを材料とした研究結果より， 種子外周部から分解されるモデルが提唱されている．しかし，当研究室のこれまでの形態学的解析により，イネ種子の主要な貯蔵物質の分解は胚周辺部から起こることが明らかにされている．イネ種子貯蔵タンパク質はプロテインボディ(PB)と呼ばれる細胞内小器官に蓄積されている． その内， プロラミンは小胞体由来の PB-I に層状に蓄積しており， グルテリンおよびグロブリンは液胞由来の PB-II に蓄積している． PB-Ⅰはヒトの消化管で難消化性を示すが， イネ発芽期には分解されることが明らかにされている． しかし PB-Ⅰと PB-II の生理学的役割は不明な点が多い．そこで本研究では，発芽期における PB-I（プロラミン）の機能を明らかにすることを目的とした.

【材料・方法と結果】

イネ（*Oryza sativa*）栽培品種日本晴を材料とし，吸水後無栄養の寒天培地で生育した．吸水後 13 日目までの発芽種子を回収し試料とした.

その発芽種子の組織切片を蛍光標識したプロラミン抗体およびグルテリン抗体を用いた顕微鏡観察を行った． 貯蔵タンパク質の分解は胚周辺部から起こり， 吸水後 13 日目では蛍光シグナルは観察されなかった． またグルテリンはプロラミンより先に切片上の蛍光シグナルが消失していた． プロラミンおよびグルテリンのより詳細な分解時期を明らかにするため， SDS-PAGE を用いて発芽時における貯蔵タンパク質の定量的解析を行った．その結果，プロラミンは吸水 5 日目から 7 日目の間に分解が進み，グルテリンは吸水 3 日目から 5 日目の間に分解が進んだ．発芽種子をウエスタンブロット法で解析した結果，PB-I に蓄積しているプロラミン分子種のうち 13b プロラミンは分解が緩やかだった． 一方， 10kDa プロラミンは急速に分解した． また， PB-II に蓄積しているグルテリンβ-サブユニットは発芽後期においても残留した． 以上の結果から， 発芽期において PB-I と PB-II には分解時期に差があり，難消化性の PB-I も何らかの生理的役割を担うことが示唆された.

prolamin, degradation, germination

発表責任者：増村威宏（masumura@kpu.ac.jp）

講演番号：4E7a04
講演日時：3 月 27 日 09:33～ 1 号館 E7 会場

小麦種子貯蔵タンパク質α-グリアジンと高分子量グルテニンは異なる蓄積挙動を示す
α-Gliadin and high molecular weight glutenin, wheat seed storage proteins, show different accumulation behavior

○松岡 祐樹[1]、前田 紘夢[1]、奥田 英子[1]、奥田 綾[1]、山田 哲也[2]、丸山 伸之[1]([1]京大院 農学研究科、[2]北大院 農学研究院)
○Yuki MATSUOKA[1], Hiromu MAEDA[1], EIKO OKUDA[1], Aya OKUDA[1], Tetsuya YAMADA[2], Nobuyuki MARUYAMA[1] ([1]Kyoto Univ. Graduate School of Agriculture, [2]Hokkaido Univ. Research Faculty of Agriculture)

【目的】小麦種子貯蔵タンパク質であるグリアジンとグルテニンは特徴的な構造を有する難溶性タンパク質であり、それぞれ特有の食品物性を示す。これらのタンパク質は小麦において多くの分子種によって構成されるため、細胞内輸送の詳細な解析がこれまで困難であった。これを解決するため、本研究では種子において小麦種子貯蔵タンパク質（α-グリアジンおよび高分子量グルテニン）を発現させた大豆形質転換体を作製し、これらの蓄積挙動について解析を行った。昨年度の本大会では大豆種子においてα-グリアジンおよび高分子量グルテニンの発現が確認されたこと、これらのタンパク質は大豆種子中で異なる蓄積挙動を示すことを報告した。本大会では組換え大豆種子の細胞分画を行った結果について、TEM での観察結果との比較を交えて報告する。
【方法】作製した小麦種子貯蔵タンパク質を発現する大豆形質転換体について、1）形質転換体種子を固定、樹脂包埋し、免疫電子顕微鏡法によってα-グリアジンおよび高分子量グルテニンの局在を解析した。2）形質転換体種子を液体窒素により凍結破砕して緩衝液に懸濁し、スクロース密度勾配遠心法によって種子破砕液の細胞分画を行った。分画されたフラクションについて小麦種子貯蔵タンパク質および細胞小器官特異的なタンパク質に対するウェスタンブロット分析を行った。
【結果】免疫電顕の結果、α-グリアジンは貯蔵液胞に蓄積するのに対し、高分子量グルテニンは細胞質中の新規オルガネラ(プロテインボディ)に蓄積することが示された。細胞分画のフラクションに対するウェスタンブロット分析では、α-グリアジンは貯蔵液胞と同じフラクションにおいて推定分子量である約 33 kDa 付近からそれよりも低分子量の位置にかけて複数のバンドが検出され、部分的に分解された状態での蓄積が示された。一方、高分子量グルテニンは、より高密度のフラクションにおいて約 71 kDa 付近に単一のバンドとして検出された。また、分画操作を繰り返すことで高分子量グルテニンの画分と大豆の種子貯蔵タンパク質である成熟型 11S グロブリンの画分が分離可能であることをウェスタンブロットによって確認することができた。これらの結果は大豆種子において α-グリアジンと高分子量グルテニンがそれぞれ貯蔵液胞とプロテインボディという異なる細胞小器官に蓄積することを示している。

・本研究において京都大学生存圏研究所・生態学研究センターDASH システムを利用した。

wheat seed storage protein, transgenic soybean, subcellular localization

講演番号：4E7a05
講演日時：3 月 27 日 09:44～ 1 号館 E7 会場

NADPH 依存的グルタチオン還元活性を持つダイズ PDI ファミリータンパク質の解析
Analysis of soybean protein disulfide isomerase family proteins which have NADPH-dependent glutathione reductase activity

○奥田 綾[1]、増田 太郎[1]、裏出 令子[2]([1]京大院農・農学、[2]京大・複合研)
○Aya OKUDA[1], Taro MASUDA[1], Reiko URADE[2] ([1]Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ., [2]Inst. for Integrated Radiation and Nuclear Sci., Kyoto Univ.)

【目的】真核細胞の小胞体で合成されるタンパク質の大部分は、ジスルフィド結合の形成を伴う酸化的フォールディングを受ける。そのため小胞体内腔はタンパク質の酸化的フォールディングに適したレドックス環境である必要があり、レドックスバッファーであるグルタチオンの還元型(GSH)と酸化型 (GSSG)の比率が重要であると考えられている。また小胞体における主なタンパク質の酸化的フォールディング酵素として Protein Disulfide Isomerase(PDI)ファミリータンパク質が知られており、我々はダイズの PDI ファミリーを 9 種類同定してきた。PDI ファミリータンパク質の活性中心の 2 つのシステイン残基がジスルフィド結合を形成している酸化型が基質に一過的なジスルフィド結合を形成するが、形成されたジスルフィド結合を正しく架け替えて基質タンパク質をフォールディングするためには活性中心が還元型でなければならない。酸化型の PDI が過剰な環境では基質のフォールディングが阻害されてしまうため、小胞体内では GSH が PDI の活性中心を還元し、GSSG が産生されると考えられている。そのため小胞体内での GSH レベルを適切に維持する機構として細胞質から小胞体内へと GSH が輸送されるルートと、小胞体内で GSSG の還元が起こる 2 つのルートが存在する可能性が考えられる。前者のルートについては最近明らかになったが、後者を担う小胞体局在性のグルタチオン還元酵素はいまだ見出されていない。そこで我々は小胞体内在グルタチオン還元酵素の探索を目的とし、ダイズの PDI ファミリータンパク質についてグルタチオン還元活性の検討を行った。
【方法･結果】酸化的フォールディングに関わる 7 種類のダイズ PDI ファミリータンパク質(GmPDIL-1, GmPDIL-2, GmPDIM, GmPDIS-1, GmPDIS-2, GmPDIL6, GmPDIL7)について、グルタチオン還元活性を NADPH 存在下で測定した。活性は NADPH の吸光度の減少および DTNB によるチオール基の定量により測定した。その結果、ダイズ PDI ファミリータンパク質にグルタチオン還元活性を持つものが存在することが明らかとなった。また、活性が NADPH に依存するかを調べる為に様々な還元当量となる化合物の存在下で活性を測定した。活性は NADPH 存在下のみで見られ、非存在下やアスコルビン酸、NADH 存在下では検出されなかった。また、グルタチオン還元活性が活性中心のシステイン残基を介した反応かどうかを調べる為に、PDI ファミリータンパク質の活性中心 CxxC のシステイン残基をアラニンに置換したところ、グルタチオン還元活性が失われた。以上よりダイズ PDI ファミリーの一部が活性中心のシステイン残基を介して NADPH 依存的にグルタチオンを還元する活性を持つことが明らかとなり、小胞体のレドックス環境の制御に寄与するグルタチオン還元酵素として働き得ることが示唆された。

protein disulfide isomerase, glutathione reductase, redox regulation

講演番号：4E7a06
講演日時：3 月 27 日 10:05～ 1 号館 E7 会場

塩ストレス条件下で発芽させた大豆のニコチアナミン合成酵素に関する研究

Study on Nicotianamine synthase in germinating soybean seeds under salt stress

○佐々木 瞳、金内 誠、松本 菜月、レーティゴック ラン（宮城大 食産業）
○Hitomi SASAKI, Makoto KANAUCHI, Natsuki MATSUMOTO, Lan LE THI NGOC (Miyagi Univ.)

【背景・目的】近年、大豆タンパク質によるヒトの脂質代謝改善効果やイソフラボンによる抗酸化作用など、大豆の機能性物質について研究が進んでいる。大豆中にはなかでも血圧上昇抑制効果を持つペプチドや関連物質が存在し、機能性食品などに応用されている。それら血圧上昇抑制物質の 1 つに、ニコチアナミンがあげられる。ニコチアナミンは、植物中でメチオニンから S-アデノシルメチオニンを経て合成される窒素化合物の一種で、キレート作用やアンジオテンシン変換酵素阻害活性を持つことが知られている。このようなニコチアナミンの発芽大豆中の血圧上昇抑制効果については多数報告される。一方、大豆中のニコチアナミンの生成メカニズムや生成酵素の詳細な検討、高生産条件検討に至るものは少ない。その要因の 1 つに、LC-MS/MS や HPLC、放射性同位体を用いた方法が一般で、容易に測定できないことが考えられる。

そこで本研究は、マイクロプレートを用いた比色法による簡便な測定方法を確立し、発芽大豆中のニコチアナミン生成について検討する。これにより、ニコチアナミン合成酵素の酵素学的特性について明らかとする。

【実験方法】試料大豆は国産大豆トヨマサリを用いた。0～10%食塩水に 8 時間浸漬し、水切り後に 16 時間放置した(エアーレスト)。再度 0～10%食塩水に 24 時間浸漬したものを発芽大豆とした。発芽大豆をミキサーで粉砕して粗酵素液を抽出し、サンプル溶液とした。サンプル溶液にメチオニンと ATP を添加し 37℃で反応させ、合成酵素の活性を測定した。比色法による S-アデノシルメチオニン合成酵素(SAMS)活性測定は、ATP をマイクロプレートで吸光度測定し、その減少量をもって酵素活性を算出した。ニコチアナミン合成酵素(NAS)活性は、ニコチアナミンによりキレートされる Fe または Ca イオンをマイクロプレートで吸光度測定し、その減少量をもって酵素活性を算出した。

【結果及び考察】1U の SAMS 活性は、1 分間に S-アデノシルメチオニン(SAM)生成時の反応によって減少した ATP の mM とした。生成した SAM は、ATP 量を測定することで、モニターが可能であった。発芽大豆の SAMS 活性を塩濃度 0~10%で検討した結果、塩濃度 5%で発芽させたものが最も活性が高かった。一方、ニコチアナミン合成酵素(NAS)については、ニコチアナミンの持つキレート作用を利用し、遊離金属の濃度によるマイクロプレート比色法を用いた測定方法の検討を行った。1U の NAS は、1 分間に生成するニコチアナミンの mM とした。その結果、ニコチアナミンと Fe あるいは Ca イオンの量には相関があり、酵素活性測定が可能であると考えられた。

nicotianamine thynthase, germinating soybean, colorimetric method

講演番号：4E7a07
講演日時：3 月 27 日 10:16～ 1 号館 E7 会場

タマネギ由来フルクトオリゴ糖分解酵素の組換タンパク質の性質
Some properties of recombinant fructan exohydrolase from onion
○上野 敬司[1]、相田 裕貴[1]、奥 聡史[2]、志村 華子[2]、前田 智雄[3]、実山 豊[2]、鈴木 卓[2]、小野寺 秀一[1]([1]酪農学園大 農食環境学群、[2]北大院 農、[3]弘前大 農学生命科学部)
○keiji UENO[1], Yuki AITA[1], Satoshi OKU[2], Hanako SHIMURA[2], Tomoo MAEDA[3], Yutaka JITSUYAMA[2], Takashi SUZUKI[2], Shuichi ONODERA[1] ([1]Rakuno Gakuen University, [2]Hokkaido University, [3]Hirosaki University)

【目的】タマネギ(*Allium cepa* L.)は鱗茎肥大に伴いフルクトオリゴ糖を蓄積し、品種間で顕著な差があることが知られている(Maeda et al, 2017)。この品種間差のある 2 品種（北もみじ 2000, ポールスター）について、生育期間(4-8 月)中のフルクトオリゴ糖含量やその代謝関連酵素活性の経時的な変動を調査したところ、鱗茎が肥大する時期にフルクトオリゴ糖含量に差異が認められた（Oku et al, 投稿中)。この理由の一つとしてフルクトオリゴ糖加水分解酵素(FEH)の差異が影響していると想定される。最近、我々はタマネギ鱗茎から FEH を探索し、得られた部分精製酵素の諸性質を調べた（日本応用糖質科学会 2018 年度大会)。また FEH 候補遺伝子についてタバコプロトプラスト発現系で組み換えタンパク質の評価を行った（園芸学会 2018 年度秋季大会)。本研究では、この FEH 候補遺伝子の *Pichia pastoris* 発現系を構築し、その組み換えタンパク質の詳細な酵素的性質を調べることを目的とした。
【方法】タマネギの FEH 候補遺伝子を In-Fusion クローニングにより *Pichia pastoris* 発現用ベクター pPICZαB に挿入し、発現ベクターを構築した。このベクターを用いて、*P. pastoris* を形質転換したのち、形質転換体から組み換えタンパク質を生産し、各種のフルクトオリゴ糖分解活性を調べた。終濃度 10 mM の各種フルクトオリゴ糖を基質として用い、pH 5.0、30℃、30 分間湯浴し、生成したフルクトースを HPAEC で定量して分解活性を算出した。酵素活性の単位は、1 分間に 1 μmol のフルクトースを生成する酵素量を 1 unit とした。
【結果】*P. pastoris* で生産した組み換えタンパク質粗酵素液は、スクロースに作用せず、β–2, 1 結合を有するフルクトオリゴ糖の三糖類である 1-ケストースをよく加水分解する fructan 1-exohydrolase（1-FEH）活性を示し、タバコプロトプラスト発現系で生産した組み換えタンパク質と同様であった。またニストース、フルクトシルニストース、イヌリンにも作用する他、スクロースのグルコースにフルクトースがβ–2,6 結合したネオケストースにも作用した。ネオケストースは 1-FEH では分解されない基質であるため、この FEH 候補遺伝子は既知の FEH の基質特異性と異なる新しいタイプの FEH をコードすると考えられた。また、この基質特異性はタマネギ部分精製酵素で得られたものとも類似していることに加え、タマネギ部分精製酵素の内部アミノ酸配列情報と FEH 候補遺伝子の推定アミノ酸配列が一致しており、この FEH 候補遺伝子の翻訳産物がタマネギのフルクトオリゴ糖分解に関与していることが示唆された。

Onion, Fructan, Fructan exohydrolase

発表責任者：上野敬司（ueno-k@rakuno.ac.jp）

講演番号：4E7a08
講演日時：3 月 27 日 10:27～ 1 号館 E7 会場

ピタヤにおけるβ-ガラクトシダーゼアイソザイムの解析

The analysis of β-Galactosidase isoform in *Hylocereus undatus*

○川村 昂史、野村 啓一 (神戸大農)
○Takashi KAWAMURA, Keiichi NOMURA (Kobe Univ. of Agric)

【背景と目的】ピタヤ（*Hylocereus undatus*）はサボテン科に属する亜熱帯果樹である．ピタヤを含めサボテン科植物は経済栽培種が極めて少ないこともあり，その生育特性，年間生理に関する知見は乏しい．ピタヤは葉状枝にアラビノース，ガラクトースを主成分とする粘性多糖を含んでいることから，ピタヤの生育特性を知るうえでは，この粘性多糖の代謝機構解明が重要である．本研究ではこの粘性多糖の代謝に関与していると考えられるβ-ガラクトシダーゼに着目し，その機能解析を目的とした．

【方法と結果】ピタヤ葉状枝より mRNA を抽出し，β-ガラクトシダーゼの保存性の高い領域を基に縮重プライマーを作成して RT-PCR を行い，配列を解析した．さらにその配列を基に 5'Race，3'Race を行い，cDNA の全長配列を明らかにした．RT-PCR の結果ピタヤには少なくとも 7 つのアイソザイムが発現していることが明らかとなった．得られた配列を基に分子系統樹を作成したところ，特に HubGal1,6 は果実初期に発現するグループ，HubGal3,5,7 はペクチン分解に関わるとされるグループに分けられた．特に HubGal7 はガラクトース結合性レクチン様ドメインを欠損しているほか，トマトの TBG4 と近縁であった．また各月ごとの葉状枝やピタヤ果実等からも mRNA を抽出し，時期ごとのアイソザイムの発現を解析した．葉状枝においては複数のアイソザイムが季節を問わず発現していたが，特に 6 月においては各アイソザイムが同時に発現していた．また HubGal5 は 6 月において多く発現したが，他の月ではほぼ発現が認められなかった．

【考察】高等植物においてβ-ガラクトシダーゼは GH35 に属し，基質非還元性末端からのガラクトシル残基加水分解を触媒する酵素であり，一般にマルチジーンファミリーとして存在している．また植物のβ-ガラクトシダーゼはガラクトース結合性レクチン様ドメインを C 末端側に持つものと持たないものに分けられ，その中でも TBG4 はトマト果実の軟化に深く関係している．今回の結果から，HubGal7 は果実でも発現が認められたため，これはピタヤ果実における多糖代謝に特に関わっていると考えられる．HubGal3,5 は配列が似通っているものの月ごとの葉状枝での発現はかなり異なっており，HubGal5 は 3 に比べて葉状枝において限定的な役割を担っていると考えられる．また，月ごとのアイソザイムの発現が異なっていたのは，葉状枝多糖が年間を通じて構造が変化していることを示唆している．

β-galactosidase, Gene expresssion, *Hylocereus undatus*

講演番号：4E7a09
講演日時：3 月 27 日 10:38～ 1 号館 E7 会場

構造解析及び MD シミュレーションにより明らかとなった植物ホルモン代謝システム
The activation mechanism of phytohormone metabolic enzyme, revealed by structural analysis and MD simulation.
○竹原 清日 [1]、三上 文三 [2]、桜庭 俊 [3]、松岡 信 [1]、上口（田中） 美弥子 [1] ([1]名大・生物機能セ、[2]京大院・農、[3]量研)
○Sayaka TAKEHARA[1], Bunzo MIKAMI[2], Shun SAKURABA[3], Makoto MATSUOKA[1], Miyako UEGUCHI (TANAKA)[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Kyoto Univ., [3]QST)

【目的】植物ホルモンのひとつであるジベレリン (GA) は、草丈の伸長促進や発芽促進、花芽形成促進などさまざまな生理作用をもつ。 ジベレリン生合成経路の後半段階においては GA20-oxidase (GA20ox) および GA3-oxidase (GA3ox) が、代謝経路では GA2-oxidase (GA2ox) が働いており、いずれも 2-オキソグルタル酸要求性酸化酵素に属する酵素である。 我々は、これら酵素の構造解析に取り組み、イネの GA 不活化酵素である GA2ox3 の構造を明らかにした。 その全体構造は、S−S 結合で結合したダイマー同士が相互作用した 4 量体を形成しており、基質である GA_4 が活性中心以外にもダイマー分子の間に結合して 4 量体を形成していることが明らかとなった。 そこで本研究は、植物ホルモン不活化酵素における多量体構造形成と酵素活性との関係を調べるとともに、その代謝メカニズムを明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】GA2ox3 の溶液中での分子状態を調べるため、多量体形成に必要と考えられる GA_4 存在下でゲル濾過を行った。その結果、溶液中でも 4 量体構造をとることが明らかとなった。 さらに、植物細胞内における多量体形成能および細胞内での局在場所を調べるため、イネのプロトプラストを用いた BiFC 解析を行った結果、*in vitro* と同様に *in planta* でも多量体構造をとっており、その多量体形成は細胞質で行われることも分かった。 また、ゲルろ過で 4 量体および単量体の単離にも成功し、得られた各分子の酵素活性を調べたところ、GA_4 を介した 4 量体は単量体に比べ酵素反応速度がはるかに速いことが分かった。 以上の結果から、GA2ox3 は GA_4 濃度に依存して多量体構造を形成し、それに伴い GA 代謝を促進するといった、タンパク質レベルでの調節も行うことが示唆された。 さらに、オーキシンの不活化酵素である DAO にも同様な基質依存的な構造変化及び活性の上昇が見られたことから、植物にはホルモン量を調整する共通のシステムが存在することが示唆された。
また、これら不活化酵素の活性機構ついて検討するため、分子動力学 (MD) シミュレーションによる蛋白質のダイナミクスを解析し代謝メカニズムを検討したので合わせて報告する。
本研究は、新学術領域研究により助成された。

gibberellin, plant hormone, dioxygenase

講演番号：4E7a10
講演日時：3 月 27 日 10:49～ 1 号館 E7 会場

GA 合成・代謝酵素と阻害剤との共結晶化の試み
Co-crystallization of GA synthetic / metabolic enzymes with their inhibitor
○尾原 寛之[1]、竹原 清日[1,2]、三上 文三[2]、松岡 信[1]、上口（田中） 美弥子[1] ([1]名大・生物機能セ、[2]京大院・農)
○Hiroyuki OBARA[1], Sayaka TAKEHARA[1,2], Bunzo MIKAMI[2], Makoto MATSUOKA[1], Miyako UEGUCHI(TANAKA)[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Kyoto Univ.)

【目的】
植物ホルモンのひとつであるジベレリン（GA）は、草丈の伸長促進や発芽促進、花芽形成促進など農業的に重要な様々な生理作用を持つ。プロヘキサジオンは、GA 生合成酵素である GA3-oxidase（GA3ox）を阻害することが知られており、イネや小麦、大麦において倒伏軽減剤として世界的に広く利用されている。一方で、プロヘキサジオンは、イネにおいて GA 代謝酵素である GA2-oxdase（GA2ox）も阻害することを我々は報告しており、補基質である 2-オキソグルタル酸（2OG）と拮抗的に働くことが示唆された（2013 年度大会）。しかし、その詳細な作用機構は未だ明らかになっていない。そこで本研究では、イネのこれらの酵素について、GA3ox2-プロヘキサジオン、GA2ox3-プロヘキサジオン共結晶の X 線結晶構造解析を行うことで、プロヘキサジオンの作用機構を解明し、より特異性を上げた阻害剤の開発を行うことを目的とする。

【方法・結果】
両酵素は共に大腸菌系で発現させた。GA2ox3 については、GST タグによるアフィニティ精製をした後、タグを切断して陰イオン交換クロマトグラフィを行い、単一に精製した。得られた精製タンパク質を基質である GA_4 と阻害剤プロヘキサジオンの存在下で結晶化させたところ、0.2M 硫酸アンモニウム、12% PEG8000 の条件下において立方状の結晶が得られた。SPring-8 にて、分解能 3.26Å の X 線回析データを得ており、現在このデータを基に精密化を行っている。精密化の途中ではあるが、2OG の位置にプロヘキサジオンが結合していることが確認されており、これは以前報告した酵素活性の結果と一致している。GA3ox2 についても同様に、GST タグでアフィニティ精製した後、タグを切断してゲルろ過クロマトグラフィを行い、GA3ox2 の単一化を試みた。しかし、翻訳が途中で止まっている不完全長のタンパク質が精製物に含まれており、結晶を得ることが出来なかった。そこで、新たに C 末端側に His タグを付けたコンストラクトを作成し、GST タグに加えて His タグでもアフィニティ精製を行い、全長翻訳されたタンパク質のみを精製することを試みた。現在、結晶化の初期条件を探索中であるので併せて報告する。
本研究の一部は、新学術領域研究により助成された。

gibberellin, phytohormone, dioxygenase

講演番号：4E7a11
講演日時：3 月 27 日 11:10～ 1 号館 E7 会場

植物ホルモン関連因子の結晶構造解析に向けた試み
Attempts to analyze the crystal structure of phytohormone related factors
○杉原 諒彦、竹原 清日、松岡 信、上口（田中） 美弥子（名大・生物機能セ）
○ Akihiko SUGIHARA, Sayaka TAKEHARA, Makoto MATSUOKA, Miyako UEGUCHI(TANAKA) (Nagoya Univ. Bioscience and Biotechnology Center)

【目的・背景】
ジベレリン（GA）は伸長や発芽、種子形成など多くの生理作用に関与している植物ホルモンである。GA のシグナル伝達において中心的に働く因子が DELLA タンパク質である。DELLA は GA 反応の抑制因子として知られ、C 末側に GRAS ドメインを、N 末側に DELLA および TVHYNP モチーフを持つ GRAS ファミリーに属するタンパク質である。細胞内で GA が受容体 GID1 と結合すると、GA-GID1 複合体は DELLA と結合できるようになり、DELLA の分解と GA 応答を引き起こす。一方、DELLA は、コアクティベーターとして、GA 合成酵素遺伝子等の転写を活性化して、それらのフィードバック制御にも関わることを最近我々は明らかにしている。この転写活性化には、C2H2 型 zinc finger をもつ IDD ファミリーが転写因子として関わり、IDD の C 末端領域が DELLA の GRAS ドメインと結合していた。近年、別の GRAS ファミリータンパク質である SHORT-ROOT(SHR)と IDD の共結晶が報告され、IDD の N 末側と SHR が結合することが明らかになった。しかしながら、DELLA タンパク質とは IDD の結合部位が異なるため結合様式や機能に違いがあると考えられた。そこで、本研究では X 線結晶構造解析により、イネの DELLA タンパク質である SLR1 と IDD との分子機構や結合様式を明らかにすることで、GA による転写調節機構をより理解することを目的とした。
【方法・結果】
SLR1 の GRAS ドメインと IDD はそれぞれ大腸菌系で発現させた。IDD は不安定な領域が多く安定性に乏しかった。そこで、IDD の発現領域と発現ベクターを検討した。発現領域の検討ではプルダウンアッセイによって SLR1 との結合を確認しつつ、IDD の領域を決定した。SLR1 の GRAS ドメインについては、発現宿主を Rosetta (DE3) pLysS から BL21 Star (DE3) へ変更することにより、十分量発現させることが可能になった。また精製方法の検討も行い、最終的にアフィニティー精製と陰イオン交換クロマトグラフィーを行う精製方法に決定した。これらによって IDD,SLR1 ともにより単一なサンプルを調整することが可能となり共結晶を得ることができた。しかし、構造解析に十分な反射が得られなかったため、現在、さらに共結晶化のより良い条件を探索中である。
本研究は新学術領域研究の助成を受けた。

gibberellin, crystal structure, transcription factor

講演番号：4E7a12
講演日時：3 月 27 日 11:21～ 1 号館 E7 会場

アブラナ科植物の自家不和合性を司る花粉因子と雌蕊因子のハプロタイプ特異的相互作用解析
Analysis of haplotype specific interaction between pollen and stigma factors that controls Brassica self-incompatibility

○河辺 善[1]、村瀬 浩司[1]、高田 美信[2]、渡辺 正夫[2]、片山 幸江[1]、岡本 研[1]、盧 翌[1]、陸 鵬[1]、鈴木 道生[1]、高山 誠司[1]、永田 宏次[1] ([1]東大院、[2]東北大院)
○Zen Kawabe[1], Kohji Murase[1], Yoshinobu Takada[2], Masao Watanabe[2], Yukie Katayama[1], Ken Okamoto[1], Yi Lu[1], Peng Lu[1], Michio Suzuki[1], Seiji Takayama[1], Koji Nagata[1] ([1]The University of Tokyo, [2]Tohoku University)

多くの被子植物は遺伝的な多様性を保つために花粉の自他を識別し、自家受精を防ぐ性質を備えており、自家不和合性と呼ばれている。アブラナ科植物の自家不和合性は *S* と呼ばれる 1 つの遺伝子座によって制御されていることが知られている。*S* 遺伝子には複数のハプロタイプ（S_1, S_2, …, S_n）が存在しており、雌蕊及び花粉の表現型が持つハプロタイプが一致したとき、その花粉は拒絶される。*S* 遺伝子座には花粉及び雌蕊でそれぞれ自他識別を行う決定因子がコードされており、雌蕊側因子として受容体キナーゼをコードする *SRK* が、花粉側因子としてその低分子リガンドである *SP11* が同定されている。花粉表面に存在する SP11 は雌蕊の柱頭細胞膜に発現している SRK とハプロタイプ特異的に結合して、SRK の活性化を誘導し、下流のシグナル伝達と花粉拒絶反応を引き起こす。当研究グループの先行研究において、ハプロタイプ 8 番（以下 S_8）の S_8-SP11 と S_8-SRK の複合体立体構造が決定され、S_8-SRK の約 30 のアミノ酸が S_8-SP11 の認識を行っていることが明らかにされたが、これらのアミノ酸がどのようにして厳密な自他識別を可能にしているのか、その詳細なメカニズムは不明である。そこで本研究ではアブラナ科植物の自家不和合性における自他識別メカニズムの解明を目的に、S_8 と最も近縁な S_{46} の SP11 と SRK を用いてハプロタイプ特異的な相互作用について生化学的、タンパク質構造化学的解析を行った。

S_8-SP11 と S_8-SRK の複合体立体構造を基に S_8 と S_{46} 間での自他識別の鍵となる SRK 側のアミノ酸残基を 7 個選定し、S_{46}-SRK 型のアミノ酸残基に置換した変異型 S_8-SRK^{m7} を作製した。S_8-SP11 および S_{46}-SP11 を用いてプルダウンアッセイを試みたところ、変異型 S_8-SRK^{m7} は S_{46}-SP11 と結合したが S_8-SP11 とは結合しなかった。この結果はこの 7 アミノ酸残基の変異によって、SRK の SP11 認識特異性が S_8 から S_{46} へ変換されたことを示している。また、SP11 は 8 個の保存されたシステイン残基（C1-C4）が 4 本のジスルフィド結合を形成する（C1-C8, C2-C5, C3-C6, C4-C7）が、S_{46}-SP11 では C4 と C8 が失われており、C3-C4 の間に S_{46}-SP11 特有のシステイン残基を有する。S_{46}-SP11 におけるジスルフィド結合様式を明らかにするために、S_{46}-SP11 をプロテアーゼで断片化したのちに MALDI-TOF MS で解析した。その結果、活性型 S_{46}-SP11 の C1 はジスルフィド結合を形成せず、S_{46}-SP11 特有の C3-C4 の間にあるシステイン残基は他のシステイン残基とジスルフィド結合を形成していることが示唆された。この結果は S_{46}-SP11 が他の SP11 とは異なるジスルフィド結合様式を持つことを示している。活性型 S_{46}-SP11 のジスルフィド結合架橋様式を確定するために、結晶化および NMR 溶液構造解析を進めている。

Self-incompatibility, Protein structure, Plant diversity

発表責任者：河辺善（z.k.rugger.mcz@gmail.com）

講演番号：4E7a13
講演日時：3 月 27 日 11:32～ 1 号館 E7 会場

ギンネムのミモシン合成酵素の同定と酵素学的性質の解明

Identification and characterization of mimosine synthase from *Leucaena leucocephala*

○大貝 茂希[1]、福田 雅一[2]、渡邊 啓一[4]、屋 宏典[3] ([1]鹿児島大学、[2]琉球大農、[3]琉球大熱生研、[4]佐賀大学)
○Shigeki OOGAI[1], Masakazu FUKUTA[2], Keiiti WATANABE[4], Hirosuke OKU[3] ([1]Kagoshima Univ, [2]Ryukyu Univ. of Agric, [3]Ryukyu Univ. of TBRC, [4]Saga Univ)

ギンネム（*Leucaena leucocephala*）は、中央アメリカ原産で、熱帯・亜熱帯のアルカリ土壌に繁茂するマメ科ネムノキ亜科植物である。ギンネムの茎葉部は、乾燥重量で約 25%ものタンパク質を含み、ビタミン K やカロチン含量も豊富で、家畜の嗜好性も高いため、東南アジアでは飼料や食料として用いられている。生育も非常に早く荒地でも育つため、離島圏である本地域における特産のタンパク質資源・粗飼料資源としての開発の可能性のあるバイオマス資源といえる。
しかし、ギンネムの茎葉部及び種子中には、非タンパク質性毒性アミノ酸であるミモシンが多量に存在していることから、飼料化の利用が制限されている。単胃家畜におけるギンネム茎葉部の長期給与は、発育障害、脱毛、繁殖障害を引き起こすことが知られている。ミモシンは、鉄や亜鉛をキレートすることが知られており、それを利用した細胞周期同調剤や低酸素模倣剤としての研究は行われているが、ミモシンの代謝経路はほとんど研究されていない。特に、合成に関しては *O*-acetlyl-L-serine（OAS）と 3-hydroxy-4-pyridone（3H4P）を基質としてシステイン合成酵素のアイソザイムの一つが合成することが報告されている（Ikegami et al. 1990）。高等植物においてシステイン合成酵素群は細胞質型・葉緑体型・ミトコンドリア型の 3 タイプ存在し、それぞれが複数の酵素を有することが分かっている。また、この酵素群はシステインだけでなくβ−シアノ−L−アラニン合成によるシアノ化合物の無毒化や他のマメ科植物の有する非タンパク質性アミノ酸の合成にも関与していることが知られている。しかし、ネムノキ亜科植物に関する研究は盛んではなく、いまだ酵素の特定には至っていない。
演者らは、ギンネムのミモシン合成酵素を網羅的に探索し、既にミモシンを合成しないことが報告されている細胞質型システイン合成酵素（Negi et al. 2014）と、新規のシステイン合成酵素を 2 つクローニングした。酵素の機能を調べた結果、新規のシステイン合成酵素の 1 つがミモシンとシステインの両方を合成することが分かった。この酵素は、ミモシンを合成しないギンネム細胞質型システイン合成酵素と 86%と非常に高い相同性を示し、系統解析の結果シロイヌナズナ細胞質型システイン合成酵素のうちβ-シアノ-L-アラニン合成に関わっている D タイプと比較的近縁であることが判明した。

Mimosine, Cysteine, Cysteine synthase

講演番号：4E7a14
講演日時：3 月 27 日 11:43～ 1 号館 E7 会場

ブラシノステロイド生合成における鍵酵素 CYP90B1 の結晶構造及び基質の位置・立体特異的な水酸化メカニズム

Crystal structure of CYP90B1, a key enzyme in brassinosteriod biosynthesis, reveal regio- and stereo-specific hydroxylation of substrate

○藤山 敬介[1]、日野 智也[1]、渡辺 文太[3]、Lee Hyoung Jae[2]、水谷 正治[2]、永野 真吾[1] ([1]鳥取大院工、[2]神戸大院農、[3]京都大化研)

○Keisuke Fujiyama[1], Tomoya Hino[1], Bunta Watanabe[3], Hyoung Jae Lee[2], Masaharu Mizutani[2], Shingo Nagano[1] ([1]Grad. Sch. of Eng., Tottori Univ., [2]Grad. Sch. of Agr. Sci., Kobe Univ., [3]Inst. for Chem. of Res., Kyoto Univ.)

ブラシノステロイド (BR) は主に伸長成長を促進する植物ホルモンであり、生合成の過程で多くのシトクロムP450 (P450, CYP) が関与することが知られている。そのうちの一つであるCYP90B1は、植物ステロールとして知られるカンペステロール (CR) を水酸化し、(22*S*)-OH CRを特異的に生成する反応を触媒する (Fig. 1)。この反応はBR生合成における初発かつ律速段階であることから、CYP90B1はBR生合成の鍵酵素として考えられている。また、C22位に付加された水酸基の立体化学はBR受容体の水素結合に関わるため、CYP90B1の位置・立体特異的な水酸化はBRのシグナル伝達にも関わる重要な反応である。このことから、CYP90B1は植物生理学的に重要な酵素であり、その立体構造は植物の成長を制御する農薬開発の基盤になると期待される。

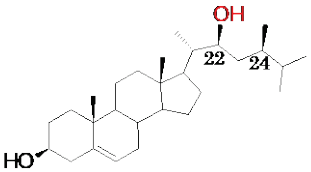


Fig.1 (22*S*)-OH CRの構造

今回、我々は基質アナログのコレステロール (CHR) が結合したシロイヌナズナ由来CYP90B1の結晶構造を決定し、植物由来ミクロソーム型P450として世界で初めて立体構造を明らかにした。本口演では、CHR結合型CYP90B1の結晶構造と位置・立体特異的な水酸化メカニズムについて報告する。CYP90B1の全体構造を構造既知のP450と比較したところ、CYP90B1は典型的なP450のフォールドを持つ可溶性P450のCYP120A1とよく類似していた。次にCHRの結合様式について確認した。基質ポケットは主に疎水性アミノ酸で構成されており、CHRはそれらアミノ酸残基との疎水的な相互作用で結合していた。基質の持つ唯一の水酸基はHis385や水分子を介してVal216の主鎖カルボニル基と水素結合を形成していた。基質近傍のいくつかのアミノ酸残基をAlaに置換した点変異体をそれぞれ作成し、水酸化活性や基質の親和性を測定した結果、Tyr112やHis385などが基質の結合に重要であることを明らかにした。また、基質とポケットの間の空隙を水分子のクラスターが埋めることで、基質とポケットの構造的な相補性が向上していると考えられた。次に位置・立体特異的な水酸化に関して考察をした。CHR結合型の構造から、CYP90B1に結合したCHRの炭素原子の中でC22位が最もヘム鉄に接近しているため、位置特異的な水酸化が説明できる。また、CRに対する立体特異的な水酸化メカニズムを明らかにするため、CHR結合型の構造を用いてCRのドッキングシミュレーションを行った。その結果、CRのC24位のメチル基とヘム間の立体障害がステロール側鎖のコンフォメーションを制限することで、立体特異的に水酸化されることが示唆された。以上のように、本研究では、CHR結合型CYP90B1の構造やCRのドッキングシミュレーションより、BR生合成系に関する構造生物学的な知見が得られた。また、阻害剤結合型の結晶構造から明らかにした、阻害剤の結合様式などの構造情報に基づいて、今後はCYP90B1に対して高い特異性を持つ農薬の設計が期待される。さらに、CYP90Bオルソログはソラニンなどの毒性アルカロイドの生合成にも関わるため、毒物生産を阻害する農薬の開発などにも応用が可能であると考えられる。

Brassinosteroid, P450, Crystal structure

講演番号：4E7a15
講演日時：3 月 27 日 11:54～ 1 号館 E7 会場

細胞膜透過ペプチドを利用した植物細胞へのタンパク質直接導入法の開発

Direct protein transport into plant cells using cell-penetrating peptides

○大村 昂誠、木村 さやか、河野 強、岩﨑 崇（鳥取大院持続）
○Kousei OMURA, SAYAKA KIMURA, TSUYOSHI KAWANO, TAKASHI IWASAKI (Tottori Univ. of .Grad Sch)

【背景・目的】 植物細胞は細胞壁を有しているため、植物細胞内へタンパク質を導入することは困難とされている。パーティクル・ボンバードメント法のように、特殊な装置を使用するタンパク質導入法は存在するが、簡便・安価かつ細胞へのダメージが少ないタンパク質導入法はいまだ存在しない。このような背景に対して、ゲノム編集酵素（CRISPR-Cas9）や花成ホルモン（Florigen）といったタンパク質を植物細胞内へ導入することができれば、効率的な育種や生長制御が実現することから、植物細胞を対象としたタンパク質導入法に対するニーズはきわめて大きいと言える。

そこで本研究では、植物細胞を対象とした簡便なタンパク質導入法を開発するにあたり、細胞膜透過ペプチドに着目した。これまでに我々の研究室では、植物細胞に有効な細胞膜透過ペプチドとして、ポリヒスチジン（PolyHis）を開発した。PolyHis はヒスチジン残基のみが連続したシンプルなペプチドであり、植物細胞に対して高い膜透過性を示すことが確認されている。本研究では、この PolyHis を利用して、植物細胞内にタンパク質（酵素）を直接導入する手法の開発に挑戦した。

【方法・結果】 まず、RFP（赤色蛍光タンパク質）に様々な鎖長の PolyHis（His8～20）を融合した RFP::PolyHis を調製し、タバコ BY-2 細胞培養液に添加した。その後、プロトプラスト化処理により細胞壁ならびに吸着したタンパク質を除去し、細胞内に導入された RFP::PolyHis を定量した。その結果、RFP-His20 が最も高い細胞内導入量を示したことから、His20 は植物細胞に対する有効なタンパク質導入配列であることが示唆された。

次いで、PolyHis（His20）、RFP および CyaA（アデニル酸シクラーゼ）を融合した RFP::CyaA::His20 を調製した。RFP::CyaA::His20 をタバコ BY-2 細胞培養液に添加した後、プロトプラスト化処理により細胞壁を除去した。細胞内に導入された RFP::CyaA::His20 を定量するために、細胞内蛍光量ならびに酵素活性（細胞内 cAMP 量）を測定した。その結果、RFP::CyaA::His20 を添加した BY-2 細胞で、細胞内蛍光量の有意な上昇が確認された。また、cAMP 濃度を定量したところ、RFP::CyaA::His20 を添加した BY-2 細胞で、細胞内 cAMP 濃度の有意な増加が確認された。これらの結果より、His20 をタンパク質（酵素）に融合することにより、機能を保持した状態で植物細胞内へ直接導入できることが実証された。今後は、様々な植物種およびタンパク質（酵素）を対象として、PolyHis を利用したタンパク質直接導入法の有用性を実証していく予定である。

Plant cell, Cell-penetrating peptide, Protein transport

発表責任者：岩崎 崇（itaka@muses.tottori-u.ac.jp）

シンポジウムプログラム

3月24日（日）9:00 ～ 12:00

1S01　農芸化学から持続可能な世界への変革を目指して ～農芸化学研究が国連の持続可能な開発目標（SDGs）に果たす役割～

3月24日（日） 9:00 ～ 12:00
共　催：日本学術会議農芸化学分科会
会　場：A4会場（1号館　1階　141）
世話人：熊谷日登美（日大・生資科），裏出令子（京大・複合研）
座　長：熊谷日登美（日大・生資科），裏出令子（京大・複合研）

9:00　はじめに ……熊谷日登美（日大・生資科）
9:10　1S01A4a1　SDGsと農芸化学における食品栄養研究 ……○清水　誠（東農大応生科）
9:40　1S01A4a2　SDGsにおける微生物の貢献～エネルギー・環境保全対策を中心に～ ……○橋本　渉[1]，河井重幸[2]，村田幸作[3]（[1]京大院・農，[2]石川県大・資源研，[3]摂南大・理工）
10:10　1S01A4a3　作物の持続的な生産に向けた植物栄養からのアプローチ ……○馬　建鋒，山地直樹（岡山大植物研）
10:40　休憩
10:50　1S01A4a4　海洋微生物を活用したSDGsへの挑戦　～海と森をホワイトバイオでつなぐ～ ……○大田ゆかり（（国研）海洋研究開発機構（JAMSTEC））
11:20　1S01A4a5　畑で見つけた健康長寿社会を支える高栄養価タンパク質 ……○横田明穂（奈良先端大名誉教授）
11:50　おわりに ……裏出令子（京大・複合研）

1S02　ライフサイエンス研究とアカデミア創薬を加速する共用基盤技術（AMED/BINDSワークショップ）

3月24日（日） 9:00 ～ 12:00
共　催：AMED「創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業（BINDS）」
会　場：A3会場（1号館　1階　142）
世話人：澤崎達也（愛媛大PROS），宮川拓也（東大院・農生科），田之倉優（東大院・農生科）
座　長：澤崎達也（愛媛大PROS），宮川拓也（東大院・農生科）

9:00　はじめに ……田之倉優（東大院・農生科）
9:05　1S02A3a1　アカデミア創薬をひと押しするコムギ無細胞系を基盤とした支援技術 ……○澤崎達也（愛媛大PROS）
9:30　1S02A3a2　基礎研究から創薬への一歩を手厚く支援する共用研究基盤 ……○小島宏建（東大創薬機構）
10:00　1S02A3a3　タンパク質 - 基質相互作用のバイオインフォマティクス解析とその応用 ……○富井健太郎（産総研）
10:30　1S02A3a4　クライオ電子顕微鏡による原子分解能解析 ……○岩崎憲治[1]，杉田征彦[2]，廣瀬未果[2]，川本晃大[2]，宮崎直幸[2]（[1]筑波大TARA，[2]阪大蛋白研）
11:00　1S02A3a5　BINDS事業における立体構造解析技術開発 ……○千田俊哉（高エネ機構物構研構造生物）
11:30　1S02A3a6　分子機能解明に向けた構造生命科学の統合アプローチ ……○宮川拓也，田之倉優（東大院・農生科）
11:55　おわりに ……澤崎達也（愛媛大PROS）

1S03　フードメタボロミクス～健康長寿を目指す食品機能性研究

3 月 24 日（日） 9:00 ～ 12:00
会　場：B6 会場（1 号館　2 階　242）
世話人：亀井康富（京府大院・生環），荒　　武（京大院・農）
座　長：亀井康富（京府大院・生環），荒　　武（京大院・農）

9:00　はじめに ……亀井康富（京府大院・生環）
9:05　1S03B6a1　緑茶の機能性を多面的に捉えるメタボリック・プロファイリング
……○藤村由紀[1]，三浦大典[2]，立花宏文[1]（[1]九大院農，[2]産総研）
9:30　1S03B6a2　クッキングメタボロミクス～調理・加工中における食品成分の網羅解析～
……○及川　彰[1,2]（[1]山形大農，[2]理研 CSRS）
9:55　1S03B6a3　メタボローム解析を活用した食品機能性全体像の解明 ……○高橋春弥，後藤　剛，河田照雄（京大農）
10:20　休憩
10:30　1S03B6a4　リピドミクス解析を活用した食肉評価および栄養素摂取比率の推定
……○三浦進司[1]，妹尾奈波[1]，梅林脩平[1]，井上瑞樹[1]，山本俊佑[1]，三好規之[1]，守田昭仁[1]，亀井康富[2]
（[1]静岡県大食，[2]京都府大生命）
10:55　1S03B6a5　NMR および GC/MS メタボロミクスによる発酵食品成分の包括的解析
……○冨田　理（農研機構食品研）
11:20　1S03B6a6　食品メタボロームレポジトリ：注目成分を決める新たな基盤
……○櫻井　望[1,2]（[1]国立遺伝学研究所，[2]かずさ DNA 研究所）
11:45　おわりに ……荒　　武（京大院・農）

1S04　微生物・植物における一酸化窒素研究の新展開：生成機構と生理機能への理解から応用まで

3 月 24 日（日） 9:00 ～ 12:00
会　場：D6 会場（1 号館　4 階　442）
世話人：高木博史（奈良先端大バイオ），川北一人（名大生命農）
座　長：高木博史（奈良先端大バイオ），川北一人（名大生命農），山崎秀雄（琉球大理），高谷直樹（筑波大生命環境）

9:00　はじめに ……高木博史（奈良先端大バイオ）
9:06　1S04D6a1　細菌におけるニトロ環状ヌクレオチドによるストレス応答機構 ……○澤　智裕（熊本大院生命科学）
9:34　1S04D6a2　菌体内 NO 濃度を指標とした大腸菌 NO 消去系の機能解析 ……○松本明郎（東邦大医加齢薬理）
10:02　1S04D6a3　糸状菌における一酸化窒素代謝の生理的意義
……○高谷直樹[1,2]，桝尾俊介[1]（[1]筑波大生命環境，[2]筑波大微生物サステイナビリティ研究センター）
10:30　1S04D6a4　酵母に見出した「両刃の剣」一酸化窒素の合成機構と生理機能 ……○高木博史（奈良先端大バイオ）
10:58　1S04D6a5　植物 NO 研究の現在，過去，未来 ……○山崎秀雄（琉球大理）
11:26　1S04D6a6　植物の感染防御応答における NO の分子機能 ……○川北一人（名大生命農）
11:54　おわりに ……川北一人（名大生命農）

1S05　微生物画像情報のデジタル化がもたらす未来

3 月 24 日（日） 9:00 ～ 12:00
会　場：C6 会場（1 号館　3 階　342）
世話人：紙野　圭（製品評価機構バイオ C），大矢禎一（東大新領域）
座　長：紙野　圭（製品評価機構バイオ C），大矢禎一（東大新領域）

9:00　1S05C6a1　微生物画像情報のデジタル化がもたらす未来の序に代えて ……○紙野　圭（製品評価機構バイオ C）
9:04　1S05C6a2　微生物形態デジタル情報の活用 ……○大矢禎一（東大新領域）
9:33　1S05C6a3　Controlled ecophysiological studies at single-cell resolution ……○Yutaka Yawata（U. Tsukuba）
10:02　1S05C6a4　細胞ラマンスペクトルを利用したトランスクリプトームの非破壊測定 ……○若本祐一（東大総合文化）
10:31　1S05C6a5　細胞形態変化を利用した抗真菌物質の探索
……○二村友史[1]，ウソンレイチェル[1]，山本甲斐[1,2]，室井　誠[1]，長田裕之[1,2]
（[1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー，[2]埼玉大）
11:00　1S05C6a6　放線菌コロニーを自動識別する人工知能の開発
……○山村英樹[1]，安藤英俊[2]，中島啓太[2]，早川正幸[3]（[1]山梨大・生命環境，[2]山梨大学・工，[3]山梨大）
11:29　1S05C6a7　未利用微生物資源の収集探索・スクリーニング革命 ……○小笠原渉（長岡技科大院）
11:58　おわりに ……大矢禎一（東大新領域）

3月24日（日）14:00 ～ 17:00

1S06　ペプチド合成技術の新展開

3月24日（日）　14:00 ～ 16:30
後　援：日本ペプチド学会
会　場：D6会場（1号館　4階　442）
世話人：今野博行（山形大院理工），清水弘樹（産総研生物プロセス）
座　長：今野博行（山形大院理工），清水弘樹（産総研生物プロセス）

14:00　　はじめに ……今野博行（山形大院理工）
14:05　1S06D6p1　疎水性タグを用いた液相ペプチド合成とその応用展開 ……○千葉一裕（東農工大農）
14:35　1S06D6p2　異常アミノ酸含有ペプチド callipeltin 類の全合成研究 ……○今野博行（山形大院理工）
15:00　1S06D6p3　ペプチド化学を基盤とするプロテアーゼ阻害剤の設計・合成と評価 ……○赤路健一（京都薬大）
15:30　1S06D6p4　低温マイクロ波利用によるペプチド・糖ペプチド固相合成
……長島　生，○清水弘樹（産総研生物プロセス）
15:55　1S06D6p5　ライゲーション法による（糖）タンパク質の合成 ……○北條裕信（阪大蛋白研）
16:25　　おわりに ……清水弘樹（産総研生物プロセス）

1S07　微生物・代謝・生体触媒・遺伝子のユニークかつ重要な機能の解明と応用への展望

3月24日（日）　14:00 ～ 17:00
会　場：C6会場（1号館　3階　342）
世話人：小林達彦（筑波大生命環境），西山　真（東大生物工学セ）
座　長：小林達彦（筑波大生命環境），野尻秀昭（東大生物工学セ），西山　真（東大生物工学セ）

14:00　　はじめに ……小林達彦（筑波大生命環境）
14:03　1S07C6p1　新しい生体触媒の発見 ……○小林達彦（筑波大生命環境）
14:32　1S07C6p2　芳香環二水酸化酵素の触媒反応を進める精緻な機構 ……○野尻秀昭（東大生物工学セ）
15:01　1S07C6p3　“Pseudogene？”にコードされるタンパク質による酵素活性の制御 ……○西山　真（東大生物工学セ）
15:30　1S07C6p4　アーキアのユニークな代謝機構 ……○跡見晴幸（京大院工）
15:59　1S07C6p5　ミスマッチ塩基対特異的エンドヌクレアーゼによる新規 DNA 修復機構 ……○石野良純（九大院・農）
16:28　1S07C6p6　細菌メンブレンベシクルの生態的意義を考える
……○野村暢彦[1,2]，豊福雅典[1,2]（[1]筑波大生命環境，[2]筑波大微生物サステイナビリティ研究センター）
16:57　　おわりに ……西山　真（東大生物工学セ）

1S08　食による脳機能改善を考える

3月24日（日）　14:00 ～ 17:00
会　場：B6会場（1号館　2階　242）
世話人：久恒辰博（東大新領域），入江一浩（京大院農），大日向耕作（京大院農）
座　長：久恒辰博（東大新領域），入江一浩（京大院農），大日向耕作（京大院農）

14:00　1S08B6p1　アミロイドβの凝集を抑制する食品・生薬成分の作用機構 ……○入江一浩，村上一馬（京大院農）
14:30　1S08B6p2　末梢－中枢相互作用の解明による新しい脳機能改善戦略 ……○大日向耕作（京大院農）
15:00　1S08B6p3　食品に由来する脳機能改善素材の開発 ……○阿野泰久（キリン(株)健康研）
15:30　1S08B6p4　腸内細菌と脳機能―ビフィズス菌摂取による認知機能改善の可能性
……○清水金忠（森永乳業(株)基礎研究所）
16:00　1S08B6p5　食事パターンと認知症の関係：久山町研究 ……○二宮利治（九州大学）
16:30　1S08B6p6　ヒト介入試験を通じた食品成分による脳老化改善の探求 ……○久恒辰博（東大新領域）

1S09　ケミカルバイオロジーに基づく化学コミュニケーションの理解と制御

3 月 24 日（日）　14:00 ～ 17:00
協　賛：科研費新学術領域研究「化学コミュニケーションのフロンティア」
会　場：A4 会場（1 号館　1 階　141）
世話人：井本正哉（慶応大理工），北　将樹（名大院生命農）
座　長：井本正哉（慶応大理工），北　将樹（名大院生命農）

14:00　はじめに ……井本正哉（慶応大理工）
14:05　1S09A4p1　海綿動物由来の細胞毒性物質を生産する共生微生物の発見と伝播機構の解明
……○高田健太郎（北里大海洋）
14:33　1S09A4p2　第 3 の液性因子：腸内細菌叢由来代謝物質がもたらす機能
……○福田真嗣[1,2,3,4,5]
([1]慶大先端生命研，[2]JSTさきがけ，[3]神奈川産技総研，[4]筑大 TMRC，[5]メタジェン)
15:01　1S09A4p3　哺乳動物毒における化学コミュニケーション……○北　将樹[1,2]（[1]名大院生命農，[2]JST さきがけ）
15:29　1S09A4p4　グアニン 4 重鎖安定化物質の分子プロファイリングとがん創薬への展開
……○清宮啓之[1]，新家一男[2]，長澤和夫[3]
([1]がん研・化療セ・分子生物治療，[2]産総研・生命工学・創薬基盤，[3]東京農工大・院・工)
15:57　1S09A4p5　真核微生物における小分子を介した新しい細胞間コミュニケーション
……○吉田　稔[1,2]，大澤　晋[1]，八代田陽子[1]（[1]理研環境資源化学セ，[2]東大応生工）
16:25　1S09A4p6　ホヤ脊索管形成の制御機構のケミカルバイオロジー……○井本正哉（慶応大理工）
16:53　おわりに ……北　将樹（名大院生命農）

1S10　バイオポリマー研究フロントライン：バイオエコノミーへの挑戦

3 月 24 日（日）　14:00 ～ 17:00
後　援：科学技術振興機構（JST）
会　場：A3 会場（1 号館　1 階　142）
世話人：松本謙一郎（北大院工・応化），田口精一（東農大・生命科学・分子生命化学），大西康夫（東大院・農生科）
座　長：松本謙一郎（北大院工・応化），田口精一（東農大・生命科学・分子生命化学），大西康夫（東大院・農生科）

14:00　はじめに ……松本謙一郎（北大院工・応化）
14:05　1S10A3p1　バイオエコノミー：地球に対するフェアトレード
……○五十嵐圭日子[1,2]（[1]東大院農生科，[2]VTTフィンランド技術研究センター）
14:35　1S10A3p2　微生物由来の天然ポリカチオンを利用した生体高分子の細胞内送達法
……○濱野吉十（福井県大・生物資源）
15:05　1S10A3p3　高性能イミダゾール系バイオプラスチックの一貫生産プロセスの開発
……○大西康夫[1,2,3]，金子達雄[3,4]，荻野千秋[3,5]，高谷直樹[3,6]
([1]東大院・農生科，[2]東大・微生物イノベ連携機構，[3]CREST，[4]北陸先端大・マテリアルサイエンス，[5]神戸大院・工，[6]筑波大・生命環境)
15:35　休憩 10 分
15:45　1S10A3p4　非天然ポリエステル生合成系の開発と配列制御型ポリマーへの展開
……○松本謙一郎[1,4,5]，堀　千明[1]，大井俊彦[1,5]，磯野拓也[1]，佐藤敏文[1]，石井大輔[2,5]，岩田忠久[3,5]，田口精一[2,5]
([1]北大院工，[2]東農大生命，[3]東大農，[4]ALCA-JST，[5]CREST-JST)
16:15　1S10A3p5　海洋分解性ポリマー PHBH の微生物生産……○佐藤俊輔（(株)カネカ バイオテクノロジー研究所）
16:45　おわりに ……田口精一（東農大・生命科学・分子生命化学）

3月26日（火）9:00 ～ 12:00

3S11　産業利用が始まっている体内時計研究

3月26日（火）　9:00 ～ 12:00
会　場：A3会場（1号館　1階　142）
世話人：大池 秀明（農研機構・食品研），小田 裕昭（名大院生命農）
座　長：大池 秀明（農研機構・食品研），小田 裕昭（名大院生命農）

9:00　3S11A3a1　はじめに　～物事には適した時刻が存在する～ ……○大池秀明（農研機構・食品研）
9:15　3S11A3a2　生体の季節リズムを利用した代謝プログラミングの畜産応用 ……○安尾しのぶ（九大農）
9:50　3S11A3a3　魚類養殖における体内時計研究成果の産業利用 ……○飯郷雅之（宇都宮大農）
10:25　休憩
10:30　3S11A3a4　体内時計を調節する化合物の探索 ……○廣田　毅（名古屋大ITbM）
11:05　3S11A3a5　体内時計を利用した植物工場 ……谷垣悠介，○福田弘和（大阪府大工）
11:40　3S11A3a6　まとめと展望 ……○小田裕昭（名大院生命農）

3S12　食品機能研究の新時代～ ex vivo, in vitro 培養系にて生体機能を再現する～

3月26日（火）　9:00 ～ 12:00
会　場：B6会場（1号館　2階　242）
世話人：岩槻　健（東農大・応生科），清水　誠（東農大・応生科）
座　長：岩槻　健（東農大・応生科），清水　誠（東農大・応生科）

9:00　はじめに ……岩槻　健（東農大・応生科）
9:05　3S12B6a1　ミニ腸の創生と応用 ……○阿久津英憲（国立成育医療研究センター研究所）
9:30　3S12B6a2　胃オルガノイド restitution model を用いたピロリ菌走化性メカニズムの解析 ……○羽生ひかる（シンシナティ大薬理・生理学）
9:55　3S12B6a3　リンパ球培養系を用いた食品の免疫調節機能解析 ……○戸塚　護（日獣生科大・応生）
10:20　3S12B6a4　ATP 動態の可視化と応用性 ……○山本正道（京大医・腎内）
10:45　3S12B6a5　Ex vivo における肝臓の3次元組織構造構築とその応用 …○谷水直樹（札幌医大・フロンティア医研）
11:10　3S12B6a6　オルガノイド培養系を用いた味蕾および膵細胞の機能解析 ……○岩槻　健（東農大・応生科）
11:35　おわりに ……清水　誠（東農大・応生科）

3S13　生合成マシナリからリデザインへ

3月26日（火）　9:00 ～ 12:00
協　賛：科研費新学術領域　生物合成系の再設計による複雑骨格機能分子の革新的創成科学（生合成リデザイン）
会　場：D6会場（1号館　4階　442）
世話人：大利　徹（北大院工），尾仲宏康（東大院農生科）
座　長：大利　徹（北大院工），尾仲宏康（東大院農生科）

9:00　はじめに ……尾仲宏康（東大院農生科）
9:05　3S13D6a1　RiPPs 型生合成リデザインによる迅速多様な中分子創薬に向けた修飾ペプチド創製手法 ……○尾仲宏康（東大院農）
9:35　3S13D6a2　人工酵素を用いたバイオガソリンの生産に関して ……○湯澤　賢（東大・生物工学セ）
10:05　3S13D6a3　不均衡変異導入にもとづく実用的な微生物育種方法 ……○東田英毅（株式会社ちとせ研究所）
10:35　休憩
10:45　3S13D6a4　抗腫瘍性海洋天然物ハリコンドリン B からの抗がん剤創薬 ……田上克也[1]，○野本研一[2]（[1]エーザイ株式会社，[2]エーザイインク）
11:15　3S13D6a5　精密解析に基づく多価不飽和脂肪酸生合成酵素の機能改変 ……林　祥平[2]，佐藤康治[1]，小笠原泰志[1]，○大利　徹[1]（[1]北大院工，[2]北大総合化学院）
11:45　おわりに ……大利　徹（北大院工）

3S14　酵母が拓く脂質・生体膜研究のフロンティア

3 月 26 日（火） 9:00 ～ 12:00
会　場：C6 会場（1 号館　3 階　342）
世話人：福田良一（東大院農生科），舘川宏之（東大院農生科）
座　長：福田良一（東大院農生科），舘川宏之（東大院農生科）

9:00　3S14C6a1　オートファジーにおける膜動態を支える分子メカニズム ……○中戸川仁（東工大生命理工）
9:30　3S14C6a2　酵母の前胞子膜形成におけるリン脂質とオルガネラ接触部位の役割
……○舘川宏之[1,2]（[1]東大院農生科，[2]東大・微生物連携機構）
9:55　3S14C6a3　酵母の細胞膜における脂質非対称性の生理的意義 ……○田中一馬，岸本拓磨，三岡哲生（北大遺制研）
10:25　3S14C6a4　酵母におけるオルガネラ間のステロール輸送機構
……○福田良一[1,2]（[1]東大院農生科，[2]東大・微生物連携機構）
10:50　3S14C6a5　海洋天然物セオネラミドによるステロールの可視化と機能変調
……○西村慎一[1,2]（[1]東大院農生科，[2]東大・微生物連携機構）
11:20　3S14C6a6　油脂生産性の飛躍的向上を目指した油脂酵母の改良
……○高久洋暁[1]，小笠原渉[2]，矢追克郎[3]，油谷幸代[4]，荒木秀雄[5]，田代康介[6]，蓮沼誠久[7]，山崎晴丈[1]
（[1]新潟薬大応生科，[2]長岡技科大工，[3]産総研生物プロセス，[4]産総研 CBBD-OIL，
[5]不二製油グループ本社，[6]九大農，[7]神大院イノベ）

3 月 26 日（火）14:00 ～ 17:00

3S15　ゲノム合成の世界的なうねりと現状：日本の貢献

3 月 26 日（火） 14:00 ～ 17:00
会　場：E6 会場（1 号館　5 階　542）
世話人：板谷光泰（慶大先端生命研），朝井　計（東京農大），金子真也（東工大）
座　長：板谷光泰（慶大先端生命研），朝井　計（東京農大），金子真也（東工大）

14:00　3S15E6p1　ヒトゲノムのデザイン原理の探究 ……○相澤康則（東工大生命）
14:30　3S15E6p2　ゲノム合成時代のセルフリー技術 ……○末次正幸，奈良聖亜，倉田竜明（立教大理）
15:00　3S15E6p3　正確で迅速な長鎖 DNA 合成 ……○柘植謙爾（神戸大科学技術イノベ）
15:30　3S15E6p4　DNA 水平伝播技術を用いたゲノム合成と活用法
……○金子真也[1]，中濱みさ子[1]，福島寛美[1]，板谷光泰[2]（[1]東工大・生命理工，[2]慶大先端生命研）
16:00　3S15E6p5　合成生物シアノバチルスにおける合成ゲノム再起動計画
……○渡辺　智[1]，朝井　計[1]，赤沼元気[2]，千葉櫻拓[1]，河村富士夫[2]，板谷光泰[3]，吉川博文[1]
（[1]東京農大生命，[2]立教大理，[3]慶大先端生命研）
16:30　3S15E6p6　ゲノム合成とゲノム移動への道のり ……○板谷光泰（慶大先端生命研）

3S16　食品機能を仲介するマイクロ RNA・エクソソーム研究最前線

3 月 26 日（火） 14:00 ～ 17:00
会　場：B6 会場（1 号館　2 階　242）
世話人：立花宏文（九大院農院），園山　慶（北大院農）
座　長：園山　慶（北大院農），立花宏文（九大院農院）

14:00　はじめに ……立花宏文（九大院農院）
14:05　3S16B6p1　エクソソーム研究の最前線：食品と未病社会 ……○落谷孝広（国立がん研究センター）
14:40　3S16B6p2　マイクロ RNA 研究の最前線 ……○田原栄俊（広島大学大学院医歯薬保健学研究科）
15:15　3S16B6p3　腸内細菌と宿主のクロストークを媒介するエクソソーム
……○園山　慶[1]，青木（吉田）綾子[2]，鶴田剛司[3]（[1]北大院農，[2]日女大家政，[3]岡大院環境生命）
15:45　3S16B6p4　乳由来のエクソソーム・マイクロ RNA の特徴と機能 ……○和泉裕久（森永乳業 栄科研）
16:15　3S16B6p5　食品因子のエクソソーム・マイクロ RNA 依存的な機能性発現 ……○立花宏文（九大院農院）
16:45　おわりに ……園山　慶（北大院農）

3S17　農芸化学における有機合成の力 －その視点と未来－

3 月 26 日（火） 14:00 ～ 17:00
会　場：D6 会場（1 号館　4 階　442）
世話人：滝川浩郷（東大院農生科），清田洋正（岡山大院環境生命），石神　健（東農大生命科）
座　長：滝川浩郷（東大院農生科），清田洋正（岡山大院環境生命），石神　健（東農大生命科）

14:00　3S17D6p1　光学活性アリルアルコール類の合成手法の開発と天然物合成への応用 ……○矢島　新（東農大生命科）
14:30　3S17D6p2　計算化学を活用した天然物合成へのアプローチ ……○占部大介（富山県大工）
15:00　3S17D6p3　斬新かつ独創的なアイデアで挑む天然物合成 ……○森　直紀（東大院農生科）
15:30　3S17D6p4　リグナン類の立体異性体を含めた合成および構造と活性との関係 ……○山内　聡（愛媛大院農）
16:00　3S17D6p5　合成化学で挑む細胞内糖修飾の生体機能 ……○伊藤幸成（理化学研究所）
16:30　3S17D6p6　天然物の網羅的合成と新生物機能の解明 ……○西川俊夫，中崎敦夫，安立昌篤（名古屋大院生命農学）

3S18　植物生長促進微生物研究の新潮流

3 月 26 日（火） 14:00 ～ 17:00
会　場：C6 会場（1 号館　3 階　342）
世話人：由里本博也（京大院農），谷　明生（岡山大植物研）
座　長：由里本博也（京大院農），谷　明生（岡山大植物研）

14:00　3S18C6p1　はじめに～葉面 C1 微生物の生存戦略とその利用 ……○由里本博也，阪井康能（京大院農）
14:25　3S18C6p2　微生物による水生植物成長促進機構のミッシングリンク ……○森川正章（北海道大環境）
14:55　3S18C6p3　内生糸状菌との相互作用を介したアブラナ科植物の生存戦略
……○晝間　敬[1,2]（[1]奈良先端大バイオ，[2]JST さきがけ）
15:25　3S18C6p4　フィールドアグリオミクスで有機農業を科学する ……○市橋泰範（理研 BRC）
15:55　3S18C6p5　土壌微生物を「デザイン」する・・・植物生長を最大化する基盤技術の登場
……○篠原　信[1]，安藤晃規[2]，小川　順[2]，宮本憲二[3]，加藤康夫[4]
（[1]農研機構，[2]京大農，[3]慶應大理工，[4]富県大生セ）
16:25　3S18C6p6　メチロトロフのランタノイド依存性研究の最前線 ……○谷　明生（岡山大植物研）

3 月 27 日（水）9:00 ～ 12:00

4S19　マイクロバイオーム研究から新産業創出に向けた技術的課題と取り組み

3 月 27 日（水） 9:00 ～ 12:00
後　援：一般社団法人日本マイクロバイオームコンソーシアム（JMBC）
会　場：A4 会場（1 号館　1 階　141）
世話人：川﨑浩子（製品評価技術基盤機構バイオ C），関口勇地（産総研バイオメディカル RI），坂本光央（理研 BRC-JCM）
座　長：山副敦司（製品評価技術基盤機構バイオ C），坂本光央（理研 BRC-JCM）

9:00　はじめに ……川﨑浩子（製品評価技術基盤機構バイオ C）
9:05　4S19A4a1　微生物間相互作用を利用した難培養微生物の分離の試みとバイオリソース整備
……○坂本光央[1,2]（[1]理研 BRC-JCM，[2]日本医療研究開発機構，PRIME）
9:33　4S19A4a2　食品素材としての機能性腸内代謝物の開発　～エクオール，ウロリチン～
……○中島賢則，山本浩明（ダイセル・コーポレート研）
10:01　4S19A4a3　健常人マイクロバイオームデータベース構築に向けた解析方法の統一化
……○亀山恵司，恒吉桃香，藤井孝吉，梶浦貴之（味の素株式会社）
10:29　4S19A4a4　計測レファレンスの必要性と Mock Community の提供に向けた取り組み
……○三浦隆匡，山副敦司，川﨑浩子（(独)製品評価技術基盤機構）
10:57　4S19A4a5　マイクロバイオーム解析の精度管理のための人工核酸標準物質
……○関口勇地（産総研）
11:25　4S19A4a6　マイクロバイオーム産業の経済効果 ……○笠原　堅（日本マイクロバイオームコンソーシアム）
11:53　おわりに ……寺内　淳（日本マイクロバイオームコンソーシアム）

4S20　酵素の立体構造から動きや機能の理解：酵素の応用利用に必須な構造機能相関の解明

3 月 27 日（水） 9:00 ～ 12:00
会　場：C6 会場（1 号館　3 階　342）
世話人：織田昌幸（京都府大院生環），河合富佐子（岡山大），沼本修孝（医科歯科大難研）
座　長：織田昌幸（京都府大院生環），沼本修孝（医科歯科大難研）

9:00　4S20C6a1　趣旨説明及びクチナーゼ研究背景 ……○河合富佐子（岡山大学）
9:25　4S20C6a2　クチナーゼの基質結合型結晶構造からわかった酵素反応前後の構造変化
……○沼本修孝（医科歯科大難研）
9:40　4S20C6a3　クチナーゼの分子動力学計算による反応機構解析 ……○神谷成敏（兵庫県大）
9:55　休憩
10:00　4S20C6a4　新規 Gly-Pro 分解性システインペプチダーゼの構造と反応特性 ……○渡部邦彦（京都府大院生環）
10:25　4S20C6a5　Second harmonic generation を用いたインターロイキン 2 誘導型 T 細胞キナーゼの選択的阻害薬の創出 ……○判谷吉嗣[1]，飯尾清誠[1]，判谷理恵[1]，梅谷佳代[1]，佐藤俊宏[1]，Tracy Young[2]，Katelyn Connell[2]，Sam Kintz[2]，Joshua Salafsky[2]
（[1]日本たばこ産業株式会社，[2]Biodesy, Inc.）
10:50　4S20C6a6　動的構造によるキラル化合物合成酵素の活性制御
……○田之倉優[1]，宮川拓也[1]，片岡道彦[2]（[1]東大院・農生科，[2]阪府大院・生命環境）
11:15　4S20C6a7　結晶構造解析によるアミラーゼの反応機構の解明
……○三上文三，坂　直樹，森湖太郎，水谷公彦，高橋延行（京大農・応用生命）
11:40　おわりに ……織田昌幸（京都府大院生環）

4S21　生理活性ペプチドから動物界を俯瞰する

3 月 27 日（水） 9:00 ～ 12:00
協　賛：日本比較内分泌学会
会　場：E6 会場（1 号館　5 階　542）
世話人：河野　強（鳥取大院・連農），中山二郎（九大院・農），筒井和義（早稲田大院・先進理工）
座　長：河野　強（鳥取大院・連農），国吉久人（広島大院・生物圏）

9:00　はじめに ……○河野　強（鳥取大院・連農）
9:10　4S21E6a1　線虫 *C. elegnas* のインスリン様ペプチドから動物界を俯瞰する ……河野　強（鳥取大院・連農）
9:40　4S21E6a2　昆虫におけるペプチドホルモンを介した栄養選好性摂食行動のメカニズム
……○永田晋治（東大院・新領域）
10:10　4S21E6a3　環状ペプチドクォルモンを介する腸内細菌と宿主のクロストークの可能性 ……○中山二郎（九大院・農）
10:40　4S21E6a4　光刺激により放出されるクラゲの卵成熟誘起ホルモン ……○竹田典代（広島大・総科）
11:10　4S21E6a5　鳥類で発見され生殖腺刺激ホルモン放出抑制ホルモンから動物界を俯瞰する：比較解析から普遍原理の理解 ……○筒井和義（早稲田大院・先進理工）
11:40　総合討論

4S22　食品成分の多彩な免疫調節作用とその分子メカニズム

3 月 27 日（水） 9:00 ～ 12:00
会　場：B6 会場（1 号館　2 階　242）
世話人：西山千春（東理大・基礎工），高橋恭子（日大・生資）
座　長：西山千春（東理大・基礎工），高橋恭子（日大・生資）

9:00　4S22B6a1　腸内細菌による miRNA を介した腸管上皮透過性調節とその機構 ……○高橋恭子（日大・生資）
9:30　4S22B6a2　食用油の持つ多彩な機能とアレルギー克服に向けた新展開
……○國澤　純[1,2,3,4]（[1]医薬健栄研，[2]大阪大医歯薬，[3]神戸大医，[4]東大医科研）
10:00　4S22B6a3　生体制御に関わる多彩なリポクオリティ ……○有田　誠[1,2,3]（[1]慶應大薬，[2]理研 IMS，[3]横市大院生命医）
10:30　4S22B6a4　β グルカンの腸管免疫に及ぼす影響について ……○岩倉洋一郎（東理大・生命研）
11:00　4S22B6a5　食品成分の腸内細菌代謝を介した健康制御 ……○小川　順，岸野重信（京大院農・応用生命）
11:30　4S22B6a6　短鎖脂肪酸によるアレルギー抑制効果 ……○西山千春（東理大・基礎工）

4S23　イソプレノイド生合成経路は新発見の宝庫

3 月 27 日（水） 9:00 ～ 12:00
協　賛：イソプレノイド研究会
会　場：D6 会場（1 号館　4 階　442）
世話人：佐藤　努（新潟大農），川向　誠（島根大生資），葛山智久（東大・生物工学セ，東大・微生物連携機構）
座　長：戒能智宏（島根大生資），葛山智久（東大・生物工学セ，東大・微生物連携機構），佐藤　努（新潟大農）

9:00　はじめに ‥‥‥

講演番号：1S01A4a1
講演日時、会場：3 月 24 日 09:10～ A4 会場

SDGs と農芸化学における食品栄養研究

SDGs and food/nutrition research in JSBBA

○清水 誠（東農大応生科）
○Makoto Shimizu (Tokyo Univ. of Agric.)

多々ある SDGs の目標の中で食品栄養研究に関わるものというと、「2.1 安全かつ栄養のある食料を十分に供給する」、「3.4 NCD(非感染性疾患) を減少させる」、「3.9 有害物質・汚染物質による病気や死亡を減少させる」、「12.2 天然資源の効率的な利用」などの項目が思いつく。農芸化学分野で行われてきた(1)未利用資源からの良質・安全な食品素材の探索・製造、(2)健康を改善するための栄養素・機能性食品素材の利用は、まさに上記に合致する研究と言うことが出来るだろう。

未利用資源の活用については、例えば 1970 年代に、地球規模での食料タンパク質不足に備えようという取り組みがあった。石油から分離されたパラフィンを原料として培養した微生物のタンパク質（いわゆる石油タンパク質）や、太陽エネルギーの変換効率の良い牧草タンパク質などの食品利用を考えて、それらの栄養価や加工特性あるいは安全性の解析が進められた。演者自身も、チーズ副産物である牛乳ホエイタンパク質の加工特性の研究に携わった経験がある。タンパク質のみならず、豆腐製造の廃棄物であるオカラ、エビ・カニの殻の成分であるキチンの利用など、未利用食料資源から有用な成分を取り出して利用しようとする試みは今でも続いているが、このような研究が、実はその後の機能性食品研究の基礎となったことも興味深い。食品中の非栄養成分として価値のないものとされてきた食物繊維は、その後整腸機能を持つ食品の機能性素材として広く利用されるようになる。キチンなどの多糖類も中性脂質・コレステロールの上昇を抑制する特定保健用食品の素材として利用されている。特殊な例では、ビール製造の副産物から潰瘍性大腸炎の患者のための病者用食品が開発されている。このような、健康増進、疾病予防（特に生活習慣病予防）を目標とした機能性食品の創出は、日本の農芸化学者たちが中心になって推進したもので、今や世界各国がこのコンセプトを基盤に、食による健康増進を目指した活動を進めている。これは我が国の農芸化学が 30 年以上も前から推進してきた SDGs 活動そのものと言える。

そもそもこのような農芸化学の食・栄養研究は、初代会長鈴木梅太郎の一連の研究の中にその精神を見ることが出来る。脚気という国民病を予防・治療する成分の探索から始まったオリザニン（ビタミン B1）の発見はもとより、日本初の育児用調製粉乳の開発、コーリャンなどの栄養価の低い作物の利活用、米ぬかからの良質な油脂の分離、エクストルーダーを用いた貯蔵性の高い携行食糧の製造技術開発など、その目指したものはまさに人類の福祉と健康向上のための研究・開発であった。何をいまさら「SDGs」などと新しいお題目のように取り上げて騒いでいるのだ、と言いたい。

SDGs, food resources, functional food

発表責任者：清水　誠（ms205346@nodai.ac.jp）

講演番号：1S01A4a2
講演日時、会場：3 月 24 日 09:40～ A4 会場

SDGs における微生物の貢献～エネルギー・環境保全対策を中心に～

Microbial contribution to SDGs: Focused on energy and environmental protection areas

○橋本 渉[1]、河井 重幸[2]、村田 幸作[3] ([1]京大院・農、[2]石川県大・資源研、[3]摂南大・理工)
○Wataru Hashimoto[1], Shigeyuki Kawai[2], Kousaku Murata[3] ([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Res. Inst. Bioresour. Biotechnol., Ishikawa Pref. Univ., [3]Fac. Sci. Eng., Setsunan Univ.)

微生物の中には、動物や植物には見られない優れた機能を示し、持続可能な開発目標（SDGs）を達成できる可能性を秘めた細菌が存在する。本講演では、エネルギーや環境保全対策に適用可能な細菌の特異な細胞構造と生理機能を中心に紹介する。

グラム陰性の *Azotobacter vinelandii* は、「大気窒素」を窒素源として利用できる単生窒素固定細菌である。一方、ハーバー・ボッシュ法による「化学的窒素固定」は高温・高圧の条件下で行われ、莫大なエネルギーを必要とする。したがって、SDGs の観点から、「生物学的窒素固定」の割合を増やすことが重要である。*A. vinelandii* はポリヒドロキシ酪酸（PHB：バイオプラスチック素材）やアルギン酸（増粘多糖類）を生産する。廃食油からバイオディーゼル燃料（BDF）が生産される際、副生成物として「廃グリセロール」が生じる。そこで、*A. vinelandii* を用いて、「大気窒素」と「廃グリセロール」からバイオポリマーの生産を試みた。本菌は、好気的条件下で、水道水で希釈した「廃グリセロール」のみで良好に生育し、グリセロールを完全に資化した。その培養菌体の細胞切片を観察すると、細胞内に著量の PHB が蓄積し、細胞表層から形成される膜小胞にアルギン酸が内包されていた。本法は、BDF 製造を強力に推進するとともに、「大気窒素」を利活用する次世代の発酵技術として期待される。

近年、広大な排他的経済水域をもつ我が国において、藻類等の「海洋バイオマス」の利活用が求められている。グラム陰性の *Sphingomonas* 属細菌 A1 株は、養殖可能な褐藻類の主要成分であるアルギン酸を良好に資化する。A1 株細胞は、アルギン酸に対して正の走化性を示し、褐藻類の藻体表面に付着する。その際、高電位を示す大きな窪み（「体腔」）が細胞表層に形成され、負電荷を帯びたアルギン酸を濃縮する。そこで、A1 株を用いた「海洋バイオマス」の高度利用を目指した。A1 株のトランスクリプトミクスにより恒常的高発現プロモーターを同定し、メタボロミクスにより乳酸が副生成物として生じることがわかった。恒常的高発現プロモーター制御下の *Zymomonas mobilis* 由来エタノール発酵能を付与し、乳酸生成系を破壊した A1 株は、3 日間の好気的培養によりアルギン酸から 13g/L のバイオエタノールを分泌生産した。現在、酵母を用いた「海洋バイオマス」の利活用も進めている。また、ダイオキシン分解 *Sphingomonas* 属細菌に、A1 株の「体腔」を分子移植することにより、その分解能が向上することが示された。

以上のように、微生物の潜在能力を積極的に活用し、再生エネルギーの導入や廃棄物の削減等の SDGs を達成することがますます重要になると考えられる。

Marine biomass, Microbe, Nitrogen fixation

発表責任者：橋本　渉（whasimot@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：1S01A4a3
講演日時、会場：3 月 24 日 10:10～ A4 会場

作物の持続的な生産に向けた植物栄養からのアプローチ

Approaches for sustainable crop production from plant nutrition side

○馬 建鋒、山地 直樹（岡山大植物研）
○Jian Feng Ma, Naoki Yamaji (Okayama Univ.)

世界の人口は増え続けており、2050 年には 90 億に達すると予測されている。現在より 20 億多い人口を養うためには、今の倍の作物生産量が必要とされている。限られた土地と資源でいかに持続的に作物生産を高めていくかは、我々に課せられた重要且つ緊急な課題である。

作物生産量を高めるためには、さまざまなアプローチが考えられる。そのうちの 1 つは、問題土壌での生産性を改善することである。本シンポジウムでは、私どもが取り組んでいる酸性土壌について紹介する。酸性土壌は熱帯や亜熱帯に広く分布する典型的な問題土壌で、世界の耕地面積の３～４割を占めている。そこでの主な作物生育阻害因子はアルミニウム毒性である。アルミニウムは低濃度で素早く根の伸長阻害を引き起こし、作物の養分や水分の吸収を妨げる。しかし、一部の作物は長い進化の過程でアルミニウム耐性を獲得してきた。私どもは、アルミニウム耐性に関与するいくつかの輸送体をイネやオオムギから同定した。オオムギから同定した HvAACT1 は MATE(multidrug and toxic compound extrusion)ファミリーに属するクエン酸を輸送するトランスポーターであり、根圏にクエン酸を分泌することでアルミニウムをキレートし、無毒化する。HvAACT1 の発現はアルミニウム耐性と正の相関があり、耐性品種における高発現が上流のトランスポゾンの挿入によることが最近明らかとなった。その挿入は HvAACT1 の発現を高め、発現場所を根の根端に変化させる役割があった。面白いことに、アジア地域のアルミニウム耐性品種とヨーロッパの耐性品種にはまったく異なる挿入があるが、HvAACT1 の発現量と発現場所に関してまったく同じ役割をしていた。さらにその挿入をアルミニウム感受性品種に導入すると、酸性土壌耐性が強くなり、酸性土壌での生産性の向上が期待できる。

一方、肥料や作物の養分利用率を上げていくこともう 1 つのアプローチである。最近、我々はイネの節でリンの分配に関与する新規輸送体 SPDT を突き止めた。この輸送体は吸収されたリンを分配する際に、スイッチの役割をする。この遺伝子を破壊すると、収量にはほとんど影響せず、種子のフィチン酸濃度が 20-30％減少した。イネの種子中のリンの 8 割程度はフィチン酸の形態で存在し、人間や反芻しない家畜が消化できないため、環境に排出され、富栄養化を引き起こす。またフィチン酸は鉄や亜鉛などの金属と強く結合するため、我々のこれらの金属の吸収を阻害する。さらに、大部分のリンが収穫時に種子と共に圃場外に持ち出されるため、収穫量を維持するために、毎年多量のリン酸肥料を施与しなければならない。したがって、種子中のフィチン酸濃度を減らすことは環境だけではなく、我々の栄養や持続的な農業にも大事である。

plant nutrition, acid soil, P-use efficiency

発表責任者：馬　建鋒（maj@rib.okayama-u.ac.jp）

講演番号：1S01A4a4
講演日時、会場：3 月 24 日 10:50～ A4 会場

海洋微生物を活用した SDGs への挑戦　～海と森をホワイトバイオでつなぐ～

Challenge to SDGs utilizing marine microorganisms - Connecting the ocean and the forest with white biotechnology -

○大田 ゆかり（（国研）海洋研究開発機構)
○Yukari Ohta (JAMSTEC)

本シンポジウムでは，海洋性細菌の生物機能と有機合成化学を組み合わせたホワイトバイオテクノロジーによる，森林バイオマスの有効利用を通じた SDGs への挑戦について紹介する。

現在私たちは，木材などの陸上植物の主要成分であるリグニンを原料として，持続的に生産とその利用が可能な有用化学品を製造するための一連の技術開発に取り組んでいる。リグニンは，地球上で一次生産される主要な有機化合物のうちで最大の芳香族化合物資源であり，化石資源に変わる化学品原料として期待されている。

他方，細菌の多くは光合成を起点として一次生産された多様な有機化合物を代謝変換する優れた機能を持っている。近年私たちは，海底沈木から単離した *Novosphingobium* 属細菌が，複雑な芳香族重合体であるリグニンを構成する単位モノマー間に，高頻度でみられるエーテル結合を選択的に開裂することを見出した。本菌株が持つ酵素群を利用し，木材から抽出したリグニン画分を原料として，フェニルプロパノン構造を有する芳香族モノマーのワンポット生産を試みた。

フェニルプロパン系化合物は，工業分野においては，香水，香料，精油，殺菌剤，麻酔薬，抗酸化剤などの医薬品や機能性食品及びそれらの合成中間体となる有用な化合物群である。しかしながら，同化合物は，複雑な反応性を示すことや供給源の面で条件が整わずに，これまで充分な利用研究がなされているとは言い難い。そこで上記方法で得られる芳香族モノマーを基幹化合物としてリグニン有効利用の可能性を探ることとした。これまでに，シンプルな有機合成反応を組み合わせて，新規な各種ポリマー製造用原料として有望な化合物の合成にも成功している。

本研究での取り組みが，7. エネルギー，8. 持続的な経済成長，9. 産業と技術革新の基盤，12. つくる責任 つかう責任，13. 気候変動対策，14. 海の豊かさ，15. 陸の豊かさ，などを始めとする様々な SDGs への貢献となるべく，今後もさらなる研究開発に邁進する所存である。

marine bacterium, lignin, white biotechnology

発表責任者：大田ゆかり（ohtay@jamstec.go.jp）

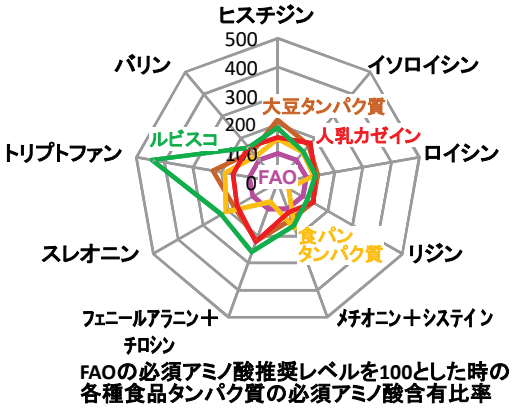
講演番号：1S01A4a5
講演日時、会場：3 月 24 日 11:20～ A4 会場

畑で見つけた健康長寿社会を支える高栄養価タンパク質
Highly nutritional protein found in the farm field

○横田 明穂（奈良先端大名誉教授）
○Akiho Yokota (NAIST, Prof. Emer.)

キャベツ地上部は大きく分けて作物として出荷されている芯に近い部分の重量が 7 割近くを占め、その周辺を深緑の外葉が取り囲んでいる。芯の部分は貯蔵組織で、デンプンを多く含み甘くて柔らかい。日本の外葉年間発生量はほぼ 100 万トンに達しほとんどが捨てられているが、この廃棄外葉には 10,000 トンを超える光合成 CO_2 固定酵素（ルビスコ）が含まれている。

ヒトにとって栄養価が高いタンパク質とは必須アミノ酸含量が高く、さらに必須アミノ酸量比がヒトのタンパク質の比に近いものである。一般に鶏卵や鶏肉は必須アミノ酸総量と構成が優れている。一方、食料源になっている植物性タンパク質は一般にリジンやトリプトファン含量が低い。植物性タンパク質の中でこのような一般原則から大きく逸脱しているのがルビスコである。1970 年ごろ、ルビスコが必須アミノ酸に富むことが見出され、その後食料としての利用を目指した研究が各国で続けられてきたが、鶏卵などと比べて特に優れた点は見出せず、未だにこのタンパク質がタンパク質源として利用されたという例はない。



FAOの必須アミノ酸推奨レベルを100とした時の
各種食品タンパク質の必須アミノ酸含有比率

約 3,600 種に及ぶルビスコ及びルビスコ様遺伝子が解読された現在、タンパク質源としてのルビスコの位置付けも大きく変化した。キャベツルビスコ遺伝子の塩基配列から予測され、タンパク質化学的解析からも確認されたアミノ酸配列に基づいたルビスコ構成アミノ酸から計算した結果、すべてのルビスコで共通して 1 g タンパク質に含まれる必須アミノ酸含量が FAO/WHO が推奨する量の 2 倍以上の含量を有していた。もう一つのルビスコの特徴はトリプトファン含量が高いことであった。滋賀県を始めいくつかの長寿県では、緑黄色野菜を恒常的に豊富に摂取していることが平均寿命の延伸に関係している可能性が示唆されている。

このような情報を元に、キャベツ外葉から葉緑体内で機能している状態、いわゆる無傷の状態のルビスコを調製する方法を確立し、トリプトファンと長寿との関連やルビスコの活用方法を現在研究中である。本シンポジウムでは、これらの研究の今後の方向、さらには SDGs との関連などについて議論する。（本開発研究は奈良県及び滋賀県県からの支援を受け、（株）植物バイオテック（設立予定）、（株）パンドラファームグループ、滋賀医科大学の共同研究として進めている。）

RuBisCO, nutritional protein, tryptophan

発表責任者：横田　明穂（yokota@bs.naist.jp）

講演番号：1S02A3a1
講演日時、会場：3 月 24 日 09:05～ A3 会場

アカデミア創薬をひと押しするコムギ無細胞系を基盤とした支援技術

One-push technology supporting for academia drug discovery based on a wheat cell-free system

○澤崎 達也（愛媛大 PROS）
○Tatsuya Sawasaki (Ehime Univ. PROS)

アカデミア研究者において、タンパク質を対象とした薬剤探索は、まだまだ敷居が高いのが現状である。その大きな理由は、創薬への道のりが何となく長く複雑であると思われていることにある。確かに、１）標的としているタンパク質の発現系構築、２）薬剤探索に向けたアッセイ系構築、３）数万種類の化合物を対象としたスクリーニング、４）候補化合物から効果の高い薬剤の絞り込み、５）細胞での毒性評価や薬効評価、そして６）化合物展開など、進めるべき手順や手法は多種多様で、どの手法・技術が自分のタンパク質に適しているのか、考えるポイントが多すぎるのが現状である。また、例えば、自分のタンパク質が酵素で無かった場合は、そもそも阻害剤なんて取得できるイメージが湧かない、など創薬に向けてどの様なプローチがあるのか、良く分からないとの質問を受ける。その様な状況を打破するために組織化されたのが BINDS である。

我々は、アカデミア創薬をひと押しできる技術として、コムギ無細胞系を基盤とした様々な技術を開発してきた。コムギ無細胞系はタンパク質を試験管内で合成する技術であり、タンパク質を精製することなく、合成反応液を直接薬剤探索に利用できるためアッセイ系構築が楽など、上記の 1～4)までをシームレスに進めることができるためアカデミア創薬に有利な点が多い。要は、創薬への敷居を低くしてくれる技術であるといえる。例え酵素で無くても、先ずは相互作用するタンパク質の探索からスタートし薬剤探索は可能であり、実際我々は、タンパク質-タンパク質相互作用やタンパク質-DNA を指標に、複合体形成阻害剤や転写因子の阻害剤を取得してきた。これらを例に、アカデミア創薬をひと押しする支援技術の紹介を行う。

BINDS, drug screening, cell-free

発表責任者：澤崎達也（sawasaki@ehime-u.ac.jp）

講演番号：1S02A3a2
講演日時、会場：3 月 24 日 09:30～ A3 会場

基礎研究から創薬への一歩を手厚く支援する共用研究基盤

Supporting common facilities for entry from basic research to drug discovery

○小島 宏建（東大創薬機構）
○Hirotatsu KOJIMA (DDI, UTokyo)

ライフサイエンス研究での新しい知見やアイデアをもとに、医薬や農薬、化粧品材料、生命現象解明のための研究用試薬の開発などに有用な化合物を探されたい研究者を私どもは手厚く支援している。

2007 年より化合物ライブラリーとスクリーニング施設の整備を開始し、現在は製薬企業の寄託化合物 6 万を含む 28 万の化合物サンプルとサンプル溶液の微量分注装置、各種スクリーニング機器を産学官の所属を問わず、利用を希望する研究者にいつでも低コスト（サンプル自体は無料で、送料やプレートなどの消耗品の実費のみ）で提供できるよう維持している。

化合物スクリーニングの実施方法は、頭では想像できるものの、実際に実施するためには様々なノウハウが必要である。スクリーニング研究への参入を丁寧にお手伝いすべく、サンプルの提供や施設の開放といったハード面のみならず、スクリーニングの方法や化合物サンプルの選択、発見した活性化合物からさらに優れた特性を示す化合物への化学合成支援など、ソフト面に関する相談も経験豊富なスタッフにより充実させている。また、半実習的なスクリーニング技術に関する初心者向け講習会（受講無料）を年に数回実施し、技術の普及にも努めており、毎回多数の方が受講されている。

ご興味がある方は創薬機構のウェブサイト（https://www.ddi.u-tokyo.ac.jp/）をご覧いただき、お気軽にお問い合わせください。

Chemical screening, Chemical library, Drug discovery

講演番号：1S02A3a3
講演日時、会場：3 月 24 日 10:00～ A3 会場

タンパク質-基質相互作用のバイオインフォマティクス解析とその応用
Bioinformatics analysis of protein-ligand interactions and their applications

○富井 健太郎（産総研）
○Kentaro Tomii (AIST)

われわれのグループでは、タンパク質のアミノ酸配列や立体構造等に関する大規模データを利用した、立体構造予測法、相互作用予測法、機能部位予測法等の開発と提供を行っている。近年の生体分子に関する解析技術の発展に伴い、配列情報や立体構造情報は急激に蓄積が進んでいる。こうした大規模データを効果的に取り扱い、そこから生物学的知識を発見・抽出するための計算科学的手法の開発を行いながら、開発手法をはじめとするバイオインフォマティクスの手法を生物学上重要と考えられる研究課題推進の支援に応用している。これまでに開発した高感度タンパク質類似性検索法 FORTE を用いて、従来の配列類似性検索手法では検出できなかった構造・機能ドメインの同定を行っている。また FORTE は従来の配列比較法よりも正確なアラインメントを構築できることから、そのアラインメントに基づく立体構造予測あるいは機能（部位）予測等を通してタンパク質機能解析の推進、効率化に寄与している。また、タンパク質の立体構造に関する大規模データを利用したタンパク質基質結合(候補)部位類似性検索のためのデータベース PoSSuM を構築し、基質結合候補部位の探索や結合基質の推定に役立てている。

本発表では、植物のホルモン受容体と農業の分野での利用が期待される化合物との相互作用に関するバイオインフォマティクス技術を活用した解析例について紹介する。ジベレリンに対する応答に関連するタンパク質が新たに同定され、また、大豆製品などに豊富に含まれるゲニステインの標的が同定されたタンパク質の一つであることが明らかにされた。バイオインフォマティクス技術を利用した複合体・基質結合モードの予測などを通して、基質特異性の要因推定を行った。また、アブシジン酸（ABA）アゴニストと ABA 受容体の相互作用に重要なアミノ酸残基を、バイオインフォマティクス技術を利用した解析により同定し、結合様式の推定を行った。こうしたバイオインフォマティクス技術の利用が、阻害作用の機序解明や阻害剤開発に結びつきつつある。

Protein, Bioinformatics, Receptor

講演番号：1S02A3a4
講演日時、会場：3 月 24 日 10:30～ A3 会場

クライオ電子顕微鏡による原子分解能解析

Atomic resolution cryo-EM single-particle analysis

○岩崎 憲治[1]、杉田 征彦[2]、廣瀬 未果[2]、川本 晃大[2]、宮崎 直幸[2] ([1]筑波大 TARA、[2]阪大蛋白研)
○Kenji Iwasaki[1], Yukihiko Sugita[2], Mika Hirose[2], Akihiro Kawamoto[2], Naoyuki Miyazaki[2] ([1]Univ. of Tsukuba, [2]Osaka Univ.)

本講演では、最先端のクライオ電子顕微鏡（以下 cryo-EM）技術による生体分子の構造解析手法を紹介する。次から次へとトップジャーナルに紹介される生体分子の構造には従来では不可能と考えられていたフィコビリソームのような大きく複雑なものから、ダイナミックな分子の動きを捉えた構造多型の解析まで、技術革新を反映した結果が続いている。ターゲット分子を液体に非常に近い状態の氷に包埋し、Cryo-EM で撮影する。たくさんの分子の画像（粒子画像という）から統計処理によって得られた密度図使って原子モデルを構築する。この構造解析手法を日本では単粒子解析法と呼ぶが、近年のその劇的な進歩が、2017 年度のノーベル化学賞の背景にあったことは間違いない。特にデータベースには cryo-EM 単粒子解析によって解明された分子の構造が 2013 年を境に急速に登録されるようになった。では、そこで起きた技術革新とは何か、どのような分子の構造解析に使えるのか。技術革新の中心として電子直接検出カメラの登場が挙げられることが多い。それまでのカメラの弱点であったボケを解消する装置として開発が進められていたものだが、高速で撮影できるという点が思わぬ効果をもたらした。動画撮影である。これによって氷包埋試料の cryo-EM 撮影で長年問題だった試料微動の問題が一挙に解決した。それだけではない。電子を一個二個と数えられるようになったのである。これによってさらに記録されるターゲット分子の信号強度は改善され、cryo-EM の苦手な小さな分子の解析もできるようになってきた。実際我々のところでも、電子直接検出カメラを電子カウント機能付きのものにアップグレードしたところ、β-galactosidase の解析においてそれまで 3Å台だった分解能が一挙に 2.3Å分解能まで改善された。ここまでくると結合水が見えてくる。カメラだけではない、高機能高効率の cryo-EM の登場、そして RELION という非常に優れた画像解析ソフトウェアの登場がある。どれか一つ欠けても現在のようなスピードでなおかつ高分解能で構造解析することは不可能だろう。本手法は、100kDa より小さい分子は不可能と考えられてきたが、Danev 博士のボルタ位相板の開発や試料作製の工夫などにより分子量 30kDa レベルの解析まで 2017-2018 年にかけて一挙に到達した。単粒子解析法は形が均一な分子の解析に適しているが、一方で同一溶液中における分子の構造多型の解析が、粒子画像集団をアンサンブルとして扱う本手法では可能であることが指摘されてきた。以前は、粒子画像における分子形状の違いが、撮影されたときの分子の向きが異なるものなのか、それとも構造が異なるためなのが、区別がつかなかった。RELION は、この問題を克服し、multibody refinement の技術として一般化を図っている。このような最先端の手法を紹介する。

cryo-EM, EM, single particle analysis

発表責任者：岩崎憲治（ikenji@tara.tsukuba.ac.jp）

講演番号：1S02A3a5
講演日時、会場：3 月 24 日 11:00～ A3 会場

BINDS 事業における立体構造解析技術開発
R&D of tertiary structure analysis techniques in BINDS

○千田 俊哉（高エネ機構物構研構造生物）
○Toshiya Senda (KEK, IMSS, SBRC)

創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム事業（BINDS）は、構造生物学をはじめとして、化合物スクリーニングなど様々な創薬関連技術を提供することで、国内のライフサイエンス研究者をサポートしようという事業である。ただし、対象としている研究は創薬関連研究だけではなく、基礎研究や農学、工学分野のライフサイエンス研究も幅広くサポートしている。どのようなサポートが受けられるかに関しての詳細は、プロジェクトのホームページ（http://binds.jp/）を参照されたい。様々なサポートの中で、中心的なサポートに挙げられるのは、放射光 X 線を利用した結晶構造解析や X 線小角散乱（Bio-SAXS）に関する支援である。放射光 X 線を利用した構造解析に関しては、高エネルギー加速器研究機構の Photon Factory（PF）および理研播磨の SPring-8 と SACLA が利用可能となっている。BINDS 事業に於いては、それぞれの施設が、それぞれの特徴を生かした支援を行なってきた。PF において特に力を入れているのが低エネルギー（長波長）X 線を利用した Native SAD/MR-Native SAD 法による構造解析である。この手法は、位相決定のために重原子やセレノメチオニンを導入する必要が無いため、一般的な位相決定の手法となり得るものである。Native SAD 法を成功させるためには高精度の回折強度測定が必要とされるが、He チャンバーやピクセルアレイ型検出器の導入を経て Native SAD 法による構造解析の成功例が増加しつつあり、実用に耐える技術になりつつある。また、Bio-SAXS の分野においても SEC-SAXS 法の導入など、最新の手法を取り入れることで溶液構造の解析例が増加しつつあり、結晶構造解析との組み合わせ解析例も増えてきた。最近では、平衡にある系の解析も可能になりつつある。放射光利用に加え、クライオ電子顕微鏡に関する構造解析のサポートが始まったことは、BINDS プロジェクトの大きな特徴の一つである。国内にある数少ないハイエンドのクライオ電子顕微鏡を効率的に使い最大限の成果を創出するために、本プロジェクトにおいては電子顕微鏡に役割を設定している。近原子分解能の解析を可能とするような良質なグリッドを作成するためのスクリーニング用クライオ電子顕微鏡（E1）と、E1 施設で得られた良質なグリットを利用して高分解能データを取得するためのハイエンドクライオ電子顕微鏡（E2）である。このようなグループ化を行うことで、高分解能データ取得を効率よく行い、近原子分解能の構造解析が可能となると考えている。発表では、これらの技術の現状と利用法、そしてそこから生み出されている結果について概説したい。

Tertiary Structure determination, X-ray crystallography, Cryo-electron microscopy

発表責任者：千田俊哉（toshiya.senda@kek.jp）

講演番号：1S02A3a6
講演日時、会場：3 月 24 日 11:30～ A3 会場

分子機能解明に向けた構造生命科学の統合アプローチ
Integrative approach of structural life science for elucidating molecular function

○宮川 拓也、田之倉 優（東大院・農生科）
○Takuya Miyakawa, Masaru Tanokura (Grad. Sch. Agr. Life Sci., Univ. Tokyo)

生命現象を構築する化学反応と分子間相互作用を原子レベルで理解し、得られた知見を創薬等のバイオテクノロジーに利用する「構造生命科学」において、X 線結晶構造解析は生命現象を担うタンパク質や核酸、それらに結合して機能する多様な生体分子や薬剤の作用構造を解析するための最も有効な手法の一つである。PDIS やその後継の BINDS 等のプロジェクトでは、Photon Factory や SPring-8 等の大型放射光施設におけるビームラインとデータ収集の技術開発が進められ、専門ではない研究者であっても X 線結晶構造解析に取り組めるようになってきたことから、多岐に渡る生命科学分野において構造情報のさらなる活用が期待される。

X 線結晶構造解析によって視覚化された生体分子の 3 次元構造は、多くの場合に化学反応と分子間相互作用を説明するための主要な構造基盤を示唆してくれる。しかしながら、結晶構造で見られる限られた分子状態のスナップショットだけでは理解が困難な生体分子の作動機構に関しては、欠落した情報を補完しなければならない。そこで、精緻な構造情報の取得に加えて、他の手法を組み合わせた統合的なアプローチによる解析が重要になる。演者らは最近、そうした解析が必要な複数の事例に遭遇しており、これに対しては X 線結晶構造解析によって得られた構造情報に、X 線小角散乱（SAXS）、分子動力学（MD）シミュレーション、ケミカルバイオロジー等の手法を組み合わせることで、異なるタイプの細胞内タンパク質の作動機構の解析を試みている。例えば、精子の鞭毛に局在する Ca^{2+}結合タンパク質のカラクシンは、精子が卵に向かって遊走するための鞭毛運動を Ca^{2+}依存的に制御するが、カラクシンの Ca^{2+}結合型・非結合型の結晶構造の比較では、その制御機構を説明することが困難であった。カラクシンには Ca^{2+}結合型・非結合型でほぼ同一の 2 種類の結晶構造（開構造及び閉構造）が観測され、これら構造の理論散乱曲線と SAXS により得られた溶液状態のカラクシンの散乱曲線を比較解析することにより、Ca^{2+}結合は開構造から閉構造へとカラクシンの構造遷移を誘導することが示された。

演者らがこれまでに取り組んできた統合アプローチのための解析手法は、いずれも BINDS プロジェクトにおいて専門の研究者による支援を受けて利用できることから、BINDS による支援は生体分子の機能解明を加速する上で有用である。本講演では、BINDS から支援を受ける視点で、X 線結晶構造解析とそこから得られる構造情報に基づいた統合アプローチによる解析例を紹介する。

X-ray crystallography, integrative structural analysis, structure-function relationship

発表責任者：宮川拓也（atmiya@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：1S03B6a1
講演日時、会場：3 月 24 日 09:05～ B6 会場

緑茶の機能性を多面的に捉えるメタボリック・プロファイリング

Metabolic Profiling for a Multifaceted View of the Functionality of Green Tea

○藤村 由紀[1]、三浦 大典[2]、立花 宏文[1] ([1]九大院農、[2]産総研)
○Yoshinori Fujimura[1], Daisuke Miura[2], Hirofumi Tachibana[1] ([1]Fac. Agric, Kyushu Univ., [2]AIST)

現状の食品の機能性評価技術は、主としてその機能性を特定の単一含有成分の情報（量や効果の強さ）のみで説明しようとするため、共存する複数の成分の影響を厳密かつ同時に評価することが難しい。そのため、当初想定していた機能性をうまく享受できなかったり、効能を得るために大量摂取するなどの要因にもなっており、既存の評価技術の限界も指摘されている。複合成分系である食品の機能性は個々の成分の協調的作用の上に成り立つため、複数成分の共存下での特定成分の特異的な挙動や共存成分との潜在的関係性を可視化できる概念・技術が求められている。

これまでに、我々は含有する一連の低分子化合物群の量比バランスで試料間の性質（表現型）を客観的に評価できるメタボリック・プロファイリング法の開発を行ってきた（***Anal. Chem***., 82, 498, 2010; ***Genes Cells***, 18, 1107, 2013; ***Molecules***, 22, E1621, 2017）。本法は、バイオマーカー探索、病態評価、疾病発症機構の解明（***J. Toxicol. Sci***., 35, 365, 2010; ***Pancreas***, 43, 311, 2014; ***Atherosclerosis***, 240, 250, 2015; ***BBRC***, 496, 140, 2018）に有効であると共に、食品の品質鑑定・予測ならびに要因解析の新手法としても着目されている（***PLoS One***, 8, e70098, 2013; ***J. Agric. Food Chem***., 63, 3742, 2015）。また、本プロファイリング解析は、数十種類の茶（*Camellia sinensis* L.）品種の機能性評価（機能性品種の判別やその予測モデルの構築／生理活性因子や共存成分バランスの解明等）にも有効であった（***PLoS One***, 6, e23426, 2011）。本結果は、複合成分系である緑茶の機能性をその「成分量比バランス」で簡便に評価できることを意味している。このような計量化学的アプローチは、機能性を付与した新規品種開発や既存品種の有用性発掘に役立つことが十分に期待できる。

一方、我々は緑茶カテキンの多彩な生理作用を特異的に仲介する細胞膜受容体を同定すると共に、生体が緑茶カテキンを感知する詳細な仕組みを明らかにしてきた（***化学と生物***, 54, 698, 2016）。また、緑茶のプロファイリング解析により、緑茶カテキンの感知力を高めることでその機能性（抗がん作用など）を増強する成分の同定（***Sci. Rep***., 5, 9474, 2015）にも成功してきた。さらに、緑茶の機能性（抗酸化活性）を示す「成分の組合せ」抽出法の開発（***Sci. Rep***., 7, 2257, 2017）を進めると共に、プロファイリング解析が緑茶の機能性（血糖上昇抑制作用）関与成分の同定や機能性に寄与する成分の組合せ提示にも役立つことを見出してきた（***Sci. Rep***., 9, 16041, 2018）。本講演では、緑茶の機能性を多面的に捉えるプロファイリング解析研究の一端を紹介したい。

Metabolic Profiling, Green Tea, Functionality

発表責任者：藤村 由紀（fujimu@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：1S03B6a2
講演日時、会場：3 月 24 日 09:30～ B6 会場

クッキングメタボロミクス～調理・加工中における食品成分の網羅解析～

Cooking metabolomics ~comprehensive analysis of compounds in processing and cooking foods~

○及川 彰[1,2] ([1]山形大農、[2]理研 CSRS)
○Akira Oikawa[1,2] ([1]Yamagata Univ., [2]RIKEN CSRS)

我々が毎日口にしている食品には非常に多くの化合物が含まれている．その中には，食品の風味に関わるアミノ酸や糖類などの化合物や，ヒトの健康に関与する機能性成分などが含まれる．従来の食品分析では，主にこれらの風味や機能性に関わる数種類の化合物だけに焦点が当てられてきた．しかし，実際に食している食品の中には，既知や未知の化合物が数百～数千種類含まれていると想定され，これらについて得られている情報はまだ少ない．また，加熱・濃縮などが行われる食品加工や調理中における成分変化についても，いくつかの風味や機能性に関わる成分やメイラード反応生成物など，一部の化合物に注目した研究がほとんどであった．

近年，化合物を網羅的に解析できる技術であるメタボロミクスが，食品や農産物分野にも応用されてきている．しかしその多くは，加工・調理前の農産物に対して行われたものであり，実際に口にしている加工・調理後の食品におけるメタボローム情報はほとんど明らかにされていない．我々は，このブラックボックスである加工・調理中における食品中成分の網羅解析を，「クッキングメタボロミクス」と命名し，現在下記のようないくつかの食品を対象に研究を行っている．

干し柿は，柿の代表的な加工品である．従来は天日干しで数週間かけて製造されていたが，現在は工場などで乾燥機によって製造される場合もある．干し柿の製造中においては，柿に含まれる成分が濃縮され，甘みや柿の風味が増すことなどが知られていたが，その他の成分変動については明らかにされていない．本研究では，糖類の増加だけでなく，カロテノイド類を含むいくつかの機能性成分の増加や，メイラード反応生成物と考えられる糖アミノ酸が合成されることを明らかにした．現在，柿品種間における乾燥時の成分変動の差異や，成分変動に注目した乾燥方法の比較などを行っている．

山形県庄内地方では，冬の汁物に酒粕を多く用いる食文化を持っている．その際，酒粕は味噌と一緒に加熱されることが多い．本研究では，酒粕および味噌単独での加熱による成分変化に加え，予め酒粕と味噌を混ぜた後に加熱したサンプルに含まれる成分を明らかにし，比較解析することを試みている．

本シンポジウムでは上記に加え，いくつかの加工・調理における成分変動解析にメタボロミクスを用いた例を紹介する．

metabolomics, cooking, food processing

発表責任者：及川　彰（oikawa@tds1.tr.yamagata-u.ac.jp）

講演番号：1S03B6a3
講演日時、会場：3 月 24 日 09:55～ B6 会場

メタボローム解析を活用した食品機能性全体像の解明

Metabolome analysis reveals global functions of food

○高橋 春弥、後藤 剛、河田 照雄（京大農）
○Haruya Takahashi, Tsuyoshi Goto, Teruo Kawada (Kyoto Univ. of Agric.)

飽食の現代社会において、種々の生活習慣病を惹起する肥満は深刻な問題である。厚生労働省は、健康日本２１を定め、肥満を解消あるいは予防するため、食事制限や運動の習慣づけをするよう提示してきたが、肥満者割合の効果的な減少には至っていないのが現状である。このため、より効果的な肥満予防法を提示することが、国民健康増進の観点から、喫緊の課題である。

日々の食生活は、肥満予防の最前線であると捉えることができる。誰しもが、「バランスの良い食生活が、健康維持に重要」であることを知っている。しかし、何をもって「バランスが良い」と定義するのか、その実態はかなり曖昧である。なぜならば、そもそも、食品中に「どのような成分」が「どれほどの量」存在しているのか、その全体像が把握できていないからである。我々は、主に肥満予防に重要な脂質代謝に着目し、脂肪酸酸化を促す作用に重要なペルオキシソーム増殖剤応答性受容体（PPAR）α を活性化させる成分を食品・植物から探索し、これまでに多数同定してきた。これらの成分以外にも、国内外の研究グループの活発な研究により、食品には様々な機能性成分が存在することが明らかにされる一方、これらの成果は、食品に含まれる成分の一部を明らかにしたにとどまる。未だに我々は、食品の全体像について十分に理解できていないのが現状である。

近年の質量分析技術とデジタル技術の向上・融合により誕生したメタボローム解析は、サンプルに含まれる低分子代謝物を網羅的に解明できる強力なツールである。我々は、PPARα を活性化させた際に生じる生体内代謝変動の全体像把握のため、メタボローム解析を活用した。肥満状態のマウスに PPARα 活性化剤を投与すると、多様な内因性代謝物が変化し、その中でリゾリン脂質の一種である palmitoyl lysophosphatidylcholine [LPC(16:0)] が血中で増加していることを見出した。LPC(16:0) は、PPARα 活性化によって肝臓で多く生成され、脂肪細胞においては糖取込み能の増強、肝細胞においては PPARα を活性化させる作用があることを見出した。

現在、我々は、このメタボローム解析を食品に含まれる成分の網羅的解析に応用し、食品の機能性実験と融合させた、新しい食品機能性評価系の構築を目指している。これにより、従来法では限界のあった食品機能性の全体像を把握することを可能とし、食品中に「どのような成分」が「どれほどの量」存在しているのかを明らかにすると同時に、「バランスの良い食生活が、健康維持に重要」を科学的に解明・説明することで、国民健康増進の一助となることを期待する。

metabolome analysis, functions of food

講演番号：1S03B6a4
講演日時、会場：3 月 24 日 10:30～ B6 会場

リピドミクス解析を活用した食肉評価および栄養素摂取比率の推定

Evaluation of meat and estimation of nutrient intake ratio utilizing lipidomics analysis

○三浦 進司[1]、妹尾 奈波[1]、梅林 脩平[1]、井上 瑞樹[1]、山本 俊佑[1]、三好 規之[1]、守田 昭仁[1]、亀井 康富[2] ([1]静岡県大食、[2]京都府大生命)
○ Shinji MIURA[1], Nanami SENOO[1], Shuhei UMEBAYASHI[1], Mizuki INOUE[1], Syunsuke YAMAMOTO[1], Noriyuki MIYOSHI[1], Akihito MORITA[1], Yasutomi KAMEI[2] ([1]Univ. of Shizuoka, [2]Kyoto Pref. Univ.)

脂質は生体膜の構成成分、エネルギー源、シグナル分子などとして多彩な役割を担う分子である。生体内には数多くの脂質分子種が存在し、その多様性が様々な生命現象や機能制御に関与することが類推されている。しかし、その分子実体やメカニズムについては不明な点が多い。生体膜の主要な構成成分である phosphatidylcholine (PC)は、グリセロール骨格に２つの脂肪酸が結合した構造を有するため、結合している脂肪酸の組み合わせから生体内には数多くの分子種が存在する。演者らはこれまでに、独自に開発したリピドミクス解析法を用いて、骨格筋に含まれる PC 分子種が骨格筋性状によって異なることを明らかにし、PC に結合している脂肪酸種の違いを生じるメカニズムの一端を捉えることにも成功している。すなわち、骨格筋を形成する筋線維は、収縮速度の違いから速筋タイプと遅筋タイプに大別されるが、マウスの速筋中には 1-palmitoyl-2-docosahexaenoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (**PDPC**)が多く存在し、遅筋中には **PDPC** に加え 1-stearoyl-2-docosahexaenoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (**SDPC**)も多く存在することを見出した。また、持久運動トレーニングによって「後天的に遅筋化した骨格筋」においても **SDPC** 量の増加が観察され、その増加には「遅筋化を促す転写共役因子 PGC-1α」が必要であることを明らかにした。以上のことから、PC 分子種の違いが筋線維タイプごとの特性に寄与していることが示唆される。この知見をもとに、食肉に含まれるリン脂質分子種について網羅的に解析したところ、動物種、銘柄、餌の種類などによって含有されるリン脂質分子種が異なっていることを見出している。

一方、炭水化物、脂質の摂取比率の適正化は栄養指導の基本であるが、この比率を推定できる特異的なバイオマーカーは存在しない。長期間の高炭水化物食摂取は、肝臓での脂肪酸生合成を促進するため、肝臓から分泌されるリポタンパク質中の PC に結合する脂肪酸種にも変化が生じると考えられる。そこで演者らは、リピドミクス解析法を用いて血漿に含まれる PC 分子種を網羅的に測定し、炭水化物、脂質の摂取エネルギー比率に応じて変化する PC 分子種の同定を試みた。その結果、脂質エネルギー比率の増加にともなって、マウスおよびヒト血漿中の 1-palmitoyl-2-palmitoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (**PPPC**)、1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (**POPC**)が減少することが明らかとなった。**PPPC** と **POPC** は、炭水化物、脂質の摂取比率を反映する新規バイオマーカーになる可能性がある。

phospholipids, skeletal muscle, carbohydrate-fat ratio

発表責任者：三浦進司（miura@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：1S03B6a5
講演日時、会場：3 月 24 日 10:55～ B6 会場

NMR および GC/MS メタボロミクスによる発酵食品成分の包括的解析
NMR- and GC/MS-based metabolomics for comprehensive compositional analysis of fermented foods
○冨田 理（農研機構食品研）
○Satoru Tomita (Food Res. Inst. NARO)

温暖湿潤な我が国では多種多様な発酵食品/飲料が生まれ、受け継がれてきた。とりわけ、酒、しょうゆ、酢、みそなどは「和食文化」に欠かせない要素である。また今日ではパン、ヨーグルトなど海外の発酵食品も日本人の食を支えている。近年、発酵食品は伝統的食文化や健康増進などの観点から消費者の関心を集めているが、その現場では職人的な経験と勘を頼りに製造が行われていることが少なくない。そのため食品成分による客観的な指標(マーカー)を取り入れ、発酵工程の管理や品質の向上に役立てることが望まれている。

発酵食品の製造には発酵微生物の代謝活動が密接に関わっており、発酵工程において様々な代謝物（メタボライト）が消費・生産されることで独特の味・香りが形成される。その際、使用されるスターター菌株の特性、原料の状態、温度や塩分濃度といった環境条件など、多数の要因が複雑に関わり合いながら発酵が進行することになる。幅広い成分をノンターゲットで取り扱うメタボロミクスの手法は、このような複雑性をもつ発酵食品の解析に対してアドバンテージを有していると期待される。実際に、ヨーグルト、チーズ、ワイン、ワインビネガー、サワードゥなど、海外の代表的な発酵食品の解析に用いられており、日本においても、しょうゆ、みそ、漬物、食酢、日本酒などを対象とした解析例がみられる。

これまでに我々は NMR 法と SPME-GC/MS 法を用いて、漬物、食酢、パン生地、甘酒などの解析を行ってきた。特に、長野県木曽地方に伝わるユニークな無塩乳酸発酵漬物「すんき」に着目し、その水溶性・揮発性成分組成を解明するとともに、製品間・年次間での多様性や、品質に寄与する指標成分を解析してきた。最近では、16S rRNA メタゲノム解析によって明らかにしたすんきの乳酸菌叢データを活用し、指標成分の多寡を決定づける乳酸菌種について重要な知見を得ている。また、メタボロミクスのさらなる活用として、食品の発酵に適する乳酸菌株のスクリーニングを試みた。ミックス野菜ジュースに乳酸菌を接種し、生成された代謝産物の組成を解析したところ、糖・有機酸・アミノ酸などの消費/生産性が異なる菌株が迅速に判別された。同一菌種に属する菌株についても代謝物の明確な差異が検出され、乳酸菌の異なる発酵特性を菌株レベルで判別できることが実証された。本シンポジウムでは発酵食品研究へのメタボロミクスの適用例としてこれらの研究成果について紹介したい。

参考文献　Tomita et al., Food Chem., 258, 25-34 (2018)
Tomita et al., PLoS ONE, 12(7), e0182229 (2017)

Fermented food, Metabolomics, Lactic acid bacteria

発表責任者：冨田 理（satorutomita@affrc.go.jp）

講演番号：1S03B6a6
講演日時、会場：3 月 24 日 11:20～ B6 会場

食品メタボロームレポジトリ：注目成分を決める新たな基盤

Food Metabolome Repository for prioritizing the compound peaks for further investigation

○櫻井 望[1,2] ([1]国立遺伝学研究所、[2]かずさ DNA 研究所)
○Nozomu Sakurai[1,2] ([1]National Institute of Genetics, [2]Kazusa DNA Research Institute)

本講演では、食品メタボロームレポジトリ（http://metabolites.in/foods、以後、食レポと略す）を紹介する。食レポは、代表的な食品 222 種類を、液体クロマトグラフィー-質量分析（LC-MS）を用いて、解析対象化合物を限定しない（ノンターゲットな）メタボローム解析を行った結果を収めたデータベースである。未知の成分ピークであっても、それが含まれる食品を検索することができるので、その成分の分布状況から研究を進めるための手がかりを得ることができる。例えば、ある成分ピークが発酵食品に特異的に含まれており、その原材料には含まれていなかったとすると、発酵の過程でできたものと推測できる。また、ヒトの血中や尿などに含まれる未知成分の推定にも役立つことが期待される。血液や尿中には、食品由来成分やその代謝化合物（グルクロン酸抱合体など）が多数存在すると考えられているが、多くのものは既知の化合物データベースには登録されていない。未知成分ピークを含めた食品成分の情報を、代謝による構造変化の質量差分を考慮して血液や尿中の未知成分と比較することで、食品由来の代謝成分を推定できる場合がある。このように食レポは、研究を進めるべき候補成分に優先順位をつけたり、食品成分の体内動態を考察したり、あるいは食品由来のバイオマーカー探索などを行ったりするのに役立つ、新たな情報基盤である。

食レポを構築した背景は、未知化合物の同定・推定（アノテーション）の難しさが、依然としてノンターゲットメタボローム解析の律速となっていることである。何かの表現型と関連の強い候補ピークがいくつか見つかったとしても、アノテーションがつけられないために解釈ができないことがある。また、MS/MS スペクトルからの構造推定は精力的に研究が進められているが、一番スコアの高い候補が常に正解とは限らず、最終的には人間の判断に頼らざるを得ないのが現状である。すなわち、アノテーションの問題の本質は、アノテーションが難しいこと自体と言うよりも、むしろ、どの成分候補を優先して研究を進めるべきかを決めるための他の情報がないことと言える。その新たな情報として、由来試料の特異性（分布）が役立つと考え、食レポを構築した。食品は、植物、動物、微生物など多数の生物が含まれ、また長期間の発酵や加熱調理なども含まれるため、化学成分の多様性が大きいと考えられ、対象として適していると思い採用した。今後、より広範な試料や、異なる分析装置でのデータの集積を行うことで、食品を含めた未知成分の解明やその利活用に、さらに役立つ情報基盤となるだろう。

metabolome (metabolomics), food ingredients database, liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS)

発表責任者：櫻井望（sakurai@nig.ac.jp）

講演番号：1S04D6a1
講演日時、会場：3 月 24 日 09:06～ D6 会場

細菌におけるニトロ環状ヌクレオチドによるストレス応答機構

Stress response mechanisms regulated by nitrated cyclic nucleotide in bacteria

○澤 智裕（熊本大院生命科学）
○Tomohiro Sawa (Kumamoto Univ.)

一酸化窒素（NO）はガス状分子という特性から、生成場所から拡散によって移動し、感受性のある細胞に対してシグナル作用を発揮できる。そのシグナル活性は、ヘム含有タンパク質を受容体とする経路があり、代表的な受容タンパク質として可溶性グアニル酸シクラーゼ（sGC）がよく知られている。sGC は環状ヌクレオチドである cGMP をセカンドメッセンジャーとして生成し多様な生理応答を制御する。NO はまた bi-radical という性質から他のラジカル分子種ともすみやかに反応する。なかでも酸素ラジカルであるスーパーオキシドラジカルとは拡散律速で反応し、化学的反応性に富むパーオキシナイトライトを生成する。パーオキシナイトライトは核酸の中でもとくにグアニンとよく反応し、それをニトロ化してニトログアニンを生成することが知られていた。我々は哺乳細胞内で生ずるニトログアニンを探索したところ、cGMP のニトロ化体であるニトロ cGMP が炎症などにより顕著に生成が高まることを見出した。この生成したニトロ cGMP は親電子性を有しており、タンパク質システイン側鎖に付加して、翻訳後修飾であるタンパク質 S-グアニル化をもたらすこと、さらにタンパク質 S-グアニル化が抗酸化酵素などの誘導を介したストレス応答を担う重要なシグナル経路を構成することを見出した。我々は細菌におけるニトロ cGMP の生成を検討したところ、sGC を持たない大腸菌においてニトロ cGMP の生成を認めたが、その生成には可溶性アデニル酸シクラーゼが関わる可能性が示唆された。さらに細菌においてもタンパク質 S-グアニル化が見られ、それは培養条件に影響を受けていることが分かった。細菌感染の場においては、炎症細胞（マクロファージなど）が産生したニトロ cGMP が菌体表面タンパク質の S-グアニル化を引き起こし、それが引き金となって殺菌性のオートファジーが誘導されることが分かった。一方、細菌はこのような生体防御機構に対して、ニトロ cGMP を不活性化するシステインパースルフィド（いわゆる活性イオウ）を生成して、殺菌機構から逃れる仕組みを利用している可能性が示唆された。本講演では細菌感染・生体防御のインターフェイスにおけるニトロ cGMP-活性イオウの働きについて紹介したい。

nitric oxide, reactive nitrogen oxide, reactive sulfur species

発表責任者：澤　智裕（sawat@kumamoto-u.ac.jp）

講演番号：1S04D6a2
講演日時、会場：3 月 24 日 09:34～ D6 会場

菌体内 NO 濃度を指標とした大腸菌 NO 消去系の機能解析
Functional in situ analysis of nitric oxide metabolism in E.coli

○松本 明郎（東邦大医加齢薬理）
○Akio Matsumoto (Toho Univ. School of Med.)

一酸化窒素（NO）はラジカル分子としての特性を持ち、様々な生体分子に対する修飾因子として機能する。これまで、内皮細胞由来血管弛緩因子（EDRF）やマクロファージなどによる細胞内殺菌をはじめ、細胞内・細胞間のシグナル伝達に関与する NO の機能について、微生物から動物に至る幅広い種を素材として研究が進められてきた。これらの研究から、NO を産生しシグナルを生じさせる系が存在する一方、過剰なシグナルが暴走することを防ぐ消去系（ブレーキ）の存在も明らかになり、細胞内での NO 作用は緻密に制御されていることが明らかにされてきた。

微生物は、細胞外からの NO 暴露を容易に受ける構造であるのに加え、脱窒過程に由来する NO の暴露を受ける。NO を代謝（消去）する酵素を微生物は４～５種類も有しているのに対し、哺乳類は同種の酵素を持たない。これまで、これらの酵素活性について in vitro での解析は進められてきたものの、各々の酵素機能や複合した酵素活性が in situ で解析されたことはなかった。

我々は、菌体内の NO 濃度を観察するために NO センサーを開発した。NO センサーは、菌体内で発現し、NO 濃度に応じて生物発光強度を変化させるため、非侵襲的かつ連続して菌体内 NO 濃度変化を観察することが可能になった。NO センサー遺伝子を組込んだ大腸菌は、培養液中に加えた 10 nM NO による菌体内 NO 濃度変化を検知することも可能である。

大腸菌は独立した３種類の NO 代謝酵素（NorV, Hmp, Hcp）遺伝子を有する。単独、または複合欠損株を作成し、一定量の NO を培養液中に加えた際に生じる菌体内 NO 濃度を経時的に観察したところ、３つの NO 代謝酵素が複合して細胞内 NO 濃度を２桁以上低下させていることが明らかになった。また発光量の増加率から推定した擬似 Km 値は NorV を欠損させただけで 1/3 に低下した。さらに、NorV は NO 暴露直後の NO 代謝に特に重要であった。また、中性培養液中に亜硝酸を負荷すると、亜硝酸還元酵素欠損株では菌体内での有意な NO 濃度上昇も観察された。

NO センサーは、菌体内で活性を持つ NO を連続して可視化することを可能にし、NO 代謝系の重要性を in situ で検討する手段となった。実際、大腸菌においては NO 代謝酵素が外界から侵入する NO を極めて効率的に低減し NO の傷害性を回避していることを示すとともに、硝酸代謝系に由来する NO 産生に対しても防御系としても機能していることが示唆された。

nitric oxide, NO sensor

発表責任者：松本明郎（akio.matsumoto@med.toho-u.ac.jp）

講演番号：1S04D6a3
講演日時、会場：3 月 24 日 10:02～ D6 会場

糸状菌における一酸化窒素代謝の生理的意義

Physiological significans of nitric oxide in filamentous fungi

○高谷 直樹[1,2]、桝尾 俊介[1] ([1]筑波大生命環境、[2]筑波大微生物サステイナビリティ研究センター)
○Naoki Takaya[1,2], Shunsuke Masuo[1] ([1]Univ. of Tsukuba, [2]MiCS)

微生物にとって、一酸化窒素（NO）は細胞傷害性のラジカルであると同時に、シグナル分子や硝酸呼吸の基質にもなる重要な水溶性の気体である。祥雲博士によってカビが NO を代謝すること(1)が発見されてから 25 年間の研究によって、糸状菌と NO の様々な関わりが明らかになってきた。

１．シトクロム P450nor（P450nor）とカビの脱窒

P450nor は NADH-NO oxidoreductase 活性を有するヘムタンパク質であり、Fusarium oxysporum、麹菌 Aspergillus oryzae、担子菌 Trichosporon cutaneum などカビに広く分布している。この遺伝子破壊株は亜硝酸塩を亜酸化窒素（N_2O）に還元する能力を失うことから、亜硝酸塩から生じる NO を N_2O に変換する機能を持つことが示された。興味深いことに F. oxysporum などの P450nor は細胞質とミトコンドリアに局在化しており、NO を電子受容体とした異化代謝としての機能と NO の解毒の機能が提唱された。

２．フラボヘモグロビン（Fhb）と NO の解毒

F. oxysporum を硝酸塩もしくは亜硝酸塩を含む培地で培養すると、P450nor とともに Fhb が大量に生産される(2)。その後、Fhb はカビや酵母に分布する NADH 依存性の NO ジオキシゲナーゼであり NO を硝酸塩へと解毒することが示された。

３．Aspergillus nidulans の NO 耐性化遺伝子

A. nidulans の多コピー型プラスミドベクターを用いて作製された全ゲノム DNA ライブラリーを A. nidulans に導入する戦略によって、生育の NO 耐性に関わる遺伝子を単離した。ヘム生合成系遺伝子、アミノ酸・ビタミン代謝系遺伝子が得られ、NO によって大規模な代謝変化が起きることが明らかになった。また、NapA（酵母のストレス応答に関わる Yap1 様転写因子）や NO の解毒に関わるメタロチオネイン様ペプチド(3)が得られ、本菌が NO に対するストレス応答・解毒系を亢進させることが示された。

1) Nakahara, K., *et al.* J. Biol. Chem. 268, 8350 (1993) ; 2) Takaya, N. et al., FEBS Lett. 414, 545 (1997); 3) Zhou, S. *et al.* Nat. Chem. Biol. 9, 657 (2013)

Nitric oxide, Aspergillus, Fusarium

発表責任者：高谷直樹（takaya.naoki.ge@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：1S04D6a4
講演日時、会場：3 月 24 日 10:30～ D6 会場

酵母に見出した「両刃の剣」一酸化窒素の合成機構と生理機能

Synthetic mechanism and physiological function of "a double-edged sword" nitric oxide found in yeast

○高木 博史（奈良先端大バイオ）
○Hiroshi Takagi (Nara Inst. Sci. Tech.)

一酸化窒素（NO）は哺乳類の細胞内でアルギニン（Arg）から NO 合成酵素（NOS）によって生成し、シグナル分子として血圧調節、神経伝達、感染・炎症など幅広い生命現象に関わっている。一方、高等生物のモデルとして、また種々の発酵産業において重要な酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では、ゲノム上に哺乳類 NOS のオルソログが存在せず、NO の合成経路や生理機能はほとんど不明である。

我々は酵母において、高温処理のような酸化ストレスに応答して Arg 依存的に NO が合成されること、また NOS 様活性には NOS のレダクターゼドメインと相同性を示す Tah18 タンパク質が関与することを見出した。Tah18 は Dre2 タンパク質と複合体を形成し、NADPH からの電子を Dre2 に渡すことで細胞質の鉄硫黄タンパク質合成に関わるフラビンタンパク質であるが、NO 合成への関与は初めての知見である。さらに、これまでの知見をもとに、「通常、Tah18 と Dre2 は複合体を形成し、鉄硫黄タンパク質の生合成に関与するとともに、Tah18 依存的な NOS 様活性の発現を抑制している。一方、酸化ストレスに曝されると、Dre2 がレドックスセンサーとして働き、複合体から解離することで、遊離した Tah18 依存的に NO が合成される。また、高濃度の過酸化水素処理条件で合成される過剰量の NO は細胞死を誘導する。」という新規な NO 合成制御モデルを提唱した。現在、酵母における NO 研究を加速する上で重要な、NOS 様活性の責任分子であるオキシゲナーゼの同定を急いでいる。

NO の生理機能については、酸化ストレス耐性に寄与する結果を得ている。酵母を高温に曝すと、Tah18 依存的に合成される NO が銅代謝に関与する転写因子 Mac1 を活性化し、銅の取込み系の亢進を介して銅依存型スーパーオキシドジスムターゼ Sod1 の活性を上昇させることで、高温に伴い生成する活性酸素種（ROS）を消去することを見出した。また、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* では、NO の合成系や解毒酵素の同定、酸化ストレス応答の解析を行い、NO を介したシグナル伝達系の存在を示した。酸化ストレス耐性との関連では、産業酵母の育種への応用が期待される。実際に、NO 合成系を強化したパン酵母を作製したところ、親株に比べて製パン過程でのストレス（乾燥、冷凍）に対する耐性が向上し、発酵力が増加したことから、産業酵母における NO の有用性を実証できた。

酵母において、NO は哺乳類と同様に機能二面性（細胞保護、細胞死）を持つ「両刃の剣」である。NO が生理機能を発現する環境の違い（高温と過酸化水素、ROS のレベルや種類）が、NO の二面性を引き出す要因かも知れない。また、Tah18 の哺乳類オルソログ（Ndor1）が酵母の NO 合成に関与することが示唆され、酵母に見出した NO 合成機構が真核生物に広く保存されている可能性が示された。

Yeast, Nitric oxide, Oxidative stress response

発表責任者：高木博史（hiro@bs.naist.jp）

講演番号：1S04D6a5
講演日時、会場：3 月 24 日 10:58～ D6 会場

植物 NO 研究の現在、過去、未来
Plant nitric oxide research: its past, present and future

○山崎 秀雄 (琉球大理)
○Hideo Yamasaki (Univ. Ryukyus)

一酸化窒素（NO）研究の歴史は古く、18 世紀に行われた Priestley の実験にまで遡ることができる。Priestley 以降、NO は生体毒性のある公害ガスであるとの認知が固定化されていった。1980 年代に入り、NO が血管平滑筋の弛緩に関与している可能性が高まり、医科学分野を中心に活発な議論が行われている。その後、L-アルギニンから NO を合成する一酸化窒素合成酵素（NOS）の発見、cGMP による新しい信号伝達系の発見を経て、1998 年のノーベル医学生理学賞受賞課題にまで至った。植物の NO 研究は、平滑筋弛緩研究とは独立した歴史と複雑な経緯を持っている。Klepper は、ダイズの光合成電子伝達系を阻害した時に NO が発生する事を 1975 年に報告している。1981 年には、Harper らが、マメ科植物特有の硝酸還元酵素（cNR）によって NO が合成されることを示していた。この 2 つの発見の生理的意義は全く不明であったことから、当時の植物研究者の関心を引くことはなかった。長い空白期の後、植物の感染応答に NOS が関与している可能性が 1998 年の Nature 誌に報告され、NO に対する植物研究者の関心が急速に高まった。その後、哺乳類型 NOS は植物に存在しないことが判明したが、NOS の探索は引き続き行われ、Science、Cell、PNAS 等の有力誌に植物固有の NOS(Plant iNOS, AtNOS1)が報告された。しかし、これらの論文にデータ捏造疑惑が生じ、論文撤回のスキャンダルにまで至っている［1]。現在までに、植物および藻類に NOS は見いだされていない。NOS が関与しない NO 合成機構を検討していた我々は、Harper らの研究を再検討し、NO が亜硝酸塩から NR 酵素反応によって合成されることを 1999 年に示していた［2]。動物の血液ヘモグロビンにも亜硝酸依存性の NO 合成反応があることが発見され、亜硝酸塩を基質とした NO 合成反応の普遍性が確定的となった［3]。本講演では、植物 NO 研究の現在及び過去を紹介し、農学分野における植物 NO 研究の未来を考察する［4]。

［1］Travis J (2004). NO-making enzyme no more: Cell, PNAS papers retracted, Science, 306, 960.
［2］Yamasaki H, Sakihama Y, Takahashi S (1999) An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme. Trends in Plant Science, 4, 128-129.
［3］山崎秀雄，渡邊なお子（2014）硝酸塩・亜硝酸塩を基質とした NO 合成機構研究の現在・過去・未来, 血管, vol 37, 107-114.
［4］Yamasaki H, Cohen MF (2016) Biological consilience of hydrogen sulfide and nitric oxide in plants: Gases of primordial Earth linking plant, microbial and animal physiologies. Nitric Oxide, 55-56, 91-100.

nitric oxide, nitrate reductase, hydrogen sulfide

発表責任者：山崎秀雄（yamasaki@sci.u-ryukyu.ac.jp）

講演番号：1S04D6a6
講演日時、会場：3 月 24 日 11:26～ D6 会場

植物の感染防御応答における NO の分子機能
Function of NO in Plant Defense Responses against pathogen
○川北 一人 (名大生命農)
○Kazuhito KAWAKITA (Bioagric. Nagoya Univ.)

一酸化窒素 (NO) は反応性に富むラジカル分子であり、生理的および病理的な諸過程を制御する細胞内・細胞間情報伝達系因子として働くことがよく知られている。植物においては、NO は形態形成、成熟過程、気孔の閉鎖といった様々な生理現象に深く関わっている。各種刺激、例えば植物ホルモンのアブシジン酸処理や傷害などのストレスに応答して NO 生成が認められる。特に非病原菌接種あるいは抵抗反応誘導物質（エリシター）処理に応答した NO 生成は、植物に共通な現象として認められ、植物の生体防御機構において NO が関与することが示されている。植物では NO 合成酵素 (NOS)を介した反応とは異なる亜硝酸 (NO_2^-) 依存性 NO 生成経路の存在が推定された。硝酸還元酵素 (NR) は NO_3^- を NO_2^- に還元する反応を触媒する窒素同化の律速酵素として知られており、NR が植物の NO 生成系として着目された。我々は防御応答時に誘導される新規な NR 遺伝子 (*StNR5* と *StNR6*) をジャガイモ植物から単離し、NR はエリシター応答性 NO 生成を担う酵素の一つであることを示した。また、植物の感染防御応答の際に細胞内において生成する NO の標的分子探索の一環として、NO が関与するタンパク質翻訳後修飾であるニトロソ化（*S*-nitrosylation）に着目した。NO 供与体 GSNO を処理したジャガイモ葉および塊茎、ジャガイモ疫病菌を摂取したジャガイモ葉において、ニトロソ化候補タンパク質を同定した。本講演では、ニトロソ化プロテオーム解析により同定した候補タンパク質について、病害応答における機能を検討した結果を報告する。

NO, Plant, Defense responses

発表責任者：川北一人（kkawakit@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：1S05C6a1
講演日時、会場：3 月 24 日 09:00～ C6 会場

微生物画像情報のデジタル化がもたらす未来の序に代えて

Digitalization of microbial imaging

○紙野 圭（製品評価機構バイオ C）
○Kei Kamino (NITE)

本シンポジウムでは、近年注目が集まる微生物の画像情報のデジタル化により、産業や技術にどのような波及効果が見込まれるかについて考えることを主題とする。微生物の画像データに含まれる情報は豊富である。しかしそれらの情報は、概して些細で S/N 比が極端に低く、多くの画像を特定の観点で比較することでしか見出せないことも多い。そのため、注意深い観察眼や直感と言われるものに頼ることも多く、またそれら情報は暗黙知となることも多い。一方で、情報技術と画像・スペクトル取得に関わる技術の進歩は甚だしく、私たちの生活においても自動運転などに象徴される情報活用の波が急速に押し寄せている。

微生物学あるいは生物学において、観察することは最も伝統的で本質的である。大昔に観察から立てられた仮説を何十年も掛けてあらゆる分子生物学的・細胞生物学的手法を用いて証明するということも少なくない。また形態分類が成り立っていること自体が画像情報の豊富さを物語っている。観察することは画像の取得という工程に加えて、認識と解釈・判断という工程を経るものであり、上記の観察眼や直感と呼ばれるものは主に認識や解釈・判断の工程に対応する。その領域の情報処理の選択肢が膨大であるため、一般化が困難で、暗黙知とする傾向が強い。この領域を、情報処理技術を導入して共有知にできるか、ということが現代のチャンレンジである。

一方、画像取得の工程においては、非侵襲性も重要なポイントとなる。非侵襲的な画像取得技術によってリアルタイム性を持たせることで、その情報量は飛躍的増大する。また、産業や社会への波及性を考えると汎用性も重要である。

本シンポジウムでは、微生物の画像情報の活用を微生物の評価、選抜、分類、分離、検出といった切り口で取り組んでおられる第一線の先生方の講演を通じて、産業や技術にどのような変革をもたらすのかについて考える場となれば幸いである。

morphology, morphometrics, assay

発表責任者：紙野　圭（kamino-kei@nite.go.jp）

講演番号：1S05C6a2
講演日時、会場：3 月 24 日 09:04～ C6 会場

微生物形態デジタル情報の活用

Utilization of quantitative morphological information of microorganisms

○大矢 禎一（東大新領域）
○Yoshikazu Ohya (Univ. of Tokyo)

微生物の形態を手製の顕微鏡を使ってはじめて観察したのは、低温殺菌を開発したルイ・パスツールである。フランスのある地域の醸造業者から依頼を受けて、アルコール発酵の主役となる出芽酵母とその働きを阻害する乳酸菌という微生物を見つけることになる。このように酵母によるアルコール発酵の歴史は細胞を観察することから始まった。酵母の顕微鏡画像には非常に多くの表現型情報が含まれているが、それをまずデジタル画像として捉え、数理形態学の力を借りて定量化することで、酵母の形態的特徴や性質を客観的、定量的に扱えられるようになった。そこで今回の発表では、微生物の形態デジタル情報の解析がどのように発酵醸造の研究に活用されているかについて解説する。

顕微鏡が高性能になり、蛍光顕微鏡が普及し、生きたままでも酵母を観察できるようになると、細胞生物学や遺伝学の多くの研究で酵母細胞の観察が行われるようになってきた。しかしそのほとんどは定性的な記述にとどまり、たとえ定量的な解析を行っている場合でも研究者が目で見て対象の識別と形態情報の抽出を行っていた。完全定量化のために強力な武器になるのが、画像解析システムである。筆者らが開発した CalMorph という画像解析システムの特徴は出芽酵母に最適化されたシステムであり、細胞の認識度が非常に優れているという点である。

最近我々はこの画像解析システムを用いて、清酒酵母の形態表現型の解析を行った[1)]。その結果、清酒酵母は他の野生型出芽酵母とは異なり、特徴的な形態をしていることが明らかになった。同じ清酒酵母の中でも、明治時代に単離された昔の酵母と、昭和時代から頒布されはじめた新しい酵母であるきょうかい酵母 7 号系酵母は形が異なっており、新しい酵母の細胞の方がサイズ的に小さくなっていた。遺伝的にも昔の酵母と新しい酵母は異なる系統であったことから、遺伝型と形態表現型が相関していることが明らかになった[2)]。きょうかい酵母 7 号系酵母は様々な目的のために育種されて来たが、変異源を用いて得られた酵母の方が、自然突然変異の導入で育種された酵母よりも形態表現型の変化が大きかった。オフターゲットによる影響が形態表現型に現れているものと考えられる。今後出芽酵母の形態デジタル情報は、微生物の育種の過程でますます使われていくことが期待される。

[1] Ohnuki S et al. (2017) Phenotypic diagnosis of lineage and differentiation during sake yeast breeding. ***G3*** 7:2807-2820.
[2] Ohya Y and Kashima M (2019) History, lineage and phenotypic differentiation of sake yeast. ***Biosci Biotechnol Biochem.*** in press

Saccharomyces cerevisiae, morphology, CalMorph

発表責任者：大矢禎一（ohya@k.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：1S05C6a3
講演日時、会場：3 月 24 日 09:33～ C6 会場

Controlled ecophysiological studies at single-cell resolution

○Yutaka Yawata (U. Tsukuba)

The advent of new microscale technologies such as microfluidics and most recently microfluidic robotics offers unprecedented opportunities to manipulate environmental conditions over length scales relevant to bacterial transport and on time scales short enough to resolve bacterial responses to rapid shift in a surrounding condition. These approaches are enabling controlled ecological studies of environmental bacteria that account for fundamental characteristics of natural microbial habitats, and are shedding light on the ecological principals underpinning the dynamic microbial consortiums that are the fundamental driver of global element cycles. On the other hand, emerging noninvasive technologies are revolutionizing our notion of cell analysis, by allowing a microbiologist to interrogate live and intact cell about its physiological status and taxonomy without affecting cellular physiology and integrity. Here, I argue the great potential of combining novel microscale technologies and noninvasive analysis technologies to expand the scope of controlled ecological studies of live and intact environmental microbes, to bring about new insights into the complex microbial life in the nature.

Microfluidics, Robotics, Machine learning

講演番号：1S05C6a4
講演日時、会場：3 月 24 日 10:02～ C6 会場

細胞ラマンスペクトルを利用したトランスクリプトームの非破壊測定

Non-destructive transcriptome measurement based on cellular Raman spectra

○若本 祐一（東大総合文化）
○Yuichi Wakamoto (Univ of Tokyo)

細胞内には膨大な種類の遺伝子が存在し、その多数の遺伝子の発現状態によって細胞の状態が決定されると考えられている。トランスクリプトームやプロテオームなどの網羅的な遺伝子発現状態の計測手法では、必ず細胞を破砕または溶解し、細胞内の RNA やタンパク質を取り出す必要がある。そのため、生きた細胞内で起こる細胞内分子群の時間変化を一細胞レベルで追従することは不可能である。これを実現するためには、細胞を破壊することなしにオミクス情報を抽出する方法が必要となる。今回、我々の研究グループでは、細胞にレーザー光を照射して得られる自発ラマンスペクトルと、同培養環境に置かれた細胞内のトランスクリプトームのあいだに計算論的な対応関係があることを突き止めた。さらにこの対応関係を利用することで、わずか数秒のレーザー光照射で取得できるラマンスペクトルから、細胞を破壊することなしに、細胞内の数千種類におよぶ網羅的な転写 RNA 発現量を推定できることを示した。

この研究では、分裂酵母および大腸菌を様々な環境条件下で培養し、各環境下における細胞のラマンスペクトルとトランスクリプトームを取得した。まず得られたラマンスペクトルを主成分線形判別法（PC-LDA）を用いて次元圧縮することで、環境条件に依存してラマンスペクトルを分類できることを確認した。次に、次元圧縮したラマンスペクトルと RNA-Seq 解析により得られたトランスクリプトームとの対応を部分的最小二乗回帰（PLS-R）により推定した。Permutation test により、実際のデータの対応精度が偶然に得られる確率は 0.06%以下であることが示された。さらにこの関係を利用して、圧倒的に低次元の次元圧縮後のラマンスペクトルから、数千個におよぶ RNA の発現量を推定できることを明らかにした。これが実現した背景には、トランスクリプトームの変動が実は実際の遺伝子数に比べ、圧倒的に低い次元に拘束されているという事情がある。

このラマン-トランスクリプトーム対応を利用することで、トランスクリプトームを非破壊・迅速・安価に取得できる可能性があるとともに、生きた細胞内で起こる膨大な遺伝子発現の時間変化を理解する「ライブセル・オミクス」の実現につながることが期待される。

Raman spectroscopy, Transcriptome, Live-cell omics

発表責任者：若本　祐一（cwaka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：1S05C6a5
講演日時、会場：3 月 24 日 10:31～ C6 会場

細胞形態変化を利用した抗真菌物質の探索

Exploration of antifungal substances based on cell morphological changes

○二村 友史[1]、ウソン レイチェル[1]、山本 甲斐[1,2]、室井 誠[1]、長田 裕之[1,2] ([1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー、[2]埼玉大)
○Yushi Futamura[1], Rachael Uson[1], Kai Yamamoto[1,2], Makoto Muroi[1], Hiroyuki Osada[1,2] ([1]Chem. Biol., RIKEN CSRS, [2]Saitama Univ.)

【目的】真菌による感染症は医療、農業分野で甚大な被害をもたらしている。現在までにキャンディン類やポリオキシン類など様々な抗真菌薬が開発されてきたが、薬効や耐性菌の出現で新たなタイプの抗真菌剤が広く求められている。我々はこれまでに様々な抗がん剤が動物細胞に誘導する形態変化をデータベース化した MorphoBase を構築し、化合物の作用機序予測や新奇化合物の探索に役立ててきた[1]。またその手法をイネいもち病菌に適応して抗真菌剤の探索に利用してきた[2]。さらに最近ではディープラーニング（DL）を用いて細胞形態を判別するモデルの構築に取り組んでいる。本講演では、細胞形態変化を指標とした抗真菌物質の探索について紹介する。
【方法】真菌の形態変化画像は KEYENCE 社 BZ-X800 で Z 軸方向に 7 μm 毎に 50 枚撮像し、デコンボリューションして生成した。上記データは 4 分割後、さらにそれらを 90 度ずつ回転させたデータを作成して拡張し、最終的に約 12 万枚の画像を用意した。DL を用いた真菌形態変化の判別モデルの構築には、NVIDIA DIGITS を利用した。フレームワークには Caffe を、ネットワークには GoogleNet を用いた。学習は収集したデータの 75%を用いて訓練し、残り 25%で検証する方法を取り、30 回学習させた。
【結果】真菌の形態変化を学習させるため、作用がよく知られた抗真菌剤 13 種を選んで形態変化を収集し、これらの化合物が誘導する表現型を swelling など 8 種に分類した。収集した画像を用いて学習を行なったところ、正解率が 98.7%の判別モデルが構築できた。このデータベースを用いて微生物スクリーニングを実施した。その結果、放線菌 YO15-A001 株のエキスは、ATP 合成酵素や V-ATPase の阻害剤によって誘導される形態変化『Beads』を誘導した。本菌株が生産する活性物質の単離精製・構造決定を行ない、新規 26 員環マクロライド化合物 YO15001A（**1**）を見出した。**1** の抗真菌活性を評価したところ、イネいもち病菌 *Pyricularia oryzae* に対して強い増殖阻害活性を示した（IC_{50} 値 8.8 ng/mL）。さらに呼吸活性に与える影響を解析したところ、**1** が確かに ATP 合成酵素を阻害したことから、構築した判別モデルの有用性を示すことができた。

なお、本研究は農研機構生研支援センター「イノベーション創出強化研究推進事業」の支援を受けて行った。

[1] Muroi M et al, Nat Prod Rep (2016) 33: 621-625
[2] Futamura Y et al, Biosci Biotechnol Biochem (2017) 81: 28-31

Antifungal substance, Cell morphology, AI

講演番号：1S05C6a6
講演日時、会場：3 月 24 日 11:00～ C6 会場

放線菌コロニーを自動識別する人工知能の開発

Development of artificial intelligence to automatically identify actinomycete colonies

○山村 英樹[1]、安藤 英俊[2]、中島 啓太[2]、早川 正幸[3] ([1]山梨大・生命環境、[2]山梨大学・工、[3]山梨大)
○Hideki Yamamura[1], Hidetoshi Ando[2], Keita Nakashima[2], Masayuki Hayakawa[3] ([1]Fac. Life Environ. Sci., Univ. Yamanashi, [2]Fac. Engineer., Univ. Yamanashi, [3]Univ. Yamanashi)

放線菌はストレプトマイシンやイベルメクチンに代表されるように創薬資源として重要な微生物である。放線菌を創薬資源として収集する際には、土壌などの環境試料を腐植酸-ビタミン寒天培地（HV agar）といった放線菌の選択分離培地に播種し、生育してきたコロニーを肉眼で観察しつつ、どのコロニーが同じか？ユニークなのか？を判断している。しかしながら、人間の観察力は個別の能力に依存しており、記憶力にも限界があるため、ユニーク株逸失の可能性、重複株の存在などの問題が存在している。一方、人工知能を用いた画像認識技術が飛躍的に向上しており、バイオを含めた様々な分野で応用が進んでいる。そこで、我々は微生物コロニーを画像情報として捉え、放線菌プレートの撮像条件とその手段、照射光源について検討を行い、人工知能を活用した放線菌コロニーの自動識別システムの開発を目指した。

まず、最初に我々は最適な放線菌コロニーの撮像条件の検討を行った結果、背景色白ー透過光有りの条件で最もよく肉眼観察時に近い画像を得る事ができた。また、ブラックライト UV、ピーク波長 370 nm）を照射し、放線菌コロニーの観察を行ったところ、一部の放線菌コロニーは自家蛍光を示す特徴を有しており、釣菌後の培養菌体においては明確な蛍光を示した。

上記の撮像条件で撮影した放線菌分離プレート画像は、放線菌の熟練研究者が放線菌とバクテリアのコロニーの正しい位置を指定した 50 種類程度のプレート画像を自動識別システムに与え、放線菌コロニーの識別方法を学習させた。自動識別を行うシステムには人工知能技術の一種である深層学習を用いた。システムはコロニーの位置を検出し、そのコロニーが放線菌であるか、それ以外のバクテリア等であるかを識別することが可能となる。自動識別の結果は放線菌コロニーが写っている部分を矩形で強調した。肉眼でも識別しやすい、ある程度の大きさを持つコロニーについては、可視光画像に加えブラックライトや紫外線カメラを用いた画像を併用することで放線菌の検出精度が 89%になった。一方で、直径 1.2 mm 程度以下の非常に小さなコロニーについては、コロニーの検出が困難なケースが見られた。これは小さなコロニーでは画像から得られる情報が大きなコロニーに比べて少ないことが大きな要因であると考えられる。

今後は検出精度の向上を図ると共に、検出された放線菌画像同士の類似性を計算するシステムを構築することを目指している。一方で、放線菌が生産する代謝産物の多様性とコロニーの多様性を比較し特徴をつかむ事ができれば、より早い段階で創薬資源として放線菌株を選抜できる可能性がある。

actinomycetes, artificial intelligence, colony

発表責任者：山村　英樹（hyamamura@yamanashi.ac.jp）

講演番号：1S05C6a7
講演日時、会場：3 月 24 日 11:29～ C6 会場

未利用微生物資源の収集探索・スクリーニング革命
Biological Treasure Hunting Technology

○小笠原 渉（長岡技科大院）
○Wataru Ogasawara (Nagaoka Univ. of Tech.)

長きにわたり人類は微生物を利用し、その恩恵に浴してきた。しかし、それらは現在我々が認識しつつある多様な微生物のほんの一握りでしかない。地球上に存在する微生物の細胞数は 10^{29} から 10^{30} 個に及ぶとされており、その種の数も優に 1000 万を超えると予測されている。一方、人類が分離培養を行い、その生理性状を調べて学名を記載してきた微生物は、せいぜい 2 万種弱であり、全微生物種のごくわずかでしかない。環境中に存在する微生物の 99%以上（つまりほとんど）は未だ培養されたことがないと言われる理由はここにある。こうした未培養微生物はしばしば難培養微生物であるとも考えられている。しかし、微生物の分離培養は今なお Robert Koch や Louis Pasteur 以来の古典的な寒天培養や希釈培養に依拠している。仮に土壌 1 グラムの中に 10^{8} 個の微生物が存在していてそれが「何らかの条件下ですべて培養可能」だとしても、寒天培地で分離培養操作ができるコロニー密度はせいぜいプレート 1 枚あたり 100 個であり、すべての微生物を網羅的に培養するためには 1,000,000 枚の寒天培地が必要となる。我々は、これだけの桁数の微生物を培養する技術を「全く」持ちあわせておらず、現実に微生物の「どれだけが未培養」であり、「どれだけが難培養であるか」は実のところ誰も知らない。この本質的な問題の克服のためには、そしてその結果として培養できる微生物の割合を 20%、30%という確かな割合までに高めるためには、「高集積化した寒天培地プレートあるいはタイタープレート」すなわちマイクロデバイスを用いたハイスループットな培養方法を開発する以外に道はない。これまでにこうしたマイクロデバイスによる微生物の培養研究は行われてきたものの、多くが大腸菌の組換え体のスクリーニングなどの用途に限定されており、多様な微生物を培養するとともに、増殖検出系、機能アッセイシステム、保存のためのバックアップなどを備えたハイスループットシステムは全く存在しない。こうしたハイスループットプラットフォームの実現は、微生物の探索・培養を全く新たなステージへと導く。これまでの古典的技術では捕捉できなかった膨大かつ多様な未培養微生物を効率的に培養できる革命的ステージが訪れ、微生物を活用した多様なバイオテクノロジーの進展が期待される。

本発表では、マイクロ・ナノテクノロジーを基盤とした微生物のハイスループットな培養・スクリーニングを可能とする汎用的プラットフォームの構築を目指すチームの新たな試みを紹介する。この開発の中で、微生物イメージング技術開発は極めて重要なテーマとなっている。

Screening, Microorganisms

講演番号：1S06D6p1
講演日時、会場：3 月 24 日 14:05～ D6 会場

疎水性タグを用いた液相ペプチド合成とその応用展開

Hydrophobic Tag-Guided Liquid Phase Peptide Synthesis and Its Broad Applications

○千葉 一裕（東農工大農）
○Kazuhiro Chiba (Tokyo Univ. Agric. and Technol.)

ペプチドや核酸オリゴマーなどの「中分子」は，次世代医薬候補物質や新たな機能性分子としての可能性が期待され，その構造と機能，合成法は注目の対象となっている．特に，生体内のタンパク質，核酸，糖鎖やその複合体の分子間相互作用は，種々のシグナル伝達等，活性の発現に直接関与し，これら「高分子内の相互作用点」の化学構造および化学的特性を解析することは，生体機能発現メカニズムの解明に必須となっている．その分子間相互作用に直接関係する限定された部位だけを取り出した形状を持つ分子断片である「活性フラグメント」を効率的につくり出すことができれば，選択的な活性発現に必要となる最小ユニットとして，低分子生物活性物質を凌ぐ新たな農薬や医薬の世界を拡げることができると考えられる．しかし高分子の断片部分とはいえ，分子量が数千程度におよぶ中分子を立体構造も含めて精密に合成するためには，必然的に数十ステップもの化学反応と反応毎の分離精製操作が必要になる．従って各反応は，副生成物の発生を抑制しながらほぼ定量的に完結させなければならない他，反応，分離，精製も極めて迅速かつ簡易な操作で実施できなければならない．さらに産業応用への展開を考えると，従前の化学合成の手法では不十分であり，100 グラム～数キログラムの目的物が，殆ど精製操作無しに少なくとも最終純度 99.5%以上の高純度品として得られるものであることが望ましい．この極めて高いハードルをクリアするためには，操作性については簡便である現行の固相合成法のメリットを確保しつつ，反応プロセスや化学反応そのものにも全く新しい学術基盤の構築と革新的手法の導入が必須となる．

化学合成に応用する上での最大の課題は，生体高分子活性フラグメントの基本骨格となるペプチドや核酸を伸長させる過程の「合成中間体」や「最終生成物」をいかにして，二層に分離した一方の溶液だけに選択的に溶解させるか，あるいは均一溶液から選択的に不溶化するなどの方法で分離するかということである．生体高分子の一部を構成するこれらのフラグメント分子は，水溶性が高く高極性のものが多いため，多くの有機溶媒には溶解しにくく，そのため化学反応に供することすら困難であったが，演者はこれまでペプチドや核酸合成に適用できる専用の疎水性タグを数多く開発し，これに合成中間体を直接結合させることによって溶解性を変え，これまで不可能とされた反応プロセスを変革することに成功した．このような新たな技術により，数十段階にも及ぶ中分子合成の全ステップにおいて，最終段階までクロマトグラフィーなどの精製操作や過剰量の試薬添加を行わずに，純度 99.5%以上の高純度品を数グラムから数百グラムスケールで得ることができた．

peptide, synthesis, nucleic acid

発表責任者：千葉一裕（chiba@cc.tuat.ac.jp）

講演番号：1S06D6p2
講演日時、会場：3 月 24 日 14:35～ D6 会場

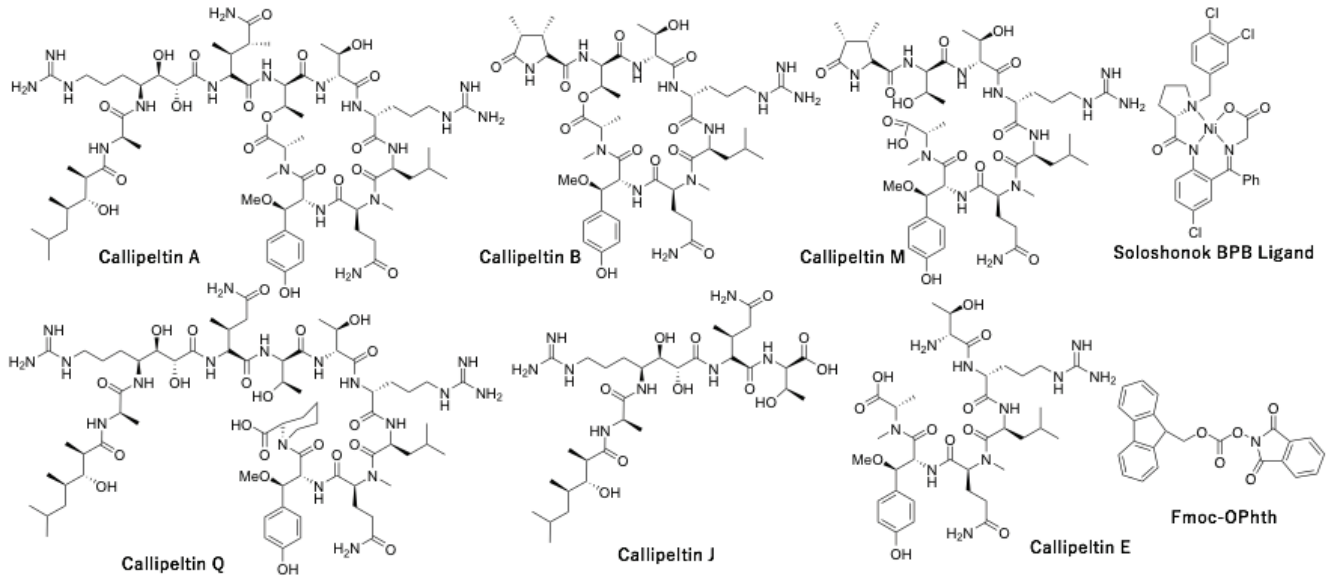
異常アミノ酸含有ペプチド callipeltin 類の全合成研究

Synthetic study of callipeltins, the peptides with unusual amino acid residues

○今野 博行（山形大院理工）
○Hiroyuki Konno (Yamagata Univ.)

Callipeltin 類は海綿より単離された異常アミノ酸含有ペプチドであり，細胞毒性を有し，さらにケモカインレセプターCCR5 を強力に阻害する. CCR5 はそのリガンド RANTES との相互作用により血管内では炎症メディエーター，脳組織内では神経保護として働く．また CCR5 は HIV 感染受容体として利用されている．よって callipeltin 類は非常に魅力的な合成ターゲットである．しかし現在まで最も顕著な生物活性を示す callipeltin A の全合成例はなく，それらを構成する異常アミノ酸類や断片ペプチドの合成にとどまっていた．そこで私たちは callipeltin 類を構成する異常アミノ酸の効率的な合成法の開発ならびにそれらのペプチド鎖内への組み込みを検討してきたので報告する．

構成する異常アミノ酸類の合成では，まず Soloshonok BPB リガンドを用いて Fmoc-D-alloThr, Fmoc-3-MeGln の立体制御合成に成功した．また Fmoc-ADH, AGDHE は Glu, pDME は pGlu からジアステレオ制御下に合成した．一方で β-MeOTyr と HTH は不斉合成反応を用いることで目的とする誘導体に導いた．次にペプチドの組み立てを行った．合成戦略として C 末端から一般的な Fmoc-固相合成法により伸長し，最終脱保護は distilled TFA を用いた．環状デプシ構造の形成は終盤で分子内デプシ結合の形成を行った．その結果, callipeltin B, E, J, M, Q の全合成に成功した．上記の合成研究は callipeltin 類の毒性を有する部位の推定, Fmoc-OPhth の開発などももたらした．



callipeltin, unusual amino acid, solid phase peptide synthesis

発表責任者：今野博行（konno@yz.yamagata-u.ac.jp）

講演番号：1S06D6p3
講演日時、会場：3 月 24 日 15:00～ D6 会場

ペプチド化学を基盤とするプロテアーゼ阻害剤の設計・合成と評価

Design, synthesis, and evaluation of protease inhibitors based on peptide chemistry

○赤路 健一（京都薬大）
○Kenichi Akaji (Kyoto Pharm. Univ.)

従来から汎用されている医療用低分子医薬品の多くは、標的蛋白質との相互作用によって薬としての作用を示す。その標的蛋白質の 8 割近くは酵素と受容体であり、酵素のほうが受容体よりも標的としての割合がやや高いと考えられている。また、近年多用されるようになってきた分子標的抗がん薬でも、がん細胞に多く発現している特定の増殖関連受容体やリン酸化酵素（キナーゼ）を標的としている。このうち、キナーゼを標的とする分子標的抗がん薬には低分子製剤が多く含まれるが、受容体を標的とする分子標的薬には抗体製剤などの蛋白製剤が用いられることが多い。一般に、蛋白製剤の生産には発現手法が用いられるため多段階の精製過程や厳格な純度検定が必要となる。このため、化学合成が可能なペプチドを基盤とする中～低分子医薬品の創製が求められるようになってきた。特定の蛋白質のみを標的とする中～低分子医薬品を設計・合成するためには、標的蛋白質との相互作用を最大化できるように設計された非天然型アミノ酸やそれらを組み込んだペプチドの利用が必須となる。

本講演では、標的蛋白質との相互作用最大化を目指した候補化合物の構造最適化とその合成について紹介したい。具体例として、演者らのグループが対象としてきた蛋白質加水分解酵素（プロテアーゼ）を標的とする構造最適化について述べる。プロテアーゼは蛋白質中のペプチド（アミド）結合の切断反応を触媒する酵素で、生体機能調節や細胞増殖、細菌・ウイルスの増殖にかかわる蛋白質の産生に必要不可欠である。したがって、このような生理機能調節にかかわるプロテアーゼや疾患発症に直接かかわるプロテアーゼを阻害することで、疾患の原因となる分子の生成を抑えたり細胞内情報伝達を抑制したりすることが可能になる。プロテアーゼ阻害剤の開発では、プロテアーゼの基質認識の基本となるペプチド化学に基づく阻害剤設計が行われることが多い。また、プロテアーゼと阻害剤との複合体構造解析に基づいて効率よく構造最適化がすすめられる。本講演では、重症呼吸器症候群（SARS）の原因ウイルスの増殖に必須となるチオールプロテアーゼと、アルツハイマー病発症原因に深くかかわるアミロイドペプチド産生の律速酵素であるアスパルテックプロテアーゼを例にとり、その阻害剤設計と合成ならびに評価について紹介する。

protease, inhibitor, unnatural amino acid

発表責任者：赤路健一（akaji@mb.kyoto-phu.ac.jp）

講演番号：1S06D6p4
講演日時、会場：3 月 24 日 15:30～ D6 会場

低温マイクロ波利用によるペプチド・糖ペプチド固相合成

Solid-phase syntheses for peptides and glycopeptides with microwave irradiation under low temperature

長島 生、○清水 弘樹（産総研生物プロセス）
Izuru Nagashima, ○Hiroki Shimizu (AIST)

ペプチド固相合成法では、アミノ酸伸長や脱保護などの本反応を固相上で進めることで、液相反応において必要となる反応後の逐次精製を「固相の洗浄」だけに簡略化させている。また、液相合成法でしばしば観察される、ペプチド鎖が長くなると反応点の立体障害が生じるため数十残基程度で合成限界が見えてくるという問題の解決も齎した。これらの結果、現在では数十残基ペプチドの化学合成は、自動的に行うことが可能となっている。一方、ペプチド固相合成では、液相法での TLC の様に簡便な反応追跡評価が難しい条件下で固相上での副反応を抑える必要があるため、「試薬の過剰量の利用」や「反応に長時間かける」など、実害は少ないが好ましくない要因も潜んでいる。

2.45GHz のマイクロ波が電子レンジにも利用されていることから分かる様に、マイクロ波は物質を効率的に加熱する作用を有する。近年、化学反応の効率加熱手段として利用され、そのときに様々なメリットを齎すことが報告されている。ペプチド固相合成では、マイクロ波を利用することで、固相合成法で求められる「長時間反応」の短縮化が可能となった。同時に、1 残基伸長反応の収率を向上させることが可能となり、結果、より長鎖ペプチドの合成が実用的ともなった。我々の主観的な感覚では、マイクロ波を利用しない場合では単離精製含めて 20 残基程度までが実践的であったが、マイクロ波を利用すると 40～50 残基でも十分汎用的に合成が可能であると感じている。

今日では、マイクロ波照射が可能なペプチド自動合成装ちもしはんされている。しかしいっぽうで、まいくろはをりようするとひつぜんてきに「反応系を加熱してしまう」という新たな要因（問題点）を生むことにもなった。この対策として、反応時間を 1 分以下など極端に短くすることで多官能基性化合物であるペプチド合成の汎用化を目指した報告がいくつかなされている。

我々は、ペプチド固相合成におけるマイクロ波の効果が高温特性によるものだけでないことを見出し、低温に保ちつつマイクロ波照射可能な導波管を利用して、低温でも反応を促進させ、長鎖ペプチドの固相合成に成功した。同時に、必要試薬量の低減にも成功した。本講演では、「ペプチド固相合成におけるマイクロ波利用のメリット」や「マイクロ波を利用した糖ペプチド合成例」などのこれまで得られた知見とともに、「糖ペプチド合成の汎用化に向けたマイクロ波の利用」などの将来的な展望を含めて、低温マイクロ波利用ペプチド・糖ペプチド合成について講演する。

これは、連続的に反応を進める固相合成では、1 反応の収率がどれだけ 100%に近いかが連続して反応を遂行できる鍵となる、ペプチド合成ではより長鎖のペプチドが合成できる鍵となる。計算上、アミノ酸 1 残基伸長が 95%の場合、20 残基ペプチドは 38%で合成されるが、50 残基は 8%ほどにしかならず、実際に合成後の単離精製は容易ではない。しかし、アミノ酸 1 残基伸長が 98%になると、50 残基ペプチドは 37%で合成される。マイクロ波は、この「1 残基伸長数%の向上」を齎し、結果、より長鎖ペプチドの汎用合成が可能となった。

SPPS, microwave, glycopeptide

発表責任者：清水弘樹（hiroki.shimizu@aist.go.jp）

講演番号：1S06D6p5
講演日時、会場：3 月 24 日 15:55～ D6 会場

ライゲーション法による(糖)タンパク質の合成
Chemical protein synthesis by the ligation method

○北條 裕信（阪大蛋白研）
○Hironobu Hojo (Osaka Univ.)

近年、タンパク質の化学合成法は大きく発展し、様々なタンパク質、糖タンパク質の機能解析に貢献している。大腸菌を用いた組換え DNA 法と異なり、化学合成法においては、リン酸化、アセチル化、脂質付加等の翻訳後修飾を部位特異的に自在に導入可能である。また、昆虫や哺乳類由来培養細胞で糖タンパク質を発現する際には、ヒト型糖鎖とは異なることや(前者)、糖鎖構造のミクロ不均一性の問題が生じるが、化学合成法では任意の均一な糖鎖構造を持つタンパク質を合成可能である。さらに、化学合成法では、D-タンパク質の合成や、蛍光基、非天然アミノ酸による修飾導入等、天然にはない官能基の導入も可能である。従って、これらの化学合成タンパク質の利用は、組換え DNA 法に依存したこれまでのタンパク質科学を大きく発展させることにもつながる。

現在のタンパク質合成法においては、目的の(糖)タンパク質を幾つかのポリペプチド鎖に分割して固相法により合成し、精製した後それらを化学選択的に縮合するライゲーション法が主流となっている。固相合成の簡便さ、迅速さを保ちつつ、高純度のタンパク質を合成することのできる優れた方法である。本講演では筆者らが開発したペプチドチオエステルを鍵中間体とするチオエステル法による(糖)タンパク質合成について紹介したい。この方法では、末端にチオエステル基を有するペプチドを固相法により合成し、チオエステル基を銀イオン等により活性化して、化学選択的に他のペプチドと縮合する。側鎖アミノ基とチオール基の保護が必要であるが、任意のアミノ酸配列でペプチド同士を縮合することのできる柔軟性の高い方法である。また、保護基はペプチドの溶解性を向上させるタグとして用いることができるため、ペプチド鎖構築時の難溶性の問題を回避することができる。ここでは、これまでに合成した分子量 23 kDa の糖タンパク質、がん転移の鍵となるマトリクスメタロプロテアーゼの産生促進に関わる糖タンパク質、エムプリンの活性発現部位、ヒトインターロイキン-2、ヒトスーパーオキシドジスムターゼ等の(糖)タンパク質化学合成を通してチオエステル法の合成戦略と特徴を紹介する。

chemical synthesis, glycoprotein, peptide thioester

発表責任者：北條裕信（hojo@protein.osaka-u.ac.jp）

講演番号：1S07C6p1
講演日時、会場：3 月 24 日 14:03～ C6 会場

新しい生体触媒の発見
Discovery of new biocatalyts

○小林 達彦（筑波大生命環境）
○Michihiko KOBAYASHI (Univ. Tsukuba)

全ゲノム研究の時代であるが未知の酵素・生体触媒は存在し、また、これまで知られていない潜在機能をタンパク質がもち併せている場合もある。それらを探索することは基礎・応用両観点から重要である。我々は近年、新規な代謝や酵素、生体触媒のスクリーニングを中心とした研究を進めている。

がんや心疾患などの慢性疾患は、世界規模の健康問題である。様々な野菜や果物に含まれるフラボノイドは、それらの慢性疾患に対する予防効果をもつ有用な生理活性物質である。フラボノイドの代謝に関しては、既にいくつかの主要な経路が明らかにされているものの、未知の経路も存在すると考えられている。そこで、ヒトに近いモデル動物であるブタの臓器から、有用なフラボノイドの一種である7,8-dihydroxyflavone (7,8-DHF)を代謝するする未知の酵素を探したところ、酸素運搬タンパク質として知られるヘモグロビン (Hb) が7,8-DHFに対し作用する活性を示すことを発見した。また、ヒトのHbも同じ活性をもつことを明らかにした。

一方、放線菌*Streptomyces coelicolor* A3(2)株から新規酸化酵素をスクリーニングしている過程で、本菌の培養上清に青色色素として出てくるアクチノロージンが生理学的条件下において酸化反応の触媒活性を示す有機触媒であることを発見した。また、他の低分子有機化合物も同じ活性をもつことを明らかにした。

catalyst, microorganism

講演番号：1S07C6p2
講演日時、会場：3 月 24 日 14:32～ C6 会場

芳香環二水酸化酵素の触媒反応を進める精緻な機構
Molecular mechanisms of catalysis of Rieske non-heme iron oxygenase

○野尻 秀昭（東大生物工学セ）
○Hideaki Nojiri (Biotechnol. Res. Ctr., UTokyo)

芳香族化合物は好気的環境で比較的速やかに酸化的分解を受け、多くの場合二酸化炭素まで完全分解される。この代謝は様々な土壌細菌が行うが、その鍵となるのが、芳香環に対して分子状酸素を使って水酸基を導入する酸素添加酵素（オキシゲナーゼ）が触媒する水酸化反応である。特に複数の芳香環が縮合した多環芳香族炭化水素やヘテロ環式芳香族炭化水素の分解では、Rieske non-heme iron oxygenase（RO）と呼ばれるマルチコンポーネント型オキシゲナーゼが、分解反応全体の進行を左右する初発酸化酵素として重要な役割を果たす。RO は、芳香族基質に部位特異的・立体選択的な二水酸化反応を触媒する酸化酵素（Oxy）と、NADH からの電子を Oxy に伝達する電子伝達コンポーネントからなり、細胞質内で別々に遊離して存在するコンポーネント間での効率的な電子伝達は分解反応の進行を決める重要な要因となる。

演者らは、含窒素芳香族化合物 carbazole の代謝系を材料に、この代謝系の初発酸化酵素である carbazole 1,9a-dioxygenase（CARDO）について、多面的、かつ詳細に解析を行ってきた。多様な細菌が CARDO を有するが、それらは共通して、Oxy に加えて、二つの電子伝達コンポーネント［ferredoxin (Fd)と reductase］から構成される。これまでに、*Pseudomonas* 属細菌、*Janthinobacterium* 属細菌、*Novosphingobium* 属細菌、*Nocardioides* 属細菌の各種 CARDO を材料に、3 種のコンポーネント単体、RO で唯一の報告である Oxy:Fd 複合体の結晶構造を決定し、基質認識機構や Oxy-Fd 間の相互作用様式などを明らかにしてきた。しかし、これらの先行研究には各コンポーネントの酸化還元状態の制御が不十分なものもあり、得られた構造の比較に基づく考察には、実際の反応サイクルでの状態を十分に反映していない危惧が考えられた。最近、演者らのグループでは、酸化還元状態を制御した結晶作成と、基質、酸素、反応生成物のソーキングを組み合わせることで、Fd からの電子伝達を含めた Oxy の反応サイクル中に出てくるほとんどの状態の構造解明に成功した。

講演では、反応サイクル中での構造の詳細な比較解析によって、反応サイクルが進む機構を紹介すると共に、円滑に反応を進める精緻な機構について考察する。

biodegradation, enzyme, structure

発表責任者：野尻秀昭（anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：1S07C6p3
講演日時、会場：3 月 24 日 15:01～ C6 会場

“Pseudogene？”にコードされるタンパク質による酵素活性の制御
Regulation of enzyme activities by proteins encoded by “pseudogenes?”
○西山 真（東大生物工学セ）
○Makoto Nishiyama (BRC, The University of Tokyo)

生物の代謝は、代謝を担う酵素をコードする「遺伝子の発現」および「酵素活性」の 2 つのレベルで調節される。酵素活性を調節するシステムとして、エフェクターが直接酵素本体に結合することで酵素活性を制御する場合や、酵素がフェクター結合ドメインと融合したかたちで存在し、エフェクターの結合が構造変化を誘起することで、酵素活性を制御する場合などが知られている。

我々は、高度好熱性細菌 *Thermus thermophilus* の各種酵素の活性調節を研究している過程で、上記のようなエフェクター結合ドメインを介さずに、酵素が活性を持たない酵素ホモログと相互作用することで活性調節される例を見出した。例えば、TCA 回路とアミノ酸生合成をつなぐグルタミン酸脱水素酵素(GDH)は、活性の本体である GdhB とそれに類似したアミノ酸配列を持ちながらも活性中心残基を失った GdhA とのヘテロ 6 量体で存在することで、ロイシンにより活性化を受けるようになる。最近、GDH ヘテロ複合体が、アデニンホスホリボシル転移酵素とアノテーションされながらもアミノ酸置換のため酵素活性を示さないホモログ(APRTh)とも相互作用することを見出した。APRTh は AMP と結合することで GDH の活性を大きく上昇させる。すなわち、GDH 活性の本体である GdhB は、酵素学的に不活性な GdhA と APRTh と複合体を作ることで、ロイシンと AMP によって活性が上昇させるようにデザインされていることを意味する。高等動物の GDH はホモ 6 量体でロイシンと ADP により活性化されるが、*T. thermophilus* は同様な活性調節を複数の構造ホモログを利用することで達成していることになる。これ以外に、我々は同菌の短鎖脂肪酸 CoA 転移酵素(CoAT)がアラニンデヒドロゲナーゼ様タンパク質(ADLP)と相互作用することを見出した。ADLP も活性中心残基にアミノ酸置換があって酵素活性を示さないが、補酵素 NAD^+または NADH との結合活性は保持していた。興味深いことに、ADLP と複合体を形成した CoAT は、NAD^+存在下でのみ活性が大きく低下する。このことは、ADLP が細胞内の NAD^+/NADH を感知して CoAT の活性を調節する装置として機能していることを示唆している。

これまで、活性中心などに変異が入るなどして酵素活性を示さないタンパク質をコードする遺伝子は pseudogene とよばれ、かつての機能分子の残骸として、生物学的には意味がないものと考えられてきた。我々の結果は、pseudogene と考えられていた遺伝子の産物が環境に応答するための代謝制御装置として機能していることを示しており、従来の概念を書き換える必要性を示唆している。本シンポジウムでは、上記の例を紹介し、その生物学的な意味について議論したい。

Enzyme regulation, Protein-protein interaction, *Thermus thermophilus*

発表責任者：西山　真（umanis@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：1S07C6p4
講演日時、会場：3 月 24 日 15:30～ C6 会場

アーキアのユニークな代謝機構

Unique metabolism in Archaea

○跡見 晴幸（京大院工）
○Haruyuki Atomi (Kyoto Univ.)

アーキアは系統学的に真核生物・バクテリアとは異なる第３の生物ドメインを構成する。いままでの研究を通じて、アーキアは数多くの特徴的代謝（メタン生成等）や生体分子（イソプレノイド型膜脂質等）を有することがわかってきた。我々は超好熱性のアーキアの１種である *Thermococcus kodakarensis* を対象とし、研究を進めている。*T. kodakarensis* は鹿児島県小宝島の硫気孔から単離され、至適生育温度 85˚C、絶対嫌気性、絶対従属栄養性のアーキアである。本菌ゲノムのサイズは比較的小さく 2,088,737 bp からなり、推定される遺伝子数はわずか 2,306 個である。一次構造から機能予測できる遺伝子数はその約半数の 1,165 個であり残り半数は機能未知の遺伝子である。我々の当面の目標はこれら機能未知遺伝子の機能解明を通じて、アーキアのエネルギー代謝・生合成・転写制御等の生命機能のメカニズムを明らかにすることである。その戦略として、我々はゲノム情報から推定される酵素・代謝経路の有無と *T. kodakarensis* の実際の形質・代謝特性との違いに着目している。まず機能推定可能な遺伝子の情報に基づいて *T. kodakarensis* の物質取り込み・代謝マップを作成し、個々の代謝経路について、それらを構成する酵素の相同遺伝子がゲノム上に存在するか否かを検証する。全て揃っている場合は問題ないが、一部の遺伝子が見当たらない場合には、その反応を担う新規酵素や経路が存在する可能性もあり研究のターゲットとなる。ここでは *T. kodakarensis* の coenzyme A（CoA），nicotinamide adenine dinucleotide（NAD^+）等の補酵素の生合成経路に関する最近の研究成果を紹介する。特に CoA の生合成経路については、不明であった dephospho-CoA kinase 遺伝子が最近同定できた。Dephospho-CoA kinase は CoA 生合成経路の最終反応を触媒する。*T. kodakarensis* ゲノム上にはバクテリアの同酵素と相同性を示すタンパク質をコードする遺伝子が２種（TK1334, TK2192）存在したが、いずれの発現産物も dephospho-CoA kinase 活性を示さなかった。そこで詳細なデータベース検索が行われ、一部のメタゲノム配列に dephospho-CoA kinase の１つ上流の反応を触媒する phosphopantetheine adenylyltransferase（PPAT）遺伝子と融合している機能未知遺伝子の存在が浮かび上がった。この機能未知遺伝子のホモログは単独で *T. kodakarensis* ゲノム上に存在し、生化学的な解析からその産物が dephospho-CoA kinase 活性を示すことがわかった。また機能推定が比較的容易な phosphopantetheine synthetase, phosphopantetheine decarboxylase, PPAT についても遺伝学的にそれらの機能を検証した。これらの解析結果から *T. kodakarensis* における制御も含めた CoA 生合成経路の全容が明らかとなった。

Archaea, metabolism, hyperthermophile

発表責任者：跡見晴幸（atomi@sbchem.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：1S07C6p5
講演日時、会場：3 月 24 日 15:59～ C6 会場

ミスマッチ塩基対特異的エンドヌクレアーゼによる新規 DNA 修復機構
A novel DNA repair mechanism initiated by a mismatch specific endonuclease

○石野 良純（九大院・農）
○Yoshizumi Ishino (Kyushu Univ.)

DNA は内在性または外因性の影響によって常に損傷し、遺伝情報の変化、喪失の脅威に曝されている。生命を維持して子孫へ正しく遺伝情報を伝えるために、すべての生物は DNA 修復機能を有している。これまでの DNA 修復に関する研究は、ヌクレオチド切除修復（NER）、塩基切除修復（BER）、ミスマッチ修復（MMR）、相同組換え修復（HR）、非相同末端結合（NHEJ）などの修復機構を明らかにしてきた。これらの修復機能はバクテリアから真核生物まで保存されているが、第３のドメインであるアーキアの DNA 修復機構は未だほとんど解明されていない。本講演では特に MMR について述べる。MMR は DNA 複製のミスや塩基損傷により A-T, G-C 以外の塩基対ができ、それが突然変異に繋がることを防ぐ機構である。この修復系を司る MutS/MutL はバクテリアからヒトまで保存されており研究が進んでいる。しかし、アーキアのゲノム上に MutS/MutL に配列の類似性を示す ORF が存在するものの、実際にミスマッチ塩基に対して活性を示すものは報告がなく、アーキアの MMR の存在はミステリアスなものとして捉えられてきた。最近、我々は *Pyrococcus furiosus* からミスマッチ塩基対を含む二本鎖 DNA 特異的にエンドヌクレアーゼ活性を示すタンパク質を発見した。このタンパク質はもともとフランスのグループが、*P. abyssi* から PCNA と相互作用するエンドヌクレアーゼとして同定し、NucS と名付けて分岐構造を有する DNA に作用することを提唱してきた酵素と相同性があった。我々は、NucS の真の基質はミスマッチ塩基対を含む DNA であることを証明して EndoMS (Mismatch Specific) と名付け、この酵素がアーキアにおける MMR 経路で重要な役割を果たすことを提唱した。アーキアゲノムを網羅的に調べると、大部分のアーキアは EndoMS/NucS を有し、機能的な MutS/MutL を有しない。一部のアーキアからは EndoMS/NucS が見つからないが、我々はその一つのメタン菌から分離した MutS ホモログがミスマッチ塩基対に特異的に反応することを証明した。すなわち、MutS/MutL と EndoMS/NucS はアーキアゲノム上で相補的に存在する。さらに、MutS/MutL は一部のバクテリアには存在せず、それらの MMR の存在が長年の謎であったが、それらが EndoMS/NucS を有することがわかった。その一種である *Corynebacterium glutamicum* を用いて、EndoMS/NucS の性質を調べるとともに、*endoMS* 遺伝子破壊株を作成してその性質を調べた。精製した *C. glutamicum* 由来の EndoMS/NucS はミスマッチ塩基対 DNA を特異的に切断した。また、*endoMS* 破壊株は野生株と比較して突然変異率が顕著に上昇した。以上のことから、我々は EndoMS/NucS によるミスマッチ塩基対 DNA の二本鎖切断によって開始される新規な MMR 経路を提唱する。

mismatch repair, archaea, endonuclease

発表責任者：石野良純（ishino@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：1S07C6p6
講演日時、会場：3 月 24 日 16:28～ C6 会場

細菌メンブレンベシクルの生態的意義を考える

Bacteriol cell-cell communication by using MV

○野村 暢彦[1,2]、豊福 雅典[1,2] ([1]筑波大生命環境、[2]筑波大微生物サステイナビリティ研究センター)
○Nobuhiko Nomura[1,2], Masanori Toyofuku[1,2] ([1]Univ. of Tsukuba, [2]MiCS, Univ. of Tsukuba)

近年，地球上のほとんどの細菌は集団つまりバイオフィルムの状態で存在することが明らかになってきた.そして，細菌は自ら産生するシグナル物質を介してお互いに情報伝達を行い，集団として機能を制御している．その Cell-cell communication においては Quorum sensing(QS)が知られている.QS により，シグナル物質は徐々に拡散して周辺の細胞の遺伝子発現を連続的（アナログ）に調節すると考えられている．一方，近年，細菌はグラム陰性・陽性細菌を問わず，膜粒子であるメンブレンベシクル(MV)を産生することが明らかになってきた(1).興味深いことに，1MV には 1 細胞が応答出来る細菌シグナルが含まれており(2)，つまり，細菌のシグナル物質は，MV により遠い近いにかかわらず細胞に運搬されることで，オンとオフでのとびとび（デジタル）な細胞の遺伝子発現制御が可能になる.

さらに，MV の生成機構について調べたところ，グラム陰性細菌では集団の中の一部の細胞が破裂して(細胞死),放出された膜断片が再会合することによって MV が形成され(explosive cell lysis)(3)，一方，グラム陽性菌では同様に細胞は死ぬが細胞の形は保ったまま，細胞膜の一部が丸くなり MV が内部・外部に形成されることが明らかになった(bubbling cell death)(4)．これらのシステムの巧妙かつ興味深いところは，集団中の一部の細菌でのみ細胞死とそれにともない MV 形成が誘導される点である．つまり，集団全体としては，生き残った細菌が死んだ細菌から放出された MV の恩恵にあずかるようである(1)．また，バイオフィルム形成においては，溶菌に伴って放出される細胞外 DNA が，細胞間をつなぐ糊のような働きをして，その形成を促進させている．細菌における細胞死の意義はあまり研究されてこなかったが，細菌が集団生活を送っていることを考慮していくと，細菌集団中の一部の細胞死も多細胞生物の様に興味深い事かも知れない.

1) Toyofuku M., Nomura N., Eberl, L. (2018) Nature Reviews Microbiology
2) Toyofuku, M., *et al.* (2017) The ISME J 11.
3) Turnbull L., Toyofuku M., *et al*. (2016) Nature Communications 7, 11220
4) Toyofuku M., *et al*. (2017) Nature Communications 8, 481.

Biofilm, Cell-cell communication, MV

発表責任者：野村　暢彦（nomura.nobuhiko.ge@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：1S08B6p1
講演日時、会場：3 月 24 日 14:00～ B6 会場

アミロイドβの凝集を抑制する食品・生薬成分の作用機構

Suppression mechanism of amyloid beta aggregation by food and herbal ingredients

○入江 一浩、村上 一馬（京大院農）
○Kazuhiro Irie, Kazuma Murakami (Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ.)

アルツハイマー病 (AD) には現時点で根本的治療法がないことから，正確な早期診断法の確立と食事などの生活習慣の改善による発症の遅延が，最も現実的な対応の一つとして考えられている．AD は，アミロイド β タンパク質（Aβ）の蓄積（老人斑の形成），タウタンパク質のリン酸化（神経原線維変化），神経細胞の脱落の順序で進行するとされる．近年，Aβ の毒性本体は高分子量の凝集体ではなく，準安定なオリゴマーであることが指摘されている．したがって，AD の早期診断薬や予防薬を開発するためには，毒性を示す Aβ オリゴマーの立体構造を明らかにし，それに対する抗体などの薬剤を設計する必要がある．演者らは，Aβ42 が毒性を示す上で重要なターン構造を明らかにし [1]，それを標的とした立体構造特異抗体 (24B3) を免疫生物研究所と共同開発した．本抗体とヒト脳脊髄液を用いることにより，従来のアミロイド PET よりも早期に AD 診断できる可能性を示した [2]．さらに，24B3 は AD モデルマウスの異常行動を緩和したことから [3]，AD の予防ならびに治療への応用が期待される．しかしながら，抗体のヒト化や安全性試験ならびにコストなど，ハードルはきわめて高い．

これまで，食品・生薬成分の中から多くの Aβ42 凝集（オリゴマー化）抑制物質が報告され，AD モデルマウスに対して予防・治療効果を示したものもいくつかあるが，作用機構に関しては不明な点が多い．演者らは，既存薬の有効利用という観点から，肝機能改善薬であるシリマリンと神経変性疾患への有効性が報告されている生薬・チョウトウコウに着目して研究を行ってきている．これまでに，シリマリンが AD 病態を改善することを AD モデルマウスで明らかにし [4], Aβ42 凝集抑制物質の一つとしてカテコール型フラボノイドであるタキシフォリンを単離・同定した [5]．その作用機構を各種機器分析法によって解析した結果，酸化により生じた *o*-キノン体が，Aβ42 の Lys16, 28 のアミノ基によるマイケル付加を受けることによって凝集を抑制することが判明した [6]. 一方, モリン, ケンフェロール，クルクミンなどの非カテコール型フラボノイドは，Aβ42 の His13-Ala21（Aβ42 オリゴマーにおける分子間 β-sheet 領域）にインターカレーションすることにより，凝集を抑制した [7]．さらに，チョウトウコウから単離・同定したウンカリン酸類は，Aβ42 の凝集における 2 つの過程（核形成と線維伸長段階）のうち，核形成段階を選択的に抑制した [8]．以上の結果は，Aβ42 の凝集抑制物質の構造的な要因として，① カテコール構造，② 共役系による平面構造，③ カルボキシ基の少なくとも 3 つがあることを示唆しており，今後の凝集抑制物質の探索において有用である．さらに，マウスを用いた代謝実験において，経口投与したフラボノイドの脳内への移行形態の一部を明らかにしつつある．

【参考文献】 1) A. Morimoto *et al., J. Biol. Chem.*, **279**, 52781 (2004), K. Murakami *et al., J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 15168 (2005), Y. Masuda *et al., ChemBioChem,* **10**, 287 (2009); 2) K. Murakami *et al., Sci. Rep.*, **6**, 29038 (2016), 入江一浩，*化学,* **71** (11), 41 (2016), C. Akiba *et al., J. Alzheimers Dis.*, **63**, 989 (2018); 3) N. Izuo *et al., Sci. Rep.* **7**, 11811 (2017); 4) N. Murata *et al., Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 2299 (2010); 5) M. Sato *et al., Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 1100 (2013); 6) M. Sato *et al., J. Biol. Chem.*, **288**, 23212 (2013), 7) M. Hanaki *et al., Bioorg. Med. Chem.*, **24**, 304 (2016), Y. Masuda *et al., Bioorg. Med. Chem.*, **19**, 5967 (2011); 8) T. Yoshioka *et al., J. Nat. Prod.*, **79**, 2521 (2016), K. Murakami *et al., Chem. Commun.*, **54**, 6272 (2018).

Alzheimer's disease, amyloid beta, polyphenol

発表責任者：入江　一浩（irie@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：1S08B6p2
講演日時、会場：3 月 24 日 14:30～ B6 会場

末梢－中枢相互作用の解明による新しい脳機能改善戦略

New strategies for improving brain function based on the periphery-brain interaction

○大日向 耕作（京大院農）
○Kousaku Ohinata (Kyoto Univ., Grad. Sch. of Agri.)

神経系は、迅速な情報処理を行う高度に制御された全身性システムであり、多彩な生理作用を仲介し恒常性維持に重要な役割を果たしている。神経系において中心的役割を果たす脳は、体全体の 2%の体積であるにも関わらず、全エネルギーの 1/4 を消費する負荷の高い利己的な臓器であり、血液脳関門（BBB）が存在することから独立性の高い臓器として知られる。しかしながら、実際には末梢環境に少なからず影響を受け、また、末梢シグナルを受容する。これまで我々は、食品タンパク質の酵素消化により多彩な機能性を示す生理活性ペプチドが生成し、これらのなかには末梢投与により脳機能を改善する場合があることを見出した。本講演では 1) 末梢環境変化による認知機能低下、および、それを改善するペプチド 2) 腸―脳連関により作用する抗うつ様ペプチドの例を紹介する。

糖尿病は認知症の危険因子として知られる。そこで、糖尿病発症リスクを高める高脂肪食摂取による認知機能に及ぼす影響を検討した。その結果、ラードを主成分とする高脂肪食で1週間飼育した場合に、海馬依存性記憶が低下し極めて短期間で脳機能低下が惹起されることを明らかにした。さらに、久山町研究から認知機能低下の防御因子であることが示された牛乳から、これを改善するペプチドを見出した。認知症の新しい予防・治療戦略の開発につながる可能性がある。

現代のストレス社会を反映し神経疾患数が増加し、その対策が急務である。最近、我々は経口投与で強力な抗うつ様作用を示す大豆由来のペプチドを発見しsoy-deprestatinと命名した[1]。最小有効量は0.3 mg/kgであり医薬品に匹敵する強力な効果を示す。本ペプチドの経口投与による抗うつ様作用は、迷走神経切除で消失し、また、求心性迷走神経が入力する孤束核（NTS）における神経活動マーカーc-Fos 発現が増加することが明らかとなった。したがって、soy-deprestatin は消化管に直接作用し、そのシグナルが迷走神経を介して、脳に伝達されると考えられる。食と生体の相互作用に着目した既存薬とは全く異なる作用機構を介した創薬シーズといえる。また、消化管ホルモン分泌調節を介して脳機能を調節するものも存在する[2,3]。なお、短時間で生理活性を示すこれらの腸―脳連関ペプチドは gut microbiome とは作用点が異なると考えられる。

食と脳の相互作用の詳細は依然として不明な点も多く、今後、基礎、臨床、疫学など多彩な分野の研究者が参入・協力することにより、大きな学術領域として発展することが期待される。

[参考文献]

[1] Mori Y, Asakura S *et al*. **FASEB J.** 2018;32(2):568-575; [2] Aoki H, Nakato J, *et al*. **FEBS Lett**. 2017;591(14):2121-2130; [3] Nakato J, Aoki H *et al*. **FEBS Lett**. 2016;590(16):2681-9.

Bioactive peptides, Gut-brain communication, Cognition

発表責任者：大日向耕作（ohinata@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：1S08B6p3
講演日時、会場：3 月 24 日 15:00～ B6 会場

食品に由来する脳機能改善素材の開発

Development of food-derived materials improving cognitive function

○阿野 泰久（キリン(株)健康研）
○Yasuhisa Ano (Kirin Co. Ltd., Res. Lab. for Health Sci.)

高齢化が進む国内では認知症患者は急増し、2025 年には 730 万人に達するとされる。認知症には発症後の有効な治療方法がなく、日常生活での予防が注目されている。近年の疫学調査によると適度な酒類や発酵乳製品の摂取が老後の認知機能低下や認知症予防に関連があることが各々報告されている。

酒類について、例えば赤ワインポリフェノールのレスベラトロールについて、非臨床および臨床試験でアルツハイマー病(AD)予防に関する報告が多数ある。一方、最も消費量の多いビールに関する報告は殆どない。そこで我々はビールの原料として 1000 年以上供され、薬用植物としても知られるホップに着目し、ホップ由来の苦味成分イソ α 酸の AD 予防、認知機能改善作用を見いだした。AD ではアミロイド β(Aβ)沈着による老人斑やリン酸化タウ沈着による神経原線維変化が発症原因とされる。また、脳内の老廃物は免疫細胞のミクログリアにより貪食除去されるが、加齢に伴いその機能は低下し、逆に炎症状態亢進により病態が悪化する。我々はイソ α 酸がミクログリアの核内受容体 PPAR-γ を活性化し、貪食機能を亢進し、抗炎症機能を高めることを見いだした。AD モデルマウスを用いてイソ α 酸の効果を検証した結果、イソ α 酸の摂取はミクログリアの機能を亢進し、Aβ 沈着と脳内炎症を抑制し、認知機能を改善した。また、Aβ 沈着後のマウスへのイソ α 酸短期投与でも脳内炎症と海馬ニューロンの過活動を改善し、認知機能を改善した。加えて、苦味受容体への強いアゴニスト作用が知られるイソ α 酸は迷走神経を活性化し、モノアミンの産生を介して、海馬依存的な記憶学習機能を改善することも明らかとなった。この成果をもとに、認知機能改善作用は維持しつつも苦味を低減させた熟成ホップ苦味酸を独自に開発した。

一方、発酵乳製品について、乳製品を摂取する食習慣のある人は老後の認知機能の低下が予防されるという疫学調査が近年なされた。我々は、中でも白カビで発酵させたカマンベールチーズについて AD モデルマウスで予防効果を見出した。更にカマンベールチーズに含まれる認知機能改善の有効成分をスコポラミン健忘症モデルマウスにより探索した結果、Tryptophan-tyrosine(WY)を含むペプチド配列に記憶力改善作用を見出した。WY ペプチドは MAO-B 阻害活性により脳内モノアミンの量を増加し、記憶力を改善することを確認した。この成果をもとに WY ペプチドが高含有なホエイ酵素分解物を開発し、自然加齢マウスを用いた試験で WY ペプチドやホエイ酵素分解物が加齢に伴い低下した認知機能を改善することを確認した。これらの食品由来素材について、ヒトでの有効性の検証を進め、認知機能改善、認知症予防食品の開発が期待される。

dementia, memory, inflammation

発表責任者：阿野泰久（Yasuhisa_Ano@kirin.co.jp）

講演番号：1S08B6p4
講演日時、会場：3 月 24 日 15:30～ B6 会場

腸内細菌と脳機能―ビフィズス菌摂取による認知機能改善の可能性

Gut microbiota and brain function - Potential of probiotic Bifidobacterium for preventing cognitive impairment in Alzheimer's disease-

○清水 金忠（森永乳業(株)基礎研究所）
○Jinzhong Xiao (Next Generation Science Institute, Morinaga Milk Industry Co., Ltd.)

ヒトの腸内には数百種類，数百兆個以上の細菌が棲息しており，腸内細菌叢を形成している。ビフィズス菌は腸内細菌叢の主要構成菌であり、整腸作用をはじめ様々な保健機能が知られている。近年では、腸は食物を消化吸収するだけでなく、気分やストレスなど精神状態にも影響を与えることが明らかとなっており、腸内細菌を介した脳と腸の機能連関を意味する「脳腸相関」が脚光を浴びている。アルツハイマー病をはじめとした認知症は全世界的に増加しており、特に日本では超高齢社会の到来とともに大きな社会問題となっている。近年の研究から、認知症は数十年単位で進行する慢性病の一つであり、認知症は一度発症すると症状を改善させることが困難であり、根本的な治療法がない現在では、将来の認知症を見据えた早めの対策が課題となっており、認知症の発症予防や進行抑制を目的とした生活習慣の介入や、機能性食品による日常生活の中での予防策が求められている。
このような背景の中、我々はプロバイオティクス摂取による認知症改善作用を検証する研究に取り組んできた。本講演では、*Bifidobacterium breve* A1 のアルツハイマー病型認知機能改善作用に関する動物実験および予備臨床試験の研究結果を紹介し、ビフィズス菌による認知症発症抑制作用の可能性について展望したい。

1. Kobayashi Y, Sugahara H, Shimada K, Mitsuyama E, Kuhara T, Yasuoka A, Kondo T, Abe K, Xiao JZ. Therapeutic potential of *Bifidobacterium breve* strain A1 for preventing cognitive impairment in Alzheimer's disease. Sci Rep. 2017 Oct 18;7(1):13510.
2. Kobayashi Y, Kinoshita T, Matsumoto A, Yoshino K, Saito I, Xiao JZ. *Bifidobacterium breve* A1 supplementation improved cognitive decline in older adults with mild cognitive impairment: an open-label, single-arm study. The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease (in press).

Bifidobacterium, Dementia, Probiotics

講演番号：1S08B6p5
講演日時、会場：3 月 24 日 16:00～ B6 会場

食事パターンと認知症の関係：久山町研究

Dietary pattern and dementia: the Hisayama Study

○二宮 利治 (九州大学)
○Toshiharu Ninomiya (Kyushu University)

わが国は、4 人に 1 人が高齢者という超高齢社会を迎え、認知症の増加が医療・社会問題となっている。さらに、認知症予防に有効な食事について関心が高まっている。近年の海外の臨床・疫学研究の成績では、地中海式食事パターンが認知症の発症リスクを減少させるという報告が散見される。しかし、わが国には固有の食文化があり、海外の食習慣をそのまま国内に持ち込むことは容易ではない。そのため、認知症予防に有効なわが国固有の食事パターンを同定することが重要である。そこで、福岡県久山町で継続中の追跡調査（久山町研究）の成績をもとに、日本人の地域住民における食習慣と認知症発症の関係を検討した。その結果、大豆製品と豆腐、緑黄色野菜、淡色野菜、藻類、牛乳・乳製品、芋類、果実類、魚の摂取量が多く、米とアルコールの摂取が低いという食事パターンを有する者では、全認知症の発症リスクが有意に低かった。病型別の検討では、アルツハイマー型認知症、血管性認知症ともに発症リスクが低かった。

さらに、近年、鶏肉に多く含有するイミダゾールジペプチドとして知られるカルノシン・アンセリンの摂取が抗酸化作用・抗糖化作用・抗炎症作用を介して認知機能障害に予防的に作用することが報告されている。そこで、カルノシン・アンセリンの分解産物であるβアラニンの血中濃度と認知症の発症リスクとの関連について検討した。血清βアラニン濃度は液体クロマトグラフ質量分析法により測定した。その結果、血清βアラニン濃度の上昇に伴い、全認知症およびアルツハイマー型認知症の発症リスクは有意に低下した。

将来の認知症を予防する上で、高血圧や糖尿病、喫煙などの危険因子の予防・管理に加え、食習慣にも留意することが重要であると考えられる。また、鶏肉などカルノシン・アンセリンあるいはβアラニンを含有する食事は、認知機能障害に対し保護的に作用することが示唆された。

Dementia, Diet, Epidemiology

講演番号：1S08B6p6
講演日時、会場：3 月 24 日 16:30～ B6 会場

ヒト介入試験を通じた食品成分による脳老化改善の探求

Human placebo-controled randomized interventional trials and improvement of brain aging by food factors

○久恒 辰博（東大新領域）
○Tatsuhiro Hisatsune (The University of Tokyo, GSFS)

高齢者の健康寿命を延伸する高機能食品成分の開発に対する期待が一段と高まっている。多価不飽和脂肪酸（DHA）とイチョウ葉成分については、記憶機能の改善を謳った機能性表示食品として、既に販売が始まっている。また、ビタミン類や乳由来成分など複数の高機能食品成分を含む栄養補助食品の開発も、大手の食品企業を含めて、非常に活発になってきた。加齢による脳機能の低下は、認知症の発症を引き起こす最大のリスク因子とされている。代表的な認知症であるアルツハイマー病においては、発病後の治療がきわめて困難なこともあり、超早期の診断とそれに引き続く生活習慣の改善（食生活の改善など）によるリスクの低下が最も現実的な対応の一つと考えられている。今後１０年以内に、認知症パンデミック（2025 年問題：日本人の 20 人に 1 人が認知症）が予測されていることから、食の果たす役割はきわめて大きいと思われる。こういった背景の中で、様々な食品を出発材料として、脳老化を改善し、機能改善をもたらす可能性のある食品成分について、将来的に機能性表示食品の制度を目指した食品開発が活発化している。関係する研究分野では、大学・公的研究所と企業との連携がさらに活発化し、新たなイノベーション（革新）の創出が期待されている。一方で、早過ぎる展開によって消費者からの不安や不信感が生ずる懸念もあり、基礎研究を推進することにより、十分なエビデンスを蓄積しつつ、このような機能性食品の開発を慎重に進めて行く必要がある。この課題を解決するためには、食品成分のヒトでのエビデンスを得るために、ヒト介入試験を行う必要性があり、食品成分の効果（有効性と安全性）を確かめることが求められている。当研究室では、数年前から、医学系の研究機関と連携をして、食品機能性成分を含む試験食品と、含まないプラセボ食品を用いた高齢者ランダム化比較試験を行ってきた。本シンポジウムでは、これまでに実施した肉類イミダゾールジペプチド食品を使用した高齢者ランダム化比較試験の結果を紹介することを通じて、「食による脳老化改善」に関する現状の把握と、これからの課題解決を目的として、情報提供を行う。

Randomized control trial (RCT), Alzheimer Disease, Mild Cognitive Impairment (MCI)

発表責任者：久恒辰博（hisatsune@edu.k.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：1S09A4p1
講演日時、会場：3 月 24 日 14:05～ A4 会場

海綿動物由来の細胞毒性物質を生産する共生微生物の発見と伝播機構の解明

Mycale sponges inherit cytotoxin producers through vertical microbial transmission.

○高田 健太郎（北里大海洋）
○Kentaro Takada (Kitasato Univ.)

海洋無脊椎動物は特徴的な化学構造を持つ二次代謝産物を多く含むことから、研究試薬や医薬品開発における重要な生物資源のひとつとして考えられている。その中でも、海綿動物は際立って多くの二次代謝産物を体内に含み、これまで複数の医薬品が開発されている。これらの化合物は海綿動物に共生する微生物によって生産されると考えられてきたが、生産微生物が難培養性であることから、その詳細は明らかにされていなかった。2014 年、八丈島の海綿 *Theonella swinhoei* に含まれる 30 種以上の化合物が、*Entotheonella* というカイメン特有の共生微生物によって生産されることが遺伝子レベルで明らかにされ、難培養性の共生微生物が新たな生物資源として利用可能なことが証明された。[1] さらに、他の海綿動物に共生する *Entotheonella* もまた、様々な化合物の生産を担うことが明らかになり、当該バクテリアの二次代謝生産能力の高さが証明されている。[2] その後、少しずつ海綿動物由来の二次代謝産物の生産微生物に関する知見が集積されているものの、ほとんどの化合物の生産者は明らかになっていない。

我々の研究グループは、アクチンの脱重合阻害により細胞毒性を引き起こす mycalolide という化合物に注目し、その生産微生物に関する研究をおこなってきた。本発表では、生合成遺伝子クラスターの発見、生産微生物の同定、および、カイメン完全養殖技術の開発によって明らかになった、生産微生物の宿主間における伝播機構について紹介する。

参考文献

1. Wilson MC, et al. An environmental bacterial taxon with a large and distinct metabolic repertoire. ***Nature*** 506 :58-62, 2014.
2. a) Wakimoto T. et al. Calyculin biogenesis from a pyrophosphate protoxin produced by a sponge symbiont. ***Nat Chem Biol.*** 10:648-55. 2014. b) Ueoka R et al. Metabolic and evolutionary origin of actin-binding polyketides from diverse organisms. ***Nat Chem Biol.*** 11:705-12, 2015. c) Mori T et al. Single-bacterial genomics validates rich and varied specialized metabolism of uncultivated Entotheonella sponge symbionts. ***Proc Natl Acad Sci U.S. A.*** 115:1718-1723, 2018.

marine natural products, symbiotic bacteria, biosynthesis

発表責任者：高田　健太郎（ktakada@kitasato-u.ac.jp）

講演番号：1S09A4p2
講演日時、会場：3 月 24 日 14:33～ A4 会場

第 3 の液性因子：腸内細菌叢由来代謝物質がもたらす機能

The third humoral factor: Shedding light on the function of gut microbiota-derived metabolites

○福田 真嗣[1,2,3,4,5] ([1]慶大先端生命研、[2]JST PRESTO、[3]神奈川産技総研、[4]筑大 TMRC、[5]メタジェン)
○Shinji Fukuda[1,2,3,4,5] ([1]Inst. Adv. Biosci., Keio Univ., [2]JST PRESTO, [3]KISTEC-KAST, [4]TMRC, Univ. Tsukuba, [5]Metabologenomics, Inc.)

生体内において、臓器連関や細胞間コミュニケーションを担う因子としてホルモンやサイトカインなどが知られている。しかし近年の研究で、腸内に生息する数百種類以上で数十から 100 兆個にもおよぶとされる腸内細菌叢から産生される様々な代謝物質も、異種生物である宿主細胞や臓器機能に影響を与えることが知られるようになり、これらを第 3 の液性因子と捉える機運が高まりつつある。腸内細菌叢はその構成成分や産生する代謝物質を介してヒトの健康維持に寄与することが知られているが、薬剤摂取やストレス、あるいはライフスタイルや食習慣の変化など、様々な環境要因により腸内細菌叢のバランスが崩れると（これを dysbiosis と呼ぶ）、大腸癌や炎症性腸疾患といった腸そのものの疾患に加えて、自己免疫疾患や代謝疾患といった全身性疾患につながることも知られている。それ故、腸内細菌叢由来代謝物質を第 3 の液性因子として捉え、その機能を正しく理解しそれらを制御することは、われわれの健康維持・疾患予防において重要であるが、とりわけ宿主状態、特に加齢と腸内環境との関連については不明な点が多い。そこでわれわれは、宿主加齢と腸内環境との特徴を詳細に解析するため、無菌マウスおよび SPF マウスを生後 3 週から 1 年半の間ビニールアイソレーター内でそれぞれ飼育し、滅菌水と滅菌飼料を与えることで、外環境や食餌由来の微生物の混入を防ぎ、摂取飼料の変化も起きない人工的環境を作り出した。その間に無菌および SPF マウスから定期的に血液および便を採取し、細菌叢のメタゲノム解析および代謝物質のメタボローム解析を実施した。その結果、加齢に伴って宿主の消化吸収能が低下することで大腸内に流入する食餌由来成分の変化を招き、結果として腸内細菌叢やそこから産生される代謝物質群が変化することが明らかとなった。変化した腸内環境の宿主への影響を評価するため、若齢無菌マウスへの老齢 SPF マウス由来腸内細菌叢の移植試験を実施した。その結果、老齢 SPF マウスの腸内細菌叢は宿主の肥満を促し、耐糖能の悪化も引き起こすことが明らかとなった。本研究成果は、宿主加齢に伴った腸内環境変動の分子基盤の一端を明らかにするのみならず、加齢に伴って生じた dysbiosis が二次的に宿主肥満を促すといった、宿主–腸内細菌叢間相互作用における新たな機能側面の理解に繋がると考えられる。

Gut microbiota, Metabolomics, Metagenomics

発表責任者：福田真嗣（sfukuda@sfc.keio.ac.jp）

講演番号：1S09A4p3
講演日時、会場：3 月 24 日 15:01～ A4 会場

哺乳動物毒における化学コミュニケーション

Chemical Communication on the Mammalian Venom

○北 将樹[1,2] ([1]名大院生命農、[2]JST さきがけ)
○Masaki KITA[1,2] ([1]Nagoya Univ, Bioagric., [2]PRESTO, JST)

動物由来の天然毒には、フグ毒テトロドトキシンなど、ユニークな構造や切れ味鋭い活性をもつものが多い。また加速進化により、有毒動物の生理活性ペプチドには構造や機能に多様性がみられる。このように新規神経毒の化学的解明は、薬理学、神経科学、精神医学など広範な生命科学の基礎研究に寄与し、また疼痛治療薬など新規薬剤の開発にもつながる［*Clinical Neuroscience* **2017**, *35*, 1453］。我々は希少な哺乳類が持つ有毒物質に注目して、食虫目トガリネズミが唾液に持つ致死性タンパク毒ブラリナトキシン［*PNAS* **2004**, *101*, 75422］や、単孔目カモノハシの毒液に含まれるC型ナトリウム利尿ペプチドホルモンの部分断片ペプチド［*JACS* **2009**, *131*, 18038；*Pure Appl. Chem.* **2012**, *84*, 1317］など、ユニークな活性物質を発見してきた。このように構造や機能がユニークな麻痺性神経毒は、痛みや麻痺関連の受容体や器官に特異的に作用すると予想される。本講演では、トガリネズミがミールワームなど餌を瞬時に麻痺させ捕獲するという興味深い現象に注目して、ブラリナトガリネズミの顎下腺から新たに単離した分子量約 5 kDa の麻痺性ペプチド BPP 類の構造や生物活性など、化学生態学および進化生態学的にも興味深い、希少な哺乳類由来の有毒物質に関する最近の取り組みを紹介する。さらに、これら神経毒を異種の哺乳類がもつ類似化合物と比較することで、独自に進化してきた種がもつ有毒物質（＝化学コミュニケーション物質）の生物学・生態学的意義を探りたい。

paralytic peptide, mammalian venom, neurotoxin

発表責任者：北将樹（mkita@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：1S09A4p4
講演日時、会場：3 月 24 日 15:29～ A4 会場

グアニン 4 重鎖安定化物質の分子プロファイリングとがん創薬への展開

Molecular profiling of G-quadruplex-stabilizing compounds and its application to cancer drug discovery

○清宮 啓之[1]、新家 一男[2]、長澤 和夫[3]([1]がん研・化療セ・分子生物治療、[2]産総研・生命工学・創薬基盤、[3]東京農工大・院・工)
○Hiroyuki Seimiya[1], Kazuo Shin-ya[2], Kazuo Nagasawa[3] ([1]JFCR Cancer Chemother. Ctr., [2]Natl. Inst. Adv. Indust. Sci. Tech., [3]Fac. Eng., Tokyo Univ. Agr. Tech.)

染色体末端のテロメア反復配列 TTAGGG は、K^+などの 1 価イオンの存在下で G-カルテットと呼ばれる平面構造を取ることが可能である。G-カルテットはさらに、π-π 相互作用によって重層し、グアニン 4 重鎖（G-quadruplex: G4）と呼ばれる特殊な高次構造を形成する。G4 は、テロメア以外でも概ね$(GGGX_{1\text{-}7})_n$を満たす核酸配列で形成される。近年、G4 が細胞内にも存在することが示され、その生理的意義に関心が集まっている。興味深いことに、微生物は進化の過程で、自身のゲノム上から G4 形成配列を積極的に排除してきたとする仮説が最近、提唱されている。テロメスタチンという G4 安定化物質を産生する放線菌が存在することも踏まえると、微生物生存競争の中で、G4 安定化物質を産生することには一定の意義が存在するのかもしれない。すなわち、G4 とその安定化物質は、生物間の抗生関係を制御する重要な因子である可能性も考えられる。我々は、このような発想をがんの新薬開発に応用すべく、G4 安定化物質が惹起する細胞応答、そしてそのような応答のがん細胞選択性に関する研究を行ってきた。具体的には、テロメスタチンやその合成誘導体としての G4 安定化物質が、テロメア G4 を過度に安定化することで染色体末端のキャップ機能を速やかに破綻させること、難治性神経膠芽腫の起源となるがん幹細胞（神経膠腫幹細胞）に対して強い制がん効果を示すことなどを見出してきた。G4 安定化物質は DNA の複製ストレスを惹起するが、我々の調べでは、神経膠腫幹細胞は複製ストレス刺激に対して特に過敏であることが分かった。さらに、G4 安定化物質に対する様々な臓器由来のがん細胞株の感受性を調べたところ、複数の膵がん細胞株が特に強い感受性を示すことが見出された。この膵がん細胞株を皮下移植したマウスゼノグラフトモデルにおいて、G4 安定化物質は抗腫瘍効果を示した。興味深いことに、これらの膵がん細胞株では、G4 安定化物質を処理しても DNA 損傷が顕著には誘導されず、別の作用が制がん効果に寄与している可能性が示唆された。これと関連して、G4 安定化物質は G4 形成配列を有する mRNA の転写・翻訳を抑制することが試験管内の検討で判明した。G4 安定化物質はテロメラーゼ阻害活性を併せ持つが、G4 安定化活性をもたないテロメラーゼ阻害剤は、G4 形成配列を有する mRNA の転写・翻訳に影響を与えなかった。これらのことから、G4 安定化物質は DNA 損傷のみならず、mRNA の転写・翻訳抑制をも引き起こすことによって制がん効果を発揮している可能性が示唆された。以上の結果は、G4、すなわち従来のゲノム・エピゲノムの概念には当てはまらない、核酸の「かたち」ががん治療の有望な標的であることを示しており、新たながん治療薬としての G4 安定化物質の開発が期待される。

G-quadruplex, cancer stem cell, telomere

発表責任者：清宮啓之（hseimiya@jfcr.or.jp）

講演番号：1S09A4p5
講演日時、会場：3 月 24 日 15:57～ A4 会場

真核微生物における小分子を介した新しい細胞間コミュニケーション

Novel cell-to-cell communication via small molecules in eukaryotic microorganisms

○吉田 稔[1,2]、大澤 晋[1]、八代田 陽子[1] ([1]理研環境資源化学セ、[2]東大応生工)
○Minoru Yoshida[1,2], Shin Ohsawa[1], Yoko Yashiroda[1] ([1]RIKEN CSRS, [2]Dept. Biotechnol., Univ, of Tokyo)

視覚や聴覚を持たない微生物は、主に化学コミュニケーションを介して同種・異種微生物の存在を感知し、共生物質や抗生物質を生産しているのではないかと推定されるが、その実体はほとんどわかっていない。一般に生物は良好な栄養源から優先的に利用するシステムを有する。カタボライト抑制と呼ばれるこの機構は、競合する微生物間において良好な栄養源を優先的に利用して自己の増殖を有利にしようという進化的に重要なシステムである。例えば、培地中に分岐鎖アミノ酸が存在しても、より良好な N 源であるアンモニアやグルタミン酸が存在すると、それらを優先的に利用し、分岐鎖アミノ酸を取り込まない。これを窒素カタボライト抑制（NCR）という。そのため、分岐鎖アミノ酸の要求性変異株は、培地中に分岐鎖アミノ酸が十分に存在しても生育できない。演者らは、分裂酵母において自身が微量に分泌する酸素化脂肪酸代謝物（オキシリピン）が一定の濃度に達すると NCR を解除し、分岐鎖アミノ酸取り込み能を回復して生育可能になることを見いだした（Sun et al. ***Sci Rep*** 2016）。興味深いことに、この適応生育作用は細胞に記憶され、一度適応した細胞は NCR の解除が持続することから、エピジェネティックな制御を受けていると考えられる。実際、ヒストン修飾と転写伸長に関与する Gcn5 の欠損株では、恒常的に NCR が解除されていた。このように、カタボライト抑制がかえって生育に不利になるような条件下においては、微生物は積極的にカタボライト抑制を解除し、それを記憶するシステムも併せ持っている可能性が考えられる。分裂酵母における NCR の分子機構とその生物学的意義について考察したい。

nitrogen metabolism, oxylipin, epigenetics

発表責任者：吉田　稔（yoshidam@riken.jp）

講演番号：1S09A4p6
講演日時、会場：3 月 24 日 16:25～ A4 会場

ホヤ脊索管形成の制御機構のケミカルバイオロジー

Chemical Biology for the development of ascidian Ciona robusta

○井本 正哉（慶応大理工）
○Masaya Imoto (Keio Univ.)

近年の再生医療分野の期待の中で，3 次元的な器官形成機構の解明はますます重要であると認識されている．とくに私たちの体内にはあらゆる管組織が存在するが，これらがどのように形成されるかについてはほとんどわかっていない．そこでヒトに近縁なモデル生物であるカタユウレイホヤに着目した．ホヤの脊索は生体の管形成のシンプルな *in vivo* モデルであることから，ケミカルバイオロジーの研究手法でホヤの脊索管形成の機構解明に取り組んだ．まず，ホヤ初期発生に影響を及ぼす化合物を探索したところ，かつてがん細胞の転移阻害剤として我々が開発した化合物 UTKO1 が脊索管形成を阻害することがわかった．そこで，UTKO1 によるホヤの脊索管形成阻害機構の解析研究を開始した．

我々はヒトがん細胞における UTKO1 の標的分子は 14-3-3ζ であることを報告している[1]．そこで UTKO1 がホヤにおいても 14-3-3 に作用するか検討した．ホヤの 14-3-3 は 4 種類のアイソフォームが存在するが，UTKO1 はそのうち 14-3-3εa に特異的に結合してその機能を抑えることで管形成を阻害していることがわかった．次に UTKO1 は 14-3-3εa のどのような機能を抑制しているのかを検討した．その結果，14-3-3εa が ERM(Ezrin/Radixin/Moesin)と結合すること，さらにこの結合が UTKO1 によって阻害されることを見出したことから，14-3-3εa と ERM の相互作用が管形成に重要であることがわかった．

つぎに 14-3-3εa と ERM の相互作用がどのように脊索管形成を制御しているのかを解析するために脊索管形成過程のライブ観察を行った．管腔の開口前に 14-3-3εa と ERM は管腔から離れた基底部，特に中央の収縮環に共局在していた．そして管腔が開きだすと，両者は収縮環から管腔に向かって周期的に発生する「流れ」に乗って管腔に移動することを発見しました．この「流れ」は UTKO1 処理したホヤや 14-3-3εa と ERM の結合能を失った変異体ホヤではみられなかった．このことは 14-3-3εa と ERM の相互作用がこの「流れ」を作っているということを示している．以上より収縮環における 14-3-3εa と ERM の結合が，収縮環から管腔に至る物質の「流れ」を発生させて，この「流れ」に乗って管腔の形成に関わるさまざまな基底部の因子を管腔へと運んでいることを明らかにした[2]．

1) Kobayashi H, et al JBC, 286(45):39259-39268 (2011)
2) Mizotani Y, et al. PNAS 115(38):E8873-E8881 (2018)

ascidian Ciona robusta, 14-3-3, UTKO1

発表責任者：井本正哉（imoto@bio.keio.ac.jp）

講演番号：1S10A3p1
講演日時、会場：3 月 24 日 14:05～ A3 会場

バイオエコノミー：地球に対するフェアトレード

Bioeconomy: fair trade for the Earth

○五十嵐 圭日子[1,2] ([1]東大院農生科、[2]VTT フィンランド技術研究センター)
○Kiyohiko IGARASHI[1,2] ([1]Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo, [2]VTT Tech. Res. Center Finland)

「バイオエコノミー（Bioeconomy)」とは、生物圏に負荷をかけない経済活動を意味し、欧州を中心に広く浸透し始めている概念である。ヨーロッパ委員会（EC）における「Bioeconomy」の定義を直訳すると「再生可能な生物資源の生産と、これらの資源や廃棄物の流入を、食品、飼料、バイオベース製品、バイオエネルギーなどの付加価値（の高い）製品に変換することです。その分野と産業は、幅広い科学、産業化技術、地元の知識と暗黙の知識を活用することで、強力なイノベーションの可能性を秘めています」となるが、国連の「持続可能な開発目標（Sustainable Development Goals; SDGs)」への貢献や、環境、社会、企業統治（environment, social, and governance; ESG）に配慮している企業を重視・選別して行う「ESG 投資」への対策など様々な取り組みがバイオエコノミーに含まれる。どの一方で、我が国では平成 29 年 6 月に閣議決定された「科学技術イノベーション総合戦略」に短く「市場の不透明さから投資が十分に行われていない」と書かれただけで、その遅れが指摘されている。本講演では、バイオエコノミーを巡る世界の動きを俯瞰し、地球に対するフェアトレードという視点でバイオエコノミーを動かすことの大切さを議論する。

Bioeconomy, SDGs, Fair trade

発表責任者：Kiyohiko Igarashi（aquarius@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：1S10A3p2
講演日時、会場：3 月 24 日 14:35～ A3 会場

微生物由来の天然ポリカチオンを利用した生体高分子の細胞内送達法

Intracellular delivery of biological macromolecules using bacterial polycations

○濱野 吉十（福井県大・生物資源）
○Yoshimitsu Hamano (Fukui Pref. Univ.)

酵素や抗体などのタンパク質、そして、DNA のような高分子化合物は、通常、細胞膜を透過しない。細胞の恒常性維持においてこの性質は重要であるが、その反面、機能解析や制御あるいは医療目的で、これら高分子を細胞外から内に直接導入することを難しくしている。これまでに、マイクロインジェクションやエレクトロポレーションなど細胞膜を一過的に破壊し導入する方法や、リポソームを用いて導入する方法などが用いられてきた。しかし、導入効率や細胞に与える損傷の大きさから、必ずしも満足のいく結果は得られていない。一方で、塩基性ペプチド（カチオン性ペプチド）の優れた細胞膜透過性が注目され、タンパク質・酵素をこれらで修飾し、細胞内に直接送達させる方法が盛んに試みられるようになってきた。実際に、ポリカチオン性ペプチドとの化学的架橋体あるいは融合タンパク質としてポリカチオン修飾したタンパク質を調製し、細胞培養液に加えるだけで細胞機能が制御できた例も数多く報告され、細胞生化学的手法の一つとして認知されるとともに、抗体医薬を含むバイオ医薬品の新しい送達法としても注目されている。

現在、8 残基からなる L-アルギニンペプチド（R8）がポリカチオン修飾の汎用ツールとして基礎研究レベルで利用されている。特に、タンパク質や酵素の表層を化学的に R8 で修飾する方法が有効であるが、タンパク質が変性しない温和な条件で R8 修飾するためには、特異的な反応基を有する R8（例えば、クリックケミストリー修飾された R8）を利用する必要がある。しかし、有機化学的な固相合成法に頼るこの手法は、極めてコストが高いため、バイオ医薬品等への適用が難しい。

そこで我々は、R8 に代わるポリカチオン修飾の新ツールとして、放線菌由来の天然ポリカチオン化合物であるε-ポリ-L-リジン（ε-PL）に着目した。ε-PL は、微生物培養で得られる低コストポリカチオンである。しかし、この構造にクリックケミストリー用の官能基（azide 基や alkyne 基など）を導入するためには、R8 の場合と同じく保護基を多用した高度な有機合成技術が必要であり、コストも高い。しかし、ε-PL 合成酵素（*Nat. Chem. Biol.*, 4, 766, 2008）の発展的な研究を行う過程で、ε-PL 生産菌を OH-PEG_4-azide 含有培地で培養するだけで、ε-PL のカルボキシル基末端に OH-PEG_4-azide を導入できることを見出した。特筆すべきは、得られたε-PL-PEG_4-azide を用いてタンパク質表層を化学的にポリカチオン修飾すると、R8 修飾と同じように生体膜透過性効果を付与できたことである。本発表では、生体高分子を微生物由来の天然ポリカチオンで修飾し細胞内へ直接送達できた研究成果について紹介する。

membrane-permeable peptide, cell penetrating peptide, poly lysine

発表責任者：濱野　吉十（hamano@fpu.ac.jp）

講演番号：1S10A3p3
講演日時、会場：3 月 24 日 15:05～ A3 会場

高性能イミダゾール系バイオプラスチックの一貫生産プロセスの開発

Development of integrated processes for the production of high-performance polyimidazole bioplastics

○大西 康夫[1,2,3]、金子 達雄[3,4]、荻野 千秋[3,5]、高谷 直樹[3,6]([1]東大院・農生科、[2]東大・微生物イノベ連携機構、[3]CREST、[4]北陸先端大・マテリアルサイエンス、[5]神戸大院・工、[6]筑波大・生命環境)
○Yasuo Ohnishi[1,2,3], Tatsuo Kaneko[3,4], Chiaki Ogino[3,5], Naoki Takaya[3,6] ([1]Grad. Sch. of Agric. & Life Sci., Utokyo, [2]CRIIM, Utokyo, [3]CREST, [4]Sch. Of Mat'l. Sci., JAIST, [5]Grad. Sch. Of Tech., Kobe Univ., [6]Faculty of Life & Environ. Sci., Univ. of Tsukuba)

【背景・目的】化学産業において多種・多様な高機能化学品が製造されているが、その大部分は石油化学由来の原料から合成されている。近年、いくつかのバイオマス由来ポリマーが実用化されているが、強度・耐熱性に優れた芳香族ポリマー（エンジニアリングプラスチック）に関しては、バイオマス由来のものは皆無である。本研究*においては、セルロースを原料とした芳香族化合物の微生物発酵生産システムを確立し、発酵生産される芳香族化合物を原料としたポリベンズイミダゾール（PBI）系新規ポリマーを開発することにより、実バイオマスから PBI 系ポリマーを生産する一貫プロセスを構築することを目的とした。(*JST CREST 2013～2018 年度 JPMJCR13B3)
【方法・結果】PBI はオルトジアミン芳香族カルボン酸を原料とするポリマーであるが、バイオマスからオルトジアミン芳香族が生産された例はない。そこで発酵生産可能な 3-アミノ-4-ヒドロキシ安息香酸（3,4-AHBA）を 3,4-ジアミノ安息香酸（3,4-DABA）に化学変換し、PBI 合成の基幹ジアミンとして用いることとした。一方、種々の芳香族化合物の微生物生産系を構築し、これら芳香族化合物を基幹ジアミンと共重合させることで、新規 PBI の合成を試みた。このような戦略の下に行った研究により、以下の成果が得られた。(1) 3,4-AHBA 合成遺伝子を組み込んだコリネ菌を用い、紙パルプ糖化後発酵によって、3.3 g/L で 3,4-AHBA を培養上清に生産する系を構築した。(2) 3,4-AHBA を 3,4-DABA に化学変換するプロセスおよび 3,4-DABA を重合･成型して PBI フィルムを作製するプロセスを開発した。この PBI フィルムは 10%重量減少温度が 700˚C を超える超耐熱性を示した。また、この PBI を高分子修飾法によってイオン化することに成功した。イオン性 PBI は高耐熱・高イオン伝導性固体電解質としての利用が期待できる。(3) 4-アミノフェニルアラニンおよび 4-アミノ桂皮酸生産系に新たな酵素遺伝子を導入し、4-アミノフェニル酢酸、4-アミノフェニルエタノール、4-アミノフェネチルアミンおよび 4-アミノフェニルプロピオン酸を生産する大腸菌を構築するとともに、コリスミ酸から 4-アミノ安息香酸（4-ABA）を効率よく生産する組換え大腸菌を構築し、紙パルプ糖化液から 4-ABA を発酵生産した。(4) 3,4-DABA と 4-ABA の共重合（PBI にアミド結合を導入する分子設計）により 10%重量減少温度 745˚C という、あらゆるプラスチックの中で最高の熱分解温度を有する PBI フィルムを開発した。また、微生物生産された 3,4-DABA および 4-ABA を用いて、同等の性質を有する PBI ホモポリマー、共重合ポリマーの合成に成功し、セルロースからのエンジニアリングプラスチック生産を世界に先駆けて達成した。

polyimidazole, bioplastic, fermentation

発表責任者：大西康夫（ayasuo@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：1S10A3p4
講演日時、会場：3 月 24 日 15:45～ A3 会場

非天然ポリエステル生合成系の開発と配列制御型ポリマーへの展開

Biosynthesis of block copolyesters using engineered bacteria

○松本 謙一郎[1,4,5]、堀 千明[1]、大井 俊彦[1,5]、磯野 拓也[1]、佐藤 敏文[1]、石井 大輔[2,5]、岩田 忠久[3,5]、田口 精一[2,5] ([1]北大院工、[2]東農大生命、[3]東大農、[4]ALCA-JST、[5]CREST-JST)
○Ken'ichiro Matsumoto[1,4,5], Chiaki Hori[1], Toshihiko Ooi[1,5], Takuya Isono[1], Toshifumi Satoh[1], Daisuke Ishii[2,5], Tadahisa Iwata[3,5], Seiichi Taguchi[2,5] ([1]Eng. Hokudai, [2]Tokyo Univ. of Agric., [3]The Univ. Tokyo, [4]ACLA-JST, [5]CREST-JST)

微生物産生ポリエステルであるポリヒドロキシアルカン酸(PHA)は、バイオベースプラスチックの一つとして知られる。本シンポジウムでも紹介するように、3-ヒドロキシ酪酸と 3-ヒドロキシヘキサン酸の共重合体 PHBH は、すでに商業生産されているが、さらなる用途拡大のためには、ポリマー物性の拡張、すなわち高分子の構造制御が重要課題である。著者らは、人工的に改変した PHA の生合成系を用いた非天然型 PHA の生合成に取り組んでいる。本系で中心的な役割を果たすのは、乳酸モノマーであるラクチル CoA に対して重合活性を示す特殊な変異型 PHA シンターゼ､乳酸重合酵素である。本酵素を用いると、構造中に乳酸を含む共重合体、ポリ(乳酸-*co*-3-ヒドロキシ酪酸)の合成が可能となる。乳酸は糖からの合成収率が 3-ヒドロキシ酪酸より高いため、乳酸ポリマーは天然型のポリヒドロキシ酪酸よりも高い収率で得られる。加えて、本共重合体は透明性と伸張性を示すことから、部材化などの材料としての用途開発を進めている。さらに我々は、乳酸重合酵素がさらに幅広い基質特異性を有することを見出し、グリコール酸、2-ヒドロキシ酪酸などの様々な 2-ヒドロキシカルボン酸(2HA)をモノマーユニットとして含む PHA の合成も達成した。これらの非天然型 PHA は、完全な透明性や加水分解性など、天然型 PHA とは異なる性質を示す。これらの非天然 PHA に特徴的な性質は、主にモノマーユニットの一次構造に起因している。

最近我々は､最初に発見された乳酸重合酵素と別のクラスに属する新しい 2HA 重合酵素を発見した。本酵素は、2 つの重合酵素の部分構造を融合して得られたキメラ酵素である。興味深いことに、本キメラ酵素と 2HA モノマー供給系を用いて組換え大腸菌内で共重合体を合成すると、通常得られるランダム共重合体ではなく、ブロック共重合体が合成されることが判明した。通常、生合成高分子のモノマー配列制御は、DNA の複製に代表されるように、鋳型依存的な合成系によって実現される。PHA の生合成系は明らかに鋳型分子を有しないため、未知の配列制御機構が存在することが推定された。関連酵素の速度論的解析の結果、一本の高分子鎖の重合中に細胞内のモノマー濃度が変動することにより、ブロック配列が生み出される機構を提案した。この新しい合成原理により、モノマーユニットの一次構造に加えてモノマー配列による構造制御が可能となり、これまで考えられていたよりさらに広範囲に物性の改変ができる可能性が示された。さらに本モデルは、モノマー供給と重合という二段階反応において、定常状態近似が成立していないことを示唆する。このような動的な代謝系が存在することは、代謝シミュレーションの際に考慮する必要があると考えられる。

biobased plastic, PHA synthase, block copolymer

発表責任者：松本謙一郎（mken@eng.hokudai.ac.jp）

講演番号：1S10A3p5
講演日時、会場：3 月 24 日 16:15～ A3 会場

海洋分解性ポリマーPHBH の微生物生産
Microbial production of Marine degradable polymer PHBH

○佐藤 俊輔 (（株）カネカ　バイオテクノロジー研究所)
○Shunsuke SATO (KANEKA. Biotech Lab.)

近年、環境調和型の経済活動“バイオエコノミー”に関する国際的な議論が活発になっている。当社は、植物原料から微生物生産される生分解性ポリマーPHBH を実用化すべく、研究開発、設備投資を進めている。PHBH は微生物が炭素、及びエネルギー蓄積の為に合成するポリヒドロキシアルカン酸の一種である。PHBH は炭素数が 4 の(*R*)-3-hydroxybutyrate、並びに炭素数が 6 の(*R*)-3-hydroxyhexanoate (3HHx)からなる共重合ポリエステルである[１]。 PHBH は天然型の高分子であることから、環境中で高い生分解性を示し、プラスチックバッグ、パッケージング資材、農業用資材、コンポストバッグ、紙コーティング、海洋資材などへの実用化が期待されている。例えば近年、海洋への蓄積が大きな社会問題となっている海洋マイクロプラスチック問題に対し、海洋中の微生物により良好に分解される PHBH は、その解決策の１つになり得ると期待されている[２]。

ポリマー材料の特性として、軟質性、靭性が重要である。PHBH の場合、軟質性は共重合比率によって制御される。具体的には 3HHx 比率が高くなるほど結晶化度が低下し、軟質となる。 微生物生産において、この 3HHx 比率比率は、１）3HHx モノマーのフラックス、並びに２）重合酵素の基質特異性、により決定される。 重合酵素に関しては、PHBH 重合酵素の変異体を創生することで、高い 3HHx 組成の軟質 PHBH を重合することに成功した[３]。 更に、3HHx 組成を精密に制御するため、鍵酵素であるエノイル CoA ヒドラターゼの細胞内活性を遺伝子転写レベルで制御する技術を完成させ、幅広い 3HHx 組成の PHBH を工業レベルで生産することに成功した[４]。靭性は分子量の影響を大きく受ける。PHBH の場合、培養終了後のダウンプロセス、成形加工工程における分子量低下を考えると、培養終了時の分子量は 200 万以上が好ましい。我々は、PHA デポリメラーゼ PhaZ6 が PHBH の分子量を低下させることを発見、破壊株を育種することで分子量を高めることに成功した[５]。

[1]Sato S., *et al. J. Biosci. Bioeng.,* **120(3)**, 241-251 (2015)
[2]Morohoshi T, et al. Micobes Environ, **33(1)**, 19-25 (2018)
[3]JP4264819
[4]Arikawa H., *et al. Microb. Cell Fact.*, **15**, 184 (2016)
[5] Arikawa H, *et al.* J Biotech., **227**, 94-102 (2016)

Biodegradable Polymer, Polyhydroxylkanoate, Biopolymer

発表責任者：佐藤俊輔（Shunsuke.Sato@kaneka.co.jp）

講演番号：3S11A3a1
講演日時、会場：3 月 26 日 09:00～ A3 会場

はじめに　～物事には適した時刻が存在する～
Introduction: Suitable time to do something in a day

○大池 秀明（農研機構・食品研）
○Hideaki OIKE (NARO・FRI)

我々の身体は 24 時間常に同じ状態ではない。1 日の中には活動に適した時間帯があり、また、休息に適した時間帯もある。特定の病気が発症しやすい時間帯もあるし（時間医学）、特定の薬が効きやすい時間帯もある（時間薬理学）。また、同じカロリーの食事をしても、太りやすい時間帯があり、そうでない時間帯もある（時間栄養学）。これらは、体内時計の１つであるサーカディアンリズムのなせる業であり、植物、ラン藻、アカパンカビ、昆虫などにもこのリズムは存在している。ちなみに、動物と植物では、サーカディアンリズムを生み出す時計遺伝子の起源が異なっているが、昆虫からヒトまでは、5 億年以上前から同じ遺伝子（Clock, Period など）を利用して生活している。

本講演では、シンポジウムのイントロとして、動物やヒトにおける報告を中心に、1 日の中で様々な生理現象やパフォーマンスが変動することをご紹介する。そして、体内時計の仕組みから考えて、食事の時間帯や生活リズムが、このパフォーマンス制御に大きく関わることを解説する。また、シンポジウム全体を通し、体内時計を活用した最新の研究事例に触れていただくことで、研究の新しい応用性を考えるきっかけにしていただければ幸いである。

circadian rhythm, clock, food

発表責任者：大池秀明（oike@affrc.go.jp）

講演番号：3S11A3a2
講演日時、会場：3 月 26 日 09:15～ A3 会場

生体の季節リズムを利用した代謝プログラミングの畜産応用

Application of metabolic imprinting by seasonal rhythms for beef production

○安尾 しのぶ (九大農)
○Shinobu Yasuo (Kyushu Univ.)

地球上には 24 時間の明暗周期や 1 年の季節周期など様々な環境リズムが存在し、生物はそれらのリズムに適応して様々な周期の体内時計を進化させてきた。季節スケールの体内時計は概年時計とよばれ、繁殖や成長などが適した季節に促されるように内因的にコントロールされている。また、環境からの季節情報のインプットには日長が用いられ、長日や短日といった季節情報に応じて行動や生理機能が変化する。このような季節スケールの体内時計を光線管理により人工制御できれば、安全かつ簡便に畜産動物の生産性が制御できると考えられる。日本の主要な畜産動物であるウシは、人工授精技術や飼養管理技術の発達により、一年を通して繁殖が可能な周年繁殖動物となっているが、冬季における成長遅延や脂肪の過剰蓄積、また日長による乳牛の乳量・乳成分の変化などが知られている。海外では牧草の季節リズムに合わせて季節繁殖形態で飼育する技術や、光周期のコントロールで泌乳量を高める技術など、季節を考慮した飼養管理システムが主に乳牛を用いて実用化されている。しかし、年間を通じたシステム管理や光線管理には手間や光熱費がかかるという欠点がある。また、肉牛を用いて季節リズムをコントロールする例はほとんど見られない。

我々はより簡便に畜産動物の季節リズムを利用して産肉性や肉質を制御したいと考え、若齢期の環境が体質として刷り込まれるという代謝インプリンティングに着目した。これは乳幼児期までの栄養やストレスが成人期の代謝関連疾病リスクに影響するというDOHaD(Developmental Origins of Health and Disease）の概念に基づくものである。我々は、若齢期の光コントロール環境が体質として刷り込まれ、生涯にわたる増体量や脂肪・骨格筋の代謝変化につながるという仮説をたて、マウスと黒毛和種のウシを用いた調査を行なったので紹介する。また、ウシの飼育は長期にわたるため、若齢期の光周期の影響を成長後まで反映するバイオマーカーが有用となる。研究ツールが整ったマウスを用いた網羅解析からウシにおける実証研究へという研究戦略についても紹介する。

photoperiod, body weight, muscle

発表責任者：安尾しのぶ（syasuo@brs.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3S11A3a3
講演日時、会場：3 月 26 日 09:50～ A3 会場

魚類養殖における体内時計研究成果の産業利用
Applications of circadian and seasonal rhythms in aquaculture

○飯郷 雅之 (宇都宮大農)
○Masayuki IIGO (Utsunomiya Univ.)

魚類が重要な食料資源であることは言を待たない．多くの生物に日周リズムや季節リズムがみられるのと同様に，魚類の生理や行動にはこれらの周期性がみられる．活動リズムや摂餌リズムの日周リズムは体内時計による制御を受けている．また，繁殖期決定には体内時計と光周性が関与していることが知られている．この 20 年の間に魚類の体内時計に関する研究は大きく進展し，体内時計や季節繁殖制御の分子機構が明らかになってきた．本講演では，魚類養殖における体内時計や季節繁殖制御に関する研究成果の産業利用について紹介する．

ひとつ目の例は，「自発摂餌システム」である．通常，魚類の養殖現場では，管理する人間側の都合に合わせた手捲き給餌，あるいは自動給餌機を用いた給餌が行われる．しかしながら，水温が急激に変化するなどの原因により自然条件下では魚類の食欲は急激に変化することがある．「自発摂餌システム」はオペラント条件付けにより魚類の食欲に合わせて給餌を行うシステムで，トリガーを引くと一定量の餌が給餌されるようにシステムを構成する．個体自身の体内時計に合わせた給餌が可能であるため，餌料転換効率も良く，環境破壊の原因となる残餌を減らすことが可能である．

ふたつ目の例は，季節繁殖の制御である．日長と水温の季節変化により温帯，寒帯に棲息する魚類の繁殖期は制御されている．よって，日長と水温を人為的に制御することにより，魚類の繁殖期を制御することができる．魚類の季節繁殖を制御する分子機構は不明であったが，我々は短日繁殖型のサクラマスをモデルとした解析により，脳の底部に位置する脳室周囲器官である血管嚢に光受容体遺伝子群，時計遺伝子群，季節繁殖関連遺伝子群が発現することを見出した．血管嚢の除去手術により生殖腺発達が抑制されることから，血管嚢が魚類の季節繁殖を制御する季節センサーであると結論した．

短日繁殖型のアユでは，夏至を過ぎて日長が短くなると急激に生殖腺が発達し，婚姻色が発現して味も落ちる．養殖現場では日没前から深夜まで電照飼育を行い，生殖腺発達を抑制している．電照飼育に用いる光源を白熱灯から LED 灯に切り換えることが可能であることもわかってきた．

トラフグは長日繁殖型であり，日長の長日化に伴って生殖腺が発達し，3-5 月に産卵期を迎える．トラフグの白子は 12000 円/kg 以上の価格がつく高級食材であり，通常の旬は年を明けてからになるが，秋季からの日長制御によりお正月に合わせて白子を生産することができれば，養殖業者に大きな利益をもたらすことができる．そこで，現在，トラフグを対象に季節繁殖分子機構の解明を進めるとともに，LED 光を用いた早期成熟技術の開発を試みている．

circadian clock, seasonal reproduction, photoreceptors

発表責任者：飯郷雅之（iigo@cc.utsunomiya-u.ac.jp）

講演番号：3S11A3a4
講演日時、会場：3 月 26 日 10:30～ A3 会場

体内時計を調節する化合物の探索

Identification of small molecule regulators of the circadian clock

○廣田 毅（名古屋大 ITbM）
○Tsuyoshi Hirota (ITbM, Nagoya Univ.)

睡眠・覚醒や代謝など様々な生理現象に見られる一日周期のリズムは、体内に存在する概日時計に制御されている。概日時計が約 24 時間という周期で安定して発振する機構に迫るため、私たちはヒト培養細胞を用いたスクリーニング系を構築し、概日リズムの調節因子を探索してきた。化合物を用いて生物機構を解析するケミカルバイオロジーの手法を応用し、多様な構造を持つ何十万種類もの低分子化合物から概日時計の周期を強力に変化させる新規化合物を発見した。さらにアフィニティー精製と質量分析を用いて化合物の標的タンパク質を同定し、その機能解析から概日時計の重要な制御機構を明らかにした。これらのユニークな化合物が標的タンパク質にどのように作用するのかを原子レベルから解明するため、構造生物学を取り入れた研究を新たに開始している。このような概日時計研究について、最近の知見を含めて議論したい。

circadian clock, compound, high-throughput screening

発表責任者：廣田　毅（thirota@itbm.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3S11A3a5
講演日時、会場：3 月 26 日 11:05～ A3 会場

体内時計を利用した植物工場
Plant factory using biological clocks
谷垣 悠介、○福田 弘和（大阪府大工）
Yusuke Tanigaki, ○Hirokazu Fukuda (Osaka Pref. Univ.)

作物の生育状態の管理は、施設園芸や露地栽培農業において重要な課題である。現在、作物の生育状態の把握には、カメラ計測による生体情報取得、生育状態のモデル化による解析などがある。また、取得した生体情報は機械学習や SPA（Speaking Plant Approach）に代表される栽培環境制御へと還元されている（Nishina, 2015)。近年、月面農場といった地球外での作物栽培に関する研究も行われており、多様化する作物研究では、均一環境における標準体との比較より、作物の本来の生育や応答を評価できる新たな基準を必要としている。この解決には、生体内部の情報を用いることが有効だが、何を正常とするかの基準点の提示が研究課題となっている。そこで我々は、ほぼ全ての生物がもつ体内時計、それがもたらす生体リズムに着目して研究を行っている。

この体内時計は多くの生理現象・生体現象を調整しており、植物では生育量や生育速度を決定する重要な因子である。この体内時計リズムが外環境のリズム（日長周期)と完全に同期すると、生育量が増大することも知られている。従って、農業などの作物栽培現場では、生産性の改善において外環境の光リズムと体内時計を計測し制御することが重要となる。

我々は体内時計計測として、継時的に多検体を含むカメラ画像を取得し各個体の体内時計リズムを計測する画像診断システムを構築している。さらに、このシステムにより取得された体内時計リズムから植物体の生育状態を診断し、優良株を選抜する苗診断システムを既に植物工場に導入している（Moriyuki and Fukuda. 2016)。一方で、外部情報からの計測結果には、外因性と内因性の 2 種類の情報が含まれており、体内時計に由来する内因性の変動を正確に計測するまでに至っていない。そこで、現在、内因性の変動を捉えるためにトランスクリプトーム解析に着目し、体内時計の正確な計測システムの開発に取り組んでいる。また、この研究では、高コストなトランスクリプトーム解析のコスト削減や周期解析による生育状態の診断手法の開発も同時に行っている。これらの手法を外部情報計測と結びつけることで、より正確な体内時計計測が可能となる。これにより外因性と内因性の変動を分離した理解が可能となり、既存の生体情報取得システムによりもたらされる情報をより効率的に作物栽培に応用できる。本発表では、我々が構築してきた体内時計計測システムの実用を示しながら、植物工場ひいては農業への体内時計研究成果の導入について報告する。

Plant Factory, Circadian Clock

発表責任者：谷垣　悠介（polyhedrin@gmail.com）

講演番号：3S11A3a6
講演日時、会場：3 月 26 日 11:40～ A3 会場

まとめと展望
Remarks and perspectives

○小田 裕昭（名大院生命農）
○Hiroaki Oda (Nagoya Univ.)

ほとんどの生物が体内時計を持ち，それが正常に動くことで様々な生理作用も正常に動くことがわかってきた。その性質を利用した産業利用も視野にはいるようになってきたため，このシンポジウムが開かれるようになった。

しかし，直線的に進む時間とくらべ，一回転する周期性の時間は，波のように理解されており，その解釈は直感的にわかりにくいことも多い。振幅が変動した場合は，増加・減少と類似するため理解しやすいが，位相が移動したり，波長が変わる場合，それをどう目的につなげて解釈していくかは難しい。また，いったん概日時計のシステムが理解されると，すべての周期性の現象はその支配下にあるように思ってしまう。しかし，必ずしもすべての周期的現象が時計遺伝子の支配下にあるとも限らない。

産業利用の場合も当然であるが，研究室レベルでも，動物実験でこれまで普通に行われてきたペアフィーディング，制限摂食などの方法も，概日時計を考えるとその解釈には注意が必要である。また，培養細胞研究において，定期的に行う培地交換の時間をちゃんと決めている研究者は多くない。しかし，培地交換のタイミングで，結果が大きく異なることも起こりうる。

一方，多くのバクテリアは概日リズムを持っていないと考えられているが，腸内細菌の場合，宿主である動物に概日リズムがあり，さらに摂食に伴う外的環境の劇的な変化が周期的に起きるため，腸内細菌叢も日周リズムを示し，それが健康にも大きな影響を及ぼすことになる。このように，本来リズムをもたないものも，その周辺にリズムをもつものがあるとそれに引き込まれるということになる。

体内時計研究の可能性について，上で述べたようなことを紹介しながら，今後の展望を述べたい。

chronobiology, circadian rhythm, chrononutrition

発表責任者：小田裕昭（hirooda@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3S12B6a1
講演日時、会場：3 月 26 日 09:05～ B6 会場

ミニ腸の創生と応用
Xeno-free generation of multi-functional gut organoids (Mini-Guts) from human pluripotent stem cells
○阿久津 英憲（国成育医療研セ）
○Hidenori Akutsu (NCCHD)

約 250 種以上，37 兆個もの細胞からなる私たちは，たった 1 つの細胞である受精卵から始まる．細胞分裂を繰り返し胚盤胞となり，着床以降神経，筋肉，肝臓，消化管，心臓や骨など構造や機能が異なる様々な細胞へと段階的に変化していく．発生は細胞分化の過程ともいえる．哺乳類の発生を細胞が分化する力（分化能）に着目すると，受精卵は胎盤を含めた個体全てを生みだすことができる細胞であり，その能力を分化全能性という．発生が少し進んだ胚盤胞の内部細胞塊から樹立される ES 細胞は，自己複製能と外胚葉・中胚葉・内胚葉組織のあらゆる組織へ分化する分化多能性をもつ細胞であり，発生や細胞生物学の基礎的研究のみならず疾患機序解明から創薬開発，そして細胞治療などの再生医療への応用も期待されている．

臓器は複数細胞種が有機的につながる機能的多細胞構造体である。多能性幹細胞から生体器官のような機能的な多細胞構造体（オルガノイド）を作り出すことは、アプリケーションとして大きな可能性を秘める一方で、技術的に課題が多い。腸管組織はヒト臓器の中でも複雑な構造，機能を有する臓器であり，ヒト多能性幹細胞からの分化誘導は容易ではない．我々は，マイクロファブリケーション技術によるマイクロパターン基材を基に多能性幹細胞の新たな培養空間を創出する研究を行ってきた。マイクロパターン基材の応用により幹細胞の自己組織化を誘導することでより，生体に近い機能を有するヒト腸管モデルとしてミニチュア腸（ミニ腸）に成功した．ミニ腸は，小腸の粘膜上皮組織（粘膜組織），神経組織や結合組織からなる粘膜下組織と蠕動運動を可能とする消化管平滑筋などによる複合機能器官である．複雑なヒト腸管発生を研究する安定的な実験系となることや，消化管関連の難治性疾患や機能不全の診断・治療法開発へ応用そして将来的には腸管組織修復への細胞ソースとなる可能性もみえてきた．今回，オルガノイド研究の動向を概説しつつ，ヒト ES/iPS 細胞からのミニ腸創生とその応用の可能性について報告する．

Organoid, Intestine, stem cells

発表責任者：阿久津英憲（akutsu-h@ncchd.go.jp）

講演番号：3S12B6a2
講演日時、会場：3 月 26 日 09:30～ B6 会場

胃オルガノイド restitution model を用いたピロリ菌走化性メカニズムの解析

Gastroid restitution model system to investigate *Helicobactor pylori* chemotaxis

○羽生 ひかる（シンシナティ大学)
○Hikaru Hanyu (University of Cincinnati)

消化管は常に様々なストレスに曝されながらも、迅速な上皮修復機能を含む様々な粘膜防御機序により恒常性を維持している。例えば、塩味・辛味の強い食品やアルコールを摂取した際に生じた胃上皮の小さな損傷部位は、周囲の上皮細胞が早急に遊走することにより被覆される。この過程は restitution と呼ばれ、細胞内カルシウムやアクチンなどの多くの因子によって調節されていると考えられているが、詳細は未だ明らかにされていない。この早期上皮修復過程は *Helicobactor pylori*（ピロリ菌）や非ステロイド系抗炎症薬（NSAID）によって阻害され、傷害の進展や潰瘍の発生に寄与することが知られている。一方、胃潰瘍や胃癌発生に深く関与するピロリ菌は、世界人口の半数以上に感染していると推測されるが、興味深いことに、感染者の約 90%は無症状であるとの報告があり、その理由は明らかにされていない。

我々は二光子顕微鏡を使用した *in vivo* におけるマウス胃 restitution model を用いて、傷害周囲の遊走細胞における膜アクチン量が上昇していることを見出した。しかしながら、アクチンの動態がみられる部位を *in vivo* で特定することは困難であった。近年、消化管上皮の初代三次元培養系である「オルガノイド」の培養法が確立され、幅広く使用されていることから、我々も胃オルガノイドを用いたアクチン動態の評価系を確立し、損傷修復は損傷部位に接する細胞外側膜におけるアクチンの重合が引き金となることを明らかにした。さらに、損傷部位は細胞遊走により被覆されると同時に、死細胞の内腔側への脱落が起こり、これらの過程は細胞内カルシウムを介したアクチン動態に依存していることを見出した。

次に、この評価系を応用し、ピロリ菌の胃傷害に及ぼす影響に関する研究を行った。当研究室の *in vivo* の先行研究において、ピロリ菌が胃損傷部位に集積し、その修復を遅延させることが示されており、その走化性メカニズムの解明を本研究の目的とした。ピロリ菌野生株を感染させた胃オルガノイドに 1 細胞分の損傷を与えると、*in vitro* においてもピロリ菌が傷害部位に集積し、それにより修復が遅延する様子が観察された。ピロリ菌走化性システムを欠損した変異株を用いて同様の実験を行うことにより、ピロリ菌の修復部位への集積には、走化性システムにおける運動性や方向転換のシグナル伝達が重要な役割を担うことが示された。さらには、損傷部位を感知する走化性受容体の特定にも成功した。これらのことから、ピロリ菌が偶発的に発生した胃傷害を感知して集積することで、修復過程を阻害し、胃傷害をさらに悪化または進展させるということが推察された。

Helicobactor pylori, restitution, gastroid

講演番号：3S12B6a3
講演日時、会場：3 月 26 日 09:55～ B6 会場

リンパ球培養系を用いた食品の免疫調節機能解析

Analysis of immune modulatory function of food factors using lymphoid cell culture

○戸塚 護（日本獣医生命科学大・応用生命科学）
○Mamoru TOTSUKA (Nippon Veterinary and Life Science University)

食品中の免疫調節機能成分の検索や作用メカニズムの解析においては、ヒトおよびマウス由来の培養細胞株、マウス各種免疫組織から得た免疫細胞の初代培養系が主に用いられている。さらに生体内における免疫調節機能を解析するためには、マウス個体への経口投与実験が不可欠である。各種遺伝子改変マウス個体やそれに由来する免疫細胞を用いた解析が、免疫調節機能研究には多大な貢献をしてきた。

著者らは野生型および遺伝子改変マウス由来のナイーブ $CD4^+$ T 細胞の初代培養系を用いて、食品成分がヘルパーT細胞や制御性T細胞への機能分化に与える影響について解析を行ってきた。機能分化前のナイーブT細胞の性質を保った培養細胞株は存在しないため，現状では初代培養が不可欠である。また、細胞増殖をさせる前のナイーブT細胞の初代培養系は *in vitro* での遺伝子操作が困難であり、遺伝子改変マウスが利用できない状況においては、作用メカニズム解析は大きな影響を受ける。

機能性食品研究において動物実験が制限される状況となっても、ヒト末梢血由来単核球（PBMC）を用いることができるため、培養・利用が困難な他の臓器由来細胞と比較した場合には影響は小さいとも言える。しかしながら、PBMC とは異なる独特の性質をもつ腸管免疫系細胞への作用の解析などは、現状では実験動物の利用なくしてはほぼ不可能に近い。

本講演では、実験動物が使用出来ない状況において生じる問題点を整理するとともに、これらの問題を解決する可能性をもつリンパ球など免疫細胞の培養技術の現状について概観したい。

naive CD4+ T cell, regulatory T cell, functional differentiation

発表責任者：戸塚　護（mtotsuka@nvlu.ac.jp）

講演番号：3S12B6a4
講演日時、会場：3 月 26 日 10:20～ B6 会場

ATP 動態の可視化と応用性
Visualization and Application of ATP dynamics

○山本 正道（京大医）
○Masamichi YAMAMOTO (Kyoto Univ. Med.)

ATP 動態の解析は実際の生体内活性を理解するため必要不可欠である。しかしながら、マウス生体内で ATP 動態を可視化することは困難であった。そこで、私達はこの目的のために ATP 量依存的に蛍光比を変化させる蛍光共鳴エネルギー移動蛍光蛋白質をマウスへ応用した。(ATP 可視化マウス)。このマウスでは、全臓器・細胞の細胞内の ATP 量を定量的、高感度、非侵襲的かつ時空間的に生理的条件下および疾患条件下で調べることができる。また、このマウスの臓器から様々な細胞を in vitro へ展開する事で、細胞から細胞小器官レベルでの ATP 動態の解析も可能となってきた。今回は、この ATP 可視化マウスの性能と応用例を紹介したい。

ATP, imaging

発表責任者：山本正道（myamamot@kuhp.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3S12B6a5
講演日時、会場：3 月 26 日 10:45～ B6 会場

Ex vivo における肝臓の 3 次元組織構造構築とその応用

Reconstitution of hepatic tissue structures ex vivo

○谷水 直樹（札幌医大）
○Naoki Tanimizu (Sapporo Medical Univ.)

肝臓は、糖代謝や脂質代謝をはじめ、生命活動に欠かせない種々の代謝反応を行う。これらの代謝反応は、肝細胞が担っているため、Ex vivo で肝機能を再現するためには、代謝機能を保持した肝細胞を安定に培養することが必要である。

肝臓は高い再生能力を持ち、肝細胞は細胞肥大や増殖によって組織再生に寄与する。しかし、生体外に取り出した肝細胞は増殖せず、また、培養開始後、急速に代謝機能を喪失する。種々の幹細胞からの分化誘導も報告されているが、誘導肝細胞の代謝機能は充分ではない。我々は、生体内の 3 次元肝組織構造を再現することで、機能的な肝細胞を長期間安定して培養する方法の確立に取り組んでいる。

肝臓には、肝細胞と胆管上皮細胞という、2 種類の上皮細胞が存在している。肝細胞は隣接する細胞との間に毛細胆管を形成し、胆管上皮細胞は樹枝状チューブ構造である胆管を形成する。肝細胞はコレステロールやビリルビンの代謝産物を含む胆汁を産生して、毛細胆管に分泌する。胆汁は、毛細胆管から胆管に流れ込み、最終的には十二指腸に排出される。毛細胆管と胆管との接続が形成されないと、肝細胞組織内に胆汁が蓄積するために、肝細胞死が誘導される。したがって、高度の代謝機能を持った肝細胞を安定して培養するためには、胆管を組み込んだ肝組織を構築する必要がある。

我々は、健常な成体マウスの肝臓から Ex vivo で増幅可能な肝細胞の前駆細胞を分離・同定し、さらに機能的な肝細胞に再分化する方法を確立した。また、胆管上皮細胞を増幅した後に、胆管構造を再現することにも成功した。これらの知見をもとに、肝細胞組織と胆管を接続することで、胆汁の排泄路を備えた肝組織の構築に取り組んでいる。

本シンポジウムでは、Ex vivo における肝組織構築のため方法を述べるとともに、代謝反応や肝疾患の解析などへの応用の可能性を議論したい。

liver tissue structure, metabolic function, hepatocyte

発表責任者：谷水　直樹（tanimizu@sapmed.ac.jp）

講演番号：3S12B6a6
講演日時、会場：3 月 26 日 11:10～ B6 会場

オルガノイド培養系を用いた味蕾および膵細胞の機能解析

Functional analysis of taste and pancreatic cells using organoid culture system

○岩槻 健（東農大応生）
○Ken Iwatsuki (Tokyo Univ. of Agric.)

これまで、消化管上皮、肝臓、膵臓など内胚葉を起源とする組織の初代培養には困難を伴うことが多かった。その一因として、再生を繰り返す組織幹細胞が同定されていなかったため、幹細胞の栄養要求性が不明だったことが挙げられる。しかし、2007 年に小腸のクリプトに存在する幹細胞のマーカーが Lgr5 であることが発表されたことに続き、Lgr5 陽性細胞はマトリジェルに包埋し Wnt3a、Noggin、R-Spondin、EGF などを添加した基本培地にて培養することで増殖・分化させることが可能であることが明らかとなった。現在では、内胚葉由来の臓器・組織幹細胞の多くがこの 3 次元培養系（オルガノイド培養系）により培養が可能となっており、in vitro における生体組織のモデル培養系として注目されている。

我々は近年、舌上皮の有郭乳頭に存在する味蕾幹細胞も Lgr5 陽性であり、幹細胞活性を有することを明らかにし、味蕾オルガノイド培養系を確立してきた。味蕾オルガノイド培養系の導入により、これまでに生体と同様の味細胞を培養できなかった点が克服され、呈味物質による味細胞応答測定が可能になった他、in vitro において味細胞の再生過程の解析も可能となった。最近では、味蕾オルガノイドの他、再生が困難な器官である膵臓においてオルガノイド培養系を導入し、膵臓 β 細胞の再生を in vitro にて再現できないか試みている。現在までに膵管をオルガノイド培養に供することで、内分泌前駆細胞が出現する現象を確認している。

本発表では、これまで我々が取り組んできた味蕾オルガノイド培養系の確立とその応用、および膵管オルガノイド培養系を用いた内分泌細胞作出の試みについて報告するとともに、現在の in vitro 培養系の課題や展望について議論したい。

organoid, taste cell, pancreas

講演番号：3S13D6a1
講演日時、会場：3 月 26 日 09:05～ D6 会場

RiPPs 型生合成リデザインによる迅速多様な中分子創薬に向けた修飾ペプチド創製手法

Enzymatic synthesis of diverse ribosomally synthesized and post-translationally-modified peptides.

○尾仲 宏康（東大院農）
○Hiroyasu Onaka (Univ of Tokyo)

中分子創薬における中分子とは低分子合成薬剤と抗体などの高分子との中間に位置する中程度の分子量(分子量 500～2000)を持つ化合物群と定義され、ペプチドなどの天然化合物などが含まれる。抗体は非常に高いターゲット選択性を有するが、製造に動物細胞が必要なため、その製造コストは非常に高価である。それに対して、ペプチドなどの天然物は発酵生産や有機合成により安価に製造が可能であるため、次世代創薬に適した化合物群として期待できる。本講演では、そのような中分子の一つである、リボゾーム翻訳後修飾ペプチド(RiPPs: Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides)に焦点を当てる。

RiPPs の最大の特徴は前駆体ペプチドが構造遺伝子としてゲノム上にコードされていることである。遺伝子の転写翻訳によって前駆体ペプチドが形成されるということは、構造遺伝子の塩基置換によってアミノ酸配列の置換が達成できる。ペプチド合成に有機合成を介する必要がないため大変容易に類縁体を創製することが出来る。このことは，創薬において多様な誘導体から目的の活性を持つ化合物をスクリーニングする際に、簡便に多様な化合物誘導体ライブラリーを調製できるので大変有利である。

既に我々はこの RiPPs 生合成マシナリーの全工程を試験管内にて完全再構成し、構造遺伝子断片の投入だけで、迅速簡便に多様な修飾ペプチドを作製することが可能になったことを報告している。

RiPPs の一種であるゴードスポリン(goadsporin: GS)は放線菌 *Streptomyces* sp. Tp-A0584 が生産する二次代謝産物であり、放線菌に対して二次代謝と形態分化を誘導する活性を有している。GS は 6 カ所のアゾール環部位と 2 カ所のデヒドロアラニン(Dha)部位、N 末にアセチル基を有しており、これらは構造遺伝子である *godA* がリボゾーム翻訳によって GodA 前駆体ペプチドになった後に、6 個の翻訳後修飾酵素群によって導入される。これら 6 個の翻訳後修飾酵素反応と無細胞翻訳系とを組み合わせることにより、200 bp 程度の構造遺伝子 DNA 断片を投入するだけでワンポット反応により GS が一昼夜で合成できるシステム・FIT-GS system を構築した。本システムを用い、これまでに 53 種類のアナログ体の創製に成功している。

今回、GS に加え、*Streptomyces lactacystinaeus* 由来のチオペプチドであるラクタゾール(lactazole)のワンポット反応系・FIT-Laz system が実現した。本成果により創薬へ向けた効率的なアナログライブラリー創製が今後、より一層期待できる。

drug screening, Streptomyces, one pot reaction

発表責任者：尾仲宏康（aonaka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3S13D6a2
講演日時、会場：3 月 26 日 09:35～ D6 会場

人工酵素を用いたバイオガソリンの生産に関して

Biogasoline production by engineeed enzymes

○湯澤 賢（東大・生物工学セ）
○Satoshi Yuzawa (BRC. UTokyo)

バイオアルコールとはバイオマスなどの再生可能資源から微生物により生産されたアルコールのことを指し、例えばバイオエタノールやバイオブタノールが挙げられる。これらバイオアルコールは、カーボンニュートラルなガソリンの代替燃料もしくは添加剤として機能することが知られ、世界各地で産業応用が検討されている。しかしながら、アルコールの親水性がパイプラインの腐食性と関連付けられるなど、好ましくない特性もある。一方で、ケトンはアルコールと比較して疎水性が高く、エネルギー密度も高い。そこで我々は、バイオケトンの微生物生産を目的に研究を行っている。

微生物によるアセトン（C3）の生産はよく知られているが、アルコールに近い性質を示すため、バイオガソリンとして利用するにはハードルが高い。しかしながら、より長鎖のケトンを生産する微生物も知られていない。そこで、我々は人工的に改変した酵素を用いてバイオケトンを生産する微生物を構築することを目指した。バイオケトンを生産する酵素をデザインするために我々はタイプ I モジュラーポリケチド合成酵素（モジュラーPKS）を親酵素として利用した。モジュラーPKS はアシル CoA を基質として利用するポリメラーゼであり、様々なアシル CoA を順次縮合することにより、一般にポリケチドと総称される様々な化合物を合成する。非常に複雑かつ多段階の化学反応を触媒するが、その反応機構は明快であり、これまでリデザインのターゲットとして 20 年以上研究されてきた。これまでに開発された方法に加え、我々が独自に開発したモジュラーPKS の改変手法を用いることにより、目的とする C4~C7 の 10 種類のケトンを *in vitro* で合成することに成功した[1]。これらのケトンのほとんどはこれまで生合成の報告がないものばかりである。次にバイオケトンの微生物内生産を試みた。放線菌を宿主として利用した結果、再生可能資源である植物バイオマスの加水分解物（主にグルコースとキシロース）から 1 g/L 以上のケトン（C6 と C7）の生産を確認した[2,3]。これらケトンの燃料特性を比較したところ、エタノールやブタノールと比較して、部分的に優位性が認められた[3]。生産量をさらに改善すればこれら改変微生物の産業応用への道が開かれるかもしれない。

文献１）Yuzawa S et al. ***ACS Synth Biol*** 6:139-147 (2017).
文献２）Yuzawa S et al. ***ACS Chem Biol*** 12: 2725-2729 (2017).
文献３）Yuzawa S et al. ***Nat Commun*** 9: 4569 (2018)

Biogasoline, Polyketide synthase, Redesign

発表責任者：湯澤 賢（usyuzawa@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3S13D6a3
講演日時、会場：3 月 26 日 10:05～ D6 会場

不均衡変異導入にもとづく実用的な微生物育種方法

Practical strain improvement method of microorganism by disparity mutagenesis

○東田 英毅（株式会社ちとせ研究所）
○Hideki Tohda (Chitose Laboratory Corp.)

代表的な骨格合成酵素と典型的な修飾酵素からなる生合成マシナリーを再設計することによって、天然には見られない新規物質の創出や、希少な天然物を大量かつ安定に供給する方法の開発が急速に進んでいる。しかしながら新規物質や、既存化合物であっても天然にはない高い濃度の存在下では、それを生産する微生物に何かしらの抑制や阻害がかかることが考えられ、このことが工業化の障害になることは、容易に推測される。

このようなリデザイン後の微生物を用いた物質生産を円滑に進める強力な手法として、育種が挙げられる。そもそも自然界で得られた有用な生命現象は、自然から切り出されたのち、その能力が人間にとってより活用しやすくなるように、優れた品種へと育種される。そして育種は、望ましい性質とプロセスをデザインし、実際に生物を改良するサイクルの繰り返しによって進む。それを人工的に進めるためには、自然に起こる突然変異を化学物質や放射線など生物のゲノムレベルでダメージを与える方法によって効率的に引き起こす変異導入法と、さまざまな形質を持つ個体の中から必要な機能を有する生物を選択するスクリーニング法が使われてきた。生物が環境に適用しようとする力をそのまま用い、確率論的にいつか生まれてくる可能性があった品種を加速して選んでくる技術でもある。

さらにわれわれは、理論進化学者の古澤満が提唱する不均衡進化理論をベースに、自然界で起こる突然変異を短期間で効率良く引き起こす変異導入技術を開発し、事業に活用している。この不均衡変異導入法は DNA 複製依存的に発生する複製エラーを利用した、増殖依存的な突然変異導入法である。この方法を用いることで、さまざまな微生物をヒトにとってより有益な形質を持つように進化させる育種を従来よりもずっと短い時間でできるようになった。われわれはさらにこの技術を進化させ、第二世代、第三世代の技術開発を進めている。育種対象となる生物には、自然界に存在する野生株だけでなく、人工的に設計され遺伝子組換えによって作り出された生物も含まれている。

本シンポジウムの主題であるリデザイン後の微生物をはじめ、合成生物学的手法やゲノム編集といった新しい手法によって有用な形質を保有するようになった生物もまた、われわれの育種の良いターゲットである。ピンポイントで改変された生合成系を取り巻くゲノム全体の最適化という、ゲノム調整とも記述される概念であり、新規な有用物質生産株の工業化に必要な技術として期待している。

disparity theory of evolution, asymmetrical DNA replication, genome adjustment

発表責任者：東田英毅（hideki.tohda@chitose-bio.com）

講演番号：3S13D6a4
講演日時、会場：3 月 26 日 10:45～ D6 会場

抗腫瘍性海洋天然物ハリコンドリンＢからの抗がん剤創薬

Discovery of anti-cancer drug from a marine natural product, halichondrin B

田上 克也[1]、○野本 研一[2] ([1]エーザイ株式会社、[2]エーザイインク)
Katsuya TAGAMI[1], ○Kenichi NOMOTO[2] ([1]Eisai Co Ltd., [2]Eisai Inc.)

1986 年に上村・平田らによりクロイソカイメンより抗腫瘍海洋天然物ハリコンドリン B（HB）が単離・構造決定され、米国 National Cancer Institute（NCI）で天然 HB を用いた抗腫瘍試験結果から新規作用機序の抗がん剤として期待が示唆されていた。1992 年にハーバード大学岸研究室で全合成された HB 右半分の化合物が in vitro での活性を保持していることが明らかとなり、この結果を受けて弊社研究所において 200 以上の誘導体の合成と評価を行い、生体内での安定性と抗腫瘍活性に優れたエリブリンメシル酸塩（以下エリブリン）を 1998 年に臨床開発化合物として選択した。

エリブリンの標的である微小管は、細胞分裂期では紡錘体を形成して核染色体の分離を担当するが、細胞分裂間期では細胞外情報の取り込みや細胞内分子輸送に関わり極性をもった細胞運動、上皮間葉転換 (EMT) の維持などに重要な役割を担っている。作用機序としては、タキソールやビンカアルカロイド類と同じ微小管機能阻害剤の範疇に入るが、エリブリンは微小管プラス端に特異的に結合し、微小管ダイナミクス阻害とともにプラス端集積因子群の機能を阻害することが大きな特徴である。エリブリンは分裂期の乳癌細胞に対しては，有糸分裂阻害に基づく殺細胞作用を発揮する。更には分裂間期の乳癌細胞に対しては、 EMT を元に戻す、即ち浸潤転移能亢進などの悪性形質を特徴とする間葉系の形質を運動能の低い上皮系細胞の形質へと転換する（間葉上皮転換，MET）作用を有することが in vitro、in vivo 両方の実験から示されている。

臨床的には、乳がんの標準化学療法であるアントラサイクリン系及びタキサン系抗がん剤を含む前治療歴のある局所再発あるいは転移性乳がん患者様を対象としたフェーズ 3 試験において、対象群（主治医選択治療群）に比べて統計学的に有意な全生存期間の延長が認められている。前治療歴のある転移性乳がんの患者様において、単剤で統計学的に有意に全生存期間を延長した世界初めてのがん化学療法剤であり、わが国においては、進行又は再発乳癌に加えて、近年、悪性軟部腫瘍の治療薬として使用されている。

エリブリンの合成は極めて難度が高く、非常に厳密で繊細な反応を含む実に 60 工程以上もの化学反応と精製工程を要している。エリブリンは分子内に 19 個もの不斉炭素を有し、理論上存在する 50 万以上の立体異性体をいかにコントロールしていくかも大きなチャレンジであった。

本発表では、このように進行がん患者様への新たな治療薬の創製を可能にした、抗腫瘍海洋天然物 HB からの創薬へのチームの着眼、挑戦について述べさせていただきます。

marine natural product, halichondrin B, eribulin

講演番号：3S13D6a5
講演日時、会場：3 月 26 日 11:15～ D6 会場

精密解析に基づく多価不飽和脂肪酸生合成酵素の機能改変

Dissecting polyunsaturated fatty acid synthases for product profile control

林 祥平[2]、佐藤 康治[1]、小笠原 泰志[1]、○大利 徹[1] ([1]北大院工、[2]北大総合化学院)
Shohei Hayashi[2], Yasuharu Satoh[1], Yasushi Ogasawara[1], ○Tohru Dairi[1] ([1]Graduate School of Engineering, Hokkaido Univ., [2]Graduate School of Chemical Sciences and Engineering, Hokkaido Univ.)

【研究背景】ドコサヘキサエン酸（DHA; C22:6 ω3)、エイコサペンタエン酸（EPA; C20:5 ω3）、アラキドン酸（ARA; C20:4 ω6）に代表される多価不飽和脂肪酸（PUFA）は必須脂肪酸であり、魚油等が主な供給源である。しかし近年の需要増加により新規供給源が求められている。ある種の海洋性微細藻類や細菌は PUFA を脂肪酸合成酵素ではなく、ポリケチド合成酵素様のマルチドメインから構成される巨大酵素複合体 （PUFA 合成酵素） により生合成する。しかし、巨大酵素であるが故に詳細な機能解析例は少ない。そこで本研究では、*Moritella marina* 由来 DHA 合成酵素、*Photobacterium profundum* 由来 EPA 合成酵素、*Aureispira marina* 由来 ARA 合成酵素を用い、*cis* 不飽和二重結合形成機構と炭素鎖長制御機構の解明を行った。

【方法・結果】上記 PUFA 合成酵素は巨大酵素であり *in vitro* 解析は困難である。そこで最初に大腸菌を用いた異種宿主発現系での評価を行った。4 つのサブユニットからなる各々の酵素遺伝子を共存可能なベクターで発現させた結果、形質転換株は何れも予想される PUFA を生産した。次に *cis* 不飽和二重結合形成機構の手掛かりを得るため、EPA の各サブユニット遺伝子を対応する ARA 遺伝子と置換する方法、サブユニットの途中で相互に入れ替えて構築したキメラ酵素遺伝子を用いる方法、および各ドメインの活性残基を不活化する方法により、ARA 合成酵素の C サブユニットに存在する ketosynthase (KS) /chain length factor (CLF) ドメインと dehydratase (DH) ドメイン、および B サブユニットに存在する DH ドメインが ARA 生産に必須であることが分かった。また、炭素鎖長制御機構を解明するため、DHA と EPA の合成酵素遺伝子を用いて同様の実験を行った結果、DHA/EPA 合成酵素の C サブユニットに存在する KS/CLF ドメインが関与することが分かった。さらに詳細に解析するため、各ドメインの組換え酵素と合成した各種アシル-ACP/SNAC 基質を用いた *in vitro* 解析を行い、*cis* 不飽和二重結合形成機構と炭素鎖長制御機構の全体像を明らかにした。得られた知見で微細藻類 DHA 合成酵素をリデザインした結果、EPA 合成酵素に変換させることに成功した。本シンポジウムではこれらの詳細について紹介したい。

polyunsaturated fatty acid synthase, biosynthesis, functional analysis

発表責任者：大利　徹（dairi@eng.hokudai.ac.jp）

講演番号：3S14C6a1
講演日時、会場：3 月 26 日 09:00～ C6 会場

オートファジーにおける膜動態を支える分子メカニズム

Molecular mechanisms underlying membrane dynamics during autophagy

○中戸川 仁（東工大生命理工）
○Hitoshi Nakatogawa (Tokyo Tech.)

オートファジーにおいては、様々な細胞成分が“オートファゴソーム”内に隔離され、液胞あるいはリソソームに輸送されて分解される。オートファジーの分解対象は、細胞質のタンパク質や RNA からミトコンドリア、ペルオキシソームなどのオルガネラまで多岐にわたり、オートファジーは飢餓応答や細胞成分の量的制御、品質管理など様々な役割を果たしている。オートファゴソームは以下の様な過程を経て形成される。まず、Atg タンパク質群の働きにより前駆体膜が形成され、これが伸張して“隔離膜”となる。隔離膜は分解対象を取り囲むようにして湾曲しながら球状に伸展し、閉じ、二重膜小胞であるオートファゴソームが完成する。オートファゴソームの形成は、オートファジーを象徴するユニークなイベントであるが、その分子機構には多くの疑問が残されている。オートファゴソームを形成するための膜の供給源に関しても長年議論が重ねられてきたが、未だ明確な答えは得られていない。しかしながら最近、小胞体がオートファゴソームの形成に密接に関与していることが明らかとなってきた。

私たちは、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて、オートファジーの分子機構および生理機能の解明を進めている。その中で、Atg タンパク質の一つである Atg2 にオートファゴソーム膜前駆体を小胞体に繋ぎ留める機能があることを示唆する結果を得た。Atg2 のこの機能が損なわれると、オートファゴソーム形成は前駆体膜形成の最終段階で停止し、隔離膜は伸張しない。このようなことから、Atg2 を介して前駆体膜が小胞体膜に結合することにより、小胞体からの膜の流入が開始し、隔離膜が伸張していくのではないかと考えている。

一方で、Atg2 は小胞体からゴルジ体への輸送小胞（COPII 小胞）が形成される ER exit site と隔離膜とのコンタクトサイトに局在化することが以前より示されていた。このような結果から、COPII 小胞が隔離膜に脂質を供給している可能性が示唆されていたが、これを直接示す実験的証拠はなかった。私たちは最近、COPII 小胞を積み荷タンパク質で強く標識する手法を用いて、この積み荷タンパク質が COPII 小胞を介してオートファゴソーム膜に移行することを示したので、この成果も合わせて報告する。

autophagy, Saccharomyces cerevisiae, endoplasmic reticulum

講演番号：3S14C6a2
講演日時、会場：3 月 26 日 09:30～ C6 会場

酵母の前胞子膜形成におけるリン脂質とオルガネラ接触部位の役割

The role of PI4P and membrane contact sites in prospore membrane formation during sporulation of budding yeast

○舘川 宏之 [1,2] ([1] 東大院農生科・応生化、[2] 東大・微生物連携機構)
○Hiroyuki TACHIKAWA[1,2] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

出芽酵母の胞子形成は、２倍体細胞内に４つの新しい１倍体胞子をつくりだすダイナミックな細胞内再編成の過程である。この過程において、細胞内に前胞子膜と呼ばれる新規二重膜構造が形成され、細胞質や核を含むオルガネラを取り込んで伸長し、閉鎖して胞子膜となる。前胞子膜形成には、オートファジーの隔離膜の形成と類似点があるものの、全く異なる因子が関与している。また、オルガネラ形成や、高等動物の繊毛形成、精子の先体の形成、植物の細胞板形成も同様に新しい膜構造を構築する過程であり、前胞子膜形成の研究はこれらの過程の理解につながると考えられる。

我々は前胞子膜の伸長にフォーカスして、その分子メカニズムの解明を目指している。これまでの研究で、前胞子膜伸長に関与する因子として、１型プロテインホスファターゼである Gip1-Glc7 複合体に加えて[1)]、Spo73, Spo71, Vps13 が必要であることを示してきている。Spo73 は機能未知のディスフェリンドメインのみからなり、Spo71, Vps13 と複合体を形成し[2) 3)]、前胞子膜伸長に寄与することが推測されているものの、この複合体による膜伸長の分子機構は不明である。そこで、*spo73*Δ の胞子形成能を部分的に回復するマルチコピーサプレッサーのスクリーニングを行い、細胞膜上の PI 4-キナーゼ (PI4K) 複合体をコードする、*STT4* の遺伝子断片および *EFR3* を得た。これに基づいて様々な解析を行い、*spo73*Δ において前胞子膜上の PI4P 量を減少させることにより前胞子膜の伸長が回復することを明らかにした。このことは、Spo73 が前胞子膜上の PI4P の量の制御に関与することを示唆している。最近、Vps13 が細胞内の様々な膜コンタクトサイトに局在すること、PI4P の量の制御には膜コンタクトサイトが関係することが報告されている。そこで、小胞体-細胞膜接触部位の繋留タンパク質の胞子形成時における局在を解析したところ、それらが前胞子膜上に局在すること、またさらにその局在が *spo73*Δ において異常になることを見出した。これらの結果より、Spo73 が Spo71, Vps13 と複合体を形成し、小胞体-細胞膜接触部位の繋留タンパク質をリクルートして、ともに小胞体-前胞子膜接触部位を形成することにより前胞子膜の伸長に寄与するというモデルを立てて検証を試みているので報告したい。

1) Nakamura TS et al. 2017 *Mol. Biol. Cell* 28: 3881-3895, 2) Park JS et al. 2013 *Eukayot. Cell* 12: 1530-1537, 3) Okumura Y et al.2016 *mSphere* 1: 00038-15

membrane, PI4P, sporulation

発表責任者：舘川宏之（atachi@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3S14C6a3
講演日時、会場：3 月 26 日 09:55～ C6 会場

酵母の細胞膜における脂質非対称性の生理的意義

Physiological significance of phospholipid asymmetry in the plasma membrane in yeast

○田中 一馬、岸本 拓磨、三岡 哲生（北大遺制研）
○Kazuma Tanaka, Takuma Kishimoto, Tetsuo Mioka (Inst. Gen. Med. Hokkaido Univ.)

生体膜では脂質二重層の間で脂質が非対称に分布することが知られている。例えば細胞膜では、フォスファチジルセリン(PS)やフォスファチジルエタノールアミン(PE)は細胞質側の層に多く、一方フォスファチジルコリン(PC)やスフィンゴ脂質は細胞外側の層に多く分布することが知られている。この細胞膜における脂質の非対称性は酵母からヒトまで保存されているが、その生理的意義については不明な点が多い。膜脂質の非対称性形成に重要な役割を果たすタンパク質としてフリッパーゼが知られている。フリッパーゼは 4 型に分類される P-Type ATPase であって、カルシウムポンプ等と相同性を示すが、イオンではなくリン脂質を細胞外側層から細胞質側層へと輸送する。フリッパーゼの構造的特徴の一つに Cdc50 ファミリーに属する非触媒サブユニットを有することがある。出芽酵母の細胞膜には Dnf1 及び Dnf2 フリッパーゼが存在するが、Lem3 は両者に共通した非触媒サブユニットである。*lem3* 変異株は細胞極性に弱い異常は示すものの、他に表現型は示さない。私達は最近、*lem3* 変異株の脂質非対称性異常を高発現で抑圧する遺伝子として Sfk1 を見出している(Mioka *et al.*, *Mol Biol Cell*, 29:1203-1218, 2018)。Sfk1 は細胞膜に局在する 6 回膜貫通タンパク質で、フリッパーゼと相同性は示さないが、機能的関連を有する。すなわち、*lem3 sfk1* 二重変異株では脂質非対称性の異常がより強くなっていることに加えて細胞膜の透過性が上昇しており、様々な薬剤やイオンに対して増殖感受性を示す。これらを踏まえ、脂質非対称性の更なる異常は細胞増殖に影響を与える可能性を考え、*lem3 sfk1* 二重変異と合成致死となる変異（単独では致死ではないが *lem3 sfk1* と組合わさると致死となる）の検索を行い、*crf1* 変異を得た。Crf1 は Dnf3 を触媒サブユニットとするフリッパーゼの非触媒サブユニットであり、Dnf3-Crf1 は主としてゴルジ体に局在するが、細胞膜にも局在して働いていることが明らかとなった。従って、3 つのフリッパーゼ（Dnf1-Lem3, Dnf2-Lem3, Dnf3-Crf1）と Sfk1 の変異が重なると致死となることが明らかとなった。現在、*lem3 sfk1 crf1* の条件致死変異株を作成して表現型の解析を行っているが、細胞膜透過性の劇的な上昇、通常は細胞膜に多く存在するエルゴステロールの分布異常とそれに伴う脂肪滴の蓄積、様々な細胞膜タンパク質の局在異常、等が見出されている。一方で、エキソサイトーシスやエンドサイトーシス等の小胞輸送には異常は見出されていない。従って、*lem3 sfk1 crf1* 株では、脂質の非対称性が大きく損なわれる結果、多くの細胞膜機能が破綻して増殖不全に至っているものと考えられる。本シンポジウムでは、これらの結果を元に脂質非対称性の生理的な役割について議論したい。

phospholipid asymmetry, flippase, ergosterol

発表責任者：田中一馬（k-tanaka@igm.hokudai.ac.jp）

講演番号：3S14C6a4
講演日時、会場：3 月 26 日 10:25～ C6 会場

酵母におけるオルガネラ間のステロール輸送機構

Interorganelle sterol transport in yeast

○福田 良一（東大院農生科）
○Ryouichi Fukuda (Univ. Tokyo)

ステロールは、真核細胞の生体膜を構成する主要かつ必須の脂質の一つである。ステロールは細胞膜や様々なオルガネラ膜に含まれているが、その含量は膜ごとに異なっており、そのことがそれぞれの膜の構造や機能に重要であると考えられている。細胞内では、ステロールは小胞体で合成され、細胞膜やオルガネラ膜へ分配されることから、それらの膜が正常に形成されるためには小胞体からのそれらの膜へのステロール輸送が重要であると考えられる。ステロールの細胞内輸送としては、1990 年代から小胞輸送に依存しない機構が存在することが知られていたが、その機構としては、ステロールを一方の膜から引き抜き、もう一方の膜へ輸送して挿入する脂質輸送タンパク質（Lipid Transfer Protein, LTP）と呼ばれるタンパク質による輸送や、2 つの膜が近接した膜コンタクトサイト（Membrane Contact Site）と呼ばれる領域を介した輸送が提唱されてきた。

ステロールはミトコンドリアの膜にも含まれている。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* ではミトコンドリアはチューブ状の構造を取るが、主要ステロールであるエルゴステロールの合成欠損株ではミトコンドリアが凝集することから、ステロールはミトコンドリアの構造に重要であると考えられる(1)。また、動物などではステロールはミトコンドリアに輸送されホルモンの合成に利用される。これらのことから、小胞体からミトコンドリアへのステロール輸送は生物にとって重要なプロセスであると考えられるが、その機構は未解明である。

オルガネラ間のステロール輸送の研究が遅れている理由として、ステロールの移動を簡便に評価する系がないことが挙げられる。そこで筆者らは、*S. cerevisiae* において小胞体からミトコンドリアへのステロール輸送を *in vivo* および *in vitro* で評価する系を構築し、その機構を解析してきた(2, 3)。更に我々はこの系を用い、オキシステロール結合タンパク質（Oxysterol-binding protein, OSBP）関連タンパク質（OSBP-related protein, ORP）である Osh タンパク質が LTP として小胞体からミトコンドリアへのステロール輸送を担うことを明らかにした(3)。本講演では、これらの研究結果について紹介する。

(1) Altmann and Westermann, *Mol. Biol. Cell*, **16**, 5410-5417 (2005)
(2) Tian *et al*., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **79**, 1608-1614 (2015)
(3) Tian *et al*., *J. Biol. Chem.*, **293**, 5636-5648 (2018)

sterol, *Saccharomyces cerevisiae*, mitochondria

発表責任者：福田良一（afukuda@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3S14C6a5
講演日時、会場：3 月 26 日 10:50～ C6 会場

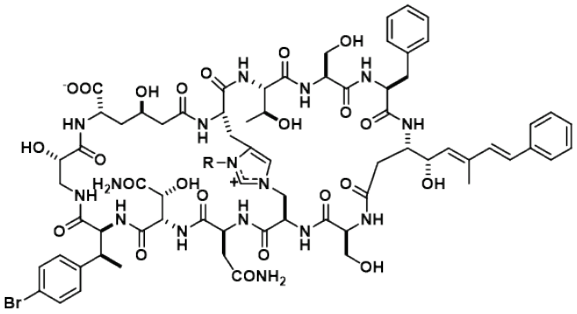
海洋天然物セオネラミドによるステロールの可視化と機能変調

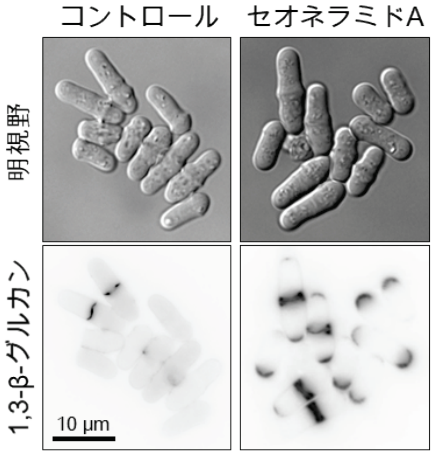
Visualizing and functionally modulating sterols by theonellamides, marine sponge-derived peptides.

○西村 慎一（東大院農）
○Shinichi Nishimura (Univ of Tokyo)

細胞は細胞膜により外界と隔てられ、細胞内はオルガネラ膜により仕切られている。生体膜では様々な反応が制御され、疾患関連イベントが多く起こり、創薬標的にもなっている。生体膜の重量にして約 50%を占めるのが脂質である。しかし脂質は遺伝子に直接コードされていないため遺伝学的解析が容易ではなく、機能の理解が進んでいない。

酵母の膜ステロールはエルゴステロールであり、その機能は生合成遺伝子破壊株の表現型探索により解析されてきた。一方、膜ステロールに結合する化合物の表現型解析も有効な手段であると期待できる。海綿に含有される二環性ペプチドである抗真菌化合物セオネラミドは、エルゴステロールに結合する（下図左）。そして分裂酵母では液胞の断片化や細胞壁の肥厚を誘導する（下図右 ; Nat. Chem. Biol. 2010.）。この現象は 1,3-β-グルカン合成酵素 Bgs1 と低分子量 GTPase である Rho1 を要することが分かっているが、その分子機構は不明である。セオネラミドによる細胞壁肥厚の詳細を理解するため、本化合物の蛍光標識体や Bgs1 タンパク質の局在を蛍光顕微鏡下で観察すると、これらの分子の細胞壁肥厚部位への経時的な蓄積が明らかになった。電子顕微鏡観察では、化合物処理により、膜様の構造体が巻き込まれた細胞壁の異常蓄積が認められた。さらにプロテオームスケールでタンパク質の局在変化を観察すると、壁異常部位に集積するタンパク質、排除されるタンパク質の存在が明らかになりつつある。本シンポジウムではセオネラミドを用いたステロールの可視化と機能解析について、最新のデータを交えて紹介したい。





membrane lipid, sterol, natural product

発表責任者：西村慎一（anshin@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3S14C6a6
講演日時、会場：3 月 26 日 11:20～ C6 会場

油脂生産性の飛躍的向上を目指した油脂酵母の改良

Improvement of oleaginous yeast for the purpose of high-level lipid production

○高久 洋暁[1]、小笠原 渉[2]、矢追 克郎[3]、油谷 幸代[4]、荒木 秀雄[5]、田代 康介[6]、蓮沼 誠久[7]、山崎 晴丈[1] ([1]新潟薬大応生科、[2]長岡技科大工、[3]産総研生物プロセス、[4]産総研 CBBD-OIL、[5]不二製油グループ本社、[6]九大農、[7]神大院イノベ)

○Hiroaki TAKAKU[1], Wataru OGASAWARA[2], Katsuro YAOI[3], Sachiyo ABURATANI[4], Hideo ARAKI[5], Kosuke TASHIRO[6], Tomohisa HASUNUMA[7], Harutake YAMAZAKI[1] ([1]Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., [2]Nagaoka Univ., [3]AIST, [4]AISTCBBD-OIL, [5]FUJI OIL HOLDINGS INC., [6]Kyushu Univ., [7]Kobe Univ.)

近年、新興国の成長とともにエネルギー、食糧などのあらゆる資源の需要増加に拍車が掛かり、資源争奪戦、価格の乱高下を引き起こしている。このような状況は、我々の生活と密接な関係の油脂についてもあてはまり、わずか油脂自給率 13%の我が国の安定的な油脂原料の供給は急務課題である。環境保護や日本の国土を考えると広大な農地を開拓し、油糧作物の生産拡大は望ましくなく、植物だけでなく、幅広く日本にあった油脂資源の確保法が求められる。本研究では、その一つの方法として様々なバイオマス由来の糖を資化して細胞内に油脂を蓄積する油脂酵母による油脂生産に注目した。

１．油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の油脂蓄積変異株の取得とその油脂生産性

油脂酵母 *L. starkeyi* は、様々な糖を資化し、乾燥菌体重量の約 70%まで油脂の主成分のトリアシルグリセロール（TAG）を細胞内に蓄積するため、産業油脂生産微生物としての大きな潜在的能力を有する。我々は、*L. starkeyi* の TAG 合成・分解経路を明らかにし、さらにその油脂生産重要因子を特定するため、*L. starkeyi* 油脂高蓄積及び油脂低蓄積変異株を取得後、野生株と変異株の比較検討からの重要因子同定を考えた。油脂生産性が野生株の 7 倍以上も向上した高蓄積変異株、或いは 1/3 以下に低下した油脂低蓄積変異株など、多数の解析対象価値の高い油脂蓄積変異株が取得できた。

２．油脂酵母 *L. starkeyi* の野生株と油脂蓄積変異株の遺伝子発現挙動の比較

野生株と油脂高蓄積変異株の TAG 合成･分解経路に関与する遺伝子の発現挙動を比較解析した結果、油脂高蓄積変異株において、アシル CoA 合成系に関与する酵素遺伝子、中性脂質合系のアシル基のグリセロール骨格への付加に関与する酵素遺伝子の発現が野生株と比較して上昇していた。

３．油脂酵母 *L. starkeyi* のメタボローム解析とその応用

油脂酵母 *L. starkeyi* の野生株及び油脂高蓄積変異株における解糖系、ペントースリン酸経路、TCA 回路、アシル CoA 合成系のメタボローム解析を行った。その結果、油脂高蓄積変異株は野生株より、アシル CoA 合成系の出発物質のクエン酸濃度が低く、アセチル CoA、マロニル CoA 濃度が高かったため、遺伝子発現解析と同様に油脂高蓄積変異株のアシル CoA 合成系は野生株よりも活性化されていることが示唆された。そこでアシル CoA 合成系の遺伝子を高発現させたところ、油脂生産性が向上した。

４．油脂酵母 *L. starkeyi* の野生株と油脂蓄積変異株のゲノム比較解析

野生株と油脂蓄積変異株のゲノム比較解析を実施し、油脂生産性に関与する候補遺伝子を解析した結果、複数の油脂生産に関与する遺伝子の同定に成功した。

oleaginous yeast, lipid, *Lipomyces starkeyi*

発表責任者：高久洋暁（htakaku@nupals.ac.jp）

講演番号：3S15E6p1
講演日時、会場：3 月 26 日 14:00～ E6 会場

ヒトゲノムのデザイン原理の探究
Exploration of the Design Principle of the Human Genome

○相澤 康則（東工大生命）
○Yasunori Aizawa (Tokyo Tech, Life Science)

ゲノム合成国際コンソーシアム Genome Project-write（GPw）が発足して 1 年が経った。GPw 以前はゲノム合成の対象が単細胞生物に限定されていたが、ポスト GP-write 時代では、それがヒトを含む高等生物種にまで拡がり、高等生物のゲノムデザイン原理を明らかにする必要性が顕在化した。

大腸菌や酵母と比較した場合、高等生物のゲノムの大きな特徴として「遺伝子密度が極めて低いこと」が挙げられる。ゲノム全長に占める遺伝子領域（正確には ORF）の割合は、前者では 70%ほどに達するのに対して、後者ではわずか 1-2%しかない。したがって後者に対しては、合成するゲノムを設計する前段階で、この広大な非遺伝子領域をどのように設計するのかが現在、大きな課題となっている。未だにその「非遺伝子ゲノム領域のデザイン原理」を探究し、そのデザインルールを構築するに我々は至っていないのである。

私たちの研究室ではプレ GPw 時代から、非遺伝子ヒトゲノム領域の半分以上を占めるトランスポゾンや、同ゲノム領域に散在している機能未知転写領域を対象に、それらゲノム配列のもつ機能性を探究してきた。そして発足と同時に GPw に参画後は、「非遺伝子ヒトゲノム領域のデザイン原理」を明らかにすべく、ヒトゲノムのミニマム化を進めている。本講演ではミニマム化の現状と共に、ミニマム化を効率よく進めるために必要だと我々が気付いたゲノム工学新技術の開発状況をご紹介する。

Human genome, Intergenic regions, Genome minimization

発表責任者：相澤康則（yaizawa@bio.titech.ac.jp）

講演番号：3S15E6p2
講演日時、会場：3 月 26 日 14:30～ E6 会場

ゲノム合成時代のセルフリー技術

Cell-free technology in era of synthetic genomics

○末次 正幸、奈良 聖亜、倉田 竜明 (立教大理)
○Su'etsugu Masayuki, Seia Nara, Tatsuaki Kurata (Rikkyo Univ.)

近年、ゲノム合成研究に対する注目が高まっているものの、ゲノムスケールの長鎖 DNA 合成には、大腸菌あるいは酵母を用いた時間と手間のかかる生物学的クローニングが必要である。最近我々は 25 種の蛋白質を用いて、大腸菌ゲノム複製における開始・終結・分離の全サイクルを試験管内に再構成することに成功した(Su’etsugu *et al.*, 2017 *Nucleic Acids Res.*)。この「複製サイクル再構成系：RCR (Replication-Cycle Reaction)」では複製後に絡み合った姉妹環状 DNA の分離後、元の環状構造に戻った産物を鋳型として、さらなるラウンドの複製サイクルが自律的に何度も繰り返される。よって、等温での環状 DNA の指数増幅が達成される。RCR はゲノム複製系をまるごと再現したものであるため、200 kb を超える長鎖環状 DNA の増幅が可能である。また、我々は、50 種の遺伝子断片を一回の反応で同時連結する RA 連結反応も開発している。RA 連結反応と RCR 増幅反応との組み合わせにより、ゲノムスケールの長鎖 DNA を細胞を使わずに試験管内で簡便に合成可能であり、紹介させていただく。

DNA replication, Synthetic biology, Escherichia coli

発表責任者：末次正幸（suetsugu@rikkyo.ac.jp）

講演番号：3S15E6p3
講演日時、会場：3 月 26 日 15:00～ E6 会場

正確で迅速な長鎖 DNA 合成

Precise and rapid long DNA synthesis

○柘植 謙爾（神戸大科学技術イノベ）
○Kenji Tsuge (Kobe Univ. of Sci. Tech. Innov.)

合成生物や、遺伝子治療、再生医療などの進展により、今後長鎖 DNA の需要が増加すると期待されるが、長鎖 DNA（>10 kb）の受託合成ビジネスは、それより短い短鎖（～1 kb）や中鎖（＜10 kb）の DNA 合成ビジネスよりも圧倒的に少ない。その理由には、例えば、ベクター中に安定に保持することや、大量にかつ純度高く精製すること、無傷でピペッティングすること、という長鎖 DNA 取り扱いにおける一般的な問題点も挙げられるが、特に合成という観点では、１塩基の間違いもない DNA を合成することが困難であること、当初の設計を変更することなく合成することが困難である、という２つの問題点が大きいと言える。演者らは、これらの問題点を解決するために、枯草菌を用いた遺伝子集積法の OGAB 法をはじめとする、独自の長鎖 DNA 合成技術を発展させてきた。

１塩基の間違いもない DNA を効率よく取得するためには、化学合成 DNA 時点での誤り（～数 1,000 塩基に１か所）を排除する必要がある。通常、DNA をクローン化しシーケンシングすることで、正しいクローンを選択する。シーケンシングは中鎖 DNA 以下の合成では最終の目的の DNA が合成されてから行うことが一般的であるが、長鎖 DNA では変異の導入数が合成長さに比例するため、多数のクローンのシーケンシングを行っても誤りのないクローンが一つも得られないことが起こりがちである。演者が開発した第二世代 OGAB 法は、この問題の解決を意識して、一度に 50 個以上という極めて多数の DNA 断片を正しい順序と向きに集積できる。例えば 50 kb の長鎖 DNA を 1 kb の短鎖 DNA50 個から一度に集積可能である。これにより、集積の材料となる 50 個の DNA 断片のそれぞれを、シーケンシングしやすい短鎖の DNA として一度クローン化しシーケンシングを可能とし、材料の DNA の時点で間違いを排除し、得られた長鎖 DNA に化学合成に伴う変異を持ち込まないということを実現した。

もう一つの当初の設計を変更しないことに対しては、独自の化学合成・二本鎖化手法を開発した。配列の問題により化学合成が上手くいかない場合、合成された一本鎖 DNA を二本鎖 DNA に変換できない場合がある。受託合成会社に発注した場合には、当初の配列を同義語コドン置換して合成することを薦められる場合がある。このような変更は、タンパク質をコードしている場合は妥協できるかもしれないが、プロモーターなどの制御配列では困難である。この状況の改善ため、従来よりも長い 200 塩基の化学合成 DNA を用い、さらに独自の DNA 二本鎖技術を開発し、基本的にどのような配列の DNA の配列も第二世代 OGAB 法に使用可能な短鎖の二本鎖 DNA を得られるようになった。

講演では、正しい長鎖 DNA の迅速に取得を可能とするこれらの技術をより詳しく紹介したい。

Long DNA, DNA assembly, OGAB

発表責任者：柘植謙爾（ktsuge@port.kobe-u.ac.jp）

講演番号：3S15E6p4
講演日時、会場：3 月 26 日 15:30～ E6 会場

DNA 水平伝播技術を用いたゲノム合成と活用法

Application of Cell Lysis Technology for Genome synthesis

○金子 真也[1]、中濱 みさ子[1]、福島 寛美[1]、板谷 光泰[2]([1]東工大・生命理工、[2]慶應大・先端生命研)
○Shinya KANEKO[1], Misako NAKAHAMA[1], Hiromi FUKUSHIMA[1], Mitsuhiro ITAYA[2] ([1]School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, [2]Inst. Adv. Biosci. Keio Univ.)

次世代シーケンサーの登場で塩基配列の解読は目覚ましい進歩を遂げた。そして遂に生物の設計図であるゲノム自体を合成し、活用する研究が世界各国で開始された。しかし DNA は長くなるほど物理的ダメージを受けやすく、ゲノムサイズの大きな DNA はピペッティングを伴う *in vitro* 操作には適さない。大腸菌、酵母、枯草菌を宿主とした *in vivo* でのゲノム合成法が報告されているものの、合成されたゲノムを活用する手段についての報告は極めて少ない。本研究では自然界での水平伝播に習って、長鎖 DNA 取り扱い技術について紹介する。

自然界では DNA による遺伝情報のやり取り(水平伝播)が微生物間で頻繁に生じていると報告されている。我々は細胞外に放出されたプラスミド DNA が介在する「自然形質転換による水平伝播」に着目し、プラスミド DNA の抽出・精製操作を必要としない遺伝子伝搬法(導入法)として「溶菌法」(Cell Lysis Technology to provide transformable Extra-cellular DNA; CELyTED)を開発した(1-4)。ある条件下で宿主細胞を溶菌させた溶菌液中に安定して存在しうる細胞外核酸を用いた形質転換法であり、*in vitro* での生化学的な抽出・精製操作を必要としないため、迅速かつ簡便で、特に精製過程で物理的なダメージを受けやすい長鎖プラスミド DNA に効果的である(2)。「溶菌法；CELyTED」の汎用性は非常に広く、自然形質転換能を持たない原核微生物の外、真核微生物である出芽酵母の形質転換法にも適用できることが確認された。本講演では「溶菌法」を用いたゲノム合成法への応用について紹介する。

(1) Kaneko S. and Itaya M. (2010) *J. Biochem.* **147**: 819-822.
(2) Itaya M. and Kaneko S. (2010) *Nucleic Acids Research* **38**: 2551-2557.
(3) 金子真也、板谷光泰 (2016) *化学と生物* **54**, p.668-673
(4) Kaneko S. et al. (2018) *J. Biochem.* **163**：305-312

horizontal gene transfer, transformation, Cell lysis

発表責任者：金子真也（skaneko@bio.titech.ac.jp）

講演番号：3S15E6p5
講演日時、会場：3 月 26 日 16:00～ E6 会場

合成生物シアノバチルスにおける合成ゲノム再起動計画

Rebooting of synthetic cyanobacterial genome in *Bacillus subtilis* BEST7613

○渡辺 智[1]、朝井 計[1]、赤沼 元気[2]、千葉櫻 拓[1]、河村 富士夫[2]、板谷 光泰[3]、吉川 博文[1] ([1]東京農大生命、[2]立教大理、[3]慶応大先端生命)
○ Satoru Watanabe[1], Kei Asai[1], Genki Akanuma[2], Taku Chibazakura[1], Fujio Kawamura[2], Mitsuhiro Itaya[3], Hirofumi Yoshikawa[1] ([1]Tokyo Univ. of Agric, [2]Rikkyo Univ., [3]Keio Univ.)

枯草菌 *Bacillus subtilis* BEST 7003 株のゲノム内にシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 のゲノム (3.6 Mb) を人為的にクローニングした *B. subtilis* BEST 7613 株、通称シアノバチルス 1.0 が作出された。本株の完成は 2004 年に報告され、いわゆる合成生物の先駆けとして国内外に大きなインパクトを与えた。枯草菌、シアノバクテリアの両ゲノムを保持するにも関わらず、シアノバチルスの生き様は枯草菌そのものであり、これは細胞の性質を決定するにはゲノムだけでなく「ゲノムを取り巻く環境」が重要であることを示している。枯草菌の中で異種のゲノムを機能させることができるのか？シアノバクテリアゲノムが活性化したら一体何が起こるのか？我々はシアノバチルスのシアノバクテリアゲノム起動に取り組んできた。遺伝子発現系の改良により徐々にシアノバクテリアゲノムは起動しつつあるものの、完成から 15 年経過した現在においても（まだ）シアノバチルスは光合成を行わない。枯草菌とシアノバクテリアの歴史的背景、進化系統を比較すると両者が分岐したのは少なく見積もっても 30 億年以上前であり、この隔たりを越えるのに 15 年で結論を出すのは時期尚早である。そもそも、シアノバクテリアという生き物について我々はどれだけの知識を持っているだろうか。実はシアノバクテリアがどのようにゲノムを複製して増殖しているのか、という基本的な細胞増殖のメカニズムすらよくわかってはいなかった。本シンポジウムでは、シアノバチルスにおけるシアノバクテリアゲノム起動の現状と、シアノバチルス研究から明らかとなったシアノバクテリア DNA 複製の新知見、種の壁を利用したシアノバクテリアのゲノム改変技術について講演する。

synthetic biology, cyanobacteria, genomic engineering

発表責任者：渡辺智（s3watana@nodai.ac.jp）

講演番号：3S15E6p6
講演日時、会場：3 月 26 日 16:30～ E6 会場

ゲノム合成とゲノム移動への道のり
Toward synthesis and activation of genomes

○板谷 光泰（慶應大学先端生命科学研究所）
○Mitsuhiro Itaya (Inst. Adv. Biosci, Keio Univ.)

ゲノム合成は世界の大きな潮流であり、この分野で必須の完全ゲノム合成とその移動のシナリオを世に問うている。試験管で調製できる低分子生体物質と異なり、ゲノムは巨大すぎて損傷を受けやすく、無傷で純粋に大量に試験管で作り出すことは 20 世紀には不可能であった。不可能を可能にしたのは枯草菌（こそうきん）と呼ばれるバクテリアである。枯草菌は、ゲノム編集、ゲノム操作が柔軟に適用できる数少ない生物材料で、ゲノム構造を思うがまま変化させられる。30 年前、誰も見向きもしなかった枯草菌のこの能力にとりつかれ、独自のアイデアと膨大な試行錯誤の繰り返しと 7 年の歳月をかけて、世界で初めてゲノムの完全合成に成功し報告した（2005 年）。合成対象としたゲノムは光合成で生育するラン藻（シアノバクテリア）ゲノムで、サイズ 3,500 kbp と巨大であり、世界にインパクトを与えた。ゲノムは合成するだけでは片手落ちであり、合成ゲノムを移動させるための手法としての接合伝達システムの開発にも触れたい。枯草菌でのゲノム合成手法の独自性は高く、現在でも独走状態が続いている。枯草菌という認知度の高くない生物を用いたことで、理解され認められるまでの道のりは平坦ではなかった。前例は自ら作り出さねばならず、まとまった成果は数年かかることを伝えたい。世界がゲノム合成に舵をきった今、合成対象は現存のゲノムだけでなく、完全に設計されたゲノムにもおよび、合成ゲノムが機能させるまでの一気通貫システムの構築が必須である。使いこなすには時間とコストはかかるが、日本発の独自ゲノム合成を世界標準にしたい。

【参考文献】
１）板谷、金子：「ゲノム合成の潮流」、実験医学（印刷中）
２）金子、板谷:「細胞外核酸を利用した簡便で迅速な形質転換系の確立」化学と生物, 54:p. 668-673 (2016)
３）柘植、板谷：「ゲノム再編集のための遺伝子クラスター単位の構築」化学と生物 54, p. 740-746.（2016）
３）板谷：「生命システムにおけるゲノム科学とゲノム工学」、第 7 章、pp131-146、’生命システム工学―進化分子工学から進化生命工学へ’, 田口精一編、【化学同人】(2012)
４）板谷‘合成生物学’ 浅島誠・他編、シリーズ現代生物科学入門 9、第 2 章「ゲノム構造の再編成」、pp35-65 岩波書店（2010）

Genome synthesis, Bacillus genome manipulation vector, Conjugational transfer

講演番号：3S16B6p1
講演日時、会場：3 月 26 日 14:05～ B6 会場

エクソソーム研究の最前線：食品と未病社会

State of the art EV research: food science towards presymptomatic disease

○落谷 孝広（国立がん研究センター）
○Takahiro Ochiya (National Cancer Center)

「未病」という言葉が流行語のように頻繁に使われている。これは裏を返せば、現在人が、老化とともにやがては自身の身に降りかかるかもしれない病を恐れてのことであり、２人に一人ががんに罹患する日本人だからこそより切実な問題である。ではこの「未病」という言葉が代表するヒトの健康状態を判定するマーカーは何だろうか？未病とは検査を受けても現行のマーカー類や画像診断では特別な異常が見つからず、特定の病気と診断されはしないが、健康ともいえない状態。おそらくそのまま放置すると病気になるだろうと予測される状態、だと多くの辞典には記載されている。ということは、高脂血症、糖尿病、高血圧なども「未病」の１つと考えることができるわけだが、となるとやはり重要なのはこうした病の兆候をいち早く見つけ、元の状態に戻す手段を開発することこそ、未病の学問ということになる。我々人間は病気の原因をゲノム、エピゲノムのレベルにまで掘り下げ、その発症のメカニズムを深く解明するに至っている。その中であらゆる病の引き金になるのが、マイクロ RNA などのノンコーディング RNA であることもごく最近になって理解されつつある。さらにマイクロ RNA を運ぶカーゴであるエクソソームと未病をつなぐリングもおぼろげながら見えてきた。人間の基本である「食」をマイクロ RNA のレベルで理解する研究も世界中で行われつつある。今までは、病気になったらそれを治す医療が主流だが、これからは病気にならないための医療、研究にもっと本腰を入れるべき時が来た。人類がその叡智を結集して未病に立ち向かい、健康長寿の真の姿を描くためには何が必要か、エクソソーム研究はその鍵を握る。

1. Ageta H, et al., UBL3 modification influences protein sorting to small extracellular vesicles. ***Nat Commun*****,** 2018
2. Otsuka K. et al., Maintaining good miRNAs in the body keeps the doctor away?: Perspectives on the relationship between food-derived natural products and microRNAs in relation to exosomes/extracellular vesicles. ***Mol Nutr Food Res*****.** 2018.
3. Yokoi A, et al., Malignant extracellular vesicles carrying MMP1 mRNA cause mesothelial cell damage facilitating peritoneal dissemination in ovarian cancer. ***Nat Commun***, 2017
4. Kosaka N, et al. Versatile roles of extracellular vesicles in cancer. ***J Clin Invest*****,** 2016
5. Tominaga N, et al. Brain metastatic cancer cells release microRNA-181c-containing extracellular vesicles capable of destructing blood-brain barrier. ***Nat Commun***, 6:6716, 2015
6. Ono M, et al. Exosomes from bone marrow mesenchymal stem cells contain a microRNA that promotes dormancy in metastatic breast cancer cells. ***Sci Signal***, 7:ra63, 2014
7. Yoshioka Y, et al. Ultra-sensitive liquid biopsy of circulating extracellular vesicles using ExoScreen. ***Nat Commun***, 5:3591, 2014

Exosome, microRNA, Food

発表責任者：落谷孝広（tochiya@ncc.go.jp）

講演番号：3S16B6p2
講演日時、会場：3 月 26 日 14:40～ B6 会場

マイクロ RNA 研究の最前線

The cutting edge of microRNA research

○田原 栄俊（広島大学大学院医歯薬保健学研究科）
○Hidetoshi TAHARA (Hiroshima Univ. Institute of Biomedical & Health Sciences)

マイクロ RNA は、DNA から転写される RNA の一種で、タンパク質に翻訳されるメッセンジャーRNA とは異なりタンパク質をコードしない 22 塩基程度の長さの非コード RNA の一つである。マイクロ RNA は、動植物に広く存在し、ヒトでは約 3000 種類ほど知られており、生体内における疾患の発症の重要な制御因子として様々な機能が知られている。細胞内で合成されたマイクロ RNA は、細胞外小胞とよばれる小胞に内包されて、細胞外に放出されていることが知られており、細胞間のコミュニケーションツールとして働いている。そのため、動植物由来のマイクロ RNA が、エクソソームなどの細胞外小胞を介して、ヒトの生体内で機能する可能性もある。我々は、マイクロ RNA の重要な機能として、老化やがんの抑制機構に着目して研究を行っている。その中でも、細胞老化とともに増加してくるマイクロ RNA が、がんの細胞増殖抑制機構として重要であることを明らかにしてきた。例えば、miR-22 は、子宮頸がんや乳がんのがん細胞を扁平巨大化させて細胞老化を誘導することにより細胞の増殖や遊走能を顕著に抑制する。しかも、in vivo での転移性乳がんゼノグラフトモデルにおいて、顕著に腫瘍の増殖と転移の抑制を示すことを明らかにした。近年、miR-22 よりも更に強力で、がん幹細胞や抗がん剤耐性のがん細胞にも効果を示すマイクロ RNA を発見し研究を進めている。本講演では、その分子メカニズムと悪性胸膜中皮腫を対象としたゼノグラフトモデルマウスの研究成果につても講演する。様々な疾患細胞から血液や唾液などの体液中に疾患特有のエクソソームなどの細胞外小胞などが放出することから、体液中のマイクロ RNA をもちいたバイオマーカーの開発が注目されている。我々は、次世代シークエンスを用いてアルツハイマー型認知症、種々のがんおよび加齢を対象としたバイオマーカーの開発を行っている。本講演では、その開発の一端もご紹介したい。

microRNA, Exosome, cancer

発表責任者：田原栄俊（toshi@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：3S16B6p3
講演日時、会場：3 月 26 日 15:15～ B6 会場

腸内細菌と宿主のクロストークを媒介するエクソソーム

Exosomes that mediate crosstalk between gut microbiota and host

○園山 慶[1]、青木（吉田） 綾子[2]、鶴田 剛司[3] ([1]北大院農、[2]日女大家政、[3]岡大院環境生命)
○Kei Sonoyama[1], Ayako Aoki-Yoshida[2], Takeshi Tsuruta[3] ([1]Hokkaido Univ., [2]Japan Women's Univ., [3]Okayama Univ.)

私達の研究室では、食物 - 腸内細菌叢 - 宿主生理の関係に興味を持って研究を行なっていて、特に宿主の体内で情報がどのように伝達されるのかについて明らかにしたいと考えている。このようなことに関してはこれまでに、食物中の炭水化物や脂質を腸内細菌が代謝することによって腸管腔内で生じる短鎖脂肪酸、共役リノール酸、トリメチルアミンなどの低分子化合物、ならびに腸内細菌の菌体成分であるリポ多糖やペプチドグリカンなどが、腸上皮細胞に発現する受容体によって認識されるか、あるいは腸管から取り込まれた後に循環してさまざまな組織に到達するかして、宿主の生理に影響をおよぼすことが提唱されてきた。しかしながら、体外である腸管腔に存在する腸内細菌叢の情報が腸管を飛び越えて体内の組織に伝達される様式の全貌が理解されているわけではない。

私達はこれまでに、難消化性オリゴ糖の摂取によって腸内細菌叢の構成が変化するとともにアレルギー性炎症が抑えられることをいくつかの動物モデルで観察してきた。また、漬物製造の種菌として用いられる *Lactobacillus plantarum* No.14 株の投与がマウスの肥満および白色脂肪組織炎症を抑えること、ならびにそれらにともなう代謝異常を抑えることも観察した。私達は、これらのことにエクソソームおよびそのカーゴである microRNA（miRNA）が関与するという仮説を立てた。これを検証するために、*in vitro* における免疫細胞の炎症性サイトカイン産生や脂肪細胞の脂肪蓄積に対するエクソソームの影響を調べた。その結果、*in vivo* において観察された No.14 株の肥満抑制作用や抗炎症作用の少なくとも一部をエクソソームが媒介することを示唆する知見を得た。

また、循環血中のエクソソームに含まれる miRNA のプロファイルが難消化性オリゴ糖の摂取や No.14 株の投与によって変化することも観察した。循環血中のエクソソームは体内のさまざまな細胞が放出したエクソソームの総体とみなされるが、腸内細菌叢の変化や乳酸菌株の投与に応答して miRNA のプロファイルが変化するようなエクソソームは、腸内細菌が直接曝露する腸粘膜に存在する細胞が放出すると考えるのが合理的である。実際、マウスの大腸粘膜固有層に存在する単核球に含まれる miRNA のプロファイルは、難消化性オリゴ糖の摂取によって変化した。以上の観察結果は、前述した私達の仮説を支持する状況証拠と考えることができる。現在、さらに証拠を積み上げるために、エクソソームの投与がマウスの表現型におよぼす影響の解析や、変化する miRNA による標的 mRNA のサイレンシングを証明する作業を進めている。

Gut microbiota, Exosome, microRNA

発表責任者：園山　慶（ksnym@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：3S16B6p4
講演日時、会場：3 月 26 日 15:45～ B6 会場

乳由来のエクソソーム・マイクロ RNA の特徴と機能

Characteristics and functions of milk-derived exosome and microRNA

○和泉 裕久（森永乳業　栄科研）
○Hirohisa Izumi (Morinaga Milk Industry Co., Ltd.)

我々は、機能性 small RNA の一つであるマイクロ RNA（miRNA）が、ヒト母乳、牛乳、ラット乳の乳清中に存在し、免疫系に関与する miRNA が比較的高発現していること、消化管を模した低 pH 環境や RNase 添加に対して耐性を示すこと、その耐性の少なくとも一部はエクソソームと呼ばれる脂質二重膜でできた小胞中に存在するためであること、ただしエクソソーム以外の形態で存在する miRNA もあることを示してきた。
現在、世界中で乳中 miRNA あるいはエクソソームについて、様々な研究が進められているものの、その生理学的機能については未だ解明されているとは言えない。今回、乳中に含まれる miRNA あるいはエクソソームについて、種間の比較、泌乳時期による比較、細胞や動物を用いた検討結果などの我々の知見についてだけでなく、国内外で行なわれている研究から、乳中 miRNA やエクソソームについてまとめ、これらが「乳」本来の役割である母から子（仔）への機能伝達において果たす可能性についても議論したい。

exosome, microRNA, milk

講演番号：3S16B6p5
講演日時、会場：3 月 26 日 16:15～ B6 会場

食品因子のエクソソーム・マイクロ RNA 依存的な機能性発現

Exosome/microRNAs mediate functionality of food factors

○立花 宏文 (九大院農院)
○Hirofumi Tachibana (Kyushu Univ.)

食事性ポリフェノールの機能性発現には生体における感知機構（ポリフェノールセンシング）が関与している。本シンポジウムでは代表的な食事性ポリフェノールである緑茶カテキン、大豆イソフラボン、アントシアニジンの各センシングと microRNA(miRNA)の関係について紹介する。

緑茶の主要な成分である EGCG はその感知レセプターである 67-kDa Laminin Receptor (67LR)を介して cAMP/protein kinase A(PKA)/protein phosphatase 2A(PP2A)経路を活性化することで抗メラノーマ活性を発現する。EGCG はこの 67LR 依存的なセンシング経路を介して miRNA の一種である let7b の発現を増加させる [1]。let7b はメラノーマにおいて発現が低下していることが知られているが、EGCG の経口投与は肺に形成された転移腫瘍における let-7b の発現量を増加させた。また、EGCG はがん遺伝子の一種である HMGA2 の発現を let7b 依存的に抑制した。マクロファージは炎症を促進する M1 型と炎症を抑制する M2 型の 2 種類に大別されるが、EGCG は Let-7b 依存的にマクロファージの M2 型への分極を促進した。

大豆イソフラボンはファイトエストロゲンと呼ばれるように、その機能性はエストロゲン受容体 ER を介した作用として理解されてきた。一方我々は、ER に依存しない新しい機能性発現機序として、RNA 合成酵素の一種である PAPD5 依存的な経路の存在を見出した。大豆イソフラボンは PAPD5 依存的に miR320a の発現量を調節し、その標的分子の一つであるβカテニンの発現量を低下させた。

アントシアニジンの一種であるデルフィニジンの経口投与は廃用性筋萎縮を誘導したマウスの筋重量の低下を抑制する。廃用性筋萎縮にはユビキチンリガーゼの一種である MuRF1 の発現亢進が関与している。廃用性筋萎縮を誘導したマウスの骨格筋やデキサメタゾンを作用させた筋芽細胞株 C2C12 において MuRF1 の発現が亢進していたが、デルフィニジンはこうした発現上昇を抑制した。miRNA の一種である miR-23a は MuRF1 を標的とすることで筋委縮阻害作用を発揮することが知られている。デキサメタゾンは筋芽細胞における miR-23a の発現ならびにその転写誘導因子 NFATc3 の発現を低下させたが、デルフィニジンはこの低下を抑制した。また、デルフィニジンを投与した廃用性筋萎縮誘導マウスの骨格筋では miR-23a の発現ならびに NFATc3 の発現が促進されていた [2]。難吸収性のデルフィニジンの機能性発現機序の一つとして腸管上皮細胞由来 miR-23a の関与について言及したい。

1) Sci. Rep. 6, 19225 (2016)
2) J. Agri. Food Chem. 65, 45-50 (2017)

Polyphenol sensing, miRNA, exosome

発表責任者：立花宏文（tatibana@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3S17D6p1
講演日時、会場：3 月 26 日 14:00～ D6 会場

光学活性アリルアルコール類の合成手法の開発と天然物合成への応用

Development of the practical methods for the synthesis of optically active allyl alcohols, and its applications for the natural product synthesis

○矢島 新（東農大生命科）
○Arata Yajima (Tokyo Univ. of Agric.)

生物活性有機化合物に関連した研究では、いかに沢山の量を確保するか、いかに純粋な試料を準備できるのかが重要な鍵を握ることが多い。農芸化学分野においてはその傾向は顕著であり、古くから有機合成の力が必要とされてきた。分析技術や分離技術が発展している現代においてもその立場は変化しないが、新しい手法や簡便な手法を開発し続けることで、将来起こりうるあらゆるケースに対応できるように準備することは重要である。

天然有機化合物を合成する際に、その中間体としてアリルアルコールを部分構造として有する化合物が必要になることがある。目的とする最終物質にそのモチーフがある場合や、アリルアルコールに存在するヒドロキシ基、二重結合部位を足がかりとしてさらなる変換を進める場合などが該当する。これまでに多様なアリルアルコール類の合成方法が開発されており、有用な手法も数多く報告されてきている。しかし一方でそれらの手法は、農芸化学的な観点からは疑問符が付きかねないデメリットを持っている場合もある。

そこで本講演では光学活性アリルアルコール類を効率よく、簡便に、高い立体選択性でをキーワードにした手法の開発と、その手法を用いた生物活性有機化合物の合成、およびその生物活性評価などについて述べる。

total synthesis, asymmetric synthesis, natural product

発表責任者：矢島新（ayaji@nodai.ac.jp）

講演番号：3S17D6p2
講演日時、会場：3 月 26 日 14:30～ D6 会場

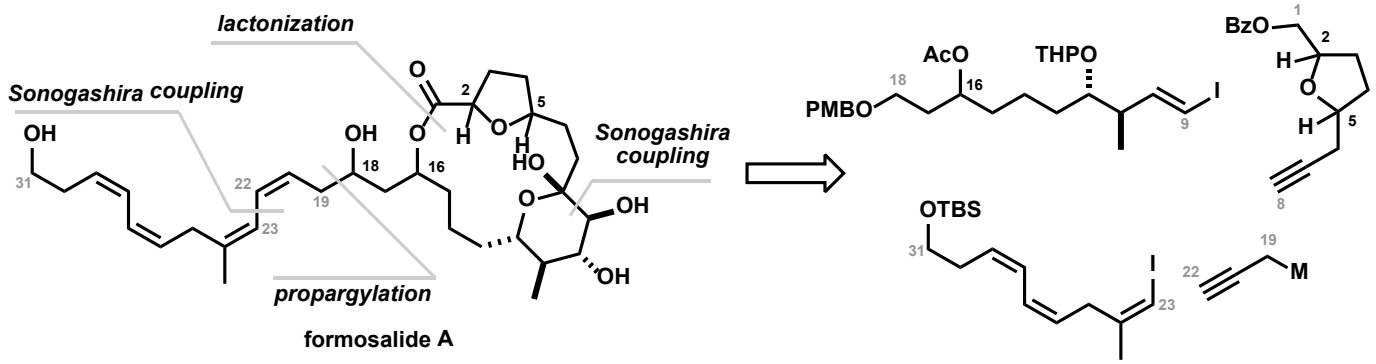
計算化学を活用した天然物合成へのアプローチ

A Computer-Aided Approach Toward Natural Product Synthesis

○占部 大介（富山県大工）
○Daisuke Urabe (Toyama Pref. Univ.)

近年、コンピュータの急速な発達と計算化学の進展により、有機化学に関連する様々な分野で計算化学が導入されている。天然物化学の分野では、ECD や NMR スペクトル計算などが革新的な構造推定法として利用されており、有機合成化学の分野においても中間体の電子状態や立体･化学選択性の発現機構の考察に計算化学が多用されている。我々は、配座解析、遷移状態探索、分光スペクトルシミュレーションなどの計算化学的手法を積極的に取り入れて、天然物の全合成研究を展開している。本シンポジウムでは、希少ポリケチドの構造推定と合成研究を中心に、これまで行ってきた研究について紹介する。

渦鞭毛藻 Prorocentrum sp.から単離されたホルモサリド A は、ヒト T リンパ球性白血病由来細胞とヒト大腸腺癌由来細胞に対して強い毒性を示すポリケチドであるが、天然からは微量しか得られない。そのため、平面構造は明らかにされているものの、C2, 5, 16, 18 立体化学が決定されていない。我々は、DFT 法による NMR 計算と DP4+により、ホルモサリド A の不明な立体中心を高精度で推定した。次いで、推定した構造をもとにホルモサリド A の合成計画を立案した。構造活性相関研究への展開を視野に入れ、多様な立体異性体が合成可能な収束的経路を考案し、現在までに 3 つのフラグメントの立体選択的合成に成功している。シンポジウムでは計算化学による構造推定の詳細と、ホルモサリド A の全合成研究について紹介する。



natural product syntheisis, organic synthesis, computational chemistry

発表責任者：占部大介（urabe@pu-toyama.ac.jp）

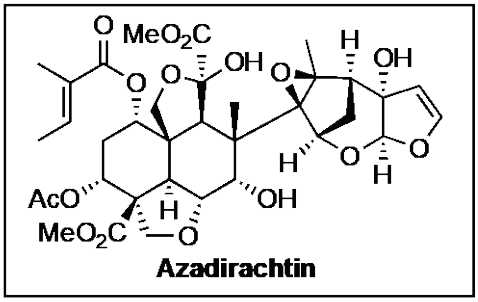
講演番号：3S17D6p3
講演日時、会場：3 月 26 日 15:00～ D6 会場

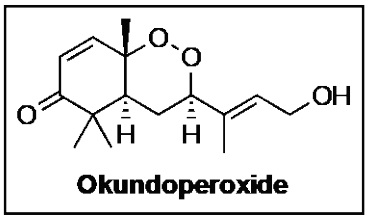
斬新かつ独創的なアイデアで挑む天然物合成
Natural product synthesis with innovative and inventive ideas

○森 直紀（東大院農生科）
○Naoki MORI (The Univ. of Tokyo)

農芸化学における有機合成（特に天然物合成）の役割として、天然から微量にしか得られない有機化合物の迅速な合成・供給を通して生命現象の解明に貢献すること、が第一に挙げられるのは間違いありません。ただし、合成化学者には新規合成法の開発や複雑天然物合成などを通して有機合成化学の発展にも寄与する使命があることも忘れてはなりません。私が所属している東京大学農学部有機化学研究室は、創設以来、「生物学的に重要な天然物」と「構造的に重要な天然物」の両方を研究対象として取り扱うことで、生命科学・有機合成化学の両分野において多大な功績を残してきた歴史があります。

その中において私は指導教授とともにより後者を重視した研究、すなわち構造的に興味深い天然物を斬新かつ独創的な方法で合成することを目標とする研究を行ってきました。本シンポジウムでは、これまでに合成を達成した化合物の中からアザジラクチンとオクンドペルオキシドの合成を取り上げ、天然物合成におけるアプローチの重要性について理解を深めるとともに、天然物をスマートに合成する意義についても考えたいと思います。





natural product synthesis, azadirachtin, okundoperoxide

発表責任者：森直紀（anmori@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

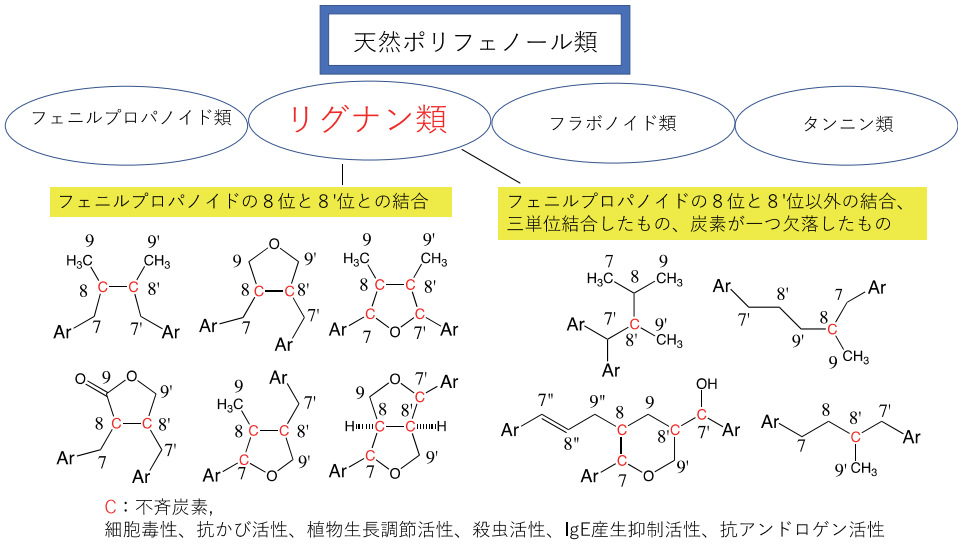
講演番号：3S17D6p4
講演日時、会場：3 月 26 日 15:30～ D6 会場

リグナン類の立体異性体を含めた合成および構造と活性との関係

Syntheses of lignans containing stereoisomers and structure-activity relationship

○山内 聡（愛媛大院農）
○Yamauchi Satoshi (Graduate School of Agriculture, Ehime University)

リグナン類は、フェニルプロパノイド単位（C6-C3 単位）が 2 または 3 単位結合した、広く植物により生合成され食品性植物にも含まれる化合物である。古くから知られる化合物ではあるが、C6-C3 単位の結合様式が多く、また、基本骨格内が酸化され、分子内エーテル環の形成のされ方、水酸化される場所も数多く観察され、様々な生物活性を示す。そのため、現在でも多くの研究者のターゲットであり、植物からの単離同定、生物活性試験、合成研究が行われているが、これまで立体構造を含めた構造と生物活性を明らかにする研究例は少なかった。リグナン類は、他のポリフェノール類に比べて不斉炭素が多く、植物により鏡像異性体の混合物として生合成される場合もあることから生物活性試験を行う前に、有機合成化学的手法により立体異性体を作り分け、最も高い生物活性を有する立体構造に固定して構造活性相関研究を行うことが望ましいと考えられる。我々がこれまでに、立体異性体を含めて合成し、生物活性試験を行ったリグナン類は、リグナン類において最も一般的な C6-C3 単位の 8 位と 8’ 位が結合したもの、C6-C3 単位の 8 位と 8’ 位以外の結合様式を持つもの（ネオリグナン）、炭素が一つ欠落しているもの（ノルリグナン）、C6-C3 単位が三単位結合したもの（セスキリグナン）であり（図）、立体構造とともに、リグナン類の変化に富んだ基本構造が生物活性に与える影響を明らかにすることを目的として研究を行ってきた。その結果、基本骨格によって有効な生物活性が異なり、立体構造は生物活性に大きく影響を与える場合とそうでない場合があった。また、構造活性相関研究の結果、ベンゼン環上の置換基が生物活性に影響を与えることも示され、天然の構造よりも高い活性を有する化合物を合成することができた。



図：合成によって得られた主なリグナン類と調べた生物活性

lignan, norlignan, neolignan

発表責任者：山内聡（syamauch@agr.ehime-u.ac.jp）

講演番号：3S17D6p5
講演日時、会場：3 月 26 日 16:00～ D6 会場

合成化学で挑む細胞内糖修飾の生体機能

Exploring functions of intracellular glycan modifications by means chemical synthesis

○伊藤 幸成（理化学研究所）
○Yukishige ITO (RIKEN)

過去 20 年にわたり、我々の研究室では主として複合糖質糖鎖の合成と機能解析を目指した研究を行ってきた。これは、合成化学としての興味もさることながら、糖鎖生物学の重要性に関する認識が高まってきた時代背景に後押しされて来たものでもある。

複合糖質糖鎖が担う生物機能は多岐にわたる。細胞表層に存在する糖鎖が細胞の移動、細胞－マトリクスおよび細胞間認識、シグナル伝達、微生物感染、ガンの転移や悪性化、細胞分化、免疫応答などに関わることは良く知られている。また、タンパク質の安定化、立体構造維持、細胞内・細胞間輸送においても重要な役割を担っている。糖鎖構造の異常はガン、プリオン病、筋ジストロフィー、糖鎖不全症など様々な疾病と関連している。また、抗 HIV 活性分子や中和抗体はウィルス表層の糖鎖を認識することが示されている。最近では、タンパク質品質管理機構（フォールディング、輸送、分解）が糖鎖生物学における重要なトピックになっているが、ここでは D-グルコースや D-マンノースといった糖残基からなる、一見平凡な糖タンパク質糖鎖や糖脂質が興味ある機能を持つことが明らかになっている。

一方、どのような構造のものであれ、生体試料に由来する糖鎖や複合糖質を単一な形で得ることは困難を伴う。従って、これらの機能を精密に調べる上で、化学合成によって構造が規定された糖鎖を得ることは重要な方向性である。しかし、他の生体高分子（ペプチド、核酸など）と比べ、糖鎖の化学合成は完成度が低い状態にある。これは糖鎖研究におけるボトルネックであるが、糖鎖は手作りの化学が威力を発揮する領域であること意味するものでもある。その中で、我々は糖鎖効率的合成における手法、特に立体選択的グリコシル化反応の開発を基軸とした研究を展開し、複合糖質の細胞内機能解析を目指してきた (1)。今回はその経緯を振り返りつつ、最近の研究を紹介したい。

(1) 伊藤幸成：有機合成化学協会誌, 74, 206-218(2016)

Glycoconjugates, Stereoselective glycosylation, Cellular functions

発表責任者：伊藤 幸成（yukito@riken.jp）

講演番号：3S17D6p6
講演日時、会場：3 月 26 日 16:30～ D6 会場

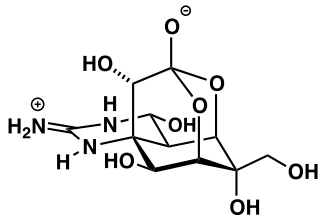
天然物の網羅的合成と新生物機能の解明

Collective Synthesis of Natural Products for Elucidating New Biological Activities

○西川 俊夫、中崎 敦夫、安立 昌篤 (名古屋大院生命農学)
○Toshio Nishikawa, Atsuo Nakazaki, Masaatsu Adachi (Nagoya Univ.)

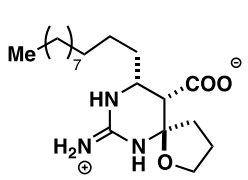
生物が生産する有機化合物（天然物）には、ユニークで強力な生物活性を示すものが少なくない。しかし、その多くは天然からの入手が困難なため、十分な活性評価がなされずに放置されてきた。当研究室では、天然物の有効活用を目指して、精密有機合成による天然物の供給と生物活性の探索研究を展開しているが、その過程で以下に示す天然物をその天然類縁体とセットで“網羅的に”合成し、その中から極めてユニークな生物活性を示す分子を見出すことに成功してきた。これらの活性は、単一の天然物を合成しただけでは、決して見つけることができなかったものである。

近年、ユニークな活性を示す新しい天然物の発見が困難になっていると言われているが、我々は、これら経験から、天然物の網羅的合成とそれらを使った広範な生物活性評価が、天然物が潜在的に持つ生物活性を探索するきわめて有力な方法であると考えるに至った。本シンポジウムでは、これら天然物の網羅的合成と、そこから明らかになってきた新たな生物活性について、最近の研究成果を紹介する。



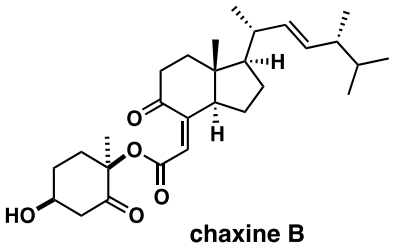
tetrodotoxin

フグ中毒の原因物質



crambescin B COOH

海綿から得られたグアニジンアルカロイド



chaxine B

キノコの微量成分

1. Nishikawa, T.; Urabe, D.; Adachi, D.; Isobe, M. *Synlett* **2015**, *26*, 1930-1939.

2 Nakazaki, A.; Nakane, Y.; Ishikawa, Y.; Yotsu-Yamashita, M.; Nishikawa, T. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 5304-5309.

3. Hirata, Y.; Nakazaki, A.; Kawagishi, H.; Nishikawa, T. *Org. Lett.* **2017**, *19*, 560–563.

organic synthesis, natural products, biological activity

発表責任者：西川俊夫（nisikawa@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3S18C6p1
講演日時、会場：3 月 26 日 14:00～ C6 会場

はじめに～葉面 C1 微生物の生存戦略とその利用

Introduction - Survival strategy of C1 microorganisms in the phyllosphere and its application

○由里本 博也、阪井 康能（京大院農）
○Hiroya YURIMOTO, Yasuyoshi SAKAI (Kyoto Univ.)

【はじめに】

農作物の安定生産のためには施肥が不可欠であるが、コスト高、環境への影響、資源の枯渇などの問題を抱えており、施肥量の減少・適正化に向けた栽培技術の開発・普及が進められている。そのような栽培技術の一つとして、植物生長促進効果をもつ微生物を利用する技術開発が期待されている。近年、次世代シーケンサーやその他の解析技術の進歩も相まって、根圏および葉圏微生物コミュニティーの菌叢解析や、微生物-植物相互作用に関する双方の生理・生態の解明に関する研究が進展してきた。本シンポジウム（3S18）では、根圏および葉圏の微生物菌叢解析や、微生物・植物双方の生理機能、高い生長促進能を持つ微生物の探索やその利用方法の開発などに関して最新の成果を紹介し、植物生長促進微生物を活用する栽培技術開発の可能性や課題について議論したい。

【葉面 C1 微生物の生存戦略とその利用】

植物からは様々な揮発性有機化合物が放出されており、メタンやメタノールなどの C1 化合物もその主要成分である。葉面にはこれらの C1 化合物を炭素源として利用できる微生物（C1 微生物）が棲息している。根粒菌や菌根菌など根圏微生物についての理解とその利用に関する知見に比べて、植物地上部（葉圏）に棲息する非病原性微生物に関する研究の歴史は浅いが、近年、C1 微生物の中でもメタノール資化性 *Methylobacterium* 属細菌が葉面微生物の優占種として常在し、植物生長促進効果を持つことが明らかとなってきた。生長促進を中心とする C1 微生物と植物との相互作用のメカニズムについては未解明な点が多く残されており、葉面 C1 微生物-植物の共生原理の解明とその高度活用による新規栽培技術の確立が期待されている。

発表者らは C1 微生物の葉面での生存戦略機構に関する研究を進めており、最近では、葉面への強い定着能を示す *Methylobacterium* sp. OR01 株がパントテン酸（ビタミン B_5）要求性を示し、葉面に存在するパントテン酸やその生合成前駆体を獲得して定着することや、シアノバクテリアの概日時計タンパク質 KaiC のホモログが、*M. extorquens* AM1 においては UV と温度の複合環境刺激への応答に重要な機能をもち、植物への定着にも関与することを明らかにした。本講演では、このような葉面 C1 微生物の植物上での生存戦略に関する研究成果とともに、*Methylobacterium* 属細菌による作物増収効果についても紹介する。

methanol, *Methylobacterium*, phyllosphere

発表責任者：由里本　博也（yury@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3S18C6p2
講演日時、会場：3 月 26 日 14:25～ C6 会場

微生物による水生植物成長促進機構のミッシングリンク
Missing link in the mechanisms of aquatic plant growth promotion by microorganisms

○森川 正章（北海道大環境）
○Masaaki Morikawa (Hokkaido Univ.)

作物や穀物の成長に有益な作用を示す共生微生物に関する研究の歴史は長く、根粒菌に関してはおよそ 130 年前にまで遡ることができる。この間に蓄積されてきた膨大な知見からは、微生物のしたたかな戦略を垣間見ることができる。例えば成長促進細菌(PGPB)の作用機構を見ると、大気中窒素の固定、土壌リン・鉄の可溶化や吸収介助、抗病原微生物化合物の生産、そして植物ホルモン類の生産がある。PGPB が作る植物ホルモンで最も一般的なものはインドール-３-酢酸(IAA, オーキシン)およびその類似物質であろう。そして黒沢英一と藪田貞治郎によってイネ馬鹿苗病真菌(*Gibberella fujikuroi*)から発見されたジテルペン酸化合物ジベレリン GA 類、アブシジン酸 ABA およびジャスモン酸 JA やサイトカイニン(kinetin, zeatin, isopentenyladenine)も生産することが知られている。さらに巧妙な手段として、成長抑制ホルモンであるエチレンの合成前駆体 1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸(ACC)を、アンモニアと α-ケト酪酸に分解する酵素 ACC deaminase を生産することによってエチレン生成を抑えて成長促進する機構まである。私たちは有用バイオマスとして注目されている浮遊性の水生植物ウキクサ亜科(Lemnoideae)植物の成長を促進する細菌群について研究している。これまでに、*Acinetobacter* 属、*Pseudomonas* 属、*Bacillus* 属、*Delftia* 属、*Aquitalea* 属(池ら)、*Sinorhizobium* 属(遠山ら)の細菌群を PGPB として報告しているが、その作用機構はこれまでに知られているものと一部異なっているらしい。具体的には、PGPB は宿主植物へのストレス付与の程度が小さい [1]ことや PGPB が水生植物に付着するために細胞外に分泌生産する高分子化合物（多糖類やタンパク質)が、その作用因子のひとつであることなどが分かってきた。またごく最近、植物の成長制御に関わるホルモン類 GA3, IAA, ABA, JA, あるいは ACC, AVG(エチレン合成阻害剤), ascorbic acid(抗酸化物質)を *Lemna minor*（コウキクサ）にさまざまな濃度で外部より添加してその成長を比較したところ、ABA あるいは AVG によってコウキクサの成長が強く抑制されたが、ACC、GA3、IAA いずれにも成長促進活性は見られなかった [2]。その一方において、ウキクサ内部共生細菌のおよそ 80%が IAA あるいはその類似化合物を生産していることは、IAA がウキクサの成長を制御している可能性は否定しきれない [3]。まだ水生植物と PGPB の共生に関する研究ははじまったばかりであるが、そこには陸上植物とは違った、独自の新しい相互作用機構が潜んでいることが期待される。

1) H. Ishizawa *et al.* (2017) *Plant. Phys. Biochem.* **118,** 667-673
2) D. Utami *et al.* (2018) *Front. Chem.* **6,** 251
3) S. Gilbert *et al.* (2018) *Front. Chem.* **6,** 265

Duckweed, *Lemna minor*, Plant Growth-Promoting Bacteria

発表責任者：森川正章（morikawa@ees.hokudai.ac.jp）

講演番号：3S18C6p3
講演日時、会場：3 月 26 日 14:55～ C6 会場

内生糸状菌との相互作用を介したアブラナ科植物の生存戦略
Plant survival strategies via interactions with fungal endophytes

○晝間 敬 [1,2] ([1]奈良先端大バイオ、[2]JST さきがけ)
○Kei Hiruma[1,2] ([1]NAIST. Bio., [2]JST, PRESTO)

植物は根圏糸状菌と共生することで様々な環境下で適応している。糸状菌 *Colletotrichum tofieldiae* (*Ct*)はシロイヌナズナなどのアブラナ科植物の根に病気を引き起こすことなく感染する。また、貧栄養条件下では植物にリンなどの栄養素を供給することで植物生長を促すという、アーバスキュラー菌根菌と類似した共生効果を非菌根性植物に対して発揮する。さらには、根圏微生物群との協調及び競合の結果、*Ct* の共生効果は大きく変動することも明らかになっている。本発表では、*Ct* による植物に対する共生効果について紹介するとともに、植物のトリプトファン由来の二次代謝物と植物のリン枯渇適応反応を介した共生効果の制御機構について明らかになったことを中心として発表する。さらには、Ct が他の根圏微生物群に与える機能についても同時に紹介したい。

Plant growth promotion, Fungal endophytes, Phosphate starvation response

発表責任者：晝間敬（hiruma@bs.naist.jp）

講演番号：3S18C6p4
講演日時、会場：3 月 26 日 15:25～ C6 会場

フィールドアグリオミクスで有機農業を科学する
Field agri-omics dissects organic agriculture
○市橋 泰範（理研 BRC）
○Yasunori ICHIHASHI (RIKEN BRC)

近年、有機農業は世界的な食料および環境問題解決に関して注目されている。有機農法の一つである太陽熱処理は、土壌中の植物病原体を防除する方法として開発されたが、植物病原体がいない場合でも植物の成長を促進する効果が知られている。その成長促進効果のメカニズムを明らかにするため、私たちは同じ圃場内において異なる農法でコマツナを栽培し、全代謝物解析および微生物プロファイル解析によるフィールドアグリオミクス研究を行った。その結果、太陽熱処理が土壌全体の微生物でなく、コマツナの根圏に生息する微生物の種類に大きく影響することがわかった。またコマツナや土壌、根圏微生物など全てのデータを統合したネットワーク解析を行うと、個別の解析では明らかにできなかった収量に強く相関した有機態窒素（アミノ酸など）および根圏微生物が明らかになった。さらに栄養源や生理活性物質として収量を増加させる特定の有機態窒素があることを無菌培養実験により実証した。本研究のデータは、慣行農法を支える無機栄養説とは異なり、有機態窒素を利用した農法の有効性を示唆するものである。

Organic agriculture, Omics, Network analysis

発表責任者：市橋 泰範（yasunori.ichihashi@riken.jp）

講演番号：3S18C6p5
講演日時、会場：3 月 26 日 15:55～ C6 会場

土壌微生物を「デザイン」する・・・植物生長を最大化する基盤技術の登場

Technology of designing Soil Microorganisms: Emergence of fundamental technology to maximize plant growth

○篠原 信[1]、安藤 晃規[2]、小川 順[2]、宮本 憲二[3]、加藤 康夫[4]([1]農研機構、[2]京大農、[3]慶應大理工、[4]富県大生セ)
○Makoto Shinohara[1], Akinori Ando[2], Jun Ogawa[2], Kenji Miyamoto[3], Yasuo Kato[4] ([1]NARO, [2]Kyoto Univ. of Agric., [3]Keio Univ., [4]Toyama Pref. Univ.)

土壌微生物をデザインする…それは構想することはできても、実現不可能な夢だった。それがいま、実現しようとしている。これまでの研究では、有用と思われる微生物を見出し、それを土壌に投入しても、土着微生物に駆逐され、期待通りの成果を上げることは困難だった。土着微生物の生態系を改変しようと、堆肥を加えたり消毒をしたりという介入程度しか手はなく、その結果も成り行き任せでしかなかった。土壌微生物をデザインすることは、事実上不可能なことであった。しかもそもそも、土壌微生物の機能（有機物を分解し、植物に好適な無機養分を供給する機能：土壌機能）を保ったまま培養する技術がこれまでなかった。ポリウレタンやロックウールなどの人工媒体に、土壌機能を移植することはできなかった。このため、有機質肥料をこれら人工媒体に施用すると腐敗し、腐敗した媒体に植物を育てようとしても生育が悪化し、最悪の場合、枯死する。有機質肥料を使用するならば、自然土壌に頼らざるを得なかった。つまり、人類は土壌を創造する技術を持たなかった。

しかしここにきて、ブレークスルーとなる技術が生まれた。土壌機能を水中で再現する微生物培養法（並行複式無機化法）である。この方式で培養された微生物群は、人工樹脂や無生物的な鉱物などに固定化すると、これまでは不可能だった、土壌機能の付与が実現でき、有機質肥料を加えながら栽培することができる。これにより、土壌を使わない養液栽培では不可能とされてきた、有機質肥料の利用が初めて可能になった（有機質肥料活用型養液栽培）。

さらに我々は、限られた種の微生物のみで土壌機能を再現する研究を進めた結果、従属栄養細菌 1 種と硝化菌 2 種（アンモニア酸化菌、亜硝酸酸化菌）の合計 3 種のみで土壌機能を再現することに成功した（エレメンタル土壌微生物）。エレメンタル土壌微生物を核として、さまざまな微生物を組み合わせれば、人為的に選抜した微生物のみで構成された土壌微生物の生態系を構築することも可能となる。これに、物理性・化学性を人為的にデザインした人工媒体を擬似土壌担体として使用し、微生物群を固定化すれば、「デザイナー・ソイル」という、これまでにないコンセプトの人工土壌を創出することが可能となる。植物の生育を最大化し、施肥効率を劇的に向上させ、病害を抑止するなどのさまざまな機能を付加することができると期待される。

本シンポジウム講演では、その研究の最前線の成果を紹介する。

soil microorganisms, microbial ecosystem, organic hydroponics

発表責任者：篠原信（shsh@affrc.go.jp）

講演番号：3S18C6p6
講演日時、会場：3 月 26 日 16:25～ C6 会場

メチロトロフのランタノイド依存性研究の最前線
Frontline of lanthanide dependent methylotrophy

○谷 明生 (岡山大植物研)
○Akio Tani (IPSR Okayama Univ.)

メタン・メタノールといった C1 化合物を利用する好気的な（広義の）メチロトロフ細菌のうち、グラム陰性細菌は、ピロロキノリンキノン依存メタノール脱水素酵素(MDH)を持っている。本酵素は活性中心にカルシウムイオンを持つペリプラズム酵素であり、MxaF と名付けられている。多くのメチロトロフ細菌ゲノムには MxaF と 50%程度の相同性を持つ XoxF 遺伝子が見つかっていた。その遺伝子欠失株がメタノール生育能を失うことから生育には重要であることが示唆されていたが、実験室環境では発現量が低く、生化学的な機能が分かっていなかった。

植物葉圏の主要な共生細菌で、植物が放出するメタノールを利用して優占化する、*Methylobacterium* 属細菌において、ランタノイドの存在により生育が促進され、メタノール酸化活性が高くなること、精製された MDH が XoxF であり、ランタノイドが含まれることが分かった。次いで、*Verrucomicrobia* に属する好酸性メタノトロフである *Methylacidiphilum fumariolicum* において、その生育がランタノイドに依存すること、精製された XoxF の活性中心にランタノイドが含まれることが示され、この地球上にはランタノイドに依存する生命が存在することが分かった。

生物学上初めてとなるランタノイド依存酵素の発見は、メチロトロフ研究に大きな波紋を広げている。ランタノイドはレアアースに含まれることから、天然にはあまり存在しないと考えられがちであるが、環境中には普遍的に存在している。ランタノイドを必須とする微生物が存在すること、またランタノイドの存在下で異なる挙動を示す微生物が存在することから、微生物の生態を明らかにする上で私たちは重要な因子を見落としていたことを意味している。

本発表では XoxF のランタノイド依存性の発見から広がった関連研究の総括と、私たちの最新の関連研究成果の一端、①ランタノイド存在下で生育が可能、または促進される新属メチロトロフ *Novimethylophilus kurashikiensis* と *Oharaeibacter diazotorphicus* について②*Methylobacterium* 属細菌のランタノイドを結合するタンパク質について③ランタノイドに依存的に MDH をスイッチする MxbD センサーキナーゼについて④ランタノイド存在下でのホルムアルデヒド以降の代謝経路について、紹介する。

methylotroph, lanthanide, methanol dehydrogenase

発表責任者：谷 明生（atani@okayama-u.ac.jp）

講演番号：4S19A4a1
講演日時、会場：3 月 27 日 09:05～ A4 会場

微生物間相互作用を利用した難培養微生物の分離の試みとバイオリソース整備

Isolation of yet-uncultured microorganisms from the human gut and development of microbial resources

○坂本 光央[1,2] ([1]理研 BRC-JCM、[2]日本医療研究開発機構, PRIME)
○Mitsuo Sakamoto[1,2] ([1]RIKEN BRC-JCM, [2]PRIME, AMED)

次世代シーケンサーを活用した微生物叢の網羅的な解析により、培養を介さずともヒトの常在微生物叢、特にヒト腸内細菌叢の把握およびその機能を容易に理解できるようになった。培養の煩わしさがないためか、多くの研究者がマイクロバイオームの研究分野に参入しており、ヒト微生物叢の研究は今花盛りである。ヒト腸内の微生物のその多くがこれまでに未培養あるいは未同定の微生物（難培養微生物）であるということは、今日では周知の事実である。ヒト微生物叢の研究をこれまで以上に発展させるためには、難培養性の微生物を種毎に分離培養し、微生物の本質を理解することが重要である。2012 年以降、“カルチャロミクス”（culturomics）という手法の導入で微生物の分離・培養の分野は活気を取り戻している。“カルチャロミクス”とは複数の培養条件を用いて解析する培養手法で、フランスの研究グループはこの方法を用いて数多くの新種候補を分離している。単離された微生物は、その分類学的研究が行われるとともに、その微生物に学名が与えられ、研究者間でその標的とする微生物に制限なくアクセスできる環境（カルチャーコレクション）に寄託される必要があると考えられるが、前述のフランスの研究グループによって発表された論文の多くがその基準を満たしていない。

我々も、ヒト腸内から新規微生物を単離し、その分類学的研究を行うとともに、微生物資源の確保およびその利用の観点からバイオリソースの整備を行っている。これまでに健常成人 11 名の糞便サンプルから種々の血液寒天培地などを用いて 3,600 株を超える菌株を分離した。また、共生関係にある微生物を分離できると期待されるメンブランフィルター法の適用を試みた。さらに、近年当室（JCM）に寄託される菌株の中には、その菌株だけでは生育が困難で、発育を助ける菌株（helper strain）との共生培養を必要とするユニークな菌株が存在することから、主な常在微生物である *Bacteroides thetaiotaomicron*、*Cutibacterium acnes* subsp. *acnes* あるいは *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* との共生培養法によっても菌株の分離を試みた。分離株は 160 種程度に分類され、分離株の中には、近年、宿主と健康との関連性が注目されている *Akkermansia muciniphila* のようなユニークな既知種とともに 30 種程度の新種候補も見つかっており、既に 5 種を正式に新種として発表している。該当菌株は当室に寄託し、既に提供を開始している。本講演では、新規微生物の分離とともに、その受け皿となっているカルチャーコレクションの重要性についても議論したい。

データの一部は、公益財団法人発酵研究所（IFO）の一般研究助成ならびに国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）の革新的先端研究開発支援事業（PRIME）の支援によるものである。

uncultured microbes, symbionts, bioresource

発表責任者：坂本光央（sakamoto@riken.jp）

講演番号：4S19A4a2
講演日時、会場：3 月 27 日 09:33～ A4 会場

食品素材としての機能性腸内代謝物の開発　～エクオール、ウロリチン～

Development of functional metabolites with gut microbiota for human health

○中島 賢則、山本 浩明 (ダイセル・コーポレート研)
○Takanori Nakajima, Hiroaki Yamamoto (Daicel Corporation)

ヒトの腸内には 1,000 種類以上の微生物が存在すると言われている。それらは様々な役割をもってヒトとの共存関係を築いていると予想されるが、我々はそのマイクロバイオームの一部の微生物によってもたらされる機能性代謝物に着目し、食品素材への開発を進めている。

エクオール（EQL）は、大豆イソフラボンの一つであるダイゼインから腸内細菌によって生成される代謝物であり、大豆イソフラボンによる健康効果発揮の活性本体と考えられている。また、EQL を腸内でつくることのできる EQL 生産者は日本人の 30～50%であると言われており、マイクロバイオームの違いがヒトに対する食品機能の差に影響していることが示唆される。我々は 2013 年にヒト由来腸内細菌を利用して EQL を工業的に生産することに成功し、食品素材として市場に供給している。

更に我々はもう一つの重要なヒト腸内代謝物であるウロリチン A（UroA; 3,8-dihydroxy-6H-dibenzo[b,d]pyran-6-one）に注目した。UroA は抗老化作用など多くの健康機能をもつスーパーフルーツとして知られるザクロに含まれるエラジタンニンやエラグ酸からヒト腸内細菌によって生産される代謝物である。これまでに、エラジタンニンの一種ゲラニインを経口投与したラットで、尿中において 7 種類のウロリチン類が検出されている。また健常人 30 名を対象としたウロリチン生産者確認試験を実施した結果、約 50%がウロリチン生産者であり、UroA が主要な代謝物であることがわかった。UroA は高い抗酸化活性、抗炎症作用を有することが報告されているが、我々は UroA が肌に対する抗老化効果などを有し、ヒトの健康に有益な機能性を発揮する可能性を示してきた。更に、機能不全のミトコンドリアに作用するマイトファジー誘導効果があることが報告されており、新規な機能性食品素材として注目されている。近年、エラグ酸を基質として、UroA の前駆体である UroC を生産する腸内細菌 *Gordonibacter urolithinfaciens* がヒト糞便から分離された。しかし、UroA 生産能を有する単一の微生物はこれまでに分離されていなかった。我々はウロリチン生産者糞便から UroA 生産菌をスクリーニングした結果、UroC から UroA を生産する *Clostridium* 属細菌を初めて分離することに成功した。更にこの *Clostridium* 属細菌と *Gordonibacter* 属細菌の混合培養システムにより、エラグ酸から UroA を 1 ポットで生産することに成功した。

これらの機能性腸内代謝物の生産に関与する腸内細菌はいずれも非常にマイナーな微生物である。本発表では、ヒト腸内においてこれらのマイナーな腸内細菌の活躍によって生産されている機能性代謝物による食品素材開発に関して、上記の２化合物の事例を紹介する。

functional metabolites, Urolithin A, Equol

発表責任者：中島賢則（tk_nakajima@jp.daicel.com）

講演番号：4S19A4a3
講演日時、会場：3 月 27 日 10:01～ A4 会場

健常人マイクロバイオームデータベース構築に向けた解析方法の統一化

Protocol standardization to develop a database on heathy human microbiome

○亀山 恵司、恒吉 桃香、藤井 孝吉、梶浦 貴之 (味の素株式会社)
○Keishi Kameyama, Momoka Tsuneyoshi, Takayoshi Fujii, Takayuki Kajiura (Ajinomoto Co., Inc.)

腸内環境は健康と密接な関りがあることから、人のマイクロバイオームと健康との関係についてのデータ収集・蓄積が世界的に加速化しているが、企業の研究開発や産業応用において自由に利活用できるデータベースとして整備されていない。日本マイクロバイオームコンソーシアム（JMBC）では、日本人の健常人マイクロバイオームデータベースを構築し、参画企業で共同利用するための仕組み作りを進めている。大規模で且つ高品質なマイクロバイオームデータベースを構築するためには、同意取得、検体の採取、輸送・保存、DNA 抽出、シークエンス等のプロトコールを可能な限り統一してデータを取得する必要がある。特に、DNA 抽出法は、マイクロバイオーム解析における最大の留意点と考えられているため [1, 2]、International Human Microbiome Standards（IHMS）では、DNA 抽出バイアスについての詳細な検討を行い、糞便からの DNA 抽出法のベンチマークとして、ビーズ法の Protocol Q を提案している [1]。一方、日本人は欧米人と異なる固有の腸内細菌叢を持つことが知られていることから [3]、日本人の糞便マイクロバイオーム解析に適した DNA 抽出法を選択しなければならないが、糞便検体からの DNA 抽出効率を定量的に評価するためには、標準物質（糞便を模倣した標準菌体試料および標準核酸試料）を使用する必要がある。そこで、欧米での先行事例を参考に、国内においても、平成 30 年度 NEDO 先導研究プログラムに採択された「マイクロバイオームの産業利用に向けた解析技術及び革新的制御技術の開発」の中で、JMBC、産業技術総合研究所、製品評価技術基盤機構、理化学研究所が共同で、日本人の糞便を模倣した標準物質の開発とそれを用いたマイクロバイオーム解析プロセスの検討を行い、日本人の大規模コホート研究に向けたプロトコールの整備を進めている。本演題では、自社内での糞便 DNA 抽出プロトコールの検討結果を交え JMBC の活動の一端を紹介したい。

1) Costea PI. et al.: Nat Biotechnol., 35(11): 1069-1076, 2017
2) Shinha R. et al.: Nat Biotechnol., 35(11): 1077-1086, 2017
3) Nishijima S. et al.: DNA Res., 23(2): 125-133, 2016

Protocol standardization, human microbiome, database

発表責任者：亀山恵司（keishi_kameyama@ajinomoto.com）

講演番号：4S19A4a4
講演日時、会場：3 月 27 日 10:29～ A4 会場

計測レファレンスの必要性と Mock Community の提供に向けた取り組み

Development of bacterial Mock Community as a reference material for microbiome research

○三浦 隆匡、山副 敦司、川﨑 浩子（（独）製品評価技術基盤機構）
○Takamasa Miura, Atsushi Yamazoe, Hiroko Kawasaki (NITE/NBRC)

近年、腸内細菌や土壌細菌などの微生物集団（マイクロバイオーム）と宿主や環境の間には深い関わりがあることが明らかになってきており、このマイクロバイオームを理解するために様々なオミックス解析が精力的に行われている。この中でも、新型シーケンサーを用いてサンプルから抽出した DNA から、16S rRNA 遺伝子を PCR 増幅した後にシーケンスするメタ 16S 解析が一般的に実施されている。本解析は、サンプル採取にはじまり、保存・輸送、DNA 抽出、ライブラリー調製、シーケンス、データ解析までとその工程は多岐に渡る。各工程における方法は解析実施機関によって様々であり、その違いや作業者間の手練の差などから生ずるバイアスが解析結果に大きく影響を与えてしまうことが報告されている [1)2)]。このため、統一されていない手法により取得された解析データには結果にばらつきがみられ、誤った結論に至ってしまうおそれや他者の結果と正確に比較できない可能性がある。

複雑なマイクロバイオームを理解して応用するためには、手法の標準化や標準サンプルを使用した精度管理などが課題となると考えられる。解析工程のうち、DNA 抽出方法の影響が最も大きいと言われており、欧米では DNA 抽出方法の標準化が検討されている。米国では、2018 年 4 月にマイクロバイオーム研究のための省庁間戦略計画 [3)]が作成され、基盤技術として標準プロトコールや参照物質の開発が推奨されている。そこで、NITE/NBRC では、本課題を解決する手段として手法検証用の計測用レファレンス（Mock Community）の開発を行っている。

Mock Community とは、マイクロバイオームを模擬するために複数の微生物株由来の細胞やそのゲノム DNA を既知量ずつ混合したサンプルである。現在、開発を進めている Mock Community は、NBRC が保有する株のうちマイクロバイオームに関わりが深い複数の株について細胞数を測定して均等に混合した Cell Mock と、あらかじめ各株から抽出したゲノム DNA を混合した DNA Mock の 2 種類がある。また、マイクロバイオーム解析で生じるバイアスは、グラム染色の違い（DNA 抽出のしやすさ）や GC 含量やゲノムサイズなどに起因することを考慮し、それぞれが平均的になるように株を選抜し混合している。本発表では、開発中の Mock Community を計測レファレンスとして用いた使用事例や提供に関する取り組みについて紹介する。

1) Costea, PI. et al., 2017, Nature biotechnology, 35(11):1069.
2) Sinha, R. et al., 2017, Nature biotechnology, 35(11):1077.
3) Interagency Strategic Plan for Microbiome Research, FY 2018-2022. United States.

mock community, microbiome, metagenome

発表責任者：三浦隆匡（miura-takamasa@nite.go.jp）

講演番号：4S19A4a5
講演日時、会場：3 月 27 日 10:57～ A4 会場

マイクロバイオーム解析の精度管理のための人工核酸標準物質

Synthetic spike-in standards for comprehensive quality control of microbiome measurements

○関口 勇地（産総研）
○Yuji Sekiguchi (AIST)

マイクロバイオームは地球上のいたるところで観察されており、地球環境の保全からヒトの健康に至るさまざまな側面で重要な役割を担っている。とりわけ、ヒト腸内マイクロバイオームなどヒトと直接触接するマイクロバイオームはさまざまな疾患等の診断用マーカーや創薬ターゲットとして注目されている。それらマイクロバイオームの解析においては、試料中にどのような種類の微生物種がどの程度（の量）存在するかを知る（計測する）ことが出発点となる。現在、創薬等様々な分野において、マイクロバイオームの構成を明らかにするため、次世代シークエンサーを利用した解析が広く行われている。その一方で、次世代シークエンサーによる解析結果の信頼性、異なる研究・検査機関間のデータの比較互換性の乏しさが懸念されている。今後蓄積が期待されるマイクロバイオーム関連データの精度保証のためにも、解析の精度管理技術の確立は今後重要な課題となると考えられる。筆者らは、細菌等の系統分類で広く利用されているマーカー遺伝子である 16S リボソーム RNA（rRNA）遺伝子を標的とした解析フローを想定した内部標準、およびそれらを利用した精度管理技術を開発した 1)。本人工配列を持つ核酸による構成される標準物質は、マイクロバイオーム解析試料から抽出した核酸に添加する、あるいは解析試料に直接添加することも可能であり、その後の DNA 抽出、PCR、シークエンシング、次世代シークエンサーから出力されるリードデータのフィルタリング、OTU クラスタリング、OTU の系統分類までのプロセスの精度管理が可能となる。また、試料に添加する人工 16S rRNA 遺伝子の物質量を元に、単位試料（単位容積や単位重量）当たりの各微生物分類群の絶対定量が可能になることも実証した。また、本標準は、16S rRNA 遺伝子アンプリコン解析の定量性などの精度管理に使えるだけでなく、解析時のマイクロバイオーム試料のトレーサビリティの確保にも利用可能である 2)。今後、開発した人工核酸標準物質を利用した精度管理技術を、医療、食品、環境分野等、実際のマイクロバイオーム解析に広く適用し、その信頼性の確保に向けた取り組みを実施する予定である。本コンセプトを他のマーカー遺伝子に拡張し、ゲノム解析、メタゲノム解析の精度管理技術への応用に展開していく予定である。今後これらの標準基盤を活用し、産業界も含めたマイクロバイオーム解析の精度管理方法の確立や、比較互換性の担保のための解析プロトコルの標準化の推進が国内においても重要な課題となると考えている。これらの論点についても議論したい。

2) Tourlousse et al., Nucleic Acids Res., 45(4), e23 (2017)
3) Tourlousse et al., Sci. Rep., 8(1), 9095 (2018)

microbiome, metagenomics, standards

発表責任者：関口勇地（y.sekiguchi@aist.go.jp）

講演番号：4S19A4a6
講演日時、会場：3 月 27 日 11:25～ A4 会場

マイクロバイオーム産業の経済効果
Economic effects of microbiome industry

○笠原 堅（日本マイクロバイオームコンソーシアム）
○Ken Kasahara (JMBC)

ある環境中に存在する微生物群は、微生物の叢(くさむら)と書いて微生物叢(びせいぶつそう)もしくはマイクロバイオータ(microbiota)などと呼ばれており、そのゲノム情報の総体はマイクロバイーム(microbiome)と呼ばれています。ヒトの腸内、口内、皮膚など様々な部位に微生物叢は形成されており、そこには 1000 種類, 数にして 100 兆個以上の微生物が存在しています。

ヨーグルトや乳酸菌飲料など腸内環境を整えることを特徴とする食品は、既に大きな市場を形成しており、国内の特定保健用食品市場 6586 億円(2017 年)の 53.1%が整腸作用のある食品です（日本健康・栄養食品協会）。近年は、C.difficile 感染症(CDI)への糞便移植が大きな効果を発揮したことなどがきっかけとなり、ヒトマイクロバイオームへの関心が年々高まっています。微生物叢とヒトの健康との関係が次々と明らかとなってきており、例えば肥満、糖尿病、自己免疫疾患、急性下痢、癌、精神障害などとの関係が示唆されています。

肥満治療市場規模は、2021 年までに$78 億に達すると予想されています(Global Information 2016)。糖尿病治療費は、2016 年で既に世界で 90 兆円と見積もられています。アトピー性皮膚炎やアレルギー性鼻炎、喘息では、治療費の他に症状悪化に伴う生産性損失なども加えると 10 兆円以上になると見積もられています。それらの全てがマイクロバイオームで解決できるわけではないですが、そのような社会的損失の根本原因の一端をマイクロバイオームを通じて解決できる可能性はあります。

一般社団法人日本マイクロバイオームコンソーシアム(JMBC)は、ヒトの健康と密接に関わる微生物叢をターゲットとする産業を日本国内に根付かせ、そして世界で戦える産業に発展させるために、参画企業が協調して基盤技術を整備することを目的とする団体です。ここでは、JMBC が描いているマイクロバイオーム産業の将来像とそれを実現するための JMBC の活動をご紹介したいと思います。

microbiome, metagenome, consortium

講演番号：4S20C6a1
講演日時、会場：3 月 27 日 09:00～ C6 会場

趣旨説明及びクチナーゼ研究背景
Aim of the symposium and background of the research on cutinase

○河合 富佐子（岡山大学）
○Fusako KAWAI (Okayama Univ.)

生命の基本はタンパク質である。生命現象の理解はタンパク質機能の理解であるといっても過言ではないが、機能性タンパク質の主役は酵素である。近年タンパク質分析手法の発展によって、1 Å レベルの高分解能での解析が容易になってきた。これまでタンパク質の結晶構造を主体とした静的な構造解析を下に機能の解析がおこなわれてきたが、X 線結晶構造解析の重要さに変わりはないものの、静的な構造解析のみでタンパク質機能を理解するのは限界がある。動的機能の解析には NMR, タンパク質溶液散乱法（SAXS）のような実験手法と分子動力学シミュレーション(MDS)や Three-dimensional Reference Interaction Site Model(3D-RISM)のような bioinformatics を駆使して動的な反応機構を理解することが不可欠である。

我々の研究グループはいくつかの大学の共同研究者から編成され、ポリエステル中最も難分解性である PET 分解酵素であるクチナーゼを研究対象として、様々な角度からの取り組みを行ってきた。このシンポジウムではクチナーゼ研究の中でいわば基本となる静的構造として X 線構造解析による反応機構の推定と MDS によるいわば動的な反応機構をご紹介することで、両者の比較およびこれらが補完しあうことでより詳細な反応機構の理解に至る途を理解して頂けると思われる。また、それに続いて様々な酵素研究の第一人者の先生方に本シンポジウムの主題に沿った観点からの研究を紹介して頂く。これらすべての発表を通して現時点における酵素の立体構造と機能の相関について研究の最先端に触れて頂けるものと考える。

シンポジウムの前半をしめるクチナーゼは carboxylesterase の一種であり、構造的にはα/β hydrolase に属する。名称の由来は植物クチクラ層の成分であるクチンを分解する酵素として植物病原菌から発見されたことによる。現在ではクチナーゼの特色としてポリエステル分解能が記載されているように脂肪族から芳香族までさまざまなポリエステル分解に関わっている。PET はボトル、繊維、パッケージなどに使用され、マイクロプラスチックの要因となっている。Biopolyesters の主体はいずれも脂肪族ポリエステル類であるにも関らず、芳香族ポリエステル PET は自然界では非分解性である。PET のリサイクルには PET 分解酵素は不可欠であり、低結晶性 PET の分解酵素が報告されているものの、高結晶性 PET の分解には至っていない。クチナーゼの反応機構の解明はより高度な分解酵素の開発に不可欠である。また、本酵素は固体－液体界面の反応を触媒するので、関連酵素研究に新たな切り口を提供すると考えられる。

Functional analysis of protein structures, Analysis of static and dynamic functions of proteins, Cutinase

発表責任者：河合富佐子（fkawai@kit.ac.jp, fkawai@okayama-u.ac.jp）

講演番号：4S20C6a2
講演日時、会場：3 月 27 日 09:25～ C6 会場

クチナーゼの基質結合型結晶構造からわかった酵素反応前後の構造変化

Crystal structures of substrate bound forms of the cutinase reveal structural change during the enzymatic reaction

○沼本 修孝（医科歯科大難研）
○Nobutaka NUMOTO (Med. Res. Inst., Tokyo Med. Dent. Univ.)

土壌放線菌の一種である *Saccharomonospora viridis* AHK190 から単離されたクチナーゼ（Cut190）は、ペットボトルなどで広く使用されている難分解性プラスチックの polyethylene terephthalate（PET）を加水分解することが示され [1]、また Ca^{2+}存在下で熱安定性も高いことから産業応用面からも注目されている酵素である。本研究では、熱安定性および活性が向上した S226P/R228S 変異体（Cut190*）について、低分子基質との複合体での X 線結晶構造解析により、Cut190*の酵素反応の分子機構を解明することを目的とした。

低分子基質との複合体結晶を作製するに当たり、結晶中での酵素反応が行われないよう、活性残基である S176 を Ala に置換した変異体、Cut190*S176A を用いて結晶化を行った。本変異体では Ca^{2+}結合部位が 3 カ所確認され、1 カ所は先行研究 [2]からアロステリック因子として酵素活性に関わることが知られていた結合部位と同一であったが、他の 2 カ所は新規な結合部位であり、おもに本酵素の高い熱安定性に寄与していることがわかった [3]。

低分子基質として、コハク酸モノメチルおよびアジピン酸モノメチルを用い、soaking 法にて複合体結晶構造解析に成功した [4]。得られた構造から、コハク酸モノメチル結合型は酵素反応の開始前に相当する Pre-reaction state と考えられた。驚いたことに、アロステリック因子として働いている Ca^{2+}が解離しており、それに伴い基質結合部位周辺にも構造変化が生じていたため、われわれはこれを新たに Engaged form と名付けた。一方アジピン酸モノメチル結合型は、基質のエステル部位が切断された反応直後に相当する構造であることが示唆され、Post-reaction state と解釈した。またこの構造では、アロステリック因子の Ca^{2+}が解離しておらず、基質結合前と基本的に同一の構造であった。

以上を統合して、基質の結合と同時に一時的にアロステリック因子の Ca^{2+}が解離して Engaged form に移行し、その状態で酵素反応が進行し、基質の切断が終了した後に再び Ca^{2+}が結合して構造変化を起こし、生成物の脱離と新たな基質結合が促されるという反応機構を提唱している。

[1] Kawai *et al., Appl. Microbiol. Biotechnol.,* **95**, 419-430, 2014.
[2] Miyakawa *et al., Appl. Microbiol. Biotechnol.,* **99**, 4297-4307, 2015.
[3]Oda *et al., Appl Microbiol Biotechnol,* in press.
[4] Numoto *et al., Biochemistry,* **57**, 5289-5300, 2018.

PET degrading, reaction mechanism, conformational change

発表責任者：沼本修孝（numoto.str@mri.tmd.ac.jp）

講演番号：4S20C6a3
講演日時、会場：3 月 27 日 09:40～ C6 会場

クチナーゼの分子動力学計算による反応機構解析

Reaction mechanism of cutinase analyzed by molecular dynamics simulations

○神谷 成敏 (兵庫県大)
○Narutoshi Kamiya (Univ. of Hyogo)

クチナーゼ(Cut190)は polyethylene terephthalate (PET)を加水分解する酵素で、その安定性や活性はカルシウムイオン濃度に依存する。その反応機構を理解するために、イオンや基質の有無の条件下で様々な結晶構造が解かれている。これらの構造を基に、イオンの存在確率を求めるために 3D Reference Interaction Site Model (3D-RISM)計算や、動的な挙動を解析するために分子動力学(Molecular Dynamics, MD)シミュレーションを行った。

カルシウムイオンの構造安定性への寄与を調べるために、クチナーゼの変異体 S226P/R228S/S176A 変異体 (Cut190*S176A)のカルシウム結合/非結合構造を初期構造として、複数のカルシウムイオン濃度下で、MD シミュレーションを実行した[Inaba et al. J. Therm. Anal. Calorim. in press]。主鎖の構造揺らぎを解析したところ、Cut190*S176A のカルシウム非結合構造では揺らぎが濃度によらず一定であるのに対し、カルシウム結合構造では揺らぎがカルシウム濃度の増加に伴い減少し、その後増加した。これらの結果は、カルシウムイオンが溶液中に適度に存在するとカルシウム結合部位を安定化することを示し、実験結果を定性的に再現した。

クチナーゼの基質認識機構を解析するために、Cut190*S176A の複数の構造を解析した[Numoto et al. Biochemistry 57, 5289 (2018)]。3D-RISM 法による結合部位の解析から質量分析の結果に対応する 3 個のカルシウム結合部位を同定した。反応前としてアサインした succinate 基質結合構造や反応後とアサインした adipate 基質結合構造は、それぞれ、カルシウムが非結合/結合で結合部位が engaged/open 型であることが結晶解析から明らかにされた。反応機構のモデル構築のため結晶解析では得られていない、succinate,カルシウム結合,open 型モデルと adipate,カルシウム非結合,engaged 型モデルの virtual モデルを構築した。全ての基質複合体構造の安定性を評価するために、MD シミュレーションを行い、基質の解離時間を解析した。virtual モデルの adipate,カルシウム非結合,engaged 型が最安定でシミュレーション時間内では解離せず、結晶構造の succinate/adipate は準安定、virtual モデルの succinate,カルシウム結合,open 型モデルが不安定と評価された。以上から、基質が結合するためにはカルシウムイオンが結合して結合部位を開く、反応するためには一度カルシウムが解離して基質と強く結合し、反応後は基質を放出するために再びカルシウムが結合して活性部位を開くサイクリックな反応モデルが提案できる。

cutinase, molecular dynamics simulation, substrate dissociation

発表責任者：神谷　成敏（n.kamiya@sim.u-hyogo.ac.jp）

講演番号：4S20C6a4
講演日時、会場：3 月 27 日 10:00～ C6 会場

新規 Gly-Pro 分解性システインペプチダーゼの構造と反応特性
Structure and function of a novel Gly-Pro hydrolyzing cysteine peptidase

○渡部 邦彦（京都府大院生環）
○Kunihiko Watanabe (Kyoto Pref. Univ.)

乳酸菌 *Lactobacillus farciminis* JCM1097 株が産生するシステインペプチダーゼ *Lf-dip* (C69 ファミリー) は、コラーゲン中に存在する繰り返し配列 Gly-Pro-X 由来の難分解性ジペプチド Gly-Pro を強力に分解することを見出した*。Gly-Pro 分解酵素では、これまで金属酵素であるプロリダーゼ (M24 ファミリー)の報告はあるが、システインペプチダーゼとしては初である。*Lf-dip* を含む C69 ファミリーは、機能や構造に関する報告がほとんどない一方で、部分的なアミノ酸配列相同性から N-terminal nucleophile (Ntn) ヒドロラーゼの特徴を持つ。特に Ntn ヒドロラーゼが、自己触媒的な成熟化後、N 末端に Cys、Ser、Thr 等の求核残基を持つのと同じく、*Lf-dip* も活性型は N 末端配列に Cys9 を有する。また基質特異性調査により、*Lf-dip* は幅広いジペプチド基質選択性がありながら、Xaa-Pro の中では Gly-Pro 以外ほとんど分解しないことが判っている。本発表では、まず組換え体の野生型酵素 (r*Lf-dip*) に加え、成熟化しない変異体酵素の結晶構造も決定することで、構造的観点から成熟化の反応機構を推定し、次に r*Lf-dip* と基質アナログ Ala-Pro あるいは基質 Met-Ala の複合体結晶の構造を解説し、r*Lf-dip* の奇妙な基質特異性の原因についての解析を紹介する。

r*Lf-dip* は 1,6-hexanediol を沈殿剤として結晶化し、SPring-8 において SAD 法を用いて結晶構造を分解能 1.78 Å で決定した。その結果 r*Lf-dip* の構造は、Ntn ヒドロラーゼに典型的なαββαモチーフに加え、C 末端側に特有のドメインを有していた。成熟化しない変異体は、活性残基 C9 および成熟化に必要と予想された残基 D31 の変異 (C→A, D→P) によって得た (C9A-r*Lf-dip*、D31P-r*Lf-dip*)。分子置換により C9A、D31P 変異体の結晶構造も決定した。これらの構造から、活性残基 C9 が成熟化の求核攻撃に最適な残基であり、加えてプロトンの引き抜きが不要であることが判り、r*Lf-dip* の成熟化機構は、溶媒により脱プロトン化された活性残基 C9 側鎖チオラート基が、直前の S8 カルボニル炭素に求核攻撃するメカニズムであることが推定された。

r*Lf-dip* 結晶を、分解される Met-Ala または分解されない Ala-Pro に浸漬することで構造決定を行い、それぞれの酵素-基質複合体の構造をモデル化した。Ala-Pro と異なり、Gly-Pro には Gly の側鎖がないため N 末端 Gly について可動な立体配座をとることから、r*Lf-dip* は Gly-Pro を分解できるが、Ala-Pro を含むその他の Xaa-Pro でも認識できないため特徴的な基質特異性を有することが示唆された。

なお本研究は、京都大学三上文三先生と共同で行った。

* *J. Biochem.* 154: 419-427 (2013)

cysteine peptidase, Ntn hydrolase, Gly-Pro

発表責任者：渡部　邦彦（kwatanab@kpu.ac.jp）

講演番号：4S20C6a5
講演日時、会場：3 月 27 日 10:25～ C6 会場

Second harmonic generation を用いたインターロイキン 2 誘導型 T 細胞キナーゼの選択的阻害薬の創出

Identification of inactive conformation-selective interleukin-2-inducible T-cell kinase inhibitors based on second harmonic generation

○判谷 吉嗣[1]、飯尾 清誠[1]、判谷 理恵[1]、梅谷 佳代[1]、佐藤 俊宏[1]、Tracy Young[2]、Katelyn Connell[2]、Sam Kintz[2]、Joshua Salafsky[2] ([1]日本たばこ産業株式会社、[2]Biodesy, Inc.)
○Yoshiji Hantani[1], Kiyosei Iio[1], Rie Hantani[1], Kayo Umetani[1], Toshihiro Sato[1], Young Tracy[2], Connell Katelyn[2], Kintz Sam[2], Salafsky Joshua[2] ([1]Japan Tobacco Inc., [2]Biodesy, Inc.)

プロテインキナーゼは蛋白質をリン酸化する酵素であり，ヒトゲノム中に約 500 種類存在する。シグナル伝達や代謝の調節に深く関与していることから，その機能異常が疾患につながることも多く，このため，創薬の主要なターゲットの一つとなっている。多くのプロテインキナーゼの触媒ドメインの構造は高く保存されており，特に活性型コンフォメーションの ATP 結合部位の構造トポロジーは非常に高い。このことが，ATP 結合部位を標的とした阻害薬開発における選択性の取得を困難なものにしている。プロテインキナーゼの多くは，活性型と非活性型のコンフォメーションの平衡状態にあり，一般的に非活性型のコンフォメーションに結合する阻害薬は高い選択性を有する。プロテインキナーゼ阻害薬の探索には，通常，キナーゼの活性を指標としたハイスループットスクリーニング（HTS）が用いられるが，これにより得られた阻害薬は活性型と非活性型のどちらに結合するか不明である。標的以外のキナーゼへの作用は，しばしば副作用の要因となることから，選択性の高い阻害薬を得るため，非活性型に結合する阻害薬を選抜する方法が非常に重要となる。

Second harmonic generation (SHG) は蛋白質のコンフォメーション変化を検出する技術であり，今回 TEC ファミリーのチロシンキナーゼであるインターロイキン 2 誘導型 T 細胞キナーゼ（ITK）に対する SHG 評価系を構築した。SHG は，レーザー照射により励起された蛍光団から第二高調波が発生する現象で，SHG シグナル強度は蛍光分子の固定化面に対する角度変化により変動する。具体的には，蛋白質を SHG 用蛍光試薬で標識し，阻害薬の存在下，非存在下で SHG シグナル変化を測定し，標識部位に生じた構造変化を検出する。

我々は ITK のシステイン変異体を作製し，このシステインを SHG 用蛍光試薬でラベル化した後，ITK をプレート上に固定化した。ITK の非活性型あるいは活性型に結合する 14 のツール化合物を用いて評価系構築を行った。その結果，非活性型に結合する化合物の識別に成功した。さらに，この評価系を用いて HTS ヒット 105 化合物から，ITK の非活性型に結合する 22 化合物を選抜した。その中の 2 化合物についてキナーゼパネル評価を行ったところ，これらの化合物は高い選択性を示した。SHG はキナーゼの非活性型に結合する化合物を見出す有用な手法と考えられた。

high throughput screening, second harmonic generation, interleukin-2-inducible T-cell kinase

発表責任者：判谷吉嗣（yoshiji.hantani@jt.com）

講演番号：4S20C6a6
講演日時、会場：3 月 27 日 10:50～ C6 会場

動的構造によるキラル化合物合成酵素の活性制御

Catalytic-property regulation of enzymes for producing chiral compounds by dynamic structures

○田之倉 優[1]、宮川 拓也[1]、片岡 道彦[2] ([1]東大院・農生科、[2]阪府大院・生命環境)
○Masaru Tanokura[1], Takuya Miyakawa[1], Michihiko Kataoka[2] ([1]Grad. Sch. Agr. Life Sci., Univ. Tokyo, [2]Grad. Sch. Life Env. Sci., Osaka Pref. Univ.)

不斉中心を有するキラル化合物は、医薬、農薬、他の産業上有用な化合物の合成に欠かすことができない構成要素として幅広く利用されており、近年合成されている医薬品の約半数が分子内に不斉炭素原子をもつと推計されている。サリドマイドに代表されるように、キラル化合物はその立体異性体の種類によって生理活性が大きく異なることから、特定の立体異性をもつキラル化合物のみを効率的に不斉合成するための方法の開発が求められている。一方、酵素等の生体触媒は反応特異性と低環境負荷の観点で化学触媒よりも優れた利点をしばしば有しており、バイオテクノロジー戦略大綱の中で、2025 年までに環境負荷の高い化学プロセスの 20%をバイオプロセスに置き換える方針が示されている。例えば、ラクトナーゼを用いた D-パントイルラクトンの生産プロセスでは、従来の化学プロセスによる光学分割と比較して、CO_2 発生量が 30%低減されている。また、経口血糖降下薬の sitagliptin の不斉合成では、従来の化学プロセスを *R* 体選択的アミントランスアミナーゼ（*R*-ATA）による酵素反応プロセスに置き換えることで、一日当りの生産量が 53%増加し、19%の製造コストの削減につながっている。

キラル化合物を不斉合成する酵素の産業応用のために、演者らは酵素の立体選択的な反応機構の解明とそれに基づいた酵素の高機能化研究に取り組んできた。酵素は立体選択的な反応を可能にするために特定の配向で基質を触媒部位に固定する必要がある。この基質認識においては従来、酵素が基質の形状に適した鍵穴構造をもつと考えられてきたが、キラル化合物合成酵素の構造学的解析により、複数の酵素が鍵穴構造の形成に動的なループ領域を利用しており、それが触媒部位への基質の配置の制御に寄与していることが明らかになってきた。(4*R*,6*R*)-アクチノールの不斉合成で利用される旧黄色酵素の例では、触媒部位の外側に突き出ていたループ領域が、基質の結合に伴って構造変化を引き起こし、触媒部位に基質を留める役割を果たしていた。このループ領域の構造変化は基質の形状に応じて起こることから、反応効率と基質特異性の両面で重要であると考えられる。一方、*R*-ATA の解析例では、触媒部位の近傍に位置するループ領域が触媒部位に結合可能な基質の大きさを制限していることが示され、この領域のコンホメーションを大きく変化させることが可能な一残基置換により基質特異性が拡大できることが明らかになった。こうしたキラル化合物合成酵素の構造学的知見から、触媒部位の周囲に位置するループ領域を標的とした動的構造の制御が、酵素の基質特異性の改変において有用であると期待される。

asymmetric synthesis, protein engineering, X-ray crystallography

発表責任者：田之倉 優（amtanok@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4S20C6a7
講演日時、会場：3 月 27 日 11:15～ C6 会場

結晶構造解析によるアミラーゼの反応機構の解明

Elucidation of reaction mechanism of amylases by crystal structure analysis

○三上 文三、坂 直樹、森 湖太郎、水谷 公彦、高橋 延行（京大農・応用生命）
○Bunzo Mikami, Naoki Saka, Kotarou Mori, Kimihiko Mizutani, Nobuyuki Takahashi (Kyoto Univ. of Agric.)

酵素タンパク質は、その機能を発揮するために何らかの構造変化を利用しているが、この構造変化の詳細を捉えるために X 線結晶構造解析が有効な方法となっている。このためには良質の結晶が得られていることが前提となる。しかし、溶液中とは異なり、結晶構造には様々な制限があることが多い。一般的に時分割の構造解析は困難な場合が多く、酵素の一連の構造変化を捉えるためには、基質（基質アナログ）複合体や酵素の変異体を用いた多数のスナップショットが必要となる。さらに、現在行われている凍結法にも問題がある。これらの問題を乗り越えて酵素の働きをとらえた例として主にアミラーゼの機能解析について紹介する。

１．結晶中でのパッキングが酵素の構造変化を困難にすることがある。β－アミラーゼやアルギン酸リアーゼでは結晶の空間群によっては対称な分子との相互作用によって活性部位のループの動きが固定され、基質の結合やループの構造変化を観察することはできない。また、プルラナーゼの例では、対称分子が接近しているために活性部位にシクロデキストリンをソーキングすることが困難であった。機能解析のためには、スクリーニングによって適切な空間配置を持つ結晶を得る必要がある。

２．凍結による影響が大きい場合がある。凍結法はシンクロトロンでの回折データの収集に必須であるが、タンパク質の結晶を凍結すると、結晶の格子が数%程度縮むことが多く、場合によっては基質の結合等に影響がでることがある。さらに、凍結によって pH が大きく変化する可能性がある。酵素の構造変化の pH 依存性を調べるためにはキャピラリーを用いた非凍結法が有効であるが、凍結法に比べて分解能の低下は否めない。キャピラリーを用いて構造の pH 変化を追跡した例としてβ－アミラーゼとグルコースとの複合体のサブサイト親和力の変化を調べた例とマルトース複合体のサブサイト-1 のグルコース残基の環構造の変化を明らかにして例を紹介する。

３．凍結保護剤の影響が大きい場合がある。凍結による氷の形成を防ぐために、凍結保護剤として、（ポリ）エチレングリコール、グリセロール、メチルペンタンジオール等の化合物がよく用いられている。これらの化合物はアミラーゼの基質である糖と類似性を持つことからアミラーゼと弱い相互作用を示し活性部位のマッピングに役立つこともあるが、基質との相互作用を観察するためには、注意が必要である。凍結保護剤の影響について、β－アミラーゼの変異体の例を紹介する。

以上のように結晶を用いた酵素の機能解析には様々な問題があり、結果の解釈に注意が必要であるが酵素機能の直接的な解析手段として重要である。

X-ray crystallography, amylase, structural biology

発表責任者：三上文三（mikami@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号:4S21E6a1
講演日時、会場:3 月 27 日 09:10～ E6 会場

線虫 *C. elegnas* のインスリン様ペプチドから動物界を俯瞰する

An overlook at the animal kingdom from *C. elegans* insulin-like peptides

〇河野 強（鳥取大農）
〇Tsuyoshi Kawano (Faculty of Agriculture, Tottori Univ.)

インスリン様ペプチド（インスリンと同様のジスルフィド結合様式を有するペプチドの総称であり、インスリンスーパーファミリーならびにリラキシンスーパーファミリーを含む）は幅広い動物種に存在し、様々な生命現象に関わる。ヒトでは insulin,insulin-like growth factor, relaxin, INSL 等, 10 種が知られている。これらのペプチドは、それぞれの受容体を介して種々の生理機能を発揮する。一方、無脊椎動物では、キイロショウジョウバエで 8 種、線虫で 40 種のインスリン様ペプチドの存在が知られている。他にも、軟体動物、棘皮動物等にインスリン様ペプチドが存在する。

1997 年に線虫 *Caenorhabditis elegans* の幼虫休眠・成虫寿命を制御する *daf-2* 遺伝子がインスリン受容体様タンパクをコードするとの報告があり、これを契機に、インスリン様分子の探索とその生理機能に関する研究が開始された。*C. elegans* のインスリン様シグナルは多岐に亘る生命現象に関与する。休眠・寿命制御のみならず、連合学習、生体防御、生殖にも関わる。40 種のインスリン様分子は唯一のインスリン受容体様タンパク DAF-2 を介して、そろぞれ特有の生理機能を担う。生理機能が不明なインスリン様分子も少なからず存在する。また興味深いことに、*C. elegans* のインスリン様分子にはシグナルに拮抗的に働く分子（アンタゴニスト）も存在する。

演者らは主に逆遺伝学的手法を用いて休眠・寿命制御に関わる種々の *C. elegans* インスリン様遺伝子を同定し、それらの発現パターン・機能解析等を行った。その過程でアンタゴニストして機能するインスリン様分子 INS-18, INS-17, INS-23 を同定した。アンタゴニストとして機能するインスリン様分子の最初の報告となった。さらに、アゴニストとして機能する INS-35（腸で産生される）は生育状況に応じて分泌方向を可逆的に変動することを明らかにした。

本演題では、まず、幅広い動物種に存在するインスリン様ペプチドについて概説する。次いで、*C. elegans* のインスリン様分子の構造と様々な生理機能について言及する。最後に、アンタゴニストとして機能する INS-18, INS-23 の解析結果，ならびに、INS-35 の可逆的な分泌極性変動を紹介する予定である。*C. elegans* のインスリン様ペプチドから他生物種のインスリン様ペプチドを眺めてみたい。

参考文献

河野 強：線虫 C. エレガンスの休眠・寿命を制御するインスリン様ペプチド
化学と生物 第 55 巻, 6 号, pp. 400-405 (2017).

insulin-like peptides, *C. elegans*, diversity

発表責任者:河野 強（kawano@muses.tottori-u.ac.jp）

講演番号：4S21E6a2
講演日時、会場：3 月 27 日 09:40～ E6 会場

昆虫におけるペプチドホルモンを介した栄養選好性摂食行動 のメカニズム

Endocrine control in nutrient selective feeding in insects

○永田 晋治（東大院・新領域）
○Shinji Nagata (Univ. of Tokyo)

昆虫の摂食行動は、脊椎動物と同様、多くのペプチド性因子により調節されている。摂食行動を調節するそれぞれのペプチド性因子は、体内で異なる場所で機能するが、主に次の 3 つに分類できる。(1)脳-食道下神経節-前額神経球の局所神経回路で機能する因子は、摂食のモチベーションを調節する。(2)脳に付属する側心体で体内の栄養状態を感知し、側心体から分泌されるペプチド性因子が、エネルギー恒常性を維持する。(3)腸管では、餌の質的および量的な情報を感知して分泌する因子が、腸管の蠕動運動などを制御する。つまり、ペプチド性因子を介して、体内の栄養状態や餌に含まれている栄養分の情報が、直接的あるいは間接的に脳神経系に作用し、統合的に摂食行動のモチベーションが修飾あるいは調節されている。このことは、フタホシコオロギ *Gryllus bimaculatus*、およびカイコ *Bombyx mori* を使った私たちの最近の研究成果により、見出すことができた。例えば、栄養センサーである側心体から分泌される脂質動員ホルモンは、体内の血糖値あるいは脂質レベルを調節することで、食行動を制御している。また、アラトトロピン、アラトスタチン-B、ミオサプレッシン、short neuropeptide F、Neuropeptide F など C 末端に RF アミドを有する多くのペプチドは、脳神経系だけでなく、腸管からも分泌され、腸管の蠕動運動や循環系のポンプの拍動などを制御したりする。また、同時に末梢組織である脂肪体に作用し代謝系も調節することで、摂食行動を調節している。以上のことより、昆虫では、これらペプチド性因子が、体内で統合的に機能してエネルギーホメオスタシスや摂食モチベーションを調節しているという考えに至った。また、不足した栄養分を摂取する本能的な行動である、栄養分選好性行動(Self-selection)の分子レベルのメカニズムについても、徐々に明らかになってきた。本シンポジウムでは、これらのペプチド性因子の昆虫での機能的な普遍性、および進化的な考察なども合わせて紹介する。

Insect, Feeding behavior, Peptide

発表責任者：永田晋治（shinjin@edu.k.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4S21E6a3
講演日時、会場：3 月 27 日 10:10～ E6 会場

環状ペプチドクォルモンを介する腸内細菌と宿主のクロストークの可能性

Possibility of cyclic peptide quormone-mediated cross-talk between gut microbes and host

○中山 二郎（九大院農）
○Jiro Nakayama (Kyushu Univ.)

生物はフェロモン、クオルモン、ホルモンのようなシグナル分子を用いて、個体間や細胞間の情報伝達を高度に成立させている。その背景には、シグナル分子とその受容体の共進化があり、無数に共存するシグナル分子から特定のシグナルのみを感知し、適材適所に応答する高度なシステムを進化させている。従来の生命科学においては、正規の受容体を通してのシグナル分子の作用に関する研究が盛んに行われ、個々の生命体でのシグナル分子とその伝達機構の多くが解明された。しかし地球上では、元来すべての生物が他の生命体と共生・寄生関係の中で生きており、種を超えたシグナル分子とシグナル伝達系のクロストークが共生関係に重要な働きをしている例も多いと考えられる。

我々は、これまでに同種細菌間のコミュニケーションシグナルとしてのクオルモンに着目して研究を進めてきた。中でもグラム陽性細菌に幅広く存在する環状チオラクトンあるいはラクトン構造を有するペプチドクオルモンは、ゲノムシーケンスデータベースを探索すると、その遺伝子保有菌種は 500 種、ペプチドシーケンスのバリエーションは 1000 種近くに上る。つまりグラム陽性菌では、これらの環状ペプチド分子を用いて種特異的なクオラムセンシングを自在に展開していると想像される。特に、これらのグラム陽性菌にはヒト腸内にて多岐にわたり常在するファーミキューテス門の細菌が多く、数百種の細菌が高密度にひしめき合うヒト腸管内では、この環状ペプチドクオルモンを用いたクオラムセンシングは重要な働きを有すると考えられる。しかし、これらの環状ペプチドクオルモンの多くは反応性が高く、構造安定性が悪く、他分子や宿主細胞と不可逆的に相互作用している可能性が疑われる。現在我々は、その可能性を追求して、宿主の免疫細胞との相互作用などに興味を持って研究を進めている。

我々はまた、クオラムセンシングの阻害という観点から天然物からの受容体アンタゴニストのスクリーニングを行ってきた。その結果、興味深いことに、タキキニン受容体のアンタゴニストとして知られる WS9326 やエンドセリン受容体のアンタゴニストとして知られる Cochinmicin が腸球菌のクオルモンである GBAP のアンタゴニストとして機能することを見出した。そこで、GBAP がこれらのホルモンの受容体（GPCR）とクロストークするのではないかと考え、結合活性を調べた。その結果、非常に弱いながらも GBAP が GPCR に対して結合することが見出された。今回は、一つのクオルモンについてのみ調べた結果であるが、多様な腸内細菌のクオルモンと腸管で多岐にわたり発現している GPCR との間では様々なクロストークがあることが十分に予想され大変興味が持たれるところである。

quormone, cyclic peptide, cross-talk

発表責任者：中山二郎（nakayama@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：4S21E6a4
講演日時、会場：3 月 27 日 10:40～ E6 会場

光刺激により放出されるクラゲの卵成熟誘起ホルモン
Maturation-inducing hormone in hydrozoan jellyfish

○竹田 典代（広大）
○Noriyo Takeda (Hiroshima Univ.)

有性生殖によって次世代を生み出す多くの動物では、卵と精子が効率良く出会い受精する必要がある。そのため、卵と精子を時間的に同調して放出する仕組みをもっている。例えば脊索動物門に属するホヤでは、暗状態から明状態への移行が放卵・放精の引き金となる。環形動物門に属するゴカイでは、冬期、大潮の夜間の満潮時に生殖群泳（普段は底生生活を行なっているが、生殖時に多数の個体が同時に海中を泳ぐ行動）を行い、一斉に放卵・放精を行う。ホヤやゴカイよりもさらに原始的なクラゲは光状態の変化で放卵・放精が引き起こされる。種により、暗期から明期、または明期から暗期の光状態の変化（以下「光刺激」とする）が引き金となる。光刺激を受けると、卵巣内の一次卵母細胞が卵成熟を開始し、成熟した卵は卵巣上皮を破り海水中に放出される。放卵後の卵巣には、今回放卵に至らなかった未熟な一次卵母細胞が残っており、次回の放卵（24 時間後）までに成長し、次回の光刺激に応答して卵成熟を開始する。私達は、このように、毎日規則正しく放卵するクラゲの配偶子放出制御機構を明らかにすることを目指している。

これまでの研究により、卵成熟を開始させる卵成熟誘起ホルモン（Maturation Inducing Hormone; MIH）は４アミノ酸からなるペプチドであることが明らかになった（Takeda et al., 2018）。クラゲ MIH は卵巣上皮の神経細胞に含まれており、光刺激後に放出されてくること、MIH を抗原とする抗体は卵成熟を阻害することが示された。さらに、この神経ペプチドはオスの放精も誘起することが分かった。クラゲでは雌雄で共通した神経ペプチドを用いることにより、放卵と放精のタイミングを同調させ、受精率を高めていることが予想される。

Takeda N, Kon Y, Quiroga Artigas G, Lapébie P, Barreau C, Koizumi O, Kishimoto T, Tachibana K, Houliston E, Deguchi R. (2018) Identification of jellyfish neuropeptides that act directly as oocyte maturation-inducing hormones. *Development* 145. doi: 10.1242/dev.156786.

maturation inducing hormone, neuropeptide, oocyte maturation

講演番号：4S21E6a5
講演日時、会場：3 月 27 日 11:10～ E6 会場

鳥類で発見され生殖腺刺激ホルモン放出抑制ホルモンから動物界を俯瞰する :比較解析から普遍原理の理解

Discovery and Comparative Aspect of Gonadotropin-Inhibitory Hormone in Vertebrates: Unity and Diversity

○筒井 和義（早稲田大学 教育・総合科学学術院 統合脳科学研究室）
○Kazuyoshi Tsutsui (Laboratory of Integrative Brain Sciences, Department of Biology, Waseda University)

生殖制御の新しい理解には、新規脳ホルモンを同定することが不可欠である。1970 年代に Schally と Guillemin により、哺乳類の視床下部から生殖腺刺激ホルモンの放出を促進する生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)が発見された。しかし、生殖腺刺激ホルモンの放出を抑制する脳ホルモンの存在は永らく不明であった。2000 年に筒井らは鳥類の視床下部から生殖腺刺激ホルモンの放出を抑制する新規の脳ホルモンを発見して、生殖腺刺激ホルモン放出抑制ホルモン(GnIH)と命名した。その後、筒井らは GnIH はヒトなどの霊長類からヤツメウナギなどの無顎類に至る脊椎動物に広く存在することを明らかにした。生理学的な解析により、GnIH は生殖腺刺激ホルモンの合成と放出を低下させ、脊椎動物の生殖機能を抑制することを証明した。次に、GnIH の作用機構を解析して、GnIH は GnIH 受容体（GPR147）が存在する生殖腺刺激ホルモン産生細胞と GnRH ニューロンに作用して生殖腺刺激ホルモンの放出を抑制することを明らかにした。さらに、GnIH の発現制御機構を解析して、松果体と網膜から分泌されるメラトニンが GnIH ニューロンに局在するメラトニン受容体（Mel_{1c}）を介して GnIH の発現と分泌を誘導することを発見した。また、ストレスが GnIH の発現を高めて生殖機能を抑制することを見いだした。最近の研究により、GnIH は生殖機能の抑制に加えて攻撃行動や性行動などの生殖行動の発現を抑えることを発見した。以上の一連の研究により、古典的理解とは遥かにかけ離れた生殖を制御する新規の脳内分子機構が解明された。これらの発見は社会要請の高い生殖機能障害に有効となる治療法の開発に寄与するものである。

Gonadotropin-Inhibitory Hormone, Neuroendocrinology, Reproduction

発表責任者：筒井和義（k-tsutsui@waseda.jp）

講演番号：4S22B6a1
講演日時、会場：3 月 27 日 09:00～ B6 会場

腸内細菌による miRNA を介した腸管上皮透過性調節とその機構

Regulation of intestinal epithelial permeability by gut microbiota-dependent miRNA

○高橋 恭子（日大生資）
○Kyoko Takahashi (Nihon Univ.)

食品の消化・吸収を担う腸管には、生体で最大の免疫系が存在する。腸管にはまた、莫大な数の腸内細菌が生息し、両者の相互作用が健康維持に重要な役割を果たす。一方、腸内細菌叢の乱れが免疫の関わる様々な疾患の罹患リスクを増大させることが明らかにされ、その機構として腸管上皮透過性の亢進が数多く報告されている。腸管上皮透過性は、隣り合う腸管上皮細胞(IEC)間に形成されるタイトジャンクションと呼ばれる密着結合により制御され、その亢進は管腔の様々な抗原の体内への侵入を可能にし、免疫細胞の過剰な活性化や炎症反応を誘導することとなる。まず、腸内細菌による IEC の miRNA への作用を介した上皮透過性の調節機構が存在することを明らかにした。腸内細菌により誘導される miR-21-5p が、低分子量 GTP アーゼ ARF4 依存的にタイトジャンクションタンパク質 occludin, claudin-4 の発現を抑制することにより、上皮透過性を亢進することが示された。

次に、腸管上皮透過性調節の鍵を握る ARF4 について、さらに IEC における役割と機能を解析した。通常および無菌マウスの腸管各部位の IEC における ARF4 の発現を解析したところ、大腸 IEC においては腸内細菌により発現が誘導されることが示された。また、マウスのデキストラン硫酸ナトリウム誘導性大腸炎モデルを用いて、炎症時の ARF4 の挙動を解析した。その結果、腸炎誘導時の大腸 IEC において ARF4 の発現が有意に上昇すること、逆に occludin の発現が有意に減少することが示された。さらに、ARF4 が細胞骨格制御に関わる分子と結合することが示され、ARF4 はタイトジャンクションタンパク質の発現抑制のみならず、細胞骨格の制御を介してタイトジャンクションの形成に影響を及ぼす可能性が考えられた。

以上の結果より、腸内細菌叢の乱れ等により miR-21-5p が過剰に発現した場合に、上述のような機構により ARF4 依存的に腸管上皮透過性が亢進し、炎症が引き起こされると考えられた。さらなる研究により、腸内細菌叢の乱れや腸管上皮透過性の亢進が関わる疾患の抑制のためのターゲットの確立につながることが期待される。

intestinal epithelial cell, miRNA, gut microbiota

発表責任者：高橋恭子（ktaka@brs.nihon-u.ac.jp）

講演番号：4S22B6a2
講演日時、会場：3 月 27 日 09:30～ B6 会場

食用油の持つ多彩な機能とアレルギー克服に向けた新展開

Various functions of dietary oils for the control of allergic and inflammatory diseases

○國澤 純[1,2,3,4] ([1]医薬健栄研、[2]大阪大医歯薬、[3]神戸大医、[4]東大医科研)
○Jun Kunisawa[1,2,3,4] ([1]NIBIOHN, [2]Osaka Univ, [3]Kobe Univ, [4]IMSUT)

食事として摂取した成分は腸管で吸収された後、体の構成成分の一部となることから、食事の内容は健康状態に直接影響します。さらに腸管には「腸内フローラ」とも呼ばれる多くの腸内細菌が存在しており、食事と同様、健康状態に影響を与えることが分かってきました。一方、腸管組織には生体内の半分以上の免疫細胞が存在しており、腸管局所のみならず皮膚や呼吸器といった他の臓器における免疫機能にも影響を与えています。これら腸管免疫のもつ恒常性維持機構の破綻は各種アレルギー炎症性疾患の発症につながることが分かってきましたが、特に近年、アレルギー炎症性疾患の患者数が増大していることから、食事や腸内細菌を介した腸管免疫の制御とアレルギー炎症性疾患との関連が注目されています。本講演では油を例に、アレルギー炎症性疾患の発症における食事や腸内細菌の関与、さらにはその知見を活用した創薬や機能性食品の開発について、コホート研究も含めた最新の知見を紹介したいと思います。

Dietary oil, Allergy, Functional food

発表責任者：國澤純（kunisawa@nibiohn.go.jp）

講演番号：4S22B6a3
講演日時、会場：3 月 27 日 10:00～ B6 会場

生体制御に関わる多彩なリポクオリティ

The importance of LipoQuality in biological systems

○有田 誠[1,2,3] ([1]慶應大薬、[2]理研 IMS、[3]横市大院生命医)
○Makoto Arita[1,2,3] ([1]Keio Univ. Facul. of Pharm., [2]RIKEN Cent. for Integ. Med. Sci., [3]Grad. Sch. of Med. Life Sci., Yokohama City Univ.)

生体内には多くの種類の脂肪酸が存在しており、その質の違いや代謝バランスの変化はヒトの健康維持と密接な関係があると考えられている。例えば、魚食中心であった日本人の食環境が西欧食に置き換わってきたことで、脂肪酸の質（脂肪酸クオリティ）、すなわちエイコサペンタエン酸（EPA）やドコサヘキサエン酸（DHA）などの ω 3 脂肪酸の減少と、リノール酸やアラキドン酸など ω 6 脂肪酸の増大が認められ、そのことが心血管病やメタボリックシンドロームのリスク増大に関係するのではないかと考えられている。すなわち、栄養として摂取する脂肪酸の「量」だけでなく「質」の違いが健康維持において重要であると考えられているわけだが、本当なのか、またその分子機序はどのようなものなのか、ということについて様々な角度からの研究が行われている。

一方で近年の質量分析技術の進歩は、各々の脂肪酸分子種の代謝、分布、動態を詳細に捉えることを可能にした。我々は、生体内のリン脂質や脂肪酸の代謝を包括的に捉えるためのメタボロミクス解析システムを確立し、炎症の制御において脂肪酸代謝の質的変化が関与する可能性を見いだしてきた。また、微生物と宿主との相互作用において、腸内細菌が産生するユニークな脂肪酸代謝系および機能性脂質に着目した研究を行っている。このような背景のもと、各種脂肪酸の合成・代謝酵素の遺伝子改変動物、あるいは栄養要因によって体内の脂肪酸代謝バランスが変化した状況において、脂肪酸クオリティの違いを機能的に反映する代謝系および活性代謝物の同定を進めている。本講演では、脂肪酸クオリティによる生体制御機構、およびその健康維持における重要性について紹介したい。

ω 3 PUFA, LipoQuality, Anti-inflammation

発表責任者：有田誠（arita-mk@pha.keio.ac.jp）

講演番号：4S22B6a4
講演日時、会場：3 月 27 日 10:30～ B6 会場

βグルカンの腸管免疫に及ぼす影響について

Effects of beta-glucans on the intestinal immune system

○岩倉 洋一郎（東京理科大学)
○Yoichiro Iwakura (Tokyo Univ. of Sci.)

Dectin-1 は C 型レクチン受容体のメンバーであり、細胞外に糖鎖認識ドメインを持ち、細胞質内には活性化シグナルの伝達に関与する ITAM モチーフを持つ。我々は Dectin-1 が真菌の細胞壁構成成分であるβグルカンの受容体であり、真菌の感染防御で重要な役割を果たすことを見出した(Saijo et al., *Nat. Immunol.*, 2007)。Dectin-1 シグナルは下流で、IL−17A/F 産生を誘導し、これらが抗菌ペプチド産生や好中球の遊走を誘導し、抗真菌活性を発揮する。ところで、βグルカンはキノコや酵母の細胞壁成分であり、漢方薬や機能性食品として利用されているにも拘らず、これまでそのメカニズムはよくわかっていない。今回、我々は Dectin-1 の遺伝子欠損マウスを用いて、潰瘍性大腸炎のモデルであるデキストラン硫酸ナトリウム（DSS）誘導大腸炎を誘導したところ、大腸炎に耐性である事を見出した。この時、Dectin-1 シグナルは大腸で IL-17F 誘導を介して抗菌蛋白質(S100A8)の分泌を促し、腸管内の乳酸桿菌 *Lactobacillus murinus* の増殖を抑制するのに対し、Dectin-1 シグナルを阻害すると、増殖抑制が解除され菌の増殖が促進されると同時に、抗炎症性 T 細胞である Treg の分化が誘導されることを見出した。この乳酸桿菌だけを無菌マウスに移入すると、このマウスでも Treg 細胞が増加し DSS 誘導大腸炎に耐性となる事から、*L. murinus* が Treg 増加に重要な役割を果たしていることがわかった。ところで、昆布などに含まれるラミナリンと呼ばれる低分子βグルカンは、通常の大きな分子量を持つβグルカンの作用を拮抗的に阻害することが知られている。マウスに低分子グルカンを食べさせると、*L. murinus* が増殖し、Treg 細胞が増える事によって、腸管炎症が抑制されることがわかった。一方、IL−17F シグナルは S100A8 以外に別の抗菌蛋白質である Phospholipase A2 を誘導することがわかった。Phospholipase A2 は特異的に *Clostridium* cluster XIVa の増殖を阻害するため、IL-17F 欠損マウスでは腸内における *L. murinus* の他に *Clostridium* XIVa の割合が増加した。*Clostridium* XIVa は短鎖脂肪酸の分泌を介して Treg を誘導することが知られており、実際 IL−17F 欠損マウスでは Treg が増加し、このため DSS 誘導大腸炎やナイーブ T 細胞誘導大腸炎に対し、耐性を増すことがわかった。しかし、IL−17A 欠損マウスではこのようなことは認められなかった。これは、産生細胞や産生誘導機構の差によるものと考えられた。これらの結果から、食品中のβグルカンは腸内の細菌叢を変える事によって腸管の免疫応答性を調節するのに重要な役割を果たしている事が示されると共に、低分子βグルカン、あるいは抗 IL−17F 抗体は炎症性腸疾患の予防・治療薬として有望であることが示唆された。

β-glucan, C-type lectin receptor, Inflammatory Bowel Disease

発表責任者：岩倉洋一郎（iwakura@rs.tus.ac.jp）

講演番号：4S22B6a5
講演日時、会場：3 月 27 日 11:00～ B6 会場

食品成分の腸内細菌代謝を介した健康制御

Health control by gut microbial food component metabolisms

○小川 順、岸野 重信（京大院農・応用生命）
○Jun Ogawa, Shigenobu Kishino (Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

食品成分は私たちの体内で様々な化合物へ変換され吸収される。この過程には私たち自身の代謝のみならず、腸内細菌代謝が関わっている。最近ではその機能が「もう一つの臓器」としてとらえられている腸内細菌による食品成分代謝に関する最近の知見を中心に、代謝物が与えうる影響を免疫に関する話題を中心に紹介するとともに、食・腸内細菌・健康の相互関係を考える。

食品由来脂肪酸が腸内細菌により飽和化されること、代謝物として水酸化・オキソ・エノン脂肪酸などが生成し、宿主に移行していることを見いだした。これらの代謝物の生理機能を評価した結果、リノール酸由来の水酸化脂肪酸（HYA）がマウス腸細胞ならびに骨髄系樹状細胞を用いた評価系において、炎症性サイトカインの産生を抑制することを見いだした。また HYA が、リポ多糖が誘発する骨髄系樹状細胞の成熟化を抑制し、抗酸化や解毒代謝を担う遺伝子群の転写を活性化することで細胞保護作用を示すことを見いだした。さらに， HYA が GPR40 を起点とするシグナル伝達を介して、腸管上皮や歯肉上皮のバリア機能の低下を抑制することを見いだした。一方、α-リノレン酸由来の水酸化・オキソ脂肪酸が、単球の抗炎症性 M2 型マクロファージへの分化に寄与することを見いだした。腸管粘膜免疫系に及ぼす影響を調べた結果、α-リノレン酸由来代謝物が腸管を Th2 サイトカイン優位な環境に制御することが示唆された。このほかにも、水酸化・オキソ脂肪酸に PPAR、LXR、TRPV1 を介した脂質代謝・エネルギー代謝制御機能を、エノン脂肪酸に抗酸化作用を、HYA に抗ヘリコバクター活性を見いだしている。

高尿酸血症に起因する痛風などの疾病が増加している。我々は、腸内細菌による食品由来プリン体の分解が血中尿酸値の低減につながると考えた。腸管に存在するプリンヌクレオシドを分解する乳酸菌を選抜し、食餌性高尿酸血症モデルラットを用いて評価した結果、これらの乳酸菌の摂取がプリン体の過剰摂取による血中尿酸値の上昇を抑制する可能性を見いだした。

ブロッコリー等のアブラナ科植物には *S*-glycoside 結合型配糖体グルコシノレートが含まれる。グルコシノレートはヒト体内において腸内細菌によりイソチオシアネートに変換され、発がん抑制などの様々な生理機能を示す。乳酸菌においてグルコシノレートの分解機構を解析した結果、PTS sugar transporter、aryl-phospho-β-D-glucosidase により構成される新規な分解酵素系を見いだした。

これらの研究は、腸内細菌による食品成分代謝の把握、ならびに、代謝系・代謝産物の生理機能評価により、食・腸内細菌・健康の相互関係を理解することの重要性を示している。

gut microbiota, functional lipid, food component metabolism

発表責任者：小川　順（ogawa@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4S22B6a6
講演日時、会場：3 月 27 日 11:30～ B6 会場

短鎖脂肪酸によるアレルギー抑制効果

The effect of short chain fatty acids on mast cell-mediated allergic responses

○西山 千春（東理大基礎工）
○Chiharu Nishiyama (Tokyo Univ. of Sci.)

短鎖脂肪酸（SCFAs）は、ヒトにとって難消化性の食物繊維を腸内細菌が分解する際に産生される酢酸、プロピオン酸、酪酸などを指し、近年、免疫担当細胞や腸管上皮細胞に作用して、抗炎症作用を発揮することが報告されている。SCFAs は G タンパク質共役型受容体（GPCRs）である GPR41、43、109A を介して細胞活性化を制御する。また、酪酸の場合はヒストン脱アセチル化酵素の阻害活性を有しており、T 細胞内の転写因子 Foxp3 発現誘導を促進する結果、制御性 T 細胞分化を促す経路も存在する。一方、花粉症や食物アレルギーといった I 型アレルギー反応を引き起こすマスト細胞は、IgE 受容体を細胞表面に発現しており、花粉や食品中に含まれるアレルゲンに特異的な IgE 抗体の刺激を受けて活性化する。この時、活性化した細胞から分泌されるヒスタミンやエイコサノイド、サイトカインが即時型反応や遅発相での様々なアレルギー症状をもたらす。現行のアレルギー治療薬として、抗ヒスタミン剤、ロイコトリエン拮抗薬、抗 IgE 抗体が奏功していることからも、マスト細胞を中心とした一連の反応がアレルギーの抑制に有効な標的であるとことが支持される。
このように、アレルギー疾患において重要な役割を果たすマスト細胞であるが、SCFAs によりどのような影響を受けるのかについては不明なままであった。私たちは、SCFAs がマスト細胞の機能に及ぼす効果を解析し、IgE 依存性の脱顆粒反応を、酪酸、プロピオン酸、吉草酸、イソ酪酸、イソ吉草酸が用量依存的に抑制することを見出した。これら SCFAs を経口的に摂取することによりマウスのアナフィラキシー反応が抑制されたことから、SCFAs が生体の IgE 依存性アレルギー反応の制御に有効であることが示された。更に、siRNA や阻害剤、ノックアウトマウス、マスト細胞欠損マウスなどを用いた各種解析により、SCFAs によるマスト細胞機能調節の分子機構が徐々に明らかになってきた。すなわち、マスト細胞は GPR109A を発現しており、吉草酸は主に、酪酸は部分的に GPR109A を介してマスト細胞に作用し、これによりプロスタグランジン PGE_2 分泌や IL-10 産生が増幅される結果、マスト細胞がオートクライン的に活性化抑制されるといったシナリオが浮かび上がってきた。今回、SCFAs がマスト細胞活性化を制御して抗アレルギー作用を発揮すること、吉草酸が GPR109A を介して細胞機能を調節することなどが新たに示され、食品成分がアレルギーの病態に寄与する機序の一端が明らかになった。引き続き、PGE_2 以外のエイコサノイドの寄与をはじめとした未解明の課題に取り組み、新たなアレルギー治療標的の発見に繋げていきたい。

Short chain fatty acids, mast cells, allergy

発表責任者：西山千春（chinishi@rs.tus.ac.jp）

講演番号：4S23D6a1
講演日時、会場：3 月 27 日 09:05～ D6 会場

Bacillus 属細菌の新規イソプレノイド生合成経路
New biosynthetic pathway of isoprenoid in Bacillus species
○佐藤 努（新潟大農）
○Tsutomu Sato (Niigata Univ. of Agric)

【シンポジウム概要】動物・植物・微生物に広く分布するイソプレノイドは，既知のものだけで８万種類を超える，天然有機化合物の中で最大のグループである。ビタミン・ホルモン・フェロモン等として生物体内・間で機能する物質を多く含み，また，食品・薬剤・香料・化成品等として人間生活に大いに利用されてきている。近年，イソプレノイド生合成研究から，インパクトの高い基礎的発見が立て続けに成され，今世紀初頭の大きなトピックスとなった非メバロン酸（MEP）経路の発見の記憶は新しい。また，社会実装に近い応用研究への進展も著しい。イソプレノイド生合成経路は，新しい経路・酵素・反応の宝庫であり，最近でも新規性の高い発見がインパクトの高いジャーナルに数多く発表されている。本シンポジウムでは 6 名が最前線の成果を講演し議論することで，農芸化学会のさらなる飛躍に寄与する。

【本講演内容】私達は *Bacillus* 属細菌に存在するイソプレノイド生合成経路・酵素を主に対象として研究を行ってきており，概要を紹介する。主な成果として，既知テルペン合成酵素と一次構造の類似性を持たない新型テルペン合成酵素 [1, 2]，C_{35} と C_{30} の基質から異なった環状構造を形成する二機能性テルペン環化酵素 [3, 4], スクアレンの両末端を環化する初のオノセロイド合成酵素 [5] , の発見がある。また，発見した酵素を利用して，希少テルペンであるアンブレインの人工経路による創出にも成功した [5]。これらの発見は，モデル微生物の一つである枯草菌で主に成されていることから，まだまだ多くの生物において新規イソプレノイド生合成経路・酵素が存在するものと期待している。実際，*Mycobacterium* 属細菌において，既知テルペン合成酵素と一次構造の類似性を持たない新型テルペン合成酵素が未同定であり [6]，探索中である。

一方，ごく最近，イソプレノイドの生合成としては初めて活性酸素のスーパーオキシドによる非酵素経路も *Bacillus* 属細菌から見出した [7]。ポストゲノムでは分からない非酵素経路を探索することにより，様々な生物から新規経路・新規イソプレノイドを今後も発見できる可能性があると考えられる。

【文献】

1) T. Sato *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, 133, 9734. 2) M. Fujihashi *et al.*, *Chem. Sci.*, 2018, 9, 3754.
3) T. Sato *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, 133, 17540. 4) L. Tenkovskaia *et al.*, *ChemBioChem*, 2017, 18, 1910.
5) D. Ueda *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, 135, 18335. 6) T. Sato *et al.*, *Org. Biomol. Chem.*, 2008, 6, 3788.
7) D. Ueda *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2018, 57, 10347.

isoprenoid, terpenoid, biosynthesis

発表責任者：佐藤努（satot@agr.niigata-u.ac.jp）

講演番号：4S23D6a2
講演日時、会場：3 月 27 日 09:30～ D6 会場

テルペン環化酵素が触媒する多段階反応の構造基盤
Structural basis for multi-step reactions catalyzed by terpene cyclase
○葛山 智久（東大・生物工学セ）
○Tomohisa Kuzuyama (Univ. Tokyo)

テルペノイドは最大の天然有機化合物群であり、多様な構造と生理活性を有することから、医薬品だけでなく添加物や工業原料として様々な場面で利用されている。その生合成は、前駆体であるプレニル二リン酸の合成、テルペン環化酵素による環状骨格の形成、水酸化酵素や糖転移酵素等による修飾の各段階からなる。なかでもテルペン環化酵素が担う環状骨格の形成反応は、単独の酵素による反応によって複雑な多環式化合物を立体選択的に一挙に作り出すことができる、構造多様性を生み出す鍵反応である。

テルペン環化酵素 CotB2 は、放線菌 *Streptomyces melanosporofaciens* MI614-43F2 が生産するサイクロオクタチンの生合成遺伝子クラスターから発見された。本酵素は、不斉点を持たない炭素鎖長 20 の非環状化合物、ゲラニルゲラニル二リン酸を基質として、6 つの不斉点を持ち 3 つの環構造が縮合したサイクロオクタチンの生合成中間体、サイクロオクタット−9−エン−7−オールを合成する。

一方、テルペン環化酵素 CLDS は、放線菌 *Streptomyces* sp. CL190 が生産するラバンドシアニンの生合成遺伝子クラスターから発見された。本酵素は、2 分子の炭素鎖長 5 のジメチルアリル二リン酸を縮合し、さらに環化することでシクロラバンデュリル二リン酸を合成する。

本発表では、多段階からなる複雑な環化反応を触媒する CotB2 と CLDS の 2 つのテルペン環化酵素の反応機構とその構造基盤について紹介する。また、これらの立体構造に基づいた変異導入による反応産物の変化についても紹介する。

Tomita T. *et al*. *ACS Chem. Biol*. 12: 1621 (2017).
Tomita T. Kobayashi M. *et al*. *Angew. Chem. Int. Ed*. 56: 14913 (2017).

terpene, mechanism, enzyme

発表責任者：葛山智久（utkuz@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4S23D6a3
講演日時、会場：3 月 27 日 10:00～ D6 会場

古細菌型メバロン酸経路の発見
Discovery of the archaeal mevalonate pathway
○邊見 久 (名大院生命農)
○Hisashi Hemmi (Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ.)

メバロン酸経路はイソプレノイド生合成における前駆体供給経路であり、主に真核生物と古細菌で使われている。半世紀以上前に酵母を用いて明らかにされた真核生物型メバロン酸経路では、アセチル CoA から生じたメバロン酸が２つのキナーゼによってジホスホメバロン酸に変換された後に、ATP 依存性の脱炭酸酵素であるジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ（DMD）の働きによって、イソプレノイド生合成の基本単位であるイソペンテニル二リン酸へと変換される。しかし、奇妙なことに、古細菌の大部分は DMD のホモログ遺伝子を有しておらず、それらは部分的に異なった中間体を経由する変形メバロン酸経路を有すると考えられてきた。近年、我々を含めた複数のグループにより、主に古細菌の一部から、２種類の変形メバロン酸経路、ハロアーキア型経路とサーモプラズマ型経路が発見されている。しかし、それらの経路はいずれも DMD に相同な酵素を利用しており、したがって、大部分の古細菌に保存されているであろうメバロン酸経路は未解明であった。

我々は最近、比較ゲノム解析により、DMD ホモログを持たない、つまり未知のメバロン酸経路を有すると予想される古細菌に保存された遺伝子を探索することで、第４のメバロン酸経路とも言える、古細菌型メバロン酸経路を発見した。同経路は、２種類の新奇酵素、ホスホメバロン酸デヒドラターゼとホスホ-*trans*-アンヒドロメバロン酸デカルボキシラーゼを含み、他のメバロン酸経路に比べて ATP 消費が少ない省エネ型の代謝経路である。本発表では、同経路の発見の経緯に加え、メバロン酸経路の分子進化におけるその位置づけや、応用の可能性についても述べたいと考えている。

isoprenoid, mevalonate pathway, archaea

発表責任者：邊見　久（hhemmi@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：4S23D6a4
講演日時、会場：3 月 27 日 10:30～ D6 会場

植物種を超えて存在するモミラクトン生合成遺伝子クラスター
Evolutionary conservation of momilactone biosynthetic gene clusters in plants
○岡田 憲典（東大生セ）
○Kazunori Okada (The Univ. of Tokyo)

植物は動物と違って動けない。そこで、植物自身の生存に有利に働くような多種多様な化学防御物質を生産・利用して巧みに生き延びている。イネのモミから単離されたジテルペン化合物のモミラクトンは、病原菌感染時の防御物質ファイトアレキシンとして、また、近傍の植物の生育を妨げるアレロパシー物質として機能することが知られる。このようにイネがストレスに適応するために進化の過程で獲得してきた二次代謝産物のことを Specialized metabolites と呼ぶ。モミラクトンはイネの根から恒常的に根圏に滲出されるだけでなく、いもち病菌などの病原菌感染や UV や重金属暴露などの非生物ストレスによってもイネ全身で生産誘導される。私たちは、イネのジテルペン型ファイトアレキシンの生合成経路の解明を進める過程で、モミラクトン生合成遺伝子がイネ４番染色体上でクラスターを形成しており、同調的な発現誘導を示すことを見出した[1)]。さらに最近、イネと生活環を共にする水田雑草のイヌビエが微量のモミラクトンを生産し、その生合成遺伝子群はイネと同様にクラスターを形成していることが明らかとなった[2)]。このようなクラスター形成とモミラクトンの進化的な関係に興味を持ち、祖先種である野生イネを用いた解析を進めた。その結果、人による育種を受ける以前から存在する野生種のイネにおいても、すでにモミラクトンの生産能および遺伝子クラスターが保持しされており、クラスター形成の進化上の分岐点が見えてきた。また、高等植物以外では、蘚類ハイゴケがアレロパシー物質としてモミラクトンを恒常的および誘導的に生産することが知られていたが、私たちはその生合成経路の解明を目指し、ハイゴケのモミラクトン生合成遺伝子の同定を進めている[3)]。興味深いことに、ハイゴケのモミラクトン生合成遺伝子も染色体上でクラスターを形成していることを示唆する結果を得ており、現在その証明を急いでいる。このように、進化的にかけ離れたこれらの植物が、いつ、どうやってモミラクトン合成能を獲得し、また、なぜ生合成遺伝子クラスターを形成しているのか？さらには、生産誘導機構には植物共通なシステムが機能しているのか？など多くの謎が存在する。本発表では、植物に競争力を与える Specialized metabolites モミラクトンのイネにおける進化軌跡を中心にお話し、また、モミラクトンの天然農薬としての可能性や耐性機構解明への試みについても紹介したい。

1) Shimura *et al.*, ***J. Biol. Chem.***, 282, 34013-34018 (2007)
2) Guo *et al.*, ***Nature Communications.*** 8(1):1031. (2017)
3) Okada *et al.*, ***Sci Rep.*** 6:25316. (2016)

gene cluster, specialized metabolites, chemical defense

発表責任者：岡田憲典（ukazokad@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4S23D6a5
講演日時、会場：3 月 27 日 11:00～ D6 会場

パラゴムノキのゴム粒子膜上への異種酵素の導入による新規ポリイソプレノイド生合成

Biosynthesis of novel polyisoprenoids catalyzed by prenyltransferases heterologously introduced onto rubber particles from *Hevea brasiliensis*

○高橋 征司（東北大院工）
○Seiji Takahashi (Grad. Sch. Eng. Tohoku. Univ.)

現在，伝統的に産業利用されてきた天然材料の大半が石油化学製品に置き換わっているが，天然ゴム（NR）のユニークな物性は石油化学ポリマーで完全再現するのは困難であり，タイヤ生産をはじめとするゴム産業に不可欠である．工業材料としての NR の大半はパラゴムノキより採取されるラテックスから生産されるが，その中で疎水性の NR はリン脂質一重層で覆われたゴム粒子（RP）と呼ばれるオルガネラ内に貯蔵されている．分子量 10^6 Da 以上にもなるパラゴムノキの NR の基本骨格は，*cis*-1,4-ポリイソプレンであるが，そのω末端に数個の *trans*-イソプレン単位が結合している．この構造的特徴は，全生物が有する糖キャリア脂質であるポリプレノール（C_{45-60}）やドリコール（C_{75-120}）と類似である．それらの基本骨格生合成は *cis* 型プレニル鎖延長酵素（cPT）で触媒されるため，NR 生合成酵素は生成物鎖長特性が特殊化した cPT であると予想されていた．しかし，NR に相当するポリイソプレノイドを cPT で生合成できたという実証報告はなく，NR 生合成機構は謎のままであった．

我々は，NR 生合成酵素の実態解明を目指し，パラゴムノキのラテックスで特異的に発現する cPT ホモログである HRT1 を単離していたが，大腸菌発現系で得た組換え型 HRT1 は cPT 活性を示さず，酵母で発現させた HRT1 はドリコールと同様の鎖長の生成物（C_{80-100}）しか与えなかったため，cPT が NR 生合成活性を発現するためには何らかの因子が必要であると考えた．ここで，cPT はその生成物鎖長特性などから，主に真核生物の小胞体に局在する長鎖型（C_{70-120}），原核生物，古細菌，植物が有する中鎖型（C_{30-60}），一部の原核生物や植物の有する短鎖型（C_{10-20}）に分類することができる．我々は，植物の中鎖型 cPT を酵母で異種発現させ小胞体膜に組み込ませた際に，主生成物に加えドリコールサイズのポリイソプレノイドも生合成することを見出し，cPT が配置される膜の構造と生成物の膜内への組み込みが鎖長制御に関与していると予想した．そこで，無細胞タンパク質合成系を利用し，翻訳と共役させながら HRT1 を RP 膜上に導入したところ，分子量 10^6 Da 以上にも及ぶポリイソプレノイドを生合成する活性を示した．驚いたことに，ヒトや酵母の長鎖型 cPT をパラゴムノキの RP に導入した場合でも，同様の NR 生合成活性を示した．一方，植物の短鎖型 cPT，微生物の中鎖型 cPT を RP に導入した際は有意な NR 合成活性を示さなかったが，鎖長制御に寄与する残基を見出し，置換することで，NR 生合成能を付与することに成功した．以上の結果から，NR に特化した cPT がある訳ではなく，RP への適切な cPT の組み込みが NR 生合成の鍵であることがわかった．さらに，cPT 以外の酵素の導入によるポリマー合成にも成功したため，RP を用いた有用ポリマー生合成系開発への道が拓けた．

natural rubber, prenyltransferase, rubber particle

発表責任者：高橋 征司（takahasi@seika.che.tohoku.ac.jp）

講演番号：4S23D6a6
講演日時、会場：3 月 27 日 11:30～ D6 会場

コエンザイム Q 生合成に関わる新規遺伝子

Novel genes involved in coenzyme Q synthesis

○川向 誠（島根大生資）
○Makoto KAWAMUKAI (Life & Env. Sci., Shimane Univ.)

コエンザイム Q（CoQ、ユビキノン）は、原核生物では原形質膜で、真核生物ではミトコンドリアにおいて呼吸鎖電子伝達系の必須成分としてエネルギー産生に関与する。それに加えて、サルファイドキノンレダクターゼやデヒドロオロテートデヒドロゲナーゼなどの補酵素として働くことから様々な細胞内の代謝経路に関わる。CoQ はキノン骨格とイソプレノイド側鎖から構成され、ヒトや分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* ではその側鎖長が 10 である CoQ_{10} を生合成する(1,2)。還元型の CoQ_{10} は抗酸化作用を持ち、ヒトが生体内で生合成できる唯一の脂溶性抗酸化物質である。また、CoQ_{10} は加齢とともにその量が減少するため、サプリメントとしての摂取が効果的である。CoQ_{10} を合成する微生物の中では、分裂酵母 *S. pombe* が、遺伝学的な解析が容易で、遺伝子工学的ツールが発達していることから、生合成の解析や生産検討に最適な生物種である。*S. pombe* では少なくとも 10 個の遺伝子が CoQ の生合成に関与し、その遺伝子がヒトにまで保存されていることを私たちは証明している(3)。

一方で、CoQ 生合成には未解明の部分が多々存在する。キノン骨格の由来に関して、*p*-ヒドロキシ安息香酸（PHB）以外に *p*-アミノ安息香酸（pABA）が利用されることを見出しているが、キノン骨格部分の前駆体の生合成に関しては未解明である。分裂酵母 *S. pombe* にはミトコンドリアに局在するタンパク質をコードする遺伝子が約 400 個ある。それらの遺伝子破壊株の CoQ_{10} 量を網羅的に定量したところ、著しく CoQ_{10} 量が減少し、どの生物種においても CoQ 生合成に関与する報告がない遺伝子を見出した。新たに発見した機能未知の遺伝子を *coq11* と *coq12* と命名した。*coq11* や *coq12* の破壊株は CoQ_{10} 量の合成量は、通常の１０分の１以下の合成量であった。完全に CoQ 合成を欠損しないのは、pABA がキノン骨格の前駆体として使われるためである。*coq12* 破壊株を、PHB や *p*-ヒドロキシベンズアルデヒド（PHBALD）を単独で添加した培地において生育させたところ、CoQ_{10} の生産性が回復した。このことから、Coq12 は PHB 合成に関与する新規因子であると考えている。これらの結果を含め、最近進展してきている CoQ の生合成に関して最先端の状況を報告する。

(1) M. Kawamukai, Biosynthesis of coenzyme Q in eukaryotes. Biosci. Biotechnol. Biochem. 80:23-33 (2016)
(2) M. Kawamukai, Biosynthesis and applications of prenylquinones. Biosci. Biotechnol. Biochem. 82:963-977 (2018)
(3) K. Hayashi, Y. Ogiyama, K. Yokomi, T. Nakagawa, T. Kaino, M. Kawamukai, Functional conservation of coenzyme Q biosynthetic genes among yeasts, plants, and humans. PLoS ONE 9(6) e99038 (2014)

coenzyme Q, ubiquinone, fission yeast

発表責任者：川向　誠（kawamuka@life.shimane-u.ac.jp）

講演番号：4S24A3a1
講演日時、会場：3 月 27 日 09:10～ A3 会場

バイオエコノミーと農芸化学会への期待

Bioeconomy, relation and contribution to Bioscience, Biotechnology and Agrochemistry

○藤島 義之（新エネルギー・産業技術総合開発機構）
○Yoshiyuki FUJISHIMA (New Energy and Industrial Technology Development Organization)

バイオエコノミーという言葉は 2009 年に OECD が出した Bioeconomy to 2030 というレポートから世界に広がり、各国で政策が作られ実行されている。一方で国連の SDGs やパリ協定で、地球の持続と人々の生活様式のシフトがさまざまな場面で求められてきている。産業におけるカーボンが化石由来からバイオ由来へシフトをするために、農芸化学（バイオテクノロジー、バイオマスの活用）が技術的、経済的に妥当なものを生み出す必要がある。
バイオエコノミーは言葉としては日本にはなじみが薄いが、約 100 年の農芸化学会の歴史はそのまま日本のバイオエコノミーへの挑戦の歴史であると考えられる。また、世界が行おうとしているバイオシフトについても日本は 1970 年代にあった石油ショック後のサンシャイン計画やムーンライト計画、さらには関西淡路大震災、東日本大震災などから得られた教訓を国連の気候変動枠組会議における京都議定書やパリ協定とすり合わせて、バイオマス活用やバイオテクノロジー産業につながるような具体的プロジェクトとして行っている。
OECD のバイオエコノミーや合成生物学議論、グローバルバイオエコノミーサミット、その他欧米の学会等で行われているバイオエコノミーの議論、日本の研究開発の流れ、そして今後の農芸化学への期待について述べる。

Bioeconomy, biomass, bioscience, biotechnology and agrochemistry

発表責任者：藤島義之（fujishimaysy@nedo.go.jp）

講演番号：4S24A3a2
講演日時、会場：3 月 27 日 09:35～ A3 会場

環境 DNA 分析による生物相モニタリングと環境評価への応用

Monitoring of macrobiota by environmental DNA analysis and its application for environmental assessments

○山中 裕樹（龍谷大）
○Hiroki Yamanaka (Ryukoku Univ.)

環境 DNA とは水中や土壌中に含まれる生物由来の DNA を指し、特に近年は大型動物由来の生体外 DNA を対象とした環境 DNA 分析が急速に発展している。細菌などの微小な生物はろ過などで生物体そのものを集めることができ、ここから抽出した DNA をもちいる環境 DNA 分析はすでに長い歴史を持っている。その一方で、魚類などの大型生物由来の DNA もろ過によって集めた試料中に含まれていることが明らかとなり、応用が進んでいる。環境 DNA 分析は野外調査においては水を汲むだけという簡便さから、これまで困難であった広域多地点調査や、超長期のモニタリングを比較的小労力で実行可能にする。得られた DNA 試料は半永久的に凍結保存が効き、興味ある種ごとの検出や、メタバーコーディングによる網羅的な種の検出など、必要に応じた分析ができる。このような利点から、環境 DNA 分析は従来の環境調査、特に生物相調査の手法を根底から変えようとしている。

2011 年にフランスの研究チームが外来種であるウシガエルの DNA をため池の水から検出できたとする報告をして以降、大型生物検出への適用例が急速に増加している。単純には環境中から集めた DNA を PCR やシーケンシングといった既存の分子生物学的手法によって分析し、種を識別するための適切なマーカー遺伝子を使って検出・同定を行う技術である。初期の研究ではウシガエルをはじめとして、コイ、ブルーギルなど、特定の種を対象に分析する「種特異的な検出」がほぼすべてを占めていた。その一方で、Minamoto et al. (2012) に始まる、複数種を同時に検出する試みも進んできた。2015 年になり、Miya et al. (2015) では魚類全般の DNA を環境 DNA 試料中からユニバーサルに増幅し、次世代シーケンサーでの分析により種組成を網羅的に明らかにできる技術が確立され、この環境 DNA メタバーコーディングを用いた研究・調査が一般化しつつある。

生態学や水産学では対象種がどこにどのように分布しているのかという情報は、環境評価をするうえでも資源管理をするうえでも不可欠な基礎情報であるが、必要な情報解析をするのに足るだけのデータを収集するのはコスト上も技術的にも相当な困難を伴う。環境 DNA 分析の登場は、これらの分野のビッグデータ化を強力に進める好機である。すでに国内では離島を含めて海岸線上の 600 地点ほどでの全国一斉調査が実施され、膨大なデータが解析中の状況である。本講演の中ではこれまでの国内での研究例を中心として基礎から応用を概観し、今後環境 DNA 分析がもたらしうる波及効果について、そして、ビジネスについて展望を述べる。更に、アメリカなど諸外国で進みつつある環境 DNA 分析に関連する政府機関の取り組み、企業の取り組みについても紹介したい。

environmental DNA, fish, biomonitoring

発表責任者：山中裕樹（yamanaka@rins.ryukoku.ac.jp）

講演番号：4S24A3a3
講演日時、会場：3 月 27 日 10:00～ A3 会場

環境微生物群のモニタリング・機能強化による新たな環境バイオ技術の開発

Development of environmental biotechnologies by monitoring and functional enhancement of microbial communities in environments

○堀 知行（産総研）
○Tomoyuki Hori (AIST)

人の健康や生活環境の維持および産業の持続的成長のため、産業活動で生じた廃水や汚染土壌を低コストかつ低い環境負荷で浄化・処理することが求められている。一方、世界的な水不足問題の深刻化とともに廃水の再生利用に対する社会ニーズが急速に高まっている。これら産業廃水の処理・再生や広域汚染サイトの土壌修復において、自然環境に存在する未知微生物群「環境微生物群」が有する浄化能力の促進・強化が喫緊の課題となっている。

これまで我々の研究グループでは、環境中の微生物を 1 ランで 1000 万種以上同定する次世代シーケンサー解析法を確立し、これを共焦点反射顕微鏡法や安定同位体プローブ法（SIP：Stable Isotope Probing）と有機的に組み合わせることで、水処理再生や土壌浄化の中核的役割を担う環境微生物群の同定に成功した。さらに、それらの浄化機構の推定・理解を通して、新たな環境修復技術の開発および汚染物質処理の効率化への道筋を示してきた。また、環境微生物群に関する学術的知見や解析ノウハウを蓄積させ、企業、大学、公的研究機関等との実証・実用化研究を展開している。

本講演では、環境微生物群を利用した重金属（セレン）汚染土壌の原位置対策技術の提案[1)]、膜分離活性汚泥法（MBR：Membrane Bioreactor）と逆浸透（RO：Reverse Osmosis）膜分離法による水処理再生技術で深刻な「微生物付着による膜閉塞（バイオファウリング）」の新機構解明[2),3)]、および石油化学工業廃水中に存在する難分解性有害物質「1,4-ジオキサン」の新規分解菌の同定とその協調的振る舞いによる処理活性維持[4)]に関する最新の研究成果を紹介する。さらに、産総研で取り組んでいる「環境微生物データベースプロジェクト」の成果の一端として下水汚泥微生物群のネットワーク解析結果[5)]について報告する。

1) Navarro RR *et al*., Environ Sci Technol, **49 (13)**, 7684-7691 (2015)
2) Inaba T *et al*., NPJ Biofilms Microbiomes, **3**, 5 (2017)
3) Inaba T *et al*., Sci Rep, **8 (1)**, 16805 (2018)
4) Aoyagi T *et al*., ISME J, **12 (10)**, 2376-2388 (2018)
5) Narihiro T *et al*., Microbes Environ, in press

Environmental biotechnology, Microbial community, High-throughput sequencing

発表責任者：堀知行（hori-tomo@aist.go.jp）

講演番号：4S24A3a4
講演日時、会場：3 月 27 日 10:30～ A3 会場

バイオレメディエーション技術を活用した塩素化エチレン類の土壌汚染対策

Bioremediation for purifying soil contamination polluted by chloroethene

○小松 大祐[1]、西村 実[2]、養王田 正文[3]（[1]（株）エンバイオエンジニアリング、[2]（株）エンバイオホールディングス、[3]農工大）
○ Daisuke Komatsu[1], Minoru Nishimura[2], Masafumi Yohda[3]（[1]Enbio Eengineering, [2]Enbio Holdings, [3]Tokyo Univ. of Agric. and Tech.）

土壌汚染対策法が 2003 年に施行され，2018 年 11 月現在，特定有害物質として 26 物質に指定基準が設けられている。同法では指定基準に不適合状態となった土地において土壌汚染により健康被害が生じる恐れがある場合，都道府県知事から土壌汚染対策の指示が出され，適切な措置が求められることとなる。その他にも土地の売買等の契機により，自主的な土壌汚染対策等も多数行われている。

土壌汚染対策法における特定有害物質 26 物質のうち，塩素化エチレン類やベンゼン等の揮発性有機化合物の土壌浄化対策工法の一つにバイオレメディエーションがある。土壌を場外へ搬出しない，いわゆる「原位置浄化」としてのバイオレメディエーションは，低環境負荷，かつ低コストな工法であり，優れた土壌浄化対策工法の一つである。しかしながら，バイオレメディエーションは汚染物質を分解する主体が細菌等の微生物であることから，微生物の存在量や活性を左右する環境要件に影響を受けやすく，そのコントロールが難しい。従って，バイオレメディエーションをコントロールするためには，汚染物質を分解できる微生物の存在量や分解酵素遺伝子量等，様々なパラメータを遺伝子解析等の手法を用いて，モニタリングしながら，適切に管理していくことが重要である。

また，バイオレメディエーションにはバイオスティミュレーションとバイオオーグメンテーションの 2 つの手法がある。バイオスティミュレーションは薬剤のみを投入することで，土着の微生物を活性化させる手法である。一方，バイオオーグメンテーションは分解性能が優れた微生物を薬剤と一緒に外部から投入する手法である。バイオオーグメンテーションは，近年の DNA 解析技術の進歩により，汚染物質分解微生物の全ゲノム解析等も行われており，安全で汚染物質の高い分解能力を持つ微生物を投入することが可能であり，バイオスティミュレーションと比較し，工期を短くできる可能性がある一方，投入した微生物が十分にその分解活性を発揮できないケースも知られている。原因として，投入した微生物がサイトの環境条件に適応できないこと，投入した微生物と土着の微生物との相性（基質等の競合）等により，投入した微生物が十分生育できず，死滅してしまい，目的の汚染物質を十分分解できないこと等が考えられている。

そこで筆者らは，汚染物質分解菌の分解活性を促進する複数種の細菌を見出し，混合培養系であるコンソーシアを作成した。本コンソーシアは，汚染物質分解菌単一の場合と比較し，汚染物質分解活性が非常に高いことが分かっている。現在，本コンソーシアを用いたバイオオーグメンテーションについて，実サイトにおける汚染物質の分解性能や，生態系への影響，特に病原性のある微生物が増殖しないか等の安全性評価も含め，実用化に向けて最終段階の検討に入っている。

Bioremediation, Bioaugmentation, *Dehalococcoides*

発表責任者：小松大祐（d_komatsu@enbio-eng.com）

講演番号：4S24A3a5
講演日時、会場：3 月 27 日 10:55～ A3 会場

硝化菌の可培養化を基盤とする硝化複合微生物群のデザイン

Design of nitrifying complex microorganisms based on cultivation of nitrifying bacteria

○安藤 晃規、小川 順（京大院農）
○Akinori Ando, Jun Ogawa (Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

これまで、有機廃棄物は土壌の潜在力を頼りに施肥利用されてきた。投入された有機体窒素は、分解を受けアンモニアに変換され、さらに硝化細菌により亜硝酸イオン（NO_2^-）、硝酸イオン（NO_3^-）へと酸化される。硝化細菌は、主にアンモニア酸化菌群と亜硝酸酸化菌群により構成され、硝酸化成において鍵となる菌群として知られている。土壌中では、これらの微生物群が協調的に働くことで、作物への硝酸態窒素の供給を実現している。すなわち、植物の生育や作物生産における窒素供給の効率化には、硝化微生物群の理解と制御が不可欠である。しかし、独立栄養細菌である硝化細菌が難培養性であること、大量培養が困難であること、また、硝化反応自体が制御困難な複合微生物系であることなどが、基礎的な解析や応用展開へのボトルネックとなっていた。

一方で、ボトルネックを回避する作物生産技術として、植物工場に代表される無菌的な水耕栽培法が開発され、未来社会における重要な食糧生産技術と認識されている。しかしながら、微生物機能を排除した環境のため化学肥料しか用いることができず、環境負荷と施設維持コスト、病害への脆弱性の観点で課題を有している。

本講演では、難培養性の硝化細菌の制御に焦点を当てた土壌微生物群の解析と硝化細菌の可培養化と硝化複合微生物群のデザインによるこれらのボトルネックと課題への取り組みを紹介する。

１，硝化微生物群の馴養と有機質肥料活用型溶液栽培

有機態窒素の硝化に必須な土壌微生物群の馴養培養法と、構築した硝化微生物群を活用する有機質肥料活用型養液栽培が開発されている。本栽培法は有機物の栽培系への直接利用や、高い施肥効率や根圏病害抑制効果などの従来の水耕栽培では見られなかった特徴などを示す。

２，馴養培養時の窒素動態と微生物群の解析

硝化反応中の窒素動態と菌叢の推移を解析し、有機物の分解、アンモニア化成、硝酸化成の３つの役割を担う菌群が、比較的単純な菌群で構成されていることを明らかにし、硝化反応が単純な細菌群のみで再構成できる可能性を明らかにした。

３，硝化反応に関わる微生物生態機能の再構築

自然土壌でしか実現できなかった有機物の無機化に関して、硝化に関わる代表的な微生物を活用し、有機態窒素のアンモニア化成と硝酸化成を同時に実現する微生物群集の再構築に成功した。

４，難培養性硝化細菌の分離培養の検討

実栽培現場では多様な環境が想定され、さまざまな環境に適した硝化細菌が必要となる。これまでは、硝化細菌のコロニー化に１ヶ月以上の培養期間を要していたが、培養条件を精査することで比較的短期間でのコロニー肥大化に成功し、簡便な硝化菌の単離法を構築した。

nitrifying bacteria, ammonia oxidizing bacteria, nitrite oxidizing bacteria

発表責任者：安藤　晃規（aando@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4S24A3a6
講演日時、会場：3 月 27 日 11:20～ A3 会場

清酒醸造の自動制御の新たな扉　AI 活用によるブレイクスルー

New development of automatic control for sake brewing

○秦 洋二（月桂冠（株）総合研究所）
○Yoji HATA (Research Institute of Gekkeikan)

清酒醸造とは、麹菌と酵母の 2 種類の微生物を巧みに操りながら、アルコール度数 20%近くまで発酵させる世界に類を見ない醸造技術である。麹菌の糖化反応と酵母のアルコール発酵とのバランスをとりながら、「美味しい酒」を造るには、発酵期間中のきめ細やかな管理が欠かせない。適切な発酵管理を行うには、管理責任者である「杜氏」の勘・コツ・経験に頼るところが大きい。これまで、杜氏の経験に左右されることなく、清酒醸造を自動制御しようとする研究は数多くなされてきている。ここでは、これら自動制御に関する過去の研究を振り返るとともに、近年注目されてきた AI 技術により、発酵制御の新たな扉が開かれる可能性についても紹介したい。

清酒醸造は糖化と発酵が同時に進行する並行複発酵とされているが、もう一つ同時に進行する反応がある。それは「溶解」である。原料米の固体状のデンプンが、酵素の働きを受けて溶解する反応である。この溶解反応があるため、清酒もろみは固液混合の不均一な状態となり、その比率はもろみ経過とともに常に変化する。この溶解反応も同時に進行するため、もろみの状態を把握することが困難となり、自動制御を難しくさせている。我々は、原料処理としてあらかじめ原料米のデンプンをオリゴ糖まで分解して発酵させる「融米仕込み」を開発することにより、溶解反応を完了させて、もろみ中の反応を糖化と発酵だけで把握することができるようになった。そのため、もろみ中のグルコース濃度、アルコール濃度のシミュレーションが可能となり、自動制御の可能性が高まった。また制御のアウトプットとて、ファジー制御をとりいれることにより、常に将来を予測しながら制御量を調整できるようになった。これは、まさしく杜氏が、経験的に行っている制御技術と合致するものである。
またこのような数値シミュレーションだけでなく、杜氏の勘・コツ・経験は、様々な言語表現としても残されている。杜氏のノウハウを、「A のときは、B を行う」のような単純なルールに分解して、ナレッジデータベースを構築することができた。このように我々は過去の莫大なデータを参照することが可能となったが、このデータから新たな法則を生み出すまでにはいたっていない。そこで注目されるのは AI 技術である。これまで蓄積されたビッグデータを AI で解析することにより、精度の向上、不安定さの改善が図られるだけでなく、いままで見出せなかった新しい法則が導かれる可能性がある。まさしく杜氏を超える発想である。研究はまだまだで緒についたばかりであるが、その可能性について議論したい。

Sake Brewing, AI, Automatic control

発表責任者：秦　洋二（y_hata@gekkeikan.co.jp）

分野融合連携（他学会連携）シンポジウム

昨年度の本大会において，学術活動強化委員会企画シンポジウムとして他学会と合同企画でシンポジウムを開催いたしました．2019 年度大会はその流れをより一層加速することを目指して，当該シンポジウムを分野融合連携（他学会連携）シンポジウムと称することにいたしました．今回は，日本農芸化学会とも関連が深い，日本機能性食品医用学会，日本ゲノム微生物学会と 2 つのシンポジウムを行います．皆様，奮ってご参加ください．

3 月 26 日（火）9:00 ～ 12:00

3TJ1 【日本機能性食品医用学会との合同企画】 食品機能研究を担う両翼 ― 分子メカニズムの解明と臨床応用 ―

3 月 26 日（火） 9:00 ～ 12:00
共　催：日本機能性食品医用学会
会　場：A4 会場（1 号館　1 階　141）
世話人：宇都宮一典（東京慈恵会医科大学糖尿病・代謝・内分泌内科/日本機能性食品医用学会理事長），菅原達也（京大院農）
座　長：宇都宮一典（東京慈恵会医科大学糖尿病・代謝・内分泌内科/日本機能性食品医用学会理事長），菅原達也（京大院農）

9:00　はじめに ・・・

講演番号：3TJ1A4a1
講演日時、会場：3 月 26 日 09:05～ A4 会場

糖尿病における食事療法の意義と課題

Dietary thrapy and its related issue for management of typ 2 diabetes

○宇都宮 一典（東京慈恵会医科大学糖尿病・代謝・内分泌内科）
○Kazunori Utsunomiya (The Jikei Uniersity Shool of Medice)

健康寿命の延伸には、糖尿病をはじめとする生活習慣病の予防と管理が重要である。特に、糖尿病は多くの慢性疾患の基盤病態となることから、有効な予防・管理対策を立てることが、健康寿命の延伸に大きな意義をもつ。我が国における 2 型糖尿病の増加は、戦後の経済成長に伴う食生活の変化に起因している。日本は、世界の最長寿国となり、伝統的な日本食が最も健康的であることは、諸外国からも一致して評価されている。平成 25 年 12 月、ユネスコが和食を無形文化遺産に承認し、我が国の食文化に対する畏敬の念を表すものである。一方で、近年の栄養摂取状況の変遷の中に、糖尿病の増加につながる要因のあることも事実であり、内臓脂肪型肥満によるインスリン抵抗性を主体とする病態の増加は、確実に我が国の疾患構造に変化をもたらしている。このような状況を考えると、日本人の栄養摂取の在り方について、再検討すべき時期にきていると言えるよう。糖尿病における食事療法は、総エネルギー摂取量の適正化によって肥満を解消し、インスリン作用からみた需要と供給のバランスを円滑にし、高血糖のみならず、糖尿病における種々の病態を是正することを目的としている。インスリンの作用が、糖代謝のみならず、脂質ならびに蛋白質代謝など多岐に及んでいることを念頭に置き、食事療法を実践するにあたっては、個々の病態に合わせ、高血糖のみならず、あらゆる側面からその妥当性が検証されなければならならない。さらに、長期にわたる継続を可能にするためには、安全性とともに地域の食文化あるいは患者の嗜好性に配慮した指導が必要である。一方、糖尿病では動脈硬化性疾患や糖尿病腎症など種々の臓器障害を合併し、それぞれの食事基準が設定されていることから、その制約を受けることも忘れてはならない。このような包括的な視野に立って、栄養素摂取比率を勘案することが求められている。肥満の是正のためには、総エネルギー量の適正化が、最も重要である。しかし、自由生活下において、個々の必要エネルギーを正確に評価するとは困難である。従来、糖尿病の食事療法における指示エネルギーの処方には、標準体重を BMI22 とし、これに日常労作量から推定される値を乗じて設定する方法が、長く用いられてきた。これに従えば治療開始前の BMI によらず、一律に 22 を目指すことになるが、エネルギー必要量は年齢とともに変化し、個人差も著しく、実際的とは言えない。そこで、2016 年糖尿病診療ガイドラインでは、現体重の 5%の減量を目指し、その後、身体活動や代謝パラメーターを評価しながら、個々の適正体重とエネルギー必要量を決める、個別化を図ることが必要だとした。今後、日本人糖尿病の病態の多様化に伴って、個々の患者の価値観に基づいた食事療法の個別化が、一層求められよう。

Diabetes, Dietary Tharapy, Nutrition

講演番号：3TJ1A4a2
講演日時、会場：3 月 26 日 09:30～ A4 会場

脂肪組織機能を制御する食品由来成分に関する研究

Study of food ingredients which regulate functions of adipose tissues

○後藤 剛[1,2]、高橋 春弥[1]、野村 亘[1,2]、鄭 蕙芬[1]、荒 武[1]、河田 照雄[1,2] ([1]京大院農、[2]京大生理化学 U)

○Tsuyoshi Goto[1,2], Haruya Takahashi[1], Wataru Nomura[1,2], Huei-Fen Jheng[1], Takeshi Ara[1], Teruo Kawada[1,2] ([1]Grad. Sch. of Agric. Kyoto Univ., [2]Res. Unit for Physiol. Chem. Kyoto Univ.)

過栄養・運動不足に起因する肥満者の急増が世界的な健康問題となってきている。肥満は糖・脂質代謝異常症によって惹起される動脈硬化性疾患のみならず、がんや呼吸器系疾患による死亡リスクを増加させることが報告されている。また、肥満は認知症の危険因子となることも明らかになりつつあり、来るべき超高齢化社会に向け、肥満に対する新たな予防法の確立は重要な課題である。

肥満は脂肪組織の過剰蓄積状態と定義されるが、脂肪組織は白色脂肪組織と褐色脂肪組織に大別される。白色脂肪組織は主に白色脂肪細胞によって構成されている。白色脂肪細胞は余剰エネルギーをトリグリセリド（TG）の形で貯蔵し、絶食時など全身のエネルギー要求性が高まった際には、脂肪酸とグリセロールに分解し、エネルギー基質として全身に再供給する機能を有する。肥満状態の白色脂肪組織においては、脂肪滴の蓄積が亢進することにより白色脂肪細胞の肥大化が起こるとともに、白色脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインの分泌パターンに変化が生じ、このような変化が肥満時の病態発症の一因となっているものと考えられている。さらに、肥満時にはマクロファージに代表される免疫細胞の脂肪組織への浸潤が高まり、これらの免疫細胞と白色脂肪細胞との相互作用により、慢性炎症状態を呈することが知られている。脂肪組織の慢性炎症状態は肥満時に惹起されるインスリン抵抗性に代表される代謝異常の主要因となっていることが示されている。

白色脂肪組織が余剰エネルギーの蓄積機能を担うのに対し、褐色脂肪組織を主に構成する褐色脂肪細胞はミトコンドリア内膜上に存在する脱共役タンパク質 1（UCP1）の機能によって高い熱産生能を有し、褐色脂肪組織は寒冷下での体温維持等に重要な役割を果たしている。近年、成人の褐色脂肪組織活性が肥満度と逆相関することが示され、褐色脂肪組織も肥満に対する新たな標的組織として着目されつつある。

私達の研究室では、以前より白色・褐色脂肪組織機能に影響を与える食品成分について研究を行ってきた。これらの研究を通じて肥満や肥満に伴う代謝異常症に対して有効な可能性がある食品成分について見出してきている。本発表では、脂肪組織機能について概説するとともに、脂肪細胞機能調節作用を有する食品成分について、私達の研究結果を含め紹介する。

obesity, adipose tissue, food ingredients

発表責任者：後藤剛（tgoto@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3TJ1A4a3
講演日時、会場：3 月 26 日 09:55～ A4 会場

機能性食品の軟骨代謝に及ぼす影響

Effect of functional foods on cartilage metabolism

○長岡 功[1]、鶴田 曉史[1]、堀池 巧[2]、吉村 雅文[2] ([1]順天堂大医、[2]順天堂大スポーツ健康科学)
○ Isao NAGAOKA[1], Akifumi TSURUTA[1], Takumi HORIIKE[2], Masafumi YOSHIMURA[2] ([1]Juntendo Univ. Sch. of Med., [2]Juntendo Univ. Sch. of Health and Sports Sci)

変形性関節症（OA）は、徐々に進行する軟骨破壊によって局所の痛みと、慢性的に増強する運動機能の制限を来す疾患であり、膝の OA すなわち変形性膝関節症（膝 OA）がとりわけ多い。OA の評価には、JOA（日本整形外科学会 OA 膝治療成績判定基準)、JKOM（日本版変形性膝関節症患者機能評価表)、VAS（visual analogue scale）などのスコアが用いられている。しかし、これらのスコアは、疼痛や症状を評価するのに優れているものの、患者の主観に左右されることがある。また、関節病変は、X 線や、その他の画像に基づいて評価されるが、画像に変化を生じるには長期間の年月を必要とすることから、より短期間で病変を評価できる新たな手段が求められている。

さらに、関節軟骨の破壊・消耗が激しいスポーツでは、関節に故障を抱える選手が多く、将来 OA を発症する可能性が高いという報告もある。そのため、運動選手本人たちの主観的な訴えだけでなく、膝関節の状態を客観的に評価できるマーカーの開発が待たれている。

そのような状況のもと、関節の病態を客観的に評価するためにさまざまなバイオマーカーが研究されてきた。特に II 型コラーゲンは関節軟骨に特異的に存在するため、II 型コラーゲン分解と合成をみることは軟骨の病態評価に役立つと考えられている。

そこで本講演では、軟骨代謝を特異的に反映する II 型コラーゲンの分解マーカーと合成マーカーを用いて、膝 OA 患者と運動選手における軟骨代謝を検討した結果と、さらに「機能性表示食品」であるグルコサミンの運動選手に対する効果を検討した結果を紹介する。

biomarker, cartilage metabolism, athletes

発表責任者：長岡　功（nagaokai@juntendo.ac.jp）

講演番号：3TJ1A4a4
講演日時、会場：3 月 26 日 10:30～ A4 会場

機能性をもつ食品成分の探索と作用メカニズムの解明

Searching for and mechanism analysis of functional food ingredients

○井上 順（東農大・応生・農化）
○Jun INOUE (Tokyo Univ. of Agric.)

近年、多くの食品由来成分の代謝改善作用が明らかになり、その作用機構が精力的に解析されている。我々は、脂質代謝関連遺伝子の発現を制御する食品成分の探索を行い、代謝改善効果をもつ成分の探索を試みてきた。

SREBP は脂質代謝を包括的に制御する転写因子であり、その活性上昇は脂肪酸・コレステロール合成促進につながる。II 型糖尿病を発症しているマウスの肝臓では過剰に活性化しており、その活性を抑制することで症状が改善することから、肥満や糖尿病の治療・予防の分子標的として期待されている。

我々は SREBP の標的遺伝子として脂肪酸合成酵素（FAS）遺伝子を用い、SREBP 活性を抑制する食品成分の探索を行った。その結果、FAS 遺伝子発現を抑制する多くの成分の同定に成功し、さらにそれらが実際に SREBP 活性を抑制していることを明らかにした。見出した成分の SREBP 活性抑制メカニズムを解析したところ、大きく分けて次の 3 つのパターンに分類できた。（１）プロセシング抑制（２）成熟体 SREBP の分解促進（３）前駆体 SREBP の分解促進

また、今回見出した成分の肥満モデルマウスへの投与は、肝臓における SREBP-1 活性を低下させることに加えて、抗肥満作用や抗脂肪肝作用を示した。これらの一連の研究により、機能性をもつ食品成分を新たに見出し、その効果の作用機構を明らかにすることに成功した。

多くの場合、食品成分は効果が弱く作用する濃度が高いことから、それらの生体利用率の低さが生体での作用への大きな障壁となる。この点を改善する一つの方法として、異なる作用メカニズムで同様の活性を発揮する成分を同時に摂取することで、低濃度でさらに副作用を抑えつつ効率的に作用させることができると考えられる。今回見出した食品成分の同時投与がどのように作用するのかについて現在検討中である。

本研究により遺伝子発現レベルを変化させる成分を網羅的に探索することで、食品成分の新たな機能を見出すことができた。今後、より詳細な作用機構を解明することで、抗生活習慣病効果を有する新たな機能性食品開発への応用が期待される。

SREBP, Food factors

発表責任者：井上順（ji206785@nodai.ac.jp）

講演番号：3TJ1A4a5
講演日時、会場：3 月 26 日 10:55～ A4 会場

食塩感受性高血圧と環境要因　ゲノム修飾と病態
Salt sensitive hypertension and environmental factors, modification of genome and pathophysiology
○下澤 達雄（国際医療福祉大学）
○Tatsuo Shimosawa (Int U of Health and Welfare)

高血圧患者の血圧上昇メカニズムには体液量の増加と血管抵抗の増加があり、この 2 者が複雑に絡み合い、高血圧が維持される。加齢や糖尿病などでは血管内皮機能の低下により血管拡張性が低下するため血管抵抗が増大するため高血圧になりやすい。一方体液量の増加はなぜ起きるのか、腎臓からのナトリウム排泄が低下するメカニズムはどのようになっているのかはいまだ不明な点も多い。遺伝子解析から、体液量が増えやすくなる候補遺伝子がいくつか挙げられているものの、他の疾患の SNP 解析と比較すると高血圧候補遺伝子の SNP の寄与度は小さい。また、継時的に観察するとナトリウム摂取に対する血圧上昇反応は変化することも判ってきた。この知見はナトリウムの排泄異常は遺伝的に決まるのみならず、環境因子などによっても変わりうることを示唆する。われわれは交感神経活動がヒストンのアセチル化を介してナトリウム再吸収を亢進させることをすでに報告しているが、最近では腎臓内の酸化ストレスが直接にナトリウム輸送体のリン酸化を亢進してナトリウム排泄を阻害することを明らかにした。
本シンポジウムではナトリウム摂取による体液量増加のメカニズムとナトリウム排泄を促す可能性のある治療方法について概説する。

Hypertension, Salt, Epigenome

発表責任者：下澤達雄（tshimo-tky@umin.ac.jp）

講演番号：3TJ1A4a6
講演日時、会場：3 月 26 日 11:20～ A4 会場

食品成分の分析や吸収代謝研究から考える健康的生活

There are several issues about analysis of absorption and metabolism of food constituents, which make us rethink about what is "healthy life"

○仲川 清隆（東北大院農）
○Kiyotaka Nakagawa (Tohoku Univ. Agri.)

20 年以上も前になるが、演者が学生の時に、ボストンにあるタフツ大学のヒトの老化と栄養に関する研究所において、日本人の長寿と日本食の関係が討議され、食事ごとに飲用される緑茶の抗酸化作用などの生体機能性が欧米人に特に注目されたと聞いている。我が国の緑茶カテキン研究が多く紹介され、欠点も指摘されたそうである。それは、カテキンが特異的な紫外部吸収を持たないにも関わらず、当時はそれを利用して分析されていた点であったと聞いている。そこで演者は、ポリフェノール構造に特異的な化学発光を応用した高感度・高選択的分析法を開発し、緑茶一杯の飲用により、カテキンが確かにヒトの体内に吸収され、血中のカテキンおよび代謝された抱合型の濃度は増え、但し、抱合されるとカテキンの生理作用は弱まることを示し（詳しくは、総説「天然抗酸化物質の吸収と代謝」化学と生物，38，104-114，2000 を参照下さい)、農学博士の学位を頂いた。

その後に、たとえ試験管内（in vitro）試験で食品成分に生理機能が観察されても、その化学構造が生体内（in vivo）では代謝を受けて構造変化していることを度々経験し、こうした経験から、食品成分の消化管からの吸収と体内での代謝の理解は重要であることを身を以て学んだ。以来、食品成分の生体内での機能評価にあたっては、“選択性が高く高感度な分析手法を開発し、吸収や体内での代謝と代謝型を十分に考慮する”、こうしたストラテジーでの研究を常に心がけている。

本観点から研究を展開し、最近では例えば、(1) 認知症予防が期待されるリン脂質プラズマローゲン（Pls）をラットへ投与すると、吸収時にホスファチジルエタノールアミン型 Pls からホスファチジルコリン型-Pls への変換および sn-2 位へのアラキドン酸の比較的選択的な再エステル化が起きること、(2)メイラード反応産物の吸収はあまり知られていないが、粉乳は脂質（ホスファチジルエタノールアミン）と糖質によるメイラード反応産物を含み、この反応産物は少なからずラットへ吸収されること、(3)抗炎症などが期待されるフラボノイドであるルテオリンは、摂取するアグリコンや配糖体の違い、加えて、ラットとヒトの違いにより吸収代謝プロファイルが異なること、(4) γ-オリザノールの生理作用は代謝物であるフェルラ酸によると考えられてきたが、一部のγ-オリザノールがそのままの形で体内へ吸収され、長時間にわたって血中に存在すること、これらを見出してきた。

本講演では上記知見を紹介しつつ、食品成分の分析や吸収代謝研究の側面から健康的生活を考えたい。特に、特定保健用食品や機能性表示食品をはじめとする機能性食品などの開発では、その食品成分の消化吸収代謝を理解することは大切と考えられる。

Analysis, Absorption and metabolism, Food constituents

発表責任者：仲川清隆（nkgw@m.tohoku.ac.jp）

講演番号：3TJ2A4p1
講演日時、会場：3 月 26 日 14:00～ A4 会場

有用希少イノシトールを生産する枯草菌細胞工場

Bacillus subtilis cell factory for production of rare inositol

○吉田 健一、石川 周 (神戸大科技イノベ)
○Ken-ichi Yoshida, Shu Ishikawa (Kobe Univ.)

イノシトールはシクロヘキサンの各炭素上の水素原子が 1 つずつヒドロキシ基に置き換わった構造を持つ、シクリトールの 1 種である。ビタミン B 群の 1 種とも考えられた経緯があり、ヒトの場合は糖尿病などが原因で体内のイノシトールが不足すると、神経症状や発育不全が起こるなどの悪影響も知られている。イノシトールには 9 種類の立体異性体があり、中でもミオ-イノシトールは、自然界で最も豊富な異性体である。一方その他の異性体は一般に希少物質であるが、D-キロ-イノシトール[2]およびシロ-イノシトール[3, 4]は、それぞれ糖尿病およびアルツハイマー病の治療剤として期待されており、これらの効率的な生産方法の確立が待ち望まれている。

そこで、我々はリン酸の主な貯蔵形態として多くの植物組織に含まれており、特に農業廃棄物である米ぬかに豊富なフィチン酸（ミオ-イノシトール六リン酸）を原料としてシロ-イノシトールを生産するバイオテクノロジーの開発に着手した。フィターゼはフィチン酸から無機リン酸を切り落としてミオ-イノシトールを遊離させる酵素である。そこで、枯草菌において異種フィターゼを分泌させ[1]、米ぬかに含まれるフィチン酸をミオ-イノシトールに変換できる能力を付与した。さらに、枯草菌は元来、ミオ-イノシトール、シロ-イノシトールおよび D-キロ-イノシトールを含むイノシトール立体異性体を代謝する能力を有するので、この代謝経路を人為的に改変して、培養培地中に含まれるミオ-イノシトールをシロ-イノシトールに変換することに成功した[3, 4]。すなわち、このようにして米ぬかという農業廃棄物からシロ-イノシトールという有用物質を直接生産する枯草菌「バクテリア細胞工場」が育種されるに至った。

一方、一般に多くの生物においてミオ-イノシトールはグルコースからグルコース 6 リン酸、ミオ-イノシトール 1 リン酸を経て生成される。我々はこのミオ-イノシトール生成系を人工的に枯草菌に組み込み、グルコースから直接的にシロ-イノシトールを生産することにも成功している。本講演では、この開発経緯と現在の到達点についても紹介する予定である。

1) S. Tsuji, et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **79**, 1906-1914 (2015).
2) M.Yamaoka, et al., *Microb. Cell Fact*. **10**, 69 (2011).
3) K. Tanaka et al., *Microb. Cell Fact*. **12**, 124 (2013).
4) K. Tanaka et al., *Microb. Cell Fact*. **16**, 67 (2017).

inositol, Bacillus subtilis, cell factory

発表責任者：吉田　健一（kenyoshi@kobe-u.ac.jp）

講演番号：3TJ2A4p2
講演日時、会場：3 月 26 日 14:30～ A4 会場

新たな代謝解析手法による可逆的 TCA 回路の解明

A reversible TCA cycle revealed by a novel metabolomics approach

○布浦 拓郎（JAMSTEC）
○Takuro Nunoura (JAMSTEC)

環境微生物ゲノム解析に伴い、中央代謝やアミノ酸生合成系等生命活動の根幹に関わる代謝系においても、既存の代謝システムの部分的あるいは完全な欠失が想定される事例が数多く観察される。しかし、実際に欠失が存在するのか、あるいは機能を代替する未知酵素や未知経路が存在するのか、検証される事例は極めて限られる。それには、未知機能探索の定法である遺伝子操作系樹立に手間が掛かることは勿論であるが、既存の代謝解析や酵素精製によるアプローチも、培養の困難さ、非効率さ故に適応が極めて実施困難であることもその要因として上げられる。演者らの研究グループでは、僅か 10^8 細胞程度のバイオマスから中央代謝やアミノ酸生合成経路の機能検証が可能な手法を開発し、非常に増殖効率の低い好熱性水素酸化硫黄還元細菌 *Thermosulfidibacter takaii* に適応することで、本菌より、可逆的 tricarboxylic acid（TCA)回路を見出した。

T. takaii は水素を電子供与体、硫黄を電子受容体として、独立栄養条件でも混合栄養条件でも増殖する好熱菌である。ゲノム、トランスクリプトーム、プロテオーム、そして細胞抽出液中の酵素活性測定等全ての解析の結果は、TCA 回路が培養条件に関わらず恒常的に機能していること、特に独立条件化では TCA 回路が還元的に働くことで、炭素固定を行っていることを示唆していた。しかし、TCA 回路の機能方向の決定には代謝解析が不可欠であるが、*T. takaii* は増殖効率が低く、既存の代謝解析手法の適用は出来ない。そこで、演者らは新たに開発した手法を適用し、*T. takaii* が有機物の有無、そして、基質として添加した有機酸の種類により、TCA 回路の回転方向を極めて柔軟に変化させることで、炭素固定や有機物の取込を行っていることを明らかにしたのである。

参考文献

Nunoura T, et al. (2018) A primordial and reversible TCA cycle in a facultatively chemolithoautotrophic thermophile. Science, 359, 559-563

reversible TCA cycle, thermophile, metabolomics

発表責任者：布浦拓郎（takuron@jamstec.go.jp）

講演番号：3TJ2A4p3
講演日時、会場：3 月 26 日 15:00～ A4 会場

果実様香気成分を高生産する酵母変異株の育種

Breeding of sake yeast with enhanced productivity of fruity flavor component

○高橋 俊成（菊正宗）
○Toshinari TAKAHASHI (Kiku-Masamune Sake Brewing Co. Ltd.)

大吟醸酒の特徴香である吟醸香の主要成分は、酵母によって生合成される酢酸イソアミルとカプロン酸エチルである。これらの生合成は米の外層部に由来する不飽和脂肪酸によって阻害される。したがって、吟醸香を高めるには高精白米の利用が欠かせない。さらに低温で長期間の発酵が必要なため、手間とコストがかかり、高価な商品となる。一方、高精白すると、原料米に由来する米の旨み成分は減少する。低精白米を用いて吟醸香を高生産する酵母変異株を育種できれば、旨みと吟醸香を併せ持ち、かつコストを抑えた清酒の醸造が可能となる。本講演では、低精白米を用いた清酒醸造において吟醸香成分を高生産する酵母変異株の育種と実醸造への応用例を紹介する。

【酢酸イソアミル高生産酵母変異株の育種とその特性解析】清酒酵母 Km97 株（きょうかい 9 号酵母泡なし株由来アルギナーゼ欠損株）に突然変異を誘発し、イノシトールホスホリルセラミド合成酵素の阻害剤オーレオバシジン A 耐性株の中から、低精白米仕込みにおいて酢酸イソアミル生産能が向上した *hia*（high isoamyl acetate）*1* 株を選抜した。酢酸イソアミルはアルコールアセチルトランスフェラーゼ（AATase）によって生合成される。AATase をコードする *ATF1* 遺伝子の発現は不飽和脂肪酸による転写抑制を受けるが、*hia1* 株では親株に比べ *ATF1* の発現量および AATase 活性が増加し、*ATF1* の発現は不飽和脂肪酸による抑制を受けなかった。さらに *ATF1* の転写因子をコードする *MGA2* にナンセンス変異（706Ser*）が生じていることが明らかとなり、この変異が不飽和脂肪酸による *ATF1* 発現抑制の解除に関与することが明らかとなった。

【カプロン酸エチル高生産酵母変異株の育種とその特性解析】脂肪酸合成酵素阻害剤セルレニンに耐性を示す酵母変異株では、カプロン酸エチルの生産量が増加することが知られている。そこで、酢酸イソアミルおよびカプロン酸エチルの両成分を高生産する酵母を育種するため、*hia1* 株に突然変異を誘発し、得られたセルレニン耐性株の中から、低精白米仕込みにおいてカプロン酸エチル生産能が向上した *hec*（high ethyl caproate）*2* 株を選抜した。*hec2* 株ではカプロン酸エチル高生産能を付与する既知の *FAS2* 変異に加え、カプロイル-CoA からカプロン酸エチルへの生合成経路が活性化されていることが明らかとなった。

以上の研究成果に基づき、低精白米を用いた *hec2* 株の実醸造試験を行ったところ、製成酒において吟醸香成分を高含有することが明らかとなり、純米酒「香醸」、しぼりたて「ギンパック」として商品化に成功した。

Saccharomyces cerevisiae, isoamyl acetate, ethyl caproate

発表責任者：高橋　俊成（t-takahasi@kikumasamune.co.jp）

講演番号：3TJ2A4p4
講演日時、会場：3 月 26 日 15:30～ A4 会場

微生物統合データベース「MicrobeDB.jp」

Integrated Database for Microbes “MicrobeDB.jp”

森 宙史、東 光一、藤澤 貴智、MicrobeDB.jp プロジェクトチーム、○黒川 顕（遺伝研）
Hiroshi Mori, Koichi Higashi, Takatomo Fujisawa, MicrobeDB.jp Project Team, ○Ken Kurokawa (National Institute of Genetics)

我々はセマンティックウェブ技術を徹底的に導入する事で微生物に関する多様な知識やデータをオントロジーによって整理・統合したデータベース「MicrobeDB.jp」（https://microbedb.jp/）を開発している。本データベースには、公共データベースに収録されている膨大なメタゲノムデータを同一の解析パイプライン「VITCOMIC2」（http://vitcomic.org/）にて全て再解析した結果を収録しており、それらを検索・閲覧・比較することが可能である。また、独自のゲノム・メタゲノムデータを登録することで、公共データとの比較解析も可能としている。
この MicrobeDB.jpに含まれる数万サンプルにおよぶ微生物群集構造データに機械学習技術を適用し、地球上のあらゆる環境に生息する微生物群集の関連性を俯瞰的に評価するシステム「LEA（Latent Environment Allocation）」（http://leamicrobe.jp/）を開発した。大量のメタゲノムデータに対して機械学習を適用することで、微生物群集の形成に影響を与える環境パターンが自動的に抽出でき、新規微生物群集サンプルの性質を高速に評価することが可能となる。すなわち、新規微生物群集の由来環境の、一般的に見られる状態からの「逸脱」を的確に検出することが可能である。本システムは、ヒト共生微生物を利用した疾患の新たな診断や、環境汚染の検出、さらに創薬、化粧品、食品、健康、土木、建築、住宅、農業、畜産業、水産業、土壌改良、上下水・排水処理など、微生物群集の分析、制御などを目的とした事業全般に応用可能である。
本講演では、統合データベースの活用方法や将来的展望に関して述べる。

microbiome, metagenome, database

発表責任者：黒川顕（kk@nig.ac.jp）

講演番号：3TJ2A4p5
講演日時、会場：3 月 26 日 16:00～ A4 会場

麹菌群のゲノム研究とゲノム編集技術
Genome and genome editing study of *Aspergillus oryzae*
○岩下 和裕 (独立行政法人酒類総合研究所)
○Kazuhiro Iwashita (NRIB)

我々のラボでは、麹菌(*Aspergillus oryzae*) RIB40 株のゲノムが解読されて以来、麹菌株群について広くゲノム解析を行ってきた。さらに、近年では Cas9 タンパク質の直接導入により、自然に単離された変異株と同様の変異を持った株を得ることに成功している。本シンポジウムでは、麹菌のゲノム進化と突然変異により起こりうるゲノムの構造変化について紹介する。これにより、ゲノム編集技術開発・応用研究について議論するための基盤的な情報提供を目的とした。

麹菌は１倍体で多核の微生物であり、有性生殖が発見されていない不完全菌類である。また、非相同末端結合(NHEJ)の作用が非常に強く、これは生活環の多くを１倍体の麹菌には重要な機能であると考えられる。そのために、*ligD* 欠損株が取得されるまでは相同組換え効率が低く、遺伝子操作が大変難しい微生物であった。多核であることと高い NHEJ 活性は、麹菌のゲノム進化にも影響を与えていると考えられる。糸状菌の自然突然変異確率は $1x10^{7}$ 程度であり、通常の麹菌の培養や製麹では、これ以上の変化が生じ、修復されていると考えられる。麹菌のゲノムアレイによる解析では、麹菌株群は 13 の系統に分かれ、500kb 以上の欠失も高頻度に起こっていることが示唆された。これらの株群のパルスフィールドゲル電気泳動により、系統間はもちろん、系統内においても高頻度に染色体間組換えが生じていることが示唆された。ゲノムシーケンスによる麹菌株間の比較解析の結果、実際に高頻度の欠失・挿入、染色体間組換えが確認された。麹菌のゲノム進化では、塩基レベルの置換や挿入・欠失だけでなく、大規模欠失、染色体間組換えも高頻度に生じていることが確認された。さらに、イオンビームや紫外線処理が与えるゲノムの影響について、ゲノムアレイや局所的なゲノムシーケンスにより検討した結果、点変異はもちろん、比較ゲノム解析で見られたような染色体の大規模欠損が確認された。また、PCR によって変異箇所を増幅できないものもあることから、染色体間組換えも示唆されている。このことから、麹菌は通常の変異処理によって、点変異だけでなく染色体構造レベルの構造変化を生じる微生物であることがわかる。

一方で、麹菌が持つ NHED の高活性はゲノム編集には都合が良い。我々は、Cas9 タンパク質による麹菌のゲノム編集技術を開発し、より効率の良い目的遺伝子の変異株の単離方法である co-genome editing 法も確立している。ゲノム編集により得られた麹菌のターゲット領域の解析から、１塩基欠損による点変異と数 kb 規模の大規模領域欠損を確認しており、これらの現象は、麹菌のゲノム進化研究の研究と一致する。これらの情報を元に今後のゲノム編集研究のあり方について議論したい。

Aspergillus oryzae, genome editing, genome evolution

発表責任者：岩下和裕（iwashitact@nrib.go.jp）

講演番号：3TJ2A4p6
講演日時、会場：3 月 26 日 16:30～ A4 会場

次世代シーケンサーを用いた病原細菌におけるゲノム解析の進展
Advance in genome analysis of pathogenic bacteria using NGS

○林 哲也（九大院医）
○Tetsuya Hayashi (Kyushu Univ.)

次世代シーケンサの急速な性能向上と普及は、生命科学の多くの分野において革命的な進展をもたらしている。病原細菌の分野においても、かつては到底実施不可能であった様々な研究が可能となり、新たな展開が生まれてきている。RNA-Seq や ChIP-Seq などによる functional genomics における次世代シーケンサの活用もさることながら、多数の菌株を対象とした comparative genomics では、極めて大きな規模の比較解析を高精度に実施することが可能となり、様々な菌種において解析が進み、特に大きな変容を遂げつつある。本講演では、我々の研究室での経験を基に、キャピラリーシーケンサ時代の比較ゲノム解析の例を幾つか示したうえで、

（１）科・属・種や血清型・病原型などの切り口で多数の菌株（数百から数千株）を網羅した大規模な比較ゲノム解析とそういったゲノム解析から得られるゲノムワイドな SNP 情報を用いた高精度な系統解析

（２）院内感染や市中での集団感染への次世代シーケンサを用いたゲノム解析（クリニカルシーケンシング clinical sequencing）

に関する具体例を示し、次世代シーケンサの性能向上と普及によってもたらされつつある病原細菌学分野での比較ゲノム研究の進展を紹介する。

pathogenic bacteria, genome analysis, NGS

発表責任者：林哲也（thayash@bact.med.kyushu-u.ac.jp）

ランチョンシンポジウムプログラム

ランチョンセミナー・ランチョンシンポジウムのチケットは，当日の朝に東京農業大学１号館１階出入口ロビー「ランチョンセミナー・ランチョンシンポジウムチケット配布デスク」にて配布します．（入口が３か所ありますので，キャンパスマップを確認下さい．）開催日当日，8:15 より配布します．チケット配布の際，大会参加証にチケット受領の押印をしますので，大会参加登録をお済ませの上，チケットを受け取り，開始５分前までに会場にお越しください．空席がある場合は，チケットがなくても入場できます．

3 月 24 日（日）12:30 ～ 13:30

1LS01　大学教育の改革とその将来像

3 月 24 日（日） 12:30 ～ 13:30
主　催：（公社）日本農芸化学会 JABEE 対応委員会
後　援：（公財）農学会
会　場：C5 会場（1 号館　3 階　343）
世話人：江坂宗春（広大院生物圏科学），小原章裕（名城大農）
座　長：小原章裕（名城大農）

12:30　1LS01–1　**JABEE と大学教育改革** ……○江坂宗春（広大生物圏科学）
12:35　1LS01–2　**大学教育の改革とその将来像** ……○森　晃憲（文部科学省 大臣官房審議官）
13:00　1LS01–3　**経済界の求める人材像と大学に期待される改革** ……○長谷川知子（経団連 SDGs 本部 本部長）
13:25　**閉会の挨拶** ……野尻秀昭（東大生物工学セ）

3 月 26 日（火）12:30 ～ 13:20

3LS01　男女共同参画ランチョンシンポジウム（フォーラム）「一人の社会人として皆が幸せな社会の実現を」

3 月 26 日（火） 12:30 ～ 13:20
後　援：男女共同参画学協会連絡会
会　場：レストランすずしろ

12:30　**開会の挨拶** ……裏出令子（京都大学複合原子力科学研究所）

12:40　3LS01–1　**「女性研究者のワークライフバランス～何でも欲張って楽しむこと」**……飯島陽子（神奈川工科大学）
海外でも研究してみたい，研究と子育てを両立したい，ポスドクを脱却したい…　戦略と勢いでなんとかなります．これまでの自身の苦楽経験を踏まえ，ざっくばらんにお話できればと思います．

3LS01–2　**「私らしく生きる人生の途中経過」**……丸山千登勢（福井県立大学生物資源学部）
「やってみて失敗したのは，ただの失敗．やらずにいるのは大失敗」．私の人生の様々な岐路において，選択を支えてくれた言葉です．一つの生き方の例としてご紹介したいと思います．

3LS01–3　**「大学における男女共同参画の取り組みに求められるものとは？」**
……室田佳恵子（島根大学学術研究院農生命科学系）
これまでに大学で参加した男女共同参画に関わる取り組みについて紹介します．女子学生の理工系進学を応援するためのアイディアを一緒に考えましょう．

3LS01–4　**「企業での研究とは？」**……大室　繭（アサヒビール（株））
企業での研究と商品開発の経験をふまえ，モノづくりに活かせる研究をするということ，その面白さや難しさについて感じたことをお話しします．

3LS01–5　**「女性企業研究者の生活と雑感」**……田中美順（森永乳業（株））
企業での研究と育児（保育園探し～各受験そして今）について，これまでの経験とその時期考えていたことについて，ざっくばらんにお話致します．

3LS01–6　**「企業研究者としての喜び，悩み」**……冨森菜美乃（サントリーウエルネス（株））
企業研究者として感じること，仕事と家事・子育て等のワークライフバランスの実現を目指す中での試行錯誤や感じることなどをお話し，自分にあった働き方を見つける一助になれば幸いです．

3LS01–7　**「難病の子どもがいる研究生活」**……伊藤康博　（農業・食品産業技術総合研究機構）
子ども二人，そのうち一人は知的障害と心臓病を抱えています．父親として家事と子育て，また研究成果を上げるために気を付けていること，これまでの経験をお話しします．

3LS01–8　**「スペシャリストからジェネラリストへの転換」**……永野　愛（協和発酵バイオ（株））
研究職から開発職，企画管理職へと仕事内容が推移してきた経験を踏まえ，何故この進路を選択したのか，今どのような仕事をしているのか，企画管理業務の面白さや，仕事を通して今感じていることをお話しします．

3LS01–9　**「子育てを通して広がる，社会との接点」**……石井正治（東京大学大学院農学生命科学研究科）
結婚して１５年間ただ家に帰って寝るだけだった場所が，子どもが産まれてからは身近な社会となり，その社会を夫婦ともども愛おしく思うようになっていた．子育ての面白大変さを軸に話します．

3LS01–10　**「ワンオペ育児のライフ，そしてワーク」**……向井理恵（徳大院・社会産業理工・生物）
夫と別居かつ親戚も県外の状況で，1 歳児を育てている様子をお話しいたます．ワークライフバランスというけれど，ワークはライフが整ってこそ，と感じている日々です．

13:15　**閉会の挨拶** ……熊谷日登美（日本大学生物資源科学部）

3月26日（火）12:30 ～ 13:20

3LS02　BBB　ランチョンセミナー　「研究者による自己アピール」～より広く伝えることの意義

昨年度，英文誌編集員会ではオープンサイエンスについての話題をとりあげ，好評をいただきました．本年度は，研究者によるアピールをテーマにしたセミナーを開催致します．

英文誌 Biosci. Biotechnol. Biochem. は，その長い歴史を通じて，幅広い研究領域における質の高い論文を掲載し続けてきました．2016 年から出版を委託している Taylor & Francis 社においては，同社が出版を手がけるジャーナルの中でも最もダウンロード数が多い雑誌として高く評価されています．しかし，未だそれに見合ったレベルのインパクトファクター値を得ていません．このギャップはどこから来るのでしょうか？

一人目の講演者である Taylor & Francis 社のキムリカ氏は，本誌の著者は他に比較して自らの成果を引用することに控えめである可能性を挙げます．論文がアクセプトされることは一つのゴールですが，そこで終わってはいけない，と同氏は呼びかけます．本講演では，他誌における自己引用率のデータ等も踏まえ，今後に向けた取り組みに示唆を与えて頂きます．

研究者が自らの成果を積極的に広報することの重要性は，ジャーナルの問題に留まりません．本セミナーでは，二人目の講演者としてリサーチアドミニストレーターの統括役として活躍を続ける小泉　周先生をお招きします．かつて，和文誌『化学と生物』に関連の話題を寄稿下さった先生は，研究力を「厚み」で評価する新しい取り組みを進めることでも知られる医学領域の研究者です．その深いご経験から，研究者による自己アピールのあり方についてアドバイスをいただきます．

本学会の成果をより広く伝えかつ評価されるためには何ができるのか？―この機会を通じてご一緒に考えて参りたいと思います．

主　催：(公社)日本農芸化学会英文誌編集委員会
協　賛：Taylor & Francis Group
世話人：上田賢志（日本大学生物資源科学部），鈴木義人（茨城大学農学部）
日　時：2019 年 3 月 26 日（火）12:30 ～ 13:20
会　場：C5 会場（東京農業大学　1 号館 3 階 343）

12:30～12:35　開会の挨拶 ‥‥‥

講演番号：1LS01-1
講演日時、会場：3 月 24 日 12:30～ C5 会場

JABEE と大学教育改革
JABEE and Reform of University Education

○江坂 宗春（広大生物圏科学）
○Muneharu Esaka (Hiroshima Univ.)

一般社団法人 日本技術者教育認定機構 JABEE（Japan Accreditation Board for Engineering Education）は、国際的に通用する技術者の育成のため、技術者教育の振興、大学や高専の技術者教育プログラムの審査・認定を行う機構である（http://www.jabee.org を参照）。2001 年度に認定開始後、累計 506 プログラムが認定され、認定プログラムの修了生の累計は約 28 万人に達している。

日本農芸化学会は、JABEE 対応委員会を組織し、農学系 17 学会が加盟する公益財団法人 農学会・農学教育推進委員会のもとで、JABEE 農学一般関連分野の審査に加わるとともに、「生物工学および生物工学関連分野」とも連携しながら、JABEE 講習会、JABEE 普及指導活動等を行っている。

また、JABEE 対応委員会は、全国大会時に、以下のような教育シンポジウムを開催してきている。

・2007 年度「日本農芸化学会と JABEE」
・2008 年度「農芸化学における魅力ある大学教育と JABEE」
・2009 年度「農芸化学分野の大学院における技術者、研究者養成教育の改革」
・2010 年度「農芸化学における教育改革と分野別質保証」
・2011 年度「JABEE とキャリア教育」（東日本大震災で中止）
・2012 年度「農芸化学における人材育成」
・2013 年度「大学・大学院での教育改革と人材養成」
・2014 年度「農学系人材養成に関する最近の取り組みについて」
・2015 年度「グローバル人材育成と教育改革」
・2016 年度「技術者・研究者人生における技術士資格の意義とメリット」
・2017 年度「農芸化学における技術者教育、技術士養成」
・2018 年度「農学って、なあに？ -農学教育の未来ビジョン-」

現在、農芸化学会の JABEE 対応委員会は、JABEE に特化するのではなく、広く農学・農芸化学教育の推進をはかる委員会として位置付けている。

今回のシンポジウムは、「大学教育の改革とその将来像」とし、文部科学省、および、経団連の方から、大学の将来像、大学教育はどうあるべきか、大学改革の方向性と未来ビジョンについて提言してもらい、大学教育の質保証を担保しながら、有能な人材を育成するための方策について討論したい。

JABEE, University reform, Educational reform

発表責任者：江坂（mesaka@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：1LS01-2
講演日時、会場：3 月 24 日 12:35～ C5 会場

大学教育の改革とその将来像
Reform on University Education and its prospect

○森 晃憲（文部科学省）
○Akinori MORI (Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Tchnology)

社会が変化し続けるなかで将来を展望して、わが国の大学等の高等教育機関に対しては、さまざまな課題について意見、要望が寄せられている。また、今後、18 歳人口の減少が見込まれるところ、それを見据えて、大学等の在り方を考えていく必要がある。

文部科学省の中央教育審議会大学分科会では、「2040 年に向けた高等教育のグランドデザイン」について議論を行ってきており、今般、答申を行う予定である。そこでは、学修者本位の教育への転換を目指して、多様性と柔軟性を確保しながら教育研究体制の充実と教育の質の保証を求めている。この答申の内容を紹介しつつ、現在、文部科学省が進めてようとしている取り組みを説明し、日本の大学教育が進むべき方向などについて議論できればと思っている。

learning outcomes, professional faculty, quality assurance

講演番号：1LS01-3
講演日時、会場：3 月 24 日 13:00～ C5 会場

経済界の求める人材像と大学に期待される改革

University Reform and educational reform expected by the Business Community

○長谷川 知子（経団連）
○Tomoko HASEGAWA (Keidanren)

人口減少社会の到来による労働力不足の壁を乗り越えるには、質の高い教育を受けた多様な能力を持つ人材と、そうした人材を育成する多様な高等教育機関の存在が不可欠である。また、経団連が目指す Society 5.0 の実現に必要なイノベーションを生み出すエコシステムの確立には、教育・研究の両面で大学が重要な役割を担っており、大学の競争力強化は必須と言える。

こうした中、政府の各種会議でも大学改革について検討がなされ、また文部科学省の中央教育審議会では、大学の再編・統合などを含む将来構想について、昨年 11 月に答申を行っている。

そこで、経団連としても、「大学教育の質の向上」、「そのために必要な大学の再編・統合」、「大学のマネジメント力や財務基盤の強化」の 3 点に絞って、昨年 6 月に提言を取りまとめ公表した。また、12 月には、経団連が今年 10 月に 2021 年度以降入社対象の「採用選考に関する指針」を策定しないことを受け、課題として認識された今後の採用活動と大学教育のあり方についての提案も公表している。当日は、これらの二つの提言を踏まえ、経済界の求める人材像と大学に期待される改革についてお話ししたい。

university reform, educational reform, human resource development

ランチョンセミナー　プログラム

本大会のランチョンセミナーのチケットは，セミナー開催当日の朝に，東京農業大学 1 号館 1 階入り口付近「ランチョンセミナー・ランチョンシンポジウムチケット配布デスク」にて配布します．配布時間は，3 月 24 日，26，27 日とも 8:15 ～ 10:15 です．

チケット配布の際，大会参加証にチケット受領の押印をしますので，大会参加登録をお済ませの上，チケットをお受け取り下さい．

チケット配布は，定員に達した時点で終了します．

チケットは，12:30 を過ぎると無効になります．その後はチケットをお持ちでない方と同等の扱いとなりますのでご注意ください．チケットをお持ちでない方は，ランチョンセミナー・ランチョンシンポジウムに参加できません．ただし，空席がある場合はこの限りではありません．

3 月 24 日（日）12:30 ～ 13:20

LS 1-1　Wavefunction, Inc.

C1 会場（1 号館　3F　331）

司会：渡邊 裕介（Wavefunction, Inc.）

Spartan'18 のご紹介

1. Spartan'18 のご紹介

渡邊 裕介（Wavefunction, Inc.）

2. Spartan'18 による天然物の 13C 化学シフト計算：改良点と応用

橋本　勝（弘前大学）

LS 1-2　株式会社リバネス

D5 会場（1 号館　4F　443）

司会：高橋 宏之（株式会社リバネス）

研究を社会実装するためのプロジェクトを生み出すリバネスの挑戦
～農芸化学のみなさまと仕掛けたいこと～

高橋 宏之（株式会社リバネス）

LS 1-3　株式会社島津製作所

D1 会場（1 号館　4F　431）

司会：渡辺 淳（株式会社島津製作所）

島津製作所の最新分析ソリューションのご紹介

1. 超臨界流体を用いて前処理操作や分離分析の課題を解決！

松本 恵子（株式会社島津製作所）

2. ここまでできる！バクテリアの MALDI-MS プロテオタイピング

寺本 華奈江（株式会社島津製作所）

3 月 26 日（火）12:30 ～ 13:20

LS 2-1　東ソー株式会社

C1 会場（1 号館　3F　331）

ファージライブラリと次世代シークエンサーを使った抗体，ペプチドの進化分子工学的設計
～ノーベル賞技術を基礎から解説～

伊東 祐二（鹿児島大学 大学院理工学研究科）

LS 2-2　ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社

B1 会場（1 号館　2F　231）

メタボロミクスを利用した腸内細菌叢の代謝系の解析とその応用

松本 光晴（協同乳業株式会社）

LS 2-3　日東薬品工業株式会社　D1 会場（1 号館　4F　431）

座長：小川 順（京都大学 大学院農学研究科）

そしてすべてはつながっている
～ポストバイオティクス “HYA” を軸に明かされつつある口－腸連関と腸内細菌機能～
腸内細菌由来脂肪酸代謝物の歯周病に対する効果

山崎 和久（新潟大学 大学院医歯学総合研究科）

LS 2-4　SCIEX　D5 会場（1 号館　4F　443）

司会：結束 一成（SCIEX）

Physicochemical screening による微生物新規物質の探索

中島 琢自（北里大学 北里生命科学研究所）

LS 2-5　サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社　B5 会場（1 号館　2F　243）

液体クロマトグラフから質量分析計まで最新技術紹介
定量，定性分析のためのさまざまな分離，検出技術

窪田 雅之（サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社）

LS 2-6　タカラバイオ株式会社　E5 会場（1 号館　5F　543）

司会：大場 利治（タカラバイオ株式会社）

MIG-seq 法：次世代シーケンサーを用いた手軽なゲノムワイド塩基配列分析

陶山 佳久（東北大学 大学院農学研究科）

LS 2-7　味の素株式会社　E2 会場（1 号館　5F　532）

司会：中沼 新吾（味の素株式会社）

骨格筋のアミノ酸代謝と応答
～サルコペニア対策への応用～

小林 久峰（味の素株式会社）

3 月 27 日（水）12:30 ～ 13:20

LS 3-1　日本ウォーターズ株式会社　C5 会場（1 号館　3F　343）

たった数秒で食品の品質と偽装を判断
～直接イオン化による質量分析～

寺崎 真樹（日本ウォーターズ株式会社）

WAVEFUNCTION

日本農芸化学会 2019 年度大会
ランチョンセミナー LS1-1

日時：3 月 24 日 (日)　12:30 ～ 13:20

場所：C 1 会場
東京農業大学 世田谷キャンパス 1 号館 3F 331

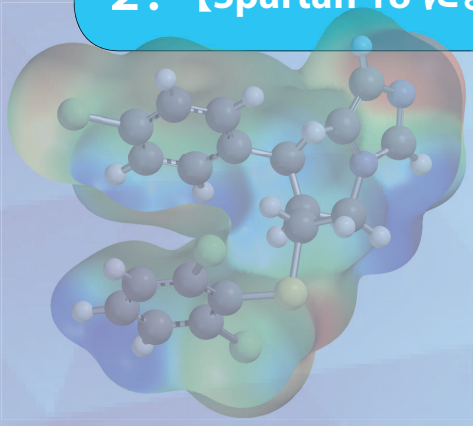
Spartan'18
For windows,Macintosh and Linux

・Spartan(スパルタン) は、最新式の可視化機能と強力な計算エンジンを装備した、安価で使いやすい分子モデリングソフトウェアです。
・今回リリースした Spartan'18 では、特に 13C NMR 化学シフトの再現性を強化、DFT 計算結果を経験的補正を加え、さらに 1600 を超える天然物データと比較検証することで平均誤差 2-3ppm を実現しました。
・本ランチョンセミナーでは、13C NMR 化学シフトの計算を中心に、Spartan'18 を紹介します。

1．【Spartan'18 のご紹介】

Wavefunction, Inc.　渡邊　裕介

2．【Spartan'18 による天然物の 13C 化学シフト計算：改良点と応用】



弘前大学　**橋本　勝** 先生
農学生命科学部 分子生命科学科　教授

Leave a Nest

日本農芸化学会2019年度大会
ランチョンセミナー（L1-2）

研究を社会実装するためのプロジェクトを生み出すリバネスの挑戦
～農芸化学のみなさまと仕掛けたいこと～

日時：2019年3月24日（金）　12:30 – 13:20
会場：D５（1号館 4F 443）

リバネスでは、多様な分野の研究者、企業、さらには町工場など、異分野どうしの知識を組み合わせて新たな研究を生み出すことにチャレンジし続けています。

本セミナーでは、研究者と大企業、ベンチャー、町工場と連携することで研究の幅を広げる取組み、研究者自身が自分の研究成果を社会実装するためのプログラム、研究キャリアの多様性を広げて研究人材が活躍する場を作る取組みを中心にお話しさせていただきます。

また、マレーシアのマレーシア工科大学内に開設したバイオ系ベンチャーのインキュベーションと研究人材の育成を行う「NEST-BIO VENTURE LABORATORY」についても、設立の経緯や、日本の研究者や企業とどのようなことを仕掛けていきたいと考えているかについてお話しします。

農芸化学会に参加しているアカデミア、企業の方々と、研究成果の事業化や新規の共同研究プロジェクトの創出などを一緒に生み出していきたいと考えています。こうした機会を探している方は、ぜひ本セミナーにご参加ください。

[リバネスがアカデミアの研究者と取組んでいる主なプロジェクト]

LNest Grant
リバネス研究費
40歳以下の研究者を対象にした、アカデミアと企業のつながりを創出する研究助成

Hyper Interdisciplinary Conference
アカデミア、大企業、ベンチャー、町工場、生産者、中高生らが集まり新しい研究を生み出すための場

Real-Tech Seed Acceleration Program
TECH PLANTER
アカデミアの研究者が持つ研究成果の社会実装を加速する、シーズの発掘・育成プログラム

L-RAD
未採択の研究申請書を生かした企業との共同研究の創出

SCIENCE CASTLE
国内外で開催中の中高生のための学会

CDF Career Discovery Forum
未来の仲間を集め、未来のキャリアを創造/想像する場

共催：株式会社リバネス
https://lne.st　E-mail：info@Lne.st

SHIMADZU
Excellence in Science

日本農芸化学会2019年度大会

ランチョンセミナーのご案内

LS1-3 島津製作所の最新分析ソリューションのご紹介

日時 2019年3月24日(日) 12:30～13:20

会場 D1会場(東京農業大学 世田谷キャンパス 1号館4F 431)

講演1 **超臨界流体を用いて前処理操作や分離分析の課題を解決!**

松本　恵子 (株式会社島津製作所)

超臨界流体クロマトグラフィーは、液体クロマトグラフィーとは異なる分離特性を有し、構造異性体や性質が類似した夾雑物質との分離など従来からの課題にソリューションを提供します。また、オンライン超臨界流体抽出/超臨界流体クロマトグラフによる前処理の簡略化についても合わせてご紹介します。

講演2 **ここまでできる!バクテリアのMALDI-MSプロテオタイピング**

寺本　華奈江 (株式会社島津製作所)

MALDI-MSを用いた微生物の属や種の同定は良く知られていますが、同種でも様々な特徴をもつバクテリアでは亜種や株レベルでの分析も重要視され始めています。アクネ菌のMALDI-MSプロテオタイピングなどを例に、Strain Solution™や去年9月にリリースしたばかりのeMSTAT Solution™など、マススペクトルを簡単に解析できるソフトウェアをご紹介します。

司会:渡邉　淳 (株式会社島津製作所)

お問合せ
(株)島津製作所　分析計測事業部　グローバルマーケティング部
〒604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1　TEL:075-823-1352

The 2019 Annual Meeting of The Japan Society for Bioscience, Biotechnology and Agrochemistry

日本農芸化学会 2019 年度大会

東ソー ランチョンセミナー

プログラムNo. **LS2-1**

演題

ファージライブラリと次世代シークエンサーを使った抗体、ペプチドの進化分子工学的設計 ～ノーベル賞技術を基礎から解説～

日時

2019年3月26日(火)
12:30 - 13:20

会場

C1会場(1号館 3F 331)
東京農業大学 世田谷キャンパス

演者

伊東 祐二 先生
(鹿児島大学大学院理工学研究科 教授)

ファージディスプレイは、大腸菌に感染するバクテリオファージの表面タンパク質の遺伝子に、外来性の遺伝子を融合することで、その遺伝子産物であるペプチド・タンパク質をファージ粒子の表面に提示する技術であり、この技術を使って、分子ライブラリ(ペプチドやタンパク質の多様な変異混合物)をファージ表面に提示したものをファージライブラリと呼んでいる。2018年、米国のJ.P. Smithと英国のG. Winter、両博士が、この技術開発の貢献者として、ノーベル化学賞を受賞したことは記憶に新しい。

このファージライブラリから、バイオパンニングという選別手法を使って、現在までに、多くの機能性ペプチドや抗体分子の単離・デザイン研究がおこなわれてきた。本セミナーでは、我々の研究を通して、その進化分子工学的設計における有用性、有効性を明らかにするとともに、近年、ゲノム解析において利用されている次世代シークエンサーを用いた網羅的配列解析の導入による効率的な機能分子同定法について紹介したい。特に、このような手法で単離同定した抗体結合ペプチドや脳移行性抗体などを利用した新たな抗体医薬品開発へのアプローチについても触れる。

TOSOH
東ソー株式会社
バイオサイエンス事業部

本 社／〒105-8623 東京都港区芝3-8-2 芝公園ファーストビル
TEL 03-5427-5180 FAX 03-5427-5220
大 阪 支 店 ☎ (06) 6209-1948 名古屋支店 ☎ (052) 211-5730
福 岡 支 店 ☎ (092) 781-0481 仙 台 支 店 ☎ (022) 266-2341
山口営業所 ☎ (0834) 63-9888
http://www.separations.asia.tosohbioscience.com/

C1812GX.A

LS2-2　日本農芸化学会 2019 年度大会ランチョンセミナー

メタボロミクスを利用した腸内細菌叢の代謝系の解析とその応用

日時　2019 年 3 月 26 日 (火)　12:30 ～ 13:20

場所　B 1 会場　　1 号館 2F 231

演者　協同乳業株式会社研究所 技術開発グループ

松本光晴先生

腸内容物メタボローム（低分子代謝産物）は、腸管腔から吸収され血中に移行した場合、全身を巡る可能性が高く健康への影響は大きい。そのため、腸内環境と宿主のクロストーク研究において、腸内マイクロバイオーム解析と同様にメタボローム解析も必須である。本セミナーでは、演者らが、約 10 年前からメタボロミクスを利用して蓄積してきた腸管腔内メタボロームの基礎的データと、それを利用して、腸内マイクロバイオームの代謝制御技術（食品）の開発を目指した応用例を紹介する。また、「応用研究のための基礎データ収集」という視点でのアプローチにおけるサンプリング方法の重要性にも触れる。

Human Metabolome Technologies
〒104-0033　東京都中央区新川 2-9-6　シュテルン中央ビル 5 階
ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社
03-3551-2180　https://humanmetabolome.com/

「そしてすべては つながっている」



～ ポストバイオティクス“HYA”を軸に 明かされつつある口－腸連関と腸内細菌機能 ～

日本農芸化学会2019年度大会
日東薬品工業株式会社ランチョンセミナーLS2-3

座長 小川　順 先生
（京都大学大学院農学研究科 教授）

講師 山崎　和久 先生
（新潟大学大学院 医歯学総合研究科 教授）

日時
2019年3月26日(火)
12:30～13:20

会場 D1

講演タイトル 腸内細菌由来脂肪酸代謝物の歯周病に対する効果

講義で微生物の環境での役割を説明する際、炭素や窒素などの物質循環のキープレイヤーだという説明をします。物質は食物連鎖や人間活動などに付随して循環しており、その循環において、複雑な有機物の低分子への変換を担う微生物が果たす役割は大きいと解説します。微生物が物質循環を駆動し、ひとつながりの輪を実現しているのです。

口から腸へとつながる消化管は、トポロジー的には外環境と言えます。腸は血管、リンパ管などを介して体内環境と密接につながっています。したがって、口と腸は、外環境と内環境をつなぐ循環経路を提供していると言えます。さて、最近、この循環経路を巡って様々な生理機能を全身で発揮しているかもしれない物質が様々に見いだされてきており、その物質の産生に腸内細菌の代謝活性が関与している可能性が示唆されております。例えば、食事成分に由来する腸内細菌代謝物（ポストバイオティクス）の一つ、脂肪酸代謝物であるHYAが、口と腸とで上皮細胞のバリア機能を強化することが見いだされています。体内においても、環境における微生物の役割と類似の“つながりを作る様相”が見えてきているかのようです。

口と腸と全身と、外循環と内循環、これらをつなぐ腸内細菌の機能。これまで分離して従えられてきた事象が、一気にそのつながりをあらわにしてきているのです。

そしてすべてはつながっている‥‥。

NOSTER
Postbiotics® to benefit everybody.

日東薬品工業株式会社

日本農芸化学会 2019 年度大会

[SCIEX 共催] ランチョンセミナー



有機化合物の分析に必要不可欠なツール、質量分析装置。
その活用分野は、生体における機能を解明するための、たんぱく質や代謝物などの
網羅的解析をはじめ、創薬研究、食品中に含まれるアレルゲン物質の特定や
機能性成分についての研究など、あらゆるアプリケーションに広がりを見せています。
本セミナーでは、北里大学北里生命科学研究所 創薬資源微生物学寄附講座
特任准教授 中島琢自 先生より、SCIEX 高分解能 MS(Q-TOF)を用いた
放線菌が生産する新規物質を紹介していただきます。
また、複雑なサンプル中の全てのピークについて、トリプル四重極に匹敵する感度と精度の
MS/MS 定量データを取得する SWATH Technology についてご紹介いたします。

Physicochemical screening による 微生物新規物質の探索

北里大学北里生命科学研究所
創薬資源微生物学寄附講座 特任准教授 **中島 琢自 先生**

[講演要旨]

微生物が生産する天然物は強力な生物活性を示す化合物も多く、その一部は医薬品などに利用され、人類は多大なる恩恵を受けてきました。なかでも、ワックスマンが 1940 年初頭にストレプトマイシンなど抗生物質を発見して以来、放線菌が生産する二次代謝産物の研究は飛躍的に発展しました。その多くが生物活性を指標に発見された二次代謝産物です。しかし、培養液抽出物には多くの化合物が含まれており、目的とした化合物以外は見逃されています。私たちの研究室では培養液抽出物に含まれる二次代謝産物の物理化学的性状を分析し、新規物質と推定された化合物を分画・精製・構造決定しています。このスクリーニングを physicochemical (PC) screening と称し、新規骨格の化合物を発見してきました。得られた新規物質は構造決定後に生物活性を測定しています。質量分析は培養抽出物に含まれる化合物を新規物質と推定する上で重要な情報を与えてくれます。本ランチョンセミナーでは質量分析を用いた PC screening により見いだされた放線菌が生産する新規物質を紹介します。

プログラム No.：LS2-4

日時 2019 年 3 月 26 日(火) 12:30～13:20

会場 D5 会場（東京農業大学 世田谷キャンパス 1 号館 4F 443）

SCIEX 株式会社エービー・サイエックス
本社：〒140-0001 東京都品川区北品川 4-7-35 御殿山トラストタワー 21F
TEL：0120(318)551 FAX：0120(318)040
大阪：〒531-0072 大阪府大阪市北区豊崎 3-19-3 ピアスタワー 3F
www.sciex.jp Email : jp_sales@sciex.com

MKT07-759A

thermo scientific

日本農芸化学会2019年度大会 ランチョンセミナー LS2-5

液体クロマトグラフから質量分析計まで最新技術紹介
『定量、定性分析のためのさまざまな分離、検出技術』

日 時　2019年3月26日(火) 12：30～13：20

会 場　B5会場(東京農業大学 世田谷キャンパス　1号館 2F 243)

演 者　窪田　雅之
サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社
クロマトグラフィー&MS事業部　マーケティング部

セミナー要旨

化学物質は動植物や細菌などによる代謝や、生化学的反応を伴わない環境中での分解反応まで、さまざまな形態に変化し、物理化学的性質も変化します。生化学、天然物化学においてはそれらの性質を考慮しながら分析化学的手法によりそれらの生成物の構造解析や、反応速度を評価する定量分析までを日々行いますが、そもそも分析化学自体も進歩を続けており、最新の手法を研究に取り入れることは研究を迅速に進めるために重要となります。

このセミナーでは、液体クロマトグラフィーの検出器として、標準物質がなくてもおよその定量的評価が可能な荷電化粒子検出器や、試料間で差異を見つけながら定性分析を実現する高分解能質量分析計まで、液体クロマトグラフをベースにした分析化学の最前線をご紹介します。



Thermo Scientific™ Vanquish™ UHPLCシステム

Thermo Scientific™ TSQ Forits™ トリプル四重極質量分析計

製品の詳細情報はこちら

www.thermofisher.com/fortis
www.thermofisher.com/hplcuhplc

© 2019 Thermo Fisher Scientific Inc. 無断複写・転写を禁じます。 LCMS174_A1901SO
ここに記載されている会社名、製品名は各社の商標または登録商標です。
ここに記載されている内容は予告なく変更することがあります。
ここに記載されている製品は研究用機器であり、医療機器ではありません。

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社

分析機器に関するお問い合わせはこちら

TEL：0120-753-670　FAX：0120-753-671
Analyze.jp@thermofisher.com
facebook.com/ThermoFisherJapan　@ThermoFisherJP
www.thermofisher.com

ThermoFisher SCIENTIFIC

日本農芸化学会2019年度大会　ランチョンセミナーLS2-6

MIG-seq法：次世代シーケンサーを用いた手軽なゲノムワイド塩基配列分析

演者　陶山 佳久 先生　東北大学大学院農学研究科
司会　大場 利治　タカラバイオ株式会社

3月26日（火）　12:30-13:20
E5会場
（東京農業大学1号館5階 543）

MIG-seq（Multiplexed ISSR genotyping by sequencing）法は、次世代シーケンサー（NGS）を利用した手軽なゲノムワイドSNPジェノタイピング技術として開発された（Suyama and Matsuki 2015; Scientific Reports）。その原理は、一般的なゲノムDNA中に多数存在する単純反復配列に挟まれた領域（ISSR; inter-simple sequence repeat）を対象として、ユニバーサルなマルチプレックスPCRプライマーによって数千以上のゲノム領域を同時に増幅し、これらをNGSによって分析してゲノムワイドな塩基配列情報を取得する技術である。その特徴として、生物種を問わず広く適用が可能で、例えば標準的な解析では、1度に数百サンプルの少量のDNA試料を対象として、迅速（3日）・簡単（2回のPCRとNGSラン）・経済的（消耗品は～1000円／サンプル）に数百座以上のSNP分析が可能である。特にこの手法では、PCRによってライブラリー構築をスタートすることができるため、従来は分析が難しかった微量・低品質DNAサンプル等についても、ゲノムワイドな塩基配列分析の道が開けた点が大きな特徴と言える。本講演では、その基礎から最新の改良法をはじめ、適用研究として個体・種識別、集団遺伝、分子系統解析等の事例を含めて解説する。

使用商品のご紹介

・マルチプレックスPCRをより迅速に！high-plexにも対応
Multiplex PCR Assay Kit Ver.2　（製品コード RR062A/B）
・バイアスの少ない正確な定量が可能！イルミナ社NGS用ライブラリー定量キット
Library Quantification Kit　（製品コード　638324）

★詳細は・・・　タカラバイオ　製品コード〇〇〇　検 索

タカラバイオ株式会社
東京支店　TEL 03-3271-8553　FAX 03-3271-7282
関西支店　TEL 077-565-6969　FAX 077-565-6995
テクニカルサポートライン
TEL 077-565-6999　FAX 077-565-6995
Website　http://www.takara-bio.co.jp
Facebook　http://www.facebook.com/takarabio.jp

that's GOOD science!

Clontech TaKaRa cellartis

Eat Well, Live Well.

AJINOMOTO

日本農芸化学会2019年度大会

ランチョンセミナー LS2-7



骨格筋のアミノ酸代謝と応答

～サルコペニア対策への応用～

日時 2019年3月26日（火） 12時30分～13時20分

会場 東京農業大学 世田谷キャンパス E2会場（1号館 5F 532）

演者 小林 久峰 味の素株式会社 アミノサイエンス統括部

骨格筋の量は筋タンパク質の合成と分解の動的平衡により成人期では一定に保たれている。しかし加齢によって筋タンパク質合成刺激に対する反応性が低下し、高齢期においては筋量と筋力・筋機能の低下を特徴とするサルコペニアという現象が生じる。これは歩行・運動機能の低下や、転倒・骨折リスクの増大に結びついており、生活の質の低下、フレイル（虚弱）、自立性の喪失、さらには死亡リスクの増大に関係する。

骨格筋タンパク質の合成・分解に影響を与える生活習慣は、栄養と運動である。特に、タンパク質の摂取による血中アミノ酸濃度の増加と、骨格筋へのアミノ酸の供給が筋タンパク質合成を引き起こす。

我々は、安定同位体標識アミノ酸のトレーサー法を用いた人での研究により、アミノ酸の中では特に必須アミノ酸の摂取が高齢者の骨格筋タンパク質合成の促進に重要であり、中でもロイシンの含量を約40%に高めたロイシン高配合必須アミノ酸混合物（以下「Amino　L40」）が効率的に高齢者の筋タンパク質合成を促進することを見出した。さらにわずか3gの「Amino　L40」の摂取が、20gのホエイタンパク質を摂取した場合と同等の筋タンパク質合成を起こすことも確認している。



骨格筋におけるアミノ酸とタンパク質の代謝研究によって見出した「Amino　L40」と、そのサルコペニア対策への応用について紹介し、古典的なマクロ栄養素であるタンパク・アミノ酸の機能性と超高齢社会における重要性について考察する。

共催：味の素株式会社

日本農芸化学会2019年度大会

日本ウォーターズ ランチョンセミナーのご案内

LS3-1 たった数秒で食品の品質と偽装を判断 ～ 直接イオン化法による質量分析 ～

日本ウォーターズ株式会社　寺崎 真樹

日時： **2019年3月27日（水）12:30～13:20**

会場： **C5会場**（東京農業大学 世田谷キャンパス 1号館 3F 343）

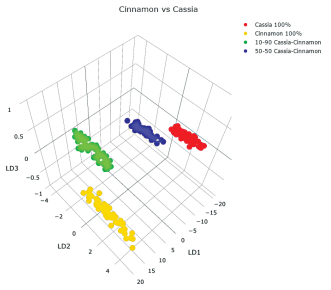
製品の偽装や不良品・劣化品との差異解析はメーカーにとって大きな課題です。しかし、従来の技術ではサンプル前処理と分析、データの解釈に時間がかかるため、分析者の大きな負担となっていました。

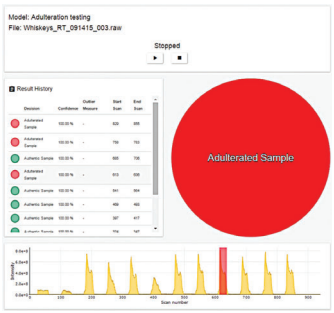
本セミナーでは下記の組み合わせによって、これらの課題に対するソリューションを提供する DART QDa with LiveID システムについてアプリケーション例とともにご紹介します。

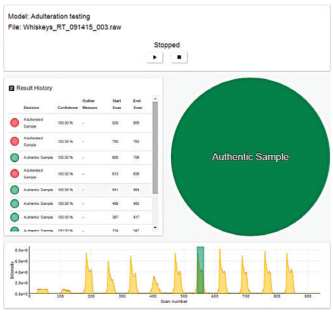
①堅牢で信頼性が高く、操作も簡単な ACQUITY QDa 検出器

②サンプル前処理を最小限に抑え、クロマトグラフィーによる分離を必要とせずに、さまざまなサンプルに対応可能なダイレクトかつ迅速な分析手法を実現する IonSense社の DART イオン源

③得られたデータから多変量解析によって結果を得て、迅速なリアルタイムサンプル分類をユーザーへ提供する LiveID ソフトウェア









DART QDa with LiveIDシステム

- 最小限のサンプル前処理によるダイレクト分析
- リアルタイムによるサンプルの分類
- わかりやすい操作と容易なデータの解釈
- 測定から意思決定までをわずか数秒で実現可能

日本ウォーターズ株式会社　www.waters.com
東京本社 〒140-0001　東京都品川区北品川1-3-12 第5小池ビル　TEL 03-3471-7191　FAX 03-3471-7118
大阪支社 〒532-0011　大阪市淀川区西中島5-14-10 新大阪トヨタビル11F　TEL 06-6304-8888　FAX 06-6300-1734
ショールーム　東京　大阪
サービス拠点　東京　大阪　札幌　福島　静岡　富山　名古屋　徳島　福岡

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

本書の内容の一部または全部を無断で複写複製(コピー)及び転載することは、法律で認められた場合を除き、権利の侵害となりますので、あらかじめ本会あて許諾を求めてください。
Copyright © 2019 by Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry

日 本 農 芸 化 学 会 2019 年 度 大 会 講 演 要 旨 集 (オンライン)
Program & Proceedings (online) of the Annual Meeting 2019 Tokyo of
Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry
2019 年 3 月 5 日公開　Published online 5 March 2019　ISSN 2186-7976

発行者　公益社団法人日本農芸化学会　JSBBA　http://www.jsbba.or.jp/
PUBLISHER　113-0032 東京都文京区弥生 2-4-16 学会センタービル 2 階　Phone 03-3811-8789

データ作成者 株式会社ダイナコム　DYNACOM　http://www.dynacom.co.jp/
ASSISTS　261-7125 千葉県千葉市美浜区中瀬 2-6-1 WBG マリブイースト 25 階　Phone 043-213-8131
小宮山印刷工業株式会社　KOMIYAMA PRINTING　http://www.kopas.co.jp/