ISSN 2186-7976

March 5, 2020
令和２年３月５日発行

Annual Meeting of the Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry, 2020

大会講演要旨集

■２０２０年度(令和２年度)大会[福岡]■





公益社団法人日本農芸化学会

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

© Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry

目次

授賞式、受賞者講演、受賞者----------2
一般講演番号の見方----------7
一般講演発表プログラム----------8
一般講演（ポスター発表）プログラム----------73
一般講演発表要旨----------80
大会シンポジウムプログラム----------1,674
大会シンポジウム要旨----------1,683
分野融合連携（他学会連携）シンポジウムプログラム----------1,820
分野融合連携（他学会連携）シンポジウム要旨----------1,821
ランチョンシンポジウムプログラム----------1,830
ランチョンシンポジウム要旨----------1,831
ランチョンセミナープログラム----------1,834
ランチョンセミナー広告要旨----------1,836

日本農芸化学会

（2020 年度）学会賞等授賞式，受賞者講演，受賞者一覧

日時：2020 年 3 月 25 日（水）10 時 00 分～17 時 30 分（開場 9 時～）
場所：福岡国際会議場（福岡市博多区石城町 2-1）
進行予定：

（10：00）**2020 年度学会賞等授賞式**　※適宜記念撮影
1　授賞選考委員長報告
2　日本農芸化学会賞授与
3　日本農芸化学会功績賞授与
4　農芸化学技術賞授与
5　農芸化学奨励賞授与

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

（10：40）**第 17 回農芸化学研究企画賞表彰式および中小企業研究助成採択報告**
1　産学官学術交流委員長報告
2　農芸化学研究企画賞表彰

（10：45）**BBB 論文賞，BBB Most-Cited Paper Award 及び BBB Most-Cited Review Award 報告**
1　英文誌編集委員長報告

（10：50）**会長祝辞**
（10：55）レイアウト変更（ **** 休憩 5 分間 **** ）
（11：00）**受賞者講演開始**
（11：00）日本農芸化学会賞受賞者講演（2 件，各 25 分）
（11：50）**** 休憩 60 分間 ****
（12：50）農芸化学女性研究者賞受賞者講演（3 件，各 10 分）
（13：20）日本農芸化学会功績賞受賞者講演（2 件，各 20 分）
（14：00）**** 休憩 5 分間 ****
（14：05）農芸化学技術賞受賞者講演（3 件，各 15 分）
（14：50）農芸化学女性企業研究者賞受賞者講演（2 件，各 10 分）
（15：10）**** 休憩 5 分間 ****
（15：15）農芸化学奨励賞受賞者講演（10 件，各 10 分）
（16：55）**** 休憩 5 分間 ****
（17：00）農芸化学若手女性研究者賞受賞者講演（3 件，各 10 分）
（17：45）**受賞講演終了**
（18：30～20：30）**懇親会**　ホテルオークラ福岡

受賞者：

【日本農芸化学会賞】（2 件，50 音順）
河岸　洋和　（静岡大学グリーン科学技術研究所）
「高等菌類由来の生物活性物質に関する化学的研究」
高木　博史　（奈良先端科学技術大学院大学）
「酵母のストレス耐性に関する新規な分子機構と高機能開発」

【日本農芸化学会功績賞】（2 件 50 音順）
板谷　光泰　（高機能遺伝子デザイン技術研究組合）
「ゲノム合成からゲノム移動までの一気通貫システム開発」
鈴木　秀之　（京都工芸繊維大学大学院）
「バクテリアによるγ-グルタミル化合物代謝の遺伝生化学的・構造生物学的研究とその応用展開」

【農芸化学技術賞】(3 件, 50 音順)

日下部　均・野口　利忠・稲垣　賢二　(株式会社エンザイム・センサ・ヤマサ醤油株式会社・岡山大学大学院環境生命科学研究科)
「L-グルタミン酸オキシダーゼの発見と応用開発」

松本　光晴　(協同乳業株式会社)
「腸内細菌叢の代謝制御によるポリアミン産生技術を用いた機能性食品の開発」

植田　文教・小田　由里子　(富士フイルム株式会社)
「サラシア属植物のヒト消化管調節因子の解明と新規機能性食品の開発」

【農芸化学奨励賞】(10 件, 50 音順)

赤沼　元気　(学習院大学理学部)
「枯草菌リボソームの新たな機能に関する研究」

池田　丈　(広島大学大学院統合生命科学研究科)
「固体材料表面と生体分子の相互作用の解析とバイオ融合マテリアル開発への応用」

榎本　賢　(東北大学大学院農学研究科)
「特異な複素環構造と有用な生物活性を示す天然有機化合物の合成研究」

尾形　慎　(独立行政法人 福島工業高等専門学校)
「酵素法を基盤とした糖質複合分子の機能設計に関する研究」

落合　秋人　(新潟大学工学部)
「食品タンパク質の新機能の発見とその多面的利用への構造論的展開」

杉山　暁史　(京都大学生存圏研究所)
「植物根圏での代謝物の動態及び機能に関する研究」

鈴木　智大　(宇都宮大学バイオサイエンス教育研究センター)
「きのこ類が産生する生物活性物質に関する天然物化学的・遺伝情報学的研究」

中島　健一朗　(自然科学研究機構　生理学研究所)
「味覚の脳内伝達とその調節を担う神経機構の解析」

樋口　裕次郎　(九州大学大学院農学研究院)
「真菌における膜交通に関する分子細胞生理学研究」

増田　裕一　(三重大学大学院生物資源学研究科)
「天然由来ペプチドの活性発現に係わる三次元構造の解明と応用」

【農芸化学女性研究者賞】(3 件, 50 音順)

市　育代　(お茶の水女子大学基幹研究院)
「脂肪酸の栄養状態で変化する生体応答の制御機構に関する研究」

稲葉　靖子　(宮崎大学農学部)
「種子植物の生殖器官における発熱分子機構とミトコンドリア特性に関する研究」

西村　麻里江　(農業・食品産業技術総合研究機構)
「植物病原性糸状菌をモデルに用いた糸状菌における環境認識と応答に関する研究」

【農芸化学若手女性研究者賞】(3 件, 50 音順)

國武　絵美　(三重大学大学院生物資源学研究科)
「糸状菌におけるリグノセルロース分解酵素遺伝子の発現制御機構に関する分子生物学的研究」

河村　奈緒子　(岐阜大学研究推進・社会連携機構)
「シアル酸含有糖鎖の合成研究および細胞膜ドメイン解析のための糖脂質プローブの開発」

千葉　洋子　(理化学研究所・環境資源科学研究センター)
「未知の中心的代謝酵素の探索と性状解析 ー生命の多様性および進化の理解を目指して」

【農芸化学女性企業研究者賞】(2 件, 50 音順)

久保田　浩美　(花王株式会社スキンケア研究所)
「日用品・食品の開発につながる微生物制御の基礎研究」

土屋　友理　(キリンホールディングス株式会社)
「発酵中にホップを添加する製法による発酵促進とその応用」

【第 17 回農芸化学研究企画賞】(2 件)

研究領域①　先導的生物活性物質研究と新技術開発

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

赤澤　真一　(長岡工業高等専門学校 物質工学科)
「ミミズ細胞を用いた全く新しいバイオ医薬品生産宿主の開発 」

研究領域③　グリーンバイオテクノロジー

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

織田　昌幸　(京都府立大学大学院生命環境科学研究科)
「クチナーゼ Cut190 の PET 分解能向上による実用化のための基盤及び実証研究」

【2020 年度日本農学賞（本会推薦)】

本会より推薦した下記の者が日本農学賞を受賞いたしました。
2020 年 4 月 5 日東京大学山上会館で開催される日本農学大会において、日本農学賞授与式並びに受賞者講演が予定されています。
受 賞 者 ：尾添　嘉久　(島根大学生物資源科学部)
受賞題目：昆虫・線虫の神経伝達物質受容体とイオンチャネルの構造、分子機能、生理学的役割、および薬理学的性質の解明

【2019年 (Vol.83) BBB論文賞(掲載順)】(10件)

pp.192～201
Tetsuya Shiina, Kazuya Nakagawa, Yukiko Fujisaki, Taro Ozaki, Chengwei Liu, Tomonobu Toyomasu, Masaru Hashimoto, Hiroyuki Koshino, Atsushi Minami, Hiroshi Kawaide & Hideaki Oikawa
Biosynthetic study of conidiation-inducing factor conidiogenone: heterologous production and cyclization mechanism of a key bifunctional diterpene synthase

pp.281～290
Koji Yamaguchi, Yuya Yoshimura, Shinya Nakagawa, Hirokazu Mezaki, Satomi Yoshimura & Tsutomu Kawasaki
OsDRE2 contributes to chitin-triggered response through its interaction with OsRLCK185

pp.463～471
Shiho Ito, Noriyuki Kioka & Kazumitsu Ueda
Cell migration is negatively modulated by ABCA1

pp.569～577
Yusuke Yoshida, Hiroyuki Iguchi, Yasuyoshi Sakai & Hiroya Yurimoto
Pantothenate auxotrophy of *Methylobacterium* spp. isolated from living plants

pp.876～881
Koji Miyamoto, Tomoharu Matsumoto, Emi Yumoto, Tomoko Sakazawa, Takao Yokota, Hisakazu Yamane & Kenichi Uchida
Facile preparation of optically active jasmonates and their biological activities in rice

pp.1372～1381
Eiichiro Kan, Yohei Katsuyama, Jun-ichi Maruyama, Koichi Tamano, Yasuji Koyama & Yasuo Ohnishi
Production of the plant polyketide curcumin in *Aspergillus oryzae*: strengthening malonyl-CoA supply for yield improvement

pp.1498～1505
Kazuya Tomimoto, Takeshi Akao & Hisashi Fukuda
Histone deacetylases in sake yeast affect fermentation characteristics

pp.1740～1746
Masamori Iwase, Kyoko Watanabe, Makoto Shimizu, Tsukasa Suzuki, Yuji Yamamoto, Jun Inoue & Ryuichiro Sato
Chrysin reduces the activity and protein level of mature forms of sterol regulatory element-binding proteins

pp.2144～2152
Yusuke Fujii, Thuy Tien Thi Nguyen, Yuta Fujimura, Naotaka Kameya, Shoji Nakamura, Kensuke Arakawa & Hidetoshi Morita
Fecal metabolite of a gnotobiotic mouse transplanted with gut microbiota from a patient with Alzheimer's disease

pp.2163～2171
Yosef Hamba Tola, Yoshiko Fujitani & Akio Tani
Bacteria with natural chemotaxis towards methanol revealed by chemotaxis fishing technique

【Most-Cited Paper Award】被引用回数　22回*

Vol.82, No.3, pp.456～465

Weiran Xu, Liang He, Ying Li, Yan Tan, Fan Zhang & Hong Xu

Silencing of lncRNA ZFAS1 inhibits malignancies by blocking Wnt/β-catenin signaling in gastric cancer cells

【Most-Cited Review Award】被引用回数　30回*

Vol.82, No.4, pp.600～610

Kaeko Murota, Yoshimasa Nakamura & Mariko Uehara

Flavonoid metabolism: the interaction of metabolites and gut microbiota

一般講演番号の見方

○ 講演番号の

最初の１桁の数字は講演発表日

２ ⟶ ３月２６日（木）
３ ⟶ ３月２７日（金）
４ ⟶ ３月２８日（土）

次のアルファベット（大文字）は各講演会場の講義棟

Ａ　　センター2 号館
Ｂ　　工学部学習総合プラザ
Ｃ　　理学部講義棟

次の桁の数字は各講義棟の会場番号（※九大の講義室名ではありません）

０１
０２
０３
０４
・
・
・
Ａ　が　最大２２まで
Ｂ　が　最大１１まで
Ｃ　が　最大０４まで

次の 4 番目のアルファベット（小文字）は、午前の部か午後の部。

ａ　は　午前の部
ｐ　は　午後の部

次の 5 番目の数字は講演の通し番号（０１～）

たとえば、**２Ａ１２ｐ０５**は、

３月２６日（木）、センター2 号館１２会場、午後の部、５番目　の講演です。

○ 講演開始の時間は、次の通りです。

ａ［ａｍ］（午前）

０１．9：30	０２．9：41	０３．9：52	０４．10：03
０５．10：14	10：25（PC 接続時間）	０６．10：35	０７．10：46
０８．10：57	０９．11：08	１０．11：19	11：30（PC 接続時間）
１１．11：40	１２．11：51	１３．12：02	１４．12：13
１５．12：24			

ｐ［ｐｍ］（午後）

０１．13：50	０２．14：01	０３．14：12	０４．14：23
０５．14：34	０６．14：45	14：56（PC 接続時間）	０７．15：06
０８．15：17	０９．15：28	１０．15：39	１１．15：50
１２．16：01	16：11（PC 接続時間）	１３．16：21	１４．16：32
１５．16：43	１６．16：54	１７．17：05	１８．17：16

一般講演発表プログラム

1. 講演時間は 1 題につき，11 分 （発表 8 分，質疑 2 分 30 秒，交替時間 30 秒）.
2 ○は講演者（登壇者）を示す.
3. 座長は，プログラム集41～43ページの座長一覧をご覧ください.
4. 講演番号 1 文字目（数字）は講演日（2：3 月 26 日，3：3 月 27 日,4：3 月 28 日），2～4 文字目は講演会場（A01～C04），5 文字目（英字小文字 1 字）の a は午前, p は午後, 5～6 文字目（数字 2 桁）は講演順番（01～18）.（例）「2A01p02」は，3 月 26 日，A01 会場，午後の部，2 番目の講演となります.

第 2 日(3 月 26 日)

講演番号
開始時間　　演　　題　　発表者氏名(所属)

A01 会場　午前の部(9:30～12:13)

食品―1310 食品化学 - 糖質，脂質―

a01～a05 発表者の接続時間 9:20～9:30

2A01a01　フルクトシルトランスフェラーゼ(FTase)を用いて糖類を低減したオレンジ果汁の開発
9:30　○須藤僚也，堀江　暁，矢島由莉佳，西山千晶，若林英行（キリンホールディングス株式会社）

2A01a02　中赤外分光法を用いた酵素処理オレンジ果汁中に含まれる成分糖の定量
9:41　○矢島由莉佳[1]，堀江　暁[1]，須藤僚也[1]，西山千晶[1]，若林英行[1]，末原憲一郎[2]，亀岡孝治[3]，橋本　篤[3]（[1]キリンホールディングス株式会社，[2]三重大大学院地域イノベーション学研究科，[3]三重大大学院生物資源学研究科）

2A01a03　石川県産クリの低温貯蔵による遊離糖および澱粉の性質変化
9:52　○齋藤泰宏[1]，本多裕司[1]，西山　駿[2]（[1]石川県立大学，[2]石川県農林総合研究センター）

2A01a04　キュアリングによる五郎島金時の遊離糖と澱粉の性質の変化について
10:03　○本多裕司，岡野麻里，稲毛優子，齋藤泰宏（石川県大・生資環）

2A01a05　エンドウペクチンの構造解析および乳タンパク質安定化能に関する研究
10:14　○野口美咲[1]，鈴木志保[2]，シャカットプラカートソンボン[3]，福井健介[3]，長谷川芳則[3]，中澤昌美[1]，上田光宏[1]，阪本龍司[1]（[1]阪府大院・生命環境，[2]阪府大・研究推進機構，[3]不二製油グループ本社㈱）

a06～a10 発表者の接続時間 10:25～10:35

2A01a06　窒素施肥によるイネ種子内のトレハロース 6-リン酸及びその関連分子の発現変動解析
10:35　○酒井孝一朗[1]，黒田昌治[2]，福田あかり[2]，永野　淳[3,4]，阿部啓子[1,5]，朝倉富子[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]農研機構・中央農研，[3]龍谷大・農，[4]クロックミクス，[5]KISTEC）

2A01a07　コンブ部位によるアルギン酸含有量とタンパク質含有量の変動
10:46　○平賀捷悟[1]，山田将也[2]，関　憧平[3]，四ツ倉典滋[4]，垣田浩孝[1,2]（[1]日大院総合基，[2]日大文理，[3]北大院環境科学院，[4]北方生物圏フィールド科学センター）

2A01a08　^{1}H NMR によるグルカン類の非破壊絶対定量方法の検討
10:57　○加藤　毅，山本佳奈，水越一史，五十嵐友二（(一財)日本食品分析センター）

2A01a09　血糖値が高めの成人における塩糀の空腹時血糖低減効果
11:08　○北川　学[1]，中村彩乃[1]，山本哲郎[2]，近藤澄夫[3]（[1]マルコメ，[2]TTC，[3]医療法人健昌会福島健康管理センター）

2A01a10　タンパク質欠乏による VLDL 受容体の発現変動及びその脂肪肝への影響
11:19　○大塩優衣[1]，服部裕太[2]，竹中麻子[2]（[1]明大院農，[2]明大農）

a11～a13 発表者の接続時間 11:30～11:40

2A01a11　ヨメガカサガイの生殖線から見いだされた末端二重結合を有する新規トリエン酸群の構造
11:40　○川島英城（岩手県立大・宮古短大部）

2A01a12　トリアシルグリセロールヒドロペルオキシドの吸収代謝の評価：ナトリウムを用いた LC-MS/MS 分析を通じて
11:51　○高橋　巧[1]，加藤俊治[1,2]，伊藤隼哉[1]，境野眞善[2]，佐野貴士[2]，今義　潤[2]，池田郁男[3]，仲川清隆[1,2]（[1]東北大院農・機能分子解析学，[2]東北大院農・J-オイルミルズ油脂イノベーション共同研究講座，[3]東北大・未来科学技術共同研究センター）

2A01a13　米由来グルコシルセラミドの腸管モデル細胞系への炎症刺激に与える影響と in vitro 消化法を用いた米の調理条件の違いによる生体利用性の変化
12:02　○曽我みちる，田中　駿，山下慎司，木下幹朗（帯畜大）

A01 会場　午後の部(13:50～14:34)

食品―1312 食品化学 - 色素，香料―

p01～p04 発表者の接続時間 13:40～13:50

2A01p01　黄花フリージアの黄色色素の同定とその抗酸化活性の検討
13:50　○下出早貴[1]，清河文子[2]，小牧正子[2]，三沢典彦[3]，新藤一敏[1]（[1]日女大・家政・食物，[2]石川県農総研，[3]石川県大・生資研）

2A01p02　蝶豆および紫ヤムに含まれるアシル化アントシアニン色素の化学的研究
14:01　○本田沙理，高橋桜子，熊澤茂則（静岡県大食品）

2A01p03　システインとフルフラールの強酸性下におけるメイラード反応により生成する色素化合物フルペンチアジネートの食品中での探索と生成経路の検討
14:12　○野田響子[1]，岸本真凜[1]，島村裕子[2]，村田容常[1]（[1]お茶大食物，[2]静岡県大食栄）

2A01p04　チアミン由来の新規色素 pyrizepine の形成条件，精製方法及び生成経路
14:23　○来山祥子，野田響子，井越明日香，村田容常（お茶大院ライフ）

A02 会場　午前の部(9:30～12:13)

食品―1322 食品工学 - 物性，分析―

a01～a05 発表者の接続時間 9:20～9:30

2A02a01　コロナ検出器を用いた果汁および野菜汁の有機酸定量法の検討
9:30　○大城沙織，箕川　剛，石橋　諒，東村　豊，西野雅之（三栄源エフ・エフ・アイ株式会社）

2A02a02　IC-MS を用いた高極性農薬一斉分析法の検討
9:41　○高橋洋武，佐野勇気，橘田　規，照井善光（日本食品検査）

2A02a03　発酵食品およびキノコ栽培に用いるオプティカル pH センサーの開発
9:52　○中川克彦[1]，田中友隆[1]，早瀬伸樹[1]，森永弘志[2]，宮部真司[2]（[1]新居浜高専，[2]㈱大愛）

2A02a04　ビール泡層の性状がヘルムホルツ共鳴に及ぼす影響
10:03　○犬飼一貴[1]，磯江　晃[2]，乾　隆子[2]，勝野那嘉子[1]，西津貴久[1]（[1]岐阜大・応生，[2]サントリービール㈱）

2A02a05　大麦若葉エキスがヒト大腸細菌叢に与える効果についての検討
10:14　○佐々木建吾[1]，佐々木大介[1]，門脇靖司[2]，青塚康幸[2]，近藤昭彦[1]　([1]神戸大院・科技イノベ，[2]日本薬品開発)

a06〜a09 発表者の接続時間 10:25〜10:35

2A02a06　赤外分光法及び XRD を用いた米粉の固体構造評価に関する研究
10:35　○楊　嘉敏[1]，市川千晶[1]，石川大太郎[2]，藤井智幸[1]　([1]東北大院農，[2]福島大農)
2A02a07　食物アレルゲン検査試薬の新規開発法確立へ向けた網羅的ペプチドアレイと Nanobody アーミング酵母の応用可能性
10:46　○今中　陽[1]，久保田麻友香[1]，橋本美保[2]，加藤重城[2]，本山智晴[1]，中野祥吾[1]，伊藤創平[1]，寺田祐子[1]，伊藤圭祐[1]　([1]静県大院・薬食，[2]プリマハム㈱)
2A02a08　バイオナノカプセル足場技術を用いた食品検査キットの高感度化
10:57　○水野麻美[1]，黒田俊一[2]，中山　勉[1]，飯嶋益巳[1]　([1]東農大・応生・健康，[2]阪大・産研)
2A02a09　バイオナノカプセル足場技術を用いた食物アレルゲンの簡便・迅速・高感度検出法の開発
11:08　○山本星里[1]，藤方　楓[1]，黒田俊一[2]，中山　勉[1]，飯嶋益巳[1]　([1]東農大・応生・健康，[2]阪大・産研)

a11〜a13 発表者の接続時間 11:30〜11:40

2A02a11　ナスコアコレクションにおける新規食品機能性成分ナス由来コリンエステル(アセチルコリン)
11:40　○王　文豪[1]，和具なおみ[1]，深谷茜音[1]，宮武宏治[2]，齊藤猛雄[2]，山口翔平[1]，中村浩蔵[1]　([1]信州大農，[2]農研機構野菜花き研究部門)
2A02a12　高知県栽培冬春ナスにおける新規食品機能性成分ナス由来コリンエステル(アセチルコリン)
11:51　○深谷茜音[1]，和具なおみ[1]，王　文豪[1]，猪野亜矢[2]，北山みずほ[2]，山口翔平[1]，中村浩蔵[2]　([1]信州大学，[2]高知県農業技術センター)
2A02a13　近赤外分光法によるナス由来コリンエステル(アセチルコリン)の非破壊測定法の開発
12:02　○野澤周吾[1]，鈴木美穂[1]，和具なおみ[1]，猪野亜矢[2]，北山みずほ[2]，山口翔平[1]，中村浩蔵[1]　([1]信州大農，[2]高知県農業技術センター)

A02 会場　午後の部(13:50〜14:34)

食品―1313 食品化学 - その他―

p01〜p04 発表者の接続時間 13:40〜13:50

2A02p01　マヌカ蜂蜜の加熱に伴うメチルグリオキサール減少機構の解明
13:50　○加藤陽二[1,2]，来住悠衣[1]，三好規之[3]　([1]兵庫県大環境人間，[2]兵庫県大先端食，[3]静岡県大食品栄養)
2A02p02　乾燥ストレス下で生育したトマト果実のトランスクリプトームおよびメタボローム解析
14:01　○朝倉浩子[1]，山川　隆[2]，上田玲子[1]，平　　修[3]，阿部啓子[1]，朝倉富子[1]　([1]東大院農生科・応生化，[2]東大院農生科・食の安全研セ，[3]福大農)
2A02p03　米飯の理化学的特性に影響をおよぼす遺伝子座を利用した用途予測の検討
14:12　○望月賢太[1]，辻井良政[2]，堀　清純[3]，髙野克己[2]　([1]東農大院農・農化，[2]東農大応生・農化，[3]農研機構・作物開発セ)
2A02p04　ツタンカーメンエンドウの加熱中に生じる着色反応に関与する成分の同定
14:23　○前川優樹[1]，近藤(比江森)美樹[1,2]　([1]徳島文理大院人間生活，[2]徳島文理大人間生活)

A03 会場　午前の部(9:30〜12:13)

食品―1330 食品機能・栄養 - 脂質代謝，糖質代謝―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

2A03a01　ラットにおけるキサントフモールの吸収及び酸化コレステロールの生態有害性に対する調節作用の検証
9:30　○石川航也[1]，中堀紘花[2]，一色祐佳[1]，長田恭一[1]　([1]明治大農，[2]明治大院農)
2A03a02　ラットにおける酸化コレステロールの血中輸送動態
9:41　○麻生菜央[1]，青木円花[1]，城内文吾[2]，佐藤匡央[2]　([1]九大院生資環，[2]九大院農)
2A03a03　異系統のラットの脳における外因性酸化コレステロール分子種の移行性の違い
9:52　○中堀紘花[1]，石川航也[2]，一色祐佳[2]，長田恭一[2]　([1]明治大院農，[2]明治大農)
2A03a04　ラットにおける *Selenomonas ruminantium* 由来プラスマローゲンのリンパ吸収動態
10:03　○金濱　晶[1]，柏木明子[2]，山田美和[1]，西向めぐみ[1]　([1]岩手大・総合科学，[2]弘前大・農学生命)
2A03a05　ペプチド輸送胆体(PEPT1)欠損マウスでは，ジペプチド FP(Phe-Pro)のコレステロール代謝改善作用は消失する
10:14　○坂野新太，森　崚輔，岡田健司，王吉力持，山本雄太，二本松太郎，長岡　利　(岐阜大応用生物科学)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

2A03a06　アイスプラントに含まれる脂肪代謝促進活性を有する物質の解析
10:35　○山形純輝[1]，古川岳人[1]，蔡　晃植[1,2,3]　([1]長浜バイオ大・バイオ，[2]長浜バイオ大院・バイオ，[3]長浜バイオ大・ゲノム編集研究所)
2A03a07　ATP 消費作用を介した緑茶カテキンの中性脂肪分解機構
10:46　○吸原慧紀，石坂朱里，村上　明　(兵庫県立大学大学院・環境人間学研究科)
2A03a08　ウロリチン A が 3T3-L1 細胞および皮下脂肪に対して脂肪蓄積抑制作用をもつ。
10:57　○堀本泰弘[1]，中谷祥恵[1]，中林なつみ[1]，工藤眞丈[2]，中島賢則[2]，卯川裕一[2]，古旗賢二[1]　([1]城西大薬科，[2]㈱ ダイセル・コーポレート研)
2A03a09　光親和性標識法によるマウス脂肪細胞におけるフコース相互作用分子の探索
11:08　○中尾友彦[1]，小南友里[1]，渡邉壮一[1]，細谷孝充[2]，潮　秀樹[1]　([1]東大院農，[2]東京医科歯科大)
2A03a10　腸内細菌が産生する脂肪酸代謝産物のヒト iPS 小腸モデルを用いた生理機能解明
11:19　○野口　惇[1]，清水　誠[1]，高橋　裕[1]，岸野重信[2]，小川　順[2]，山内祥生[1]，佐藤隆一郎[1]　([1]東大院・農生科・応生化，[2]京大院・農・応用生命)

a11〜a13 発表者の接続時間 11:30〜11:40

2A03a11　柿由来ペクチンが小腸絨毛形態変化と栄養吸収能に及ぼす影響の解析
11:40　○後藤咲季[1]，伊藤賢一[2]，大野真貴[2]，北口公司[1,3]，矢部富雄[1,3,4]　([1]岐阜大院・連合農学，[2]一丸ファルコス，[3]岐阜大・応用生物科学，[4]生命の鎖統合研究センター)
2A03a12　クレソンに含まれるウレア化合物の機能性解析
11:51　○中屋　慎[1,2]，庄條愛子[3]，水野淨子[3]，藤原永年[4]，北村進一[1]　([1]大阪府立大学，[2]大手前栄養製菓学院専門学校，[3]相愛大学，[4]帝塚山大学)
2A03a13　胆汁酸吸着剤による盲腸内短鎖脂肪酸の産生促進と腸管 IgA 分泌の促進
12:02　西田紗希，堀之内歩，東村泰樹，赤堀玲奈，○松本健司　(石川県大生資環)

A03 会場　午後の部（13:50〜14:34）

食品―1313 食品化学 - その他―

p01〜p04 発表者の接続時間 13:40〜13:50

2A03p01　えぐ味成分ホモゲンチジン酸の分子挙動解析
13:50　○前迫一輝[1]，黒田彩歌[2]，坂本裕香[2]，伊藤圭祐[3]，赤川　貢[4]，石井剛志[1,2]　([1]神戸学院大院栄養，[2]神戸学院大栄養，[3]静岡県大食栄，[4]大阪府大院生命環境）

2A03p02　小麦ふすま含有成分が全粒粉パンの製パン特性および風味に与える影響
14:01　○松田里菜[1]，岡　大貴[2]，辻井良政[2]，野口智弘[3]，高野克己[2]　([1]東京農大院・農化，[2]東京農大応生・農化，[3]東京農大応生・食加技セ）

2A03p03　超長期熟成したビールの「熟成香」に寄与する香気成分に関する研究
14:12　○大畠麻由[1]，小杉隆之[2]，實方綾子[1]，高澄耕次[1]，谷川篤史[2]，蛸井　潔[2]，金子　剛[1]，土屋陽一[1]　([1]サッポロホールディングス株式会社　価値創造フロンティア研究所，[2]サッポロビール株式会社）

2A03p04　GC×GC-TOFMS を用いた後発酵茶の香気特性の解明
14:23　○岩出亜美[1]，大塚祐季[1]，松神麻美[2]，樺島文恵[2]，森山洋憲[3]，下藤　悟[3]，柏木丈拡[1]，島村智子[1]，受田浩之[4]　([1]高知大・農，[2]LECOジャパン，[3]高知県工技セ，[4]高知大・地域創造セ）

A04 会場　午前の部（9:30〜11:30）

食品―1340 食品機能・栄養 - その他―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

2A04a01　愛知県額田郡幸田町産・筆柿果実のポリフェノールについての検討
9:30　○保田倫子[1]，西脇志保[1]，江間陽菜[1]，永田晃久[2]，矢田友和[2]　([1]椙山大生活，[2]JAあいち三河）

2A04a02　Delphinidin 誘導性 microRNA の細胞外小胞を介した筋萎縮抑制作用
9:41　○丸亀裕貴[1]，村田　希[1,2]，後藤　萌[1]，藤村由紀[1]，立花宏文[1]　([1]九大院農院・生機科，[2]愛媛大学 学術支援センター）

2A04a03　緑茶摂取によるヒト血球細胞における DNA メチル化調節作用
9:52　○山本真生[1]，廣井　舜[1]，熊添基文[1]，藤村由紀[1]，山本（前田）万里[2]，花房俊昭[3]，立花宏文[1]　([1]九大院農院，[2]農研機構，[3]大阪医科大）

2A04a04　小腸オルガノイドを利用したデオキシニバレノールの影響評価
10:03　○羽生ひかる[1]，岩槻　健[2]，齋藤由季[1]，輿石沙織[1]，丹野星亜[1]，只石　幹[1]，清水　誠[1]，服部一夫[1]　([1]東農大栄養，[2]東農大食品安全）

2A04a05　空間学習および記憶に対する菱外皮のポリフェノールの効果
10:14　○岸川由紀[1]，安田みどり[2]，小松洋平[1]，藤原和彦[1]，宮原洋八[1]　([1]西九大リハ，[2]西九大健栄）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

2A04a06　エクオール産生能とダイジンの代謝におよぼす胆汁酸の影響
10:35　○平井愛実，吉岡寛子，戸田登志也　（武庫川女子大）

2A04a07　緑茶抽出物摂取による血中 cGMP 濃度上昇とフラバノン類による増強
10:46　○田中愛健[1]，恩田弘明[1]，畠山　結[1]，熊添基文[1]，藤村由紀[1]，米倉円佳[2]，中曽根光[2]，立花宏文[1]　([1]九州大院農院・生機科，[2]トヨタ自動車・アグリバイオ事業部）

2A04a08　食品に含まれる *cis* lycopenes の生理活性に関する研究
10:57　○酒見裕香[1]，佐藤加奈[1]，原久瑠美[1]，本田真己[2]，新藤一敏[1]　([1]日女大・家政・食物，[2]名城大・理工）

2A04a09　大麦における米特有 γ-オリザノール分子種の同定
11:08　○伊藤隼哉，澤田一恵，仲川清隆　（東北大院農）

2A04a10　ヤマトシロアリ（*Reticulitermes speratus*）の脂肪酸組成
11:19　○小木曽加奈[1]，村野耕平[2]，古田一匡[3]，杉山英子[1]　([1]長野県大健康発達，[2]長野県工技センター，[3]富士通株式会社）

A04 会場　午後の部（13:50〜14:34）

食品―1336 食品機能・栄養 - 癌，抗癌―

p01〜p04 発表者の接続時間 13:40〜13:50

2A04p01　食品由来機能性微粒子 EPDENs の取得と物性解析
13:50　○野中大成[1]，木村颯花[1]，池田正浩[2]，園田紘子[2]，清水正高[3]，河野拓人[3]，高橋幸毅[4]，大島達也[4]，山﨑正夫[2]，山﨑有美[1]　([1]宮大地域，[2]宮大農，[3]宮崎工技セ，[4]宮大工）

2A04p02　食品由来機能性微粒子 EPDENs の乳がん抑制作用
14:01　○木村颯花[1]，山崎正夫[2]，福井敬一[3]，吉山佳世[3]，近藤知已[3]，山崎有美[1]　([1]宮大地域，[2]宮大農，[3]JA宮経連）

2A04p03　原発性滲出性リンパ腫に対するククルビタシンBの抗腫瘍効果の検討
14:12　○上野幹憲，刈谷龍昇，シティタンチャリーガンヤ，岡田誠治　（熊本大学ヒトレトロウイルス学共同研究センター）

2A04p04　Epigallocatechin-3-O-gallate（EGCG）/Phosphodiesterase 3 阻害剤併用は膵臓がんのがん幹細胞性を阻害する
14:23　○熊添基文，高井美佳，廣井　舜，高松香菜子，門松　舞，山下麻衣，藤村由紀，立花宏文　（九州大農）

A05 会場　午前の部（9:30〜12:13）

食品―1338 食品機能・栄養 - 神経，内分泌，味覚・食欲―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

2A05a01　レポーターアッセイを用いた客観的甘味評価系の構築
9:30　○井手美里，三坂　巧　（東大院農生科・応生化）

2A05a02　霊長類旨味受容体における高いグルタミン酸感受性獲得の分子機構
9:41　○戸田安香[1]，早川卓志[2]，中北智哉[3]，河村正二[4]，今井啓雄[5]，石丸喜朗[1]，三坂　巧[6]　([1]明大農・農芸化，[2]北大院地球環境・環境生物，[3]愛大・PROS，[4]東大院新領域・先端生命，[5]京大霊長類研・ゲノム細胞，[6]東大院農生科・応生化）

2A05a03　マウス味蕾におけるセルピンの発現
9:52　○甘楽怜紀，黒川あずさ，成川真隆，三坂　巧　（東大院農生科）

2A05a04　甘味受容体 T1R3 サブユニット膜貫通領域における活性型・不活性型モデルの比較
10:03　○中北智哉[1,2]，成川真隆[2]，広川貴次[3]，三坂　巧[2]　([1]愛媛大PROS，[2]東大院農生科・応生化，[3]産総研）

2A05a05　味感受性の加齢依存的変化と短期記憶能力との関連性の検討
10:14　○高橋涼佳，上吉原絢，成川真隆，三坂　巧　（東大院農生科）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

2A05a06　コイ味覚受容体の発現解析
10:35　○久保園峻，戸田安香，石丸喜朗　（明大農・農芸化）

2A05a07　腸内細菌枯渇状態のマウスの味覚嗜好性変化
10:46　○丸岡祐子，藍原祥子　（神戸大院農）

2A05a08　甘味料スクラロースがマウス消化管オルガノイドに与える影響の解析
10:57　○大木淳子[1,2]，稲葉明彦[2]，田中啓介[3]，篠澤章久[3]，吉瀬祐子[3]，松本征仁[4]，野村政壽[5]，山根拓実[2]，大石祐一[2]，岩槻　健[2]　([1]つく国大医，[2]東農大応生科，[3]東農大ゲノムセンター，[4]順天堂大医，[5]久留米大医)

2A05a09　微量アミン受容体 hTAAR1 に作用する食品素材のスクリーニングと活性成分の同定
11:08　○太田広人[1]，松下聖大[2]，迫田一輝[2]，山中実喜子[3]，藤田航平[3]　([1]崇城大生物生命，[2]熊本大院自然科学，[3]サントリーグローバルイノベーションセンター㈱)

2A05a10　幼若期における咀嚼刺激が脳内発現遺伝子と行動に与える影響
11:19　○李　善美[1]，安岡顕人[1]，永井俊匡[2]，斎藤芳和[1]，阿部啓子[1,3]，朝倉富子[1]　([1]東大院農生科，[2]高崎健大・栄養，[3]神奈川県立産業技術総合研究所)

a11～a13 発表者の接続時間 11:30～11:40

2A05a11　醤油によるだし香気成分の揮発促進／抑制
11:40　○竹内悠人，廣瀬真也，坂本洋子，真岸範浩　（ヒガシマル醤油㈱・研究所)

2A05a12　日本酒の香りは心理的・生理的リラックス効果をもたらす
11:51　○鈴木佐知子[1]，矢田幸博[2]，竹内美穂[1]，石田博樹[1]　([1]月桂冠・総研，[2]筑波大院・グローバル教育院)

2A05a13　末梢組織における BDNF 産生促進作用を機序とする抗うつ食品素材の探索
12:02　○中島健輔[1]，大磯　茂[1,2]，仮屋薗博子[1,2]　([1]長崎国際大薬，[2]長崎国際大院薬)

A05 会場　午後の部(13:50～14:34)

食品―1333 食品機能・栄養 - 消化・吸収，循環・血管―

p01～p04 発表者の接続時間 13:40～13:50

2A05p01　ナス降圧作用への GABA の影響評価
13:50　○坂本希加子，早坂柚実，山口翔平，中村浩蔵　（信州大学)

2A05p02　テレメトリー法による経口投与アセチルコリンの降圧作用と自律神経活動評価
14:01　○早坂柚実，山口翔平，中村浩蔵　（信州大農)

2A05p03　ラットにおける糖転移ナリンジンのバイオアベイラビリティ―と体内動態
14:12　○松本敦子[1]，長田恭一[1]，橋爪雄志[2]，タンジャマハマドゥ[2]　([1]明治大農，[2]東洋精糖㈱)

2A05p04　ラットにおけるルチンの吸収利用と代謝
14:23　○尾方みのり，石田瑞穂，長田恭一　（明治大農)

A06 会場　午前の部(9:30～12:13)

食品―1334 食品機能・栄養 - 免疫，炎症（6 題）1335 食品機能・栄養 - アレルギー・アレルゲン（6 題）―

a01～a04 発表者の接続時間 9:20～9:30

2A06a01　酸化型ビタミン C によるタンパク質修飾を介した単球・マクロファージの機能調節
9:30　○板倉正典[1]，根岸瑠美[2]，近澤未歩[1]，佐々木栄太[1]，内田浩二[1]　([1]東大院・農生化，[2]東大・定量研)

2A06a02　抗酸化性ポリフェノールを介したヒストンリガンドの生成
9:41　板倉正典，○山口公輔，近澤未歩，佐々木栄太，内田浩二（東京大農)

2A06a03　細胞外ヒストンの細胞障害性に対する酸化型ビタミン C 修飾タンパク質の保護効果
9:52　板倉正典，○北澤麗磨，近澤未歩，佐々木栄太，内田浩二（東京大農)

2A06a04　糖修飾エビアレルゲンタンパク質のモデルマウスによるアレルゲン性評価
10:03　○山口春菜，目黒帆乃佳，菰田俊一　（宮城大　食産業)

a06～a10 発表者の接続時間 10:25～10:35

2A06a06　メチル化カテキンとエリオジクチオールの抗アレルギー作用における 機能性フードペアリング
10:35　○藤野小夏，吉本孝憲，藤村由紀，立花宏文　（九大院農院・生機科)

2A06a07　5 種類の褐藻類大型海藻抽出液のヒアルロニダーゼ阻害活性
10:46　○有本清也[1]，高崎隆平[2]，垣田浩孝[1]　([1]日大院総合基，[2]日大文理)

2A06a08　リン酸修飾 Fag e 2 の IgA 産生促進を介したソバアレルギー軽減作用
10:57　○鈴木湧太[1]，山口大樹[1]，中村宗一郎[1]，片山　茂[1,2]　([1]信州大・農，[2]信州大・先鋭領域融合)

2A06a09　経皮感作マウスに高圧下ペプシン処理 β-ラクトグロブリンを経口投与したときのアレルギー応答
11:08　○山田　潔，湯澤美沙季，松岡歩実，松元香澄，東　徳洋（宇都宮大農)

2A06a10　トマト種子抽出物および含有サポニン lycoperoside H の I 型アレルギー性皮膚炎症状に対する作用
11:19　○竹田翔伍[1]，中村誠宏[2]，松田久司[2]，下田博司[1]　([1]オリザ油化㈱，[2]京都薬大)

a11～a13 発表者の接続時間 11:30～11:40

2A06a11　西洋食負荷 Ldlr KO マウスにおけるニトベギク由来オリザビンの粥状動脈硬化症と炎症の予防効果
11:40　○井出将博[1,2]，鷲見加奈子[1]，中村鉄平[1]，Xian Wen Tan[2]，吉田　泉[1]，高橋有志[1]，三嶋　隆[1]，藤田和弘[1]，五十嵐友二[1]，松浦栄次[2]　([1]日本食品分析セ，[2]岡山大院 医歯薬学)

2A06a12　短鎖脂肪酸は腸管系樹状細胞の分化を誘導する
11:51　○三浦亮介，八代拓也，西山千春　（東理大基礎工)

2A06a13　野沢菜漬け由来乳酸菌投与による宿主免疫賦活効果とがん転移の抑制効果
12:02　○田中沙智[1]，稲葉千尋[1]，杉山李奈[1]，遠藤勝紀[1]，浅見拓哉[1]，北村秀光[2]　([1]信州大，[2]北大遺制研)

A06 会場　午後の部(13:50～14:34)

食品―1337 食品機能・栄養 - 酸化，抗酸化，糖化，抗糖化，老化―

p01～p04 発表者の接続時間 13:40～13:50

2A06p01　異物抱合酵素発現酵母を用いたピセアタンノール抱合代謝物の調製及び特性解析
13:50　○中山　舞，西川美宇，安田佳織，深谷圭介，占部大介，榊　利之，生城真一　（富山県大工)

2A06p02　フェニルホウ酸誘導体との親和性を利用した フラボノール標的タンパク質の網羅的分析法の開発
14:01　○早川　諒[1]，中川侑紀[2]，飯泉陽介[3]，石井剛志[4]，芦田　均[5]，赤川　貢[2]　([1]大阪府立大・生命環境，[2]大阪府立大院・生命環境，[3]京都府立医科大・医学，[4]神戸学院大・栄養学，[5]神戸大院・農学)

2A06p03　ジヒドロキシプロリン含有ペプチドの有機合成とその生理活性について
14:12　○堀　優希，二瓶賢一，水重貴文，蕪山由己人　（宇都宮大学)

2A06p04　変性 β-1,3-1,6-グルカンによる包接可溶化で抗酸化物質の抗酸化活性を高める
14:23　○土居菜々子，甲元一也　（甲南大FIRST）

A07 会場　午前の部（9:30〜11:08）

微生物―1450 その他―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

2A07a01　シオミズツボワムシの高増殖・大型変異系統の樹立
9:30　○常泉和秀[1]，山田美恵子[1]，一瀬勝紀[1]，市田裕之[1]，金　禧珍[2]，萩原篤志[2]，川田実季[3]，片山貴士[3]，崎山一孝[3]，手塚信弘[3]，小磯雅彦[3]，阿部知子[1]　（[1]理化学研究所仁科センター，[2]長崎大学，[3]水産研究・教育機構）
2A07a02　反転を伴う回転振盪による糸状菌の培養
9:41　○小野寺正幸[1]，小林由衣乃[1]，川村奈々[2]，竹園　恵[1]，中島敏明[3]，茂野俊也[4]　（[1]新潟工大院生産開発工，[2]㈱プリス，[3]筑波大院生命環境，[4]つくば環微研）
2A07a03　*Bacillus amyloliquefaciens* W-O-1A の示す抗カビ活性について
9:52　○志村洋一郎[1]，髙橋茉佑[1]，加藤　蒼[1]，佐藤有里華[1]，尾形友朔[1]，松浦成美[1]，稲元民夫[1]，福島　淳[1]，上松　仁[2]　（[1]秋田県立大生物資源，[2]秋田高専物質工）
2A07a04　日光東照宮彩色文化財に発生した真菌叢の網羅的解析および光触媒殺菌による真菌防除の検討
10:03　○小笠原麻衣[1,2,3]，三浦菜摘[1]，鈴木孝宗[2]，寺島千晶[2]，藤嶋　昭[2,3]，落合　剛[2,3]，鈴木智順[1,2]　（[1]東理大応生，[2]東理大総研，[3]KISTEC）
2A07a05　Characterization of different sugary kefirs revealed at microbial and functional levels
10:14　○Raul Ricardo GAMBA，Takashi Koyanagi，Toshiki Enomoto　（Department of Food Science（Ishikawa Prefectural University））

a06〜a08 発表者の接続時間 10:25〜10:35

2A07a06　動物種間における腸内細菌数の比較
10:35　○武藤　惇，荒木希和子，久保　幹　（立命館大）
2A07a07　枯草菌の接合伝達に必要な遺伝子の探索
10:46　○山口喜芳，金子真也，相澤康則　（東工大生命）
2A07a08　ネパール産醸造酒のスターターから単離した *Hyphopichia burtonii* のアミラーゼ分泌に関わる転写調節因子の探索
10:57　○山下晶生[1]，志波　優[2]，田村倫子[1]　（[1]東農大院・健康，[2]東農大・生命科学）

A08 会場　午前の部（9:30〜12:13）

微生物―1420 遺伝子 - 構造，機能―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

2A08a01　日本各地の環境試料からの IncPromA 群プラスミドの収集と比較
9:30　○山本雪絵[1]，金子健成[1]，早川雅也[2]，森内良太[3]，道羅英夫[3]，金原和秀[1,2]，新谷政己[1,2,3]　（[1]静大・工，[2]静大院・総合科技，[3]静大・グリーン研）
2A08a02　自己伝達性プラスミドが可動性プラスミドを伝達させる能力の比較
9:41　○早川雅也[1]，山本雪絵[2]，金原和秀[1,2]，新谷政己[1,2,3]　（[1]静大院・総合科技，[2]静大・工，[3]静大・グリーン研）
2A08a03　同一不和合性群に属するプラスミドであってもその宿主域は異なる
9:52　德田真穂[1]，千葉怜碧[2]，井上謙吾[3]，雪　真弘[4]，大熊盛也[4]，水口千穂[5]，野尻秀昭[5]，金原和秀[1,2]，○新谷政己[1,2,6]（[1]静大院・総合科技，[2]静大・工，[3]宮崎大・農，[4]理研・BRC-JCM，[5]東大・生物工学セ，[6]静大・グリーン研）
2A08a04　*Sphingobium* sp. SYK-6 株における 5-ホルミルフェルラ酸代謝系遺伝子の同定と機能解析
10:03　○川添　充[1]，高橋健司[1]，樋口雄大[1]，菱山正二郎[2]，上村直史[1]，政井英司[1]　（[1]長岡技科大・生物，[2]森林総研）
2A08a05　*Sphingobium* sp. SYK-6 株に見いだされた立体選択的なリグニン由来芳香族化合物の外膜輸送システム
10:14　○柴田昂輝[1]，藤田雅也[1]，上村直史[1]，菱山正二郎[2]，政井英司[1]　（[1]長岡技科大・生物，[2]森林総研）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

2A08a06　人工遺伝子クラスターを利用した有機塩素殺虫剤分解酵素遺伝子キャプチャリング株の作製
10:35　○蘇　立俊，加藤広海，大坪嘉行，津田雅孝，永田裕二（東北大院生命）
2A08a07　有機リン系殺虫剤分解細菌 Sphingopyxis wildii 株由来の 2 種のハロアルカンデハロゲナーゼの解析
10:46　○鄧　文昊[1]，Annapoorni Lakshman Sagar[2]，陳　楠楠[1]，加藤広海[1]，大坪嘉行[1]，津田雅孝[1]，Dayanannda Siddavattam[2]，永田裕二[1]　（[1]東北大学・大学院生命科学研究科（院生命科），[2]University of Hyderabad）
2A08a08　PET 分解細菌 *Ideonella sakaiensis* における aldehyde dehydrogenase 遺伝子の機能解明
10:57　○蜂須賀真一[1]，高山暁生[2]，藤原　毅[2]，吉田昭介[1,2]　（[1]奈良先端大・研究推進機構，[2]奈良先端大・バイオ）
2A08a09　硫黄制限条件下における白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* による塩素化芳香族化合物分解について
11:08　○曽我晃久，ワイズ里沙，酒井杏匠，志水元亨，加藤雅士（名城大農）
2A08a10　Construction of experimental evolution system of haloalkane dehalogenases and characterization of the evolved enzymes
11:19　○Nannan CHEN，Yoshiyuki Ohtsubo，Masataka Tsuda，Yuji Nagata　（Tohoku Univ.）

a11〜a13 発表者の接続時間 11:30〜11:40

2A08a11　PCB/ビフェニル分解菌 *Acidovorax* sp. KKS102 株が有する ICE の接合伝達に関与する *traR* 遺伝子の機能解析
11:40　○松本　哲，酒井啓一郎，永田裕二，津田雅孝，大坪嘉行（東北大院生命科）
2A08a12　薬剤耐性遺伝子の伝播に寄与しうるプラスミドの収集
11:51　○中道孝一朗[1]，森　光矢[2]，金原和秀[1,2]，新谷政己[1,2,3]（[1]静大・工，[2]静大院・総合科技，[3]静大・グリーン研）
2A08a13　Replication-Cycle Reaction（RCR）法を利用した環境試料内に存在する環状プラスミド DNA の増幅とその塩基配列の解読
12:02　○森　光矢[1]，奈良聖亜[2]，末次正幸[2]，金原和秀[1]，新谷政己[1,3]　（[1]静大院総合科技，[2]立教大院理，[3]静大グリーン研）

A08 会場　午後の部（13:50〜14:34）

微生物―1420 遺伝子 - 構造，機能―

p01〜p04 発表者の接続時間 13:40〜13:50

2A08p01　*Lactobacillus agilis* BKN88 が持つ 2 種のフラジェリンの特性解析
13:50　○江口直人[1]，鈴木駿也[1]，横田健治[2]，五十君靜信[2]，梶川揚申[2]　（[1]東農大院・農化，[2]東農大・農化）
2A08p02　*In vitro* 再構成系を用いたグルタミン酸生産菌 *Corynebacterium glutamicum* 由来 PDH-ODH 複合体の解析
14:01　○近藤直子[1]，衣川寛知[1]，小峰（阿部）理乃[1]，西山　真[1,2]，古園さおり[1,2,3]　（[1]東大・生物工学セ，[2]東大・微生物連携機構，[3]理研CSRS）

2A08p03　放線菌の環状及び線状プラスミドの接合伝達機構解析
14:12　○深田悠太[1]，田中咲希[1]，池田治生[2]，片岡正和[1]　([1]信州大院・生命医工，[2]北里大・北里生命科学研)

2A08p04　*Streptomyces rochei* 7434AN4 株の線状ゲノムの全塩基配列決定とその解析
14:23　ヨシニンディタ[1,2]，○稲田晋宣[3]，曹　志生[1]，アミルディンアクマドファウジ[1]，手島愛子[1]，見崎裕也[2]，ルクマンムスリミン[1]，楊　英杰[1]，志波　優[4]，吉川博文[5]，田上道平[6]，レジャバアレキサンダー[6]，石川　淳[7]，黒田　誠[7]，関塚剛史[7]，木梨陽康[1]，荒川賢治[1,2]　([1]広島大院・先端研，[2]広島大院・統合生命，[3]広島大・自然科学センター，[4]東農大生命科学，[5]東農大農，[6]理研，[7]国立感染研)

A09 会場　午前の部(9:30〜11:30)

微生物―1422 遺伝子 - ゲノム解析，メタゲノム，プロテオーム，バイオインフォーマティクス―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

2A09a01　ユニークな自家熱型高温好気消化プロセスにおける動態変化解明のためのショットガンメタゲノミクス解析
9:30　○石田夏美，河野祥尚，田代幸寛，酒井謙二　(九大院・生資環)

2A09a02　ヒト毛髪に付着する細菌群集構造の形成因子の解明
9:41　○渡辺康太[1]，西　英二[2]，田代幸寛[1]，酒井謙二[1]　([1]九大院・生資環，[2]大分科捜研)

2A09a03　アクネ菌 16S rRNA 遺伝子を利用した個人識別法の開発
9:52　○楊　佳約[1]，月見友哉[1]，吉川実亜[1]，鈴木健大[2]，武田知己[1]，冨田　勝[1]，福田真嗣[1]　([1]慶大・先端生命研，[2]理研)

2A09a04　森林土壌での樹木根分解に関与する微生物群集構造の解析
10:03　○石山菜々子[1]，堀沢　栄[1]，酒井佳美[2]　([1]高知工科大学，[2]森林研究・整備機構森林総合研究所)

2A09a05　地盤改良工法における丸太の劣化に関連する微生物の検討
10:14　○岡野大輝[1]，堀沢　栄[1]，原　　忠[2]　([1]高知工科大，[2]高知大教育研究部)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

2A09a06　Comparison of novel genome sequences reveal gene recruitment mechanisms of catabolic genes among nine diverse carbazole-degrading bacteria.
10:35　○Felipe VEJARANO[1]，Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1,2]，Yoshiyuki OHTSUBO[3]，Masataka TSUDA[3]，Kazunori OKADA[1]，Hideaki NOJIRI[1,2]　([1]BRC, UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Tohoku University)

2A09a07　軽油分解メタン発酵には多様な嫌気的アルカン分解酵素が関与する
10:46　○竹田玲奈[1]，棚橋優花[2]，伏屋里茄子[2]，中村浩平[2]　([1]岐大自科技研，[2]岐大応生)

2A09a08　*Serrate marcescens* の二次代謝産物産生制御機構の解明に向けたゲノム解析
10:57　○矢部涼香，岡田千波，村上佳織，福島　淳　(秋田県大生資科)

2A09a09　分裂酵母の新規胞子壁タンパク質の同定と機能解析
11:08　○谷口拓海，松崎彩子，中村太郎　(大阪市大・院理)

2A09a10　放射線抵抗性細菌デイノコッカス・ラジオデュランスの DNA 修復機構の正確性に関する比較ゲノム解析
11:19　○三善英彦[1,2]，佐藤勝也[2]，大野　豊[2]，鳴海一成[1]　([1]東洋大学大学院・生命科学研究科，[2]量子化学研究開発機構・高崎量子応用研究所)

A09 会場　午後の部(13:50〜14:34)

微生物―1421 遺伝子 - 発現制御，トランスクリプトーム―

p01〜p04 発表者の接続時間 13:40〜13:50

2A09p01　*Shewanella oneidensis* のバイオフィルム形成とシトクロム *c* 合成を制御する ECF シグマ因子の同定
13:50　○古賀亮太，松元陽歩，高妻篤史，渡邉一哉　(東京薬科大学)

2A09p02　*Shewanella oneidensis* MR-1 株における電極電位応答性プロモーターの同定
14:01　○廣瀬篤弥，高妻篤史，渡邉一哉　(東薬大院生命)

2A09p03　真菌特有の bZIP 型転写因子 HapX と HapB/C/E 複合体との相互作用：HapX の N-末端ドメインの機能解析
14:12　○山下美春，辻上誠也，村田俊輔，志水元亨，加藤雅士　(名城大農)

2A09p04　Burkholderia multivorans の鉄硫黄クラスター生合成遺伝子群における転写活性化機構の解析
14:23　○野々山翔太，岸田康平，永田裕二，大坪嘉行，津田雅孝　(東北大・院生命科)

A10 会場　午前の部(9:30〜11:51)

微生物―1410 細胞 - 分離，分類，生態―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

2A10a01　多様な土壌環境におけるアンモニア酸化微生物の群集構造解析
9:30　○高川智弘，鈴木智順　(東理大・応生)

2A10a02　*Trichoderma reesei* によるもみ殻分解に対する微生物叢の影響解析
9:41　○岩波明季[1]，浦山俊一[1,2]，萩原大祐[1,2]　([1]筑波大生命環境，[2]筑波大・MiCS)

2A10a03　高濃度 CO_2 適応能と窒素固定能を備えた微細藻類群集の探索
9:52　○飯田遥貴，油井信弘，藤井克彦　(工学院大先進工)

2A10a04　分離共培養容器を用いたサンゴ共在細菌間相互作用の実験的再構築
10:03　○西川有美[1]，三浦夏子[1]，植田充美[2]，片岡道彦[1]　([1]阪府大院・生命環境，[2]京大院・農・応用生命)

2A10a05　好アルカリ性高度好塩性古細菌の分離と諸性質解析
10:14　○工藤美祈[1]，早船瑞麗[1]，近藤悠介[1]，嶋根康弘[2]，峯岸宏明[1,2]　([1]東洋大学，[2]海洋研究開発機構)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

2A10a06　MALDI-MS プロテオタイピングのためのバイオマーカー同定
10:35　○寺本華奈江，関谷禎規，岩本慎一，田中耕一　(島津製作所)

2A10a07　ヒト毛髪付着主要細菌の分離
10:46　○西　悠里，渡邉康太，田代幸寛，酒井謙二　(九大院・生資環)

2A10a08　CODH/ACS を欠損した偏性混合栄養メタン菌の解析
10:57　○名古屋美紗[1]，高妻篤史[1]，上野嘉之[2]，渡邉一哉[1]　([1]東薬大生命，[2]鹿島建設)

2A10a09　循環型汚水浄化槽から分離された代謝産物要求細菌の系統解析とヘルパー細 菌との対応関係の解析
11:08　○野村拓哉，鈴木智順　(東理大応生)

2A10a10　循環型汚水浄化槽内における代謝産物要求細菌の網羅的な系統解析
11:19　○鈴木遥菜，島田紘帆，鈴木智順　(東理大・応生)

a11 発表者の接続時間 11:30〜11:40

2A10a11　循環型汚水浄化槽における代謝産物要求細菌が要求する物質の特定
11:40　○山本晃裕，島田紘帆，鈴木智順　（東理大応生）

A11 会場　午前の部（9:30〜12:02）

微生物―1440 物質生産 - 醸造，発酵（一次代謝産物）―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

2A11a01　清酒酵母変異株のリンゴ酸高生産原因変異遺伝子の同定
9:30　○馬場嵩一朗[1]，澤田和敬[2]，永野幸生[1,3]，折田　亮[4]，木村　圭[1,4]，玉置尚徳[1,5]，後藤正利[1,4]，小林元太[1,4]　([1]鹿児島大院連農，[2]佐賀県工技セ，[3]佐大分析セ，[4]佐大農，[5]鹿児島大農）
2A11a02　野生酵母における 4-VG 生産系の役割と清酒醸造に向けた 4-VG 非生成株の遺伝的要因の解析
9:41　○奥村真衣[1]，吉村明浩[2]，澤井美伯[2]，正木和夫[2,3]，向田　潤[4]，三井亮司[4]，島田昌也[1]，早川享志[1]，中川智行[1]　([1]岐阜大院自然科学，[2]岐阜県食品科学研，[3]酒類総合研究所，[4]岡山理科大理）
2A11a03　カプロン酸エチル超高生産株の育種と清酒実地醸造試験
9:52　○小高敦史，高宮毅志，松村憲吾，堀田夏紀，村上直之，鈴木佐知子，秦　洋二，石田博樹　（月桂冠・総研）
2A11a04　全ゲノム情報に基づく国酒酵母の系統学的検討
10:03　○森谷千星[1]，門倉利守[1]，中山俊一[1]，松谷峰之介[2]，兼崎　友[3]，藤田信之[4]，鈴木健一朗[1]　([1]東農大醸造，[2]東農大生物資源ゲノム解析センター，[3]静大グリーン科学技術研究所，[4]東農大微生物）
2A11a05　清酒酵母きょうかい 6 号由来新規アルコール耐性変異株の原因変異の探索
10:14　○五島徹也，周　　延，小林めぐみ，赤尾　健　（酒総研）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

2A11a06　メタボローム及びタンパク質解析による出芽酵母菌株の特性解析
10:35　○高橋　圭[1]，河野弘美[1]，水野　恵[1]，渡辺大輔[1,2]　([1]酒類総研，[2]京大院・農・食品生物）
2A11a07　醪中における清酒酵母の圧力不活性化要因の解析
10:46　○池崎　南[1]，野村一樹[2]，堀沙織里[3]，青木俊夫[4]，栗林　喬[4]，金桶光起[4]，井口晃徳[1,3]，重松　亨[1,3]　([1]新潟薬大院・応生科，[2]農研機構 食品研究部門，[3]新潟薬大・応生科，[4]新潟県醸造試験場）
2A11a08　バリン代謝が変化した新規 *ILV6* 変異酵母のアミノ酸生成能と清酒醸造特性
10:57　○村上直之[1]，磯貝章太[2]，蘆田佳子[2]，小高敦史[1]，西村　明[2]，松村憲吾[1]，秦　洋二[1]，石田博樹[1]，高木博史[2]　([1]月桂冠・総研，[2]奈良先端大バイオ）
2A11a09　清酒酵母のフェニルアラニン高含有株に見出した *ARO80* 遺伝子変異の機能解析および清酒醸造への応用
11:08　蘆田佳子[1]，○豊川洋一[1]，磯貝章太[1]，村上直之[2]，小高敦史[2]，松村憲吾[2]，西村　明[1]，秦　洋二[2]，石田博樹[2]，高木博史[1]　([1]奈良先端大・バイオ，[2]月桂冠・総研）
2A11a10　清酒酵母におけるプロリン高生産株の育種と新規な γ-グルタミルキナーゼ変異体の機能解析
11:19　○磯貝章太[1]，豊川洋一[1]，小高敦史[2]，高崎友里恵[1]，蘆田佳子[1]，村上直之[2]，松村憲吾[2]，西村　明[1]，秦　洋二[2]，石田博樹[2]，高木博史[1]　([1]奈良先端大・バイオ，[2]月桂冠・総研）

a11〜a12 発表者の接続時間 11:30〜11:40

2A11a11　花から分離した野生酵母の糖資化能が清酒の味に及ぼす影響
11:40　○堤星太郎[1]，家田明音[1]，酒井杏匠[1]，三井　俊[2]，伊藤彰敏[2]，志水元亨[1]，加藤雅士[1]　([1]名城大院・農，[2]あいち産業科学技術総合センター・食品工業技術センター）
2A11a12　ブドウ果皮常在酵母の同定とワイン醸造における役割
11:51　○渡辺大輔，橋本　渉　（京大院農）

A11 会場　午後の部（13:50〜14:34）

微生物―1440 物質生産 - 醸造，発酵（一次代謝産物）―

p01〜p04 発表者の接続時間 13:40〜13:50

2A11p01　アンズの花からの新規清酒製造用酵母の分離
13:50　○野地秀和[1]，本間裕人[2]，徳田宏晴[2]，数岡孝幸[2]　([1]東農大院農，[2]東農大応生）
2A11p02　藤の花からの清酒醸造用野生酵母の単離と育種
14:01　○鈴木聖袈[1]，鈴木雅史[1]，栗林　喬[3]，佐藤圭吾[3]，武内沙樹[2]，菖池陽平[2]，杉本華幸[1,2]，金桶光起[3]，鈴木一史[1,2]　([1]新潟大院・自然研，[2]新潟大・農，[3]新潟県醸造試験場）
2A11p03　近畿大学構内の花からの酵母の分離及び醸造特性の解析
14:12　○松尾啓史[1]，笠行康葉[1]，高崎友里恵[1]，堂本有美華[1]，清水浩美[2]，大橋正孝[2]，都築正男[2]，首藤明子[2]，倉田淳志[1]，上垣浩一[1]　([1]近畿大農，[2]奈良県産振セ）
2A11p04　大麦麦芽から分離した「とやま産まれの酵母」による実地醸造と清酒醸造特性
14:23　○尾仲宏康[1]，丸山潤一[1]，浅水俊平[1]，山田雅人[2]，五島徹也[3]，赤尾　健[3]　([1]東大院農生科，[2]成政酒造，[3]酒総研）

A12 会場　午前の部（9:30〜12:13）

微生物―1430 代謝 - 代謝調節，発酵生理，メタボローム―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

2A12a01　メタノール資化性菌での代替経路による C1 化合物資化に向けた代謝改変
9:30　平林　翼[1]，○折田和泉[1]，新田克章[2]，中村　聡[1]，福崎英一郎[2]，福居俊昭[1]　([1]東工大生命理工，[2]阪大院工）
2A12a02　水素細菌およびメチロトローフにおける転写制御スイッチの確立
9:41　平山歩夢[1]，折田和泉[1]，中村　聡[1]，梅野太輔[2]，○福居俊昭[1]　([1]東工大生命理工，[2]千葉大院工）
2A12a03　フラックスバランス解析を活用した油脂酵母の油脂生産性の改良
9:52　○寺澤大輝[1]，白井智量[2]，松田史夫[3]，油谷幸代[4,5]，荒　学志[7]，山崎晴丈[1]，志田洋介[6]，小笠原渉[6]，矢追克郎[5]，荒木秀雄[7]，高久洋暁[1]　([1]新潟薬大・応生科，[2]理研・CSRS，[3]阪大院・情報科学，[4]産総研・CBBD-OIL，[5]産総研・生物プロセス，[6]長岡技科大・工，[7]不二製油グループ本社株式会社）
2A12a04　比較ゲノム解析による油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の新規油脂蓄積制御因子の同定とその機能解析
10:03　○風間春香[1]，森　一樹[2]，油谷幸代[3,4]，荒　学志[6]，山崎晴丈[1]，志田洋介[5]，小笠原渉[5]，矢追克郎[4]，荒木秀雄[6]，田代康介[7]，高久洋暁[1]　([1]新潟薬大・応生科，[2]鹿児島高専，[3]産総研・CBBD-OIL，[4]産総研・生物プロセス，[5]長岡技科大・工，[6]不二製油グループ本社，[7]九州大・院生資源・遺伝子制御）
2A12a05　情報科学を活用した油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の新規油脂生産制御因子の獲得
10:14　○庭山ひかる[1]，油谷幸代[2,3]，荒　学志[5]，山崎晴丈[1]，志田洋介[4]，小笠原渉[4]，矢追克郎[3]，荒木秀雄[5]，高久洋暁[1]　([1]新潟薬大・応生科，[2]産総研・CBBD-OIL，[3]産総研・生物プロセス，[4]長岡技科大・工，[5]不二製油グループ本社）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

2A12a06　比較ゲノム解析による油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の油脂低蓄積原因遺伝子の同定
10:35　○佐藤里佳子[1]，山田日向子[1]，森　一樹[2]，油谷幸代[3,4]，荒　学志[6]，山崎晴丈[1]，志田洋介[5]，小笠原渉[5]，矢追克郎[4]，荒木秀雄[6]，田代康介[7]，高久洋暁[1]　([1]新潟薬大・応生科，[2]鹿児島高専，[3]産総研・CBBD-OIL，[4]産総研・生物プロセス，[5]長岡技科大・工，[6]不二製油グループ本社，[7]九州大・院生資源・遺伝子制御)

2A12a07　油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* のトリアシルグリセロール分解酵素の機能解析
10:46　○山本大雅[1]，荒　学志[4]，山崎晴丈[1]，志田洋介[2]，小笠原渉[2]，矢追克郎[3]，荒木秀雄[4]，高久洋暁[1]　([1]新潟薬大・応生科，[2]長岡技科大・工，[3]産総研・生物プロセス，[4]不二製油グループ本社)

2A12a08　YggS/PROSC タンパク質ファミリーによるビタミン B_6 恒常性維持機構
10:57　○小河ほのか，伊藤智和，邊見　久，吉村　徹　(名大院・生命農)

2A12a09　安息香酸は分裂酵母の CoQ 生合成を顕著に阻害する
11:08　○西田郁久[1]，戒能智宏[1,2]，松尾安浩[1,2]，川向　誠[1,2]　([1]島根大生物資源，[2]島根大農生命系)

2A12a10　亜リン酸依存性による生物学的封じ込め株の pH 依存的増殖メカニズムの解明
11:19　○日野智仁[1]，本　陽介[1]，池田　丈[2]，石田丈典[2]，舟橋久景[2]，黒田章夫[2,3]，廣田隆一[2,3]　([1]広島大工，[2]広島大院統合生命，[3]JST-ALCA)

a11〜a13 発表者の接続時間 11:30〜11:40

2A12a11　*Thermus thermophillus* HB27 における Acetyl-CoA synthetase の機能解析
11:40　○高島慶一郎[1]，吉田彩子[1]，富田武郎[1,2]，葛山智久[2,3]，古園さおり[1,2]，西山　真[1,2]　([1]東大・生物工学セ，[2]東大・CRIIM，[3]東大院・農生科)

2A12a12　高度好熱菌由来 CoA transferase の制御タンパク質 ADLP の機能構造解析
11:51　○吉田彩子[1]，山本寛之[1]，富田武郎[1,2]，葛山智久[2,3]，古園さおり[1,2]，西山　真[1,2]　([1]東大生物工学セ，[2]東大CRIIM，[3]東大院農生科)

2A12a13　乳酸菌 *Enterococcus faecalis* のグリセロール代謝における糖新生の役割
12:02　○土肥裕希[1,2]　([1]岡山理大・工，[2]筑波大・生命環境)

A12 会場　午後の部(13:50〜14:34)

微生物―1430 代謝 - 代謝調節，発酵生理，メタボローム―

p01〜p04 発表者の接続時間 13:40〜13:50

2A12p01　大腸菌代謝ステート遷移における酢酸の役割
13:50　中澤昂太[1]，太刀川智之[1]，島田友裕[2]，○田中　寛[1]　([1]東工大化生研，[2]明大農)

2A12p02　フミン酸添加培養モデルが解明する土壌環境中での糸状菌の代謝制御
14:01　○宮崎つぐみ，大泉太於，中澤奈美，桝尾俊介，高谷直樹　(筑波大・生命環境・微生物サステイナビリティ研究センター)

2A12p03　糖消費速度に応じて発現変動する代謝遺伝子
14:12　山口　陽[1]，豊田晃一[2]，乾　将行[2]，○柘植陽太[1,3]　([1]金沢大院・自科，[2]RITE，[3]金沢大・新学術)

2A12p04　Light lanthanides induce methylotrophy and methanol oxidation pathway in *Bradyrhizobium* sp. strain Ce-3
14:23　○VIAGIAN PASTAWAN[1]，Soya Suganuma[1]，Kosuke Mizuno[1]，Lun Wang[1]，Masaya Shimada[1]，Takashi Hayakawa[1]，Nanung Agus Fitriyanto[2]，Tomoyuki Nakagawa[1]　([1]Gifu Univ.，[2]Gadjah Mada Univ.)

A16 会場　午前の部(9:30〜12:13)

微生物―1443 物質生産 - 微生物変換，微生物酵素反応―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

2A16a01　カビ胞子を用いた新規な非水系ステロイド変換システムの開発
9:30　○白松李菜，小田　忍　(金沢工大ゲノム研)

2A16a02　糸状菌胞子を用いた非水系微生物変換システム
9:41　○杉本恭子，小田　忍　(金沢工大ゲノム研)

2A16a03　界面バイオプロセスを用いた alpha-pinene の微生物変換
9:52　○米田亘輝，角地孝文，小田　忍　(金沢工大ゲノム研)

2A16a04　機能向上を狙った静岡県産農産物の乳酸菌発酵
10:03　○袴田雅俊　(静岡県工業技術研究所)

2A16a05　ヒト皮膚に対するフェアリー化合物の有効性・安全性
10:14　○青島央江[1]，崔　宰熏[2]，呉　　静[2]，河岸洋和[2]　([1]ビタミンC[60]バイオリサーチ株式会社，[2]国立大学法人静岡大学　グリーン科学技術研究所)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

2A16a06　(*R*)-3-ヒドロキシ酪酸を(*R*)-1,3-ブタンジオールに変換する微生物の探索
10:35　岸野重信[1]，○白石大貴[1]，盤若明日香[2]，坪田　潤[2]，小川　順[1]　([1]京大院農・応用生命，[2]大阪ガス)

2A16a07　紅麹菌プロテアーゼによる大豆タンパク質加水分解機能性ペプチドのオミクス解析
10:46　○橘信二郎[1]，與儀真衣[1]，小倉裕太[1]，比嘉悠貴[2]，深見裕之[2]，為定　誠[2]　([1]琉球大・農，[2]小林製薬中央研究所)

2A16a08　酢酸菌を用いるペリプラズミック代謝工学の試み
10:57　中村謙太郎[1]，永木　翔[2]，松谷峰之介[1]，片岡尚也[1,2,3]，松下一信[1,2,3]，足立収生[1]，○薬師寿治[1,2,3]　([1]山口大・院創成科学，[2]山口大・農学部，[3]山口大・中高温微研セ)

2A16a09　メチロトロフ C1 代謝の逆反応によるグルコースからのメタノール生産
11:08　○竹谷友之，山木田雅，阪井康能，由里本博也　(京大院農)

2A16a10　シロイヌナズナ由来 UGT78D2 を導入した大腸菌を用いたフラボノイド変換反応
11:19　松阪祐哉[2]，○小堀　亮[1]，西村拓哉[1]，川崎　崇[3]，齊藤安貴子[1,2]　([1]大阪電気通信大学大学院工学研究科先端理工学専攻，[2]大阪電気通信大学工学部環境科学科，[3]京都大学生存圏研究所)

a11〜a13 発表者の接続時間 11:30〜11:40

2A16a11　レスベラトロールを基質とするアグリコンの複数水酸基への選択的配糖化反応の研究
11:40　○岡崎塁大[1]，古谷　翔[1]，竹内道樹[2]，原良太郎[2]，小川　順[3]，上田　誠[1,2]　([1]小山高専物質工学科，[2]京大院農・産業微生物，[3]京大院農・応用生命)

2A16a12　プロトカテク酸脱炭酸反応を促進するジメチルアリルピロリン酸脱リン酸化酵素遺伝子の同定
11:51　栗本祐樹，田中　誠，○園木和典　(弘前大・農生)

2A16a13　リグニンからの 4-ヒドロキシ安息香酸生産への *Pseudomonas* sp. NGC7 株の適用
12:02　○阿久津美歩[1]，上村直史[2]，政井英司[2]，園木和典[1]　([1]弘前大院・農学生命，[2]長岡技大院・工・生命)

A17 会場　午前の部（9:30〜12:13）

微生物―1414 細胞 - 情報伝達，細胞応答，ストレス応答―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

2A17a01　*Escherichia coli* における新規 *yecD-yecE* toxin-antitoxin system の解析
9:30　○島本　望，山口良弘　（阪市大理）

2A17a02　大腸菌の新規 toxin-antitoxin system, YegX-YegW, の同定
9:41　○原　健太，山口良弘　（阪市大理）

2A17a03　大腸菌における新規 toxin-antitoxin system *fic-yhfG* の同定
9:52　○中村勇斗，山口良弘　（阪市大理）

2A17a04　メチルグリオキサールによる出芽酵母の核分裂阻害機構の解析
10:03　○野村　亘[1,2]，青木美穂[3]，後藤　剛[1,2]，河田照雄[1,2]，井上善晴[3]　（[1]京大院・農・食品生物，[2]京大・生理化学研究ユニット，[3]京大院・農・応生科）

2A17a05　分岐鎖アルコールによる酵母生育阻害の新たな分子メカニズムの発見とイソブタノール生産への応用
10:14　○黒田浩一[1]，渡邉幸夫[1]，Gerald R. Fink[2]，Gregory Stephanopoulos[3]，植田充美[1]，Jose L. Avalos[4]　（[1]京大院農・応用生命，[2]Whitehead Institute for Biomedical Research，[3]Massachusetts Institute of Technology，[4]Princeton University）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

2A17a06　希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の胞子嚢開裂を制御するシグマ−アンチシグマファクター系の同定と機能解析
10:35　○光山京太[1]，手塚武揚[1,2]，大西康夫[1,2]　（[1]東大院・農生科・応生工，[2]東大・微生物連携機構）

2A17a07　希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の胞子嚢開裂を制御する Clp プロテアーゼに関する研究
10:46　○鈴木遼太[1]，手塚武揚[1,2]，大西康夫[1,2]　（[1]東大院・農生科，[2]東大・微生物連携機構）

2A17a08　希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の胞子嚢形成・開裂を制御する FliA レギュロンの機能解析
10:57　手塚武揚[1,2]，○漆間功真[3]，大西康夫[1,2]　（[1]東大院・農生科・応生工，[2]東大・微生物イノベ連携機構，[3]東大・農）

2A17a09　ピルビン酸応答二成分制御系 BtsS/R によるバイオフィルム形成制御機構の解明
11:08　○山路幸太郎[1]，小笠原寛[2]　（[1]信州大　繊維学部　応生，[2]信州大　基盤研究セ　遺伝子）

2A17a10　大腸菌ペリプラズムタンパク質 YccT によるアミロイド線維形成制御機構
11:19　小林弘明[1]，佐野晃太郎[1]，加藤佑輝[1]，○小笠原寛[2]　（[1]信州大・繊維・応生，[2]信州大・基盤研究セ・遺伝子）

a11〜a13 発表者の接続時間 11:30〜11:40

2A17a11　酵母に見出した一酸化窒素合成に必要な補酵素の解析
11:40　○吉川雄樹，那須野亮，高木博史　（奈良先端科学技術大学院大学）

2A17a12　リボフラビン合成系酵素 GTP シクロヒドロラーゼ II 依存的な新しい一酸化窒素耐性機構
11:51　○那須野亮，アナムカイルル，高木博史　（奈良先端大バイオ）

2A17a13　酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における転写因子 Fzf1 による細胞内 NO レベルの調節機構
12:02　○吉岡奈津子，那須野亮，高木博史　（奈良先端大・バイオ）

A17 会場　午後の部（13:50〜14:34）

微生物―1414 細胞 - 情報伝達，細胞応答，ストレス応答―

p01〜p04 発表者の接続時間 13:40〜13:50

2A17p01　複合スフィンゴ脂質生合成破綻下における酵母の生存戦略
13:50　坂本理沙，瓜田敦哉，○谷　元洋　（九州大理）

2A17p02　出芽酵母の複合スフィンゴ脂質生合成破綻下における cAMP/PKA シグナリング経路と HOG 経路の役割
14:01　○瓜田敦哉[1]，柳瀬由起美[1]，石橋洋平[2]，谷　元洋[1]　（[1]九州大理，[2]九州大農）

2A17p03　グルコース応答経路によるスピンドルチェックポイントタンパク質 Mad1 の制御機構
14:12　○田部卓磨[1]，明吉純花[1]，酒井智健[1]，川向　誠[1,2]，松尾安浩[1,2]　（[1]島根大・生物資源・生命科学，[2]島根大・農生命系）

2A17p04　分裂酵母 cAMP/PKA 経路の標的因子 Mug14 の解析
14:23　○稲村真一[1]，田部卓磨[2]，川向　誠[1,2,3]，松尾安浩[1,2,3]　（[1]島根大・自然科学，[2]島根大・生物資源・生命科学，[3]島根大・農生命系）

A18 会場　午前の部（9:30〜11:30）

微生物―1412 細胞 - 栄養，生育，増殖―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

2A18a01　IncP-7 群プラスミド pCAR1 上に新たに見出された TA システムの機能解析
9:30　○高島　綾[1]，河野　響[1]，上田朋美[1]，水口千穂[1,2]，岡田憲典[1]，野尻秀昭[1,2]　（[1]東大・生物工学セ，[2]東大・微生物連携機構）

2A18a02　細菌にプラスミドへの非感受性を与える転写制御ネットワークの解明
9:41　○河野　響[1]，水口千穂[1,2]，岡田憲典[1]，野尻秀昭[1,2]　（[1]東大・生物工学セ，[2]東大・微生物連携機構）

2A18a03　Lanthanide dependent methylotrophic pathway in *Methylobacterium aquaticum* 22A
9:52　○Patcha YANPIRAT，Akio TANI　（Okayama Univ.）

2A18a04　*Methylobacterium aquaticum* strain 22A におけるランタノイドスイッチのメカニズム
10:03　○宮本稚子，谷　明生　（岡山大植物研）

2A18a05　*Methylobacterium aquaticum* 22A 株における Lanmodulin の機能解析
10:14　○藤谷良子，谷　明生　（岡山大植物研）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

2A18a06　*Methylorubrum* 属細菌の低栄養環境下におけるランタノイド応答の分子メカニズムの解明
10:35　○水野洸介[1]，原田雄斗[1]，岩本悟志[1]，谷　明生[2]，三井亮司[3]，島田昌也[1]，早川享志[1]，中川智行[1]　（[1]岐阜大自然科学，[2]岡山大植物研，[3]岡山理科大理）

2A18a07　ブタ由来の腸内細菌 *Megasphaera elsdenii* の有機酸代謝経路の解明
10:46　○板谷かえで[1]，荒岡亮祐[1]，宮原　平[1]，宮本浩邦[1,2,3]，児玉浩明[1]　（[1]千葉大院園芸，[2]サーマス，[3]理研生命医科学）

2A18a08　ブタの糞からの Bacteroidetes 門バクテリアの単離と有機酸産生能の特徴
10:57　○佐藤茉由[1]，宮本浩邦[1,2,3]，児玉浩明[1]　（[1]千葉大・園芸，[2]サーマス，[3]理研・生命医科学）

2A18a09　好熱性プロバイオティクス *Bacillus hisashii* の細胞外多糖が腸内バクテリアの有機酸産生に与える影響
11:08 ○施　書琦[1]，佐藤茉由[1]，須田　栞[1]，土肥博史[1]，宮本浩邦[1,2,3]，児玉浩明[1]　([1]千葉大院園芸，[2]サーマス，[3]理研. 生命医科学)

2A18a10　自吸式通気攪拌装置が ATAD プロセス主要細菌の増殖に及ぼす影響
11:19 ○坂元俊介[1]，三島健司[2]，田代幸寛[1]，酒井謙二[1]　([1]九大院・生資環，[2]福岡大学)

A19 会場　午前の部(9:30〜12:13)

食品―1313 食品化学 - その他―

a01〜a04 発表者の接続時間 9:20〜9:30

2A19a01　微生物を用いた熟成魚の製造とその性質
9:30 ○原田美鶴[1]，舘野美紗子[2]，跡部美樹雄[3]，村上周一郎[1,3]　([1]明治大農・農化，[2]明治大院農・農化，[3]㈱ミートエポック)

2A19a02　Study on food ingredients that regulate the activity of retinaldehyde dehydrogenase isozymes (RALDHs)
9:41 ○Thi Bao Chau BUI，Shohei NOSAKI，Yuqun XU，Masaru TANOKURA，Takuya MIYAKAWA，Satoshi HACHIMURA　(Grad. Sch. Agr. Life Sci., Univ. Tokyo)

2A19a03　チェリー・オブ・ザ・リオ・グランデ葉抽出物による 5-リポキシゲナーゼ阻害
9:52 ○川上祐生，神崎真由香，桐岡佐妃，津嘉山泉，岩岡裕二，伊東秀之，山本登志子，高橋吉孝　(岡山県大保福)

2A19a04　島根県西ノ島町産 褐藻ツルアラメの粉末化工程における食品品質および生理活性に関する検討
10:03 ○杉浦義正[1]，木下陽一[2]，山谷裕昭[3]，井上裕三[3]，中西正美[4]，平田文久[4]，林　裕一[5]，村瀬　昇[1]　([1]水産機構水大校，[2]西ノ島町，[3]ノア隠岐，[4]JFしまね，[5]岡部㈱海洋事業部)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

2A19a06　ボイル緑色野菜の退色抑制技術の開発
10:35 ○井上萌恵，山本　純，黒瀧秀樹，松元一頼　(奥野製薬工業株式会社)

2A19a07　*Petasites japonicus* 葉柄の各種あく抜き処理がピロリジジンアルカロイド類の低減に及ぼす影響
10:46 ○竹中真紀子[1]，三宅紀子[1]，木村俊之[2]，漆山哲生[3]，等々力節子[2]　([1]東京家政学院大学，[2]農研機構食品研究部門，[3]農林水産省)

2A19a08　蛍光灯・ＬＥＤ照射による乳製品の光劣化に対する乳化型抗酸化製剤の作用
10:57 小林康祐，○門脇章夫，檜山真一郎　(太陽化学株式会社)

2A19a09　インゲンマメから抽出した水溶性多糖類の物性と走査型プローブ顕微鏡による構造解析
11:08 ○酒井円香[1]，大星仁美[1]，中村彰宏[1]，長谷川芳則[2]，西山節子[2]　([1]茨城大農，[2]不二製油グループ本社　未来創造研究所)

2A19a10　直鎖ペプチドからのプロリン含有環状ジペプチド生成機構の解明
11:19 ○大塚祐季[1]，有田　光[1]，阪地満帆[1]，山本憲司[2]，柏木丈拡[1]，島村智子[1]，受田浩之[3]　([1]高知大・農，[2]サントリーホールディングス㈱，[3]高知大・地域創造セ)

a11〜a13 発表者の接続時間 11:30〜11:40

2A19a11　シュークリームの選択行動
11:40 ○後藤幸生，細川陽子　(高砂香料工業株式会社)

2A19a12　果実の収穫時期がデラウェアワインの品質に与える影響
11:51 ○下野雄太，三輪由佳，平松和也，谷本秀夫　(大阪環農水研)

2A19a13　二番茶葉を用いた新規乳酸発酵茶の開発
12:02 ○永嶺海夕，大島知也，舘野勝洋，椎葉　究，安部智子　(東京電機大理工)

B01 会場　午前の部(9:30〜12:13)

有機化学，天然物化学―1110 天然物 - 単離構造決定 - 微生物―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

2B01a01　緑膿菌に活性を示す新規抗生物質の発見と構造
9:30 ○澤　竜一，五十嵐雅之，梅北まや，木村智之，波多野和樹，林　千草，久保田由美子，渋谷優子　(微化研)

2B01a02　アリ由来放線菌の生産する新規 hydrazone 含有抗生物質に関する研究
9:41 ○五十嵐雅之，木村智之，村松秀行，澤　竜一，梅北まや，林　千草，有坂理恵　(微化研)

2B01a03　フグ由来の新規テトロドトキシン関連化合物の単離と構造
9:52 ○八重樫優士[1]，工藤雄大[2,1]，長由扶子[1]，此木敬一[1]，山下まり[1]　([1]東北大院農，[2]東北大学際研)

2B01a04　有毒イモリより得られた *N*-hydroxy 型テトロドトキシン類縁体の構造解析
10:03 ○工藤雄大[1,2]，ハニフィンチャールス[3]，小瀧裕一[4]，山下まり[2]　([1]東北大学際研，[2]東北大院農，[3]ユタ州立大ユーインターベイシン校，[4]福島学院大)

2B01a05　麻痺性貝毒サキシトキシンの推定生合成中間体の合成と有毒生物中の分析
10:14 ○東海林千容[1]，長由扶子[1]，赤松みちる[1]，安達栞菜[2]，石塚　颯[2]，此木敬一[1]，長澤和夫[2]，山下まり[1]　([1]東北大院農，[2]東農工大院工)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

2B01a06　Isolation of Bioactive Compounds from the fruiting bodies of *Entoloma clypeatum*
10:35 ○Irine Yunhafita Malya[1]，Jing Wu[2]，Jae-Hoon Choi[1,2]，Hirofumi Hirai[1,2]，Hirokazu Kawagishi[1,2]　([1]Grad. Sch. Sci. Tech., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ.)

2B01a07　Isolation and Biological Activity Evaluation of Secondary Metabolites from *Pleurocybella porrigens*
10:46 ○Arbin Sunuwar[1]，Arif Yanuar Ridwan[2]，Jing Wu[3]，Jae-Hoon Choi[1,2,3]，Hirofumi Hirai[1,2,3]，Hirokazu Kawagishi[1,2,3]　([1]Grad. Sch. Inte. Sci. Tec., Shizuoka Univ., [2]Gra. Sch. Sci. Tech., Shizuoka Univ., [3]RIGST, Shizuoka Univ.)

2B01a08　キノコからの免疫チェックポイント阻害物質の探索
10:57 ○呉　　静[1]，高橋真奈美[2]，リヅアンアリフ[3]，崔　宰熏[1,2,3]，平井浩文[1,2,3]，二木美咲[4]，平田裕嗣[4]，西川俊夫[4]，原田栄津子[5]，小堀　一[6]，戸田雅昭[7]，ガバザコリナ[7]，安間太郎[7]，ガバザエステバン[7]，河岸洋和[1,2,3]　([1]静大グリーン研，[2]静大院総合農，[3]静大院創造，[4]名大院生命農，[5]宮崎大農，[6]岩出菌研，[7]三重大院医)

2B01a09　シロオニタケ子実体機能性物質の探索
11:08 ○上石優作[1]，呉　　静[2]，崔　宰熏[1,2,3]，平井浩文[1,2,3]，河岸洋和[1,2,3]　([1]静大院・総合農，[2]静大・グリーン研，[3]静大院・創造)

2B01a10　サケツバタケ菌糸体培養濾液からの生物活性物質の探索
11:19 ○篠塚　陸[1]，ゆんはふぃたまるやいりね[2]，呉　　静[3]，崔　宰熏[1,2,3,4]，平井浩文[1,2,3,4]，河岸洋和[1,2,3,4]　([1]静大農・応生科，[2]静大院・総合農，[3]静大・グリーン研，[4]静大院・創造)

a11〜a13 発表者の接続時間 11:30〜11:40

2B01a11　オオシロカラカサタケ培養濾液由来の生体機能性物質の探索
11:40 ○小椋隆平[1]，呉　　静[3]，崔　宰熏[1,2,3,4]，平井浩文[1,2,3,4]，河岸洋和[1,2,3,4]　([1]静大農，[2]静大院・総合農，[3]静大・グリーン研，[4]静大院・創造)

2B01a12　糸状菌代謝産物からの抗アスペルギルス活性物質の探索
11:51　○渡邊善洋[1]，吉田百合香[2]，常盤俊之[1]，穂苅　玲[1]，石山亜紀[1,3]，岩月正人[1,3]，野中健一[1,3]，矢口貴志[4]，大村　智[1]（[1]北里生命科学研究所，[2]北里大学理学部 化学科，[3]感染制御科学府，[4]千葉大学 真菌医学研究センター）

2B01a13　*Calcarisporium arbuscular* から単離した新規 Gymnomitrane
12:02　○三浦聖美，松本愛美，殿内暁夫，橋本　勝（弘前大農）

B02 会場　午前の部（9:30〜10:57）

有機化学，天然物化学―1170 その他―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

2B02a01　N-アルキルアザフラボノイドの合成及び増殖抑制活性に関する研究
9:30　○武林　薫[1]，川井　悟[1]，常盤野哲生[2]，吉澤結子[2]（[1]東電大理工，[2]秋田県大生資科）

2B02a02　ピラノクマリン類の合成及び増殖抑制活性に関する研究
9:41　○鈴木杏実[1]，川井　悟[1]，常盤野哲生[2]，吉澤結子[2]（[1]東電大理工，[2]秋田県大生資科）

2B02a03　キサントン類の合成及び増殖抑制活性に関する研究
9:52　○松岡勇樹[1]，川井　悟[1]，常盤野哲生[2]，吉澤結子[2]（[1]東電大理工，[2]秋田県大生資科）

2B02a04　スチリルクロメンの合成及び増殖抑制活性に関する研究
10:03　○井上悠真[1]，川井　悟[1]，常盤野哲生[2]，吉澤結子[2]（[1]東電大理工，[2]秋田県大生資科）

2B02a05　スギヒラタケが産生する毒性物質に関する組織学的研究
10:14　○手塚裕紀[1]，中村瑠奈[1]，浅川倫宏[2]，前川文彦[3]，木村栄輝[3]，菅　敏幸[4]，河岸洋和[5,6]，鈴木智大[1]（[1]宇都宮大・バイオ，[2]東海大・創造科学技術研究機構，[3]国立環境研究所・環境リスク健康研究センター，[4]静県大・薬，[5]静岡大・農，[6]静岡大・グリーン研）

a06〜a07 発表者の接続時間 10:25〜10:35

2B02a06　リンゴ果実における食害で誘導される二次代謝物の動態
10:35　○大畑勇統[1]，森田沙代[1]，吉永直子[1]，石栗陽一[2]，森　直樹[1]（[1]京大院・農，[2]青森産技セ　りんご研）

2B02a07　Marchantia paleacea subsp.diptera（フタバネゼニゴケ）が発する香気成分
10:46　○桜井和俊[1]，富山賢一[2]，矢口善博[2]，浅川義範[3]（[1]静岡県立静岡がんセンター研究所，[2]高砂香料工業株式会社研究開発本部，[3]徳島文理大学生薬研究所）

B03 会場　午前の部（9:30〜11:30）

有機化学，天然物化学―1140 天然物 - ケミカルバイオロジー ―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

2B03a01　新しいタイプの二次代謝酵素 TAS1 のホモログを活用した新規生理活性天然化合物の発掘
9:30　○本山高幸，野川俊彦，清水　猛，川谷　誠，二村友史，尹　忠銖，長田裕之（理研CSRS・ケミカルバイオロジー）

2B03a02　ハイグロマイシン B により生産誘導される二次代謝産物の生合成遺伝子クラスター同定及び生理活性の解析
9:41　○加藤　翔[1,2]，本山高幸[2]，二村友史[2]，浦本昌和[2]，長田裕之[1,2]（[1]埼玉大理工，[2]理研CSRS・ケミカルバイオロジー）

2B03a03　アミロイド β の凝集阻害機構に基づいた天然物ライブラリーの分類
9:52　○村上一馬[1]，堀井詩織[1]，定光達斗[1]，花木瑞穂[1]，郡司祐樹[2]，入江一浩[1]（[1]京大農，[2]アルプス薬品工業）

2B03a04　放線菌由来抗生物質により生産誘導されるイネいもち病菌二次代謝産物の生理機能解析
10:03　○古山祐貴[1,2]，本山高幸[1]，野川俊彦[1]，鎌倉高志[2]，長田裕之[1]（[1]理研CSRS・ケミカルバイオロジー，[2]東理大院理工・応生）

2B03a05　ゼニゴケ（*Marchantia polymorpha*）の精子誘引物質の同定
10:14　○山崎由美子[1]，松川哲也[1]，竹村美保[2]，荒木　崇[3]，大和勝幸[1]，梶山慎一郎[1]（[1]近畿大院・生物理工，[2]石川県大生資研，[3]京都大院・生命科学）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

2B03a06　希少アルドヘキソースおよびヘキソサミンの DU-145 ヒト前立腺がん細胞株に対する増殖抑制活性
10:35　○北口菜摘[1]，柳田　亮[2]，石山大展[3]，佐藤正資[2]，川浪康弘[2]（[1]香川大院農，[2]香川大農，[3]愛媛大院連合農）

2B03a07　ヒトリシズカ抽出物および単離化合物ヒトリン A-B がヒト脂肪由来間葉系幹細胞に及ぼす影響
10:46　○國廣建斗[1]，佐野　桂[1]，萩谷　薫[1]，金　尚永[2]，高上馬希重[2]（[1]株式会社アルビオン，[2]北海道医療大学）

2B03a08　キューバ産植物由来の抗炎症物質の探索研究
10:57　○蛭川美奈子[1]，Echenique-Diaz Lazaro[2]，溝田浩二[2]，大舘智志[3]，Begue-Quiala Gerardo[4]，Delgado Labanino Jorge[4]，Gamez Diez Jorgelino[4]，柴田貴広[1]，北　将樹[1]（[1]名大院生命農，[2]宮城教育大教員キャリア研究機構，[3]北大低温研，[4]キューバ共和国アレハンドロ・デ・フンボルト国立公園）

2B03a09　*Bacillus cereus* 培養液における食中毒素セレウリドの産生と分解
11:08　○奈賀俊人[1,2]，高木結花[2]，服部能英[3]，竹中宏誌[3]，大田洋一郎[3]，切畑光統[3]，谷森紳治[1]（[1]大阪府大院生命環境，[2]東食短大，[3]大阪府大BNCT研究センター）

2B03a10　脂肪分解を促進するクアシノイドの作用機序解析
11:19　○岩田稜平，加藤英介（北大院農）

B03 会場　午後の部（13:50〜14:34）

有機化学，天然物化学―1140 天然物 - ケミカルバイオロジー ―

p01〜p04 発表者の接続時間 13:40〜13:50

2B03p01　生理活性脂質を目指した Mixed Acetal の合成研究
13:50　○田中遼太郎[1]，石橋洋平[2]，伊東　信[2]，安部真人[1]（[1]愛媛大農，[2]九大院農）

2B03p02　多価不飽和脂肪酸を有するホスファチジルセリンの合成研究
14:01　多田大輝[1]，三澤嘉久[2]，馬場直道[2]，○安部真人[1]（[1]愛媛大農，[2]備前化成株式会社）

2B03p03　久慈市で産出される琥珀と亜炭，並びに外国産亜炭の生物活性物質の比較分析
14:12　○島津優人[1]，三浦悠花[1]，越野広雪[2]，木村賢一[1]（[1]岩手大院・総合科学，[2]理研CSRS）

2B03p04　遺伝子変異酵母株を用いたドイツ産琥珀に含まれる生物活性物質の単離精製と同定
14:23　○井上奈々[1]，越野広雪[2]，下田　希[1]，Menor-Salvan Cesar[3]，木村賢一[1]（[1]岩手大院・総合科学，[2]理研CSRS，[3]University of Alcara）

B04 会場　午前の部（9:30〜12:13）

生物科学―1720 タンパク質・ペプチド科学 – 構造，機能，その他―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

2B04a01　多糖モノオキシゲナーゼ，CBP21 の変性機構と構造安定性
9:30　○杉本華幸[1,2]，中村禄朗[1]，中島優一[1]，坪田侑里香[2]，渡邉剛志[1,2]，鈴木一史[1,2]　([1]新潟大院・自然科学，[2]新潟大農・応生化)

2B04a02　ホスファチジルセリン脱炭酸酵素の結晶構造から明らかになった生体膜リン脂質生合成機構
9:41　○渡邊康紀[1]，渡辺誠也[1,2]　([1]愛媛大院・農，[2]愛媛大・CMES)

2B04a03　高分解能回折データから明らかになった制限酵素と切断された DNA のユニークな相互作用
9:52　○喜多恵子[1]，三上文三[2,3]　([1]京都大院農，[2]京都大エネルギー理工学研究所，[3]京都大生存圏研究所)

2B04a04　新規アコニターゼXのX線結晶構造解析と分子進化的考察
10:03　○村瀬陽介[1]，渡邊康紀[1]，渡辺誠也[1,2]　([1]愛媛大院農，[2]愛媛大CMES)

2B04a05　超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* におけるレプリソームの機能変換機構
10:14　○沖　啓輔[1]，山上　健[1]，永田麻梨子[1]，眞柳浩太[2]，沼田倫征[1]，石野園子[1]，石野良純[1]　([1]九大院・農，[2]九大・生医研)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

2B04a06　HBV 細胞内侵入阻害リポペプチド Myrcludex B の新規作用機構
10:35　○七原匡哉[1]，曽宮正晴[2]，黒田俊一[2]　([1]大阪大生命，[2]大阪大学産業科学研究所)

2B04a07　植物・昆虫細胞を用いた細胞膜透過性ペプチドの比較
10:46　○大下勝也，角田優伍，宮下正弘，宮川　恒　(京大院農)

2B04a08　超音波で断片化した DNA の 3' 端と効率的修復
10:57　○大坪嘉行，酒井啓一郎，永田裕二，津田雅孝　(東北大院生命)

2B04a09　抗体 77-3 を用いた Aβ-HDL 複合体の ELISA
11:08　○吉濱恵亮[1]，吉宗一晃[1]，神野英毅[2]，古山裕亮[1]　([1]日大生産工，[2]星薬大)

2B04a10　ELISA の検出による Aβ 凝集体の表面に対するエタノールの影響
11:19　○高島聖史[1]，吉宗一晃[1]，神野英毅[2]　([1]日大生産工，[2]星薬大)

a11〜a13 発表者の接続時間 11:30〜11:40

2B04a11　C 型レクチン様タンパク質 RegIV の可溶化と糖鎖との結合性
11:40　○田中浩志，竹内彩佳，郷田秀一郎，海野英昭，畠山智充　(長崎大院・工)

2B04a12　タンパク質異常凝集形成に対する未利用海藻の有用性
11:51　○八木寿梓[1]，三輪明日香[2]，伊藤佑夏[2]，川本仁志[3]，三木康成[3]，大城　隆[1]　([1]鳥取大工，[2]鳥取大院持社創科，[3](株)海産物きむらや)

2B04a13　*scyllo*-inositol dehydrogenase アラニン変異体の基質特異性解析
12:02　○鈴木麻佑[1]，佐々木康幸[2]，伊藤晋作[2]，中村　顕[3]，矢嶋俊介[2]　([1]東京農業大院農，[2]東京農業大生命，[3]筑波大生命)

B04 会場　午後の部（13:50〜14:34）

生物科学―1720 タンパク質・ペプチド科学 – 構造，機能，その他―

p01〜p04 発表者の接続時間 13:40〜13:50

2B04p01　麹菌界面活性蛋白質ハイドロフォビン RolA の自己組織化構造形成過程の可視化・解析
13:50　○寺内裕貴[1]，齋藤有美[1]，田中拓未[1]，三ツ石方也[2]，藪　浩[3]，吉見　啓[4]，七谷　圭[1]，阿部敬悦[1,4]　([1]東北大農，[2]東北大・多元研，[3]東北大・材料研，[4]東北大・未来研)

2B04p02　SH-SY5Y 細胞のキノリン酸刺激によるアポトーシスと核小体タンパク質 B23 の動態
14:01　○西尾昌洋，鬼頭健斗，栗谷健志，梅川逸人　(三重大院生物資源)

2B04p03　TGF-β シグナル伝達因子 SMAD2 および SMAD3 の MH2 ドメインにおける性質比較
14:12　○楠林和貴[1]，宮園健一[1]，伊藤友子[1]，栗崎　晃[2,3]，浅島　誠[2]，田之倉優[1]　([1]東大農，[2]産総研，[3]奈良先端大バイオサイエンス)

2B04p04　抗真菌性ディフェンシンにおけるアポトーシス誘導機構の解析
14:23　○落合秋人[1]，小川広大[1]，田中孝明[1]，提箸祥幸[2]，谷口正之[1]　([1]新潟大・自然研，[2]農研機構・北農研)

B05 会場　午前の部（9:30〜12:13）

有機化学，天然物化学―1120 天然物 - 生合成―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

2B05a01　抗生物質 resormycin 生合成遺伝子群の同定および機能解析
9:30　○茅根千湖[1]，山中一也[2]，五十嵐雅之[3]，濱野吉十[1]，丸山千登勢[1]　([1]福井県大院・生物資源，[2]関西大・化生工，[3]微化研)

2B05a02　細胞膜透過に寄与する抗生物質 streptothricin の oligo (β-Lys)構造
9:41　○兼田康平[1]，武内大和[1]，加藤康夫[2]，丸山千登勢[1]，濱野吉十[1]　([1]福井県大院・生物資源，[2]富山県大・生医工研セ)

2B05a03　放線菌 *Streptomyces celluloflavus* における poly-L-diaminobutyric acid 生合成機構の解析
9:52　○山中一也[1]，轟万悦子[1]，竹原宗範[2]，濱野吉十[3]，老川典夫[1]　([1]関西大・化生工，[2]滋賀県大・工，[3]福井県大・生物資源)

2B05a04　海洋性難培養微生物が生産する有用物質の異種生産技術に関する研究
10:03　○工藤　慧[1]，西田みち代[2]，酒井紀子[2]，末永　光[1]，池田治生[3]，新家一男[1,4]　([1]産総研，[2]次世代天然物化学技術研究組合，[3]北里大生命研，[4]東大生物工学セ)

2B05a05　BAC を利用した 200kb を超える quinoliidomicin 生合成遺伝子クラスターの異種発現
10:14　○橋本拓哉[1]，橋本絢子[2]，小曽根郁子[2]，酒井紀子[3]，高橋俊二[4]，池田治生[5]，新家一男[1]　([1]産総研・創薬基盤，[2]JBIC，[3]天然物組合，[4]理研CSRS・天然物生合成，[5]北里大・北里生命科学研)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

2B05a06　キノコ形成促進物質 coprinoferrin の担子菌における普遍性証明と生合成解明
10:35　○高西　潤[1]，桝谷貴洋[1]，恒松雄太[1]，礒谷智輝[2]，早川一郎[2]，坂倉　彰[2]，渡辺賢二[1]　([1]静岡県大薬，[2]岡山大院自然)

2B05a07　担子菌キノコを宿主とした外来遺伝子発現に基づく新規天然物生産系の確立
10:46　○浅井しほり，恒松雄太，高西　潤，渡辺賢二　（静岡県大薬）

2B05a08　ブテノライド型シグナル分子 SRB の生合成遺伝子破壊株における代謝産物解析
10:57　○手島愛子[1]，西浦凜貴斗[1]，丸山千登勢[2]，濱野吉十[2]，荒川賢治[1,3]　（[1]広島大院・先端研，[2]福井県大・生物資源，[3]広島大院・統合生命）

2B05a09　アゾキシ化合物の生合成機構および生物活性に関する研究
11:08　○田中　悠[1]，達川綾香[2]，藤田昂大[3]，岸本拓也[2]，福本　敦[4]，安齊洋次郎[4]，荒川賢治[1,2,3]　（[1]広島大・工，[2]広島大院・先端研，[3]広島大院・統合生命，[4]東邦大・薬）

2B05a10　抗ガン活性向上を目指したランカサイジン誘導体の構造リデザインと計算機シミュレーションによる最適化
11:19　○西浦菜摘[1]，ムスリミンルクマン[2]，エルレファイモハメド[3]，森田洋行[4]，アヨブアフマド[5]，荒川賢治[1,2,6]　（[1]広島大・工，[2]広島大院・先端研，[3]ズウェイル市立科学技術院大学，[4]富山大院・和漢医薬学総合研究所，[5]ヘリオポリス大学，[6]広島大院・統合生命）

a11〜a13 発表者の接続時間 11:30〜11:40

2B05a11　typeII AmCP を介して生合成されるマレイマイシン類の生合成機構に関する研究
11:40　○曽根祐輔[1]，Muhammad Prima PUTRA[1]，松田研一[1]，葛山智久[1,2]，古園さおり[1,2]，西山　真[1,2]　（[1]東大・生物工学セ，[2]東大・微生物イノベ連携機構）

2B05a12　*Serratia* sp. ATCC 39006 におけるアミノ基キャリアタンパク質を介した生合成についての研究
11:51　○平島佑樹[1]，曽根祐輔[1]，菊池恒志郎[1]，富田武郎[1,2]，葛山智久[1,2]，古園さおり[1,2]，西山　真[1,2]　（[1]東大・生物工学セ，[2]東大・微生物イノベ連携機構）

2B05a13　放線菌の生産するアザビシクロ環含有化合物 vazabitide A 生合成におけるアジリジン環合成経路に関する研究
12:02　○黒澤　菫[1]，松田研一[1]，長谷部文人[1]，富田武郎[1,2]，葛山智久[2,3]，西山　真[1,2]　（[1]東大・生セ，[2]東大・微生物イノベ連携機構，[3]東大院・農生科）

B05 会場　午後の部（13:50〜14:34）

生物科学―1740 その他―

p01〜p04 発表者の接続時間 13:40〜13:50

2B05p01　dCas9 トランスアクチベーターシステムを用いたニワトリオボアルブミン遺伝子座の活性化
13:50　○上平正道，石　　銘，河邉佳典　（九州大工）

2B05p02　鶏卵卵黄膜およびカラザ由来新規美容素材エッグプラセンタ™ の開発
14:01　○嵯峨根里穂[1]，中村紀夫[1]，山田裕晃[1]，草川太郎[2]，山津敦史[1]，金　武祚[1]，佐藤健司[3]　（[1]株式会社ファーマフーズ，[2]株式会社フューチャーラボ，[3]京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻）

2B05p03　試験管内試験によるエッグプラセンタ™ の美容効果の検証
14:12　○原　由洋[1]，中村紀夫[1]，草川太郎[2]，山津敦史[1]，金　武祚[1]，佐藤健司[3]　（[1]株式会社ファーマフーズ，[2]株式会社フューチャーラボ，[3]京都大学大学院農学研究科応用生物科学専攻）

2B05p04　エッグプラセンタ ™ のヒトにおける美容効果
14:23　○草川太郎[2]，中村紀夫[1]，山津敦史[1]，金　武祚[1]，佐藤健司[3]　（[1]株式会社ファーマフーズ，[2]株式会社フューチャーラボ，[3]京都大学大学院農学研究科応用生物科学専攻）

B06 会場　午前の部（9:52〜12:13）

植物―1640 生物間相互作用―

a03〜a05 発表者の接続時間 9:42〜9:52

2B06a03　植物は毒針で昆虫を撃退する？－シュウ酸カルシウム針状結晶が植物防御タンパク質・防御物質の働きを劇的に増強する効果
9:52　○今野浩太郎，松本信弘，行弘文子　（農研機構　生物機能利用研究部門）

2B06a04　イネ立枯病菌 Rhizopus oryzae キシラナーゼに対するイネ XIPs の阻害活性
10:03　○大沼貴之，今岡　駿，三井圭吾，田中　盾　（近畿大農）

2B06a05　トマト斑葉細菌病菌と軟腐病菌に対するシロイヌナズナの耐病性を付与する小松菜内生細菌の同定とその効果の評価
10:14　○黒川摩利[1]，中野正貴[1]，北畑信隆[2]，朽津和幸[1]，古屋俊樹[1]　（[1]東京理科大・理工，[2]東大院・農生科）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

2B06a06　好熱菌発酵産物を施用した人参の機能性と根圏微生物群集，並びに土壌代謝物に関する統合オミクス解析
10:35　○松浦真紀子[1,2]，守屋茂春[3]，坪井亜里沙[2,3]，富永直樹[4]，石井千歳[2]，中熊照乃[2]，児玉浩明[1]，澤田有司[3]，平井優美[3]，宮本浩邦[1,2,5]，茂田勝美[4]　（[1]千葉大院・園芸，[2]サーマス，[3]理研・環境資源，[4]タキイ種苗，[5]理研・生命医科学）

2B06a07　代謝物を介した根圏微生物叢形成のモデル実験系の構築
10:46　○豊福美和子，中安　大，奥谷芙季，矢崎一史，杉山暁史（京都大生存研）

2B06a08　圃場栽培トマト根からのトマチン分泌と根圏細菌叢への影響
10:57　○中安　大[1]，大野滉平[1]，青木裕一[2]，山﨑真一[2]，髙瀬尚文[3]，庄司　翼[4]，矢崎一史[1]，杉山暁史[1]　（[1]京都大・生存研，[2]東北大・ToMMo，[3]京都先端大・バイオ環境，[4]奈良先端大・バイオサイエンス）

2B06a09　イネに対してプライミング機構を誘導するシグナル物質の探索
11:08　○藤田萌香[1]，草島美幸[2]，仲下英雄[1]　（[1]福井県大院・生資，[2]東大院・農生科・応生化）

2B06a10　植物免疫抑制剤がアグロバクテリウムと植物の相互作用に及ぼす影響
11:19　○草島美幸，青木智史，高橋郁夫，姜　　凱，中村英光，浅見忠男　（東大院農生科）

a11〜a13 発表者の接続時間 11:30〜11:40

2B06a11　病原細菌鞭毛タンパク質フラジェリンの CD2 － 1 領域を認識するイネ受容体の同定
11:40　○安田宜剛[1]，今尾優吾[1]，村上貴彦[1]，桂木雄也[2]，平井洋行[2]，蔡　晃植[1,2,3]　（[1]長浜バイオ大院・バイオ，[2]長浜バイオ大・バイオ，[3]長浜バイオ大・ゲノム編集研究所）

2B06a12　葉枯れ病菌に感染したトウモロコシ葉に生産される抗菌性ジテルペノイドとベンゾキサジノイドの誘導機構
11:51　○鶴嶋　鉄[1]，森　直樹[2]，宮川　恒[2]　（[1]阪南大，[2]京都大農）

2B06a13　ヘテロキトオリゴ糖受容体のタンパク質同定に向けた光アフィニティープローブの開発
12:02　○廣岡健太朗，野島耕陽，秋山康紀　（阪府大・院生命）

B06 会場　午後の部（13:50〜14:34）

動物―1560 その他―

p01〜p04 発表者の接続時間 13:40〜13:50

2B06p01　発育低下のみられる骨格筋における TNF 関連受容体の発現異常
13:50　○井上敬夫[1]，萩山　満[1]，前西　修[2]，木村雅友[2]，水口信行[3]，峯　嘉宏[3]，筑後孝章[2]，伊藤龍生[4]，佐藤隆夫[2]，伊藤彰彦[1]　([1]近畿大医，[2]近畿大病院，[3]近畿大ライフサイエンス研，[4]近畿大農)

2B06p02　フタホシコオロギにおける成育中の個体群密度が成虫の形態および行動に与える影響
14:01　○清家　瞳，永田晋治　(東京大学)

2B06p03　A novel endocrine control of blood sugar homeostasis in the two spotted cricket, *Gryllus bimaculatus*.
14:12　○Yijun ZHOU，Shinji NAGATA　(Tokyo Univ.)

2B06p04　変態阻害物質を用いたミズクラゲのストロビレーションの組織化学的解析
14:23　○藤井夏鈴[1]，荒川賢治[2]，国吉久人[2]　([1]広島大・生物圏，[2]広島大院・統合生命)

B07 会場　午前の部（9:30〜12:13）

動物―1521 細胞 - 情報伝達，細胞応答，分化制御―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

2B07a01　霊長類味蕾オルガノイドを用いたうま味評価系構築の試み
9:30　○中安亜希[1]，金丸青里香[1]，稲葉明彦[1]，佐藤幸治[2]，今井啓雄[3]，山根拓実[1]，大石祐一[1]，岩槻　健[1]　([1]東農大，[2]生理研，[3]京都大)

2B07a02　サル消化管オルガノイドを用いた霊長類特異的 Tuft 細胞機能の探索
9:41　○稲葉明彦[1]，有永理峰[2]，早津徳人[3]，岡崎康司[3]，遠藤高帆[3]，今井啓雄[4]，山根拓実[1,2]，大石祐一[1,2]，岩槻　健[1,2]　([1]東農大院農，[2]東農大応生，[3]理研IMS，[4]京大霊長類研)

2B07a03　老化傾向にある筋芽細胞の分化不全・筋萎縮形質は細胞外小胞（エクソソーム）を介して周辺細胞に伝播し得る
9:52　杉村友梨，服部秀美，○江藤　望　(宮崎大農)

2B07a04　pH とグルコース濃度の違いが C2C12 の筋分化に与える影響
10:03　○野口翔平，山口貴史，江藤　望，服部秀美　(宮崎大農)

2B07a05　速筋由来の筋サテライト細胞の性質を決定する因子の解析
10:14　○瀧川花穂[1]，藤田真理子[1]，小野悠介[2]，亀井康富[1]　([1]京府大院生命環境，[2]熊本大発生医学研究所)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

2B07a06　G タンパク質共役受容体 LGR6 は筋分化調節に関与する
10:35　○山口真由[1]，北風智也[2]，原田直樹[1]，乾　　博[3]，山地亮一[1]　([1]大阪府大院・生命環境，[2]神戸大院・農，[3]大阪府大・栄養)

2B07a07　老化促進モデルマウス SAMP1 の骨格筋において β-cryptoxanthin はオートファジーを活性化する
10:46　○野口真里[1]，北風智也[2]，向井克之[3]，原田直樹[1]，乾　　博[4]，山地亮一[1]　([1]大阪府大院・生命環境，[2]神戸大院・科技イノベ，[3]㈱ダイセル，[4]大阪府大院・栄養)

2B07a08　構造解析に基づいた筋形成型オリゴ DNA の短縮化
10:57　○池田玲奈[1]，梅澤公二[2]，二橋佑磨[3]，進士彩華[4]，下里剛士[2]，鏡味　裕[1]，高谷智英[1]　([1]信州大農，[2]信州大バイオメディカル研，[3]信州大院総合医理工，[4]信州大院総合理工)

2B07a09　軟骨細胞分化マーカー Sox9 の発現に及ぼす一酸化炭素ドナー CORM2 の影響
11:08　○関本純輝[1]，井上博文[2]，田中未央里[2]，高橋信之[1]，上原万里子[1]　([1]東農大院農，[2]東農大応生)

2B07a10　空気暴露に刺激される表皮分化のメカニズム解析
11:19　○手島裕文，伊藤帆南，加藤まなみ，栗林美樹，辰川英樹，人見清隆　(名大院創薬科学)

a11〜a13 発表者の接続時間 11:30〜11:40

2B07a11　粘膜型マスト細胞の分化機構の解明
11:40　○中野信浩[1]，才田一樹[1,2]，北浦次郎[1]，八代拓也[2]，西山千春[1,2]，奥村　康[1]，小川秀興[1]　([1]順天堂大院医，[2]東理大基工)

2B07a12　細胞内 cAMP は NAD^+ 合成系酵素 NAMPT の発現を介して脂肪細胞分化を制御する
11:51　○三谷塁一[1]，渡邉　駿[1]，和田憲次郎[2]　([1]信州大院・総合理工（農学専攻），[2]信州大農)

2B07a13　脂肪細胞分化における Ca^{2+} 活性型カリウムチャネル KCa3.1 の役割
12:02　○西塚　誠[1]，中野友香[2]，野崎未紗[1]，今川正良[2]　([1]弘前大農生，[2]名市大薬)

B07 会場　午後の部（13:50〜14:34）

動物―1521 細胞 - 情報伝達，細胞応答，分化制御―

p01〜p04 発表者の接続時間 13:40〜13:50

2B07p01　転写因子 EHF はランゲルハンス細胞の分化に関与する
13:50　○矢野堅士[1,2]，八代拓也[2]，西山千春[1,2]，北浦次郎[1]，奥村　康[1]，中野信浩[1]　([1]順天堂大院医，[2]東理大基礎工)

2B07p02　T-box ファミリー転写因子 Eomesodermin による IFN-γ 遺伝子の発現調節機構の解析
14:01　○中尾彩香，原田美鈴，東　幸奈，谷垣里穂，片岡孝夫　(京工繊大院・応用生物)

2B07p03　マウス海馬由来 HT22 細胞における酸化ストレス依存的なエクソソーム修飾
14:12　○佐藤飛翔[1]，田辺岳海[2]，宮西伸光[3,4]，根建　拓[1,2]　([1]東洋大学生命科学部応用生物科学科，[2]東洋大学大学院生命科学研究科，[3]東洋大学食環境科学部食環境科学科，[4]東洋大学大学院食環境科学研究科)

2B07p04　低分子量 G タンパク質 RhoJ の発現抑制は TGF-β1 誘導性 EMT を促進する
14:23　○野崎未紗，西塚　誠　(弘前大農生)

B08 会場　午前の部（9:52〜12:13）

植物―1650 植物栄養，光合成，オルガネラ，膜輸送（8 題）1660 タンパク質，酵素 - 機能，調節（3 題）―

a03〜a05 発表者の接続時間 9:42〜9:52

2B08a03　光化学系 I-鉄欠乏ストレス誘導タンパク質超複合体の構造解析
9:52　○秋田総理[1,2]，長尾　遼[1]，加藤公児[1]，中島芳樹[1]，横野牧生[3]，植野嘉文[4]，鈴木健裕[5]，堂前　直[5]，沈　建仁[1]，秋本誠志[4]，宮崎直幸[6]　([1]岡大異分野，[2]JSTさきがけ，[3]日本製粉，[4]神戸大院理，[5]理研CSRS，[6]筑波大生存ダイナミクス)

2B08a04　光合成活性調節に関与する藍藻 Na^+/H^+ アンチポーターの解析
10:03　○辻井　雅[1]，狩野文香[1]，小林歩夢[1]，解良康太[1]，児島征司[2]，小口理一[2]，彦坂幸毅[2]，園池公毅[3]，魚住信之[1]　([1]東北大院・工，[2]東北大院・生命，[3]早稲田大学・教育科学学術院)

2B08a05　BSD2 は酸化失活ルビスコを還元再活性化し，光合成反応を促進する
10:14　Busch Florian A.[1]，冨永　淳[2]，高橋俊一[3]，矢守　航[4]，Milward Sara E.[1]，西村浩二[5]，戸田陽介[6,7]，高見常明[8]，渡邊俊介[9]，木下俊則[6]，坂本　亘[8]，坂本　敦[2]，○島田裕士[2]（[1]RSB, ANU，[2]広島大・院統合生命，[3]基生研，[4]東大・院農学生命科学，[5]島根大・生物資源，[6]名大・ITbM，[7]JSTさきがけ，[8]岡山大・植物研，[9]理研 CSRS）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

2B08a06　生きた植物細胞の中で膜内在性タンパク質のトポロジーを評価する新規な蛍光レポーター系の開発に関する研究
10:35　○久我一弘，龍田怜奈，吉原えりか，吉田昇平，清水英寿，地阪光生，横田一成，西村浩二（島根大・生物資源）

2B08a07　GPI-アンカーの付加は，アラビノガラクタンタンパク質の正常な糖鎖形成や細胞内輸送に必要である。
10:46　○永里太暉[1]，杉田雄斗[1]，津野雄平[1]，松岡　健[1,2]（[1]九大院生資環，[2]九大院農）

2B08a08　SPL7 は *SULTR2;1* の発現促進を介して植物の硫黄欠乏・銅欠乏耐性に寄与するのか
10:57　○牛渡　司[1]，光田展隆[3]，鹿内利治[4]，丸山明子[2]（[1]九大院生資環，[2]九大農，[3]産総研，[4]京都大院理）

2B08a09　Sulfur Deficiency Induced Phosphate Uptake, Root-to-Shoot Transport, and Accumulation in Shoots *Arabidopsis thaliana*
11:08　○Alaa ALLAHHAM[1]，Akiko MARUYAMA-NAKASHITA[2]（[1]Kyushu Univ., Grad. Sch. Bio-Environ. Sci.，[2]Kyushu Univ., Fac. Agr.）

2B08a10　STP1 を介した糖シグナルによる側枝形成制御機構の解明
11:19　○西岡真歩[1]，平野慎吾[2]，佐古香織[1,2]，重岡　成[1,2]，田茂井政宏[1,2]（[1]近畿大院農，[2]近畿大農）

a11〜a13 発表者の接続時間 11:30〜11:40

2B08a11　ダイズおよびツルマメのプロテオーム解析
11:40　○橋口拓勇，橋口正嗣，田中秀典，権藤崇裕，明石　良（宮崎大農）

2B08a12　VTC3 を介した植物アスコルビン酸生合成調節機構の解明
11:51　○田中泰裕[1]，高尾理穂[1]，小川貴央[1]，重岡　成[2]，丸田隆典[1]，石川孝博[1]（[1]島根大院・自然科学，[2]近畿大・附属農場）

2B08a13　アフィニティー樹脂によるシロイヌナズナアスコルビン酸結合タンパク質の探索
12:02　○西原好美[1]，西野耕平[1]，岩岡裕二[2]，丸田隆典[1]，小川貴央[1]，重岡　成[3]，田井章博[4]，澤　嘉弘[1]，石川孝博[1]（[1]島根大院・自然科学，[2]岡山県大・保健福祉，[3]近畿大・附属農場，[4]徳島大院・社会産業理工）

B08 会場　午後の部（13:50〜14:34）

植物―1670 遺伝子 - 構造解析，ゲノム，遺伝，変異―

p01〜p04 発表者の接続時間 13:40〜13:50

2B08p01　苔類ゼニゴケにおけるジベレリン類縁化合物のメチル化による成長制御
13:50　○川村昇吾，孫　　芮，山岡尚平，鈴木かおり，吉竹吉洋，西浜竜一，河内孝之（京都大学生命科学研究科）

2B08p02　無性生殖する植物は遺伝的にどう変化するか？
14:01　○永野幸生，山本ちひろ（佐賀大）

2B08p03　全ゲノム解析による尾上菜の特徴解析
14:12　○中島遼太[1]，中川幸彦[2]，古川岳人[2]，池田直樹[2]，小倉　淳[1,2]，蔡　晃植[1,2,3]（[1]長浜バイオ大院・バイオ，[2]長浜バイオ大・バイオ，[3]長浜バイオ大・ゲノム編集研究所）

2B08p04　2017 年中に発表されたゲノム編集イネのオフターゲット効果に関する評価
14:23　○成島純平[1]，中村公亮[1]，木俣真弥[1]，志波　優[2]，秋本　智[1]，曽我慶介[1]，権藤崇裕[3]，明石　良[3]，近藤一成[1]（[1]国立衛研，[2]東京農大，[3]宮崎大）

B09 会場　午前の部（9:30〜12:13）

生物科学―1731 生物工学 - 解析技術・方法論，その他―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

2B09a01　GABA 測定キットの開発
9:30　西山辰也[1,2]，Woro Triarsi Sulistyaningdyah[2]，○上田賢志[1]，日下部均[2]（[1]日大生資科，[2]㈱エンザイムセンサ）

2B09a02　タバコ細胞において発現する PR タンパク質の質量分析計による定量
9:41　○安藤大悟，宮下正弘，宮川　恒（京大院農）

2B09a03　電気化学的解析による藍染液中のインジゴ測定
9:52　○中川香澄[1]，多田真奈巳[1]，阪本鷹行[1,2]，竹内道樹[3]，加納健司[4]，小川　順[3,4]，櫻谷英治[1,2]（[1]徳島大院・先端技術，[2]徳島大・生物資源，[3]京大院農・産業微生物，[4]京大院農・応用生命）

2B09a04　高導電性ディスポーサブル電気化学ウイルス検出センサーによる E 型肝炎ウイルス様粒子の高感度かつ迅速な検出
10:03　○竹村謙信[1]，チョードリアンカンダッタ[2]，李　天成[3]，鈴木哲郎[4]，朴　龍洙[1,2]（[1]静岡大院・創造院・バイオサイエンス，[2]静大グリーン科技研，[3]ウイルス第[2]部・国立感染研，[4]浜医大・医・医学科）

2B09a05　プローブ粒子液中拡散挙動に基づいた画像解析による MRSA DNA センサの構築
10:14　○松島雛子[1]，一木啓志[1]，童　兪靜[2]，莊　漢聲[2]，高村映一郎[1]，里村武範[3,4]，坂元博昭[1,4]，末信一朗[1,2,3]（[1]福井大院・工・繊維，[2]台湾國立成功大，[3]福井大院・工・生物応用化，[4]福井大学・生命セ）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

2B09a06　新規抗真菌活性物質探索系の構築
10:35　○小山菜穂[1]，森英里子[1]，伊藤早紀[2]，喜田亜由美[1]，堤　杏子[2]，飯田泰広[1,2]（[1]神奈川工大院，[2]神奈川工大・応用バイオ）

2B09a07　高次構造を保持した毛髪・体毛の物理化学データ解析
10:46　○塚本　楓[1]，坂田研二[2]，菊地　淳[1,2,3]（[1]横市大院・生命医，[2]理研・環境資源，[3]名大院・生命農）

2B09a08　モデル細胞集合体におけるシグナルの伝播挙動
10:57　笠井一生，○白井　理，北隅優希，加納健司（京都大農）

2B09a09　Microsatellite capture sequencing 法を用いた *in silico* 多型解析パイプラインの構築
11:08　○田中啓介（東農大ゲノムセ）

2B09a10　機械学習支援によるタンパク質の効率的進化工学
11:19　○中澤　光[1]，及川未早来[1]，斎藤　裕[2,4]，亀田倫史[3,4]，津田宏治[3,4]，梅津光央[1,4]（[1]東北大　院工，[2]産総合研　人工知脳，[3]東大院　新領域，[4]理研　革新知能）

a11〜a13 発表者の接続時間 11:30〜11:40

2B09a11　β-secretase 活性評価用新規 FRET 基質の開発とその応用
11:40　○Lui Zhi Ling[1]，石川雄大[2]，藤平大介[2]，安達　稔[1]，宮内玲奈[1]，山村　晃[1,2]，山口淳一[1]，飯田泰広[1,2]（[1]神奈工大院，[2]神奈工大・応用バイオ）

2B09a12　Ecobody 技術を用いたウサギモノクローナル抗体サンドイッチ ELISA システムの開発
11:51　○中野秀雄，DAORUNG Sila-on，CHERTCHINNAPHAT Phornnaphat，兒島孝明（名大院生命農）

2B09a13　機能的ナノボディ探索プラットフォームとしての酵母表層提示システム
12:02　○梶原果穂[1,2]，青木　航[1,2]，植田充美[1,2]　([1]京大院・農・応用生命，[2]JST-CREST)

B09 会場　午後の部(13:50〜14:34)

生物科学―1731 生物工学 – 解析技術・方法論，その他―

p01〜p04 発表者の接続時間 13:40〜13:50

2B09p01　酸化銅ナノ粒子結合ペプチドを活用した細胞毒性の低減
13:50　○石田亘広，細川洋一，今枝孝夫，畠中孝彰　(豊田中央研究所)
2B09p02　遊離状態のナノボディの結合能をハイスループットに評価できる「ペプチドバーコーディング法」
14:01　○松崎友星[1]，青木　航[1,2]，植田充美[1,2]　([1]京大院農，[2]JST CREST)
2B09p03　半導体特性を持つ黄鉄鉱ナノ粒子のヘムタンパク質を用いた合成メカニズムの解明
14:12　○山下達也[1]，松田大輝[1]，岡田至崇[2]，
アーサンナズムル[2]，鈴木庸平[3]，鈴木道生[1]　([1]東大院農学生命，[2]東大先端研，[3]東大院理)
2B09p04　生命科学分野の卒業論文研究の広範な教育的意義と新たな教育評価の工夫
14:23　○高橋勇二[1,2]，矢野眞和[3]，東京薬科大学AP事業推進室[3]
([1]東京薬科大学生命，[2]東京薬科大AP事業推進責任者，[3]東京薬科大学)

B11 会場　午前の部(9:30〜12:13)

有機化学，天然物化学―1160 合成，反応機構―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

2B11a01　シロイヌナズナに含まれる α-ピロン型代謝物，アラビドピロン類の全合成
9:30　○松本拓也[1]，張間沙希[1]，クリントチャップル[2]，
二瓶賢一[1]　([1]宇都宮大農，[2]パデュー大)
2B11a02　W493 A 誘導体の化学合成
9:41　○モウウェンジ，三井美彩，二瓶賢一　(宇都宮大農)
2B11a03　*Homalium stenophyllum* から単離されたフロレチン配糖体の化学合成と構造決定
9:52　○島影　凌，二瓶賢一　(宇都宮大農)
2B11a04　ディスポロプシンの全合成とそのチロシナーゼ阻害活性
10:03　○関下帆乃香，馬酔木奈々，二瓶賢一　(宇都宮大農)
2B11a05　南極産ホヤ由来メロテルペン Rossinone 類の合成研究
10:14　○齋藤克哉，倉沢一輝，滝野ちあき，桑原重文，榎本　賢
(東北大学大学院農学研究科)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

2B11a06　クォラムセンシング阻害物質 aculene 類の合成研究
10:35　○横川陽向[1]，石澤誠也[1]，齋藤克哉[2]，桑原重文[2]，
榎本　賢[2]　([1]東北大農，[2]東北大院農)
2B11a07　Strophasterol D, E, F 及び glaucoposterol A の合成研究
10:46　○佐藤俊太郎，桑原重文　(東北大院農)
2B11a08　(−)-Diocollettines A の全合成
10:57　○川元美咲，佐藤俊太郎，桑原重文　(東北大農)
2B11a09　Terfestatin 類の網羅的合成研究
11:08　○菅原　駿[1]，桑原重文[1]，小倉由資[2]，十和田諒[1]，
佐藤俊太郎[1]　([1]東北大農，[2]東大農)
2B11a10　pestaloquinol 類の合成研究
11:19　○日戸誠也[1]，小倉由資[1]，滝川浩郷[1]，桑原重文[2]　([1]東大農，[2]東北大農)

a11〜a13 発表者の接続時間 11:30〜11:40

2B11a11　Amycolamicin の全合成研究
11:40　○目黒康洋，桑原重文　(東北大院農)
2B11a12　テトロドトキシンの推定生合成中間体の合成研究
11:51　○宮坂忠親[1]，安立昌篤[2]，西川俊夫[1]　([1]名大院生命農，[2]東北大院薬)
2B11a13　除草活性を有する抗生物質ホスホノトリキシンの合成研究
12:02　○中村皓毅，松島芳隆　(東京農業大学・農芸化学科)

講演番号
開始時間　　演　題　　発表者氏名(所属)

A01 会場　午前の部(9:30〜11:19)

食品―1311 食品化学 - タンパク質，アミノ酸―

a01〜a04 発表者の接続時間 9:20〜9:30

3A01a01　中性子小角散乱法によるダイズ種子貯蔵タンパク質の構造解析を目指した技術開発
9:30　○奥田　綾，佐藤信浩，守島　健，井上倫太郎，裏出令子，杉山正明　(京大複合研)

3A01a02　X 線小角散乱でみる大豆タンパク質のナノ構造に対する緩衝剤および塩の影響
9:41　○佐藤信浩，裏出令子，奥田　綾，守島　健，井上倫太郎，杉山正明　(京大複合研)

3A01a03　液卵白の予備加熱処理が加熱ゲルの特性に及ぼす影響
9:52　○小山翔大[1]，岡　大貴[2]，辻井良政[2]，半田明弘[3]，高野克己[4]　([1]東京農大院農・農化，[2]東京農大応生・農化，[3]キユーピー株式会社，[4]東京農大)

3A01a04　乳中のカルシウムイオンがヨーグルトカード形成に与える影響
10:03　○寺内広行[1]，岡　大貴[2]，野口智弘[3]，高野克己[2]　([1]東京農大院農・農化，[2]東京農大応生・農化，[3]東京農大応生・食加技セ)

a06〜a09 発表者の接続時間 10:25〜10:35

3A01a06　LC-MS/MS ショットガン法による麹カビチーズの網羅的ペプチド解析
10:35　○長尾春那[1]，飯田季里子[2]，齋藤伽苗[1,2]，川上　浩[1,2]　([1]共立女大家政，[2]共立女大院)

3A01a07　甘味タンパク質の全網羅ペプチドライブラリーを用いた“コク味”受容体相互作用領域の解析と高活性ペプチドの創製
10:46　○山本深月，寺田祐子，伊藤圭祐　(静県大院・薬食)

3A01a08　発芽大豆中のニコチアナミン合成酵素に関する研究
10:57　○佐々木瞳，金内　誠　(宮城大食産)

3A01a09　トリプシン阻害活性を有する亜麻仁アルブミンの特性
11:08　○山口勇将[1]，野崎優司[1]，池ヶ谷紫苑[1]，二宮和美[2]，熊谷　仁[2]，熊谷日登美[1]　([1]日大生資科，[2]共立女子大家政)

A01 会場　午後の部(13:50〜17:16)

食品―1312 食品化学 - 色素，香料―

p01〜p06 発表者の接続時間 13:40〜13:50

3A01p01　醸造工程中に失われる香りから見出されたビールらしさに寄与する香気成分
13:50　○成瀬史子[1]，二関倫太郎[1]，蛸井　潔[1]，原田紘祐[2]，飛田康貴[2]，堀内政宏[2]，清崎俊博[1]，野村真弘[1]　([1]サッポロビール株式会社，[2]高田香料株式会社)

3A01p02　本格麦焼酎のフルーティーな香りに 4-Ethylguaiacol が及ぼす影響
14:01　○熊丸陽奈[1]，丸山一樹[1]，滝沢隆一[2]，金子　剛[1]，土屋陽一[1]　([1]サッポロホールディングス㈱，[2]サッポロビール㈱)

3A01p03　キムチ製品で発生するワサビ様刺激臭の原因成分探索
14:12　○岩佐　悟[1]，飛田啓輔[1]，冨田　理[2]，池田未果[3]　([1]茨城県産業技術イノベーションセンター，[2]農研機構食品研究部門，[3]東海漬物㈱漬物機能研究所)

3A01p04　発酵乳のフレーバーリリース分析モデル系構築と継時的な定量分析について
14:23　○西川　卓，安永元樹，佐野恵右　(曽田香料)

3A01p05　各種抗酸化物の併用によるレモングラス香気成分の劣化抑制効果の解析
14:34　○宮崎真緒[1]，太田香穂[1,2]，宮野敬之[2]，小林弘司[1]，石川洋哉[1]　([1]福岡女子大院人栄，[2]株式会社　クマモト敬和)

3A01p06　グレードの異なるマダガスカル産バニラビーンズより調製したエキスの香気分析
14:45　○小林宏成，宮沢紀雄，大西俊朗，西井郁子，長野和種，石崎　享　(長谷川香料㈱)

p07〜p12 発表者の接続時間 14:56〜15:06

3A01p07　加熱によるスイカ果汁の香気成分の変化
15:06　武者采輝[1]，太田智弥[1]，佐藤寛人[2]，村山哲也[1]，○網干貴子[1]　([1]山形大農，[2]山形農総研)

3A01p08　醤油米菓咀嚼中の香気特徴研究
15:17　○川村知世[1]，竹井　亮[1]，鷲尾英明[1]，小林史幸[2]，小竹佐知子[2]　([1]亀田製菓㈱，[2]日本獣医生命科学大学)

3A01p09　小麦生地中の揮発性成分生成における LOX アイソザイムの影響
15:28　○成澤朋之[1,2]，酒井孝一朗[2]，仲島日出男[1]，山下治之[2]，杉山健二郎[3]，乙部千雅子[4]，椎葉　究[5]，山田昌治[3]，朝倉富子[2]　([1]埼玉県産技セ北部，[2]東大院農応生化，[3]工学院大先進工応化，[4]農研機構作物研，[5]東京電機大理工)

3A01p10　油脂劣化による不快臭に応答する嗅覚受容体の同定と抑制香料の探索
15:39　○寺田育生，村井正人，三木あずさ，三原　尚，小林　剛，佐野　昇，石田賢哉，星野邦秀　(高砂香料工業株式会社 研究開発本部)

3A01p11　大豆の青臭さの感知に関わるヒト嗅覚受容体の特定
15:50　○伊藤圭祐，佐藤茅乃，土屋さくら，小塚康平，中野祥吾，伊藤創平，寺田祐子　(静県大院・薬食)

3A01p12　ヒト味覚・嗅覚受容体応答の統合的理解のための新規な網羅的受容体解析法の開発
16:01　○土屋さくら，松山　南，伊藤豊実，寺田祐子，伊藤圭祐　(静県大院・薬食)

p13〜p17 発表者の接続時間 16:12〜16:21

3A01p13　主観的香気強度と胃電図決定論性との相関関係
16:21　○高井英司[1]，青柳隆大[1]，濱田梓之佑[2]，市川敬太[2]，松浦康之[3]，木下史也[4]，高田宗樹[2]　([1]曽田香料㈱，[2]福井大院・工，[3]岐阜市女短大・国際文化，[4]富山県大・工)

3A01p14　油脂が鼻腔内香気成分到達性に及ぼす影響
16:32　○中田勇二，杉山真悟，林　和寛　(味の素株式会社)

3A01p15　食品全体の複合的な辛味を定量評価できるヒト TRPV1 応答評価系の開発
16:43　○松山　南，伊藤豊実，寺田祐子，中野祥吾，伊藤創平，伊藤圭祐　(静県大院・薬食)

3A01p16　TRPV1 アゴニストであるピペリン類の調製と相対モル感度を利用した HPLC 定量法の開発
16:54　○水本俊行[1]，中野扶佐子[1]，齋藤豪紀[1]，大野裕和[1]，村上敏之[1]，寺田祐子[2]，伊藤圭祐[2]，増本直子[3]，西﨑雄三[3]，杉本直樹[3]　([1]丸善製薬，[2]静県大院・薬食，[3]国立医薬品食品衛生研究所)

3A01p17　ナガコショウ ヒハツの TRPV1, A1 活性におけるピペリン類の寄与
17:05　○寺田祐子[1]，中野扶佐子[2]，大野裕和[2]，村上敏之[2]，伊藤圭祐[1]　([1]静県大院・薬食，[2]丸善製薬株式会社)

A02 会場　午前の部（9:30〜12:13）

食品―1322 食品工学 - 物性，分析―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

3A02a01　表面筋電図法と動的粘弾性測定を用いた増粘多糖類ゲルの嚥下難易度の評価
9:30　○梅谷華奈[1]，上田玲子[1]，小西史子[2]，舟木淳子[3]，安岡顕人[1]，阿部啓子[1,4]，朝倉富子[1]　([1]東大院・農生科，[2]女子栄養大・栄，[3]福岡女子大，[4]KISTEC)

3A02a02　高脂質ゲルの冷凍耐性における油脂種類の影響
9:41　○松本拓矩，中島聡史，秋山亜希子，増田麻衣，崎谷宣孝，渡邉裕一，上田佳宏　(ソマール株式会社)

3A02a03　米菓への油脂浸透度と食感の関係
9:52　○山谷健太[1,3]，近藤沙李[2]，原　伊織[3]，竹井　亮[1]，勝野那嘉子[3]，西津貴久[3]　([1]亀田製菓株式会社，[2]岐阜大院，[3]岐阜大)

3A02a04　各種乳化剤がアミロース脂質複合体形成と老化抑制効果に及ぼす影響
10:03　○永田幹太朗[1]，勝野那嘉子[2]，西津貴久[2]　([1]岐阜大院・自然研，[2]岐阜大・応生)

3A02a05　パン冷却時におけるデンプンの糊化状態に与える冷却速度の影響
10:14　○齋藤凱暉[1]，野口智弘[2]，伊賀大八[3]，井上好文[3]，高野克己[4]　([1]東京農大院農，[2]東京農大応生食加セ，[3]日本パン技研，[4]東京農大応生)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

3A02a06　X 線小角・高角散乱と DSC の同時測定によるコメの糊化過程の解明
10:35　○高木秀彰　(KEK物構研)

3A02a07　6-α-グルコシルトランスフェラーゼを利用して得られた新規高分子デキストリンは老化しない
10:46　○宮田　学，十川達文，岸下誠一郎，安田亜希子，山本拓生，阿賀　創，牛尾慎平　(株式会社 林原)

3A02a08　老化しない新規高分子デキストリンは高い水和特性に起因するユニークな物性を示すとともに消化吸収されエネルギー源になる
10:57　○安田亜希子，伊藤理恵，小川　亨，石橋真紀，西田毅弘，日野克彦，三皷仁志，阿賀　創，牛尾慎平　(株式会社 林原)

3A02a09　老化しない新規高分子デキストリンはユニークな分子構造と高い水和特性に起因した新しいテクスチャーを創出することができる
11:08　○溝手晶子，安田亜希子，伊藤理恵，西田毅弘，日野克彦，三皷仁志，阿賀　創，牛尾慎平　(株式会社 林原)

3A02a10　α-1,6 グルコシル残基の高分子デキストリンへの導入はガラス転移温度曲線に影響せず老化しない性質を与える
11:19　○川井清司[1]，住田梨嘉[1]，岸下誠一郎[2]，安田亜希子[2]，溝手晶子[2]，山本拓生[2]，三皷仁志[2]，阿賀　創[2]，牛尾慎平[2]　([1]広島大学，[2]株式会社 林原)

a11〜a13 発表者の接続時間 11:30〜11:40

3A02a11　フード 3D プリンタにより食感を作り出す
11:40　清水純平，○武政　誠　(東京電機大院理工)

3A02a12　フード 3D プリンタ用フードインクのレオロジー特性測定装置開発
11:51　○渡邊健太，武政　誠　(東京電大)

3A02a13　機械学習によるスナック菓子の食感分析
12:02　○吉田駿介，武政　誠　(東京電機大理工)

A02 会場　午後の部（13:50〜17:27）

食品―1340 食品機能・栄養 - その他―

p01〜p06 発表者の接続時間 13:40〜13:50

3A02p01　食餌脂肪量の違いがオリゴ糖摂取ラットの大腸 ALP 活性誘導をはじめとする腸内環境に及ぼす影響
13:50　○岡崎由佳子，鈴木毬那，東海林綾香　(藤女子大人間生活)

3A02p02　食用きのこの種類別による腸内細菌叢に与える影響の比較
14:01　○清水崇光[1]，森光一郎[1]，小林　仁[1]，都築　毅[2]　([1]ホクト株式会社きのこ総合研究所，[2]東北大農)

3A02p03　Preventive Effects and Mechanisms of Garlic on Dyslipidemia and Gut Microbiome Dysbiosis
14:12　○Keyu CHEN，De-xing Hou　(Kagoshima Univ.)

3A02p04　サツマイモ焼酎粕を用いた麹菌培養物のコレステロール代謝と腸内細菌叢に与える影響
14:23　○小境敏揮[1,2]，加藤寛隆[3]，章　超[2]，河野邦晃[2]，岩井謙一[2]，髙瀬良和[2]，小川健二郎[4]，西山和夫[1,3]，山﨑正夫[1,3]　([1]宮崎大院・農工総合，[2]霧島酒造，[3]宮崎大・農，[4]宮崎大・テニュアトラック推進機構)

3A02p05　整腸作用を有する食品による便臭低減評価〜便臭の主観・客観評価の乖離〜
14:34　○小田由里子[1]，水木　将[2]，関　忍[1]，野見山哲生[2]　([1]富士フイルム，[2]信州大医)

3A02p06　ヒト腸内細菌培養モデルを用いた複合プロバイオティクスの評価
14:45　○山口大貴[2]，藤田絢弥子[1]，金谷　忠[2]，河野麻実子[2]，児玉高幸[2]，川上宏智[2]，稲垣瑞穂[1]　([1]岐阜大・応用生物，[2]森下仁丹株式会社 ヘルスケア事業本部 ヘルスケア研究開発部)

p07〜p12 発表者の接続時間 14:56〜15:06

3A02p07　ヒト腸内細菌培養 1mL モデルの構築
15:06　石川愛花，○稲垣瑞穂　(岐阜大・応用生物)

3A02p08　OLL1073R-1 乳酸菌で発酵したヨーグルトの摂取による，睡眠の改善および消化器症状への影響を介した精神系 QOL への効果
15:17　○丸山広達[1]，木下　徹[2]，狩野　宏[3]，牧野聖也[3]，陶山啓子[4]，西嶋真理子[4]，赤松公子[4]，城賀本晶子[4]，片上貴久美[4]，斉藤　功[5]　([1]愛媛大農，[2]ちいき進かがく株式会社，[3]株式会社 明治 研究本部 乳酸菌研究所，[4]愛媛大医，[5]大分大医)

3A02p09　*Lactobacillus crispatus* KT-11 のヒト表皮角化細胞における皮膚保護能の検討
15:28　○星芙美香，渡邉　樹　(株式会社キティー)

3A02p10　腸管上皮尿酸トランスポーター ABCG2 の発現を制御する食品成分の探索・解析
15:39　○榎本泰大[1]，近藤泰嗣[2]，豊田　優[3]，鈴木洋史[3]，高田龍平[3]，仁科淳良[4]，薩　秀夫[2]　([1]前工大院・工，[2]前工大・工，[3]東大病院・薬剤部，[4]日大・理工)

3A02p11　ガーリック由来 diallyl trisulfide によるアセトアミノフェン誘導性肝障害抑制機構の解明
15:50　○細野　崇[1,2]，折原　陸[2]，三浦　徳[2]，増澤(尾﨑)依[2]，関泰一郎[1,2]　([1]日大院・生資科・応生科，[2]日大・生資科・生命化)

3A02p12　食品中の活性硫黄の定量解析
16:01　○菱山純一，居原　秀，笠松真吾　(大阪府大)

p13〜p18 発表者の接続時間 16:12〜16:21

3A02p13　非アルコール性脂肪肝を予防する食品成分の *in vitro* モデル系を用いた探索および解析
16:21　○波津優花[1]，本松由衣[2]，山本晃久[1]，仁科淳良[3]，薩　秀夫[2]　([1]前工大院工，[2]前工大工，[3]日大理工)

3A02p14　肝星細胞における β カロテンの線維化抑制効果
16:32　○田代純輝，橋本堂史　(神戸大院農)

3A02p15　タウリンがケモカイン受容体の遺伝子発現に及ぼす影響
16:43　○福村みどり[1]，和多利研二[1]，薩　秀夫[2]　([1]前工大院工，[2]前工大工)

3A02p16　GABA 摂取による持久運動能力増強効果
16:54　○金　有宏[1]，山田裕晃[1]，坂下真耶[1]，山津敦史[1]，金　武祚[1]，青井　渉[2]　([1]株式会社ファーマフーズ，[2]京都府立大学大学院生命環境科学研究科)

3A02p17　*in vitro* 運動モデルによる筋収縮時のメタボローム解析
17:05　○佐藤聡子，野村　充，青野　恵　(ライオン株式会社 研究開発本部)

3A02p18　L-Theanine の不安抑制効果はマウスの系統によって異なる
17:16　○松尾契吾[1]，渡邊　佑[1]，中村孝博[2]，直井実穂[2]，竹中麻子[2]　([1]明治大学大学院・農学研究科，[2]明治大学・農学部)

A03 会場　午前の部(9:41〜12:13)

食品―1330 食品機能・栄養 - 脂質代謝，糖質代謝―

a02〜a05 発表者の接続時間 9:31〜9:41

3A03a02　AMP キナーゼを介した食後高脂血症改善作用メカニズムの解明
9:41　○松田真英[1]，津山博之[1]，菊池真優[1]，田中未央里[2]，井上博文[2]，上原万里子[1]，高橋信之[1]　([1]東農大院農，[2]東農大応生)

3A03a03　12α 水酸化胆汁酸と脂肪肝の関係
9:52　○堀　将太[1]，阿部隆行[1]，李　東根[1]，吹谷　智[1]，横田　篤[1]，麻生茉央[2]，城内文吾[2]，佐藤匡央[2]，石塚　敏[1]　([1]北大農，[2]九大農)

3A03a04　脱脂大豆は PPARγ/SHP 経路を介して高脂肪食誘導性の肝臓脂肪蓄積を抑制する
10:03　○松本雄宇[1]，石見佳子[2]，鈴木　司[1]，小林謙一[3]，井上　順[1]，山本祐司[1]　([1]東農大・応生・農化，[2]東農大・総合研究所，[3]ノートルダム清心女子大学・食品栄養)

3A03a05　ガーデンクレススプラウトおよびベンジルイソイオシアネートの中性脂肪代謝制御
10:14　○横山慎一郎[1]，小寺美有紀[1]，平井晶子[3]，中田光彦[3,4]，上野有紀[2]，大澤俊彦[2]　([1]岐阜食科研，[2]愛知学院大，[3]サラダコスモ，[4]野菜で健康研究所)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

3A03a06　果糖ブドウ糖液糖の過剰摂取が若年 2 型糖尿病発症に与える影響
10:35　○花井悠真，西本沙弥香，江藤　望，服部秀美　(宮崎大農)

3A03a07　概日リズム依存的なプロシアニジン高含有食品素材の食後高血糖抑制効果の検証
10:46　○廣直賢勇，光橋雄史，芦田　均，山下陽子　(神戸大院・農)

3A03a08　ブルーベリー葉抽出物の高血糖改善作用
10:57　○松本　悠[1]，矢野善久[1]，山﨑正夫[2]，藤田裕之[1]　([1]京都先端科学大学バイオ環境，[2]宮崎大学農)

3A03a09　小豆抽出物に含まれる食後高血糖抑制成分の分析
11:08　○栗谷健志[1]，西尾昌洋[1]，大野菜々子[1]，増田裕一[1]，勝崎裕隆[1]，近藤修司[2]，園　淳平[2]，中村昌弘[2]，梅川逸人[1]　([1]三重大生資，[2]井村屋株式会社)

3A03a10　緑茶カテキン主用代謝物である 5-hydroxyphenyl-γ-valerolactone の L6 骨格筋細胞における糖取り込み促進作用
11:19　○高垣晶子[1,2]，吉岡泰淳[1]，山下陽子[1]，長野智哉[1]，池田真規[1]，芦田　均[1]　([1]神戸大院農・生命機能科学，[2]三井農林・R&D)

a11〜a13 発表者の接続時間 11:30〜11:40

3A03a11　HYA (10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid)の食品向け実用化開発
11:40　○柴田光治[1]，藤村俊夫[1]，北尾浩平[1]，木村郁夫[2]，岸野重信[3]，小川　順[3]　([1]日東薬品工業，[2]東京農工大農，[3]京大院農・応用生命)

3A03a12　腸内細菌叢由来水素ガスが高強度運動時のエネルギー代謝に及ぼす影響
11:51　○角　沙樹[1]，枝　伸彦[2]，赤間高雄[3]，松本光晴[1]　([1]協同乳業，[2]国立スポーツ科学センター，[3]早稲田大学　スポーツ科学学術院)

3A03a13　脱脂ごまパウダー(リピスマート™)の食後中性脂肪吸収抑制効果(無作為化二重盲検プラセボ対照クロスオーバー試験)
12:02　○山田裕晃[1]，森田沙代[1]，古賀啓太[1]，山津敦史[1]，古田到真[2]，金　武祚[1]　([1]株式会社ファーマフーズ，[2]三井製糖株式会社)

A03 会場　午後の部(13:50〜17:16)

食品―1331 食品機能・栄養 - メタボリック・シンドローム，エネルギー代謝―

p01〜p06 発表者の接続時間 13:40〜13:50

3A03p01　魚介類のセレン源であるセレノネイン摂取は脂肪性肝疾患モデルマウスの病態を改善する
13:50　○宮田昌明，進藤龍之介，松下功暉，上田裕香子，杉浦義正，山下倫明　(水産機構水大校)

3A03p02　新規ビフィズス菌株の肥満抑制効果
14:01　○丸田ひとみ[1]，中村昇二[2]，藤井祐介[2]，豊川直樹[2]，山下広美[1]　([1]岡県大・保福・栄養，[2]オハヨー乳業㈱)

3A03p03　肥満抑制と腸内細菌叢に与えるセルロースナノファイバー摂取と運動の影響
14:12　○長野隆男[1]，矢野博己[2]　([1]石川県大食品，[2]川崎医福大体育)

3A03p04　The regulation effects of Ampelopsis Grossedentata Derived dihydromyricetin on bile acids secretion and microbiota metabolites in metabolic syndrome
14:23　○KUN XIE[1]，Kozue Sakao[1,2]，De-Xing Hou[1,2]　([11] United Grad. Sch. of Agric. Sci.,Kagoshima Univ., Japan, [22] Dept. of Food Sci. & Biotech., Fac. of Agric.,Kagoshima Univ., Japan)

3A03p05　スルフォラファンの肥満抑制効果に対する腸内細菌叢の変化の解析
14:34　○小高愛未[1]，正路健太[2]，松谷峰之介[3]，志波　優[3,4]，松本雄宇[1,2]，鈴木　司[1,2]，山本祐司[1,2]，井上　順[1,2]　([1]東農大・応生化・農化，[2]東農大院・農・農化，[3]東農大・生物資源ゲノム解析セ，[4]東農大・生命科)

3A03p06　食事脂質由来腸内細菌代謝産物と宿主エネルギー代謝制御
14:45　○向山広美[1]，宮本潤基[1,2]，五十嵐美樹[1]，木村郁夫[1,2]　([1]東京農工大学大学院 農学研究院 応用生命化学専攻，[2]AMED-CREST)

p07〜p12 発表者の接続時間 14:56〜15:06

3A03p07　肝星細胞の活性化及びコラーゲン産生に対するブラジル産プロポリスの効果の検討
15:06　○小川智弘　(近大工)

3A03p08　骨格筋エネルギー代謝と脂肪代謝におけるエゾウコギの影響
15:17 ○山中敦詞[1]，小野夏彦[1]，瓜生圭介[1]，丸　勇史[1]，岡田陽子[2]，橋本健志[2]　([1]備前化成，[2]立命館大)

3A03p09　発酵乳ケフィアが筋肉細胞に及ぼす効果
15:28 ○木下将人[1]，本郷玲奈[2]，大友　剛[3]，徳丸浩一郎[3]，照屋輝一郎[1,2,4]　([1]九大院シス生，[2]九大院生資環，[3]日本ケフィア，[4]九大院農院)

3A03p10　8R-ヒドロキシエイコサペンタエン酸(8R-HEPE)，8R-ヒドロキシエイコサテトラエン酸(8R-HETE)，10R-ヒドロキシドコサヘキサエン酸(10R-HDHA)供給源としてのツノナシオキアミ活用
15:39 ○山田秀俊，熊谷加奈子，植村亜衣子，結城彩花　(岩手生物工学研究センター)

3A03p11　琥珀抽出物の生活習慣病に対する多機能効果について
15:50 ○山本卓也[1,2,3]，武田令子[1,2]，岡崎一眞[1,2]，関田真理絵[1,2]，五十嵐則夫[2]，山野幹夫[1,2]，オスマンムハンマド[3]，十河衿香[3]，坂本和一[3]　([1]琥珀バイオテクノロジー，[2]ヤマノビューティケミカル，[3]筑波大生命環境)

3A03p12　超硬質米と黒米のロウカット玄米の特性
16:01 ○中村澄子[1]，雑賀慶二[2]，部屋泰伸[2]，西山直希[2]，小林和幸[3]，松井崇晃[3]，板谷越重人[3]，大坪研一[1]　([1]新潟薬大，[2]東洋ライス株式会社，[3]新潟県農総研)

p13〜p17 発表者の接続時間 16:12〜16:21

3A03p13　分岐鎖アミノ酸は骨格筋・肝臓の糖代謝を制御し，低タンパク質食摂取による肝臓脂肪蓄積を抑制する
16:21 ○内田海登[1]，加来香苗[2]，竹中麻子[2]　([1]明治大院農学研究科，[2]明治大農)

3A03p14　食事誘導性肥満ラットにおける GLP-1 分泌応答の増強には回腸部が寄与する
16:32 ○佐野杏莉，比良　徹　(北海道大農)

3A03p15　ビートファイバー摂取はラットの摂取エネルギーを減少させ，胆汁酸プールと小腸粘膜プレプログルカゴン遺伝子発現を増加させる
16:43 ○藤谷美菜，越智博介，前野元希，長森公寛，岸田太郎(愛媛大農)

3A03p16　納豆に含まれる粘り成分 γ-ポリグルタミン酸がマウス血糖値及び盲腸内短鎖脂肪酸に及ぼす影響
16:54 ○田村　基，堀　幸子，猪瀬篤子，小堀真珠子　(農研機構　食品研究部門)

3A03p17　イヌリンの高脂肪食マウスの血糖値に与える影響
17:05 ○滝口泰之，田中祐輔，清水佳純，竹島妃七　(千葉工大生命)

A04 会場　午前の部(9:30〜12:13)

食品―1336 食品機能・栄養 - 癌，抗癌（5 題）1337 食品機能・栄養 - 酸化，抗酸化，糖化，抗糖化，老化（8 題）―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

3A04a01　Piper longum が含有する新規化合物を含むネオリグナンとその生理活性評価
9:30 ○仁科淳良[1]，西澤一輝[1]，浮谷基彦[1]，深津　誠[1]，ニュンペイ[2]　([1]日大理工，[2]パセイン大)

3A04a02　Effects of extrinsic PlsEtn on Caco-2 and differentiated Caco-2: PlsEtn in human intestinal cancer cells and impaired intestinal lining
9:41 ○EPHANTUS BERNARD[1]，Shinji YAMASHITA[1]，Ayaka YAMAMOTO[2]，Kiyotaka NAKAGAWA[3]，Teruo MIYAZAWA[3]，Mikio KINOSHITA[1]　([1]Obihiro Univ.，[2]Yaizu Suisankagaku Ind.，[3]Tohoku Univ.)

3A04a03　がん幹細胞に対する酵素消化低分子化フコイダン抽出物と抗がん剤の併用効果
9:52 ○橋本真奈[1]，徳永佐和[1]，江藤　博[2]，照屋輝一郎[1,3]　([1]九大院シス生，[2]第一産業㈱，[3]九大院農院)

3A04a04　がん細胞に対するコラーゲンペプチドの効果
10:03 ○倉田淳代[1]，木村泰久[1]，松尾道憲[2]，木岡紀幸[1]　([1]京都大農，[2]京都女子大家政)

3A04a05　卵由来スフィンゴミエリンによる肝癌細胞への細胞死誘導機構の解析
10:14 ○畠中直人，山田可奈子，三浦　豊　(農工大院農)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

3A04a06　ホモアンセリンおよび酸化ホモアンセリンの測定方法の確立と生体内局在の解明
10:35 ○垣花優希[1,2]，笠松真吾[1]，内田浩二[3]，居原　秀[1]　([1]大阪府大理，[2]学振DC[2]，[3]東大農)

3A04a07　2-オキソ-イミダゾールジペプチドの抗酸化活性
10:46 ○居原　秀[1]，垣花優希[1]，内田浩二[2]　([1]大阪府大理，[2]東京大農)

3A04a08　エゴマ油の抗酸化能を向上させる抽出法の検討およびその生理作用
10:57 ○宮田恵多[1]，大森菜々穣[1]，山下雄一郎[1]，山口大貴[2]，三浦紀称嗣[2]，浜口昂大[3]，長谷川浩一[3]，松本義信[1]，奥　和之[1]，宮田富弘[1]　([1]川福大臨床栄養，[2]川福大院健康科学，[3]中部大応用生物)

3A04a09　培地中の硫酸塩がユーグレナの活性イオウ分子の生成動態に及ぼす影響
11:08 ○神田彩華[1]，笠松真吾[1]，中野長久[2]，居原　秀[1]　([1]大阪府大理，[2]大阪府大生命環境)

3A04a10　好熱性子嚢菌 *Myceliopathora thermophila* 産生する糖化抑制物質の探索
11:19 ○吉井一晴[1]，高野真希[2]，星野一宏[2]　([1]富山大工，[2]富山大院理工)

a11〜a13 発表者の接続時間 11:30〜11:40

3A04a11　カルボキシメチルリジンをターゲットとしたフロロタンニン類の抗糖化活性の評価
11:40 ○村田直輝[1]，東　満寛[2]，山内浩資[2]，三宅英雄[1,3]，田中礼士[1,3]，柴田敏行[1,3]　([1]三重大院・生資，[2]カイゲンファーマ㈱，[3]三重大・海藻バイオ研)

3A04a12　線虫 *C.elegans* を用いたシアニジン 3-グルコシドの抗糖化活性評価
11:51 ○瀬戸山央，廣川隆彦　((地独)神奈川県立産技総研)

3A04a13　コリアンダーシードに含まれる機能性成分の皮膚老化に対する効果
12:02 ○沢辺昭義[1,2]，山下敦之[1]，友尻真理恵[2]，竹田竜嗣[3]　([1]近畿大院農，[2]近畿大農，[3]関西福祉科学大・健康福祉)

A04 会場　午後の部(13:50〜16:54)

食品―1337 食品機能・栄養 - 酸化，抗酸化，糖化，抗糖化，老化―

p01〜p06 発表者の接続時間 13:40〜13:50

3A04p01　低密度リポタンパク質の酸化に対する褐藻類由来フコイダンの効果
13:50 ○邱　釋漫[1]，山岸　喬[2]，西澤　信[2]，高杉美佳子[3]，新井博文[1]　([1]北見工業大学，[2]ファイナルフューチャーインターナショナル株式会社，[3]九州産業大学)

3A04p02　植物色素 betanin の強力な peroxynitrite 消去能による細胞保護機能の検証
14:01 ○加藤嵩士，薬師　葉，橋本　誠，橋床泰之，崎浜靖子(北大院農)

3A04p03　黄ニラ抽出物の酸化ストレス軽減作用
14:12 ○川上賀代子[1]，守谷智恵[1]，畑中唯史[2]，洲崎悦子[1]，坪井誠二[1]　([1]就実大薬，[2]岡山生物研)

3A04p04　GABA による脳腸相関活性化とその分子基盤
14:23 ○原口瑞木[1]，蕃塚 涼[2]，内村佳奈子[3]，金　武祚[4]，片倉喜範[2,3,5]　([1]九大農・食化工，[2]九大院・生資環，[3]九大院・シス生，[4]株式会社ファーマフーズ，[5]九大院・農院)

3A04p05　担子菌 *Trametes versicolor* 熱水抽出液の Glutamate 誘発酸化ストレス抑制効果
14:34 ○高井智貴[1]，高野真希[2]，星野一宏[2]　([1]富山大工，[2]富山大理工)

3A04p06　ほうじ茶に特異的に含まれる成分の機能解析
14:45 ○山田康枝[1]，沖田裕司[1]，矢吹　智[1]，西居和哉[1]，笹木哲也[2]　([1]近畿大，[2]石川県工試)

p07〜p12 発表者の接続時間 14:56〜15:06

3A04p07　フェルラ酸-4'-*O*-グルクロニドはラジカル消去活性が極めて低いがアミロイド β 誘導性神経細胞死を抑制する
15:06 ○外山華恵[1]，原　崇[2]，三亀啓吾[2]，中村澄子[4]，池内　健[3]，城斗志夫[2]，大坪研一[4]　([1]新潟大院自然科学，[2]新潟大農，[3]新潟大脳研，[4]新潟薬大応用生命)

3A04p08　アシベニイグチ(*Caloboletus calopus*)に含有される神経細胞保護作用物質の探索研究
15:17 ○木船須一朗[1]，南園　祈[2]，吉川航平[2]，菅野有紀[2]，須長直斗[2]，菅谷紘一[2]，小野瀬淳一[1,2]，阿部尚樹[1,2]　([1]東農大院・健康，[2]東農大・応生・健康)

3A04p09　糖尿病がアルツハイマー病態に与える影響とロスマリン酸の効果の検証
15:28 ○宮脇里奈，山下　玲，伯野史彦，高橋伸一郎，岡田晋治，小林彰子　(東大院農)

3A04p10　オルトジヒドロキシイソフラボンを含む発酵大豆イソフラボンの脳機能に及ぼす影響
15:39 ○平松直人，梅田周佑，呉　暁紅，岡田利孝　(株式会社東洋発酵)

3A04p11　アピオス食餌負荷による膵ラ氏島への影響
15:50 ○渡邉理江[1]，梶岡陽菜[1]，山本悠介[1]，山本　鈴[1]，砂辺梨湖[1]，安達沙希[1]，赤嶺三奈[1]，儀間章託[1]，馬越阿佑美[1]，森岡優衣[1]，松永祐輔[2]　([1]美作大食物，[2]㈱津山工業原料)

3A04p12　EGCG による SMP30 の発現上昇は酸化剤 t-BHP 誘導性肝障害の誘発を抑制する
16:01 ○荒川航太[1]，井上博文[2]，田中未央里[2]，高橋信之[1]，上原万里子[1]　([1]東農大院農，[2]東農大応生)

p13〜p15 発表者の接続時間 16:12〜16:21

3A04p13　イソ α 酸の Nrf2 を介したアルコール性肝障害予防効果
16:21 ○高瀬貴仁[1]，豊田　集[2]，小林直之[1]，井上孝司[1]，石島智子[2]，土屋陽一[1]，岡田晋治[2]　([1]サッポロホールディングス㈱，[2]東大院農生科・応生化)

3A04p14　ラットを用いた腹膜中皮細胞移植の検討
16:32 ○大崎雄介[1,2]，高橋知香[2]，伊藤貞嘉[2]，森　建文[2]　([1]東北大・院農・栄養学，[2]東北大・院医・統合腎不全医療)

3A04p15　水溶性食物繊維イヌリンを用いた健常高齢者の腸内菌叢変動解析
16:43 ○千々岩樹佳[1,2]，Pui Shan Wong[2]，井手圭吾[1,2]，伊藤智子[3]，川上涼子[3]，村田浩子[3]，樋口　満[3]，柴田重信[4]，油谷幸代[2]，竹山春子[1,2]　([1]早大院先進理工生命医科，[2]産総研CBBD-OIL，[3]早大院スポーツ科学，[4]早大院先進理工電子生命)

A05 会場　午前の部(9:30〜12:13)

食品―1338 食品機能・栄養 - 神経，内分泌，味覚・食欲―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

3A05a01　冷えの症状に対する冷感覚の感受性の関与
9:30 ○森　紀之[1,2]，青木美優[2]，中江美沙子[2]　([1]同女大・生活，[2]滋賀県大・人間文化)

3A05a02　ジリノレオイルホスファチジルコリン(DLPC)によるミトコンドリア増強を介した Neuro2a 細胞に対する酸化ストレスからの保護効果
9:41 ○長井　薫，加留部真紀，中嶋新菜，八木夏海，山内加奈恵　(千里金蘭大生活科学)

3A05a03　酸化ストレスに対するダイゼインの AMPK 活性化を介したミトコンドリア機能亢進作用による神経細胞保護効果
9:52 ○伊藤章悟[1]，長井　薫[2]　([1]甲子園大栄，[2]千里金蘭大生活科)

3A05a04　マウスの脳内モノアミン及び行動は給餌される標準飼料に影響を受ける
10:03 ○松元沙樹[1]，山本咲希[1]，椛島奈津美[1]，市瀬嵩志[1]，古屋茂樹[1,2]　([1]九州大農，[2]イノベイティブバイオアーキテクチャーセンター)

3A05a05　ロスマリン酸摂取による脳内モノアミン変動の解析
10:14 ○貫間春圭[1]，長谷知輝[1]，平　修[2]，阿部啓子[1,3]，小林彰子[1]　([1]東大院農，[2]福大農，[3]産技総研)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

3A05a06　神経変性疾患モデル線虫における酵素合成フェルラ酸ルチノシドの神経保護作用
10:35 ○松本果楠子[1]，Park Hyun Young[2]，Vattem A. Dhiraj[2]，中村宗一郎[1]，片山　茂[1,3]　([1]信州大学院農，[2]オハイオ大，[3]信大バイオメディカル研究所)

3A05a07　こんにゃく由来セラミドの血液脳関門透過性及び脳内アミロイド β 蓄積低減効果の検討
10:46 ○江口晃一[1]，高橋香織[1]，三上大輔[2]，湯山耕平[2]，向井克之[1,2]，五十嵐靖之[2]　([1]㈱ダイセル，[2]北海道大)

3A05a08　黒ショウガ(*Kaempferia parviflora*)による脳認知機能改善効果
10:57 ○吉田　泉[1]，吉田　香[2]，井出将博[1]，高橋有志[1]，藤田和弘[1]，五十嵐友二[1]　([1]日本食品分析セ，[2]同志社女子大)

3A05a09　飼料の違いが社会的敗北 BALB/c マウスの行動に与える影響
11:08 ○石其慧太[1]，佐藤瑞穂[1,2]，谷島優平[1]，豊田　淳[1,2]　([1]茨大農，[2]農工大連農)

3A05a10　社会的敗北ストレスモデルにおけるコラーゲン分解物の抗うつ作用と神経炎症への影響
11:19 ○野木村大[1]，水重貴文[2]，多賀祐喜[3]，楠畑　雅[3]，蕪山由己人[2]　([1]宇都宮大学大学院農学研究科，[2]宇都宮大学学術院，[3]株式会社ニッピ)

a11〜a13 発表者の接続時間 11:30〜11:40

3A05a11　乳由来 β ラクトリンの継続摂取による注意集中力の向上
11:40 ○阿野泰久[1]，喜多真弘[1]，渡邉順史[2]，梅田　聡[3]　([1]キリンHD健康研，[2]協和発酵バイオ，[3]慶応大)

3A05a12　脳特異的セリン合成不全マウスにおいて惹起される Ca シグナル関連分子の脳内発現変化
11:51 ○内海　真[1]，濱野桃子[2]，古屋茂樹[3]　([1]九州大学大学院生資環，[2]九州大学農学研究院，[3]九州大学イノベーティブバイオアーキテクチャーセンター)

3A05a13　発達期におけるタンパク質栄養制限は成熟期脳内神経伝達シグナル系の発現・機能異常を惹起する
12:02　○北野　楽[1]，椛島奈津美[1]，渡邊貴美[1]，最上侑佑盛[1]，日比亜佑実[1]，古屋茂樹[1,2]　([1]九州大農，[2]九大イノベイティブバイオアーキテクチャーセンター)

A05 会場　午後の部(13:50〜17:27)

食品―1333 食品機能・栄養 - 消化・吸収，循環・血管―

p01〜p06 発表者の接続時間 13:40〜13:50

3A05p01　食品成分抱合型代謝産物の質量分析解析法の確立
13:50　○中野　悠[1]，黒木勝久[1]，リューミンチー[2]，水光正仁[1]，榊原陽一[1]　([1]宮崎大農，[2]トレド大薬)
3A05p02　ラット門脈ならびに回腸部腸間膜静脈における食後のグルコース濃度と消化管ホルモン濃度の変動
14:01　○蒲地美南[1]，原　　博[2]，比良　徹[1]　([1]北海道大農，[2]藤女子大)
3A05p03　魚油乳化物摂取はリンパ脂質輸送を促進させる
14:12　○中山恵理子[1]，武山　藍[1]，城内文吾[2]，加藤綾華[3]，柳本賢一[3]，佐藤匡央[2]　([1]九大院生資環，[2]九大院農，[3]日水食機研)
3A05p04　ヒマワリの脱脂種子の活用を目指した生体調節機能の探索
14:23　○佐藤咲希[1]，川添華菜[2]，南　雄二[1,2]，加治屋勝子[1,2]　([1]鹿児島大学農学部食料生命科学科，[2]鹿児島大学大学院農林水産学研究科)
3A05p05　ヒマワリオイルの特性解析と血流改善効果
14:34　○川添華菜[1]，佐藤咲希[2]，南　雄二[1,2]，加治屋勝子[1,2]　([1]鹿大院農，[2]鹿大農)
3A05p06　桜島大根による血管機能改善効果および活性成分トリゴネリンの解析
14:45　○佐々木真歩[1]，加治屋崇[2]，南　雄二[1]，加治屋勝子[1]　([1]鹿児島大農食料生命，[2]天陽会中央病院)

p07〜p12 発表者の接続時間 14:56〜15:06

3A05p07　血管異常収縮に対するマルベリー由来成分の機能的作用
15:06　○鶴留奈津子[1]，東かなた[2]，南　雄二[1,2]，加治屋勝子[1,2]　([1]鹿児島大院農，[2]鹿児島大農)
3A05p08　ガーリック由来有機硫黄化合物が tissue factor ならびにプラーク形成に及ぼす影響
15:17　○奥江紗知子[1]，矢口真実[1]，三浦　徳[2]，増澤(尾﨑)依[2]，細野　崇[1,2]，関泰一郎[1,2]　([1]日大院 生資科 応生科，[2]日大 生資科 生命化)
3A05p09　ナス粉末の継続摂取は血圧高めのストレス被験者の血圧を改善する
15:28　○中村浩蔵[1]，鈴木美穂[1]，高橋伶仁[1]，山口翔平[1]，椿　和文[2]，藤田智之[1]，西村三恵[3]，西平　順[3]　([1]信州大農，[2]株式会社ADEKA，[3]北海道情報大学)
3A05p10　ナス粉末の継続摂取は血圧高めのストレス被験者の心理状態を改善する
15:39　○山口翔平[1]，高橋伶仁[1]，鈴木美穂[1]，椿　和文[2]，藤田智之[1]，西村三恵[3]，西平　順[3]，中村浩蔵[1]　([1]信州大農，[2]株式会社ADEKA，[3]北海道情報大学)
3A05p11　ナス加工食品の継続摂取による血圧，心理状態改善作用
15:50　○鈴木美穂[1]，高橋伶仁[1]，山口翔平[1]，猪野亜矢[2]，髙田梨沙[3]，冨田邦彦[4]，髙木智矢[4]，藤田智之[1]，西村三恵[5]，西平　順[5]，中村浩蔵[1]　([1]信州大農，[2]高知県農業技術センター，[3]株式会社サラダコスモ，[4]三井食品工業株式会社，[5]北海道情報大学)
3A05p12　*in situ* マウス脳灌流法による血液脳関門透過性ジペプチドの探索と脳蓄積部位の解明
16:01　○芳野温子[1]，清原隼人[1]，駒林玄軌[1]，道具伸也[2]，高田芙友子[2]，韮澤　崇[3]，田中　充[1]，松井利郎[1]　([1]九大院農，[2]福大薬，[3]Bruker Japan)

p13〜p18 発表者の接続時間 16:12〜16:21

3A05p13　ユーグレナ・グラシリス EOD-1 株の摂取が若年女性の整腸作用に及ぼす影響
16:21　○平松智子[1]，内藤淳子[2]，西岡満智子[2]，西田典永[2]，高橋　円[2]，田淵朱莉[1]，三宅加奈子[1]，岩岡裕二[1]，伊東秀之[1]　([1]岡山県立大栄養，[2]神鋼環境ソリューション)
3A05p14　ケルセチンの吸収機構における細胞外小胞の役割
16:32　○杉元亮介，丸毛　遥，石坂朱里，村上　明　(兵庫県立大学大学院・環境人間学研究科)
3A05p15　コラーゲン架橋分子ピリジノリンの腸管透過経路の解析
16:43　○尾上真純，村上庸人，赤尾菜々子，山本菜々美，早瀬文孝，渡辺寛人　(明治大学)
3A05p16　イメージング質量分析を用いたロスマリン酸のマウス小腸における吸収と分布の可視化
16:54　○小松澤里帆[1]，平　　修[2]，岡田憲典[3]，阿部啓子[1,4]，小林彰子[1]　([1]東大院農，[2]福大農，[3]東大生セ，[4]産技総研)
3A05p17　Ca^{2+} バイオセンサーマウスを用いた微細藻類ユーグレナの腸管センシングの可視化解析
17:05　○中島綾香[1]，安田光佑[1]，村田阿子[1]，鈴木健吾[1]，安達貴弘[2]　([1]株式会社ユーグレナ，[2]東京医科歯科大学)
3A05p18　ヒト腸内細菌によるクルクミン代謝に関する化学的研究(3)
17:16　○丹羽利夫[1]，横山慎一郎[2]，望月美佳[3]，大澤俊彦[3]　([1]修文大健康栄養，[2]岐阜県食品科学研究所，[3]愛知学院大心身科学)

A06 会場　午前の部(9:30〜12:13)

食品―1334 食品機能・栄養 - 免疫，炎症―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

3A06a01　食餌量制限の免疫老化抑制効果：体重減少率に着目した解析
9:30　○徳留　亮[1]，角田紗希[1]，関根玲奈[1]，扇野道弘[1]，須田瞭太[1]，小方優弥[1]，榎本　淳[1,2]　([1]群大院理工，[2]群大食健康セ)
3A06a02　マスト細胞は脂肪細胞の分化・成熟を正負両方向に制御する
9:41　○祖父江春菜，今村玲奈，高野真衣，中西祐輔，高橋恭子(日大生物資源)
3A06a03　慢性社会的敗北ストレスモデルマウスを用いたビフィズス菌 *Bifidobacterium bifidum* TMC3115 株給与の評価
9:52　○依田一豊[1]，佐藤瑞穂[2,4]，原田　岳[1]，大澤夏樹[3]，何　　方[1]，豊田　淳[2,3,4]　([1]タカナシ乳業㈱，[2]東農工大連農，[3]茨城大院農，[4]茨城大農)
3A06a04　乳酸菌 *Lactobacillus sakei* のメンブランベシクルによる腸管 IgA 産生増強メカニズムの解明
10:03　○山崎思乃[1,3]，三好柚紀[2,3]，雑賀あずさ[3]，長竹貴広[3]，松永安由[3]，國澤　純[3]，片倉啓雄[1]　([1]関西大化生工，[2]関西大院理工，[3]医薬健栄研)
3A06a05　ヒロメ(*Undaria undarioides*)から調製したエクソソーム様微小胞の免疫賦活能
10:14　○伊藤智広[1]，世古夏実[2]，伊藤裕子[3]，赤尾幸博[4]　([1]三重大院生資，[2]三重大生資　，[3]大阪医大，[4]岐阜大院連合創薬)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

3A06a06　*Lactobacillus plantarum* 06CC2 株 の *Helicobacter pylori* によるヒト胃上皮細胞株炎症誘導に対する抑制作用
10:35　○李　怡然[1]，竹下正彦[1]，中野智木[1]，有馬勇夫[1]，ツェンドアユシチュルーンバト[2]，オユンスレンツェンデスレン[3]，井越敬司[4]，古賀泰裕[5]　([1]南日本酪農協同㈱，[2]蒙科技大，[3]蒙バイオテクノ協会，[4]東海大農，[5]東海大医)

3A06a07　SUMO 種依存的 SNPs 活性に対する vialinin A の影響
10:46　○國井僚介[1]，中澤侑子[2]，菅谷紘一[2]，小野瀬淳一[2]，阿部尚樹[1,2]　([1]東農大院・健康，[2]東農大・応生・健康)

3A06a08　IL-12 発現を制御するバイオジェニクスのマクロファージモデル細胞を用いた探索および解析
10:57　○日浦月穂[1]，梅谷華奈[2]，鈴木政彦[3]，辻川勇治[3]，坂根　巌[3]，薩　秀夫[2]　([1]前工大院・工，[2]前工大・工，[3]㈱伊藤園・中央研究所)

3A06a09　Procyanidin B2 gallate の mTOR 経路を介した T 細胞機能制御
11:08　○遠藤勝紀，松井莉奈，杉山李奈，浅見拓哉，稲葉千尋，真壁秀文，田中沙智　(信州大農)

3A06a10　Fermented rice bran supplementation enhances intestine restoration in a mice model of ulcerative colitis using dextran sodium sulfate-induced inflammation
11:19　○Afifah Zahra Agista[1]，Jahidul Islam[1]，Yusuke Ohsaki[1]，Takuya Koseki[2]，Michio Komai[1]，Hitoshi Shirakawa[1]　([1]Grad. Sch. Agri. Sci, Tohoku Univ, [2]Fac. Agri., Yamagata Univ)

a11〜a13 発表者の接続時間 11:30〜11:40

3A06a11　小腸と大腸の腸管関連リンパ組織における種々の抗原に対する IgA 産生応答の比較
11:40　○岡田　開[1]，津田真人[1]，小島菜月[1]，宇野直哉[1]，池田大貴[1]，八村敏志[2]，高橋宜聖[3]，高橋恭子[1]，上野川修一[1]，細野　朗[1]　([1]日大・生資科，[2]東大・院・食の安全研究セ，[3]感染研・免疫)

3A06a12　高糖野菜発酵液由来の新種乳酸菌 *Lactobacillus kosoi* の粘膜免疫増強活性の評価
11:51　○中島(前田)由香里[1]，山口ひかる[1]，松崎千秋[1]，東村泰希[2]，邱　泰瑛[3]，山本憲二[4]，高橋知也[5]　([1]石川県大・資源研，[2]石川県大・生資環，[3]北見工大，[4]和歌山大，[5]アルソア R&D)

3A06a13　IL-22 を介して皮膚バリア機能を改善する発酵食品由来の菌株のスクリーニング
12:02　○小竹久仁彦[1,2]，熊澤利彦[1,2]，西村篤寿[1]，浅井紀之[1]，安達貴弘[2]　([1]イチビキ㈱，[2]東京医科歯科大・難研)

A06 会場　午後の部(13:50〜16:54)

食品―1334 食品機能・栄養 - 免疫，炎症―

p01〜p06 発表者の接続時間 13:40〜13:50

3A06p01　抗炎症作用を指標とした破骨細胞分化評価系の確立
13:50　○伊東侑亮[1]，高橋信之[1]，森川未織[1]，田中未央里[2]，井上博文[2]，上原万里子[1]　([1]東農大院農，[2]東農大応生)

3A06p02　大豆イソフラボン代謝物エクオールの関節リウマチ抑制作用
14:01　○井上千尋，林　宜蒨，山下修矢，宮本恵美，藤村由紀，立花宏文　(九大院農院・生機科)

3A06p03　クルクミンの抗炎症作用機構の解明
14:12　○西尾沙絵香[1]，中島史恵[2]，ルイスポーラ[2]，シュナイダークラウス[2]，内田浩二[3]，柴田貴広[1]　([1]名大院生命農，[2]バンダービルト大学，[3]東大院農生科)

3A06p04　光センシングによる簡便な未病マーカーの開発
14:23　○數村公子[1]，波多野薫子[1]，竹内康造[1]，松下悦史[2]，吉田晃浩[3]，阿部　新[4,5]，朝倉富子[6]，斎藤芳和[6]，美和登志幸[7]，服部将貴[8]，大澤俊彦[9]　([1]浜松ホトニクス・中研，[2]中津川市民病院・循環器内科，[3]中津川市民病院・検査科，[4]多摩総合・脳血管内科，[5]日本医大・脳神経内科，[6]東大院農生科・応生化，[7]浜松ホトニクス・電子管，[8]浜松ホトニクス・GSCC，[9]愛知学院大・心身)

3A06p05　ハニーブッシュ抽出物が sIgA 産生に及ぼす影響の解析
14:34　○増田美咲[1]，ジュベールエリザベス[2]，三浦　豊[1]　([1]農工大農，[2]農業研究評議会)

3A06p06　緑茶カテキン EGCG の血管内皮細胞由来細胞外小胞を介した生体調節作用
14:45　○小川史代，疋田　愛，両角麻衣，熊添基文，藤村由紀，立花宏文　(九大院農院・生機科)

p07〜p12 発表者の接続時間 14:56〜15:06

3A06p07　マウス大腸粘膜固有層単核球において 1 ーケストース摂取により増加した microRNA が T 細胞の遺伝子発現に及ぼす影響
15:06　○逢坂文那[1]，門田吉弘[2]，栃尾　巧[2]，園山　慶[1]　([1]北海道大農，[2]物産フードサイエンス)

3A06p08　腸内細菌叢への介入による腸管 GABA 濃度の変化とその作用
15:17　○池上美音[1]，福本凛太郎[1]，土居玄武[1]，蛭田莉央[1]，原田　岳[2]，何　　方[2]，藤佑志郎[1]，松藤　寛[1]，中西祐輔[1]，高橋恭子[1]　([1]日大生物資源，[2]タカナシ乳業㈱・商品研究所)

3A06p09　無菌 ODS ラットにおけるアスコルビン酸欠乏による腸管と肝臓での炎症様変化の解析
15:28　○川出野絵，村井篤嗣，鈴木若奈，竹内健三郎，小林美里，堀尾文彦　(名古屋大院生命農)

3A06p10　*Lactobacillus plantarum* OLL2712 株の経口投与による高脂肪食を短期摂取したマウスの脂肪組織および腸管における抗炎症作用の検討
15:39　○王イバイ[1]，高野智弘[1]，周英ギョク[1,2]，王　　蓉[1,2]，田之倉優[1,2]，宮川拓也[2]，足立(中嶋)はるよ[1]，八村敏志[1]　([1]東大院農生科・食の安全研セ，[2]東大院農生科・応生化)

3A06p11　*β*-Elemene alleviates the formation of fat tissue-related inflammation
15:50　○Yingyu ZHOU[1,2]，Tomohiro TAKANO[1,2]，Yimei WANG[1,2]，Xuyang LI[2]，Rong WANG[1,2]，Haruyo ADACHI(NAKAJIMA)[1,2]，Masaru TANOKURA[1,2]，Takuya MIYAKAWA[2]，Satoshi HACHIMURA[1,2]　([1]Res. Cent. Food Safety, Univ. Tokyo, [2]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. Tokyo)

3A06p12　酪酸は FBP1 を介して腸管上皮バリア機能を高める
16:01　○宮下采佳，浅野かおり，杉　由高，中田一彰，藤佑志郎，大槻　崇，松藤　寛，中西祐輔，花澤重正，高橋恭子　(日大生物資源)

p13〜p15 発表者の接続時間 16:12〜16:21

3A06p13　IgE が腸管のメタボロームと炎症に及す影響についての解析
16:21　○戸田雅子[1]，Blanco Frank[2]，Barker-Tejeda Thomas Clive[3]，Perez Gordo Marina[3]，Rojo David[3]，Villasenor Alma[3]，Vieths Stefan[2]，Barber Domingo[3]　([1]東北大農，[2]ポールエーリッヒ研究所，[3]CEUサンパブロ大)

3A06p14　海洋病原菌 *Vibrio metschnikoviili* の鉄吸収と増殖を阻害する化合物のスパイス抽出物からの探索
16:32　○陸　　鵬，王　夢瑶，神谷岳洋，張　米敏，岡本　研，鈴木道生，朝倉富子，藤原　徹，永田宏次　(東京大学 大学院農学生命科学研究科)

3A06p15　ユーグレナ・グラシリス EOD-1 株の長期摂取における影響
16:43　○石橋健一[1]，西岡満智子[2]，大中信輝[2]，髙橋　円[2]，山中大輔[1]，安達禎之[1]，大野尚仁[1]　([1]東京薬大薬，[2]神鋼環境ソリューション)

A07 会場　午前の部（9:30〜12:13）

微生物―1441 物質生産 – 発酵（二次代謝産物，抗生物質，ペプチド，生理活性物質）―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

3A07a01　米糠培地における麹菌培養条件による酵素生産能の違いについて
9:30　○飯泉　湧，相良純一　（金工大）

3A07a02　紅麹色素高産生株の探索と機能性食品開発に関する研究
9:41　○喜屋武大誠[1]，川野喬之[1]，仲宗根健一[1]，安田正昭[2]，橘信二郎[1]　（[1]琉球大農，[2]沖縄大健康栄養学部）

3A07a03　界面バイオプロセスを用いた *Monascus* 色素の生産研究
9:52　○村川穂奈美[1]，橘信二郎[2]，岩月正人[3]，渡邊善洋[3]，小田　忍[1]　（[1]金沢工大ゲノム研，[2]琉球大農，[3]北里生命科学研）

3A07a04　Autophagy deficiency boosts the production of kojic acid in the filamentous fungus Aspergillus oryzae
10:03　○Junlin CHEN[1]，Minoru YOSHIDA[1,2,3]，Manabu ARIOKA[1,2]　（[1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]RIKEN CSRS）

3A07a05　*Fusarium oxysporum* 由来 *ycjR* を用いたプロトカテク酸の発酵生産
10:14　○勝木　希，桝尾俊介，高谷直樹　（筑波大・生命環境・微生物サステイナビリティ研究センター）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

3A07a06　黄麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるポリケチド生産への *kojA* プロモーターの使用：長期間生産への応用の見通し
10:35　○玉野孝一[1,2]，國永万保子[1]，小島　直[3]，梅村舞子[1,2]，町田雅之[1]，小池英明[1]　（[1]産総研生物プロセス，[2]産総研CBBD-OIL，[3]産総研バイオメディカル）

3A07a07　*Aspergillus nidulans* の二次代謝とオルニチン代謝間における関連性
10:46　○門岡千尋[1,2]，浅井禎吾[3]，森　一樹[4]，奥津果優[2]，吉﨑由美子[1,2]，髙峯和則[1,2]，後藤正利[1,5]，玉置尚徳[1,2]，二神泰基[1,2]　([1]鹿児島大院連農，[2]鹿児島大農，[3]東北大薬，[4]鹿児島高専，[5]佐賀大農）

3A07a08　麹菌におけるゲノム編集を利用した多重代謝改変による異種天然物生産性の向上
10:57　○齋藤直也[1]，片山琢也[1,2]，南　篤志[3]，及川英秋[3]，丸山潤一[1,2]　（[1]東大院・農生科・応生工，[2]東大・微生物連携機構，[3]北大院・理）

3A07a09　共培養による *Aspergillus niger* の黄色色素生産誘導の発見
11:08　○辻　晴佳[1]，二宮章洋[2]，甲斐建次[3]，浦山俊一[2,4]，萩原大祐[2,4]　（[1]筑波大院・生命環境，[2]筑波大・生命環境系，[3]阪府大・生命環境，[4]筑波大・MiCS）

3A07a10　トティウイルスによるイネいもち病菌のカビ毒テヌアゾン酸産生誘導
11:19　○二宮章洋[1]，浦山俊一[1,2]，周防　玲[3]，藤　晋一[4]，森山裕充[5]，萩原大祐[1,2]　（[1]筑波大生命環境，[2]筑波大MiCS，[3]日大生物資源，[4]秋田県大生物資源，[5]東農工大農）

a11〜a13 発表者の接続時間 11:30〜11:40

3A07a11　*Aspergillus terreus* のイタコン酸生産に及ぼす金属イオンの影響（第 3 報）
11:40　柿崎徹也[2]，南　智之[2]，浜田勇和[2]，吉川侑太朗[1]，江場祐貴[1]，横前滉太[1]，○林　大三[1]，金政　真[1,2]　（[1]中部大・環生科，[2]中部大院・応生）

3A07a12　糸状菌が生産する適合溶質エクトインに関する研究
11:51　○土谷敬多郎[1]，椰野準希[2]，村田紋奈[2]，山下暁史[2]，山口大輝[2]，佐藤龍一[3]，小島千怜[1]，堤内　要[2,3]，金政　真[1,2]　([1]中部大・環生科，[2]中部大院・応生，[3]中部大・応生化）

3A07a13　ダイズおよび根粒菌における適合溶質の分析に関する研究
12:02　○小島千怜[1]，土谷敬多郎[1]，椰野準希[2]，村田紋奈[2]，山口大輝[2]，堤内　要[2,3]，佐藤龍一[3]，金政　真[1,2]　（[1]中部大・環生科，[2]中部大院・応生，[3]中部大・応生化）

A07 会場　午後の部（13:50〜17:16）

微生物―1441 物質生産 – 発酵（二次代謝産物，抗生物質，ペプチド，生理活性物質）―

p01〜p06 発表者の接続時間 13:40〜13:50

3A07p01　環状バクテリオシン，ラクトサイクリシン Q の生合成遺伝子群の解析
13:50　○加唐　諭，星　優美，吉村京一，高城博也，沢　稔彦，園元謙二，善藤威史　（九大院・農）

3A07p02　多成分バクテリオシントランスポーター EnkT の分泌機構の解明
14:01　○竹内愛子，和田夏美，須志田浩稔，野見山泰成，園元謙二，善藤威史　（九大院・農）

3A07p03　部位特異的変異によるバクテリオシンの改変とその影響
14:12　○小山　遼[1]，PEREZ Rodney Honrada[1,2]，竹内啓記[1]，園元謙二[1]，善藤威史[1]　（[1]九州大農，[2]フィリピン大学・ロスバニョス校）

3A07p04　たくあん漬から分離した *Lactococcus lactis* PJR24 が生産するバクテリオシンの特性と精製
14:23　○高橋孝太郎[1]，河原あい[1]，松崎弘美[1,2]　（[1]熊本県大院環境共生，[2]熊本県大環境共生）

3A07p05　味噌漬け豆腐由来 *Lactobacillus plantarum* PUK6 の多成分バクテリオシン遺伝子クラスターの解析
14:34　○河原あい[1]，善藤威史[2]，松崎弘美[3]　（[1]熊本県大院環境共生，[2]九州大農，[3]熊本県大環境共生）

3A07p06　海底流木から分離された細菌が産生するバクテリオシン
14:45　○大町一実[1]，小林武志[1]，寺原　猛[1]，今田千秋[1]，亀井加恵子[2]，和久友則[2]，長沼　毅[3]　（[1]東京海洋大学，[2]京都工芸繊維大学，[3]広島大学）

p07〜p12 発表者の接続時間 14:56〜15:06

3A07p07　発酵食品由来乳酸菌からのフェルラ酸エステラーゼ生産菌のスクリーニング
15:06　○矢野嵩典，中西陽香，三井亮司　（岡山理大理）

3A07p08　*Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* が生産するフェナジン誘導体による植物保護活性の解析
15:17　○櫻岡良平[1]，染谷信孝[2]，諸星知広[1]　（[1]宇大院工，[2]農研機構）

3A07p09　顕微ラマン多変量スペクトル分解法を用いた二次代謝産物 penicillin 及び avermectin の菌体内検出
15:28　○堀井俊平[1,2]，安藤正弘[3,4]，中島琢自[3,5]，Ashok Samuel[3]，松本厚子[5]，高橋洋子[5]，竹山春子[1,2,3,6]　（[1]早大院先進理工，[2]産総研 CBBD-OIL，[3]早大ナノライフ創新研，[4]JSTさきがけ，[5]北里大生命科学研，[6]早大先進生命動態研）

3A07p10　一次代謝関連遺伝子の導入によるリベロマイシン生産改善
15:39　○高木　海[1]，白井智量[2]，岡村英治[1]，近藤昭彦[2]，長田裕之[3]，高橋俊二[1]　（[1]理研 CSRS・天然物生合成，[2]理研 CSRS・細胞生産研究チーム，[3]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー）

3A07p11　放線菌由来新規 β-カルボリン類の探索
15:50　○砂田礼菜，山田誠久，上田祥平，高橋　瞭，仁平卓也，木谷　茂　（阪大・生物工学国際交流セ）

3A07p12　放線菌 *Streptomyces lavendulae* FRI-5 株が生産する新規ポリエンマクロライド化合物の同定
16:01　○池阪昂平[1]，吉岡拓哉[1]，五十嵐康弘[2]，難波卓司[3]，仁平卓也[1]，木谷　茂[1]　（[1]生物工学国際交流セ，[2]富山県立大工，[3]高知大農林海洋科学）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:12〜16:21

3A07p13　中心代謝改変による有用物質生産への応用
16:21 ○土居志織[1,2]，小松　護[2]，池田治生[2]（[1]慶應大，[2]北里大・生命研）

3A07p14　リンコマイシンにより放線菌の二次代謝能が高まる仕組みの解明に向けたリボソームプロファイル解析
16:32 ○向井慶一郎[1]，小林桃子[1]，石塚美咲[1]，今井　優[2]，保坂　毅[1,3]（[1]信州大院・総合理工，[2]Northeastern Univ.，[3]信州大・バイオメディカル研）

3A07p15　生育初期に抗菌物質を生産する放線菌の探索と特性解析
16:43 ○内田牧歩[1]，北川輝弥[2]，保坂　毅[3]（[1]信州大・農，[2]信州大院・総合理工，[3]信州大・バイオメディカル研）

3A07p16　放線菌由来の新規カチオン性ポリペプチド：ポリ(L-ジアミノプロピオン酸)の単離，構造決定と特性評価
16:54 加藤芳尚，稲葉　悠，室　尚吾，吉田　修，○竹原宗範（滋県大工）

3A07p17　放線菌 *Streptomyces vietnamensis* の単コロニーの表現型が多様化する仕組みの解析
17:05 ○保坂　毅[1,2,3]，森本　諒[1,2]，小林　匠[3]，丸山友子[1,2]，濱渦亮子[1]（[1]信州大バイオメディカル研，[2]信州大総合理工，[3]信州大農）

A08 会場　午前の部(9:30〜12:13)

微生物―1420 遺伝子 - 構造，機能―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

3A08a01　マコモタケの共存に関わる遺伝子の探索
9:30 ○青木大地[1]，伊藤綾乃[1]，堤　祐大[1]，小野晶子[1]，佐藤千裕[1]，崔　宰熏[2,3]，河岸洋和[2,3]，鈴木智大[1]（[1]宇都宮大・バイオ，[2]静岡大・農，[3]静岡大・グリーン研）

3A08a02　冬虫夏草サナギタケ(*Cordysceps militaris*)の各交配型における比較ゲノム解析
9:41 ○鈴木智大[1]，鈴木貴也[2]，小野晶子[1]，鈴木稔之[1]，崔　宰熏[3,4]，河岸洋和[3,4]，道羅英夫[2,4]（[1]宇都宮大・バイオ，[2]静岡大・理，[3]静岡大・農，[4]静岡大・グリーン研）

3A08a03　冬虫夏草サナギタケ(*Cordyceps militaris*)由来レクチンの糖特異性解析
9:52 ○小野晶子[1]，佐藤千裕[1]，鈴木稔之[1]，崔　宰熏[2,3]，平井浩文[2]，道羅英夫[2]，河岸洋和[2,3]，鈴木智大[1]（[1]宇都宮大・バイオ，[2]静岡大・グリーン研，[3]静岡大・農）

3A08a04　麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるヌクレオファジーレセプターの探索
10:03 ○髙橋慶晃，武田陽一，菊間隆志（立命館大生命科学）

3A08a05　糸状菌 *Aspergillus nidulans* の細胞壁形成及び維持における AP2 複合体の機能
10:14 ○金　京運[1]，岩間　亮[1,2]，堀内裕之[1,2]（[1]東大院・農生科，[2]東大・微生物連携）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

3A08a06　糸状菌の持つ分泌型ホスホリパーゼ A_2 の構造および機能解析
10:35 ○関口永莉[1]，宮川拓也[2]，田之倉優[2]，吉田　稔[1,3,4]，有岡　学[1,3]（[1]東大院・農生科・応生工，[2]東大院・農生科・応生化，[3]東大・微生物連携機構，[4]理研環境資源セ）

3A08a07　多重遺伝子破壊による黄麹菌 *Aspergillus oryzae* が有するハイドロフォービン遺伝子群の機能解析
10:46 ○近藤永治，山川　結，安藤祐人，瀬川亜美，金井優斗，中島春紫（明治大農・農化）

3A08a08　麹菌におけるイトラコナゾール耐性を指標とした形質転換用マーカーの開発
10:57 ○渡嘉敷直杏[1]，水谷　治[1,2]，外山博英[1,2]（[1]鹿児島連大・農，[2]琉球大学・農）

3A08a09　クエン酸生産糸状菌 *Aspergillus tubingensis*（*A. niger*）WU-2223L を宿主とした CRISPR/Cas9 システムによる高効率かつ迅速な遺伝子置換
11:08 ○吉岡育哲，桐村光太郎（早大・先進理工・応化）

3A08a10　マーカーリサイクル法を用いた Rhodosporidium toruloides 二倍体株における KU70 破壊株の作出
11:19 ○筥崎悠貴[1]，高見沢健留[1]，志田洋介[1]，森　一樹[2]，田代康介[4]，油谷幸代[5]，山崎晴丈[3]，髙久洋暁[3]，小笠原渉[1]（[1]長岡技大，[2]鹿児島高専，[3]新潟薬科大，[4]九州大学，[5]産総研・創薬基盤）

a11〜a13 発表者の接続時間 11:30〜11:40

3A08a11　分裂酵母の巨大な中心体タンパク質 Spo15 はどのようにして胞子細胞膜形成に関わるか
11:40 ○新美柊子，石橋尚実，中村太郎（大阪市大・院理）

3A08a12　*Saccharomyces cerevisiae* におけるイントロンによるタンパク質発現増強に関与する遺伝子のゲノムワイドスクリーニング
11:51 ○菊田浩希[1]，星田尚司[1,2,3]，赤田倫治[1,2,3]（[1]山口大院・創成科学・化学，[2]山口大中高温微生物セ，[3]山口大生命医工学セ）

3A08a13　炭素源により凝集・分散変化を示すキシロース代謝酵素のアミノ酸配列の解析
12:02 ○本薗尚悟[1]，片平くるみ[1]，前田比呂[1]，星田尚司[2,3,4]，赤田倫治[2,3,4]（[1]山口大工，[2]山口大院創成科学・化学，[3]山口大中高温微生物セ，[4]山口大生命医工学セ）

A08 会場　午後の部(13:50〜17:05)

微生物―1420 遺伝子 - 構造，機能（6 演題）1422 遺伝子 - ゲノム解析，メタゲノム，プロテオーム，バイオインフォーマティクス（10 演題）―

p01〜p06 発表者の接続時間 13:40〜13:50

3A08p01　プラスミド・宿主染色体由来の MvaT ホモログの DNA 結合能の評価
13:50 ○津島和生[1]，角埜裕基[1]，水口千穂[1,2]，岡田憲典[1,2]，野尻秀昭[1,2]（[1]東大・生物工学セ，[2]微生物連携機構）

3A08p02　*Pseudomonas* 属細菌の H-NS ファミリータンパク質における翻訳後修飾部位の同定
14:01 ヴァシレヴァデリアナ[1]，○水口千穂[1,2]，孫　　悦[1]，古園さおり[1,2,4]，吉田　稔[2,3,4]，岡田憲典[1]，野尻秀昭[1,2]（[1]東大・生物工学セ，[2]東大・微生物連携機構，[3]東大院農生科・応生工，[4]理研CSRS・ケミカルゲノミクス）

3A08p03　緑膿菌において亜硝酸で誘導発現する遺伝子群の機能解析
14:12 ○岡本洸彰[1]，石田菜津美[1]，亀谷将史[1,2]，石井正治[1,2]，新井博之[1,2]（[1]東大院・農生科，[2]東京大学微生物科学イノベーション連携研究機構）

3A08p04　リボソームタンパク質 S14 の進化と 30S サブユニットの多様化
14:23 ○赤沼元気[1,2]，河村富士夫[2]，渡辺　智[3]，渡辺正樹[3]，大川典哉[3]，朝井　計[3]，千葉櫻拓[3]，吉川博文[3]，山田康之[2]（[1]学習院大生命，[2]立教大生命，[3]東京農大バイオ）

3A08p05　超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* における IA 型 DNA トポイソメラーゼ機能の遺伝学的解析
14:34 ○山浦昂大[1]，松見理恵[2]，John Reeve[3]，石野良純[2]（[1]九州大農，[2]九州大院農，[3]オハイオ州立大）

3A08p06　次世代型プレバイオティクス・ガラクトシル-β-1,4-ラムノースのビフィズス菌特異的な増殖促進機構の解析
14:45 ○平野里佳[1,2]，阪中幹祥[1,3]，杉本直久[4]，江口省吾[4]，奈良未沙希[1]，片山高嶺[5]，北岡本光[4,6]，中井博之[4]，栗原　新[2]（[1]石川県大生資環，[2]近畿大生物理工，[3]デンマーク工大食品，[4]新潟大農，[5]京大院生命，[6]農研機構・食品研）

p07〜p12 発表者の接続時間 14:56〜15:06

3A08p07　エンドヌクレアーゼ *Taq*I の直接導入で得られた産業用酵母の再編成ゲノムの構造解析
15:06　○安川泰史[1]，小田有沙[2]，増尾直久[1]，太田邦史[2]　([1]三菱商事ライフサイエンス株式会社，[2]東大院総合文化)

3A08p08　アスタキサンチン生産緑藻 *Haematococcus lacustris* のゲノム解析
15:17　○森本大地，吉田天士，澤山茂樹　(京都大学)

3A08p09　ハチ消化管由来新規フルクトフィリック乳酸菌 3 菌種の生化学的特徴及びゲノム構造の解析
15:28　○前野慎太朗[1]，西村洋哉[2]，遠藤明仁[2]　([1]農大院生物産業，[2]農大食香粧)

3A08p10　サンゴ共在微生物を対象とした一細胞選択的な全ゲノム解析技術の開発
15:39　○西川洋平[1,2]，細川正人[2,3]，井手圭吾[1,4]，小川雅人[1,4]，竹山春子[1,2,3,4]　([1]産総研-早大 CBBD-OIL，[2]早大ナノライフ創新研，[3]早大先進生命動態研，[4]早大院先進理工)

3A08p11　発酵食品由来の乳酸菌ゲノムにおける地域性の探索
15:50　○木野裕太[1]，澤田和典[2]，小谷野仁[1]，山田拓司[1]　([1]東工大生命理工学院，[2]㈱ぐるなび)

3A08p12　メタ発酵主要菌の性状解析および比較ゲノム解析
16:01　○平野香花[1]，田代幸寛[1]，児玉浩明[2]，宮本浩邦[2,3,4]，須田　亙[3]，服部正平[3,5]，酒井謙二[1]　([1]九大院・生資環，[2]千葉大・園芸，[3]理研・生命医科学，[4]㈱サーマス，[5]早稲田大・先端理工)

p13〜p16 発表者の接続時間 16:12〜16:21

3A08p13　黒麹菌由来発現タンパク質のプロテオーム解析
16:21　○植松千暁[1]，愛川もも[2]，作田萌奈[2]，片岡涼輔[1]，渡邉泰祐[1]，荻原　淳[1]　([1]日大院生資研究科，[2]日大生資科・生命化)

3A08p14　トキイロヒラタケ単胞子分離単核体株における遺伝子発現差解析
16:32　○福田泰久[1]，平山朋美[2]，白坂憲章[1]　([1]近畿大農，[2]近畿大院農)

3A08p15　微生物 *de novo* ゲノム解析におけるアノテーションツール比較
16:43　○藤浪　俊，福長一鈴　(アメリエフ株式会社)

3A08p16　ヒトマイクロバイオーム解析のための Mock Community の開発
16:54　○三浦隆匡[1]，島村麻美子[1]，内野佳仁[1]，山副敦司[1]，坂本光央[2,3]，関口勇地[4]，成田興司[5]，亀山恵司[5]，久田貴義[5]，笠原　堅[5]，寺内　淳[5]，川﨑浩子[1]　([1]NITE・NBRC，[2]理研BRC-JCM，[3]日本医療研究開発機構, PRIME，[4]産総研，[5]日本マイクロバイオームコンソーシアム)

A09 会場　午前の部(9:30〜12:13)

微生物―1430 代謝 - 代謝調節，発酵生理，メタボローム―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

3A09a01　分子内安定同位体プロービングを用いた好熱性独立栄養性細菌の炭酸固定経路の検証
9:30　○千葉洋子[1,2]，澄田智美[2]，力石嘉人[3]，布浦拓郎[2]　([1]理研，[2]海洋研究開発機構，[3]北海道大低温研)

3A09a02　発芽玄米を培養基とした *Lachancea thermotolerans* と *Saccharomyces cerevisiae* の発酵特性の比較
9:41　○小鷹　晶[1]，粂井貴行[1]，三井亮司[2]　([1]ファンケル，[2]岡山理大理)

3A09a03　酵母 *Saccharomyces cerevisiae* におけるアルギニンによるプロリン資化抑制機構の解析
9:52　○谷川　翼，西村　明，高木博史　(奈良先端大・バイオ)

3A09a04　メタボローム解析が明らかにする低酸素濃度におけるコリネ型細菌の芳香族化合物代謝促進機構と代謝改変によるソルガム搾汁液からの物質生産
10:03　○川口秀夫[1]，宮崎翔子[1]，蓮沼誠久[1,2]，荻野千秋[2,3]，佐塚隆志[4]，近藤昭彦[1,2]　([1]神戸大院科技イノベ，[2]神戸大先端バイオセ，[3]神戸大院工，[4]名古屋大生物機能セ)

3A09a05　漬物由来乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* 22A-3 によるフェルラ酸還元と 4-VG 生成抑制機構の解析
10:14　○若槻壮哉[1]，西谷洋輔[2]，向田　潤[2]，阿波里佳[2]，川上秀昭[2]，桑原浩誠[2]，矢野嵩典[1]，三井亮司[1]　([1]岡山理科大理，[2]丸善製薬株式会社)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

3A09a06　土壌微生物によるリボフラビンの生分解機構の解析
10:35　○尾崎紗代子，金澤拓史，土肥裕希，桝尾俊介，高谷直樹　(筑波大・生命環境・微生物サステイナビリティ研究センター)

3A09a07　ラビリンチュラ類のミトコンドリアにおける脂肪酸 β 酸化系の破壊は代謝性アシドーシスを引き起こす
10:46　○丹生谷颯人，石橋洋平，伊東　信，沖野　望　(九州大農)

3A09a08　*in silico* 代謝デザインに基づく非酸化的解糖系依存の大腸菌株の創出
10:57　○三吉健太[1]，川井隆太郎[1]，堀之内貴明[2]，戸谷吉博[1]，清水　浩[1]　([1]阪大院・情報・バイオ情報，[2]理研)

3A09a09　ルシフェラーゼ発光による枯草菌細胞内 NADPH レベルの非破壊的観測
11:08　○吉田健一[1]，石川　周[1]，田中　寛[2]　([1]神戸大科技イノベ，[2]東工大)

3A09a10　分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の CoQ 生合成に関与する Pos5 の解析
11:19　○西原昇瑚[1]，西田郁久[2]，柳井良太[2]，戒能智宏[3]，川向　誠[3]　([1]島根大院・自然科学，[2]島根大・生物資源，[3]島根大・農生命科学系)

a11〜a13 発表者の接続時間 11:30〜11:40

3A09a11　代謝経路の動的モデルを使った in vitro の酵素反応系による複数酵素 Vmax の予測
11:40　北村さや香，○戸谷吉博，清水　浩　(阪大院・情報・バイオ情報)

3A09a12　ジアシルグリセロール高蓄積納豆菌の創生の試み
11:51　○松岡　聡[1]，鈴木祥太[2]，河村富士夫[3]　([1]埼玉大院理工研，[2]法政大生命，[3]立教大理)

3A09a13　*Bacillus coagulans* のポリアミン代謝経路
12:02　藤原有希[1]，松浦健人[2]，原口健司[2]，○鈴木秀之[1]　([1]京都工繊大，[2]京都茶研)

A09 会場　午後の部(13:50〜17:27)

微生物―1421 遺伝子 - 発現制御，トランスクリプトーム―

p01〜p06 発表者の接続時間 13:40〜13:50

3A09p01　コリネ型細菌を用いた物質生産を指向した誘導プロモーターの探索
13:50　○小林雅規[1,2]，久保田健[1]，乾　将行[1,2]　([1]RITE，[2]奈良先端大・バイオ)

3A09p02　コリネ型細菌におけるアスパラギン代謝オペロン発現制御因子 AnsR の結合配列の同定
14:01　菅谷理貴[2]，○豊田晃一[1]，乾　将行[1,2]　([1]RITE，[2]奈良先端大・バイオ)

3A09p03　低温培養下におけるコリネ型細菌 RNase J の発現制御解析
14:12　○田中裕也[1]，濱本　渚[2]，澤　誠人[2]，乾　将行[1,2]　([1]RITE，[2]奈良先端大・バイオ)

3A09p04　DNA 構造情報による麹菌由来転写因子の結合メカニズムの解析
14:23 ○岡　大椰[1]，兒島孝明[1]，井原邦夫[2]，小林哲夫[1]，中野秀雄[1]（[1]名古屋大学生命農学研究科，[2]名古屋大学遺伝子解析施設）

3A09p05　糸状菌 *Aspergillus nidulans* におけるプロテアーゼの生産制御
14:34 ○柴山智洋[1]，浅野圭祐[1]，金丸京子[2]，木村　真[1]，國武絵美[3]，小林哲夫[1]（[1]名大院生命農学，[2]中部大応用生物，[3]三重大院生物資源）

3A09p06　*Aspergillus nidulans* における cAMP シグナリング関連因子のヘミセルラーゼ発現抑制への関与
14:45 ○國武絵美[1]，木村哲哉[1]，小林哲夫[2]（[1]三重大院生資，[2]名大院生命農）

p07〜p12 発表者の接続時間 14:56〜15:06

3A09p07　黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* における転写因子 AmyR の活性化機構の解析
15:06 ○橋本　渉[1]，渡部　昭[1]，水谷　治[2]，山田　修[3]，五味勝也[1]（[1]東北大院農，[2]琉球大学，[3]酒総研）

3A09p08　5′ CAGE データに基づく *Aspergillus* 属真菌種間の一次代謝酵素遺伝子群における転写開始点の比較解析
15:17 ○井上大志，新谷尚弘，五味勝也（東北大院農）

3A09p09　固体培養特異的発現に関与する転写因子 FlbC の麹菌バイオマス分解酵素遺伝子発現への影響
15:28 ○大沼　司，荒井　啓，藤田翔貴，新谷尚弘，五味勝也（東北大農）

3A09p10　黄麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるペプチダーゼ遺伝子の転写に窒素源が与える影響
15:39 ○白石敦士，田中優花子，山形洋平（東京農工大院）

3A09p11　麹菌 *Aspergillus oryzae* における有性生殖関連遺伝子の高発現による有性生殖誘導の試み
15:50 ○菅原由香[1]，片山琢也[1,2]，丸山潤一[1,2]（[1]東大院・農生科・応生工，[2]東大・微生物連携機構）

3A09p12　糸状菌 *Aspergillus aculeatus* における *uge5* 破壊はカーボンカタボライト抑制を解除する
16:01 ○谷　修治，角谷朝香，炭谷順一，川口剛司（阪府大院・生環科）

p13〜p18 発表者の接続時間 16:12〜16:21

3A09p13　*Kocuria rhizophila* DC2201 の有機溶媒耐性メカニズムの解明
16:21 ○戸田　弘，伊藤伸哉（富山県大生医工研セ）

3A09p14　H-NS ファミリータンパク質のレギュロンはプラスミド保持に伴い劇的に変化する
16:32 ○中村泰輔[1]，河野　響[1]，兼崎　友[2]，川崎信治[3,4]，水口千穂[1,5]，岡田憲典[1]，野尻秀昭[1,5]（[1]東大・生物工学セ，[2]東農大・ゲノム解析セ，[3]東農大・バイオ，[4]東農大・微生物，[5]東大・微生物連携機構）

3A09p15　染色体由来の転写制御因子がプラスミド pCAR1 上の分解遺伝子群の発現を一細胞レベルで変化させる
16:43 ○武田祐太郎[1]，山本夏実[1]，高比良早紀[1]，水口千穂[1,2]，岡田憲典[1]，野尻秀昭[1,2]（[1]東大・生物工学セ，[2]東大・微生物連携機構）

3A09p16　放線菌 *Streptomyces avermitilis* のカルコフォア生産制御機構の解析
16:54 ○萩谷　祥[1]，Salvatore Cosentino[2]，按田瑞恵[2]，後藤恭宏[3]，中村佳司[3]，林　哲也[3]，岩崎　渉[2]，上田賢志[1]，高野英晃[1]（[1]日大・生資科・生命研，[2]東大・院理・生物科学，[3]九大院・医学研究院）

3A09p17　*Streptomyces griseus* における GPCR 様制御系 Cvn1 と c-di-GMP シグナル伝達系の関係性
17:05 ○向山絵理香，天野泰介，上田賢志，高野英晃（日大・生資科・生命研）

3A09p18　新生ポリペプチド鎖依存的な膜局在化による mRNA 分解促進
17:16 ○石井英治[1,2]，秋山芳展[1]，森　博幸[1]（[1]京大ウイ・再生研，[2]日本学術振興会特別研究員ＰＤ）

A10 会場　午前の部（9:30〜12:24）

微生物―1410 細胞 - 分離，分類，生態（9 題）1411 細胞 - 複合微生物，共生微生物，難培養性微生物（5 題）―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

3A10a01　pH に依存した *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J の捕食
9:30 ○守屋多恵[1]，吉村純一[1]，星子裕貴[1]，Garcia-Contreras Rodolfo[2]，前田憲成[1]（[1]九工大院・生体工，[2]メキシコ国立自治大・医）

3A10a02　好塩性古細菌 *Halorubrum* 属 sp. 176-9 株，590-2 株と既知株との紫外線曝露比較による抵抗性解析
9:41 ○小宮山寿紗[1]，嶋根康弘[2]，峯岸宏明[1,2]（[1]東洋大学，[2]海洋研究開発機構）

3A10a03　*Lactobacillus fructivorans* および近縁菌種由来グリセロ糖脂質の化学的性状
9:52 ○川原一芳，駒井美紗，飯田博一（関東学院大）

3A10a04　Lipomycetaceae 科酵母の国内種分布及び新種並びに *Babjevia* 属の再分類・修正（emendation）について
10:03 ○山崎敦史（製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター）

3A10a05　Characterization of Anaerobic Thermophilic Chitin-Degrading Bacterium UU3 Isolated from Compost
10:14 Umbhorn Ungkulpasvich[1]，○Akihiko Kosugi[1,2]（[1]Tsukuba Univ.，[2]JIRCAS）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

3A10a06　チアミンを代謝する土壌微生物の単離
10:35 ○熊野匠人[1,2]，室本亮介[1]，橋本義輝[1,2]，小林達彦[1,2]（[1]筑波大院・生命環境，[2]筑波大・MiCS）

3A10a07　エマルション培養法を用いたペプチダーゼ生産微生物のスクリーニング
10:46 ○橋口太一[1]，本間宣行[1]，鈴木義之[3]，志田洋介[1]，小笠原渉[2]（[1]長岡技科大院・生物，[2]長岡技科大院・技学イノベーション，[3]長岡高専・専攻科）

3A10a08　複合微生物系によるウロリチンの生産に関する研究（5）〜新規ヒト腸内由来ウロリチン B 生産菌の発見と利用〜
10:57 ○沢田翔一，中島賢則，山本浩明（ダイセル・コーポレート研）

3A10a09　Evidence for the correlation between heterokaryon incompatibility and strain phylogeny in the industrial filamentous fungus *Aspergillus oryzae*
11:08 ○Chan LU[1]，Noriko MORI[1]，Takuya KATAYAMA[1,2]，Ryota SAITO[3]，Kazuhiro IWASHITA[3]，Jun-ichi MARUYAMA[1,2]（[1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo，[2]CRIIM, UTokyo，[3]NRIB）

3A10a10　プラスミドの受容菌認識における外膜タンパク質 OprH の機能解析
11:19 ○作田郁子[1]，水口千穂[1,2]，岡田憲典[1]，野尻秀昭[1,2]（[1]東大・生物工学セ，[2]東大・微生物連携機構）

a11〜a14 発表者の接続時間 11:30〜11:40

3A10a11　ATAD プロセスにおける難培養主要好熱細菌の直接 FISH 観察と分離
11:40 ○恒吉研志，新井智博，田代幸寛，酒井謙二（九大院・生資環）

3A10a12　火山灰に由来する難培養高度好熱菌の集積と分離の検討
11:51　○沖村麻衣子[1]，ヒダヤファンディー[1,2]，ビエネスカトリーナ[1]，奥川友紀[1]，田代幸寛[1]，酒井謙二[1]　([1]九大院・生資環，[2]IOPRI)

3A10a13　深部地下圏環境におけるメトキシ芳香族化合物(MACs)分解メタン生成共生系の発見
12:02　○坂本幸子[1]，延優小西[2]，眞弓大介[3]，玉澤　聡[4]，五十嵐雅之[5]，若山　樹[5]，前田治男[5]，坂田　将[3]，鎌形洋一[2]，玉木秀幸[2]　([1]筑波大院・生命，[2]産総研・生物プロセス，[3]産総研・地圏資源，[4]幌延地圏環境研究所，[5]国際石油開発帝石株式会社)

3A10a14　耐／好塩性プロテアーゼ生産菌の探索とその系統解析
12:13　○土方友理[1]，近藤悠介[1]，嶋根康弘[2]，峯岸宏明[1,2]　([1]東洋大学，[2]海洋研究開発機構)

A10 会場　午後の部(13:50〜16:32)

微生物―1411 細胞 - 複合微生物，共生微生物，難培養性微生物―

p01〜p06 発表者の接続時間 13:40〜13:50

3A10p01　Difference of Gut Microbial Community in Indonesian Obese, Type 2 Diabetic, and Healthy Groups
13:50　○Phatthanaphong THERDTATHA[1], Masaru TANAKA[1], Mariyatun MARIYATUN[2], Miisaroh ALMUNIFAH[2], Nancy Eka Putri MANURUNG[2], Siska INDRIARSIH[2], Yuan-kun Lee[3], Endang Sutriswati RAHAYU[2], Jiro NAKAYAMA[1] ([1]Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Kyushu University, [2]Faculty of Agricultural Technology, Universitas Gadjah Mada, [3]Department of Microbiology and Immunology, National University of Singapore)

3A10p02　Difference of Gut Microbial Metabolism among Indonesian Obese, Type 2 Diabetic, and Healthy Groups
14:01　○Yayi Song[1], Phatthanaphong THERDTATHA[1], Mariyatun MARIYATUN[2], Miisaroh ALMUNIFAH[2], Nancy Eka Putri MANURUNG[2], Siska INDRIARSIH[2], Yuan-Kun LEE[3], Endang Sutriswati RAHAYU[2], Jiro NAKAYAMA[1] ([1]Department of Bioscience & Biotechnology ,Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University, [2]Faculty of Agricultural Technology, University Gadjah Mada, [3]Department of Microbiology and Immunology, National University of Singapore)

3A10p03　モンゴル人の腸内フローラと生活習慣病との関係
14:12　○篠田あかり[1]，デンベレルシルチン[2]，三島梨子[1]，田中　優[1]，堀野美里[1]，ジャムヤンドゴースレン[2]，ラハクバジャウツォクトバートル[2]，中山二郎[1]　([1]九州大農，[2]モンゴル生命科学大学)

3A10p04　歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* の自己凝集と溶血がタイプ 2 クオラムセンシングによって調節される
14:23　○谷口彰吾，飯田亮平，阿座上弘行　(山口大農)

3A10p05　難培養性微生物とは何か？ 休眠・覚醒・自己増殖阻害
14:34　○青井議輝[1]，田村　淳[1]，寺地裕康[2]，村上千穂[3]，加藤　節[1]，中島田豊[1]，金田一智規[2]，大橋晶良[2]　([1]広島大院統合生命，[2]広島大院工，[3]安田女子大薬)

3A10p06　難培養性微生物とは何か？ コロニーを形成しない微生物の選択的獲得
14:45　○馬場啓彰，JUNG Dawoon，加藤　節，中島田豊，青井議輝　(広島大統合生命科学)

p07〜p12 発表者の接続時間 14:56〜15:06

3A10p07　難培養微生物とは何か？環境中における未知増殖制御ネットワークを解き明かす
15:06　○鈴木陸太[1]，杉山　周[3]，SEO Eunyoung[3]，加藤　節[2]，中島田豊[2]，青井議輝[2]　([1]広島大学工，[2]広島大学統合生命科学，[3]広島大学先端研)

3A10p08　The microbial community in a multiple parallel mineralization system suppresses *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* on *Lactuca sativa*
15:17　○JAMJAN MEEBOON[1], Makoto Shinohara[1], Kazuki Fujiwara[1], Kenji Miyamoto[2], Yasuo Kato[3], Akinori Ando[4,5], Jun Ogawa[4,5] ([1]NARO, [2]Dept. Biosci. Inform., Keio Univ., [3]Biotech. Res. Cent., Toyama Pref. Univ., [4]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [5]Res. Unit Physiol. Chem. Kyoto Univ.)

3A10p09　有機質肥料活用型養液栽培による生産物の品質及び棚もち評価
15:28　○篠原　信[1]，安藤　聡[1]，宮本憲二[2]，加藤康夫[3]，安藤晃規[4]，小川　順[5]　([1]農研機構，[2]慶大理工，[3]富山県大・生医工研セ，[4]京大院農，[5]京大・生理化学研究ユニット)

3A10p10　消化汚泥からバイオガスを生産できる微生物菌叢の生態解明
15:39　○近　綾香，油井信弘，藤井克彦　(工学院大先進工)

3A10p11　高リグニン分解活性を示す白色腐朽菌-細菌複合微生物系の作出
15:50　○寺島大貴[1]，松村真輝[1]，森　智夫[1]，河岸洋和[1,2,3]，平井浩文[1,2]　([1]静大農，[2]静大グリーン研，[3]静大創造院)

3A10p12　ニホンミツバチ由来乳酸菌の単離と諸性状解析
16:01　○櫻間晴子[1]，坂本文夫[1,2]，萩下大郎[1]　([1]京都先端大バイオ環境，[2]京都ニホンミツバチ研究所)

p13 発表者の接続時間 16:12〜16:21

3A10p13　ヒト腸内芽胞形成細菌の各種胆汁酸による発芽誘導と分離培養
16:21　○鬼塚咲良，田中　優，中山二郎　(九大院・農)

A11 会場　午前の部(9:30〜12:13)

微生物―1440 物質生産 - 醸造，発酵（一次代謝産物）―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

3A11a01　原形・扁平白米と球形白米により醸成した清酒のメタボライト比較解析
9:30　○平吉明日香[1]，平田章悟[1,2]，福本浩史[1,3]，小松夕子[1]，小林拓嗣[1]，矢澤　彌[1]，室井佑介[4]，川上晃司[4]，岩下和裕[1,2,3]　([1]酒総研，[2]広島大院・統合生命，[3]広島大・工，[4]株式会社サタケ)

3A11a02　ワイン発酵助成剤が清酒醸造に及ぼす影響
9:41　○飯塚(古川)幸子，神田涼子，藤田晃子，山田　修　(酒総研)

3A11a03　新たな泡盛製造法「3 回蒸溜法」と育種酵母 T25 株を併用した泡盛の開発
9:52　○塚原正俊[1]，阿部峻之[1]，渡久地洋平[2]，豊川洋一[3]，渡辺大輔[4]，高木博史[3]　([1]㈱バイオジェット，[2](有)神村酒造，[3]奈良先端大，[4]京大農)

3A11a04　本格焼酎・泡盛の品質を特徴付ける香気成分の閾値調査及び分類
10:03　○長船行雄，利田賢次，韓　錦順，磯谷敦子，向井伸彦　(酒類総合研究所)

3A11a05　製麹における酵素発現様式が麹構造に及ぼす影響
10:14　○田川結希[1]，吉崎由美子[2]，花城　勲[2]，奥津果優[2]，二神泰基[2]，玉置尚徳[2]，髙峯和則[2]　([1]鹿大院・農，[2]鹿大・農)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

3A11a06　黒麹菌低酸生成変異株の造成とその特徴付け
10:35 ○久貝樹幹，穂坂　賢，進藤　斉，徳岡昌文 （東農大院農）

3A11a07　泡盛醸造における *Aspergillus luchuensis* 由来フェノール酸脱炭酸酵素の 4-VG 生成への寄与
10:46 ○眞榮田麻友美[1,2]，本底麻綸[2]，渡嘉敷建孝[3]，後藤正利[1,4]，水谷　治[1,2]，上地敬子[2]，平良東紀[1,2] （[1]鹿大院連農，[2]琉球大農，[3]石川種麹店，[4]佐賀大農）

3A11a08　ミントビールの発酵による香気成分の変化について
10:57 ○大沢千晶，谷川篤史，蛸井　潔，神前陽一，石田文人（サッポロビール株式会社）

3A11a09　味噌・醤油酵母 Zygosaccharomyces 酵母の接合及び，接合関連遺伝子発現制御
11:08 ○黒木克明，尾形智夫 （前橋工科大学大学院）

3A11a10　黒酢発酵液由来乳酸菌の D-アミノ酸生成能評価と酵素学的解析
11:19 ○星南穂子[1]，藤井　暁[2]，橋口和典[2]，長野正信[2]，亀谷将史[1,3]，新井博之[1,3]，石井正治[1,3] （[1]東大院　農生科　応生工，[2]坂元醸造，[3]東大微生物連携機構）

a11〜a13 発表者の接続時間 11:30〜11:40

3A11a11　豆乳凝固能を持つ酵母の分離とその性質
11:40 ○山本　希，庄子真樹，佐々木瞳，金内　誠 （宮城大食産）

3A11a12　ドライエイジングにおける使用菌種の相異が熟成肉の品質に与える影響
11:51 ○秋葉奏汰[1]，跡部美樹雄[2]，村上周一郎[1,2] （[1]明治大農，[2]㈱ミートエポック）

3A11a13　ラッカーゼ処理によるショウガ粉末乳酸菌発酵物調製時の生育阻害の予防
12:02 ○桐生高明[1]，木曽太郎[1]，西村政晃[2]，増田隆史[3]，村上　洋[1] （[1]大阪産業技術研究所，[2]Japan Ginger㈱，[3]LIKE TODO JAPAN製薬㈱）

A11 会場　午後の部（13:50〜17:27）

微生物―1440 物質生産 - 醸造，発酵（一次代謝産物）―

p01〜p06 発表者の接続時間 13:40〜13:50

3A11p01　阿波晩茶の発酵に関与する乳酸菌の地域特性
13:50 ○西岡浩貴[1,2,3]，大野智生[4]，丹羽　諒[5]，岩橋　均[2,4,5]，堀江祐範[2,3] （[1]徳島県工技セ，[2]岐阜大院・連合農学，[3]産総研・健康工学，[4]岐阜大院・自然科技，[5]岐阜大・応用生物）

3A11p02　石鎚黒茶の乳酸菌ゲノムを探求する
14:01 ○丹羽　諒[1]，西岡浩貴[2,3,4]，岩橋　均[1,3]，堀江祐範[3,4] （[1]岐阜大応用生物科学部，[2]徳島県工技セ，[3]岐阜大院・連合農学，[4]産総研・健康工学）

3A11p03　紀州なれずし発酵時の細菌叢に関する研究
14:12 ○大野智生[1]，久保実希[2]，シャプトリヨラニ[3]，岩橋　均[1,2,3]（[1]岐阜大院自科技，[2]岐阜大応生，[3]岐阜大院連農）

3A11p04　伝統的無塩発酵漬物「すんき」の乳酸菌叢と成分組成の解析
14:23 ○冨田　理[1]，渡辺　純[1]，中村敏英[1]，遠藤明仁[2]，岡田早苗[3,4] （[1]農研機構 食品研究部門，[2]東京農業大学，[3]木曽町，[4]高崎健康福祉大学）

3A11p05　発酵千枚漬と甘酢千枚漬の乳酸菌叢の比較
14:34 ○井口博之 （京都先端大・バイオ環境）

3A11p06　商業的に生産されるぬか漬け漬物製造中の菌叢が与える成分への影響
14:45 ○澤田和典[1]，小谷野仁[2]，山本　希[2]，山田拓司[2] （[1]㈱ぐるなび，[2]東工大生命理工学院）

p07〜p11 発表者の接続時間 14:56〜15:06

3A11p07　複合微生物系を用いたメタ発酵の制御因子の解明による選択的 L-乳酸生産
15:06 ○関谷和真[1]，石田勇貴[1]，木村知弘[1]，宮本浩邦[2]，田代幸寛[1]，酒井謙二[1] （[1]九大院・生資環，[2]理研・生命医科学）

3A11p08　酪酸産生菌のオリゴ糖代謝と糖加水分解酵素の解析
15:17 ○丹野広貴[1]，藤井　匡[2]，前野慎太朗[1]，平野勝紹[2]，栃尾　巧[2]，遠藤明仁[1] （[1]東農大生物産業，[2]物産フードサイエンス株式会社）

3A11p09　蒟蒻芋麹による蒟蒻マンナンの加水分解と多様な用途開発
15:28 ○足立収生[1]，有馬秀幸[2]，種場理絵[2]，田中淳也[2]，片岡尚也[1]，赤壁善彦[1]，松下一信[1]，薬師寿治[1] （[1]山口大農，[2]山口県産技セ）

3A11p10　清酒製造の上槽工程で使用された濾布に残留している香気成分のクラスター解析
15:39 ○伊藤一成，谷野有佳，花房裕子，三宅剛史 （岡山県工技セ）

3A11p11　清酒製造の上槽工程における脂肪酸とそのエチルエステルの変化
15:50 ○谷野有佳，伊藤一成，花房裕子，三宅剛史 （岡山県工技セ）

p13〜p18 発表者の接続時間 16:12〜16:21

3A11p13　清酒醸造過程における peptidylprolyl *cis-trans* isomerase（PPIase）の挙動に関する研究
16:21 ○山田宏樹[1]，藤原久志[2]，若井芳則[2]，渡部邦彦[1] （[1]京都大院　生命環境，[2]黄桜㈱）

3A11p14　*Ideonella sakaiensis* における PcaG 遺伝子破壊株の性状解析
16:32 ○西井太郎[1]，蜂須賀真一[2]，吉田昭介[1,2] （[1]奈良先端大バイオ，[2]奈良先端大研究推進機構）

3A11p15　コリネ型細菌によるパルミトレイン酸の生産（第一報）
16:43 ○北村嘉子[1]，大竹辰徳[1]，林　幹朗[2]，竹野誠記[1]，池田正人[1] （[1]信州大農，[2]協和発酵バイオ）

3A11p16　コリネ型細菌によるパルミトレイン酸の生産（第二報）
16:54 北村嘉子[1]，大竹辰徳[1]，林　幹朗[2]，○竹野誠記[1]，池田正人[1] （[1]信州大農，[2]協和発酵バイオ）

3A11p17　有機合成反応を利用したビニル化合物生産菌の選択的分離法
17:05 ○麻生祐司[1]，佐野芽生[1]，小原仁実[1]，松本圭司[2]，和田一仁[2] （[1]京都工繊大院・工芸科学，[2]株式会社カネカ・R&B本部）

3A11p18　*Aspergillus niger* S17-5 の生産するヒドロキシヘキシルイタコン酸の生理活性評価
17:16 ○佐野芽生[1]，小原仁実[1]，松本圭司[2]，和田一仁[2]，麻生祐司[1] （[1]京都工繊大院，[2]株式会社カネカ・Ｒ＆Ｂ本部）

A12 会場　午前の部（9:30〜12:13）

微生物―1413 細胞 - 構造，オルガネラ，小胞，分泌，細胞構成分子―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

3A12a01　有機塩素系殺虫剤分解能を持つスフィンゴモナッド細菌株の membrane vesicle 形成
9:30 ○鈴木達也[1]，相馬隆光[2]，加藤広海[1]，豊福雅典[3,4]，野村暢彦[3,4]，永田裕二[1] （[1]東北大学大学院・生命科学研究科，[2]筑波大学大学院・生命環境科学研究科，[3]筑波大学・生命環境系，[4]筑波大学・微生物サステイナビリティ研究センター）

3A12a02　菌体外膜小胞へのタンパク質輸送における細胞表層構造制御タンパク質の機能
9:41　○釜阪紘平，陳　　晨，川本　純，小川拓哉，栗原達夫（京都大学化学研究所）

3A12a03　細菌のセンサータンパク質によるベシクル生産とバイオフィルム分散の誘導
9:52　○横山文秋[1,2]，今井友也[3]，川本　純[1]，小川拓哉[1]，栗原達夫[1]（[1]京都大学・化学研究所，[2]日本学術振興会・特別研究員，[3]京都大学・生存圏研究所）

3A12a04　腸内細菌叢が産生するメンブレンベシクルの解析
10:03　○菊地　薫[1]，尾花　望[2,3]，野村暢彦[3,4]（[1]筑波大・生命環境，[2]筑波大・医学医療系・TMRC，[3]筑波大・MiCS，[4]筑波大・生命環境系）

3A12a05　枯草菌における Spo0A を介したメンブレンベシクル生産
10:14　○安部公博[1]，尾花　望[2,3]，豊福雅典[1,3]，野村暢彦[1,3]（[1]筑波大生命環境，[2]筑波大TMRC，[3]筑波大MiCS）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

3A12a06　*degP* 遺伝子破壊による *Meiothermus ruber* H328 株の膜小胞産生能強化に関する研究
10:35　○淺野優希[1]，大西愛航[1]，川崎一則[2]，渡部邦彦[1]（[1]京府大院・生命環境，[2]産総研・関西センター）

3A12a07　産業利用糸状菌における細胞外膜小胞の発見
10:46　○岩橋由佳[1]，浦山俊一[1,2]，桝尾俊介[1,2]，兼松周作[1]，高谷直樹[1,2]，野村暢彦[1,2]，竹下典男[1,2]，豊福雅典[1,2]，萩原大祐[1,2]（[1]筑波大・生命環境，[2]筑波大・MiCS）

3A12a08　細菌由来メンブレンベシクルの 1 粒子表面化学解析
10:57　○髙橋花奈子[1]，安田まり奈[2]，豊福雅典[2]，重藤真介[1]（[1]関西学院大院理工，[2]筑波大院生命環境）

3A12a09　膜小胞過剰分泌性 *Buttiauxella* 属細菌における小胞分泌機構の解析
11:08　○中道菜緒[1]，二又裕之[2,3]，田代陽介[2,4]（[1]静大工，[2]静大院総合科技，[3]静大グリーン研，[4]JSTさきがけ）

3A12a10　緑膿菌膜小胞形成部位に局在するカルジオリピンの合成機構及び生理機能
11:19　○上野　想[1]，塩田拓也[1]，三浦わかな[2]，二又裕之[1,3]，田代陽介[1,4]（[1]静大院総合科技，[2]静大工，[3]静大グリーン研，[4]JSTさきがけ）

a11〜a13 発表者の接続時間 11:30〜11:40

3A12a11　細菌由来メンブレンベシクルへの物質封入技術の構築
11:40　○臼倉雄紀[1]，野村暢彦[1,2]，豊福雅典[1,2]（[1]筑波大生命環境，[2]筑波大学微生物サステイナビリティ研究センター）

3A12a12　放線菌に由来する膜小胞の解析
11:51　○永久保利紀[1]，野村暢彦[1,2]，豊福雅典[1,2]（[1]筑波大院・生命環境系，[2]筑波大・微生物サステイナビリティ研究センター）

3A12a13　鉄還元細菌由来メンブレンベシクルを介した緑膿菌の細胞外電子移動
12:02　○徳納吉秀[1,2,3]，野村暢彦[1,4]，豊福雅典[1,4]（[1]筑波大学生命環境系，[2]物質材料研究機構国際ナノアーキテクトニクス研究拠点，[3]日本学術振興会特別研究員PD，[4]筑波大学微生物サステイナビリティ研究センター）

A12 会場　午後の部（13:50〜17:27）

微生物―1413 細胞 - 構造，オルガネラ，小胞，分泌，細胞構成分子―

p01〜p06 発表者の接続時間 13:40〜13:50

3A12p01　L 型大腸菌が栄養型に復帰するときの形態形成因子の局在
13:50　○藤田智也（茨城県立医療大・医セ）

3A12p02　Corynebacterium glutamicum における DegQ 様プロテアーゼの役割
14:01　○渡辺真央，テレジアナタリアマリア，岩井伯隆，和地正明（東京工業大学）

3A12p03　*Enterococcus faecium* 由来酸性グリセロ糖脂質の化学的性状
14:12　○亀井桃香，有路沙織，飯田博一，川原一芳（関東学院大理工生命）

3A12p04　*Actinoplanes missouriensis* の胞子嚢膜を構成する脂質のリピドーム解析
14:23　○前田聡史[1]，手塚武揚[1,2]，和泉自泰[3]，高橋政友[3]，馬場健史[3]，大西康夫[1,2]（[1]東大院・農生科，[2]東大・微生物イノベ連携機構，[3]九大・生医研）

3A12p05　*Saccharomyces cerevisiae* の細胞膜における生体膜構成リン脂質の分布と機能の解析
14:34　林　透真[1]，○古尾谷南沙[1]，水池　彩[1]，堀内裕之[1,2]，福田良一[1,2]（[1]東大院・農生科，[2]東大・微生物連携）

3A12p06　酵母生育定常期におけるステロール合成鍵酵素 Erg1 の細胞内分子動態
14:45　○柴田裕平[1]，奥　公秀[1]，阪井康能[1,2]（[1]京都大農，[2]京都大学際融合）

p07〜p12 発表者の接続時間 14:56〜15:06

3A12p07　メタノール資化性酵母 *Candida boidinii* における小胞体内酸化還元状態の解析
15:06　○若林万紗也[1]，由里本博也[1]，寶関　淳[1,2]，阪井康能[1]（[1]京大院農，[2]京都先端大・バイオ環境）

3A12p08　分裂酵母の胞子細胞膜形成開始におけるスピンドル極体タンパク質 Spo7 のはたらき
15:17　○鈴木未菜，中村太郎（大阪市大・院理）

3A12p09　分裂酵母細胞膜にみられる陥入構造の形成に関わる 2 つの BAR ドメインタンパク質の解析
15:28　○箕面凪砂[1]，田原悠平[1,2]，宮田真人[1,2]，中村太郎[1]（[1]大阪市大・院理，[2]大阪市大・複合先端）

3A12p10　出芽酵母の胞子形成における Vps13 の解析
15:39　○藤枝祐二[1]，棟重賢治[1]，中村　毅[1]，須田恭之[2]，舘川宏之[1,3]（[1]東京大農生科，[2]筑波大医，[3]微生物科学イノベーション連携研究機構）

3A12p11　出芽酵母 YBR056w にコードされる *β*-1,6-グルカナーゼ活性を持つ蛋白質の解析
15:50　北澤陽一郎[1]，永田晋治[3]，平山弘人[4]，鈴木　匡[4]，足立博之[1,2]，○野田陽一[1,2]（[1]東大院・農生化，[2]東大微生物連携研究機構，[3]東大院・新領域，[4]理研・CPR）

3A12p12　分裂酵母の新規 RNA 結合タンパク質 Nrp1 の機能解析
16:01　○湯川格史[1,2]，大石充輝[1]，登田　隆[1,2]（[1]広島大・院統合生命，[2]広島大・健康長寿研究拠点）

p13〜p18 発表者の接続時間 16:12〜16:21

3A12p13　1 細胞自家蛍光解析で可視化する微生物の細胞死過程の多様性
16:21　○下段千尋[1]，高部響介[2]，野村暢彦[2,3]，八幡　穣[2,3]（[1]筑波大・生命環境学群，[2]筑波大・生命環境系，[3]筑波大・MiCS）

3A12p14　糸状菌オルガネラと細胞壁・隔壁のラベルフリーラマンイメージング解析
16:32　○安田　充[1]，竹下典男[2]，重藤真介[1]（[1]関西学院大理工，[2]筑波大生命環境）

3A12p15　Identification of novel proteins regulating fungal cell-to-cell communication by localization screening of multicellularity-specific uncharacterized proteins
16:43　○Md. Abdulla Al MAMUN[1]，Takuya KATAYAMA[1,2]，Wei CAO[3]，Shugo NAKAMURA[3]，Jun-ichi MARUYAMA[1,2]（[1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]INIAD, Toyo Univ.）

3A12p16　黄麹菌 *Aspergillus oryzae* における AoCdc48 の機能及び有用物質分泌生産能に関する解析
16:54 ○守田湧貴，菊松風大，竹川　薫，樋口裕次郎　（九大院生資環 生命機能）

3A12p17　黄麹菌 *Aspergillus oryzae* における AAA ATPase AipA と AoAbp1 のエンドサイトーシスにおける機能解析
17:05 ○日浅怜子，柿本健一，竹川　薫，樋口裕次郎　（九大院生資環 生命機能）

3A12p18　黄麹菌における *α*-アミラーゼ mRNA の可視化解析
17:16 ○樋口裕次郎，竹川　薫　（九大院農）

A15 会場　午前の部（9:30〜12:13）

微生物―1443 物質生産 - 微生物変換，微生物酵素反応―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

3A15a01　難分解性土壌有機化合物フミン酸の分解酵素の精製
9:30 ○伊藤空良，西山辰也，上田賢志　（日大生資科）

3A15a02　放線菌が分泌する二種のヌクレオチダーゼの諸性質解明
9:41 ○星野理央，西山辰也，上田賢志　（日大生資科）

3A15a03　*Gordonibacter urolithinfaciens* DSM27213 における新規酵素エラグ酸ラクトナーゼの同定および機能解析
9:52 岸野重信[1]，渡邊寛子[1]，○熊澤加奈子[1]，工藤眞丈[2]，林　素子[2]，山本浩明[2]，小川　順[1]　（[1]京都院農，[2]ダイセル・コーポレート研）

3A15a04　*Gordonibacter urolithinfaciens* DSM 27213 における urolithin 脱水酸化反応に関与する因子の解析
10:03 ○渡邊寛子[1]，岸野重信[1]，工藤眞丈[2]，林　素子[2]，山本浩明[2]，小川　順[1]　（[1]京大院農，[2]ダイセル・コーポレート研）

3A15a05　水酸化脂肪酸 10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid からオキソ脂肪酸 10-oxo-*cis*-12-octadecenoic acid への変換反応に有用な微生物の探索
10:14 ○江原優作，岸野重信，中辻亮太，小川　順　（京大院農・応用生命）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

3A15a06　ピリミジンの酸化的代謝に関わる uracil-thymine dehydrogenase の特性解析
10:35 宋　子良[1]，○定免宏幸[1]，竹内道樹[2]，堀之内伸行[1]，斯　大勇[1]，日比　慎[2,3]，清水　昌[1]，小川　順[1]　（[1]京大院農・応用生命，[2]京大院農・産業微生物，[3]富山県大工・生工研センター）

3A15a07　*Pichia farinosa* NBRC0462 株が産生するフルオロケトン還元酵素の触媒機能解析および光学純度の向上に向けた変異導入
10:46 ○釜井彩花[1]，七田沙耶香[1,2]，三木慎介[3]，礒部公安[1,2]，日比　慎[1]，中林　誠[1]，浅野泰久[1,2]　（[1]富山県大・生工研セ，[2]JST, ERATO，[3]セントラル硝子㈱）

3A15a08　Biocatalytic Asymmetric Ring-opening of Dihydroisoxazoles: A New Route to Complementary Enantiomers of *β*-Hydroxy nitriles from Olefins
10:57 ○Daijun ZHENG，Yasuhisa Asano　（Toyama Prefectural University）

3A15a09　腸内細菌による難消化性澱粉分解メカニズムの解明
11:08 岸野重信，森川拓磨，○山本ティミラ明李，小川　順　（京大院農・応用生 命）

3A15a10　新規可逆的脱炭酸酵素 4-hydroxyisophthalic acid decarboxylase の諸性質解明
11:19 吉原朋矢，○青野　陸，木野邦器　（早大・先進理工・応化）

a11〜a13 発表者の接続時間 11:30〜11:40

3A15a11　海洋由来酵母による褐藻類主要成分マンニトールからの油脂生産
11:40 ○中田翔太[1]，日尾　守[2]，髙瀬隆一[1,2]，河井重幸[3]，渡辺大輔[1,2]，橋本　渉[1,2]　（[1]京大院農，[2]京大農，[3]石川県大）

3A15a12　大腸菌と酵母の共培養による Tropinone の生産
11:51 ○室田健来，長谷部文人，大石和敬，鮒　信学　（静岡県立大院食）

3A15a13　プレバイオティクスオリゴ糖 1-ケストース の構造を基盤とした新規オリゴ糖の酵素合成利用
12:02 ○白井沙也加，保坂浩貴，平野貴子，袴田　航，西尾俊幸（日大院生資科）

A17 会場　午前の部（9:30〜12:13）

微生物―1414 細胞 - 情報伝達，細胞応答，ストレス応答―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

3A17a01　リパーゼ・スーパーインデューサーにより誘導されるリパーゼと関連物質の機能解析
9:30 ○石塚盛雄[1]，多勢真大[1]，関谷麻美[1]，千濱良太[1]，赤沼元気[2]，牛尾一利[3]　（[1]中央大理工，[2]立教大理，[3]新居浜高専物生）

3A17a02　ADP 結合型センサーヒスチジンキナーゼ VicK の細胞質内領域の X 線結晶構造
9:41 ○孫　定国[1]，江口陽子[2]，内海龍太郎[2]，岡島俊英[1]　（[1]大阪大学　産業科学研究所　生体分子反応科学研究分野，[2]近畿大学生物理工学部　食品安全工学科）

3A17a03　麹菌のアレスチン様因子 CreD のユビキチン化はマルトース輸送体 MalP のグルコース不活性化制御に必要である
9:52 ○藤田翔貴[1]，多田日菜子[1]，田中瑞己[2]，新谷尚弘[1]，五味勝也[1]　（[1]東北大学院農，[2]静岡県大食栄）

3A17a04　麹菌のカーボンカタボライト抑制制御に関わるアレスチン様タンパク質 CreD の発現量制御機構
10:03 ○田中瑞己[1]，藤田翔貴[2]，多田日菜子[2]，新谷尚弘[2]，河原崎泰昌[1]，五味勝也[2]　（[1]静県大食栄，[2]東北大農）

3A17a05　シグナルを封入した人工メンブレンベシクルによる細菌制御
10:14 ○中嶋勇人[1]，豊福雅典[2,3]，野村暢彦[2,3]，Utada Andrew. S.[2,3]　（[1]筑波大・生命環境，[2]筑波大・MiCS，[3]筑波大・生命環境系）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

3A17a06　過酷な環境から単離された微細藻類の新規な光酸化ストレス防御機構のオミクス解析
10:35 ○豊島拓樹[1]，吉田梨沙子[1]，佐保好亮[1]，高市真一[2]，川崎信治[1,2]　（[1]東農大バイオサイエンス，[2]東農大分子微生物）

3A17a07　好熱菌に分布する機能未知の AstaP ホモログタンパク質の機能解析
10:46 ○本間　薫[1]，大島一輝[1]，加藤聖子[1]，石毛太一郎[3]，久保田恵理[3]，高市真一[1,2]，川崎信治[1,2]　（[1]東農大バイオ，[2]東農大微生物，[3]東農大ゲノム解析セ）

3A17a08　出芽酵母の複合スフィンゴ脂質構造多様性破綻ライブラリーの作製とストレス耐性能評価
10:57 ○古賀綾乃，高山千廣，谷　元洋　（九州大理）

3A17a09　*Lactobacillus agilis* BKN88 における走化性の解析
11:08 ○鈴木駿也[1]，近藤和穂[1]，横田健治[2]，五十君静信[2]，梶川揚申[2]　（[1]東農大院・農化，[2]東農大・ 農化）

3A17a10　ヒト表皮由来細胞を用いたヒト毛髪主要細菌による発育・老化関連遺伝子 SIRT1 の発現促進 / 抑制活性調査
11:19 ○山田あずさ，渡辺康太，西　悠里，田代幸寛，酒井謙二，片倉喜範　（九大院・ 生資環）

a11〜a13 発表者の接続時間 11:30〜11:40

3A17a11　出芽酵母のリン酸飢餓誘導性オートファジーと選択的オートファジーにおいて重要な Slt2 と Hrr25 による Atg29 のリン酸化制御
11:40　○奥村　俊，横田浩人，菊池あゆみ，五味勝也，新谷尚弘（東北大・院農）

3A17a12　分裂酵母の胞子形成の制御に関わる DDK 複合体 Spo4-Spo6 と，SIN 経路因子の相互作用解析
11:51　○伊藤碧美[1]，中村太郎[2]，今田一姫[1,2]（[1]鈴鹿高専，[2]大阪市大・院理）

3A17a13　TORC1 経路における細胞内グルタミン検知機構
12:02　○谷川美頼[1]，山本勝良[2]，前田達哉[1]（[1]浜松医科大，[2]東大定量研）

A17 会場　午後の部（13:50〜17:27）

微生物―1414 細胞 - 情報伝達，細胞応答，ストレス応答―

p01〜p06 発表者の接続時間 13:40〜13:50

3A17p01　超高温堆肥及び原料汚泥から分離された *Calditerricola* 属細菌の低温耐性機構の解明
13:50　○尾島舞世，前田一至，田代幸寛，酒井謙二（九大院・生資環）

3A17p02　普遍的リボヌクレアーゼによる大腸菌バイオフィルム形成制御機構の解析
14:01　○南　篤[1]，日高真誠[1,2]，葛山智久[1,2]，小川哲弘[1,2]（[1]東大院・農生科・応生工，[2]東大・微生物連携機構）

3A17p03　種横断的な活性パースルフィド産生経路とその生理的意義の解明
14:12　○西村　明[1]，赤池孝章[2]，高木博史[1]（[1]奈良先端・バイオ，[2]東北大・医）

3A17p04　*Aspergillus fumigatus* のファルネソール応答機構における一酸化窒素の機能解析
14:23　○老木紗予子[1]，二宮章洋[1]，浦山俊一[1,2]，萩原大祐[1,2]（[1]筑波大・生命環境，[2]筑波大・MiCS）

3A17p05　好気性光合成細菌 *Rseobacter denitrificans* において LOV-HK はストレス耐性に寄与する
14:34　○山本麻衣子，亀谷将史，石井正治，新井博之（東大院農生科・応生工）

3A17p06　分裂酵母の接合過程を亢進させる優性変異
14:45　章　佳君，河野真歩，深町拓紀，松尾安浩，○川向　誠（島根大生資）

p07〜p12 発表者の接続時間 14:56〜15:06

3A17p07　酵母のプロテオスタシスにおける高濃度エタノールへの適応応答
15:06　○吉田雅偲，加藤沙枝，井澤真吾（京工繊大・応生）

3A17p08　絶対嫌気性菌 *Clostridium* 属細菌の O_2 適応機構に関する研究
15:17　○永塚健司[1]，宇津智晴[1]，菅谷雄史[1]，平澤克明[1]，佐藤拓海[2]，新村洋一[1,2]，川崎信治[1,2]（[1]東農大バイオ，[2]東農大微生物）

3A17p09　イネいもち病菌における推定カルシウムチャネル及びその構成因子の機能解析
15:28　○山内優季，平岡輪子，林　平，内田百岳，荒添貴之，鎌倉高志（東理大理工）

3A17p10　酵母ユビキチンリガーゼ Rsp5 の C2 ドメインを介したエンドサイトーシス調節機構
15:39　○棚橋亮弥[1]，ティラシティヌルアフィア[1]，渡辺大輔[2]，高木博史[1]（[1]奈良先端大・バイオ，[2]京大院・農）

3A17p11　栄養飢餓に誘導される出芽酵母リボソーム分解機構の解析
15:50　○西　晃平[1]，山田陸翠[1]，赤川博文[1]，陣内　凱[1]，島日佳理[1]，日髙真誠[1,2]，葛山智久[1,2]，小川哲弘[1,2]（[1]東大院・農生科・応生工，[2]東大　微生物連携機構）

3A17p12　プロファージ遺伝子よる微生物間コミュニケーションの活性化
16:01　○安田まり奈[1]，森永花菜[2]，尾花　望[3,5]，野村暢彦[4,5]，豊福雅典[4,5]（[1]筑波大院・生命環境科科学，[2]産総研・生物プロセス研究部門，[3]筑波大・医学医療系トランスボーダー医学研究センター，[4]筑波大・生命環境系，[5]筑波大・微生物サステイナビリティ研究センター）

p13〜p18 発表者の接続時間 16:12〜16:21

3A17p13　分裂酵母のアクチンと微小管の制御に関わる分子経路の解析
16:21　○辻　拓也[1]，久米一規[2]，水沼正樹[2]（[1]広島大工，[2]広島大院統合生命）

3A17p14　酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* と *Komagataeibacter medellinensis* における共通の耐熱化機構の解析
16:32　○松本奈実[1]，水町優希[1]，松谷峰之介[1,2]，片岡尚也[1,3,4]，薬師寿治[1,3,4]，松下一信[1,3,4]（[1]山口大院創成科学，[2]東農大ゲノム解析セ，[3]山口大農，[4]山口大中高温微セ）

3A17p15　*Saccharomyces cerevisiae* の膜結合型ムチン Hkr1p の C 末端領域は HM-1 キラートキシン耐性獲得と出芽方向性を制御する
16:43　○今藤俊宏，鈴木宇香，笠原　紳（宮城大学食産業学部）

3A17p16　*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB600 の EPS 合成遺伝子群の機能解析
16:54　○工藤大夢，鈴木駿吾，関口里奈，佐々木泰子（明治大・農）

3A17p17　Study on a novel protein FipA as a possible scaffold for Fus3 MAPK cascade in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*
17:05　○Yue CHEN[1]，Takuya KATAYAMA[1,2]，Ozgur BAYRAM[3]，Gerhard H. BRAUS[4]，Katsuhiko KITAMOTO[5]，Jun-ichi MARUYAMA[1,2]（[1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Dept. of Biol., Maynooth Univ., [4]Dept. of Mol. Microbiol. Genet., Georg-August-University Goettingen, [5]Nihon Pharmaceutical Univ.）

3A17p18　超好熱菌細胞内における大型ポリアミンの転写・翻訳への関与
17:16　○福田青郎[1]，尾崎　守[1]，福田萌子[1]，濱川匡史[1]，家森優佳[1]，秀瀬涼太[2]，兼崎　友[3]，加藤　知[1]，藤原伸介[1]（[1]関西学院大理工，[2]神戸大院科学技術イノベ，[3]静岡大グリーン研）

A18 会場　午前の部（9:30〜11:30）

微生物―1412 細胞 - 栄養，生育，増殖―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

3A18a01　THE EFFECT OF CARBON SOURCE ON THE OXIDATIVE STRESS INDUCED IN HEATED *ESCHERICHIA COLI* CELLS
9:30　○Khanh Vo[1]，Akihiro Wada[1]，Ryoko Asada[1,2]，Jin Sakamoto[2]，Tetsuaki Tsuchido[2]，Masakazu Furuta[1,2]（[1]Dept. Quantum and Radiation, Grad. Engineering, Osaka Prefecture Univ., [2]Research Center of Microorganism Control, Organization of Research Promotion, Osaka Prefecture Univ.）

3A18a02　加熱処理芽胞の発育動態解析に基づく包括損傷評価
9:41　○朝田良子[1,2]，傳　大輝[1]，坂元　仁[2]，土戸哲明[2]，古田雅一[1,2]（[1]大阪府大・院・工，[2]大阪府大・研究推進機構・微制研セ）

3A18a03　ガンマ線照射芽胞の差分後培養法による包括損傷評価
9:52　○傳　大輝[1]，朝田良子[1,2]，坂元　仁[2]，土戸哲明[2]，古田雅一[1,2]　([1]大阪府大院・工，[2]大阪府大・研究推進機構・微制研セ)

3A18a04　枯草菌胞子の加熱殺菌に発芽レセプターの損傷は関与するのか
10:03　○坂元　仁[1]，朝田良子[1,2,3]，古田雅一[1,2,3]，土戸哲明[1]　([1]大阪府立大微制研セ，[2]大阪府立大院工量子，[3]大阪府立大放研セ)

3A18a05　好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* の芽胞内で発現しているアラニン脱水素酵素の同定
10:14　○大森勇門[1,2]，亀井咲也香[1]，安達泰志[2]，大島敏久[1,2]　([1]大阪工大・工・生命工学，[2]大阪工大・院工・生命工学)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

3A18a06　生大豆が納豆菌に応答して抗菌物質を生産・分泌する
10:35　○長瀬鮎美，杉浦春香，渡辺大輔，橋本　渉　(京大院農)

3A18a07　枯草菌の加熱処理およびガンマ線照射芽胞に対するチモールの発育抑制作用の解析
10:46　○岡田太地[1]，阪井俊夫[1]，朝田良子[1,2,3]，坂元　仁[3]，土戸哲明[1,2,3]，古田雅一[1,2,3]　([1]大阪府大院・工・量子，[2]大阪府大院・放研セ，[3]大阪府大院・微制研)

3A18a08　D-アミノ酸の抗菌能評価と作用特性
10:57　○内田脩斗[1]，松村吉信[1,2]　([1]関西大・生命生物工，[2]関西大・ORDIST)

3A18a09　ボイセンベリーの抗菌性の評価
11:08　○橋本奈々美[1]，水木　徹[4]，三浦　健[1,2,3]　([1]東洋大院・生命科学，[2]東洋大学・生命科学，[3]東洋大学・ライフイノベーション研究所，[4]東洋大学・バイオナノエレクトロニクス研究センター)

3A18a10　空気によるマイクロバブルの微生物への殺菌効果
11:19　○赤尾紅羽，西本真琴　(和歌山高専)

A18 会場　午後の部(13:50〜17:05)

微生物―1412 細胞 - 栄養，生育，増殖―

p01〜p06 発表者の接続時間 13:40〜13:50

3A18p01　*Aspergillus niger* の培養方法による形態変化への影響
13:50　○正木佑弥[1]，村上周一郎[2]　([1]明治大院農，[2]明治大農)

3A18p02　*Arenibacter* sp. C-21 株におけるヨウ素の局在性とヨウ素結合タンパク
14:01　○中澤　遥，天知誠吾　(千葉大院園芸)

3A18p03　細菌のヨウ素酸呼吸には新規鉄硫黄モリブデンタンパク Idr が関与する
14:12　○柏　澄江[1]，山﨑千尋[1]，笠原康裕[2]，天知誠吾[1]　([1]千葉大園，[2]北大低温研)

3A18p04　セレン耐性菌 *Cellulomonas* sp. D3a 株における亜セレン酸還元機構の解析
14:23　○戸部隆太[1]，牧村康平[1]，坂本暁紀[1]，Tejo N. Prakash[2]，三原久明[1]　([1]立命大生命，[2]Thapar Inst. Eng. & Tech.)

3A18p05　超低栄養性細菌 *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株の *mnoA* の機能解析
14:34　○岸本真奈[1]，池ヶ谷凌士[2]，新谷政己[2]，金原和秀[2]，吉田信行[2]　([1]静大・工，[2]静大院・総合科技)

3A18p06　培養条件検討から *adhX* 遺伝子依存的貧栄養環境生育機構に迫る
14:45　○酒井洋範，加藤広海，大坪嘉行，津田雅孝，永田裕二　(東北大院生命科)

p07〜p12 発表者の接続時間 14:56〜15:06

3A18p07　深海好圧性細菌 *Shewanella violacea* が有する 4 つのペプチド輸送体の特性解析
15:06　○根來将吾[1]，翠川雄斗[1]，加藤千明[2]，阿部文快[1]　([1]青山学院大学，[2]海洋研究開発機構)

3A18p08　O_2 耐性菌 *Amphibacillus xylanus* の“嫌気ストレス”に関する研究 [第 2 報]
15:17　大野由依[1]，木俣真弥[1]，○齋藤迅成[1]，松本滉平[1]，尾崎和帆[1]，川越　樹[1]，田中啓介[2]，酒井陽一[3]，高山　努[3]，中本忠宏[4]，武田晃治[5]，吉村悦郎[6]，阿部　晃[7]，川崎信治[1]，新村洋一[1]　([1]東農大バイオ，[2]東農大ゲノム解析セ，[3]大同大，[4]東レリサーチセ，[5]東農大教職課程，[6]放送大教養，[7]東農大分子微生物)

3A18p09　酢酸，酪酸存在下で見られる *Hydrogenophilus thermoluteolus* TH-1 株の生育阻害
15:28　○岩本啓志[1]，亀谷将史[1,2]，新井博之[1,2]，石井正治[1,2]　([1]東大 農生科，[2]東大微生物連携機構)

3A18p10　ビフィズス菌の生理状態に影響を及ぼす環境要因に関する研究
15:39　○佐野寿広[1]，渡部拓也[1]，佐藤拓海[2]，川崎信治[1,2]　([1]東農大バイオ，[2]東農大微生物)

3A18p11　乳酸酸性環境における共存酵母による乳酸菌の生存性向上効果の検討
15:50　○平井智美，相澤美穂，小笹佳菜，清田彩美，川澄俊之　(日女大食)

3A18p12　花と訪花昆虫に生息する嫌気性細菌の生理的意義に関する研究
16:01　○鈴木大貴[1]，森　達則[1]，山本安里沙[1]，石毛太一郎[3]，佐藤拓海[2]，川崎信治[1,2]　([1]東農大バイオ，[2]東農大微生物，[3]東農大ゲノム解析セ)

p13〜p16 発表者の接続時間 16:12〜16:21

3A18p13　ウイスキー由来乳酸菌 *Lactobacillus helveticus* の環境適応と進化
16:21　○城戸良彦[1]，前野慎太朗[1]，久保田恵理[2]，志波　優[2,3]，遠藤明仁[1]　([1]農大食香粧化学科，[2]農大ゲノム解析センター，[3]農大分子微生物学科)

3A18p14　カフェイン耐性乳酸菌の人工胃腸液における生存性
16:32　○齊藤可剛[1]，関　文巳[2]，水木　徹[3]，三浦　健[1,4]　([1]東洋大院・生命科学，[2]東洋大学・生命科学，[3]東洋大学・バイオナノエレクトロニクス研究センター，[4]東洋大学・ライフイノベーション研究所)

3A18p15　微生物によるメイラード反応生成物の分解および褐変抑制の最適条件の検討とその作用機序の解明
16:43　○黒川香緒里[1]，油井拓哉[1]，島村裕子[1]，小林文男[2]，増田修一[1]　([1]静岡県大院・薬食生命，[2]有限会社ラヴィアンサンテ)

3A18p16　黄色ブドウ球菌由来膜小胞形成と毒素ファージ誘導の関連性の解明
16:54　○山梨佑花，安藤彩加，島村裕子，大橋典男，増田修一　(静岡県大・食品栄養)

B01 会場　午前の部(9:30〜12:13)

有機化学，天然物化学―1111 天然物 - 単離構造決定 - 動物，植物 (5 題) 1110 天然物 - 単離構造決定 - 微生物 (8 題)―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

3B01a01　ヤマカガシ (Rhabdophis tigrinus) が有する頸腺毒成分の地域的特徴
9:30　○井上貴斗[1]，中田　隆[1]，吉永直子[1]，Alan H. Savitzky[2]，森　哲[3]，森　直樹[1]　([1]京大院農，[2]ユタ州立大生物，[3]京大院理)

3B01a02　ヤエヤマサソリ毒液に含まれる抗ウイルス活性成分の単離・同定
9:41　○宮下正弘[1]，三谷直也[1]，北中淳史[1]，焼尾真緒[1]，陳　明[2]，西本幸子[3]，堀田　博[2,3]，中川好秋[1]，宮川　恒[1]　([1]京大院農，[2]神戸大医，[3]甲南女子大医療栄養)

3B01a03　食虫動物トガリネズミ由来の麻痺性神経毒ペプチドの構造と生物活性
9:52　○森田真布[1]，武仲敏子[2]，別所　学[2]，Maturana D. Andres[2]，木越英夫[3]，大舘智志[4]，上村大輔[5]，北　将樹[2]（[1]名大物質国際研，[2]名大院生命農，[3]筑波大院数理物質，[4]北大低温研，[5]神奈川大理）

3B01a04　雑草ホオズキ類に含まれる昆虫摂食阻害物質
10:03　○森本正則，綱木海成，栗山美鈴，松田一彦　（近畿大農）

3B01a05　ヤーコン葉部腺毛由来セスキテルペンラクトン類の昆虫摂食阻害発現に必要な化学構造因子（第 2 報）
10:14　○綱木海成，森本正則，河野大祐，松田一彦　（近畿大農）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

3B01a06　黒穂菌由来の植物成長調節物質に関する化学的研究
10:35　○森本悠介[1]，呉　　静[4]，崔　宰熏[1,2,3,4]，徳山真治[3]，平井浩文[1,2,3,4]，河岸洋和[1,2,3,4]（[1]静岡大院総合農，[2]静大院創造，[3]静大応生化，[4]静大グリーン研）

3B01a07　フェアリー化合物の安定性と分解産物に関する化学的研究
10:46　○渥美有矢[1]，竹村太秀[1]，呉　　静[2]，崔　宰熏[1,2,5]，平井浩文[1,2,5]，近藤　満[2,5,6]，浅川倫宏[3]，稲井　誠[4]，菅　敏幸[4]，河岸洋和[1,2,5]（[1]静岡大院・総合農，[2]静岡大・グリーン研，[3]東海大・海洋，[4]静岡県大・薬，[5]静岡大院・創造，[6]静岡大院・総合理）

3B01a08　コムラサキシメジ菌糸体培養濾液由来の植物成長調節物質の探索
10:57　○住田真晟[1]，呉　　静[2]，崔　宰熏[1,2,3]，平井浩文[1,2,3]，河岸洋和[1,2,3]（[1]静大農・応生科，[2]静大・グリーン研，[3]静大院・創造）

3B01a09　サンゴハリタケ（*Hericium coralloides*）由来の生体機能性物質の探索
11:08　○清宗　大[1]，呉　　静[3]，崔　宰熏[1,2,3,4]，平井浩文[1,2,3,4]，河岸洋和[1,2,3,4]（[1]静大院・総合農，[2]静大農・応用生物化学科，[3]静大・グリーン研，[4]静大院・創造）

3B01a10　キナメツムタケ子実体由来の生体機能性物質の探索
11:19　○横堀沙英[1]，呉　　静[2]，崔　宰熏[1,2,3]，平井浩文[1,2,3]，河岸洋和[1,2,3]（[1]静大・農，[2]静大・グリーン研，[3]静大院・創造）

a11〜a13 発表者の接続時間 11:30〜11:40

3B01a11　白きょう病菌（*Beauveria bassiana*）由来の生物活性物質
11:40　○日比琢斗[1]，呉　　静[2]，崔　宰熏[1,2,3]，道羅英夫[2]，平井浩文[1,2,3]，河岸洋和[1,2,3]（[1]静大院・総合農，[2]静大・グリーン研，[3]静大院・創造）

3B01a12　*Pestalotiopsis microspora* が生産する新規神経保護物質の単離と構造解析
11:51　○菅野和紀[1]，鶴川幸音[1]，柴崎久宜[1]，井口恵太[1]，村上裕信[1]，内山淳平[1]，倉持浩司[2]，紙透伸治[1]（[1]麻布大獣医，[2]東理大理工）

3B01a13　ヘム重合阻害を指標とした微生物代謝産物からの抗マラリア活性物質の探索
12:02　○清水優希[1]，石山亜紀[1,2]，小池李茉[3]，渡邊善洋[2]，穂苅　玲[2]，岩月正人[1,2]，大村　智[2]（[1]北里大学感染制御科学府，[2]北里生命化学研究所，[3]北里大学理学部化学科）

B01 会場　午後の部（13:50〜17:16）

有機化学，天然物化学―1110 天然物 - 単離構造決定 - 微生物（12 題）1111 天然物 - 単離構造決定 - 動物，植物（5 題）―

p01〜p06 発表者の接続時間 13:40〜13:50

3B01p01　担子菌類 *Aleurodiscus grantii* が生産する植物幼苗根伸長阻害物質の同定
13:50　山口　諒[1]，石原　亨[2]，○上野琴巳[2]（[1]鳥取大院農，[2]鳥取大農）

3B01p02　放線菌異種発現による verticilactam 新規類縁体の生産と単離・構造決定
14:01　○野川俊彦[1]，寺井淳高[1]，新家一男[2]，池田治生[3]，高橋俊二[4]，長田裕之[1]（[1]理研CSRS・ケミカルバイオロジー，[2]産総研，[3]北里大・生命研，[4]理研CSRS・天然物生合成）

3B01p03　インドネシア産樹木内生菌が生産する新規二次代謝産物の探索
14:12　○末広　航，小関卓也，塩野義人　（山形大学農）

3B01p04　インドネシア産樹木より分離した糸状菌 GI-1005 株が生産する代謝産物について
14:23　○佐藤志帆，小関卓也，塩野義人　（山形大農）

3B01p05　ナラ菌 Raffaelea quercivora が生産する二次代謝産物について
14:34　○塩野義人，中村智紀，小関卓也　（山形大農）

3B01p06　Cyclohelminthol CP3 の構造
14:45　○橋本　勝，猪瀬航太，田中静也，殿内暁夫　（弘前大農生）

p07〜p12 発表者の接続時間 14:56〜15:06

3B01p07　*Seiridium* sp. から単離した新規セスキテルペン
15:06　○西山真未，田中和明，橋本　勝　（弘前大学）

3B01p08　*Stenotrophomonas maltophilia* KMM 349 株が産生するシデロフォア解析
15:17　○久富　敦[1]，志波　優[2]，藤田信之[2]，越野広雪[3]，田中尚人[1,2]（[1]東農大院環境共生，[2]東農大生命，[3]理研MSCU）

3B01p09　アゾール環含有ペプチド coryneazolicin の異宿主生産と生理活性
15:28　○小谷真也[1,2]，田熊桃子[1]，長野裕樹[1]，KAWEEWAN Issara[2]，逸見　光[3]，大吉崇文[1,2]（[1]静大院・総合，[2]静大院・創造，[3]農研機構・食品部門）

3B01p10　植物根圏における土壌細菌の増殖を刺激する物質の探索
15:39　○井田和輝，近藤竜彦，小鹿　一　（名大農）

3B01p11　微生物が生産する糸状菌の二次代謝産物能の制限を解除するアンロッカーの探索
15:50　○酒井一成[1]，名児耶睦[2]，荒川絵美[3]，渡邊善洋[1]，岩月正人[1,3]，野中健一[1,3]，大村　智[1]（[1]北里大生命研，[2]北里大理，[3]北里大院感染制御）

3B01p12　ポリカチオン化修飾による微生物由来生理活性中分子ペプチドの新しい探索技術の開発
16:01　○永嶋世蓮，武内大和，丸山千登勢，濱野吉十　（福井県大院・生物資源）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:12〜16:21

3B01p13　ツキヨタケ（*Omphalotus japonicus*）菌糸培養物に含まれる新規 polyisoprene polyol について
16:21　○青木聡樹[1]，網干貴子[1,2]，新井大輔[3]，飯塚禎明[3]，村山哲也[1,2]（[1]岩手大院連農，[2]山形大農，[3]山形大農フィールド科学センター）

3B01p14　ハスモンヨトウ抵抗性ダイズ品種ペキンが持つ特徴的成分の同定
16:32　○矢野まりこ[1]，中田　隆[2]，寺石政義[1]，吉永直子[1]，奥本　裕[1]，森　直樹[1]（[1]京大院農，[2]農研機構）

3B01p15　スズランの花より見出だしたスズラン様香気成分の同定
16:43　○大橋輝久，坂巻憲佐，赤尾寛子，石崎　亨　（長谷川香料㈱）

3B01p16　バンレイシ科植物アテモヤの種子からの squamocin-IV の単離・生物活性評価
16:54　○吉田優香，増田裕一　（三重大生物資源）

3B01p17　エゾエンゴサクの青色花弁に含まれる鉄錯体アントシアニンの化学研究
17:05　○吉田久美[1]，鬼塚丈矢[1]，尾山公一[2]，近藤忠雄[1]（[1]名古屋大院情報，[2]名古屋大物国セ）

B02 会場　午前の部（9:30〜12:13）

植物―1620 植物ホルモン，成長調節物質―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

3B02a01　エチレンレセプター変異体イネにおける初期生長の促進
9:30　○森田重人[1,2]，谷　柚希[1]，増村威宏[1,2]　([1]京都府大生命環境，[2]京都農技セ生資セ)

3B02a02　陸棲藍藻 *Nostoc* sp. HK-01 における植物生長調節物質の生産と休眠細胞の発芽調節
9:41　○木村駿太[1,2]，中嶋正敏[1]，湯本絵美[3]，宮本皓司[4]，オン　碧[5]，横谷香織[5]，浅見忠男[1]　([1]東大院・農生科，[2]学振PD，[3]帝京大・先端機器セ，[4]帝京大・理工，[5]筑波大・生命環境)

3B02a03　ストリゴラクトン受容体 D14 過剰発現の引き起こす病害抵抗性とその誘導機構
9:52　○伊藤瑛子[1]，山野博之[1]，前田　哲[2]，神田恭和[2]，草島美幸[1]，藤田萌香[3]，仲下英雄[3]，森　昌樹[2]，中村英光[1]，浅見忠男[1]　([1]東京大農生科，[2]農研機構，[3]福井県大)

3B02a04　典型的ストリゴラクトンの生合成経路の解明
10:03　○若林孝俊[1,2]，濱名実咲[1]，森　采美[1]，北野友里恵[1]，支田香澄[1]，秋山遼太[1]，刑部敬史[3]，刑部祐里子[3]，水谷正治[1]，杉本幸裕[1,2]　([1]神戸大院・農，[2]JST/JICA SATREPS，[3]徳大・生物資源)

3B02a05　基質アナログ型ストリゴラクトン生合成阻害剤の探索
10:14　○川田紘次郎[1]，内田裕也[1]，小野田聡志[1]，佐々木康幸[1]，野村崇人[2]，矢嶋俊介[1]，伊藤晋作[1]　([1]東京農大・バイオ，[2]宇都宮大・バイオ)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

3B02a06　多機能性物質カリキンの受容体阻害剤の創製
10:35　酒井寿彦，喜久里貢，高橋郁夫，中村英光，○浅見忠男（東大院農生科）

3B02a07　酢酸コリン処理によって認められるシロイヌナズナ生長促進の分子機構解析
10:46　○池田直樹[1]，神村麻友[1]，小林　毅[2]，蔡　晃植[1,3]　([1]長浜バイオ大・バイオ，[2]アグロカネショウ㈱，[3]長浜バイオ大・ゲノム編集研究所)

3B02a08　フェアリー化合物の生合成に関連した新規プリン代謝の解明
10:57　○竹村太秀[1]，崔　宰熏[1,2]，大西利幸[1,2]，平井浩文[1,2]，稲井　誠[3]，大内仁志[3]，浅川倫宏[4]，菅　敏幸[3]，河岸洋和[1,2]　([1]静大院・創造，[2]静大・グリーン研，[3]静県大・薬，[4]東海大・海洋)

3B02a09　コムラサキシメジにおける 2-azahypoxanthine のトリアジン基形成機構に関する研究
11:08　○伊藤彰将[1,2]，古田島美颯[3]，崔　宰熏[1,3,4]，平井浩文[1,3,4]，浅川倫宏[5]，大内仁志[6]，稲井　誠[6]，菅　敏幸[6]，河岸洋和[1,3,4]　([1]静大院・創造，[2]JSPS，[3]静大院・総合農，[4]静大・グリーン研，[5]東海大・海洋，[6]静県大・薬)

3B02a10　Conversion of 2-Azahypoxanthine (AHX) to 2-Aza-8-oxohypoxanthine (AOH) by resting cells of *Buttiauxella* sp. A111
11:19　○Apirati Sukprasitchai，Ayaka Kikuchi，Jae-Hoon Choi，Hirokazu Kawagishi，Shinji Tokuyama　(Grad. Sch.Inte.Sci.Tech., Shizuoka Univ.)

a11〜a13 発表者の接続時間 11:30〜11:40

3B02a11　イネにおけるフェアリー化合物の代謝に関する化学的研究
11:40　○崔　宰熏[1,2,3]，與五澤薫[1]，平井浩文[1,2,3]，松浦英幸[4]，堀越　秀[4]，佐分利亘[4]，森　春英[4]，河岸洋和[1,2,3]　([1]静大院・総合農，[2]静大・グリーン研，[3]静大院・創造，[4]北大・農)

3B02a12　植物成長調節活性物質である ICA における代謝と生理機能の解明
11:51　○古田島美颯[1]，松崎信生[2]，崔　宰熏[1,2,3]，呉　　静[3]，平井浩文[1,2,3]，浅川倫宏[4]，大内仁志[5]，稲井　誠[5]，菅　敏幸[5]，河岸洋和[1,2,3]　([1]静大院・総合農，[2]静大院・創造，[3]静大・グリーン研，[4]東海大・海洋，[5]静県大・薬)

3B02a13　植物におけるフェアリー化合物 2-azahypoxanthine の代謝酵素に関する生化学的研究
12:02　○稲木　僚[1]，竹村太秀[1]，崔　宰熏[1,2,3]，堤　祐司[4]，平井浩文[1,2,3]，河岸洋和[1,2,3]　([1]静大院・総合農，[2]静大・グリーン研，[3]静大院・創造，[4]九大農・環境農学)

B02 会場　午後の部（13:50〜16:54）

植物―1620 植物ホルモン，成長調節物質（6 題）1690 その他（7 題）―

p01〜p06 発表者の接続時間 13:40〜13:50

3B02p01　ブラシノステロイド情報伝達経路上の新規 bHLH 型転写因子の植物成長における機能解析
13:50　○田中雄一朗[1,3]，長谷川玲花[4]，山上あゆみ[1,2]，池田美穂[4]，光田展隆[5]，久城哲夫[3]，篠崎一雄[2]，浅見忠男[6]，高木　優[4]，中野雄司[1,2]　([1]京大院・生命，[2]理研・CSRS，[3]明治大院・農，[4]埼大院・理工，[5]産総研，[6]東大院・農)

3B02p02　高活性型ブラシノステロイドを生産する CYP85A3 の構造決定に向けた大量発現及び精製
14:01　○藤山敬介[1]，髙見祐貴[2]，日野智也[1]，大西利幸[3]，轟　泰司[3,4]，水谷正治[5]，永野真吾[1]　([1]鳥取大院工，[2]鳥取大工，[3]静岡大農，[4]静岡大グリーン研，[5]神戸大院農)

3B02p03　ブラシノステロイド情報伝達における新規 MYB 型転写因子 BMYs の単離と機能解析
14:12　○藤田健司郎[1,3]，長谷川玲花[4]，山上あゆみ[1,2]，池田美穂[4]，光田展隆[5]，久城哲夫[3]，篠崎一雄[2]，高木　優[4,5]，浅見忠男[6]，中野雄司[1,2]　([1]京大院・生命，[2]理研・CSRS，[3]明治大院・農，[4]埼大院・理工，[5]産総研，[6]東大院・農)

3B02p04　新規 GH3 阻害剤を用いたオーキシン代謝経路の解析
14:23　○新井一司[1]，福井康祐[1]，笠原博幸[2,3]，林謙一郎[1]　([1]岡山理大，[2]理研・CSRS，[3]東京農工大・GIR)

3B02p05　レイシの花の発達に伴うオーキシン関連化合物の変化
14:34　○金　倫熙，宮川　恒，宮下正弘，大迫祐太朗，山根久代，田尾龍太郎　(京大院農)

3B02p06　ジベレリン生合成を阻害するジベレリン誘導体
14:45　○磯野満理奈[1]，竹内　純[2]，瀬尾光範[4]，轟　泰司[2,3]　([1]静大院・総科技・農，[2]静大・農，[3]静大・グリーン研，[4]理研・CSRS)

p07〜p10 発表者の接続時間 14:56〜15:06

3B02p07　ジャスモン酸誘導体プロヒドロジャスモンはレッドリーフレタスにおけるフェノール性化合物の蓄積を促進する
15:06　○波岡　由[1]，高橋真哉[1,2]，青野光子[1,3]，佐野友春[4]，腰山雅巳[5]，藤澤　浩[5]，礒田博子[1,2]　([1]筑波大・T-LSI，[2]筑波大・生命環境，[3]国環研・生物C，[4]国環研・計測C，[5]日本ゼオン)

3B02p08　Foliar application of prohydrojasmon on growth, total phenolic content, anthocyanin accumulation and antioxidant activity of komatsuna and lettuce
15:17　○Haidar Rafid Azis[1]，Selma Etteieb[1,2]，Shinya Takahashi[1,3]，Masami Koshiyama[4]，Hiroshi Fujisawa[5]，Hiroko Isoda[1,3]　([1]ARENA, Univ. Tsukuba, Japan, [2](LSTE), INAT, Tunis, Tunisia, [3]FLES, Univ. Tsukuba, Tsukuba, Japan, [4]Specialty Chem. Div., Zeon Corp., Tokyo, Japan, [5]Headquarters, Zeon Corp., Tokyo, Japan)

3B02p09　ソバ α-アミラーゼ阻害ペプチド遺伝子の植物体内での発現
15:28　○新町文絵，菊地　舞，平野佳奈，熊谷日登美，水野真二，渡辺慶一　(日大生物資源)

3B02p10　サリチル酸の気孔閉鎖誘導におけるシグナル伝達物質としての硫化水素
15:39　○山田直隆[1]，新北大樹[1]，岩井純夫[2]　([1]九州大農，[2]鹿児島大農)

p13〜p15 発表者の接続時間 16:12〜16:21

3B02p13　Studies on Sustainable Plant Production System Using Plant Growth Promoting Bacteria and Co-compost from Palm Plantation
16:21　○Alsayeda Zahra Salman[1]，Clament Chin[2]，Norhayati Ramli[3]，Mohd Zainudin[4]，Yukihiro Tashiro[1]，Kenji Sakai[1]　([1]Grad. Sch. Bioresour. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ., [2]Facul. Of Sustai. Agri. Univ. Malaysia Sabah, [3]Facul. of Biotech. and Biomolec. Sci. Univ. Putra Malaysia, [4]Instit. of Trop. Agri. and Food Secur. Univ. Putra Malaysia)

3B02p14　青枯病様発生土壌でのトマト発育におけるウルトラファインバブル水の効果
16:32　○横山峰幸[1]，海田るみ[1]，山下貴敏[2]，田中和広[2]，藤井義晴[1]　([1]農工大院農，[2]田中金属製作所)

3B02p15　ノリ養殖の不作原因特定のための現場水質分析
16:43　○吉村　航[1]，小杉知佳[1]，島田裕至[2]，吉満友野[2]　([1]日本製鉄㈱，[2]千水総研セ)

B03 会場　午前の部(9:30〜12:13)

有機化学，天然物化学―1140 天然物 - ケミカルバイオロジー ―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

3B03a01　TEAD-YAP 相互作用を標的とした化合物の探索
9:30　○高瀬翔平[1]，林瀬瑠奈[1]，則次恒太[1]，市川保恵[2]，小川健司[2,3]，吉田　稔[2,4,5]，伊藤昭博[1,4]　([1]東京薬科大・生命科学，[2]理研CSRS・創薬シード，[3]日大・生物資源科学，[4]理研CSRS・ケミカルゲノミクス，[5]東大院農・応生工，微生物連携機構)

3B03a02　FD-891 − F-actin 複合体構造と PPI 阻害機構の解析
9:41　吉田香里[1]，山田有里佳[2]，藤井高志[2]，工藤史貴[3]，片岡孝夫[4]，江口　正[3]，難波啓一[2,5]，○臼井健郎[1]　([1]筑波大生命環境，[2]阪大院生命機能，[3]東工大理学院，[4]京都工繊大工芸科学，[5]理研BDR)

3B03a03　Tight Junction 開口剤 MA026 の Claudin に対する標的特異性
9:52　○向山海凪[1]，内山千尋[2]，福田　茜[2]，中澤圭輝[2]，倉持由佳[2]，谷口敦彦[2]，南雲陽子[1]，林　良雄[2]，臼井健郎[1]　([1]筑波大生命環境，[2]東京薬科大薬)

3B03a04　Debromoaplysiatoxin 単純化アナログ・10-Me-Aplog-1 の側鎖長の最適化
10:03　○権田敦子，高田晃児，入江一浩　(京大院農)

3B03a05　CH/π 相互作用に着目した aplysiatoxin 単純化アナログの合成と生物活性
10:14　○小林巧実，入江一浩　(京大院農)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

3B03a06　分裂酵母を用いた抗癌活性を有する新規キネシン阻害剤の探索
10:35　○登田　隆[1,2]，湯川格史[1,2]，栗澤尚瑛[3]，小野寺拓夢[4]，木村賢一[3,4]　([1]広島大学・院統合生命，[2]広島健康長寿拠点，[3]岩手大・院総合科学，[4]岩手大農)

3B03a07　フラグメントユニットの近接性と配向性が異なる共有結合型 PPARγ リガンドの合成と活性評価
10:46　○宇津木優樹[1]，小渕裕菜[2]，河村幸雄[2]，永尾雅哉[3]，礒田博子[1,4]，宮前友策[1,3,4]　([1]筑波大院グローバル教育院，[2]京都女子食物，[3]京大院生命，[4]筑波大生命環境)

3B03a08　統合表現型プロファイリングとケミカルプロテオミクスの手法による 3 量体 G_i タンパク質調節化合物の発見
10:57　○河村達郎[1,2]，二村友史[3]，SHANG Erchang[2]，室井　誠[1,3]，JANNING Petra[2]，上野雅佳[4]，WILKE Julian[2]，武田茂樹[4]，近藤恭光[3]，ZIEGLER Slava[2]，渡辺信元[1]，WALDMANN Herbert[2]，長田裕之[1,3]　([1]理研CSRS・理研-マックスプランク連携，[2]マックスプランク分子生理学研究所，[3]理研CSRS・ケミカルバイオロジー，[4]群馬大・理工)

3B03a09　2DE-CETSA を用いた PKM2 制御シグナルに作用する化合物 NPD10084 の同定
11:08　○室井　誠[1]，永澤生久子[1]，小川直子[1]，川谷　誠[1]，大石智一[2]，大庭俊一[2]，川田　学[2]，長田裕之[1]　([1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー，[2]微化研)

3B03a10　Squalene oxidation products and their effect on the human keratinocyte cell line HaCaT
11:19　○Saoussane Khalifa[1]，Naoki Shimizu[1]，Shunji Kato[1,2]，Junya Ito[1]，Takahiro Eitsuka[1]，Kiyotaka Nakagawa[1]　([1]Food and Biodynamic Chemistry Lab., Grad.School of Agric.Sci., Tohoku Univ., Japan, [2]Division of Host Defense Mechanism, Tokai Univ., School of Medicine)

a11〜a13 発表者の接続時間 11:30〜11:40

3B03a11　細胞内局在観察を志向したテトランドリン蛍光標識化合物の合成とオートファジー阻害活性評価
11:40　○高橋知暉[1]，東海芙美子[1]，礒田博子[2,3]，繁森英幸[2]，宮前友策[2]　([1]筑波大学　生命環境科学研究科，[2]筑波大学　生命環境系，[3]筑波大学　地中海・北アフリカ研究センター)

3B03a12　脱ユビキチン化酵素の切断活性を利用した細胞内標的タンパク質発現制御法の構築
11:51　○宮前友策[1,2,3]，宇津木優樹[2]，礒田博子[1,2,4]，Ling-Chun Chen[3]，Thomas J. Wandless[3]　([1]筑波大生命環境，[2]筑波大グローバル教育院，[3]CSB Stanford Univ.，[4]筑波大地中海・北アフリカ)

3B03a13　*N*-Ar-DCL 誘導体の合成と発光活性
12:02　○森口舞子[1]，姜　法雄[1]，滝川浩郷[2]，久世雅樹[1]　([1]神戸大院農，[2]東大院農生科)

B03 会場　午後の部(13:50〜17:27)

有機化学，天然物化学―1140 天然物 - ケミカルバイオロジー(13 題)
1130 天然物 - 作用機構（5 題）―

p01〜p06 発表者の接続時間 13:40〜13:50

3B03p01　マルチタグ交換可能なノシル型ジアジリン光ラベル試薬の創製
13:50　○村井勇太[1]，スハイリーサェーディンアイミ[2]，石川卓弥[2]，門出健次[1]　([1]北大院先端生命，[2]北大院生命科学)

3B03p02　抗ウイルス活性を有するカルボリン誘導体の作用標的の同定：光親和性プローブの設計・合成・評価
14:01　○竹本佑平，袴田　航，平野貴子，西尾俊幸　(日大院生資科)

3B03p03　3,4-Dihydroquinolizinium 化合物のチオールに対する反応性評価
14:12　○川合計太朗，小鹿　一，中川　優　(名大院・生命農)

3B03p04　フッ素化フラバン-3-オール誘導体の構造-活性相関研究
14:23　○道下　僚[1]，西野祐樹[1]，石丸拓実[2]，澤野翔哉[2]，齊藤安貴子[1,2]　([1]大阪電通大院工，[2]大阪電通大工)

3B03p05　Formycin A による去勢抵抗性前立腺がん細胞選択的細胞死誘導
14:34　○武井智暉[1]，濱村祐輝[1]，本郷　周[2]，小坂威雄[2]，大家基嗣[2]，井本正哉[1]　([1]慶大・院・理工，[2]慶大・医)

3B03p06　変異 β-catenin 依存的にアポトーシスを誘導する化合物の作用機序解析
14:45　○池田拓慧[1]，室井　誠[2]，石川俊平[3]，長田裕之[2]，井本正哉[2]　([1]慶應大・理工，[2]理研CSRS, ケミカルバイオロジー，[3]東大・医)

p07〜p12 発表者の接続時間 14:56〜15:06

3B03p07　細胞内ビリルビン代謝を標的とする新規パーキンソン病治療薬シード BRUP-1 の同定と作用機序解析
15:06　○片浦哲志[1]，斉木臣二[2]，石川景一[2]，赤松和土[2]，笹澤有紀子[1,2]，服部信孝[2]，井本正哉[1]　([1]慶大院理工，[2]順天堂大医)

3B03p08　疫病菌交配ホルモン受容体遺伝子の探索
15:17　○笠原功輝，田中愛子，竹本大吾，小鹿　一　(名大農)

3B03p09　疫病菌交配ホルモン生合成遺伝子の探索
15:28　○有吉　俊[1]，田中愛子[1]，竹本大吾[1]，大栗隆二[2]，矢島　新[2]，小鹿　一[1]　([1]名大院・生命農，[2]東農大院・農)

3B03p10　ε-poly-L-lysine 修飾による抗体の細胞内送達法の確立
15:39　○武内大和[1]，牛丸和乗[1]，加藤康夫[2]，丸山千登勢[1]，濱野吉十[1]　([1]福井県大院・生物資源，[2]富山県大・生医工研セ)

3B03p11　ゴルジ体マンノシダーゼ阻害剤の構造修飾による活性の分離 〜細胞毒性の軽減とマンノシダーゼ阻害に基づくスフェロイド形成阻害〜
15:50　○加納結衣[1]，小山亮祐[1]，水谷文香[2]，袴田　航[1,2]，平野貴子[1,2]，西尾俊幸[1,2]　([1]日大院・生資科，[2]日大・生資科・生化)

3B03p12　既報小腸グルコシダーゼ阻害剤をライブラリとして用いる小胞体グルコシダーゼ II 阻害剤の探索手法の開発
16:01　○中村啓喜[1]，井上拓哉[1]，恩田桃子[2]，袴田　航[1,2]，平野貴子[1,2]，西尾俊幸[1,2]　([1]日大生資科・生命化，[2]日大院・生資科)

p13〜p18 発表者の接続時間 16:12〜16:21

3B03p13　イオンモビリティ MS による植物ホルモンの超高感度分析
16:21　○謝　肖男[1]，竹原千恵[1]，朝比奈雅志[2]，米山香織[3]，野村崇人[1]，米山弘一[3]　([1]宇都宮大学・バイオセンター，[2]帝京大・理工・バイオ，[3]愛媛大・農)

3B03p14　アミロイド β タンパク質の凝集の蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)による検出
16:32　○杉山恵里，増田裕一　(三重大院生物資源)

3B03p15　clavariopsin A の誘導化と PC12 細胞に対する神経突起伸長作用
16:43　○森川綾音，長島志琹，小鹿　一　(名大院・生命農)

3B03p16　新規神経細胞保護物質 pestalotioquinol A の作用機構解析
16:54　○鶴川幸音[1]，菅野和紀[1]，鈴木優華[1]，村上裕信[1]，竹田志郎[1]，永根大幹[1]，坂上元栄[1]，篠田　陽[2]，紙透伸治[1]　([1]麻布大・獣医，[2]東京薬科大・薬)

3B03p17　梨幼果抽出成分による出芽酵母の寿命延長効果と老化関連遺伝子の発現
17:05　○村田和加恵[1,2]，長谷川真梨菜[1]，藤田憲一[2]，山口良弘[2]，田中俊雄[2,3]，荻田　亮[2,3]　([1]米子高専，[2]阪市大院・理，[3]阪市大・健康研セ)

3B03p18　スサビノリ由来硫酸化多糖体ポルフィランの抗炎症作用
17:16　柳戸彩奈，山口健一，○小田達也　(長大水)

B04 会場　午前の部(9:30〜12:13)

生物科学―1720 タンパク質・ペプチド科学 – 構造，機能，その他(5 題) 1710 糖鎖科学 – 構造，機能，糖鎖工学，その他(8 題)―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

3B04a01　膜脂質－微生物型ロドプシン相互作用の網羅的解析
9:30　○関　貴洋[1]，斉藤遥平[1]，須藤雄気[2]，村田武士[3]，河合(野間)繁子[1]，梅野太輔[1]　([1]千葉大工，[2]岡山大薬，[3]千葉大理)

3B04a02　トリプシン加水分解で生じる単鎖ペプチドのコレステロールミセル崩壊活性
9:41　○伊藤雅子[1,2]，清水一憲[1]，本多裕之[1]　([1]名大院工・生命分子工学，[2]愛知産技セ)

3B04a03　アコヤガイ貝殻内の ACC 結合タンパク質の構造・機能解析
9:52　○岩橋晴香[1]，荒城綾香[1]，根岸瑠美[2]，降旗一夫[1]，永田宏次[1]，鈴木道生[1]　([1]東大院農，[2]東大定量研)

3B04a04　TNF-α 結合活性を持つフィブロネクチン変異体の創出
10:03　○牧野祥嗣，伊藤伸哉　(富県大工)

3B04a05　デルタロドプシンの変異体解析
10:14　○佐藤良樹[1]，弘埜陽子[1]，石井　純[2]，柘植謙爾[2]，松田史生[3]，戸谷吉博[3]，原　清敬[1]　([1]静岡県立大食栄環，[2]神戸大先端バイオ工，[3]阪大院情報)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

3B04a06　ゼブラフィッシュ胚から分泌される希少糖含有糖ペプチドの構造研究
10:35　○長束俊治，沢　空樹，飯塚紀公　(新潟大院自然科学)

3B04a07　カイコ中部絹糸腺の糖鎖構造解析
10:46　○梶浦裕之[1]，内野恵郎[2]，立松謙一郎[2]，瀬筒秀樹[2]，藤山和仁[1]　([1]阪大　ICBiotech，[2]農研機構・生物研)

3B04a08　プラディミシン誘導体を利用した糖タンパク質の染色
10:57　○垣原眞太朗[1]，都築麗江[1]，小鹿　一[1]，五十嵐康弘[2]，伊藤幸成[3]，中川　優[1,3]　([1]名大院生命農，[2]富山県大生工，[3]理研)

3B04a09　野生イノシシに含まれるグリコサミノグリカンの分析
11:08　○武田-奥田尚子，延　水晶，田村純一　(鳥取大農)

3B04a10　*Schizosaccharomyces* 属における細胞表層糖鎖の構造解析
11:19　○福永嵩大[1]，田中直孝[2]，中北愼一[3]，樋口裕次郎[1]，前川裕美[1]，竹川　薫[1]　([1]九州大農，[2]香川大農，[3]香川大総合生命)

a11〜a13 発表者の接続時間 11:30〜11:40

3B04a11　シアル酸結合レクチン(Siglec7)の新規シアル酸結合領域の存在
11:40　○佐藤ちひろ，山川奈緒，吉村　淳，北島　健　(名古屋大学)

3B04a12　ハイマンノース型糖鎖ポリマーによる核 / 細胞質レクチンの同定
11:51　○前田　恵[1,2]，田中創平[2]，高瀬美穂[2]，Van Damme Els JM[3]，木村吉伸[1,2]　([1]岡山大院・環境生命，[2]岡山大農，[3]ベルギーゲント大学)

3B04a13　酵母におけるアミロイドベータ配列とそれを含む下流配列の凝集および局在解析
12:02　○久保友雅[1]，村橋璃香[1]，浦野大樹[2]，赤田倫治[2,3,4]，星田尚司[2,3,4]　([1]山口大工，[2]山口大院創成科学・化学，[3]山口大中高温微生物セ，[4]山口大生命医工学セ)

B04 会場　午後の部(13:50〜17:27)

生物科学―1710 糖鎖科学 – 構造，機能，糖鎖工学，その他―

p01〜p06 発表者の接続時間 13:40〜13:50

3B04p01　シアル酸を有する *O*-結合型糖アミノ酸の合成研究
13:50　○伊藤　駿，朝比奈雄也，北條裕信　(大阪大学蛋白質研究所)

3B04p02　ペプチド上の α-フコシル結合の安定性の検討
14:01　○安藤達也，朝比奈雄也，北條裕信　(阪大蛋白研)

3B04p03　マトリグリカン繰返しオリゴ糖の合成
14:12　○田村純一[1,2]，大村優華[2]，田村敬裕[1]　([1]鳥取大院連農，[2]鳥取大院農)

3B04p04　*O*-マンノシルグリカン部分構造，Xylα1-3GlcAβ1-3Xylβ1-4Rbo の合成
14:23　○田村敬裕[1]，大村優華[2]，田村純一[1,2]　([1]鳥取大連農，[2]鳥取大院農)

3B04p05　ポリ ADP リボース合成に向けた実用的リボシルアデノシンユニット構築法の開発
14:34　○萩野瑠衣[1]，茂崎恵太[1]，石田秀治[1,2]，安藤弘宗[2]，田中秀則[2]　([1]岐阜大・応用生物，[2]岐阜大・G-CHAIN)

3B04p06　二環性シアル酸を用いた c 系列ガングリオシドの合成
14:45　○武馬弘幸[1]，河村奈緒子[2]，田中秀則[2]，今村彰宏[1]，石田秀治[1,2]，安藤弘宗[2]　([1]岐阜大・応用生物，[2]岐阜大・G-CHAIN)

p07〜p12 発表者の接続時間 14:56〜15:06

3B04p07　脂質ラフトの動態解明に向けたラクト系スフィンゴ糖脂質プローブの合成
15:06　○高橋舞菜[1]，白崎淳哉[2]，河村奈緒子[2]，田中秀則[2]，今村彰宏[1]，石田秀治[1,2]，安藤弘宗[2]　([1]岐阜大・応用生物，[2]岐阜大・G-CHAIN)

3B04p08　二環性シアル酸供与体の効率的合成法の検討
15:17　○吉田裕香子[1]，田中秀則[2]，今村彰宏[1]，石田秀治[1,2]，河村奈緒子[2]，安藤弘宗[2]　([1]岐阜大・応用生物，[2]岐阜大・G-CHAIN)

3B04p09　完全な α 選択的 Kdo グリコシド化法の開発研究
15:28　○浜島将伍[1]，河村奈緒子[2]，田中秀則[2]，今村彰宏[1]，石田秀治[1,2]，一柳　剛[3]，安藤弘宗[2]　([1]岐阜大・応用生物，[2]岐阜大・G-CHAIN，[3]鳥取大農)

3B04p10　糖ペプチド合成を志向したエステラーゼによる脱アセチル化反応
15:39　○吉村弥生[1,2]，長島　生[3]，横江貴之[3]，清水弘樹[3]，岸本利光[1]，千葉靖典[2]　([1](一財) バイオインダストリー協会，[2]産総研・創薬基盤，[3]産総研・生物プロセス)

3B04p11　チオエーテル基を用いた立体選択的グリコシル化の反応機構に関する研究
15:50　須田　栞[1]，前川丈武[1]，杉橋　葵[1]，西田芳弘[1,2]，○土肥博史[1,2]　([1]千葉大園芸，[2]千葉大分子キラリティー研究センター)

3B04p12　アラビナン分解酵素の機能解析に向けた D-アラビノフラノシド含有プローブの合成研究
16:01　○石渡明弘，伊藤幸成　(理研)

p13〜p18 発表者の接続時間 16:12〜16:21

3B04p13　位置選択的グリコシル化と水酸基の立体反転を基軸としたアスパラギン結合型糖鎖の合成
16:21　○松尾一郎，佐野加苗，永田光穂，高垣智迪　(群馬大院理工)

3B04p14　ポリラクトサミンの化学的構築に向けた合成研究
16:32　○細川基樹[1]，今村彰宏[1]，石田秀治[1,2]　([1]岐阜大院・自然科技，[2]岐阜大・G-CHAIN)

3B04p15　圧力変化に対する DPPC 二分子膜流動性へ及ぼす一価不飽和脂肪酸の影響
16:43　○上野弘人，西本真琴　(和歌山高専)

3B04p16　α-L-ガラクトシル化を基盤とするフコイダンの化学合成研究
16:54　○富田紘隆[1]，今村彰宏[1]，石田秀治[1,2]　([1]岐阜大院・自然科技，[2]岐阜大・G-CHAIN)

3B04p17　細菌由来コレステリル-α-グルコシド(CPG)およびその類縁体の合成
17:05　○髙登公一[1]，今村彰宏[1]，石田秀治[1,2]　([1]岐阜大院・自然科技，[2]岐阜大・G-CHAIN)

3B04p18　トキソプラズマの感染機構解明に向けたシアロ糖鎖の合成と評価
17:16　小川明日香[2]，河村奈緒子[1]，田中秀則[1]，今村彰宏[2]，石田秀治[1,2]，○安藤弘宗[1]　([1]岐阜大・G-CHAIN，[2]岐阜大・応用生物)

B05 会場　午前の部(9:30〜12:13)

有機化学，天然物化学―1120 天然物 - 生合成―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

3B05a01　大腸菌による Ergothioneine 発酵生産の効率化
9:30　○田草川隼[1]，上出倫敬[1]，佐藤康治[2]，小笠原泰志[2]，大津厳生[3]，大利　徹[2]　([1]北大院総合化学，[2]北大院工，[3]筑波大生命環境)

3B05a02　多価不飽和脂肪酸合成酵素の生産物リリース機構の解明
9:41　○林　祥平[1]，小笠原泰志[2]，佐藤康治[2]，丸山千登勢[3]，濱野吉十[3]，大利　徹[2]　([1]北大院総合化学，[2]北大院工学，[3]福井県大院生物資源)

3B05a03　Investigation of a novel epimerase in the biosynthesis of D-tryptophan containing lasso peptide, MS-271
9:52　○Zhi FENG[1]，Yasushi OGASAWARA[2]，Tohru DAIRI[2]　([1]Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

3B05a04　Biosynthesis Study of Indole Diterpene Lolitrems and its Structural Diversification
10:03　○Yulu JIANG[1]，Taro OZAKI[1]，Chengwei LIU[1]，Jun-ichi MARUYAMA[2]，Atsushi MINAMI[1]，Hideaki OIKAWA[1]　([1]Dept. of chem., Fac. Sci., Hokkaido Univ., [2]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo)

3B05a05　酸無水物型二量体ゾフィエリンの特異な八員環形成機構
10:14　○椎名哲也，松　優佑，長嶺翔太，尾﨑太郎，劉　成偉，南　篤志，及川英秋　(北大院理)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

3B05a06　FR901483 の生合成研究
10:35　○田村優依[1]，佐藤道大[1]，谷口昌要[2]，笹村智司[2]，永井浩二[2]，渡辺賢二[1]　([1]静岡県大薬，[2]大鵬薬品工業)

3B05a07　シトクロム P450 による二量化ジケトピペラジンの創製
10:46　○小谷拓也，猿渡隆佳，佐藤道大，渡辺賢二　(静岡県大薬)

3B05a08　糸状菌由来 azaphilone 系天然物 cochliodone A の生合成研究
10:57　○赤岡史人[1]，高西　潤[1]，佐藤道大[1]，三野　孝[2]，渡辺賢二[1]　([1]静岡県大薬，[2]千葉大院工)

3B05a09　担子菌由来テルペン系天然物の異種生産
11:08　○西下純平[1]，長嶺翔太[1]，尾崎太郎[1]，劉　成偉[1]，丸山潤一[2]，南　篤志[1]，及川英秋[1]　([1]北大院理，[2]東大院農)

3B05a10　担子菌由来ジテルペン erinacine 生合成経路の解明と効率的再構築
11:19　○小谷明里[1]，劉　成偉[1]，尾崎太郎[1]，呉　　静[2]，河岸洋和[2]，丸山潤一[3]，南　篤志[1]，及川英秋[1]　([1]北大院理，[2]静岡大・農，[3]東大院・農生科・応生工)

a11〜a13 発表者の接続時間 11:30〜11:40

3B05a11　コリバクチン生産制御に基づく大腸発がん化学予防剤の開発
11:40　○尾形勇二，石野皓哉，佐藤道大，恒松雄太，渡辺賢二　(静岡県大薬)

3B05a12　Fumagillin 生合成酵素 Fma-P450 の触媒する多段階酸化反応
11:51　○蜂矢志保実，岸本真治，渡辺賢二　(静岡県大薬)

3B05a13　Diels-Alderase CghA の全容解明
12:02　○岸本真治[1]，佐藤道大[1]，Jamieson Cooper[2]，横山　葵[1]，成田一仁[1]，前田直哉[1]，恒松雄太[1]，原　幸大[1]，橋本　博[1]，Houk Kendall. N.[2]，渡辺賢二[1]　([1]静岡県大薬，[2]UCLA)

B05 会場　午後の部（13:50〜17:05）

有機化学，天然物化学―1120 天然物 - 生合成―

p01〜p06 発表者の接続時間 13:40〜13:50

3B05p01　トリコスタチン生合成マシナリーの *in vitro* 再構成
13:50 ○青山美和子[1]，湯澤　賢[1]，松田悠太郎[2]，大澤宏祐[3]，吉田将人[3]，土井隆行[3]，新家一男[4]，西山　真[5,6]，葛山智久[1,6]（[1]東大院・農生科，[2]東大・農，[3]東北大院・薬，[4]産総研，[5]東大・生物工学セ，[6]東大・微生物イノベ連携機構）

3B05p02　放線菌における新奇芳香環生合成マシナリーの解明
14:01 ○張　　倢[1]，トンウェイリー[1]，湯澤　賢[1]，白石太郎[1]，新家一男[2]，西山　真[3,4]，葛山智久[1,4]（[1]東大院・農生科，[2]産総研，[3]東大・生物工学セ，[4]東大・微生物イノベ連携機構）

3B05p03　麹菌異種発現系を用いた Abscisic Acid の生合成研究（4）
14:12 ○瀧野純矢，小崎拓登，劉　成偉，尾崎太郎，南　篤志，及川英秋（北大院理）

3B05p04　麹菌異種発現系を用いた PR-toxin の生合成研究
14:23 ○佐藤芳郎[1]，瀧野純矢[1]，劉　成偉[1]，尾崎太郎[1]，丸山潤一[2]，南　篤志[1]，及川英秋[1]（[1]北大院理，[2]東大院農）

3B05p05　カプサイシン生合成におけるバニリルアミン生成への推定アミノトランスフェラーゼの関与
14:34 ○中里彩夏[1]，金島一樹[1]，三澤悠貴[1]，佐野香織[1]，中谷祥恵[1]，田中義行[2]，古旗賢二[1]（[1]城西大学，[2]京都大学）

3B05p06　カプサイシン生合成における推定アミノトラスフェラーゼのアミノ酸置換の影響
14:45 ○金島一樹[1]，中里彩夏[1]，佐野香織[2]，中谷祥恵[1]，田中義行[3]，古旗賢二[1]（[1]城西大院薬，[2]城西大理，[3]京都大）

p07〜p12 発表者の接続時間 14:56〜15:06

3B05p07　ラホヤマイシン生合成に関与する脂肪族ニトロ化酵素に関する研究
15:06 ○冨田宏矢[1]，勝山陽平[1,2]，大西康夫[1,2]（[1]東大院・農生科・応生工，[2]東大・微生物イノベ連携機構）

3B05p08　2 つの II 型 PKS と FAS 間における ACP のクロストークに関する *in vitro* 解析
15:17 ○堀内真展[1]，杜丹ヤオ[1]，勝山陽平[1,2]，Burkart Michael D[3]，大西康夫[1,2]（[1]東大院農生科・応生工，[2]東大・微生物イノベ連携機構，[3]UCSD, Dep. of Chem. and Biochem.）

3B05p09　非リボソームペプチド cirratiomycin の生合成研究
15:28 ○李　佳鳳[1]，曽根　薫[1]，新家一男[2]，勝山陽平[1,3]，大西康夫[1,3]（[1]東大院・農生科・応生工，[2]産総研，[3]東大・微生物イノベ連携機構）

3B05p10　JBIR-34,35 の生合成に関わる NRPS のクライオ電子顕微鏡による解析
15:39 ○浦野直樹[1]，勝山陽平[1,2]，安達成彦[3]，川崎政人[3]，千田俊哉[3]，大西康夫[1,2]（[1]東大院・農生科，[2]微生物連携機構，[3]高エネ機構・物構研）

3B05p11　放線菌が生産するジアゾ基含有トリペプチド alazopeptin の全生合成経路の解明
15:50 勝山陽平[1,3]，○川合誠司[2]，菅谷優子[1]，冨田宏矢[1]，大西康夫[1,3]（[1]東大院・農生科・応生工，[2]東大農・生命化学工学，[3]東大・微生物イノベ連携機構）

3B05p12　ビセニスタチン生合成におけるアシル基転移酵素 VinK とアシルキャリアタンパク質間の相互作用解析
16:01 ○川田浩一，千菅太一，宮永顕正，工藤史貴，江口　正（東工大理）

p13〜p16 発表者の接続時間 16:12〜16:21

3B05p13　コナダニ類に由来する脂肪族ギ酸エステルの生合成
16:21 ○森山太介，荒谷剛史，清水伸泰（京都先端科学大学）

3B05p14　ベンザスタチン生合成においてニトレン中間体を介した環化反応を触媒する P450 の X 線結晶構造解析
16:32 ○堤　隼馬[1]，浦野直樹[1]，勝山陽平[1,2]，大西康夫[1,2]（[1]東大院・農生科・応生工，[2]東大・微生物イノベ連携機構）

3B05p15　cinnamyl alcohol dehydrogenase（CAD）がトウガラシのカプシエイト生合成のキー酵素である
16:43 ○鵜澤雄也[1]，金島一樹[2]，中里彩夏[3]，佐野香織[1]，橋本雅司[1]，中谷祥恵[2]，古旗賢二[2]（[1]城西大・理・化学，[2]城西大・院・薬科学，[3]城西大・薬・薬科学）

3B05p16　辛味度の異なるトウガラシ品種におけるバニリルアミン合成能と推定アミノトランスフェラーゼ発現量の関連
16:54 ○三澤悠貴[1]，田中義行[2]，中谷祥恵[1]，古旗賢二[1]（[1]城西大院薬，[2]京都大院農）

B06 会場　午前の部（9:30〜12:13）

動物―1510 個体 - 生理・栄養・代謝，生体機能，生体制御，メタボローム―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

3B06a01　卵巣摘出ラットにおける骨髄ステロール量の変動
9:30 ○江口小百合[1]，宮﨑優里花[1]，小野雅博[1]，城内文吾[2]，佐藤匡央[2]（[1]九大院生資環，[2]九大院農）

3B06a02　脂肪細胞機能調節におけるイソプレノイド合成経路の役割の検討
9:41 ○後藤　剛[1,2]，Yeh Yu-Sheng[1]，Kwon Jungin[1]，Jheng Huei-Fen[1]，高橋春弥[1]，野村　亘[1,2]，井上和生[1]，河田照雄[1,2]（[1]京都大院・農，[2]京都大・学際融合教育研究推進センター）

3B06a03　CYP7B1 and its function on the progression of non-alcoholic steatohepatitis
9:52 ○Napatsorn DUMRONGKULCHART, Yuichi WATANABE, Makoto SHIMIZU, Yoshio YAMAUCHI, Ryuichiro SATO（Dept. of Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. of Agr. and Life Sci., Univ. of Tokyo）

3B06a04　非アルコール性脂肪肝を制御する新たな転写因子の同定
10:03 ○清水　誠[1]，不野歩美[1]，梅村真理子[2]，高橋勇二[2]，山内祥生[1]，佐藤隆一郎[1]（[1]東京大農，[2]東京薬大生命）

3B06a05　寒冷刺激に応答する転写因子 ATF5 の機能解析
10:14 ○不野歩美[1]，清水　誠[1]，梅村真理子[2]，高橋勇二[2]，佐藤隆一郎[1]（[1]東京大 農生科 応生化，[2]東京薬大）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

3B06a06　エストラジオールは白色脂肪組織の FGF21 および脱共役タンパク質 UCP-1 の遺伝子発現を抑制する
10:35 ○加藤　拓，佐藤遼太，守谷浩子，横堀友希，長谷川由希子，井上佳奈，竹中麻子（明治大・農）

3B06a07　膵臓 β 細胞機能調節作用を介した胎児期男性ホルモンの DOHaD への関与
10:46 ○原田直樹[1]，四元優佑[1]，甲木孝弘[1]，與田安紘[1]，乾　　博[2]，山地亮一[1]（[1]大阪府大生命環境，[2]大阪府大栄養）

3B06a08　細胞膜上性ステロイドホルモン受容体 mPRε を介した代謝機能制御
10:57 ○渡辺啓太，劉　　瑩，大植隆司，木村郁夫（東京農工大学）

3B06a09　グルカゴンはグルコース代謝に重要でなくアミノ酸異化代謝の転写制御に重要である
11:08 ○小田裕昭[1]，半澤史聡[2]，橋本尚央子[1]，孫　淑敏[1]，池田彩子[2]，林　　敬[3]（[1]名古屋大生命農，[2]名古屋学芸大，[3]名古屋大環境医学研）

3B06a10　筋萎縮転写因子 FOXO1 はエネルギー代謝に重要な転写共役因子 PGC-1β の遺伝子発現を負に制御する
11:19 ○亀井康富，中井志帆，大藪　葵，畑澤幸乃（京都府立大学）

a11〜a13 発表者の接続時間 11:30〜11:40

3B06a11　線虫 *C. elegans* の幼虫休眠を制御する短鎖神経ペプチド FLP-6 の機能解析
11:40 ○河野　強[1,2]，荒井千佳子[1]，堀　結佳[2]，小野真弘[2]，松永洋平[3]，岩﨑　崇[1,2]（[1]鳥取大・農，[2]鳥取大院・持続性社会，[3]HIROTSU バイオ）

3B06a12　線虫 *C. elegans* の幼虫休眠を制御する短鎖神経ペプチド受容体 FRPR-4 の解析
11:51 ○小野真弘[1]，松永洋平[2]，美藤友博[1]，岩﨑　崇[1]，河野　強[1]（[1]鳥取大院，[2]HIROTSUバイオ）

3B06a13　線虫 *Caenorhabditis elegans* のビタミン C 生合成経路の同定
12:02 ○薮田行哲[1]，青木優果[1]，苅谷あゆみ[1]，和田滉佑[1]，柳本綾子[1]，原　寛佳[1]，岡本奈穂[1]，美藤友博[1]，吉田晋一[2]，石原　亨[1]，渡邊文雄[1]（[1]鳥取大農，[2]鳥取県産技センター）

B06 会場　午後の部（13:50〜17:27）

動物―1510 個体 - 生理・栄養・代謝，生体機能，生体制御，メタボローム―

p01〜p06 発表者の接続時間 13:40〜13:50

3B06p01　新規肝線維化発症関連遺伝子としての 67-kDa laminin receptor の同定
13:50 ○西岡成汰，竹下菜津子，錦戸里紗，山田脩平，藤村由紀，立花宏文（九大院農院・生機科）

3B06p02　四塩化炭素誘導急性肝障害の再生過程におけるマクロファージ除去の影響
14:01 ○三浦　徳[1]，池田志織[2]，増澤(尾﨑)依[2]，細野　崇[2,3]，関泰一郎[2,3]（[1]日大・生資科・総合研究所，[2]日大・生資科・生命化，[3]日大院・生資科・応生科）

3B06p03　非アルコール性脂肪肝炎，急性肝障害モデルマウスにおける尿素回路関連酵素に関する研究
14:12 ○LI WEITONG[1]，三浦　徳[2]，北田祐也[1]，石倉菜奈[2]，増澤(尾﨑)依[2]，細野　崇[1,2]，関泰一郎[1,2]（[1]日大院・生資科・応生科，[2]日大・生資科・生命化）

3B06p04　肺線維症におけるタンパク質架橋化酵素の機能解析とその新規基質の同定
14:23 ○竹内大修[1]，桑田啓子[2]，辰川英樹[1]，人見清隆[1]（[1]名大院創薬，[2]名大・IT b M）

3B06p05　Investigations of Biochemical Properties and Novel Function of Fibrinogen by Establishing Knockout Medaka (*Oryzias latipes*)
14:34 ○Qi Meng[1]，Risa Suzuki[1]，Yuko Watanabe[1]，Rina Oguri[1]，Hideki Tatsukawa[1]，Hisashi Hashimoto[2]，Kiyotaka Hitomi[1]（[1]Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ.，[2]Grad. Sch. Sci., Nagoya Univ.）

3B06p06　魚類におけるマイクロプラスチックの入出力代謝応答の評価
14:45 ○藤村哲平[1]，坂田研二[2]，菊地　淳[1,2,3]（[1]横浜市立大学大学院　生命医科学研究科，[2]特定国立研究開発法人理化学研究所 環境資源科学研究センター，[3]名古屋大学大学院 生命農学研究科）

p07〜p12 発表者の接続時間 14:56〜15:06

3B06p07　離乳期マウスにおける腸内細菌叢形成に影響する消化管内タンパク質の発現解析
15:06 ○鬼頭一平[1]，伊藤大貴[1]，宮田真路[2]，灘野大太[1]，松田　幹[1]，大島健司[1]（[1]名古屋大農，[2]東京農工大農）

3B06p08　腸内共生細菌由来ポリアミンは腸管粘膜バリアと免疫を調整する
15:17 ○中村篤央[1,2]，栗原　新[3]，松本光晴[2]，長谷耕二[3]（[1]慶應大薬，[2]協同乳業，[3]近畿大生物理工）

3B06p09　転写抑制因子 Bach1 は大腸粘液分泌に関与する
15:28 ○谷川　潤[1]，髙木智久[2]，水島かつら[2]，平井泰子[2]，武藤哲彦[3]，五十嵐和彦[3]，内藤裕二[2]，東村泰希[1,2]（[1]石川県大・生資環，[2]京府医院・医，[3]東北大院・医）

3B06p10　社会的ストレス応答に与える週齢の影響
15:39 ○榊原啓之[1]，浦上倫緒[1]，田中　航[1]，松山弘希[1]，柴田ひかり[2]，平野平野明伽音[2]，下位香代子[2]（[1]宮崎大学農学部，[2]静岡県立大学）

3B06p11　体幹への着圧が代謝・生理機能に及ぼす影響
15:50 ○嶋田耕育[1]，野原正勝[1,4]，亀井飛鳥[1]，篠崎文夏[1]，立田みどり[2]，渡邉隆之[2]，徳田充孝[2]，阿部啓子[1,3]（[1]KISTEC，[2]株式会社ダイアナ，[3]東大院農，[4]岡理大・獣医）

3B06p12　着圧がマウス肝臓遺伝子発現に及ぼす影響
16:01 ○篠崎文夏[1]，嶋田耕育[1]，亀井飛鳥[1]，野原正勝[1,2]，立田みどり[3]，渡邉隆之[3]，徳田充孝[3]，阿部啓子[1,4]（[1]KISTEC，[2]岡山理科大学，[3]株式会社ダイアナ，[4]東大院農）

p13〜p18 発表者の接続時間 16:12〜16:21

3B06p13　カイコのクワ認識に関与する成分と味覚受容体の探索
16:21 ○小林優理，鈴木俊太，東原和成（東京大学 大学院農学生命科学研究科 応用生命化学専攻）

3B06p14　オオカミカイロモン類似物質の気相中濃度の継時変化はマウスの忌避行動に影響を及ぼす
16:32 ○長田和実[1]，宮園貞治[2]，野口智弘[2]（[1]日大生物資源科学，[2]旭川医大医）

3B06p15　リクガメのエサ探索についての行動および分子生物学的解析
16:43 ○海老原充[1]，西岡ゆきこ[2]（[1]関東学院大理工，[2]石川県立大学）

3B06p16　Sterol Composition Analysis of the Two-Spotted Crickets, Gryllus bimaculatus
16:54 ○Yin Shan Isa MACK，Shinji Nagata（The University of Tokyo）

3B06p17　ネムリユスリカにおける新規トレハローストランスポーターの探索と機能解析
17:05 ○水谷晃輔[1]，菊田真吾[2]，コルネットリッシャー[3]，宮田佑吾[3]，徳本翔子[1]，黄川田隆洋[1,3]（[1]東京大新領域，[2]茨城大学農，[3]農研機構）

3B06p18　イヌとウシの酸性キチナーゼの不活性化
17:16 ○小山文隆[1]，樫村明徳[1]，脇田悟誌[1]，坂口政吉[1]，菅原康里[1]，田畑絵理[1,2]（[1]工学院大・先進工，[2]日本学術振興会・特別研究員(DC[1])）

B07 会場　午前の部（9:30〜12:13）

動物―1521 細胞 - 情報伝達，細胞応答，分化制御（8 題）1540 タンパク質 – 構造，機能，活性，修飾，分解，局在，プロテオーム（5 題）―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

3B07a01　AMPK は TSC2 を介して AP-1 活性を制御する
9:30 ○山下達也[1]，松本雄宇[1,2]，鈴木　司[1,2]，井上　順[1,2]，山本祐司[1,2]（[1]東農大院・農・農化，[2]東農大・応生・農化）

3B07a02　AMPK が SRSF1 を介して選択的スプライシングに及ぼす影響の解析
9:41 ○鈴木　司[1,2]，松本英里[1]，松本雄宇[1,2]，井上　順[1,2]，山本祐司[1,2]（[1]東農大院・農・農化，[2]東農大・応生・農化）

3B07a03　プロスタグランジン A_2 硫酸抱合体のプロスタグランジン受容体を介した生理機能の解明
9:52 ○児玉直輝[1]，黒木勝久[1]，Ming-Cheh Liu[2]，水光正仁[1]，榊原陽一[1]（[1]宮崎大学，[2]トレド大学）

3B07a04　小胞体の形態やストレス応答に対する五環性トリテルペノイド類の作用機序の解析
10:03 ○馬場康輔，佐々木咲季，片岡孝夫（京工繊大院・応用生物）

3B07a05　COX と PPARγ によるアレルギー応答抑制機構
10:14 ○長田和樹，笠倉和巳，三浦亮介，八代拓也，西山千春（東理大基礎工）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

3B07a06　ドラッグデザインに有用なニューロセルピン熱安定型変異体の創出
10:35 ○陶山莉菜乃[1]，原田彰大[1]，三上文三[2,3]，恩田真紀[1]（[1]大阪府立大学・理・生物科学，[2]京都大学生存圏研究所，[3]京都大学エネルギー理工学研究所）

3B07a07　病原性ニューロセルピン変異体 H338R の調整法の確立と諸性質の解析
10:46 ○品田紗智子，小林　誠，恩田真紀（大阪府立大学・理・生物科学）

3B07a08　セルピンの線維化と凝集体形成における C 末端領域の関わり
10:57 ○米倉百音，廣畠早紀，西川勇樹，恩田真紀（大阪府立大・理・生物科学）

3B07a09　サリドマイド催奇性に関わる $CRL4^{CRBN}$ の新規基質の同定
11:08 ○朝妻知子，伊藤拓水，半田　宏（東医大医）

3B07a10　ヒトとマウスキトトリオシダーゼの糖転移活性の評価
11:19 ○木村将大[1,2]，渡邊　尭[1]，関根一考[1]，石塚ひとみ[1]，池尻　碧[1]，小山文隆[1]（[1]工学院大・先進工，[2]日本学術振興会・特別研究員 DC[2]）

a11〜a13 発表者の接続時間 11:30〜11:40

3B07a11　Caenorhabditis elegans を用いた低温暴露応答における CD36 の機能解析
11:40 ○松本晋也，小粥みどり，原田明穂，廣田さやか，宮崎愛子，一谷美月，高桑沙也加，平松あい（京女大）

3B07a12　脂質代謝制御因子 Insig-酸化ステロール結合の新規応答
11:51 ○渡邉雄一，三吉翔子，清水　誠，山内祥生，佐藤隆一郎（東大院・農生科・応生化）

3B07a13　ApoE 欠損マウスにおける自然抗体の機能解明
12:02 ○林　世映，近澤未歩，板倉正典，佐々木栄太，内田浩二（東京大学）

B07 会場　午後の部（13:50〜17:27）

動物―1540 タンパク質 – 構造，機能，活性，修飾，分解，局在，プロテオーム（11 題）1530 遺伝子 - 構造，発現制御，機能，修飾，トランスクリプトーム，エピジェネティクス，ゲノミクス，ゲノム編集（7 題）―

p01〜p06 発表者の接続時間 13:40〜13:50

3B07p01　Lamin A isoform 4 に生ずる *N*-ミリストイル化の解析
13:50 ○七田真由，岩田春菜，守屋康子，内海俊彦（山口大院創成科）

3B07p02　SCF ユビキチンリガーゼ調節因子 DCUN1D3 に生じる *N*-ミリストイル化及び特異的切断・分解の解析
14:01 ○西上美里，細川拓郎，守屋康子，内海俊彦（山口大院創成科）

3B07p03　*N*-ミリストイル化タンパク質結合因子 UNC119A と *N*-ミリストイル化タンパク質との相互作用の解析
14:12 ○岩本奈津子，大塚　葵，守屋康子，内海俊彦（山口大院創成科）

3B07p04　生体内におけるピロール化タンパク質の生成と機能
14:23 ○近澤未歩[1]，岩田汐里[1]，林　世映[1]，板倉正典[1]，佐々木栄太[1]，吉武　淳[2]，柴田貴広[2]，内田浩二[1]（[1]東大農，[2]名大農）

3B07p05　タンパク質の安定性－胚発生過程におけるリゾチームの構造変化－
14:34 ○室井由起子[1]，杉元康志[2]（[1]鹿児島大農，[2]九州栄養福祉大）

3B07p06　UBE3B によるプロテアソーム制御機構の解析
14:45 ○岡田麻衣子[1,2]，岡本一将[2]，根本莉緒[1]，生村瞳美[1]，矢野和義[1,2]（[1]東京工科大・応用生物，[2]東京工科大院・バイオニクス）

p07〜p12 発表者の接続時間 14:56〜15:06

3B07p07　TGF-β シグナル伝達系における主要転写因子 SMAD2/3 による補因子選択機構
15:06 ○宮園健一[1]，森脇沙帆[1]，大野陽介[1]，和田ひかる[1]，伊藤友子[1]，栗崎　晃[2,3]，浅島　誠[2]，田之倉優[1]（[1]東大農，[2]産総研，[3]奈良先端大バイオサイエンス）

3B07p08　魚類刺棘由来毒素関連タンパク質の組換え体発現とその性質
15:17 ○佐藤　吏[1]，畠山智充[1]，郷田秀一郎[1]，海野英昭[1]，城崎紗也[2]，岸川彰宏[1]（[1]長崎大工，[2]九州大工）

3B07p09　コモンマーモセットにおける酸性キチナーゼの遺伝子発現解析とその酵素機能
15:28 ○田畑絵理[1,2]，樫村明徳[1]，上原麻衣子[1]，脇田悟誌[1]，菅原康里[1]，坎本晃海[3]，佐々木えりか[3]，小山文隆[1]（[1]工学院大先進工，[2]日本学術振興会・特別研究員（DC[1]），[3]実験動物中央研究所）

3B07p10　脂肪酸合成律速酵素 ACC 複合体構成因子の探索
15:39 ○高橋　舜[1]，平口遥香[2]，松本雄宇[1,2]，鈴木　司[1,2]，山本祐司[1,2]，井上　順[1,2]（[1]東農大・応生・生応，[2]東農大・応生・農化）

3B07p11　腸管上皮細胞由来抗菌性レクチン RegIV に抵抗性をもつ乳酸菌の細胞外多糖の特性
15:50 ○池田咲生子，西尾英実，吉岡ちなみ，渡辺寛人（明治大農）

3B07p12　前頭前野における恐怖記憶再固定化と消去エングラムによる恐怖記憶制御機構
16:01 ○石川理絵，喜田　聡（東京大院・農・応用生命化学）

p13〜p18 発表者の接続時間 16:12〜16:21

3B07p13　前頭前野-扁桃体回路は社会行動を制御し，前頭前野-視床室傍核回路は社会記憶形成を制御する
16:21 ○谷水俊之[1]，櫻内華恵[1]，石川理絵[1,2]，喜田　聡[1,2]（[1]東農大院・農・バイオ，[2]東大院・農・応用生命化学）

3B07p14　恐怖記憶固定化に対する青斑核の役割の解析
16:32 ○在原　悠[1]，喜田　聡[1,2]（[1]東農大院・農・バイオ，[2]東大院・農・応用生命化学）

3B07p15　アデノシン A2a 受容体が海馬依存性記憶想起を制御する
16:43 ○渡邊亮介[1]，長谷川俊介[1]，喜田　聡[1,2]（[1]東農大院・農・バイオ，[2]東大院・農・応用生命化学）

3B07p16　ニワトリ生殖細胞分化における PRDM14 の機能解析
16:54 ○金岡英徳[1]，萩原遥太[1]，奥嵜雄也[1]，松林和茉[1]，鈴木孝幸[3]，飯島信司[2]，西島謙一[1]（[1]名大院工，[2]愛工大，[3]名大院農）

3B07p17　ヒストン脱アセチル化酵素による白色脂肪細胞の UCP1 発現制御機構の解析
17:05 ○川原崎聡子[1]，YULIANA Ana[1]，鄭　蕙芬[1]，野村　亘[1,2]，高橋春弥[1]，荒　　武[1]，井上和生[1]，河田照雄[1,2]，後藤　剛[1,2]（[1]京大院農・食品生物，[2]京大・生理化学研究ユニット）

3B07p18　腸管幹細胞の stemness に及ぼす IL-4 の影響
17:16 ○齋藤由季，佐藤美佳，岩槻　健，只石　幹，服部一夫，清水　誠（東農大農）

B08 会場　午前の部（9:30〜11:30）

植物―1680 植物工学 - 育種，物質生産，形質転換（5 題）1660 タンパク質，酵素 - 機能，調節（5 題）―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

3B08a01　真核微細藻類 *Nannochloropsis* におけるプラチナ TALENs を利用した高効率外来遺伝子フリーゲノム編集ツールの開発
9:30　○栗田朋和[1]，諸井桂之[2]，岩井雅子[3]，岡崎久美子[1]，野村誠治[4]，斎藤史彦[4]，高見明秀[4]，坂本　敦[1]，太田啓之[3]，佐久間哲史[1]，山本　卓[1]（[1]広島大・院統合生命，[2]広島大・院理学，[3]東京工業大・生命理工，[4]マツダ株式会社）

3B08a02　ミドリムシ産業利用種における RNP 複合体を用いた高効率ゲノム編集法の開発
9:41　○野村俊尚[1,2]，井上小槙[1]，上原由紀子[1]，山田康嗣[2,3]，岩田　修[2,3]，鈴木健吾[2,3]，持田恵一[1,2,4,5]（[1]理研CSRS，[2]理研 BZP，[3]ユーグレナ，[4]横市大，[5]岡大）

3B08a03　スギ（*Cryptomeria japonica* D. Don）における効率的なゲノム編集技術の開発
9:52　○七里吉彦[1]，上野真義[2]，大宮泰徳[2]，二村典宏[2]，遠藤真咲[3]，西口　満[2]，小長谷賢一[1]，谷口　亨[4]（[1]森林総研森林バイオ，[2]森林総研，[3]農研機構・生物機能，[4]森林総研林木育種セ）

3B08a04　Poly-His 法を利用したモデル・非モデル植物細胞へのタンパク質直接導入
10:03　○大村昂誠[1]，七里吉彦[2]，遠藤圭太[3]，河野　強[1]，岩崎　崇[1]（[1]鳥取大院・農，[2]森林総研森林バイオ，[3]森林総研林木育種センター）

3B08a05　越淡麗 *Sdr4-k* 穂発芽耐性を持たせた酒米育種
10:14　○岩野舞衣子[1]，Rana Md Masud[1]，金澤伸矢[2]，金古堅太郎[1]，三ツ井敏明[1,2]（[1]新潟大学院 自然研，[2]新潟大 農）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

3B08a06　微細藻類ユーグレナのワックスエステル発酵制御因子 WSRK がピルビン酸：$NADP^+$ 酸化還元酵素のリン酸化および酵素活性におよぼす影響
10:35　○駒井陽輔[1]，石井侑樹[1]，小川貴央[1]，丸田隆典[1]，重岡　成[2]，中澤昌美[3]，石川孝博[1]（[1]島根大院・自然科学，[2]近畿大・附属農場，[3]阪府大院・生命）

3B08a07　天然ゴム生合成マシーナリーのインビトロ再構成系構築の試み
10:46　○西野　輝[1]，黒岩　凰[1]，モンドル慶子[1]，山口晴彦[2]，宮城ゆき乃[2]，山下　哲[3]，高橋誠司[4]，戸澤　譲[1]（[1]埼玉大院理工，[2]住友ゴム工業㈱，[3]金沢大理工，[4]東北大院工）

3B08a08　インビトロ再構成系した天然ゴム生合成酵素の活性解析
10:57　○黒岩　凰[1]，西野　輝[1]，廣森美樹[2]，モンドル慶子[1]，山口晴彦[3]，宮城ゆき乃[3]，山下　哲[4]，高橋征司[2]，戸澤　譲[1]（[1]埼玉大院理工，[2]東北大院工，[3]住友ゴム工業㈱，[4]金沢大理工）

3B08a09　Screening for defense-related genes in two latex-producing plants.
11:08　○Hyrmeya Eric SAVADOGO[1]，Yui SHIOMI[1]，Yasuda JUNKO[1]，Toshiharu AKINO[1]，Kenji MIURA[2]，Masamitsu YAMAGUCHI[1]，Hideki YOSHIDA[1]，Takanari UMEGAWACHI[1]，Ryo TANAKA[1]，Dang Ngoc Anh SUONG[1]，Sakihito KITAJIMA[1]（[1]Department of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology，[2]Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba）

3B08a10　かいわれスプラウトのアグロインフィルトレーションを用いる PLAT ドメイン含有タンパク質の抗昆虫活性の検討
11:19　○安田詢子[1]，秋野順治[1]，三浦謙治[2]，北島佐紀人[1]（[1]京都工芸繊維大・応用生物，[2]筑波大）

B08 会場　午後の部（13:50〜17:16）

植物―1660 タンパク質，酵素 - 機能，調節（12 題）1671 遺伝子 - 機能，発現制御（5 題）―

p01〜p06 発表者の接続時間 13:40〜13:50

3B08p01　ブラシノステロイドのマスター転写因子 BIL1/BZR1 のプロモーター選択特異性の解明
13:50　○野崎翔平[1]，宮川拓也[1]，光田展隆[2]，寺田　透[3]，山上あゆみ[4]，中野雄司[4]，田之倉優[1]（[1]東大院・農学生命科学，[2]産総研・生物プロセス研究部門，[3]東大院・情報学環，[4]京大院・生命科学）

3B08p02　キチナーゼ様タンパク質は触媒残基を導入しても活性化しない
14:01　○大川一明，岸上奈央，貴田雄太，小山文隆（工学院大・先進工）

3B08p03　ダイズのイソフラボノイド生合成酵素の X 線結晶構造解析
14:12　○山下　哲[1]，今泉璃城[1]，中多　舜[1]，竹下浩平[2]，和氣駿之[3]，山本雅貴[2]，高橋征司[3]，片岡邦重[1]，中山　亨[3]（[1]金沢大 理工，[2]理研 RSC，[3]東北大院 工）

3B08p04　好熱性と常温性シアノバクテリア RuBisCO の構造活性相関研究
14:23　○河野飛鳥[1]，磯野香奈子[1]，合田初奈[2]，林美彩希[2]，蘆田弘樹[1]（[1]神戸大院・人間発達環境，[2]神戸大・発達）

3B08p05　オゴノリ科海藻の赤血球凝集活性に及ぼす培養水温の影響
14:34　○垣田浩孝[1,2]，有本清也[1]，音泉良太[2]，三澤彩香[2]（[1]日大院総合基，[2]日大文理）

3B08p06　紅藻スサビノリ由来熱可溶性タンパク質 HES1,2,3 の比較
14:45　○岩本博行[1]，神原明梨[1]，井上昌也[1]，三輪泰彦[1]，山口健一[2]（[1]福山大生命工，[2]長崎大院水環）

p07〜p12 発表者の接続時間 14:56〜15:06

3B08p07　ジベレリン及びオーキシンの恒常性を維持する共通の代謝システム
15:06　○竹原清日[1]，三上文三[2]，桜庭　俊[3]，吉村久子[1]，松岡　信[1]，上口（田中）美弥子[1]（[1]名大・生物機能セ，[2]京大・生存圏，[3]量研）

3B08p08　2-オキソグルタル酸要求性酸化酵素に対するプロヘキサジオンの選択的阻害の解析
15:17　○尾原寛之[1]，竹原清日[1]，三上文三[2]，松岡　信[1]，上口（田中）美弥子[1]（[1]名大・生物機能セ，[2]京大・生存圏）

3B08p09　植物ホルモン関連因子の構造生物学的解析に向けた試み
15:28　○杉原諒彦[1]，竹原清日[1]，三上文三[2]，松岡　信[1]，上口（田中）美弥子[1]（[1]名大・生物機能セ，[2]京大・生存圏研）

3B08p10　イネ除草剤抵抗性遺伝子 *HIS1* および *HSL1* の系譜解析
15:39　○戸澤　譲[1]，吉田　均[2]（[1]埼玉大院理工，[2]農研機構）

3B08p11　イネ除草剤不活性化酵素 HIS1 および HSL のタンパク質機能改変
15:50　○佐久間望，親松紗璃依，高村夏生，高荷幸恵，戸澤　譲（埼玉大学院理工）

3B08p12　イネ除草剤不活性化酵素 HIS1 の新たな基質の発見とその解析
16:01　○親松紗璃依[1]，高村夏生[1]，山崎明彦[2]，酒井基成[2]，鈴木　悟[2]，関野景介[2]，黒木　慎[3]，戸澤　譲[1]（[1]埼玉大学院理工，[2]エスディーエスバイオテック㈱，[3]農研機構）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:12〜16:21

3B08p13　SLIM1 による *SDI1* の発現促進：硫黄欠乏下におけるグルコシノレート生合成の効率的な抑制機構
16:21　○川口諒太[1]，丸山-仲下明子[2]（[1]九大院生資環，[2]九大院農）

3B08p14　新規転写因子 GRAB2 および Zn2 による OsPR7 遺伝子の転写制御機構
16:32 ○中塚達人[1]，西村成史[1]，平井洋行[2]，古川岳人[2]，仲下英雄[3]，蔡　晃植[1,2,4]（[1]長浜バイオ大院・バイオ，[2]長浜バイオ大・バイオ，[3]福井県立大院・資源，[4]長浜バイオ大・ゲノム編集研究所）

3B08p15　イネカルス形成制御遺伝子の探索と解析
16:43 ○西尾　陸[1]，春名沙紀[1]，沼本　穂[1]，森田重人[1,2]，増村威宏[1,2]（[1]京都府立大学・生命環境，[2]京都府農技セ・生資セ）

3B08p16　amaterasu-oomikami：二倍体植物への進化の扉を開いた遺伝子
16:54 ○山下一郎（進化生物学研究庵 811）

3B08p17　雑種強勢形質を特徴付ける代謝物の探索とその制御機構の解析
17:05 ○杉　直也[1]，椙澤都月[1]，レティノクイン[1]，光田展隆[2]，藤原すみれ[2]，鈴木　穣[3]，斎藤和季[4,5]，草野　都[1,4]，柴　博史[1]（[1]筑波大院・生命環境，[2]産総研・生物プロセス，[3]東大・新領域，[4]理研・CSRS，[5]千葉大・薬）

B09 会場　午前の部（9:52〜12:13）

生物科学―1730 生物工学 - 酵素工学・生物反応工学，生物材料工学，生体医用工学―

a03〜a05 発表者の接続時間 9:42〜9:52

3B09a03　アシタバ（*Angelica keiskei*）由来 *Tps* 遺伝子のクローニングと機能解析
9:52 ○飯村九林[1]，八反順一郎[2]，三沢典彦[2]，新藤一敏[1]（[1]日女大・家政，[2]石川県大・生資研）

3B09a04　ジスルフィド結合導入による MMLV 逆転写酵素の耐熱化
10:03 ○神田橋眞子[1]，李　瞳陽[2]，生川雄太郎[2]，馬場美聡[2]，兒島憲二[1,2]，滝田禎亮[1,2]，肥山貴圭[3]，山崎友実[3]，保川　清[1,2]（[1]京大農，[2]京大院農，[3]東洋紡）

3B09a05　*cre* 発現ベクターの改良による *Thermus thermophilus* の Cre/*lox* 多重遺伝子破壊法の耐熱化
10:14 ○平津圭一郎[1]，西村政隆[1]，布柴達男[2]（[1]防衛大・応化，[2]国基大・教養）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

3B09a06　ヤスデ，*Oxidus gracilis* 由来のヒドロキシニトリルリアーゼのタンパク質工学による触媒効率およびエナンチオ選択性の向上
10:35 ○浅野泰久，チャイキュウシリポーン，元島史尋（富県大工）

3B09a07　Structural base to improve the enzyme activity and enantioselectivity of hydroxynitrile lyase from millipede, *Parafonteria laminate* for (*R*)-2-chloromandelonitrile synthesis
10:46 ○Aem NUYLERT[1,2]，Yasuhisa ASANO[1,2]（[1]Biotechnology Research Center, Toyama Prefectural Univ., [2]Asano Active Enzyme Molecule Project, ERATO, JST）

3B09a08　酵素担持ペーパーデバイスにおいてベタイン誘導体が担持酵素の保存安定性に及ぼす影響
10:57 ○青木拓真[1]，山本真史[1,2]，北村武大[2]，森田祐子[2]，甲元一也[1]（[1]甲南大FIRST，[2]第一工業製薬㈱）

3B09a09　珪藻殻への有用タンパク質提示発現による機能性材料開発
11:08 ○林日佳里，大西菜月，米田広平，松田祐介（関西学院大院）

3B09a10　R848 内封リポソームによる腫瘍随伴マクロファージ再教育及び抗体医薬 ADCP 効果増強
11:19 ○李　　昊，曽宮正晴，黒田俊一（阪大産研）

a11〜a13 発表者の接続時間 11:30〜11:40

3B09a11　化粧品素材の生産における緑藻細胞の直接的な利用方法の構築
11:40 ○小澤七海[1]，崎濱由梨[1]，中西昭仁[1]，軽部征夫[2]（[1]東京工科大・応生，[2]東京工科大・片柳研）

3B09a12　微生物産生ブロック共重合体ポリマーの構造機能相関の解析
11:51 ○佐藤圭悟[1]，影山友基[2]，藤井隆之輔[2]，松本謙一郎[3]（[1]北大工，[2]北大総合化学院，[3]北大院工）

3B09a13　新規配列制御型グリコール酸ポリマーの生合成と構造解析
12:02 ○梶川彩香[1]，榊原早也果[2]，荒井修造[2]，大井俊彦[3]，堀　千明[3]，松本謙一郎[3]（[1]北大工，[2]北大総合化学院，[3]北大院工）

B09 会場　午後の部（13:50〜17:27）

植物―1610 一次代謝，二次代謝，メタボローム―

p01〜p06 発表者の接続時間 13:40〜13:50

3B09p01　巨大植物二次代謝酵素の発見：チューリップ原種からのチューリッポシド B 変換酵素の精製および性状解析
13:50 ○上田真子[1]，野村泰治[1,2]，北岡直樹[1,2]，加藤康夫[1,2]（[1]富山県大院・工，[2]富山県大・生医工研セ）

3B09p02　チューリップ原種からのチューリッポシド A 変換酵素の精製および性状解析
14:01 ○野村泰治[1,2]，上田真子[1]，北岡直樹[1,2]，加藤康夫[1,2]（[1]富山県大院・工，[2]富山県大・生医工研セ）

3B09p03　*Bacillus amyloliquefaciens* 由来 phenolic acid decarboxylase を発現したタケ培養細胞によるスチレン誘導体の生産
14:12 ○北岡直樹[1,2]，早田朋代[2]，野村泰治[1,2]，荻田信二郎[3]，加藤康夫[1,2]（[1]富山県大・生医工研セ，[2]富山県大・生物工，[3]県立広島大・生命科学）

3B09p04　ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の投与による植物培養細胞の潜在的二次代謝能の発掘：タケ細胞における誘導性化合物の同定および生合成酵素の探索
14:23 ○米田朱里[1]，野村泰治[1,2]，北岡直樹[1,2]，荻田信二郎[3]，加藤康夫[1,2]（[1]富山県大院・工，[2]富山県大・生医工研セ，[3]県立広島大・生命科学）

3B09p05　オオムギのフェニルアミドファイトアレキシン
14:34 ○宇部尚樹[1]，藪田行哲[2]，塔野岡卓司[3]，上野琴巳[2]，武田　真[4]，石原　亨[2]（[1]鳥取連大・農，[2]鳥取大・農，[3]農研機構，[4]岡山大・植物研）

3B09p06　輸送工学を利用した効率的なイソキノリンアルカロイド生産
14:45 ○山田泰之[1]，潤井みや[1]，松井治幸[1]，井上　開[1]，大木秀浩[1]，南　博道[2]，佐藤文彦[3,4]，士反伸和[1]（[1]神戸薬大，[2]石川県大，[3]京大院生命，[4]阪府大院理）

p07〜p12 発表者の接続時間 14:56〜15:06

3B09p07　原種コーヒーから単離したカフェイン生合成系酵素遺伝子の機能解析と基質特異性決定部位の探索
15:06 ○國久葉月[1]，岩根利奈[1]，井田美帆[1]，高木　駿[1]，倉田陸朗[1]，Valerie Poncet[2]，Alexandre de Kochko[2]，水野幸一[1]（[1]秋田県大生物資源，[2]IRD-Montpellier DIADE）

3B09p08　ゼニゴケの菌型テルペン合成酵素は油体細胞特異的に発現し油体へのセスキテルペン集積を担う
15:17 滝澤遼典[1]，畑田珠希[1]，森脇祐太[1]，阿部祥香[1]，山下優子[1]，肥塚崇男[1]，大和勝幸[2]，西浜竜一[3]，フェンチェン[4]，河内孝之[3]，○松井健二[1]（[1]山口大農，[2]近畿大生物理工，[3]京都大生命科学，[4]テネシー大農）

3B09p09　オーロンを経由するゼニゴケの新規赤色色素生合成経路
15:28 ○押切春佳[1]，松下紋子[2]，渡辺文太[3]，久保浩義[1,2]，高梨功次郎[1,2]（[1]信州大・総合理工，[2]信州大・理，[3]京大・化研）

3B09p10　蘚類ハイゴケの染色体上でクラスター化しているモミラクトン生合成遺伝子群の機能解析
15:39　○樋口俊哉[1]，照屋美優[1]，藤原　薫[1]，宮本皓司[2]，山根久和[2,3]，林謙一郎[4]，川出　洋[5]，Longjiang Fan[6]，野尻秀昭[1]，岡田憲典[1]　([1]東大・生物工学セ，[2]帝京大・バイオ，[3]帝京大先端機器分析センター，[4]岡山理科大・理，[5]東京農工大学院・農，[6]中国・浙江大学)

3B09p11　野生イネのストレス誘導性シトクロム P450 の機能解析
15:50　○佐藤遼平[1]，冨山詩歩[1]，川出　洋[2]，豊増知伸[3]，宮本皓司[4]，野尻秀昭[1]，岡田憲典[1]　([1]東京大学・生物生産工学研究センター，[2]東京農工大学・農学研究院，[3]山形大学・農学部，[4]帝京大学・理工学部)

3B09p12　ムラサキのシコニン生合成に関与する Cytochrome P450 の機能解析
16:01　○吉村和貴[1]，中川友喜美[2]，渡辺文太[3]，矢崎一史[2]，高梨功次郎[4]　([1]信州大・総合理工，[2]京大・生存研，[3]京大・化研，[4]信州大・理)

p13〜p18 発表者の接続時間 16:12〜16:21

3B09p13　イチゴ中のフラバン-3-オール類の質量分析イメージングを用いた分布の解明
16:21　○榎元廣文[1]，八田　一[2]　([1]帝京大理工，[2]京都女子大家政)

3B09p14　ダイズ特化代謝産物の根圏分泌及び生合成遺伝子発現の日周変動解析
16:32　○松田陽菜子[1]，中安　大[1]，山崎真一[2]，青木裕一[2]，永野　惇[3]，矢崎一史[1]，杉山暁史[1]　([1]京都大・生存研，[2]東北大・東北メディカル・メガバンク機構，[3]龍谷大・農)

3B09p15　統合オミクスによるエダマメフラボノイド生合成の解明
16:43　○岡田康平[1]，中村　李[1]，星野友紀[1]，及川　彰[1,2]　([1]山形大農，[2]理研CSRS)

3B09p16　メタボローム解析による栽培土壌とエダマメ品質の相関解析
16:54　○増田勘太郎[1]，佐々木亮介[2]，斉藤和季[2,3]，及川　彰[1,2]　([1]山形大院農，[2]理研CSRS，[3]千葉大院薬)

3B09p17　Glucosinolate catabolism dependent on two atypical myrosinases is required for sustaining plant growth under sulfur deficiency
17:05　○Liu ZHANG[1]，Ryota KAWAGUCHI[1]，Tomomi MORIKAWA-ICHINOSE[1]，Alaa ALLAHHAM[1]，Sun-Ju KIM[3]，Akiko MARUYAMA-NAKASHITA[2]　([1]Kyushu Univ., Grad. Sch. Bio-Environ. Sci., [2]Kyushu Univ., Fac. Agr., [3]Chungnam National Univ.)

3B09p18　シロイヌナズナ成熟個体のグルコシノレート蓄積に及ぼす硫酸イオントランスポーター SULTR1;2 欠損の影響
17:16　○一瀬智美[1]，金　善州[2]，Alaa Allahham[1]，川口諒太[1]，藤村由紀[1]，丸山明子[1]　([1]九州大　院農，[2]忠南大学)

B11 会場　午前の部(9:30〜12:13)

有機化学，天然物化学―1160 合成，反応機構―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

3B11a01　様々なグルコサミン供与体によるヘプトース誘導体の 2 位水酸基への立体選択的グリコシル化
9:30　○冨樫佳祐[1]，大谷直輝[2]，後久保春花[1]，一柳　剛[1]　([1]鳥取大農，[2]鳥取大院持続性社会創生科学)

3B11a02　L-*glycero*-D-*manno*-heptose からなる LPS 内部コア 3 糖の合成研究
9:41　○尾川周平[1]，大谷直輝[1]，織田健成[2]，一柳　剛[2]　([1]鳥取大院持続性社会創生科学，[2]鳥取大農)

3B11a03　Shagene A, および B の不斉全合成研究
9:52　○八木田凌太郎[1]，西林和也[2]，MOHAMMED Tagwa[2]，平家崇吉[2]，竹本佳司[2]，入江一浩[1]，塚野千尋[1]　([1]京大院農，[2]京大院薬)

3B11a04　超原子価ヨウ素による β-エナミノンのロダン化反応
10:03　○松井大樹，園田素啓，谷森紳治　(阪府大院生命環境)

3B11a05　細胞毒性を有する鎖状 norlignan の biotin プローブの合成
10:14　○卯津羅萌音，西脇　寿，山内　聡　(愛媛大院農)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

3B11a06　食品性植物に含まれる lariciresinol の体内代謝産物である conidendrin の全立体異性体の合成と抗アレルギー活性及び抗炎症作用
10:35　○白方陽菜子，西脇　寿，石田萌子，菅原卓也，山内　聡　(愛媛大院農)

3B11a07　3-Methyl-cyanobacterin の新規不斉合成経路の確立
10:46　○松本紘明，山内　聡，西脇　寿　(愛媛大院農)

3B11a08　ナキテルピオシンの合成研究
10:57　○松雪洋恵[1]，深谷圭介[1,2]，占部大介[1,2]　([1]富山県大工，[2]富山県大・生医工研セ)

3B11a09　トウモロコシが産生するファイトアレキシン zealexin 類の合成研究
11:08　○石井航平，松島芳隆　(東京農業大学・農芸化学科)

3B11a10　ジベレリン様活性を有する化合物 helminthosporic acid の合成研究
11:19　○春原大亮，松島芳隆　(東京農業大学・農芸化学科)

a11〜a13 発表者の接続時間 11:30〜11:40

3B11a11　Manginoid E の合成研究
11:40　○山田健士郎，山田英俊，若森晋之介　(関西学院大理工)

3B11a12　フラボノイド配糖体糖鎖の酸加水分解に関する条件検討
11:51　○須貝　威，倉林一樹，恒川龍二，藤田理愛，花屋賢悟，東林修平　(慶應大薬)

3B11a13　抗体 HBV 活性を有する CDM-3008 のマイクロ波利用合成研究
12:02　横江貴之，○清水弘樹　(産総研生物プロセス)

B11 会場　午後の部(13:50〜17:16)

有機化学，天然物化学―1160 合成，反応機構―

p01〜p06 発表者の接続時間 13:40〜13:50

3B11p01　キラル Ni 錯体に対するビニルトシラートの反応
13:50　○茂野優平[1]，今野博行[1]，森脇浩樹[2]，ソロショノクヴァディム[3]　([1]山形大院理工，[2]浜理薬品株，[3]バスク大)

3B11p02　ラルストニン A ならびにラルストアミド A の合成研究
14:01　○今野博行[1]，大山貴恵[1]，森脇浩樹[2]，ソノショノフバディム[3]　([1]山形大院理工，[2]浜理薬品工業，[3]バスク大学)

3B11p03　Bk-1097 に含まれる ATHOD の合成とその立体化学の調査
14:12　○門脇斗真，加藤誠弥，矢野成和，今野博行　(山形大院理工)

3B11p04　アミノ糖脂質である Deinococcucin A の合成研究
14:23　○嶋澤悠希[1]，勝田　亮[2]，矢島　新[2]，額田恭郎[2]，石神　健[2]　([1]東農大院・農，[2]東農大・生命)

3B11p05　Tatemarisulfonate A および異性体の合成研究
14:34　○木村健児[1]，勝田　亮[2]，矢島　新[2]，額田恭郎[2]，石神　健[2]　([1]東農大院農，[2]東農大生命)

3B11p06　Aspinolide 類の合成研究
14:45　○武田圭太[1]，勝田　亮[2]，矢島　新[2]，石神　健[2]，額田恭郎[2]　([1]東農大院・農，[2]東農大・生命)

p07〜p12 発表者の接続時間 14:56〜15:06

3B11p07　バラの重要香気成分である DAMASCENOLIDE の類縁体合成と香気特性
15:06 ○宮澤　和[1,2]，大橋輝久[1]，川口賢二[1]，田中尚子[1]，勝田　亮[2]，矢島　新[2]，額田恭郎[2]，石神　健[2]（[1]長谷川香料㈱，[2]東農大・生命）

3B11p08　ウミヤツメのフェロモン様物質ペトロマイゼストロステロールの合成研究
15:17 ○河合真穂，西川俊夫，中崎敦夫（名大院生命農）

3B11p09　多環テルペンインドールの新合成法
15:28 ○山口将司，小野義貴，樋口恵子，杉野公美，中崎敦夫，西川俊夫（名大院生命農）

3B11p10　フィサリンの合成研究
15:39 ○新木悠介，西川俊夫（名大院生命農）

3B11p11　プルミスクレリン A の合成研究
15:50 ○柴田将貴[1]，西川俊夫[1]，安立昌篤[1,2]（[1]名大院生命農，[2]東北大院薬）

3B11p12　強心ステロイド類の新規な自在合成法の開発
16:01 ○渡邉正悟，西川俊夫，中崎敦夫（名大院生命農）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:12〜16:21

3B11p13　強心ステロイドの不飽和ラクトン部位の新規構築法の開発
16:21 ○松村泰志，西川俊夫，中崎敦夫（名大院生命農）

3B11p14　ジャガイモシスト線虫孵化促進物質ソラノエクレピン A のＡＢＣＤ環部分の合成研究
16:32 ○立松怜史[1]，安立昌篤[2]，西川俊夫[1]（[1]名大院生命農，[2]東北大院薬）

3B11p15　アンフィジノリド L の合成研究
16:43 ○小泉　潤[1]，深谷圭介[1,2]，占部大介[1,2]（[1]富山県大工，[2]富山県大・生医工研セ）

3B11p16　ホルモサリド A の合成研究
16:54 ○茂住梨紗[1]，深谷圭介[1,2]，占部大介[1,2]（[1]富山県大工，[2]富山県大・生医工研セ）

3B11p17　アルキベマイシン A の合成研究
17:05 ○印藤寛二[1]，深谷圭介[1,2]，占部大介[1,2]（[1]富山県大工，[2]富山県大・生医工研セ）

C01 会場　午前の部（9:30〜12:13）

環境科学・バイオマス利用―1010 環境保全，浄化技術工学，バイオレメディエーション，環境汚染物質―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

3C01a01　塩生植物アッケシソウの根圏における必須微量元素 マンガンに対する生理応答特性
9:30 ○扇世史輝，吳　雨珊，仲山英樹（長崎大院水環）

3C01a02　微生物と線虫を用いた金属資源循環プロセスの評価
9:41 ○濵野　樹[1]，倉橋健介[2]，吉原静恵[1]，齊藤丈晴[1]，徳本勇人[1]（[1]大阪府立大学，[2]大阪府立大学工業高等専門学校）

3C01a03　ポットを用いたモエジマシダのヒ素吸収における土壌との相互作用の検討
9:52 ○韓　　凝[1]，楊　重陽[1]，ホインニン[1,2]，簡　梅芳[1]，井上千弘[1]（[1]東北大学，[2]国立海洋大学）

3C01a04　Cd 汚染水田土壌における間断灌漑（3 湛 4 落）が微生物群集活性に与える影響
10:03 ○永井健太郎[1]，墨　泰孝[1]，國頭　恭[2]（[1]中部大応生，[2]信大理）

3C01a05　微生物と線虫による土壌浄化技術の創出
10:14 ○山田航平[1]，小田ちなみ[1]，濵野　樹[1]，倉橋健介[2]，吉原静恵[1]，星　英之[1]，徳本勇人[1]（[1]大阪府立大学，[2]大阪府立大学工業高等専門学校）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

3C01a06　Survivability of a gamma-hexachlorocyclohexane-degrading sphingomonad strain in soil.
10:35 ○Kafayat YUSUF，Hiromi Kato，Masataka Tsuda，Yuji Nagata（Tohoku Univ.）

3C01a07　Transcriptomic analysis of benzene-degrading nitrate-reducing *Azoarcus* sp. DN11 reveals the involvement of hydroxylation as initial reaction in anaerobic benzene degradation pathway
10:46 ○Allan DEVANADERA[1]，Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1,2]，Yuki KASAI[3]，Yoh TAKAHATA[4]，Kazunori OKADA[1]，Hideaki NOJIRI[1,2]（[1]BRC, UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Chuo Univ., [4]Taisei Corp.）

3C01a08　Azoxystrobin transformation by *Bacillus licheniformis* strain TAB7 produces azoxystrobin amine as novel metabolite
10:57 ○Amirah ALIAS[1]，Enock MPOFU[1]，Keisuke TOMITA[1]，Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1,2]，Kenji TOMITA[3]，Joydeep CHAKRABORTY[1]，Michal MALON[4]，Yusuke OGURA[3]，Hirosato TAKIKAWA[3]，Kazunori OKADA[1]，Toshiaki KIMURA[5]，Hideaki NOJIRI[1,2]（[1]BRC, UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Dept. Appl. Biol. Chem, UTokyo, [4]JEOL, Tokyo, [5]Toyota Motor Corp）

3C01a09　微生物による蒸気式木材乾燥機廃液の脱色
11:08 小森香穂，井上謙吾，亀井一郎，吉田ナオト，○清　啓自（宮崎大農）

3C01a10　パツリンを分解する糸状菌の単離と機能解析
11:19 ○三田芽実[1]，中川博之[2]，古屋俊樹[1]（[1]東京理科大・理工，[2]農研機構・食品研）

a11〜a13 発表者の接続時間 11:30〜11:40

3C01a11　分岐鎖ポリアミンを用いた抗菌粒子の開発
11:40 ○廣田裕介[1]，榊原早津季[1]，福田青朗[1]，山内光陽[1]，増尾貞弘[1]，林　翰佳[2]，藤原伸介[1]（[1]関西学院大理工，[2]台湾海洋大生命）

3C01a12　紫外線 LED を用いた光触媒（TiO_2）によるリグニンの分解
11:51 ○安川喜仁，辻山彰一（京府大院　生命環境）

3C01a13　平板状銀ナノ粒子を用いた塗料状光半導体による殺菌と光照射の効果
12:02 ○田中賢二[1]，宮本樹里[1]，伊東謙吾[2]（[1]近大産理工生環科，[2]㈱伊都研究所）

C01 会場　午後の部（13:50〜16:54）

環境科学・バイオマス利用―1010 環境保全，浄化技術工学，バイオレメディエーション，環境汚染物質―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:40〜13:50

3C01p01　低温硝化槽からのアンモニア酸化細菌の単離と諸性質の検討
13:50 ○飯山桃子[1]，牧野陽介[2]，角野立夫[1,2]，水木　徹[3]，三浦　健[1,2]（[1]東洋大・生命科学，[2]東洋大院・生命科学，[3]東洋大・バイオナノエレクトロニクス研究センター）

3C01p02　嫌気微生物の物質変換活性に及ぼす微生物蓄電性由来 Mackinawite の影響評価
14:01 ○安池一貴[1]，工藤優輝[1]，田代陽介[1]，二又裕之[1,2,3]（[1]静大院，[2]静大創造科学技術大学院，[3]静大グリーン科学技術研究所）

3C01p03　木材腐朽菌による加硫ゴム中の無機物脱離作用
14:12 ○佐藤　伸，ほあんきむてぃえん，稲森　渉，濱田賢作，奥田尚子（公立鳥取環境大学）

3C01p04　機械学習によるろ過膜ファウリング発生の重要因子探索
14:23 ○横山大稀[1]，朝倉大河[1]，鈴木漱星[2]，松本朋子[1]，菊地　淳[1,2,3]（[1]理研CSRS，[2]横浜市大大学院，[3]名古屋大大学院）

3C01p05　PCB/ビフェニル分解菌 *Alcaligenes denirificans* A41 株のポリヒドロキシアルカン酸合成関連遺伝子の解析
14:34 ○南　葉月，石合志央梨，前田理久　（明治大農）

p07〜p11 発表者の接続時間 14:56〜15:06

3C01p07　人形峠坑水の鉄処理槽内における細菌群集構造解析
15:06 ○羽部　浩[1]，稲葉知大[1]，青柳　智[1]，愛澤秀信[1]，佐藤由也[1]，堀　知行[1]，山路恵子[2]，小原義之[3]，福山賢仁[3]，蔡　惠良[4]，西村拓朗[4]　([1]産総研・環境管理，[2]筑波大・生命環境，[3]原子力機構・人形峠環境技術センター，[4]㈱ナガオカ）
3C01p08　金属腐食と微生物群集構造の相関解析
15:17 ○若井　暁，高井　研　（海洋機構・超先鋭）
3C01p09　PVA スポンジ担体投入型硝化槽の構築および菌叢構造解析
15:28 ○牧野陽介[1]，飯山桃子[2]，三浦　健[1,2]　([1]東洋大院・生命科学，[2]東洋大・生命科学）
3C01p10　日本産ウォッシュチーズの微生物叢と生分解性高分子分解活性
15:39 ○ガンスフオリギル，鈴木美和，橘　熊野，橘　陽子，粕谷健一　（群馬大学）
3C01p11　プラスチックの生分解試験のための海水の調製
15:50 ○中山敦好，川崎典起，山野尚子　（産総研）

p13〜p15 発表者の接続時間 16:12〜16:21

3C01p13　海洋プラスチックデブリから単離されたポリ(3-ヒドロキシブタン酸)分解放線菌の特徴付け
16:21 ○鈴木美和[1]，滝澤玲香[2]，橘　熊野[2,3]，粕谷健一[2,3]　([1]群馬大理工，[2]群馬大院理工，[3]群馬大食健セ）
3C01p14　分光学的視点によるグリーンプラスチックの分解要因解析
16:32 ○山脇　涼[1]，坪井裕理[2]，鄭　章代[2]，伊藤研悟[1,2]，菊地　淳[1,2,3]　([1]横浜市立大学大学院，[2]理化学研究所 環境資源科学研究センター，[3]名古屋大学大学院生命農学研究科）
3C01p15　ナイロン 4 分解菌の単離とその分解性評価
16:43 ○外村彩夏[1]，森上佳衣子[1]，橘弘一郎[2]，山田美和[3]，本田正義[4]，阿部英喜[2]，下田誠也[1]　([1]熊本県大環境共生，[2]理研 CSRS，[3]岩手大農，[4]東京理科大工）

C02 会場　午前の部(9:30〜12:13)

環境科学・バイオマス利用―1030 バイオマス，バイオマス変換，バイオ燃料，バイオ化成品―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

3C02a01　水草から単離されたセルラーゼ生産菌の同定とその生産される酵素の生化学的解析
9:30 ○浦田健司[1]，渡邊康紀[1]，渡辺誠也[1,2]　([1]愛媛大院農，[2]愛媛大CMES）
3C02a02　酵母 *Saccharomyces cerevisiae* へのセルラーゼ生産能の付与
9:41 ○松崎浩明，渡邉翔介，志波勇介，秦野琢之　（福山大生命工）
3C02a03　セルラーゼ超高生産菌　T1281 株由来セルラーゼを用いた同時糖化発酵(SSF)に向けた検討
9:52 ○加川雄介，平松紳吾，山田勝成　（東レ株式会社　先端融合研究所）
3C02a04　セルラーゼによるセルロースの分解性向上に及ぼすベタイン型添加剤の作用機構の解明
10:03 ○三宅子龍，山本真史，吉岡直哉，甲元一也　（甲南大 FIRST）
3C02a05　膜利用発酵リアクターによるエタノール収量向上メカニズムの解明
10:14 ○鶴谷篤生，水野寛之，井手深雪，耳塚　孝，平松紳吾，日笠雅史，山田勝成　（東レ株式会社）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

3C02a06　セルロース系バイオマスを原料とする複合微生物系によるエタノール生産条件の検討
10:35 ○菰田恵菜，山中優花，堀沢　栄　（高知工科大学）
3C02a07　木材腐朽菌を用いたセルロース系バイオマスからのエタノール生産
10:46 ○山中優花，堀沢　栄　（高知工科大学）
3C02a08　エタノール固体発酵法による菜種ミールの高付加価値化に関する研究
10:57 ○田島大貴[1]，栗本崇志[2]，窪倉麻莉子[1]，大高雅人[1]，藤沢奈津子[1]，大西章博[1]，藤本尚志[1]　([1]東農大，[2]日清オイリオグループ株式会社）
3C02a09　Behaviors of microbial community on continuous bio-hydrogen production using dynamic membrane bioreactor (DMBR)
11:08 ○Jeong-Jun YOON　(Korea Institute of Industrial Technology (KITECH))
3C02a10　白色腐朽菌の好気的水素産生に関与するヒドロゲナーゼの解析
11:19 ○岸川凜太郎[1]，森　智夫[2]，河岸洋和[2,3,4]，平井浩文[2,3]　([1]静大院・総合農，[2]静大・農，[3]静大・グリーン研，[4]静大・創造院）

a11〜a13 発表者の接続時間 11:30〜11:40

3C02a11　セルロース系バイオマスからの高効率水素生産技術の確立に向けた大腸菌水素生産株の改良
11:40 ○寺本陽彦[1]，清水　哲[1]，須田雅子[1]，乾　将行[1,2]　([1]RITE，[2]奈良先端大・バイオ）
3C02a12　紅色非硫黄細菌におけるポリヒドロキシ酪酸生合成関連遺伝子破壊による酢酸からの水素収率の向上
11:51 ○清水　哲[1]，寺本陽彦[1]，乾　将行[1,2]　([1]RITE，[2]奈良先端大・バイオ）
3C02a13　イソブタノール生産コリネ型細菌の開発
12:02 ○長谷川智[1]，城島　透[1]，須田雅子[1]，乾　将行[1,2]　([1]RITE，[2]奈良先端大・バイオ）

C02 会場　午後の部(13:50〜17:05)

環境科学・バイオマス利用―1030 バイオマス，バイオマス変換，バイオ燃料，バイオ化成品―

p01〜p06 発表者の接続時間 13:40〜13:50

3C02p01　*Clostridium cellulovorans* とメタン菌叢による温州ミカン残渣からのメタン発酵
13:50 ○田丸　浩[1,2,3]，富田寿男[1]　([1]三重大院・生資，[2]三重大・先端科学研支バイオインフォ，[3]三重大・スマートセルイノベ研）
3C02p02　Anaerobic degradation of bacterial whole cells by methanogenic microbial communities
14:01 ○Samia Quaiyum[1,2]，Kensuke Igarashi[2]，Souichiro Kato[1,2]　([1]Hokkaido Univ.，[2]AIST Hokkaido）
3C02p03　Enrichment of Thermophilic Methanogenic Microflora from Mesophilic Activated Sludge
14:12 ○Sumire NAKAKOJI[1]，Melly MELLYANAWATY[2]，Wiratni S. BUDHIJANTO[2]，Masahiro TATARA[1]，Yoshiyuki UENO[1]　([1]Kajima Technical Research Institute, Japan，[2]Gadjah Mada University, Indonesia）
3C02p04　Studies on new control strategy for meta-lactic acid fermentation driving with mixed culture system
14:23 ○SIYUAN YUE[1]，Takaharo Mizoguchi[1]，Yukihiro Tashiro[1]，Kenji Sakai[1]，Hirokuni Miyamoto[2]　([1]Grad. Sch. Bioresour. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ.，[2]Fac. Horticul., Chiba Univ.）

3C02p05　新規乳酸ベースバイオポリマーの生合成における培養条件の検討
14:34　○岡本沙樹[1]，西上明花[2]，後藤早希[2]，松本謙一郎[3]，阿部英喜[4]，田口精一[5]，田中賢二[6]，松崎弘美[1,2]　([1]熊本県大環境共生，[2]熊本県大院環境共生，[3]北大院工，[4]理研-CSRS，[5]東農大生命科学，[6]近畿大産理工)

3C02p06　アルギン酸を単一炭素源としたポリ(3-ヒドロキシブタン酸)の微生物合成
14:45　○滝田祐人[1]，森谷大樹[2]，河合盛進[3]，鈴木宏昭[3]，山田美和[1,2]　([1]岩手大・農，[2]岩手大・院総合科学，[3]トヨタ紡織・新領域開拓部)

p07〜p12 発表者の接続時間 14:56〜15:06

3C02p07　高温メタン発酵過程における分子量の異なる生分解性プラスチックの分解特性
15:06　○曽　厚嘉[1]，増谷一成[2]，大西章博[1]，木村良晴[2]，藤本尚志[1]　([1]東農大，[2]京工繊大)

3C02p08　選択的白色腐朽菌が産する溶解性多糖モノオキシゲナーゼの構造および活性の解析
15:17　○近藤敬子[1]，グエンフエン[2]，ワンサミハルジャアンドリー[2]，小瀧　努[1,2]，三上文三[3]，渡辺隆司[4]，永田　崇[1,2]，片平正人[1,2]　([1]京大・エネルギー理工学研究所，[2]京大・院エネ科，[3]京大・院農，[4]京大・生存研)

3C02p09　リグニン・多糖複合体分解に関与する白色腐朽菌由来グルクロノイルエステラーゼの速度論解析および添加剤耐性
15:28　○坂井勇太[1]，林　孟宜[1,2]，近藤敬子[2]，米沢柚香[1]，檜山明穂[1]，永田　崇[1,2]，片平正人[1,2]　([1]京大・院エネ科，[2]京大・エネルギー理工学研究所)

3C02p10　草食性陸ガニによるリグニン含有バイオマス分解の可能性について
15:39　○三宅克英[1]，久世悠登[1]，八神陽一[1]，小野内健人[1]，馬場保徳[2]　([1]名城大理工，[2]石川県大)

3C02p11　Heterologous expression and oxidative activity of four fungal ligninolytic enzymes by *Pichia pastoris*
15:50　○KENNETH TEO SZE KAI[1]，KEIKO KONDO[2]，TAKASHI NAGATA[1,2]，MASATO KATAHIRA[1,2]　([1]Graduate School of Energy Science, Kyoto University, [2]Institute of Advanced Energy, Kyoto University)

3C02p12　リグニンの C_α-C_β 間を特異的に開裂する白色腐朽菌の探索
16:01　○篠原桃香[1]，永井優樹[1]，森　智夫[1]，河岸洋和[1,2,3]，平井浩文[1,2]　([1]静大農，[2]静大グリーン研，[3]静大創造院)

p13〜p16 発表者の接続時間 16:12〜16:21

3C02p13　Transcriptomic analysis of lignocellulose degrading enzymes in *Herbivorax saccincola* A7 on cellulose and xylan fermentation
16:21　Sirilak Baramee，○Takamitsu Arai，Akihiko Kosugi (JIRCAS)

3C02p14　Tetraethylammonium fluoride-mediated a green hydrogen transfer process for selective reduction of biomass-derived aldehydes
16:32　○Fusheng XU[1]，Zhaozhuo YU[2]，Hu LI[2]，Hiroyuki KONNO[1]　([1]Yamagata Univ., [2]Guizhou Univ.)

3C02p15　ジフェニルエーテル化合物を分解する新規微生物の探索
16:43　○利根川聡史[1]，羽部　浩[2]，古屋俊樹[1]　([1]東京理科大・理工，[2]産総研・環境管理)

3C02p16　2-フェノキシアセトフェノンのエーテル結合を切断する微生物の機能解析
16:54　○大谷早紀[1]，羽部　浩[2]，古屋俊樹[1]　([1]東京理科大・理工，[2]産総研・環境管理)

C03 会場　午前の部(9:30〜12:13)

酵素―1220 糖質代謝関連酵素―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

3C03a01　*N,N,N*-trimethylglucosaminium 残基を有する化合物に対する *p*-nitrophenyl *N*-acetyl-*β*-D-glucosaminide 資化性菌由来 *β*-*N*-アセチルグルコサミニダーゼの感受性の検討
9:30　○小出麻奈，菅沼笙子，仁戸田照彦，神崎　浩　(岡山大院・環境生命)

3C03a02　*Pseudoclostridium thermosuccinogenes* および *Tepidibacillus decaturensis* 由来 GH15 マルトオリゴ糖 4(6)グルコシルトランスフェラーゼ様タンパク質の機能解析
9:41　○澤田　桃，佐分利亘，森　春英　(北大院農)

3C03a03　麹菌の GH1 に属する菌体内局在型新規 *β*-グルコシダーゼの酵素学的諸性質
9:52　○渡部　昭，新谷尚弘，五味勝也　(東北大院農)

3C03a04　ビフィズス菌 *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* の特異なアラビノキシラン分解系
10:03　○芦田　久，吉原侑希，米野雅大　(近畿大生物理工)

3C03a05　Gum arabic 側鎖末端を分解する *Fusarium oxysporum* 由来 4-*O*-*α*-L-ラムノシル-*β*-D-グルクロニダーゼの反応特性解析
10:14　○吉條美由[1]，近藤辰哉[1]，中屋　愼[2,3]，竹中重雄[4]，小竹敬久[5]，中澤昌美[1]，上田光宏[1]，阪本龍司[1]　([1]阪府大院・生命環境，[2]阪府大院・研究推進機構，[3]大手前栄養製菓学院専門学校・栄養，[4]阪府大院・総リハ，[5]埼玉大院・理工)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

3C03a06　単細胞性シアノバクテリア由来フマラーゼ(FumC)の生化学解析
10:35　○片山徳賢[1]，小山内崇[2]　([1]明治大院農，[2]明治大農)

3C03a07　麹菌が生産するキシログルカンの分解に重要な alpha-xylosidase の同定
10:46　○松沢智彦[1]，亀山昭彦[2]，矢追克郎[1]　([1]産総研・生物プロセス，[2]産総研・創薬基盤)

3C03a08　植物病原性真菌 *Microdochium nivale* 由来菌体外 *β*-グルコシダーゼの機能解析
10:57　○太田智也[1]，佐分利亘[1]，ジュウェルリンダ[2]，シャントム[3]，今井亮三[4]，森　春英[1]　([1]北大院農，[2]カナダ農務省，[3]ゲルフ大，[4]農研機構)

3C03a09　イネ由来 GH1 *β*-グルコシダーゼ OsTAGG1 の *β*→*α* ループ 4 置換体のグリコン特異性の解析
11:08　○堀越　秀，佐分利亘，森　春英　(北大農院)

3C03a10　シロアリ共生原生生物由来新規 BGL の生産と機能解析
11:19　○齋藤悠香[1]，平松紳吾[1]，山田千晶[1]，山田勝成[1]，小田切正人[2]，守屋繁春[2]　([1]東レ㈱先端融合研，[2]理化学研究所)

a11〜a13 発表者の接続時間 11:30〜11:40

3C03a11　CGTase を用いた分岐シクロイソマルトテトラオースの合成及びその構造解析
11:40　○鈴木貴視，川島　晶，藤田章弘，渡邊　光，森　哲也，西本友之，阿賀　創，牛尾慎平　(株式会社 林原)

3C03a12　二糖特異的コージビオースホスホリラーゼの同定
11:51　○奥村律奈[1]，板橋大輝[1]，喜多春乃[1]，仁平高則[1]，北岡本光[1,2]，中井博之[1]　([1]新潟大農，[2]農研機構食品研)

3C03a13　Catalytic regulation of the vertebrarte CMP-sialic acid synthetase by its C-teminal domain
12:02　○Di Wu[1,2]，Sakura Toda[1,2]，Pierre-Andre Gilormini[3]，Yann Guerardel[3]，Chihiro Sato[1,2]，Ken Kitajima[1,2]　([1]Biosci. Biotech. Center, Nagoya University, [2]Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya University, [3]Unit. Glyco. Struc. Func., Lille Univ 1)

C03 会場　午後の部（13:50〜16:54）

酵素―1220 糖質代謝関連酵素―

p01〜p06 発表者の接続時間 13:40〜13:50

3C03p01　*Paenibacillus* sp. H2C 株由来菌体内キシラナーゼ Xyn10F の性質および切断様式
13:50　○奥田敬子[1]，Undramaa Bat-Erdene[1]，萩原祐介[2]，三原康博[2]，八波利恵[1]，福居俊昭[1]，中村　聡[1]（[1]東京工業大学，[2]味の素株式会社）

3C03p02　*Xanthomonas campestris* WU-9701 由来グルコース転移酵素 XgtA の結晶構造解析
14:01　○渡邉理沙[1]，有村泰宏[2,3]，曹　　偉[1]，石井義孝[4]，桐村光太郎[1]（[1]早大・先進理工・応化，[2]ロックフェラー大，[3]早大・先進理工・電生，[4]早大・理工研）

3C03p03　フラクトオリゴ糖を分解する GH32β-フルクトフラノシダーゼの立体構造解析
14:12　○川合礼華[1]，北村純一[1]，藤井　匡[2]，栃尾　巧[2]，西河　淳[1]，殿塚隆史[1]（[1]東京農工大院農，[2]物産フードサイエンス㈱研究開発センター）

3C03p04　*Aspergillus nidulans* が生産する 2 つの β-D-ガラクトフラノシダーゼの基質特異性および諸性質の解析
14:23　○松永恵美子[1]，豊田早紀[1]，山田久恵[1]，田中　大[2]，樋口裕次郎[1]，竹川　薫[1]（[1]九大院・農，[2]東北医薬大・薬）

3C03p05　国際宇宙ステーションで得られた希少糖生産酵素 *Pseudomonas stutzeri* L-rhamnose isomerase 変異酵素の結晶を用いたデオキシ希少糖複合体の構造解析
14:34　○吉田裕美[1,3]，吉原明秀[2,3]，田仲広明[4]，伊中浩治[5]，山田　貢[6]，何森　健[2,3]，神鳥成弘[1,3]（[1]香川大・総合生命研究セ・医，[2]香川大・農，[3]香川大・国際希少糖研究教育，[4]コンフォーカルサイエンス，[5]丸和栄養食品，[6]宇宙航空研究開発機構）

3C03p06　*Paenibacillus glycanilyticus* FH11 由来 α-1,3-グルカナーゼ触媒ドメインの反応機構と結晶化
14:45　○Intuy Rattanaporn[1]，伊藤貴文[2]，スヨタワサナ[3]，林　順司[4]，矢野成和[5]，真壁幸樹[5]，豊竹洋佑[1]，若山　守[1]，日伏隆雄[2]（[1]立命大生命，[2]福井県大生資，[3]ソンクラ大産業バイオ，[4]徳島大生資産，[5]山形大院理工）

p07〜p12 発表者の接続時間 14:56〜15:06

3C03p07　放線菌由来 GH13_30 α-グルコシダーゼの機能解析
15:06　○佐分利亘，田上貴祥，壷井芙美，奥山正幸，木村淳夫，森　春英（北大院農）

3C03p08　ニゲロース特異的な Solute-binding protein の発見
15:17　○田上貴祥，壷井芙美，佐藤宏樹，奥山正幸，佐分利亘，森　春英，木村淳夫（北大・院農）

3C03p09　L-アラビノース 1-脱水素酵素の基質特異性の構造基盤の解析
15:28　○吉原健太郎[1]，渡辺誠也[1,2,3]（[1]愛媛大農，[2]愛媛大院農，[3]愛媛大CMES）

3C03p10　カイコ由来 α-L-fucosidase の糖タンパク質の N 型糖鎖に対する活性の解析
15:39　○中村駿太郎[1]，宮崎剛亜[1,2]，朴　龍洙[1,2]（[1]静大院・総合科技・農，[2]静大グリーン科技研）

3C03p11　カイコ由来 α-N-アセチルガラクトサミニダーゼの酵素学的性質の解析
15:50　○池谷真里奈[1]，宮崎剛亜[1,2]，朴　龍洙[1,2]（[1]静大院・総合科技・農，[2]静大グリーン科技研）

3C03p12　カイコ由来スクロース加水分解酵素の基質および阻害剤との複合体構造解析
16:01　○宮崎剛亜，朴　龍洙（静大グリーン科技研）

p13〜p15 発表者の接続時間 16:12〜16:21

3C03p13　*Shinella* sp. NN-6 のケトース 3-エピメラーゼの誘導炭素源の検討および D-アルロース生産の最適化
16:21　○鈴木琢磨[1]，池田　光[1]，森本兼司[2]（[1]香川大学，[2]国際希少糖研究教育機構）

3C03p14　*Enterococcus faecium* SE4 株由来 L-ラムノースイソメラーゼの諸性質および D-アロース生産への応用
16:32　○筒井　馨[1]，森本兼司[1,2]（[1]香川大院農，[2]国際希少糖研究教育機構）

3C03p15　超好熱アーキア *Pyrobaculum aerophilum* 由来新規ガラクトース 1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼに関する研究
16:43　○大志田達也[1]，林　順司[2]，米田一成[3]，大島敏久[4]，櫻庭春彦[1]（[1]香川大農，[2]徳島大生物資源，[3]東海大農，[4]大阪工大工）

C04 会場　午前の部（9:30〜12:13）

酵素―1210 アミノ酸代謝関連酵素，脂質代謝関連酵素―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

3C04a01　エタノールアミン型プラズマローゲン特異的ホスホリパーゼ D の精製，機能解析および遺伝子クローニング
9:30　○野澤俊貴，川村柚葉，王　　澤，杉森大助（福島大理工）

3C04a02　エタノールアミン型プラズマローゲン特異的ホスホリパーゼ D の異種組換え発現
9:41　○川村柚葉，野澤俊貴，王　　澤，杉森大助（福島大理工）

3C04a03　リン脂質改質を目指した好熱性細菌 B157^T 株由来活性型ホスホリパーゼ A_1 組換え体の調製と性質決定
9:52　○森　千波，田中秀典，齋藤　遼，辻本善之，渡部邦彦（京府大院生命環境）

3C04a04　麹菌由来の新規油脂分解酵素
10:03　○市川響太郎，吉田彩花，塩野義人，小関卓也（山形大農）

3C04a05　ラビリンチュラ類特有のリパーゼ / ホスホリパーゼのユニークな位置特異性は海洋微生物の種間競争と脂肪酸取り込みに関与する
10:14　○石橋洋平[1]，青木敬祐[1]，沖野　望[1]，林　雅弘[2]，伊東　信[1]（[1]九州大農，[2]宮崎大農）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

3C04a06　*Burkholderia stabilis* 由来コレステロールエステラーゼの診断薬への応用
10:35　小西健司[1]，吉田圭太朗[2]，安武義晃[2,3]，村松周治[1]，○酒瀬川信一[1]，田村具博[2,3,4]（[1]旭化成ファーマ株式会社，[2]産業技術総合研究所，[3]Computational Bio Big-Data Open Innovation Laboratory（CBBD-OIL），AIST，[4]北海道大学）

3C04a07　*Burkholderia stabilis* を宿主とした細胞外コレステロールエステラーゼの組換え生産
10:46　○吉田圭太朗[1]，小西健司[2]，MAGANA-MORA Arturo[1,3]，ROUGNY Adrien[1,3]，安武義晃[1,3]，村松周治[2]，村田里美[2]，熊谷俊高[4]，油谷幸代[1,3]，酒瀬川信一[2]，田村具博[1,3,5]（[1]産総研，[2]旭化成ファーマ，[3]Computational Bio Big-Data Innovation Laboratory, AIST，[4]ファームラボ，[5]北大院農）

3C04a08　ラビリンチュラ類から見出された新規ステロールエステル合成酵素の機能解析
10:57　○定光翔平[1]，石橋洋平[1]，深堀義朝[1]，林　雅弘[2]，渡辺　昂[1]，沖野　望[1]，伊東　信[1]（[1]九大院農，[2]宮大農）

3C04a09　*In vitro* and *In vivo* Analysis of FadH Protein from *Shewanella livingstonensis* Ac10 Involved in DHA Conversion

11:08　○Yustina Yusuf，Kazuki Hirose，Jun Kawamoto，Takuya Ogawa，Tatsuo Kurihara　（Institute for Chemical Research, Kyoto University）

3C04a10　リゾホスファチジン酸アシル基転移酵素ホモログの比較解析

11:19　久保嶋美咲，○SUWANAWAT Nittikarn，川本　純，小川拓哉，栗原達夫　（京大・化研）

a11〜a13 発表者の接続時間 11:30〜11:40

3C04a11　高基質特異性 L-グルタミン酸オキシダーゼの活性中心残基 Glu617 への変異導入による機能解析

11:40　○矢野佳果[1]，松尾慎作[1]，伊藤菜奈子[2]，今田勝巳[2]，日下部均[3]，根本理子[1]，田村　隆[1]，稲垣賢二[1]　（[1]岡山大院・環境生命，[2]阪大院・理，[3]エンザイムセンサ）

3C04a12　糸状菌由来 L-リシン α-オキシダーゼの活性中心に存在する Asp212 残基の機能解析

11:51　○齋藤雅哉[1]，松本侑也[1]，松田崚汰[2]，北川征樹[2]，伊藤菜奈子[2]，今田勝巳[2]，日下部均[3]，根本理子[1]，田村　隆[1]，稲垣賢二[1]　（[1]岡山大院・環境生命，[2]阪大院・理，[3]エンザイム・センサ）

3C04a13　遺伝子へのランダム変異導入による大腸菌由来システイン合成酵素 OASS-B の基質特異性改変

12:02　○中村　卓[1]，近藤輝明[1]，高木博史[2]　（[1]長浜バイオ大・バイオサイエンス，[2]奈良先端大・バイオ）

C04 会場　午後の部（13:50〜17:16）

酵素―1210 アミノ酸代謝関連酵素，脂質代謝関連酵素（5 演題）1230 タンパク質・ペプチド代謝関連酵素，核酸代謝関連酵素（5 題）1240 酸化還元酵素（5 題）―

p01〜p05 発表者の接続時間 13:40〜13:50

3C04p01　芳香族 D-アミノ酸誘導体の光学分割可能な新規祖先型 L-アミノ酸酸化酵素の開発と機能解析

13:50　○中野祥吾，南野優季，烏田裕香，長谷部文人，伊藤創平（静岡県大食栄）

3C04p02　好熱性細菌 *Thermomicrobium roseum* 由来 D-アミノ酸デアセチラーゼの機能解析

14:01　○加塩健悟[1,2]，佐々本康平[1,3]，氷見山幹基[1]，倉田淳志[2]，中村　努[1]，上垣浩一[2]　（[1]産総研，[2]近畿大農，[3]摂南大学院）

3C04p03　PDXDC1 は未同定のヒトフェニルアラニンデカルボキシラーゼの有力候補である

14:12　○鈴木大輔[1]，安藤　秀[2]，鈴木良雄[2]，佐藤祐介[1,3]，吉澤史昭[1,3]　（[1]東京農工大学大学院連合農学研究科，[2]順天堂大学大学院スポーツ健康科学研究科，[3]宇都宮大学学術院）

3C04p04　*Pseudomonas putida* KT2440 株由来 D-リジントランスポーターによる基質認識

14:23　○三原久明，CHAMPAS Sayamol，山内美咲，戸部隆太（立命大・生命）

3C04p05　メチオニン生合成における新規フィードバック制御機構の発見

14:34　○長谷部文人　（静岡県大・食）

p07〜p11 発表者の接続時間 14:56〜15:06

3C04p07　ヒトリボヌクレアーゼ H2 の Val143 は触媒活性と基質特異性に重要な役割を果たす

15:06　○馬場美聡[1]，兒島憲二[1]，西村拓人[1]，杉浦拓也[1]，滝田禎亮[1]，上原　了[2,3]，CROUCH Robert J.[2]，保川　清[1]　（[1]京大院・農，[2]NIH・NICHD，[3]立命大・R-GIRO）

3C04p08　*Acidovorax* sp. KKS102 株が有する融合酵素 DahX の tRNA 編集活性

15:17　○高橋由紀子[1,2]，中鉢千尋[1,2]，野々山翔太[1,2]，佐藤優花里[1,2]，永田裕二[1,2]　（[1]東北大院，[2]生命科学）

3C04p09　抗菌薬開発に資する *Porphyromonas gingivalis* 由来 Dipeptidyl peptidase 11 の構造解析と阻害化合物探索

15:28　○中村彰宏[1]，阪本泰光[2]，鈴木義之[3,4]，渡邉友里江[5]，關谷瑞樹[2]，六本木沙織[2]，櫛引千里[2]，飯塚一平[2]，谷　　修[6]，阪下日登志[6]，伊中浩治[7]，田仲広明[8]，山田　貢[9]，大田和敬[9]，本間宣行[4]，志田洋介[4]，中西真弓[2]，野中孝昌[2]，合田浩明[5]，田中信忠[5,10]，小笠原渉[1,4]　（[1]長岡技科大・工・技学イノベ，[2]岩手医大・薬，[3]長岡高専，[4]長岡技科大・工・生機，[5]昭和大・薬，[6]産総研・バイオメディカル，[7]㈱丸和栄養食品，[8]㈱コンフォーカルサイエンス，[9]JAXA，[10]昭和大・分子分析センター）

3C04p10　担子菌酵母フェニルアラニンアンモニアリアーゼと阻害剤 Z302 との相互作用に関する熱力学的解析と結晶構造解析

15:39　○中島　崇[1]，山田直隆[1]，吉村昂大[1]，姚　　閔[2]，沼田倫征[1]，石野良純[1]　（[1]九州大農，[2]北海道大学先端生命）

3C04p11　アミノグリコシド 7"-リン酸基転移酵素-Ia による ハイグロマイシン B 認識機構の立体構造解析

15:50　○竹野谷美穂子[1]，島村達郎[2]，山中隆司[1]，足立祐也[1]，伊藤晋作[1]，佐々木康幸[1]，中村　顕[3,4]，矢嶋俊介[1]　（[1]東農大バイオ，[2]京大院医，[3]筑波大生命環境，[4]筑波大MiCS）

p13〜p17 発表者の接続時間 16:12〜16:21

3C04p13　転写調節因子 NsrR のモリブデン補因子生合成における役割

16:21　○藤田大樹，西田　亮，戸部隆太，三原久明　（立命大・生命）

3C04p14　新規 8*R*-リポキシゲナーゼ同定とプロテクチン D1 酵素合成への応用

16:32　○結城彩花[1]，植村亜衣子[1]，箱崎真友佳[1]，矢野　明[1]，馬場直道[2]，三澤嘉久[2]，安部真人[3]，山田秀俊[1]　（[1]岩手生工研，[2]備前化成株式会社，[3]愛媛大学大学院農学研究科）

3C04p15　*Methylobacterium* sp. FD1 株由来ホルムアルデヒドジスムターゼ（Fdm3）の特性解析

16:43　○井元誠志，戸津井規希，岸本　昇，米光　裕　（和歌山高専）

3C04p16　好気性光合成細菌 *Roseobacter denitrificans* における cyanide insensitive oxidase の生理的機能

16:54　○吉田昇平[1]，山本麻衣子[1]，亀谷将史[1,2]，石井正治[1,2]，新井博之[1,2]　（[1]東大院・農生科，[2]東京大学微生物科学イノベーション連携研究機構）

3C04p17　白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来の Class 3 に属するシトクロム P450 の機能解析

17:05　○森　玲香，ワイズ里沙，酒井杏匠，志水元亨，加藤雅士（名城大学）

講演番号
開始時間　　演　題　　発表者氏名(所属)

A01 会場　午前の部(9:52〜12:13)

食品―1339 食品機能・栄養 - ビタミン・ミネラル―

a03〜a05 発表者の接続時間 9:42〜9:52

4A01a03　α-トコトリエノールが I-10 細胞のテストステロン分泌に及ぼす影響
9:52　○寺田直史，加藤英介　(北大院農)

4A01a04　トコトリエノール高含有米「オオナリ」給与豚肉の特性評価
10:03　○木村俊之[1]，中島郁世[2]，山口弘道[3]，草佳那子[4]，八日市屋敏之[5]，佐々木啓介[2]，斎藤真二[5]　([1]農研機構食品研究部門，[2]農研機構畜産研究部門，[3]農研機構中央農業研究センター，[4]農研機構本部，[5]フリーデン㈱)

4A01a05　タバコ細胞 BY-2 とヒト細胞 HeLa における PQQ によるオートファジー誘導
10:14　○池本一人[1]，高橋明大[2]，松井　陸[2]，井上悠子[2]，森安裕二[2]　([1]三菱ガス化学㈱新潟研究所，[2]埼玉大学)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

4A01a06　食餌由来ビタミン K がラット脳における認知機能関連遺伝子の発現に及ぼす影響
10:35　○片倉しおり，岡田菜緒，大崎雄介，スルタナハリマ，駒井三千夫，白川　仁　(東北大・院農)

4A01a07　PQQ およびキノン化合物による破骨細胞分化に及ぼす影響
10:46　○小林未侑[1]，外山博英[2]，橘信二郎[2]　([1]鹿大院・連合農，[2]琉球大・農)

4A01a08　甲殻類オオミジンコを用いた機能性食品素材 PQQ の体脂肪減少効果の評価
10:57　○MOHAMAD ISHAK Nur Syafiqah，池本一人　(ミツビシガス化学㈱新潟研究所)

4A01a09　The potential roles of vitamin B6 in satellite cell functions
11:08　○Thanutchaporn KUMRUNGSEE，Kai Onishi，Takumi Komaru，Noriyuki Yanaka　(Hiroshima Univ.)

4A01a10　マウス腸オルガノイドを用いた微量栄養素の消化管内作用の解析
11:19　○湯浅ほのか[1]，安宅由佳[1]，小川剛伸[1]，桝田哲哉[1]，大木淳子[2]，岩槻　健[2]，谷　史人[1]　([1]京大院農，[2]東農大応生科)

a11〜a13 発表者の接続時間 11:30〜11:40

4A01a11　脂肪肝形成初期段階におけるタンパク質性低栄養によるミネラル代謝への影響
11:40　○南野勝彦　(羽衣国際大学)

4A01a12　潜在的亜鉛欠乏が妊娠期母ラットおよび仔ラットの貧血指標に及ぼす影響
11:51　○笹川　剛，佐藤采香，大崎雄介，白川　仁，駒井三千夫　(東北大農)

4A01a13　農産物に含まれる亜鉛トランスポーター ZIP4 増強化合物の評価・探索
12:02　○高橋正和[1]，大川楓佳[1]，山内遥菜[1]，杉本雅俊[2]，神戸大朋[3]，片野　肇[1]　([1]福井県大生物資源，[2]福井県食品加工研究所，[3]京都大院統合生命)

A02 会場　午前の部(9:30〜12:13)

食品―1321 食品工学 - 保蔵，安全性（6 題）1323 食品工学 - その他（7 題）―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

4A02a01　鶏卵の鮮度指標としての卵黄係数(YI)とサルモネラ菌増殖性の関係
9:30　○久保七彩[1]，山下真由子[1]，岡真優子[2]，八田　一[1]　([1]京都女子大学　大学院，[2]京都府立大学)

4A02a02　第 3 世代シーケンサー MinION を用いた，生産現場で活用できる微生物遺伝子同定法の構築
9:41　○篠原雄治，ヨハネスクルニアワン，坂井浩晃，鈴木康司，永富康司　(アサヒクオリティーアンドイノベーションズ株式会社)

4A02a03　安全・簡便な新規活性種調製法を基盤とする衛生管理ならびに防疫対策の開発
9:52　○田村健治　(首都大・産技高専品川)

4A02a04　甘草抽出物及び glabridin によるバイオフィルムの制御
10:03　○塚谷忠之，黒田理恵子，川口友彰，坂田文彦　(福岡県工技セ)

4A02a05　A prototype of time temperature indicator for food cold chain monitoring
10:14　○Ihaku SOU，Yung-Te HOU，Tzong-Jih CHENG，Li-Chy CHEN，Po-Chuan HSIEH　(Taiwan Univ.)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

4A02a06　さつま砂糖漬けにおける味噌漬け処理が細菌増殖に及ぼす影響
10:35　○小林聡子，横山文二，辰野竜平，古下　学，福田　翼　(水産機構水大校)

4A02a07　ツノナシオキアミ魚味噌製造における発酵スターターが品質に及ぼす影響
10:46　○福田　翼[1]，宿名隼人[1]，藤代俊久[2]，辰野竜平[1]，古下　学[1]　([1]水産機構・水大校，[2]いちからコーポレーション)

4A02a08　エノキタケ抽出エキスの氷結晶成長抑制効果が冷凍ホイップクリームの品質維持に及ぼす効果
10:57　○荒井直樹[1]，藤原綾子[1]，河原秀久[2]　([1]株式会社カネカ，[2]関西大　生命・生物工)

4A02a09　きのこボールによるビタミン D_2 の取り込みおよび生成に関する研究
11:08　○福田史織[1]，鮫島由香[2]，松井徳光[2]　([1]武庫女大院，[2]武庫川女子大)

4A02a10　NMR を用いた採蜜時期の異なる百花蜂蜜の成分組成分析および保存に伴う成分の経時変化追跡
11:19　○住田喬哉，伊藤光洋，瀧口沙希，盧　翌，陸　鵬，張　迷敏，岡本　研，鈴木道生，降旗一夫，永田宏次　(東大・院農生科)

a11〜a13 発表者の接続時間 11:30〜11:40

4A02a11　メイラード反応由来変異発がん物質の生成に対する塩類の抑制効果
11:40　○林　夏衣，島村裕子，増田修一　(静岡県大・食品栄養)

4A02a12　γ シクロデキストリンを用いたコエンザイム Q10 と R-α リポ酸の 3 成分包接体の作製
11:51　○上梶友記子，寺尾啓二　(シクロケムバイオ)

4A02a13　収縮能を有するウシ 3 次元筋組織の構築
12:02　○古橋麻衣[1,2]，森本雄矢[2]，島　亜衣[2]，仲村太志[1]，石川　博[3]，竹内昌治[2]　([1]日清食品ホールディングス㈱グローバルイノベーション研究センター，[2]東京大学大学院　情報理工学系研究科，[3]筑波大学　医学医療系)

A03 会場　午前の部(9:41〜12:35)

食品―1331 食品機能・栄養 - メタボリック・シンドローム，エネルギー代謝―

a02〜a05 発表者の接続時間 9:31〜9:41

4A03a02　褐色様脂肪細胞不活性化を阻害する食品成分スクリーニング系の確立
9:41　○森川未織[1]，伊東侑亮[1]，田中未央里[2]，井上博文[2]，後藤　剛[3]，河田照雄[3]，上原万里子[1]，高橋信之[1]　([1]東農大院農，[2]東農大応生，[3]京大院農)

4A03a03　アシタバ由来カルコンは 3T3-L1 脂肪細胞において脂肪分解およびベージュ化を促進する
9:52　○長谷川莉沙，劉　軼韵，北風智也，山下陽子，芦田　均(神戸大院農)

4A03a04　ゲニステインによる NAD^+ 合成関連酵素 NAMPT の発現制御メカニズムの解明
10:03　○渡邉　駿[1]，三谷塁一[1]，片山　茂[1,2]，中村宗一郎[1]　([1]信州大院・総合理工(農学専攻)，[2]信州大・先鋭領域融合)

4A03a05　AhR による体内時計の乱れを介した脂肪肝誘導のメカニズムとポリフェノールによる保護効果
10:14　○野村拓也[1]，北風智也[2]，芦田　均[2]　([1]神戸大農，[2]神戸大院農)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

4A03a06　Cinnamtannin A2 の廃用性筋萎縮に対する作用
10:35　○鈴木健太，平嶋那由多，大山　栞，藤井靖之，越阪部奈緒美　(芝浦工業大学)

4A03a07　プロポリス成分の褐色脂肪細胞化誘導と組織温度上昇機構の解明
10:46　○兵頭拓真[1]，西川　翔[1]，青山広樹[1]，宮田　椋[2]，熊澤茂則[2]，津田孝範[1]　([1]中部大・応生，[2]静岡県大・食品栄養)

4A03a08　大豆タンパク質 β-コングリシニンと運動の併用による褐色脂肪細胞化誘導作用
10:57　○西川　翔，北村泰聖，小島拓也，津田孝範　(中部大・応生)

4A03a09　Fish Oil の肥満予防・改善に関する研究
11:08　○石川瑛未[1]，奥江紗知子[2]，河野勇気[1]，三浦　徳[1]，増澤(尾﨑)依[1]，細野　崇[1,2]，関泰一郎[1,2]　([1]日大 生資科 生命化，[2]日大院 生資科 応生科)

4A03a10　メタボリックシンドロームにおけるレプチン抵抗性が皮膚中 I 型コラーゲン合成に及ぼす影響
11:19　○山根拓実，天野莉夏，鈴木裕大，瀧澤絹華，金野凌介，岩槻　健，大石祐一　(東農大応生科)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:30〜11:40

4A03a11　昆布連続摂取による日本人の体組成，血清脂質および甲状腺ホルモン濃度に及ぼす影響の検討：二重盲検並行群間試験
11:40　○青江誠一郎[1]，大歳紘史[2]，中村史子[3]，藤原　優[3]　([1]大妻女子大学家政学部，[2]㈱マルヤナギ小倉屋，[3]ＣＰＣＣ株式会社)

4A03a12　サイリウム種皮由来の食物繊維の機能性の検討―食後血中中性脂肪上昇抑制・食後血糖値上昇抑制・血圧低下作用―
11:51　○吉沼春香，井池信子，田辺創一，仲村太志　(日清食品ホールディングス㈱・グローバルイノベーション研究センター)

4A03a13　スダチ果皮エキスによるメタボリックシンドローム予防効果のランダム化二重盲検試験
12:02　○堤　理恵[1]，敷島康普[2]，三浦宏之[2]，阪上　浩[1]　([1]徳島大栄，[2]池田薬草株式会社)

4A03a14　成人男性におけるフルクトース(果糖)摂取誘導内臓脂肪の蓄積に対するユーカリ葉抽出物の抑制効果試験
12:13　○杉本圭一郎[1]，藤澤浩之[1]，中川一弥[1]，此枝三郎[1]，山内俊一[2]　([1]長岡香料，[2]柏たなか病院・糖尿病セ)

4A03a15　サンルージュの食後血糖上昇抑制作用とその関与成分の同定
12:24　○渡邉喬嗣[1]，和才昌史[1]，藤村由紀[1]，三浦大典[2]，立花宏文[1]　([1]九州大農，[2]産総研)

A04 会場　午前の部(9:30〜12:35)

食品―1320 食品工学 - 製造工学，加工学（10 題）1337 食品機能・栄養 - 酸化，抗酸化，糖化，抗糖化，老化（5 題）―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

4A04a01　加熱穀類に生成するバニリンの分析
9:30　○都築和香子，今場司朗，小竹英一　(農研機構)

4A04a02　ミルクコーヒーの高温処理が沈殿生成に及ぼす影響
9:41　○森夕希子[1]，田丸竜万[1]，勝野那嘉子[2]，西津貴久[2]　([1]岐阜大院・自然研，[2]岐阜大・応生)

4A04a03　米粒内の貯蔵タンパク質が冷凍米飯の老化特性に与える影響
9:52　○國枝美沙[1]，橋本朋子[2]，野口由里香[2]，勝野那嘉子[3]，西津貴久[3]　([1]岐阜大院・自然研，[2]日本水産株式会社，[3]岐阜大・応生)

4A04a04　粥および水の添加量がグルテンフリー米粉パンの物理的性質に及ぼす影響について
10:03　○池田紗南，勝野那嘉子，西津貴久　(岐阜大・応生)

4A04a05　グルテンフリー米粉パンの香気特性に関する研究
10:14　○小笠原萌，勝野那嘉子，西津貴久　(岐阜大・応生)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

4A04a06　アカモク添加によるパンの保水性への影響
10:35　○村上　香，志田　桃，正岡智輝　(広島工業大生命)

4A04a07　ヒメマツタケ抽出残渣由来の抽出液が有する免疫チェックポイント阻害活性
10:46　○小堀　一[1]，原田栄津子[2]，多田有人[1]，森園智浩[1]，戸田雅昭[2]，ダレッサンドロガバザコリナ[2]，ガバザエステバン[2]　([1]岩出菌学研究所，[2]三重大医)

4A04a08　高オレイン酸系統大豆を用いた豆腐の構造特性における脂質の影響
10:57　城野愛巳，○丸岡早紀，江口日向子，穴井豊昭，渡邉啓一(佐賀大農)

4A04a09　塩類が亜臨界水中での単糖の異性化 に及ぼす影響とその速度論的解析
11:08　○古城侑也，谷　史人，小林　敬　(京大院農)

4A04a10　亜臨界水中での希少糖の合成に及ぼす緩衝液の影響
11:19　○尾西佑一朗[1]，古城侑也[2]，平山祐輔[2]，安達修二[3]，谷　史人[2]，小林　敬[2]　([1]京大農，[2]京大院農，[3]京都先端大)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:30〜11:40

4A04a11　ファージディスプレイ法を用いた過酸化脂質修飾タンパク質抗体の解析
11:40　○阿南優佑，佐々木栄太，板倉正典，近澤未歩，内田浩二(東大院農生科)

4A04a12　ローヤルゼリーが骨格筋萎縮モデルと筋芽細胞の骨格筋代謝に及ぼす影響
11:51　○岡本秀人[1]，白川智彦[2]，松原琢磨[2]，奥村暢章[1]，古株彰一郎[2]　([1]株式会社山田養蜂場本社　みつばち健康科学研究所，[2]九州歯科大学　健康増進学講座　分子情報生化学分野)

4A04a13　スダチ果皮ポリメトキシフラボンであるスダチチンは，ERK 経路を介して表皮角化細胞の増殖を抑制する
12:02　○安部庄剛，西谷真美，湯浅恵造　(徳島大院先端技術)

4A04a14　モロッコ植物由来エッセンシャルオイルのアンチエイジング効果
12:13　○平江衣絵[1]，中村水玖[2]，LEDRHEM Merieme[3]，BOUAMAMA Hafida[3]，片倉喜範[1,2,4]　([1]九大農・食化工，[2]九大院・生資環，[3]カディ・エオード大，[4]九大院・農院)

4A04a15　皮膚に対するオオヤマザクラ（*Cerasus sargentii*）果実エキスの抗シワ効果
12:24　○岩間直子[1]，河合貴弘[2]，北村裕志[2]　([1](地独)青森産技セ弘工研，[2]六花酒造株式会社)

A05 会場　午前の部（9:30〜12:24）

食品―1338 食品機能・栄養 - 神経，内分泌，味覚・食欲（5 題）1332 食品機能・栄養 – タンパク質・アミノ酸代謝（9 演題）―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

4A05a01　Flavan 3-ols は青斑核を介して覚醒状態を維持する
9:30　○藤井靖之[1]，坂田　純[1]，伏見太希[1]，松永祥孟[2]，阿部啓子[2]，平　　修[3]，越阪部奈緒美[1]　([1]芝浦工大，[2]東京大学，[3]福島大学)
4A05a02　クエン酸摂取の慢性ストレス負荷モデルにおける効果
9:41　○斎木朝子[1]，衞藤史博[2,3]，平光正典[1]，小林直之[1]，土屋陽一[1]，瀬藤光利[2,3,4]，矢尾育子[2,4,5]　([1]サッポロホールディングス株式会社　価値創造フロンティア研究所，[2]浜松医科大学光尖端医学教育研究センターフォトニクス医学研究部，[3]浜松医科大学細胞分子解剖学講座，[4]国際マスイメージングセンター，[5]関西学院大学 理工学部 生命医化学科)
4A05a03　ローズマリー抽出物摂取による抗ストレス効果の検討
9:52　○萱島知子[1]，海野美月[2]，海切弘子[2]，松原主典[2]　([1]佐賀大教育，[2]広島大院教育)
4A05a04　ブローボトル形態冷菓とリラックス効果の関連性評価
10:03　○山本　宗[1]，真川竜太[1]，阪井直哉[1]，一楽建二[1]，山崎英恵[2]　([1]江崎グリコ，[2]龍谷大農)
4A05a05　糸状菌の酸ストレス条件下でのアグマチン誘導性
10:14　○坂根隆浩[1]，加藤紗也[1]，福田青郎[1]，ティラグールガンジャナ[2]，藤原伸介[1]　([1]関西学院大理工，[2]カセサート大農)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

4A05a06　高 Resistant Protein 甘酒による角質水分量への影響
10:35　○高橋雅弥[1]，笹村昂平[1]，佐野友希[1]，横山春花[1]，吉田知華[1]，町田雅之[1]，尾関健二[1]，川合史晃[2]，栗本将太[2]，中村雅彦[2]　([1]金工大・ゲノム研，[2]厚生産業株式会社)
4A05a07　たんぱく質濃度 2.2 g/100 kcal の市販乳児用ミルクを哺乳した満期産児の発育
10:46　○神野慎治，山崎香枝，中村吉孝，木ノ内俊　(㈱ 明治)
4A05a08　スケソウダラ魚肉タンパク質摂取による骨格筋量増大作用の機序解明
10:57　○山本衿子[1]，藤谷美菜[2]，内田健志[3]，井上菜穂子[4]，阿部啓子[1]，岸田太郎[2]，岡田晋治[1]　([1]東大院農生科，[2]愛媛大院農・生命機能，[3]日本水産㈱食品機能研，[4]日大・生資)
4A05a09　細胞外セリン欠乏に応答した肝がん細胞株のアミノ酸代謝及び遺伝子発現制御機構
11:08　○濱野桃子[1]，友永省三[2]，小田裕昭[3]，加藤久典[4]，古屋茂樹[1]　([1]九州大農，[2]京都大農，[3]名古屋大農，[4]東京大農)
4A05a10　出芽酵母における高濃度トリプトファンによるアミノ酸インバランスの解析
11:19　○大橋一登　(群大・生調研)

a11〜a14 発表者の接続時間 11:30〜11:40

4A05a11　GABA によるホモカルノシン合成の誘導，および単一筋線維を用いたイミダゾールジペプチドの新規機能性の探索
11:40　○小丸拓海[1]，佐藤可奈子[1]，有馬岳志[1]，大西　魁[1]，佐藤三佳子[2]，大石泰之[2]，Thomas Hawke[3]，矢中規之[1]，Thanutchaporn Kumrungsee[1]　([1]広島大院統合生命，[2]日本ハム中央研究所，[3]McMaster Univ.)
4A05a12　J774.1 マクロファージ様細胞において mTORC2 シグナルはリソソーム活性を制御する
11:51　○坂井麻衣子[1]，大西康太[2]，増田真志[2]，大南博和[2]，奥村仙示[2]，原　太一[3]，竹谷　豊[2]　([1]徳島大学 大学院栄養生命科学教育部 臨床食管理学分野，[2]徳島大学 大学院医歯薬学研究部 臨床食管理学分野，[3]早稲田大学 人間科学学術院健康福祉科学科 細胞制御学・食品生命科学研究室)
4A05a13　食品による栄養飢餓非依存性オートファジーの分子機構の解明
12:02　○山越正汰[1]，矢野敏史[1]，坂井麻衣子[2]，藤元　萌[3]，大西康太[4]，原　太一[1]　([1]早稲田大学 人間科学学術院 細胞制御・食品生命科学研究室，[2]徳島大学 大学院栄養生命科学教育部 臨床食管理学分野，[3]東京大学 大学院農学生命科学研究科 動物細胞制御学研究室，[4]徳島大学 大学院医歯薬学研究部 臨床食管理学分野)
4A05a14　近赤外蛍光イメージングを用いた *in vivo* オートファジー活性評価法の構築
12:13　○福田哲平[1]，大西康太[2]，増田真志[2]，松﨑泰教[3]，今野　歩[3]，藤元　萌[4]，大西愛花[1]，坂井麻衣子[1]，大南博和[2]，奥村仙示[2]，原　太一[5]，平井宏和[3]，竹谷　豊[2]　([1]徳島大学 大学院栄養生命科学教育部 臨床食管理学分野，[2]徳島大学 大学院医歯薬学研究部 臨床食管理学分野，[3]群馬大学 大学院医学系研究科 脳神経再生医学分野，[4]東京大学 大学院農学生命科学研究科 動物細胞制御学研究室，[5]早稲田大学 人間科学学術院健康福祉科学科 細胞制御学・食品生命科学研究室)

A06 会場　午前の部（9:30〜12:13）

食品―1334 食品機能・栄養 - 免疫，炎症―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

4A06a01　シソ葉香気成分による免疫抑制効果
9:30　○岡田　光，八代拓也，西山千春　(東理大)
4A06a02　サリチルアルデヒドによる免疫細胞の機能調節
9:41　○松原宏樹，八代拓也，飯塚雄輝，笠倉和巳，西山千春　(東理大)
4A06a03　ケンフェロールは AhR アンタゴニスト活性を介して腸管樹状細胞の RALDH2 発現を促進する
9:52　○綿貫優実，八代拓也，山口昌樹，西山千春　(東理大)
4A06a04　化学発光を利用した非侵襲性腎炎モデルマウスの作製，および glucosyl hesperidin の予防効果
10:03　○八澤茉央[1]，橋本孝太郎[1]，仮屋大志[1]，眞田洋平[1]，橋本貴生[1]，van de Loo Fons AJ[2]，Thanutchaporn Kumrungsee[1]，矢中規之[1]　([1]広島大院統合生命，[2]Radboud Univ.)
4A06a05　緑茶カテキン EGCG の抗肥満作用は骨髄細胞特異的 67-kDa ラミニン受容体ノックアウトマウスにおいて消失する
10:14　○村田京介，福富拓哉，山田脩平，冨岡玲乃，西岡成汰，熊添基文，藤村由紀，立花宏文　(九大院農院・生機科)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

4A06a06　加齢に伴う腸間膜リンパ節樹状細胞における RALDH2 発現の低下は抗原摂取による制御性 T 細胞誘導の低下の一因となる
10:35　○高野智弘[1]，上滝隆太郎[1]，朴　知賢[1,2]，塩河亜弥[1]，好田　正[3]，田之倉優[1,2]，宮川拓也[2]，高橋恭子[4]，足立(中嶋)はるよ[1]，八村敏志[1]　([1]東大院農生科・食の安全研セ，[2]東大院農生科・応生化，[3]東農工大農・応生化，[4]日大・生資科)
4A06a07　γ-リノレン酸の乳酸菌代謝産物である γKetoC は免疫抑制作用を有し皮膚炎を抑制する
10:46　○八代拓也[1]，山本愛日[1]，飯田真由[1]，大村さくら[1]，岸野重信[2]，小川　順[2]，西山千春[1]　([1]東京理科大基礎工，[2]京大院農・応用生命)

4A06a08　分岐鎖型短鎖脂肪酸によるマスト細胞依存性アレルギー炎症の抑制
10:57 ○飯塚雄輝，笠倉和巳，藤垣　泉，三浦亮介，八代拓也，西山千春　（東理大基礎工）

4A06a09　食物アレルギーモデルマウス由来肺細胞の喘息誘導性刺激に対する応答性
11:08 ○柳井梨咲，江上里砂，斎藤南那，中川　渉，東　俊哉，鷲谷絢史，髙橋　輝，津田真人，細野　朗　（日大生資科）

4A06a10　腸間膜リンパ節樹状細胞の抗原提示による T 細胞分化における乳酸菌 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* YRC3780 のバランス調節効果
11:19 ○中川稜悟[1]，顧文テイ[1]，高野智弘[1]，王イバイ[1]，宇野　智[1]，森永真実子[1]，内田健治[2]，鳥居剛史[2]，元島英雅[2]，片野直哉[2]，足立(中嶋)はるよ[1]，八村敏志[1]　([1]東大院農生科・食の安全研セ，[2]よつ葉乳業・中央研)

a11〜a13 発表者の接続時間 11:30〜11:40

4A06a11　*Lactobacillus paracasei* K71 経口投与による NC/Nga マウスの皮膚炎症状緩和とサイトカイン発現レベル変動
11:40 ○山本佳奈[1]，岡本　楓[2]，町田優莉佳[2]，三原敏敬[1]，城斗志夫[2]，原　　崇[2]　([1]亀田製菓，[2]新潟大農)

4A06a12　キニガイグチ（*Tylopilus ballouii*）に含有される抗アレルギー活性物質に関する研究
11:51 ○菅谷紘一[1]，井野睦美[2]，小野瀬淳一[1]，阿部尚樹[1]　([1]東農大院・健康，[2]東農大院・栄養)

4A06a13　加熱処理によるフコイダン分解物の抗アレルギー効果への影響
12:02 ○森田温子，水野雅史　（神戸大院農）

A07 会場　午前の部（9:30〜12:24）

微生物―1441 物質生産 – 発酵（二次代謝産物，抗生物質，ペプチド，生理活性物質）―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

4A07a01　Aurantiochytrium sp.1 AJ7869 を用いたステロール生産技術の開発
9:30 ○鈴木茂雄[1]，KISELEVA Evgenia[1]，西田裕貴[3]，石橋洋平[2]，沖野　望[2]，伊東　信[2]　([1]味の素株式会社，[2]九大院・農・生命機能，[3]九大院・生資環・生命機能)

4A07a02　出芽酵母によるゲラニオールから他の香気物質への転換に関する研究
9:41 ○前田　勇，大橋勇敢　（宇都宮大院農）

4A07a03　発酵大豆テンペ抽出物に含まれる脂肪酸とその誘導体の抗菌活性の評価
9:52 ○和久井美咲[1]，村上　舞[2]，前田　勇[1,2]　([1]宇都宮大院農，[2]宇都宮大農)

4A07a04　機能獲得型変異を持つ YabJ タンパク質による納豆菌ポリ-γ-グルタミン酸の生産制御
10:03 ○木村啓太郎[1]，ルティティッホン[1]，藤本　瑞[2]　([1]農研機構・食品部門，[2]農研機構・生物部門)

4A07a05　ポリヒドロキシアルカン酸重合酵素の連鎖移動反応を介した 3-ヒドロキシ酪酸オリゴマーの分泌生産
10:14 ○宮原佑宜[1,3]，廣江綾香[1,3]，山田麻里子[1,3]，柘植丈治[2,3]，田口精一[1,4]　([1]東京農大，[2]東工大，[3]JST-MIRAI，[4]JST-CREST)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

4A07a06　*Bacillus cereus* YB-4 由来ポリエステル重合酵素を発現させた組換え大腸菌による 3-ヒドロキシブタン酸オリゴマーの分泌生産
10:35 ○後藤早希[1,2]，宮原佑宜[1,2]，廣江綾香[1,2]，山田麻里子[1,2]，柘植丈治[2,3]，田口精一[1]　([1]東農大，[2]JST-MIRAI，[3]東工大院)

4A07a07　オリゴエステル分泌生産における末端構造の制御および構造解析
10:46 ○水野匠詞[1,2]，櫻井徹生[1,2]，廣江綾香[2,3]，田口精一[3,4]，柘植丈治[1,2]　([1]東工大，[2]JST-MIRAI，[3]東京農大，[4]北大院工)

4A07a08　酸ストレスによる抗ウイルス活性物質シネフンギンの増産効果
10:57 ○山形　遥，中島佑里子，根本理子，稲垣賢二，田村　隆　(岡山大院・環境生命)

4A07a09　パームヤシ病原性 Ganoderma boninense に対する抗糸状菌活性の機構解明
11:08 ○近藤宜希[1]，浅原理央[1]，中野貴裕[1]，CHIN Claent fui seung[2]，ZAINUDIN Huzairi[3]，RAMLI Norhayati[3]，田代幸寛[1]，酒井謙二[1]　([1]九大院・生資環，[2]マレーシアサバ大学，[3]プトラ・マレーシア大学)

4A07a10　カロテノイド生産のためのゲノム組換え大腸菌の創出(2)
11:19 ○竹村美保，渡辺あすか，作野華誉，三沢典彦　（石川県立大学）

a11〜a14 発表者の接続時間 11:30〜11:40

4A07a11　組換え大腸菌を用いたバイオマス由来チロシン誘導体の発酵生産
11:40 ○嵯峨知沙，佐々倉有麻，桝尾俊介，高谷直樹　（筑波大・生命環境・微生物サステイナビリティ研究センター）

4A07a12　*Chromobacterium violaceum* VP2 株を使用したビオラセイン生産条件の検討
11:51 ○高橋蘭丸，滝口泰之　（千葉工業大学）

4A07a13　シグナル分子シュードレセプター改変における物質生産性プロファイルの解析
12:02 ○見崎裕也[1]，山本章治[2]，鈴木敏弘[2]，岩國美由季[2]，高橋　譲[2]，稲田晋宣[3]，木梨陽康[2]，荒川賢治[1,2]　([1]広島大院・統合生命，[2]広島大院・先端研，[3]広島大・自然科学セ)

4A07a14　バイオフィルム破壊量の新規定量法，バイオフィルム-レプリカ法
12:13 ○小田　忍，川村祥太，長谷川誠　（金沢工大ゲノム研）

A08 会場　午前の部（9:30〜12:13）

微生物―1450 その他―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

4A08a01　細菌の細胞壁に対する光触媒反応の影響
9:30 ○髙尾綾乃[1,2,3]，大嶋佑治[1]，岡本歩未[1]，落合　剛[2,3]，藤嶋　昭[2,3]，鈴木智順[1,3]　([1]東理大　応生，[2]KISTEC，[3]東理大総研)

4A08a02　各生育期の細菌外殻構造が光触媒反応に及ぼす影響の解析
9:41 ○槻あかね[1]，藤嶋　昭[2]，鈴木智順[1,2]　([1]東理大応生，[2]東理大総研)

4A08a03　微生物を含む PC グラウトの力学および粘度特性
9:52 ○富澤　哲，本田晴香，松家武樹　（熊本高専）

4A08a04　Analysis of orchard field for construction of the database by Soil Fertility Index (SOFIX)
10:03 ○Pitchayapa Pholkaw，Quoc Thinh Tran，Kiwako Araki，Motoki Kubo　(Ritsumeikan Univ.)

4A08a05　土壌肥沃度指標(SOFIX)に基づくブドウ栽培に適した土壌の解析
10:14 ○竹田利奈，荒木希和子，久保　幹　（立命館大）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

4A08a06　土壌環境が植物病発症に与える影響の解析
10:35 ○雲川雄悟，前田憲慶，荒木希和子，久保　幹　（立命館大）

4A08a07　熱殺菌土壌における細菌数の回復と肥沃度との関係解析
10:46 ○國川　藍，荒木希和子，久保　幹　（立命館大）

4A08a09　生物学的処理および光触媒・Boron-doped diamond 電極ハイブリッド式汚水浄化システムの改良と環境影響評価
11:08　○久保田智紀[1]，井手口真理[1]，佐藤俊樹[1]，落合　剛[2,3]，藤嶋　昭[2]，鈴木智順[1,2]　([1]東理大応生，[2]東理大総研，[3]KISTEC)

4A08a10　Establishment of a NanoBiT-based two- and three-hybrid system in fission yeast
11:19　○Fereshteh AZADEH[1]，Akihisa MATSUYAMA[2]，Minoru YOSHIDA[1,2,3]　([1]University of Tokyo, [2]RIKEN CSRS, [3]CRIIM)

a11〜a13 発表者の接続時間 11:30〜11:40

4A08a11　グラナチシンと結合する分泌タンパク質
11:40　○西山辰也，榎本成美，長安伶奈，上田賢志　(日大生資科)

4A08a12　The rare earth elements-mediated methanol dehydrogenase switch in a methanotrophic bacterium Methylococcus capsulatus Bath
11:51　○RUOYUN XIE[1]，Motoko Takashino[2]，Kensuke Igarashi[2]，Souichiro Kato[1,2]　([1]Hokkaido Univ., [2]National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)

4A08a13　野菜のにおいを検知する微生物バイオセンサーの開発
12:02　○南さやか，諸橋賢吾　(東京理科大・理工)

A09 会場　午前の部(9:30〜12:24)

微生物―1421 遺伝子 - 発現制御，トランスクリプトーム―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

4A09a01　PCB 分解菌 *Acidovorax* sp. KKS102 株が示す多段階増殖とレスポンスレギュレーター BphQ の翻訳後修飾
9:30　○酒井啓一郎，永田裕二，津田雅孝，大坪嘉行　(東北大生命)

4A09a02　*Serratia* における small RNA ChiX と Hfq によるキチン分解系の制御
9:41　小嶋優常[1]，宗像直輝[1]，熊木智耶[2]，堀井恭子[1]，山岸拓矢[1]，杉本華幸[1,2]，○鈴木一史[1,2]　([1]新潟大院・自然科学，[2]新潟大・農・応生化)

4A09a03　*Comamonas testosteroni* TA441 のフェノール代謝に関する研究
9:52　○新北大樹，亀谷将史，石井正治，新井博之　(東大院)

4A09a04　グリシン誘導性 small RNA GcvB によるサルモネラ増殖抑制機構の解析
10:03　○宮腰昌利　(筑波大医)

4A09a05　放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2)におけるヘムを基盤とした NO 依存性二成分制御系による鉄硫黄タンパク質と共同した抗生物質生産調節機構
10:14　○本間颯太，伊藤晋作，矢嶋俊介，佐々木康幸　(東農大農)

a06〜a09 発表者の接続時間 10:25〜10:35

4A09a06　ゴム分解性細菌 *Gordonia polyisoprenivorans* VH2 のシグマ因子が制御する光応答メカニズムの解析
10:35　○田島　侑，榮山　新，上田賢志，髙野英晃　(日大・生資科・生命研)

4A09a07　ミヤコグサ根粒菌 *Mesorhizobium japonicum* における光誘導性遺伝子の制御と機能
10:46　○鈴木真紀[1]，兼崎　友[2]，吉川博文[3]，上田賢志[1]，髙野英晃[1]　([1]日大・生資科・生命研，[2]東農大・生物資源ゲノム解析セ，[3]東農大・生命科)

4A09a08　フェルラ酸を検出するバクテリアセンサー
10:57　○白濵里帆，室佳史乃，上村直史，政井英司　(長岡技科大・生物)

4A09a09　Effects of glucuronoyl esterase on the regulation of hemicellulases in *Neurospora crassa*
11:08　○Ruijie WANG[1]，Minoru YOSHIDA[1,2,3]，Manabu ARIOKA[1,2]　([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]RIKEN CSRS)

a11〜a14 発表者の接続時間 11:30〜11:40

4A09a11　タンパク質の熱変性に好熱菌はどう応答するか
11:40　○鈴木宏和，奥村友太，三河由依，吉村俊祐，髙田真穂，大城　隆　(鳥取大学工学部)

4A09a12　超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* における芳香族アミノ酸生合成遺伝子群の転写活性化因子の同定
11:51　○金井　保，山本康之，金関剛史，跡見晴幸　(京大院工)

4A09a13　ヒト腸内細菌 *Prevotella copri* の 2 つのキシラナーゼの発現解析
12:02　○高木千尋[1]，林　秀謙[1,2]　([1]前工大院工，[2]前工大工)

4A09a14　*Komagataella phaffii* におけるメタノール誘導性遺伝子発現制御に重要な転写因子 Mxr1 の機能領域の同定
12:13　○井上紘一，由里本博也，阪井康能　(京大院農)

A10 会場　午前の部(9:30〜12:02)

微生物―1411 細胞 - 複合微生物，共生微生物，難培養性微生物―

a01〜a04 発表者の接続時間 9:20〜9:30

4A10a01　脱窒細菌とセルロース分解菌による脱窒法の検討
9:30　○政岡修平，鈴木智順　(東理大応生)

4A10a02　硝化細菌のコロニー化に影響を与える培養条件の精査
9:41　○安藤晃規[1,2]，岡田若子[1]，宮本憲二[3]，加藤康夫[4]，篠原　信[5]，小川　順[1,2]　([1]京大院農・応用生命，[2]京大・生理化学，[3]慶大・理工，[4]富山県大・生医工研セ，[5]農研機構)

4A10a03　有機養液栽培におけるバイオフィルム由来根部成長促進物質の活性評価
9:52　○黄　　穎[1]，内藤久仁子[1]，加藤康夫[2]，篠原　誠[3]，安藤晃規[4,5]，小川　順[4,5]，宮本憲二[1]　([1]慶大・理工，[2]富山県大・生医工研セ，[3]農研機構，[4]京大院農・応用生命，[5]京大・生理化学)

4A10a04　有機養液栽培でみられた植物の根の形態的特徴
10:03　○野崎　守[1]，野村泰治[1]，北岡直樹[1]，安藤晃規[2,3]，宮本憲二[4]，篠原　信[5]，小川　順[2,3]，加藤康夫[1]　([1]富山県大・生医工研セ，[2]京大院農・応用生命，[3]京大・生理化学，[4]慶大・理工，[5]農研機構)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

4A10a06　炭素源資化性が異なる複数の窒素固定細菌を利用した高活性型生物窒素肥料の開発に向けた解析
10:35　○吉留大輔[1]，近藤佐紀[1]，鵜沼廣太朗[1]，葛山智久[1,2]，日髙真誠[1,2]　([1]東大院・農生科，[2]東京大学微生物科学イノベーション連携機構)

4A10a07　Water-in-oil ドロップレットを用いた乳酸菌スクリーニング手法の検討
10:46　○渡邉瑞貴，森　浩二，紙野　圭　(製品評価技術基盤機構)

4A10a08　純粋培養した AM 菌の胞子成熟を促進する物質の探索
10:57　○丸井汐里，亀岡　啓，秋山康紀　(大阪府大・生命環境)

4A10a09　緑膿菌のクォーラムセンシング物質が与える細菌溶菌性捕食細菌デロビブリオ属細菌への捕食阻害原因物質の特定
11:08　○星子裕貴[1]，西山嘉人[1]，ロペスハコメルイスエサウ[2]，平野隆太郎[1]，守屋多恵[1]，ガルシアコントレラスロドルホ[2]，前田憲成[1]　([1]九工大院生命体，[2]メキシコ国立自治大医)

4A10a10　サワードウ自然発酵を駆動する乳酸菌リレーに pH が果たす役割
11:19　○大城麦人[1,2]，田中　優[1]，善藤威史[1]，中山二郎[1]　([1]九州大農，[2]山崎製パン中央研)

a11〜a12 発表者の接続時間 11:30〜11:40

4A10a11　沖縄のサンゴ礁海域における Ruegeria 属細菌分布調査の検討
11:40　○北村瑠璃子[1]，西川有美[1]，西村優菜[1]，三浦夏子[1]，伊藤通浩[2]，高木俊幸[3]，片岡道彦[1]　([1]阪府大院・生命環境，[2]琉球大熱生研，[3]東大大気海洋研)

4A10a12　光合成微生物人工共生体を用いたナノセルロース生産システムの構築
11:51　○櫻澤　熙[1,5]，山中　茂[2]，森川英明[3]，村上　泰[4]，小笠原寛[5]　([1]信州大院・繊維・応生，[2]信州大・繊維，[3]信州大・繊維・先進繊維，[4]信州大・繊維・化材，[5]信州大・基盤研究支援セ・遺伝子)

A11 会場　午前の部(9:30〜12:35)

微生物―1440 物質生産 - 醸造，発酵（一次代謝産物）(4 演題)
1442 物質生産 - 酵素，タンパク質（10 演題）―

a01〜a04 発表者の接続時間 9:20〜9:30

4A11a01　遺伝子組み換え大腸菌によるデンプンからの 1,3-propndiol の直接生産
9:30　○佐藤臨太郎[1,2]，麻生祐司[1,2]　([1]京都工繊大院，[2]JST-MIRAI 未来社会創造事業)

4A11a02　*Methylobacterium extorquens* AM1 によるメタノールからのセルロース生産
9:41　○名和真佑，田中知成，小原仁実，麻生祐司　(京都工繊大院)

4A11a03　油糧糸状菌 *Mortierella alpina* の分子育種による遊離脂肪酸生産株のリピドーム解析
9:52　○島田良美[1]，下平武彦[2]，相馬悠希[2]，和泉自泰[2]，安藤晃規[1]，岸野重信[1]，阪本鷹行[3]，馬場健史[2]，小川　順[1]，櫻谷英治[3]　([1]京大院農・応用生命，[2]九州大・生医研，[3]徳島大・生物資源)

4A11a04　ラビリンチュラ類 *Aurantiochytrium* sp. T7 による ω3-ドコサペンタエン酸(DPA)の生産
10:03　○奥田知生[1]，安藤晃規[1,2]，波多野文美[1]，菊川寛史[1]，松山恵介[3]，小川　順[1,2]　([1]京大院農・応用生命，[2]京大・生理化学，[3]長瀬産業株式会社)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

4A11a06　鰹節カビ *Aspergillus* 属糸状菌が生産する加水分解酵素の特性解析
10:35　小川千晶[1]，上村真理子[2]，中林麗奈[1]，木村行宏[1]，横田仁子[3]，土居幹治[3]，○竹中慎治[1]　([1]神戸大院農，[2]神戸大農，[3]マルトモ㈱)

4A11a07　シアノバクテリア外膜脱離細胞の諸性質と栄養生産への応用
10:46　○児島征司　(パナソニック㈱)

4A11a08　結晶化が困難なアルドキシム脱水酵素の変異導入による結晶構造解析
10:57　○松井大亮[1]，村木則文[2,3]，Chen Ke[1]，森　智也[1]，青野重利[2,3]，浅野泰久[1]　([1]富山県大工・生医工研セ，[2]自然科学研究機構・生命創成探究セ，[3]自然科学研究機構・分子研)

4A11a09　イソブチルシアノアクリレートナノ粒子が ヤケイロタケの酵素生産と菌体量に与える影響
11:08　○神尾　瑞[1]，堀沢　栄[1]，小松千景[2]　([1]高知工科大，[2]チカミミルテック株式会社)

4A11a10　麹菌菌体外放出系を利用したプロタミンの生産
11:19　○小暮望音，中島健介，米田広平，松田祐介　(関西学院大院・理工・生命)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:30〜11:40

4A11a11　*N* 結合型糖鎖欠損糖タンパク質を分泌生産する黄麹菌 AoGlycoDelete 株の諸性質解析
11:40　○李　秋実[1]，田辺佳奈[2]，小谷哲也[2]，竹川　薫[1]，樋口裕次郎[1]　([1]九大院　生資環，[2]AGC ㈱)

4A11a12　タンパク質高生産タグを組み込んだエチレン生成シアノバクテリアの改良
11:51　○神藤定生[1]，榊原絢美[2]，森澤佑太[2]，松井健史[3]，小池和好[3]，勝又　聡[3]，細田晃文[2]，田村廣人[2]　([1]名城大理工，[2]名城大農，[3]出光興産株式会社)

4A11a13　ピキア酵母株産生ヒト治療用抗体(ヒュミラ)の糖鎖の改変
12:02　○渋井達郎，福井麻由，原　宏佳　(日本獣医生命科学大学)

4A11a14　麹菌 *A. oryzae* のハイドロフォービン HypD の超親水性 C 末端領域がタンパク質安定性に及ぼす影響
12:13　○田近麻友子[1]，天貝拓海[1]，石倉幹大[1]，中野宏軌[1]，井上美紅[2]，齋藤堂也[2]，竹内南優紀[2]，中島春紫[1,2]　([1]明治大院農化，[2]明治大農化)

4A11a15　タンパク質データベースを利用した *in silico* 解析による新規アコニット酸イソメラーゼの探索と活性の検出
12:24　○小田祐之亮，滝口有沙，吉岡育哲，桐村光太郎　(早大・先進理工・応化)

A12 会場　午前の部(9:30〜12:35)

微生物―1442 物質生産 - 酵素，タンパク質―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

4A12a01　ビフィズス菌が生産するスクロースアナログ二糖の分解に関わる酵素の研究
9:30　○保坂浩貴[1]，系浴勇真[2]，平野貴子[1,2]，袴田　航[1,2]，西尾俊幸[1,2]　([1]日大院・生資科，[2]日大・生資科・生命化)

4A12a02　*N*-アセチルスクロサミンおよびスクロース存在下で *Bifidobacterium pseudocatenulatum* が生産する糖質加水分解酵素の諸性質について
9:41　○藤田　宙，平野貴子，袴田　航，西尾俊幸　(日大院生資科)

4A12a03　胆汁酸分解と抗生物質耐性に関わる両機能性酵素によるプロバイオティクス
9:52　○草田裕之[1]，有田正規[2]，遠野雅徳[3]，玉木秀幸[1]　([1]産総研生物プロセス，[2]国立遺伝研，[3]農研機構畜産研究部門)

4A12a04　マルトトリオース生成アミラーゼを用いたアスコルビン酸配糖体とグリセロール配糖体の合成
10:03　○酒井彩美，掃部正浩，甲斐建次，谷　修治，炭谷順一，川口剛司　(阪府大院生環科)

4A12a05　放線菌 Streptomyces corchorusii 由来タンパク性アミラーゼ阻害剤 Paim の網羅的変異導入による阻害特異性の変換
10:14　○岩崎夏帆，谷　修治，炭谷順一，川口剛司　(阪府大院生環科)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

4A12a06　ウェルシュ菌による *Clostridium acetobutylicum* の各種セルラーゼの発現
10:35　○川畑博暉[1]，澤入駿哉[1]，成谷宏文[2]，森山龍一[1]，宮田　茂[1]　([1]中部大学大学院応生，[2]広島大学大学院生物圏科学)

4A12a07　分泌生産のためのウェルシュ菌用新規発現ベクターの構築
10:46　○荒川利行，加藤実希，矢野智奈美，宮田　茂　(中部大学大学院応生)

4A12a08　化学酵素的アミド結合形成法を用いたジペプチド類似体の合成
10:57　佐々木楓，○鈴木　伸，木野邦器　(早大・先進理工・応化)

4A12a09　化学酵素的アミド結合形成システムを応用したキラリティー制御可能なジケトピペラジン合成法の開発
11:08 ○唐鎌翔大，横田光希，鈴木　伸，木野邦器　（早大・先進理工・応化）

4A12a10　麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来ルチノシダーゼの糖転移反応および効率的生産
11:19 ○廣田瑠花，川﨑真由，塩野義人，小関卓也　（山形大農）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:30〜11:40

4A12a11　成熟タンパク質へのアミノ酸付加が *Aspergillus oryzae* 由来タンナーゼ TanB の酵素学的性質に及ぼす影響
11:40 ○高橋千尋[1]，市川響太郎[1]，塩野義人[1]，新谷智子[2]，渡部　昭[2]，神崎　浩[3]，五味勝也[2]，小関卓也[1]　（[1]山形大農，[2]東北大院農，[3]岡山大院環境生命）

4A12a12　高度好塩性古細菌が生産するキシラナーゼの分離とその諸性質解析
11:51 ○人見大地[1]，嶋根康弘[2]，峯岸宏明[1,2]　（[1]東洋大学大学院，[2]海洋研究開発機構）

4A12a13　分裂酵母胞子表層タンパク質の特性を使った異種タンパク質発現生産系構築への試み
12:02 ○今田一姫[1,2]，山口成美[1]　（[1]鈴鹿高専，[2]大阪市大院理）

4A12a14　枯草菌宿主でのグルコースまたはラムノース制御可能なハイブリッド型タンパク質発現系の開発
12:13 小松弘昌，壽原直杜，○広岡和丈　（福山大生命工・生物工）

4A12a15　*Bacillus circulans* KA-304 由来 α-1,3-グルカナーゼの機能解析と構造解析
12:24 ○大塚　唯[1]，矢野成和[2]，伊藤貴文[3]，日び隆雄[3]，田中良和[4]，若山　守[5]，真壁幸樹[2]　（[1]山形大工，[2]山形大院理工，[3]福井県大生資，[4]東北大院生命，[5]立命館大生命）

A16 会場　午前の部（9:30〜12:24）

微生物―1443 物質生産 - 微生物変換，微生物酵素反応―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

4A16a01　*C*-配糖体分解微生物の単離と産物の同定
9:30 ○渡辺聖実[1]，草刈雅和[1]，寺下柚子[1]，熊野匠人[1,2]，橋本義輝[1,2]，小林達彦[1,2]　（[1]筑波大院・生命環境，[2]筑波大・MiCS）

4A16a02　C-配糖体代謝酵素の探索と解析
9:41 ○堀　早苗[1]，寺下柚子[1]，熊野匠人[1,2]，橋本義輝[1,2]，小林達彦[1,2]　（[1]筑波大院・生命環境，[2]筑波大・MiCS）

4A16a03　脳神経疾患予防ならびに脳機能改善に資するチロシン含有ジペプチドの生産
9:52 ○佐怒賀悠，木野邦器　（早大・先進理工・応化）

4A16a04　バイオプロセスによるフルフラールからの 2,5-フランジカルボン酸生産
10:03 ○川鍋一樹，青野　陸，木野邦器　（早大・先進理工・応化）

4A16a05　L-アミノ酸オキシダーゼ提示酵母による細胞外での高効率なアンモニア生産
10:14 ○渡邉幸夫，黒田浩一，植田充美　（京大院・農・応用生命）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

4A16a06　芳香族化合物を高生産するためのプラスミドフリーなフェニルアラニン高生産大腸菌株の育種
10:35 ○岸田隆寛[1]，駒　大輔[2]，大橋博之[2]，山中勇人[2]，森芳邦彦[2]，長森英二[1]，大本貴士[2]　（[1]大阪工大工，[2]大阪技術研）

4A16a07　*Rhodococcus-Escherichia coli* 発現シャトルベクターの宿主域の解析
10:46 ○山村栄虎　（協和ファーマケミカル株式会社）

4A16a08　酸素発生型光合成で駆動する嫌気発酵プロセス
10:57 ○得平茂樹，肥後明佳　（首都大理）

4A16a09　デルタロドプシンによる ATP 再生を伴う物質生産性の向上
11:08 ○塩澤優稀[1]，弘埜陽子[1]，石井　純[2]，柘植謙爾[2]，松田史生[3]，戸谷吉博[3]，原　清敬[1]　（[1]静岡県立大院・食栄環，[2]神戸大・先端バイオ工，[3]阪大院・情報）

4A16a10　*Penicillium aurantiogriseum* の触媒反応により *Aspergillus ustus* 代謝物から 生成する新規フロイソキノリンアルカロイド
11:19 ○山田光代，齊藤太樹，小川凌太，仁戸田照彦，神崎　浩（岡山大院・環境生命）

a11〜a14 発表者の接続時間 11:30〜11:40

4A16a11　光増感剤/組換え大腸菌細胞系を用いた光触媒的水素生産
11:40 ○本田裕樹，篠原優佳，藤井　浩　（奈良女子大理）

4A16a12　微生物の金属硫化物生成能と遺伝子工学的な水素生成能付与を組み合わせた光駆動型水素生成
11:51 ○篠原優佳[1]，本田裕樹[1]，渡邊源規[2]，石原達己[2,3]，藤井　浩[1]　（[1]奈良女子大理，[2]九州大WPI-I[2]CNER，[3]九州大工）

4A16a13　*Cellulosimicrobium funkei* 由来キサンチンオキシダーゼの機能解析
12:02 小園伊織[1]，○川村悠華[1]，竹内道樹[2]，小園祥子[1]，日比　慎[2,3]，小川　順[1]　（[1]京大院農・応用生命，[2]京大院農・産業微生物，[3]富山県大工・生工研セ）

4A16a14　講演取消

A17 会場　午前の部（9:30〜12:35）

微生物―1414 細胞 - 情報伝達，細胞応答，ストレス応答―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

4A17a01　*Lactobacillus plantarum* Pne-12 株のヒートショック処理が誘導する種々の応答に関する検討
9:30 ○米満鮎子[1]，矢島冬紗子[2]，中西愛美[2]，佐々木泰子[1]　（[1]明治大農，[2]株式会社ピックルスコーポレーション）

4A17a02　エタノール生産菌 *Zymomonas mobilis* CP4 由来の高温適応株における変異のストレス応答への寄与
9:41 ○久我昂史[1]，加藤　舜[1]，白丸優貴[2]，村田正之[1,2,3]，高坂智之[1,2,3]，山田　守[1,2,3]　（[1]山口大院・創科，[2]山口大・農，[3]山口大・中高温微生物研究センター）

4A17a03　緑膿菌バイオフィルム内に出現する変異株の解析・分離
9:52 ○矢野真弓[1]，伊澤　徹[1]，豊福雅典[2,3]，野村暢彦[2,3]　（[1]筑波大・生命環境，[2]筑波大・MiCS，[3]筑波大・生命環境系）

4A17a04　シアノバクテリアの DnaK と ClpB の協調的シャペロン作用
10:03 ○仲本　準，平岡　海　（埼玉大理）

4A17a05　出芽酵母の圧力適応におけるカルシウムの役割
10:14 ○望月貴博，神賀和希，山口有乃，阿部文快　（青山学院大理工）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

4A17a06　可動性因子による緑膿菌の細胞間コミュニケーション制御機構の解明
10:35 ○須澤由希[1]，遠矢正城[1]，尾花　望[2,3]，吉澤　晋[4]，木暮一啓[4]，野村暢彦[3,5]，豊福雅典[3,5]　（[1]筑波大院・生命環境，[2]筑波大・医・TMRC，[3]筑波大・MiCS，[4]東京大・大気海洋研，[5]筑波大・生命環境系）

4A17a07　グルタミン酸とアスパラギン酸は高親和性 cAMP ホスホジエステラーゼ遺伝子を高発現するウシグソヒトヨタケの子実体形成遅延を回復する
10:46　○千　菊夫，伊藤　哲，森　裕秋，山本翔也，小島宏延，柴田晶美　（信州大農）

4A17a08　飢餓における *Roseateles depolymerans* の光合成関連遺伝子転写に関与する σ^{32} ホモログの欠損株のトランスクリプトーム解析
10:57　○陶山哲志[1]，菅野菜々子[2]，千原康太郎[1,3]，松倉智子[1]，野田尚宏[1,3]，花田　智[2]　（[1]産総研・バイオメディカル，[2]首都大・院・理，[3]早稲田大学・理工学術院）

4A17a09　サルモネラ菌の TCS と PTS をつなぐコネクター RcsG の分子機構
11:08　○加藤明宣，深見知可，萩原　慧　（近畿大院農）

4A17a10　Improvement of thermotolerance of Zymomonas mobilis TISTR548 by increase in expression of genes for heat shock proteins and reactive oxygen species-scavenging enzymes
11:19　○Sakunda Anggarini[1]，Masayuki Murata[1]，Tomoyuki Kosaka[1,2,3]，Mamoru Yamada[1,2,3]　（[1]Life Science, Graduate School of Science and Technology for Inovation, Yamaguchi Univ. [2]Department of Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Yamaguchi Univ., [3]Research Center for Thermotolerant Microbial Resources, Yamaguchi Univ.）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:30〜11:40

4A17a11　*Lactobacillus plantarum* 環境単離株における莢膜相変異機構による集団適応機構の解析
11:40　○澁澤　薫[1]，江橋由夏[1]，尾花　望[2,3]，野村暢彦[3,4]　（[1]筑波大・生命環境，[2]筑波大・医学医療系・TMRC，[3]筑波大・MiCS，[4]筑波大・生命環境系）

4A17a12　酸応答性ヒスチジンキナーゼセンサー EvgS の活性化機構
11:51　稲田慎也，芝山健太，○江口陽子　（近畿大生物理工）

4A17a13　Adaptation of Kluyveromyces marxianus for increase in ethanol production and stress tolerance
12:02　○Sornsiri PATTANAKITTIVORAKUL[1]，Tatsuya TSUZUNO[2]，Tomoyuki KOSAKA[1,2]，Mamoru YAMADA[1,2]　（[1]Graduate School of Science and Technology for Innovation, Yamaguchi Univ., Japan, [2]Department of Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Yamaguchi Univ., Japan）

4A17a14　栄養条件に応答した骨格筋分泌因子 CXCL10 の発現分泌制御
12:13　○平岩絵梨花，篠崎綾香，石内-佐藤友里，根建　拓　（東洋大学）

4A17a15　酵母を用いた代謝活性化型エピ変異原検出法の構築
12:24　○杉山圭一，木下麻緒，本間正充　（国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部）

A18 会場　午前の部（9:30〜12:35）

微生物―1412 細胞 - 栄養，生育，増殖―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

4A18a01　分裂酵母の窒素シグナリング因子を介した細胞間コミュニケーションにおける受容機構の解明
9:30　○橋本莉央[1,2]，八代田陽子[2]，大澤　晋[1]，平井　剛[3]，森山裕充[2]，吉田　稔[1,4]　（[1]理研CSRS・ケミカルゲノミクス，[2]東京農工大院・農，[3]九州大院・薬，[4]東大院農・応生工，微生物連携機構）

4A18a02　分裂酵母における栄養源感受性変異株の探索と解析
9:41　○三浦俊一[1]，八代田陽子[2]，西村慎一[1,3]，松山晃久[2,3]，吉田　稔[1,2,3]　（[1]東大農，[2]理研 CSRS，[3]微生物連携機構）

4A18a03　PAF 複合体-SAGA 複合体を介した窒素カタボライト抑制制御機構の解明
9:52　○大澤　晋[1]，八代田陽子[1]，吉田　稔[1,2]　（[1]理研CSRS・ケミカルゲノミクス，[2]東大院農　応生工，微生物連携機構）

4A18a04　分裂酵母の細胞形態形成制御因子による胞子形成開始の調節機構の解析
10:03　○落合竜季[1]，森麻里子[1]，中村太郎[2]，今田一姫[1,2]　（[1]鈴鹿高専・生物応用化学，[2]大阪市大・院理）

4A18a05　L-トリプトファンによる分裂酵母 *S. pombe* の生育阻害
10:14　○北村憲司[1,2]，永島直翔[2]　（[1]広島大・自然研セ，[2]広島大・統合生命）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

4A18a06　分裂酵母における長寿命原因遺伝子の同定及び細胞間情報伝達による寿命延長機構の解明
10:35　○唐澤健太，刈谷静夏，高久洋暁，山崎晴丈　（新潟薬大・応生科）

4A18a07　分裂酵母に存在する 2 つの DDK-Dbf4 キナーゼ複合体の役割分担および機能発現メカニズムの解明
10:46　○葉山菜央，中村太郎　（大阪市大・院理）

4A18a08　出芽酵母 S-アデノシルメチオニントランスポーター SAM3 が関与する寿命延長機構の解析
10:57　○近石祐希[1]，久米一規[2]，水沼正樹[2]　（[1]広島大工，[2]広島大院・統合生命）

4A18a09　出芽酵母の寿命延長に関わる Ssg1 の機能解析
11:08　○益村晃司[1]，久米一規[2]，水沼正樹[2]　（[1]広島大院・先端研，[2]広島大院・統合生命）

4A18a10　出芽酵母における経時寿命の一細胞解析
11:19　○鈴木健太[1]，青井議輝[1,2]，中島田豊[1,2]，加藤　節[1,2]　（[1]広島大院先端研，[2]広島大院統合生命）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:30〜11:40

4A18a11　翻訳因子 eIF5A による酵母の代謝調節機能の研究
11:40　○高橋　匠[1]，近藤直子[2]，白井温子[2]，ヒルバートマグパンタイ[1,2]，松山晃久[1,2]，吉田　稔[1,2,3]　（[1]東大農，[2]理研　CSRS，[3]東京大学　微生物科学イノベーション連携研究機構）

4A18a12　糸状菌の細胞壁多糖 α-1,3-グルカンの生合成における細胞内 α-アミラーゼ遺伝子の機能解析
11:51　○宮澤　拳[1]，竹内　歩[1]，小泉亜未[1]，吉見　啓[2,3]，佐野元昭[4]，中島　佑[1]，阿部敬悦[1,3]　（[1]東北大院農，[2]京大院農，[3]東北大未来研，[4]金沢工大ゲノム研）

4A18a13　マイクロ流体デバイスを用いた糸状菌の菌糸における可塑性の解析
12:02　○福田紗弓[1]，柳沢直樹[2]，高谷直樹[1]，佐藤良勝[2]，竹下典男[1]　（[1]筑波大・生命環境・微生物サステイナビリティ研究センター，[2]名古屋大・ITbM）

4A18a14　キチン分解菌 *Cellulosimicrobium* sp. NTK2 の生育における糖添加の影響
12:13　○東谷洸里[1]，長田晴季[2]，美藤友博[2]，清水克彦[3]，有馬二朗[2]　（[1]鳥取大院持社創生，[2]鳥取大農，[3]鳥取大CoRE）

4A18a15　線虫の環境因子による寿命制御機構の解析
12:24　○竹尾俊哉[1]，久米一規[2]，水沼正樹[2]　（[1]広島大工，[2]広島大院　統合生命）

B01 会場　午前の部（9:30〜12:13）

有機化学，天然物化学―1111 天然物 - 単離構造決定 - 動物，植物―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

4B01a01　薬用植物 *Tamarix gallica* 由来ポリフェノール化合物のアミロイドポリペプチド凝集阻害活性
9:30　○繁森英幸[1,2]，HMIDENE Asma Ben[3]，礒田博子[1]　（[1]筑波大生命環境，[2]筑波大MiCS，[3]筑波大院生命環境）

4B01a02　イネにおけるテルペノイド型ファイトアレキシン生産の種内多様性
9:41　○仮谷佳祐[1]，宇部尚樹[2]，上野琴巳[3]，寺石政義[4]，奥本　裕[4]，森　直樹[4]，石原　亨[3]（[1]鳥取大学院・持続性社会，[2]鳥取大学院・連農，[3]鳥取大・農，[4]京都大学院・農）

4B01a03　タイ産プロポリスの成分的多様性
9:52　○向出和真[1]，本田沙理[1]，Vongsak Boonyadist[2]，熊澤茂則[1]（[1]静県大食，[2]ブラパ大薬）

4B01a04　甘草グリチルリチン及びその類縁体の高純度試薬の開発
10:03　○田村敦裕，森　拓哉，中塚進一（長良サイエンス株式会社）

4B01a05　茶テオガリン及びその類縁体の高純度試薬の開発
10:14　○森　拓哉，田村敦裕，中塚進一（長良サイエンス株式会社）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

4B01a06　仏手柑に含まれるアポトーシス誘導物質
10:35　○夏見弥侑，奥野祥治（和歌山高専）

4B01a07　ヤエヤマサソリの脱皮殻に含まれる新奇蛍光物質
10:46　○義本裕介，田中柾人，宮下正弘，中川好秋，宮川　恒（京大院農）

4B01a08　マンナン存在下での抗真菌試験に基づく糖結合性天然物の探索
10:57　○宮西　航，小鹿　一，中川　優（名大院・生命農）

4B01a09　ジャバラ由来の *α*-グルコシダーゼ阻害活性物質の探索
11:08　○楠本恵理，奥野祥治（和歌山高専）

4B01a10　梅干しに含まれる抗老化活性物質の探索
11:19　○上田有里子[1]，河野良平[2]，野村幸子[2]，宇都宮洋才[2]，奥野祥治[1]（[1]和歌山高専，[2]和歌山医大）

a11〜a13 発表者の接続時間 11:30〜11:40

4B01a11　*Costus pictus* 葉に含まれるリパーゼ阻害物質
11:40　○吉村奈緒里[1]，大塚梨沙[1]，吉岡百合[2]，牧野祥平[2]，松村晋一[2]，森本正則[1]（[1]近畿大農，[2]稲畑香料株式会社）

4B01a12　*Zanthoxylum zanthoxyloides* が示す 3T3-L1 前駆脂肪細胞に対する脂肪蓄積抑制物質の単離・同定
11:51　○南川遥妃[1]，柏木丈拡[1]，ブックストントーマス[2]，島村智子[1]（[1]高知大農，[2]ガーナ大森林園芸作物セ）

4B01a13　Isolation and Structure Determination of Antidiabetic Compounds from Hexane Extract of Red Kidney Beans (Phaseolus vulgaris L)
12:02　○Anita Maya SUTEDJA[1,2,3]，Emiko YANASE[1]，Irmanida BATUBARA[2,4]，Dedi FARDIAZ[2]，Hanifah Nuryani LIOE[2]（[1]Gifu University, [2]IPB University, [3]Widya Mandala Catholic University Surabaya, [4]Tropical Biopharmaca Research Center IPB University）

B02 会場　午前の部（9:30〜12:35）

有機化学，天然物化学―1150 農薬，医薬―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

4B02a01　疫病菌の無性生殖阻害物質 lycoside 類の合成研究
9:30　○加藤史華，小鹿　一（名大農）

4B02a02　植物由来の疫病菌無性生殖阻害物質と作用機構に関する研究
9:41　○安藤優花，加藤史華，田中愛子，竹本大吾，小鹿　一（名大農）

4B02a03　表面増強ラマン分光法を用いた酵素反応の直接検出：アセチルコリンエステラーゼの阻害剤スクリーニングへの適用
9:52　○山口　洋[1]，竹井弘之[1,2]（[1]東洋大院生命科学，[2]東洋大生命科学）

4B02a04　*C*-メチル化フラボノイドのラジカル消去作用
10:03　○福原　潔[1]，中西郁夫[2]，大久保敬[3]，今井耕平[1]，水野美麗[1]，松本謙一郎[2]，大野彰子[4]（[1]昭和大薬，[2]量研機構，[3]阪大高等共創院，[4]国衛研）

4B02a05　分子内環固定によるシリビニンの高機能化
10:14　○水野美麗，森　一憲，柴沼質子，福原　潔（昭和大薬）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

4B02a06　膜透過性が高い環状ペプチドの探索法の検討
10:35　○井上雄介，増田裕一（三重大生物資源）

4B02a07　1-デオキシ-D-アルロースの線虫成長阻害活性
10:46　○佐藤正資[1]，吉原明秀[2]，砂古口博文[3]，新谷知也[4]，George W.J. Fleet[5]，何森　健[2]（[1]香川大農，[2]香川大希少糖機構，[3]香川県環保研，[4]愛媛大院連合農，[5]オックスフォード大）

4B02a08　大量合成に適したペプチド液相合成法の開発
10:57　○高澤理子[1]，岡田洋平[1]，久保大輔[2]，岩永なつみ[2]，藤田秀司[2]，鈴木康介[2]，鈴木秀明[2]，神谷秀博[1]，千葉一裕[1]（[1]東京農工大，[2]JITSUBO株式会社）

4B02a09　クワ（*Morus sp.*）の葉抽出物による歯周病原細菌に対する抗菌活性
11:08　白井尊久[1]，○佐藤祐太郎[1]，石原和幸[2]（[1]東京歯科大学歯学部，[2]東京歯科大学　微生物学講座）

4B02a10　変性 *β*-1,3-1,6-グルカンに包接された抗菌剤の抗菌活性
11:19　○畦﨑梨花，甲元一也（甲南大FIRST）

a11〜a15 発表者の接続時間 11:30〜11:40

4B02a11　クマリン骨格形成鍵酵素における基質認識に必要な化学因子の探索
11:40　○関口茉樹，清水文一（東洋大院生命）

4B02a12　新規なアルデヒドの絶対配置決定法
11:51　○福士幸治，ラクサナアヌグラアディ，福田　怜（北大農）

4B02a13　ネオニコチノイド系殺虫剤に対する脊椎動物と昆虫間の感受性差をもたらす分子機構
12:02　○神谷昌輝[1]，嶋田翔太[2]，冨山　翔[1]，小泉　航[1]，伊原　誠[1]，松田一彦[1]（[1]近畿大農，[2]近畿大院農）

4B02a14　花粉媒介昆虫の標的に対するネオニコチノイド系殺虫剤の作用機構
12:13　○小森勇磨[1]，重藤　渉[2]，神谷昌輝[1]，小泉　航[1]，伊原　誠[1]，松田一彦[1]（[1]近畿大農，[2]近畿大院農）

4B02a15　メチル基を付加した *γ*-BHC 類縁体の殺虫活性と GABA アンタゴニスト活性
12:24　○田中啓司[1]，尾添嘉久[2]，赤松美紀[3]，松田一彦[1]（[1]近畿大学農，[2]島根大生物資源，[3]京都大農）

B03 会場　午前の部（9:30〜12:35）

有機化学，天然物化学―1130 天然物 - 作用機構―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

4B03a01　超活性海洋天然有機化合物マイトトキシンの標的分子探索
9:30　角替俊輔[1]，チャンキャサリーン[2]，トンエイミーヒンヤン[2]，アウラクカマルディープカウアー[2]，ハスビドアンドレア[2]，松本　健[3]，八代田陽子[3]，モファットジェイソン[2]，ブーンチャールズ[2]，山下まり[1]，村田道雄[4]，吉田　稔[3,5,6]，○此木敬一[1]（[1]東北大院農，[2]トロント大，[3]理研CSRS，[4]阪大院理，[5]東大院農・応生工，[6]東大微生物連携機構）

4B03a02　殺線虫活性物質パラヘルクアミドの標的活性の分子構造基盤
9:41　○二木邦浩[1]，小泉　航[2]，伊原　誠[1]，松田一彦[1]（[1]近畿大院農，[2]近畿大農）

4B03a03　パラヘルクアミドの標的選択性の構造因子
9:52　○小泉　航[1]，二木邦浩[2]，伊原　誠[1]　([1]近畿大農，[2]近畿大院農)

4B03a04　(*R*)-*β*-tyrosine がシロイヌナズナ根の細胞壁形成酵素に与える影響
10:03　○阪本駿太，井上貴斗，吉永直子，小林　優，寺石政義，奥本　裕，森　直樹　(京都大農)

4B03a05　マンノースとの結合におけるプラディミシン A の二糖部分の役割
10:14　○大矢柚香[1]，小鹿　一[1]，五十嵐康弘[2]，伊藤幸成[3]，中川　優[1,3]　([1]名大院生命農，[2]富山県大生工，[3]理研)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

4B03a06　コレラ菌 Na^+ 輸送性 NADH-キノン酸化還元酵素の阻害剤オーラシンの結合部位の同定
10:35　○佐野裕樹[1]，桝谷貴洋[1]，村井正俊[1]，BARQUERA Blanca[2]，三芳秀人[1]　([1]京都大学大学院農学研究科，[2]レンセラー工科大学生物科学科)

4B03a07　コレラ菌 Na^+ 輸送型 NADH-キノン酸化還元酵素の特異的化学修飾法の検討
10:46　○石川　萌[1]，桝谷貴洋[1]，村井正俊[1]，BARQUERA Blanca[2]，三芳秀人[1]　([1]京都大学大学院農学研究科，[2]レンセラー工科大学生物科学科)

4B03a08　クロイソカイメン抽出物由来電位依存性ナトリウムチャネル阻害剤の探索
10:57　○島田紀子，長由扶子，此木敬一，山下まり　(東北大農)

4B03a09　Piperovatine の電位依存性 Na チャネルに対する作用機構
11:08　○鈴木竜也，大和誠司　(住友化学株式会社)

4B03a10　アネトールは薬剤排出ポンプの抑制を介してナギラクトン E の抗真菌作用を増強させる
11:19　○上田裕貴[1]，田原悠平[1]，宮田真人[1]，山口良弘[1]，荻田　亮[1,2]，藤田憲一[1]　([1]阪市大・院理，[2]阪市大・健康研セ)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:30〜11:40

4B03a11　ヒマシ油由来のヒドロキシ脂肪酸 ricinoleic acid の calcineurin と GSK-3*β* に対する阻害作用
11:40　○吉田　潤[1]，大川佑介[2]，小山卓矢[3]，下田　希[2]，上杉祥太[4]，高木博史[5]，伊藤芳明[2,3]，木村賢一[2,3]　([1]岩手医科大・教養教育，[2]岩手大院・総合科学，[3]岩手大・農，[4]岩手生工研，[5]奈良先端大・バイオサイエンス)

4B03a12　ピレスリン生合成酵素 TcGLIP に対するホスホン酸エステル型阻害剤の絶対配置の解明と構造活性相関
11:51　○伊原　誠[1]，小椋明生[1]，泊口佳史[1]，松尾憲忠[2]，田辺　陽[2]，松田一彦[1]　([1]近畿大農，[2]関西学院大理工)

4B03a13　モミジガサに含まれる interleukin-2 産生阻害物質
12:02　○上杉祥太[1]，箱崎真友佳[1]，植村亜衣子[1]，熊谷加奈子[1]，木村賢一[2]，山田秀俊[1]，矢野　明[1]　([1]岩手生工研，[2]岩手大・農)

4B03a14　人工キノン類を用いたミトコンドリア呼吸鎖複合体-I のキノン結合ポケットの構造特性の解明
12:13　○宇野晋平[1]，桝谷貴洋[1]，伊藤(新澤)恭子[2]，志波智生[3]，稲岡健ダニエル[4]，村井正俊[1]，三芳秀人[1]　([1]京都大農，[2]兵庫県立大生命理学，[3]京都工芸繊維大工芸科学，[4]長崎大熱帯医学)

4B03a15　抗がん剤候補化合物 IACS-010759 のミトコンドリア呼吸鎖複合体-I における作用機構
12:24　○辻　諄人，赤尾拓海，桝谷貴洋，村井正俊，三芳秀人　(京都大学大学院農学研究科)

B04 会場　午前の部(9:30〜12:35)

生物科学―1710 糖鎖科学 – 構造，機能，糖鎖工学，その他―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

4B04a01　シロイヌナズナにおける糸状菌 *Aspergillus aculeatus* 由来ラムノガラクツロナーゼの過剰発現
9:30　○大橋貴生[1,2]，光吉祐太朗[1]，間平由梨佳[1]，梶浦裕之[1]，三﨑　亮[1]，藤山和仁[1]　([1]大阪大生国セ，[2]摂南大理工)

4B04a02　カイコ由来 *β*1,4-*N*-acetylgalactosaminyltransferase の機能解析
9:41　○西口直邦，梶浦裕之，三﨑　亮，藤山和仁　(阪大，ICBiotech)

4B04a03　中性領域で働く基質特異性の広い万能シアリダーゼの発見と性質
9:52　○岩木佑弥[1,2]，松永恵美子[3]，竹川　薫[3]，佐藤ちひろ[1,2]，北島　健[1,2]　([1]名大生物機能セ，[2]名大院生命農学，[3]九大院農)

4B04a04　*Aspergillus fumigatus* の *β*-(1→5)-ガラクトフラノース糖鎖生合成の同定と欠損による表現型への影響
10:03　○千原由莉亜[1]，田中　大[2]，太田一良[1]，岡　拓二[1]　([1]崇城大院工，[2]東北医薬大)

4B04a05　*Aspergillus fumigatus* のガラクトマンナン生合成に関わる新規な *α*-マンノピラノシド：*β*-ガラクトフラノース転移酵素の同定
10:14　○甲斐万紀子[1]，守田湧貴[2]，千原由莉亜[1]，田中　大[3]，太田一良[1,2]，岡　拓二[1,2]　([1]崇城大院工，[2]崇城大生物生命，[3]東北医薬大)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

4B04a06　*Prevotella melaninogenica* の産生する宿主糖タンパク質糖鎖遊離酵素エンド PM の性質
10:35　森　真司，大倉和貴，宮原郁子，○伊藤和央　(阪市大・院理)

4B04a07　EDEM の大腸菌での発現
10:46　○相川順一，伊藤幸成　(理化学研究所)

4B04a08　酵母 split-ubiquitin システムを用いたヒト PIG-M の物理的相互作用に関する解析
10:57　○高橋哲夫，後藤菜々美　(東海大工)

4B04a09　グライコシンターゼによる抗体への 3 本鎖 a 糖鎖の転移
11:08　○高島　晶，大隅賢二，黒河内政樹，水野真盛，高田美生，松田昭生　(野口研)

4B04a10　特異的ケミカルプローブ開発を目指したゴルジ体 *β*-ガラクトシダーゼ阻害剤であるイソフラボン誘導体の構造活性相関の解明
11:19　○清水まるみ[1]，小野寺千尋[2]，高木元成[1]，袴田　航[1,2]，平野貴子[1,2]，西尾俊幸[1,2]　([1]日大・生資科，[2]日大院・生資科)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:30〜11:40

4B04a11　細胞レベルでの新規ゴルジ体マンノシダーゼ阻害剤の活性評価と阻害標的解析
11:40　○小山亮祐，加納結衣，袴田　航，平野貴子，西尾俊幸　(日大院・生資化)

4B04a12　ERp29 による分子シャペロンの二量化と機能評価に関する検討
11:51　○中尾仁美[1]，瀬古　玲[2]，伊藤幸成[2,3]，迫野昌文[1]　([1]富山大院　生命融合，[2]JST, ERATO，[3]理研)

4B04a13　改変プロテオグリカンの機能性および構造解析
12:02　○佐野栄宏，成田武文　(都産技研)

4B04a14　ERAD 関連タンパク質欠損植物中で生成する遊離 N-グリカンの構造特性
12:13　古田佳織[1]，前田　恵[1]，Strasser Richard[2]，○木村吉伸[1]　([1]岡山大学大学院環境生命科学研究科，[2]University of Natural Resources and Life Sciences, Austria)

4B04a15　正常細胞に作用しない癌細胞選択的プロドラッグ酵素 TEM-1 変異体の開発
12:24　○高橋美穂子，坂本健作　（国立研究開発法人理化学研究所）

B05 会場　午前の部（9:30〜12:13）

有機化学，天然物化学―1120 天然物 - 生合成（11 題）1121 天然物 - 代謝（2 題）―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

4B05a01　新規ペプチドグリカン生合成経路阻害剤の探索
9:30　清水庸平[1]，佐藤洋平[1]，○小笠原泰志[2]，米田友貴[2]，猪熊泰英[2]，大利　徹[2]　（[1]北大院総合化学，[2]北大院工）
4B05a02　龍涎香人工合成経路の構築：アンブレインと香気成分の効率的合成と破骨細胞分化誘導活性
9:41　山辺陽太[1]，川越幸奈[1]，奥野琴音[1]，上田大次郎[1]，柿原嘉人[2]，○佐藤　努[1]　（[1]新潟大院自然・農，[2]新潟大・歯）
4B05a03　マッコウクジラ腸管からアンブレイン/オノセロイド生産菌の探索と利用
9:52　近岡花菜子[1]，川邊　舞[1]，○上田大次郎[1]，山田　格[2]，田島木綿子[2]，佐藤　努[1]　（[1]新潟大院自然・農，[2]科博）
4B05a04　Class IB terpene synthase: a minor product having new cyclic skeleton and site-directed mutagenesis of putative active site residue
10:03　○Rafaella Stepanova[1]，Kazuya Asada[1]，Daijiro Ueda[1]，Hayato Inagi[2]，Kunio Miki[2]，Masahiro Fujihashi[2]，Yoko Yasuno[3]，Tetsuro Shinada[3]，Tsutomu Sato[1]　（[1]Niigata Univ., [2]Kyoto Univ., [3]Osaka City Univ.）
4B05a05　*Mycobacterium* 属細菌由来イソプレニルニリン酸生合成経路の解析
10:14　○阿部　透[1]，尾崎真夢[1]，上田大次郎[1]，邊見　久[2]，佐藤　努[1]　（[1]新潟大院・自然，[2]名大院・生命農）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

4B05a06　ラダラン脂質生合成の推定鍵酵素コバラミン依存性ラジカル SAM 酵素のホロ型発現系の構築
10:35　○美馬正弥[1]，末宗周憲[2]，日野智也[2]，永野真吾[2]　（[1]鳥取大・院持続性社会・化学バイオ，[2]鳥取大・院工・化学生物）
4B05a07　トウモロコシの zealactone 生合成前駆体としての 3-オキソカーラクトン酸メチルの同定
10:46　○谷口浩規，秋山康紀　（阪府大院生命環境）
4B05a08　Evolution of *β*-amyrin 11-oxidase activity underlies saponin chemodiversity in *Glycyrrhiza* species
10:57　○Much Zaenal Fanani[1]，Satoru Sawai[1,2,3,4]，Hikaru Seki[1,2]，Masato Ishimori[3]，Hiroshi Sudo[4]，Ery O. Fukushima[1]，Kiyoshi Ohyama[2,5]，Kazuki Saito[2,3]，Toshiya Muranaka[1,2]　（[1]Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]RIKEN CSRS, [3]Grad. Sch. Pharm. Sci., Chiba Univ., [4]Tokiwa Phytochemical Co., Ltd, [5]Dept. Chem. Mat. Sci., TITECH.）
4B05a09　イネ科植物における HCAA 生合成酵素 ACT の解析
11:08　○山根美代，松島芳隆，須恵雅之　（東京農大・農化）
4B05a10　乾燥耐性を付与するプロピオン酸処理時のイネ（*Oryza sativa*）における代謝変化について
11:19　○手嶋萌映[1]，吉永直子[1]，土生芳樹[2]，寺石政義[1]，奥本　裕[1]，森　直樹[1]　（[1]京都大農，[2]農研機構）

a11〜a13 発表者の接続時間 11:30〜11:40

4B05a11　ミニコアコレクションを用いたダイズのハスモンヨトウ抵抗性の解析
11:40　○中田　隆，平賀　勧，加賀秋人　（農研機構）
4B05a12　アーキア型メバロン酸経路におけるホスホメバロン酸デヒドラターゼの特性評価
11:51　○米山　睦[1]，齋藤甲斐[2]，保野陽子[3]，品田哲郎[3]，吉村　徹[1]，邊見　久[1]　（[1]名大院・生命農，[2]大阪市大・理，[3]大阪市大院・理）
4B05a13　Does the archaeal mevalonate pathway exist in an unculturable bacterium, *Candidatus* Promineofilum breve?
12:02　○Riko KURIKI[1]，Ryo YOSHIDA[2]，Tohru YOSHIMURA[2]，Hisashi HEMMI[2]　（[1]School of Agriculture, Nagoya Univ., [2]Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya Univ.）

B06 会場　午前の部（9:30〜12:13）

動物―1520 細胞 - 細胞機能，細胞骨格，オルガネラ，輸送体，細胞接着，細胞内輸送（12 題）1550 細胞工学 - 物質生産，タンパク質工学，細胞培養，細胞外マトリックス（1 題）―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

4B06a01　摂食応答性骨格筋 E3 ユビキチンリガーゼ Trim7 の発現制御機構と機能解析
9:30　○青木悠馬，佐々木崇，清水　誠，山内祥生，佐藤隆一郎（東大院・農生科・応生化）
4B06a02　骨格筋障害・萎縮における ABCA1 遺伝子発現応答の解析
9:41　○小野敦子，清水　誠，近澤未歩，山内祥生，佐藤隆一郎（東大院・農生科・応生化）
4B06a03　ヒトおよびマウス骨格筋細胞が分泌するエクソソームの生化学的解析
9:52　○須藤優里[1]，櫻井英俊[2]，佐藤隆一郎[1]，山内祥生[1]　（[1]東大院・農生科・応生化，[2]京大・CiRA）
4B06a04　N 型糖鎖によるエクソソームの取り込み制御機構の解明
10:03　○磯貝　樹[1]，廣澤幸一朗[2]，木塚康彦[1,2,3]，鈴木健一[1,2,3]（[1]岐阜大学　応用生物科学部，[2]岐阜大学　研究推進・社会連携機構　生命の鎖統合研究センター，[3]科学技術振興機構 CREST）
4B06a05　ビネキシン *α*/CAP 依存的に接着斑に局在するタンパク質の単離と解析
10:14　○柴原正和[1]，阿部雄一[2]，木村泰久[1]，木岡紀幸[1]　（[1]京都大学大学院，[2]愛知県がんセンター）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

4B06a06　低温処理がマウス細胞に及ぼす影響とベージュ脂肪細胞への分化
10:35　○塩見尚史，冨士原由貴　（神戸女学院人間科学）
4B06a07　ショウジュウバエにおけるミトコンドリアへの新規な脂肪酸輸送機構の発見
10:46　○長尾耕治郎，石井隆太，大平直義，葭原啓太，小西　翔，従二直人，梅田眞郷　（京都大工）
4B06a08　ミトコンドリアマトリクスに局在するプロテアーゼ Lon は mtDNA の遺伝子発現を制御する
10:57　○松島雄一，高橋和也，瀬戸山大樹，康　東天　（九州大医）
4B06a09　GPI アンカー修飾がエクト型亜鉛要求性酵素の分解に与える影響の解析
11:08　○我妻拓実[1]，神戸大朋[2]　（[1]京都大農，[2]京都大生命）
4B06a10　ヒト細胞における CD73 の成熟および活性化は，亜鉛トランスポーターによって制御される
11:19　○森野菜穂[1]，神戸大朋[2]　（[1]京都大農，[2]京都大生命）

a11〜a13 発表者の接続時間 11:30〜11:40

4B06a11　オルソログ間のキメラタンパク質を用いた抗ガン剤トランスポーター MRP1（ABCC1）の機能解析
11:40　○田口善智，横田瑞希，有賀佳那　（近畿大生物理工　遺伝子工）

4B06a12　コレステロールがヒト多剤輸送体 MDR1 の基質輸送を促進する機構の解析
11:51　○岩村紗花[1]，木岡紀幸[1]，植田和光[2]，木村泰久[1]　([1]京大農，[2]京大iCeMS)

4B06a13　HDL 形成初期反応解析のための再構成系の構築
12:02　○坂田和樹[1]，木岡紀幸[1]，植田和光[2]，木村泰久[1]　([1]京大院農，[2]京大iCeMS)

B07 会場　午前の部(9:30〜12:13)

動物―1530 遺伝子 - 構造，発現制御，機能，修飾，トランスクリプトーム，エピジェネティクス，ゲノミクス，ゲノム編集―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

4B07a01　組織切片を用いたエピゲノム解析
9:30　○原田哲仁[1]，前原一満[1]，田中かおり[1]，半田哲也[2]，木村　宏[2]，大川恭行[1]　([1]九州大生医，[2]東工大科学技術創成)

4B07a02　カニクイザルにおけるキチナーゼ遺伝子発現解析：マウスおよびヒトとの比較
9:41　○上原麻衣子，田畑絵理，小山文隆　(工学院大先進工)

4B07a03　場所嗜好性課題を用いた海馬神経新生エンハンサーによるニコチン依存性薬物記憶忘却の促進
9:52　○南　朱夏[1]，喜田　聡[1,2]　([1]東京農業大学大学院，[2]東京大学大学院)

4B07a04　食餌性必須栄養素欠乏による海馬における脳内炎症と神経変性及び海馬依存性記憶障害の関連性の解析
10:03　○辻　竜平[1,2]，宮原瑞希[1]，芹田龍郎[1]，喜田　聡[1,2]　([1]東京農業大学院・農・バイオ，[2]東京大学大学院・農学生命科・応用生命化学)

4B07a05　神経炎症性サイトカイン TNFα は海馬依存性記憶の想起を負に制御する
10:14　○高橋翔平[1,2]，福島穂高[1]，喜田　聡[1,2]　([1]東農大院・農・バイオ，[2]東大院・農・応用生命化学)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

4B07a06　カルシウムシグナルによる CHERP を介した選択的スプライシング制御機構の解明
10:35　○石塚高己，増田誠司　(京都大学)

4B07a07　1 細胞トランスクリプトーム解析によるマウス味細胞の分類
10:46　○岩槻　健[1]，早津徳人[2]，岡崎康司[2]，遠藤高帆[2]，橋本浩介[2]，金丸青里香[2]，山根拓実[1]，大石祐一[1]　([1]東農大・応用生科，[2]理研 IMS)

4B07a08　3 次元再構成組織イメージからの位置特異的トランスクリプトーム解析
10:57　○松永浩子[1]，有川浩司[1]，山崎美輝[2,3]，鈴木直子[1]，髙橋清文[1]，我妻竜太[2]，細川正人[1,4]，竹山春子[1,2,3]　([1]早大ナノライフ創新研，[2]早大院先進理工，[3]産総研 CBBD-OIL，[4]先進生命動態研)

4B07a09　組織空間的トランスクリプトーム解析及びゲノム変異解析に向けた微量生体分子の抽出
11:08　○山崎美輝[1,2]，細川正人[3,4]，有川浩司[4]，髙橋清文[4]，松永浩子[4]，竹山春子[1,2,3,4]　([1]早大院先進理工，[2]産総研 CBBD-OIL，[3]早大先進生命動態研，[4]早大ナノライフ創新研)

4B07a10　*Caenorhabditis elegans* における変異体形質を決定する原因遺伝子同定法について
11:19　○出坂夏美，瀬川天太，高木宏樹，東村泰希　(石川県大・生資環)

a11〜a13 発表者の接続時間 11:30〜11:40

4B07a11　HP1α クロモドメインを用いた蛍光プローブによる細胞分裂中のクロマチン動態観察
11:40　○佐々木和樹[1]，鈴木律裕[2]，中尾洋一[2]，吉田　稔[1,3]　([1]理研CSRS・ケミカルゲノミクス，[2]早稲田大先進理工学系研究科化学・生命科学，[3]東大院農・応生工，微生物連携機構)

4B07a12　損傷 DNA-核膜孔複合体間相互作用による姉妹染色分体間接着の促進
11:51　○尾間由佳子[1,2]，折原行希[1]，高橋大輔[1,3]，小西辰紀[1]，原田昌彦[1]　([1]東北大・院農・分子生物，[2]学振特別研究員RPD，[3]学振特別研究員DC[1])

4B07a13　核内 mRNA 代謝制御シグナルの解析-ミトコンドリア呼吸鎖 III の阻害剤はなぜ mRNA 代謝に影響するのか-
12:02　○三宅俊太郎，増田誠司　(京大生命)

B08 会場　午前の部(9:30〜12:35)

植物―1680 植物工学 - 育種，物質生産，形質転換（10 題）1650 植物栄養，光合成，オルガネラ，膜輸送（5 題）―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

4B08a01　シラカバ花粉アレルゲン Bet v 1 のベンサミアナタバコにおける大量発現
9:30　○三浦謙治[1,4]，山田侑希[1]，木戸口正典[2,3]，矢田　瑛[1]，中村貴子[2]，吉田英樹[1,4]，加藤幸宣[3]，増子裕典[2]，檜澤伸之[2]，藤枝重治[3]，野口恵美子[2]　([1]筑波大生命環境，[2]筑波大医，[3]福井大医，[4]筑波大T-PIRC)

4B08a02　アブシジン酸存在下で増殖と細胞死を共に抑制したタバコ BY-2 細胞からのタンパク質の分泌と培養中の培地中成分の変化
9:41　○井上智晴[1]，小田大和人[1]，丸山-仲下明子[2]，松岡　健[1,2]　([1]九大・院生資環，[2]九大・院農)

4B08a03　*N*-Glycan analysis of recombinant β-glucocerebrosidase produced in root culture
9:52　○Naphatsamon UTHAILAK，Hiroyuki KAJIURA，Ryo MISAKI，Kazuhito FUJIYAMA　(ICBiotech, Osaka Univ.)

4B08a04　光合成能およびワックスエステル生合成能を同時強化した形質転換ユーグレナにおけるパラミロン顆粒形成
10:03　○西川由依菜[1]，多保田真歩[2]，重岡　成[1,2]，田茂井政宏[1,2]　([1]近畿大院農，[2]近畿大農)

4B08a05　光制御による植物を用いた有用タンパク質製造方法の開発
10:14　○田中裕之[1]，池澤信博[1]，北原大輔[1]，竹本　浩[1]，永島明知[1]，出来島康方[1]，川端　潤[1]，村瀬　誠[2]　([1]三菱ケミカル，[2]バイオインダストリー協会)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

4B08a06　植物工場ユニット内で栽培したラズベリー葉中ポリフェノール成分の生産量変化
10:35　○橋本誠也[1]，輿水　駿[1]，辻　一成[1]，小堀　亮[1]，川崎　崇[2]，齊藤安貴子[1]　([1]大阪電気通信大学大学院工学研究科先端理工学専攻，[2]京都大学生存圏研究所)

4B08a07　カラスビシャクのムカゴ形成過程とムカゴへの機能性多糖の蓄積
10:46　○栗木淳寛[1]，下川　響[2]，江口壽彦[3]，田中宏幸[4,5]，松岡　健[1,2,3,6]　([1]九大農，[2]九大院生資環，[3]九大生環セ，[4]九大院薬，[5]山口理大薬，[6]九大院農)

4B08a08　国内産生薬植物カラスビシャクの形質転換系
10:57　○青木達大[1]，下川　響[1]，江口壽彦[2]，松岡　健[1,2,3]　([1]九大院生資環，[2]九大生環セ，[3]九大院農)

4B08a09　遺伝子組換えタバコ植物を台木とした接ぎ木における穂木への外来遺伝子産物の移動
11:08　○梅山幸子[1]，宮原　平[1]，小口太一[2]，太田大策[3]，辻本　恭[4]，小関良宏[4]，児玉浩明[1]　([1]千葉大院園芸，[2]筑波大生命環境，[3]阪府大院生命，[4]農工大院生命)

4B08a10　イネカルス抽出液を利用する無細胞翻訳システムの汎用性の検討
11:19　○鈴木　翔，戸澤　譲　(埼玉大学院・理工)

a11〜a15 発表者の接続時間 11:30〜11:40

4B08a11　緑藻クラミドモナスのデンプン鞘は CO_2 濃縮機構に寄与する
11:40　○山野隆志，豊川知華，福澤秀哉　(京大・院・生命)

4B08a12　緑藻クラミドモナスの脂質蓄積の制御(1)タンパク質リン酸化酵素 TAR1 の機能
11:51　新川はるか[1]，太田羽藍[1]，梶川昌孝[1,2]，野村裕子[3]，小倉真優[4]，椹木裕里[1]，山野隆志[1]，中神弘史[3]，杉山直幸[4]，石濱　泰[4]，兼崎　友[5]，吉川博文[5]，○福澤秀哉[1]　([1]京都大生命，[2]近畿大生命理工，[3]理研，[4]京都大薬，[5]東京農大)

4B08a13　緑藻クラミドモナスの脂質蓄積の制御(2)タンパク質脱リン酸化酵素 PP2C3 の同定
12:02　宮本明日香[1]，梶川昌孝[1,2]，新川はるか[1]，○辻　敬典[1]，山野隆志[1]，福澤秀哉[1]　([1]京大生命，[2]近大生命理工)

4B08a14　緑藻クラミドモナスの脂質蓄積の制御(3)脂質蓄積異常株 bbs9-1 の解析
12:13　○木下あかり[1]，辻　敬典[1]，新川はるか[1]，梶川昌孝[1,2]，山野隆志[1]，福澤秀哉[1]　([1]京大生命，[2]近畿大)

4B08a15　水耕栽培におけるリン酸イオン，カリウムイオン及び硝酸イオンの自動濃度管理システムの構築
12:24　○徐　克彬，阿黒達也，北隅優希，加納健司，白井　理　(京大院農)

B09 会場　午前の部(9:30〜12:24)

植物―1630 環境応答，ストレス応答，情報伝達，分化―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

4B09a01　*Osatg7* と高温登熟被害米の完熟種子におけるプロテオーム比較解析
9:30　○金古堅太郎[1]，瀬倉茉莉[1]，岡本裕哉[1]，花俣　繁[2]，バスラムマルワン[2]，朽津和幸[3]，三ツ井敏明[2]　([1]新潟大院・自然科学，[2]新潟大農・応生化，[3]東京理科大理工・応用生物)

4B09a02　シロイヌナズナの熱ショック応答に及ぼす塩の影響に関する研究
9:41　○坂本　陽[1]，原　正和[1,2]　([1]静岡大院総合，[2]静岡大グリーン研)

4B09a03　新規ミトコンドリア阻害剤 FSL0260 は植物の耐塩性を強化する
9:52　○佐古香織[1,2]，二村有史[2]，清水　猛[2]，松井章浩[2]，平野裕之[2]，近藤恭光[2]，室井　誠[2]，青野晴美[2]，田中真帆[2]，本田香織[2]，清水謙志郎[2]，川谷　誠[2]，中野雄司[2]，長田裕之[2]，野口　航[3]，関　原明[2]　([1]近大農，[2]理研CSRS，[3]東京薬大生命)

4B09a04　強光ストレス下の植物におけるアスコルビン酸再生機構
10:03　○田中　澪[1]，寺井佑介[2]，上野祐美[1]，小川貴央[1,2]，宮城敦子[3]，川合真紀[3]，石川孝博[1,2]，丸田隆典[1,2]　([1]島根大院・自然科学，[2]島根大・生資科・生命工，[3]埼玉大・理工)

4B09a05　微細藻類ユーグレナにおけるカロテノイド合成酵素の機能解析と抗酸化系における役割
10:14　○玉木　峻[1]，石川孝博[2]，篠村知子[1]　([1]帝京大・理工・バイオ，[2]島根大院・自然科学)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

4B09a06　シロイヌナズナ *CONSTANS-LIKE* 遺伝子が葉緑体発達に及ぼす影響
10:35　○木下寛子，稲葉靖子，稲葉丈人　(宮崎大農)

4B09a07　緑色光吸収型フィトクロムによる葉面積拡大にともなう成長促進
10:46　○吉原静恵，徳本勇人　(阪府大理)

4B09a08　シロイヌナズナ根の細胞膜を介した低温感受による気孔開閉と光合成効率への影響
10:57　○菅原拓也，陽川　憲　(北見工業大学)

4B09a09　トウモロコシ根の光応答：根端の異なる領域間での代謝物比較解析
11:08　○陽川　憲[1]，Frantisek Baluska[2]，Stefano Mancuso[3]　([1]北見工大，[2]ボン大学，[3]フィレンツェ大学)

4B09a10　根分泌物を介したシロイヌナズナ個体間の相互作用
11:19　○村田　純，渡辺健宏，小村　啓　(公益財団法人 サントリー生命科学財団)

a11〜a14 発表者の接続時間 11:30〜11:40

4B09a11　亜高山帯に生息しているシラビソ葉におけるクチクラ成分の分析
11:40　○正木怜也[1]，生方正章[2]，岩渕晴男[2]，種子田春彦[3]，清水文一[1]　([1]東洋大院生命，[2]日本電子㈱ MS事業ユニット，[3]東大院理)

4B09a12　青シソにおける二次代謝関連遺伝子発現のストレス応答と日周変動
11:51　平安山昌史[1]，武川航大[1]，加川夏子[2,3]，○華岡光正[1,3]　([1]千葉大・院園芸・応用生命，[2]千葉大・環境健康フィールド科学セ，[3]千葉大・植物分子科学セ)

4B09a13　iTRAQ 法を用いた転写因子 GLK1 相互作用因子の探索
12:02　○堀之内冬紅[1]，湯淺日菜子[1]，稲葉靖子[1]，森　仁志[2]，稲葉丈人[1]　([1]宮崎大農，[2]名大院生命農)

4B09a14　ズッキーニから同定された汚染物質輸送タンパク質のストレス応答への関与
12:13　○藤田健太郎[1]，足助聡一郎[1]，乾　秀之[1,2]　([1]神戸大院農，[2]神戸大・バイオ)

B11 会場　午前の部(9:30〜12:13)

有機化学，天然物化学―1160 合成，反応機構―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

4B11a01　分子内電子移動過程の制御による Pratosine の電解全合成
9:30　○岡本一央，千葉一裕　(東農工大)

4B11a02　ペプチドの分子内環化反応を促進する反応場の構築
9:41　○山上紗弓理[1]，岡田洋平[2]，北野克和[1]，千葉一裕[1]　([1]東農工院農，[2]東農工院工)

4B11a03　Zeapyranolactone の合成研究
9:52　○山本舜也，小倉由資，滝川浩郷　(東大院農)

4B11a04　キキョウ花弁に含まれる多アシル化アントシアニン，プラチコニンの全合成研究
10:03　○尾山公一[1]，清水俊順[2]，柴　康太[2]，近藤忠雄[2]，吉田久美[2]　([1]名大物国セ，[2]名大院情報学)

4B11a05　大豆イソフラボン代謝産物エクオール両エナンチオマーの不斉合成
10:14　○植村隆人，斎藤雄輔，園田素啓，谷森紳治　(大阪府立大生環)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

4B11a06　含ベンジル位シクロプロパンカンナビノイド Radulanin J の不斉全合成
10:35　○大江拓人，姜　法雄，久世雅樹　(神戸大院農)

4B11a07　アミノ酸骨格を利用した α-アミノ芳香族ケトン骨格の合成
10:46 ○橋本　誠，タクリムゼトリアナ，黒川菜摘，橋床泰之（北大院農）

4B11a08　プレニル基およびゲラニル基を導入したホモイソフラボノイドの合成研究
10:57 ○鈴木皓仁[1]，金田　匡[1]，川井　悟[3]，吉澤結子[2]，常盤野哲生[2]（[1]秋田県大院生資科，[2]秋田県大生資科，[3]東電大理工）

4B11a09　フルオラスシリカゲル担持型プロリン触媒による不斉アルドール反応：基質範囲と回収・再利用検討
11:08 ○石原一輝，大林里帆，小林佑基，石原稿太朗，塩入孝之，松儀真人（名城大農）

4B11a10　含アジリジン天然物の推定生合成中間体の合成研究
11:19 ○岡村仁則[1]，滝川浩郷[2]，品田哲郎[1]（[1]阪市大院理，[2]東大院農生科）

a11〜a13 発表者の接続時間 11:30〜11:40

4B11a11　最小シクロデキストリンの改良合成と構造決定
11:40 ○若森晋之介，萩森　資，山田英俊（関西学院大理工）

4B11a12　カテキンモデルを用いた B 環部の位置選択的酸化反応に関する研究
11:51 ○落合悠斗，廣瀬紗弓，柳瀬笑子（岐阜大学大学院）

4B11a13　新規のチアゾリジン開環反応を利用した糖タンパク質 Evasin-3 の化学合成
12:02 ○片山秀和[1]，永田宏次[2]（[1]東海大工・生命化学，[2]東大院農生科）

C01 会場　午前の部（9:30〜12:24）

環境科学・バイオマス利用―1020 資源変換，資源再生利用―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

4C01a01　Dynamics of physicochemical and bacterial characteristics in the autothermal thermophilic aerobic digestion process equipped with two types of aeration systems
9:30 ○MIN ZHANG，Yukihiro Tashiro，Kenji Sakai（Grad. Sch. of Biosci. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ.）

4C01a02　褐藻を食したヒメハマトビムシの腸管内微生物の探索およびメタゲノム解析
9:41 ○中村晟一朗[1]，馬場保徳[2]，河井重幸[2]（[1]石川県大院生物資源，[2]石川県大生物資源研）

4C01a03　水田土壌への牛糞堆肥と竹粉の施用による窒素固定活性と細菌叢の季節変動に関する研究
9:52 ○AO ZHALAGA[1]，稲場克弘[2]，平井英明[1,2]，前田　勇[1,2]（[1]宇都宮大院農，[2]宇都宮大農）

4C01a04　ポリ乳酸の好気性高温堆肥発酵における微生物叢および有機物分解酵素の解析
10:03 ○石井紗也加，吉井貴宏，森屋利幸，大島泰郎（共和化工株式会社　環境微生物学研究所）

4C01a05　ゴム添加土壌中の微生物群集構造変化
10:14 ○新　朋香，儀武菜美子，西岡　心，笠井大輔（長岡技科大・生物）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

4C01a06　大腸菌を用いたパラジウム回収技術の開発
10:35 ○渡邊宏樹，山本兼由（法政大学）

4C01a07　沈水植物オオカナダモ（*Egeria densa*）に集積するマンガン酸化物―放射光蛍光 X 線分析による化学形態の評価と金属資源回収の試み―
10:46 ○原田英美子[1]，奥井啓介[1]，鋒山大輝[1]，市之瀬智生[2]，保倉明子[2]（[1]滋賀県立大・環境，[2]東京電機大・工）

4C01a08　ファインバブル生成技術を用いた水素細菌の効率的な培養手法の開発と物質生産への展開
10:57 ○平野伸一[1]，山梨由布[2]，伊藤　司[2]（[1]電中研，[2]群大院理工）

4C01a09　廃棄素材を用いた carotenoid 開裂酸化酵素 2 による crocetin dialdehyde ならびに crocetin の効率的な産生
11:08 ○角谷晃司[1,2]，西野恵理[1]，金丸真也[1]（[1]近畿大学薬学総合研，[2]近畿大学アンチエイジングセ）

4C01a10　*Actinoplanes* sp. OR16 株のイソプレンゴム分解酵素遺伝子の機能解析
11:19 ○儀武菜美子，新　朋香，須田大登，笠井大輔（長岡技科大・生物）

a11〜a14 発表者の接続時間 11:30〜11:40

4C01a11　地下環境を利用したバイオメタン鉱床造成 / 生産法（Subsurface Cultivation and Gasification; SCG）〜バイオメタン生産成功の条件は何か？〜
11:40 ○上野晃生[1]，玉澤　聡[1]，玉村修司[1]，村上拓馬[1]，木山　保[1]，猪股英紀[1]，荒牧憲隆[2]，青山秀夫[3]，山口眞司[3]，長沼　毅[4]，金子勝比古[1]（[1]幌延地圏環境研究所，[2](独)香川高専，[3]三菱マテリアル株式会社，[4]広島大院統合生命科学研究科）

4C01a12　固体腐植ヒューミンによる生物学的 CO_2 固定・資源化反応の促進
11:51 ○笠井拓哉[1]，ラスカーマハスウェタ[1]，栗田貴宣[2]，片山新太[1]（[1]名大未来研，[2]国総研）

4C01a13　*Klebsiella* sp. YG160 株によるグリセロールから 1,3-プロパンジオールの生産
12:02 ○矢野和也，喜多晃久，中川克彦，早瀬伸樹（新居浜高専）

4C01a14　*Nocardia* 属細菌のポリイソプレン代謝に関わる遺伝子の単離と機能解析
12:13 ○鈴木夏平，佐藤里咲，儀武菜美子，笠井大輔（長岡技科大・生物）

C02 会場　午前の部（9:30〜12:13）

環境科学・バイオマス利用―1030 バイオマス，バイオマス変換，バイオ燃料，バイオ化成品（8 題）1040 バイオ電池関連（5 題）―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

4C02a01　好塩性細菌ハロモナスにおける不揮発性腐敗アミンを単一炭素・窒素源とした最小培地中での適合溶質生産特性の解析
9:30 ○仲山英樹，三好勝之，河本　亮（長崎大院水環）

4C02a02　ハロモナス細胞工場を用いた廃棄バイオマス原料からの γ-アミノ酪酸生産
9:41 ○鄒　子燕，仲山英樹（長崎大学院水環）

4C02a03　酸性耐性をもつ Rhodosporidium fluviale DMKU-RK253 変異株の単離
9:52 ○田中優吏[1]，呉　志展[1]，梶浦裕之[1]，大橋貴生[3]，三﨑　亮[1]，リムトンサビトリー[2]，藤山和仁[1]（[1]阪大，ICBiotech，[2]タイ，カセサート大学，[3]摂南大学 理工学部）

4C02a04　リパーゼの高発現によるマンノシルエリスリトールリピッドの生産性の向上
10:03 ○雜賀あずさ[1]，菅原知宏[2]，山本周平[2]，森田友岳[1]（[1]産総研・機能化学，[2]東洋紡㈱・敦賀バイオ研）

4C02a05　CO_2 からエチレンを生成する新たなバイオプロセスの構築
10:14 ○中村孝道[1]，谷口惠梨[1]，白川和樹[2]，布施博之[2]，平野伸一[3]，久留主泰朗[4]（[1]熊谷組技研，[2]芝工大シス理工，[3]電中研，[4]茨城大農）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

4C02a06　緑藻 Coccomyxa のゲノム編集技術を用いた油脂生産性増加と細胞壁脆弱化
10:35　○井出曜子[1]，早川准平[2]，小松さと子[1]，吉満勇也[1]，原山重明[2]（[1]株式会社デンソー，[2]中央大）

4C02a07　酵母を用いたコーヒー抽出残渣からの高付加価値品の生産
10:46　○水谷友梨香[1]，加藤愛理[2]，関川貴寛[2,3]，菊川寛史[2,3]，原　清敬[2,3]（[1]静岡県立大院・薬食生命，[2]静岡県立大・食栄・環，[3]静岡県立大院・食栄環）

4C02a08　孟宗竹の総合利用に関する研究（その 5）
10:57　○王　建鵬[2]，櫻井友香[1]，矢田堀裕聖[2]，対馬克伸[1]，大平辰朗[3]，平本　茂[2]，椎葉　究[1,2]（[1]東電大理工，[2]東電大理工院，[3]森林総研）

4C02a09　水田 MFC における電極周辺土壌への鉄粉散布による出力向上メカニズムの解明
11:08　○松元陽歩[1]，名古屋美紗[1]，猪鼻淑乃[1]，土屋美愉[1]，須賀恵悟[1]，廣瀬篤弥[1]，山田翔平[1]，平野伸一[2]，伊藤由紀[2]，田中姿郎[2]，高妻篤史[1]，渡邉一哉[1]（[1]東薬大生命，[2]電中研）

4C02a10　A novel sensor based on electrochemical reduction of in situ graphene oxide（ERGO）for selective determination of dopamine
11:19　○Ning Li[1]，Hiroaki Sakamoto[1,2]，Eiichiro Takamura[1]，Shin-ichiro Suye[1]，Haitao Zheng[3]（[1]Dept. Front. Fib. Tech. Sci. Eng., Grad. Sch. Eng., Fukui Univ., [2]Life Sci. Innov., Fukui Univ., [3]Dept. Chem. Eng., Tiangong Univ.）

a11〜a13 発表者の接続時間 11:30〜11:40

4C02a11　酵素カスケードシステムを用いたアミノ酸駆動のメンブレンレスバイオ電池の開発
11:40　○堀永晃作[1]，里村武範[1,3]，高村映一郎[2]，坂元博昭[2,3]，末信一朗[1,2,3]，櫻庭春彦[4]，大島敏久[5]（[1]福井大学院・工・生物応用化，[2]福井大学院・工・繊維，[3]福井大学・生命セ，[4]香川大農，[5]大阪工大）

4C02a12　多段階酵素反応型バイオ電池を目指したマイクロフロー型デバイスの構築
11:51　○菱井和樹[1]，小松丈紘[1]，高村映一郎[1]，坂元博昭[1,2]，里村武範[2,3]，櫻庭春彦[4]，大島敏久[5]，天谷　諭[6]，末信一朗[1,2,3]（[1]福井大学院・工・繊維，[2]福井大学・ライフセ，[3]福井大学・工・生物応用化，[4]香川大農，[5]大阪工大，[6]理研）

4C02a13　電極表面に固定化された酵素の可動性向上によるバイオ電池の性能向上
12:02　○高村映一郎[1]，鈴木治人[1]，坂元博昭[1]，里村武範[1]，櫻庭春彦[2]，大島敏久[3]，末信一朗[1]（[1]福井大工，[2]香川大農，[3]大阪工大）

C03 会場　午前の部（9:30〜12:13）

酵素―1220 糖質代謝関連酵素―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

4C03a01　分子モデリング技術を活用した L-アラビノフラノシダーゼの機能改変
9:30　○大橋博之，駒　大輔，山中勇人，森芳邦彦，大本貴士（大阪技術研）

4C03a02　*Bifidobacterium bifidum* 由来スルフォグリコシダーゼ BbhII の糖鎖結合ドメインの機能解析
9:41　○荒井　萌[1]，加藤紀彦[1]，山田千早[2]，前渋貴子[1]，吉田彩子[3]，西山　真[3]，伏信進矢[2]，片山高嶺[1]（[1]京大院・生命，[2]東大院・農生科，[3]東大生物生産工学センター）

4C03a03　全アミノ酸スキャニング変異導入法を用いた *Bacillus* sp. TAR-1 株由来キシラナーゼの耐熱化
9:52　○鍬田航平[1]，鈴木愛美[2]，滝田禎亮[1,2]，中谷滉太[2]，李　瞳陽[2]，片野裕太[2]，兒島憲二[1,2]，坂　直樹[2]，三上文三[1,2]，八波利恵[3]，中村　聡[3]，保川　清[1,2]（[1]京大・農，[2]京大院・農，[3]東工大・生命理工）

4C03a04　Thermostabilization of pullulanase by protein engineering
10:03　○Yuma KURAKATA，Aki TOMIKI，Tomoko MATSUI（Novozymes Japan Ltd.）

4C03a05　*Paenibacillus* sp. str. FPU-7 由来アルギン酸リアーゼの立体構造
10:14　○伊藤貴文，中川えみ，要田　萌，仲市あかり，日比隆雄，木元　久（福井県大・生物資源）

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

4C03a06　*Caldanaerobacter subterraneus* 由来 CE-4 酵素の X 線結晶構造解析
10:35　○佐々木康平[1,2]，下澤勇弥[1,2]，氷見山幹基[1]，森芳邦彦[3]，大本貴士[3]，上垣浩一[1,4]，西矢芳昭[2]，中村　努[1]（[1]産総研，[2]摂南大学院，[3]大阪技術研，[4]近畿大学）

4C03a07　麹菌の細胞壁 α-1,3-グルカン生合成に関与する α-アミラーゼ AgtA の酵素学的性質の解析
10:46　○小泉亜未[1]，尾形　慎[2]，矢野成和[3]，宮澤　拳[1]，吉見　啓[4,5]，佐野元昭[6]，阿部敬悦[1,4]（[1]東北大院・農，[2]福島高専・化学バイオ，[3]山形大院・理工，[4]東北大・NICHe，[5]京都大院・農，[6]金沢工大・ゲノム研）

4C03a08　GH15 古細菌トレハラーゼの機能解析
10:57　○坂口政吉，湯浅充洋，多田凌吾，南澤秋弥，甲田有梨奈，川喜田正夫（工学院大先進工）

4C03a09　*Falsirhodobacter* sp. alg1 が生産するエキソ型アルギン酸リアーゼ AlyFRB の生成物の特徴とその触媒機構
11:08　前原伸哉[1]，柴田敏行[1]，田中礼士[1]，モリテツシ[2]，○三宅英雄[1]（[1]三重大院生資，[2]東農工大工）

4C03a10　非凍結結晶を用いた β-アミラーゼと基質アナログ複合体構造の pH 変化の解析
11:19　○三上文三[1,2]，安達基泰[4]，姜　有那[3]，河村和広[3]，水谷公彦[3]，高橋延行[3]（[1]京都大学生存研，[2]京都大学エネ研，[3]京都大学農，[4]日本原子力機構）

a11〜a13 発表者の接続時間 11:30〜11:40

4C03a11　ブタ血清由来マルターゼ-グルコアミラーゼを構成する 2 つのサブユニットは独立に機能する
11:40　○渡邊　憲，田上貴祥，奥山正幸，木村淳夫（北大・院農）

4C03a12　α-グルコシダーゼを用いた α-マンノシルオリゴ糖の合成
11:51　○前山和輝，田上貴祥，奥山正幸，木村淳夫（北大院農）

4C03a13　糖転移性を有する β-N-アセチルヘキソサミニダーゼの探索
12:02　○倉掛昌裕，門田和也（福山大・海洋）

C04 会場　午前の部（9:30〜12:13）

酵素―1240 酸化還元酵素―

a01〜a05 発表者の接続時間 9:20〜9:30

4C04a01　キノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素の活性中心サブユニット生合成に関与するセリンプロテアーゼの生化学的・構造学的解析
9:30　○大関俊範[1]，中井忠志[2]，谷澤克行[1]，岡島俊英[1]（[1]大阪大学，[2]広島工業大学）

4C04a02　キノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素オペロンの近傍遺伝子 *Pden_1710* のプロモーター解析
9:41　○宮城尚弥[1]，百﨑大起[1]，谷澤克行[2]，岡島俊英[2]，中井忠志[1]　([1]広島工業大学 生命学部 食品生命科学科，[2]大阪大学 産業科学研究所 生体分子反応科学研究分野)

4C04a03　銅アミン酸化酵素のトパキノン補酵素生合成反応における中間体形成の分光学的解析・速度論的解析
9:52　○酒井克輝[1]，佐々木康[1]，村川武志[2]，谷澤克行[1]，岡島俊英[1]　([1]大阪大学　産業科学研究所　生体分子反応科学研究分野，[2]大阪医科大学　医学部　生化学教室)

4C04a04　金多孔質と白金ナノクラスターを用いたカビ由来 FAD 依存性グルコース脱水素酵素による直接電子移動型酵素電極反応の実現と解析
10:03　○足立大宜[1]，藤井昂洸[2]，本田通済[2]，北隅優希[1]，白井　理[1]，加納健司[1]　([1]京大院農，[2]池田糖化工業)

4C04a05　Bacillus smithii 由来高度耐熱性インジゴ還元酵素の生化学的特性解析
10:14　○米田一成[1]，吉岡観紗[1]，櫻庭春彦[2]，荒木朋洋[1]，大島敏久[3]　([1]東海大農，[2]香川大農，[3]大阪工大工)

a06〜a10 発表者の接続時間 10:25〜10:35

4C04a06　リンゴ酸デヒドロゲナーゼの結晶構造に基づく動的反応メカニズムの考察
10:35　○下澤勇弥[1,2]，西矢芳昭[1]，佐々本康平[1,2]，氷見山幹基[2]，中村　努[2]　([1]摂南大院　理工　生命，[2]国立研究開発法人産業技術総合研究所)

4C04a07　好熱性アーキア由来色素依存性 D-アミノ酸脱水素酵素のバイオセンサ用素子としての機能評価
10:46　○里村武範[1,2]，江本　慎[1]，黒沢則夫[3]，大島敏久[4]，櫻庭春彦[5]，末信一朗[1]　([1]福井大工，[2]福井大ライフ，[3]創価大，[4]大阪工大工，[5]香川大農)

4C04a08　*Sulfolobus tokodaii* 由来 sulfur oxygenase reductase のクライオ電子顕微鏡を用いた近原子分解能単粒子解析
10:57　○佐藤優太[1]，安達成彦[2]，守屋俊夫[2]，荒川孝俊[1,3]，川崎政人[2]，山田千早[1,3]，矢吹崇吏[1]，若木高善[1]，千田俊哉[2]，伏信進矢[1,3]　([1]東大院・農生科・応生工，[2]高エネ機構・物構研・構造生物，[3]東大微生物連携機構)

4C04a09　超好熱性アーキアにおけるリポ酸生合成遺伝子の同定
11:08　○佐藤喬章，蜂須賀真一，跡見晴幸　(京都大工)

4C04a10　*In vitro* analysis of two lipoate synthase candidates from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*
11:19　○Jianqiang JIN，Tsuyoshi Fujiwara，Shinichi Hachisuka，Takaaki Sato，Haruyuki Atomi　(Kyoto Univ.)

a11〜a13 発表者の接続時間 11:30〜11:40

4C04a11　超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* における機能未知 phosphatase の酵素学的解析
11:40　○道盛裕太，濱北宗太郎，下坂天洋，跡見晴幸　(京大院工)

4C04a12　低級アルカン水酸化酵素のオペロンに存在するシャペロニン様タンパク質の単離
11:51　井上千裕，安部欣高，山之内渉，○藤枝伸宇　(阪府大)

4C04a13　鉄型ニトリルヒドラターゼの翻訳後活性化アクセサリータンパク質の解析
12:02　○橋本義輝[1,2]，宇部優子[1]，土居志織[1]，熊野匠人[1,2]，小林達彦[1,2]　([1]筑波大院・生命環境，[2]筑波大・MiCS)

一般講演（ポスター発表）プログラム

1. °はコアタイム発表者を示す．
2. コアタイムは 15:00～17:00 となります．

第 2 日（3 月 26 日）

ポスター番号 講演番号　　演　　題　　発表者氏名（所属）

体育館　P001～P200

P001　3C01pl3　海洋プラスチックデブリから単離されたポリ（3-ヒドロキシブタン酸）分解放線菌の特徴付け
○鈴木美和[1]，滝澤玲香[2]，橘　熊野[2,3]，粕谷健一[2,3]　([1]群馬大理工，[2]群馬大院理工，[3]群馬大食健セ)

P002　3C01p02　嫌気微生物の物質変換活性に及ぼす微生物蓄電性由来 Mackinawite の影響評価
○安池一貴[1]，工藤優輝[1]，田代陽介[1]，二又裕之[1,2,3]　([1]静大院，[2]静大創造科学技術大学院，[3]静大グリーン科学技術研究所)

P003　3C01p08　金属腐食と微生物群集構造の相関解析
○若井　暁，高井　研　(海洋機構・超先鋭)

P004　4C01a12　固体腐植ヒューミンによる生物学的 CO_2 固定・資源化反応の促進
○笠井拓哉[1]，ラスカーマハスウェタ[1]，栗田貴宣[2]，片山新太[1]　([1]名大未来研，[2]国総研)

P005　4C01a08　ファインバブル生成技術を用いた水素細菌の効率的な培養手法の開発と物質生産への展開
○平野伸一[1]，山梨由布[2]，伊藤　司[2]　([1]電中研，[2]群大院理工)

P006　3C02p16　2-フェノキシアセトフェノンのエーテル結合を切断する微生物の機能解析
○大谷早紀[1]，羽部　浩[2]，古屋俊樹[1]　([1]東京理科大・理工，[2]産総研・環境管理)

P007　3C02a03　セルラーゼ超高生産菌　T1281 株由来セルラーゼを用いた同時糖化発酵（SSF）に向けた検討
○加川雄介，平松紳吾，山田勝成　(東レ株式会社　先端融合研究所)

P008　3C02p04　Studies on new control strategy for meta-lactic acid fermentation driving with mixed culture system
○SIYUAN YUE[1]，Takaharo Mizoguchi[1]，Yukihiro Tashiro[1]，Kenji Sakai[1]，Hirokuni Miyamoto[2]　([1]Grad. Sch. Bioresour. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ., [2]Fac. Horticul., Chiba Univ.)

P009　4C02a06　緑藻 Coccomyxa のゲノム編集技術を用いた油脂生産性増加と細胞壁脆弱化
○井出曜子[1]，早川准平[2]，小松さと子[1]，吉満勇也[1]，原山重明[2]　([1]株式会社デンソー，[2]中央大)

P010　4C02a13　電極表面に固定化された酵素の可動性向上によるバイオ電池の性能向上
○高村映一郎[1]，鈴木治人[1]，坂元博昭[1]，里村武範[1]，櫻庭春彦[2]，大島敏久[3]，末信一朗[1]　([1]福井大工，[2]香川大農，[3]大阪工大)

P011　2B01a12　糸状菌代謝産物からの抗アスペルギルス活性物質の探索
○渡邊善洋[1]，吉田百合香[2]，常盤俊之[1]，穂苅　玲[1]，石山亜紀[1,3]，岩月正人[1,3]，野中健一[1,3]，矢口貴志[4]，大村　智[1]　([1]北里生命科学研究所，[2]北里大学理学部 化学科，[3]感染制御科学府，[4]千葉大学真菌医学研究センター)

P012　2B01a13　*Calcarisporium arbuscular* から単離した新規 Gymnomitrane
○三浦聖美，松本愛美，殿内暁夫，橋本　勝　(弘前大農)

P013　3B01a12　*Pestalotiopsis microspora* が生産する新規神経保護物質の単離と構造解析
○菅野和紀[1]，鶴川幸音[1]，柴崎久宜[1]，井口恵太[1]，村上裕信[1]，内山淳平[1]，倉持浩司[2]，紙透伸治[1]　([1]麻布大獣医，[2]東理大理工)

P014　3B01a13　ヘム重合阻害を指標とした微生物代謝産物からの抗マラリア活性物質の探索
○清水優希[1]，石山亜紀[1,2]，小池李茉[3]，渡邊善洋[2]，穂苅　玲[2]，岩月正人[1,2]，大村　智[2]　([1]北里大学感染制御科学府，[2]北里生命化学研究所，[3]北里大学理学部化学科)

P015　4B01a07　ヤエヤマサソリの脱皮殻に含まれる新奇蛍光物質
○義本裕介，田中柾人，宮下正弘，中川好秋，宮川　恒　(京大院農)

P016　3B01a01　ヤマカガシ（Rhabdophis tigrinus）が有する頸腺毒成分の地域的特徴
○井上貴斗[1]，中田　隆[1]，吉永直子[1]，Alan H. Savitzky[2]，森　　哲[3]，森　直樹[1]　([1]京大院農，[2]ユタ州立大生物，[3]京大院理)

P017　3B01pl5　スズランの花より見出だしたスズラン様香気成分の同定
○大橋輝久，坂巻憲佐，赤尾寛子，石崎　享　(長谷川香料㈱)

P018　4B05a02　龍涎香人工合成経路の構築：アンブレインと香気成分の効率的合成と破骨細胞分化誘導活性
山辺陽太[1]，川越幸奈[1]，奥野琴音[1]，上田大次郎[1]，柿原嘉人[2]，○佐藤　努[1]　([1]新潟大院自然・農，[2]新潟大・歯)

P019　2B05a10　抗ガン活性向上を目指したランカサイジン誘導体の構造リデザインと計算機シミュレーションによる最適化
○西浦菜摘[1]，ムスリミンルクマン[2]，エルレファイモハメド[3]，森田洋行[4]，アヨブアフマド[5]，荒川賢治[1,2,6]　([1]広島大・工，[2]広島大院・先端研，[3]ズウェイル市立科学技術院大学，[4]富山大院・和漢医薬学総合研究所，[5]ヘリオポリス大学，[6]広島大院・統合生命)

P020　3B05a10　担子菌由来ジテルペン erinacine 生合成経路の解明と効率的再構築
○小谷明里[1]，劉　成偉[1]，尾﨑太郎[1]，呉　　静[2]，河岸洋和[2]，丸山潤一[3]，南　篤志[1]，及川英秋[1]　([1]北大院理，[2]静岡大・農，[3]東大院・農生科・応生工)

P021　3B05pl1　放線菌が生産するジアゾ基含有トリペプチド alazopeptin の全生合成経路の解明
勝山陽平[1,3]，○川合誠司[2]，菅谷優子[1]，冨田宏矢[1]，大西康夫[1,3]　([1]東大院・農生科・応生工，[2]東大農・生命化学工学，[3]東大・微生物イノベ連携機構)

P022　3B05pl4　ベンザスタチン生合成においてニトレン中間体を介した環化反応を触媒する P450 の X 線結晶構造解析
○堤　隼馬[1]，浦野直樹[1]，勝山陽平[1,2]，大西康夫[1,2]　([1]東大院・農生科・応生工，[2]東大・微生物イノベ連携機構)

P023　2B05a04　海洋性難培養微生物が生産する有用物質の異種生産技術に関する研究
○工藤　慧[1]，西田みち代[2]，酒井紀子[2]，末永　光[1]，池田治生[3]，新家一男[1,4]　([1]産総研，[2]次世代天然物化学技術研究組合，[3]北里大生命研，[4]東大生物工学セ)

P024　2B05a05　BAC を利用した 200 kb を超える quinoliidomicin 生合成遺伝子クラスターの異種発現
○橋本拓哉[1]，橋本絢子[2]，小曽根郁子[2]，酒井紀子[3]，高橋俊二[4]，池田治生[5]，新家一男[1]　([1]産総研・創薬基盤，[2]JBIC，[3]天然物組合，[4]理研CSRS・天然物生合成，[5]北里大・北里生命科学研)

P025　4B03a14　人工キノン類を用いたミトコンドリア呼吸鎖複合体-I のキノン結合ポケットの構造特性の解明
○宇野晋平[1]，桝谷貴洋[1]，伊藤（新澤）恭子[2]，志波智生[3]，稲岡健ダニエル[4]，村井正俊[1]，三芳秀人[1]　([1]京都大農，[2]兵庫県立大生命理学，[3]京都工芸繊維大工芸科学，[4]長崎大熱帯医学)

P026　3B03p16　新規神経細胞保護物質 pestalotioquinol A の作用機構解析
○鶴川幸音[1]，菅野和紀[1]，鈴木優華[1]，村上裕信[1]，竹田志郎[1]，永根大幹[1]，坂上元栄[1]，篠田　陽[2]，紙透伸治[1]　([1]麻布大・獣医，[2]東京薬科大・薬)

P027　3B03pl4　アミロイド β タンパク質の凝集の蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）による検出
○杉山恵里，増田裕一　(三重大院生物資源)

P028　3B03a12　脱ユビキチン化酵素の切断活性を利用した細胞内標的タンパク質発現制御法の構築
○宮前友策[1,2,3]，宇津木優樹[2]，礒田博子[1,2,4]，Ling-Chun Chen[3]，Thomas J. Wandless[3]　([1]筑波大生命環境，[2]筑波大グローバル教育院，[3]CSB Stanford Univ.，[4]筑波大地中海・北アフリカ)

P029　2B03a03　アミロイド β の凝集阻害機構に基づいた天然物ライブラリーの分類
○村上一馬[1]，堀井詩織[1]，定光達斗[1]，花木瑞穂[1]，郡司祐樹[2]，入江一浩[1]　([1]京大農，[2]アルプス薬品工業)

P030　3B03p07　細胞内ビリルビン代謝を標的とする新規パーキンソン病治療薬シード BRUP-1 の同定と作用機序解析
○片浦哲志[1]，斉木臣二[2]，石川景一[2]，赤松和土[2]，笹澤有紀子[1,2]，服部信孝[2]，井本正哉[1]　([1]慶大院理工，[2]順天堂大医)

P031　2B03a06　希少アルドヘキソースおよびヘキソサミンの DU-145 ヒト前立腺がん細胞株に対する増殖抑制活性
○北口菜摘[1]，柳田　亮[2]，石山大展[3]，佐藤正資[2]，川浪康弘[2]　([1]香川大院農，[2]香川大農，[3]愛媛大院連合農)

P032　3B03p13　イオンモビリティ MS による植物ホルモンの超高感度分析
○謝　肖男[1]，竹原千恵[1]，朝比奈雅志[2]，米山香織[3]，野村崇人[1]，米山弘一[3]　([1]宇都宮大学・バイオセンター，[2]帝京大・理工・バイオ，[3]愛媛大・農)

P033　4B02a13　ネオニコチノイド系殺虫剤に対する脊椎動物と昆虫間の感受性差をもたらす分子機構
○神谷昌輝[1]，嶋田翔太[2]，冨山　翔[1]，小泉　航[1]，伊原　誠[1]，松田一彦[1]　([1]近畿大農，[2]近畿大院農)

P034　4B02a15　メチル基を付加した γ-BHC 類縁体の殺虫活性と GABA アンタゴニスト活性
○田中啓司[1]，尾添嘉久[2]，赤松美紀[3]，松田一彦[1]　([1]近畿大学農，[2]島根大生物資源，[3]京都大農)

P035　4B02a03　表面増強ラマン分光法を用いた酵素反応の直接検出：アセチルコリンエステラーゼの阻害剤スクリーニングへの適用
○山口　洋[1]，竹井弘之[1,2]　([1]東洋大院生命科学，[2]東洋大生命科学)

P036　2B11a12　テトロドトキシンの推定生合成中間体の合成研究
○宮坂忠親[1]，安立昌篤[2]，西川俊夫[1]　([1]名大院生命農，[2]東北大院薬)

P037　2B11a11　Amycolamicin の全合成研究
○目黒康洋，桑原重文　(東北大院農)

P038　4B11a06　含ベンジル位シクロプロパンカンナビノイド Radulanin J の不斉全合成
○大江拓人，姜　法雄，久世雅樹　(神戸大院農)

P039　2B11a13　除草活性を有する抗生物質ホスホノトリキシンの合成研究
○中村皓毅，松島芳隆　(東京農業大学・農芸化学科)

P040　3C04p01　芳香族 D-アミノ酸誘導体の光学分割可能な新規祖先型 L-アミノ酸酸化酵素の開発と機能解析
○中野祥吾，南野優季，烏田裕香，長谷部文人，伊藤創平　(静岡県大食栄)

P041　3C04a05　ラビリンチュラ類特有のリパーゼ / ホスホリパーゼのユニークな位置特異性は海洋微生物の種間競争と脂肪酸取り込みに関与する
○石橋洋平[1]，青木敬祐[1]，沖野　望[1]，林　雅弘[2]，伊東　信[1]　([1]九州大農，[2]宮崎大農)

P042　3C04p09　抗菌薬開発に資する *Porphyromonas gingivalis* 由来 Dipeptidyl peptidase 11 の構造解析と阻害化合物探索
○中村彰宏[1]，阪本泰光[2]，鈴木義之[3,4]，渡邉友里江[5]，關谷瑞樹[2]，六本木沙織[2]，櫛引千里[2]，飯塚一平[2]，谷　　修[6]，阪下日登志[6]，伊中浩治[7]，田仲広明[8]，山田　貢[9]，大田和敬[9]，本間宣行[4]，志田洋介[4]，中西真弓[2]，野中孝昌[2]，合田浩明[5]，田中信忠[5,10]，小笠原渉[1,4]　([1]長岡技科大・工・技学イノベ，[2]岩手医大・薬，[3]長岡高専，[4]長岡技科大・工・生機，[5]昭和大・薬，[6]産総研・バイオメディカル，[7]㈱丸和栄養食品，[8]㈱コンフォーカルサイエンス，[9]JAXA，[10]昭和大・分子分析センター)

P043　4C04a08　*Sulfolobus tokodaii* 由来 sulfur oxygenase reductase のクライオ電子顕微鏡を用いた近原子分解能単粒子解析
○佐藤優太[1]，安達成彦[2]，守屋俊夫[2]，荒川孝俊[1,3]，川崎政人[2]，山田千早[1,3]，矢吹崇吏[1]，若木高善[1]，千田俊哉[2]，伏信進矢[1,3]　([1]東大院・農生科・応生工，[2]高エネ機構・物構研・構造生物，[3]東大微生物連携機構)

P044　4C04a09　超好熱性アーキアにおけるリポ酸生合成遺伝子の同定
○佐藤喬章，蜂須賀真一，跡見晴幸　(京都大工)

P045　3C03a05　Gum arabic 側鎖末端を分解する *Fusarium oxysporum* 由来 4-*O*-α-L-ラムノシル-β-D-グルクロニダーゼの反応特性解析
○吉條美由[1]，近藤辰哉[1]，中屋　愼[2,3]，竹中重雄[4]，小竹敬久[5]，中澤昌美[1]，上田光宏[1]，阪本龍司[1]　([1]阪府大院・生命環境，[2]阪府大院・研究推進機構，[3]大手前栄養製菓学院専門学校・栄養，[4]阪府大院・総リハ，[5]埼玉大院・理工)

P046　3C03a10　シロアリ共生原生生物由来新規 BGL の生産と機能解析
○齋藤悠香[1]，平松紳吾[1]，山田千晶[1]，山田勝成[1]，小田切正人[2]，守屋繁春[2]　([1]東レ㈱先端融合研，[2]理化学研究所)

P047　4C03a02　*Bifidobacterium bifidum* 由来スルフォグリコシダーゼ BbhII の糖鎖結合ドメインの機能解析
○荒井　萌[1]，加藤紀彦[1]，山田千早[2]，前渋貴子[1]，吉田彩子[3]，西山　真[3]，伏信進矢[2]，片山高嶺[1]　([1]京大院・生命，[2]東大院・農生科，[3]東大生物生産工学センター)

P048　4C03a07　麹菌の細胞壁 α-1,3-グルカン生合成に関与する α-アミラーゼ AgtA の酵素学的性質の解析
○小泉亜未[1]，尾形　慎[2]，矢野成和[3]，宮澤　拳[1]，吉見　啓[4,5]，佐野元昭[6]，阿部敬悦[1,4]　([1]東北大院・農，[2]福島高専・化学バイオ，[3]山形大院・理工，[4]東北大・NICHe，[5]京都大院・農，[6]金沢工大・ゲノム研)

P049　3C03p04　*Aspergillus nidulans* が生産する 2 つの β-D-ガラクトフラノシダーゼの基質特異性および諸性質の解析
○松永恵美子[1]，豊田早紀[1]，山田久恵[1]，田中　大[2]，樋口裕次郎[1]，竹川　薫[1]　([1]九大院・農，[2]東北医薬大・薬)

P050　2A01a12　トリアシルグリセロールヒドロペルオキシドの吸収代謝の評価：ナトリウムを用いた LC-MS/MS 分析を通じて
○高橋　巧[1]，加藤俊治[1,2]，伊藤隼哉[1]，境野眞善[2]，佐野貴士[2]，今義　潤[2]，池田郁男[3]，仲川清隆[1,2]　([1]東北大院農・機能分子解析学，[2]東北大院農・J-オイルミルズ油脂イノベーション共同研究講座，[3]東北大・未来科学技術共同研究センター)

P051　2A01a02　中赤外分光法を用いた酵素処理オレンジ果汁中に含まれる成分糖の定量
○矢島由莉佳[1]，堀江　暁[1]，須藤僚也[1]，西山千晶[1]，若林英行[1]，末原憲一郎[2]，亀岡孝治[3]，橋本　篤[3]　([1]キリンホールディングス株式会社，[2]三重大大学院地域イノベーション学研究科，[3]三重大大学院生物資源学研究科)

P052　3A01a09　トリプシン阻害活性を有する亜麻仁アルブミンの特性
○山口勇将[1]，野崎優司[1]，池ヶ谷紫苑[1]，二宮和美[2]，熊谷　仁[2]，熊谷日登美[1]　([1]日大生資科，[2]共立女子大家政)

P053　3A01a07　甘味タンパク質の全網羅ペプチドライブラリーを用いた “ コク味 ” 受容体相互作用領域の解析と高活性ペプチドの創製
○山本深月，寺田祐子，伊藤圭祐　(静県大院・薬食)

P054　3A02a11　フード 3D プリンタにより食感を作り出す
清水純平，○武政　誠　(東京電機大院理工)

P055　4A02a08　エノキタケ抽出エキスの氷結晶成長抑制効果が冷凍ホイップクリームの品質維持に及ぼす効果
○荒井直樹[1]，藤原綾子[1]，河原秀久[2]　([1]株式会社カネカ，[2]関西大生命・生物工)

P056　3A01p05　各種抗酸化物の併用によるレモングラス香気成分の劣化抑制効果の解析
○宮崎真緒[1]，太田香穂[1,2]，宮野敬之[2]，小林弘司[1]，石川洋哉[1]　([1]福岡女子大院人栄，[2]株式会社　クマモト敬和)

P057　3A01p01　醸造工程中に失われる香りから見出されたビールらしさに寄与する香気成分
○成瀬史子[1]，二関倫太郎[1]，蛸井　潔[1]，原田紘祐[2]，飛田康貴[2]，堀内政宏[2]，清崎俊博[1]，野村真弘[1]（[1]サッポロビール株式会社，[2]高田香料株式会社）

P058　2A02p02　乾燥ストレス下で生育したトマト果実のトランスクリプトームおよびメタボローム解析
○朝倉浩子[1]，山川　隆[2]，上田玲子[1]，平　　修[3]，阿部啓子[1]，朝倉富子[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]東大院農生科・食の安全研セ，[3]福大農）

P059　2A19a01　微生物を用いた熟成魚の製造とその性質
○原田美鶴[1]，舘野美紗子[2]，跡部美樹雄[3]，村上周一郎[1,3]（[1]明治大農・農化，[2]明治大院農・農化，[3]㈱ミートエポック）

P060　2A03p01　えぐ味成分ホモゲンチジン酸の分子挙動解析
○前迫一輝[1]，黒田彩歌[2]，坂本裕香[2]，伊藤圭祐[3]，赤川　貢[4]，石井剛志[1,2]（[1]神戸学院大院栄養，[2]神戸学院大栄養，[3]静岡県大食栄，[4]大阪府大院生命環境）

P061　4A04a07　ヒメマツタケ抽出残渣由来の抽出液が有する免疫チェックポイント阻害活性
○小堀　一[1]，原田栄津子[2]，多田有人[1]，森園智浩[1]，戸田雅昭[2]，ダレッサンドロガバザコリナ[2]，ガバザエステバン[2]（[1]岩出菌学研究所，[2]三重大医）

P062　3A02a09　老化しない新規高分子デキストリンはユニークな分子構造と高い水和特性に起因した新しいテクスチャーを創出することができる
○溝手晶子，安田亜希子，伊藤理恵，西田毅弘，日野克彦，三皷仁志，阿賀　創，牛尾慎平（株式会社 林原）

P063　2A02a08　バイオナノカプセル足場技術を用いた食品検査キットの高感度化
○水野麻美[1]，黒田俊一[2]，中山　勉[1]，飯嶋益巳[1]（[1]東農大・応生・健康，[2]阪大・産研）

P064　3A05p09　ナス粉末の継続摂取は血圧高めのストレス被験者の血圧を改善する
○中村浩蔵[1]，鈴木美穂[1]，高橋伶仁[1]，山口翔平[1]，椿　和文[2]，藤田智之[1]，西村三恵[3]，西平　順[3]（[1]信州大農，[2]株式会社ADEKA，[3]北海道情報大学）

P065　3A05p17　Ca^{2+} バイオセンサーマウスを用いた微細藻類ユーグレナの腸管センシングの可視化解析
○中島綾香[1]，安田光佑[1]，村田阿子[1]，鈴木健吾[1]，安達貴弘[2]（[1]株式会社ユーグレナ，[2]東京医科歯科大学）

P066　3A05p14　ケルセチンの吸収機構における細胞外小胞の役割
○杉元亮介，丸毛　遥，石坂朱里，村上　明（兵庫県立大学大学院・環境人間学研究科）

P067　2A03a10　腸内細菌が産生する脂肪酸代謝産物のヒト iPS 小腸モデルを用いた生理機能解明
○野口　惇[1]，清水　誠[1]，高橋　裕[1]，岸野重信[2]，小川　順[2]，山内祥生[1]，佐藤隆一郎[1]（[1]東大院・農生科・応生化，[2]京大院・農・応用生命）

P068　3A03a12　腸内細菌叢由来水素ガスが高強度運動時のエネルギー代謝に及ぼす影響
○角　沙樹[1]，枝　伸彦[2]，赤間高雄[3]，松本光晴[1]（[1]協同乳業，[2]国立スポーツ科学センター，[3]早稲田大学　スポーツ科学学術院）

P069　3A03a03　12α 水酸化胆汁酸と脂肪肝の関係
○堀　将太[1]，阿部隆行[1]，李　東根[1]，吹谷　智[1]，横田　篤[1]，麻生菜央[2]，城内文吾[2]，佐藤匡央[2]，石塚　敏[1]（[1]北大農，[2]九大農）

P070　3A03a11　HYA（10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid）の食品向け実用化開発
○柴田光治[1]，藤村俊夫[1]，北尾浩平[1]，木村郁夫[2]，岸野重信[3]，小川　順[3]（[1]日東薬品工業，[2]東京農工大農，[3]京大院農・応用生命）

P071　2A03a11　柿由来ペクチンが小腸絨毛形態変化と栄養吸収能に及ぼす影響の解析
○後藤咲季[1]，伊藤賢一[2]，大野真貴[2]，北口公司[1,3]，矢部富雄[1,3,4]（[1]岐阜大院・連合農学，[2]一丸ファルコス，[3]岐阜大・応用生物科学，[4]生命の鎖統合研究センター）

P072　4A03a02　褐色様脂肪細胞不活性化を阻害する食品成分スクリーニング系の確立
○森川未織[1]，伊東侑亮[1]，田中未央里[2]，井上博文[2]，後藤　剛[3]，河田照雄[3]，上原万里子[1]，高橋信之[1]（[1]東農大院農，[2]東農大応生，[3]京大院農）

P073　3A03p14　食事誘導性肥満ラットにおける GLP-1 分泌応答の増強には回腸部が寄与する
○佐野杏莉，比良　徹（北海道大農）

P074　4A05a12　J774.1 マクロファージ様細胞において mTORC2 シグナルはリソソーム活性を制御する
○坂井麻衣子[1]，大西康太[2]，増田真志[2]，大南博和[2]，奥村仙示[2]，原　太一[3]，竹谷　豊[2]（[1]徳島大学 大学院栄養生命科学教育部 臨床食管理学分野，[2]徳島大学 大学院医歯薬学研究部 臨床食管理学分野，[3]早稲田大学 人間科学学術院健康福祉科学科 細胞制御学・食品生命科学研究室）

P075　2A04p02　食品由来機能性微粒子 EPDENs の乳がん抑制作用
○木村颯花[1]，山崎正夫[2]，福井敬一[3]，吉山佳世[3]，近藤知巳[3]，山崎有美[1]（[1]宮大地域，[2]宮大農，[3]JA宮経連）

P076　3A04a06　ホモアンセリンおよび酸化ホモアンセリンの測定方法の確立と生体内局在の解明
○垣花優希[1,2]，笠松真吾[1]，内田浩二[3]，居原　秀[1]（[1]大阪府大理，[2]学振DC[2]，[3]東大農）

P077　3A04p09　糖尿病がアルツハイマー病態に与える影響とロスマリン酸の効果の検証
○宮脇里奈，山下　玲，伯野史彦，高橋伸一郎，岡田晋治，小林彰子（東大院農）

P078　4A06a03　ケンフェロールは AhR アンタゴニスト活性を介して腸管樹状細胞の RALDH2 発現を促進する
○綿貫優実，八代拓也，山口昌樹，西山千春（東理大）

P079　2A06a11　西洋食負荷 Ldlr KO マウスにおけるニトベギク由来オリザビンの粥状動脈硬化症と炎症の予防効果
○井出将博[1,2]，鷲見加奈子[1]，中村鉄平[1]，Xian Wen Tan[2]，吉田　泉[1]，高橋有志[1]，三嶋　隆[1]，藤田和弘[1]，五十嵐友二[1]，松浦栄次[2]（[1]日本食品分析セ，[2]岡山大院 医歯薬学）

P080　4A06a05　緑茶カテキン EGCG の抗肥満作用は骨髄細胞特異的 67-kDa ラミニン受容体ノックアウトマウスにおいて消失する
○村田京介，福富拓哉，山田脩平，冨岡玲乃，西岡成汰，熊添基文，藤村由紀，立花宏文（九大院農院・生機科）

P081　4A06a07　γ-リノレン酸の乳酸菌代謝産物である γKetoC は免疫抑制作用を有し皮膚炎を抑制する
○八代拓也[1]，山本愛日[1]，飯田真由[1]，大村さくら[1]，岸野重信[2]，小川　順[2]，西山千春[1]（[1]東京理科大基礎工，[2]京大院農・応用生命）

P082　3A06a05　ヒロメ（*Undaria undarioides*）から調製したエクソソーム様微小胞の免疫賦活能
○伊藤智広[1]，世古夏実[2]，伊藤裕子[3]，赤尾幸博[4]（[1]三重大院生資，[2]三重大生資　，[3]大阪医大，[4]岐阜大院連合創薬）

P083　3A06p06　緑茶カテキン EGCG の血管内皮細胞由来細胞外小胞を介した生体調節作用
○小川史代，疋田　愛，両角麻衣，熊添基文，藤村由紀，立花宏文（九大院農院・生機科）

P084　2A06a08　リン酸修飾 Fag e 2 の IgA 産生促進を介したソバアレルギー軽減作用
○鈴木湧太[1]，山口大樹[1]，中村宗一郎[1]，片山　茂[1,2]（[1]信州大・農，[2]信州大・先鋭領域融合）

P085　3A04p02　植物色素 betanin の強力な peroxynitrite 消去能による細胞保護機能の検証
○加藤嵩士，薬師　葉，橋本　誠，橋床泰之，崎浜靖子（北大院農）

P086　4A04a11　ファージディスプレイ法を用いた過酸化脂質修飾タンパク質抗体の解析
○阿南優佑，佐々木栄太，板倉正典，近澤未歩，内田浩二（東大院農生科）

P087　2A05a02　霊長類旨味受容体における高いグルタミン酸感受性獲得の分子機構
○戸田安香[1]，早川卓志[2]，中北智哉[3]，河村正二[4]，今井啓雄[5]，石丸喜朗[1]，三坂　巧[6]　([1]明大農・農芸化，[2]北大院地球環境・環境生物，[3]愛大・PROS，[4]東大院新領域・先端生命，[5]京大霊長類研・ゲノム細胞，[6]東大院農生科・応生化)

P088　2A05a12　日本酒の香りは心理的・生理的リラックス効果をもたらす
○鈴木佐知子[1]，矢田幸博[2]，竹内美穂[1]，石田博樹[1]　([1]月桂冠・総研，[2]筑波大院・グローバル教育院)

P089　3A05a13　発達期におけるタンパク質栄養制限は成熟期脳内神経伝達シグナル系の発現・機能異常を惹起する
○北野　楽[1]，椛島奈津美[1]，渡邊貴美[1]，最上侑佑盛[1]，日比亜佑実[1]，古屋茂樹[1,2]　([1]九州大農，[2]九大イノベイティブバイオアーキテクチャーセンター)

P090　3A05a09　飼料の違いが社会的敗北 BALB/c マウスの行動に与える影響
○石其慧太[1]，佐藤瑞穂[1,2]，谷島優平[1]，豊田　淳[1,2]　([1]茨大農，[2]農工大連農)

P091　4A01a03　α-トコトリエノールが I-10 細胞のテストステロン分泌に及ぼす影響
○寺田直史，加藤英介　(北大院農)

P092　4A01a10　マウス腸オルガノイドを用いた微量栄養素の消化管内作用の解析
○湯浅ほのか[1]，安宅由佳[1]，小川剛伸[1]，桝田哲哉[1]，大木淳子[2]，岩槻　健[2]，谷　史人[1]　([1]京大院農，[2]東農大応生科)

P093　3A02p14　肝星細胞における β カロテンの線維化抑制効果
○田代純輝，橋本堂史　(神戸大院農)

P094　2A04a03　緑茶摂取によるヒト血球細胞における DNA メチル化調節作用
○山本真生[1]，廣井　舜[1]，熊添基文[1]，藤村由紀[1]，山本(前田)万里[2]，花房俊昭[3]，立花宏文[1]　([1]九大院農院，[2]農研機構，[3]大阪医科大)

P095　2A10a08　CODH/ACS を欠損した偏性混合栄養メタン菌の解析
○名古屋美紗[1]，高妻篤史[1]，上野嘉之[2]，渡邉一哉[1]　([1]東薬大生命，[2]鹿島建設)

P096　2A10a05　好アルカリ性高度好塩性古細菌の分離と諸性質解析
○工藤美祈[1]，早船瑞麗[1]，近藤悠介[1]，嶋根康弘[2]，峯岸宏明[1,2]　([1]東洋大学，[2]海洋研究開発機構)

P097　3A10a13　深部地下圏環境におけるメトキシ芳香族化合物(MACs)分解メタン生成共生系の発見
○坂本幸子[1]，延優小西[2]，眞弓大介[3]，玉澤　聡[4]，五十嵐雅之[5]，若山　樹[5]，前田治男[5]，坂田　将[3]，鎌形洋一[2]，玉木秀幸[2]　([1]筑波大院・生命，[2]産総研・生物プロセス，[3]産総研・地圏資源，[4]幌延地圏環境研究所，[5]国際石油開発帝石株式会社)

P098　2A10a06　MALDI-MS プロテオタイピングのためのバイオマーカー同定
○寺本華奈江，関谷禎規，岩本慎一，田中耕一　(島津製作所)

P099　3A10p01　Difference of Gut Microbial Community in Indonesian Obese, Type 2 Diabetic, and Healthy Groups
○Phatthanaphong THERDTATHA[1], Masaru TANAKA[1], Mariyatun MARIYATUN[2], Miisaroh ALMUNIFAH[2], Nancy Eka Putri MANURUNG[2], Siska INDRIARSIH[2], Yuan-kun Lee[3], Endang Sutriswati RAHAYU[2], Jiro NAKAYAMA[1]　([1]Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Kyushu University, [2]Faculty of Agricultural Technology, Universitas Gadjah Mada, [3]Department of Microbiology and Immunology, National University of Singapore)

P100　3A10a12　火山灰に由来する難培養高度好熱菌の集積と分離の検討
○沖村麻衣子[1]，ヒダヤファンディー[1,2]，ビエネスカトリーナ[1]，奥川友紀[1]，田代幸寛[1]，酒井謙二[1]　([1]九大院・生資環，[2]IOPRI)

P101　3A10a08　複合微生物系によるウロリチンの生産に関する研究(5)　～新規ヒト腸内由来ウロリチン B 生産菌の発見と利用～
○沢田翔一，中島賢則，山本浩明　(ダイセル・コーポレート研)

P102　4A18a03　PAF 複合体-SAGA 複合体を介した窒素カタボライト抑制制御機構の解明
○大澤　晋[1]，八代田陽子[1]，吉田　稔[1,2]　([1]理研CSRS・ケミカルゲノミクス，[2]東大院農　応生工，微生物連携機構)

P103　2A18a06　*Methylorubrum* 属細菌の低栄養環境下におけるランタノイド応答の分子メカニズムの解明
○水野洸介[1]，原田雄斗[1]，岩本悟志[1]，谷　明生[2]，三井亮司[3]，島田昌也[1]，早川享志[1]，中川智行[1]　([1]岐阜大自然科学，[2]岡山大植物研，[3]岡山理科大理)

P104　4A18a13　マイクロ流体デバイスを用いた糸状菌の菌糸における可塑性の解析
○福田紗弓[1]，柳沢直樹[2]，高谷直樹[1]，佐藤良勝[2]，竹下典男[1]　([1]筑波大・生命環境・微生物サステイナビリティ研究センター，[2]名古屋大・IT b M)

P105　3A18p05　超低栄養性細菌 *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株の *mnoA* の機能解析
○岸本真奈[1]，池ヶ谷凌士[2]，新谷政己[2]，金原和秀[2]，吉田信行[2]　([1]静大・工，[2]静大院・総合科技)

P106　2A18a02　細菌にプラスミドへの非感受性を与える転写制御ネットワークの解明
○河野　響[1]，水口千穂[1,2]，岡田憲典[1]，野尻秀昭[1,2]　([1]東大・生物工学セ，[2]東大・微生物連携機構)

P107　3A12a03　細菌のセンサータンパク質によるベシクル生産とバイオフィルム分散の誘導
○横山文秋[1,2]，今井友也[3]，川本　純[1]，小川拓哉[1]，栗原達夫[1]　([1]京都大学・化学研究所，[2]日本学術振興会・特別研究員，[3]京都大学・生存圏研究所)

P108　3A12a13　鉄還元細菌由来メンブレンベシクルを介した緑膿菌の細胞外電子移動
○徳納吉秀[1,2,3]，野村暢彦[1,4]，豊福雅典[1,4]　([1]筑波大学生命環境系，[2]物質材料研究機構国際ナノアーキテクトニクス研究拠点，[3]日本学術振興会特別研究員PD，[4]筑波大学微生物サステイナビリティ研究センター)

P109　3A12p11　出芽酵母 YBR056w にコードされる β-1,6-グルカナーゼ活性を持つ蛋白質の解析
北澤陽一郎[1]，永田晋治[3]，平山弘人[4]，鈴木　匡[4]，足立博之[1,2]，○野田陽一[1,2]　([1]東大院・農生化，[2]東大微生物連携研究機構，[3]東大院・新領域，[4]理研・CPR)

P110　3A12p18　黄麹菌における α-アミラーゼ mRNA の可視化解析
○樋口裕次郎，竹川　薫　(九大院農)

P111　3A12p04　*Actinoplanes missouriensis* の胞子嚢膜を構成する脂質のリピドーム解析
○前田聡史[1]，手塚武揚[1,2]，和泉自泰[3]，高橋政友[3]，馬場健史[3]，大西康夫[1,2]　([1]東大院・農生科，[2]東大・微生物イノベ連携機構，[3]九大・生医研)

P112　3A12p14　糸状菌オルガネラと細胞壁・隔壁のラベルフリーラマンイメージング解析
○安田　充[1]，竹下典男[2]，重藤真介[1]　([1]関西学院大理工，[2]筑波大生命環境)

P113　2A17a06　希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の胞子嚢開裂を制御するシグマ－アンチシグマファクター系の同定と機能解析
○光山京太[1]，手塚武揚[1,2]，大西康夫[1,2]　([1]東大院・農生科・応生工，[2]東大・微生物連携機構)

P114　3A17a06　過酷な環境から単離された微細藻類の新規な光酸化ストレス防御機構のオミクス解析
○豊島拓樹[1]，吉田梨沙子[1]，佐保好亮[1]，高市真一[2]，川崎信治[1,2]　([1]東農大バイオサイエンス，[2]東農大分子微生物)

P115　3A17a01　リパーゼ・スーパーインデューサーにより誘導されるリパーゼと関連物質の機能解析
○石塚盛雄[1]，多勢真大[1]，関谷麻美[1]，千濱良太[1]，赤沼元気[2]，牛尾一利[3]　([1]中央大理工，[2]立教大理，[3]新居浜高専物生)

P116　3A17p07　酵母のプロテオスタシスにおける高濃度エタノールへの適応応答
○吉田雅偲，加藤沙枝，井澤真吾　(京工繊大・応生)

P117　3A17p12　プロファージ遺伝子よる微生物間コミュニケーションの活性化
○安田まり奈[1]，森永花菜[2]，尾花　望[3,5]，野村暢彦[4,5]
([1]筑波大院・生命環境科科学，[2]産総研・生物プロセス研究部門，[3]筑波大・医学医療系トランスボーダー医学研究センター，[4]筑波大・生命環境系，[5]筑波大・微生物サステイナビリティ研究センター)

P118　3A17p17　Study on a novel protein FipA as a possible scaffold for Fus3 MAPK cascade in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*
○Yue CHEN[1]，Takuya KATAYAMA[1,2]，Ozgur BAYRAM[3]，Gerhard H. BRAUS[4]，Katsuhiko KITAMOTO[5]，Jun-ichi MARUYAMA[1,2]　([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Dept. of Biol., Maynooth Univ., [4]Dept. of Mol. Microbiol. Genet., Georg-August-University Goettingen, [5]Nihon Pharmaceutical Univ.)

P119　4A17a11　*Lactobacillus plantarum* 環境単離株における莢膜相変異機構による集団適応機構の解析
○澁澤　薫[1]，江橋由夏[1]，尾花　望[2,3]，野村暢彦[3,4]　([1]筑波大・生命環境，[2]筑波大・医学医療系・TMRC，[3]筑波大・MiCS，[4]筑波大・生命環境系)

P120　3A17p18　超好熱菌細胞内における大型ポリアミンの転写・翻訳への関与
○福田青郎[1]，尾崎　守[1]，福田萌子[1]，濱川匡史[1]，家森優佳[1]，秀瀬涼太[2]，兼崎　友[3]，加藤　知[1]，藤原伸介[1]　([1]関西学院大理工，[2]神戸大院科学技術イノベ，[3]静岡大グリーン研)

P121　4A08a09　生物学的処理および光触媒・Boron-doped diamond 電極ハイブリッド式汚水浄化システムの改良と環境影響評価
○久保田智紀[1]，井手口真理[1]，佐藤俊樹[1]，落合　剛[2,3]，藤嶋　昭[2]，鈴木智順[1,2]　([1]東理大応生，[2]東理大総研，[3]KISTEC)

P122　2A08a03　同一不和合性群に属するプラスミドであってもその宿主域は異なる
徳田真穂[1]，千葉怜碧[2]，井上謙吾[3]，雪　真弘[4]，大熊盛也[4]，水口千穂[5]，野尻秀昭[5]，金原和秀[1,2]，○新谷政己[1,2,6]　([1]静大院・総合科技，[2]静大・工，[3]宮崎大・農，[4]理研・BRC-JCM，[5]東大・生物工学セ，[6]静大・グリーン研)

P123　2A08a05　*Sphingobium* sp. SYK-6 株に見いだされた立体選択的なリグニン由来芳香族化合物の外膜輸送システム
○柴田昂輝[1]，藤田雅也[1]，上村直史[1]，菱山正二郎[2]，政井英司[1]
([1]長岡技科大・生物，[2]森林総研)

P124　2A08a06　人工遺伝子クラスターを利用した有機塩素殺虫剤分解酵素遺伝子キャプチャリング株の作製
○蘇　立俊，加藤広海，大坪嘉行，津田雅孝，永田裕二　(東北大院生命)

P125　3A08p06　次世代型プレバイオティクス・ガラクトシル-*β*-1,4-ラムノースのビフィズス菌特異的な増殖促進機構の解析
○平野里佳[1,2]，阪中幹祥[1,3]，杉本直久[4]，江口省吾[4]，奈良未沙希[1]，片山高嶺[5]，北岡本光[4,6]，中井博之[4]，栗原　新[2]　([1]石川県大生資環，[2]近畿大生物理工，[3]デンマーク工大食品，[4]新潟大農，[5]京大院生命，[6]農研機構・食品研)

P126　3A08p05　超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* における IA 型 DNA トポイソメラーゼ機能の遺伝学的解析
○山浦昂大[1]，松見理恵[2]，John Reeve[3]，石野良純[2]　([1]九州大農，[2]九州大院農，[3]オハイオ州立大)

P127　2A09p02　*Shewanella oneidensis* MR-1 株における電極電位応答性プロモーターの同定
○廣瀬篤弥，高妻篤史，渡邉一哉　(東薬大院生命)

P128　3A09p14　H-NS ファミリータンパク質のレギュロンはプラスミド保持に伴い劇的に変化する
○中村泰輔[1]，河野　響[1]，兼崎　友[2]，川崎信治[3,4]，水口千穂[1,5]，岡田憲典[1]，野尻秀昭[1,5]　([1]東大・生物工学セ，[2]東農大・ゲノム解析セ，[3]東農大・バイオ，[4]東農大・微生物，[5]東大・微生物連携機構)

P129　4A09a14　*Komagataella phaffii* におけるメタノール誘導性遺伝子発現制御に重要な転写因子 Mxr1 の機能領域の同定
○井上紘一，由里本博也，阪井康能　(京大院農)

P130　4A09a05　放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2)におけるヘムを基盤とした NO 依存性二成分制御系による鉄硫黄タンパク質と共同した抗生物質生産調節機構
○本間颯太，伊藤晋作，矢嶋俊介，佐々木康幸　(東農大農)

P131　3A09p04　DNA 構造情報による麹菌由来転写因子の結合メカニズムの解析
○岡　大椰[1]，兒島孝明[1]，井原邦夫[2]，小林哲夫[1]，中野秀雄[1]　([1]名古屋大学生命農学研究科，[2]名古屋大学遺伝子解析施設)

P132　3A08p07　エンドヌクレアーゼ *Taq*I の直接導入で得られた産業用酵母の再編成ゲノムの構造解析
○安川泰史[1]，小田有沙[2]，増尾直久[1]，太田邦史[2]　([1]三菱商事ライフサイエンス株式会社，[2]東大院総合文化)

P133　3A08p16　ヒトマイクロバイオーム解析のための Mock Community の開発
○三浦隆匡[1]，島村麻美子[1]，内野佳仁[1]，山副敦司[1]，坂本光央[2,3]，関口勇地[4]，成田興司[5]，亀山恵司[5]，久田貴義[5]，笠原　堅[5]，寺内　淳[5]，川崎浩子[1]　([1]NITE・NBRC，[2]理研BRC-JCM，[3]日本医療研究開発機構, PRIME，[4]産総研，[5]日本マイクロバイオームコンソーシアム)

P134　2A12a12　高度好熱菌由来 CoA transferase の制御タンパク質 ADLP の機能構造解析
○吉田彩子[1]，山本寛之[1]，富田武郎[1,2]，葛山智久[2,3]，古園さおり[1,2]，西山　真[1,2]　([1]東大生物工学セ，[2]東大CRIIM，[3]東大院農生科)

P135　2A12a04　比較ゲノム解析による油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の新規油脂蓄積制御因子の同定とその機能解析
○風間春香[1]，森　一樹[2]，油谷幸代[3,4]，荒　学志[6]，山崎晴丈[1]，志田洋介[5]，小笠原渉[5]，矢追克郎[4]，荒木秀雄[6]，田代康介[7]，高久洋暁[1]　([1]新潟薬大・応生科，[2]鹿児島高専，[3]産総研・CBBD-OIL，[4]産総研・生物プロセス，[5]長岡技科大・工，[6]不二製油グループ本社，[7]九州大・院生資源・遺伝子制御)

P136　2A12p02　フミン酸添加培養モデルが解明する土壌環境中での糸状菌の代謝制御
○宮崎つぐみ，大泉太於，中澤奈美，桝尾俊介，高谷直樹　(筑波大・生命環境・微生物サステイナビリティ研究センター)

P137　3A09a09　ルシフェラーゼ発光による枯草菌細胞内 NADPH レベルの非破壊的観測
○吉田健一[1]，石川　周[1]，田中　寛[2]　([1]神戸大科技イノベ，[2]東工大)

P138　3A09a11　代謝経路の動的モデルを使った in vitro の酵素反応系による複数酵素 Vmax の予測
北村さや香，○戸谷吉博，清水　浩　(阪大院・情報・バイオ情報)

P139　4A12a08　化学酵素的アミド結合形成法を用いたジペプチド類似体の合成
佐々木楓，○鈴木　伸，木野邦器　(早大・先進理工・応化)

P140　4A12a15　*Bacillus circulans* KA-304 由来 *α*-1,3-グルカナーゼの機能解析と構造解析
○大塚　唯[1]，矢野成和[2]，伊藤貴文[3]，日び隆雄[3]，田中良和[4]，若山　守[5]，真壁幸樹[2]　([1]山形大工，[2]山形大院理工，[3]福井県大生資，[4]東北大院生命，[5]立命館大生命)

P141　4A11a11　*N*結合型糖鎖欠損糖タンパク質を分泌生産する黄麹菌 AoGlycoDelete 株の諸性質解析
○李　秋実[1]，田辺佳奈[2]，小谷哲也[2]，竹川　薫[1]，樋口裕次郎[1]
([1]九大院　生資環，[2]AGC ㈱)

P142　3A15a03　*Gordonibacter urolithinfaciens* DSM27213 における新規酵素エラグ酸ラクトナーゼの同定および機能解析
岸野重信[1]，渡邊寛子[1]，○熊澤加奈子[1]，工藤眞丈[2]，林　素子[2]，山本浩明[2]，小川　順[1]　([1]京都院農，[2]ダイセル・コーポレート研)

P143　4A16a10　*Penicillium aurantiogriseum* の触媒反応により *Aspergillus ustus* 代謝物から 生成する新規フロイソキノリンアルカロイド
○山田光代，齊藤太樹，小川凌太，仁戸田照彦，神崎　浩　(岡山大院・環境生命)

P144　2A16a02　糸状菌胞子を用いた非水系微生物変換システム
○杉本恭子，小田　忍　(金沢工大ゲノム研)

P145　4A16a08　酸素発生型光合成で駆動する嫌気発酵プロセス
○得平茂樹，肥後明佳　（首都大理）

P146　3A15a11　海洋由来酵母による褐藻類主要成分マンニトールからの油脂生産
○中田翔太[1]，日尾　守[2]，髙瀬隆一[1,2]，河井重幸[3]，渡辺大輔[1,2]，橋本　渉[1,2]　（[1]京大院農，[2]京大農，[3]石川県大）

P147　2A11a08　バリン代謝が変化した新規 *ILV6* 変異酵母のアミノ酸生成能と清酒醸造特性
○村上直之[1]，磯貝章太[2]，蘆田佳子[2]，小高敦史[1]，西村　明[2]，松村憲吾[1]，秦　洋二[1]，石田博樹[1]，高木博史[2]　（[1]月桂冠・総研，[2]奈良先端大バイオ）

P148　3A11p15　コリネ型細菌によるパルミトレイン酸の生産（第一報）
○北村嘉子[1]，大竹辰徳[1]，林　幹朗[2]，竹野誠記[1]，池田正人[1]　（[1]信州大農，[2]協和発酵バイオ）

P149　3A11p17　有機合成反応を利用したビニル化合物生産菌の選択的分離法
○麻生祐司[1]，佐野芽生[1]，小原仁実[1]，松本圭司[2]，和田一仁[2]　（[1]京都工繊大院・工芸科学，[2]株式会社カネカ・R&B本部）

P150　3A11a01　原形・扁平白米と球形白米により醸成した清酒のメタボライト比較解析
○平吉明日香[1]，平田章悟[1,2]，福本浩史[1,3]，小松夕子[1]，小林拓嗣[1]，矢澤　彌[1]，室井佑介[4]，川上晃司[4]，岩下和裕[1,2,3]　（[1]酒総研，[2]広島大院・統合生命，[3]広島大・工，[4]株式会社サタケ）

P151　3A11p08　酪酸産生菌のオリゴ糖代謝と糖加水分解酵素の解析
○丹野広貴[1]，藤井　匡[2]，前野慎太朗[1]，平野勝紹[2]，栃尾　巧[2]，遠藤明仁[1]　（[1]東農大生物産業，[2]物産フードサイエンス株式会社）

P152　3A11a12　ドライエイジングにおける使用菌種の相異が熟成肉の品質に与える影響
○秋葉奏汰[1]，跡部美樹雄[2]，村上周一郎[1,2]　（[1]明治大農，[2]㈱ミートエポック）

P153　3A07p03　部位特異的変異によるバクテリオシンの改変とその影響
○小山　遼[1]，PEREZ Rodney Honrada[1,2]，竹内啓記[1]，園元謙二[1]，善藤威史[1]　（[1]九州大農，[2]フィリピン大学・ロスバニョス校）

P154　3A07p09　顕微ラマン多変量スペクトル分解法を用いた二次代謝産物 penicillin 及び avermectin の菌体内検出
○堀井俊平[1,2]，安藤正弘[3,4]，中島琢自[3,5]，Ashok Samuel[3]，松本厚子[5]，高橋洋子[5]，竹山春子[1,2,3,6]　（[1]早大院先進理工，[2]産総研 CBBD-OIL，[3]早大ナノライフ創新研，[4]JSTさきがけ，[5]北里大生命科学研，[6]早大先進生命動態研）

P155　3A07a08　麹菌におけるゲノム編集を利用した多重代謝改変による異種天然物生産性の向上
○齋藤直也[1]，片山琢也[1,2]，南　篤志[3]，及川英秋[3]，丸山潤一[1,2]　（[1]東大院・農生科・応生工，[2]東大・微生物連携機構，[3]北大院・理）

P156　4A07a09　パームヤシ病原性 Ganoderma boninense に対する抗糸状菌活性の機構解明
○近藤宜希[1]，浅原理央[1]，中野貴裕[1]，CHIN Claent fui seung[2]，ZAINUDIN Huzairi[3]，RAMLI Norhayati[3]，田代幸寛[1]，酒井謙二[1]　（[1]九大院・生資環，[2]マレーシアサバ大学，[3]プトラ・マレーシア大学）

P157　3A07a06　黄麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるポリケチド生産への *kojA* プロモーターの使用：長期間生産への応用の見通し
○玉野孝一[1,2]，國永万保子[1]，小島　直[3]，梅村舞子[1,2]，町田雅之[1]，小池英明[1]　（[1]産総研生物プロセス，[2]産総研CBBD-OIL，[3]産総研バイオメディカル）

P158　3A07p07　発酵食品由来乳酸菌からのフェルラ酸エステラーゼ生産菌のスクリーニング
○矢野嵩典，中西陽香，三井亮司　（岡山理大理）

P159　3A07p13　中心代謝改変による有用物質生産への応用
○土居志織[1,2]，小松　護[2]，池田治生[2]　（[1]慶應大，[2]北里大・生命研）

P160　2B07a06　G タンパク質共役受容体 LGR6 は筋分化調節に関与する
○山口真由[1]，北風智也[2]，原田直樹[1]，乾　　博[3]，山地亮一[1]　（[1]大阪府大院・生命環境，[2]神戸大院・農，[3]大阪府大・栄養）

P161　2B07a07　老化促進モデルマウス SAMP1 の骨格筋において *β*-cryptoxanthin はオートファジーを活性化する
○野口真里[1]，北風智也[2]，向井克之[3]，原田直樹[1]，乾　　博[4]，山地亮一[1]　（[1]大阪府大院・生命環境，[2]神戸大院・科技イノベ，[3]㈱ダイセル，[4]大阪府大院・栄養）

P162　2B07a02　サル消化管オルガノイドを用いた霊長類特異的 Tuft 細胞機能の探索
○稲葉明彦[1]，有永理峰[2]，早津徳人[3]，岡崎康司[3]，遠藤高帆[3]，今井啓雄[4]，山根拓実[1,2]，大石祐一[1,2]，岩槻　健[1,2]　（[1]東農大院農，[2]東農大応生，[3]理研IMS，[4]京大霊長類研）

P163　3B07p13　前頭前野-扁桃体回路は社会行動を制御し、前頭前野-視床室傍核回路は社会記憶形成を制御する
○谷水俊之[1]，櫻内華恵[1]，石川理絵[1,2]，喜田　聡[1,2]　（[1]東農大院・農・バイオ，[2]東大院・農・応用生命化学）

P164　4B07a07　1 細胞トランスクリプトーム解析によるマウス味細胞の分類
○岩槻　健[1]，早津徳人[2]，岡崎康司[2]，遠藤高帆[2]，橋本浩介[2]，金丸青里香[2]，山根拓実[1]，大石祐一[1]　（[1]東農大・応用生科，[2]理研 IMS）

P165　4B07a05　神経炎症性サイトカイン TNF*α* は海馬依存性記憶の想起を負に制御する
○高橋翔平[1,2]，福島穂高[1]，喜田　聡[1,2]　（[1]東農大院・農・バイオ，[2]東大院・農・応用生命化学）

P166　3B06a03　CYP7B1 and its function on the progression of non-alcoholic steatohepatitis
○Napatsorn DUMRONGKULCHART，Yuichi WATANABE，Makoto SHIMIZU，Yoshio YAMAUCHI，Ryuichiro SATO（Dept. of Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. of Agr. and Life Sci., Univ. of Tokyo）

P167　3B06p13　カイコのクワ認識に関与する成分と味覚受容体の探索
○小林優理，鈴木俊太，東原和成　（東京大学 大学院農学生命科学研究科 応用生命化学専攻）

P168　3B06a02　脂肪細胞機能調節におけるイソプレノイド合成経路の役割の検討
○後藤　剛[1,2]，Yeh Yu-Sheng[1]，Kwon Jungin[1]，Jheng Huei-Fen[1]，高橋春弥[1]，野村　亘[1,2]，井上和生[1]，河田照雄[1,2]　（[1]京都大院・農，[2]京都大・学際融合教育研究推進センター）

P169　3B06p08　腸内共生細菌由来ポリアミンは腸管粘膜バリアと免疫を調整する
○中村篤央[1,2]，栗原　新[3]，松本光晴[2]，長谷耕二[3]　（[1]慶應大薬，[2]協同乳業，[3]近畿大生物理工）

P170　3B06p09　転写抑制因子 Bach1 は大腸粘液分泌に関与する
○谷川　潤[1]，髙木智久[2]，水島かつら[2]，平井泰子[2]，武藤哲彦[3]，五十嵐和彦[3]，内藤裕二[2]，東村泰希[1,2]　（[1]石川県大・生資環，[2]京府医院・医，[3]東北大院・医）

P171　3B06p01　新規肝線維化発症関連遺伝子としての 67-kDa laminin receptor の同定
○西岡成汰，竹下菜津子，錦戸里紗，山田脩平，藤村由紀，立花宏文　（九大院農院・生機科）

P172　3B06p02　四塩化炭素誘導急性肝障害の再生過程におけるマクロファージ除去の影響
○三浦　徳[1]，池田志織[2]，増澤(尾﨑)依[2]，細野　崇[2,3]，関泰一郎[2,3]　（[1]日大・生資科・総合研究所，[2]日大・生資科・生命化，[3]日大院・生資科・応生科）

P173　4B06a07　ショウジュウバエにおけるミトコンドリアへの新規な脂肪酸輸送機構の発見
○長尾耕治郎，石井隆太，大平直義，葭原啓太，小西　翔，従二直人，梅田眞郷　（京都大工）

P174　4B08a11　緑藻クラミドモナスのデンプン鞘は CO_2 濃縮機構に寄与する
○山野隆志，豊川知華，福澤秀哉　（京大・院・生命）

P175　2B08a05　BSD2 は酸化失活ルビスコを還元再活性化し，光合成反応を促進する
Busch Florian A.[1]，冨永　淳[2]，高橋俊一[3]，矢守　航[4]，Milward Sara E.[1]，西村浩二[5]，戸田陽介[6,7]，高見常明[8]，渡邊俊介[9]，木下俊則[6]，坂本　亘[8]，坂本　敦[2]，○島田裕士[2]
([1]RSB, ANU，[2]広島大・院統合生命，[3]基生研，[4]東大・院農学生命科学，[5]島根大・生物資源，[6]名大・ITbM，[7]JSTさきがけ，[8]岡山大・植物研，[9]理研 CSRS)

P176　3B08a08　インビトロ再構成系した天然ゴム生合成酵素の活性解析
○黒岩　風[1]，西野　輝[1]，廣森美樹[2]，モンドル慶子[1]，山口晴彦[3]，宮城ゆき乃[3]，山下　哲[4]，高橋征司[2]，戸澤　譲[1]
([1]埼玉大院理工，[2]東北大院工，[3]住友ゴム工業㈱，[4]金沢大理工)

P177　3B09p04　ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の投与による植物培養細胞の潜在的二次代謝能の発掘：タケ細胞における誘導性化合物の同定および生合成酵素の探索
○米田朱里[1]，野村泰治[1,2]，北岡直樹[1,2]，荻田信二郎[3]，加藤康夫[1,2]
([1]富山県大院・工，[2]富山県大・生医工研セ，[3]県立広島大・生命科学)

P178　3B09p07　原種コーヒーから単離したカフェイン生合成系酵素遺伝子の機能解析と基質特異性決定部位の探索
○國久葉月[1]，岩根利奈[1]，井田美帆[1]，高木　駿[1]，倉田陸朗[1]，Valerie Poncet[2]，Alexandre de Kochko[2]，水野幸一[1]　([1]秋田県大生物資源，[2]IRD-Montpellier DIADE)

P179　3B09p09　オーロンを経由するゼニゴケの新規赤色色素生合成経路
○押切春佳[1]，松下紋子[2]，渡辺文太[3]，久保浩義[1,2]，高梨功次郎[1,2]
([1]信州大・総合理工，[2]信州大・理，[3]京大・化研)

P180　3B09p08　ゼニゴケの菌型テルペン合成酵素は油体細胞特異的に発現し油体へのセスキテルペン集積を担う
滝澤遼典[1]，畑田珠希[1]，森脇祐太[1]，阿部祥香[1]，山下優子[1]，肥塚崇男[1]，大和勝幸[2]，西浜竜一[3]，フェンチェン[4]，河内孝之[3]，○松井健二[1]　([1]山口大農，[2]近畿大生物理工，[3]京都大生命科学，[4]テネシー大農)

P181　3B02a08　フェアリー化合物の生合成に関連した新規プリン代謝の解明
○竹村太秀[1]，崔　宰熏[1,2]，大西利幸[1,2]，平井浩文[1,2]，稲井　誠[3]，大内仁志[3]，浅川倫宏[4]，菅　敏幸[3]，河岸洋和[1,2]　([1]静大院・創造，[2]静大・グリーン研，[3]静県大・薬，[4]東海大・海洋)

P182　3B02a05　基質アナログ型ストリゴラクトン生合成阻害剤の探索
○川田紘次郎[1]，内田裕也[1]，小野田聡志[1]，佐々木康幸[1]，野村崇人[2]，矢嶋俊介[1]，伊藤晋作[1]　([1]東京農大・バイオ，[2]宇都宮大・バイオ)

P183　4B09a04　強光ストレス下の植物におけるアスコルビン酸再生機構
○田中　澪[1]，寺井佑介[2]，上野祐美[1]，小川貴央[1,2]，宮城敦子[3]，川合真紀[3]，石川孝博[1,2]，丸田隆典[1,2]　([1]島根大院・自然科学，[2]島根大・生資科・生命工，[3]埼玉大・理工)

P184　4B09a03　新規ミトコンドリア阻害剤 FSL0260 は植物の耐塩性を強化する
○佐古香織[1,2]，二村有史[2]，清水　猛[2]，松井章浩[2]，平野裕之[2]，近藤恭光[2]，室井　誠[2]，青野晴美[2]，田中真帆[2]，本田香織[2]，清水謙志郎[2]，川谷　誠[2]，中野雄司[2]，長田裕之[2]，野口　航[3]，関　原明[2]　([1]近大農，[2]理研CSRS，[3]東京薬大生命)

P185　2B06a05　トマト斑葉細菌病菌と軟腐病菌に対するシロイヌナズナの耐病性を付与する小松菜内生細菌の同定とその効果の評価
○黒川摩利[1]，中野正貴[1]，北畑信隆[2]，朽津和幸[1]，古屋俊樹[1]　([1]東京理科大・理工，[2]東大院・農生科)

P186　3B08p04　好熱性と常温性シアノバクテリア RuBisCO の構造活性相関研究
○河野飛鳥[1]，磯野香奈子[1]，合田初奈[2]，林美彩希[2]，蘆田弘樹[1]
([1]神戸大院・人間発達環境，[2]神戸大・発達)

P187　3B08a03　スギ(*Cryptomeria japonica* D. Don)における効率的なゲノム編集技術の開発
○七里吉彦[1]，上野真義[2]，大宮泰徳[2]，二村典宏[2]，遠藤真咲[3]，西口　満[2]，小長谷賢一[1]，谷口　亨[4]　([1]森林総研森林バイオ，[2]森林総研，[3]農研機構・生物機能，[4]森林総研林木育種セ)

P188　4B08a04　光合成能およびワックスエステル生合成能を同時強化した形質転換ユーグレナにおけるパラミロン顆粒形成
○西川由依菜[1]，多保田真歩[2]，重岡　成[1,2]，田茂井政宏[1,2]　([1]近畿大院農，[2]近畿大農)

P189　3B08a02　ミドリムシ産業利用種における RNP 複合体を用いた高効率ゲノム編集法の開発
○野村俊尚[1,2]，井上小槙[1]，上原由紀子[1]，山田康嗣[2,3]，岩田　修[2,3]，鈴木健吾[2,3]，持田恵一[1,2,4,5]　([1]理研CSRS，[2]理研BZP，[3]ユーグレナ，[4]横市大，[5]岡大)

P190　4B04a05　*Aspergillus fumigatus* のガラクトマンナン生合成に関わる新規な α-マンノピラノシド：β-ガラクトフラノース転移酵素の同定
○甲斐万紀子[1]，守田湧貴[2]，千原由莉亜[1]，田中　大[3]，太田一良[1,2]，岡　拓二[1,2]　([1]崇城大院工，[2]崇城大生物生命，[3]東北医薬大)

P191　3B04a08　プラディミシン誘導体を利用した糖タンパク質の染色
○垣原眞太朗[1]，都築麗江[1]，小鹿　一[1]，五十嵐康弘[2]，伊藤幸成[3]，中川　優[1,3]　([1]名大院生命農，[2]富山県大生工，[3]理研)

P192　3B04a10　*Schizosaccharomyces* 属における細胞表層糖鎖の構造解析
○福永嵩大[1]，田中直孝[2]，中北愼一[3]，樋口裕次郎[1]，前川裕美[1]，竹川　薫[1]　([1]九州大農，[2]香川大農，[3]香川大総合生命)

P193　2B04a02　ホスファチジルセリン脱炭酸酵素の結晶構造から明らかになった生体膜リン脂質生合成機構
○渡邊康紀[1]，渡辺誠也[1,2]　([1]愛媛大院・農，[2]愛媛大・CMES)

P194　2B04a05　超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* におけるレプリソームの機能変換機構
○沖　啓輔[1]，山上　健[1]，永田麻梨子[1]，眞柳浩太[2]，沼田倫征[1]，石野園子[1]，石野良純[1]　([1]九大院・農，[2]九大・生医研)

P195　2B04p01　麹菌界面活性蛋白質ハイドロフォビン RolA の自己組織化構造形成過程の可視化・解析
○寺内裕貴[1]，齋藤有美[1]，田中拓未[1]，三ツ石方也[2]，藪　浩[3]，吉見　啓[4]，七谷　圭[1]，阿部敬悦[1,4]　([1]東北大農，[2]東北大・多元研，[3]東北大・材料研，[4]東北大・未来研)

P196　2B04a06　HBV 細胞内侵入阻害リポペプチド Myrcludex B の新規作用機構
○七原匡哉[1]，曽宮正晴[2]，黒田俊一[2]　([1]大阪大生命，[2]大阪大学産業科学研究所)

P197　2B09a01　GABA 測定キットの開発
西山辰也[1,2]，Woro Triarsi Sulistyaningdyah[2]，○上田賢志[1]，日下部均[2]　([1]日大生資科，[2]㈱ エンザイムセンサ)

P198　2B09p03　半導体特性を持つ黄鉄鉱ナノ粒子のヘムタンパク質を用いた合成メカニズムの解明
○山下達也[1]，松田大輝[1]，岡田至崇[2]，アーサンナズムル[2]，鈴木庸平[3]，鈴木道生[1]　([1]東大院農学生命，[2]東大先端研，[3]東大院理)

P199　2B09p04　生命科学分野の卒業論文研究の広範な教育的意義と新たな教育評価の工夫
○高橋勇二[1,2]，矢野眞和[3]，東京薬科大学AP事業推進室[3]　([1]東京薬科大学生命，[2]東京薬科大AP事業推進責任者，[3]東京薬科大学)

P200　2B09a12　Ecobody 技術を用いたウサギモノクローナル抗体サンドイッチ ELISA システムの開発
○中野秀雄，DAORUNG Sila-on，CHERTCHINNAPHAT Phornnaphat，兒島孝明　(名大院生命農)

講演番号：2A01a01
講演日時：3 月 26 日 09:30～ センター2 号館 A01 会場

フルクトシルトランスフェラーゼ（FTase）を用いて糖類を低減したオレンジ果汁の開発

Development of sugar-reduced orange juice using fructosyltransferase (FTase)

○須藤 僚也、堀江 暁、矢島 由莉佳、西山 千晶、若林 英行（キリンホールディングス株式会社）
○Ryoya SUTO, Akira HORIE, Yurika YAJIMA, Chiaki NISHIYAMA, Hideyuki WAKABAYASHI (Kirin Holdings Company, Limited)

【背景・目的】
近年、WHO はガイドライン「Sugars intake for adults and children」で糖類の摂取を抑制するよう推奨しており、糖類の過剰摂取は社会課題の１つとなっている。コーラ等の清涼飲料は糖類を高甘味度甘味料で代替することにより糖類オフ/ゼロにすることは容易だが、糖を含有する果汁や野菜汁等の場合、100%果汁の濃厚さを保ったまま糖類を減らすことは非常に困難である。オレンジジュースなどの果汁飲料はビタミン C 等の栄養成分を豊富に含むため、健康的なイメージを持つ飲料であるが、天然物由来の糖類が多く含まれる。そのため糖類だけを低減した、より健康的な 100%果汁の開発が期待される。糖類を低減する手法としては発酵や膜処理などの方法が報告されているが、糖類以外の成分も大きく変動してしまうことなど製造上の制約がある。当技術では酵素反応によって、糖類を特異的に低減したオレンジ果汁を開発することを目的とした。

【方法・結果】
食品添加物として許容されている酵素の中からスクリーニングし、オレンジ果汁中のスクロースをフルクトオリゴ糖に変換するフルクトトシルトランスフェラーゼ(FTase)活性の高い酵素を見出した。さらに、改良した酵素剤の中からペクチナーゼ活性が低下した酵素を選抜し、オレンジ果汁を清澄化しない FTase を発見した。上記酵素を用いて作成した糖類低減オレンジ果汁について各種分析を実施したところ、酸度・Brix・pH・VC・主要香気成分はいずれも変化しなかった。また、上記酵素を用いて作成した糖類低減オレンジ果汁を官能評価したところ良好な香味を示した。

【展望】
今後は、当技術を実用化するための製造課題について検討を進めていく。また、当技術によればオレンジ以外の果汁および野菜汁にも拡張できる可能性があるため、他の素材についても検討を進めていく予定である。

Sugar reduction, Orange, fructosyltransferase

発表責任者：須藤僚也（Ryoya_Suto@kirin.co.jp）

講演番号：2A01a02
講演日時：3 月 26 日 09:41～ センター2 号館 A01 会場

中赤外分光法を用いた酵素処理オレンジ果汁中に含まれる成分糖の定量

Determination of component sugars in enzymatically treated orange juices using FTIR spectroscopy

○矢島 由莉佳[1]、堀江 暁[1]、須藤 僚也[1]、西山 千晶[1]、若林 英行[1]、末原 憲一郎[2]、亀岡 孝治[3]、橋本 篤[3]([1]キリンホールディングス株式会社、[2]三重大大学院地域イノベーション学研究科、[3]三重大大学院生物資源学研究科)
○ Yurika YAJIMA[1], AKIRA HORIE[1], RYOYA SUTO[1], CHIAKI NISHIYAMA[1], HIDEYUKI WAKABAYASHI[1], KEN-ICHIRO SUEHARA[2], TAKAHARU KAMEOKA[3], ATSUSHI HASHIMOTO[3] ([1]Kirin Holdings Company, Limited, [2]Mie University Graduate School of Regional Innovation Studies, [3]Mie University Graduate School of Bioresources)

【背景と目的】

近年，世界保健機構はガイドライン「Sugars intake for adults and children」で糖類の摂取を抑制するよう強く推奨しており，糖類の摂取過剰は社会課題の１つとなっている．そこで我々は，糖転移酵素を用いることで糖類を低減した 100%オレンジ果汁飲料の製造を実現した．酵素処理オレンジ果汁を製造する上で，食品製造現場での工程管理としては迅速かつ正確に糖類を定量する必要があるが，一般的に成分糖の分析に用いられている HPLC は前処理や分析時間の問題，作業の煩雑さ等の課題により製造現場での運用が困難である．また，製造現場において汎用機器である糖度計(屈折計) や酵素法は，特異性が不十分で正確な定量には不向きである．そこで本研究では，既往の研究※において水溶液中の糖類の同時個別定量の可能性が示されている中赤外分光法に着目し，より組成が複雑な酵素処理オレンジ果汁中の成分糖の個別定量法の確立を目的とした．

【実験方法】

実験試料には，複数の産地かつ複数の条件で酵素処理をおこなったオレンジ果汁を用いた．分析に供する際は，11° Brix に調整した．中赤外スペクトル測定には 9 回反射の ATR アクセサリーを付属した FT-IR を用い，測定範囲 4000～400 cm^{-1}，分解能 4 cm^{-1}，積算回数 16 回の条件で測定した．統計解析は，HPLC で成分糖を分離後，RI 検出器を用いて測定した各成分糖の分析値を用い，部分的最小二乗回帰(PLS)によって行った．

【結果と考察】

酵素処理オレンジ果汁に含まれる成分糖のスペクトルは，指紋領域(1200～900 cm^{-1})において特徴的なスペクトルパターンを有しており，酵素反応中のオレンジ果汁のスペクトルパターンは糖組成の変動に伴い，経時的な変化が認められた．そこで，各成分糖のピーク情報を用いて，PLS 解析により酵素処理オレンジ果汁中の糖濃度の予測を試みた．その結果，赤外分光情報に基づいた各成分糖の予測値は，HPLC による基準値と良好に一致した．以上のことから，中赤外分光法は酵素処理オレンジ果汁中に含まれる成分糖の個別定量において，迅速かつ簡易な手法として製造現場で実用化できる可能性が示された．

※亀岡ら，食科工誌，45(3)：199-204(1998)

FTIR, sugar reduction, orange

発表責任者：矢島由莉佳（Yurika_1_Yajima@kirin.co.jp）

講演番号：2A01a03
講演日時：3 月 26 日 09:52～ センター2 号館 A01 会場

石川県産クリの低温貯蔵による遊離糖および澱粉の性質変化

Effect of cold storage on free sugars and starch properties of chestnuts cultivated in Ishikawa prefecture

○齋藤 泰宏[1]、本多 裕司[1]、西山 駿[2]([1]石川県立大学、[2]石川県農林総合研究センター)
○Yasuhiro SAITO[1], Yuji Honda[1], Syun Nishiyama[2] ([1]Ishikawa Prefectural Univ., [2]Ishikawa Agriculture and Foresty Research Center)

【緒論】石川県では年間 110 t（2018 年産）の栗が収穫され、収穫量の大半は輪島市や穴水町といった奥能登地方で栽培されている。石川県の主要な栽培品種は「丹沢」、「筑波」、および「石鎚」であるが、他にも「ぽろたん」や「利平」も栽培されている。
栗は収穫後、低温かつ高湿度で貯蔵すると甘味が増加すると言われている。我々は昨年の本大会において、低温貯蔵（-1℃，45 日）前後における石川県産の「丹沢」、「筑波」、「石鎚」の呈味成分を比較した。その結果、低温貯蔵した栗の遊離糖含量が増加するとともに、栗に含まれる澱粉の糊化開始温度も上昇し、糊化エンタルピー変化が減少したことを明らかにした(1)。
本研究では、石川県で栽培される栗の主要栽培品種（丹沢、筑波、石鎚）に加え「ぽろたん」、「ぽろすけ」、「利平」の計 6 品種に含まれる遊離糖と澱粉の性質を分析し、低温貯蔵による変化と品種間の差異を比較検討することを目的とした。
【方法】石川県農林総合研究センター農業試験場能登駐在所の圃場で 2019 年に収穫および低温貯蔵（0 ℃，30 日）した栗（丹沢、筑波、石鎚、ぽろたん、ぽろすけ、利平）を試料として用いた。
栗に含まれる遊離糖組成を調べるために、栗を剥皮して破砕した試料に 80 %エタノールを添加し、20 時間振盪して遊離糖を抽出した。遊離糖（フルクトース、グルコース、スクロース、マルトース、ラフィノース）の分析には HPLC（カラム：Shodex AsahiPak NH2P-50 4E）および HPIC（カラム：Carbopac PA1 2×250 mm）を用いた。また、栗に含まれる澱粉の糊化温度の差異を検討する為に、剥皮した栗をスライスして凍結乾燥させ、ミルサーで破砕した栗粉を調製し、示差走査型熱量計（Seturum microDSC Ⅲ）で測定した。
【結果】低温貯蔵前（収穫直後）の試料に含まれる遊離糖を分析したところ、すべての品種において遊離糖含量は 3 g/ 100 g（試料）であり、スクロースが 80 %以上を占めていた。
低温貯蔵前の栗に含まれる澱粉の糊化に関するパラメーターを決定したところ、糊化開始温度は 60 ℃から 63 ℃であり、糊化終了温度は 70 ℃から 73 ℃であった。
現在、低温貯蔵後の遊離糖含量と組成、および栗粉に含まれる澱粉の物理学的な性質を分析しているところである。本発表では、栗の定温貯蔵前後における遊離糖組成と栗に含まれる澱粉の性質の差異について議論する予定である

(1) 齋藤泰宏，本多裕司「能登栗の低温貯蔵による遊離糖組成の変化」　日本農芸化学会 2019 年度（平成 31 年度）大会

Cold storage, Free sugar, Starch

講演番号：2A01a04
講演日時：3 月 26 日 10:03～ センター2 号館 A01 会場

キュアリングによる五郎島金時の遊離糖と澱粉の性質の変化について

Effect of curing on free sugars and starch properties of “Goroujima-kintoki” sweet potato

○本多 裕司、岡野 麻里、稲毛 優子、齋藤 泰宏（石川県大・生資環）
○Yuji Honda, Mari Okano, Yuko Inage, Yasuhiro Saito (Ishikawa Prefectural Univ.)

【緒言】加賀野菜とは、金沢で古くから栽培されている野菜の中から、金沢市農産物ブランド協会が認定した 15 品目のブランド野菜である。なかでも、「五郎島金時」というサツマイモは流通量が多く、石川県内でよくみかける加賀野菜の一つである。「五郎島金時」は金沢市の五郎島、粟ケ崎地区、および内灘砂丘で栽培されていた高系 14 号から選抜された品種である。「五郎島金時」は 8 月中旬から 10 月にかけて収穫されるが、10 月以降に収穫された「五郎島金時」はキュアリング処理をされてから貯蔵される。キュアリング処理とは高温多湿（温度 32 ℃、湿度 100 %）で貯蔵する処理であり、サツマイモの傷口にコルク層を形成させて腐敗を防ぎ、貯蔵性を上げることができる。キュアリング処理後は、定温貯蔵（温度 13 ℃、湿度 95 %）することで、「五郎島金時」は長期保存されている。

本研究では、キュアリング前、キュアリング直後、および定温貯蔵 1 ヶ月後の「五郎島金時」に含まれる遊離糖組成と濃度について分析した。また、サツマイモに含まれる澱粉は、加熱後に β アミラーゼによって増加するマルトースの供給源である。澱粉の糊化に関する性質と甘味度の関係を検討するために、「五郎島金時」に含まれる澱粉の糊化特性などの物理化学的な性質についても分析した。以上の分析で得られたデータから、「五郎島金時」の甘味度に対するキュアリングの効果について検証することを本研究の目的とした。

【方法と結果】石川県農商工連携研究会から提供された五郎島金時を本研究の試料とした。キュアリング前、キュアリング直後、および定温貯蔵 1 ヶ月後の試料を以下の分析に供した。遊離糖（フルクトース、グルコースおよびスクロース）含量は、高速液体クロマトグラフィーで分析した。

澱粉の糊化と粘度に関する性質は、示差走査熱量計（DSC）とラピッドビスコアナライザー（RVA）で分析した。

各試料の遊離糖含量を比較してみると、キュアリング直後と定温貯蔵 1 か月後のスクロース含量は 2 倍以上増加していたが、フルクトースの含量は低下していた。DSC で決定した糊化開始温度と終了温度を比較してみると、キュアリング前と定温貯蔵 1 ヶ月後の試料に差異がみられた。また、RVA のパラメーターを比較してみると、ピーク温度、最高粘度、最低粘度、最終粘度、ブレイクダウン、およびセットバック値に差異がみられた。現在、得られたデータを他のサツマイモと比較検討しているところである。

Sugar, Starch, Sweetpotato

発表責任者：本多裕司（honda@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：2A01a05
講演日時：3 月 26 日 10:14～ センター2 号館 A01 会場

エンドウペクチンの構造解析および乳タンパク質安定化能に関する研究

Study on chemical structure and milk protein dispersion ability of pea pectin

○野口 美咲[1]、鈴木 志保[2]、シャカットプラカート ソンボン[3]、福井 健介[3]、長谷川 芳則[3]、中澤 昌美[1]、上田 光宏[1]、阪本 龍司[1]([1]阪府大院・生命環境、[2]阪府大・研究推進機構、[3]不二製油グループ本社（株））
○Misaki NOGUCHI[1], Shiho SUZUKI[2], Sombol JACUTPRAKART[3], Kensuke FUKUI[3], Yoshinori HASEGAWA[3], Masami NAKAZAWA[1], Mitsuhiro UEDA[1], Tatsuji SAKAMOTO[1] ([1]Grad. Sch. of Life & Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Org. for Res. Pro., Osaka Pref. Univ., [3]Fuji Oil Holdings Inc.)

【目的】エンドウ種子はデンプンおよびタンパク質の供給源として利用され、その副産物であるエンドウ繊維は主に細胞壁多糖から構成される。エンドウ繊維由来ペクチン(PP)は、現在、有効利用されていないが、近年、酸性乳飲料(AMD)中のタンパク質分散安定化能を有することが見出された[1]。PP は AMD 安定剤として多用されているシトラスペクチン(CP)とは異なり、AMD の粘性を低く保持した状態で安定化可能である。この特徴は糖鎖構造の違いに由来すると予想されるが、PP の構造は不明である。ペクチンは植物一次細胞壁および中葉組織に存在するヘテロ多糖であり、主鎖はラムノース(Rha)およびガラクチュロン酸(GalA)の繰り返し構造から成るラムノガラクチュロナン-I(RG-I)、GalA から成るホモガラクチュロナン(HG)、HG がキシロース(Xyl)で置換されたキシロガラクチュロナン(XGA)から構成され、RG-I 中の Rha にはアラビナン(ABN)やガラクタン(GN)などの中性糖側鎖が結合している。各領域の分子量や割合は、植物種や抽出方法により異なる。本研究では、本研究室保有の多様なペクチン分解酵素を駆使し、PP の糖鎖構造および AMD 安定化能との相関を解明することを目的とした。
【方法と結果】エンドウ繊維より、4 条件(120℃・pH 3, 6, 9; 90℃・pH 6)でペクチンを抽出した結果、120℃・pH 6 の条件において、最も分子量が大きく、高収率でペクチンを獲得できたことから、本ペクチンを以後の実験に用いた。脱エステル化後、陰イオン交換カラムにて精製した PP の重量平均分子量(M_w)は 488,000 であり、アラビノース(Ara)が全体の 50%を占め、RG-I 中の約 60%の Rha に側鎖が結合していた。側鎖構造を決定するため、PP を側鎖分解酵素で処理後、遊離率算出および ^{1}H-NMR 解析を行った。その結果、Ara は分岐 α-1,5-L-ABN として存在しており、その分岐率は約 60%であった。また RG-I 中の 35%の Rha には主にガラクトースが結合し、長鎖 β-1,4-D-GN も低い割合で結合していた。次に主鎖構造を決定するため、側鎖を除去した PP 主鎖を主鎖分解酵素で処理し、ゲルろ過カラムまたは強陰イオン交換カラムに供し、RG-I, HG, XGA を調製した。各領域の M_w は RG-I(67,000)>XGA(46,000)>HG(7,000)であった。XGA 中の Xyl 置換率は 63%であったことから、PP 主鎖中の各領域比は RG-I/HG/XGA=3/3/4、中性糖側鎖を含めると 7/1/2 であると推定された。以上の結果、PP は CP に比べ、HG の割合が低く、多分岐の ABN が結合した M_w の大きい RG-I を有することが判明した。AMD の安定化において、重要な役割を担っている PP 中の構造を特定するため、酵素処理により PP 中の各領域を部分分解した PP を調製し、これらの AMD 安定化能について評価を行っている。

[1] Cheng et al. (2018) *Food Research International*, 109, 544-551.

pectin, structure, milk protein dispersion

講演番号：2A01a06
講演日時：3 月 26 日 10:35～ センター2 号館 A01 会場

窒素施肥によるイネ種子内のトレハロース 6-リン酸及びその関連分子の発現変動解析
Expression Change of Trehalose 6-phosphate and its Related Molecules in Rice Seed by Additional Nitrogen Fertilization
○酒井 孝一朗[1]、黒田 昌治[2]、福田 あかり[2]、永野 淳[3,4]、阿部 啓子[1,5]、朝倉 富子[1]([1]東大院農生科・応生化、[2]農研機構・中央農研、[3]龍谷大・農、[4]クロックミクス、[5]KISTEC)
○Koichiro SAKAI[1], Masaharu KURODA[2], Akari FUKUDA[2], Atsushi NAGANO[3,4], Keiko ABE[1,5], Tomiko ASAKURA[1] ([1]the Univ. of Tokyo, [2]National Agriculture and Food Research Organization, [3]Ryukoku Univ., [4]Clockmics, [5]KISTEC)

コメの収量増加の方法の一つに出穂時期以降の窒素追肥があるが、これは収量を増加させる一方で、コメが硬くパサパサとした食感になることが知られている。その原因の一つとして米粒中の貯蔵タンパク質の増加がこれまでに指摘されてきたが、我々の先行研究において、追肥の影響として細胞壁などの多糖類合成に関わる遺伝子群の発現が低下することを新たに見出した。実際、完熟種子胚乳のβ－グルカン量は、追肥群で対照群と比べて有意に減少しており、炭素骨格が多糖類よりもタンパク質の方に割り振られることが示唆された。ここで、多糖類/タンパク質合成のバランスを調節する鍵因子として、生体内の代謝制御に重要な役割をもつトレハロース 6-リン酸(T6P)と、T6P によりその活性が制御され糖代謝の制御に関わるセリン・スレオニンキナーゼ SnRK1b に着目した。
[方法]　日本晴をインキュベーター内で栽培して実験材料とした。出穂開花した時点で追肥群のみに塩化アンモニウムを土面散布し、開花後 7,10,15,20 日目の登熟途上の種子を採取した。開花後 15 日目の種子から RNA を抽出し、DNA マイクロアレイに供した。また、開花後 7,10,15,20 日目の種子を用いて、LC-MS による T6P 量の測定を行った。さらに、RNAi によって *SnRK1b* をノックダウンしたカルスを作製し、RNA-seq により下流遺伝子の発現変動解析を試みた。
[結果]　トレハロース合成に関係する遺伝子群の中で、T6P 合成酵素 4 種、T6P 脱リン酸化酵素 3 種の発現が追肥群で変動しており、T6P 量が追肥により変動している可能性が示された。
そこで更に LC-MS により T6P の定量を行った結果、追肥群の登熟種子は対照群に対して T6P 量が高い傾向にあることがわかった。

rice, trehalose 6-phosphate, SnRK1

講演番号：2A01a07
講演日時：3 月 26 日 10:46～ センター2 号館 A01 会場

コンブ部位によるアルギン酸含有量とタンパク質含有量の変動
Variations of alginate and protein concentration by kelp site
○平賀 捷悟[1]、山田 将也[2]、関 憧平[3]、四ツ倉 典滋[4]、垣田 浩孝[1,2] ([1]日大院総合基、[2]日大文理、[3]北大院環境科学院、[4]北方生物圏フィールド科学センター)
○ Shogo HIRAGA[1], Masaya YAMADA[2], Shohei SEKI[3], Norishige YOTSUKURA[4], Hirotaka KAKITA[1,2] ([1]Graduate School of Integrated Basic Sciences,Nihon Univ., [2]College of Humanities and Sciences,Nihon Univ., [3]Graduate School of Environmental Science,Hokkaido Univ., [4]Field Science Center for Northern Biosphere)

＜緒言＞近年、海藻由来の有用成分の研究が進み、身の回りにある食品、医療品、工業品に利用されている。その有用成分の 1 つであるアルギン酸は、コンブ属(*Saccharina*)やワカメ属(*Undaria*)などの褐藻類に多く含まれる細胞間酸性多糖で、2 種類のウロン酸(β－D－マンヌロン酸(以下Mと略)とα－L－グルロン酸(以下Ｇと略))が 1，4 結合で重合した直鎖状ポリマーである。また、アルギン酸は 2 価の金属イオンと反応しゲルを作る性質がある。アルギン酸ゲルの物性はMとＧの組成比(M/Ｇ比)に影響される。M/Ｇ比の低い(M/Ｇ＜1)アルギン酸は硬くもろいアルギン酸ゲルを作るため医療用包埋剤等に利用され、M/Ｇ比の高い(M/Ｇ＞1)アルギン酸ゲルは柔らかくしなやかなアルギン酸ゲルを作るため歯科印象剤等に利用されている。つまり、用途に適したM/Ｇ比のアルギン酸を得る技術は産業的に非常に有用であることが分かる。しかし、いまだにその技術は完成されていない。アルギン酸の生合成経路や関連する酵素に関しては微生物では詳細まで解明されているが、海藻では不明な点が多い。そこで本研究ではコンブの付着器から先端部分までの断片中のアルギン酸含有量、M／Ｇ比、アルギン酸の分子量、タンパク質含有量、タンパク質の分子量を明らかにし、これらを関連づけることを目的とした。＜材料・方法＞北海道厚岸で採取した褐藻類大型海藻ナガコンブを用いた。ナガコンブを付着器から先端にかけて 1 m間隔で切断し、更に縦に 2 つに切断し、断片を得た。一方のコンブ断片を洗浄後、アルカリ溶液中で振とうし、アルギン酸ナトリウムとして粗アルギン酸を回収した。粗アルギン酸をエタノールで再沈殿して精製アルギン酸を得た。精製アルギンを濃硫酸で加水分解後、中和してアルギン酸加水分解物を得た。また、ウロン酸はカルバゾール硫酸法を用いて定量した。加水分解物中のウロン酸組成は、Whatman Partisil 10 SAX を用いたＨＰＬＣによって測定した。ウロン酸はトリエチルアミン添加によりラクトン環を開環させた状態でＨＰＬＣを行った。もう一方のコンブ断片を洗浄後、凍結乾燥ののち粉砕し、タンパク質をバッファーにより抽出し、遠心分離で上清を分取して抽出サンプルを得た。抽出サンプルを、ブラッドフォード法により、タンパク質濃度を測定し、タンパク質含有量を算出した。また、抽出サンプルを、SDS-PAGE によって分子量を測定した。＜結果・考察＞アルギン酸含有率は、生育１年目、1.5 年目、2 年目のナガコンブにおいて付着器から先端にかけて 2 度減少するという結果が見られた。また、M／Ｇ比において生育１年目、1.5 年目、2 年目のナガコンブについて先端部分の方が低い傾向にあった。これらの結果と、タンパク質の関連性については現在調査中である。

Seaweed, Alginic acid, Uronic acid

発表責任者：垣田浩孝（Kakita.hirotaka@nihon-u.ac.jp）

講演番号：2A01a08
講演日時：3 月 26 日 10:57～ センター2 号館 A01 会場

^{1}H NMR によるグルカン類の非破壊絶対定量方法の検討

Nondestructive absolute quantification of glucans by ^{1}H NMR

○加藤 毅、山本 佳奈、水越 一史、五十嵐 友二（（一財）日本食品分析センター）
○Tsuyoshi KATO, Kana YAMAMOTO, Kazushi MIZUKOSHI, Tomoji IGARASHI (Japan Food Research Laboratories)

食品には結合様式や分子量の異なる様々なグルカン類が目的に応じて使用されている。既存のグルカン類の定量法は，酵素もしくは酸による加水分解によって，遊離するブドウ糖を定量する方法が用いられており，総グルカンならびにαおよびβ-グルカン含量を求めることができるが，結合様式レベルの個別定量は困難である。NMR はグルカン類の構造決定法として多くの報告があり，結合様式の識別を得意とするものの，これを用いた定量報告は殆ど無い。国内では 2008 年に，qNMR と呼ばれる精確定量を可能とする測定手法が開発され，低分子の有機化合物の純度決定法として定着しつつある。しかしながら，本法についての高分子化合物であるグルカン類への適用報告は無い。今回我々は，α-グルカン類（デキストリン，デキストランおよびプルラン），ならびにβ-グルカン類（リケナン，プスツラン，シゾフィラン，大麦由来およびパン酵母由来β-グルカン）等を用いて qNMR による定量条件を検討した。

グルカン類の NMR 測定には重水に溶解する方法が多く用いられているが，一部のβ-グルカンは溶解しないことから，本研究では重水素化ジメチルスルホキシドに溶解して，磁場共鳴周波数 500 MHz の NMR 装置によりスペクトルを測定した。^{13}C，COSY，TOCSY および HSQC を用いて各グルカンの ^{1}H の化学シフトを帰属した。グルカン類の主要な結合様式である(1→4)-α，(1→6)-α，(1→3)-β，(1→4)-βおよび(1→6)-β-結合におけるアノメリックプロトンは，それぞれδ5.1，4.8，4.6，4.4 および 4.3 ppm に分かれて観察されたため，これを用いて各結合様式毎にグルカンの定量を行った。qNMR では精確な定量を実現するために DSS-d_6 認証標準物質を内部基準として用い，パルス間隔を z 磁化が 99%以上回復する時間（緩和時間 T_1 の 5 倍以上）に設定して ^{1}H NMR スペクトルを測定した。アノメリックプロトンと DSS-d_6 のシグナル面積を用いてアンヒドログルコース含量（%）を計算してグルカン量とした。各結合様式とも 1～5 mg/mL の試料濃度において定量値の直線性を認めた。また，市販の大麦由来もしくはパン酵母由来β-グルカン標準品等の含量測定において，得られた定量値には理論値に対して 99.5～100.6%の良好な一致性が認められた。^{1}H の qNMR はグルカン類における結合様式の個別定量法として有効であると考えられ，さらなる検証試験を継続して行う予定である。

Glucan, qNMR, Nondestructive

発表責任者：加藤毅（katout@jfrl.or.jp）

講演番号：2A01a09
講演日時：3 月 26 日 11:08～ センター2 号館 A01 会場

血糖値が高めの成人における塩糀の空腹時血糖低減効果

Fasting Blood Glucose-lowering Effects of Salted Rice Koji (Shiokoji) in Mildly Hyperglycemic Adults

○北川 学[1]、中村 彩乃[1]、山本 哲郎[2]、近藤 澄夫[3] ([1]マルコメ、[2]TTC、[3]医療法人健昌会福島健康管理センター)
○MANABU KITAGAWA[1], AYANO NAKAMURA[1], TETSURO YAMAMOTO[2], SUMIO KONDOU[3] ([1]Marukome Co., Ltd, [2]TTC Co., Ltd, [3]Fukushima Healthcare Center, Kenshokai Medical Corporation)

【背景・目的】米糀は、蒸した白米の表面に *Aspergillus oryzae* を発育させた食品である。米糀は日本酒、味噌、甘酒、食酢などの我が国の伝統発酵食品の製造に不可欠な食品素材として古くから利用されてきた。近年、米糀および関連食品の保健機能に関する検討が進められている。米糀に食塩を添加した食品は塩糀と呼ばれ、国内では調味料として広く利用されている。我々は、これまで健常成人を対象として健康に及ぼす塩糀の有益な効果について探索的研究を行ってきた。その結果、適量の塩糀を血糖値が高めの成人に摂取させた場合、空腹時血糖（FBG）が低下することを見出した（未発表）。この知見を確認するために、探索的研究におけるのと同一用量の塩糀を試験食品とし、高めの FBG、すなわち正常高値または境界域に該当する FBG をもつ健常成人を被験者とする無作為化二重盲検プラセボ対照平行群間比較試験を実施した。
【方法】空腹時血糖値が高め（100～125mg/dL）の男女を対象とし、塩糀の空腹時血糖抑制に対する効果を検討するため、無作為化二重盲検プラセボ対照平行群間比較試験を実施した。試験食品は、1 日に 1 袋（塩糀またはプラセボ食品 15g）を 12 週間摂取させた。塩糀 1 日量に含まれる麹菌の乾燥菌体量は 20mg であった。プラセボ食品は麹菌非含有食品を用いた。主要評価項目は FBG とし、副次評価項目を HOMA-IR、HbA1c とした。
【結果】47 名を解析対象者とし、有効性解析を行った。その結果、一次解析における塩糀群およびプラセボ群の FBG、HOMA-IR および HbA1c の各測定値について、両群間で有意な差は認められなかった。次に生活習慣の変動による血糖への影響を排除した二次解析を行った。二次解析の対象者は塩糀群 16 名およびプラセボ群 14 名であった。その結果、4 週目の FBG で塩糀群は改善傾向（p=0.089）を示した。これと対照的にプラセボ群における FBG は上昇傾向にあり、4 週目では上昇傾向（p=0.083）、12 週目では有意な上昇（p=0.003）を示した。FBG のベースラインからの変化量を両群間で比較した結果、塩糀群における低下、プラセボ群で上昇という対照的な変化が示され、その群間差が 4 週目では有意に差が認められ(p=0.020)、12 週目においても有意傾向が認められた（p=0.082）。二次解析における HOMA-IR および HbA1c に対する塩糀摂取による有意な変化は摂取期間中いずれの群にも認められなかった。
本研究条件下では塩糀の安全性に問題はなかった。
【結論】FBG が高めの健常成人を対象としたヒト試験の成績から、塩糀 15g/日の摂取は FBG レベルを低下させる効果をもつ可能性が示された。塩糀の安全性が高いことも確認された。これらの結果に基づいて、塩糀が糖尿病予備群とされる成人のリスク軽減に有用な食品であることが示唆された。

Salted rice koji (Shiokoji), Fasting blood glucose, Hyperglycemia

講演番号：2A01a10
講演日時：3 月 26 日 11:19～ センター2 号館 A01 会場

タンパク質欠乏による VLDL 受容体の発現変動及びその脂肪肝への影響
Effect of protein deficiency on VLDL receptor expression and its roles in fatty liver development
○大塩 優衣[1]、服部 裕太[2]、竹中 麻子[2] ([1]明大院農、[2]明大農)
○Yui OSHIO[1], Yuta HATTORI[2], Asako TAKENAKA[2] ([1]Meiji University Graduate., [2]Meiji Univ.)

【背景・目的】タンパク質欠乏は脂肪肝を引き起こすことが古くから知られているが、この脂肪肝発症には複数の機構が関与すると考えられる。我々は、タンパク質欠乏ラット肝臓において Very low density lipoprotein receptor (VLDLR) mRNA 発現量が顕著に増加することを見出した。VLDLR はリポタンパク質 VLDL を細胞に取り込む受容体である。脂質代謝が活発な心筋、骨格筋、脂肪組織に高発現し、近年は肝臓で発現する VLDLR の増加が小胞体ストレスによる脂肪肝を引き起こすことが報告されている。そこで本研究では、タンパク質欠乏が VLDLR に及ぼす影響を詳細に解析するとともに、VLDLR 発現増加がタンパク質欠乏による脂肪肝に寄与する可能性を検討した。

【方法】VLDLR 遺伝子欠損マウス（B6;129S7-Vldlr<tm1Her>/L, The Jackson Laboratory）を B57BL/6J マウスと交配し、WT (*vldlr*+/+) と KO (*vldlr*-/-) マウスを得て実験に使用した。5 週齢雄性の WT および KO マウスに、カゼインを 20%含む対照食（20C）あるいは 3%含む低タンパク質食（3C）を 11 日間給餌した。解剖により血漿および臓器を採取し、肝臓・血漿の脂質、肝臓・心筋・腓腹筋・精巣上体脂肪の VLDLR mRNA 量および VLDLR 量、血中肝障害マーカー（AST, ALT）を測定した。

【結果・考察】WT, KO いずれのマウスにおいても 3C 群で 20C 群より体重増加が小さく、タンパク質欠乏の影響を確認した。VLDLR mRNA は KO マウスでは検出されず、WT マウスでは、3C 摂取により肝臓で約 8.1 倍、心筋で約 1.3 倍に増加し、腓腹筋と精巣上体脂肪には有意な変化が見られなかった。タンパク質欠乏による VLDLR 遺伝子発現の顕著な増加は肝臓特異的な現象であることが示された。VLDLR 量は心筋では 3C 摂取による増加がみられず、肝臓ではウェスタンブロットによる検出ができなかった。3C 摂取により肝臓の脂質濃度が有意に増加したが、VLDLR 欠損による変化は見られなかった。したがって、タンパク質欠乏による脂肪肝は、肝臓 VLDLR による脂質取り込み増加が原因で生じるものではないことが示された。血中 AST 濃度は WT では 3C 摂取の影響がなかったが、KO では 3C 摂取により増加した。VLDLR がタンパク質欠乏による肝炎症および肝障害を抑制する可能性が考えられた。

【結論】タンパク質欠乏により VLDLR 遺伝子発現が肝臓特異的に顕著に増加することを明らかにした。しかし、肝臓の VLDLR 量は他の臓器に比べると少なく、VLDLR による脂質取り込みはタンパク質欠乏による脂肪肝の主要因ではないことが示された。

VLDLR, protein malnutrition, fatty liver

講演番号：2A01a11
講演日時：3 月 26 日 11:40～ センター2 号館 A01 会場

ヨメガカサガイの生殖線から見いだされた末端二重結合を有する新規トリエン酸群の構造

A series of novel non-methylene-interrupted trienoic acids with a terminal double bond in ovaries of the limpet *Cellana toreuma*

○川島 英城（岩手県立大・宮古短大部）
○Hideki Kawashima (Miyako College, Iwate Prefectural University)

【目的】これまでに、ベッコウカサガイ（*Cellana grata*）や ヨメガカサガイ（*Cellana toreuma*）の生殖腺から、新規非メチレン中断型脂肪酸（二重結合間にメチレン基を 2 個以上挟む non-methylene-interrupted fatty acid, NMI FA）群の多様な構造や分布特性を明らかにしてきた[1-4]。最近、*C. grata* の 23:2Δ9,20 がヒト急性前骨髄性白血病細胞 HL60 に対する細胞毒性や glycogen synthase kinase-3β に対する阻害活性を有すること, さらにその構造アナログの一つ 18:2Δ4,15 がラット肝癌由来 H4IIE 細胞における糖新生の抑制作用を示した[5]。一方、*C. toreuma* の 17:2Δ12,16 及び 19:2Δ14,18（bis-methylene-interrupted FA）は Mg^{2+}/Mn^{2+}-dependent protein phosphatase M1A の活性化作用を示した[6]。本研究では、引き続き未同定の希少 NMI FA の構造解析を行った結果、*C. toreuma* の生殖腺から末端二重結合を有する新規トリエン酸群を見いだしたので、その構造並びに推定される生合成経路について考察した。

【方法】前報に従い[1]、2016 年 8 月に採取した三陸沿岸産 *C. toreuma* の生殖腺から全脂質を抽出後、分取用 TLC を用いてトリアシルグリセロール（TAG）と極性脂質（主にホスファチジルコリン及びホスファジルエタノールアミンを含む）にそれぞれ分画した。これらの画分を methyl ester 誘導体に調製後、不飽和度に応じて 5%硝酸銀 TLC で不飽和脂肪酸 methyl ester の分取を行い、標的とするトリエン酸画分を得た。さらに、二重結合の位置を決定するために、得られた当該画分の methyl ester を 3-pyridylcarbinol ester 誘導体に直接変換し、EI-MS（70 eV）によりこれらの構造解析を行った。

【結果】*C. toreuma* の生殖腺から、末端二重結合を有する 4 種類の奇数鎖トリエン酸を同定した。これらは、5,9,18-nonadecatrienoic acid (19:3Δ5,9,18), 5,9,20-heneicosatrienoic acid (21:3Δ5,9,20), 7,13,20-heneicosatrienoic acid (21:3Δ7,13,20), 及び 5,9,22-tricosatrienoic acid (23:3Δ5,9,22)で、生殖腺の極性脂質の構成脂肪酸として認められた。既に、*C. toreuma* の生殖腺には末端二重結合を有する多様な奇数鎖ジエン酸群の存在が確認されていることから[3, 4]、これらジエン酸はさらに一連の不飽和化（Δ5 あるいはΔ9）あるいは C2 ユニット伸長化プロセスを経ることによって、今回同定されたトリエン酸の生合成に至ったと推定している。

引用文献

1) Lipids **47**, 827 (2012), 2) Lipids **51**, 257 (2016), 3) Lipids **52**, 375 (2017), 4) Lipids **53**, 841 (2018), 5) Lipids **52**, 295 (2017), 6) Mar Drugs **17**, 410 (2019)

non-methylene-interrupted fatty acid, a terminal olefin, Cellana toreuma

発表責任者：川島英城（ajoe@iwate-pu.ac.jp）

講演番号：2A01a12
講演日時：3 月 26 日 11:51～ センター2 号館 A01 会場

トリアシルグリセロールヒドロペルオキシドの吸収代謝の評価：ナトリウムを用いた LC-MS/MS 分析を通じて
Evaluation of absorption and metabolism of triacylglycerol hydroperoxide via LC-MS/MS analysis using sodium

○高橋 巧[1]、加藤 俊治[1,2]、伊藤 隼哉[1]、境野 眞善[2]、佐野 貴士[2]、今義 潤[2]、池田 郁男[3]、仲川 清隆[1,2] ([1]東北大院農・機能分子解析学、[2]東北大院農・J-オイルミルズ油脂イノベーション共同研究講座、[3]東北大・未来科学技術共同研究センター)
○Takumi TAKAHASHI[1], Shunji KATO[1,2], Junya ITO[1], Masayoshi SAKAINO[2], Takashi SANO[2], Jun IMAGI[2], Ikuo IKEDA[3], Kiyotaka NAKAGAWA[1,2] ([1]Food and Biodynamic Chemistry Laboratory, Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., [2]J-Oil Mills Innovation Laboratory, Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., [3]New Industry Creation Hatchery Center (NICHe), Tohoku Univ.)

【緒言】食品に含まれる脂質の大部分はトリアシルグリセロール（TG）であり、TG が酸化されると、酸化一次生成物であるトリアシルグリセロールヒドロペルオキシド（TGOOH）を生じる。近年我々は、LC-MS/MS 分析時にナトリウムを用いることで、fmol レベルでの高水準な TGOOH の分析を可能とした。加えて、本法を用いて、未開封の市販食用油脂中にも TGOOH が微量に含まれていることを明らかにした。故に、我々は食用油脂をはじめとする様々な食品を介して、少ないながらも TGOOH を日常的に摂取していると推察される。したがって TGOOH の吸収代謝に興味が持たれるが、従来は分析手法の感度等に課題があり、過剰な TGOOH 投与による研究が多い。こうした研究においては、TGOOH は吸収の過程で大部分が分解・還元され、そのままの形では吸収されないと言われている。そこで本研究では、近年我々が構築した新規 TGOOH 分析法を用い、日常的に摂取し得るごく微量の TGOOH が生体内でどのように吸収代謝されるか、定性的かつ定量的な面から明らかにしようとした。

【方法・結果】市販試薬のトリオレオイルグリセロール（OOO）に、タウロコール酸ナトリウムとアルブミンを含む水溶液を加え、超音波処理し、エマルションを調製した。このエマルション中には、OOO ヒドロペルオキシド（OOO-OOH）の異性体（OO-8-hydroperoxy octadecamonoenoyl（HpOME）、OO-9-HpOME、OO-10-HpOME、OO-11-HpOME）が ppm オーダーで含まれることを確認した。調製したエマルションを、胸管リンパカニュレーション手術を施したラットの胃内に投与し、胸管から経時的にリンパ液を全量回収した。回収したリンパ液を、ナトリウムを用いた LC-MS/MS で分析した。その結果、エマルション投与前のリンパ液中ではいずれの OOO-OOH 異性体も検出されなかった一方で、エマルション投与後のリンパ液からは OOO-OOH 異性体が明瞭に検出された。したがって、投与した TGOOH の一部が代謝を受けずにリンパ液へと吸収・移行された可能性が推察された。そこで、本仮説を更に検証するために TGOOH の定量分析が必要と考え、投与エマルション及びリンパ液からの OOO-OOH 抽出法の改良に取り組んだ。その結果、全ての OOO-OOH 異性体で 80%以上の高回収率を達成した。本法を用いることで TGOOH の高水準な定量分析が可能となったため、現在、カニュレーション手術及び分析の再実施を進めている。

【参考文献】Kato, S. *et al.*, *npj Science of Food,* 2 (2018)

Triacylglycerol hydroperoxide, LC-MS/MS, Absorption and metabolism

発表責任者：仲川清隆（kiyotaka.nakagawa.c1@tohoku.ac.jp）

講演番号：2A01a13
講演日時：3 月 26 日 12:02～ センター2 号館 A01 会場

米由来グルコシルセラミドの腸管モデル細胞系への炎症刺激に与える影響と in vitro 消化法を用いた米の調理条件の違いによる生体利用性の変化

Effects of rice glucosylceramide on inflammatory stress in the intestinal tract model cells and bioavailability in various cooking conditions of rice with an in vitro digesting method

○曽我 みちる、田中 駿、山下 慎司、木下 幹朗（帯畜大）
○Michiru SOGA, Syun TANAKA, Shinji YAMASHITA, Mikio KINOSHITA (Obihiro Univ.)

研究背景）植物の主要なスフィンゴ脂質であるグルコシルセラミド（GlcCer）は、植物細胞膜の構成成分である。その骨格成分であるスフィンゴイド塩基は植物種により異なり、塩基構造の違いにより多様な分子種を示す[1)]。精製された GlcCer は皮膚バリア改善や、腸管炎症の改善効果等の食品機能性が報告されているが、食事により摂取される GlcCer の機能性については不明な点が多い。当研究室では、日本人の主食である米に着目し、米の脂溶性画分は、大腸腺腫モデルマウスの大腸異常陰窩巣（ACF）の形成抑制効果を持ち[2)]、また米のエタノール抽出物と比較して炊飯米摂取では生体利用性が低いことを報告した。したがって本研究では、米由来 GlcCer に着目し、まず米を含む異なる植物種由来の GlcCer における腸管炎症緩和作用の差異について腸管モデル細胞系を用いて検討した。次に、炊飯米の凍結乾燥物を溶媒分画によって脂質画分に分け、画分ごとの腸管炎症緩和作用について検討した。また、*in vitro* 人工消化法を用いて調理条件による生体利用性の差異について検討した。
方法）米、ダイズ、コムギ由来の精製 GlcCer を長良サイエンスから購入した。また、炊飯米の凍結乾燥物をエタノール抽出した群（エタノール抽出群）から Folch 法により総脂質画分を分配し、溶媒分画によりアセトン可溶画分（中性脂質画分）とアセトン不溶画分（極性脂質画分）に調製した。腸管炎症緩和作用の検討は、3 週間コンフルエント状態で培養した分化型 Caco-2 細胞を腸管モデル細胞として使用した[3)]。 炎症刺激として lipopolysaccharide(LPS)[50 μg/mL]を用いた。炊飯米の人工消化は通常炊飯群と粥群を用い、人工消化処理後、遠心分離によって上清と残渣に分けてそれぞれの脂質（特に GlcCer）の分析を行った。
結果及び考察）腸管炎症緩和作用の検討において由来の異なる GlcCer の添加は全て細胞数減少抑制作用を示し、また塩基構造の違いによる機能に有意な差は見られなかった。米の総脂質画分と極性脂質画分の添加は LPS による細胞数減少を有意に抑制した。エタノール抽出群、中性脂質画分の添加は細胞数減少抑制効果が見られなかった。したがって、米由来脂溶性画分のうち、GlcCer を含む極性脂質画分が腸管炎症の緩和作用を有する可能性を示した。また *in vitro* 人工消化試験により、GlcCer 含量は通常炊飯米の消化上清と比較して、粥の消化上清において高い傾向が見られた。
[1]大西ら、日本油化学会誌 46(10) (1996), [2]Yamashita et al, J Oleo Sci 68(5) (2019)
[3]Yamashita et al, J Oleo Sci 66(12) (2017)

Sphingo lipid, Rice, Inflammation

講演番号：2A01p01
講演日時：3 月 26 日 13:50～ センター2 号館 A01 会場

黄花フリージアの黄色色素の同定とその抗酸化活性の検討

Identification of a yellow pigment of yellow petal-freesia and evaluation of its antioxidant activities.

○下出 早貴[1]、清河 文子[2]、小牧 正子[2]、三沢 典彦[3]、新藤 一敏[1]([1]日女大・家政・食物、[2]石川県農総研、[3]石川県大・生資研)
○Saki SHIMODE[1], Fumiko KIYOKAWA[2], Masako KOMAKI[2], Norihiko MISAWA[3], Kazutoshi SHINDO[1] ([1]Japan Women’s Univ., [2]Ishikawa.Agr.For.Res.Cent., [3]Ishikawa Pref. Univ.)

【目的】カロテノイドは C5 のイソプレン構造を基本とする長鎖の化合物で、多くは C40 の脂溶性色素である。一方、食品産業上重要なサフランやクチナシ色素は、C20 の crocetin や crocin（crocetin の両端が 2 分子ずつの D-glucose でエステル化したもの）といった水溶性のカロテノイド（アポカロテノイド）からなる。「エアリーフローラ」は石川県オリジナル品種のフリージアである。多彩な花色が特長であり、現在流通する 10 品種はそれぞれに異なる個性的な花色を示す。淡紫色をはじめ赤色、橙色、黄色、白色など様々な花色の品種が揃う。今回、黄花品種である‘石川 f2 号’の黄色色素の同定を試みた。さらに、その色素の抗酸化活性（一重項酸素消去活性）の検討も行った。
【方法】温室にて促成栽培を行い、開花した‘石川 f2 号’から順次花弁を採取し、-80℃フリーザーにて冷凍した。この花弁（173.91 g）を 3 日間凍結乾燥させたものをミキサーで粉末とし、ここに CH_2Cl_2-MeOH (1:1), 100%MeOH, 80%MeOH をそれぞれ加えて順に黄色色素を溶媒抽出した。少量まで濃縮後、EtOAc/H_2O で二相分配した。黄色色素は水相に分配されたため、水相を半分量まで濃縮して EtOAc を除いた後 HP20 カラムに吸着させた。HP20 カラムは水と 50%MeOH で洗浄後、100%MeOH で黄色色素を溶出した。溶出物を濃縮乾固後、逆相（C30）の HPLC 分取（展開溶媒 : 30%CH_3CN+0.1%TFA）により黄色色素の純品を単離した（27.1 mg）。得られた純品について各種 NMR（^1H, ^{13}C, DQF COSY, HMBC, HMQC, NOESY）や HRESI-MS の測定を行った。次に、2N HCl を用いてアグリコンと糖に加水分解した。アグリコンと糖は EtOAc/H_2O の二相分配でそれぞれ精製した（EtOAc 相：アグリコン、水相：糖）アグリコンは各種 NMR 解析を行い、糖は旋光度及び ^1H NMR の測定を行った。最後に精製した色素及びそのアグリコンについて、メチレンブルー法を用いて一重項酸素消去活性を検討した。
【結果】‘石川 f2 号’花弁の黄色色素は、各種構造解析により、crocetin neapolitanosyl ester（crocetin の片側に 3 分子の D-glucose がエステル結合した水溶性アポカロテノイド）であることが初めて明らかとなった。なお、フリージアの花弁がアポカロテノイドを作ることは、これまで知られていなかった知見であり、crocetin neapolitanosyl ester を生産する植物の報告についても、これが初めてである。また、抗酸化試験の結果、本色素の一重項酸素消去活性の 50%阻害濃度は 75 μM であることが分かった（crocetin が同等の活性を示すことも確認された）。本研究は、‘石川 f2 号’等の黄色フリージアの黄色色素がサフランやクチナシと同様に、食品添加物、機能性食品、または医薬品原料として開発可能であることを示唆するものである。

freesia, crocetin, antioxidant activity

発表責任者：新藤一敏（kshindo@fc.jwu.ac.jp）

講演番号：2A01p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ センター2 号館 A01 会場

蝶豆および紫ヤムに含まれるアシル化アントシアニン色素の化学的研究

Chemical study on acylated antocyanin pigments in Clitoria Ternatea L. and purple yam

○本田 沙理、高橋 桜子、熊澤 茂則（静岡県大食品）
○Sari HONDA, Sakurako TAKAHASHI, Shigenori KUMAZAWA (Univ. of Shizuoka)

【研究の背景・目的】

アントシアニンはフラボノイド系の色素成分であり、花弁をはじめ果物や野菜など様々な植物素材に含まれている。古くから天然由来の食品色素として利用されてきたことから、熱や金属、pH による安定性に関する研究が数多く進められてきた。近年、アントシアニンの中でも、置換基に有機酸が結合したアシル化アントシアニンはアシル化されていないものより安定性が高いということも報告されている。しかし、アシル化アントシアニンは一般に分子量が大きく、構造が複雑なことからも、その化学的性質については未だ不明な点が多い。

チョウマメは東南アジア原産のマメ科植物で、鮮やかな青色花弁を持つことから、近年、青色色素として広く利用されている。チョウマメは分子量が 2000 近くある多アシル化アントシアニンのテルナチン類を多く含み、デルフィニジンを母骨格としたこれらのアシル化アントシアニンによって中性でも鮮やかな青色を示す。また、紫ヤムは東南アジアを中心に栽培されているヤム芋の一種で、芋全体が濃い赤紫色を呈することから、着色料として利用されている。紫ヤムにもシアニジンを母骨格とした様々な多アシル化アントシアニンが含まれているが、チョウマメを含めこれらのアシル化アントシアニンに関する研究は十分でない。

本研究では、チョウマメおよび紫ヤムに含まれる多様なアシル化アントシアニンを対象とし、その安定性や金属等との相互作用について解析を行うことで、アシル化アントシアニンの特性に科学的根拠を与えることを目的とした。

【方法と結果】

チョウマメ花弁および紫ヤム抽出物を用いて、pH2.5, 7.0 における熱安定性について試験した。安定性については、UV スペクトルパターンを測定することで、吸光度による変化と L*a*b*による色差を用いて評価した。また、HPLC を用いてチョウマメ花弁および紫ヤムに含まれる各アントシアニンを分析することで、構造的安定性についても評価した。

その結果、チョウマメ花弁、紫ヤム由来のアントシアニンは、pH2.5 の酸性下においていずれも高い安定性を示したが、pH7.0 のアルカリ性での安定性および金属等との相互作用についてはそれぞれ異なる挙動を示した。詳細については当日報告する。

acylated antocyanin, interaction, pigment

講演番号：2A01p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ センター2 号館 A01 会場

システインとフルフラールの強酸性下におけるメイラード反応により生成する色素化合物フルペンチアジネートの食品中での探索と生成経路の検討

Distribution and formation scheme of furpenthiazinate formed by the Maillard reaction between cysteine and furfural under strongly acidic conditions

○野田 響子[1]、岸本 真凜[1]、島村 裕子[2]、村田 容常[1] ([1]お茶大食物、[2]静岡県大食栄)
○ Kyoko NODA[1], Marin KISHIMOTO[1], Yuko SHIMAMURA[2], Masatsune MURATA[1] ([1]Ochanomizu Univ., [2]Univ. Shizuoka)

【背景・目的】 本研究室において、システインとフルフラールの強酸性下におけるメイラード反応生成物として、7-(2-フラニル)-2,3,5,6-テトラヒドロシクロペンタ[*b*][1,4]チアジン-3-カルボン酸 (フルペンチアジネート) を単離、構造決定した (1)。フルペンチアジネートはシクロペンタチアジン環を持つ新規な色素化合物であり、同様の骨格を持つメイラード反応生成物や、食品中の色素化合物の報告は他になく、生物活性は不明である。また、強酸性で生成することから、アミノ酸分析などで食品を酸加水分解する際に生成する可能性がある。フルペンチアジネートは 1 分子のシステインと、1 分子のフルフラール、フルフラール由来の 4 つの炭素からなると考えられるが、この 4 つの炭素が、フルフラールの C1-C4 および C2-C5 のどちら由来なのか、またどのように組み込まれたかは不明である。そこで本研究では、フルペンチアジネートの酸加水分解した食品中の探索、変異原性試験、生成経路検討を行った。
【方法】 食品の酸化水分解は、試料 1.0 g に 6 N 塩酸を 5 mL 加え、110℃で 24 時間加熱することで行った。フルペンチアジネートの定量は、ダイオードアレイ検出器 (DAD) 付きの HPLC を用いた。また、Ames 試験により変異原性を検討した。フルペンチアジネートの生成経路検討においては、システインと 1-および 5-^{13}C-リボースをそれぞれ 0.1%、2%となるように 2 N HCl (200 μL) に溶解し、110℃、1 時間加熱した反応溶液より、合成吸着樹脂 (ダイヤイオン HP20; 溶離液、水・MeOH 系)、ODS (溶離液、水・MeOH 系) を用いたクロマトグラフィーにより、フルペンチアジネートを精製した。フルペンチアジネートを MS、NMR に供し、^{13}C の挿入箇所を確認することで、生成経路を検討した。
【結果と考察】 酸加水分解した食品中での探索として、きな粉および小麦粉を酸加水分解して HPLC 分析したところ、きな粉の酸加水分解溶液中にフルペンチアジネートの生成を確認した。現在、他の豆類、穀類、アミノ酸液について、定量分析中である。Ames 試験の結果は陰性であったことから、フルペンチアジネートは変異原性を持たないことが示された。生成経路検討として、質量分析および ^{13}C-NMR スペクトル解析の結果、リボースの 1 位はフルペンチアジネートの 7a 位に、リボースの 5 位はフルペンチアジネートの 7 位および 5'位に挿入された。この結果より、リボースおよびフルフラールの誘導体とシステインの反応により、チアジン環を形成した後、リボースおよびフルフラールの C2-C5 由来の炭素鎖が付加し、フルペンチアジネートが生成すると推測した。

(1) *J. Agric. Food Chem.*, **66**, 11414-11421 (2018)

Maillard reaction, acid-hydrolysis, cysteine

講演番号：2A01p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ センター2 号館 A01 会場

チアミン由来の新規色素 pyrizepine の形成条件、精製方法及び生成経路

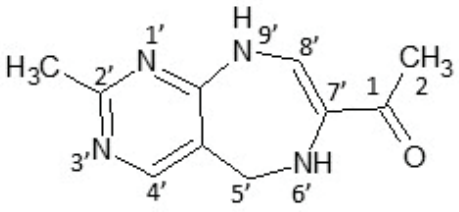
Formation condition, isolation method, and formation scheme of pyrizepine, a novel Maillard pigment derived from thiamine.

○来山 祥子、野田 響子、井越 明日香、村田 容常（お茶大院ライフ）
○Sachiko KITAYAMA, Kyoko NODA, Asuka IGOSHI, Masatsune MURATA (Ochanomizu Univ.)

【背景・目的】本研究室において、チアミンとグルコースのメイラード反応により生成する新規色素化合物、pyrizepine)を同定した[1)]。本物質の構造から pyrizepine はグルコースのメイラード反応中間体である 1-デオキシグルコソン（1-DG）から生じる炭素数 4 の誘導体とチアミンの加熱分解物である 4-Amino-5-aminomethyl-2-methylpyrimidine（AAMP）の脱水縮合により生成すると考えた。本研究では pyrizepine の形成条件及び効率的精製方法を確立した後、生成経路について検討した。

【方法】各反応液（30-240 mM チアミン、30-240 mM グルコース、30-240 mM リシンを 0.5 M リン酸緩衝液（pH 7.0）に溶解、120℃、4 時間加熱）を、DAD-HPLC（カラム、ODS；溶離液、MeOH・0.1%TFA 水溶液系 ； 検出、220-500 nm）で分析し、pyrizepine の形成条件を検討した。グルコースの代わりにエリトロース、キシロース、リボース、ガラクトース、フルクトース、アスコルビン酸を用いて pyrizepine の生成検討も行った。標品の調製には 120 mM チアミン、120 mM グルコース、30 mM リシンを 0.5 M リン酸緩衝液(pH7.0)に溶解後、120℃、4 時間加熱した反応液を用いた。反応液を pH10 に調整し、合成吸着樹脂ダイヤイオン HP20 に吸着させ、水洗後 0.1%塩酸で溶出させた。これを酢酸エチルで抽出後結晶化させ、pyrizepine 標品を得た。また、1-^{13}C 及び 6-^{13}C グルコースを用いて pyrizepine を生成し、LC/MS/MS、及び NMR 分析により、^{13}C の挿入箇所を特定した。

【結果】Pyrizepine は、チアミンとグルコース 120 mM、リシン 30 mM のときに最も多く生成した。また、5 炭糖からは生成せず 6 炭糖および 4 炭糖からのみ生成された。標識実験の結果、グルコースの 6 位の炭素は pyrizepine の 2 位及び 8’位に挿入され、グルコースの 1 位の炭素は pyrizepine に挿入されなかった。このことから、1-DG の 2 位と 3 位の間が hydrolytic β-dicarbonyl cleavage により開裂した C3-C6 由来の炭素 4 つからなる物質と AAMP が反応することで pyrizepine が生成することが示唆された。現在 AAMP の生成について検討中である。



Pyrizepine

1) 井越ら *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **82**, 1-8 (2018)

Maillard reaction, thiamine, pigment

講演番号：2A02a01
講演日時：3 月 26 日 09:30～ センター2 号館 A02 会場

コロナ検出器を用いた果汁および野菜汁の有機酸定量法の検討

Study of quantificative analysis of organic acid in fluit and vegetable juice by Corona CAD

○大城 沙織、箕川 剛、石橋 諒、東村 豊、西野 雅之（三栄源エフ・エフ・アイ株式会社）
○ Saori OHKI, Tsuyoshi MIKAWA, Ryo ISHIBASHI, Yutaka HIGASHIMURA, Masayuki NISHINO (San-Ei Gen F.F.I.,Inc.)

【背景および目的】

食品の色は、食品のおいしさを構成する重要な要素の一つである。そのため、着色を目的として果汁や野菜汁といった着色食品が広く使用されている。着色食品の品質を管理する上で風味は重要である。その風味を構成する多種類の有機酸は従来、UV 吸収が弱く、さらに逆相クロマトグラフィーでは保持が弱いため原料由来の糖やタンパク質といった夾雑成分との分離が難しかった。そこで、夾雑成分との分離を可能にするために、前処理およびクロマトグラフィーの条件を検討した結果、アニオン交換カートリッジによる前処理と、コロナ検出器を用いた検出で、UV 吸収が弱い有機酸成分を定量する方法を今回報告する。

【試料および方法】

1. 試料
   自社果汁製品（ぶどう）および野菜汁製品（赤ダイコン、紫イモ、紫にんじん)、有機酸試薬標準品（クエン酸、リンゴ酸、コハク酸、酒石酸)。
2. 前処理方法
   アニオン交換カートリッジ InertSep MA-1 をアンモニア水にてコンディショニング後、試料を添加、アンモニア水にて洗浄後、塩酸にて溶出し、濃縮乾固したものを水にて再溶解し、Ultimate 3000 HPLC を用いて分析した。
3. HPLC 条件
   カラム：InertSustain AQ-C18(2.1mm i.d.×150mm 3μm)。移動相: 0.1%TFA 水溶液/MeOH。流速:0.2mL/min。検出器：Corona Veo RS 荷電化粒子検出器。

【結果】

各種有機酸のピークと競合する、原料由来夾雑成分のピークを、アニオン交換カートリッジを用いた前処理によって除去でき、さらに十分な回収率を得た。これにより、クエン酸、リンゴ酸、コハク酸は荷電化粒子検出器を用いて一斉分析および定量が可能となった。これまで定量が難しかった UV 吸収が弱い有機酸の検出については、荷電化粒子検出器を用いることにより高感度での定量が可能となった。酒石酸の定量に向けては、酒石酸のピークと競合する妨害ピークが課題となっており、現在検討中である。

Corona CAD, organic acid, fluit and vegetable juice

講演番号：2A02a02
講演日時：3 月 26 日 09:41～ センター2 号館 A02 会場

IC-MS を用いた高極性農薬一斉分析法の検討

Study of simultaneous analysis fou highly polar pesticides by IC-MS

○高橋 洋武、佐野 勇気、橘田 規、照井 善光（日本食品検査）
○Hirotake TAKAHASHI, Yuki SANO, Tadashi KITTA, Yoshimitsu TERUI (JFIC)

【目的】

我が国における食品中の高極性農薬を対象とした公示試験法の多くに個別分析法が採用されている。これらはかなり昔に開発されたものであるため、発がん性のあるジクロロメタンやクロロホルム等を用いる、液液分配、誘導体化、オープンカラムクロマトグラフィー等の煩雑な前処理操作がある、多岐にわたる測定機器を揃えなければならないといった問題点がある。一方、欧州では、近年、上記問題点を克服した一斉分析法 QuPPe Method[1), 2)]が開発され注目を集めている。今回、QuPPe Method の前処理方法を参考に、イオンクロマトグラフー質量分析計（IC-MS）を用いた高極性農薬一斉分析法の検討を行ったので報告する。

【方法】

対象とした農薬は、グルホシネート、N-アセチルグリホサート、3-ヒドロキシメチルホスフィニコプロピオン酸（MPPA）、グリホサート、アミノメチルリン酸（AMPA）、ホセチル、亜リン酸、アセフェート、エテホンの計 9 種類であった。対象農薬のイオン性に着目し、分離は IC を採用した。通常、溶離液中の塩濃度が高い場合は検出器に MS を接続することは避けられるが、サプレッサーを用いることで塩濃度を低下させて MS で検出する方法を採用した。IC は ICS-6000、MS は Q Exactive Focus（いずれもサーモフィッシャーサイエンティフィック製）を用いた。分析カラムは IonPack AS 11HC-4μm, 2×250 mm、ガードカラムは、IonPack AG 11HC-4μm, 2×50 mm、サプレッサーは AERS500, 2 mm（いずれもサーモフィッシャーサイエンティフィック製）を用いた。移動相は陰イオン分析用水酸化カリウム溶離液ジェネレーターを用いて、塩濃度グラジエント分析を行った。

【結果および考察】

分析条件の検討結果、9 種類全ての農薬で検出が認められ、それぞれの農薬の検量線の直線性は、概ね 1 ng/mL から 10 ng/mL の間で決定係数 0.998 以上であった。本発表では、妥当性評価の結果及び市販食品についての分析結果を合わせて報告する予定である。

1) M. Anastassiades, et al, QuPPe-PO-Method, EURL-SRM.
2) M. Anastassiades, et al, QuPPe-AO-Method, EURL-SRM.

IC-MS, highly polar pesticides, simultaneous analysis

講演番号：2A02a03
講演日時：3 月 26 日 09:52～ センター2 号館 A02 会場

発酵食品およびキノコ栽培に用いるオプティカル pH センサーの開発

Development of an optical pH detection around fermented foods and mushroom cultivation

○中川 克彦[1]、田中 友隆[1]、早瀬 伸樹[1]、森永 弘志[2]、宮部 真司[2] ([1]新居浜高専、[2](株)大愛)
○Katsuhiko NAKAGAWA[1], Tomotaka TANAKA[1], Nobuki HAYASE[1], Hiroshi MORINAGA[2], Shinji MIYABE[2] ([1]Niihama NCT, [2]Daiai Co., Ltd.)

【目的】

我々の研究室では、植物の葉緑素などの天然色素であるポルフィリン類縁体をセンサ素子材として、環境測定、ヘルスケア用などに用いるオプティカルセンサ素子材の開発に取り組んできました。一方、本研究では、化学修飾したポリマーの簡便な合成を検討すると共に、化学修飾したポリマーへ機能性色素として種々の置換基を有するカチオン性テトラフェニルポルフィリン誘導体($CTPPH_2$)をイオン結合法により導入したセンサ素子材を作製し、ヨーグルト製造において乳酸菌増殖度やヨーグルト種菌・シイタケ菌子体の培養などを評価するためのオプティカルセンサ素子材の開発を目指しています。そこで、スルホン化ポリスチレンに導入したセンサ素子の光物性に及ぼす、スルホン化の導入率、スルホン化ポリスチレンの表面形態、$CTPPH_2$ の置換基効果などについて、ポルフィリン、ポリマーの DFT 計算などを用いて解析した結果と比較検討すると共に、本センサーの食品発酵などへの応用についても検討したので報告する。

【方法及び結果】

センサ素子材として、5,10,15,20-tetra(4-pyridyl) porphyrin (**TPyP, 1a**)、5,10,15,20-tetra(N-methyl-4-pyridyl) porphyrin (**TMPyP, 1b**)、5,10,15,20-tetra(4-trimethylammoniophenyl) porphyrin(**TMAP**, **1c**)の塩を合成し、水溶性ポルフィリンの酸ー塩基平衡反応の可逆性について UV スペクトル、蛍光スペクトルにより追試した。 センサ素子材は、種々のスルフォン化率を有するポリスチレン(PSt)製プレート(PSt-SF)をマイルドな条件で合成し、それらのスルフォン化率は、FT-IR-ATR, XPS, 滴定法などにより測定した。$CTPPH_2$ をポリマーへの導入法は、**1a, 1b** , **1c** の水溶液に PSt-SF を浸漬する簡便な合成法について検討した。作製したセンサ素子材の pH-応答評価は、目視、UV および蛍光スペクトルにより行った。フリーベース・ポルフィリン、ポルフィリン・テトラカチオン体およびヘキサカチオン体の構造最適化を行い、Homo, Lumo 等について実験結果と比較検討した。　ポリスチレンのスルフォン化は、濃硫酸を用い、37 度で反応時間が 30 分以上では水との接触角が一定となる事が示唆された。一方、ポリマーへの $CTPPH_2$ の導入量は、スルフォン化時間が 60 分を超過すると **1c** のみが増加する興味深い結果が得られた。センサーとして、pH 応答感度は、**1c** > **1b** > **1a** の順に低下し、ポルフィリン環へ導入した置換基の立体障害の効果によることが示唆された。さらに、本センサーによる市販ヨーグルト分析を行うと、**1b** が最も高感度であることを見出したので報告する。

Optical pH sensor, Fermented foods, Mushroom cultivation

発表責任者：中川克彦（nakagawa@chem.niihama-nct.ac.jp）

講演番号：2A02a04
講演日時：3 月 26 日 10:03～ センター2 号館 A02 会場

ビール泡層の性状がヘルムホルツ共鳴に及ぼす影響
Effects of morphological and interfacial properties on Helmholtz resonant frequency for beer foam
○犬飼 一貴[1]、磯江 晃[2]、乾 隆子[2]、勝野 那嘉子[1]、西津 貴久[1] ([1]岐阜大・応生、[2]サントリービール(株))
○Kazutaka INUKAI[1], Akira ISOE[2], Takako INUI[2], Nakako KATSUNO[1], Takahisa NISHIZU[1] ([1]Gifu Univ., [2]Suntory Beer Ltd.)

【目的】
ビールの泡には炭酸抜けの防止効果や喫飲時の口当たりの感覚による嗜好効果があるとされ,泡品質はビール品質での重要な因子である. ビールの泡は迅速に合一,消滅していくため,ロスマイルス法など従来の泡質評価法においては評価が困難であった.当研究室ではヘルムホルツ共鳴と呼ばれる音響共鳴現象を利用した新規の泡評価法について検討してきた.本研究では,共鳴周波数から算出されたポリトロープ指数と泡量・気泡径分布測定との関係を明らかにするとともに,さらに界面成分がポリトロープ指数に及ぼす影響について検証した.また本法により,実際にグラスに注いだ系での測定を検証した.
【実験方法】
泡持ちの異なる 2 種類の市販ビール系製品を試料とした. 340ml グラスに高さ 13cm になるようにビール液を静かに注ぎ,その上に超音波振動により生成した高さ 5cm の泡を載せた.泡が消失するまでのヘルムホルツ共鳴周波数を測定し,周波数からポリトロープ指数を算出した.動的フォームアナライザー（KRÜSS 製, DFA100）を用い,ビール液上に生成した高さ 5cm の泡が消失するまでの総泡体積,泡数,泡径の各分布の経時変化を測定した.またビール中の界面成分の一つである β-グルカンを添加したビール試料を用いて同様の測定を行った.
【結果・考察】
DFA ではYoung-Laplace の式を用いて泡径と泡数のヒストグラムデータより,共鳴時の音響的エネルギー損失量を算出した.泡持ちの良いビールの方が泡層の気泡総体積は大きく,特に泡径が小さいものが多く含まれていた.またヘルムホルツ共鳴では,泡作成直後の共鳴周波数が最も小さく,その後,周波数は経時的に増加し,やがて一定に収束した.泡持ちの良いビールは泡作成直後の共鳴周波数は小さく,周波数が一定に収束するまでに要する時間も長くなることが確認された. β-グルカン添加試料は泡作成時の共鳴周波数は純水添加区より小さくなり,周波数が一定に収束するまでの時間も増加した.これは,界面成分の添加により気泡の界面成分濃度が増加したことで,エネルギー損失が大きくなり,共鳴周波数が小さくなったと推察される.以上の結果から,ヘルムホルツ共鳴を利用した評価法は泡質の違いや経時変化を喫飲時の系でとらえることができる方法であると考える.

beer foam, Helmholtz resonant, β - Glucan

発表責任者：西津貴久（nishizu@gifu-u.ac.jp）

講演番号：2A02a05
講演日時：3 月 26 日 10:14～ センター2 号館 A02 会場

大麦若葉エキスがヒト大腸細菌叢に与える効果についての検討

Investigation of effects of young barley extract in a human colonic microbiota

○佐々木 建吾[1]、佐々木 大介[1]、門脇 靖司[2]、青塚 康幸[2]、近藤 昭彦[1] ([1]神戸大院・科技イノベ、[2]日本薬品開発)
○Kengo SASAKI[1], Daisuke SASAKI[1], Yasushi KADOWAKI[2], Yasuyuki Aotsuka[2], Akihiko Kondo[1] ([1]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [2]JPD Co. Ltd.)

【背景と目的】大麦（*Hordeum vulgare* L.）の若葉を搾ったエキスは青汁として知られており、抗酸化物質をはじめミネラル・クロロフィルを含む機能性成分が含有されている。一方、ヒト腸内細菌叢が宿主の健康や疾病の発症に関係していることが知られている。しかし現在、大麦若葉エキスの摂取がヒト腸内細菌叢に与える効果は不明である。我々は健常人や疾患患者のヒト大腸細菌叢を網羅したフローラモデルを *in vitro* 系内に構築して、機能性食品成分等の投与が細菌叢や代謝プロファイルに与える効果をハイスループットに評価してきた。本研究において大麦若葉エキスを *in vitro* ヒト大腸細菌叢モデルに投与して、その与える効果を明らかにすることを目的とした。
【方法と結果】モデル培養装置に 9 人のヒト臨床検体（糞便）をそれぞれ植菌した。大麦若葉エキスを初期濃度 15 g/L で投与したモデル系と投与していないモデル系を比較した。37℃で培養して *in vitro* ヒト大腸細菌叢モデルを構築した後に、その発酵液を取得した。DNA を抽出して 16S rRNA 遺伝子を対象として次世代シーケンサーにて菌叢解析を行った。発酵液中に含まれる短鎖脂肪酸は高速液体クロマトグラフィーで、アミノ酸はガスクロマトグラフ質量分析計で測定した。大麦若葉エキス投与により、*Bifidobacterium* 属や *Faecalibacterium* 属・*Roseburia* 属・Unclassified *Ruminococcaceae*・*Lachnospira* 属の全細菌に対する割合が増加していた。後者の属の増加は、酪酸産生の増加に関連していると推察された。また大麦若葉エキス投与により、リシン・グルタミン酸・セリン・トレオニン・アラニン・イソロイシン・ロイシン・バリン・フェニルアラニンの産生を増加させていた。大麦若葉エキスの持つ bifidogenic かつ butyrogenic 効果について論じる。

young barley leaf extract, human colonic microbiota, butyrate

発表責任者：佐々木建吾（sikengo@people.kobe-u.ac.jp）

講演番号：2A02a06
講演日時：3 月 26 日 10:35～ センター2 号館 A02 会場

赤外分光法及び XRD を用いた米粉の固体構造評価に関する研究

Evaluation of internal structure of rice flour with FTIR and XRD technique

○楊 嘉敏[1]、市川 千晶[1]、石川 大太郎[2]、藤井 智幸[1] ([1]東北大院農、[2]福島大農)
○JIAMIN YANG[1], CHIAKI ICHIKAWA[1], DAITARO ISHIKAWA[2], TOMOYUKI FUJII[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Fukushima Univ.)

［緒言］我が国の食料自給率向上を目的として、その応用展開が期待されている米粉は、粉砕過程においてミクロな構造変化を起こし、多様な特性を有する粉体素材となる可能性を有していることが明らかにされてきた。実際、適当な粉砕条件を選ぶと、粉砕時の衝撃によって表面が平滑になっていて、かつ内部はデンプン粒構造を維持したコア・シェル型の内部構造を有する米粉が得られている。赤外分光法は、中赤外域では分子内、分子間相互作用に鋭敏であることが知られ、さらに低波数帯では、構造の乱れを反映する挙動が現れることから、X 線回折と相補に利用することで高分子固体の内部構造の把握に有効であることが知られている。しかし、米粉の状態評価に関する研究はいまだ十分とは言えず、赤外スペクトルの詳細な解析はなされていない。そこで、本研究では、米粉の内部構造及び加工特性の体系的把握を目的として、粉砕方法の異なる米粉を調製し、その内部構造について実験的に検討を加えた。

［材料および方法］原料は日本晴（平成 29 年度滋賀県産）用いた。精白した米粒を水に５時間浸漬し、脱水後に気流粉砕機を用いて粉砕した後、乾燥させて湿式米粉試料を調製した。対照として、乾式で気流粉砕を行って乾式米粉試料を調製した。各米粉の $2\theta = 5\text{-}50^\circ$ までの XRD 曲線を測定し、結晶化度を算出した。また、各米粉を相対湿度 11.0～98.0％の範囲で調湿し、平衡含水率の異なる試料を調製するとともに、分光測定に供した。赤外分光測定は、ATR 法を用い測定波数領域は 4000～50cm^{-1}、波数分解能は４cm^{-1}、積算回数は 256 回の条件で実施した。

［結果と考察］含水率の異なる米粉試料について赤外分光スペクトルを測定したところ、1400～1000cm^{-1}付近では、930、977、1022、1076、1154 cm^{-1}および 1242cm^{-1}付近にピークを生じた。さらに、860 cm^{-1}以下では、複数の振動由来のピークに加えて、回転由来のブロードなバンドが確認された。検出されたピークのうち、粉砕方法の異なるいずれの米粉試料においても、ピラノース骨格由来の振動及びグリコシド結合の COC 伸縮振動に由来すると考えられている 577 cm^{-1}付近及び 930 cm^{-1}付近のピークのピーク波数位置には変化が認められなかった。またピーク値は含水率によって次第に減少する傾向が認められた。一方で、含水率が増加するに従って CH_2OH 側鎖の OH 変角振動に由来すると考えられている 1242 cm^{-1}付近のピークに高波数シフトが認められた。以上の結果から、米粉においては水分子の気相収着によってデンプンの高分子主鎖の骨格構造は変化しないが、構造揺らぎが大きくなっていることが示され、ラバー状態ではデンプンの CH_2OH 側鎖の易動度が大きいことが示唆された。

Rice Flour, XRD, FTIR

発表責任者：藤井　智幸（atom@tohoku.ac.jp）

講演番号：2A02a07
講演日時：3 月 26 日 10:46～ センター2 号館 A02 会場

食物アレルゲン検査試薬の新規開発法確立へ向けた網羅的ペプチドアレイと Nanobody アーミング酵母の応用可能性

Applicability of peptide array and yeast displaying Nanobody to develop food allergen-binding antibody

○今中 陽[1]、久保田 麻友香[1]、橋本 美保[2]、加藤 重城[2]、本山 智晴[1]、中野 祥吾[1]、伊藤 創平[1]、寺田 祐子[1]、伊藤 圭祐[1]([1]静県大院・薬食、[2]プリマハム（株））
○ Yo IMANAKA[1], Mayuka KUBOTA[1], Miho HASHIMOTO[2], Shigeki KATOU[2], Tomoharu MOTOYAMA[1], Shyogo NAKANO[1], Souhei ITO[1], Yuko TERADA[1], Keisuke ITO[1] ([1]Univ. Shizuoka, [2]Prima Meat Packers, Ltd.)

【背景・目的】 食物アレルギーは世界的な健康問題であり、食品中へのアレルゲン混入を正確に検査するため、特異性の高い抗体試薬の開発が求められている。抗体の特性評価においてエピトープ解析は特に重要であるが、競合 ELISA に代表される従来法での解析は効率とコストの面から十分に対応できていないのが現状である。また動物愛護の観点から、動物実験を行わない *in vitro* 抗体取得法の確立も重要な課題である。本研究ではこれら 2 つの課題を解決できる新規抗体開発法の確立を目指し、食物アレルゲン配列の網羅的ペプチドアレイを用いた迅速・簡便なエピトープ解析法、また重鎖抗体の可変領域を酵母細胞壁に固定化した Nanobody アーミング酵母ライブラリーを用いた *in vitro* 抗体取得法について有用性を検討した。

【方法・結果】 牛乳 αs-1 カゼインおよび鶏卵オボアルブミンに対するモノクローナル抗体(65F2、962H2、CN2)をモデルとして、ペプチドアレイを用いたエピトープ解析を実施した。アレルゲンタンパク質のアミノ酸配列を全網羅するように、12 アミノ酸からなるペプチドを 1 または 3 アミノ酸ずつずらして合成したペプチドアレイを作製し、抗体結合領域をスクリーニングした。続いて、得られた結合領域周辺の配列について詳細な Deletion 解析を行い、各抗体のエピトープとして EAGREVVG、VLQPSSVD、LAYFYPELF を特定した。本結果は競合 ELISA とほぼ同様の結果であった。さらに Alanine-scanning により結合に中心的に寄与するアミノ酸残基を精密に特定することにも成功した。得られたデータをもとに、71 種類の他の主要食品タンパク質のアミノ酸配列から *in silico* でエピトープ類似配列を探索し、ペプチドアレイを用いて各抗体の結合を検討した結果、いずれの抗体も交差性を示さなかったことから、これらの抗体の高い特異性が分子レベルで迅速・簡便に実証された。

続いて *in vitro* 抗体取得法を検討するために、PDB に登録されている 93 個の Nanobody の構造を元に、10^{30} 規模に可変領域をランダム化した人工 Nanobody 遺伝子を設計し、GPI アンカーを介して細胞壁に Nanobody をアーミングした出芽酵母ライブラリーを構築した。本ライブラリーを用いることで、*in vitro* での小麦結合性 Nanobody（CDR1：GYIFAHRCM、CDR2：EFVAAIVTGTITNY、CDR3：AVTAAFVTRFLY）の取得に成功した。

以上のように、本研究により、網羅的ペプチドアレイと Nanobody アーミング酵母は、食物アレルゲン検査用抗体の開発に応用可能であることが示された。

allergen, peptide array, nanobody

発表責任者：伊藤圭祐（sukeito@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：2A02a08
講演日時：3 月 26 日 10:57～ センター2 号館 A02 会場

バイオナノカプセル足場技術を用いた食品検査キットの高感度化

Bio-nanocapsule-based scaffolding technology for improving the sensitivity of food safety analyses

○水野 麻美[1]、黒田 俊一[2]、中山 勉[1]、飯嶋 益巳[1]([1]東農大・応生・健康、[2]阪大・産研)
○Asami MIZUNO[1], Shun'ichi KURODA[2], Tsutomu NAKAYAMA[1], Masumi IIJIMA[1] ([1]Tokyo Univ. Agric., [2]ISIR, Osaka Univ.)

【背景・目的】Hazard Analysis and Critical Point(HACCP)による食品の衛生管理の義務化に伴い、食品検査の重要性が改めて見直されている。特に食品中のアレルゲンや化学物質等の危険因子の検出には enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)が広く利用されているが、一般的に抗体は希少で高価なものも多いことから、使用量を可能な限り少なくし、無駄なく抗原抗体反応に供して、さらに高感度化を達成する技術開発が急がれている。近年我々は、B 型肝炎ウイルス外皮 L タンパク質の N 末端領域の一部を、protein A 由来 IgG-Fc 結合ドメイン 2 量体に置換した ZZ-L タンパク質とリン脂質二重膜から形成される直径約 30 nm の ZZ タグ提示型バイオナノカプセル(ZZ-BNC)を作製した。そして ZZ-BNC が、抗体および Fc 融合受容体のクラスターと精密整列化を同時に達成できる足場分子としての機能をもち、各種バイオアッセイの感度を著しく上昇できることを報告してきた[1,2)]。そこで本研究は、市販の ELISA キットに ZZ-BNC を応用することで、従来法の高感度化および抗体使用量の低減を図る技術の開発を目的とした。

【方法】食物アレルゲン用検査キット(モリナガ FASPEK エライザⅡシリーズ; プリマハムアレルゲンアイ® ELISAⅡシリーズ)を用いて、ZZ-BNC 添加の有無による抗原検出を検討した。

【結果・考察】モリナガ FASPEK エライザⅡシリーズでは、そばや小麦グリアジンなどの検出対象タンパク質 7 品目中 5 品目の抗原について、ZZ-BNC を添加しただけで検出感度が最大約 1.4 倍上昇することを見出した。また、プリマハムアレルゲンアイ® ELISAⅡシリーズでは、6 品目中少なくとも 2 品目について同様の効果が認められた。本結果は、酵素標識検出抗体が ZZ-BNC 表層でクラスター化と精密整列化を同時に達成し、抗体一分子当たりの標識酵素の分子数を高めた効果であると示唆された。以上より、ZZ-BNC は既存の ELISA キットに添加するだけで従来の検出感度を改善し、抗体の使用量低減を可能にするユニークな足場分子であることが示された。今後は様々な ELISA 測定キットに応用し、食品検査技術のブレイクスルーを目指していきたい。

【参考文献】1) Iijima, M. et al., Biosens. Bioelectron., 89, 810, (2017); 2) 飯嶋ら, 化学と生物, 56, 591, (2018).

Food safety analysis, ELISA, bio-nanocapsule

発表責任者：飯嶋 益巳（mi206786@nodai.ac.jp）

講演番号：2A02a09
講演日時：3 月 26 日 11:08～ センター2 号館 A02 会場

バイオナノカプセル足場技術を用いた食物アレルゲンの簡便・迅速・高感度検出法の開発

Simple, rapid, and sensitive methods for food allergen detection by bio-nanocapsule-based scaffolding technology

○山本 星里[1]、藤方 楓[1]、黒田 俊一[2]、中山 勉[1]、飯嶋 益巳[1]([1]東農大・応生・健康、[2]阪大・産研)
○Seri YAMAMOTO[1], Kaede FUJIKATA[1], Shun'ichi KURODA[2], Tsutomu NAKAYAMA[1], Masumi IIJIMA[1] ([1]Tokyo Univ. Agric., [2]ISIR, Osaka Univ.)

【背景・目的】食品製造現場等において HACCP（Hazard Analysis and Critical Control Point）の導入が義務化され、食物アレルゲンなどの様々な危害因子を、誰でも簡単に、迅速に、感度良く測定できる技術が求められている。Enzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）は汎用性が高く定量性はあるが、検査時間に数時間を有することや、専門の技術・計測機器が必要なことから、より簡便な方法が求められる。我々は、IgG の Fc 領域を固定して Fv 領域を放射状に整列提示できる足場分子、protein A 由来 Fc 結合 Z ドメイン提示型バイオナノカプセル（ZZ-BNC）を開発し、IgG 及び Fc 融合受容体をセンシング分子とした各種バイオセンシングの検出感度の改善と、センシング分子の使用量を削減する技術を開発してきた[1−2)]。本研究では、ZZ-BNC を用いたイムノスティック法による食物アレルゲンの簡便かつ高感度検出技術を開発し、食品工場等での実用化を目指すことにした。

【方法】イムノスティックの固相上に各種抗原（ovalbumin（OVA）；gliadin（GLI））を固定し、ブロッキング後、一次抗体（抗 OVA マウス IgG2b；抗 GLI ウサギ IgG）と西洋ワサビペルオキシダーゼ標識二次抗体（ウサギ抗マウス IgG；ロバ抗ウサギ IgG)、または予め二次抗体と ZZ-BNC を混合した複合体を用いて測定した。

【結果と考察】イムノスティック固定化 OVA または GLI の発色強度は、二次抗体 ZZ-BNC 複合体を使用した場合、二次抗体のみの場合と比べて、OVA は約 10 倍、GLI は約 2 倍以上増加した。これは、ZZ-BNC が二次抗体をクラスター化および精密整列化する足場分子として働き、抗体一分子当たりの標識酵素の分子数を高めて高感度検出を可能にしたためと考えられた。本法は、約 1 時間で検出が可能であり、様々な抗原の高感度検出への応用が期待できることから、食品分野だけでなく医療現場等における簡易検査法にも展開できると考える。

【参考文献】
1) Iijima, M. et al., Biosens. Bioelectron. 89, 810, (2017).
2) 飯嶋ら, 化学と生物, 56, 591, (2018).

HACCP, immunostick, bio-nanocapsule

発表責任者：飯嶋益巳（mi206786@nodai.ac.jp）

講演番号：2A02a11
講演日時：3 月 26 日 11:40～ センター2 号館 A02 会場

ナスコアコレクションにおける新規食品機能性成分ナス由来コリンエステル（アセチルコリン）
Eggplant-derived choline ester (acetylcholine), a new food functional ingredient in the eggplant core collection

○王 文豪[1]、和具 なおみ[1]、深谷 茜音[1]、宮武 宏治[2]、齊藤 猛雄[2]、山口 翔平[1]、中村 浩蔵[1]([1]信州大農、[2]農研機構野菜花き研究部門)
○Wenhao WANG[1], Naomi WAGU[1], Akane FUKAYA[1], Koji MIYATAKE[2], Takeo SAITO[2], Shohei YAMAGUCHI[1], Kozo NAKAMURA[1] ([1]shinshu Univ., [2]Institute of Vegetable and Floriculture Science (NIVFS), National Agriculture and Food Research Organization (NARO))

【目的】脊椎動物の神経伝達物質として知られるアセチルコリンは食用の植物や菌類にも含まれており、自然界に普遍的な化合物である。我々は、栽培作物 19 種の中でナス（*Solanum melongena*）に他の作物の 1000 倍以上のアセチルコリンが存在すること、血圧が高めの人を対象としたプラセボ対照ランダム化二重盲検並行群間比較試験（プラセボ対照 RCT）において 2.3 mg のナス由来コリンエステル（アセチルコリン）を含むナス粉末の継続摂取により血圧や心理状態が改善することを明らかにし、世界で初めてナスの食品機能性をプラセボ対照 RCT で示した[1)]。そこで我々は、世界中のナスの代表的な品種・系統の中から選定したナスコアコレクション 100[2)] サンプルについて、二年間にわたりナス由来コリンエステル（アセチルコリン）含量を調査した。
【方法】農研機構野菜花き研究部門安濃野菜研究拠点で栽培された、ナス完熟果をサンプルとした。ナス由来コリンエステル（アセチルコリン）は、ナス凍結乾燥粉末を希塩酸で振盪抽出、抽出液を陽イオン交換樹脂で固相抽出し、LC-MS/MS 分析による標準添加法で定量を行った。定量値は内部標準回収率で補正した。ナス由来コリンエステル（アセチルコリン）含量は新鮮重量 100 g 当たり含量（100 g F.W）で示し、3 果実の平均値を各品種の定量値とした。コリン（Choline）も同様に定量した。
【結果】全てのナスサンプルでナス由来コリンエステル（アセチルコリン）を確認した。二年目に収穫したナス果実は、一年目のものよりも低値を示した。この傾向は同一品種間の比較でも認められ、栽培年度による温度や湿度などの環境要因が影響していると考えられる。しかし、すべてのナス果実は、他の栽培作物よりもはるかに豊富なナス由来コリンエステル（アセチルコリン）を含有しており、ナス由来コリンエステル（アセチルコリン）は品種によらない、ナスに共通の食品機能性成分であると考えられ、世界各地で栽培されているナスを機能性野菜として健康維持増進に役立てられる可能性が示された。本研究は農研機構生研支援センター「革新的技術開発・緊急 展開事業（うち経営体強化プロジェクト)」の支援を受けて実施した。

1) Nishimura, M., et al, (2019) *Nutrients*, 11, 2797.
2) Miyatake, K., et al., (2019) Bred. Sci., 69: 498-502.

acetylcholine, eggplant, choline ester

発表責任者：中村浩蔵（knakamu@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2A02a12
講演日時：3 月 26 日 11:51～ センター2 号館 A02 会場

高知県栽培冬春ナスにおける新規食品機能性成分ナス由来コリンエステル（アセチルコリン）
Choline ester (acetylcholine) derived from eggplant which is new food functional ingredients in the eggplant cultivated in Kochi prefecture in winter and spring
○深谷 茜音[1]、和具 なおみ[1]、王 文豪[1]、猪野 亜矢[2]、北山 みずほ[2]、山口 翔平[1]、中村 浩蔵[2]([1]信州大学、[2]高知県農業技術センター)
○Akane FUKAYA[1], Naomi WAGU[1], Wenhao WANG[1], Aya INO[2], Mizuho KITAYAMA[2], Syohei YAMAGUCHI[1], Kozo NAKAMURA[2] ([1]Shinshu Univ., [2]Kochi Prefectural Agricultural Technology Center)

【目的】ナスには、ナス由来コリンエステル（アセチルコリン）が他の生鮮農産物の 1000 倍以上含まれている。脊椎動物の神経伝達物質としてよく知られているアセチルコリンであるが、ストレスを感じている正常高値および I 度高血圧者に対するプラセボ対照ランダム化二重盲検並行群間比較試験で血圧改善、心理状態改善作用が明らかにされた、新規な食品機能性成分である[1]。ナス由来アセチルコリンの有効用量は 2.3 mg/日・人であった。そこで本研究では、ナス生産量日本一の高知県で冬春栽培されている主要なナス 3 品種（土佐鷹、慎太郎、竜馬）について、2 年間にわたりナス由来アセチルコリン含量を調査し、ナスの品種と収穫時期による変動を調査し、生鮮ナス機能性表示食品の可能性を考察した。
【方法】サンプルのナス果実は、高知県農業技術センターで 2017 年 11 月～2018 年 6 月(H30 園芸年度)、2018 年 11 月～2019 年 7 月(R1 園芸年度)に収穫された。ナス果実を凍結乾燥・粉砕し、振盪抽出、陽イオン交換樹脂による固相抽出で処理した溶出液を希釈して測定試料とし、LC-MS/MS を用いた標準添加法でナス由来アセチルコリンを定量した。定量値は内部標準物質の回収率で補正し、生鮮重量 100g あたりの含量(100g F.W)で示した。
【結果】ナス由来アセチルコリン含量は、H30 園芸年度栽培ナスで平均 5.21mg/100g F.W、R1 園芸年度栽培ナスで平均 8.34mg/100g F.W であり、H30 園芸年度栽培ナスより有意にナス由来アセチルコリン含量が高く、全ての品種で同様の結果であった。品種別のナス由来アセチルコリン含量は、土佐鷹：6.59mg/100g F.W(H30),8.23mg/100g F.W(R1)、慎太郎：4.54mg/100g F.W(H30),9.39mg/100g F.W(R1)、竜馬：3.48mg/100g F.W(H30),7.21mg/100g F.W(R1)であった。各品種の収穫月別のナス由来アセチルコリン含量は、土佐鷹では収穫期間を通して含量が高く安定していたが、慎太郎と竜馬は冬期には含量が高いが夏期には減少した。そのため、慎太郎と竜馬は冬期栽培が適していると示唆された。以上の結果から、土佐鷹、慎太郎、竜馬は、生鮮ナス機能性表示食品として利用可能であると考えられた。
本研究は農研機構生研支援センター「革新的技術開発・緊急 展開事業（うち経営体強化プロジェクト)」の支援を受けて実施した。
[1]Nishimura M., et al (2019) Nutrients, 11(11), 2797

eggplant, acetylcholine, food functional ingredients

発表責任者：中村浩蔵（knakamu@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2A02a13
講演日時：3 月 26 日 12:02～ センター2 号館 A02 会場

近赤外分光法によるナス由来コリンエステル（アセチルコリン）の非破壊測定法の開発
Development of nondestructive measurement method for eggplant-derived choline ester (acetylcholine) by near infrared spectroscopy
○野澤 周吾[1]、鈴木 美穂[1]、和具 なおみ[1]、猪野 亜矢[2]、北山 みずほ[2]、山口 翔平[1]、中村 浩蔵[1]
([1]信州大農、[2]高知県農業技術センター)
○Shugo NOZAWA[1], Miho SUZUKI[1], Naomi WAGU[1], Aya INO[2], Mizuho KITAYAMA[2], Shohei YAMAGUCHI[1], Kozo NAKAMURA[1] ([1]Shinshu Univ., [2]Kochi Prefectural Agricultural Technology Center)

【背景・目的】我々はヒト臨床試験において、ナス由来コリンエステル（アセチルコリン、以下 ACh）を 2.3mg 含有するナス搾汁粉末を 12 週間継続摂取することでストレスを感じている正常高値血圧者および I 度高値血圧者の血圧および心理状態が有意に改善することを実証し、プラセボとの比較でナスの食品機能性を世界で初めて明らかにした[1]。ナスを生鮮機能性食品として実用化するには、ナス果実中に含まれる機能性関与成分である ACh 含量を規定しなければならない。既に LC-MS/MS を用いた直接分析法は確立しているが、ナス果実の一部をサンプリングするため生鮮ナスには適応できず、また、大量のサンプルの定量は不可能である。そこで本研究では、ナスの果実中 ACh 含量の定量を目的に、近赤外分光法を基本としたナス果実中 ACh 非破壊測定法の開発を行った。
【方法】ナスサンプルには高知県産ナス（土佐鷹、慎太郎、竜馬）の果実を、検量式作成用と評価用に分けて使用した。果実サンプルは、フルーツセレクター（クボタ計装）を用いて 652～1010 nm 吸光度データを得た後、LC-MS/MS 分析で ACh を定量した。目的変数を LC-MS/MS による ACh 定量値、説明変数に近赤外領域の特定波長の吸光度、収穫所要日数、登熟期間の平均気温と平均地温、積算日射量を用いて重回帰分析を行い、ACh 含量非破壊測定のための検量式を作成した。データ解析には SPSS Statistics base ver.25 を用いた。ACh 非破壊測定検量式から得た ACh 非破壊測定値は、LC-MS/MS による ACh 定量値と比較し、非破壊測定の妥当性を評価した。
【結果】収穫所用日数、気温および地温の温度、積算日射量とナス果実中 ACh 含量には相関があることが明らかになった。ナス果実中 ACh 非破壊測定法開発の結果、直接分析法による測定値と比較し、相関係数（R）>0.75 を満たす非破壊測定値を得られる検量式を作成することができた。これによって実機への応用が期待される高知ナスの ACh 非破壊測定が可能となった。なお、本研究は農研機構生研支援センター「革新的技術開発・緊急 展開事業（うち経営体強化プロジェクト）」の支援を受けて実施したものである。

[1] Nishimura, M., et al, (2019) *Nutrients* 11, 2797

eggplant, acetylcholine, nondestructive measurement

発表責任者：中村浩蔵（knakamu@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2A02p01
講演日時：3 月 26 日 13:50～ センター2 号館 A02 会場

マヌカ蜂蜜の加熱に伴うメチルグリオキサール減少機構の解明
Mechanism of decrease of methylglyoxal contents in manuka honey by heating
○加藤 陽二[1,2]、来住 悠衣[1]、三好 規之[3]([1]兵庫県大環境人間、[2]兵庫県大先端食、[3]静岡県大食品栄養)
○Yoji Kato[1,2], Yui Kishi[1], Noriyuki Miyoshi[3] ([1]Univ Hyogo SHSE, [2]Univ Hyogo RIFNS, [3]Univ Shizuoka)

【背景・目的】マヌカ蜂蜜は、ニュージーランド原産のマヌカ（*Leptospermum scoparium*）の花蜜に由来する蜂蜜である。特有・特徴的な成分を含んでおり、マヌカ蜂蜜の認証やグレーディングの指標に用いられている。発表者らはマヌカ蜂蜜に特徴的な新規配糖体 Leptosperin を発見し、2015 年から UMF 協会の認証物質の一つとして利用されている。また、ニュージーランド第 1 次産業省（MPI）は、マヌカ蜂蜜の定義成分として、4 つの含有物質 2-Methoxybenzoic acid（MBA）、2'-Methoxyacetophenone（MAP）、3-Phenyllactic acid（PLA）、4-Hydroxyphenyllactic acid（4HPA）の含量（下限値）等を定め、2018 年 2 月からマヌカ蜂蜜の海外輸出に適用している。グレーディング（ランク付け）に用いられる Methylglyoxal（MGO）は特徴的成分であり、高い抗菌活性を示すことが知られている。マヌカ蜂蜜は、飴などの加工品に添加されているが、加熱に伴う食品加工の過程で MGO など成分の多くが消失し、消費者が期待している効果が得られない可能性がある。本研究ではマヌカ蜂蜜に含まれる MGO の加熱に伴う変化の機構について解明することを目的とした。
【方法】加熱によりマヌカ蜂蜜の MGO 量が減少する機構を探るため、糖と水を混ぜて人工蜂蜜を調製した。蜂蜜中の低分子成分の解析には UHPLC-多波長検出器や LC-MS/MS、タンパク質成分の解析には SDS 電気泳動及び特異抗体を用いたウエスタンブロット法を使用した。
【結果】蜂蜜に豊富に含まれる L-プロリンと MGO を人工蜂蜜に添加し、90°C で加熱したところ、加熱時間の増加とともに MGO が減少した。MGO の減少に伴い、MGO と L-プロリンのアミノカルボニル反応生成物である 2 -Acetyl-1-pyrroline (2AP)が増加した。またプロリンの代わりにタンパク質モデルとし Boc-Lys あるいは Nα-Acetyl-Arg を加えた場合には、MOLD (Methylglyoxal-derived lysine dimer)あるいは MGO-アルギニン修飾物が生成した。人工蜂蜜に MGO とウシ血清アルブミンを加え、90°C で 30 分以上加熱すると MGO 量が急激に減少し、MGO-アルギニン修飾物の一つである argpyrimidine 残基が生じた。また、マヌカ蜂蜜の加熱にともない、蜂蜜由来のタンパク質に argpyrimidine 残基の生成増加が確認された。対照として用いたレンゲ蜂蜜では、加熱の有無によらず、抗 argpyrimidine 抗体に対する反応性は認められなかった。
【考察】以上のことから、加熱により蜂蜜中の MGO とアミノ基が反応して付加体を形成することで、MGO 量が減少する機構が考えられた。2 AP は加熱前のマヌカ蜂蜜にも検出されており、加熱を伴わない保存中でもアミノカルボニル反応が生じている可能性がある。

methylglyoxal, heating, manuka honey

発表責任者：加藤陽二（yojikato@shse.u-hyogo.ac.jp）

講演番号：2A02p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ センター2 号館 A02 会場

乾燥ストレス下で生育したトマト果実のトランスクリプトームおよびメタボローム解析
Transcriptome and metabolome analysis of tomato fruits grown under drought stress
○朝倉 浩子[1]、山川 隆[2]、上田 玲子[1]、平 修[3]、阿部 啓子[1]、朝倉 富子[1]([1]東大院農生科・応生化、[2]東大院農生科・食の安全研セ、[3]福大農)
○Hiroko ASAKURA[1], Takashi YAMAKAWA[2], Reiko UEDA[1], Shu TAIRA[3], Keiko ABE[1], Tomiko ASAKURA[1] ([1]University of Tokyo, Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, [2]University of Tokyo, Research Center for Food Safety, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, [3]Fukushima Univ.)

トマトは生食だけでなく、多くの加工品に利用される世界中でもっとも消費されている野菜のひとつである。近年、ゲノム編集による品質の向上や目的に合った品種の作出が試みられている一方で、栽培方法を工夫し、栄養価や食味を向上させる試みも行われている。我々は、トマトを含めいくつかの作物が乾燥ストレス条件下で栽培すると果実中の糖やアミノ酸、有機酸の含有量が変化をすることに着目し、乾燥下におけるトマト果実の成分変化と遺伝子変動について解析を行った。

登熟期の果実のトランスクリプトーム解析の結果、細胞壁代謝、脂肪酸代謝、果実成熟関連および防御応答の 4 つの GO タームが有意に変動することが示された。有意に変動した遺伝子群を KEGG 上にマッピングした結果、イノシトール合成経路および脂肪酸合成経路において、発現上昇した遺伝子が複数見られた。次に、完熟果実を用いて、メタボローム解析を行い、PCA 解析に供したところ、主な主成分として細胞壁関連の糖代謝、アミノ酸、有機酸軸の 3 軸が抽出された。

トランスクリプトームおよびメタボローム解析により、イノシトールおよび脂肪酸代謝経路が乾燥ストレスで亢進することが示唆された。そこで、特に完熟期での上昇が顕著であった脂肪酸について、イメージング MS を用いて果実内の局在の可視化を試みた。その結果、パルミチン酸は乾燥ストレス下の登熟期において種子および外果皮に蓄積するが、完熟期では種子において蓄積が顕著に上昇することが分かった。また、オレイン酸は、乾燥ストレス下の登熟期において種子および胎座に蓄積し、完熟期ではこれらの蓄積がより顕著に上昇することが分かった。蓄積の上昇が確認された脂肪酸は、リン脂質の構成分子であることから、ホスファチジルコリンおよびジパルミトイルホスファチジルコリンの局在の可視化も行った。その結果、ホスファチジルコリンはオレイン酸およびパルミチン酸の局在とほぼ同一部位に蓄積が認められ、ジパルミトイルホスファチジルコリンはパルミチン酸と同一部位に蓄積が認められた。このことから、乾燥ストレス下では、登熟期から乾燥状態を感知し、リン脂質を合成することにより、乾燥に対する防御機構に関与する可能性が示された。

tomato, stress

講演番号：2A02p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ センター2 号館 A02 会場

米飯の理化学的特性に影響をおよぼす遺伝子座を利用した用途予測の検討

Examination of application prediction using loci affecting physicochemical properties of cooked rice

○望月 賢太[1]、辻井 良政[2]、堀 清純[3]、髙野 克己[2] ([1]東農大院農・農化、[2]東農大応生・農化、[3]農研機構・作物開発セ)
○Kenta MOCHIZUKI[1], Yoshimasa TSUJII[2], Kiyosumi HORI[3], Katsumi TAKANO[2] ([1]Agrichem., Agr., Grad. Sch., Tokyo Univ. Agric., [2]Dept. Agrichem., Fac. Biosci., Tokyo Univ. Agric., [3]Institute of Crop Science, NARO)

【目的】 米は主食用、寿司米、酒造好適米および業務用米など調理法や用途によって、求められる性質は様々であり、それぞれに合った特徴を持つ品種が選抜され使用されている。現在はアミロース比率が選抜形質として利用され、その原因遺伝子も解明されている。しかし、それ以外の米飯の物性値などの理化学的形質の原因遺伝子は未解明であり、遺伝的な知見はほとんどない。我々はこれまで、日本水稲品種 162 品種を用いて、米飯の理化学的特性の評価とゲノムワイドアソシエーション解析を行い、米飯の理化学的な形質に影響を及ぼす遺伝子座を検出した。その結果、米飯の理化学的な形質は、複数の遺伝子が総合的に作用していると示唆された。本発表では、選抜された複数の遺伝子座の各用途における配列パターンを明らかにすることを目的とし、水稲品種の用途予測に関する若干の知見が得られたため報告する。
【方法】 試料米には、茨城県つくば市の農研機構次世代作物開発研究センターの試験圃場で栽培した、在来品種 33 品種と育成品種 129 品種の計 162 品種の平成 24、26、27 年産の収穫米を用いた。在来品種は、国内各地から収集した約 2000 品種の遺伝資源の中から遺伝的変異を幅広く網羅する品種を選定した。また、育成品種は、コシヒカリの系譜上の祖先品種や後代品種を中心に選定した。これら試料米の各種理化学特性の評価を行った後、各測定項目に関して 3,256 個のゲノムワイド SNP マーカーを用いて、R package rrBLUP により遺伝子座を検出した。それらの SNP マーカーを変数として、用途別(主食用良食味、主食用米、寿司米、酒造好適米および多収米)を目的変数として PLS 回帰分析を行った。
【結果】 ゲノムワイドアソシエーション解析の結果、-logP 値が 3.0 以上である各用途と関連すると考えられる遺伝子座を合計 591 ヶ所検出した。これらの遺伝子座の配列パターンを利用し、用途別予測の回帰式を作成した。決定係数は、主食用良食味（0.598）、主食用米（0.490）、寿司米（0.313）、酒造好適米（0.433）、多収米（0.549）の回帰式を作成することができた。これらの回帰式を用いて未分類の 84 品種について用途を予測した結果、主食用良食味に 8 品種、主食用米が 6 品種、寿司米が 11 品種、酒造好適米が 4 品種、多収米が 4 品種と分類された。これらの結果から、米飯の理化学的特性に影響をおよぼす遺伝子座の SNP マーカーを用いた回帰式から、品種の最適な用途を推定できる可能性が示唆された。

application of Japanese rice, genome-wide association study, partial least squares regression

発表責任者：望月賢太（44418020@nodai.ac.jp）

講演番号：2A02p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ センター2 号館 A02 会場

ツタンカーメンエンドウの加熱中に生じる着色反応に関与する成分の同定

Identification of compounds involved in coloring reaction during heating of Tutankhamun's pea

○前川 優樹[1]、近藤（比江森）美樹[1,2] ([1]徳島文理大院人間生活、[2]徳島文理大人間生活)
○Yuuki MAEKAWA[1], Miki HIEMORI-KONDO[1,2] ([1]Grad. Human life Sci. Tokusima bunri Univ., [2]Human life Sci. Tokusima bunri Univ.)

【目的】エンドウ(*Pisum sativum* L.)の古代品種の一つであるツタンカーメンエンドウは、未熟な豆を食用とする実エンドウである。当該エンドウは熱水中で加熱すると緑色から赤褐色に変化するユニークな特徴を有する。その変化は、赤飯のように着色した豆ご飯として利用されている。しかし、その着色源および着色機構については未解明である。本研究では、ツタンカーメンエンドウの加熱中に生じる着色に関与する成分、すなわち、着色源を同定し、さらに着色成分について検討した。
【方法】2016 年 5 月に和歌山県で収穫されたツタンカーメンエンドウを購入後、莢を除いて凍結保存し、実験直前に解凍して用いた。エンドウの全粒、種皮、胚乳の水抽出物を 100℃で 2 時間加熱し、着色成分の局在を検討した。次いで、加熱により着色した部位の水抽出物を Sep-Pak C_{18} プラスカートリッジにより濃縮後、ODS カラム(Atlantis $dC_{18,}$ Waters)を備えたフォトダイオードアレイ検出器付き高速液体クロマトグラフイー(DAD−HPLC)によって成分を分画し、加熱による着色反応を指標に着色源を含む成分を特定した。次いで、当該画分を超高速液体クロマトグラフィーエレクトロスプレーイオン化タンデム型質量分析計（UPLC−ESI−MS/MS)に供した。さらに、これら着色源の混合物の加熱により生成した着色成分を DAD−HPLC で分離し、それらの成分の吸収スペクトルを測定した。
【結果および考察】　加熱によって種皮由来の水抽出物が着色したことから、着色源が種皮に存在することが明らかになった。HPLC 分析および加熱反応により特定された着色源を含むピークは、UPLC によって 3 つのピークに分離された。これらに含まれる成分は MS 分析のネガティブおよびポジティブイオンモードにおいて、各々 m/z=305.2 および m/z=307.2、m/z=609.4 および m/z=611.4、m/z=913.7 および m/z=915.7 のシグナルを与えた。さらにこれらの MS/MS のフラグメントは、既知の(エピ)ガロカテキンの 1、2、3 量体と一致した。このうち、着色源の主成分は 2 量体であり、興味深いことに当該成分は、昨年度の本大会において抗酸化成分として報告したものであった。これら着色源の吸収スペクトルは加熱後に長波長側へシフトし、また、ブロードなピークが検出された。以上の結果から、ツタンカーメンエンドウの加熱反応における着色源は、(エピ)ガロカテキンに由来するものであり、着色成分はそれらの反応生成物であることが予想された。本研究から得られた情報は、ツタンカーメンエンドウの加熱による着色機構を解明するための基礎になるものである。本研究は、JSPS 科研費 17K00838 の助成を受けて実施した。

Tutankhamun's pea, heating, coloring reaction

講演番号：2A03a01
講演日時：3 月 26 日 09:30～ センター2 号館 A03 会場

ラットにおけるキサントフモールの吸収及び酸化コレステロールの生態有害性に対する調節作用の検証

Verification of bioavalabity of xanthohumol and regulatory mechanism of it on toxic effects of oxidized choresterol in rats

○石川 航也[1]、中堀 紘花[2]、一色 祐佳[1]、長田 恭一[1]([1]明治大農、[2]明治大院農)
○Koya ISHIKAWA[1], Hiroka NAKAHORI[2], Yuka ISSHIKI[1], Kyoichi OSADA[1] ([1]Meiji Univ, [2]Meiji Univ Grad Sch)

【目的】動物性加工食品中のコレステロールは、加工や長期間保存中に酸化され、酸化コレステロール（OXC）が生成する。摂取した OXC は生体内に蓄積され、動脈硬化性疾患、認知症あるいは癌等の発症に寄与する可能性が指摘されているため、その予防策を講じる必要がある。ホップの硬質樹脂に存在するプレニル化フラボノイドであるキサントフモール(XN)は、脂質代謝調節作用を示すことが明らかになっている。しかし XN の吸収利用について、また XN による OXC の吸収抑制作用については不明な点が多い。本研究ではラットにおける XN の吸収と代謝及び OXC の有害性に対する XN の調節作用の有無について検証した。

【方法】OXC はコレステロールを高温加熱して酸化した後に、精製したものを用いた。5 週齢の Wistar 系雄性ラットに AIN76 基準食を与えた対照群（C 群:n=6)、基準食に 0.25%の OXC を添加した飼料を与えた OXC 群(O 群:n=6)、あるいは基準食に 0.25%の OXC と 1%の XN を添加した XN 群(X 群:n=6)の 3 群に分け、2 週間飼育した後に解剖し、肝臓と血漿の脂質代謝及び抗酸化各パラメータ、糞中に排出されたステロイドレベル、ならびに各臓器の OXC レベルを解析した。

【結果と考察】成長パラメータについては、肝臓、精巣上体白色脂肪組織及び褐色脂肪組織の各重量は C 及び O 群と比べて X 群は有意に低くなった。肝臓トリアシルグリセロールとコレステロール各レベルは C 群と比べて O 及び X 両群は有意に低くなった。この現象の一端は、肝臓の HMG-CoA 還元酵素の活性の低下と CYP7A1 の mRNA 発現の上昇が影響したためであることが明らかになった。また、糞中のステロイドレベルについては、中性ステロイド排出レベルは C 群と比べて O 群で上昇し、X 群ではさらに上昇した。この結果から XN は食事由来のコレステロールの小腸からの吸収を抑制する作用があると考えられた。肝臓と血漿との OXC レベルは C 群と比べて O 群で高くなったが、XN 摂取で低くなった。よって、XN はコレステロールと同様に小腸からの OXC 吸収を阻害することで OXC の組織への移行を抑制していると考えられた。今後、他の臓器の OXC レベルを解析し、また、XN による OXC の吸収抑制作用のメカニズムを検討する予定である。

Xanthohumol, Oxysterol, Polyphenol

講演番号：2A03a02
講演日時：3 月 26 日 09:41～ センター2 号館 A03 会場

ラットにおける酸化コレステロールの血中輸送動態

Blood transport of oxycholesterol in rats

○麻生 菜央[1]、青木 円花[1]、城内 文吾[2]、佐藤 匡央[2] ([1]九大院生資環、[2]九大院農)
○ Nao ASO[1], Madoka AOKI[1], Bungo SHIROUCHI[2], Masao SATO[2] ([1]Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu Univ., [2]Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Graduate School, Kyushu Univ.)

【目的】
酸化コレステロールとは、コレステロールが生体内に存在する酵素やラジカル反応により酸化されることで生成する物質の総称であり、動脈硬化症やアルツハイマー病など様々な疾患との関連が報告されていることから注目されている。しかし、酸化コレステロールの血中輸送動態については明らかにされていない。本研究では、超遠心法により分画した血漿中のリポタンパク質である VLDL、LDL および HDL とリポタンパク質を含まない画分 LDF (lipid deficiency fraction) に含まれる酸化コレステロールを定量し、血中輸送動態を明らかにすることを試みる。

【方法】
5 週齢の雄性 Jcl:SD 系ラットを 1 週間の予備飼育の後、AIN-76 組成に準じ、20%コーン油および 1%コレステロールを添加した Corn 食を与える C 群、20%ラードおよび 1%コレステロールを添加した Lard 食を与える L 群の 2 群を設定し、2 週間飼育を行った。飼育終了後、9 時間絶食条件下で大動脈採血により屠殺し、各臓器および組織を摘出し、重量を測定した。血漿は段階的超遠心分離法により、VLDL 画分（$\rho<1.006$）、LDL 画分（$1.006<\rho<1.063$）、HDL 画分（$1.063<\rho<1.21$）、LDF 画分（$1.21<\rho$）に分画した。
その後、各画分中および血漿中の総コレステロール濃度を酵素法により、酸化コレステロール 13 分子種の濃度を GC-MS を用いて測定した。さらに肝臓中のコレステロール濃度を比色法により、酸化コレステロール濃度を GC-MS を用いて測定した。

【結果および考察】
L 群の血漿中および VLDL、LDL 画分中コレステロール濃度は C 群と比較して有意に高値を示し、酸化コレステロール濃度は複数の分子種において C 群と比較して有意に高値を示した。一方で、肝臓中コレステロール濃度および酸化コレステロール濃度に群間で有意な差は見られなかった。これらのことから食餌脂肪酸組成の違いは VLDL および LDL 中の酸化コレステロール濃度に影響を及ぼすことが明らかとなった。
本研究により酸化コレステロール 11 分子種のリポタンパク質分布が明らかとなり、25-Hydroxycholesterol および 27-Hydroxycholesterol は HDL 中に多く存在していることが示唆された。これらの分子種は他の酸化コレステロールとは輸送動態が異なる可能性が示された。

oxycholesterol, hydroxycholesterol, lipoprotein

講演番号：2A03a03
講演日時：3 月 26 日 09:52～ センター2 号館 A03 会場

異系統のラットの脳における外因性酸化コレステロール分子種の移行性の違い

The difference in transferability of exogenous oxidized cholesterol to the brain in rats of different strains

○中堀 紘花[1]、石川 航也[2]、一色 祐佳[2]、長田 恭一[2] ([1]明治大院農、[2]明治大農)
○Hiroka NAKAHORI[1], Koya ISHIKAWA[2], Yuka ISSHIKI[2], Kyoichi OSADA[2] ([1]Meiji Univ Grad Sch, [2]Meiji Univ)

【目的】近年、高コレステロール血症とアルツハイマー型認知症との間に関連性があるのではないかと考えられており、コレステロールが酸化されて生成する酸化コレステロール(Oxc)は、その発症メカニズムの根底にあるのではないかという報告が見られる。また、生体内から検出される Oxc は内因性と外因性のものがあり、以前の研究から外因性 Oxc が脳に到達する可能性があることが示唆された。本研究では植物ステロールの蓄積性が高い SHR 系のラットに Oxc を与え、外因性 Oxc 分子種の脳組織への移行性及びそのメカニズムについて Wistar 系ラットとの違いについて比較検討した。
【方法】6 週齢 SHR 及び WKY 系雄性ラットに、AIN76 純化飼料を摂取させた Control 群、純化飼料に Oxc 混合物を 0.25%添加した飼料を与えた Oxc 群の 2 群に分け、2 週間飼育し 12 時間の絶食後麻酔を施して解剖し、血漿、肝臓、腎臓、心臓及び脳を採取した。各臓器と血漿に含まれる Oxc レベルは脂質抽出後、GC-MS に供して測定した。
【結果及び考察】以前の研究で Wistar 系ラットについて同様の研究を行った結果、肝臓及び血漿において 7β-hydroxycholesterol（7β-OHC）、cholestanetriol、5β-epoxycholesterol、5α-epoxycholesterol、4β-hydroxycholesterol、6-ketocholestanol（6-Keto）及び 7-ketocholesterol（7-Keto）のレベルが Control 群よりも Oxc 群で有意に高くなった。このことから、外因性の Oxc は小腸から吸収され肝臓に到達し、その後末梢組織に移行すると予想された。また、脳の様々な部位における主要な Oxc 分子種を測定したところ、7-Keto レベルは多くの部位で Control 群よりも Oxc 群で有意に高くなり、5-epoxycholesterol レベルには変化が見られなかった。よって、7-Keto は血液脳関門を通過しやすい分子種である可能性が考えられた。さらに、Oxc 分子種の排出に関わる主要な大脳の遺伝子レベルを測定したところ、CYP46A1 の発現のみ Oxc 群で高くなる傾向が見られた。このことから、脳内に移行した Oxc に対しては排出経路が活性化されない可能性が考えられた。そこで、Wistar 系と異系統である SHR 及び WKY 系ラットに Oxc 混合物を投与して大脳の主要な Oxc レベルを測定したところ、Wistar 系ラットでの結果と異なり 7β-OHC、6-Keto 及び 7-Keto の各レベルは、Oxc を投与した WKY 群と比較して、Oxc を投与した SHR ラット群でそれらのレベルが有意に高くなった。さらに、脳内における Oxc 分子種の排出に重要な役割を果たすことが報告されている ABCG1 及び CYP46A1 の遺伝子発現レベルは、SHR ラットに Oxc を投与した群では低くなった。また、腎臓や心臓では Oxc を投与した SHR 系ラットで WKY 系ラットと比較して多くの外因性 Oxc 分子種のレベルが高くなったことから、外因性 Oxc 分子種の体内移行性は SHR 系ラットで高くなる可能性が考えられた。したがって外因性 Oxc が脳へ移行する可能性、及びその排出に関わる因子の遺伝子発現量が脳に蓄積する Oxc 分子種レベルに影響することが考えられた。

oxysterol, cholesterol, brain

講演番号：2A03a04
講演日時：3 月 26 日 10:03～ センター2 号館 A03 会場

ラットにおける *Selenomonas ruminantium* 由来プラスマローゲンのリンパ吸収動態
Lymphatic absorption of plasmalogen derived from *Selenomonas ruminantium* in lymph-cannulated rats
○金濱 晶[1]、柏木 明子[2]、山田 美和[1]、西向 めぐみ[1]（[1]岩手大・総合科学、[2]弘前大・農学生命）
○Aki Kanehama[1], Akiko Kashiwagi[2], Miwa Yamada[1], Megumi Nishimukai[1] ([1]Iwate Univ., [2]Hirosaki Univ.)

【目的】エーテル型リン脂質の一種であるプラスマローゲン(Pls)は、ラジカル消去能を有し、アルツハイマー症や動脈硬化症など酸化ストレスが関与する様々な疾病において減少が確認されているため、人間の生理機能に重要な役割を有していると予想されている[Goodenowe D.B. et al., J Lipid Res. (2007), Nishimukai M. et al., Clin Chim Acta. (2014)]。これまでの研究において、動物の脳や海産生物などから抽出された Pls の動物における生理的学的な機能を調査した研究は行われてきたが、微生物由来 Pls を用いた研究はほとんどない。*Selenomonas ruminantium* は、細胞膜に Pls を含有する微生物として発見されており、本菌由来の Pls は、*sn*-1 位に 16:1、*sn*-2 位に 14:0 または 16:1 と、他の生物由来の Pls と比較して短い脂肪酸を有する[T. Watanabe et al., J. Gen. Appl. Microbiol., (1982)]。そこで本研究では、動物とは異なる構造を有する微生物由来 Pls が動物の生理機能に与える影響を明らかとすることを目指し、リンパカニュレーションを施したラットに微生物由来 Pls を含む脂質エマルジョンを経腸投与後、リンパへ放出された Pls の分子種を LC-MS/MS で解析し、微生物由来 Pls の吸収動態を検討した。
【方法】9～10 週齢の Wistar/ST 系の雄ラットを、AIN93-G に準拠した基本食で予備飼育後、胸管リンパ管（リンパ液採取用）および十二指腸（経腸投与用）にカテーテルを留置し、一晩回復後、微生物由来 Pls を含む脂質エマルジョン 1 ml を経腸投与した。7.5%トリオレイン + 1%タウロコール酸ナトリウムのエマルジョンを基本組成（Control 群）とし、試験群には微生物由来 Pls を 2.5%追加で添加した。エマルジョン投与開始から 6 時間、経時的にリンパ液を全量採取した。投与後 2～3 時間および脂質投与前のリンパ液の脂質抽出を行い、LC-MS/MS を用いて Pls の分子種分析を行った。
【結果と考察】微生物由来 Pls では、*sn*-1 位に 16:1、*sn*-2 位に 14:0 または 16:1 の脂肪酸を有するエタノールアミン型 Pls の存在比が高いが、ラット由来 Pls にはこれらの分子種を有する Pls はほとんど存在しない。しかし、小腸へ微生物由来 Pls を投与すると、リンパ中に *sn*-1 位に 16:1、*sn*-2 位に 16:1 または 14:0 の脂肪酸を有するエタノールアミン型 Pls が有意に増加した。さらに、*sn*-1 位に 16:1、*sn*-2 位に 20:4 の脂肪酸を有するエタノールアミン型 Pls の増加も確認された。この結果より、投与した微生物由来 Pls は小腸吸収上皮細胞へ吸収された後、投与物中の Pls と同じ脂肪酸組成に再合成されてリンパ中に放出される、または投与物中 Pls の *sn*-1 位の 16:1 は維持され、*sn*-2 位の脂肪酸のみがラットの優先種である 20:4 の脂肪酸へ変換されリンパ中へ放出されていると考えられた。

Plasmalogen, *Selenomonas ruminantium*, Lymphatic absorption

講演番号：2A03a05
講演日時：3 月 26 日 10:14～ センター2 号館 A03 会場

ペプチド輸送担体（PEPT1）欠損マウスでは、ジペプチド FP（Phe-Pro）のコレステロール代謝改善作用は消失する

FP(Phe-Pro) induced cholesterol-lowering action was disappeared in PEPT1 KO mice

○坂野 新太、森 崚輔、岡田 健司、王 吉力持、山本 雄太、二本松 太郎、長岡 利 (岐阜大応用生物科学)
○ Arata BANNO, Ryosuke MORI, Kenji OKADA, Jirato Ou, Yudai YAMAMOTO, Taro NIHONMATU, Satoshi NAGAOKA (Gifu Univ)

【目的】世界の死因の第一位を占める心疾患、脳血管疾患は動脈硬化が主な要因となって発症する。予防として血中 LDL レベルの低減化が重要である。我々はペプチド混合物である牛心臓タンパク質加水分解物（HPHU）がコレステロール（CHOL）代謝を改善することを報告した［1］。そこで、HPHU から CHOL 吸収やミセル溶解性を低下させる画分（IB2）を単離精製し、活性ペプチドの同定を試みた。最終的に新規 CHOL 代謝改善ジペプチド FP を 400 種のジペプチドから最初に発見した。また、FP の作用を解明するために、ヒト小腸モデルである Caco-2 細胞実験やラットおよびマウスによる動物実験で解析した。さらに、ペプチドトランスポーター（PEPT1）欠損マウスによる動物実験で解析した。
【方法】（1）CHOL ミセル溶解性を低下させる IB2 画分中のペプチドを MALDI-TOF/MS で同定した。（2）Caco-2 細胞で CHOL 吸収系に対する FP の影響を解析した。（3）Wistar 系雄ラット（4 週齢）に 20%カゼインを含む高脂肪高 CHOL 食を摂取させ、FP を 14 日間経口投与し、脂質代謝への影響を評価した。(4) C57BL/6J 雄マウス(6 週齢)に 20%カゼインを含む高脂肪高 CHOL 食を摂取させ、FP を 70 日間経口投与し、肥満を含む脂質代謝への影響を評価した。(5)野生型 C57BL/6J 雄マウス(8 週齢)および PEPT1 欠損マウス(C57BL/6J 雄)(8 週齢）に、20%カゼインを含む高脂肪高 CHOL 食を摂取させ、FP を 14 日間経口投与し、放射性標識をしたコレステロールを用いて FP の CHOL 吸収を含む脂質代謝への影響を評価した。
【結果】（1）IB2 画分から新規 CHOL 代謝改善ペプチド FP を同定した。（2）Caco-2 細胞において FP により CHOL 吸収が有意に減少した。FP は ABCA1、NPC1L1、ApoB、LXRβmRNA レベルの有意な減少作用を誘導した。(3) ラットの血清総 CHOL が有意に減少し HDL-CHOL が有意に増加した。また空腸 ABCA1mRNA レベルが有意に減少した。(4) マウスの総脂肪組織重量および血清 CHOL が有意に減少した。(5) 野生型マウスにおいて、CHOL 吸収、血清総 CHOL、肝臓 CHOL および肝臓脂質が有意に減少した。本研究から、従来発見されていなかった動物実験で有効な抗肥満作用およびコレステロール代謝改善作用の両方に有効なジペプチドとして、FP を世界で最初に発見した[2]。さらに、ジペプチド FP の CHOL 代謝改善作用が PEPT1 を介して発揮されることを明らかにし、PEPT1 は CHOL 代謝を制御するための新規標的分子であることを発見した。

[1] *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73, 607-612 (2009)
[2] 脂質代謝改善剤、特願 2018-037464

PEPT1, Phe-Pro, ABCA1

発表責任者：長岡 利（nagaoka@gifu-u.ac.jp）

講演番号：2A03a06
講演日時：3 月 26 日 10:35～ センター2 号館 A03 会場

アイスプラントに含まれる脂肪代謝促進活性を有する物質の解析

Analysis of lipid metabolism activator in *Mesembryanthemum crystallinum*

○山形 純輝[1]、古川 岳人[1]、蔡 晃植[1,2,3] ([1]長浜バイオ大・バイオ、[2]長浜バイオ大院・バイオ、[3]長浜バイオ大・ゲノム編集研究所)
○Junki YAMAGATA[1], Takehito FURUKAWA[1], Fang-Sik CHE[1,2,3] ([1]Nagahama Institute of Bio-Science and Technology, [2]Graduate School of Bioscience, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology, [3]Genome Editing Research Institute, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology)

南アフリカ原産の多肉植物であるアイスプラント（*Mesembryanthemum crystallinum*）は、機能性成分を多く含むことが知られている。これまでに、アイスプラント粉末混合高脂肪食をマウスに与えると体重の増加が抑制されることが報告されている。このことから、アイスプラントが脂肪代謝促進効果もしくは脂肪蓄積抑制効果のある物質を持つ可能性が示唆された。しかし、それらの効果を有する物質は同定されていないため、我々はアイスプラントに含まれる脂肪代謝促進効果を有する物質の探索を行った。

乾燥させたアイスプラントからヘキサン、50%メタノール、超純水で抽出を行った後、各画分をマウス初代肝細胞に添加して、脂肪代謝に関わる核内受容体である *Peroxisome Proliferator Activated Receptor*（*PPAR*）α遺伝子とその下流で制御される遺伝子の発現量を定量的 RT-PCR により解析した。その結果、50％メタノール抽出画分を添加したマウス初代肝細胞で *PPARα*やその下流で制御される *CPT1-A*、*PGC1-α*、*UCP2* の発現量が上昇した。この結果から、50％メタノール抽出画分には PPARα を活性化する活性物質が存在することが判明した。そこで、この PPARα活性化物質を精製するために PPARα活性化能を指標とした検定系を確立するため、COS-7 細胞に、酵母由来の転写因子 GAL4 の DNA 結合ドメインとヒト由来の PPARα のリガンド結合ドメインの融合タンパク質を発現するベクターと GAL4 の応答配列の下流にルシフェラーゼ遺伝子を組込んだベクターを同時導入し、PPARα を活性化することが知られている WY14643 を加え、ルシフェリンを添加して発光強度を測定したところ、高い活性が認められた。そこで、この検定系にアイスプラントからの各抽出物を添加して PPARα活性化能を調べたところ、50%メタノール抽出画分に高い PPARα促進活性が認められた。そこで、肥満モデルマウスである C57BL/6JJcl マウスに、正常餌、高脂肪食、高脂肪食に 50%メタノール抽出画分を 0.03 mg/ml もしくは 1.0 mg/ml 含むものを連続経口投与し、体重、臓器重量、血糖値を測定した。その結果、肝臓重量において、コントロール群に比べて 50%メタノール抽出画分を含む高脂肪食を与えた群では有意に減少した。現在、この PPARα活性化物質をカラムクロマトグラフィーなどにより精製を行っている。

lipid metabolism, Peroxisome Proliferator Activated Receptorα, *Mesembryanthemum crystallinum*

講演番号：2A03a07
講演日時：3 月 26 日 10:46～ センター2 号館 A03 会場

ATP 消費作用を介した緑茶カテキンの中性脂肪分解機構

Possible lipolysis mechanisms of green tea catechins via ATP consumption

○吸原 慧紀、石坂 朱里、村上 明（兵庫県立大学大学院・環境人間学研究科）
○Satoki SUIHARA, Akari ISHISAKA, Akira MURAKAMI (Dept. of Food Sci. and Nutr., Sch. of Human Sci. and Environ., Univ. of Hyogo, Japan)

【目的】

緑茶カテキンは抗肥満作用を示すが、詳細なメカニズムは不明である。緑茶カテキンを含むファイトケミカルは動物にとってストレッサーであり、それらに対するストレス防御機構が活性化する[1, 2]。また、ストレス防御機構の活性化は ATP に依存している。このことから、緑茶カテキンによってストレス防御機構が誘導され ATP を消費することでエネルギー欠乏状態となるが、糖質の取込や脂質分解により ATP を産生し、これらが結果的に血糖値上昇抑制作用や抗肥満作用につながると推察した。そこで本研究では、緑茶カテキンの脂質分解機構についてエネルギー代謝の観点から解析した。

【方法】

脂質を蓄積させたヒト肝がん Huh-7 細胞に、high-（4.5 g/L）または low-glucose（LG）（1.0 g/L）0%FBS-DMEM を用いて濃度 100 μM の各種カテキン［epicatechin（EC）、epigallocatechin（EGC）、epicatechin-3-gallate（ECG）、epigallocatechin-3-gallate（EGCG）］を添加し、細胞内 Triglyceride（TG）、ATP、可溶性および不溶性タンパク質量、培地内 glucose 量の定量などを行った。

【結果・考察】

上記の 4 種カテキン添加後 32 時間での脂質分解作用を検討したところ、EGCG が最も TG 量の減少を示したため、以降の検討は EGCG を用いた。次に、EGCG による細胞内 ATP 量の変動を継時的に解析した。LG 条件下において、5 および 15 分後で細胞内 ATP 量が有意に減少し、15 分後と比較して 60 分後で有意に増加した。さらに、培地内の glucose 量を継時的に解析したところ、LG 条件下において、30、60 および 120 分後で有意に減少した。このことから、EGCG は ATP 消費作用を示し、その後、ATP 量を補うために、glucose や TG を供給源として ATP を産生させた可能性が示唆された。また、EGCG 添加後 3 時間における、不溶性タンパク質および可溶性タンパク質の定量を行ったところ、LG 条件下において、DMSO と比較して不溶性タンパク質量が有意に増加し、可溶性タンパク質量が有意に減少した。このことから、EGCG はタンパク質ストレスを与えることでタンパク質品質管理機構を活性化し、それに伴う ATP の消費が脂肪分解機構に関与する可能性が示唆された。

【参考文献】

[1] K Ohnishi *et al.*, *PLoS ONE*, 8(3), e58641 (2013).
[2] C Valentine *et al.*, *J. Clim. Biochem. Nutr.*, 65(2), 1-8 (2019).

catechins, lipolysis, ATP

発表責任者：村上　明（akira@shse.u-hyogo.ac.jp）

講演番号：2A03a08
講演日時：3 月 26 日 10:57～ センター2 号館 A03 会場

ウロリチン A が 3T3-L1 細胞および皮下脂肪に対して脂肪蓄積抑制作用をもつ。

Uurolithin A possess anti-adipogenic effects on 3T3-L1 cells and Subcutaneous fat.

○堀本 泰弘[1]、中谷 祥恵[1]、中林 なつみ[1]、工藤 眞丈[2]、中島 賢則[2]、卯川 裕一[2]、古旗 賢二[1] ([1]城西大薬科、[2](株) ダイセル・コーポレート研)
○Yasuhiro HORIMOTO[1], Sachie NAKATANI[1], Natumi NAKABAYASHI[1], Masataka KUDOH[2], Takanori NAKAJIMA[2], Yuichi UKAWA[2], Kenji KOBATA[1] ([1]Josai Univ., [2]Daicel Corporation Corporate Research Center)

【目的】エラグ酸（EA）はベリーやザクロなどに含まれるポリフェノールで、抗酸化能を有することが知られている。EA の摂取は抗肥満作用及びインスリン抵抗性改善作用などを示すことがマウスを用いた研究で報告されている。EA は腸管からの吸収性が低く、腸内細菌によりウロリチン（U）類に代謝された後、結腸で吸収されていることがヒト臨床試験で明らかにされている。したがって、EA 摂取後の抗肥満作用の一部はU類が担っている可能性があるが、U類に関する研究はEAと比較して少ない。そこで本研究では、U 類の中でも血中で最も検出される UA の抗肥満作用について、前駆脂肪細胞株及び肥満誘発マウスを用いて検討した。
【方法】前駆脂肪細胞株である 3T3-L1 細胞を播種後、24 時間後に EA、UA を終濃度 10、50、100 μM 添加した。24 時間後に WST-1 法を用いて 3T3-L1 細胞の増殖に与える影響を検討した。また、EA、UA で添加の 2 日目に脂肪分化誘導培地で 7 日間培養した。培養 9 日目に Oil red O 染色を用いて 3T3-L1 細胞の脂肪滴蓄積量を評価した。また、5 週齢の雄性 C57 BL/6J マウスを通常餌（N 群）、高脂肪餌（HF 群）、0.05%UA 含有高脂肪餌（HF+UA 群）の 3 群に分け、12 週間自由摂取させた。体重は 7 日毎に、摂食量は 2-3 日毎に測定した。内臓脂肪および皮下脂肪は腰椎（Lumbar: L）の L2-4 の範囲の腹部脂肪を測定し、実験動物用 3D マイクロ X 線 CT 法で測定した。
【結果】EA、UA は 10、50、100 μM の濃度において細胞毒性を示さずに、脂肪滴蓄積量を濃度依存的に有意に減少させた。体重および皮下脂肪を比較した結果、HF 群は N 群と比較し有意に増加し、HF+UA 群は HF 群と比較し有意に低下した。内臓脂肪および肝臓重量を比較した結果、HF 群および HF+UA 群は N 群と比較し有意に増加し、HF+UA 群は HF 群と比較し減少傾向にあった。
【考察】UA は前駆脂肪細胞株の脂肪滴蓄積を抑制することが明らかになった。また、UA の摂取は高脂肪餌による皮下脂肪重量の増加および体重増加を抑制することを明らかにした。これらの結果から、EA で報告されている抗肥満作用の一部は、その代謝物である UA によるものであることが示唆された。

obesity, polyphenol, Urolithin A

発表責任者：古旗　賢二（Kobata@josai.ac.jp）

講演番号：2A03a09
講演日時：3 月 26 日 11:08～ センター2 号館 A03 会場

光親和性標識法によるマウス脂肪細胞におけるフコース相互作用分子の探索
Investigation of fucose-interacting proteins in mouse adipocytes by photoaffinity labeling
○中尾 友彦[1]、小南 友里[1]、渡邉 壮一[1]、細谷 孝充[2]、潮 秀樹[1] ([1]東大院農、[2]東京医科歯科大)
○Tomohiko NAKAO[1], Yuri KOMINAMI[1], Soichi WATANABE[1], Takamitsu HOSOYA[2], Hideki USHIO[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]TMDU)

【目的】
L-フコース（L-fucose，6-deoxy-L-galactose）は ABO 式血液型の糖鎖分子であり，ヒトの母乳にも含まれるなど身近な単糖である．これまでに演者らは，L-フコースがマウスにおいて内臓脂肪蓄積抑制作用や脂質異化作用，抗 2 型糖尿病ホルモンであるアディポネクチン多量体の分泌促進作用を示すことを明らかにした．マウスにおける抗肥満作用は確認されたものの，脂肪細胞における作用機序については未だ不明である．そこで，本研究では脂肪細胞内外において L-フコースが標的とする分子を同定することを目的とし，フコース光架橋型プローブを合成した．
【方法】
L-フコース，p-maleimidophenyl isocyanate，L-システイン，NHS-ジアジリンからなる光架橋型プローブを合成した．マウス 3T3L1 脂肪細胞の細胞破砕試料に光架橋型プローブを混和し，30 分間インキュベート後，365nm の紫外線を 10 分間照射した．得られた試料について還元後 SDS-PAGE を行い CBB にて染色した．対照区として L-フコースを細胞破砕試料に混和し同様の処理を行なった．対照区とのディファレンシャル解析で差が認められたバンドを切り出し，トリプシン消化後 NanoLC-MS/MS にて受容分子の同定を行った．
【結果】
40,70,140,250 kDa 付近のバンドの染色強度に変化が認められた．プローブを混和した試料の 40 および 70 kDa のバンドにおいて，それぞれ GDP-L-fucose synthase，Alpha-(1,3)-fucosyltransferase 10 が同定された．これより，合成したプローブがフコース受容分子に受容することが示唆された．プローブ混和時のみに同定されたタンパク質の中で，Acetyl-CoA acetyltransferase，Acetyl-Co A acetyltransferase 3，Serine beta-lactamase-like protein LACTB など脂質代謝に関わるタンパク質が確認された．また，EH domain-containing protein 2 など糖代謝に関わるタンパク質も確認された．一方，プローブ混和によって分子量がシフトしたタンパク質の中には，遺伝子制御系に関わる transcription elongation factor SPT6 やタンパク質リン酸化に関与する serine/threonine-protein kinase TAO3 などが確認された．以上の結果から，抗肥満作用はこれら分子が関連する細胞内情報伝達機構を介して起るものと示唆された．

l-fucose, lipid metabolism, photoaffinity labeling

発表責任者：潮　秀樹（aushio@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A03a10
講演日時：3 月 26 日 11:19～ センター2 号館 A03 会場

腸内細菌が産生する脂肪酸代謝産物のヒト iPS 小腸モデルを用いた生理機能解明
Identification of a physiological function of fatty acid metabolites by intestinal bacteria using hiPSC intestinal organoids.
○野口 惇[1]、清水 誠[1]、高橋 裕[1]、岸野 重信[2]、小川 順[2]、山内 祥生[1]、佐藤 隆一郎[1]([1]東大院・農生科・応生化、[2]京大院・農・応用生命)
○ Makoto NOGUCHI[1], Makoto SHIMIZU[1], Yu TAKAHASHI[1], Shigenobu KISHINO[2], Jun OGAWA[2], Yoshio YAMAUCHI[1], Ryuichiro SATO[1] ([1]Dept. of Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. of Agr. and Life Sci., Univ. of Tokyo, [2]Appl. Life Sci., Kyoto Univ.)

肥満や糖尿病の患者数は世界規模で増加し続けている。これらの疾患の主要な原因に過食や運動不足など生活習慣の変化等が挙げられるが、腸内細菌叢の変化が宿主の代謝恒常性や生活習慣病の病態と相関することが明らかとなってきた。しかし、腸内細菌と宿主代謝に関する詳細な分子機構は不明である。近年、不飽和脂肪酸を飽和化あるいは水和化する酵素や中間体が乳酸菌から特定された。乳酸菌の大半は小腸管腔に存在し、そこで産生された代謝産物は小腸に取り込まれ機能を発揮することが予想される。我々は乳酸菌由来不飽和脂肪酸代謝産物のヒト小腸における生理機能を解明することを目的に、ヒト iPS 細胞由来小腸オルガノイド調整法を新たに開発し、それらを用いた研究を行った。

まず、乳酸菌由来脂肪酸により活性化される核内受容体を探索した。ヒト小腸で高発現する種々の核内受容体のリガンド結合ドメインと GAL4 DNA 結合ドメインを融合したプラスミドを用いて HEK293T 細胞でのルシフェラーゼアッセイによるスクリーニングを行った。その結果、乳酸菌由来代謝産物は peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) αと PPARδを選択的に活性化することが示された。中でも、γ-リノレン酸 (GLA) 由来の複数の脂肪酸は特に高いリガンド活性を示した。次に、PPARs を高発現するヒト由来培養細胞の HepG2 細胞を用いて、GLA 由来脂肪酸が内在性の PPARαおよび PPARδを活性化するか検証した。GLA 由来脂肪酸を添加しリアルタイム PCR により PPARαや PPARδ標的遺伝子の発現変動を解析した。その結果、これらの標的遺伝子は濃度依存的な発現上昇を示した。また、PPARαあるいは PPARδ選択的アンタゴニストにより標的遺伝子の発現上昇は阻害された。さらに、iPS 細胞由来ヒト小腸オルガノイドを用いて GLA 由来脂肪酸を添加し遺伝子発現解析を行った。その結果、脂肪酸β酸化に関連する PPARαや PPARδ標的遺伝子の発現上昇が認められた。また、オレイン酸添加により細胞内にトリグリセリド (TG) を蓄積させ、GLA 由来脂肪酸による影響を解析した。その結果、PPARαや PPARδ合成アゴニスト同様に GLA 由来脂肪酸は細胞内 TG を減少させることが確認された。

本研究で用いたヒト iPS 細胞由来小腸オルガノイドは幹細胞ならびにその分化細胞から成る細胞群集であると同時に、組織を模倣した立体構造を維持しており、ヒト生体内で生じる生理応答を検出するための有力なツールであると考えられる。以上のように、乳酸菌代謝産物である GLA 由来脂肪酸が PPARαおよび PPARδのデュアルアゴニスト活性を有し、ヒト小腸細胞に直接作用して細胞内脂質蓄積を抑制することが示唆された。

microbiota, fatty acid metabolites, human intestinal organoids

講演番号：2A03a11
講演日時：3 月 26 日 11:40～ センター2 号館 A03 会場

柿由来ペクチンが小腸絨毛形態変化と栄養吸収能に及ぼす影響の解析

Analysis of the effects of pectin from persimmon on morphological changes and nutrient absorption of small intestinal villi

○後藤 咲季[1]、伊藤 賢一[2]、大野 真貴[2]、北口 公司[1,3]、矢部 富雄[1,3,4]([1]岐阜大院・連合農学、[2]一丸ファルコス、[3]岐阜大・応用生物科学、[4]生命の鎖統合研究センター)
○Saki GOTOH[1], Kenichi ITO[2], Maki OHNO[2], Kohji Kitaguchi[1,3], Tomio YABE[1,3,4] ([1]Gifu Univ., United Grad. Sch. of Agric. Sci., [2]Ichimaru Pharcos CO., [3]Gifu Univ., Grad. Sch. Appl. Bio. Sci., [4]G-CHAIN)

【背景】水溶性食物繊維の一種であるペクチンは，すべての陸生植物の細胞壁と中葉組織とに偏在している。ペクチンは非常に複雑な構造を有する多糖類であり，その分子構造は由来する植物種や組織によって大きく異なっている。ペクチンの摂取は，小腸絨毛の形態に影響を及ぼすことが様々な動物実験を通して知られているが，その生理的意義については未だ明らかとなっていない。これまでに，様々な生理機能を有する柿に注目し，柿から抽出したペクチンの構造的特徴について明らかにしてきた。本研究では，「ペクチン摂取による小腸絨毛の伸長が，栄養吸収効率に有意に作用する」という仮説を立て，柿由来ペクチンが小腸絨毛形態変化とそれに伴う栄養吸収能に及ぼす影響の解析を目的とした。
【方法】小腸上皮様モデル細胞である分化 Caco-2 細胞に対してペクチンを添加し，この際のバソラテラル側培地を陰窩増殖細胞様の未分化 Caco-2 細胞に添加し，細胞増殖を確認した。また，この時の分化 Caco-2 細胞における Intestinal alkaline phosphatase (IAP)活性を測定することで，ペクチン添加による栄養吸収能への影響について検討した。さらに，分化 Caco-2 細胞から得た cDNA を用いて，糖およびカルシウムの吸収に関連する遺伝子発現の調査を行った。
【結果】小腸上皮細胞への柿ペクチン添加により，未分化 Caco-2 細胞の有意な増殖が確認された。また，食事性因子と関連している IAP の活性は，ペクチン添加によって減少することが分かった。さらに，糖およびカルシウムの透過吸収遺伝子発現量を調査した結果，12 時間培養時のペクチン添加群で，糖の吸収関連遺伝子である GLUT2 およびカルシウムの吸収関連遺伝子である Cav1.3 の有意な増加が確認された。
【結論】小腸上皮に柿ペクチンが接触することで陰窩の増殖細胞が増加し，小腸絨毛の形態が変化することが示唆された。また，柿ペクチン摂取による小腸絨毛形態変化によって，細胞の飢餓状態を誘導し，その結果，小腸における糖およびカルシウムといった栄養素の吸収効率を上昇させ得ることが示された。

pectin, small intestinal villi, persimmon

発表責任者：後藤咲季（x6103004@edu.gifu-u.ac.jp）

講演番号：2A03a12
講演日時：3 月 26 日 11:51～ センター2 号館 A03 会場

クレソンに含まれるウレア化合物の機能性解析

Analysis of health effects of Ureas in Watercress

○中屋 慎[1,2]、庄條 愛子[3]、水野 淨子[3]、藤原 永年[4]、北村 進一[1] ([1]大阪府立大学、[2]大手前栄養製菓学院専門学校、[3]相愛大学、[4]帝塚山大学)
○ Makoto Nakaya[1,2], Aiko Shojo[3], Seiko Mizuno[3], Nagatoshi Fujiwara[4], Shinichi Kitamura[1] ([1]Osaka Prefecture University, [2]Otemae College of Nutrition and Confectionery, [3]Soai University, [4]Tezukayama University)

葉物野菜として知られるクレソン（オランダガラシ，*Nasturtium officinale*）は生活習慣病予防・改善効果が知られており，一般的に，この効果は植物体内に蓄積されるグルコシノレート（GL）や，その代謝物であるイソチオシアネート(ITC)に因ると解釈されている。しかし，GL は内在性の分解酵素により速やかに ITC などへと分解される点や，生成した ITC やイソシアネート（IC）は反応性が高くアミンや水などと容易に反応する点を考慮すると，クレソンの機能性には，GL や ITC だけでなく，その反応生成物が関与している可能性がある。近年，IC とアミンの反応物であるウレア（UR）は，血圧上昇に関与する可溶性エポキシドヒドロラーゼ(sEH)の阻害活性が高いことが報告された。生体内で GL や ITC から UR が生成するメカニズムは解明されていないが，我々はウレアがクレソンの機能性成分のひとつであると仮説をたて，脂質代謝改善効果に着目した検証を行った。

HPLC-MS^2 分析により，クレソンはフェネチルイソチオシアネート(PE-ITC)及び 1,3-ジフェネチルウレア(PE-UR)を含むことがわかった。そこで，これらの物質がクレソンの脂質代謝改善効果に寄与するかを動物実験により調べた。まず，ヒト可溶性エポキシヒドロラーゼ(sEH)に対する PE-ITC, PE-UR の作用を in vitro で評価したところ，共に阻害活性を示し，特に PE-UR は PE-ITC の 10 倍強い阻害活性を有することがわかった。次に，2 物質をそれぞれ Wistar ラットに経口投与摂取し，末梢血における濃度を継時的に調べたところ，PE-ITC，PE-UR 共に摂取量依存的に血中濃度が上昇したことから，これらの物質は消化管から末梢血へと移行することがわかった。最後に，高ショ糖・高脂肪食摂取 C57BL/6 マウスにクレソン粉末及び PE-ITC，PE-UR をそれぞれ 4 週間自由摂取させ，脂質代謝改善効果を調べた。実験群には，クレソン粉末を 2.5%含む餌を摂取するクレソン群（C 群），C 群が摂取する PE-ITC，PE-UR の相当量をそれぞれ摂取する ITC 群，UR 摂取群，及び対照群の計 4 群を設定した。C 群，ITC 群，UR 群は対照群に比べ肝臓重量や精巣周辺脂肪量が低下したことなどから，PE-ITC，PE-UR は経口摂取により脂質蓄積を抑制することがわかった。一方で，ITC 群では盲腸内容物重量が他群に比べ著しく少なく，イソチオシアネート類がもつ殺菌効果により微生物量が低減した可能性が考えられた。

クレソンに特徴的な物質である PE-ITC 及び PE-UR は，経口摂取により体内に吸収され sEH 阻害活性を有する物質であることがわかった。また，継続的摂取により脂質蓄積を抑制することを明らかにした。現在，sEH 阻害活性と脂質蓄積抑制効果との関連について研究を進めている。

Watercress, Ureas, Lipid metabolism

発表責任者：中屋　慎（mnakaya@otemae.ac.jp）

講演番号：2A03a13
講演日時：3 月 26 日 12:02～ センター2 号館 A03 会場

胆汁酸吸着剤による盲腸内短鎖脂肪酸の産生促進と腸管 IgA 分泌の促進

Cholestyramine, a bile acid sequestrant, increases cecal short-chain fatty acids and intestinal immunoglobulin A in mice

西田 紗希、堀之内 歩、東村 泰樹、赤堀 玲奈、○松本 健司（石川県大生資環）
Saki NISHIDA, Ayumu HORINOUCHI, Yasuki HIGASHIMURA, Reina AKAHORI, ○Kenji MATSUMOTO (Ishikawa Prefectural Univ.)

【目的】胆汁酸吸着剤は胆汁酸の再吸収を阻害し、胆汁酸の便への排泄を促進する。胆汁酸の便への排泄促進はコレステロール代謝だけでなくエネルギー代謝にも影響を与えるため、胆汁酸吸着剤の薬効としてコレステロール低減効果に加え、血糖値低減効果が認められている（日本では前者のみ）。我々は食品中の胆汁酸吸着物質を研究する中で、ポジティブコントロールとして陰イオン交換樹脂であるコレスチラミンを用いていたが、コレスチラミンの摂取で盲腸内短鎖脂肪酸量が増加するという新たな知見を得た。本研究ではマウスを用いた動物実験において、高脂肪食および通常食におけるコレスチラミンの摂取での盲腸内短鎖脂肪酸量の変化と、短鎖脂肪酸によって誘導促進が報告されている腸管 IgA の発現について明らかにすることを研究の目的とする。
【方法】リサーチダイエット社の高脂肪飼料（45kcal% fat content, 4.73 kcal/g）にコレスチラミンを 2%添加した飼料を C57BL/6J マウス（オス、8 週齢）に 12 週間摂取させた（n=8）。10 週目に 48 時間分の糞を採取し、解剖時に血液および盲腸内容物を回収した。盲腸内容物中の短鎖脂肪酸（酢酸、プロピオン酸、酪酸）量について脂肪酸分析キットを用いて HPLC で分析した。また、糞は凍結乾燥後に粉砕し、ELISA 法により IgA 量を測定した。続いて、リサーチダイエット社の通常精製飼料（10 kcal% fat content, 3.85 kcal/g）にコレスチラミンを 1%または 2%添加した飼料を C57BL/6J（オス、8 週齢）に 8 週間摂取させた。投与開始前、4 週目、8 週目に 48 時間分の糞を採取し、8 週間後に解剖を行い、血液、盲腸内容物および大腸組織を回収した。盲腸内短鎖脂肪酸量および糞中 IgA 量について高脂肪食実験と同様に解析し、大腸組織切片についてヘマトキシリンエオジン染色で観察を行った。
【結果】高脂肪食における実験において、盲腸内の酢酸、プロピオン酸、酪酸量はコントロール群と比較して有意に増加していた（1.5 倍程度）。また、糞中 IgA 量は 1.7 倍増加していた。通常食実験において 1%、2%群共にプロピオン酸が有意に増加しており（1.5 倍程度）、酢酸と酪酸についても増加傾向が見られた。糞中 IgA に関しては 1%、2%共に有意に増加していた（2 倍程度）。また、すべての測定項目について 1%と 2%実験群には有意差は見られなかった。通常食の大腸組織観察では炎症等の異常は確認されなかった。これらの結果から、胆汁酸吸着剤であるコレスチラミンの摂取は盲腸内の短鎖脂肪酸を増加させること、さらには短鎖脂肪酸により誘導される腸管 IgA の産生も増加することが明らかになった。

bile acid sequestrant, short-chain fatty acid, IgA

発表責任者：松本健司（kmatsu@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：2A03p01
講演日時：3 月 26 日 13:50～ センター2 号館 A03 会場

えぐ味成分ホモゲンチジン酸の分子挙動解析

Characterization of molecular behavior of homogentisic acid with harsh taste (egumi)

○前迫 一輝[1]、黒田 彩歌[2]、坂本 裕香[2]、伊藤 圭祐[3]、赤川 貢[4]、石井 剛志[1,2] ([1]神戸学院大院栄養、[2]神戸学院大栄養、[3]静岡県大食栄、[4]大阪府大院生命環境)
○Kazuki Maesako[1], Ayaka Kuroda[2], Yuka Sakamoto[2], Keisuke Ito[3], Mitsugu Akagawa[4], Takeshi Ishii[1,2] ([1]Grad. Sch. of Nutrition., Kobe Gakuin Univ., [2]Depart. of Nutrition., Kobe Gakuin Univ., [3]Depart. of Food and Nutrition. Sci., Grad. Sch. of Integrated Pharmaceutical and Nutrition. Sci., Univ. of Shizuoka, [4]Div.of Appl. Life Sci., Grad. Sch. of Life & Environmental Sci., Osaka Pref. Univ.)

【目的】味覚は、摂食物に含まれる物質を口腔内で味として感知し、その嗜好性から摂食の可否を判断するために備わった感覚である。えぐ味は、灰汁(あく)の味として認知されている舌や喉に不快な違和感を与える忌避性の味覚様刺激である。えぐ味の発現については、苦味と渋味の混合味によるとの報告やそれらの味とは異なる独立した感覚であるとの報告がなされているが、機構解明には至っていない。先行研究において我々は、苦味成分と渋味成分の分子挙動を詳細に解析することで、両成分が全く異なる分子特性を有することを報告している。本研究では、タケノコのえぐ味成分のひとつであるホモゲンチジン酸(HGA)の生体成分に対する分子挙動を解析し、得られた結果を苦味成分や渋味成分の結果と比較することで、えぐ味の発現機構に関する新たな知見を集積することを目的とする。
【方法】分子挙動を比較・解析する試料には、えぐ味成分として HGA、苦味成分としてケルセチン(Que)、渋味成分としてエピガロカテキンガレート(EGCg)を用いた。HGA の呈する苦味と渋味は、味認識装置により評価した。各試料の親油性(Log*P*)は、Chem Draw を用いて理論値を算出した。各試料の疎水性および生体成分に対する親和性は、ODS カラム、リン脂質膜結合カラム、血清アルブミン結合カラムを備えた HPLC により評価した。各試料の細胞膜に対する分子挙動は、人工リン脂質膜を用いる膜透過性試験あるいは膜結合量測定により評価・解析した。各試料のタンパク質に対する分子挙動は、カゼインあるいは血清アルブミンをモデルタンパク質として利用する電気泳動法により評価・解析した。
【結果・考察】味認識装置による評価において、HGA は渋味センサに対し微弱な応答を示したが、苦味センサに対して応答を示さなかったことから、苦味と渋味の混合味であることは確認できなかった。親油性、疎水性および生体成分に対する親和性の評価において、HGA は Que の示す疎水性の性質や EGCg の示す両親媒性の性質を備えておらず、両物質に比べてタンパク質やリン脂質膜に対する親和性が著しく低かったことから、HGA と Que あるいは EGCg では、分子特性の共通性に乏しいことが示唆された。分子挙動解析において、HGA は苦味の発現に重要な分子特性をほとんど備えていなかった。また、HGA は渋味成分である EGCg と同様に細胞膜透過性が低いものの、EGCg とは異なり細胞膜表面に対する結合能やタンパク質凝集能を備えておらず、渋味の発現に重要な分子特性の多くを備えていなかった。
【結論】えぐみ成分の HGA は、苦味成分や渋味成分とは異なる分子挙動を示すことが明らかとなった。えぐ味は、苦味と渋味の混合味ではなく、独立した味質として独自の発現機構を介する可能性がある。

Harsh taste, Astringency, Homogentisic acid

発表責任者：石井 剛志（ishii_t@nutr.kobegakuin.ac.jp）

講演番号：2A03p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ センター2 号館 A03 会場

小麦ふすま含有成分が全粒粉パンの製パン特性および風味に与える影響
Effects of wheat bran ingredients on baking property and flavor of whole wheat bread
○松田 里菜[1]、岡 大貴[2]、辻井 良政[2]、野口 智弘[3]、高野 克己[2]([1]東京農大院・農化 、[2]東京農大応生・農化、[3]東京農大応生・食加技セ)
○Rina MATSUDA[1], Daiki OKA[2], Yoshimasa TSUJII[2], Tomohiro NOGUCHI[3], Katsumi TAKANO[2]
([1]Agrichem., Agr., Grad. Sch., Tokyo Univ. Agric., [2]Dept. Agrichem., Fac.Biosci., Tokyo Univ. Agric., [3]FPC, Fac. Biosci., Tokyo Univ. Agric.)

【目的】
小麦全粒粉は歩留まり 60%粉に比べ栄養価が高く、ふすまに含まれる様々な成分に富み、近年の健康志向の高まりを受けその需要が高まっている。ふすま成分の存在によって全粒粉のパンは特有の風味を示すが、全粒粉の風味や製パン性に関する詳細な検討はあまりみられない。我々は、全粒粉の製パン特性や風味に及ぼすふすま含有成分の影響を解明することを目的とし、本報告では小麦粒の外層を部分的に研磨した小麦粒より小麦粉を調製し、焼成したパンに含まれる低分子量化合物等を測定することで、全粒粉の風味に与える要因を解析することを試みた。
【方法】
試料の小麦には「ゆめかおり」（平成 30 年・神奈川県産）用い、 小麦粒をピーリング装置にて一回または二回表層を研磨後、水冷石臼方式ミル（ウエスト社）にて製粉した。小麦粉中の酵素活性はαおよびβ - アミラーゼを測定し、製パンはホームベーカリー（パナソニック社）を用い、糖質や脂質を添加しないフランスパン様の配合で行った。ガス発生量・ガス漏えい量は、混捏終了後の生地を用いファーモグラフ（アトー社）にて測定した。GC/MS（アジレント社）を用いて小麦粉、発酵前後の生地､ホイロ後の生地およびクラムの低分子量化合物量を測定し､統計解析ソフト(GL サイエンス社)にて解析した。味覚センサー（インテリジェントセンサーテクノロジー社）にてクラムの味の評価を行った。
【結果】
小麦粒の研磨歩留まりは一回研磨で 94.5%、二回研磨で 87.7%であった。小麦粉のタンパク質量はいずれも約 15.5%であった。小麦粉中のアミラーゼ活性量は、未研磨が最も高く次いで一回研磨、二回研磨であった。製パン中のガス発生量は未研磨が高く、次いで一回研磨、二回研磨であった。ガス漏えい率は二回研磨小麦粉で低く、未研磨、一回研磨では同程度であった。製パン工程中の低分子量化合物の様相は、小麦粉では研磨による差異はみられなかったが、製パン工程が進むにつれ化合物量が多く検出されるようになり、研磨回数の違いで纏まりがみられ、様相に差異が生じた。クラムの味は、未研磨を基準としたときに苦味雑味が一回研磨で-0.55、二回研磨で-2.23 となり、一般苦味も研磨により低減した。パン中の苦み成分として報告のあるトリプトファン量も研磨により比率が減少した。

Whole grain wheat bread, Wheat bran, Dough fermentation

講演番号：2A03p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ センター2 号館 A03 会場

超長期熟成したビールの「熟成香」に寄与する香気成分に関する研究
Investigation into Flavor Compounds Contributing to 'Aging Aroma' of Long-term Aged Beer
○大畠 麻由[1]、小杉 隆之[2]、實方 綾子[1]、高澄 耕次[1]、谷川 篤史[2]、蛸井 潔[2]、金子 剛[1]、土屋 陽一[1] ([1]サッポロホールディングス株式会社　価値創造フロンティア研究所、[2]サッポロビール株式会社)
○ Mayu OHATA[1], Takayuki KOSUGI[2], Ayako SANEKATA[1], Koji TAKAZUMI[1], Atsushi TANIGAWA[2], Kiyoshi TAKOI[2], Takeshi KANEKO[1], Youichi TSUCHIYA[1] ([1]Frontier Laboratories for Value Creation, SAPPORO HOLDINGS LTD., [2]SAPPORO BREWERIES LTD.)

【背景・目的】
一般にビールは、発酵後数週間低温で熟成され、そののち酵母等の固形物を除去し、容器に充填される。容器詰めされたビールは、長期間保存すると風味の劣化（老化）が認められる。一方、昨今ブームとなっているクラフトビールの中には、年単位で長期間の熟成を行う「エイジドビール」が存在する。これらのビールの熟成方法や条件は様々であるが、長期間熟成することで、老化とは異なるポジティブな香味の変化がもたらされると考えられてきた。しかしながら、このような変化に着目した研究はほとんど行われていなかった。そこで本研究では、低温にて長期間熟成したビールを用いて、熟成による香味変化に寄与する成分を探索することを目的とした。

【方法・結果】
＜熟成に寄与する成分の探索＞
本研究の対象としては、0 ℃以下の低温で 3 年 6 ヶ月熟成した後、珪藻土ろ過により清澄化させ、缶に詰めたビール（「熟成品」）を使用した。比較には、熟成品と同じ仕様で約 5 週間熟成したビール（「対照品」）を使用した。熟成品と対照品との間に差のある成分を探索した結果、対照品と比較して熟成品で多い成分が複数認められ、中には老化で増加するとされている成分とは異なる成分も認められた。
＜定量分析＞
定量は、熟成品と対照品で差のある成分、およびビールの老化で増えると過去に報告されている成分を対象とした。サンプルは上記 2 つのビールに加えて、老化のモデルとして 37℃下で加速保存試験に供した対照品（「老化品」）を用いた。その結果、老化品で熟成品より高い成分群（A 群）と、熟成品で老化品より高い成分群（B 群）が存在することが明らかとなった。
＜官能評価＞
定量結果をもとに、市販品ビールに各成分群を熟成品に相当する濃度で添加し、官能評価を実施した。その結果、A 群と B 群の両方を添加したビールは、市販品ビールおよび A 群のみを添加したビールと比べて「熟成様」のスコアが高くなった。したがって、今回見出した B 群が熟成によるポジティブな香味の変化に寄与している可能性が示唆された。

aged beer, GC-MS, aroma

発表責任者：大畠　麻由（Mayu.Ohata@sapporoholdings.co.jp）

講演番号：2A03p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ センター2 号館 A03 会場

GC×GC-TOFMS を用いた後発酵茶の香気特性の解明
Investigation of aroma characteristics in post-fermented teas by GC×GC-TOFMS
○岩出 亜美[1]、大塚 祐季[1]、松神 麻美[2]、樺島 文恵[2]、森山 洋憲[3]、下藤 悟[3]、柏木 丈拡[1]、島村 智子[1]、受田 浩之[4]([1]高知大・農、[2]LECO ジャパン、[3]高知県工技セ、[4]高知大・地域創造セ)
○Ami Iwade[1], Yuuki Otsuka[1], Asami Matsukami[2], Fumie Kabashima[2], Hironori Moriyama[3], Satoru Shimofuji[3], Takehiro Kashiwagi[1], Tomoko Shimamura[1], Hiroyuki Ukeda[4] ([1]Faculty of Agriculture and Marine Science, Kochi University, [2]LECO Japan Corporation, [3]Kochi Prefectural Industrial Technology Center, [4]Center for Regional Sustainability and Innovation, Kochi University)

【目的】微生物発酵茶とも呼ばれる後発酵茶は、その製造に微生物が関与することにより生じる独特の風味が特徴的である。日本では、高知県の碁石茶、徳島県の阿波晩茶、愛媛県の石鎚黒茶などが知られている。これまで、後発酵茶の香気成分分析には一次元 GC-MS が用いられ、主要香気成分の同定が行われてきた。しかしながら、微量香気成分や製法と香気成分生成の関連については未だ不明な点が多い。そこで本研究では、高い分離性及び解析能を有する GC×GC-TOFMS を用いて後発酵茶の香気成分分析を行い、各種茶の香気成分の特徴及び違いについて詳細に調べた。

【方法】分析試料として、不発酵茶の緑茶及び 5 種類の後発酵茶 (好気発酵茶: バタバタ茶 (富山県)、嫌気発酵茶: ミエン (タイ)、阿波晩茶、二段階発酵茶: 碁石茶、石鎚黒茶) を用いた。味分析には味認識装置 (TS-5000、Intelligent Sensor Technology, Inc. 製) を用い、各試料の酸味、塩味、旨味、苦味、渋味、旨味コク、苦味雑味、渋味刺激を評価した。また、香気成分分析には GC×GC-TOFMS (Pegasus 4D, LECO Corp.製) を用い、一次、二次カラムにはそれぞれ、Stabilwax (30 m×0.25 mm I.D) 及び DB-5ms (1.3 m×0.18 mm I.D) を使用した。得られたクロマトグラムについて、Chroma TOF 4.72 (LECO Corp.製) を用いてピーク検出及びライブラリ検索を行った。

【結果】味認識装置を用いて各種茶の味の数値化を行ったところ、不発酵茶である緑茶に比べ 5 種の後発酵茶は酸味が強く、塩味、旨味、渋味が弱い傾向にあった。また、製法ごとに味の特徴が類似していることが判明した。香気成分分析においては全試料から計 1994 本の化合物由来のピークが検出された。得られたデータを統合し、有意差の指標となる Fisher Ratio 値を算出した後、未推定化合物を含む FR 値 5 以上の計 1014 種の成分について主成分分析及びクラスター分析を行った。主成分分析の結果、味と同様、発酵工程の有無や製法の違いにより香りも変化し、製法ごとに類似した傾向が認められた。一方、二段階発酵茶の碁石茶と石鎚黒茶については味パターンが類似していたのに対し、香気成分については差異が認められた。クラスター分析におけるデンドログラムから製法ごとに関与成分を抽出したところ、好気発酵茶では 2-heptanol (グリーン臭)、嫌気発酵茶では 1-penten-3-one (胡椒様)、二段階発酵茶では 6-methyl-5-hepten-2-one (果実様) 等が新たに同定された。以上の結果より、上記化合物を含む複数の化合物により、後発酵茶の香りの差異が生じていると推察された。

post-fermented tea, aroma analysis, GCxGC-TOFMS

発表責任者：島村 智子 (tomokos@kochi-u.ac.jp)

講演番号：2A04a01
講演日時：3 月 26 日 09:30～ センター2 号館 A04 会場

愛知県額田郡幸田町産・筆柿果実のポリフェノールについての検討

Investigation of polyphenol in the fruits of Fudegaki persimmon

○保田 倫子[1]、西脇 志保[1]、江間 陽菜[1]、永田 晃久[2]、矢田 友和[2]([1]椙山大生活、[2]JA あいち三河)
○ Michiko YASUDA[1], Shiho Nishiwaki[1], Haruna Ema[1], Akihisa Nagata[2], Tomokazu Yada[2] ([1]Sugiyama Univ., [2]JA Aichi-Mikawa)

【背景】愛知県額田郡幸田町は、西三河地方唯一の町村であり、その特産品である筆柿は、幸田町とその周辺地域で主に栽培されている品種である。しかし、筆柿は、後継者不足や、地元周辺住民にとって特産物としての価値が認められていないことが原因で、特産物としての将来が危ぶまれている。筆柿は、甘柿と渋柿の果実が一つの樹でなる不完全甘柿である。また、筆柿はその名前のとおり、筆の形をした柿である。他の品種の柿のポリフェノール等の機能性成分については、多数の報告があるが、筆柿については、ほとんど報告がない。そこで、本研究では、筆柿の果実について、甘柿、半渋柿、渋柿に分類し、ポリフェノールを中心にそれぞれに含まれる成分についての検討を行った。また、渋柿と判定された筆柿は、アルコールにより脱渋し、出荷される。脱渋によるポリフェノール量の変化についても検討した。
【方法】筆柿果実を、近赤外分光法を利用した筆柿渋自動判別機により、甘柿、半渋柿、渋柿に分類した。果実を果皮および果肉に分ける際、果肉中の種と果実の様子を比較し、分類の正確さを確認した。凍結乾燥後、ホモゲナイザーにより粉砕し、実験に用いるまで凍結保存をした。アセトン、80%エタノール溶液抽出物中の総ポリフェノール量を、フォーリン-チオカルト法により測定した。また、抽出物について、DPPH ラジカル消去活性を調べた。
【結果・考察】果皮のアセトン抽出液については、甘柿、半渋柿、渋柿の順で総ポリフェノール量が少ないことがわかった。また、果皮の 80%エタノール抽出物では、渋柿の総ポリフェノール量が最も多かった。果肉については、アセトン抽出液では各群でほぼ差が見られなかったが、 80%エタノール溶液抽出物では渋柿で最も総ポリフェノール量が多かった。脱渋柿と渋柿について総ポリフェノール量を検討したところ、果肉については、アセトン抽出液については差が見られなかったが、80%エタノール抽出物では脱渋により、顕著に減少していることがわかった。アセトンおよび 80%エタノールで抽出後の残渣から DMSO 抽出を行なったが、この DMSO 抽出液については、脱渋により総ポリフェノール量が増加した。脱渋した果実の果皮についても、果肉と同様な傾向が見られた。DPPH ラジカル消去活性については、総ポリフェノール量との相関が見られたものもあった。柿の渋味成分と言われている、プロアントシアニジンは、様々な機能性について、近年、報告されている。筆柿についても同様にプロアントシアニジンが渋味成分として予想され、現在、総プロアントシアニジンの量について検討中である。

Fudegaki, Persimmon, Proanthocyanidin

発表責任者：保田 倫子（yasuda@sugiyama-u.ac.jp）

講演番号：2A04a02
講演日時：3 月 26 日 09:41～ センター2 号館 A04 会場

Delphinidin 誘導性 microRNA の細胞外小胞を介した筋萎縮抑制作用
Delphinidin-induced microRNA suppresses muscle atrophy via sEV

○丸亀 裕貴[1]、村田 希[1,2]、後藤 萌[1]、藤村 由紀[1]、立花 宏文[1] ([1]九大院農院・生機科、[2]愛媛大学 学術支援センター)
○Yuki MARUGAME[1], Motoki MURATA[1,2], Megumi GOTO[1], Yoshinori FUJIMURA[1], Hirofumi TACHIBANA[1] ([1]Kyushu Univ., [2]ADRES, Ehime Univ.)

Delphinidin はベリー類等に含まれるフラボノイドの一種であり、抗炎症作用、抗がん作用、筋萎縮抑制作用など多彩な生理活性を有することが報告されている。一方、microRNA (miRNA) は約 20 塩基の一本鎖ノンコーディング RNA であり、標的 mRNA への相補的な結合を介してその遺伝子の発現を負に制御することが知られている。当研究室ではこれまでに、Delphinidin が骨格筋において筋萎縮予防 miRNA の一種である miR-23a の発現を上昇させ、筋萎縮抑制作用を発揮することを見出している。しかしながら、Delphinidin は体内への吸収率が非常に低く、その作用メカニズムについては不明な点が多い。そこで我々は、Delphinidin により小腸で発現誘導された miR-23a が exosome をはじめとした細胞外小胞 (sEV) に内包され骨格筋に輸送されると仮定し、検討を行った。

C57BL/6 雄性マウスに Delphinidin (20 mg/kg b.w.) を経口投与し、小腸、血漿ならびに大腿四頭筋における miR-23a 発現量を評価した。その結果、小腸において miR-23a 発現量が増加する傾向が見られるとともに、血漿および大腿四頭筋において miR-23a 発現量が増加した。次に、腸管上皮細胞様に分化させた Caco2 細胞に Delphinidin を添加後、細胞内および培養上清中の miR-23a 発現量を評価した。その結果、Delphinidin 添加により基底膜側培養上清中の miR-23a 発現量が増加した。さらに、Delphinidin を添加した Caco2 細胞の管腔側および基底膜側培養上清から超遠心法により sEV を回収し、sEV 中 miR-23a 発現量を評価したところ、Delphinidin 添加により基底膜側 sEV 中の miR-23a 発現量が増加した。

続いて、Caco2 細胞由来 sEV が標的細胞に与える影響について検討を行った。Caco2 細胞の基底膜側培養上清から回収した sEV を蛍光標識し、マウス筋芽細胞株 C2C12 へ添加したところ、C2C12 細胞への取り込みが確認された。さらに、Delphinidin を添加した Caco2 細胞の基底膜側 sEV の添加は、C2C12 細胞における miR-23a 発現量を増加させた。

以上の結果より、Delphinidin は小腸からの miR-23a 含有 sEV の分泌を促進するとともに、骨格筋における miR-23a 発現量を増加させることで筋萎縮抑制作用を発揮する可能性が示された。

Delphinidin, extracellular vesicle (sEV), microRNA

講演番号：2A04a03
講演日時：3 月 26 日 09:52～ センター2 号館 A04 会場

緑茶摂取によるヒト血球細胞における DNA メチル化調節作用

Effect of ingesting green tea on DNA methylation regulation in blood cells

○山本 真生[1]、廣井 舜[1]、熊添 基文[1]、藤村 由紀[1]、山本（前田）万里[2]、花房 俊昭[3]、立花 宏文[1]
([1]九大院農院、[2]農研機構、[3]大阪医科大)
○ Mao YAMAMOTO[1], Shun HIROI[1], Motofumi KUMAZOE[1], Yoshinori FUJIMURA[1], Mari YAMAMOTO (MAEDA)[2], Toshiaki HANAFUSA[3], Hirofumi TACHIBANA[1] ([1]Kyushu Univ., [2]National Agriculture and Food Research Organization, [3]Osaka Medical Col.)

エピジェネティックな変化とは DNA の塩基配列変化を伴わない遺伝子制御であり、DNA 複製と細胞分裂を経た後も次世代の細胞へ伝達されるという特徴がある。エピジェネティックな変化の代表として DNA メチル化が知られており、神経細胞などへの分化を制御している他、様々ながんにおいてメチル化の異常が生じていることが知られている。一方、緑茶は古くから日本人に親しまれ、近年では抗がん作用、抗アレルギー作用、血糖値上昇抑制作用など多数の生理作用を有することが明らかにされている。しかしながら、緑茶の摂取がエピジェネティクスに及ぼす影響はこれまで報告されていない。そこで本研究では、緑茶摂取によるエピジェネティックな変化を明らかにすることを目的として、DNA のメチル化に着目して検討を行った。

ヒト緑茶介入試験において、介入試験以前に緑茶カテキンを摂取する習慣が無い男女各 6 名の介入前後の DNA を 465,683 ヶ所の DNA メチル化部位（CpG 部位）が包括的に測定可能な DNA メチル化ビーズアレイ（Illumina Infinium Human Methylation 450K BeadChip ：Illumina Inc.）に供した。被験者全体の介入前後の CpG 部位メチル化レベルの平均値をもとに解析を行ったところ、測定した CpG 部位の 99.99%以上の部位において、介入前後におけるメチル化レベルの変動幅は 10%以下であった。一方、介入前後における DNA メチル化レベルの変動幅が 20%以上あり、かつ被験者間でメチル化レベルの増減の方向が一致している CpG 部位が 7 ヶ所存在することが明らかになった。

また、これら 7 ヶ所のうち最もメチル化レベルが変動していたのは DPF2 遺伝子上の CpG 部位であった。そのため介入被験者のヒト血球細胞内における DPF2 mRNA 発現量を測定したところ、介入後で有意に変動していることが明らかになった。DPF2 はアポトーシス応答に重要な因子として知られており、緑茶の摂取が DPF2 の発現量を変動させることで細胞の増殖・生存に関わる可能性が示された。

green tea, epigenetics, methylation

講演番号：2A04a04
講演日時：3 月 26 日 10:03～ センター2 号館 A04 会場

小腸オルガノイドを利用したデオキシニバレノールの影響評価

Effects of Deoxynivalenol on intestinal organoids

○羽生 ひかる[1]、岩槻 健[2]、齋藤 由季[1]、輿石 沙織[1]、丹野 星亜[1]、只石 幹[1]、清水 誠[1]、服部 一夫[1] ([1]東農大栄養、[2]東農大食品安全)
○Hikaru Hanyu[1], Ken Iwatsuki[2], Yuki Saito[1], Saori Koshi-ishi[1], Seia Tan-no[1], Miki Tadaishi[1], Makoto Shimizu[1], Kazuo Hattori[1] ([1]Dept. of Nutritional Science, Tokyo Univ. of Agri., [2]Dept. of Food Safety, Tokyo Univ. of Agri.)

【背景・目的】デオキシニバレノール（Deoxynivalenol :DON）は、穀類に汚染した *Fusarium* 属によって産生され、汚染された食物の摂取は主に消化器系の障害を引き起こす。DON の小腸に対する *in vitro* 毒性評価は、これまで株化細胞を用いて行われてきたが、絨毛・クリプト構造を持たないこと、消化管のすべての細胞種（幹細胞や分化細胞）を含んでいないことなどの制約があった。近年、消化管幹細胞から各種の分化細胞までを含む消化管オルガノイドの培養が可能となり、生体により近い *in vitro* の系として様々な分野において活用されている。我々は、マウス幹細胞由来の小腸オルガノイドを用いて、DON の新しい評価系の確立することを目的とした。小腸オルガノイドは内側が管腔側、外側が基底膜側という立体構造を有することから、今回は DON の暴露経路（管腔または基底膜側）による小腸への影響の違いを検討した。
【方法】小腸オルガノイドは C57BL/6J マウス及び Lgr5-EGFP マウスの空腸から分離したクリプトを三次元的に培養することにより作製した。小腸オルガノイドに終濃度 1 μM DON をマイクロインジェクションすることで管腔側への DON 暴露を行った。また、1 μM DON を培地に添加することで基底膜側への暴露を行った。DON 暴露後、小腸バリア機能を評価するため、培地に 10 kDa 蛍光デキストランを添加し、4 日間ライブイメージングを行うことでオルガノイド内へ流入するデキストランの蛍光強度を測定した。さらに、DON 暴露 3 日後、小腸上皮を構成するたんぱく質の免疫染色を行った。また、増殖活性を評価するため、DON 暴露 24 時間後に EdU assay を行った。さらに、増殖活性に最も影響を与えると考えられる小腸幹細胞を可視化した遺伝子組み換えマウス（Lgr5-EGFP マウス）からオルガノイドを作製し、24 時間ライブイメージングを行うことで幹細胞への影響を評価した。
【結果・考察】蛍光デキストランを用いた実験において、DON の基底膜側からの暴露により Lumen における蛍光強度が増加した。さらに、DON の基底膜側暴露をした小腸オルガノイドの免疫染色において、タイトジャンクション構成たんぱく質（ZO-1）の構造の変化が認められた。また、EdU assay において、DON の基底膜側からの暴露により増殖活性が低下し、Lgr5-EGFP マウスから作製した小腸オルガノイドのライブイメージングにおいても、Lgr5 陽性幹細胞の減少がみられた。一方で、DON 管腔側暴露による影響は、いずれの試験についても PBS をインジェクションした小腸オルガノイドと比して差が認められなかった。これらの結果から、DON の小腸への影響は基底膜側からの暴露の方が大きいことが明らかとなった。

Deoxynivalenol, Intestine, Organoid

講演番号：2A04a05
講演日時：3 月 26 日 10:14～ センター2 号館 A04 会場

空間学習および記憶に対する菱外皮のポリフェノールの効果
Effect of polyphenols from water chestnut (*Trapa japonica*) husk on the spatial learning and memory.
○岸川 由紀[1]、安田 みどり[2]、小松 洋平[1]、藤原 和彦[1]、宮原 洋八[1] ([1]西九大リハ、[2]西九大健栄)
○Yuki KISHIKAWA[1], Midori YASUDA[2], Youhei KOMATSU[1], Kazuhiko FUJIWARA[1], Hiroshi MIYABARA[1] ([1]Dept. Reha., Nishikyushu Univ., [2]Dept. Health and Nutrition, Nishikyushu Univ.)

【目的】菱は、アジアやヨーロッパで育つ水生植物であり食品や漢方薬として使用されてきた。菱の外皮には、ポリフェノールが多く含まれ、高い抗酸化能をはじめ、血糖値の上昇抑制作用や血中の中性脂肪の低下作用などが明らかになっている。しかし、菱外皮のポリフェノールにはこのような生理機能は認められているものの、認知能力の効果については未だ解明されていない。そこで本研究では、菱外皮のポリフェノールに着目し、認知機能改善にどのように影響しているかを調べることを目的とした。
【方法】対象は、雄性マウス C57BL/6JJmsSlc（BL）とインスリン非依存型（Ⅱ型）糖尿病モデルマウスである C57BLKS/J Iar -+Lepr^{db}/+Lepr^{db}（DM）を各群 10 匹使用した。方法として、BL マウスは菱外皮のポリフェノール 80 mg/kg p.o.（BLP）、DM マウスは菱外皮のポリフェノール 40（DMP40）および 80（DMP80）mg/kg p.o.を与えた。コントロール群は同量の水を与えた（BLW、DMW）。6 週齢から経口投与を行い、投与開始 10 週目からモリス水迷路試験、オープンフィールド試験、新奇物体認知試験、Y 字迷路試験を実施した。認知行動試験終了後、酸化ストレス・抗酸化力測定および生化学検査を行った。
【結果・考察】BLP および DMP80 はコントロール群と比べて認知行動試験を実施する以前まで有意に低体重を示し、加齢に伴う体重増加が抑制されていることが考えられた。抗酸化力は BLW に対して BLP で有意に高値であったが、DM マウスでは差がなかった。生化学検査では、インスリン抵抗性を改善するアディポネクチンとインスリン抵抗性を惹起する TNF-α、遊離脂肪酸において、BLW と比べて BLP はアディポネクチンの有意な上昇と TNF-α の有意な減少を示し、DMW と比べて DMP40、DMP80 は遊離脂肪酸の有意な減少した。モリス水迷路試験の結果、BLW と比べて BLP は記憶学習能力の上昇を示した。また、8 日間の休息後にターゲットの場所を変更し再度試験を行ったところ、トレーニング開始から 3 日目で、BLP および DMP80 ともにコントロール群と比べて有意に速くターゲットに到達した。これにより、高度な学習である記憶の変換能力の向上が示唆された。オープンフィールド試験では BLW と比べて BLP が有意な自発運動量増加を示し、DM マウスは装置中央部への探索行動は極めて少なかった。また、新奇物体認知試験、Y 字迷路試験では認知能力の変化がみられなかった。今回の結果から、長期に及ぶトレーニングによる空間学習と記憶保持に菱外皮のポリフェノール摂取が関与していることが示唆された。

polyphenol, water chestnut, cognition

発表責任者：岸川由紀（kisikawayu@nisikyu-u.ac.jp）

講演番号：2A04a06
講演日時：3 月 26 日 10:35～ センター2 号館 A04 会場

エクオール産生能とダイジンの代謝におよぼす胆汁酸の影響

Impact of bile acid on equol production status

○平井 愛実、吉岡 寛子、戸田 登志也（武庫川女子大）
○Manami HIRAI, Hiroko YOSHIOKA, Toshiya TODA (Mukogawa Women's Univ.)

【目的】

エクオール（Eq）は、大豆イソフラボンの 1 つであるダイゼイン（De）の腸内細菌による代謝産物であり、大豆食品摂取による多くの健康効果に影響を与えることが知られている。日本人は欧米人と比較して Eq 産生者が多いとされているが、約 50%は非産生者であり、若年層では産生者の割合が低下しているといわれている。われわれは、マウスへのコール酸投与により、盲腸内のデオキシコール酸（DCA）が顕著に増加し、Eq への変換が阻害されることを昨年度の本大会で報告した。高脂肪食の摂取による胆汁酸分泌量の増加は、二次胆汁酸の腸内細菌への影響を介して、Eq の産生を抑制している可能性がある。本研究では、若年女性を中心に Eq 産生能の評価を行うとともに、Eq 産生者の糞便培養を行い胆汁酸類が Eq 代謝におよぼす影響について検討した。

【方法】

被験者 9 名について 3 日間連続して大豆食品（イソフラボンアグリコン換算 68 mg/day）を摂取させた後、4 日目の早朝第 1 尿の採取を 2 回行った。尿は脱抱合後、Sep-Pak 処理を行い分析に供した。また、すべての被験者から糞便を採取し、ダイジン（D）を含む BHI 培地に添加してガスパックによる嫌気培養を 37℃で 4 日間行った。培養液は、酢酸エチルで抽出を行い分析用サンプルとした。さらに D と各種濃度の DCA を加えた BHI 培地に Eq 産生者の糞便を添加して、同様の嫌気培養を行った。尿および糞便培養液中の D 代謝物の分析は、LC-MS/MS または HPLC により行った。

【結果および考察】

尿分析では被験者 9 名中、Eq 産生者 1 名、非産生者 7 名、2 回の採取で結果が異なった変動者は 1 名であった。非産生者の割合が極めて高く、また、比較的短期でも産生能が変化する場合があることが示された。糞便培養による産生能の評価では、産生者以外に尿分析で非産生であった被験者 1 名で Eq の産生が確認された。産生者の糞便を用いた培養試験では、DCA の添加によって配糖体である D からアグリコンの De への変換には何ら影響しなかったが、De から Eq への代謝は経時的、濃度依存的に阻害された。これらの結果から、被験者によっては、Eq 産生菌を有してはいるが、生体内においては何らかの要因によってその産生能が抑制されている可能性があり、その要因の 1 つとして胆汁酸類の影響が示唆された。

equol, bile acid, stool culture

発表責任者：戸田　登志也（ttoda@mukogawa-u.ac.jp）

講演番号：2A04a07
講演日時：3 月 26 日 10:46～ センター2 号館 A04 会場

緑茶抽出物摂取による血中 cGMP 濃度上昇とフラバノン類による増強
Flavanones enhanced the EGCG-induced increase in plasma cGMP levels.
○田中 愛健[1]、恩田 弘明[1]、畠山 結[1]、熊添 基文[1]、藤村 由紀[1]、米倉 円佳[2]、中曽根 光[2]、立花 宏文[1] ([1]九州大院農院・生機科、[2]トヨタ自動車・アグリバイオ事業部)
○ Yasutake Tanaka[1], Hiroaki Onda[1], Yui Hatakeyama[1], Motofumi Kumazoe[1], Yoshinori Fujimura[1], Madoka Yonekura[2], Hikaru Nakasone[2], Hirofumi Tachibana[1] ([1]Kyushu Univ., [2]Toyota Motor Corp.)

［背景・目的］緑茶カテキンの一種である(－)-epigallocatechin-3-*O*-gallate（EGCG）は抗がん作用や抗炎症作用等の多彩な機能性を有する食品因子である。我々は EGCG の機能性の発現にセカンドメッセンジャーの一種である環状グアノシン一リン酸（cGMP）の産生誘導が重要であることを明らかとした。この cGMP の血中濃度は抗肥満作用や血流改善作用と関連していることが知られている。しかしながら、EGCG のバイオアベイラビリティーは低く、生体内における機能性発現には多量の摂取が必要になる。一方、我々はフラバノンの一種であるエリオジクチオールががん細胞において EGCG の cGMP 産生誘導作用を増強することで抗がん作用を高めることを見出した。そこで本研究では、EGCG および緑茶抽出物の血中 cGMP 濃度上昇作用ならびにフラバノンによる増強効果について *in vivo* において検討した。
［方法］実験 1）C57BL/6J マウス（n = 6/group）に EGCG（30 or 100 mg/kg）を経口投与した。EGCG 低投与群にはフラバノン類としてエリオジクチオール、糖転移ヘスペリジンあるいはエリオシトリンを同時投与した。投与後にイソフルラン吸入麻酔下で採血を行い、血漿を得た。血漿中の cGMP 濃度は TR-FRET 法にて測定した。実験 2）C57BL/6J マウス（n = 6/group）に緑茶抽出物（EGCG 30 or 90 mg/kg 含有)および糖転移ヘスペリジンを経口投与した。投与後に得た血漿中の cGMP 濃度を測定した。
［結果］実験 1 において、EGCG の投与量に応じた血漿 cGMP 濃度の上昇を認めた。このとき、EGCG 低用量投与による血漿 cGMP 濃度上昇は、糖転移ヘスペリジンあるいはエリオシトリンの同時投与によって EGCG 高用量投与群の血漿 cGMP 濃度上昇を上回る水準まで増強された。実験 2 においても、緑茶抽出物単独投与による血中 cGMP 濃度上昇、ならびに糖転移ヘスペリジンの同時投与による増強作用を認めた。
［結論］緑茶や EGCG の摂取は血中 cGMP 濃度の上昇を誘導すること、また、フラバノンはこれらの血中 cGMP 濃度上昇作用を増強することを見出した。

food pairing, cGMP, EGCG

講演番号：2A04a08
講演日時：3 月 26 日 10:57～ センター2 号館 A04 会場

食品に含まれる *cis* lycopenes の生理活性に関する研究
Studies on bioactivities of *cis* lycopenes contained in foods
○酒見 裕香[1]、佐藤 加奈[1]、原 久瑠美[1]、本田 真己[2]、新藤 一敏[1] ([1]日女大・家政・食物、[2]名城大・理工)
○Yuka SAKEMI[1], Kana SATO[1], Kurumi HARA[1], Masaki HONDA[2], Kazutoshi SHINDO[1] ([1]Japan Women's Univ., [2]Meijo Univ.)

【目的】トマトなどの食材自体に含まれている lycopene は olefin 構造中の二重結合は all-*trans* 体である。しかしトマトを加熱調理すると、主に lycopene の二重結合の一つが *cis* 異性化した mono-*cis* lycopenes(主に 5-*cis*-lycopene, 9-*cis*-lycopene, 13-*cis*-lycopene)に変化することはよく知られている。またここまでに説明した *cis* lycopenes は加熱調理により人工的に作成されるものであるが､植物が lycopene を生合成する最終ステップ酵素であるシス-カロテン異性化酵素(CRTISO)が欠けているタンジェリン種トマト（主にヨーロッパで食用されるトマト）には 7, 9, 7', 9'-tetra-*cis*-lycopene (prolycopene)という olefin 構造中の 4 つの二重結合が *cis* 体となった lycopene が豊富に含まれている。

これまでの研究では mono-*cis* lycopenes については、生物学的利用能（腸管からの吸収効率）が all-*trans* 体より高いことは報告されている。しかしこれ以外は、*cis* lycopenes についての薬理活性に関する報告は一部の抗酸化活性を除いてほとんどない。そこで今回我々は、*cis* lycopenes の未報告の薬理活性を詳細に調べることを目的としている。

【方法】3 種類の mono-*cis* lycopene（5-*cis*-lycopene, 9-*cis*-lycopene, 13-*cis*-lycopene）については、我々のグループで確立した方法を用いて調整した。すなわちまずトマトペーストから純度の高い lycopene を調製し、これを CH_2Cl_2 に溶解した溶液を加圧用容器に入れて 80℃の湯浴中で 2 時間加熱した。その後、生成した mono-*cis* lycopenes を分取順相 HPLC（カラム：Nucleosil 300-5(250 mm)×3、溶媒：*n*-hexane : *N*,*N*-diisopropylethylamine（DIPEA）＝100 : 0.1）を行い、3 種類の mono-*cis* 体を単離精製した。精製した lycopene 100 mg から、純品の 13-*cis*-lycopene 1.3 mg, 9-*cis*-lycopene 2.0 mg, 5-*cis*-lycopene 1.6 mg が得られた。Prolycopene はタンジェリン種トマトである桃太郎ゴールド凍結乾燥粉末から CH_2Cl_2 抽出→シリカゲルカラムクロマトグラフィー（カラム:FL60D、展開溶媒：*n*-hexame-CH_2Cl_2(20:1)） で精製を行い、2.5 mg の純品を得た。*Cis* lycopenes の薬理活性としては、抗酸化活性（一重項酸素消去活性）と抗糖尿病活性（3T3-L1 前駆脂肪細胞の分化誘導促進活性）（いずれも lycopene で報告されている薬理活性）について詳細に検討することとした。

【結果及び考察】一重項酸素消去活性の活性（IC_{50}）は、lycopene (16 μM), 5-*cis*-lycopene (18 μM)、9-*cis*-lycopene (11 μM)、13-*cis*-lycopene (12 μM)、prolycopene (12 μM)であった。3T3-L1 前駆脂肪細胞の分化誘導促進活性は現在評価中であるが、all-*trans* 体では 5 μM で有意な促進活性が認められたのに対し、prolycopene と 5-*cis*-lycopene のみ 10 μM で有意な活性が認められている。

cis lycopenes, antioxidant activity, antidiabetic activity

発表責任者：新藤一敏（kshindo@fc.jwu.ac.jp）

講演番号：2A04a09
講演日時：3 月 26 日 11:08～ センター2 号館 A04 会場

大麦における米特有γ-オリザノール分子種の同定

Definitive evidence of the presence of rice-specific γ-oryzanol molecular species in barley

○伊藤 隼哉、澤田 一恵、仲川 清隆（東北大院農）
○Junya Ito, Kazue Sawada, Kiyotaka Nakagawa (Tohoku Univ.)

【目的】γ-オリザノール（OZ）は約 60 年前に米糠油から初めて単離された化合物であり、抗酸化作用や血中コレステロール低下作用といった様々な生理機能を有する。化学構造は、フェルラ酸とトリテルペンアルコールまたは植物ステロールのエステル縮合物であり、米をはじめとした種々の穀類に含まれている。従来、フェルラ酸 24-メチレンシクロアルタニル（24MCA-FA）をはじめとしたトリテルペンアルコール型 OZ は、米に特徴的に含まれ、他の植物体にはトリテルペンアルコール型 OZ がほとんど含まれないと報告されてきた。しかし、最近の報告や、我々の研究などにより、大麦にも 24MCA-FA が存在する可能性が示唆されている。さらに、我々は、米にはほとんど含まれない OZ 様の化合物（Barley-X）が大麦に存在する可能性を見出した。本研究では、大麦から 24MCA-FA と考えられる化合物（Barley-24MCA-FA）、および Barley-X を単離し、HPLC-MS/MS と NMR を用いてこれらの構造解析を試みた。

【方法】はじめに、24MCA-FA の標品を得るために、市販の米由来 OZ 混合物を、再結晶とフラッシュクロマトグラフィーにより精製して Rice-24MCA-FA を調製した。Rice-24MCA-FA について高分解能 MS や HPLC-MS/MS、各種 NMR、X 線構造解析から化学構造を確認した。続いて、大麦糠からヘキサンで脂質を抽出し、液-液抽出とフラッシュクロマトグラフィー、HPLC により精製して Barley-24MCA-FA と Barley-X を調製した。調製した両化合物を、米由来の 24MCA-FA 標品と比較しながら、高分解能 MS や HPLC-MS/MS、各種 NMR 解析により構造を詳細に検討した。

【結果・考察】各種分析の結果より、米由来の Rice-24MCA-FA の化学構造は、確かに 24MCA-FA であると確認し、24MCA-FA 標品として用いることとした。大麦糠から得られた Barley-24MCA-FA は、HPLC-MS/MS 分析において 24MCA-FA と同様の溶出時間とフラグメントイオンを示すピークとして検出され、各種 NMR のデータからも 24MCA-FA であることが確認された。一方、Barley-X は、高分解能 MS にて脱プロトン分子イオンの *m/z* 601.4262 が検出され、分子式は $C_{40}H_{58}O_4$ と推定された。さらに、^{1}H NMR、^{13}C NMR、HSQC、HMBC の各種スペクトルと NOE 相関の解析結果を 24MCA-FA と比較検証し、Barley-X はカフェ酸と 24-メチレンシクロアルタノールのエステル縮合物であるカフェ酸 24-メチレンシクロアルタニル（24MCA-CA）であることを明らかにした。また、24MCA-FA や 24MCA-CA が種々の大麦サンプル（品種）に含まれていることを確認した。本研究により、大麦にステロール型ではなくトリテルペンアルコール型の OZ が存在することを明確にし、米以外の植物体にもトリテルペンアルコール型 OZ が存在する可能性を示した。大麦は種々の加工食品の原料として利用されていることから、大麦が 24MCA-FA や 24MCA-CA の新たな供給源として活用されることが期待される。

γ-oryzanol, barley, structure determination

講演番号：2A04a10
講演日時：3 月 26 日 11:19～ センター2 号館 A04 会場

ヤマトシロアリ（*Reticulitermes speratus*）の脂肪酸組成
Fatty acids composition of subterranean termite (*Reticulitermes speratus*)
○小木曽 加奈[1]、村野 耕平[2]、古田 一匡[3]、杉山 英子[1]([1]長野県大健康発達、[2]長野県工技センター、[3]富士通株式会社)
○Kana KOGISO[1], Kohei MURANO[2], Kazumasa FURUTA[3], Eiko SUGIYAMA[1] ([1]Univ. of Nagano, [2]Nagano Pref. Gen. Ind. Tech. Center, [3]Fujitsu Ltd.)

【目的】
近年、ウシやヤギなどの反芻動物の食肉やその加工、また乳製品から作成される食品には共役リノール酸が検出され、この共役リノール酸は抗発がん作用や抗肥満作用、免疫賦活作用など多岐にわたる生理活性があるという研究がなされてきている。これらの共役リノール酸は反芻動物の第一胃内に生息する嫌気性セルロース分解細菌により生成されている。そこで嫌気性セルロース分解細菌を腸内に有するシロアリに着目した。今回用いたのはヤマトシロアリ（*Reticulitermes speratus*）である。ヤマトシロアリは日本における材木の害虫として良く知られているが、一方で自然界の分解者という役割を果たしている。ヤマトシロアリにそれらの脂肪酸を見出すことで薬用・食用素材としての価値があるかどうかを検討した。

【方法】
ヤマトシロアリ(*Reticulitermes speratus*)は長野県小川村で採取したものを用いた。シロアリは幼虫、職蟻、兵蟻、ニンフを分けない状態で 1.99 g をサンプルとして確保した。その後、クロロホルム：メタノールを 1:1 の割合で作成したものを抽出溶液とし、サンプルを 20 倍容にした。抽出溶液から溶媒を除いたエキスは 0.2881 g であった。このエキスから 0.096 g を試験管に分注後、ヘキサン 2 ml と 2 M KOH のメタノール溶液 0.2 ml を加えて、ボルテクスミキサーで 2 分間撹拌し、グリセリド脂肪酸をメチルエステル化させた。このヘキサン層を GC-MS にて測定を行った。

【結果・考察】
GC-MS の結果から、ヤマトシロアリからオレイン酸が 70%程度検出された。そのほか、ミリスチン酸、パルミチン酸、ペンタデカン酸、ステアリン酸のほか、C16 の脂肪酸類や共役リノール酸が検出された。薬用・食用素材として今後検討を進めたい。

【謝辞】川村勉様にはシロアリ採取において多大なるご協力を賜りました。この場をお借りして厚く御礼申し上げます。

Termite, Fatty acids, Screening

発表責任者：小木曽加奈（kogiso.kana@u-nagano.ac.jp）

講演番号：2A04p01
講演日時：3 月 26 日 13:50～ センター2 号館 A04 会場

食品由来機能性微粒子 EPDENs の取得と物性解析
Isolation and physical property analysis of Edible Plant Derived Exosome-like Nanoparticles
○野中 大成[1]、木村 颯花[1]、池田 正浩[2]、園田 紘子[2]、清水 正高[3]、河野 拓人[3]、高橋 幸毅[4]、大島 達也[4]、山﨑 正夫[2]、山﨑 有美[1] ([1]宮大地域、[2]宮大農、[3]宮崎工技セ、[4]宮大工)
○ Taisei NONAKA[1], Hayaka KIMURA[1], Masahiro IKEDA[2], Hiroko SONODA[2], Masataka SHIMIZU[3], Takuto KAWANO[3], Kouki TAKAHASI[4], Tatsuya OSHIMA[4], Masao YAMASAKI[2], Yumi YAMASAKI[1] ([1]Dep. Reg. Univ. Miyazaki, [2]Dep. Agr. Univ. Miyazaki, [3]Pref. Miyazaki, [4]Dep. Tech. Univ. Miyazaki)

【研究の背景】

近年、野菜や果実などの植物性食品に含まれるエクソソーム様のナノ粒子(Edible Plant Derived Exosome-like Nanoparticles;EPDENs)という因子とその機能性に関する研究成果が報告されている。EPDENs は、50～1000nm 程度の脂質二重膜を持つ微粒子で、種を超えて哺乳動物に対して生体調節機能を有することが明らかになってきていることから、新たな食品機能性因子として注目を集めている。これまでに報告されている EPDENs 含有食品として、ブドウ、グレープフルーツ、ショウガ、ニンジン、黒豆があるが、他の食品由来 EPDENs に関する報告は無い（Mu ら, Mol. Nutri. Food. Res, 2014 他）。また、上記食品由来 EPDENs がタンパク質、脂質、核酸を包含することが報告されているが、その他の因子に関する報告は無い。当研究者らは EPDENs がポリフェノールを包含することを明らかとしており、EPDENs は前述以外の因子を包含することが推察される。本研究では、種々の食用植物より EPDENs を分離し、その形態と内包物について検討した。

【方法】

EPDENs は、70 種類の植物性食品を用いて超遠心法により取得した。EPDENs の粒子径の測定では、Nano Particle Analyzer SZ-100 を用いて動的光散乱法により EPDENs の粒子径とその分布を測定した。EPDENs の形態観察では、凍結乾燥した EPDENs サンプルをオスミウムでコートし、走査電子顕微鏡を用いて EPDENs の形態を観察した。タンパク質解析は BCA 法及び SDS-PAGE 法にて、脂質解析は Folch らの方法にて、総ポリフェノール量の測定は Folin-Ciocalteu 法にて行い、RNA は RNA 抽出後アガロースゲル電気泳動法にて解析した。

【結果】

種々の植物性食品由来 EPDENs の粒子径を測定した結果、最も高い頻度で認められる EPDENs 粒子径において、オレンジ由来 EPDENs の最小径 90nm から長ネギ由来 EPDENs の最大径 200nm まで、幅広いサイズの EPDENs が食品中に含まれることが明らかとなった。70 種類の食品から選抜したカラーピーマン（緑、赤、橙、黄）由来 EPDENs の形態を、走査電子顕微鏡を用いて解析したところ、各サンプル中に約 100nm 程度の均一な粒子が認められた。同 4 種類のカラーピーマン由来 EPDENs のタンパク質、脂質、総ポリフェノール、RNA の含有について検討したところ、カラーピーマン由来 EPDENs は前述の因子を含有することが明らかとなった。

EPDENs,, exosome, nanoparticles

発表責任者：山崎有美（yamasakiy@cc.miyazaki-u.ac.jp）

講演番号：2A04p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ センター2 号館 A04 会場

食品由来機能性微粒子 EPDENs の乳がん抑制作用

Anti-tumor effect of Edible Plant Derived Exosome-like Nanoparticles in MCF-7 human breast cancer cells

○木村 颯花[1]、山崎 正夫[2]、福井 敬一[3]、吉山 佳世[3]、近藤 知巳[3]、山崎 有美[1] ([1]宮大地域、[2]宮大農、[3]JA 宮経連)
○ Hayaka KIMURA[1], Masao YAMASAKI[2], Keiichi FUKUI[3], Kayo YOSHIYAMA[3], Tomomi KONDO[3], Yumi YAMASAKI[1] ([1]Dep. Reg. Univ. Miyazaki, [2]Dep. Agr. Univ. Miyazaki, [3]JA Mz-kei)

【研究の背景】

近年、野菜や果実などの植物性食品に含まれるエクソソーム様のナノ粒子(Edible Plant Derived Exosome-like Nanoparticles;EPDENs)という新たな因子が注目されている。これまでに EPDENs の効果として、ブドウ由来 EPDENs がマウス炎症性腸疾患緩和作用を示すこと（Ju ら,Mol.Ther.,2013)、柑橘由来の EPDENs が *in vitro*, *in vivo* においてアポトーシスを亢進すること（Raimondo ら, Oncotarget, 2015）等が報告されており、EPDENs が種を超えて哺乳動物に対して生体調節機能を有することが明らかになってきている。また、食品として経口摂取された EPDENs は、ヒト体内で消化を受けることなく吸収され他の臓器に移行することが報告されていることから、体内に生じた疾患部位に EPDENs が到達し機能を発揮しているものと推察される。本研究では、種々の食用植物より EPDENs を分離し、乳がん抑制作用について評価した。

【方法】

EPDENs は、70 種類の植物性食品を用いて超遠心法により取得した。取得した EPDENs は、PBS に懸濁し細胞試験に供した。EPDENs のタンパク量を BCA 法にて測定し、各サンプルの EPDENs 処理濃度を、タンパク量を指標として決定した。乳がん抑制作用の評価では、細胞播種密度 5.0 x 10^4cells/mL、5%FBS-DMEM 培地で培養したヒト乳がん細胞株 MCF-7 に 10%濃度の EPDENs を処理し培養後、細胞増殖/細胞毒性測定用試薬 Cell Counting Kit-8 を用いて生細胞数を測定した。70 種類の食品から、カラーピーマンを選抜し、緑、赤、オレンジ、黄の 4 色のカラーピーマン由来 EPDENs の抗乳がん作用について、上述の細胞増殖/細胞毒性測定試験にて評価した。同 4 種類の EPDENs のアポトーシス誘導能は、核の形態、DNA Ladder により評価した。実験結果の統計処理は、Student’s t 検定法により有意差検定を行った。

【結果及】

種々の植物性食品由来 EPDENs の抗乳がん作用を評価した結果、カラーピーマン、タマネギ、グレープフルーツ等 9 種類の食品由来 EPDENs 処理群において、5%の危険率で有意に MCF-7 細胞の増殖を抑制した。70 種類の食品から選抜したカラーピーマン（緑、赤、橙、黄）由来 EPDENs の抗乳がん作用を評価した結果、原液、タンパク濃度 4mg/mL 群においては 4 種類全てにおいて 5%の危険率で有意に MCF-7 細胞の増殖を抑制した。また、当該 EPDENs 処理により、核の断片化が認められた。

EPDENs,, anti-cancer, apoptosis

発表責任者：山崎有美（yamasakiy@cc.miyazaki-u.ac.jp）

講演番号：2A04p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ センター2 号館 A04 会場

原発性滲出性リンパ腫に対するククルビタシンＢの抗腫瘍効果の検討

Effect of cucurbitacin B on primary effusion lymphoma

○上野 幹憲、刈谷 龍昇、シティタンチャリー ガンヤ、岡田 誠治（熊本大学ヒトレトロウイルス学共同研究センター）
○ Mikinori UENO, Ryusho KARIYA, Gunya SITTITHUMCHAREE, Seiji OKADA (Div. Hematopoiesis, Jnt. Res. Cntr. Human Retrovirus Infect., Kumamoto Univ.)

【背景】後天性免疫不全症候群(エイズ)は多剤併用療法によりコントロール可能であり慢性感染症に位置づけられる。しかしながら，エイズが慢性疾患した現在，エイズ関連リンパ腫がエイズ患者の 5-20%で合併し，死因の 10%を占める。エイズ関連リンパ腫のひとつである原発性滲出性リンパ腫 (Primary effusion lymphoma, PEL)はエイズ患者や臓器移植患者の免疫不全者において，Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV)/Human herpesvirus-8 (HHV-8)の日和見感染を起因とする希少悪性リンパ腫である。PEL は抗がん剤耐性のため，生存期間が治療開始後 6 か月と非常に予後が悪い。よって，PEL の新規治療法の確立が重要である。本研究では，抗腫瘍効果を有するウリ科植物由来ステロイドの一種である Cucurbitacin B (CuB)の PEL に対する抗腫瘍効果を検討した。
【方法】PEL 細胞株である BCBL-1, BC-1, GTO, TY-1 に対する細胞増殖抑制作用を MTT 法により検討した。BCBL-1 に対する Caspase-3, -8, -9 の活性化を Western blotting により解析した。既報において CuB は細胞骨格であるアクチンに作用することから，BCBL-1 アクチンを共焦点レーザー顕微鏡により観察した。加えて，CuB 処理による BCBL-1 の細胞周期をフローサイトメーターにより解析した。さらに，BCBL-1 細胞内 KSHV 遺伝子に対する影響を RT-PCR により解析した。*In vivo* 実験では， T, B, NK 細胞が欠損した高度免疫不全マウス BALB/c Rag-2$^{-/-}$Jak3$^{-/-}$ (BALB/c RJ)を用いた。BALB/c RJ マウス皮下に BCBL-1 (1 x 10^7 cells)を移植した(0 日目)。3 日目に固形腫瘍形成を確認後，BALB/c RJ マウス腹腔内に CuB 0.5 mg/kg を一週間に 3 回投与した。14 日目にマウス体重，腫瘍重量を測定した。
【結果】CuB の BCBL-1, BC-1, GTO, TY-1 に対する IC50 はそれぞれ 18−48 nM であった。また，CuB は BCBL-1 細胞内 Caspase-3, -8, -9 を濃度ならびに時間依存的に活性化した。共焦点レーザー顕微鏡において， CuB と 1 時間培養した BCBL-1 アクチンの構造変化を観察した。加えて，CuB は BCBL-1 に対し G2/M arrest を引き起こした。一方で，CuB 処理による BCBL-1 細胞内 KSHV 遺伝子の変化はみられなかった。*In vivo* 実験では，CuB 0.5 mg/kg 腹腔内投与により，腫瘍重量の抑制を観察した。なお，マウス体重の変化は観察されなかった。
【考察】本研究おいて，CuB は BCBL-1 のアクチン構造を変化させ，G2/M arrest を引き起こすと示唆された。その結果, Caspase-3, -8, -9 を活性化することによりアポトーシスを引き起こすと考えられた。さらに，*In vivo* 実験において，CuB 0.5 mg/kg という低用量で腫瘍重量の抑制を示した。以上の結果から，CuB は PEL に対し，抗腫瘍効果を有すると示唆された。

Primary effusion lymphoma, Cucurbitacin B, AIDS

講演番号：2A04p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ センター2 号館 A04 会場

Epigallocatechin-3-O-gallate (EGCG)/Phosphodiesterase 3 阻害剤併用は膵臓がんのがん幹細胞性を阻害する

Epigallocatechin-3-O-gallate (EGCG)/Phosphodiesterase 3 inhibitor incombination inhibits cancer stem cell properties

○熊添 基文、高井 美佳、廣井 舜、高松 香菜子、門松 舞、山下 麻衣、藤村 由紀、立花 宏文 (九州大農)
○ MOTOFUMI KUMAZOE, MIKA TAKAI, SHUN HIROI, KANAKO TAKAMATSU, MAI KADOMATSU, MAI YAMASHITA, YOSHINORI FUJIMURA, HIROFUMI TACHIBANA (Kyusyu Univ.)

【目的】我々はこれまでに緑茶カテキンの一種 Epigallocatechin-3-O-gallate (EGCG) ががん細胞に高発現する 67-kDa Laminin Receptor (67LR)への結合を介して cGMP 産生を誘導し、抗がん作用を発揮することを見出している。また、膵臓がん細胞において cGMP 産生誘導は Forkhead box O3 (FOXO3) の発現を抑制してがん幹細胞性の発現を阻害することを発見している。そこで本研究では、EGCG の膵臓がんに対するがん幹細胞性阻害活性について検討した。

【方法】ヒト膵臓がん細胞株 Panc-1 を低接着性プレートに播種後培養し、がん幹細胞性の指標であるスフェロイド形成能に対する EGCG の作用を評価した。また、PDE3 発現を正常組織と膵臓がん組織の蛍光免疫組織染色により比較した。in vivo においてヒト膵臓がん細胞株 BxPC-3 細胞株を腹腔内に移植したヌードマウスに EGCG と PDE3 阻害剤を投与し、生存期間を観察した。

【結果】EGCG はヒト膵臓がん細胞株 Panc-1 のがん幹細胞性の指標であるスフェロイド形成能を阻害する一方で、十分な阻害作用を発揮するためには高濃度の EGCG が必要であった。また、cGMP/cAMP のネガティブレギュレーターとして知られている PDE3 の発現が正常組織と比較し膵臓がん組織において高発現しており、PDE3 阻害剤が EGCG の膵臓がん細胞に対するがん幹細胞性阻害作用を増強することを見出した。また、膵臓がんにおけるがん幹細胞といわれている CD44 陽性細胞において PDE3 の発現が亢進していることが明らかにした。さらに、ヒト膵臓がん細胞株を移植した膵臓がんの腹膜播種マウスにおいて、EGCG と PDE3 阻害剤を投与した群において Control 群と比較して有意な生存期間の延長が認められた。

【結論】PDE3 阻害剤は EGCG の膵臓がん幹細胞性阻害作用を著しく増強し、腹膜播種モデルにおける生存期間の延長作用を有することを明らかにした。

EGCG, cancer, cGMP

講演番号：2A05a01
講演日時：3 月 26 日 09:30～ センター2 号館 A05 会場

レポーターアッセイを用いた客観的甘味評価系の構築

Constitution of a sweet taste evaluation system using a reporter assay.

○井手 美里、三坂 巧（東大院農生科・応生化）
○Misato IDE, Takumi MISAKA (Dept.Appl.Biol.Chem.,The Univ.Tokyo)

【背景・目的】　口腔内で甘味物質を受容している甘味受容体を培養細胞に発現させることで、甘味の強度を客観的に評価することが可能となってきた。その代表的な手法の一つに、G タンパク質共役型受容体である甘味受容体と Gq 系キメラ G タンパク質を培養細胞に共発現させ、受容体の活性化により上昇する細胞内 Ca^{2+} 濃度をカルシウム感受性蛍光指示薬により感知する手法がある。この手法は感度良く測定できるという利点があるものの、リガンド存在下で蛍光強度の変化を測定するため、色素や濁り物質を含有する溶液の呈味評価は困難であった。

しかしながら、食品成分中には多くの物質が共存しており、色素や濁りを持った物質も存在する。そこで、測定可能なリガンドの範囲を広げるべく、本研究ではレポーターアッセイ法を試行することを考えた。レポーター遺伝子としてルシフェラーゼを利用する本手法では、細胞外液を洗浄後に活性測定を行うため、リガンド非存在下で測定を行うことができる。そのため、従来の方法では測定できなかった色や濁りを持つサンプルの呈味評価が可能になると考えられた。

【方法･結果】　レポーター遺伝子として G タンパク質の活性化を検出できる市販の各種ルシフェラーゼ応答ベクターを用いた。甘味受容体を安定発現させた培養細胞に、G タンパク質とレポーター遺伝子を一過的に発現させた後、培地に甘味物質を添加し長時間共培養を行った。細胞外液を洗浄後、細胞溶解液を用いて細胞を溶解し、細胞内に蓄積されたルシフェラーゼ量をルミノメーターで測定することで、受容体の活性度合いを検出した。

複数のレポーター遺伝子及び G タンパク質を検討した結果、Gi 系 G タンパク質の活性化によりアデニル酸シクラーゼ活性が抑制されることを利用した測定系を選択することにした。この測定系では、アデニル酸シクラーゼを活性化する forskolin を甘味物質とともに培地に添加し共培養することで、甘味受容体の活性化に起因する細胞内 cAMP 量の減少をルシフェラーゼ活性で検出することができる。この測定系を利用することで、甘味物質に対する濃度依存的な応答を検出することができた。現在、測定条件の精査を行うことで、測定可能なリガンド範囲の拡大を目指している。

reporter assay, taste receptor, sweet

講演番号：2A05a02
講演日時：3 月 26 日 09:41～ センター2 号館 A05 会場

霊長類旨味受容体における高いグルタミン酸感受性獲得の分子機構
Molecular basis for the acquisition of high glutamate sensitivity in the primate umami taste receptor

○戸田 安香[1]、早川 卓志[2]、中北 智哉[3]、河村 正二[4]、今井 啓雄[5]、石丸 喜朗[1]、三坂 巧[6]([1]明大農・農芸化、[2]北大院地球環境・環境生物、[3]愛大・PROS、[4]東大院新領域・先端生命、[5]京大霊長類研・ゲノム細胞、[6]東大院農生科・応生化)
○YASUKA TODA[1], TAKASHI HAYAKAWA[2], TOMOYA NAKAGITA[3], SHOJI KAWAMURA[4], HIROO IMAI[5], YOSHIRO ISHIMARU[1], TAKUMI MISAKA[6] ([1]Dept. Agric. Chem., Meiji Univ., [2]Fac. Env. Earth Sci., Hokkaido Univ., [3]PROS, Ehime Univ., [4]Dept. Integrated Biosci., The Univ. Tokyo, [5]Dept. Cellular Mol. Biol., Kyoto Univ., [6]Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. Tokyo)

【背景と目的】ヒトはグルタミン酸ナトリウムに強い旨味を感じる。これに一致して、口腔内に発現する旨味受容体 T1R1/T1R3 は、ヒトではグルタミン酸によって強く活性化される。一方、マウスや魚類の T1R1/T1R3 はグルタミン酸ではほとんど活性化されない。これまで、当研究グループは霊長類を対象に T1R1/T1R3 の塩基配列解析と機能解析を行ってきた。その結果、ヒトと同じ狭鼻猿類に属するアカゲザルやマントヒヒ、また、広鼻猿類に属するクモザルの T1R1/T1R3 もグルタミン酸によって強く活性化されることを見出した。一方で、クモザルと同じ広鼻猿類に属するリスザルの T1R1/T1R3 はグルタミン酸ではほとんど活性化されなかった。また、ヒト T1R1/T1R3 の高いグルタミン酸感受性に、T1R1 のアミノ酸結合部位に存在する 2 アミノ酸残基（T1R1-170 及び-302）の負電荷消失が寄与することを明らかにした。

そこで本研究は、霊長類の進化の過程で、T1R1/T1R3 がいつ高いグルタミン酸感受性を獲得したのかを明らかにすることを目的として、解析対象とする霊長類の種類を増やし、T1R1/T1R3 の塩基配列解析及び機能解析を行った。

【方法】食性の異なる複数の系統に属する霊長類を対象に、ゲノム DNA 試料から旨味受容体遺伝子（*Tas1r1*, *Tas1r3*）をクローニングし、培養細胞発現用プラスミドの構築を行った。HEK293T 細胞に、各霊長類の旨味受容体（T1R1 および T1R3）、キメラ G タンパク質、発光タンパク質を一過的に発現させ、味物質添加時の発光値の変化をマルチウェルプレートリーダーにて検出した。

【結果】ヒトを含む 17 種の霊長類について、旨味受容体遺伝子のクローニングを完了した。機能解析から、グルタミン酸感受性の高い種と低い種が明らかになった。変異体解析から、T1R1 の 170 番、302 番のアミノ酸残基が狭鼻猿類や広鼻猿類以外の霊長類のグルタミン酸感受性にも影響を与えることが示された。

【考察】進化の過程で、様々な霊長類系統で独立に T1R1/T1R3 のアミノ酸結合部位に変異が生じ、グルタミン酸感受性が上昇したことが示された。今後、霊長類が実際に採食する食物の成分分析等を実施し、グルタミン酸感受性の違いと食物成分の関わりを解明したい。

taste, umami, GPCR

講演番号：2A05a03
講演日時：3 月 26 日 09:52～ センター2 号館 A05 会場

マウス味蕾におけるセルピンの発現
Expressions of serpins in mouse taste buds
○廿楽 怜紀、黒川 あずさ、成川 真隆、三坂 巧 (東大院農生科)
○Reiki TSUZURA, Azusa KUROKAWA, Masataka NARUKAWA, Takumi MISAKA (Tokyo Univ.)

【背景・目的】Serpin は、セリンプロテアーゼ阻害タンパク質およびそれに近縁なタンパク質を含む一群のスーパーファミリーで、ヒトで 36 種類、マウスで 63 種類が同定されている。Serpin によるセリンプロテアーゼの阻害は、プロテアーゼの活性中心を破壊し不可逆的に阻害するという特徴的なものである。その機能は多岐にわたり、血液凝固や血圧の制御、炎症や免疫の調節などに関与することが知られている。当研究室で過去に行われた C57BL/6J マウスの有郭乳頭上皮(CvP)を用いた DNA マイクロアレイ解析や、既報の論文で報告のあった味細胞の RNA-seq 解析により、serpin ファミリーのいくつかが味覚受容体など味マーカー分子と同程度に発現しているという結果が得られている。しかしながら、味蕾において発現する serpin の種類やその機能などの詳細はほとんど明らかになっていない。本研究では、味蕾における serpin の役割を明らかにすべく、味蕾において発現する serpin の種類と発現パターンについて検討を行った。

【方法】マウス CvP を含む舌上皮から total RNA を抽出し、cDNA を合成した。各 serpin に特異的なプライマーを設計し、これを鋳型に RT-PCR を行った。味蕾特異的な発現の有無を解析するために、RT-PCR で明確なシグナルが得られた serpin を対象として、cRNA プローブを合成し、*in situ* hybridization を行った。また、市販抗体が利用可能な一部 serpin に関しては、免疫染色法でも解析を行った。

【結果】すべてのマウス serpin に対応するプライマーを設計して RT-PCR に供したところ、*Agt*、*Serpinb3a*、*Serpinb6a*、*Serpinb9f*、*Serpine2*、*Serpinh1* を含む 45 種類のプライマーセットでバンドが確認された。また組織染色において、*Agt*、*Serpinb6a*、*Serpine2* については舌上皮での発現が認められたものの、味蕾細胞特異的な発現は確認できなかった。現在、引き続き各 serpin について発現解析を行い、味蕾細胞種特異的に発現する serpin の同定を進めている。

serpin, taste buds, *in situ* hybridization

講演番号：2A05a04
講演日時：3 月 26 日 10:03～ センター2 号館 A05 会場

甘味受容体 T1R3 サブユニット膜貫通領域における活性型・不活性型モデルの比較

Comparison of active and inactive models of transmembrane-domain of the sweet receptor T1R3 subunit.

○中北 智哉[1,2]、成川 真隆[2]、広川 貴次[3]、三坂 巧[2]([1]愛媛大 PROS、[2]東大院農生科・応生化、[3]産総研)
○Tomoya NAKAGITA[1,2], Masataka NARUKAWA[2], Takatsugu HIROKAWA[3], Takumi MISAKA[2] ([1]PROS, Ehime Univ., [2]Dept appl. biol. chem, The Univ. Tokyo, [3]AIST)

[背景・目的]甘味受容体は T1R2 及び T1R3 がヘテロダイマーを形成することにより機能する。T1R ファミリーは class C の G タンパク質共役型受容体(GPCR)であり、複数のリガンド受容サイトが存在することが知られている。そのうちの一つである T1R3 の膜貫通領域(TMD)には甘味料と阻害剤の双方が作用することが明らかとなっている。

一方で昨年、甘味受容体と同様に class C GPCR に所属する代謝型グルタミン酸受容体 5 (mGluR5)の全長構造（apo 型モデル、活性型モデル）が報告された。そこで本研究では活性型構造を用いて、T1R3-TMD における甘味料シクラメートの結合モデルを構築した上で、不活性型と比較することを目的とした。

[方法]甘味受容体及びキメラ G タンパク質を安定に発現する細胞株、及び甘味受容体変異体株を用いて、Ca^{2+}蛍光指示薬によるシグナルアッセイによりシクラメートの作用部位を同定した。その後、ドッキングシミュレーションを実施した。ドッキングには Maesto、Glide (Schrödinger)を用い OPLS3e 力場の下、SP モードで実施した。

[結果]変異体解析の結果、シクラメートは $Q636A^{3.32}$、$S729A^{5.39}$、$F730L^{5.40}$、$R790Q^{ECL3}$ の 4 変異において著しい応答消失が認められた。これらは阻害剤ラクチゾールの主要作用残基である $H641^{3.37}$ や $Q794^{7.32}$ とは異なっていることから（農芸化学会 2015 年度、2017 年度、2019 年度発表）、甘味料と阻害剤では T1R3-TMD 中の作用部位が異なることが示唆された。これらの残基を不活性型モデル、活性型モデルそれぞれで表示、比較したところ不活性型モデルでは $H641^{3.37}$、$Q794^{7.32}$ が近傍に存在しているのに対し、活性型モデルでは $Q636A^{3.32}$、$S729A^{5.39}$、$F730L^{5.40}$、$R790Q^{ECL3}$ が近傍に存在していた。活性型モデルに対しシクラメートをドッキングしたところ、これらの残基と相互作用するモデルを取得することに成功した。今後活性型モデルを基に新規甘味料の開発を目指したいと考えている。

Sweet-taste-receptor, active-form, cyclamate

発表責任者：中北　智哉（nakagita.tomoya.eo@ehime-u.ac.jp）

講演番号：2A05a05
講演日時：3 月 26 日 10:14～ センター2 号館 A05 会場

味感受性の加齢依存的変化と短期記憶能力との関連性の検討
Investigation into the relationship between aging-dependent changes of taste sensitivity and the short-term memory impairment in SAMP1 mice
○高橋 涼佳、上吉原 絢、成川 真隆、三坂 巧（東大院農生科）
○Suzuka TAKAHASHI, Aya KAMIYOSHIHARA, Masataka NARUKAWA, Takumi MISAKA (Tokyo Univ.)

【背景と目的】おいしい食べ物を食べることは、人生の楽しみの一つである。味覚に障害が起これば、食欲を失い、健康を維持することが難しくなる。超高齢社会に突入した現代、高齢者の健康維持は社会的に重大な関心事である。年を取ると味覚が衰え、食が細くなる。そのため味覚機能の維持は、健康な生活を送る上で重要となる。過去の研究において、加齢により味感受性が変化することが示されている。しかし、どのようなメカニズムで加齢により味感受性が変化してしまうのか、その詳細は不明である。これまでに我々は加齢による味感受性の変化の要因を検討し、味シグナルを検出する味蕾機能は加齢により大きく変化しないという知見を見出している。つまり、加齢による味感受性の変化には味蕾以外の要因が寄与することが考えられる。味蕾で検出された味シグナルは味覚神経を介して中枢へ伝達され、情報処理される。近年、代表的な脳疾患であるアルツハイマー病患者において味感受性の低下が報告されるなど、学習記憶機能が味感受性に影響を与える可能性が示唆されている。そこで本研究では、加齢依存的な味感受性変化の分子メカニズムを明らかにする一環として、味感受性の加齢依存的変化と短期記憶能力との関連性について検討を行った。

【方法】実験動物として、老化促進系統 SAMP1 マウス（♂）を用いた。味感受性は水と味溶液を 48 時間提示し、各々の飲水量の比率から嗜好性を算出する 48 時間二瓶選択試験によって評価した。味溶液として、デナトニウム（苦味）と NaCl（塩味）を使用した。短期記憶能力は、Y 字迷路試験により評価した。10 分間の自発行動量を測定し、交替行動率を算出した。経時的な変化を観察するために、70 および 80 週齢時に両試験を実施した。対照群として若齢群（8 週齢）を設け、同時に各試験を行った。

【結果】70 週齢の時点において、味感受性の有意な変化を観察することができた。一方、自発行動量は 70 週齢群で有意な低値を示したものの、交替行動率は若齢群と 70 週齢群間に有意な差は認められなかった。一方、80 週齢の時点では、交替行動率に加齢の影響が観察され、有意な低値を示した。したがって、短期記憶に加齢の影響が認められるよりも前に、味感受性の変化が進行している可能性が考えられた。

aging, taste sensitivity, short-term memory

講演番号：2A05a06
講演日時：3 月 26 日 10:35～ センター2 号館 A05 会場

コイ味覚受容体の発現解析

Expression analysis of taste in *Cyprinus Carpio*

○久保園 峻、戸田 安香、石丸 喜朗 (明大農・農芸化)
○Takashi KUBOZONO, Yasuka TODA, Yoshiro ISHIMARU (Meiji Univ.)

【背景・目的】

ゲノム解析の発展によって、味覚受容体を含む味覚関連遺伝子の類似性から生物の分子進化をたどることが可能となり、魚類にも哺乳類と一部共通した細胞内シグナル伝達の仕組みが存在することが明らかになった。哺乳類において、T1R1/3 と T1R2/3 はそれぞれアミノ酸・核酸と甘味物質を受容する。一方、ゼブラフィッシュとメダカでは、T1Rs は様々なアミノ酸を受容し、甘味物質を受容しないことが示された(Hideaki Oike et al., The Journal of Neuroscience, 2007)。特に、T1R2 は魚類では複数の遺伝子が存在し、哺乳類 T1R2 のオルソログではないことが示唆された。本研究対象とするコイ(*Cyprinus Carpio*)はゼブラフィッシュやメダカより 1 回多い 4 回の全ゲノム重複を経験している(Xu et al., Nature Genetics, 2014)。最近、コイが他の硬骨魚よりも多くの味覚受容体遺伝子を持つことや、RT-PCR を用いた味覚受容体の組織レベルでの発現が示された(Kong et al., Gene, 2018)。しかし、細胞レベルでの発現は未だに解明されていない。そこで、我々は、コイにおける細胞レベルでの味覚受容体の発現を明らかにする目的で、*in situ* hybridization 法を用いて発現解析を行った。

【方法と結果】

ゲノムデータベースを用いた相同性検索により、コイの 12 種の T1R(全長や断片を含む)、6 種の T2R 遺伝子配列が得られた。コイの口腔を含む組織から全 RNA を抽出し、RT-PCR を行ったところ、4 種の T1R と 6 種の T2R のクローニングに成功した。味細胞内シグナル伝達に関与する陽イオンチャネルである Trpm5 及びエフェクターである PLCβ2、4 種の T1R と 6 種の T2R の DIG-RNA プローブを作製した。コイの上顎(ヒゲを含む)と下顎の凍結切片をクリオスタットを用いて作製し、*in situ* hybridization を行った。その結果、Trpm5 及び PLCβ2 プローブによって味蕾が存在する場所が確認できた。また、T1R は 4 種全て、T2R は 3 種のみシグナルが観察された。さらに二重染色を行ったところ、現在までに PLCβ2 に 3 種の T2R と T1R3 が共発現していることが確認された。

【今後の展望】

今後は、二重染色によるそれぞれの味覚受容体の発現相関だけでなく、G タンパク質の解析を行うことで味受容細胞における新規サブセットの同定も視野に入れている。さらに、機能解析も進め、コイがヒトと類似したリガンドを受容するのか、あるいは、独自のリガンドを受容するのかを解明する予定である。

taste, fish, in situ hybridization

講演番号：2A05a07
講演日時：3 月 26 日 10:46～ センター2 号館 A05 会場

腸内細菌枯渇状態のマウスの味覚嗜好性変化
Taste preference change in mice by antibiotics-induced microbiota depletion
○丸岡 祐子、藍原 祥子 (神戸大院農)
○Yuko MARUOKA, Yoshiko AIHARA (Kobe Univ.)

【目的】従属栄養生物にとって、味覚は生命を維持する食物を認識し、取り込むために用いられる感覚だと考えられる。そのため味覚の感受性は身体の栄養状態によって変化する。近年、食物の利用は生体の代謝機能だけではなく、共生する腸内細菌の代謝に大きく依存することが明らかとなり、腸内細菌叢の乱れが消化管疾患や免疫疾患に繋がる可能性も報告されている。抗生物質の服用は、腸内細菌叢を変化させるが、ヒトにおいて味覚障害が生じる例が報告されている。マウスを用いて腸内細菌叢と味覚の関与を調べた研究によると、無菌動物ではショ糖溶液に対する嗜好性が増加することや、肥満状態では甘味感受性が低下すること、さらにプレバイオティクスの投与により改善することが報告されている。しかしこれらの研究で用いられた味覚嗜好試験は摂取後効果が含まれる実験系であり、末梢の味覚の感度の差についての報告は無い。本研究では、マウスをモデルとして短時間の嗜好性試験を行い、腸内環境変化による味覚変化の解析を行うこととした。【方法】７週齢の雄性Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスに抗菌剤及び抗真菌剤を添加した滅菌水を自由飲水させ、抗生物質誘導性腸内細菌枯渇（Ａｎｔｉｂｉｏｔｉｃｓ－ｉｎｄｕｃｅｄ　ｍｉｃｒｏｂｉｏｔａ　ｄｅｐｌｅｔｉｏｎ：ＡＩＭＤ）群を作成した。糞中よりＤＮＡを抽出し、大腸菌標準菌株ＡＴＣＣ４３８８８^{T}により作成した検量線を用いてリアルタイムＰＣＲにより算出した。８～１２週齢となったマウスに味物質の短時間摂取による嗜好性評価テストを行った。味覚嗜好性は、甘味（ショ糖、スクラロース、サッカリンナトリウム）、旨味（グルタミン酸ナトリウムとイノシン酸混合）、苦味（安息香酸デナトニウム）、酸味（クエン酸）、塩味（塩化ナトリウム）に対し一定時間内に舐める回数を計測することで評価した。【結果】糞中菌数は対照群では10^{9}ＣＦＵ／ｇ程度で推移したが、ＡＩＭＤ群では抗生物質投与３日後には約10^{6}ＣＦＵ／ｇとなり、抗生物質を投与しつづけた３０日後まで同程度で維持された。味覚嗜好性試験の結果、旨味、苦味、酸味、塩味に対する嗜好性は対照群とＡＩＭＤ群で差はなかったが、甘味に対する嗜好性のみＡＩＭＤ群で有意な上昇が観察された。引き続き末梢組織での遺伝子発現や血液の生化学的変化との相関を検証する。

taste preference, gut microbiota, mouse

講演番号：2A05a08
講演日時：3 月 26 日 10:57～ センター2 号館 A05 会場

甘味料スクラロースがマウス消化管オルガノイドに与える影響の解析

Analysis of the effect of sucralose using mice intestinal organoid.

○大木 淳子[1,2]、稲葉 明彦[2]、田中 啓介[3]、篠澤 章久[3]、吉瀬 祐子[3]、松本 征仁[4]、野村 政壽[5]、山根 拓実[2]、大石 祐一[2]、岩槻 健[2] ([1]つく国大医、[2]東農大応生科、[3]東農大ゲノムセンター、[4]順天堂大医、[5]久留米大医)

○ Junko OHKI[1,2], Akihiko INABA[2], Keisuke TANAKA[3], Akihisa SHINOZAWA[3], Yuko ARAI-KICHISE[3], Masahito MATSUMOTO[4], Masatoshi NOMURA[5], Takumi YAMANE[2], Yuichi OISHI[2], Ken IWATSUKI[2] ([1]Tsukuba Int'l. Univ., [2]Tokyo Univ. of Agric., [3]Tokyo Univ. of Agric. Genome Res. Center, [4]Juntendo Univ., [5]Kurume Univ.)

【目的】食品添加物として、アセスルファムカリウム、アスパルテーム、スクラロースなどの人工甘味料が様々な食品や飲料に使われている。天然の甘味料であるスクロースやグルコースなどは体内に入ると消化管上皮細胞に作用し、GLP-1 などのホルモンを分泌する。人工甘味料も GLP-1 をはじめとする消化管ホルモンの分泌を促進すると報告があるが、人工甘味料におけるホルモン分泌メカニズムの統一した見解はまだない。またホルモン分泌に関しては消化管にも存在する味覚受容体が関与しているとの報告もある。そこで、本研究では消化管の三次元培養系を導入し、食品添加物である人工甘味料が消化管上皮細胞に及ぼす影響について解析することを目的とした。

【方法】内分泌細胞の分化に必須の転写因子である Neurogenin3 (Ngn3) のプロモーター制御下に EGFP を発現する Ngn3-EGFP マウスから消化管オルガノイドを作製した。まず、培地に各種合成甘味料、スクロースを添加し 48 時間培養後、オルガノイド内の EGFP 陽性細胞数を計測した。続いてトランスクリプトーム解析により、スクラロース添加群で有意に発現変動する遺伝子を選出しリアルタイム PCR にて遺伝子発現量を定量化した。最後に、スクラロースによる遺伝子発現の変動が甘味受容体を介したものかを明らかにするため、T1R2 欠損 (T1R2-KO) マウスより消化管オルガノイドを作製し、スクラロース添加群で発現が変動する遺伝子に変化があるかをリアルタイム PCR にて調べた。

【結果・考察】Ngn3-EGFP オルガノイドにおける EGFP 陽性細胞数は、スクラロース 10 mM 添加群では対象群 (CO) に比して有意に増加した。アセスルファムカリウム、アスパルテーム、スクロースは 1、10 mM 濃度ともに CO 群と有意な差は見られなかった。スクラロースを添加した際に顕著に発現が上昇した遺伝子として、*Ngn3*、*ChgA*、*Gcg* など内分泌細胞系列のマーカー遺伝子、および杯細胞のマーカー遺伝子 *Muc2* を見出した。同時に、発現が有意に減少した遺伝子として幹細胞のマーカー*Lgr5* を見出した。パネート細胞、吸収上皮細胞のマーカー遺伝子 *Lyz1*、*Slc5a1* に有意な差は見られなかった。以上からマウス由来の消化管オルガノイドにおいて、スクラロースは細胞分化を制御する食品成分である可能性がある。甘味受容体を欠損させた T1R2-KO マウスから作製した消化管オルガノイドにおいても上記と同様の結果を得たことから、スクラロースが消化管上皮細胞に与える影響は、甘味受容体とは別の経路からのシグナルによるものであると考えられる。

sucralose, Neurogenin3, organoid

講演番号：2A05a09
講演日時：3 月 26 日 11:08～ センター2 号館 A05 会場

微量アミン受容体 hTAAR1 に作用する食品素材のスクリーニングと活性成分の同定

Screening of food subjects and identification of the active component acting on a trace amine receptor hTAAR1

○太田 広人[1]、松下 聖大[2]、迫田 一輝[2]、山中 実喜子[3]、藤田 航平[3]([1]崇城大生物生命、[2]熊本大院自然科学、[3]サントリーグローバルイノベーションセンター（株））
○ Hiroto OHTA[1], Shota MATSUSHITA[2], Kazuki SAKODA[2], Mikiko YAMANAKA[3], Kohei FUJITA[3] ([1]Sojo Univ., [2]Kumamoto Univ., [3]Suntory)

【目的】

ヒト微量アミン受容体 の一種 hTAAR1 には、発酵食品に含まれるフェネチルアミンなどがアゴニストとして作用する。我々は最近、hTAAR1 は胃の幽門に多く発現していることを見出した（Ohta et al., BBB, 2017）。幽門は G 細胞が多く存在するため、hTAAR1 アゴニストは、ガストリンを介した胃酸分泌、ひいては食欲増進を促す可能性があると考えた。本研究では、hTAAR1 にアゴニストとして作用する食品・天然成分を探索するために、培養細胞に発現させた hTAAR1 を用いて、スクリーニングを実施し、ヒットしたサンプルの活性成分の同定を試みた。

【方法及び結果】

スクリーニングには CRE-SEAP（分泌型アルカリホスファターゼ）レポーターアッセイを用いた。HEK-293 細胞に受容体発現ベクターpcDNA3-β2-N9/hTAAR1 とレポーターベクターpCRE-SEAP を Lipofectamine 3000 でコトランスフェクションし、1 日培養した後、96 穴培養プレートに細胞を 1×10^4 個/ウェルで播き直し、さらに 1 日培養した。培地を除去後、供試サンプルを含む無血清培地に交換し、SEAP 誘導のため 1 日培養した。この上清の SEAP 活性を発光で測定した。今回は、105 種類のサンプルをスクリーニングし、ヒットしたサンプルに含まれる活性成分の同定を進めた。

スクリーニングの結果、アマチャヅルがヒットした（特開 2018-123098）。アマチャヅル抽出成分を葉と茎それぞれの抽出物で実験を行ったところ、葉でのみ hTAAR1 アゴニスト活性が認められた。この結果を踏まえ、アマチャヅル葉の分画を行い、それぞれのアゴニスト活性を調べた。その結果、HLB 分析より得られた 30%エタノール抽出画分に活性が見られた。そのサンプルを HPLC でさらに分画を進めたところ、最初に溶出される親水性の高い画分に活性が認められた。この画分を LC-MS で成分網羅分析を行った。その結果、チラミン（TA）と同等の分子量の化合物が存在することが分かった。この候補化合物の溶出時間、MS、MS/MS、UV 吸収が TA 標品と全て一致したことから、アマチャヅル葉中に TA が含まれることが確認できた。さらに、30%エタノール抽出サンプルと HPLC 分画サンプルから TA のみを含むサンプルと、TA を除去したサンプルをそれぞれ調製し、アゴニストの応答を比較した。その結果、TA のみを含むサンプルは標品の TA の応答に一致し、TA を除去したサンプルでは、活性の低下が見られた。以上の結果から、アマチャヅル葉に含まれる活性成分の本体は TA であると判断した。

trace amine, GPCR, tyramine

発表責任者：太田広人（hiohta@bio.sojo-u.ac.jp）

講演番号：2A05a10
講演日時：3 月 26 日 11:19～ センター2 号館 A05 会場

幼若期における咀嚼刺激が脳内発現遺伝子と行動に与える影響

Effects of mastication on brain-expressed gene and behavior in juvenile rat

○李 善美[1]、安岡 顕人[1]、永井 俊匡[2]、斎藤 芳和[1]、阿部 啓子[1,3]、朝倉 富子[1] ([1]東大院農生科、[2]高崎健大・栄養、[3]神奈川県立産業技術総合研究所)
○Sonmi LI[1], Akihito YASUOKA[1], Toshitada NAGAI[2], Yoshikazu SAITO[1], Keiko ABE[1,3], Tomiko ASAKURA[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Takasaki Univ. of Health and Welfare, [3]Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology)

【背景・目的】

咀嚼は脳の活性化や記憶能力の向上を引き起こすことが報告されており，現代人の咀嚼頻度の低下が健康へ及ぼす影響が懸念される。そこで咀嚼に関する研究が進められてきたが，多くは成熟後及び老齢期に注目したものであり，発達期における報告は少ない。本研究では離乳直後のラットをモデルとし，咀嚼刺激の強度，頻度が脳に与える効果とそのメカニズムを明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

3 週齢（離乳直後）の Wistar 系雄ラットに粉末餌（Powder, P 群）または固形餌（Chow, C 群）を与え（各群 n=5），8 日間飼育した。飼育後に海馬を摘出し，DNA マイクロアレイによる海馬のトランスクリプトーム解析を行った。その結果，C 群で樹状突起の発達を制御する Rho GTPase シグナリング関連遺伝子および CREB の転写活性に関わる因子の発現上昇がみられた。本研究室ですでに行われた海馬樹状突起の形態観察では C 群で樹状突起の発達が観察されたが，これは Rho GTPase や CREB のシグナリングによるものであることが示唆された。このような海馬のトランスクリプトームおよび形態変化がどのような行動として表れるかを明らかにするため，認知行動試験を行っている。

咀嚼刺激は三叉神経を介して視床と連絡することが知られている。また，視床は視床下部との間で連絡経路が存在する。本研究室の先行研究より先述した餌を用いてラットの長期飼育（15 週間）を行った結果，C 群で血圧の低下がみられた。血圧は自律神経に支配されることから，咀嚼刺激が自律神経系に影響することが考えられた。そのためテレメトリーを用いて心拍などの生体パラメーターを測定し，咀嚼による自律神経への影響を検討している。また，自律神経系を含めた末梢の神経系を支配する視床下部について DNA マイクロアレイによる解析を行い，咀嚼の影響を分子レベルで解明する。

mastication, hippocampus, memory

発表責任者：朝倉富子（asakura@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A05a11
講演日時：3 月 26 日 11:40～ センター2 号館 A05 会場

醤油によるだし香気成分の揮発促進／抑制

Soy sauce enhances/represses the volatilization of dashi-flavor compounds.

○竹内 悠人、廣瀬 真也、坂本 洋子、真岸 範浩（ヒガシマル醤油(株)・研究所）
○ Yuto TAKEUCHI, Shinya HIROSE, Yoko SAKAMOTO, Norihiro MAGISHI (Research Laboratory Higashimaru shoyu Co., Ltd)

【背景】和食においてだしと醤油は欠かせないものである。だしは旨味の基本として用いられ、特に、淡口醤油や味噌と合わせて加熱調理されることが多い。これまで、だしや醤油の香気成分に関する研究はそれぞれ単独で行われているが、実際の調理と同様にだしと醤油を合わせて加熱した時のだし香気成分の変化等を調べた報告はない。今回、だしと醤油を合わせて加熱した際のだし揮発香気成分を解析することにより、だし風味に及ぼす醤油の影響を調べた。
【方法】2%(w/v)かつおだしに 2.7%(v/v)となるように醤油を加えた単純なモデル系を用い、加熱条件は調理試験から 90℃・2 分に設定した。今回、醤油は原材料の配合割合が異なる 4 種(淡口、濃口、溜、白)を用い、各醤油でのだし揮発香気成分を比較した。揮発香気成分の捕集は固層マイクロ抽出(SPME_HS)法により行い、その後 GC-MS 分析に供した。また、当社の商品開発担当者 5 名をパネラーとして GC-Olfactometry(スニフィング)によるかつおだしの官能評価を行い、5 人全員が認識できた Phenol,3-methyl や 4EG 等のだし香気成分を寄与度の高いだし香気成分として解析を行った。
【結果・考察】だし単独に比べて、「淡口醤油＋だし」は寄与度の高いだし香気成分の揮発量が多かった。一方で、「濃口醤油+だし」および「白醤油＋だし」の揮発量は、だし単独と同等であり、「溜醤油＋だし」はだし単独よりも揮発量が少なかった。この結果から、「淡口醤油＋だし」は「他の醤油＋だし」に比べて各だし香気成分の揮発量が多いため、お吸い物などの料理でだしの香り立ちを感じやすいことが示唆された。次に、「淡口醤油＋だし」の系でだし香気成分の揮発量が多い要因を解析した。原料面において大豆と小麦の配合比率がほぼ同じである淡口醤油と濃口醤油の成分値の違いを確認したところ、淡口醤油は濃口醤油に比べて pH が 0.1 ほど高く、さらに緩衝能が弱かった。そこで、この pH と緩衝能の違いに着目し、醤油中の主要な有機酸である乳酸を用いて pH を対照の淡口醤油(pH4.85)から 0.1 下げた醤油(醤油 1)、0.2 下げた醤油(醤油 2)をそれぞれ作製し、「淡口醤油＋だし」の各だし香気成分の揮発量を測定したところ、醤油 1 は対照に比べて揮発量が減少し、醤油 2 ではさらに減少した。また、淡口醤油は緩衝能が弱いため、だし本来の pH に変動を与えにくいという性質があり、だし風味の感じやすさの要因の一つとして示唆された。今後、醤油香気成分など、だし香気成分の揮発に影響を及ぼすと考えられる他の要因についても解析を行う予定である。

Soy sauce, dashi-flavor compounds, SPME_HS

発表責任者：竹内悠人（ken4@higashimaru.co.jp）

講演番号：2A05a12
講演日時：3 月 26 日 11:51～ センター2 号館 A05 会場

日本酒の香りは心理的・生理的リラックス効果をもたらす

Aroma components of Japanese Sake have a psychological and physiological relaxing effect

○鈴木 佐知子[1]、矢田 幸博[2]、竹内 美穂[1]、石田 博樹[1]([1]月桂冠・総研、[2]筑波大院・グローバル教育院)
○Sachiko SUZUKI[1], Yukihiro YADA[2], Miho TAKEUCHI[1], Hiroki ISHIDA[1] ([1]Res.Ins.Gekkeikan, [2]Grad.Sch.Integrative and Global Majors, Tsukuba Univ.)

【目的】近年、「香り」の持つ、心理的・生理的機能への注目が高まっており、フレグランス製品だけでなく、食品や飲料に含まれる香気成分の中にも鎮静や覚醒効果が報告されているものがある。日本酒は様々な香りを有するが、その中でも果物や花のような香りは、清酒酵母によって生成される吟醸香として人々を魅了してきた。吟醸香の主要成分はリンゴのような華やかな香りの「カプロン酸エチル」と、バナナのような芳醇な香りの「酢酸イソアミル」の 2 種類のエステル類である。これまでヒトに対して、日本酒を飲用せずに香気成分のみの吸入による効果は詳細に検討されていない。そこで本研究は、吟醸香に関する新たな知見を見出し、日本酒の香りの機能性を活用することを目的に統合生理学的手法を用い、カプロン酸エチル及び酢酸イソアミルがヒトの心身へ及ぼす作用を評価した。
【方法】被験者は健常女性 18 名とした。測定では、ブランク（空気）、対照（15%エタノール）および標品 2 点（カプロン酸エチル、酢酸イソアミル）の香りを自然呼吸下で嗅ぐこととした。心理的評価として、多面的感情尺度および気分状態（VAS）を用いた。生理的評価として、自律神経活動を評価するために瞳孔対光反応および皮膚温を測定した。また、香りに対する嗜好性も質問紙で検討した。本試験は、臨床試験機関であるチヨダパラメディカルクリニック倫理審査委員会で審査、承認を得た後に被験者への同意書による同意の下、実施した。また、利益相反関係を報告するものは、ない。
【結果と考察】カプロン酸エチルまたは酢酸イソアミルを嗅ぐことで、心理的には、自発的ストレス、意欲、抑うつ・不安、活動的快、集中の感情を有意に抑えることが認められた。一方、生理的には、瞳孔対光反応の縮瞳率において両香気成分で対照に比して有意な上昇が認められたことより副交感神経活動が優位になることが示唆された。皮膚温の計測では、酢酸イソアミルには、皮膚温を有意に上昇させる効果が認められたことから、交感神経活動を抑えることで副交感神経活動を高める作用があることが示唆された。一方、カプロン酸エチルには、皮膚温の変化が認められなかったことから、直接的に副交感神経活動を亢進させている可能性が示唆された。

以上の結果から、日本酒において、これら吟醸香の存在が、高い嗜好性と合わせて心理生理両面で高い鎮静効果を発揮していることが明らかとなった。日本のみならず、世界中の人々に日本酒、特に吟醸香が好まれる理由として、このような香りの鎮静効果（リラックス効果）がその要因の一つであることが考えられる。今後、日本酒の香りが、新たにストレス緩和や心身を安定させる目的で活用され、日常生活に癒しを提供できることが期待される。

Sake, relaxing effect, aroma

発表責任者：鈴木佐知子（s_suzuki@gekkeikan.co.jp）

講演番号：2A05a13
講演日時：3 月 26 日 12:02～ センター2 号館 A05 会場

末梢組織における BDNF 産生促進作用を機序とする抗うつ食品素材の探索

Investigation of antidepressant nutrients that upregulate brain-derived neurotrophic factor production in peripheral tissues

○中島 健輔[1]、大磯 茂[1,2]、仮屋薗 博子[1,2]（[1]長崎国際大薬、[2]長崎国際大院薬）
○Kensuke NAKAJIMA[1], Shigeru OISO[1,2], Hiroko KARIYAZONO[1,2] ([1]Nagasaki International Univ., [2]Grad. Sch. Nagasaki International Univ.)

【目的】神経細胞の新生・保護作用を有する脳由来神経栄養因子（BDNF）の脳内における減少は、うつ病の原因となる[1)]。BDNF は脳由来という名称ながら、末梢組織においても産生され、血液脳関門を通過することが報告されている[2)]。そのため、末梢組織において BDNF の産生を促進する物質は、脳移行性の有無に関わらず、脳内 BDNF 量の増加をもたらし、抗うつ作用を示すものと期待される。本研究では、種々の末梢組織由来細胞の BDNF 産生能を検討し、BDNF 産生能が明らかとなった細胞を用いて、BDNF 産生促進作用を有する食品素材の探索を行った。
【方法】末梢組織由来細胞は、ヒト腎がん細胞 ACHN、ヒト肝がん細胞 HepG2、ヒト膵臓がん細胞 MIA-Paca2 およびヒト膀胱がん細胞 T24 を用いた。RT-PCR により、各細胞における BDNF ならびに BDNF のプロセッシングに関与するプロタンパク質転換酵素の mRNA 発現を調べた。細胞の培養培地中 BDNF 濃度を ELISA により測定し、BDNF 産生能を調べた。食品素材として、きく芋、小麦ふすま、白米、緑米、発芽玄米およびアワを用いた。これらを粉砕し、メタノール中で 12 時間攪拌することにより、それぞれの抽出エキスを調製した。細胞生存率に影響を及ぼさなかった濃度の食品素材抽出エキスを細胞の培地に添加し、24 時間培養後の培地中 BDNF 濃度を対照群のそれと比較することにより BDNF の産生量に及ぼす食品素材の影響を検討した。
【結果・考察】BDNF の mRNA の発現は、ACHN および T24 細胞で認められた。ACHN および T24 細胞の BDNF 産生能を確認するため、両細胞を 1、2 および 4×10^5 個/mL/ウェルの細胞数にて 12 ウェルプレートに播種し、24 時間培養後の培地中 BDNF 濃度を測定したところ、ACHN 細胞にのみ細胞数依存的な BDNF 濃度の有意な上昇が認められた。さらに、ACHN 細胞は、BDNF のプロセッシングに関与する furin、PC5、PC7 および PACE4 の mRNA を発現していた。以上により、ACHN 細胞は、BDNF 産生促進物質の探索に有用であると考えられた。ACHN 細胞の培地中 BDNF 濃度に及ぼす食品素材のメタノール抽出エキスの影響を検討した結果、小麦ふすまおよびアワが培地中の BDNF 濃度を有意に上昇させた。小麦ふすまおよびアワは、末梢組織における BDNF 産生促進作用を機序とする抗うつ食品素材になり得ると考えられた。

1）Duman *et al.*, *Arch. Gen. Psychiatry*, 54, 597-606 (1997).
2）Pan *et al.*, *Neuropharmacology*, 37, 1553-1561 (1998).

depression, brain-derived neurotrophic factor, foxtail millet

発表責任者：中島健輔（naka@niu.ac.jp）

講演番号：2A05p01
講演日時：3 月 26 日 13:50～ センター2 号館 A05 会場

ナス降圧作用への GABA の影響評価
Evaluation of influence of GABA for blood pressure lowering effect by eggplant
○坂本 希加子、早坂 柚実、山口 翔平、中村 浩蔵（信州大学）
○Kikako SAKAMOTO, Yuzumi HAYASAKA, Shohei YAMAGUCHI, Kozo NAKAMURA (Shinshu Univ.)

【背景・目的】ストレスを感じている血圧が高めの被験者に対するプラセボ対照ランダム化二重盲検並行群間比較試験において、ナス粉末（ナス由来コリンエステル（アセチルコリン：ACh）用量 2.3 mg/日・人）の継続摂取により血圧・心理状態の有意な改善が見られ、ナスの新規な食品機能性が明らかとなった[(1)]。ナスの血圧・心理状態改善作用の主要関与成分は、ナス由来 ACh であると推定されたが、ナスには既知降圧成分である GABA が含まれており、その影響は明らかとなっていない。そこで本研究ではナスの降圧作用への GABA の影響を明らかにするために、ACh を含まないナス凍結乾燥粉末（被験試料）を調製し、高血圧自然発症ラット（SHR）への単回および反復経口投与試験で降圧作用を評価し、陽性対照（ACh を含むナス凍結乾燥粉末投与）と陰性対照（純水投与）の降圧作用を比較した。
【方法】単回経口投与試験では、14 週齢雄性 SHR へ被験試料（ACh 2.7×10^{-12} mol/kg、GABA 4.6×10^{-9} mol/kg）、陽性対照試料（ACh 10^{-9} mol/kg、GABA 4.6×10^{-9} mol/kg）または陰性対照試料を投与した。投与直前、投与 3、6、9、24 時間後にテイルカフ法を用いて血圧測定を行った。反復経口投与試験では、10～14 週齢雄性 SHR へ被験試料（ACh 2.7×10^{-11} mol/kg、GABA 4.6×10^{-8} mol/kg）、陽性対照試料（ACh 10^{-8} mol/kg、GABA 4.6×10^{-8} mol/kg）または陰性対照試料を 28 日間反復経口投与した。投与前、投与後 7、14、21、28 日目に血圧測定を行った。被験試料には、-20℃で長期間冷凍保存し ACh のみを分解させたナスを用い、陽性対照試料には収穫直後のナスを用いた。被験試料の ACh 含量は陽性対照試料の約 1/500 であり、GABA 含量は同程度であった。被験試料の投与量は、SHR への降圧作用が確認されている陽性対照試料[(2)]と同量の GABA 含量とした。
【結果】単回経口投与試験では、陽性対照群の収縮期血圧変動が陰性対照群と比較して投与 6、9 時間後に有意な低値を示し、ACh による降圧作用を確認した。一方、被験群の収縮期血圧変動は陰性対照群と同程度であり、陽性対照群と比較して投与 9 時間後に有意な高値を示した。反復経口投与試験では、陽性対照群が被験群と比較して収縮期血圧変動が有意に低下した。以上の結果から、ナスに含まれる GABA には降圧作用は認められず、ナスの血圧改善作用は ACh によるものであると考えられた。
尚、本研究は農研機構生研支援センター「革新的技術開発・緊急展開事業（うち経営体強化プロジェクト）」の支援を受けて実施した。
(1) Nishimura, M. et al. (2019) Nutrients, 11, 2797.
(2) Yamaguchi, S. et al. (2019) Food Chemistry, 276, 376-382.

acetylcholine, blood pressure lowering effect, gamma-amino butyric acid

講演番号：2A05p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ センター2 号館 A05 会場

テレメトリー法による経口投与アセチルコリンの降圧作用と自律神経活動評価
Evaluation of orally ingested acetylcholine in blood pressure lowering effect and autonomic nervous activity by the telemetry system
○早坂 柚実、山口 翔平、中村 浩蔵 (信州大農)
○Yuzumi HAYASAKA, Shohei YAMAGUCHI, Kozo NAKAMURA (Shinshu Univ.)

【目的】アセチルコリン（ACh）は、ストレスを感じている血圧高めの被験者に対するプラセボ対照ランダム化二重盲検並行群間比較試験（プラセボ対照 RCT）で、血圧および心理状態改善作用が明らかとなった新規食品機能性成分である[1]。ナスには、他農産物の 1000 倍以上の ACh が含まれており、高血圧自然発症ラット（SHR）へのナス凍結乾燥粉末（ACh 換算 10^{-9} mol/kg）の単回経口投与で有意な収縮期血圧低下が引き起こされる[2]。ナスに含まれる ACh は、M3 型ムスカリン性 ACh 受容体に作用し副交感神経活動を亢進させ、相反作用により交感神経活動を抑制して降圧作用をもたらすと考えられているが、ACh の詳しい降圧作用メカニズムは不明である。そこで本研究では、経口投与 ACh の降圧作用メカニズムを解明するために、交感神経活動の指標であるカテコールアミン（CA）を測定した。また無拘束、無麻酔下で連続記録できるテレメトリー法を用いて、血圧と腎交感神経活動データを取得し解析した。
【方法】雄性 13-17 週齢の SHR に、テレメトリーセンサ（TRM56SP, Kaha sciences）の圧力センサ部を大腿動脈から腹部大動脈内に挿入、背部を切開し腎交感神経を剥離し電極センサ部を取り付け、腹腔内にセンサを留置した。回復後、純水（コントロール;n=6）または ACh 10^{-8} mol/kg(n=6)を活動期開始時に単回経口投与した。動脈圧および腎交感神経活動をサンプリングレート 1000 Hz（1 k/s）で記録し、得られた動脈圧のトップを収縮期血圧として 5 分間毎の平均値を算出した。腎交感神経活動は 50 Hz のハイパスフィルターをかけた後、20 ms の時定数積分を行い 5 分間毎の曲線化面積値を算出した。また、代謝ケージで SHR の 24 時間尿を採取し、尿中 CA を LC-MS/MS で定量した。
【結果】ACh 10^{-8} mol/kg 投与はコントロールと比較して、尿中 CA 濃度が有意に低値を示し、全身の交感神経活動の抑制が示唆された。一方で腎交感神経活動は、有意差はないものの高値を示し、収縮期血圧は活動期を通して低値で、投与 5～11 時間後で有意に低下した。収縮期血圧と腎交感神経活動の挙動から、経口投与 ACh は交感神経活動を抑制して尿中 CA レベルを抑制し血圧を低下させるが、腎交感神経活動が機能して過度な血圧低下を防止すると考察された。本研究は農研機構生研支援センター「革新的技術開発・緊急 展開事業（うち経営体強化プロジェクト)」の支援を受けて実施した。

[1] Nishimura M et al, (2019) *Nutrients*, 11,2797.
[2] Yamaguchi S et al, (2019) *Food Chem*, 276,376-382.

acetylcholine, blood pressure lowering effect, telemetry system

発表責任者：中村浩蔵（knakamu@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2A05p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ センター2 号館 A05 会場

ラットにおける糖転移ナリンジンのバイオアベイラビリティーと体内動態
Bioavailability and pharmacokinetics of glycosyl naringin in rat
○松本 敦子[1]、長田 恭一[1]、橋爪 雄志[2]、タンジャ マハマドゥ[2]([1]明治大農、[2]東洋精糖（株））
○Atsuko MATSUMOTO[1], Kyoichi OSADA[1], Yuji HASHIZUME[2], Tandia MAHAMADOU[2] ([1]Meiji Univ, [2]Toyo Sugar Refining Co.,Ltd.)

【目的】グレープフルーツ等の柑橘類に多く含まれるフラボノイドであるナリンジンは、コレステロール低下作用等の脂質代謝改善効果及び体温上昇や食欲抑制等の抗肥満作用を示すと考えられている。しかし、ナリンジンは疎水性であるため生体内への吸収率が低い。糖転移ナリンジンは、ナリンジンを酵素処理しグルコースを転移させて水溶性を高めた素材である。よって、生体内への吸収率が上昇し、より強い機能性を示すと予想される。本研究では、ラットにナリンジンあるいは糖転移ナリンジンを投与し、その吸収性と体内動態を比較することを目的とした。
【方法】6 週齢の Wistar 系雄性ラットを 2 日間予備飼育し、ゾンデ管を用いてナリンジンまたは糖転移ナリンジンを含むエマルションを胃内に経口投与した。0、3、8、24 時間後に解剖し、血液、尿、肝臓、腎臓、胃、小腸、大腸及び糞を採取した。代謝産物はメタノールを用いて抽出し、LC-ESI-MS に供して分析した。また、代謝産物を脱抱合化して各素材の吸収性を経時的に解析した。
【結果・考察】ナリンジンを投与したラットの腎臓中の総ナリンジン代謝産物濃度は、投与 8 時間後に最大となった。一方、糖転移ナリンジンを投与したラットの腎臓中の総ナリンジン代謝産物濃度は、投与 3 時間後に最大となった。ラット腎臓中にはアグリコンであるナリンゲニン、ナリンゲニン硫酸抱合体、ナリンゲニングルクロン酸抱合体及びヒドロキシモノグルコシルナリンゲニンが存在し、ナリンゲニングルクロン酸抱合体の割合が最も多くなった。また、ナリンジンを投与したラットの肝臓中の総ナリンジン代謝産物濃度は投与 8 時間後に最大となったが、糖転移ナリンジンを投与したラットの肝臓中の総ナリンジン代謝産物濃度は投与 24 時間後に最大となった。肝臓中にはアグリコンであるナリンゲニン、ナリンゲニングルクロン酸抱合体、ヒドロキシモノグルコシルナリンゲニン及びヒドロキシメチルナリンジンが存在し、ヒドロキシメチルナリンジンの割合が最も多くなった。グルクロン酸抱合体は血漿、尿及び腎臓と同様にナリンジン投与群では投与 8 時間後に最大となり、糖転移ナリンジン投与群では投与 3 時間後に最大となったが、ヒドロキシメチルナリンジンは、両群ともに投与 24 時間後に最大となった。ナリンジンまたは糖転移ナリンジンを投与すると、吸収された代謝産物の大部分は、初期はグルクロン酸抱合体として循環すること、またその後ヒドロキシモノグルコシルナリンゲニンとして分布することが明らかとなった。現在、ナリンジン及び糖転移ナリンジンを投与したラットの糞中の代謝産物を定量的に検討している。

naringin, glycosyl naringin, pharmacokinetics

講演番号：2A05p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ センター2 号館 A05 会場

ラットにおけるルチンの吸収利用と代謝

Bioavailability and metabolism of rutin in rats

○尾方 みのり、石田 瑞穂、長田 恭一 (明治大農)
○Minori OGATA, MIZUHO ISHIDA, KYOICHI OSADA (Meiji Univ)

【目的】ソバなどに含まれているフラボノイド配糖体のルチン(R)は種々の生理活性を示すことが知られている。しかし、多様な生理活性に関する研究と比較するとその吸収や代謝に関する情報は限られている。ルチンの体内動態を明らかにすることができれば、生理活性の発現メカニズムや安全性をより理解しやすくなると考えられる。そのため、本研究ではラットにルチンを投与して小腸からの吸収と体内動態を明らかにすることを目的とした。

【方法】3 週齢の Wistar 系雄性ラットを 1 週間予備飼育し基準食を与えた対照群と、基準食に 1%R を添加した飼料を与えた R 群に分け、2 週間飼育した後、12 時間絶食を行って解剖した。血漿、 尿、 肝臓、 盲腸を採取し、各試料から代謝産物を抽出し、LC-MS に供して解析した。また、6 週齢の雄性 Wistar 系ラットに R を 25 mg/ml の濃度で胃内に強制投与し、投与から 0, 3, 6, 24 時間後に解剖して血漿、尿を採取した。採取した試料中の R 代謝産物について LC-MS に供して分析を行った。

【結果】R 群の血漿中に含まれる R の代謝産物は共通してメチル化をされていた。R 群の尿では 9 種類の代謝産物が定量され、中でもイソラムネチン(IR)-グルクロン酸抱合体(GlcA)が 39.1%と最も高い割合を占めた。R 群の肝臓では 2 種類の代謝産物が定量され、中でもケルセチン(Q)-GlcA が 93.7%と最も高い割合を占め、肝臓ではグルクロン酸抱合が盛んに行われていると考えられた。R 群の盲腸では 7 種類の代謝産物が定量された。中でも IR が 49.1%と最も高い割合を占め、盲腸では IR、Q、R など抱合化されていない代謝産物が約 73%を占めていた。

【考察】吸収された R の大半は抱合化をされており、中でもグルクロン酸抱合体は血漿、尿、盲腸中に存在した。一方、血漿、尿、盲腸中には非抱合体も存在した。血漿や盲腸に存在した非抱合体は腸内細菌により脱抱合されて生成したと考えられる。脱抱合された R は疎水性が高まって、再吸収され易くなり、腸肝循環されたために、絶食を経ても代謝産物が各臓器から検出されたのではないかと考えられる。以上のように、食事性 R 及びその代謝産物の体内残存性は高く、それぞれの代謝産物が強い生理活性を示すのではないかと考えられる。現在、R を胃内強制投与したラットにおける代謝産物とその組織分布を検討している。

Rutin, pharmacokinetics, metabolism

講演番号：2A06a01
講演日時：3 月 26 日 09:30～ センター2 号館 A06 会場

酸化型ビタミン C によるタンパク質修飾を介した単球・マクロファージの機能調節

Oxidized vitamin C-modified protein regulates monocyte/macrophage function

○板倉 正典[1]、根岸 瑠美[2]、近澤 未歩[1]、佐々木 栄太[1]、内田 浩二[1]([1]東大院・農生化、[2]東大・定量研)
○Masanori ITAKURA[1], Lumi Negishi[2], Miho Chikazawa[1], Eita Sasaki[1], Koji Uchida[1] ([1]Tokyo Univ. Graduate School of Agricultural and Life Sciences, [2]Tokyo Univ. Institute for Quantitative Biosciences)

【背景】ビタミン C(アスコルビン酸)は抗酸化剤として働き、自身はデヒドロアスコルビン酸(DHA)へと酸化されるが、反応性の高い DHA はタンパク質を修飾することでその機能を変化させることが知られている。当研究室ではこれまでに、DHA 修飾によりアルブミンが細胞への結合能を獲得することを明らかにしているが、その病態生理学的意義は未だ不明である。そこで本研究は、抗酸化剤代謝物によって新たに獲得されるタンパク質の機能解明を目的として、DHA 修飾タンパク質による単球・マクロファージの機能調節について検討を行った。
【方法、結果および考察】マウス腹腔細胞にビオチン標識 DHA 修飾アルブミンを処置し、フローサイトメトリーによる結合細胞解析を行った結果、アルブミンの DHA 修飾依存的なマクロファージへの結合が認められた。DHA 修飾アルブミンが結合する受容体の同定を目的に、株化マクロファージ細胞 J774A.1 細胞の脂質ラフト画分を用いたプルダウンアッセイを行った結果、結合タンパク質としてヒストンタンパク質が同定され、この結合はリコンビナントヒストンタンパク質を用いた検討からも確認された。ヒストン H2B は単球・マクロファージの細胞膜に発現し、プラスミノーゲン受容体として働くことでマクロファージの組織浸潤および炎症応答を制御することが報告されている。そこで DHA 修飾アルブミンのプラスミノーゲン経路への関与を検討した。リコンビナントタンパク質を用いた検討の結果、DHA 修飾アルブミン添加により H2B とプラスミノーゲンの結合が阻害されること、さらにプラスミノーゲンの活性化が抑制されることが明らかとなった。DHA 修飾アルブミンの単球・マクロファージ組織浸潤への影響を検討するため、チオグリコレート誘導性腹膜炎モデルマウスを用いた検討を行ったところ、DHA 修飾アルブミンの静脈内投与により、腹腔内への単球・マクロファージ浸潤が抑制されることが明らかとなった。
　以上の結果より、DHA 修飾アルブミンがヒストン H2B に結合することでプラスミノーゲン活性化を阻害し、単球・マクロファージの細胞浸潤を抑制することが明らかとなり、酸化型ビタミン C による新たな炎症応答調節機構の存在が示唆された。

vitamin c, macrophage, histone

講演番号：2A06a02
講演日時：3 月 26 日 09:41～ センター2 号館 A06 会場

抗酸化性ポリフェノールを介したヒストンリガンドの生成
Generation of histone ligands by antioxidant polyphenols

板倉 正典、○山口 公輔、近澤 未歩、佐々木 栄太、内田 浩二（東京大農）
Masanori ITAKURA, ○Kosuke YAMAGUCHI, Miho CHIKAZAWA, Eita SASAKI, Koji UCHIDA (Tokyo Univ.)

【背景】ポリフェノールやビタミン C は抗酸化活性やがん抑制、免疫増強など多様な生理機能が知られる食品成分であるが、近年、これらの食品成分がタンパク質を修飾することで、その機能性を変化させることが示唆されている。当研究室ではこれまでに酸化型ビタミン C により修飾を受けたアルブミンがマクロファージ細胞膜上に存在するヒストン H2B と結合し、その浸潤能を低下させることを明らかにしている。こうした知見から酸化型ビタミン C と同様に、ポリフェノールにより修飾を受けたタンパク質もヒストンと結合し、マクロファージの機能調節に関与すると予想した。そこで本研究では、タンパク質にヒストン結合活性を付与するポリフェノール類の同定およびヒストンとの結合に関与するポリフェノール修飾タンパク質構造を明らかにするとともに、ポリフェノール修飾タンパク質がマクロファージ動態に与える影響の解明を目的とした。
【方法・結果及び考察】数種類のポリフェノールを用いてアルブミン修飾体を調製し、ヒストン H2B との結合を ELISA 法にて評価した。その結果、ケルセチンおよびエピガロカテキンガレート（EGCG）修飾アルブミンと H2B との結合が認められた。またビオチン標識アルブミンを用いて修飾アルブミンのマクロファージへの結合をフローサイトメトリーにより評価したところ、アルブミンはケルセチンおよび EGCG 修飾によってマクロファージへの結合能を獲得することが明らかになった。次にヒストンと結合するアルブミン修飾構造の同定を目的として、リジン残基モデルであるビオチン化ペンチルアミンを用いた検討を行った。その結果、ペンチル化ペンチルアミンもまたケルセチンおよび EGCG 修飾によって H2B との結合能を獲得した。さらにヒストン結合活性を示す修飾ペンチルアミンを LC-MS/MS で解析したところ、環状イミン構造の形成が示唆された。
以上の結果より、ケルセチンおよび EGCG 修飾によってアルブミンはヒストン H2B およびマクロファージへの結合能を獲得し、その細胞機能を調節する可能性が示唆された。またケルセチンおよび EGCG 修飾はリジン残基を環状イミン構造に変換し、これがヒストンとの結合に関与することが示唆された。

Polyphenol, Histone, Macrophage

講演番号：2A06a03
講演日時：3 月 26 日 09:52～ センター2 号館 A06 会場

細胞外ヒストンの細胞障害性に対する酸化型ビタミン C 修飾タンパク質の保護効果
Protective effect of oxidized vitamin C modified protein against cytotoxicity of extracellular histones
板倉 正典、○北澤 麗磨、近澤 未歩、佐々木 栄太、内田 浩二（東京大農）
Masanori ITAKURA, ○Roma KITAZAWA, Miho CHIKAZAWA, Eita SASAKI, Kouji UCHIDA (Tokyo Univ)

【背景・目的】
ヒストンは核内で DNA の折り畳みに寄与するタンパク質として知られているが、ヒストンは好中球細胞外トラップ(NETs)の構成要素の一つとして細胞外へ放出され、免疫機能を制御することが近年の研究で明らかとなってきた。一方で、敗血症などの病態において過剰な細胞外ヒストンの放出が起こり、ヒストン誘発性血管内皮細胞障害や、多臓器不全症を引き起こすことが報告されている。ビタミン C は抗酸化性水溶性ビタミンであり、老化の防止や免疫機能の向上などの効果が知られている。さらに近年、高用量のビタミン C 投与が敗血症に対して治療効果を示すことが報告されているが、その作用機序には不明な点が多く残されている。当研究室ではこれまでに酸化型ビタミン C（デヒドロアスコルビン酸 : DHA）によって修飾を受けたアルブミンがヒストンへの結合能を獲得することを明らかにしている。そこで本研究では、細胞外ヒストンに対する DHA 修飾タンパク質の関与を明らかにすることを目的として、ヒストン誘発性細胞障害に対する DHA 修飾アルブミンの生体保護作用について検討を行った。
【方法、結果および考察】
ウシ胸腺由来ヒストンに、ウシ血清アルブミン（BSA）または DHA 修飾 BSA を添加したのちに可溶性画分および不溶性画分を調製し、SDS-PAGE、CBB 染色を行った。その結果、DHA 修飾 BSA 添加群においてのみヒストン凝集体が観察され、さらにヒストンのタイプによって凝集性が異なることが示唆された。凝集性の違いが DHA 修飾 BSA と各種ヒストンとのアフィニティの違いに起因するかを、リコンビナントヒストンを用いた表面プラズモン共鳴法で評価した。その結果、各種ヒストンと DHA 修飾 BSA の結合は認められたものの、アフィニティに大きな差はみられなかった。ヒストン誘発性細胞傷害に対する DHA 修飾 BSA の効果を検討するため、ヒストンおよび DHA 修飾 BSA を血管内皮細胞株 EA.hy926 細胞に添加し、2 時間後の細胞生存率をフローサイトメトリーにより評価した。その結果、ヒストン処置による細胞生存率の低下は、DHA 修飾 BSA の共処置により有意に抑制された。さらに C57BL/6J マウスへのヒストン静脈体投与による致死率は、DHA 修飾 BSA の共投与により有意な改善が認められた。
　以上の結果より、DHA 修飾 BSA はヒストンと結合、凝集することにより、ヒストン誘発性細胞障害を抑制する可能性が示唆された。

extracellular histones, oxidized vitamin C, sepsis

講演番号：2A06a04
講演日時：3 月 26 日 10:03～ センター2 号館 A06 会場

糖修飾エビアレルゲンタンパク質のモデルマウスによるアレルゲン性評価

Evaluation of sugar modified prawn allergen protein using model mouse system

○山口 春菜、目黒 帆乃佳、菰田 俊一（宮城大　食産業）
○Haruna YAMAGUCHI, Honoka MEGURO, Toshikazu KOMODA (MIYAGI Univ.)

[目的]

エビ由来の耐熱性アレルゲンタンパク質のトロポミオシン(TM)は、エビに含まれる主要なアレルゲンタンパク質である。当研究室では TM を化学修飾することにより、そのアレルゲン性がどような影響を受けるか、評価を行うこととした。化学修飾には、アレルゲンタンパク質の TM と糖類を加熱するメイラード反応を使った。評価は、ドットブロット法などの in vitro によるものと、モデルマウスによる in vivo の両方で行った。

[方法および結果]

はじめに、ブラックタイガー種のエビから、タンパク質を抽出し、硫安沈殿法等により精製を行った。SDS-PAGE により、この粗タンパク質を確認したところ、37KDa 付近に主要なバンドが確認されたので、これを TM とし、以下の試験に使用した。TM は単糖類のリボースおよび多糖類のガラクトマンナンとメイラード反応により結合させ、SDS-PAGE およびウェスタンブロッティング法、ドットブロット法により確認した。各種の検討を行った結果、糖修飾 TM は水に溶けにくい性質を持つことが分かった。このことを利用して、糖修飾 TM を簡易的に精製し、未反応の TM や水溶性の糖類を取り除くことができた。次に、エビアレルギーモデルマウスを作製し、このマウスを使って糖修飾 TM のアレルゲン性評価を行った。この結果、非修飾 TM と比べると、糖修飾 TM では投与後の血中のヒスタミン濃度が低く、TM のアレルゲン性が抑制されていることが分かった。現在、これらの糖修飾 TM を使って、長期摂取試験を行い、炎症関連のシグナル放出など解析を進めている。

tropomyosin, Maillard reaction, prawn allergy

発表責任者：菰田　俊一（komoda@myu.ac.jp）

講演番号：2A06a06
講演日時：3 月 26 日 10:35～ センター2 号館 A06 会場

メチル化カテキンとエリオジクチオールの抗アレルギー作用における 機能性フードペアリング
Functional food pairing of Methylated catechin and Eriodictyol on anti-allergic activity
○藤野 小夏、吉本 孝憲、藤村 由紀、立花 宏文（九大院農院・生機科）
○Konatsu FUJINO, Takanori YOSHIMOTO, Yoshinori FUJIMURA, Hirofumi TACHIBANA (Kyushu Univ.)

【目的】
緑茶に含まれる主要なカテキンの一種である Epigallocatechin-3-*O*-gallate（EGCG）は、ヒスタミン遊離抑制作用等の抗アレルギー作用を有することが報告されている。我々は EGCG と柑橘ポリフェノールの一種であるエリオジクチオールを組み合わせることにより、EGCG の抗がん作用が増強されることを明らかにしてきた[1)]。一方、べにふうきは吸収性及び血中での安定性に優れているメチル化カテキン Epigallocatechin-3-*O*-(3-*O*-methyl) gallate（EGCG3”Me）を含む茶品種であり、べにふうき緑茶の飲用は花粉症の症状を軽減することが報告されている。そこで本研究では、メチル化カテキンの抗アレルギー作用に対するエリオジクチオールの増強効果を検討した。
【方法および結果】
ラット好塩基球様白血病細胞株 RBL-2H3 に対し EGCG3”Me を処理し、脱顆粒の指標となるβ-hexosaminidase 放出率に与える影響を検討したところ、EGCG3”Me は濃度依存的に脱顆粒を抑制した。続いて、高親和性 IgE 受容体からの脱顆粒誘導シグナルの伝達に重要な脂質ラフトの形成に関与する酸性スフィンゴミエリナーゼ（ASM）に着目した。EGCG3”Me が ASM 活性に与える影響を薄層クロマトグラフィーにて評価した結果、EGCG3”Me は ASM を活性化し、ASM 阻害剤 Desipramine の処理により EGCG3”Me の脱顆粒抑制作用がキャンセルされた。また、ASM の上流因子で cGMP を合成する可溶性グアニル酸シクラーゼ（sGC）が脱顆粒に与える影響を検討したところ、sGC 阻害剤 NS2028 の処理により EGCG3”Me の脱顆粒抑制作用がキャンセルされた。さらに、EGCG3”Me 及びエリオジクチオールを単独処理または組み合わせて処理し、脱顆粒抑制及び ASM 活性化に与える影響を評価した。その結果、エリオジクチオールは EGCG3”Me の脱顆粒抑制作用及び ASM 活性化作用を増強した。
以上の結果より、EGCG3”Me は sGC/cGMP/ASM 経路を介して脱顆粒抑制作用を発揮することが示唆された。さらに、エリオジクチオールを組み合わせることによりメチル化カテキンの抗アレルギー作用が増強され、この増強作用に ASM 活性化に対する EGCG3”Me とエリオジクチオールの相乗的な作用が関与する可能性が示された。

1) *Scientific Reports*, 5, 9474, 2015

EGCG3"Me, Eriodictyol, Allergy

講演番号：2A06a07
講演日時：3 月 26 日 10:46～ センター2 号館 A06 会場

5 種類の褐藻類大型海藻抽出液のヒアルロニダーゼ阻害活性

Hyaluronidase-inhibitory activity of algal extracts obtained from five kinds of blown macroalgae

○有本 清也[1]、高崎 隆平[2]、垣田 浩孝[1] ([1]日大院総合基、[2]日大文理)
○ SEIYA ARIMOTO[1], RYUHEI TAKASAKI[2], HIROTAKA KAKITA[1] ([1]Graduate School of Integrated Basic Sciences, Nihon Univ., [2]College of Humanities and Sciences, Nihon Univ.)

【緒言】現在、国民の２人に１人は何らかのアレルギーにかかっていることが知られている。アレルギーとは生体内で異物に対して過剰な免疫反応が起こることである。アレルギー患者にとっては投薬による経済的負担と身体的負担が大きく、国民的な医療問題の一つとなっている。投薬以外のアレルギー治療として近年では食品成分に注目が集まっている。柑橘由来ポリフェノール等がその例であり、サプリメントとしてすでに市販されている。ポリフェノールは分子内に複数のフェノール性水酸基を有する植物成分の総称であり、血圧上昇抑制作用、脂質代謝改善作用、抗酸化作用等が報告されている。そこで本研究では 5 種類の褐藻類大型海藻の抽出液中のポリフェノール画分について抗アレルギー活性を比較することを目的とした。【材料・方法】瀬戸内海で採取したクロメ、ノコギリモク、アカモク、ホンダワラ、エンドウモクを人工海水、水の順で洗浄後、使用まで冷凍保管した。凍結乾燥海藻を細かくすりつぶして海藻粉末を得た。海藻粉末２５ｇにエタノール３７５ｍＬを添加し、5 時間撹拌抽出後、吸引ろ過して不溶物質を除去後、ロータリーエバポレーターを用いて蒸発乾固して海藻抽出物を得た。海藻抽出物はエタノールに再溶解して固相抽出カラムにかけ、ポリフェノールを分画した。各ポリフェノール画分についてフォーリン・チオカルト法によるポリフェノール定量（没食子酸を標準物質として用いた）およびヒアルロニダーゼ阻害活性を測定し、ＩＣ５０値を算出した。ヒアルロニダーゼ阻害活性はヒアルロン酸、コンパウンド４８／８０、ｐ－ジメチルベンズアルデヒドを用いて０．１M酢酸緩衝液中で実施した。ブランクとしては０．１M酢酸緩衝液を用いた。陽性コントロールとしてはタンニン酸を用いた。【結果・考察】5 種類の褐藻類大型海藻由来の海藻抽出液中のポリフェノール量、ヒアルロニダーゼ阻害活性はそれぞれ異なっていた。ノコギリモクの場合、１００％エタノールで抽出した画分を固相抽出カラムで分画した際に一つの画分にヒアルロニダーゼ阻害活性が集中した。クロメの場合、エタノール抽出において１００％エタノール抽出画分と５０％抽出画分のヒアルロニダーゼ阻害活性が、９０％、８０％、７０％、６０％エタノールでの抽出画分のヒアルロニダーゼ阻害活性に比較して高い結果を得た。このことからクロメにはヒアルロニダーゼ阻害活性を持つポリフェノールが少なくとも 2 種類以上含まれていることが示唆された。以上のことから褐藻類大型海藻には種によって異なったポリフェノールが含まれており、そのヒアルロニダーゼ阻害活性も異なることが示唆された。

Seaweed, Antiallergic, Food

発表責任者：垣田浩孝（Kakita.hirotaka@nihon-u.ac.jp）

講演番号：2A06a08
講演日時：3 月 26 日 10:57～ センター2 号館 A06 会場

リン酸修飾 Fag e 2 の IgA 産生促進を介したソバアレルギー軽減作用

Study on the anti-allergic mechanism of phosphorylated Fag e 2 enabled the enhancement of IgA production

○鈴木 湧太[1]、山口 大樹[1]、中村 宗一郎[1]、片山 茂[1,2]([1]信州大・農、[2]信州大・先鋭領域融合)
○ Yuta SUZUKI[1], Daiki YAMAGUCHI[1], Souichiro NAKAMURA[1], Shigeru KATAYAMA[1,2] ([1]Shinshu Univ. Agr., [2]Shinshu Univ. Biom.)

【目的】ソバは重篤なアレルギー症状を惹起することが知られており、主要アレルゲンとして Fag e 1（Fe1）と Fag e 2（Fe2）が既に報告されている。Fe1 はソバタンパク質中の含有量が高いこと、Fe2 は高い消化抵抗性を有し、強いアレルゲン性を示すことが知られている。本研究室ではこれまでに、糖鎖等の分子修飾がアレルゲン性を低下させることを報告してきた。そこで本研究では、感作モデルマウスを用いて、リン酸修飾 Fe2 の経口投与によるソバアレルギー改善効果を検討するとともに、作用機序を解明することを目的とした。

【方法】酵母発現用ベクター（pPICZαC）のマルチクローニングサイトに Fe2 の cDNA 配列を挿入後、得られたベクターで Pichia Pastoris X-33 を形質転換した。形質転換酵母を YNB 培地で培養し菌体外に Fe2 を分泌させた。培地中に分泌された組み替え体はサイズ排除クロマトグラフィーにより精製した。Fe2 を 0.1 M ピロリン酸溶液（pH 4.0）に溶解後、凍結乾燥し、得られた粉末を 85℃で 5 日間乾燥加熱することで、リン酸修飾 Fe2（P-Fe2）を調製した。Fe2 感作 BALB/c マウスに対し、P-Fe2 を 0.05%(w/w) 含有飼料を 6 週間自由摂取させた。血清中の抗体量とパイエル板のサイトカイン量を ELISA 法で測定した。濾胞性ヘルパーT 細胞（Tfh）の集団割合はフローサイトメトリーにより測定した。また、Fe2 感作マウスから調製したパイエル板細胞を P-Fe2 存在下で培養し、培養上清の Fe2 特異 IgA 産生量を測定した。

【結果】P-Fe2 の経口摂取によるアレルギー改善効果について検討した。対照群と比較して、P-Fe2 摂取群では、血清中特異 IgE の産生低下と特異 IgA の産生増加が認められた。また、腸管パイエル板において、P-Fe2 摂取群では、IL-4 産生低下、IL-21 産生増加、および濾胞性ヘルパーT 細胞（Tfh）集団割合の増加が示された。さらに、CD11c+樹状細胞由来の IL-6 産生量が P-Fe2 により増加した。パイエル板を用いた in vitro 実験において、P-Fe2 添加による Fe2 特異 IgA 産生量は抗 IL-21 および抗 IL-6 中和抗体により低下することが示された。以上の結果より、リン酸修飾 Fag e 2 の経口摂取は、腸管パイエル板での Fe2 特異 IgA 産生促進を介してアレルギー反応を抑制することが示された。

Buckwheat allergy, Phosphorylation, IgA

講演番号：2A06a09
講演日時：3 月 26 日 11:08～ センター2 号館 A06 会場

経皮感作マウスに高圧下ペプシン処理β-ラクトグロブリンを経口投与したときのアレルギー応答

Allergic response of orally administered pepsin-treated β-lactoglobulin under high pressure to epicutaneously-sensitized mice

○山田 潔、湯澤 美沙季、松岡 歩実、松元 香澄、東 徳洋（宇都宮大農）
○Kiyoshi YAMADA, Misaki YUZAWA, Ami MATSUOKA, Kasumi MATSUMOTO, Norihiro AZUMA (Utsunomiya Univ.)

【目的】β-ラクトグロブリン（β-LG）は主要な牛乳アレルゲンである。高圧下でタンパク質分解酵素の処理を行うことによる様々なアレルゲンタンパク質の低アレルゲン化が報告されているが、β-LG における手法は十分には確立されていない。これまでに、400 MPa または 600 MPa で 10 分間のペプシン処理を行うことで、β-LG が低アレルゲン化されることを、皮膚アナフィラキシー、腹腔投与による体温低下を指標に確認している。本研究では高圧下ペプシン処理によるβ-LG の低アレルゲン化を、経口投与により誘導される体温低下を指標として検討した。
【方法】β-LG を含有するホエータンパク質分離物（WPI）水溶液（10 mg/mL）にペプシン（酵素：基質＝1：100）を添加し、400 MPa で 10 分または 600 MPa で 10 分高圧処理して、WPI ペプシン分解物を得た。これらのβ-LG 分解物のアレルゲン性の評価は次のように行った。BALB/c マウス（６週齢、オス）の脱毛した背部皮膚にテープストリッピングを行なった後、4% SDS 60 μL を塗布した。その後、β-LG 水溶液（300 μg/60 μL）を塗布して、経皮感作を行なった。この経皮感作を週に３日連続で行い、３週間繰り返した。最後の経皮感作から１週後に、WPI ペプシン分解物を 50 mg 経口投与することにより、アナフィラキシーショックによる体温低下を誘導した。経口投与前後で直腸温を測定した。
【結果】SDS-PAGE 解析の結果、10 分間の高圧下ペプシン処理では 400 MPa と 600 MP、いずれにおいてもβ-LG の分解が認められた。マウスへ WPI を経口投与したときに誘導されるアナフィラキシーによる直腸温の低下を評価した結果、未処理の WPI を経口投与したときには、15 分後に顕著な直腸温の低下がすべてのマウスにおいて認められた。一方、600 MPa で処理した WPI を経口投与したマウスでは、このような直腸温の低下は認められなかった。投与３日後、600 MPa で処理した WPI を経口投与したマウスには未処理の WPI を、未処理の WPI を経口投与したマウスには、400 MPa で処理した WPI を経口投与した結果、400 MPa で処理した WPI を経口投与したときにも、直腸温低下の抑制が認められた。これらのことから、400 MPa で 10 分または 600 MPa で 10 分高圧処理することによって、WPI 中のβ-LG が十分に分解され、経口投与した際のβ-LG のアレルゲン性が十分に消失していることが示唆された。

food allergy, β-lactoglobulin, anaphylaxis

発表責任者：山田 潔（yamada@cc.utsunomiya-u.ac.jp）

講演番号：2A06a10
講演日時：3 月 26 日 11:19～ センター2 号館 A06 会場

トマト種子抽出物および含有サポニン lycoperoside H の I 型アレルギー性皮膚炎症状に対する作用
Effect of tomato seed extract and its major saponin, lycoperoside H, on symptom of type I allergic dermatitis

○竹田 翔伍[1]、中村 誠宏[2]、松田 久司[2]、下田 博司[1]([1]オリザ油化(株)、[2]京都薬大)
○Shogo TAKEDA[1], Seikou NAKAMURA[2], Hisashi MATSUDA[2], Hiroshi SHIMODA[1] ([1]Oryza Oil & Fat Chemical, [2]Kyoto Pharm. Univ.)

【目的】トマト(*Solanum lycopersicum*)は，広く世界中で食されている植物であるが，種子に限定した成分や機能性に関する研究は少ない。演者らは，トマト種子抽出物（TSE）に含まれる主要なサポニンとして lycoperoside H（LH）を単離・同定したことを昨年度の本大会において発表した。これまでに完熟トマトの果肉から単離された LH に類似した化学構造の escleoside B が，アレルギー性皮膚炎モデルマウスにおいて抗アレルギー作用を示すことが報告されている。そこで本研究では，TSE および LH の I 型アレルギー性皮膚炎症状抑制に対する有効性評価を行った。
【実験方法】*In vivo* 試験としてマウス掻痒モデルと PCA 反応を行った。前者では，ddY マウスに TSE または LH を経口投与し， 3%compound 48/80 溶液を頚背部に皮下投与してその後の引っ掻き回数を計測した。後者では，ddY マウスの両耳介に抗 DNP-IgE（2000 倍希釈）を皮内投与した 2 日後に TSE または LH を経口投与し，0.25 mgDNP-BSA と 0.5%エバンスブルーの生理食塩水溶液（0.25 mL）を尾静脈より投与した。その後，耳介に漏出した色素を抽出して定量した。一方，*in vitro* では TSE および LH の保湿作用を評価した。ヒト表皮 3D モデル(3DE)のメンブレン側に TSE または LH 溶液を添加し，48 時間培養後に RNA を抽出し，リアルタイム RT-PCR により保湿関連遺伝子の mRNA 発現を解析した。また，経皮水分蒸散量（TEWL）を培養 24～72 時間にかけて経時的に測定した。
【結果】掻痒モデルにおいて，TSE（500 mg/kg）および LH（10 および 30 mg/kg）投与群では引っ掻き回数が減少する傾向が見られた。一方，マウス耳介 PCA 反応では TSE（500 mg/kg）および LH（10 mg/kg）投与群において色素漏出量の有意な抑制が確認された。また，リアルタイム RT-PCR では filaggrin の発現が TSE（10 μg/mL）および LH（3 および 10 μM）の添加によって有意に増加し，ceramide synthase-3 の発現は TSE（1 および 3 μg/mL）および LH（1, 3 および 10 μM）の添加で有意に増加した。さらに，TEWL 測定の結果，培養 72 時間後において TSE（10 μg/mL）および LH（10 μM）添加群の TEWL が対照群と比較して有意に低下した。以上の結果より，TSE および LH は即時型アレルギー反応に対して抑制作用を示し，アトピー性皮膚炎の皮膚で減少が確認されている保湿関連遺伝子の一部の発現を促進し，TEWL を改善することが明らかとなり，アレルギー皮膚炎症状の抑制に効果を示す可能性が示唆された。現在，アトピー性皮膚炎モデルマウスにおける評価を実施中であり，その結果も併せて報告する。

tomato seed extract, allergic dermatitis, lycoperoside

講演番号：2A06a11
講演日時：3 月 26 日 11:40～ センター2 号館 A06 会場

西洋食負荷 Ldlr KO マウスにおけるニトベギク由来オリザビンの粥状動脈硬化症と炎症の予防効果

Preventive effect of *Tithonia diversifolia*-derived orizabin for atherosclerosis and inflammation in Western diet-fed Ldlr KO mice

○井出 将博[1,2]、鷲見 加奈子[1]、中村 鉄平[1]、Xian Wen Tan[2]、吉田 泉[1]、高橋 有志[1]、三嶋 隆[1]、藤田 和弘[1]、五十嵐 友二[1]、松浦 栄次[2]([1]日本食品分析セ、[2]岡山大院 医歯薬学)
○Masahiro IDE[1,2], Kanako Sumi[1], Teppei Nakamura[1], Tan Xian Wen[2], Izumi Yoshida[1], Yushi Takahashi[1], Takashi Mishima[1], Kazuhiro Fujita[1], Tomoji Igarashi[1], Eiji Matsuura[2] ([1]JFRL, [2]Okayama Univ.)

【背景・目的】粥状動脈硬化症は日本人の死亡原因の上位である虚血性心疾患のリスク因子であり，その予防は健全な長寿社会の維持に不可欠である。その病態は血管内皮の炎症を発端に単球のマクロファージ化，酸化 LDL（oxLDL）を無制限に取込むことによる泡沫化を経てプラークが形成され，やがてプラークは破綻し血管の閉塞に至る。これまでに我々は *Tithonia diversifolia*（ニトベギク，TD）茎葉から単離した化合物，orizabin が，ホルボールエステル（PMA）で刺激した THP-1 細胞において oxLDL 受容体，CD36 を有意に抑制することを報告し，さらに PTEN 発現の促進を介した，Akt リン酸化シグナル伝達経路の抑制による抗動脈硬化・抗炎症機能を持つ可能性を見出した。本研究は，動脈硬化モデルとして B6.129S7-Ldlr^{tm1her}/J（Ldlr$^{-/-}$）マウスを用いて，オリザビンの生体内における抗動脈硬化・抗炎症作用について評価・検討することを目的とした。
【方法】Ldlr$^{-/-}$マウス 24 匹（8 週齢，♂）を乾燥 TD エタノール抽出物群（TDE，n=5）若しくはオリザビン群（orizabin, n=5），又は西洋食対照群（n=9）に分け給餌し，毎週摂食量（FA），体重（BW）及び血糖値（BGL）を測定した。6 週間後，全採血後，肝臓，腎臓，精巣上体白色脂肪組織（eWAT），大動脈を採取し，血清分離後，血中コレステロール，トリグリセリド，血清アミロイド P 及び β2GPI/oxLDL 複合体を測定した。さらに肝臓，腎臓および精巣上体白色脂肪組織(eWAT)における遺伝子発現を qRT-PCR を用いて解析した。また採取した大動脈を Oilred O 染色し脂質蓄積面積を測定した。血管断面のヘマトキシリン・エオジン（H&E）染色切片を用いて血管内腔の狭窄率を計算した。
【結果】西洋食対照群と比較して，オリザビン群は，血清トリグリセリド（TG），血清アミロイドタンパク質（SAP），及び血管の炎症によって形成される β2GPI/oxLDL 複合体を有意に減少させた。組織における TNF-α などの炎症性サイトカインの mRNA 発現はオリザビン摂餌によって抑制される傾向があった。また腎臓においてケモカインや接着分子の遺伝子発現はオリザビン群で優位に抑制された。大動脈の組織解析では，収集された下行大動脈の血管内皮の脂質蓄積と血管狭窄は対照群と比較してオリザビン群で有意に抑制された。
【結論】西洋食負荷 Ldlr$^{-/-}$マウスにおけるオリザビン摂取は *in vitro* で得られた抗動脈硬化・抗炎症の結果を生体内において反映し，さらにオリザビンの抗炎症作用は血管，肝臓，腎臓などの全身の組織で作用する可能性が示唆された。本研究の結果，オリザビンには生体内において炎症性疾患である粥状動脈硬化症の予防や改善の可能性があることが示唆された。

atherosclerosis, TNF-α, β_2GPI / oxLDL complexes

発表責任者：井出将博（idem@jfrl.or.jp）

講演番号：2A06a12
講演日時：3 月 26 日 11:51～ センター2 号館 A06 会場

短鎖脂肪酸は腸管系樹状細胞の分化を誘導する

Short chain fatty acids induce the differentiation of intestinal dendritic cells

○三浦 亮介、八代 拓也、西山 千春（東理大基礎工）
○Ryosuke MIURA, Takuya YASHIRO, Chiharu NISHIYAMA (Dept. of Biol Sci and Tech., Tokyo Univ. of Sci)

腸内細菌が食物繊維などの難消化性糖類を発酵することで産生される短鎖脂肪酸は、宿主のエネルギー源として活用されるだけでなく、様々な免疫細胞や腸管上皮細胞に対して調節作用を持つことが近年明らかになってきている。腸管には多くの免疫担当細胞が存在しており、ヒトの場合、腸管に局在する免疫細胞は全身の約7割を占めると算出されるほどである。腸管に存在する血球系細胞は細胞表面にインテグリン分子 LPAM-1（$\alpha_4\beta_7$）や CD103（$\alpha_E\beta_7$）を発現することを特徴としており、腸管の血管内皮や腸管上皮細胞に発現する接着分子 MAdCAM-1 や E-カドヘリンとの相互作用によって腸管リンパ組織へと誘導される。このような腸管免疫細胞の分化や特異的な遺伝子発現に、短鎖脂肪酸が及ぼす影響は不明である。特に、腸管の樹状細胞（dendritic cell; DC）は、炎症反応や T 細胞分化制御を介して腸管の免疫恒常性維持に関わる重要な働きをするが、腸管特異的な形質の獲得や分化成熟のメカニズムについては不明な点が多い。そこで、本研究では、短鎖脂肪酸が DC の分化やインテグリン分子発現に寄与する可能性に着目し、解析を行った。

サイトカイン Flt3L 存在下でマウス骨髄細胞を培養すると、CD11c を発現することを共通の特徴とする DC 群が誘導される。この時、酪酸を培養液に添加すると、$PDCA1^+B220^+$で定義されるいわゆる plasmacytoid DC が劇的に減少し、対照的に conventional DC の割合が増加した。興味深いことに Flt3L で誘導した骨髄由来 DC のうち、LPAM-1 や CD103 を発現する細胞はそれぞれ 3%、10%程度であったのに対し、酪酸添加群では $LPAM\text{-}1^+$DC が 30%、$CD103^+$DC が 20%といずれも顕著に増加した。これらの効果は、プロピオン酸など他の短鎖脂肪酸にも認められた。短鎖脂肪酸はヒストン脱アセチル化酵素阻害(HDACi)活性による遺伝子発現誘導と、GPCR を介した細胞内シグナル伝達制御という多面的な作用を有する。そこで、まず、HDACi 活性の関与を検証するため、HDACi 剤のトリコスタチン A やエンチノスタットを添加したところ、酪酸と同様に plasmacytoid DC の分化が阻害され、LPAM-1 発現も誘導されたが、CD103 発現は変化しなかった。続いて、Gi 型 GPCR 阻害剤百日咳毒素を添加したところ、酪酸による $CD103^+$ DC 誘導は抑制された一方、plasmacytoid DC 分化や LPAM-1 発現に対する酪酸の効果は百日咳毒素の影響を受けなかった。以上のことから、酪酸をはじめとする短鎖脂肪酸は HDACi 活性を介して DC の分化方向性を plasmacytoid DC から conventional DC へと誘導すると共に、腸管 DC 特異的なインテグリン発現を引き起こすこと、さらに、CD103 発現は GPCR を、LPAM-1 発現は HDACi 作用を介するという異なる仕組みがあることが判明した。

本研究により、腸内細菌が短鎖脂肪酸の産生を介して腸管系 DC の分化制御を行い宿主の腸管免疫恒常性に寄与することが示され、その分子メカニズムの一端が明らかになった。

Dendritic cells, Short chain fatty acids, Gut immunity

発表責任者：三浦亮介（rmiura@rs.tus.ac.jp）

講演番号：2A06a13
講演日時：3 月 26 日 12:02～ センター2 号館 A06 会場

野沢菜漬け由来乳酸菌投与による宿主免疫賦活効果とがん転移の抑制効果

Immunomodulatory and anti-metastasis effects of lactic acid bacteria isolated from fermented *B. rapa* L.

○田中 沙智[1]、稲葉 千尋[1]、杉山 李奈[1]、遠藤 勝紀[1]、浅見 拓哉[1]、北村 秀光[2]（[1]信州大、[2]北大遺制研）
○Sachi TANAKA[1], Chihiro INABA[1], Momona SUGIYAMA[1], Katsunori ENDO[1], Takuya ASAMI[1], Hidemitsu KITAMURA[2] ([1]Shinshu Univ., [2]Hokkaido Univ.)

【目的】信州の伝統野菜の 1 つである野沢菜は、葉と茎の部分を塩漬けにした野沢菜漬けとして食されている。当研究室ではこれまでに、野沢菜は発酵に伴い乳酸菌数を増加させ、免疫反応を担うサイトカイン産生を増加させることを明らかにしている。また、野沢菜漬け由来乳酸菌を単離し、IFN-γ産生誘導能を指標にスクリーニングを行ったところ、Th1 型免疫賦活効果を有する *Lactobacillus plantarum* K4-9 株を取得した。しかしながら、K4-9 株の生体内での免疫賦活効果については明らかにされていない。そこで本研究では、K4-9 株の投与による宿主免疫系の活性化を介したがん転移の抑制効果について検討した。

【実験方法】野生型 BALB/c マウスを用いて、K4-9 株を 1 週間、経口投与した後、脾臓を回収して、各種免疫担当細胞の割合とケモカイン受容体の発現についてフローサイトメトリーによる解析を行った。また、大腸がん CT26 細胞株に対する細胞傷害活性と抗腫瘍免疫に関与するエフェクター分子の遺伝子発現レベルを定量 PCR 法により評価した。さらに、BALB/c マウスに K4-9 株を 1 週間経口投与した後、大腸がん CT26 細胞株を脾臓内あるいは尾静脈内より移入し、その後、2 週間 K4-9 株を投与した。この担がん転移マウスモデルにおける肺および肝臓における転移巣形成について、*in vivo* イメージングおよび HE 染色による解析・評価を行った。

【結果と考察】K4-9 株を経口投与したマウスの脾臓細胞において、樹状細胞の割合が増加し、CT26 細胞に対する細胞傷害活性が増加した。また、K4-9 株の投与により、細胞傷害性分子である Granzyme B の mRNA 発現とケモカインレセプターである CCR5 陽性 T 細胞の割合が有意に増加した。次に、担がん転移マウスモデルにて K4-9 株投与によるがん転移抑制効果を検証したところ、肺および肝臓における転移巣形成は K4-9 の投与により抑制された。以上のことから、乳酸菌 *L. plantarum* K4-9 株の投与により、樹状細胞や T 細胞による細胞傷害活性を含む宿主免疫系が活性化するとともに、抗腫瘍エフェクター機能が亢進することで、がんの転移巣形成を抑制することが示唆された。今後は、K4-9 株によるがん転移抑制メカニズムの詳細を明らかにしたいと考えている。

Immunomodulatory effect, anti-metastasis, Lactic acid bacteria

講演番号：2A06p01
講演日時：3 月 26 日 13:50～ センター2 号館 A06 会場

異物抱合酵素発現酵母を用いたピセアタンノール抱合代謝物の調製及び特性解析
Preparation and characterization of conjugated metabolites of piceatannol using xenobiotic metabolizing enzymes expressing yeast
○中山 舞、西川 美宇、安田 佳織、深谷 圭介、占部 大介、榊 利之、生城 真一（富山県大工）
○Mai Nakayama, Miyu Nishikawa, Kaori Yasuda, Keisuke Fukaya, Daisuke Urabe, Toshiyuki Sakaki, Shinichi Ikushiro (Toyama Pref. Univ.)

食品中機能性成分であるポリフェノール類は、異物代謝過程を通して化学構造や体内動態の変化により生理活性が影響を受ける場合があり、代謝物の同定及び機能解析が必要とされる。レスベラトロール類縁体であるピセアタンノールは生体内に取り込まれた後、異物代謝酵素群により代謝反応を受けて体外に排泄されるが、その代謝物組成及び体内動態についての詳細は明らかでない。昨年度の大会においてピセアタンノールとそのメチル化誘導体（ラポンチゲニン及びイソラポンチゲニン）の抱合体代謝物を同定するために UDP-グルクロン酸転移酵素（UGT）及び硫酸転移酵素（SULT）発現酵母菌体を用いて代謝解析を行い、抱合体代謝物の調製について報告した。本発表ではピセアタンノールの機能発現に関わる体内動態を明らかにすることを目的として、ピセアタンノール及びメチル化誘導体の抱合体代謝物の大量合成を行い、その構造解析及び特性解析を行った。

哺乳動物由来 UGT 及びヒト SULT 発現酵母菌体ライブラリーの中から各抱合体調製に最適な分子種を選定して大量調製を行った。グルクロン酸抱合代謝についてはヒト UGT2A1, サル UGT1A1 及び UGT1A9 を用いて、また、硫酸抱合代謝についてはヒト SULT1A3, SULT1B1 及び SULT1E1 を用いることにより部位特異的な抱合代謝物についておよそ 5～30mg の精製標品を得た。各抱合体について LC-MS、^{1}H-及び ^{13}C-NMR スペクトル測定により抱合基の結合数と結合位置を解析したところ、グルクロン酸抱合体については 3 位あるいは 3’/4’位が抱合化を受けた monoglucuronide の生成が確認された。硫酸抱合体については 3 位あるいは 3’/4’位が抱合化を受けた monosulfate に加えて、disulfate の生成も確認された。さらに、抱合化部位を同定した抱合体を用いてさらに異物抱合酵素発現酵母により代謝することで、グルクロン酸及び硫酸基を有するヘテロ抱合体の合成にも成功した。また、グルクロン酸及び硫酸抱合体における加水分解感受性評価を行ったところ、用いる酵素源と抱合化部位によって脱抱合能に差が確認され、特にメチル化部位に隣り合った硫酸基は脱抱合に対して抵抗性を持つ傾向を示した。

今後、調製した抱合代謝物標準品を用いてピセアタンノール投与ラットにおける代謝物の同定及び詳細な体内動態を解析することにより、食品成分中機能性成分による機能発現機構の解明につなげていきたいと考えている。

piceatannol, conjugate metabolites, yeast

講演番号：2A06p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ センター2 号館 A06 会場

フェニルホウ酸誘導体との親和性を利用した フラボノール標的タンパク質の網羅的分析法の開発
Systematic and comprehensive analytical strategy to identify flavonol-modified proteins using affinity with phenylboric acid derivatives

○早川 諒[1]、中川 侑紀[2]、飯泉 陽介[3]、石井 剛志[4]、芦田 均[5]、赤川 貢[2] ([1]大阪府立大・生命環境、[2]大阪府立大院・生命環境、[3]京都府立医科大・医学、[4]神戸学院大・栄養学、[5]神戸大院・農学)
○Ryo HAYAKAWA[1], Yuki NAKAGAWA[2], Yosuke IIZUMI[3], Takeshi ISHII[4], Hitoshi ASHIDA[5], Mitsugu AKAGAWA[2] ([1]Osaka Pref. Univ, [2]Grad.Sch.of Osaka Pref. Univ, [3]Kyoto Pref. Univ. of Med, [4]Kobe Gakuin Univ., [5]Grad.Sch.of Kobe Univ.)

【目的】フラボノールは様々な植物性食品に含まれており、冠状動脈性心臓病、脳卒中、高血圧などの発症リスクを減少させるなど、多様な生理機能性を有する。その機能性発現の分子機構としてタンパク質などの生体分子との相互作用が重要な役割を担っていることが明らかにされつつある。しかしながら、フラボノールの細胞内動態に関する詳細な知見はなく、その標的タンパク質を網羅的に検出・分離する系統的手法が確立されていないのが現状である。そこで、本研究ではフェニルホウ酸誘導体との親和性を利用したフラボノール結合タンパク質の網羅的な分析方法を開発し、フラボノール標的タンパク質を同定することを目的とした。
【方法と結果】フェニルホウ酸構造を介してフラボノイドを選択的に蛍光標識できる 2-aminoethyl diphenylborinate (DPBA) を用いて、フラボノール標的タンパク質の検出を試みた。はじめに、フラボノール類と glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) をインキュベートし、SDS-PAGE によって分離後にゲルを DPBA で染色し、蛍光スキャナーを使用して解析した。その結果、quercetin によって GAPDH が最も強く蛍光染色された。そこで、quercetin をヒト肝由来 HepG2 細胞に暴露し、結合標的となる細胞タンパク質を蛍光解析した。その結果、40-70 kDa に 4 つのタンパク質バンドが検出された。次に、*m*-aminophenylboronic acid-agarose (PBA) ビーズを用いて HepG2 細胞の quercetin 結合タンパク質の分離を試みた。PBA ビーズが持つフェニルホウ酸構造は塩基性条件下では quercetin と結合し、酸性条件下ではその結合が解離する。この化学的性質を利用したプルダウン法により、HepG2 細胞の quercetin 結合タンパク質を精製した。精製したタンパク質を二次元電気泳動で分離し、DPBA 染色により解析した結果、いくつかの蛍光スポットが検出された。それらをトリプシン消化後に MALDI-TOF MS 解析を行ったところ、GAPDH やミトコンドリア局在タンパク質、核タンパク質など、いくつかのタンパク質の同定に成功した。本研究では、同定されたタンパク質の中で、protein disulfide isomerase (PDI) ファミリーに属する PDIA3 に注目した。PDIA3 は活性中心に SH 基を 2 つ持っており、ジスルフィド結合の形成、還元、異性化を触媒する。牛肝臓由来 PDI を quercetin とインキュベートして解析したところ、濃度依存的な quercetin の結合と酵素活性の低下が確認された。以上の結果から、我々は quercetin 結合タンパク質の解析方法を確立し、PDIA3 が主要な細胞内標的タンパク質であることを明らかにした。今後は、quercetin の PDIA3 への結合がもたらす細胞応答の解析を実施する予定である。

flavonol, quercetin, protein disulfide isomerase (PDI)

講演番号：2A06p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ センター2 号館 A06 会場

ジヒドロキシプロリン含有ペプチドの有機合成とその生理活性について

Organic synthesis of dihydroxyproline-containing peptido and its biological activty

○堀 優希、二瓶 賢一、水重 貴文、蕪山 由己人（宇都宮大学）
○Yuki HORI, Kenichi NIHEI, Takafumi MIZUSHIGE, Yukihito KABUYAMA (Utsunomiya Univ.)

［背景・目的］

コラーゲンは脊椎動物において最大量を占めるタンパク質である。結合組織などに存在し，構造の維持に機能する。コラーゲンの合成においては，ビタミン C の還元力を利用してコラーゲン中の一部のプロリン (Pro) を水酸化し，水酸化プロリン (Hyp) に変換することが特徴となっている。本研究室ではこれまでに，コラーゲンを限定分解して得られるアミノ酸やペプチドに関してその抗酸化特性の解析をしてきた。その結果，Pro, Hyp やこれらを含むペプチドに強い抗酸化活性があることを見出している（鈴木ら，日本アミノ酸学会第 5 回学術大会）。Hyp の類似体として，天然には更に水酸化が進んだジヒドロキシプロリン (diHyp) が存在する。これまでに，この diHyp にも抗酸化特性があることが明らかになってきた（二瓶ら，日本アミノ酸学会第 10 周年記念大会）。以上より本研究では，diHyp を N 末端に持つジペプチドを化学合成し, 強い抗酸化活性が認められるか検証することとした。合成したペプチドに, 抗酸化作用以外の生理作用があるのか検討するため，コラーゲン代謝酵素への影響や培養細胞のプロテオームに対する影響など，いくつかの視点から評価した。

［方法］

Hyp を出発物質としてピロリジン環を脱水した構造を持つデヒドロキシプロリン誘導体を調製し，これにグリシン (Gly) ユニットを付加させた。このジペプチド構造物を四酸化オスミウムを用いてジヒドロキシ体にしてジヒドロキシプロリルグリシン (diHyp-Gly) を得た。この合成品に対して, 抗酸化特性及びコラーゲン代謝関連への影響評価としてマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) 活性に与える影響，及びヒト網膜色素細胞のプロテオームに対する影響の評価を行った。

［結果・結論］

diHyp-Gly は脂質過酸化抑制アッセイにおいては，diHyp-Gly は遊離アミノ酸より強い活性を示し，更にビタミン E と比較しても抗酸化特性が極めて強く，脂質過酸化抑制剤として効果的である可能性が示された。現在，MMP 活性に与える影響評価とプロテーオーム解析による標的分子探索を行っており，合わせて報告したい。

hydroxyproline, collagen, antioxidant activity

講演番号：2A06p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ センター2 号館 A06 会場

変性β-1,3-1,6-グルカンによる包接可溶化で抗酸化物質の抗酸化活性を高める

Complexation of antioxidants with renatured beta-1,3-1,6-glucan increases the antioxidant activity

○土居 菜々子、甲元 一也（甲南大 FIRST）
○NANAKO DOI, KAZUYA KOUMOTO (Konan Univ.)

［研究背景］
老化、癌化、動脈硬化の抑制に対して、ポリフェノールやビタミンのような抗酸化物質の摂取が有効であるとされている。しかし、これらの物質の多くは水溶性に乏しく、有効濃度を水に溶かすことは難しい。我々の研究室では、難水溶性物質を包接可溶化できる変性β－１，３－１，６－グルカン（ｒ―グルカン）を開発した。また、包接複合体を凍結乾燥させると、長期保存可能な粉末とでき、加えて、その粉末は室温で攪拌するだけで、高濃度で溶解することなどを過去の年次大会にて報告してきた。しかし、これまでは包接された物質の機能性について検討を行えていなかった。そこで本研究では、抗酸化物質を包接させた包接複合体を調製し、その抗酸化活性についての評価を行ったので報告する。
［実験方法］
ｒ―グルカンには、分岐度の高いＡｕｒｅｏｂａｓｉｄｉｕｍ　ｐｕｌｌｕｌａｎｓ由来のβ－１，３－１，６－グルカンを、抗酸化物質として、クルクミン、レスベラトロール、レチノイン酸、カテキンを用いた。抗酸化物質は包接後、凍結乾燥を行い粉末化し、実験直前に溶解させて測定に用いた。抗酸化活性の評価には、フルオレセインを蛍光物質、ＡＡＰＨ（２，２’－アゾビス－（２－メチルプロピオンアミジン）二塩酸塩）を活性酸素の発生剤としたＯＲＡＣ（Ｏｘｙｇｅｎ　Ｒａｄｉｃａｌ　Ａｂｓｏｒｂａｎｃｅ　Ｃａｐａｃｉｔｙ）測定を用いた。
［研究結果］
ＯＲＡＣ測定の基準物質としてトロロックスを用いた。まず、抗酸化物質をｒ－グルカン法によって包接複合体としたところ、先行研究と同様に多糖に包接することで各抗酸化物質の水への溶解性は大きく向上した。得られた包接複合体粉末のＯＲＡＣ値を測定したところ、すべての包接複合体において、トロロックスと比較して高いＯＲＡＣ値が得られた（クルクミンで約３倍）。つまり、包接された抗酸化物質も抗酸化活性を示すことを意味する。またｒ－グルカンにも抗酸化活性が見られたため、複合体とすることで相乗効果が発現していることも期待される。講演ではこれらの詳細について報告する。

β-1,3-1,6-glucan, inclusion complex, antioxidant

発表責任者：甲元一也（koumoto@konan-u.ac.jp）

講演番号：2A07a01
講演日時：3 月 26 日 09:30～ センター2 号館 A07 会場

シオミズツボワムシの高増殖・大型変異系統の樹立
Establishment of highly proliferative and large mutants on rotifer (*Brachionus plicatilis* s.s.)
○常泉 和秀[1]、山田 美恵子[1]、一瀬 勝紀[1]、市田 裕之[1]、金 禧珍[2]、萩原 篤志[2]、川田 実季[3]、片山 貴士[3]、﨑山 一孝[3]、手塚 信弘[3]、小磯 雅彦[3]、阿部 知子[1]([1]理化学研究所仁科センター、[2]長崎大学、[3]水産研究・教育機構)
○ Kazuhide TSUNEIZUMI[1], Mieko YAMADA[1], Katsunori ICHINOSE[1], Hiroyuki ICHIDA[1], Hee-Jin KIM[2], Atsushi HAGIWARA[2], Miki KAWADA[3], Takashi KATAYAMA[3], Kazutaka SAKIYAMA[3], Nobuhiro TEZUKA[3], Masahiko KOISO[3], Tomoko ABE[1] ([1]RIKEN Nishina Center, [2]Nagasaki Univ., [3]FRA)

養殖漁業で重要な初期餌料生物として知られるシオミズツボワムシ(以下ワムシ)は、近年海洋動物プランクトン研究のモデル生物として注目されている。漁業において産まれたばかりの仔魚は成長に伴い体サイズに合わせて餌の嗜好が変化することが知られており、最初に与える餌としてワムシが用いられ、次にアルテミアが利用される。一般的なワムシのサイズは 300μm 程度でアルテミアの幼生では 400μm～1cm となっている。しかしワムシからアルテミアへと餌を切り替える際に、適した生き餌がいまのところ見付かっていない。仔魚の個体数減少において、この餌のギャップ時期に仔魚が餓死もしくは共食いしてしまうことが問題のひとつとして挙げられる。全世界的に食糧事情が逼迫してきていることもあり、養殖での生産量を増加させるために餓死・共食いによる個体数減少を抑制する試みが注目されている。本研究では体サイズが大きくなるワムシ変異系統を選抜育種することにより上記問題へ貢献することを目的としている。

これまでのワムシ研究では、重イオンビームやγ線の照射による致死量や孵化率などのパラメーターに着目される場合がほとんどであり、変異系統の作出や変異系統作出に適した放射線照射条件に関する議論は行われていない。当研究室では様々な植物の品種改良に重イオンビームを用いて生産量増加、付加価値向上、環境耐性獲得など有用変異系統を選抜育種し実用化させてきている。本研究ではワムシにカーボンイオンビームやアルゴンイオンビームを照射し、特に生存率や、照射後の増殖能、変異系統出現頻度に関する重イオンビーム照射による影響を観察し、変異系統作出に適した照射条件の検討を行った。大規模スクリーニング手法を開発・改良し変異系統の選抜育種を行った。ワムシの背甲長・背甲幅を指標として、体サイズが大きくなる変異系統を選抜育種し、対照区より平均背甲長が 10%以上長大化した 56 系統の大型変異系統を作出した。樹立変異系統における背甲長と背甲幅の相関図を作成し、マハラノビス距離を用いた判別分析により 2 系統が外れ値として検出され、形態異常株として判定された。外れ値を除く 54 系統による相関係数は 0.85(p<0.01)と強い正の相関が示され、背甲長が大きくなると背甲幅も連動して大きくなっていた。比増殖率の計測では 56 系統のうち 34 系統で有意に対照区を下回り、多くが低増殖能系統であったが、3 系統で有意に対照区を上回る高増殖能系統であった。この 3 系統は大型かつ高増殖能を有するため、個体数減少問題解決へ向けた餌料として期待できる。本研究において大型・形態異常・低増殖能・高増殖能とバリエーションに富む変異系統を樹立でき、重イオンビームの有効性を十分に示せた。

heavy-ion beam, rotifer, breeding

講演番号：2A07a02
講演日時：3 月 26 日 09:41～ センター2 号館 A07 会場

反転を伴う回転振盪による糸状菌の培養

Cultivation of Fungi Using Rotary Shaking with Inversion

○小野寺 正幸[1]、小林 由衣乃[1]、川村 奈々[2]、竹園 恵[1]、中島 敏明[3]、茂野 俊也[4] ([1]新潟工大院生産開発工、[2]（株）プリス、[3]筑波大院生命環境、[4]つくば環微研)
○ Masayuki ONODERA[1], Yukino KOBAYASHI[1], Nana KAWAMURA[2], Satoshi TAKESONO[1], Toshiaki NAKAJIMA[3], Toshiya SHIGENO[4] ([1]Niigata Inst. Tech., [2]PRECi co., Ltd, [3]Tsukuba Univ., [4]Lab. Tsukuba Env. Microb.)

【目的】三角フラスコを用いた微生物の好気培養において回転振盪培養が広く使用されている。気液並びに液々の混合特性の増大、さらには酸素移動の増大を必要とする場合、バッフル付き三角フラスコが有効である。一方、バッフル付き三角フラスコは培養終了後、通常の三角フラスコよりも洗浄が困難であること、さらに価格も高価であるため、通常の三角フラスコでの培養が望ましいと考えられる。そこで、回転振盪に反転を伴わせることにより、反転時の急激な流れの変化による液体培地表面の乱れが増大し、混合特性並びに酸素移動特性の増大が可能ではないかと考え、通常の三角フラスコでもバッフル付きの三角フラスコと同程度、またはそれ以上の性能向上が得られるものと期待した。実際に油脂資化性酵母の生育において植物油を C 源とした場合における培養について検討したところ、通常の三角フラスコを用いて反転を伴う回転振盪培養したものの生育挙動はバッフル付き三角フラスコでの一方向回転振盪培養のそれと同程度であった。さらに、反転を伴う回転振盪培養したものは、培地と気相と内壁の堺で菌体が増殖するウォールグロースをほとんど認めなかった。[1)]今回、回転振盪培養においてウォールグロースしやすい糸状菌での反転を伴う回転振盪培養での生育挙動について検討を行った。
【方法と結果】糸状菌としては、*Aspergillus oryzae* NBRC 30113(IFO30113)を用いた。培地は、SSPY 培地(可用性デンプン1%、ペプトン 0.5%、酵母エキス 0.3%）を用いて、500mL 容三角フラスコ（培地量 100ml）で、一定量の胞子懸濁液を接種し、30℃、120rpm の回転振盪培養を行った。時計方向から反時計方向、反時計方向から時計方向の時間を反転時間とし、まずは、3 秒間として行った。通常の回転振盪培養では、ウォールグロースが認められ、さらに菌体の形状はペレット状となった。一方、反転を伴う回転振盪培養では、ウォールグロースはほとんど認められず、菌体の形状はフィラメンタス状となった。ウォールグロースについては、反転時の液表面の乱れによる培養液が三角フラスコ内壁に付着した菌体をはがす効果に起因するもと思われた。菌体形状の差異の原因については、現在、さらに検討中である。生育量については、300mL 容三角フラスコ（培地量 50ml）で行い、菌体量は Whatman 製 glass microfiber filters, Grade GF/A を用いた乾燥菌体重量法によって測定した。生育については、反転を伴った回転振盪培養の方が良好であった。これは、フィラメンタス状の方が、栄養や酸素の細胞内へ取り込みがペレット状のものと比べ良好となるのではないかと推察された。現在、さらに反転時間を変化させ生育への影響について検討している。
謝辞：本研究は、新潟工科大学 風・流体工学研究センターの研究課題として行われた。
1) 小林、川村、竹園、中島、茂野、小野寺、日本農芸化学会 2019 年度講演要旨集、1C7p12.

Aspergillus oryzae, rotary shaking culture, inversion

発表責任者：小野寺正幸（onodera@acb.niit.ac.jp）

講演番号：2A07a03
講演日時：3 月 26 日 09:52～ センター2 号館 A07 会場

Bacillus amyloliquefaciens W-O-1A の示す抗カビ活性について
Antifungal activity from *Bacillus amyloliquefaciens* W-O-1A

○志村 洋一郎[1]、髙橋 茉佑[1]、加藤 蒼[1]、佐藤 有里華[1]、尾形 友朔[1]、松浦 成美[1]、稲元 民夫[1]、福島 淳[1]、上松 仁[2] ([1]秋田県立大生物資源、[2]秋田高専物質工)
○ Yoichiro SHIMURA[1], Mayu TAKAHASHI[1], So KATO[1], Yurika SATO[1], Yusaku OGATA[1], Narumi MATSUURA[1], Tamio INAMOTO[1], Jun FUKUSHIMA[1], Hitoshi AGEMATSU[2] ([1]Akita Prefectural Univ., [2]Akita NCT)

我々は木質バイオマス利用を目的に菌株スクリーニングの中で、樹皮片から糸状菌 2B 株とそれに拮抗する細菌 W-O-1A 株を分離した。糸状菌は ITS 領域の配列解析で *Trichoderma ressei* と、細菌は 16S rRNA 遺伝子および *gyrA* 遺伝子の配列解析で *Bacillus amyloliquefaciens* と簡易同定された。
B. amyloliquefaciens では、植物病原性カビに拮抗する菌株が報告されている。同菌の抗カビ活性は、キチナーゼやプロテアーゼなどの酵素や非リボソームペプチド合成により合成されるサーファクチンやイツリンなどの環状リポペプチドが知られている。しかしながら、いずれの抗カビ物質についても、*Trichoderma* 属糸状菌に対する生育阻害は明らかとなっていない。また、抗カビ作用を再検討する中で生育阻止円周囲に菌糸が集中するような現象を観察をした。そこで、*B. amyloliquefaciens* W-O-1A 株の抗カビ物質を同定し、*Trichoderma* への作用機作を明らかにすることを大きな目的とした。昨年度の本大会において、*B. amyloliquefaciens* W-O-1A 株の無細胞培養液およびその酸沈殿物について抗菌スペクトルを調べるとともに、抗カビ物質の分離状況について報告した。現在、抗カビ物質の分離同定を進めているところである。また、ゲノム情報も獲得したので、その一部を紹介する。

Antifungal activity, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Trichoderma*

発表責任者：志村洋一郎（yshimura@akita-pu.ac.jp）

講演番号：2A07a04
講演日時：3 月 26 日 10:03～ センター2 号館 A07 会場

日光東照宮彩色文化財に発生した真菌叢の網羅的解析および光触媒殺菌による真菌防除の検討
Comprehensive analyses of fungal flora occurring in painted cultural property of Nikko Toshogu Shrine and analysis of sterilization effect by a photocatalyst

○小笠原 麻衣[1,2,3]、三浦 菜摘[1]、鈴木 孝宗[2]、寺島 千晶[2]、藤嶋 昭[2,3]、落合 剛[2,3]、鈴木 智順[1,2]
([1]東理大応生、[2]東理大総研、[3]KISTEC)
○Mai OGASAWARA[1,2,3], Natsumi MIURA[1], Norihiro SUZUKI[2], Chiaki TERASHIMA[2], Akira FUJISHIMA[2,3], Tsuyoshi OCHIAI[2,3], Tomonori SUZUKI[1,2] ([1]Department of Applied Biological Science, Tokyo University of Science, [2]Research Institute for Science & Technology, Tokyo University of Science, [3]Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology)

〔目的〕 日光社寺文化財の多くは漆塗装や漆上に様々な彩色が施されている。これら彩色部分に使用されている顔料には、膠や桐油などが溶剤や接着剤として使用されている。特に、膠で溶いた顔料を使用して彩色した部分では、塗装後約半年で黒く変色することが問題となっており、その原因は真菌の発生によるものと考えられている。しかし、原因となる真菌の正確な同定はされておらず、真菌発生の予防法についての研究も進んでいないため、大規模な修復作業以外に解決策がない。この問題を解決するために、比較的安価で安全性の高い光触媒を彩色部分の真菌防除に適用する検討を行うことにした。これまでの当研究室による光触媒殺菌の研究結果より、真菌の種類（糸状菌や酵母などの形態の違い、色素の有無）によって光触媒殺菌の効果に違いがあることがわかっている。そこで本研究では、文化財保護に貢献することを目的に、様々な彩色文化財建造物に発生する真菌叢の網羅的解析と、真菌防除のための光触媒殺菌試験を行った。
〔方法〕 彩色文化財建造物および日光自然環境由来真菌は現時点で 34 株分離されている。これら分離株に対して、18S rRNA 遺伝子および ITS 領域を用いた系統解析を行った。また、第三世代シークエンサーである MinION を用いた非培養法的真菌叢解析を行い、文化財に発生する真菌の網羅的解析も試みた。さらに、光触媒を用いた真菌防除の試験として、TiO_2 コーティングガラスを用いた UVA 照射実験を、文化財建造物から分離した真菌株に対して行った。
〔結果〕 分離株の系統解析は一部の真菌株において完了し、文化財建造物由来株は *Penicillium* 属と *Cladosporium* 属に近縁な真菌が主であった。*Penicillium* 属と *Cladosporium* 属はともに空気中に広く存在する真菌であり、従って、文化財建造物由来真菌は一般的な建築物に発生する真菌であることが示唆された。また、日光自然環境由来株では、同様の真菌が確認された他、*Monochaetia* 属等の植物病原菌も確認された。非培養法による真菌叢の解析では、文化財建造物、日光自然環境下ともに、培養が難しい、*Baudoinia* 属に近縁な真菌が主に存在していた。しかし、大猷院では担子菌門である *Kochovaella* 属が真菌叢の大半を占めていることが確認された。また、サンプリングを行った時期により、真菌叢に違いが見られた。そして、これらの結果は培養法によっては得られず、真菌叢の網羅的解析を補完するものであった。

PDA 培地で分離した文化財建造物由来株のうち、優占株 4 株に対して光触媒殺菌試験を行ったところ、4 株すべてにおいて生存率の低下が見られた。従って、光触媒による殺菌効果が示された。

本発表に際しては，系統解析の完了していない分離株の結果および新たに採取したサンプルの非培養法的真菌叢解析の結果も報告するとともに，TiO_2 を用いた光触媒試験結果についても報告する予定である。

Nikko Toshogu, fungal flora, photocatalyst

発表責任者：小笠原麻衣（mm.boc.47.0531@gmail.com）

講演番号：2A07a05
講演日時：3 月 26 日 10:14～ センター2 号館 A07 会場

Characterization of different sugary kefirs revealed at microbial and functional levels
○Raul Ricardo GAMBA, Takashi Koyanagi, Toshiki Enomoto (Department of Food Science (Ishikawa Prefectural University))

Kefir is a product generated after kefir grains fermentation, which is constituted by lactic acid bacteria, acetic acid bacteria and yeasts. There are two types of kefir, one produced from milks (milk kefir) and another from sugar solutions (sugary kefir). Sugary kefir is less consumed and studied than milk kefir. The aim of this work was to investigate the functional and microbial characteristics of kefir developed in brown sugar (BS), purified molasses (PM) and high-test molasses (HM). Antibacterial activity was determined by both microtiter plate and plate counts. Antioxidant and ACE-inhibitory activities were measured by ABTS assay and commercial kit, respectively. Microbial populations were investigated by high-throughput sequencing.

Three substrates were suitable for kefir fermentation, but distinguished by biomass and organic acids increase and pH and sugars decrease. Microbial populations varied in relation to substrate used. *Lactobacillus nagelii* was predominant in BS and PM beverages although minority species were different. However, the grains that generated these beverages were characterized by *L. casei/paracasei* > *L. hilgardii/diolivorans* > *L. harbinensis* (BS grains) and by *L. casei/paracasei* > *L. hilgardii/diolivorans* > *L. nagelii* (PM grains). *L. hilgardii/diolivorans* and *L. casei/paracasei* was the most abundant in HM grains. In HM beverages, *L. hilgardii/diolivorans* dominated at first but it was replaced by *Acetobacter lovaniensis* in successive fermentations. On the other hand, *Saccharomyces cerevisiae* was omnipresent in all beverage and grain samples. It was predominant in all grains, whereas beverages were characterized by different behaviors during successive fermentations. As for functional properties, PM and HM beverages showed stronger ACE-inhibitory and antioxidant activities than that of BS beverages. All fermented beverages showed antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium and *Staphylococcus aureus*.

Three sugary kefirs studied here showed good functional properties in spite of different microbial populations detected in each drink, suggesting that it is possible to produce different type of beverages with probiotic effects.

Sugary kefir, Function, Sequencing

講演番号：2A07a06
講演日時：3 月 26 日 10:35～ センター2 号館 A07 会場

動物種間における腸内細菌数の比較

Comparison of gut bacterial count among animal species

○武藤 惇、荒木 希和子、久保 幹（立命館大）
○Makoto MUTO, Kiwako ARAKI, Motoki KUBO (Ritsumeikan Univ.)

【背景・目的】土壌中には多種多様な微生物が存在し、特に細菌の数が圧倒的に多い。土壌中の細菌の DNA を抽出・定量する方法として Slow-stirring 法がある。本方法を用いて土壌細菌数を定量することにより、土壌環境を評価することができる。例えば、肥沃な有機栽培土壌中に生息する細菌数は土壌 1 g 中に 6.5×10^8 cells/g 以上であるのに対し、慣行栽培を継続している化学土壌中の細菌数は 2.0×10^8 cells/g 以下になる場合が多い。このように、土壌中の細菌数と土壌環境は密接に関係している。土壌と同様に多種多様な細菌が生息している環境として、動物の腸内が挙げられる。腸内細菌の構成を決定する要因としては、食事や薬などの外的要因、そして動物種や年齢などの生物的要因が挙げられる。個体ごとに腸内細菌叢は異なるが、これらの要因によって大まかな構成は類似することがわかっている。しかし、外的要因や生物的要因の違いによって腸内細菌数がどのように異なるのか興味が持たれる。本研究では腸内細菌数に着目し、Slow-stirring 法を用いて 4 種類の動物の腸内細菌数を解析することで、動物種間における腸内細菌数の違いを明らかにすることを目的とした。
【方法】ウシ、イヌ、ネコ、ヒトの 4 種類の動物の糞便から Slow-stirring 法を用いて細菌の DNA を抽出し、それぞれの腸内細菌数を定量した。また、PCR-DGGE 法を用いて 4 種の動物間の菌叢を比較した。
【結果】4 種類の動物のうち、ウシが最も高い腸内細菌数を示した。中でも生後 20 ヶ月、および 30 ヶ月の成牛で最も高く、約 1.0×10^{10} cells/ g であった。これは生後 9 ヶ月の仔ウシと比べると 10 倍近く高かったことから、月齢による消化管の発達度合いや餌の違いが腸内細菌数に影響を与えたのではないかと推察された。その他の動物種では、イヌとネコの細菌数は約 5.0×10^8 cells/ g で、ヒトでは個人差があるものの、平均すると約 2.0×10^9 cells/g であった。これらの結果は動物種の違いによるものと示唆された。また、20 代男女のヒトの腸内細菌数を調べたところ、1.0×10^9～4.5×10^9 cells/ g の幅があり、個体間でも腸内細菌数が異なることがわかった。PCR-DGGE 法によるバンドパターンを比較すると、4 種類の動物で菌叢が大きく異なることが明らかになった。さらに、イヌとネコに比べて、ウシとヒトでは細菌の種数が豊富なことがわかった。そのため、腸内細菌数の多いウシとヒトは同一の細菌数が多いのではなく、多様な細菌の存在によって腸内細菌数が多くなることが示唆された。今後は、同一個体の腸内細菌数を継続して定量することにより、腸内細菌数が増減する原因を探っていく。

gut bacteria, bacteria count, animal species

講演番号：2A07a07
講演日時：3 月 26 日 10:46～ センター2 号館 A07 会場

枯草菌の接合伝達に必要な遺伝子の探索

Screening for essential genes for conjugation of *Bacillus subtilis*

○山口 喜芳、金子 真也、相澤 康則（東工大生命）
○Kiyoshi YAMAGUCHI, Shinya Kaneko, Yasunori Aizawa (Tokyo Tech, Life Science)

微生物は、２つの細胞間での接合を介して、遺伝子の一部やプラズミドを交換する。これを接合伝達と呼ぶ。納豆菌から単離されたプラズミド pLS20 は、枯草菌の実験室株（168TrpC2 株）の同種細胞の間を、接合伝達のメカニズムで移動する。このプラズミド上には 87 種類のタンパク質がコードされており、そのうち 2 種類のタンパク質は欠損実験によって接合伝達に必須であることが実証されている（1–2)。また他の細菌での接合伝達研究から、枯草菌接合伝達に必須なタンパク質候補が 9 つ提唱されてはいるものの、これらについては実験的な検証はなされていない（3)。

そこで本研究ではまず、接合伝達時に転写活性が極めて低い遺伝子部分は、接合伝達に不要であると仮説を立て、この領域に含まれる 22 個のタンパク質コード領域を全て欠損したプラズミドを作成し、枯草菌を用いて接合伝達の効率を検証した。その結果、予想通り、この大規模欠損は接合伝達に影響はなかった。残りの 65 遺伝子に対しては、各タンパク質コード領域をひとつずつ欠損したプラズミドライブラリーを作製し、これらの接合伝達能を検証した。本講演では最新のデータを紹介し、枯草菌の接合伝達機構についての考察を行う。

（１） Ramachandran G., Miguel-Arribas A., Abia D., Singh PK., Crespo I., Gago-Co´rdoba C., et al. (2017) *PLoS Genet* **13(2)**: e1006586.
（２） Singh PK., Ramachandran G., Ramos-Ruiz R., Peiro´-Pastor R., Abia D., et al. (2013) *PLoS Genet* **9(10)**: e1003892.
（３）Bauer, T., et al. (2011) *J. Bacteriol* **193.22**: 6244-6256.

Conjugation, Bacillus subtilis, horizontal gene transfer

講演番号：2A07a08
講演日時：3 月 26 日 10:57～ センター2 号館 A07 会場

ネパール産醸造酒のスターターから単離した *Hyphopihia burtonii* のアミラーゼ分泌に関わる転写調節因子の探索

Investigation of factors associated with amylase secretion in *Hyphopihia burtonii* isolated from a sake starter

○山下 晶生[1]、志波 優[2]、田村 倫子[1] ([1]東農大院・健康、[2]東農大・生命科学)
○Akio YAMASHITA[1], Yu SHIWA[2], Tomoko TAMURA[1] ([1]Dept. of Nutri. Sci. & Food Safety, Grad. Sch. of Agric., Tokyo Univ. of Agric., [2]Fac. Life Sci., Tokyo Univ. of Agric.,)

【背景と目的】ネパール産醸造酒のスターターから、アミラーゼ産生酵母 *Hyphopihia burtonii*15-1 株を分離した。*H. burtonii* は、スターチ培地ではアミラーゼを分泌し、グルコース培地ではアミラーゼが分泌されないというアミラーゼ発現調節機構を有する。この機構の詳細は *Aspergilus oryzae* のようなカビ類で、転写因子によって調節されることが知られているが、多くの酵母ではアミラーゼ分泌能が無くこれをコードする遺伝子も有さないためほとんど解明されていない。そこで 15-1 株のゲノム配列を明らかにし、アミラーゼ遺伝子の転写調節因子が存在するのか明らかにすることを目的とした。
【方法】α-アミラーゼ活性測定は合成基質法で行った。15-1 株の全ゲノム解読は、次世代シークエンサー(Genetic Analyzer Ⅱ, Illumine) を用いて行った。*de novo* assembly を行い、得られた配列に対して、転写調節因子の探索、系統樹解析、遺伝子座の解析を行った。
【結果】α-アミラーゼ活性はスターチ含有 YM 培地にて 0.80 U/ml 培地 、グルコース含有 YM 培地では 0.01 U/ml 培地であり、この値を生菌数当たりで換算すると、約 103 倍スターチ培地の方がグルコース培地より高かった。15-1 株の全塩基数は 12.5 Mb、総遺伝子数は 5695 と予測された。BLAST 検索の結果、転写促進因子候補として *Pichia stipitis* のマルターゼ遺伝子の転写促進因子の SUC1.5 と類似した配列が 1 つヒットし HbSUC1.5 と名付けた。アミノ酸配列を予測すると、SUC1.5 や *A. oryzae* のアミラーゼ転写促進因子 AmyR にも存在するプロモーター認識部位 C_6 zinc finger モチーフを有していた。HbSUC1.5 は *P. stipitis* の SUC1.5 と同じクラスターに属し、*Saccharomyces cerevisae* のマルターゼ転写促進因子 MAL63 と AmyR は同じクラスターに属した。一方、転写抑制因子候補として *Saccharomycopsis fibuligera* のアミラーゼ転写抑制因子 MIG1 と類似した配列が 2 つヒットし、相同性の高い順に HbMIG1-1、HbMIG1-2 と名付けた。アミノ酸配列を予測すると、MIG1 や *A. oryzae* のアミラーゼ転写抑制因子 CreA に存在するプロモーター認識部位 C_2 H_2 zinc finger モチーフを有していた。HbMIG1-1 は *S. fibuligera* の MIG1 と、HbMIG1-2 は *S. cerevisae* の MIG1 と同じクラスターに属した。遺伝子座の解析を行ったところ *S. cerevisae* では MAL63 がマルターゼ、マルトースパーミアーゼとクラスターを形成していることが知られているが、15-1 株においては転写促進因子の HbSUC1.5 も転写抑制因子の HbMIG1-1、HbMIG1-2 もこれらをコードする遺伝子の周辺にはアミラーゼ分泌に関する遺伝子は存在しなかった。

Hyphopihia burtonii, Amylase, Transcriptional factor

講演番号：2A08a01
講演日時：3 月 26 日 09:30～ センター2 号館 A08 会場

日本各地の環境試料からの IncPromA 群プラスミドの収集と比較

Comparisons of IncPromA-group plasmids exogenously captured from natural environmental samples collected in Japan

○山本 雪絵[1]、金子 健成[1]、早川 雅也[2]、森内 良太[3]、道羅 英夫[3]、金原 和秀[1,2]、新谷 政己[1,2,3] ([1]静大・工、[2]静大院・総合科技、[3]静大・グリーン研)
○Yukie YAMAMOTO[1], Kensei KANEKO[1], Masaya HAYAKAWA[2], Ryota MORIUCHI[3], Hideo DOHRA[3], Kazuhide KIMBARA[1,2], Masaki SHINTANI[1,2,3] ([1]Fac. Eng. Shizuoka Univ., [2]Glad. Sch. Shizuoka Univ., [3]Shizuoka Univ. RIGST.)

【目的】プラスミドは異なる微生物間を伝播し，様々な遺伝子群を運ぶことで，宿主の生理的機能を劇的に変化させるため，微生物の急速な進化や適応を促す一方で，多剤耐性菌の出現や蔓延の原因にもなっている．これまでに多くのプラスミドが発見されてきたが，どれが実環境中で遺伝子の水平伝播を担い，どこに分布するのか，という情報はほとんど不明である．先行研究では，環境中からの自己伝達性プラスミド（自身のみで他の微生物に接合伝達可能）の収集を目的として，環境試料中の微生物を供与菌とし，可動性プラスミド（自己伝達性プラスミド存在下でのみ接合伝達可能）を保持する中間供与菌，染色体上に *gfp* 遺伝子を挿入した受容菌を用い，三親接合を行った．その結果，廃水処理施設の嫌気処理槽，抗生物質非投与の牛糞堆肥試料，湖底泥試料から，IncPromA 群プラスミドを複数取得し，そのうち 7 本の全塩基配列の決定に成功した．全塩基配列を既知の配列と比較すると，それらは 3 つのサブグループ(IncPromAβ, γ, δ)[1)]に属していた．また複数の試料から IncPromA 群プラスミドが取得された上，綱レベルで異なる細菌間を伝播することが示されたため[2)]，本群は実環境中で伝播する主要な広宿主域のプラスミド群であると予想された．そこで，本研究では，より広範な環境試料から，IncPromA 群プラスミドが取得できるかを検証し，それらの全塩基配列レベルの比較を行うことを目的とした．
【方法・結果と考察】日本各地 65 箇所の環境試料中の微生物を供与菌とした三親接合を行い，自己伝達性プラスミドを保持すると予想された 730 株の接合完了体を取得した．得られたプラスミドについて，IncPromA 群と，既に環境に広く分布することが知られている IncP-1 群をそれぞれ特異的に検出する PCR を行った結果，730 株のうち 104 株（15 箇所の試料に由来）が IncPromA 群，101 株（20 箇所の試料に由来）が IncP-1 群プラスミドを保持すると示唆された．この結果から，IncPromA 群は IncP-1 群と同様に広範な環境に存在する自己伝達性プラスミドだと考えられた．新たに全塩基配列を決定した IncPromA 群プラスミド 5 本は，異なる試料に由来するにもかかわらず，全てが IncPromAβ 群に属すことが示され，またそのサイズが約 41 kb と極めて類似していた．また，薬剤耐性遺伝子等，機能既知の遺伝子を全くもっていなかった．これらの性質は，先行研究で全塩基配列を決定した 7 本のプラスミド (IncPromAβ, γ, δ) と同様であった．以上のことは，IncPromA 群プラスミドは，種々の環境中で実際に伝播する，接合伝達に特化したプラスミドである可能性を示している．現在は取得した他の IncPromA 群プラスミド 18 本の全塩基配列を新たに解読している．

1．Yanagiya et al., 2018, Front. Microbiol. 9:2602.
2．徳田ら，日本農芸化学会 2019 年度大会

plasmid, IncPromA group, exogenous plasmid capturing

発表責任者：山本雪絵（yamamoto.yukie.16@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2A08a02
講演日時：3 月 26 日 09:41～ センター2 号館 A08 会場

自己伝達性プラスミドが可動性プラスミドを伝達させる能力の比較

Comparison of mobilizing abilities of different self-transmissible plasmids

○早川 雅也[1]、山本 雪絵[2]、金原 和秀[1,2]、新谷 政己[1,2,3]([1]静大院・総合科技、[2]静大・工、[3]静大・グリーン研)
○Masaya HAYAKAWA[1], Yukie YAMAMOTO[2], Kazuhide KIMBARA[1,2], Masaki SHINTANI[1,2,3]
([1]Grad. Sch. Shizuoka Univ., [2]Fac. Eng. Shizuoka Univ., [3]Shizuoka Univ. RIGST.)

【目的】当研究室では環境中から可動性プラスミド（自身のみでは伝達できないが，自己伝達性プラスミドと共存する場合に伝達可能）を伝達させる能力を指標として自己伝達性プラスミド（それ自体のみで伝達可能）の収集を行ってきた[1)]．その結果，IncPromA 群という不和合性群に属するプラスミドが多く取得され，そのうち 12 本の全塩基配列を決定したところ，これらすべては抗生物質耐性等を宿主に付与するような既知のアクセサリー遺伝子をもっておらず，環境中における役割は不明であった．また，これまでに発見された本群のプラスミドの大半（15/20）が，上述の収集法により得られていることから，他の自己伝達性プラスミドと比べて，当該可動性プラスミドを伝達させる能力が優れている可能性が考えられた．本研究ではこの仮説を検証することを目的に，IncPromA 群を含む，異なる自己伝達性プラスミドが可動性プラスミドを伝達させる能力を比較することにした．
【方法】供与菌と受容菌には大腸菌を用い，自己伝達性プラスミドには pSN1104-11（IncPromA 群）[1)]を，可動性プラスミドとして pBBR1MCS-5[2)]を使用した．pSN1104-11 のみ，または pSN1104-11 と pBBR1MCS-5 の双方を保持する 2 種類の菌株をそれぞれ供与菌とした．供与菌と受容菌を混合して LB 培地上の孔径 0.45 μm フィルター上で 24 時間接合し，選択培地に塗布することで接合完了体を検出した．その後，IncPromA 群プラスミドのみが伝達する場合，可動性プラスミドのみが伝達する場合，双方のプラスミドが伝達する場合のそれぞれについて伝達頻度の比較を行った．接合伝達頻度には，得られた接合完了体数を接合後の供与菌数で除した値を用いた．
【結果･考察】可動性プラスミドを持たない供与菌から受容菌への pSN1104-11 の伝達頻度は, pSN1104-11 と pBBR1MCS-5 の双方を保持する供与菌から受容菌への全体の伝達頻度より有意に低かった．これより, pSN1104-11 は pBBR1MCS-5 と共存するとき, 全体の伝達頻度が低下することが示唆された．現在，pSN1104-11 のみが伝達した頻度，可動性プラスミドのみが伝達した頻度，可動性プラスミドと IncPromA 群プラスミドの双方が伝達したそれぞれの頻度について詳細に測定している．さらに，同様の方法で他の不和合性群に属するプラスミドや他の菌株を用いた場合にどのような挙動を示すか検証している．

1. Yanagiya et al., 2018, Front. Microbiol. 9:2602.
2. Kovach et al., 1995, Gene 166, 175-176.

conjugation, self-transmissible plasmid, mobilizable plasmid

講演番号：2A08a03
講演日時：3 月 26 日 09:52～ センター2 号館 A08 会場

同一不和合性群に属するプラスミドであってもその宿主域は異なる
Host range of the same Inc group plasmids could be different to each other
徳田 真穂[1]、千葉 怜碧[2]、井上 謙吾[3]、雪 真弘[4]、大熊 盛也[4]、水口 千穂[5]、野尻 秀昭[5]、金原 和秀[1,2]、○新谷 政己[1,2,6]([1]静大院・総合科技、[2]静大・工、[3]宮崎大・農、[4]理研・BRC-JCM、[5]東大・生物工学セ、[6]静大・グリーン研)
Maho TOKUDA[1], Reimi CHIBA[2], Kengo INOUE[3], Masahiro YUKI[4], Moriya OHKUMA[4], Chiho MINAKUCHI[5], Hideaki NOJIRI[5], Kazuhide KIMBARA[1,2], ○Masaki SHINTANI[1,2,6] ([1]Grad. Sch. Shizuoka Univ., [2]Fac. Eng., Shizuoka Univ., [3]Fac. Agr., Univ. Miyazaki, [4]BRC-JCM, RIKEN, [5]BRC, Univ. Tokyo, [6]RIGST, Shizuoka Univ.)

【背景・目的】プラスミドは細菌の生存に必須でない，染色体とは別に自律複製可能な遺伝因子である．また，接合伝達によって種々の細菌間を伝播することが可能で，プラスミド上の遺伝子群のはたらきにより，宿主となる細菌の形質を大きく変える．従って，プラスミドがどのような種類の細菌に伝播し，複製されるのか，という宿主域の情報は細菌の進化・適応能を理解する上で非常に重要である．我々の先行研究で得られた，自己伝達性のプラスミド pSN1104-11 と pSN0729-62 は，同一細胞内に共存できない不和合性を示す．そのため，２つのプラスミドは，複製・維持機構が類似した同じ不和合性群 IncPromA 群に属する．にもかかわらず，双方の塩基組成は大きく異なり，例えば GC 含量は 10%異なる [1)]．また多くの場合，プラスミドの GC 含量は宿主染色体の GC 含量よりも 5-10%低いことも知られている [2)]．以上のことは，上述したプラスミドの宿主域が互いに異なることを示唆している．そこで，本研究では，これら２つのプラスミドの宿主域を比較し，塩基組成の違いが宿主域に及ぼす影響を調べることを目的とした．
【方法・結果・考察】pSN1104-11 と pSN0729-62 を保持した *Pseudomonas putida* SMDBS 株を供与菌，牛糞堆肥や土壌中の微生物群集を受容菌群として接合実験を行った．GFP 遺伝子が供与菌内では発現しない仕組みを利用して，GFP による蛍光を呈する接合完了体のみをセルソーターを用いて収集した．取得した接合完了体は 16S rRNA 遺伝子の配列に基づいて，属レベルでの同定を行った．その結果，pSN1104-11 をもつ 17 属と pSN0729-62 をもつ 15 属の接合完了体を取得し，そのうち 8 属，6 属は各プラスミドに特有の属であった．さらに，*Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* に属する細菌においては，pSN1104-11 が接合伝達した 4 属の GC 含量はすべて 60%以上であるのに対し，pSN0729-62 が伝達した 2 属の GC 含量は共に 60%以下であった. 以上の結果から, 同じ不和合性群に属していても，塩基組成の違いによって宿主域が異なり，プラスミドと宿主染色体の GC 含量に相関があることが示唆された．現在は，塩基組成の違いはプラスミドの安定性に寄与するかを調べるため，収集した接合完了体からプラスミドを脱落させた菌株を受容菌として用いた接合実験を行い，プラスミドが伝達した接合完了体を用いた安定性の試験を行っている．
(1) Yanagiya et al., 2018, Front. Microbiol. 9:2602.
(2) Shintani & Suzuki, 2019, Shintani M., Suzuki H. (2019) Plasmids and Their Hosts. In: Nishida H., Oshima T. (eds) DNA Traffic in the Environment. Springer, Singapore

plasmid, conjugation, host range

発表責任者：新谷 政己（shintani.masaki@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2A08a04
講演日時：3 月 26 日 10:03〜 センター2 号館 A08 会場

Sphingobium sp. SYK-6 株における 5-ホルミルフェルラ酸代謝系遺伝子の同定と機能解析
Identification and characterization of the 5-formylferulate catabolism genes in *Sphingobium* sp. SYK-6
○川添 充[1]、高橋 健司[1]、樋口 雄大[1]、菱山 正二郎[2]、上村 直史[1]、政井 英司[1] ([1]長岡技科大・生物、[2]森林総研)
○ Mitsuru KAWAZOE[1], Kenji TAKAHASHI[1], Yudai HIGUCHI[1], Shojiro HISHIYAMA[2], Naofumi KAMIMURA[1], Eiji MASAI[1] ([1]Nagaoka Univ. Tech., [2]FFPRI)

【目的】*Sphingobium* sp. SYK-6 株は、リグニン中で約 3−10%を占める β-5 結合をもつフェニルクマラン型化合物の dehydrodiconiferyl alcohol (DCA)を含む様々なリグニン由来二量体化合物を分解することができる。SYK-6 株において DCA は、両芳香環の側鎖アルコールがカルボン酸に酸化された後、A 環側鎖の脱炭酸を受けて stilbene 型化合物 (DCA-S)に変換される。DCA-S は C=C 結合の開裂を受けて vanillin と 5-formylferulate (5FFA)に変換される。その後、5FFA は 5 位のアルデヒドがカルボン酸に酸化されて 5-carboxyferulate (5CFA)に変換された後、5 位カルボン酸の脱炭酸により ferulate に変換されて代謝されると推定されている。これまでに DCA から DCA-S を経由して vanillin と 5FFA に至る代謝系遺伝子及び vanillin と ferulate の代謝系遺伝子が明らかにされている (Kamimura ら, *Environ Microbiol Rep*, 2017; 増羽ら, 2019 年度本大会他)。本研究では、DCA 代謝経路の全容解明を目的として、5FFA から ferulate への変換に関与する酵素遺伝子の同定と機能解析を行った。
【方法・結果・考察】SYK-6 株の細胞抽出液に NAD^+、$NADP^+$、1-methoxy-5-methylphenazinium methylsulfate (PMS)、及び PMS + FAD をそれぞれ添加し、5FFA 変換活性を調べた。その結果、NAD^+ 存在下においてのみ顕著な 5FFA 変換活性の上昇 (約 20 倍)が観察された。この結果から、5FFA の変換に NAD^+依存性の aldehyde dehydrogenase (ALDH)が関与することが予想された。SYK-6 株ゲノムに存在する全 23 個の ALDH 遺伝子を *E. coli* で発現させ、各遺伝子産物の 5FFA 変換能を調べた。その結果、SLG_12800 遺伝子産物が唯一顕著に高い 5FFA 変換能を示し、5FFA は 5CFA に変換された。相同組換えにより SLG_12800 破壊株を作製し、本株の 200 μM DCA 変換時における 5FFA 蓄積量を調べた。その結果、野生株がいずれの反応時間においても 5FFA を蓄積しなかったのに対し、SLG_12800 破壊株は反応 8 時間において約 120 μM の 5FFA を蓄積した。以上の結果から、5FFA の変換に SLG_12800 が主要に関与することが示唆された。5CFA の ferulate への変換に 5-carboxyvanillate decarboxylase をコードする *ligW* 及び *ligW2* が関与する可能性を考え、両遺伝子を *E. coli* で発現させ、各遺伝子産物の 5CFA 変換能を調べた。その結果、両遺伝子産物は 5CFA の ferulate への変換能を有していた。*ligW* 破壊株及び *ligW2* 破壊株の 200 μM 5FFA 変換時における 5CFA 蓄積量を調べた結果、反応 8 時間において野生株では蓄積が見られなかったのに対し、*ligW* 破壊株と *ligW2* 破壊株はそれぞれ 6 μM と 38 μM の 5CFA を蓄積した。さらに *ligW ligW2* 二重破壊株は 61 μM の 5CFA を蓄積した。以上の結果より、*ligW* 及び *ligW2* が 5CFA の変換に関与することが示唆された。

lignin, phenylcoumaran, aldehyde dehydrogenase

発表責任者：川添 充（s183299@stn.nagaokaut.ac.jp）

講演番号：2A08a05
講演日時：3 月 26 日 10:14～ センター2 号館 A08 会場

Sphingobium sp. SYK-6 株に見いだされた立体選択的なリグニン由来芳香族化合物の外膜輸送システム
A stereoselective outer membrane transport system for a lignin-derived aromatic compound in *Sphingobium* sp. SYK-6
○柴田 昂輝[1]、藤田 雅也[1]、上村 直史[1]、菱山 正二郎[2]、政井 英司[1]([1]長岡技科大・生物、[2]森林総研)
○Koki SHIBATA[1], Masaya FUJITA[1], Naofumi KAMIMURA[1], Shojiro HISHIYAMA[2], Eiji MASAI[1] ([1]Nagaoka Univ. Tech., [2]FFPRI)

【背景・目的】近年、化学処理と微生物変換を組み合わせたリグニンからの有用物質生産が注目されている。グラム陰性菌 *Sphingobium* sp. SYK-6 株は様々なリグニン由来芳香族化合物の代謝能を有し、本株の代謝系遺伝子は有用物質生産系の構築に有用である。これまで本株の 40 以上のリグニン由来芳香族化合物代謝系遺伝子が解明されたが、これら化合物の取り込みについての知見は細菌全般で少なく、特に外膜輸送システムはほとんどわかっていない。SYK-6 株は、外膜において siderophore や vitamin B12 を特異的に輸送する TonB-dependent receptor (TBDR)遺伝子を 74 個と多数有する。TBDR は内膜局在性の TonB-ExbB-ExbD 複合体から伝達されるプロトン駆動力由来のエネルギーを利用して基質を能動輸送する。TBDR が芳香族化合物の取り込みと代謝に関与することは知られていなかったが、最近、SYK-6 株の 17 個の TBDR 遺伝子の転写がリグニン由来芳香族化合物の代謝時に誘導されること、biphenyl 型化合物で誘導される DdvT と、TonB1-ExbB1-ExbD1/ExbD2 からなる TonB 複合体が biphenyl 型化合物の外膜輸送を担うことを明らかにした (Fujita *et al, Commun. Biol*., 2019)。本研究では、phenylcoumaran 型化合物の dehydrodiconiferyl alcohol (DCA)の代謝時に誘導される TBDR 遺伝子 *phcT* が DCA 代謝に関与するかを明らかにすることを目的とした。
【方法・結果・考察】SYK-6 株の *phcT* を相同組換えにより破壊し、破壊株休止細胞の DCA を含む様々なリグニン由来芳香族化合物に対する変換能を野生株と比較した。その結果、*phcT* 破壊株において DCA 代謝中間体である DCA-C に対する変換能だけが低下したことから、PhcT は DCA-C の外膜輸送体であることが示唆された。DCA-C には (+)-DCA-C と(–)-DCA-C が存在し、SYK-6 株においてこれらは立体選択的な酵素により代謝される。そこで、PhcT による DCA-C の外膜輸送に立体選択性があるのかを調べるために、*phcT* 破壊株による DCA-C ラセミ体変換をキラル–HPLC で分析した。その結果、野生株と比較して(–)-DCA-C 変換能が顕著に低下したのに対して(+)-DCA-C 変換能の低下は僅かであったことから、PhcT は(–)-DCA-C 選択的な外膜輸送体であることが示唆された。SYK-6 株に存在する 6 つの *tonB* の内、得られている *tonB2–tonB6* の各破壊株では DCA-C 変換能に低下は見られなかった。一方、野生株に *tonB1* または *tonB1-exbB1-exbD1*/*exbD2* をプラスミドで導入した場合、反応 60 分後の DCA-C 変換量が野生株と比較して 1.2 倍と 1.7 倍に向上した。以上から、SYK-6 株の(–)-DCA-C の外膜輸送は、PhcT と TonB1-ExbB1-ExbD1/ExbD2 から構成される TonB システムに担われると結論された。本研究は JSPS 科研費 19H02867, 19J11312 の助成を受けたものです。

lignin, stereoselective transporter, TonB-dependent receptor

発表責任者：柴田 昂輝（s173306@stn.nagaokaut.ac.jp）

講演番号：2A08a06
講演日時：3 月 26 日 10:35～ センター2 号館 A08 会場

人工遺伝子クラスターを利用した有機塩素殺虫剤分解酵素遺伝子キャプチャリング株の作製

Construction of bacterial strains for capturing of genes for the degradation of organochlorine pesticide by using artificial gene clusters

○蘇 立俊、加藤 広海、大坪 嘉行、津田 雅孝、永田 裕二（東北大院生命）
○Lijun SU, Hiromi KATO, Yoshiyuki OHTSUBO, Masataka TSUDA, Yuji NAGATA (Tohoku Univ. Graduate School of Life Sciences)

【背景・目的】有機塩素系殺虫剤 γ-hexachlorocyclohexane (γ-HCH) は人為起源の難分解性物質であるが、本物質を分解資化する細菌株が世界各地の汚染土壌から単離されている。これら株は、異なる祖先株が γ-HCH 代謝に関与するほぼ同一の *lin* 遺伝子群を獲得することで γ-HCH 分解細菌株となったと推定されているが、どこからどのようにして *lin* 遺伝子群を獲得したかは不明である。また、天然の γ-HCH 分解細菌株は、(i) γ-HCH 代謝に関与する *lin* 遺伝子群がゲノム中に散在し、近傍に存在する挿入配列 IS*6100* の影響で遺伝的に不安定で γ-HCH 分解資化能が安定維持されない、(ii) γ-HCH 代謝過程で毒性の dead-end 産物を生じる、という適応の不十分さを強く示唆する特徴を有しており、これら特徴は、分解細菌株を環境浄化や遺伝学的手法の宿主として応用する際に問題となる。そこで、本研究では、天然株より安定かつ効率的に γ-HCH 分解資化能を発揮する組換え細菌株を育種し、これを環境試料からの *lin* 遺伝子群取得用のキャプチャリング株に応用することを目的とした。
【方法・結果および考察】γ-HCH を各種芳香族化合物代謝経路における共通の中間代謝産物である β-ketoadipate に変換するのに必要な LinA から LinF の 6 つの酵素遺伝子クラスターを作製した。その際、LinA の活性が LinB の活性より相対的に強いと、より多くの dead-end 産物を生じることを考慮し、*linB* と *linA* をクラスターの先頭と最後尾にそれぞれ配置した。また、*lin* 遺伝子群の発現レベルが優れた分解細菌の創出に重要であると考えられたため、発現強度が異なると期待される 3 種のコンストラクトを作製し、これらを広宿主域プラスミドを用いて β-ketoadipate 代謝能を有し IS*6100* を保持しない様々な環境細菌株に導入した。これら組換え細菌株と天然の γ-HCH 分解資化株の γ-HCH 分解特性及び資化能を評価した結果、*lin* 遺伝子群を最も高いレベルで発現すると期待されるプラスミドを導入した株のうち、*Sphingobium chlorophenolicum* L-1 株と *Sphingomonas sangiunis* IAM12578 株を宿主とする株が良好な γ-HCH 分解活性を示し、かつ dead-end 産物を蓄積しなかった。さらに、L-1 由来株が γ-HCH を唯一の炭素源として生育できることを確認した。一方、この 2 株は、γ-HCH で汚染化した土壌に接種した場合でも、良好な γ-HCH 分解活性を示した。そこで、*lin* 遺伝子群クラスターを有する L-1 および IAM12578 由来株は、汚染環境浄化や *lin* 遺伝子群取得用の宿主として適切であると考え、これらの株に *linA* もしくは *linB* 遺伝子を欠損させた人工クラスターを導入し、*linA*/*linB* 取得用のキャプチャリング株を構築した。現在、これらキャプチャリング株と環境試料や天然の γ-HCH 分解細菌株との接合実験を行い、それらの有効性を検討している。

gene cluster, organochlorine pesticide, synthetic biology

講演番号：2A08a07
講演日時：3 月 26 日 10:46～ センター2 号館 A08 会場

有機リン系殺虫剤分解細菌 Sphingopyxis wildii 株由来の 2 種のハロアルカンデハロゲナーゼの解析
Analysis of two haloalkane dehalogenases from an organophosphates-degrading Sphingopyxis wildii strain

○鄧 文昊[1]、Annapoorni Lakshman Sagar[2]、陳 楠楠[1]、加藤 広海[1]、大坪 嘉行[1]、津田 雅孝[1]、Dayanannda Siddavattam[2]、永田 裕二[1]([1]東北大学・大学院生命科学研究科(院生命科)、[2]University of Hyderabad)
○Wenhao Deng[1], Lakshman Sagar Annapoorni[2], Nannan Chen[1], Hiromi Kato[1], Yoshiyuki Otsubo[1], Masataka Tsuda[1], Siddavattam Dayanannda[2], Yuji Nagata[1] ([1]Tohoku Univ, [2]Hyderabad Univ)

【背景・目的】インドで単離された有機リン系殺虫剤 (organophosphates: OP) 分解細菌 *Sphingopyxis wildii* 株 (Sw 株) は、全ゲノム配列解読の結果、OP 以外にも様々な難分解性芳香族化合物や有機塩素系殺虫剤γ-hexachlorocyclohexane (γ-HCH) など、多彩な環境汚染物質を分解代謝する潜在能力を有することが示唆され、多重汚染環境のバイオレメディエーションに有用な株として期待されている (Genome Biol Evol **9**: 77-81, 2017)。一方、ハロアルカンデハロゲナーゼ (HLD) は、加水分解的脱ハロゲン酵素であり、一般に基質特異性が広く、様々な有機ハロゲン化合物のハロゲン基を水酸基に置換し、アルコールへと変換する。近年、様々な細菌株が様々な HLD を有することが明らかになり、環境浄化や有害物質の解毒、物質生産などへの応用が期待されている。本研究では、Sw 株のゲノム配列に見出された 2 種の HLD ホモログについて解析を行った。
【方法・結果および考察】Sw 株ゲノムに、γ-HCH 分解細菌 *Sphingobium japonicum* UT26 株のγ-HCH 代謝の 2 段階目の反応を触媒する HLD である LinB と、identity は低いが有意な相同性を示す 2 種の推定 HLD 遺伝子が見出された。予備的実験でこれら遺伝子産物が実際に HLD 活性を示すことが確認されたため、LinB と 32%および 26%の identity を示すものをそれぞれ DswA と DswB (dehalognease from *Sphingopyxis wildii*) と命名した。LinB が研究例が多く解析の進んでいる HLD-II サブファミリーに属するのに対して、DswA と DswB はそれぞれ HLD-I、HLD-III サブファミリーに属し、両サブファミリーに属する HLDs に関する情報は少ないため、これらの詳細な解析を行うこととした。pET システムをベースにして、それぞれ N 末端あるいは C 末端に 6 x His-tag を有するタンパク質を大腸菌で発現し、精製を試みたところ、DswA は C 末端に、DswB は N 末端にそれぞれ 6 x His-tag を有するものについて良好に精製を行うことができた。精製した DswA_C-His と DswB_N-His は、多くの HLDs の良い基質である 1,3-dibromopropane に対して明らかな脱ハロゲン活性を示した。現在、これら精製酵素の基質特異性等、詳細な解析を進めている。一方、*dswA* および *dswB* 遺伝子を UT26 株由来の *linB* 欠失株に導入し、γ-HCH を唯一の炭素源として含む無機塩固体培地での生育を観察したが、これら株の生育は観察されなかった。すなわち、DswA および DswB は、γ-HCH 代謝における LinB 機能は有さないと考えられる。

dehalogenase, organophosphate, sphingomonads

講演番号：2A08a08
講演日時：3 月 26 日 10:57～ センター2 号館 A08 会場

PET 分解細菌 *Ideonella sakaiensis* における aldehyde dehydrogenase 遺伝子の機能解明
Characterization of an aldehyde dehydrogenase gene in the PET-degrading bacterium *Ideonella sakaiensis*

○蜂須賀 真一[1]、高山 暁生[2]、藤原 毅[2]、吉田 昭介[1,2]([1]奈良先端大・研究推進機構、[2]奈良先端大・バイオ)
○Shin-ichi HACHISUKA[1], Akiyo TAKAYAMA[2], Tsuyoshi FUJIWARA[2], Shosuke YOSHIDA[1,2] ([1]Inst. Res. Initiatives, NAIST, [2]Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST)

【背景・目的】Poly(ethylene terephthalate) (PET)は、大量生産されている合成ポリマーの 1 つであり、ペットボトルや衣類などの材料として利用される。PET はわずか 50 年程前に工業生産を開始したポリマーである。PET は元々自然界に存在せず、化学的に安定なことから、生物分解を受けないと考えられてきたが、最近 PET を分解して資化する細菌 *Ideonella sakaiensis* が単離された (1)。本菌は、PETase と命名された酵素により PET を mono(2-hydroxyethyl) terephthalate (MHET)に分解する。続いて、MHETase と命名された酵素により MHET を terephthalate (TPA)と ethylene glycol (EG)に分解し、生じた TPA や EG を代謝すると考えられている。例えば、本菌を利用した PET を発酵原料とする有用化合物生産において、TPA や EG の代謝は重要な基盤情報となる。これまでに、本菌における TPA 代謝経路についてはゲノム情報およびトランスクリプトーム解析から予測されていたが、EG 代謝経路については不明であった。そこで、本菌における EG 代謝経路の同定を目的として研究を進めている。
【方法・結果】以前、本菌を PET や TPA を唯一の炭素源として培養した際のトランスクリプトーム解析で (1)、1 つの aldehyde dehydrogenase (ALDH)遺伝子の転写量が PET 代謝時に顕著に亢進し、TPA 代謝時には抑制されていた。そこで本研究では、本 ALDH 遺伝子の EG 代謝への関与を予測し、本菌を EG を唯一の炭素源として培養して、再度その転写量を調べたところ、PET 代謝時と同等の傾向を示した。これらの結果から、本 ALDH が EG 代謝において重要な役割を果たすことが示唆された。次に、大腸菌を宿主として、ALDH の His タグ付加組換え型タンパク質を大量発現させ、アフィニティ精製に供した。精製組換え型タンパク質を用いて、種々のアルデヒド化合物（1 mM）に対する基質特異性を検討したところ、glycolaldehyde に対する反応初速度が、acetaldehyde、propionaldehyde、DL-glyceraldehyde および *trans*-cinnamaldehyde に対する反応初速度に比べて、3 倍以上高い値を示した。よって、本菌において、ALDH は glycolaldehyde を基質としている可能性が高いと考えられた。最近、*Pseudomonas putida* における EG 代謝経路がプロテオーム解析により予測されたが (2)、その経路上で glycolaldehyde dehydrogenase の存在が示唆されており、本菌も類似の経路を持つのではないかと予想している。現在、ALDH 遺伝子破壊株を作製している。破壊株を EG や EG 中間代謝物をそれぞれ唯一の炭素源として培養することで、本酵素の EG 代謝への生理学的な関与を調べる予定である。

1) Yoshida S. *et al.*, *Science*, 351, 1196–1199 (2016).
2) Mückschel B. *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 78, 8531-8539 (2012).

Poly(ethylene terephthalate) (PET), *Ideonella sakaiensis*, Metabolic pathway

講演番号：2A08a09
講演日時：3 月 26 日 11:08～ センター2 号館 A08 会場

硫黄制限条件下における白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* による塩素化芳香族化合物分解について

Tetrachlorohydroquinone degradation by white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* under sulfur-depletion conditions

○曽我 晃久、ワイズ 里沙、酒井 杏匠、志水 元亨、加藤 雅士 (名城大農)
○Akihisa SOGA, Lisa WISE, Kiyota SAKAI, Motoyuki SHIMIZU, Masashi KATO (Meijo Univ.)

[背景・目的]

塩素化有機化合物は農薬・溶媒・医薬品などに広く使用されており，それらが環境中に流出することで環境汚染をもたらしている．塩素化芳香族化合物は，化学的に安定で分解されにくいため， 残留性・蓄積性がある．それらは，少量でホルモン様物質，内分泌撹乱物質として働き，生物に有害な影響をもたらすことが報告されている．これまでに，白色腐朽菌は不定形芳香族高分子であるリグニンだけでなく，テトラクロロハイドロキノンのような塩素化芳香族化合物など様々な芳香族化合物を分解することが報告されている．しかしながら，白色腐朽菌による塩素化芳香族化合物の分解については，実験室で培養に用いる培地など富栄養条件下では検証されているが，環境中のような貧栄養条件下でどの程度分解されているか不明である．

[方法・結果]

栄養源豊富な人工培地での培養と自然界（栄養源が不足している）状態では， *Phanerochaete chrysosporium* の塩素化芳香族化合物の分解能が大きく異なるのではないかと考えられた．そこで本研究では，栄養源が少ない，より環境に近い培養条件における塩素化芳香族化合物の分解について調べるため，低窒素，硫黄およびリン酸枯渇条件下（人工培地よりも環境に近い条件）における *P. chrysosporium* の塩素化芳香族化合物の分解能について検討した．その結果，富栄養条件下に比べて栄養制限下（特に硫黄制限下）においてテトラクロロハイドロキノンの分解能が高くなっていることが明らかとなった．そこで，テトラクロロハイドロキノンの分解に関わる分泌酵素の同定を目的として，硫黄制限下における *P. chrysosporium* の菌体内タンパク質を 2-DE で解析したところ，2 つの omega 型 glutathione *S*-transferase (GST) が高発現していた．現在，テトラクロロハイドロキノンの分解におけるこれら 2 つの GST の役割についての解析を進めている．

Phanerochaete chrysosporium, tetrachlorohydroquinone, glutathione *S*-transferase

講演番号：2A08a10
講演日時：3 月 26 日 11:19～ センター2 号館 A08 会場

Construction of experimental evolution system of haloalkane dehalogenases and characterization of the evolved enzymes

○Nannan CHEN, Yoshiyuki Ohtsubo, Masataka Tsuda, Yuji Nagata (Tohoku Univ.)

Background and Purpose: Haloalkane dehalogenases (HLDs) convert halogenated compounds to corresponding alcohols by simple hydrolytic mechanism. It has been revealed that many bacterial strains possess HLDs or its homologues. Such potential HLDs are promising materials for the development of new biocatalysts, since HLDs generally have a broad range of substrate specificities. LinB is one of prototypical and well-studied HLDs and was originally identified as an enzyme that catalyzes the second step for the utilization of a man-made chlorinated pesticide γ-hexachlorocyclohexane (γ-HCH) in *Sphingobium japonicum* UT26. Other various γ-HCH degraders have been isolated from HCH-isomers-contaminated sites around the world, and they also have identical or almost identical LinBs. In other words, no γ-HCH degrader has been isolated that uses other HLDs besides LinB for the γ-HCH utilization. To gain an insight into the functional evolution of HLDs toward the γ-HCH utilization, we constructed experimental evolution system of HLDs.

Methods: Random mutations were introduced by error-prone PCR into *linB*, versatile other HLD genes, and genes encoding putative common ancestors of LinB and its homologous enzymes, and mutant libraries were constructed in *Esherichia coli* by using a broad-host-range vector. The resultant libraries were introduced into the *linB*-deletion mutant of UT26, which cannot grow on the minimal medium plate containing γ-HCH as a sole carbon source. Among the resultant transformants, clones that grow well on the γ-HCH plate were screened. Plasmids carrying the mutated genes were extracted from the candidate clones, re-introduced into the *linB*-deletion mutant, and their positive effect on the growth on the γ-HCH plate was confirmed. The final candidate evolved genes were sequenced, and their protein products with His-tag were highly expressed in *E. coli*, purified, and characterized.

Results and Discussion: Several candidate evolved genes were successfully obtained by the screening, indicating that our system has worked. Most of the candidate evolved enzymes were well expressed in *E. coli*, and purified to homogeneity. Some of them showed higher HLD activity than their original enzymes toward general substrate of HLDs. Evaluation of their activity toward other substrates including intermetabolites of γ-HCH is in progress.

protein evolution, pesticide, haloalkane dehalogenase

講演番号：2A08a11
講演日時：3 月 26 日 11:40～ センター2 号館 A08 会場

PCB/ビフェニル分解菌 *Acidovorax* sp. KKS102 株が有する ICE の接合伝達に関与する *traR* 遺伝子の機能解析

traR activates horizontal transfer of ICE from a PCB-degrader *Acidovorax* sp. KKS102

○松本 哲、酒井 啓一郎、永田 裕二、津田 雅孝、大坪 嘉行（東北大院生命科）
○ Satoshi MATSUMOTO, Keiichiro SAKAI, Yuji NAGATA, Masataka TSUDA, Yoshiyuki OHTSUBO (Tohoku Univ.)

【背景】可動遺伝因子の水平伝搬は細菌が新たな形質を獲得するのに重要である。可動遺伝因子のなかでも、Integrative and conjugative elements(ICEs)はプラスミドと異なり、染色体上に組込まれた状態で維持されている。*Acidovorax* sp. KKS102 株が有する ICE_{KKS102}Tn*4677*（以下、ICE_{KKS}）はベータおよびガンマプロテオバクテリアに広く分布している Tn*4371* ファミリーに属している。ICE_{KKS}は、PCB/biphenyl 分解遺伝子群をコードする *bph* オペロンを乗せており、*Sphingobium* 属、*Burkholderia* 属、*Pseudomonas* 属への細菌に接合伝達することが明らかになっている。本研究では Tn*4371* ファミリー内で、アミノ酸配列と存在位置が保存されている *traR* 遺伝子に着目した。*traR* は *bph* 遺伝子群の下流に位置し、その推定アミノ酸配列から LysR family に属する転写制御因子である。*traR* の下流には接合伝達装置の形成に関与する *mpf* 遺伝子群が存在し、*traR* と *mpf* 遺伝子群の位置関係から、*traR* の接合伝達との関連性が推測された。
【結果と考察】KKS102 株由来の SA4 株は ICE_{KKS} 上にテトラサイクリン耐性遺伝子が挿入された株である。本株にアラビノースにて誘導が可能なプロモーターの下流に *traR* 遺伝子を連結したプラスミドを保持させた株 SA4(pNITaraKm_traR)を供与菌とし、*Pseudomonas. putida* KT2440 株由来のゲンタマイシン耐性株(KT2440Gm 株) を受容菌として接合伝達試験を行った。その結果、アラビノース含有寒天培地で接合を行なった場合にのみ接合伝達体が取得された。一方、SA4 株に空ベクターを保持させた SA4(pNITaraKm)を供与菌とした場合、アラビノースの有無にかかわらず接合伝達体は取得されなかった。このことから、*traR* の発現により、接合伝達頻度が向上することが示唆された。

traR は *bph* 遺伝子群の下流に *bph* 遺伝子群と同じ向きに存在している。このことから、*bph* 遺伝子群の pE プロモーターから一続きで転写されることが考えられた。この可能性について検討するため、SA4 株、および KKS102 株の pE プロモーターを構成的プロモーターである Tac プロモーターに置換した KH968 株から RNA を抽出し、*traR* を標的に定量 RT-PCR を行った。その結果、SA4 株に対して KH968 株において *traR* の転写量の向上がみられた。このことから、*traR* は *bph* オペロンに一続きで転写されること、*bph* 遺伝子群が発現する条件下で ICE の接合伝達頻度が向上すること、が示唆された。

Tn*4371* ファミリーの ICE で *traR* 遺伝子は共通した位置にある。乗客遺伝子が発現誘導される環境下で接合伝達頻度が上昇することが、本ファミリーICE の伝播・普及に関連している可能性が考えられる。

現在 *traR* により発現制御を受ける遺伝子の同定を進めている。

Horizontal gene transfer, Integrative and conjugative elements, PCB-degrader

講演番号：2A08a12
講演日時：3 月 26 日 11:51～ センター2 号館 A08 会場

薬剤耐性遺伝子の伝播に寄与しうるプラスミドの収集

Exogenous plasmids capturing to obtain self-transmissible plasmids transmitting antibiotic resistance genes.

○中道 孝一朗[1]、森 光矢[2]、金原 和秀[1,2]、新谷 政己[1,2,3]([1]静大・工、[2]静大院・総合科技、[3]静大・グリーン研)
○Koichiro NAKAMICHI[1], Mitsuya MORI[2], Kazuhide KIMBARA[1,2], Masaki SHINTANI[1,2,3] ([1]Fac. Eng., Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. Shizuoka Univ., [3]Shizuoka Univ. RIGST)

【目的】プラスミドは，染色体とは物理的に別個に存在する遺伝因子であり，異なる細菌間を接合伝達によって伝播することが可能である．プラスミド上には，種々の遺伝子群が存在することが多い．特に薬剤耐性遺伝子群を搭載したプラスミドの伝播は，これまで効果のあった抗生物質が効かない多剤耐性菌の出現と蔓延に寄与し，世界各国で深刻な問題を引き起こしている．そのため，薬剤耐性遺伝子を伝播しているプラスミドの同定と，その伝播経路の解明は喫緊の課題である．しかし，実環境中では，「どのプラスミドが，どの細菌間を伝播しているのか」という実態は，ほとんど不明のままである．そこで本研究では，環境由来の試料中で，接合伝達するプラスミドを収集し，実環境中で薬剤耐性遺伝子の伝播に寄与するプラスミドの同定を目的とした．
【目的･結果･考察】環境からのプラスミドの収集は，全国各地より収集した環境由来の試料に含まれる微生物群集を供与菌として，あらかじめ準備した受容菌に，プラスミドを接合伝達させることで行った．このとき，受容菌に特定の抗生物質耐性を与える能力を指標にする方法(二親接合)と，環境由来の自己伝達性プラスミドが，あらかじめ準備した中間供与菌内の可動性プラスミドを，同時に受容菌に伝達する能力を指標にする方法(三親接合)の二つを行った．受容菌と中間供与菌としては，大腸菌を用い，可動性プラスミドとしては，pBBR1MCS-3[1)]を用いた．その後，得られた接合完了体が，どのようなプラスミドを持つのかについて，既知のプラスミドの分類群に特異的なプライマーを用いて PCR 解析を行った．その結果，テトラサイクリン耐性能を指標とした二親接合によって， IncA/C, IncN, IncP 群に属すると推定されるプラスミドが複数取得された. また, 三親接合によって, IncPromA, IncN，IncP 群プラスミドと推定されるプラスミドが得られた．二親接合でも三親接合でも共通して IncN，IncP 群プラスミドが得られたことから，テトラサイクリン耐性を保持した IncN，IncP 群プラスミドが，中間供与菌を経由せずに，直接受容菌に接合伝達した可能性が示された．そこで，三親接合で取得された接合完了体に対し，pBBR1MCS-3 に特異的なプライマーを用いて PCR 解析を行った．その結果，IncN，IncP 群が得られた 3 つの環境試料に由来する接合完了体のうち，2 つは，可動性プラスミドを持っていなかった．従って，これら 2 か所の環境試料には，テトラサイクリン耐性遺伝子を持つ IncN，IncP 群プラスミドが多く存在することが示唆された．現在は取得したプラスミドのうち 35 株を選抜し，全塩基配列の解読および遺伝情報の詳細な解析を行っている．

1.Kovach et al., 1995 *Gene*, 166:175-176.

Plasmid, conjugation, multidrug resistance

講演番号：2A08a13
講演日時：3 月 26 日 12:02～ センター2 号館 A08 会場

Replication-Cycle Reaction (RCR) 法を利用した環境試料内に存在する環状プラスミド DNA の増幅とその塩基配列の解読
Analysis of plasmids from natural environmental samples using Replication-Cycle Reaction (RCR)
○森 光矢[1]、奈良 聖亜[2]、末次 正幸[2]、金原 和秀[1]、新谷 政己[1,3] ([1]静大院総合科技、[2]立教大院理、[3]静大グリーン研)
○ Mitsuya MORI[1], Seia NARA[2], Masayuki SU'ETSUGU[2], Kazuhide KIMBARA[1], Masaki SHINTANI[1,3] ([1]Grad. Sch. Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. Rikkyo Univ., [3]Shizuoka Univ. RIGST)

【背景・目的】プラスミドは同種または異種微生物間を水平伝播することでその宿主の形質を大きく変化させ，微生物の進化・環境適応に深く寄与している．現在では，次世代シーケンサーなどの技術の進歩により，メタゲノムアプローチなどによる培養不可能な微生物の配列決定も可能になり，多くの新しいプラスミド配列が得られるようになった．しかし，メタゲノム配列からの完全長プラスミド配列の回収は難しく，種々の微生物が混在する微生物生態系内のどこにどのようなプラスミドが存在するのかは未だ不明である．従って，微生物生態系内のどこにどのようなプラスミドが存在するのかを特定するには，直接プラスミド DNA を解読することが重要となる．そこで本研究では，環境試料内に存在する微生物画分から環状のプラスミド DNA のみを増幅し，その塩基配列の解読を試みることとした．
【方法・結果・考察】環境試料内に存在するプラスミド DNA の塩基配列の解読は，環境試料から全 DNA を抽出し，Replication-Cycle Reaction (RCR) 法によりプラスミド DNA のみを増幅させ，それをシーケンス解析することにより行った．モデル環境試料としては活性汚泥を用い，高密度の微生物画分を取得するため, 3 L の活性汚泥から孔径 30 μm のナイロンメンブレンフィルターを用いた濾過後，濾液に含まれる微生物を，孔径 0.22 μm のナイロンメンブレンフィルター上に捕集した．RCR 法は，大腸菌のゲノムを複製するサイクルを試験管内で再現したものである．その際，鋳型 DNA が環状であること，DNA 複製開始起点の *oriC* が含まれている必要がある [1)]．そこで，上で述べた手法で捕集した微生物から全 DNA を抽出後，得られた DNA に *oriC* を人為的にランダムに挿入し，RCR 法を行った．DNA の増幅が認められたサンプルについては，挿入した *oriC* 配列から外向きにプライマーを設計して，その塩基配列を解読した．現在までに，ラットの盲腸に含まれる微生物群集のメタゲノム解析によって発見されたサイズの小さなプラスミド，pRGRH0632 (2.6 kb，accession number : LN853259.1) に類似の配列をもつと推定されるプラスミドが得られた．以上の結果は，本研究がこれまでに見過ごされてきたプラスミドの発見に寄与することを示唆している．現在は，よりサイズの大きなプラスミド DNA の取得を試みている．

1. Su'etsugu *et al*., 2017, Nucleic Acids Res. 16;45(20):11525-11534.

Plasmid ecology, Replication-Cycle Reaction, plasmidome

発表責任者：新谷政己（shintani.masaki@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2A08p01
講演日時：3 月 26 日 13:50～ センター2 号館 A08 会場

Lactobacillus agilis BKN88 が持つ 2 種のフラジェリンの特性解析
Functional analysis on two homologous flagellins of *Lactobacillus agilis* BKN88
○江口 直人[1]、鈴木 駿也[1]、横田 健治[2]、五十君 靜信[2]、梶川 揚申[2] ([1]東農大院・農化、[2]東農大・農化)
○Naoto EGUHCI[1], Syunya SUZUKI[1], Kenji YOKOTA[2], Shizunobu IGIMI[2], Akinobu KAJIKAWA[2] ([1]Grad. Sch. Agr. Chem., Tokyo Univ. of Agric, [2]Sch. Agr. Chem., Tokyo Univ. of Agric)

【背景・目的】
Lactobacillus 属細菌は一般的にべん毛を持たないが、一部べん毛を持ち運動性を示す菌種・菌株が存在する。有べん毛乳酸菌に関する知見は乏しく、そのべん毛構造や機能については大部分が未解明である。過去の研究において、筆者らは *Lactobacillus agilis* BKN88 株のべん毛を構成するフラジェリン遺伝子(*fliC1* および *fliC2*)の発現解析を行い、同菌株のべん毛が相同性の高いこれら 2 つのフラジェリンにより構成されていることを示した。しかし、これら 2 種のフラジェリンが *L. agilis* のべん毛形成や運動性にどのように関わっているかは不明である。そこで本研究では、*L. agilis* BKN88 においてそれら 2 種のフラジェリンが果たす役割を調べることを目的とした。
【実験方法】
温度感受性プラスミド pG$^+$host5 を基本骨格とした 3 種類の変異株取得用プラスミドを構築し、二重相同組換えによって 3 つの変異株、Δ*fliC1*Δ*fliC2* 株・Δ*fliC1* 株・Δ*fliC2* 株を得た。フラジェリン遺伝子特異的プライマーを用いた PCR および単離したべん毛の CBB/PAS 染色から各変異株の構築を確認した。取得した変異株を用いて、フラジェリン欠損によるべん毛繊維形成・運動性への影響を評価するため、べん毛染色・TEM 観察・軟寒天接種による運動性判定・動画解析による運動速度の測定を行った。また、べん毛繊維の安定性を評価するため、べん毛繊維を熱(37 ℃, 47 ℃, 57 ℃, 67 ℃)または酸(0.05 mM HCl, 0.5 mM, 5 mM, 50 mM)条件で処理し、Native-PAGE によりべん毛繊維から脱離したフラジェリンモノマーを検出した。
【結果・考察】
各フラジェリン単独発現株より単離されたべん毛繊維からは、予想される単一のフラジェリンタンパク質が検出された。また、これらのフラジェリンにおける糖鎖修飾に変化は認められなかった。軟寒天培地への接種・顕微鏡観察による運動性試験の結果、フラジェリン単独発現株の運動性が確認され、移動速度についても野生株との間に明確な差異はみられなかった。以上より、FliC1 と FliC2 はべん毛の繊維形成および運動性の観点からは同等であることが示唆された。また、べん毛繊維の安定性評価より、BKN88 は 2 種のフラジェリンでべん毛繊維を構成することで繊維の安定性を向上させていることが示唆された。現在、野生株のべん毛繊維における FliC1/2 の局在について解析を進めている。

Lactic acid bacteria, flagella, motility

講演番号：2A08p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ センター2 号館 A08 会場

In vitro 再構成系を用いたグルタミン酸生産菌 *Corynebacterium glutamicum* 由来 PDH-ODH 複合体の解析
In vitro characterization of the PDH-ODH heterocomplex in *Corynebacterium glutamicum*
○近藤 直子[1]、衣川 寛知[1]、小峰（阿部） 理乃[1]、西山 真[1,2]、古園 さおり[1,2,3]（[1]東大・生物工学セ、[2]東大・微生物連携機構、[3]理研 CSRS）
○Naoko KONDO[1], Hirokazu KINUGAWA[1], Ayano KOMINE-ABE[1], Makoto NISHIYAMA[1,2], Saori KOSONO[1,2,3] ([1]BRC, UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]RIKEN-CSRS)

ピルビン酸脱水素酵素（PDH）及び 2-オキソグルタル酸脱水素酵素（ODH）は 3 つのサブユニット（E1, E2, E3）で構成される巨大な酵素複合体である。複合体の核となる E2 は触媒ドメインで三量体を形成し、サブユニット結合ドメイン（PSBD）を介して E1 及び E3 と相互作用する。一般に PDH と ODH は独立した複合体だが、グルタミン酸生産菌 *Corynebacterium glutamicum* では E1p（PDH の E1）と E1o（ODH の E1）が唯一の E2 を介して共局在し、さらに E1o がエキストラな E2 触媒ドメインを有するというユニークな特徴を持つ。本研究では、グルタミン酸生産の鍵酵素でありユニークな特徴を持つ *C. glutamicum* PDH-ODH ヘテロ複合体の活性調節メカニズムの解明を目指し、*in vitro* 再構成系を用いて複合体のサブユニット組成とサブユニット間相互作用の解析を行った。

C. glutamicum の E1o 及び E2-E3 部分複合体を大腸菌組換えタンパク質としてそれぞれ調製した。E1o をゲル濾過クロマトグラフィーに供した結果、三量体及び六量体と推定される 2 つのピークが得られた。これらの E1o 画分と E2-E3 画分を混合すると ODH 活性が再構成されたことから、いずれの E1o も機能を維持した多量体であると考えられた。*C. glutamicum* ライゼートを用いたスクロース密度勾配超遠心分析で、E1o は E2 とは独立して高分子側に沈降する結果が得られており（衣川ら、2019 農化大会）、E1o がホモ多量体を形成することが *in vivo* と *in vitro* で示された。一般に E1 は二量体をとることが知られているが、*C. glutamicum* の E1o は三量体形成に関わる E2 触媒ドメインを持つことから、これを介して三量体または六量体（dimer of trimer）構造をとると考えている。また、共精製で得られた E2-E3 部分複合体は、ゲル濾過クロマトグラフィーによる推定分子量から 6 つの E2（two E2 trimers）と 8 つの E3（four E3 dimers）より構成されると考えられた。以上より、*C. glutamicum* PDH-ODH ヘテロ複合体の輪郭が徐々に明らかになりつつある。

一方、当研究室におけるアシローム解析で E2 の PSBD 内に位置するリジン残基（K391）のアセチル化が見出されており、K391R 変異株ではグルタミン酸生産量が増加する（阿部ら、2016 農化大会）。K391 変異体では E2 に対する E3 の結合能が低下していたことから、K391 は E2-E3 間相互作用に重要であることが明らかとなった。PSBD には E1 も結合するため、K391 変異が E2-E1 間相互作用にも影響するかどうか、現在検証を進めている。

Pyruvate dehydrogenase, 2-Oxoglutarate dehydrogenase, Corynebacterium glutamicum

講演番号：2A08p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ センター2 号館 A08 会場

放線菌の環状及び線状プラスミドの接合伝達機構解析
Conjugation system of circular and linear plasmids in *streptomyces*
○深田 悠太[1]、田中 咲希[1]、池田 治生[2]、片岡 正和[1] ([1]信州大院・生命医工、[2]北里大・北里生命科学研)
○Yuta FUKADA[1], Saki TANAKA[1], Haruo IKEDA[2], Masakazu KATAOKA[1] ([1]Shinshu Univ., [2]Kitasato Univ.)

【背景】
放線菌 *streptomyces* 属からは数多くのプラスミドが発見されており、それらは環状の構造を有するものと真核生物の染色体に見られるような線状構造を有するものの 2 つに大別される。これらのプラスミドは大腸菌の F 因子などとは異なる様式で複製され、さらに伝達の際に繊毛を形成することも無い。*streptomyces* 属由来の環状及び線状プラスミドには機能的に類似する配列が確認されているものの、その接合伝達機構には相違点が多く存在している。本研究ではこれらの接合伝達に関与するとされる配列と蛋白質に着目し、環状及び線状プラスミドの接合伝達機構の包括的理解を目的とした。
【結果と考察】
両形態のプラスミドのモデルとして、環状の pSN22 及び線状の SAP1 を用いた。*streptomyces* 属環状プラスミドの接合伝達において重要な役割を担うと考えられている遺伝子座は、*traR, traB, traA, clt, spdB* の５つである。これらの内、*traB* は菌糸間の伝達に、*traA*、*spdB* は菌糸内のプラスミドの拡散に寄与することが判明している。さらに TraB がシス因子である *clt* に結合することで接合伝達が開始されることが明らかになっている。加えて本研究では *traB* と *clt* のみを異なるプロモータ支配下に組み込んだ環状プラスミドが、効率の低下こそ見られたものの十分な伝達が確認されたことから、*traB* 及び *clt* が環状プラスミドの接合伝達における最小領域であると結論付けた。
線状プラスミド SAP1 の接合伝達においては、*traA*、*traB*、*ttrA* の３つの遺伝子領域が必要であると考えられている。*traA*、*traB* は環状プラスミドのものと機能的に類似しており、それぞれ菌糸間伝達と菌糸内の拡散に関与している。*ttrA* はほぼ全ての *streptomyces* 属由来線状プラスミドに類似する配列が確認されているため、接合伝達において重要な役割を持つと考えられていた。よって本研究では、*ttrA* 及びコードされる蛋白質が線状プラスミド接合伝達に与える影響を確認した。結果として、*ttrA* を保有しない線状プラスミドは接合伝達効率が著しく低下し、さらに *ttrA* がコードする蛋白質の生成を停止させた場合も同じく伝達効率の低下が見られた。したがって線状プラスミドの接合伝達は *ttrA* が不可欠であり、菌糸間伝達を担う *traB* との相互作用によって接合伝達が引き起こされていると考えられる。

Conjugation,, Plasmid, Streptomyces

発表責任者：片岡正和（mars@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2A08p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ センター2 号館 A08 会場

Streptomyces rochei 7434AN4 株の線状ゲノムの全塩基配列決定とその解析
The genome sequence of Streptomyces rochei 7434AN4, which carries a linear chromosome and three characteristic linear plasmids

ヨシ ニンディタ [1,2]、○稲田 晋宣 [3]、曹 志生 [1]、アミルディン アクマド ファウジ [1]、手島 愛子 [1]、見崎 裕也 [2]、ルクマン ムスリミン [1]、楊 英杰 [1]、志波 優 [4]、吉川 博文 [5]、田上 道平 [6]、レジャバ アレキサンダー[6]、石川 淳 [7]、黒田 誠 [7]、関塚 剛史 [7]、木梨 陽康 [1]、荒川 賢治 [1,2] ([1] 広島大院・先端研、[2] 広島大院・統合生命、[3] 広島大・自然科学センター、[4] 東農大生命科学、[5] 東農大農、[6] 理研、[7] 国立感染研)

Yosi NINDITA[1,2], ○Kuninobu INADA[3], Zhisheng CAO[1], Amirudin Akhmad FAUZI[1], Aiko TESHIMA[1], Yuya MISAKI[2], RUKMAN MUSLIMIN[1], Yingjie YANG[1], Yuh SHIWA[4], Hirofumi YOSHIKAWA[5], Michihira TAGAMI[6], Alexander LEZHAVA[6], Jun ISHIKAWA[7], Makoto KURODA[7], Tsuyoshi SEKIZUKA[7], Haruyasu KINASHI[1], Kenji ARAKAWA[1,2] ([1]Grad. Sch. AdSM, Hiroshima Univ., [2] Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ., [3]N-BARD, Hiroshima Univ., [4]Fac. Life Sci., Tokyo Univ. of Agric., [5]Tokyo Univ. of Agric., [6]RIKEN, [7]National Institute of Infectious Diseases)

【目的】 放線菌 *Streptomyces rochei* 7434AN4 株は抗生物質ランカサイジン（LC）、ランカマイシン（LM）を生産する。また本菌は 3 つの線状プラスミド（pSLA2-L、M、S）を保持している。この 3 つの線状プラスミドの全塩基配列から、これらの抗生物質の生産遺伝子がプラスミド上にコードされていることが明らかとなっている。また本菌の染色体の線状構造の維持に pSLA2-L および pSLA2-M の *tap-tpg* 遺伝子が必須であることを明らかにした。このような染色体とプラスミドのクロストークは興味深く、本菌の染色体やプラスミドの構造相関性などの詳細解析を目的とし、*S. rochei* 7434AN4 株の染色体の全塩基配列を決定した。今回、全塩基配列を決定し、染色体上の構造遺伝子について解析した結果を報告する。

【方法および結果】 *S. rochei* 7434AN4 株の染色体の全塩基配列を決定した結果、全長 8,364,802 bp、G+C 含量は 71.7%で構成されており、7,568 個の ORF、67 個の tRNA、21 個の ECF ファミリーを含む 57 個のシグマ因子が確認された。*Streptomyces* 属放線菌の多くは、rDNA 遺伝子を 6 コピー持っているとされるが、本株は 7 コピー存在していた。CRIPRs finder を用いて、CRISPR アレイを検索したところ 2 箇所確認され、その近辺に CRISPR-associated protein（*cas*）が存在していた。*Streptomyces* 属放線菌の染色体は線状構造をしていることで知られているが、線状構造の維持に必要な末端繰返し配列（TIR）長さは、53,892 bp で、線状構造の末端の複製に必要とされる Telomere-associated protein をコードする *tap* 遺伝子と terminal protein をコードする *tpg* 遺伝子は染色体上には、機能を持つような完全な状態で保存されていなかった。

二次代謝に関連する構造遺伝子を検索した結果、ゲノムマイニングで取得した 28 員環ポリエン抗生物質ペンタマイシン生合成遺伝子を含めた polyketides (PKS)クラスター、non-ribosomal peptides (NRPS) クラスター、PKS-NRPS ハイブリッドクラスターの他に、シデロフォア、ランチバイオティック、カロテノイドを含めたテルペンなどの生合成遺伝子やアゾキシアルケン KA57-A が存在していた。この他にこれまでに本菌では確認されていない二次代謝産物の生合成に関連する遺伝子クラスターを含む総計 35 の二次代謝生合成遺伝子クラスターの存在が確認された。

【公表論文】 Yosi et. al., *Scientific Reports*, vol. 9, pp. 10973-1-10973-11.

Streptomyces , genome sequence, linear genome

講演番号：2A09a01
講演日時：3 月 26 日 09:30～ センター2 号館 A09 会場

ユニークな自家熱型高温好気消化プロセスにおける動態変化解明のためのショットガンメタゲノミクス解析

Shotgun metagenomics analysis of unique autothermal thermophilic aerobic digestion process

○石田 夏美、河野 祥尚、田代 幸寛、酒井 謙二（九大院・生資環）
○Natsumi ISHIDA, Yoshihisa KAWANO, Yukihiro TASHIRO, Kenji Sakai (Grad. Sch. Bioresour. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ.)

【背景・目的】　自家熱型高温好気消化(ATAD)プロセスは衛生的かつ経済的な汚水処理法の一つである。福岡県築上町の ATAD プロセスは約 3 週間の消化期間中、理化学的動態や細菌群集構造が 3 段階で劇的に変化すること、アンモニア態窒素濃度が一定で硝酸は全く検出されないという特異的な理化学的動態を示すことが、これまでに報告されている。本研究ではこのユニークな ATAD プロセスにおけるメタゲノミクス解析を行い、プロセスの進行に伴う機能性遺伝子の変動について検討を行った。
【実験手順】　福岡県築上町液肥製造施設より ATAD プロセスにおける細菌群集構造変化の 3 フェーズから代表的試料(原料：0 日目、1st：1 日目、2nd：3 日目、3rd：9 日目)を採取し、DNA 抽出・DNA 断片化を行った後、Illumina Miseq (Illumina Inc, USA)に供してショットガンメタゲノミクス解析を行った。得られた配列情報は Illumina Basespace のアプリケーションを用いてデータ処理を行い、MG-RAST、SEED subsystems、Refseq、Blastn、Uniprot、KEGG を用いて特に窒素代謝、有機酸代謝及び細胞溶解/相互作用系の機能遺伝子に着目して解析を行った。
【結果】　全機能性遺伝子の分類では、「休眠・芽胞形成」、「芳香族化合物代謝」、「二次代謝」に関連する遺伝子の存在比が経時的に上昇し、「ファージ、プロファージ、転移因子、プラスミド」に関連する遺伝子の存在比が減少した。また、嫌気条件で稼働するバイオガスプラントの既報データと比較した場合(Luo. G et al., 2016)、詳細な細菌群集構造は全く異なるにもかかわらず各分類群の存在比は概ね類似しており、いずれでも「タンパク質代謝」、「炭化水素」、「アミノ酸と輸送」などの存在比が高いことが示された。

窒素代謝経路の遺伝子構成においては、硝化プロセスにおける亜硝酸生成系の酵素遺伝子が存在しないため硝酸が生成しないと考えられた。また、アンモニア生成系ではグルタミン酸分解(Glutamate dehydrogenase)の寄与が大きいと考えられ、それぞれのフェーズで優占する *Bacteroides* 属、*Acinetobacter* 属、*Longimicrobium* 属に近縁な *Gemmatimonas* 属がコードしていることからも支持された。

細胞壁溶解関連遺伝子はそれぞれのフェーズで優占な *Bacteroides* 属、*Acinetobacter* 属、*Sphingobacterium* 属、*Gemmatimonas* 属がコードしており、各フェーズの細菌群集構造遷移に寄与していると考えられた。またバクテリオシンの一種である Colicin 生成遺伝子が 1st フェーズで優占となる *Acinetobacter* 属と *Arcobacter* 属がコードしており、Proteobacteria 門の増殖抑制/死滅に寄与していることが示唆された。

Autothermal thermophilic aerobic digestion (ATAD), Shotgun Metagenomics, Bacteriolysis

発表責任者：石田夏美（doumyouziko@gmail.com）

講演番号：2A09a02
講演日時：3 月 26 日 09:41～ センター2 号館 A09 会場

ヒト毛髪に付着する細菌群集構造の形成因子の解明
Elucidation of formation factor of bacterial community structure on human scalp hair
○渡辺 康太[1]、西 英二[2]、田代 幸寛[1]、酒井 謙二[1] ([1]九大院・生資環、[2]大分科捜研)
○Kota WATANABE[1], Eiji NISHI[2], Yukihiro TASHIRO[1], Kenji SAKAI[1] ([1]Grad. Sci Bioresour. Bioenviron.Sci. Kyushu. Univ., [2]Oita. Pref. Police. HQ.)

【背景・目的】
人体には多くの細菌が存在し、部位により多様な細菌群集構造を形成している。我々はこれまでに、ヒト毛髪の各部位および毛根について、SEM による表面付着細菌の観察、qPCR 法による細菌数計測、次世代シーケンサーによる群集構造解析を行なってきた（Watanabe et al., Microbes Environ, 2019）。その結果、全被検者に一定数の細菌が存在し、主要細菌が共通することから、毛髪固有の常在細菌の存在が示された。一方で、毛髪細菌群集構造の多様性は個々人で異なることも示された。本研究では、更に例数を広げた対象者について、詳細にヒト毛髪付着細菌の群集構造解析と生活習慣に関するアンケートを同時に実施し、群集構造が異なる要因を検討した。
【方法】
被験者 109 名(男性 47 名、女性 62 名)から 3 本ずつ毛髪試料の採取を行うとともに、被検者情報・毛髪ケアに関するアンケート調査を行った。採取した毛髪試料から細菌 DNA を抽出し、qPCR 法にて毛髪 1 cm^2 当たりの 16S rRNA 遺伝子コピー数を定量した。さらに、次世代シーケンサーによる 16S アンプリコン解析を行った。シーケンスデータは USEARCH、QIIME にて細菌群集構造を解析した。
【結果】
qPCR 法によるコピー数計測の結果、毛髪 1cm^2 当たり 3.4(±7.7)×10^5 copies が確認された。細菌群集構造解析の結果、主要細菌門は全ての毛髪試料に共通して Proteobacteria、Actinobacteria、Firmicutes 門であった。Weighted Unifrac distance を用いたβ多様性解析の結果、被検者間よりも個人内でプロット間の距離が有意に小さく、細菌群集構造が類似することを確認した。同一被検者サンプルを平均後、Enterotyping にてクラスター分類した結果、被検者間で 2 つのクラスターを形成した。次に、細菌属レベルで各クラスター形成に影響する因子を解析した結果、*Pseudomonas* 属、*Cutiabcterium* 属細菌が主要因子として浮かび上がった。現在、アンケート調査を基に、被検者の生活習慣や毛髪ケアがクラスター形成に与える影響について解析中である。

Human hair, Bacterial community structure, Miseq

発表責任者：酒井 謙二（kensak@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：2A09a03
講演日時：3 月 26 日 09:52～ センター2 号館 A09 会場

アクネ菌 16S rRNA 遺伝子を利用した個人識別法の開発

Development of owner identification method using the 16S rRNA gene of Cutibacterium acnes

○楊 佳約[1]、月見 友哉[1]、吉川 実亜[1]、鈴木 健大[2]、武田 知己[1]、冨田 勝[1]、福田 真嗣[1] ([1]慶大・先端生命研、[2]理研)
○Jiayue Yang[1], Tomoya Tsukimi[1], Mia Yoshikawa[1], Kenta Suzuki[2], Tomoki Takeda[1], Masaru Tomita[1], Shinji Fukuda[1] ([1]Keio Univ. IAB, [2]RIKEN)

ヒトの皮膚には多種多様な皮膚細菌が生息して宿主であるヒトと相互作用し、宿主ごとに特徴的な皮膚細菌叢を形成している。これまでの研究から、このような個人特異的な皮膚細菌叢を用いて所有物の持ち主を同定できる可能性が示唆されていた。しかしながら、皮膚は常に外界に晒されている環境であるため、外部からの細菌の混入による識別精度の低下や、長期的な安定性の低下などが課題となっていた。本研究では、主要な皮膚常在菌の一種であり、現代人の皮膚から共通して検出されるアクネ菌(*Cutibacterium acnes*)の 16S rRNA 遺伝子の一塩基多型のパターン（リボタイプ)に着目し、それを用いた個人識別方法の開発を試みた。皮膚には異なるリボタイプのアクネ菌が多種類存在することが示唆されていたことから、まず本研究では皮膚細菌叢からアクネ菌の 16S リボソーマル RNA 遺伝子における可変領域のみを特異的に増幅する PCR 法及び次世代シーケンサーで解析する方法を開発した。次世代シーケンサーを用いて皮膚細菌叢中のアクネ菌リボタイプの網羅的な解析を実施したところ、個人の両手とそれぞれの持ち物表面に付着したアクネ菌リボタイプは類似性が高く、皮膚細菌叢よりも長期に安定であることを見出した。次に、ランダムフォレスト機械学習法を用いて、得られたアクネ菌リボタイプ情報から個人識別や所有者識別を行うための判別器を作成したところ、アクネ菌リボタイプのみで約 80%、皮膚細菌叢情報も合わせると 90%以上の正答率が得られた。これらのことから、皮膚常在のアクネ菌リボタイプ情報を活用することで、個人識別や持ち物の所有者識別が可能になると考えられる。近年の科学技術の進歩により、指紋認証などの従来の個人識別法とは異なる新しい個人識別方法の開発が求められている。本研究成果を応用することで、指紋では判別できないような状況においても、極僅かに残されたアクネ菌遺伝子を PCR 法により増幅し、アクネ菌リボタイプに基づく判別器を用いることで、犯罪捜査などにおける新たな個人識別法や持ち物の所有者識別法の開発につながることが期待される。

Cutibacterium acnes, 16S rRNA genotype, owner identification

講演番号：2A09a04
講演日時：3 月 26 日 10:03～ センター2 号館 A09 会場

森林土壌での樹木根分解に関与する微生物群集構造の解析
Analysis of microbial community structure related to tree root decomposition in forest soil
○石山 菜々子[1]、堀沢 栄[1]、酒井 佳美[2] ([1]高知工科大学、[2]森林研究・整備機構森林総合研究所)
○Nanako ISHIYAMA[1], Sakae Horisawa[1], Yoshimi Sakai[2] ([1]Kochi Univ. Tech., [2]FFPRI)

立木の 2～3 割程度の体積を占めるといわれる樹木根には、地球温暖化対策の一助になるとされる炭素貯蔵機能や、根の支持力による土壌流出防止機能、また地下生態系において住処・栄養供給などの森林の多面的機能を持ち、樹木根の枯死後も分解されるまではこれらの機能を持続する。したがって、樹木根の分解過程を解明することはこれらの機能の持続性を評価する上で重要となる。地上での木材分解についてはシロアリなどの昆虫や木材腐朽菌による食害が大きな影響をもたらすが、地下において分解の環境要因やその期間を示す研究成果はほとんどない。本研究では、土壌の深さ方向での樹木根の分解過程の解明の一端として、森林土壌での樹木根分解における土壌深さ別の真菌・バクテリアの群集構造の探索を行った。

試料としてスギ *Cryptomeria japonica* を用い、直径幅 3cm、長さ 20cm の四割材を根の擬似的試料として使用し、全国 5 箇所（群馬県・茨城県・京都府・熊本県・鹿児島県）の地表（深さ 0cm)、地下（5-10cm、20-30cm）に半年または 1 年埋設した後、引き上げられた。今回の試料において、まだ腐朽は進行していなかった。これらの試料をハンマーミルで粉砕し、ISOPLANTⅡ（ニッポンジーン）または QIAGEN Genomic-tip 20/G（QIAGEN）を用いて木材内部微生物 DNA を抽出した。その後、MightyAmp DNA Polymerase (TaKaRa)を用い、ITS 領域で真菌検出、16S 領域でバクテリアを検出した。得られた PCR 産物を Miseq (ilumina)でシークエンスし塩基配列を決定し、BLAST データベースと照合することによって生物種を同定した。
結果、真菌において 290 属、バクテリアにおいて 169 目が同定された。サンプルのもつ微生物群衆構造について、nMDS（Non-metric Multidimensional Scaling）で解析した結果、腐朽初期段階ではサンプルごとに多様な微生物群が存在し、その違いには試験地、特に気温による影響が大きいことが示唆された。特に、寒冷地である群馬県試料では他試験地に比べて真菌・バクテリアともに種数および Shannon wiener index による多様度が低く、真菌ではヒロヒダタケ属 *Megacollybia*、バクテリアでは *Bacilli* に偏った群集が見られた。
本研究は JSPS 科研費 JP12345678 基盤研究（B）(19H03012)の助成を受けた。また、京都大学 徳地直子先生、日本大学 上村真由子先生、鹿児島大学 鵜川信先生、 森林総研 伊藤優子氏に試料提供およびデータ解析でご協力いただいた。

fungal community, bacterial community, decomposition of tree roots

発表責任者：堀沢　栄（horisawa.sakae@kochi-tech.ac.jp）

講演番号：2A09a05
講演日時：3 月 26 日 10:14～ センター2 号館 A09 会場

地盤改良工法における丸太の劣化に関連する微生物の検討

Detection and identification of microbes related to deterioration of log used in a ground improvement method

○岡野 大輝[1]、堀沢 栄[1]、原 忠[2] ([1]高知工科大、[2]高知大教育研究部)
○Daiki Okano[1], Sakae Horisawa[1], Tadashi Hara[2] ([1]Kochi Univ. Tech., [2]Kochi Univ.)

地震が頻繁に起こる日本では、軟弱な地盤で起こる液状化現象は深刻な問題である。液状化対策のひとつとしてコンクリートや丸太の打設による地盤の改良があげられる。中でも丸太を用いる丸太打設液状化対策＆カーボンストック工法(LP-LiC)は、環境親和性のある材料の使用、森林資源の活用、炭素貯蔵効果などの利点がある。LP-LiC 工法においては、丸太の耐久性評価が重要である。木材の屋外利用における劣化要因は、生物による腐朽や蟻害、日光や風雨による劣化、摩耗などが考えられる。LP-LiC 工法における丸太は地中に埋設されることから、通常の屋外利用とは異なる環境に暴露されることとなる。本研究では、建築構造物の基礎として埋立地盤中に埋設された丸太の劣化を評価するために、丸太周辺の土壌を深さ方向や性質ごとに採取し、微生物の検出および土壌の成分分析を行った。

青森県八戸市の漁港施設に杭基礎として約 50 年間埋設されていた丸太および丸太表面付近に存在している土壌を試料として用いた。丸太は全４本(全長約 4000cm～4400cm)、地表(0mm)から深さ約 1300mm～1700mm に丸太の元口が最上部となるように設置されており，これらを重機を使用して引き抜いた。これらの丸太には、切り口に物理的な損傷による劣化が観察されたほかは、大きな腐朽箇所は見られなかった。各丸太の表面に付着していた土壌を最上部、中腹部、最下部より、また周辺土壌を深さ別に採取した。これらの土壌試料をハンマーミルで粉砕し、Extrap Soil DNA kit Plus ver.2(日鉄環境)を用いて土壌内部微生物 DNA を抽出した。抽出した DNA をテンプレートとして、MightyAmp DNA Polymerase(TaKaRa)を用いて 16S rDNA を増幅することでバクテリアを検出した。得られた PCR 産物の塩基配列を解析し、生物種を同定した。

microbial community, soil analysis, biodegradation of wood

発表責任者：堀沢　栄（horisawa.sakae@kochi-tech.ac.jp）

講演番号：2A09a06
講演日時：3 月 26 日 10:35～ センター2 号館 A09 会場

Comparison of novel genome sequences reveal gene recruitment mechanisms of catabolic genes among nine diverse carbazole-degrading bacteria.

○ Felipe VEJARANO[1], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1,2], Yoshiyuki OHTSUBO[3], Masataka TSUDA[3], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1,2] ([1]BRC, UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Tohoku University)

[Background and objective] Carbazole-degrading bacteria rely on a Rieske-type no-heme iron oxygenase carbazole 1,9a-dioxygenase to initiate carbazole dioxygenation to ultimately convert it into tricarboxylic acid intermediates. Typical genes for this dioxygenase and subsequent catabolic enzymes are found together forming the *car* gene cluster, which exists near dioxygenase genes for the degradation of the intermediate anthranilate. We recently obtained the complete genome sequences of the marine bacteria *Erythrobacter* sp. KY5, *Thalassococcus* sp. S3 and *Hyphomonas* sp. KY3, which carry the novel *Caulobacteridae*-type *car* gene cluster and have rare anthranilate-coenzyme A (*aca*) gene clusters for anthranilate degradation. As typical *car* gene clusters, sequence analysis suggests a horizontal gene transfer scenario for the acquisition of *Caulobacteridae*-type *car* gene cluster. By obtaining complete genome sequences of carbazole degraders from other environments, we aimed to investigate whether there is a common recruitment route with conserved mobile genetic elements (MGE) involved in the acquisition and diversification of *Caulobacteridae* and other types of *car* gene clusters.
[Methods] Illumina's mate pair and PCR-free libraries were used to obtain the genome sequences of 6 strains carrying the other known types of *car* gene clusters: *Pseudomonas*-type (*Marinobacterium georgiense* IC961 and *Acinetobacter johnsonii* IC001), *Sphingomonas*-type (*Novosphingobium* sp. KA1 and *Sphingomonas* sp. IC081) and *Nocardioides*-type (*Nocardioides aromaticivorans* IC177 and *Nocardioides* sp. S5). Genome assembly finishing was accomplished manually using GenoFinisher and AceFileViewer. Sequence comparison was done with BLAST and repeat elements analysis for identification of novel MGE was done using UGENE.
[Results] Several routes for the recruitment of *car* genes are suggested by our analysis, and in each of them clade specific MGE seem involved. In its ancestral state, the *Pseudomonas*-type *car* gene cluster can be recruited from individual acquisition of *car* gene modules harbored in distinct plasmids. These *car* gene modules seem to be mobilized between plasmids and chromosomes via the conserved insertion sequence (IS) *ISPpu12*. *Sphingomonas*-type *car* genes are restricted to plasmids predicted to be conjugative, on one conserved transposon-like region that carries all the catabolic genes. The novel *ISNar1*, identified ab initio from repeats analysis, seems to be involved in the recruitment and rearrangement within the chromosome of *Nocardioides*-type *car* gene clusters, and current evidence shows that this IS is exclusive of Gram-positive bacteria. Finally, remains of a conjugative transposon suggest the recruitment mechanism of *Caulobacteridae*-type gene clusters.

Carbazole degradation, Comparative genomics, Rieske non-heme iron oxygenase

発表責任者：Nojiri Hideaki（anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A09a07
講演日時：3 月 26 日 10:46～ センター2 号館 A09 会場

軽油分解メタン発酵には多様な嫌気的アルカン分解酵素が関与する

Involvement of diverse alkylsuccinate synthases in anaerobic alkane degradation under methanogenic condition

○竹田 玲奈[1]、棚橋 優花[2]、伏屋 里茄子[2]、中村 浩平[2] ([1]岐大自科技研、[2]岐大応生)
○Reina TAKEDA[1], Yuka TANAHACHI[2], Rikako FUSEYA[2], Kohei NAKAMURA[2] ([1]Gifu Univ. Grad. Sch. NST, [2]Gifu Univ. Fac. ABS)

原油は世界で最も消費されている一次エネルギーで，その需要は拡大し続けている．その原油の回収率を高めるために残存原油をメタン発酵し，エネルギーとして回収する方法が提唱されている．この原油メタン発酵の鍵と考えられる，*n*-アルカン(原油主成分)を分解するアルカン分解菌とメタン生成アーキアの共生系が様々な原油汚染環境や原油メタン発酵環境から報告されている．嫌気的アルカン分解(以下 AAD)には，アルカンにフマル酸を付加するアルキルスクシネート合成酵素(Ass)が関与する．いくつかの AAD 分離株やメタゲノム情報由来の AAD 菌が有する Ass のオペロン構造は多様であり，オペロン内遺伝子の機能や嫌気的アルカン分解への関与は不明である．しかしながら，Ass オペロンの中でも触媒サブユニットと考えられる AssA は，AAD 菌の指標酵素(遺伝子)として認識されている．本研究では軽油メタン発酵系を構築し，メタゲノム解析から AAD 菌の Ass オペロンの探索を行った．

新潟市内の原油湧出地から底泥試料を採取し，無機塩培地に嫌気的に植菌した．軽油添加系(A と B)と非添加系を構築し，暗所 30℃にて静置培養を行った．軽油添加系では継続的なメタン生成が確認された．A から培養 560 と 868 日目，B から 1022 日目に DNA を抽出し，Miseq によるメタ 16S 解析とメタゲノム解析を行った．その結果 A，B ともに，AAD 菌と考えられる *Proteobacteria* 門の *Smithella* 属細菌と *Syntrophaceae* 科細菌が優占することが明らかとなった．A では培養期間を通して *Smithella* 属細菌が優占し，560 日目では *Syntrophaceae* 科細菌も存在したが，868 日目では *Syntrophaceae* 科細菌はほとんど見られなかった．一方 B では，*Syntrophaceae* 科細菌が優占した．

また，軽油中 *n*-アルカン組成の変化を経時的に観察した．A と B のアルカン組成変化を比較したところ，A では培養初期において短鎖 *n*-アルカン(*n*-C_8～*n*-C_{11})が減少したが，培養 228 日目以降でその減少は停滞し，長鎖 *n*-アルカン(*n*-C_{16}～*n*-C_{26})が減少した．また，B では短鎖アルカンの減少が顕著だった．したがって，A の *Smithella* 属細菌は長鎖 *n*-アルカンを，B の *Syntrophaceae* 科細菌は短鎖 *n*-アルカンを利用する可能性が示唆された．

さらに，メタゲノム解析から *Smithella* 属細菌と *Syntrophaceae* 科細菌の Ass オペロンの取得を試みた．その結果，両細菌ともに既知の AAD 分離株の Ass オペロン構造と類似した Ass オペロンを有し，更に新規構造の Ass オペロンをも有することが明らかとなった．この新規 Ass オペロンには既知 AssA に 30～33%の相同性をもつ AssA が存在した．

以上より，*Smithella* 属細菌と *Syntrophaceae* 科細菌は，それぞれ異なる Ass を有し，利用する *n*-アルカン分子種が異なる可能性が示唆された．これは油田の残存原油のメタン発酵には，残存原油中 *n*-アルカン組成に適した AAD 菌が必要であることを示している．

metagenome, Carbon dioxide Capture and Storage, crude oil

発表責任者：竹田玲奈（y4521049@edu.gifu-u.ac.jp）

講演番号：2A09a08
講演日時：3 月 26 日 10:57～ センター2 号館 A09 会場

Serrate marcescens の二次代謝産物産生制御機構の解明に向けたゲノム解析
Genome analysis of *Serratia marcescens* for elucidation of secondary-metabolites production mechanism
○矢部 涼香、岡田 千波、村上 佳織、福島 淳（秋田県大生資科）
○Suzuka YABE, Chinami OKADA, Kaori MURAKAMI, Jun FUKUSHIMA (Akita Prefecture Univ.)

【背景・目的】日和見感染起因菌として知られる *Serratia marcescens* には、non-ribosormal peptide である赤色色素 prodigiosin と界面活性物質 serawettin W1 を 30℃で産生し、37℃では産生しない株が存在する。特に prodigiosin は抗腫瘍活性や抗菌活性などの生理活性を持ち、将来性が期待されている。prodigiosin の産生には *pig* 遺伝子クラスター、serawettin W1 の産生には *swrW* 遺伝子、そして両合成に共通して *pswP* 遺伝子が関与する。しかし、この温度依存性の二次代謝産物産生制御機構は解明されていない。本研究はこれら二次代謝産物の温度依存性を含む産生制御機構を解明するために *S. marcescens* ATCC 274 株と、研究室保存株である *S. marcescens* ATCC 274 由来株(以下 *S. marcescens* 274 株)、*S. marcescens* 274 株の変異株で温度依存性を失った *S. marcescens* Tan1 株の 3 株のゲノム解析を行い、それらの塩基配列を比較した。ここでは合成関連遺伝子配列およびその周辺領域を主に調べ、また、二次代謝産物合成遺伝子の発現制御に関与する可能性のある遺伝子の配列についても検討を行った。
【方法・結果】ゲノム解析について、*S. marcescens* ATCC 274 株は口腔常在微生物叢解析センターに依頼し、*S. marcescens* 274 株と *S. marcescens* Tan1 株は学内バイオテクノロジーセンターで解析した。*S. marcescens* ATCC 274 株のゲノム解析はロングリードシーケンサ (Nanopore)とショートリードシーケンサ(Illumina)を組み合わせ、*De novo* アセンブリ後 29 箇所の polishing の結果、5,148,533 bp の環状配列が得られた。GC 含量は 59.5%で、ORF は 4799 個であった。アノテーションにより *pig* 遺伝子クラスター、*pswP* 遺伝子、*swrW* 遺伝子、および *pig* 遺伝子クラスターと *swrW* 遺伝子に対し負の転写調節因子として働く *hexS* 遺伝子が検出された。quorum sensing 関連遺伝子は 4 つの *luxR* homologue のみ検出され、アシルホモセリンラクトン(AHL)類合成に関わる *luxI* homologue は存在しないことから、*S. marcescens* ATCC 274 株には AHL をシグナル分子とする quorum sensing 機構が存在しないと考えられた。続いて、*S. marcescens* 274 株および *S. marcescens* Tan1 株のゲノム解析のためにショートリードシーケンスを行い、*S. marcescens* ATCC 274 株の全塩基配列に対してそれぞれマッピングを行なった。*S. marcescens* 274 株では 40 箇所、*S. marcescens* Tan1 株で 34 箇所の変異が検出された(うち 8 箇所は共通であった)。アノテーション等の結果、両株から *pig* 遺伝子クラスター、*swrW* 遺伝子、*pswP* 遺伝子、*hexS* 遺伝子が検出された。現在、検出された変異と 3 株の二次代謝産物合成関連遺伝子の解析を進めている。

Serratia marcescens, prodigiosin, genome analysis

発表責任者：福島淳（jun_fukushima@akita-pu.ac.jp）

講演番号：2A09a09
講演日時：3 月 26 日 11:08～ センター2 号館 A09 会場

分裂酵母の新規胞子壁タンパク質の同定と機能解析
Identification and molecular dissection of novel spore wall proteins in fission yeast

○谷口 拓海、松崎 彩子、中村 太郎（大阪市大・院理）
○Takumi TANIGUCHI, Ayako MATSUZAKI, Taro NAKAMURA (Osaka City Univ.)

【目的】

分裂酵母（*Schizosaccharomyces pombe*）は、栄養源が枯渇すると有性生殖過程に入り、休眠細胞である胞子を形成する。胞子は、熱や有機溶媒などのストレスに対し強い耐性を持つ。そのような特徴を持つ一方で、胞子にどのようなタンパク質や代謝産物が含まれているかは不明な点も多い。中でも、胞子の最外層に位置し、ストレス耐性に大きく関与する胞子壁に着目した。これまで胞子壁を構成するタンパク質についてはほとんどわかっていない。本研究は、胞子壁の構成タンパク質の同定と機能解析を通して、胞子に特徴的なストレス耐性のメカニズムを明らかにすることを目的とする。

【方法と結果】

胞子壁を構成するタンパク質を同定するため、まず胞子に含まれるタンパク質を、LC-MS を用いてプロテオーム解析を行った。その結果、100 のタンパク質を同定した。その中から、栄養増殖時に発現しているタンパク質［1］を除き、胞子に特異的に検出された 34 のタンパク質を同定した。このうち、12 のタンパク質については、膜貫通ドメインやシグナル配列、GPI アンカーなどの膜や壁に関係するドメインを有していることから、胞子壁に局在する可能性が高いと考え、さらに解析をすすめた。これらのタンパク質の局在、および遺伝子破壊株の形質について調べた結果を報告する。

［1］Carpy et al., Mol Cell Proteomics. 13(8), 1925-1936 (2014)

yeast, spore, cell wall

講演番号：2A09a10
講演日時：3 月 26 日 11:19～ センター2 号館 A09 会場

放射線抵抗性細菌デイノコッカス・ラジオデュランスの DNA 修復機構の正確性に関する比較ゲノム解析

The comparative genomic analysis on the accuracy of DNA repair mechanism in the radioresistant bacterium Deinococcus radiodurans

○三善 英彦[1,2]、佐藤 勝也[2]、大野 豊[2]、鳴海 一成[1] ([1]東洋大学大学院・生命科学研究科、[2]量子化学研究開発機構・高崎量子応用研究所)
○Toshihiko SANZEN[1,2], Katsuya SATOH[2], Yutaka OONO[2], Issay NARUMI[1] ([1]Grad. Sch. Life Sci., Toyo Univ, [2]QuBS, QST Takasaki)

自然界には、他の生物にとって致死的効果あるいは変異原性を示す放射線に対して極めて耐性を示す細菌が存在し、放射線抵抗性細菌と呼ばれている。放射線抵抗性細菌の代表菌種であるデイノコッカス・ラジオデュランスの高い放射線耐性は、放射線照射で生じた DNA 損傷を効率的かつ正確に修復する能力に優れていることに起因している。これまでに、ラジオデュランスの DNA 修復能が欠損した変異株から DNA 修復欠損の責任遺伝子を同定する研究や、遺伝情報を利用して DNA 修復関連遺伝子の破壊株を作製しその特性を解析するといった研究を行ってきた。その結果、他の生物でも広く保存されている DNA 修復遺伝子、並びに他の生物種からは発見されていない新規 DNA 修復関連遺伝子を同定し、ラジオデュランスには既知の DNA 修復機構を備えつつ、当該菌に特有の DNA 修復機構を兼ね備えることで効率的な DNA 修復を行っていることを明らかにしてきた。一方、ラジオデュランスの DNA 修復機構の正確性については、抗生物質に耐性を示す突然変異株の出現頻度が DNA 損傷量に依存せずに一定であるという英国のグループの実験結果に基づき、DNA 修復機構が極めて正確であるという議論が 1970 年代になされている。しかしながら、抗生物質耐性は必須遺伝子の特定の部位に起こった点突然変異に起因するため、必須遺伝子内の塩基に欠失変異や挿入変異が起こった場合は致死となり、突然変異として検出できない。したがって、ラジオデュランスの DNA 修復機構の正確性については、十分に解明されているとは言いがたい。本研究では、従来の遺伝子レベルの視点とは異なりゲノム全体を俯瞰した視点によって、放射線で誘発される突然変異の特徴を解析し、ラジオデュランスが有する極めて効率的な DNA 修復機構の全容を解明することを目的とする。そこで、ラジオデュランスに放射線を照射後、生存・増殖した菌体を対象として、次世代シーケンサーを用いて得られた DNA 塩基配列情報を基に網羅的な比較ゲノム解析を行うことで、正確に修復されずゲノム上に蓄積された突然変異を検出することができるのではないかと考えた。さらに、相同組換え修復及び伸長合成依存的鎖対合に係わる RecA タンパク質や凝集核様体依存的末端結合修復に関与する PprA タンパク質が欠損した変異株を用いて、放射線照射後に蓄積された突然変異を野生株と比較することで、正確な DNA 修復機構への DNA 修復タンパク質の寄与についても検証する。本発表では、ラジオデュランスの RecA 欠損株及び PprA 欠損株の作出やガンマ線に対する生存率の測定結果と共に、網羅的な比較ゲノム解析を中心にこれまで得られた解析結果について報告する。

本研究の一部は、平成 31 年度東洋大学井上円了記念研究助成を受けて実施された。

Deinococcus radiodurans

講演番号：2A09p01
講演日時：3 月 26 日 13:50～ センター2 号館 A09 会場

Shewanella oneidensis のバイオフィルム形成とシトクロム *c* 合成を制御する ECF シグマ因子の同定
Identification of an ECF sigma factor that regulates biofilm formation and *c*-type cytochrome synthesis in *Shewanella oneidensis* MR-1

○古賀 亮太、松元 陽歩、高妻 篤史、渡邉 一哉 (東京薬科大学)
○Ryota KOGA, Akiho MATSUMOTO, Atsushi KOUZUMA, Kazuya WATANABE (Tokyo Univ. Pharm. Life Sci.)

【背景と目的】電気化学活性細菌（electrochemically active bacteria, EAB）は細胞外の固体（電極や金属化合物等）と電気化学的な相互作用を行うことができる細菌であり、様々な環境に生息することが知られている。EAB は微生物燃料電池や微生物電気合成等の微生物電気化学システム(bioelectrochemical system; BES）での利用が期待されているが、EAB と電極との相互作用には関しては未だ不明な点が多い。*Shewanella oneidensis* MR-1 株は広く研究に用いられている EAB のモデルであり、流水条件下、電極表面にバイオフィルムを形成して電極との電子授受を行う（Kitayama et al. 2017. *Appl Environ Microbiol* 83:e00903-17)。しかし、電極バイオフィルムの形成やバイオフィルム内での電流生成に関与する分子メカニズムに関しては未解明な点が多い。そこで本研究は、流水条件における MR-1 株の遺伝子発現変動を解析し、バイオフィルム形成や電流生成に関与する未知の因子の同定を試みた。
【結果】電気化学フローセル（electrochemical flow cell, EFC; Kitayama et al. 2017）を用いて MR-1 株を培養し、流水および非流水条件における電極付着菌体の遺伝子発現プロファイルを比較した。その結果、流水条件下では extracytoplasmic function (ECF) シグマ因子をコードすると推定される遺伝子 SO_3096 が著しい発現上昇を示すことが明らかとなった。SO_3096 の破壊株（ΔSO_3096 株）を作製し、EFC における電流生成量を野生株と比較した結果、ΔSO_3096 株の電流生成能は野生株よりも低かった。次に流水発電条件におけるΔSO_3096 株と野生株の遺伝子発現を比較した結果、ΔSO_3096 株ではシトクロムｃの成熟因子（SO_0696）や、バイオフィルム形成に関与すると考えられる c-di-GMP 合成系遺伝子（SO_3556）など多くの遺伝子の発現量が低下していた。MR-1 株による電極への電子伝達にはシトクロムｃが関与するため、ΔSO_3096 株における電流量の低下は SO_0696 の発現低下に起因すると予想された。そこで SO_0696 の破壊株（ΔSO_0696 株）を作製して電流量を測定した結果、ΔSO_0696 株は著しい電流生成の低下を示された。また、SO_3096 の過剰発現株を作製し、ΔSO_3096 株において発現低下を示した SO_0696 などの遺伝子の発現量をレポーターアッセイすることにより、これら遺伝子の発現が SO_3096 に依存することが確認された。以上の結果から、SO_3096 は流水条件において電極表面へのバイオフィルム形成と電子伝達に関連する遺伝子の発現を包括的に制御する役割を果たしており、BES における電流生成において極めて重要な因子であることが示された。今後、SO_3096 を介して遺伝子発現を誘導する環境シグナルを同定する予定である。

shewanella, biofilm, ECF sigma factor

講演番号：2A09p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ センター2 号館 A09 会場

Shewanella oneidensis MR-1 株における電極電位応答性プロモーターの同定
Identification of electrode potential-responsive promoters in *Shewanella oneidensis* MR-1
○廣瀬 篤弥、高妻 篤史、渡邉 一哉（東薬大院生命）
○Atsumi HIROSE, Atsushi KOUZUMA, Kazuya WATANABE (Tokyo Univ. Pharm. Life Sci.)

【背景と目的】

Shewanella oneidensis MR-1 株は細胞外の電極に直接電子伝達が可能なこと、遺伝子操作が容易であることから、電気化学活性細菌 (electrochemically active bacteria; EAB) のモデル菌株として広く研究されている。我々は MR-1 株が細胞外電子伝達系と Arc system (内膜間キノンの酸化還元状態を認識する二成分制御系) によって電極の電位を認識し、異化代謝系遺伝子の発現を制御することを明らかにした (Hirose et al., 2018. Nat Commun 9:1083)。この発見は電極によって生物の代謝を遺伝子発現レベルで制御できる可能性を示唆しており、我々はこの概念を電気遺伝学として提唱している (Hirose et al., 2019. Biotechnol Adv 37:107351)。電気遺伝学を発酵生産 (電気制御発酵) に応用すれば、任意の代謝経路の活性を電極電位によって制御できるため、プロセスの高効率化につながると期待される。一方、電極電位に依存して発現が変動する遺伝子は発見されているものの、電位応答に関与するプロモーター領域は未同定であった。そこで本研究では電気遺伝学の創出に向け、電極電位応答性プロモーターとその転写調節領域の同定を行った。

【方法と結果】

電位応答性プロモーターの候補として、以前の研究で電位応答を示した MR-1 株の遺伝子 (*nqr1*)、および大腸菌において Arc system 依存的に制御される遺伝子 (*feoA*) の上流領域を選定した。これらの領域を *lacZ* の下流に含むレポータープラスミドを MR-1 の野生株 (WT) および Arc system 欠損株 (Δ*arcA*) に導入し、レポーター株を得た。これらの株を異なる電極電位 (+0.7 V と–0.4 V vs. 標準水素電極) に設定した電気化学リアクターにて培養し、β-ガラクトシダーゼアッセイに供した。その結果、*feo* プロモーター (P_{feoA}) は高電位 (+0.7 V)、*nqr1* プロモーター (P_{nqr1}) は低電位 (–0.4 V) の電極存在下で誘導されることが示された。一方、Δ*arcA* 株ではこれらのプロモーターの電位応答性が失われた。また、ArcA を用いたゲルシフトアッセイの結果、両プロモーターの周辺領域が ArcA と結合することが示された。これらの結果から、P_{feoA} と P_{nqr1} の電位応答性が Arc system に依存することが確かめられた。また、P_{nqr1} の転写調節領域を解析した結果、本プロモーターの制御に Arc system 以外の転写制御因子 (EtrA) が関与することが明らかになった。そこで EtrA の欠損株 (Δ*etrA*) における P_{nqr1} の電位応答性を調べた結果、EtrA の寄与がない場合には非誘導時のプロモーター活性を抑制できることが示された。今後は両プロモーターを利用した電気制御発酵による物質生産系の構築を目指す予定である。

Shewanella, Bioelectrochemical system, transcriptional regulation

講演番号：2A09p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ センター2 号館 A09 会場

真菌特有の bZIP 型転写因子 HapX と HapB/C/E 複合体との相互作用 ： HapX の N-末端ドメインの機能解析

Interaction between fungi-specific bZIP transcription factor HapX and HapB / C / E complex: Functional analysis of the N-terminal domain of HapX

○山下 美春、辻上 誠也、村田 俊輔、志水 元亨、加藤 雅士 (名城大農)
○ Miharu YAMASHITA, Masaya TSUJIKAMI, Shunsuke MURATA, Motoyuki SHIMIZU, Masashi KATOU (Meijo Univ.)

【背景・目的】

HapX は、我々の研究グループが CCAAT-box 結合因子（HapB/C/E 複合体）と相互作用する因子として初めて見出した真菌類に特有の転写因子である。HapX は、鉄欠乏時に鉄を含有するタンパク質の遺伝子発現を抑制するなどして、鉄の恒常性維持機構の中心的な役割を果たしている。HapX は、bZIP ドメインを有しているが、単独では DNA に結合できない。鉄欠乏時に HapX と HapB/C/E 複合体との親和性が上昇すると、鉄関連遺伝子のプロモーターに存在する CCAAT-box の TGAT 配列に協調的に結合し、転写を制御する。この時、TGAT 配列のない CCAAT-box のみを有するプロモーターには HapX は結合できないので、厳密に鉄関連遺伝子と、それ以外の HapB/C/E 依存の遺伝子の転写調節を区別できることを明らかにしている。我々は既に、アライメント解析により N-末端部分の高度に保存されたアミノ酸残基がいくつか存在する領域を HapB/C/E 複合体との相互作用ドメイン (Hap Complex Interacting Domain, HCID) と推定し、HapX と HapB/C/E 複合体との相互作用の解析を行ってきた [1)]。これにより、HCID が HapB/C/E 複合体との相互作用に必要であることを見出している。本研究では、HCID 領域において高度に保存されているアミノ酸残基に点変異を導入し、HapX-HapB/C/E 相互作用における HCID の機能の解明を目的とした。

【方法・結果】

HCID 領域に存在する高度に保存された 5 つのアミノ酸残基（40 番目のセリン、41 番目のリシン、43 番目のトリプトファン、48 番目のアルギニンおよび 53 番目のアルギニン）に対してそれぞれアラニン置換による点変異を導入した $HapX^{S40A}$ 株、$HapX^{K41A}$ 株、$HapX^{W43A}$ 株、$HapX^{R48A}$ 株および $HapX^{R53A}$ 株を取得した。
$HapX^{S40A}$、$HapX^{K41A}$ および $HapX^{W43A}$ において *ΔhapX* 株と同様に鉄制限下での生育が著しく悪くなった。この結果から、40 番目のセリン、41 番目のリシンおよび 43 番目のトリプトファンは HapX の機能に重要な働きをしていることが示された。現在、HapX の N-末端部分におけるこれらのアミノ酸残基の機能を *in vitro* で詳細に調べるため、それぞれのリコンビナントタンパク質を調製し、Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) による解析を進めている。

1）村田ら、2015 年度岡山大会農芸化学会講演要旨　講演番号: 3B41p02（2015）

transcription factor, iron homeostasis, protein-DNA interaction

発表責任者：加藤雅士（mkato@ccalumni.meijo-u.ac.jp）

講演番号：2A09p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ センター2 号館 A09 会場

Burkholderia multivorans の鉄硫黄クラスター生合成遺伝子群における転写活性化機構の解析

Analysis of Transcriptional activation involved in iron-sulfur cluster biogenesis operon in *Burkholderia multivorans*

○野々山 翔太、岸田 康平、永田 裕二、大坪 嘉行、津田 雅孝（東北大・院生命科）
○Shouta NONOYAMA, Kouhei KISHIDA, Yuji NAGATA, Yoshiyuki OHTSUBO, Masataka TSUDA (Tohoku Univ.)

鉄硫黄クラスターは様々なタンパク質のコファクターとして利用され、本クラスターを含んだタンパク質は多種多様な代謝や遺伝子の発現制御等の重要な役割を担っている。主に大腸菌を用いた解析から、鉄硫黄クラスターの生合成には複数のタンパク質が関与し、それらタンパク質をコードしている遺伝子はオペロンを形成していることが判明している。本研究でモデルとした *Burkholderia multivorans* ATCC 17616 株(以下 ATCC 17616 株)は多種多様な芳香族系化合物分解能を示す土壌細菌であり、鉄硫黄クラスター生合成オペロン(*isc* オペロン)を有している。我々のこれまでの解析で、ATCC 17616 株の *isc* オペロンは鉄濃度の変化依存的に転写変動し、この転写変動に *isc* オペロンの先頭にコードされている推定制御因子 IscR が関与すること、また、本株の IscR の生化学的解析により、好気的に精製した IscR は *isc* オペロン上流領域へ特異的に結合することを示してきた。これらの結果および、大腸菌を用いた解析によって明らかとなっている IscR は鉄硫黄タンパク質で、その鉄硫黄クラスターは酸素存在下で容易に破壊されることを踏まえると、本株の IscR が *isc* オペロンに対して果たす役割は既知の知見とは異なる新規なものである可能性が示唆された。そこで、本研究では ATCC 17616 株をモデルとして、鉄硫黄クラスターと結合していない IscR の機能解明を目的とした解析を行った。
まず、本株の *isc* オペロンの培地中の鉄に対する応答を定量的 RT-PCR 解析で検討を行った。その結果、鉄が豊富に存在する培地に鉄特異的なキレーターを添加した場合、*iscR* 及びその下流遺伝子である *iscS* の転写量がともに増加した。また、この転写変動は *iscR* 欠失変異株では観察されなかった。この結果から、この転写量の増加に IscR が関与していることが示唆された。次に、鉄硫黄クラスターとの結合に利用されると予想される 3 つのシステイン残基をアラニンに置換した IscR 誘導体(IscR-3CA)を発現するプラスミドを作製し、*iscR* 欠失株に相補したところ、*iscS* の転写量が野生株と比較して増加した。これらの結果から鉄硫黄クラスターと結合していない IscR が自身のプロモーターを活性化することが示唆された。次に、この転写活性化が直接的であるかどうか検討を行うために、IscR タンパク質を用いた In vitro transcription assay(IVTA)を行った。精製した IscR に鉄硫黄クラスターが含まれていないか確認を行った後、IVTA を行った結果、両タンパク質ともに *isc* オペロン上流プロモーターからの転写を活性化することが判明した。すなわち、本株の IscR は鉄硫黄クラスターと結合していないときに自身のプロモーターを直接的に活性化することが示唆された。

Iron-sulfur cluster, Transcriptional regulation

講演番号：2A10a01
講演日時：3 月 26 日 09:30～ センター2 号館 A10 会場

多様な土壌環境におけるアンモニア酸化微生物の群集構造解析

Community structure analysis of ammonia-oxidizing microorganisms in various soil environments

○高川 智弘、鈴木 智順（東理大・応生）
○Tomohiro TAKAGAWA, Tomonori SUZUKI (Tokyo University of Science, Department of Applied Biological Science)

【目的】　アンモニア酸化は窒素循環において重要な反応のひとつである。これを担っている微生物がアンモニア酸化細菌（Ammonia oxidizing bacteria：AOB）とアンモニア酸化古細菌（Ammonia oxidizing archaea：AOA）である。AOB については、*Nitrosomonas* 属や *Nitrosococcus* 属は水環境に生息しているものが多く、*Nitrosospira* 属や *Nitrosolobus* 属は主に土壌環境に生育していることが知られている。AOA については、*Thaumarchaeota* group I. 1a は海洋堆積物や淡水などの水環境において検出されることが多く、*Thaumarchaeota* group I. 1b, I. 1c は土壌環境で検出される傾向が報告されている。しかし、それらの分布の理由は明確に得られていない。本研究では、東京理科大学理窓会記念自然公園の変化に富む地形を利用して、地域間のアンモニア酸化微生物の分布の違いを排除しつつ、土壌環境の相違が AOB や AOA の群集構造に与える影響について調べることを目的とし、土壌分析や AOB や AOA の群集構造の解析を行った。
【方法】　自然公園には、優占樹種が異なる雑木林、草原、低層湿地、池など多様な環境がある。本研究では、公園内 10 地点の表層土壌を採取した。これらの温度、含水比（水分量)、強熱減量（有機物量)、pH、アンモニア態窒素量、亜硝酸態窒素量、硝酸態窒素量について測定を行った。アンモニア態窒素量の定量にはインドフェノール青法、亜硝酸態地租量の定量には N-(1-ナフチル) エチレンジアミン吸光光度法、硝酸態窒素の定量にはブルシン吸光光度法を利用した。また、各土壌試料に対して *amoA* を使用した PCR-DGGE 法を行い、それぞれの土壌における群集構造を解析した。
【結果】　草原では 30 ℃以上であったが、竹林、落葉樹林、針葉樹林、常緑樹林では 25 ℃未満であった。水分量は、湿地、水田、ハス池において 50 %以上であったが、草原では 10 %未満であった。有機物量は、竹林、落葉樹林、針葉樹林では 50 %以上であり、草原においては 20 %未満であった。多くの土壌が pH 6 ~ 7 を示したなかで、落葉樹林、針葉樹林、常緑樹林の森林土壌では pH 6 未満であった。アンモニア態窒素量は、竹林、落葉樹林、針葉樹林において乾土 1 g あたり 80 μg 以上であり、草原では 20 μg 未満であった。亜硝酸態窒素量は、梅林、竹林、ススキ原、湿地において 0.4 μg/g 以上であった。硝酸態窒素量は、竹林、針葉樹林、ススキ原、常緑樹林において 20 μg/g 以上であった。これらについて主成分分析を行ったところ、梅林とススキ原、竹林と落葉樹林、湿地と水田がそれぞれ近い特徴をもつことが判明した。それぞれの土壌における AOB や AOA の群集構造の解析結果と合わせて、各種環境要因が AOB や AOA の分布に与える影響についても報告する予定である。

ammonia-oxidizing microorganisms, soil environments, community structure analysis

発表責任者：高川智弘（6418523@ed.tus.ac.jp）

講演番号：2A10a02
講演日時：3 月 26 日 09:41～ センター2 号館 A10 会場

Trichoderma reesei によるもみ殻分解に対する微生物叢の影響解析
Analysis of microbiota effects on rice husk degradation by *Trichoderma reesei*
○岩波 明季[1]、浦山 俊一[1,2]、萩原 大祐[1,2] ([1]筑波大生命環境、[2]筑波大・MiCS)
○Aki IWANAMI[1], Shun-ichi URAYAMA[1,2], Daisuke HAGIWARA[1,2] ([1]Fac. of Life & Env., Univ. of Tsukuba, [2]MiCS., Univ. of Tsukuba)

【背景・目的】産業および環境生態系における植物バイオマス分解に糸状菌類は重要な役割を果たしている。特に、糸状菌のバイオマス分解酵素は産業利用されており、これらの酵素生産制御機構の研究は精力的に進められている。一方、環境生態系の糸状菌によるバイオマス分解の分子生物学および生態学的な理解は遅れている。その一因として、実環境のバイオマスには多様な微生物が存在し物性的にも複雑であり、実験室の培養環境と大きく異なることが挙げられる。そこで本研究では、もみ殻を未滅菌で用いた実験室で運用可能な糸状菌培養法（マイクロコズム）を確立し、バイオマス由来の微生物叢が糸状菌のバイオマス分解能に与える影響を解析する。
【方法】市販のもみ殻に、*Trichoderma reesei* QM6A 株（WT）、QM9414 株（セルラーゼ高生産育種株）の胞子液を接種し、28℃で培養した。生育性状は実体顕微鏡で観察し、定量リアルタイム PCR により菌体 DNA を定量して生育量を推定した。菌培養したもみ殻から水溶性タンパク質を抽出し、セルラーゼ活性を測定した。セルラーゼ活性は、CMC を含む寒天を用いてディスクアッセイにより測定した。
【結果・考察】オートクレーブ滅菌および未滅菌のもみ殻に *T. reesei* WT 株を接種し、10 日目までの菌体生育を比較したところ、滅菌もみ殻上で DNA 量が 10 倍以上多く検出された。つぎに、各条件における培養系水抽出液のセルラーゼ活性を解析すると、未接種の滅菌もみ殻では活性が検出されず、WT 株接種によりセルラーゼ活性が認められた。未滅菌のもみ殻では、菌未接種でも活性が見られたことから、土着の微生物に由来するセルラーゼ活性であると考えられた。また、WT 株を接種した場合、未接種と同程度の活性を示したことから、もみ殻由来の微生物か WT 株、もしくは両者のセルラーゼ分泌能が抑制されている可能性が考えられた。そこで、構成的にセルラーゼを分泌する *T. reesei* 育種株を用いて、同様の活性試験を行った。WT 株と比較すると、滅菌もみ殻でのセルラーゼ活性は育種株で有意に増大していたが、未滅菌もみ殻では、WT 株と同程度の活性であった。SDS-PAGE により水抽出液に含まれるタンパク質を解析すると、育種株を接種した滅菌もみ殻培養系で多数の強いバンドが確認でき、活性試験の結果を支持するデータを得た。続いて、植菌した *T. reesei* が優占するマイクロコズム内において、もみ殻由来の微生物叢がどのように変化するか、16S アンプリコンシーケンスによるマイクロバイオームの比較を行った。その結果、育種株を植えた時は、もみ殻微生物叢の多様性が低下した。中には *T. reesei* の接種によって存在量が大きく増減する OTU が見つかった。この事から、*T. reesei* によりバイオマス分解が進行する過程でその影響を受ける菌が存在する可能性が示唆された。

Trichoderma reesei, microbiome, cellulase

発表責任者：萩原大祐（hagiwara.daisuke.gb@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：2A10a03
講演日時：3 月 26 日 09:52～ センター2 号館 A10 会場

高濃度 CO_2 適応能と窒素固定能を備えた微細藻類群集の探索
Enrichment of high-CO_2-acclimated microalgal consortium with nitrogen fixing ability
○飯田 遥貴、油井 信弘、藤井 克彦（工学院大先進工）
○Haruki IIDA, Nobuhiro ABURAI, Katsuhiko FUJII (Kogakuin Univ.)

【目的】
現在の大気の CO_2 濃度は約 400ppm であるが、原始大気の CO_2 濃度は約 30%を占めていたと推測される。従って、当時生息していた微細藻類は高濃度 CO_2 に適応していたと考えられるが、現在でも高濃度 CO_2 下で生育する種が多数報告されている。他方では、水圏は一般的に貧栄養状態であり、低い窒素塩濃度により微細藻類の生育は律速されている。しかし、貧栄養水域でもある程度の微細藻類の存在が確認されており、窒素固定能を持つ種が多く存在することが示唆されている。そこで本研究では、高濃度 CO_2 で生育でき、なおかつ窒素固定能をあわせ持った微細藻類を探索することを試みた。
【方法】
東京都と山梨県の県境に位置する清流で、岩や石の表面を歯ブラシで擦ってバイオフィルムを回収し、これを滅菌水に懸濁して微生物サンプルとした。バイアル瓶に窒素塩を含まない無機塩培地を分注し、微生物サンプルを加え、気相に 0.04、10、20、40%の CO_2 を充填し培養を行った。生育が見られたサンプルは新鮮培地で植え継ぎ培養するとともに、微細藻類の単離を試みた。また、集積培養で得られた増殖菌液から微生物細胞を回収し、PCR-DGGE 法を用いて群集メンバーを解析した。
【結果】
初代培養では、0.04%、10%、20% CO_2 下で培養したサンブルの多くで微細藻類と思われる微生物の生育が見られたが、40% CO_2 で培養したサンプルでは生育が見られなかった。20% CO_2 で培養したサンプルでも、植え継ぎ培養により生育が見られなくなったが、10% CO_2 で生育したサンプルは植え継ぎ培養を繰り返しても生育が継続的に見られた。平板培養法と限界希釈法を用いて 10% CO_2 生育サンプルから藻類株の単離を試みたが、大半のサンプルでは細菌や糸状菌コロニーが多数発生した。他方、一部のサンプルでのみ藻類コロニーの出現が見られたが、藻類コロニー周縁には細菌や糸状菌のコロニーが付随しており、純粋株としての分離は困難であった。そこで、サンプル中から微生物遺伝子を抽出し、16S-rRNA 遺伝子と 18S-rRNA 遺伝子を基に PCR-DGGE 法で解析したところ、いずれのサンプルでも細菌・藻類・糸状菌が多種類検出され、群集メンバー間で光合成と窒素固定を分担しながら生育していると示唆された。また、同じ水域であっても、採集した位置などサンプルの違いで群集メンバーにも違いが見られることもわかった。

Microalgae, high-CO_2-acclimation, nitrogen fixation

発表責任者：藤井　克彦（st13631@ns.kogakuin.ac.jp）

講演番号：2A10a04
講演日時：3 月 26 日 10:03～ センター2 号館 A10 会場

分離共培養容器を用いたサンゴ共在細菌間相互作用の実験的再構築

Reconstruction of interactions between coral-associated bacteria using a co-culture device

○西川 有美[1]、三浦 夏子[1]、植田 充美[2]、片岡 道彦[1]([1]阪府大院・生命環境、[2]京大院・農・応用生命)
○Yumi Nishikawa[1], Natsuko Miura[1], Mitsuyoshi Ueda[2], Michihiko Kataoka[1] ([1]Grad. Sch. Life & Environm. Sci., Osaka Prefecture Univ., [2]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【背景と目的】
近年、サンゴの共在細菌叢には病原菌等からサンゴを保護する機能があることが示唆されてきた。サンゴ病原菌の中でも、*Vibrio coralliilyticus* はサンゴの細菌性白化などを引き起こす日和見感染菌として知られる。我々は以前の研究で、*V. coralliilyticus* に対して生育阻止活性をもつ *Ruegeria* 属細菌を *V. coralliilyticus* を保有するアザミサンゴから単離した(1)。これまでに一部の *Ruegeria* 属細菌は 10 kDa 以上の高分子抗菌物質を分泌することが示唆されている。*Ruegeria* 属細菌と *V. coralliilyticus* はともに同一のサンゴから単離されたことから、サンゴ菌叢に *Ruegeria* 属細菌が一定割合以上存在すると、その分泌する抗菌物質がサンゴの細菌性白化を引き起こす *V. coralliilyticus* の生育を抑制する可能性が考えられた。そこで 2 種の菌間相互作用を詳しく調べるために、新しく開発された分離共培養容器（サンキ精機社製）を用いて検討を行った。今回用いた分離共培養容器では任意のメンブレンフィルターによって培養スペースを 2 つに仕切ることができ、特定の 2 種類の菌に焦点を当てて、各菌が相互作用したときの生育度をそれぞれ容易に測定することが可能である。

【方法と結果】
本研究で使用した 3 組の分離共培養容器について、まず各培養容器が等価であることを確認した。具体的には、片方のセルに添加した Bovine serum albumin (BSA)が特定のメンブレンフィルターを介して移動し、平衡状態に達する過程を経時的に吸光度により測定することで、BSA の移動速度から培養器の等価性を評価した。次に、*Ruegeria* 属細菌と *V. coralliilyticus* それぞれを片方の培養スペースに添加して単独培養し、用いたメンブレンフィルターを細菌が透過しないことを確かめたのち、2 菌種を用いて共培養を行った。培養開始時の菌体数を様々な比率に変えた条件下で *Ruegeria* 属細菌によって *V. coralliilyticus* の生育が抑制される条件を検討した。このとき、*Ruegeria* 属細菌としては *V. coralliilyticus* に生育阻止活性を持つものと持たないものの 2 種類を用いた。得られた結果から 2 種のサンゴ共在細菌間相互作用について考察したので、まとめて報告する。

(1) Miura et al. *Marine Biotechnol.* 2019:21:1–8.

Coral associated bacteria, Ruegeria, co-cultivation

発表責任者：三浦夏子（miura.natsuko@biochem.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：2A10a05
講演日時：3 月 26 日 10:14～ センター2 号館 A10 会場

好アルカリ性高度好塩性古細菌の分離と諸性質解析
Characterization of alkaliphlic haloarchaea isolation commercial salt
○工藤 美祈[1]、早船 瑞麗[1]、近藤 悠介[1]、嶋根 康弘[2]、峯岸 宏明[1,2] ([1]東洋大学、[2]海洋研究開発機構)
○ Minori KUDO[1], Ruiri HAYAHUNE[1], Yusuke KONDO[1], Yasuhiro SHIMANE[2], Hiroaki MINEGISHI[1,2] ([1]Toyo Univ., [2]JAMSTEC)

【背景・目的】

2019 年現在，高度好塩菌である *Halobacteria* 綱の好塩性古細菌は 65 属 269 種が報告されているが，好アルカリ性好塩性古細菌はそのうち 26 種類である．世界中にはアルカリ塩湖などの環境が多数存在し，市販塩においてもその水溶液がアルカリ性を示す場合が多く，未知の好アルカリ性好塩性古細菌が存在する可能性がある．よって 本研究では， 多くの種類の市販塩サンプルを分離源として新規好アルカリ性好塩性古細菌の分離を試み，そのうち中国産岩塩から分離された新規好アルカリ性好塩性古細菌について分類同定等の諸性質解析を行った．

【実験方法】

新規好アルカリ性好塩性古細菌の分離には NaCl を 20%含む固体培地を pH 9.5～10.0 または pH 10.5～11.0 に調整しスクリーニングに用いた．分離源として 810 種類の市販塩サンプルを使用し，寒天培地に 16 点スポットして，37℃で 3 週間培養し各サンプルにおける好アルカリ性好塩性古細菌の有無を確認した．続いて菌株が得られた市販塩サンプルを 100 μL 固体培地全面に塗り広げ，スクリーニングを行った．これらの分離株は 16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく系統解析を行った．

【結果】

810 種類の市販塩サンプルから HMB-2 培地では 27 株, HMB-1 培地では 22 株が分離することができ，これらの内 DNA 抽出が終わった 23 株の 16S rRNA 遺伝子塩基配列の解析を行った．その結果，*Halorubrum gandharaense* MK13-1 株 の近縁種が 2 株，*Haloparvum sediment* DYS4 株 の近縁種が 5 株，*Salinarchaeum chitinilyticum* MC-74 株 の近縁種が 4 株，*Halostagnicola larsenii* XH-48 株の近縁種が 1 株で，いずれも相同性が 97%以下で新種や新属の可能性が示唆された．これらのうち中国産岩塩から分離された新規性の高い No.236-4, No.236-5 および No.236-11 について分類同定を行なった．その結果至適 pH は順に 10.5, 11.0 および 11.0，至適 NaCl 濃度は順に 15%, 15%,および 18%，硝酸塩還元能試験では 3 株ともに positive を示し，ゼラチン分解能試験，亜硝酸塩還元試験，嫌気培養試験では 3 株ともに negative を示した．Tween80 分解能試験では No.236-4 および No.236-11 の 2 株が positive を示し，No.236-5 のみが negative を示した．その他の同定試験の結果も踏まえ、3 株の諸性質を解明した．

alkaline, highly salty, archaea

講演番号：2A10a06
講演日時：3 月 26 日 10:35～ センター2 号館 A10 会場

MALDI-MS プロテオタイピングのためのバイオマーカー同定
Identification of Biomarker Proteins for MALDI-MS Proteotyping
○寺本 華奈江、関谷 禎規、岩本 慎一、田中 耕一（島津製作所）
○ Kanae TERAMOTO, Sadanori SEKIYA, Shinichi IWAMOTO, Koichi TANAKA (Shimadzu Corp.)

【緒言】 MALDI-MS で観測される細菌のマススペクトルをライブラリ検索して属や種を同定する市販のシステムは，臨床微生物分野を中心に広く普及し始めている．これに対して我々は，MALDI-MS で検出したタンパク質のピークを公共のタンパク質 DB に登録されているタンパク質のアミノ酸配列情報から帰属し，各タンパク質のアミノ酸残基の変異を反映したピークシフトを利用して細菌をタイピングする MALDI-MS プロテオタイピングにより同種の細菌を分類してきた．一方，MALDI-MS では細菌のリボソームタンパク質が主として観測されると考えられているが，リボソームタンパク質は必ずしも容易に観測できず，かつアミノ酸配列の保存性が高いため，同種の細菌を識別する際にリボソームタンパク質以外をバイオマーカーとして利用する必要もある．本研究では，ヒトの皮膚常在菌 *Cutibacterium acnes* のサブタイプレベルの分類を行うために，ピークを帰属せずに細菌の分析を行うフィンガープリント法でもバイオマーカーピークとして利用されていた *C. acnes* JCM 6425^{T} の *m/z* 7035 に観測されたタンパク質の同定を試みた．
【方法】 理化学研究所バイオリソース研究センター微生物材料開発室から提供された 24 株の *C. acnes* を用いた．菌体は，無処理の全菌体試料に加え，ビーズ破砕液を限外ろ過した試料も調製した．MALDI-MS の試料は，菌体を試料プレートに塗布した後にマトリックス試薬を滴下するスメア法とマトリックス試薬を菌体と予め混合したものを試料プレートに滴下するプレミックス法により調製した．バイオマーカー探索には eMSTAT Solution™（島津製作所製）を用いた．
【結果】 スメア法で調製した試料では *m/z* 7000 付近のピークだけが強く観測されたが，菌体をビーズ破砕した試料やリボソーム画分を濃縮した試料ではリボソームタンパク質が主要ピークとして観測された．この結果から，*m/z* 7035 のタンパク質は細胞壁に多く存在することが示唆された．さらに，ビーズ破砕した試料の限外ろ過により得られたろ液で *m/z* 7035 のピークが強く観測されたため，この画分からタンパク質を精製した．トリプシンを用いたペプチドマスフィンガープリント法による解析の結果，*m/z* 7035 のタンパク質は antitoxin であることが示唆された．本研究に用いた全サブタイプで観測質量と計算質量が一致し，アミノ酸残基の変異を反映したピークシフトを確認できたことから，本タンパク質が antitoxin であることが支持された．今後，従来の微生物同定システムによる細菌の属や種を超えた詳細な解析が求められることが予想される．異なる前処理や，簡易なタンパク質精製法を利用したバイオマーカー同定法は，様々なタンパク質同定に適用できると考えられる．

MALDI-MS Proteotyping, Antitoxin, Cutibacterium acnes

発表責任者：寺本華奈江（t_kanae@shimadzu.co.jp）

講演番号：2A10a07
講演日時：3 月 26 日 10:46～ センター2 号館 A10 会場

ヒト毛髪付着主要細菌の分離
Isolation of predominant bacteria on human scalp hair
○西 悠里、渡邉 康太、田代 幸寛、酒井 謙二（九大院・生資環）
○Yuri NISHI, Kota WATANABE, Yukihiro TASHIRO, Kenji SAKAI (Grad. Sch. Bioresour. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ.)

背景・目的

人体表皮には、多くの細菌が生息する事が知られている。先行研究にて、ヒト毛髪にも高密度（10^4～10^6 cells/cm^2）の細菌が付着し、細菌群集構造解析の結果、*Pseudomonas*、*Cutibacterium*、*Lawsonella*、*Staphylococcus* 属細菌などが主要細菌であることを既に報告している（Watanabe et al., Microbes. Environ., 2019）。一方で、毛髪に存在する細菌について行われた研究は少なく、増殖様式や細菌が毛髪に及ぼす影響は明らかにされていない。そこで本研究では、毛髪とヒト毛髪主要細菌がどのような相互作用を及ぼしているか調べるため、毛髪付着細菌の分離・同定を行なうとともに、主要細菌であるか調べた。

実験方法

被験者 4 名から提供された毛髪を分離源として用いた。分離源を直接固体培地（6 種類の寒天培地(LB、PYA、TSA、NA、$MnSO_4$ 含有 NA および 2 種類のアガロース培地（NA、LB)）に広げて分離する直接分離法と液体培地（NA、LB）で集積培養後に固体培地で分離する集積分離法を行った。30°C で培養を行い、コロニー形成、2 回の純化後、細菌 DNA 抽出、PCR による 16S rRNA 遺伝子の増幅、シーケンス解析を行った。得られたシーケンスデータは、EZ taxon で細菌種を同定した。さらに、先行研究で特定された主要細菌の配列と比較して、分離菌の優占性を評価した。

結果・考察

直接分離法および集積分離法のいずれの方法でもコロニー形成を確認した。合計 129 株（直接分離法：88 株、集積分離法：41 株）のシーケンス解析の結果、31 種の細菌を分離した。*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* や *Staphylococcus caprae* は複数の培地でも分離された。*Brevibacterium casei* は $MnSO_4$ 含有 NA 培地でのみコロニーを形成した。一方、PYA 寒天培地ではコロニーを形成しなかった。アガロース培地を用いた結果、NA および LB 寒天培地では分離されなかった細菌種を分離・同定した。よって、寒天成分が一部の毛髪付着細菌のコロニー形成を阻害し、コロニーを形成する毛髪付着細菌種は固体培地の種類に依存する事が示唆された。細菌群集構造解析で得られたシーケンス配列と比較した結果、主要細菌である *Staphylococcus* 属細菌を含む複数種の細菌の分離に成功した。現在、他の培地や培養条件で *Pseudomonas* 属や *Cutibacterium* 属細菌の主要細菌の分離を行っている。

Hair, Bacteria, Isolation

講演番号：2A10a08
講演日時：3 月 26 日 10:57～ センター2 号館 A10 会場

CODH/ACS を欠損した偏性混合栄養メタン菌の解析
Analyses of obligate mixotrophic methanogens lacking CODH/ACS
○名古屋 美紗[1]、高妻 篤史[1]、上野 嘉之[2]、渡邉 一哉[1] ([1]東薬大生命、[2]鹿島建設)
○Misa Nagoya[1], Athushi Kouzuma[1], Yoshiyuki Ueno[2], Kazuya Watanabe[1] ([1]Tokyo Univ. Pharm. Life Sci., [2]Kajima Corp.)

メタン菌とはメタンを生成する異化代謝により生育するアーキアの総称であり、利用できる基質により水素資化性メタン菌と酢酸分解メタン菌に分類される。メタン菌は、有機性廃棄物を処理しながら燃料となるメタンガスを回収する嫌気消化槽において、複数種の嫌気性微生物が行う連携的代謝反応の最終段階を担う。我々の研究室では、高効率な嫌気消化を可能にする高温固定床式嫌気消化槽内に形成される微生物群集のメタゲノム解析を行い、メタン生成の大部分を担う担体バイオフィルム中で優占種となるメタン菌 2 種（*Methanosarcina* Mes1 及び *Methanothermobacter* Met2）の完全ゲノムを再構築した(Kouzuma et al. 2017 Sci. Rep. 7:1510)。このうち Met2 は、CO dehydrogenase/acetyl-CoA synthase complex（CODH/ACS）をコードする遺伝子を欠損しており、CO_2 を炭素源にした独立栄養的増殖および酢酸を基質としたメタン生成ができない可能性が示唆された。バイオフィルム中には CODH/ACS をもつ *Methanothermobacter* がマイナー種として存在していることから、Met2 がどのような代謝を行い、またなぜ優占種になれるのかに興味がもたれた。そこで本研究では、高温固定床式嫌気消化槽から Met2 を単離し、その諸性質を調査した。

Met2 を単離するために、高温固定床式嫌気消化槽の実験装置から嫌気的にバイオフィルムを回収し、気相が窒素の液体培養後に嫌気バイアル中に形成させたゲランガムスラント上に塗布した。形成されたコロニーを解析したところ、Met2 が *Coprothermobacter* と共凝集体を形成していることが示された。そこでこのコロニーの懸濁液を高水素分圧下で限界希釈培養し、Met2 の純粋培養物を得た。16S rRNA 遺伝子および *mcr* 遺伝子配列を用いた分子系統解析から、Met2 は *Methanothermobacter* 属に属すものの、幾つかの単離株とともに Type species である *Methanothermobacter thermautotrophicus* から独立したクラスターを形成することが示された。増殖試験の結果、Met2 は水素/CO_2 と酢酸の両基質が存在するときのみ増殖できることが示され、CODH/ACS 遺伝子欠損から予測される表現形質が確認された。以上の結果から我々は、Met2 を偏性混合栄養メタン菌と呼ぶことにした。

今までに完全ゲノムが解読されている 100 を超えるメタン菌のゲノム配列を調査したところ、CODH/ACS を欠損するものがかなりの数存在することが明らかになった。このことは、これまで水素資化性と呼ばれていたメタン菌の中に、かなりの割合で偏性混合栄養メタン菌が存在する可能性を示しているとともに、メタン菌の分類を再考する必要性を示唆している。

anaerobic digestion, methanogenesis, metagenome assembled genome

発表責任者：名古屋美紗（s158048@toyaku.ac.jp）

講演番号：2A10a09
講演日時：3 月 26 日 11:08～ センター2 号館 A10 会場

循環型汚水浄化槽から分離された代謝産物要求細菌の系統解析とヘルパー細 菌との対応関係の解析
Analyses of phylogeny and correspondence with helper bacteria on the bacterial strains requiring metabolites derived from the other bacteria in Lab-scale wastewater treatment system

○野村 拓哉、鈴木 智順（東理大応生）
○TAKUYA NOMURA, TOMONORI SUZUKI (Tokyo University of Science, Department of Applied Biological Science)

【目的】 当研究室で人工汚水を使用して運転している循環型汚水浄化槽から、異なる種類の細菌（ヘルパー細菌）が産生する物質を生育に必要とする代謝産物要求細菌が、好気槽処理水と嫌気槽処理水のそれぞれから分離されている。好気槽から分離された細菌株は系統解析や生理生化学的解析が未だ行われておらず、また代謝産物要求株とヘルパー株の対応がどの様な関係になっているかは明確にわかっていない。そこで本研究では、好気槽から分離された代謝産物要求株の系統解析を行うと共に、代謝産物要求株とヘルパー株との対応関係を調べ、浄化槽内で結ばれている物質的な依存関係の一端を明らかにすることを目的とした。
【方法】 系統解析は 16S rRNA 遺伝子の全塩基配列に基づいて行い、好気槽処理水から分離されている代謝産物要求株 6 株の塩基配列を解析した。代謝産物要求株とヘルパー株との対応関係は、各ヘルパー細菌株を人工汚水培地に植菌して培養し、それらの培養濾液で各代謝産物要求株が生育するかを確認することで調べた。この実験は先行研究により分離されたヘルパー細菌 8 株と、嫌気槽から分離された株を含む代謝産物要求細菌 12 株を用いて行った。
【結果】 系統解析を行った 6 株のうち B7r, B21r, D12r の 3 株は *Aliidiomarina taiwanensis* と最も近縁であったが、いずれの株も *A. taiwanensis* に対して塩基配列の相同値が 96%未満であった。これらの株は新種の細菌である可能性が高く、また相同値の低さから新属の細菌である可能性もある。B22r, D11r, F12r の 3 株は *Pusillimonas noertemannii* と最も近縁であったが、いずれの株も *P. noertemannii* に対して塩基配列の相同値が 98%未満であり、これらの株についても新種の細菌である可能性が示唆された。これらの株はまた今回解析した代謝産物要求株のうち、近縁であった株間（B7r, B21r, D12r の 3 株間および B22r, D11r, F12r の 3 株間）の相同値はいずれも 99.7%を上回っており、これらの株は同種の細菌である可能性が高いと考えられる。これらの株は今後、形態学的解析や生理生化学的解析も併せて行い、詳しい表現型を明らかにすることにより、属レベルで新しい分類群の細菌であるかを調べる。対応関係では、代謝産物要求細菌のうち B22r, D11r, F12r の 3 株はヘルパー細菌 8 株全ての培養濾液において増殖が見られたが、それ以外の株については培養した培養濾液により増殖が見られたものと見られないものがあった。ヘルパー細菌 JS20h 株の培養濾液では全ての代謝産物要求株について著しい生育が見られたほか、用いたヘルパー株によって生育速度が大きく異なることがわかった。今回の発表に際しては、生育速度に着目した結果も併せて報告する予定である。

wastewater treatment system, uncultured microorganism, phylogeny

講演番号：2A10a10
講演日時：3 月 26 日 11:19～ センター2 号館 A10 会場

循環型汚水浄化槽内における代謝産物要求細菌の網羅的な系統解析

Polyphasic analyses of phylogeny and phenotype on the bacterial strains requiring metabolites derived from the other bacteria in Lab-scale wastewater treatment system

○鈴木 遥菜、島田 紘帆、鈴木 智順（東理大・応生）
○ Haruna SUZUKI, Hiroho SHIMADA, Tomonori SUZUKI (Tokyo University of Science, Department of Applied Biological Science)

【目的】 100 万種は優位に超えていると言われている細菌種のうち、現在は 1%程度しか同定されていない。この未同定の細菌の多くは、分離法や培養法が確立されていないことが大きな要因である。これら未知の細菌の系統解析を行うことは、細菌の進化上の位置づけを行い、同時に細菌の種多様性の解明に繋がると期待されている。先行研究において、人工汚水培地では生育せず、人工汚水培地で微生物を培養した処理水を用いた培地でのみ生育する代謝産物要求細菌 3 株が分離され、これらは 16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列解析で相同値が 99%以下であり，新種ではないかと考えられた。本研究では、循環型汚水浄化槽由来の代謝産物要求株 3 株（3Cr 株、5Fr 株、HS3r 株）を用いて表現型を網羅的に解析する共に、16S rRNA 遺伝子塩基配列およびドラフトゲノム遺伝子の塩基配列を用いた分子系統解析を行うことで、3 株の新属および新種の提唱を行うことを目的とした。
【実験方法】 代謝産物要求株の培養は処理水培地を使用した。この処理水培地は、循環型汚水浄化槽に投入した人工汚水を 1 週間循環させ、回収した微生物の代謝産物が含まれた処理水を遠心分離し、上清を濾過滅菌することで作製した。分子系統学的解析において、分離株の 16S rRNA 遺伝子の全塩基配列決定、およびドラフトゲノム遺伝子（*gyr*B, *rpo*B, *rpo*D）の塩基配列決定を行った。表現型の網羅的な解析において、形態学的解析については、コロニー観察、グラム染色、走査型電子顕微鏡を用いた細胞形態の観察を行った。生理生化学的性状では、濁度を用いた生育可能温度、生育 pH、生育塩濃度の測定を行った。さらに、API ZYM（bioMérieux）を用いた各種酵素の有無の判定、API 20NE（bioMérieux）を用いた生理生化学的特性を調べた。また、化学分類学的解析においては、HPLC を用いた逆相カラムによる GC 含量の測定を行った。
【結果】 分子系統解析において、16S rRNA 塩基配列解析は 3Cr 株では *Thiopseudomonas denitrificans* X2^{T} と相同値が 97.8%、HS3r 株では *Pseudomonas caeni* HY-14^{T} と 97.4%と *Pseudomonas* 属に近縁な新属や新種の可能性が示唆された。また、5Fr 株において *Alcanivorax pacifics* W11-5^{T} と 96.6%で、系統樹の結果と併せて *Alcanivorax* 属の一部の種と共に新属であると示唆された。表現型の網羅的な解析では、分離株 3 株は共にグラム陰性の桿菌であり、生育可能温度から 3 株共に中温性であることがわかった。なお、ドラフトゲノム遺伝子を用いた分子系統解析や、形態学的解析の詳細、生育可能 pH や塩濃度、API ZYM および API 20NE を用いた 3 株の具体的な生理生化学的性状の詳細、および化学分類学的解析における 3 株の GC 含量についても併せて報告する予定である。

westewater treatment system, uncultured microorganism, phylogeny

発表責任者：鈴木 遥菜（6418520@ed.tus.ac.jp）

講演番号：2A10a11
講演日時：3 月 26 日 11:40～ センター2 号館 A10 会場

循環型汚水浄化槽における代謝産物要求細菌が要求する物質の特定

Identification of materials required by microbes requiring metabolites in Lab-scale wastewater treatment system

○山本 晃裕、島田 紘帆、鈴木 智順（東理大応生）
○Akihiro YAMAMOTO, HIROHO SHIMADA, TOMONORI SUZUKI (Tokyo University of Science, Department of Applied Biological Science)

【目的】 細菌の 99%以上は純粋培養が困難である。難培養となる原因は様々であるが、本研究では他の細菌が産生する生育因子を必要とする代謝産物要求細菌に着目した。代謝産物要求細菌の生育因子を産生する細菌をヘルパー細菌と称することにした。代謝産物要求細菌やヘルパー細菌は、当研究室で運用されているラボスケール循環型汚水浄化槽から複数株、分離されている。しかし、生育因子がどのような物質なのかは未だ明らかになっていない。そこで本研究では、生育因子である代謝産物の性質・構造を明らかにし、さらには代謝産物の機能を解明することを目的とした。
【方法】 本研究で用いた細菌株は先行研究で分離されたヘルパー細菌 JS5h 株と代謝産物要求細菌 3Cr 株とした。代謝産物を産生させるため、JS5h 株を人工汚水液体培地で 72 時間培養した。培養後、遠心分離や濾過により菌体を除去し、JS5h 株培養濾液とした。JS5h 株培養濾液に対してクロロホルム・メタノールを用いた分液操作、ロータリーエバポレーターによる濃縮を行い、陰イオン交換クロマトグラフィー・逆相カラムクロマトグラフィーにかけることでフラクション分画を行った。分画後、得られたフラクションを乾固し、人工汚水で再溶解した。これらの溶液に 3Cr 株を植菌し、生育を確認することで、生育因子である代謝産物が含まれているフラクションを特定した。さらに、3Cr 株の増殖が見られたフラクションは TLC により純度の確認を行い、検出されたスポットが単一であれば、NMR 測定・MS 測定を行った。スポットが単一でない場合、分取 TLC を行い、目的スポットのみをかきとり、シリカゲルから物質を溶出させたのち、解析を行った。
【結果】 代謝産物はフェニルアラニンであると推測された。L 体か D 体か判断するため人工汚水培地に L-フェニルアラニン、D-フェニルアラニンをそれぞれ加え、3Cr 株の生育を調べた。しかし、L-フェニルアラニンおよび D-フェニルアラニンの両者において 3Cr 株の生育は確認されなかった。このことからフェニルアラニンは目的の代謝産物ではなく、他に物質が存在している可能性が高いことが考えられた。しかし、目的物質は分析中に検出されなかったことから極微量であると考えられる。そのため、現状の培養条件では、十分量の目的物質を得ることは困難であると考えられる。そこで、構造解析に十分な量を得られるための培養条件の検討を行い、決定した培養条件についても合わせて報告する予定である。

uncultured microbe, metabolite, phenylalanine

講演番号：2A11a01
講演日時：3 月 26 日 09:30～ センター2 号館 A11 会場

清酒酵母変異株のリンゴ酸高生産原因変異遺伝子の同定

Identification of the mutated genes that are responsible for hyperproducing of malic acid in the isolated sake yeast mutants

○馬場 嵩一朗[1]、澤田 和敬[2]、永野 幸生[1,3]、折田 亮[4]、木村 圭[1,4]、玉置 尚徳[1,5]、後藤 正利[1,4]、小林 元太[1,4]([1]鹿児島大院連農、[2]佐賀県工技セ、[3]佐大分析セ、[4]佐大農、[5]鹿児島大農)
○Shuichiro BABA[1], Kazutaka SAWADA[2], Yukio NAGANO[1,3], Ryo ORITA[4], Kei KIMURA[1,4], Hisanori TAMAKI[1,5], Masatoshi GOTO[1,4], Genta KOBAYASHI[1,4] ([1]United Grad. Sch. Agric. Sci., Kagoshima Univ., [2]Ind. Technol., Cen. Saga., [3]Cen. Ana., Saga Univ., [4]Fac. Agric., Saga Univ., [5]Fac. Agric., Kagoshima Univ.)

【背景と目的】佐賀大学では清酒『悠々知酔』を県内の酒蔵と共同で製造している。この製造に使用している酵母は当研究室で分離された悠々知酔酵母 Y52 株とその泡なし変異株 Y5201 株の 2 株のみのため酒質のバリエーションが制限される。当研究室では、悠々知酔の酒質の幅を広げるために有明海から分離した清酒酵母（H3-1 株）を育種改良することで、爽やかなリンゴ酸を高生産する変異株を 5 株取得することに成功している。これら 5 株のうち、DMSS233 株はリンゴ酸生産量が約 1500 mg/L で最も大きかった。本研究では、変異株がリンゴ酸高生産能を獲得した機構を明らかにするために、オミックス解析によりリンゴ酸高生産変異株の原因変異遺伝子の特定を試みた。
【方法および結果】分離株 *Saccharomyces cerevisiae* H3-1 株とその変異株 5 株について Hiseq による Whole Genome Sequencing を行った。*S. cerevisiae* K7 株を参照ゲノムとして比較ゲノム解析を行い、DMSS233 株のみに導入された変異点を 861 か所同定した。これらの変異点について SnpEff を用いた解析を行い、変異により大きく影響を受ける可能性がある遺伝子として 382 の遺伝子を特定した。続いて、H3-1 株と変異株 DMSS233 株について RNAseq 解析を行い、1787 の遺伝子を両株間の発現変動遺伝子（DEG）として同定した。これらの DEG のうち、DMSS233 株において 924 遺伝子の発現量が増加し、863 遺伝子の発現量が減少していた。さらに、DEG の中からリンゴ酸生成に関与する遺伝子を探索したところ、リンゴ酸生合成に関与する *DAL7* 遺伝子の発現量が DMSS233 株において約 2.6 倍に増加していることを見出した。*DAL7* 遺伝子は *DAL* クラスターを構成する遺伝子の 1 つであり、*DAL* クラスターはグルタミン酸やアンモニア等の資化しやすい窒素源の存在化下では抑制されることが明らかとなっている(1)。そこで、DMSS233 株の *DAL* クラスターの発現変動を確認したところ、*DAL* クラスターを構成する 6 つの遺伝子の発現量が DMSS233 株において増加していることが明らかとなった。これらの結果から、アミノ酸やアンモニアの取込み能の低下に帰因して、*DAL* クラスター遺伝子の抑制が解除されたと考えた。ついで、前述した 382 の変異遺伝子の中からアミノ酸の取込みに関与する遺伝子を探索したところ、ミスセンス変異が導入された遺伝子の中に 7 つのアミノ酸輸送体遺伝子を見出した。最後に GC-MS による製成酒のアミノ酸を分析した結果、DMSS233 株のアミノ酸生成量は H3-1 株よりも小さかったため、アミノ酸輸送体の機能が低下していることが推察された。

(1)Simon Wong, Kenneth H Wolfe., NATURE GENETICS (2005)

Saccharomyces cerevisiae, Sake, Malic acid

講演番号：2A11a02
講演日時：3 月 26 日 09:41～ センター2 号館 A11 会場

野生酵母における 4-VG 生産系の役割と清酒醸造に向けた 4-VG 非生成株の遺伝的要因の解析
Physiological role of 4-VG producing pathway in the budding yeast and genetical cause for the 4-VG non-producing strain

○奥村 真衣[1]、吉村 明浩[2]、澤井 美伯[2]、正木 和夫[2,3]、向田 潤[4]、三井 亮司[4]、島田 昌也[1]、早川 享志[1]、中川 智行[1]([1]岐阜大院自然科学、[2]岐阜県食品科学研、[3]酒類総合研究所、[4]岡山理科大理)
○Mai OKUMURA[1], Akihiro Yoshimura[2], Yoshinori Sawai[2], Kazuo Masaki[2,3], Jun Mukoda[4], Ryoji Mitsui[4], Masaya Shimada[1], Takashi Hayakawa[1], Tomoyuki Nakagawa[1] ([1]Gifu Univ., [2]Gifu Pref. Res. Inst. for Food Sci., [3]Natl. Res. Inst. of Brewing, [4]Okayama Univ. of Sci.)

【目的】
4-ビニルグアイヤコール（4-VG）は、煙・スパイス様の香りをもつことから、清酒のオフフレーバーの一つに数えられる。きょうかい酵母はフェルラ酸の脱炭酸反応を触媒する Pad1p/Fdc1p の *FDC1* 遺伝子のナンセンス突然変異のため 4-VG を生成しないが、野生酵母による清酒醸造ではしばしば 4-VG 生成がみられる。このため、野生酵母を清酒醸造に使用する際、4-VG 生成が実用化への妨げとなることがあるため、野生酵母の選抜における最重要因子の一つとなっている。しかし、自然界における 4-VG 生産系の役割と 4-VG 生産/非生成酵母の分布、さらには 4-VG 非生成株が 4-VG を生産しない遺伝的要因に関する知見はほとんどない。そこで、本研究では野生酵母における 4-VG 生成能の分布と 4-VG 非生成の遺伝学的要因の解明を目指した。

【結果・考察】
自然界の野生酵母 59 株と東京農大菌株保存室から分譲された醪由来酵母および花酵母の 24 株の 4-VG 生成能を観察したところ、31 株が非生成株であり、野生酵母由来は 7 株のみであった。4-VG 生産を触媒する Pad1p/Fdc1p は桂皮酸の脱炭酸反応も触媒することから、4-VG 非生成株の桂皮酸への感受性を観察したところ、K7 株を含め全ての株が桂皮酸に感受性を示した。このことから 4-VG 非生成株は自然界で植物樹皮に含まれる桂皮酸の毒性回避能を欠損していることが考えられた。

次に 31 株の 4-VG 非生成株が 4-VG を生産しない遺伝的要因の解明を目指した。31 株のうち 3 株は K7 株同様、*FDC1* に 160A>T ナンセンス変異が生じており、これら株は遺伝的に清酒酵母グループに属していた。その他の株は 4-VG 生成型 Fdc1p と同じアミノ酸配列であったことから、P_{FDC1}-*FDC1* を BY4741 由来 *fdc1*Δ 株に導入したところ、4-VG を生成できない 4 株が存在した。これら株では P_{FDC1} に−354G>T 変異が観察されたことから、P_{FDC1} の変異により 4-VG 生成能が欠落したと考えられた。また P_{FDC1}-*FDC1* が正常だった 4-VG 非生成株の *PAD1* には Pad1p の失活を伴う変異はみられなかった。しかし、これら株の P_{PAD1}-*PAD1* は *pad1*Δ 株の 4-VG 生成能を相補できない株も存在した。

以上のことから、Pad1p/Fdc1p は出芽酵母の自然界での生存において重要な因子であり、桂皮酸の毒性にさらされる環境下から単離される野生酵母は 4-VG 生成能を持つ可能性が高いと考えられる。また、4-VG 非生成の遺伝的要因は多様であり、清酒酵母系がもつ *FDC1*-160A>T ナンセンス変異のみならず、P_{FDC1} や P_{PAD1} などプロモータ変異などにも起因することが明らかとなった。

4-Vinylguaiacol, *Sake* yeast, *FDC1*

発表責任者：中川 智行（t_nakaga@gifu-u.ac.jp）

講演番号：2A11a03
講演日時：3 月 26 日 09:52～ センター2 号館 A11 会場

カプロン酸エチル超高生産株の育種と清酒実地醸造試験

Breeding of a high ethyl caproate producing yeast strain for the commercial scale sake brewing

○小高 敦史、高宮 毅志、松村 憲吾、堀田 夏紀、村上 直之、鈴木 佐知子、秦 洋二、石田 博樹（月桂冠・総研）
○Atsushi KOTAKA, Takashi Takamiya, Kengo Matsumura, Natsuki Hotta, Naoyuki Murakami, Sachiko Suzuki, Yoji Hata, Hiroki Ishida (Research Institute, Gekkeikan Sake Co.)

【目的】出芽酵母は、*FAS2* 遺伝子の 3748 番目の G が A へと変異することにより、脂肪酸合成酵素阻害剤セルレニンに対して耐性を示し、清酒醸造において吟醸香のひとつであるカプロン酸エチルを高生産する。セルレニン耐性株の多くはこの変異型 *FAS2* をヘテロに持っている。これまでに我々は、ヘテロ変異株を親株として、高濃度セルレニンに対して耐性を示した変異株を複数取得しており、清酒小仕込み試験により、これらの株はカプロン酸エチル超高生産であることを報告している [1)]。また本菌株は *FAS2* ホモ変異であるが、それぞれの変異株間では増殖や清酒醸造特性が異なっていた。次世代シーケンサー解析の結果、いずれの株も染色体の本数が大きく異なっていたことが、このような差異の原因と考えられた [2)]。今回、親株と形質が近いカプロン酸エチル超高生産株を取得することを目的として酵母育種を行うことにした。また、得られた育種株を用いて小仕込み試験ならびに実地醸造試験を行い、実用化の可能性を検証した。
【方法】アルギナーゼをコードする *CAR1* が *FAS2* と同じ 16 番染色体上にあることから、*CAR1* 欠損と変異型 *FAS2* のホモ化が同時に生じた株の取得を目指した。親株には当社保有の *FAS2* ヘテロ変異株 GE-09 を用い、CAO 培地にてアルギナーゼ欠損株を取得した。得られた変異株を用いて清酒小仕込み試験を行い、醸造特性を評価した。有望変異株 1 株について、次世代シーケンサー解析に供し、さらに総米 7000 kg 実地醸造試験を行った。
【結果】*FAS2* ヘテロ変異株 GE-09 よりアルギナーゼ欠損株を複数取得した。小仕込み試験を行ったところ、多くの変異株は親株と同等の炭酸ガス減少を示した。カプロン酸エチル生産性については様々であり、親株の倍程度生産するものも存在した。大きな発酵力の低下がなく、カプロン酸エチルの生産性が大きく向上した 1 株を有望変異株とした。次世代シーケンサー解析の結果、有望変異株は *FAS2* ホモ変異であり、倍数性、異数性は親株と同じであった。また、本菌株を用いた総米 7000 kg の実地醸造試験では、発酵力は概ね維持しつつ、カプロン酸エチルはもろみで最大 20 mg/L 含まれていることを確認した。このように、本菌株の使用によりカプロン酸エチル高含有清酒の醸造を工場スケールで実現することができた。

1）Kotaka et al.: J. Biosci. Bioeng., **110**, 675-678 (2010)
2）小高ら、日本農芸化学会 2019 年度大会、3C7p04

ethyl caproate, sake brewing, commercial scale

発表責任者：小高　敦史（a_kotaka@gekkeikan.co.jp）

講演番号：2A11a04
講演日時：3 月 26 日 10:03～ センター2 号館 A11 会場

全ゲノム情報に基づく国酒酵母の系統学的検討
Whole genome-based phylogenetic analysis oh *kokushu* yeast.
○森谷 千星[1]、門倉 利守[1]、中山 俊一[1]、松谷 峰之介[2]、兼崎 友[3]、藤田 信之[4]、鈴木 健一朗[1] ([1]東農大醸造、[2]東農大生物資源ゲノム解析センター、[3]静大グリーン科学技術研究所、[4]東農大微生物)
○Chise MORIYA[1], Toshimori KADOKURA[1], Shunichi NAKAYAMA[1], Minenosuke MATSUTANI[2], Yu KANESAKI[3], Nobuyuki FUJITA[4], Ken-ichiro SUZUKI[1] ([1]Dept. Ferment. Sci., Tokyo Univ. of Agric., [2]Genome Res. Ctr., Tokyo Univ. of Agric., [3]Res. Inst. of GR Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [4]Dept. Mol. Microl., Tokyo Univ. of Agric.)

【目的】国酒醸造に利用される国酒酵母（清酒酵母、泡盛酵母、焼酎酵母）は、分類学上 *Saccharomyces cerevisiae* にまとめられているが、実用上、醸造環境に適している酵母は限られる。これらは、嗜好的評価はあるものの、各酒類醸造に適した酵母の微生物学的な定義は未だに曖昧なままである。そのため、The Yeasts 5th の主な分類基準に従って、国酒由来の酵母 100 株の 5 遺伝子（15S、*COX2*、EF1-α、ITS、26SD1/D2）による系統解析を行ったところ、*Sacch.* 属の各種がそれぞれ分岐した上で、*S. cerevisiae* に対して国酒酵母の一群が分岐した。一方で、これまでに The Yeasts 5th の同定基準を含む 11 項目の生理・生化学・系統学的性質からは、*Sacch.* 属の各種がそれぞれ区別され、国酒由来の酵母 100 株が *S. cerevisiae* とは異なり、由来ごとの群を形成することが明らかとなった。近年、多様な起源の複合群である *S. cerevisiae* について全ゲノム解析が頻繁に行われ、全ゲノム情報に基づく系統解析から、それぞれの起源を反映したクレード形成が報告されている。そこで本報告では、生理・生化学・系統学的性質によってグルーピングされた群の代表株を選択し、全ゲノム解析を行い、全ゲノムレベルでの国酒酵母の系統学的位置を検討した。
【方法】代表株として、清酒酵母の一群から、*S. sake*、*S. tokyo*、*S. yedo* と付された株を含む 6 株、泡盛酵母の一群から、*S. awamori* と付された株を含む 4 株、焼酎酵母の一群から、*S. batatae* と付された株を含む 6 株、cerevisiae（cere）系焼酎酵母の一群から、宮崎株を含む 2 株の計 18 株を選択した。Illumina 社の Hiseq2500 にてリードデータを取得し、de novo アセンブル後、AUGUSTUS にて遺伝子予測を行った。オーソログ遺伝子を抽出後、その全オーソログ遺伝子を用いて ML 法による系統樹を構築した。
【結果】ゲノムデータが公開されている実験室酵母 S288c 及び清酒酵母協会 7 号（K7）を含めた代表株で、5732 個のオーソログ遺伝子が抽出された。これらを全て用いた系統解析では、S288c に対して、*S. sake*、*S. tokyo*、*S. yedo*、K7 株を含む 6 株の清酒酵母の一群、*S. awamori*、宮崎株、鹿児島株を含む 10 株の泡盛および焼酎由来の一群、焼酎由来の 2 株の *S. batatae* の 2 株の一群の 3 クレードに分岐した。性質による群形成と比較すると、清酒酵母は同様に一群を形成したが、泡盛および焼酎、cere 系焼酎酵母に分かれていた株は一群にまとめられた。しかし、その中で泡盛由来の株から成るサブクレードの存在も示唆された。

sake yeast, *kokushu* yeast, whole genome phylogeny

発表責任者：門倉　利守（kadokura@nodai.ac.jp）

講演番号：2A11a05
講演日時：3 月 26 日 10:14～ センター2 号館 A11 会場

清酒酵母きょうかい 6 号由来新規アルコール耐性変異株の原因変異の探索

Identification of a mutation causing an alcohol-tolerance in a novel strain derived from sake yeast K6

○五島 徹也、周 延、小林 めぐみ、赤尾 健（酒総研）
○Tetsuya GOSHIMA, Yan ZHOU, Megumi KOBAYASHI, Takeshi AKAO (NRIB)

【目的】醸造環境において、醪中の酵母は高エタノール濃度や低温、酸性等のストレス環境下におかれる。現在の清酒醸造には、きょうかい 7 号（K7）をはじめとした日本醸造協会から頒布される酵母（きょうかい酵母）が用いられることが多い。きょうかい酵母は、酒質が良く、発酵力が強い一方で、遺伝的にはアルコール耐性が低いことが、当研究所の解析により既に明らかとなっている。清酒醪中での酵母の死滅は、細胞内容物の漏出により酒質に悪影響を及ぼすことから、そのリスクを防ぐ方策の一つとして、エタノール耐性清酒酵母が育種され、実用化されてきた。例えば、K7 から育種されたアルコール耐性株きょうかい 11 号である。当研究所でも独自に、きょうかい 6 号（K6）の高アルコール耐性株（K6AT）を分離している。本研究では、K6AT のアルコール耐性機構の解明を目的に、当該菌株の原因変異の探索を行った。
【方法及び結果】次世代シーケンサーを用いた酵母ゲノムの比較解析により、K6AT のゲノム配列情報において、①K6 や他の近縁株に対して固有であり、②遺伝子上に存在し、③遺伝子産物の配列に影響がある、の各条件に合致する 7 つの一塩基多型（SNP）を抽出した。これらの野生型、変異型アリルの各遺伝子座破壊株等をそれぞれ作製し、エタノールや熱への急性ストレス試験により、アルコール耐性との関連を評価した。その結果、*CDC55* 遺伝子上の 139 番の塩基がヘテロ接合型［G/C］からホモ接合型［C/C］に変化したことがアルコール耐性をもたらしたことを示すデータが得られた。また、qRT-PCR の結果、変異型アリル［C］のみを有する破壊株では、ストレス応答遺伝子群の多くが、非ストレス条件下でも発現が高くなる傾向がみられた。さらに、清酒小仕込み試験では、変異型アレル［C］を有する破壊株は、K6AT に近い醸造特性を有していた。これらの結果から、*CDC55* 遺伝子上の 139 番目の変異がアルコール耐性の原因変異であり、本遺伝子がアルコール耐性へ影響を及ぼすことが示唆された。

Fermentation, Stress tolerance, Signal transduction

発表責任者：五島徹也（t.goshima@nrib.go.jp）

講演番号：2A11a06
講演日時：3 月 26 日 10:35～ センター2 号館 A11 会場

メタボローム及びタンパク質解析による出芽酵母菌株の特性解析
The polar metabolites and protein profile analyses of budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, reveal characteristics of the yeast strain and its growth stage.
○高橋 圭[1]、河野 弘美[1]、水野 恵[1]、渡辺 大輔[1,2] ([1]酒類総研、[2]京大院・農・食品生物)
○kei takahashi[1], Hiromi Kohno[1], Megumi Mizuno[1], Daisuke Watanabe[1,2] ([1]NRIB, [2]Kyoto Univ.)

【背景及び目的】　出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)の細胞内外の代謝物は、生育ステージや、栄養状態、温度等の外的要因により変化することが知られているが、低温発酵時等、酒類醸造環境に近い条件における出芽酵母代謝物の全体像については分かっていない。また、吟醸酒醸造に利用されることが多い酵母菌株 K1801 の代謝物等の特徴についても不明である。そこで、メタボローム、揮発性成分及びタンパク質プロファイル解析により、出芽酵母の特性を明らかにすることを目的とした。
【方法】　３種類の出芽酵母（実験室酵母 X2180、醸造用酵母（K701, K1801)）を 20%グルコース含有 YPD 培地で、15℃において静置培養し、生育ステージ別（培養初期・対数増殖期・定常期）の細胞内の極性代謝物を CE-TOFMS（アジレント）により網羅的に分析した。酵母培養後の培地中の揮発性成分については、GC-FID(島津製作所)により分析した。酵母細胞内外のタンパク質については、SDS-PAGE 及びイムノブロット法により解析した。
【結果】　網羅的解析の結果、303 の極性代謝物が検出された。化合物データを用いた主成分分析(PCA)により、酵母株間ではなく生育ステージ別に明確にクラスター化することが分かった。生育ステージごとに再度 PCA を行なうと、いずれの生育ステージにおいても PC1 では実験室酵母と醸造用酵母で分かれ、PC2 では醸造用酵母間で分かれた。PCA の因子負荷量から、それぞれの生育ステージや酵母菌株と相関のある化合物を明らかにした。例えば、K1801 では生育ステージを問わず細胞内に吟醸香であるカプロン酸エチル（ヘキサン酸エチル）前駆体のヘキサン酸が高度に含まれるが、細胞外にもヘキサン酸及びヘキサン酸エチルが他の菌株と比べ高度に含まれることが分かった。また、細胞内のヘキサン酸は対数増殖期から定常期にかけて減少したが、細胞外のそれは対数増殖期から定常期にかけて著しく増加した。タンパク質解析の結果からは、代謝物の変化を説明するような酵母菌株間の特徴が得られた。これらの結果は、出芽酵母のさらなる理解に寄与する基盤的知見となるだけではなく、清酒の品質向上に役立ちうる。

Metabolomics, Yeast, Japanese sake

発表責任者：高橋圭（k.takahashi@nrib.go.jp）

講演番号：2A11a07
講演日時：3 月 26 日 10:46～ センター2 号館 A11 会場

醪中における清酒酵母の圧力不活性化要因の解析
Analysis on factors affecting pressure inactivation of *sake* yeast in moromi mash

○池崎 南[1]、野村 一樹[2]、堀 沙織里[3]、青木 俊夫[4]、栗林 喬[4]、金桶 光起[4]、井口 晃徳[1,3]、重松 亨[1,3]（[1]新潟薬大院・応生科、[2]農研機構 食品研究部門、[3]新潟薬大・応生科、[4]新潟県醸造試験場）
○Minami IKEZAKI[1], Kazuki NOMURA[2], Saori HORI[3], Toshio AOKI[4], Takashi KURIBAYASHI[4], Mithuki KANEOKE[4], Akinori IGUCHI[1,3], Toru SHIGEMATSU[1,3] ([1]Grad. Sch. Appl. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., [2]Food Research Institute, NARO, [3]Appl. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., [4]Niigata Prefectural Sake Research Institute)

【背景】我々は、非熱的に微生物を不活性化させる圧力処理技術を活用し、生酒特有の風味を維持しつつ残存酵母による過発酵を抑制した発泡性にごり生酒 AWANAMA を開発した。本技術では、過発酵の抑制に 400 MPa の圧力処理を用いており、圧力装置コストは処理圧力レベルに依存して増加するため、高圧力の発生可能な処理装置の使用は経済的に好ましくない。そこで低コスト化のため、より低い圧力レベルで不活性化が可能な圧力感受性株の作出を試みた。既報[1)]より好気呼吸能の欠損を指標とし、200 MPa の圧力処理で不活性化する圧力感受性株を作出した[2)]。しかし、実験室規模の醸造醪中では親株も圧力感受性株と同等の不活性化を示した。本研究では、新潟県清酒酵母、実験室酵母及び両株から作出された圧力感受性株を用いて、清酒酵母株が示す圧力不活性化要因の解析を行った。
【方法】新潟県清酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* S9arg 株及び実験室酵母 KA31a 株、両株由来の圧力感受性株 UV1 株（*Δcox1*, *Δcob*）及び a924E1 株（*Δcox1*）を、醪を模したコウジ汁培地で振盪培養（30°C, 48 h）した。次に、圧力不活性化に寄与する要因を圧力不活性化挙動と、培養前後の培地成分を HPLC 等で分析することによって解析した。glucose（Glc）濃度を 2%から 14.6%に調整した YPD 培地における増殖挙動および 200 MPa での不活性化挙動を解析した。
【結果・考察】S9arg 株をコウジ汁培地で培養した結果、醪と同様の不活性化を示したことから、本培地により醪を模した不活性化挙動解析が可能であると考えた。S9arg 株の不活性化要因を解析した結果、高い Glc 濃度が影響を与えている可能性が考えられた。そこで、14.6%Glc-YPD 培地にて S9arg 株を培養し 200 MPa の圧力処理に供した結果、不活性化が認められた。高 Glc 濃度が圧力不活性化を引き起こす要因を解析するため、上記 4 株を 2%または 14.6%Glc-YPD 培地にて培養し、増殖挙動および圧力不活性化挙動を解析した。2%Glc-YPD 培地においては、定常期中の好気呼吸による 2 段階目の増殖（diauxic shift）が両親株で観察され、圧力不活性化が認められなかった。両圧力感受性株は、*Δcox1* によって diauxic shift が観察されず、圧力不活性化が認められた。更に、14.6%Glc-YPD 培地で培養した S9arg 及び UV1 株においても diauxic shift が観察されず、圧力不活性化が認められた。以上の結果により、diauxic shift と圧力感受性の関連性が示唆された。しかし、14.6%Glc-YPD 培地で培養した KA31a 及び a924E1 株は、diauxic shift が観察されなかったにも関わらず、圧力不活性化も示さなかった。現在、高 Glc 濃度, diauxic shift, 圧力不活性化の関連性を解析している。1）Nomura *et al*., J. Food Sci., 2015. 2）池﨑ら：日本農芸化学会 2019 年度大会（4C7a14）

sake yeast, high hydrostatic pressure, diauxic shift

発表責任者：重松亨（shige@nupals.ac.jp）

講演番号：2A11a08
講演日時：3 月 26 日 10:57～ センター2 号館 A11 会場

バリン代謝が変化した新規 *ILV6* 変異酵母のアミノ酸生成能と清酒醸造特性
Characteristics of Saccharomyces cerevisiae with a novel mutation in *ILV6* which affects the ability of L-valine production

○村上 直之[1]、磯貝 章太[2]、蘆田 佳子[2]、小高 敦史[1]、西村 明[2]、松村 憲吾[1]、秦 洋二[1]、石田 博樹[1]、高木 博史[2]（[1]月桂冠・総研、[2]奈良先端大バイオ）
○Naoyuki Murakami[1], Shota Isogai[2], Keiko Ashida[2], Atsushi Kotaka[1], Akira Nishimura[2], Kengo Matsumura[1], Yoji Hata[1], Hiroki Ishida[1], Hiroshi Takagi[2] ([1]Res. Inst., Gekkeikan Sake Co., Ltd., [2]Grad. Sch. Sci. Tech., NAIST)

【背景・目的】分岐鎖アミノ酸（BCAA）は哺乳類にとって必須のアミノ酸であり、筋肉強化、肝機能改善作用などが知られている。BCAA の一つであるバリンは飼料やサプリメント、抗ウイルス薬の原料などに広く用いられ、大腸菌やコリネバクテリウム属細菌を用いた発酵法により生産されている。一方、酒類やパンなどの製造に用いられている産業用酵母でバリンを高生産させることができれば、醸造・発酵食品の高付加価値化が期待できることから、バリンを高生産する清酒酵母の育種を行うこととした。我々はこれまでに、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* におけるアセトヒドロキシ酸合成酵素の調節サブユニットタンパク質 Ilv6 の ACT ドメイン内に保存されているアミノ酸残基を置換することで、同酵素のバリンによるフィードバック阻害感受性が低下し、バリンの生産性が最大で 4 倍に上昇することを報告した[1)]。本研究では、清酒酵母からバリン高生産株を分離し、Ilv6 の ACT ドメイン外に見出した新規なアミノ酸置換がバリン生産性および清酒の醸造特性に及ぼす影響を解析した。
【方法･結果】月桂冠で保存している清酒酵母 GK-7 株をエチルメタンスルホン酸により変異処理し、完全栄養培地で培養した時に、細胞内バリン含量が親株（GK-7 株）と比べ 3.5 倍に上昇した株（GK-7-V7 株）を取得した。GK-7-V7 株の *ILV6* 遺伝子の塩基配列を決定したところ、新規なアミノ酸置換（Ala31Thr）を伴う変異を見出した。次に、実験室酵母 BY4741 株に野生型 Ilv6 または Ala31Thr 置換型 Ilv6（Ilv6（A31T））を発現するプラスミドを導入し、最少培地で簡易発酵試験を行った。その結果、Ilv6（A31T）発現株では細胞内バリン含量が野生型 Ilv6 発現株の 1.3 倍に増加し、Ilv6 内のアミノ酸置換（Ala31Thr）がバリン生合成の強化に寄与することが示唆された。続いて、GK-7-V7 株を用いて総米 50 g の清酒醸造試験を実施したところ、上槽酒中のバリン濃度は親株と比べやや低下していたが、イソブタノールの生産性が 1.5 倍に増加していた。これは Ilv6 内のアミノ酸置換（Ala31Thr）によりバリンの生合成が強化されるとともに、エールリッヒ経路の影響によりバリンからイソブタノールに変換された可能性が考えられた。現在、酵母菌体を多く含む酒粕中のアミノ酸含量についても解析を行っている（本研究は、農研機構生研支援センター「イノベーション創出強化研究推進事業」の支援を受けて実施した）。

1）Natthaporn Takpho et al., *Metab. Eng.*, 46, 60-67, 2018.

Saccharomyces cerevisiae, valine, sake brewing

発表責任者：村上直之（n_murakami@gekkeikan.co.jp）

講演番号：2A11a09
講演日時：3 月 26 日 11:08～ センター2 号館 A11 会場

清酒酵母のフェニルアラニン高含有株に見出した *ARO80* 遺伝子変異の機能解析および清酒醸造への応用
Identification and functional analysis of a novel mutation on the *ARO80* gene in phenylalanine-accumulating Sake yeast and its application to Sake brewing

蘆田 佳子[1]、○豊川 洋一[1]、磯貝 章太[1]、村上 直之[2]、小高 敦史[2]、松村 憲吾[2]、西村 明[1]、秦 洋二[2]、石田 博樹[2]、高木 博史[1] ([1]奈良先端大・バイオ、[2]月桂冠・総研)
Keiko ASHIDA[1], ○ Yoichi TOYOKAWA[1], Shota ISOGAI[1], Naoyuki MURAKAMI[2], Atsushi KOTAKA[2], Kengo MATSUMURA[2], Akira NISHIMURA[1], Yoji HATA[2], Hiroki ISHIDA[2], Hiroshi TAKAGI[1] ([1]Grad. Sch. Sci. Tech., NAIST, [2]Res. Inst., Gekkeikan Sake Co., Ltd.)

【背景・目的】芳香族アミノ酸の一種、フェニルアラニンは、動物にとって必須アミノ酸であり、チロシンを経由してドーパミン・ノルアドレナリンといった神経伝達物質の生合成に利用される。また、様々な食品において、人工甘味料であるアスパルテームの原料として広く利用されている。一方、清酒・醤油等の醸造食品では、醸造に用いられる酵母によってフェニルアラニンがバラ様の香りを示す 2-フェニルエタノールへと代謝されることが知られており、フェニルアラニンはこれらの醸造食品を特徴づける重要な香気成分の原料となる。このような背景のもと、産業用酵母・実験室酵母において、フェニルアラニンの毒性アナログに耐性を示す株から 2-フェニルエタノール高生産株が取得されており、フェニルアラニン生産量の増加によって、香気成分が増加することが示されている。本研究は、高付加価値な清酒の醸造への応用を目的として、フェニルアラニンを高生産する清酒酵母を育種するとともに、フェニルアラニン高生産機構を解明することを目的とした。
【方法・結果】実用清酒酵母株に対して、エチルメタンスルホン酸により突然変異を導入し、フェニルアラニンの毒性アナログ（*p*-フルオロ-DL-フェニルアラニン : PFP）を用いたスクリーニングにより PFP 耐性変異株を複数分離した。各株の細胞内アミノ酸含量を測定し、フェニルアラニン含量が親株の 2.7 倍に増加した株（F39 株）を取得した。F39 株の簡易発酵試験を行った結果、親株と同等の発酵力を示したことから、実際の清酒醸造に使用可能であることが示唆された。次に、F39 株について、全ゲノム解析を行いフェニルアラニン高生産に寄与する遺伝子変異を同定するとともに、実際に清酒醸造（小仕込み試験）を行った。その結果、F39 株ではフェニルアラニン代謝酵素（Aro9, Aro10）遺伝子の転写活性化を担う Aro80 をコードする遺伝子（*ARO80*）に新規のアミノ酸置換（His309Gln）を伴う変異を見出した。次に、この変異を有する F39 株に野生型 *ARO80* を導入したところ、細胞内フェニルアラニン含量が 30%減少した。したがって、F39 株では *ARO80* に導入された変異によって Aro80 の転写活性化能が低下し、フェニルアラニン代謝が抑制されたため、フェニルアラニン含量が増加したことが示唆された。さらに、F39 株を用いた小仕込み試験の結果、高精白米（精米歩合 45%）を用いて醸造することで、親株と比較して上槽酒中のフェニルアラニン含量が 2 倍に増加し、*ARO80* の変異が醸造環境下においてもフェニルアラニン高生産に寄与することが示された（本研究は、農研機構生研支援センター「イノベーション創出強化研究推進事業」の支援を受けて実施した）。

Saccharomyces cerevisiae, Phenylalanine, Sake brewing

発表責任者：高木博史（hiro@bs.naist.jp）

講演番号：2A11a10
講演日時：3 月 26 日 11:19～ センター2 号館 A11 会場

清酒酵母におけるプロリン高生産株の育種と新規なγ-グルタミルキナーゼ変異体の機能解析

Breeding of proline accumulating Sake yeast and functional analysis of a novel glutamyl kinase variant found in the breeding strain

○磯貝 章太[1]、豊川 洋一[1]、小高 敦史[2]、高崎 友里恵[1]、蘆田 佳子[1]、村上 直之[2]、松村 憲吾[2]、西村 明[1]、秦 洋二[2]、石田 博樹[2]、高木 博史[1] ([1]奈良先端大・バイオ、[2]月桂冠・総研)
○Shota Isogai[1], Yoichi Toyokawa[1], Atsushi Kotaka[2], Yurie Takasaki[1], Keiko Ashida[1], Naoyuki Murakami[2], Kengo Matsumura[2], Akira Nishimura[1], Yoji Hata[2], Hiroki Ishida[2], Hiroshi Takagi[1] ([1]Grad. Sch. Sci. Tech., NAIST, [2]Res. Inst., Gekkeikan Sake Co., Ltd.)

【背景・目的】 清酒およびその副産物である酒粕の高付加価値化を目的に、酵母を育種することで様々な酒質の清酒を醸造する取り組みが行われている。プロリンは甘味を示すアミノ酸であるとともに、保湿性や抗酸化作用などの生理機能を有することが知られており、プロリン含量が増加した清酒や酒粕を開発できれば、製品の高付加価値化や差別化に繋がることが期待される。酵母*Saccharomyces cerevisiae*において、プロリンの生合成はγ-グルタミルキナーゼPro1の活性がプロリンによるフィードバック阻害を受けることで制御されている。我々はこれまでにPro1内のアミノ酸置換（D154N, I150T, E149Kなど）によりフィードバック阻害感受性が低下し、細胞内プロリン含量が増加することを見出した。また、これらのPro1変異体を発現しプロリン含量を増加させた酵母は様々なストレスに対して耐性を示し、発酵能やエタノール生産性が向上することを報告してきた。このように、プロリン高含有が醸造特性に与える影響や高含有機構を解析することで、プロリンの新たな代謝制御機構や生理機能への理解が深まると考えられる。そこで本研究では、清酒酵母のプロリン高含有株を育種し、高含有機構を明らかにするとともに、醸造特性を解析することを目的とした。
【方法・結果】 協会9号酵母に突然変異処理を施し、プロリンの毒性アナログ（アゼチジン-2-カルボン酸；AZC）に耐性を示す複数の変異株を分離した。変異株の*PRO1*遺伝子配列を解析したところ、新規のアミノ酸置換（Q79H）を伴う変異を見出した。様々な生物由来のγ-グルタミルキナーゼにおいて79残基目のグルタミンは極めて高く保存されており、ホモロジーモデリングにより予測したPro1の立体構造モデルにおいても、アミノ酸置換が導入された既知の残基（Glu149やIle150）と同様にGln79はPro1の活性中心近傍に位置していた。以上のことから、変異株ではQ79Hの置換によりPro1のフィードバック阻害感受性が低下した結果、プロリンが高生産されたことでAZC耐性を獲得したと推測した。
　そこで、野生型およびQ79H置換型の組換えPro1を用いて解析を行った結果、野生型Pro1では5 mMプロリン存在下で活性が約20%に低下した。一方、Q79H置換型Pro1は100 mMプロリン存在下においても約90%の活性を保持しており、Q79Hの置換によってフィードバック阻害非感受性となることが示された。さらに、Q79H置換型Pro1を有する変異株を用いて清酒小仕込み試験を行った結果、変異株を用いて醸造した上槽酒中のプロリン含量が親株と比べ約4.4倍に増加し、醸造環境下においてもPro1のQ79H置換がプロリン高生産に寄与することが実証された（本研究の一部は、農研機構生研支援センター「イノベーション創出強化研究推進事業」の支援を受けて実施した）。

proline, *Saccharomyces cerevisiae*, γ-glutamyl kinase

発表責任者：磯貝　章太（s-isogai@bs.naist.jp）

講演番号：2A11a11
講演日時：3 月 26 日 11:40～ センター2 号館 A11 会場

花から分離した野生酵母の糖資化能が清酒の味に及ぼす影響

Ability of *Saccharomyces cerevisiae* MC87-46 to assimilate isomaltose and its effects on sake taste

○堤 星太郎[1]、家田 明音[1]、酒井 杏匠[1]、三井 俊[2]、伊藤 彰敏[2]、志水 元亨[1]、加藤 雅士[1]([1]名城大院・農、[2]あいち産業科学技術総合センター・食品工業技術センター)
○Seitaro TSUTSUMI[1], Akane IEDA[1], Kiyota SAKAI[1], Shun MITUI[2], Akitoshi ITO[2], Motoyuki SHIMIZU[1], Masashi KATO[1] ([1]Meijo Univ., [2]Food Research Centre, Aichi Centre for Industry and Science Technology)

【目的】
近年、国内の清酒の消費量は減少しており、新たな特徴を付与した清酒の開発が求められている。我々は名城大学附属農場の花 (カーネーション) から *Saccharomyces cerevisiae* MC87-46 株を分離し、清酒の醸造に用いることで、従来の清酒とは異なる香味を持つ清酒『華名城 (はなのしろ) 』を開発した。本研究では、野生酵母 MC87-46 と一般的な清酒醸造用酵母である協会酵母 901 号 (K901) を用いて製造した清酒の成分を比較し、それぞれの酵母の糖資化能の違いが清酒の香味に及ぼす影響を明らかにした。
【方法および結果】
本学附属農場のカーネーションから分離した *S. cerevisiae* MC87-46 株を用いて清酒の小仕込み試験を行った。醸造した清酒中の還元糖量を還元糖分析用 HPLC により解析したところ、MC87-46 を用いた清酒中には K901 を用いた清酒に比べて 25 倍のイソマルトースが含まれていた。酵母の発酵に伴うイソマルトース量の変化を調べるため、麹菌による米糖化液を調製後、各酵母を用いた発酵液中のイソマルトース濃度を経時的に測定した。米糖化液中のイソマルトース濃度は 46 mM であったが、K901 を加えると 18 日後には 9.0 mM まで減少した。一方 MC87-46 を加えた場合、イソマルトース濃度はほとんど減少しなかった。MC87-46 のイソマルトースの資化性が極めて低いことが示唆された。そこで、グルコース、イソマルトースを唯一の炭素源として K901 と MC87-46 をそれぞれ培養したところ、グルコースではどちらの株も同程度生育したが、イソマルトースを炭素源とした場合 MC87−46 はほとんど生育しないことが示された。イソマルターゼの発現を調べるため、*S. cerevisiae* のゲノム上に存在するイソマルターゼ遺伝子 (*ima1 – 5*) の転写量を解析した。グルコースと比較して、K901 の *ima1 – 5* はそれぞれイソマルトース応答的にそれぞれ 240、2.5、8.5、8.5、2.4 倍転写量が増加した。一方、MC87-46 ではイソマルトースによって *ima1 – 5* はほとんど誘導されなかった。
以上のことから、 MC87-46 は *ima1 – 5* の転写が誘導されないためイソマルトース資化能が低く、その結果 MC87-46 を用いて製造した清酒にはイソマルトースが多く含まれることが結論された[1)]。

1) Tsutsumi, S, *et al* (2019), Sci Rep, **9**, 13908.

Saccharomycess cereviciae strain MC87-46, Isomaltose, Japanese sake

講演番号：2A11a12
講演日時：3 月 26 日 11:51～ センター2 号館 A11 会場

ブドウ果皮常在酵母の同定とワイン醸造における役割

Identification of yeasts resident in grape skin and the roles on winemaking

○渡辺 大輔、橋本 渉（京大院農）
○Daisuke WATANABE, Wataru HASHIMOTO (Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

醸造微生物の起源について未だに多くの謎が残されている。最も単純なアルコール発酵形式である単発酵により造られるワインは先史時代から存在しており、ブドウ果皮上に天然に存在する微生物の作用でワインが生まれたのだろうと推察されている。ところが、アルコール発酵に適した酵母である *Saccharomyces cerevisiae* やその近縁種が発酵前のブドウ果皮に存在していることを示す報告事例は数少ない。本研究では、ブドウ果皮常在酵母の解析を通して、自然発酵によりワインが誕生したプロセスに関する知見を得ることを目的とした。

ブドウ果皮常在酵母を単離するため、複数の食用・ワイン用ブドウ品種を用いて試料を調製した。具体的には、①皮付きブドウ果実を搾汁することで得られる果汁、②皮付きブドウ果実を蒸留水中で振盪することで得られる洗浄液、③皮付きブドウ果実を蒸留水中に浸漬し静置培養することで得られる集積培養液を用いた。これらの液体試料をクロラムフェニコール含有培地に塗布し、酵母様のコロニーを単離した。現在までに、80 個以上のクローンについて rRNA 遺伝子間の ITS（internal transcribed spacer）領域のシーケンス解析を完了した。その結果、酵母様真菌（*Aureobasidium pullulans*）、担子菌酵母（*Sporidiobolus* 属、*Rhodotorula* 属、*Cryptococcus* 属など）、子嚢菌酵母（*Hanseniaspora uvarum*、*Torulaspora delbrueckii*、*Candida* 属、*Pichia* 属など）を同定することができた。一方、*Saccharomyces* 属酵母は検出されなかった。このことから、*S. cerevisiae* および近縁種は、発酵前のブドウ果皮にほとんど存在しておらず、今回単離されたようなブドウ果皮常在酵母の働きにより、アルコール発酵に適した酵母の生育環境が整えられる可能性が示唆された。

酵母がブドウ果実中の発酵しやすい炭素源にアクセスするためには、まず、果皮最外殻のクチクラ層を通過しなければならない。クチクラ層の主成分は、脂肪酸のポリエステルであるクチンであり、クチナーゼにより加水分解される。このクチナーゼは、貴腐の原因菌である *Botrytis cinerea* や麹菌 *Aspergillus oryzae* などの醸造に関連する糸状菌から主に同定されており、醸造微生物と原材料植物の相互作用における初発反応を引き起こす上で重要な役割を果たすのではないかと推察される。本研究において同定されたブドウ果皮常在酵母のうち、*A. pullulans* がクチナーゼ様タンパク質をコードする遺伝子を複数有することが明らかになった。今後、この遺伝子産物のクチナーゼ活性と発現調節に関して調べると共に、*A. pullulans* によるクチンの分解がワインの自然発酵の誘発に関与する可能性について解析を進めていく。

grape skin, yeast, cutinase

発表責任者：橋本 渉（whasimot@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2A11p01
講演日時：3 月 26 日 13:50～ センター2 号館 A11 会場

アンズの花からの新規清酒製造用酵母の分離
Isolation of yeast for brewing *sake* from apricot blossoms
○野地 秀和[1]、本間 裕人[2]、徳田 宏晴[2]、数岡 孝幸[2] ([1]東農大院農、[2]東農大応生)
○Hidekazu NOJI[1], Hiroto HOMMA[2], Hiroharu TOKUDA[2], Takayuki KAZUOKA[2] ([1]Grad. Sch. Agric.,Tokyo Univ. of Agric., [2]Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. of Agric.)

【目的】清酒製造用酵母として、日本醸造協会から頒布されているきょうかい酵母が広く用いられている。きょうかい酵母は、醪からの分離や育種によって取得された優れた醸造特性を有している酵母である。一方で、近年の消費者の嗜好の多様化に伴い、酒質の多様化が求められている。それに対応するため、新規清酒製造用酵母の分離や既存酵母からの育種が試みられている。本研究では新規清酒製造用酵母の分離、同定と分離酵母の醸造特性解明を目的としている。

【方法】麹汁に麹菌が生産する抗菌物質 Yeastcidin を添加した集積培地（K1 培地)、ビタミン類を含まない合成培地に Yeastcidin を添加した集積培地（B1 培地）の 2 種の培地を調製した。それぞれに分離源となる花を添加し、25℃で培養を行った。培地の糖度が下がり、発泡性が見られた集積培養液から純粋分離を試みた。取得した菌株の産膜性、TTC 還元性、Yeastcidin 耐性を調べた。その後、乾燥麹とα化米を用いた総米 150g 相当の小規模発酵試験を 13℃で 25 日間培養を行い、日本酒度、アルコール濃度を基準に発酵力の強い株を選抜した。選抜株を用いて総米 500g の清酒の小仕込み（麹歩合 23%、汲水歩合 150%）を行なった。仕込みでは初添 15℃、仲添 10℃、留添 8℃、醪最高温度を 14℃とし、醪日数 15 日目以降は徐々に 10℃まで下げた。醪育成中は、週 2 回アルコール濃度を、週 1 回ボーメ、総酸度、アミノ酸度の測定を行った。

【結果】色が異なる 3 種のアンズの花それぞれを 2 種の集積培地に添加して集積培養行った。その結果、K1 培地から 30 株、B1 培地から 20 株、合計 50 株を純粋分離することができた。それら分離株に対して産膜性を調査したとこと、K1 培地から取得された分離株のうち 25 株が産膜性を示さず、B1 培地では 20 株が産膜性を示さなかった。それら産膜性を示さなかった分離株の TTC 染色性を調べたところ、染色性 RED の株を K1 培地で 25 株、B1 培地で 14 株分離することができた。染色性 RED であった分離株 37 株を用いて小規模発酵試験を行った。醪濾液の分析を行ったところ、対照株として用いたきょうかい 9 号酵母では日本酒度+11.15、アルコール濃度 18.27%であった。分離株については、K1 培地由来の 20 株と B1 培地由来の 6 株が小規模発酵試験において高いアルコール発酵性を示した。これら 26 株の中から、異なる色の花由来、異なる集積培地由来の分離株を 7 株選び、それらを用いて清酒の小仕込みを行ったので、その結果についても報告する。

Sake yeast, Sake

発表責任者：数岡孝幸（t3kazuok@nodai.ac.jp）

講演番号：2A11p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ センター2 号館 A11 会場

藤の花からの清酒醸造用野生酵母の単離と育種
Isolation and breeding of sake yeast from wisteria flower in Niigata
○鈴木 聖袈[1]、鈴木 雅史[1]、栗林 喬[3]、佐藤 圭吾[3]、武内 沙樹[2]、菖池 陽平[2]、杉本 華幸[1,2]、金桶 光起[3]、鈴木 一史[1,2] ([1]新潟大院・自然研、[2]新潟大・農、[3]新潟県醸造試験場)
○Seika SUZUKI[1], Masashi SUZUKI[1], Takashi KURIBAYASHI[3], Keigo SATO[3], Saki TAKEUCHI[2], Yohei SHOCHI[2], Hayuki SUGIMOTO[1,2], Mituoki KANEOKE[3], Kazushi SUZUKI[1,2] ([1]Grad. Sch. Sci. and Tech., Niigata Univ., [2]Fac. Agr., Niigata Univ., [3]Niigata Prefectural Sake Research Institute)

清酒醸造において、酵母は清酒の香味を特徴付ける重要な因子の１つである。清酒醸造では、(財)日本醸造協会が全国の酒造場に頒布するきょうかい酵母が使われる場合が多い一方で、近年は各地の自然界から分離した酵母を使用し、地域のブランド酒を開発することが全国的に注目されている。これは酒類の多様化や人口減少による清酒消費量の更なる減少が危ぶまれる中、付加価値を与え、新たな需要を得ることを期待してのことである。

我々は、新潟県新潟市江南区にある北方文化博物館の藤の花から酵母の分離を試みた。北方文化博物館には樹齢 150 年、80 畳の新潟県最大の大藤棚があり、毎年県内のみならず、全国および海外から多くの観光客が訪れる。この大藤棚から、咲き始め、満開、散り始めの時期に、約 3770 の花のサンプリングを行い、嫌気状態下の YPD 培地で培養した。そのうち、満開時のサンプルからのみ 1 株の *Saccharomyces cerevisiae* を得た。

分離した酵母（藤の花酵母）を使用し、小仕込み試験を行なったところ、清酒醸造に十分なアルコール発酵力を有していないことがわかった。

アルコール発酵力の向上のため、新潟県の清酒酵母である G9-NF との育種により F1 を得た。育種後は野生酵母のみ持つことが知られている、*pho3* 遺伝子を指標として株の選択を行った。藤の花酵母、F1 を使用し、小仕込み試験を行なったところ、F1 のアルコール発酵力は藤の花酵母と比較して 23%上昇した。

更なるアルコール発酵力の向上のために、F1 と G9-NF で育種を行い、F2 を得た。育種後の株の選択は F1 取得の際と同様に行った。藤の花酵母、F2 を使用し、小仕込み試験を行なったところ、F2 のアルコール発酵力は藤の花酵母と比較して 158%上昇した。

更なるアルコール発酵力の向上のために、F2 と G9-NF、同じく新潟県の清酒酵母である G74-NF で育種を行い、F3-G9、F3-G74 を得た。育種後の株の選択は F1、F2 取得の際と同様に行った。きょうかい 7 号酵母、F3-G9、F3-G74 を使用し、小仕込み試験を行なったところ、きょうかい 7 号酵母と比較して F3-G9 は 86%、F3-G74 は 96%のアルコール発酵力を有していることがわかった。

Saccharomyces cerevisiae, wild yeast, sake yeast

講演番号：2A11p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ センター2 号館 A11 会場

近畿大学構内の花からの酵母の分離及び醸造特性の解析

Isolation of sake yeast strains from flowers in Kindai university and analysis of their fermentation profiles

○松尾 啓史[1]、笠行 康葉[1]、高崎 友里恵[1]、堂本 有美華[1]、清水 浩美[2]、大橋 正孝[2]、都築 正男[2]、首藤 明子[2]、倉田 淳志[1]、上垣 浩一[1]([1]近畿大農、[2]奈良県産振セ)
○Yoshifumi MATSUO[1], Yasuha KASAYUKI[1], Yurie TAKASAKI[1], Yumika DOMOTO[1], HIROMI SIMIZU[2], MASATAKA OHASHI[2], Masao TUZUKI[2], Akiko SHUTO[2], Atsushi KURATA[1], Koichi UEGAKI[1] ([1]Kindai Univ., [2]NIID)

【目的】

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は清酒・ワイン・ビールといった様々な酒造りに利用されている。例えば、日本醸造協会が分譲している“きょうかい酵母”は実験室酵母と比べ、アルコール産生能が高く、吟醸香が高いので清酒製造によく利用されている。アルコール産生能や芳香産生能力などの特徴は酵母株ごとに異なっており、醸造に用いる酵母の違いは酒質に大きく関わってくる。
そこで、我々は、既存の醸造用酵母とは異なった特色を持つ酵母を得ることを目標に、近畿大学構内の花から酵母の分離を行った。その後分離酵母の生理学特性解析、遺伝子解析及び発酵特性解析を行った。

【方法、結果】

酵母の選抜は、米麹汁培地を用いて、下記の手順で行った。選抜培地で増殖がみられたものを WL Nutrient 寒天培地に塗抹しコロニーの形状観察し、酵母様のものをさらに糖資化能テストを行った。さらに、酵母候補微生物の 26s/28S rRNA の D1/D2 領域の配列を調べ *S.cerevisiae* であることを確認した。その結果、春の花々から 6 株、秋の花々から 15 株、計 21 株の酵母を分離することができた。*S.cerevisiae* と同定した 21 株はキラー性試験、ＴＴＣ染色、糖資化能といった生理的特性及び *AWA1* 遺伝子・YLRW delta20 の断片長による遺伝的特徴を比較した。キラー性試験では 21 株すべてにおいてきょうかい酵母 K901 に対してキラー性がないことが確認できた。またＴＴＣ染色の結果いくつかの株は協会酵母に近い赤色を呈し、高いアルコール発酵を持つことが示唆された。春の分離酵母間では近い糖資化能を示したが、秋の分離酵母間では幾つかの炭素源で異なる糖資化能を示した。分離酵母の *AWA1* 遺伝子・YLRW delta20 のＰＣＲ産物はきょうかい酵母 K701 や K901 とは異なる断片長を示した。分離した酵母を用いて清酒小仕込み試験を行った。得られた清酒のアルコール濃度を比較したところ、いくつかの分離酵母ではきょうかい酵母 K701 や K901 と同等であった。また、有機酸組成を比較したところ、株によってはピルビン酸・酢酸の含有量に大きな違いが見られた。

Saccharomyces cerevisiae, fermentation profiles, natural yeast

講演番号：2A11p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ センター2 号館 A11 会場

大麦麦芽から分離した「とやま産まれの酵母」による実地醸造と清酒醸造特性

Characterization of a wild Sake-brewing yeast isolated from barley malt in Toyama

○尾仲 宏康[1]、丸山 潤一[1]、浅水 俊平[1]、山田 雅人[2]、五島 徹也[3]、赤尾 健[3]([1]東大院農生科、[2]成政酒造、[3]酒総研)
○ Hiroyasu ONAKA[1], Jyun-ichi Maruyama[1], Shumpei Asamizu[1], Masato Yamada[2], Tetsuya Goshima[3], Takeshi Akao[3] ([1]The Univ of Tokyo, [2]Narimasa Brewing, [3]Nat Res Inst of Brewing)

【目的】清酒醸造においては、日本醸造協会が頒布するきょうかい清酒酵母が主に使用されている。これらに共通した特徴は、醪等の清酒発酵環境から分離・選抜された優良株ということにある。しかし、優良菌株の数やバリエーションは必ずしも多くはなく、系統分類的にも極めて狭い一群に属した酵母であることが明らかになっている。そのため、きょうかい清酒酵母による品質の劇的な差別化は容易ではない。一方で 2000 年頃より、自然環境中からの酵母の分離と酒類製造への利用についての報告が散見されるようになってきた。それらにおいて酵母の分離源としては、各種の花や土壌などである。こうした自然環境由来の野生酵母を用いる目的としては、従来の優良酵母を利用した製品との品質面での差別化や、分離源や地域のポジティブなイメージ付与によるブランド価値向上などが挙げられる。本研究では、富山県産の酒類の付加価値の向上を目的として、富山県産の果実及び大麦麦芽から新規の酵母の分離を試み、酒類製造への利用が可能な *Saccharomyces cerevisiae* に属する 1 菌株を得、実地醸造まで達成したことを報告する。合わせて、本菌株の清酒醸造特性についても報告する。
【方法・結果】富山県高岡市産六条大麦麦芽より醸造に適した「とやま産まれの酵母」を分離した。本菌株は ITS 領域解析の結果、*Saccharomyces cerevisiae* NBRC2114 (Kotobukiya whisky No. 1)に最も近い配列を有することが明らかとなった。清酒小仕込み試験による醸造特性解析の結果、とやま産まれの酵母のもろみ日数はきょうかい清酒酵母 K701 よりも 3 日長くなったものの、両者の到達アルコール濃度はほぼ同じ 18%であった。K701 と比較し、有機酸組成では酢酸、リンゴ酸、コハク酸の含有量が顕著に異なっており、揮発性物質では高級アルコール含量が高く、エステル類の含量が低かった。アミノ酸度はとやま酵母の方が顕著に高かった。これらの性質が官能特性評価にも現れており、K701 に比較して、酸味の違いや、旨み、重い、雑味などの味の多さに特徴がある個性的な酒質であった。とやま産まれの酵母による実地醸造は成政酒造株式会社にて、これまでに 7 回行われており、試行錯誤の末、現在では比較的濃醇でキレのある酒質となっている。また、本酵母は野生酵母で特定の酒類醸造に特化した育種もなされていないため、富山県地域のクラフトビール、ワイン、ウイスキーの醸造にも利用されるに至っている。
【参考文献】日本醸造協会誌（醸協）第 114 巻 10 号 645-653(2019)

Wild yeast, Saccharomyces cerevisiae, Sake brewing

発表責任者：尾仲宏康（aonaka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A12a01
講演日時：3 月 26 日 09:30～ センター2 号館 A12 会場

メタノール資化性菌での代替経路による C1 化合物資化に向けた代謝改変
Metabolic engineering of methylotrophic bacteria for construction of alternative pathway for assimilation of C1 compounds
平林 翼[1]、○折田 和泉[1]、新田 克章[2]、中村 聡[1]、福崎 英一郎[2]、福居 俊昭[1] ([1]東工大生命理工、[2]阪大院工)
Tsubasa HIRABAYASHI[1], ○Izumi ORITA[1], Katsuaki NITTA[2], Satoshi NAKAMURA[1], Eiichiro FUKUSAKI[2], Toshiaki FUKUI[1] ([1]Tokyo Tech., [2]Osaka Univ.)

【背景と目的】
メタノール資化性菌 *Methylorubrum extorquens* はメタノールを酸化したギ酸をセリン回路によって固定し、C_1 受容体であるグリオキシル酸をエチルマロニル-CoA (EMC) 経路によって再生する。すなわち、セリン回路-EMC 経路は本菌のメタノール中央代謝経路として機能する。EMC 経路上には微生物産生の生分解性プラスチックであるポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) の前駆体となる CoA チオエステルが存在するが、これを PHA 生産に利用するとメタノール生育能が著しく低下する。本研究では、メタノール生育と有用物質生産を両立させるために、セリン回路-EMC 経路に依存しない代替 C_1 資化経路を *M. extroquens* に構築することを目指した代謝改変を行った。
【方法と結果】
代替 C_1 資化経路としてホルムアルデヒドをリブロース-5-リン酸 (Ru5P) に固定するリブロースモノリン酸 (RuMP) 経路に着目した。EMC 経路の鍵酵素遺伝子を破壊することでメタノール生育能が欠失した株にメタノール資化性菌 *Mycobacterium gastri* に由来する RuMP 経路の２つの鍵酵素 3-ヘキスロース-6-リン酸シンターゼ (HPS)、6-ホスホ-3-ヘキスロイソメラーゼ (PHI) の融合酵素遺伝子をプラスミドベクターで導入した。その結果、組換え株において有意な HPS-PHI 活性を検出したがメタノール単一炭素源では生育しなかった。この組換え株をメタノール培地で振とうしてメタボローム解析に供したところ、コントロール株と比較して各種鎖長の糖リン酸の細胞内濃度が顕著に低く、RuMP 経路を維持するためのペントースリン酸の再生が不十分であることが予想された。そこで糖リン酸相互変換促進のために非酸化的ペントースリン酸強化株を作製した。また、メタボローム解析において糖リン酸相互変換の初発物質であるグリセルアルデヒド-3-リン酸 (GAP) がコントロール株においても検出されなかったことから、GAP の不足が糖リン酸濃度が低い原因となっていることが推測された。そこでヘキソースリン酸から GAP への変換を強化するために Entner-Doudoroff 経路上の遺伝子の発現株を作製した。これまでのところ、いずれの組換え株もメタノール単一炭素源での生育能は示していないが、培地中のメタノール消費量の増加が観察された。現在、作製した組換え株のメタボローム解析を進めている。

Methanol, M. extorquens, Metabolomic analysis

発表責任者：折田和泉（iorita@bio.titech.ac.jp）

講演番号：2A12a02
講演日時：3 月 26 日 09:41～ センター2 号館 A12 会場

水素細菌およびメチロトローフにおける転写制御スイッチの確立

Establishment of transcriptional switch in hydrogen-oxidizing and methylotrophic bacteria

平山 歩夢[1]、折田 和泉[1]、中村 聡[1]、梅野 太輔[2]、○福居 俊昭[1] ([1]東工大生命理工、[2]千葉大院工)
Ayumu Hirayama[1], Izumi Orita[1], Satoshi Nakamura[1], Daisuke Umeno[2], ○Toshiaki Fukui[1] ([1]Tokyo Tech., [2]Chiba Univ.)

【目的】

微生物による有用物質の効率的生産には物質生産方向と細胞増殖方向の代謝フラックス制御が重要である。一方、近年の合成生物学研究では野生型 (WT) リプレッサーを用いて誘導剤添加により標的遺伝子の転写を誘導する ON スイッチに加え、逆表現型 (RP) の変異リプレッサーを用いて転写を抑制する OFF スイッチが開発されている。

微生物が生産するポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) はその高い生分解性から環境調和型高分子材料として期待されている。PHA 生産代謝においても転写スイッチによる制御は有効と考えられるが、PHA 生産菌で使用できるツールは開発途上である。本研究では PHA を多量に蓄積する水素細菌 *Ralstonia eutropha*、メタノールから PHA を生産するメチロトローフ *Methylorubrum extorquens* で機能する転写制御スイッチの確立を目指した。

【方法】

GFP 発現ベクターの *gfp* 上流にオペレーターを挿入し、リプレッサー遺伝子 (WT または RP) を導入した。リプレッサーは *Escherichia coli* 由来のコリン誘導性 BetI とアンヒドロテトラサイクリン (aTc) 誘導性 TetR を使用し、Bet ON/Bet OFF スイッチおよび Tet ON/Tet OFF スイッチを作製した。形質転換体は誘導剤非添加条件と添加条件で培養し、GFP 蛍光強度から発現制御を評価した。

【結果】

R. eutropha に Bet ON スイッチを導入した株では、*E. coli* 由来のコリン特異的トランスポーターを共発現させることでコリン添加による GFP の発現誘導が観察された。Tet ON スイッチではリプレッサー遺伝子の配置が異なる複数の構成について検討したところ、*Klebsiella aerogenes* 由来のテトラサイクリン耐性遺伝子群を用いて構築した Tet ON スイッチにおいて aTc 添加による発現誘導が良好であった。

M. extorquens に Tet ON スイッチおよび Bet OFF スイッチを導入した株では、誘導剤添加に伴う GFP の発現誘導と発現抑制がそれぞれ観察された。一方で、Bet ON スイッチではコリン添加に伴う発現誘導が見られなかったが、オペレーター配列にランダム変異を導入したライブラリーから、BetI(WT)との親和性が低下することで機能する Bet ON スイッチの取得に成功した。

Transcriptional switch, Ralstonia eutropha, Methylorubrum extorquens

発表責任者：福居俊昭（tfukui@bio.titech.ac.jp）

講演番号：2A12a03
講演日時：3 月 26 日 09:52～ センター2 号館 A12 会場

フラックスバランス解析を活用した油脂酵母の油脂生産性の改良
Improvement of oleaginous yeast using flux balance analysis for enhancement of lipid productivity
○寺澤 大輝[1]、白井 智量[2]、松田 史夫[3]、油谷 幸代[4,5]、荒 学志[7]、山崎 晴丈[1]、志田 洋介[6]、小笠原 渉[6]、矢追 克郎[5]、荒木 秀雄[7]、高久 洋暁[1]([1]新潟薬大・応生科、[2]理研・CSRS、[3]阪大院・情報科学、[4]産総研・CBBD-OIL、[5]産総研・生物プロセス、[6]長岡技科大・工、[7]不二製油グループ本社株式会社)
○Hiroki TERASAWA[1], Tomokazu SHIRAI[2], Humio MATSUDA[3], Sachiyo ABURATANI[4,5], Satoshi ARA[7], Harutake YAMAZAKI[1], Yosuke SHIDA[6], Wataru OGASAWARA[6], Katsuro YAOI[5], Hideo ARAKI[7], Hiroaki TAKAKU[1] ([1]Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., [2]Riken. Cen. Sus. Res. Sci., [3]Osaka. Univ. Sci. Tech., [4]AIST. CBBD-OIL, [5]AIST., [6]Nagaoka Univ. Tech., [7]FUJI OIL HOLDINGS INC.)

【目的】近年、世界人口の増加やエネルギー問題などにより、油脂需要は増加している。しかし、日本の油脂自給率は他の先進国と比較して極めて低く、国内で消費されている油脂の大半を輸入に頼っている。それゆえ、国内の油脂は世界情勢の変化や自然災害による価格変動に左右されており、日本独自の油脂生産方法の確立が必要である。本研究で扱っている油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* は、様々な糖を資化し、乾燥菌体重量の約 85%以上も細胞内に脂肪球という形で油脂を蓄積可能であるが、本酵母の産業活用への課題は油脂生産性の向上である。そこで我々は油脂（トリアシルグリセロール）の構成成分の脂肪酸合成促進が油脂生産性向上に繋がると考え、脂肪酸を目的関数としてフラックスバランス解析(FBA)による強化反応系の抽出、改変により、*L. starkeyi* の油脂生産性を向上させることを目的とした。

【方法】*L. starkeyi* のゲノムスケールモデルを構築し、脂肪酸を目的関数とし、脂肪酸を最大生産するように FBA を行った結果、強化すべき反応系として、脂肪酸伸長に必須である NADPH の供給系が抽出された。その NADPH 供給強化法として、①ペントースリン酸経路の強化、②NADP 依存型グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)、NADP 依存型リンゴ酸酵素(ME)の活用を考案した。NADPH 供給の強化に繋がるペントースリン酸経路の改変として、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子(*LsZWF1*)、6-ホスホグルコノラクトナーゼ(*LsSOL3*)、ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ(*LsGND2*)の高発現株Δ*lslig4*/HE*LsZWF1/LsSOL3/LsGND2* を作製した。また、NADP 依存型 GAPDH として *Kluyveromyces lactis* の *GDP1* 遺伝子、NADP 依存型 ME として *Muccor cicinelloides* の *MCE2* 遺伝子をそれぞれ *L. starkeyi* へ導入した高発現株を作製した。

【結果・考察】Δ*lslig4*/HE*LsZWF1/LsSOL3/LsGND2* 株の油脂生産性は向上しなかったが、*GDP1* 遺伝子高発現株Δ*lslig4*/HE*GDP1* 及び *MCE2* 遺伝子高発現株Δ*lslig4*/HE*MCE2* の油脂生産性は野生株と比較して、約 1.5 及び約 1.1 倍向上した。特に油脂生産性が大きく向上した Δ*lslig4*/HE*GDP1* 株の細胞内 NADPH/NADP 比を測定した結果、約 1.5 倍上昇し、補酵素の細胞内濃度が変化していた。すなわち、NADPH の供給は、*L. starkeyi* の油脂生産における律速段階の 1 つであると考えられた。
本研究は NEDO「植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発」の支援を受けて行われた。

Oleaginous yeast, *Lipomyces starkeyi*, Flux Balance Analysis

発表責任者：高久洋暁（htakaku@nupals.ac.jp）

講演番号：2A12a04
講演日時：3 月 26 日 10:03～ センター2 号館 A12 会場

比較ゲノム解析による油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の新規油脂蓄積制御因子の同定とその機能解析

Identification and functional analysis of a novel lipid accumulation regulatory factor of oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* using comparative genome analysis

○風間 春香[1]、森 一樹[2]、油谷 幸代[3,4]、荒 学志[6]、山崎 晴丈[1]、志田 洋介[5]、小笠原 渉[5]、矢追 克郎[4]、荒木 秀雄[6]、田代 康介[7]、高久 洋暁[1]([1]新潟薬大・応生科、[2]鹿児島高専、[3]産総研・CBBD-OIL、[4]産総研・生物プロセス、[5]長岡技科大・工、[6]不二製油グループ本社、[7]九州大・院生資源・遺伝子制御)

○ Haruka KAZAMA[1], Kazuki MORI[2], Sachiyo ABURATANI[3,4], Satoshi ARA[6], Harutake YAMAZAKI[1], Yosuke SIDA[5], Wataru OGASAWARA[5], Katsuro YAOI[4], Hideo ARAKI[6], Kosuke TASHIRO[7], Hiroaki TAKAKU[1] ([1]Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., [2]Natl. Inst. Tech., Kagoshima Coll., [3]AISTCBBD-OIL, [4]AIST, [5]Nagaoka Univ. Tech., [6]FUJI OIL HOLDINGS INC., [7]Kyushu Univ., Fac., Agri., Mol.Gene Tech.)

近年、世界人口の増加や食生活の変化、バイオ燃料の使用増加に伴い、油脂の需要が増え続けているが、日本の油脂自給率は主要先進国と比較して極めて低く、国内への油脂の安定供給のためには日本独自の油脂生産システムの構築が必要である。そこで本研究では、様々な糖を資化し、細胞内に油脂を蓄積する油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* に注目した。油脂酵母 *L. starkeyi* は、乾燥菌体重量の 85%以上の油脂（トリアシルグリセロール (TAG)）を脂肪球の形で蓄積することが可能なユニークな酵母であるが、産業利用には油脂生産性の向上が必須であり、これまでに本酵母の油脂蓄積制御因子は明らかになっていない。そこで、本研究では、油脂酵母 *L. starkeyi* の油脂高蓄積変異株のゲノム情報を基に油脂蓄積性向上に関与する遺伝子を同定・解析することを目的とした。

本研究室ではこれまでに、細胞あたりの TAG 量が野生株と比較して約 1.5～2.5 倍向上した油脂高蓄積変異株を複数株取得している。また、高蓄積株を親株としてさらに変異導入した油脂超高蓄積変異株も取得し、これは野生株の約 4.5～7.0 倍の油脂蓄積性を示した。これら変異株について、野生株との比較ゲノム解析を行った結果、高蓄積株 2 株及び超高蓄積変異株に共通して Transcript Id:115694 遺伝子の推定アミノ酸配列 (Protein Id:115694) にミスセンス変異が起こっていた。Transcript Id:115694 が油脂高蓄積性に関与する遺伝子がどうかを検証するため、変異株由来の変異遺伝子導入株を作製し、その形質を比較評価した。その結果、コントロールとした野生型遺伝子導入株と比較し、変異型遺伝子導入株は、細胞あたりの TAG 量が 2.8 倍増加した。また、野生型遺伝子高発現株及び変異型遺伝子高発現株を作製し、同様に形質評価を行ったところ、それぞれコントロールの 3.5 倍、5.1 倍となり、油脂蓄積性が飛躍的に向上した。以上の結果から、Transcript Id: 115694 は、油脂高蓄積及び超高蓄積変異株の原因遺伝子であり、*L. starkeyi* における油脂蓄積に関与する新規制御因子であると考えられた。さらに、これらの遺伝子組換え株についてリアルタイム PCR を用いた油脂蓄積関連遺伝子の発現解析を行ったところ、これまで本研究室で取得した油脂高蓄積変異株の遺伝子発現解析結果と同様に、特にアシル CoA 合成経路及びケネディ経路遺伝子で高発現が見られた。また、Protein Id:115694 のドメイン解析の結果、膜連結転写因子の可能性が考えられ、Protein Id:115694 は、油脂蓄積を制御する新規転写調節因子であると推測された。

本研究は NEDO「植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発」の支援を受けて行われた。

oleaginous yeast, *Lipomyces starkeyi*, comparative genome analysis

発表責任者：高久洋暁（htakaku@nupals.ac.jp）

講演番号：2A12a05
講演日時：3 月 26 日 10:14～ センター2 号館 A12 会場

情報科学を活用した油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の新規油脂生産制御因子の獲得
Acquirement of a novel lipid production regulatory factor of oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* using computational approach

○庭山 ひかる[1]、油谷 幸代[2,3]、荒 学志[5]、山崎 晴丈[1]、志田 洋介[4]、小笠原 渉[4]、矢追 克郎[3]、荒木 秀雄[5]、高久 洋暁[1]([1]新潟薬大・応生科、[2]産総研・CBBD-OIL、[3]産総研・生物プロセス、[4]長岡技科大・工、[5]不二製油グループ本社)
○Hikaru NIWAYAMA[1], Sachiyo ABURATANI[2,3], Satoshi ARA[5], Harutake YAMAZAKI[1], Yosuke SHIDA[4], Wataru OGASAWARA[4], Katsuro YAOI[3], Hideo ARAKI[5], Hiroaki TAKAKU[1] ([1]Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., [2]AIST. CBBD-OIL, [3]AIST., [4]Nagaoka Univ. Tech., [5]FUJI OIL HOLDINGS INC.)

近年、世界人口の増加やバイオ燃料の使用増加に伴い、油脂の競合が懸念されている。油脂自給率の低い我が国において自給率向上は必要不可欠であるが、日本の気候・農業人口・作物面積を考慮すると、油糧植物からの油脂獲得は困難である。そこで、本研究室では糖を資化し、細胞内の脂肪球に植物油と類似した脂肪酸組成の油脂を蓄積する油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* に注目した。*L. starkeyi* の産業利用のためには、油脂生産性（生産速度・変換率）向上が課題である。そこで我々は、油脂合成・分解・蓄積に関与する新規因子を獲得し、コントロールすることにより、油脂生産性を向上させることを考え、目的とした。

本研究室では、これまでに油脂低蓄積変異株、油脂高蓄積変異株、油脂超高蓄積変異株のような様々な油脂蓄積変異株を 180 株程取得している。低蓄積変異株 5 株、高蓄積変異株 6 株、超高蓄積変異株 3 株、野生株の油脂生産培養における 8 つのタイムポイント (Day 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7) のマイクロアレイデータを取得し、油脂生産量と相関が高い遺伝子を 15 個選択した。選択した 15 個の遺伝子群と油脂生産量の因果関係を推定するために、構造方程式モデリングを適用し、油脂生産制御ネットワークモデルを構築した。構築した油脂生産制御ネットワークから、油脂生産性を制御可能な因子をコードする遺伝子を 9 種類抽出し、それらの遺伝子高発現株又は遺伝子破壊株を作製後、油脂生産性への効果を調査した。その結果、Transcript Id:4888, 216324 の遺伝子高発現株の油脂生産性はそれぞれ 2, 1.2 倍向上、Transcript Id:45559 の遺伝子破壊株の油脂生産性は 1.5 倍向上した。また、高発現させると油脂生産性が向上した Transcript Id:4888 の遺伝子破壊株は、油脂生産性が 0.7 倍に低下した。これらの遺伝子の推定アミノ酸配列を Blastp 解析した結果、Protein Id:45559 は膜内金属タンパク質分解酵素に類似していたが、Protein Id:4888, 216324 は機能予測不明なタンパク質であった。我々は、遺伝子高発現株では油脂生産性が向上し、遺伝子破壊株では油脂生産性が低下した 新規油脂生産制御因子 Protein Id:4888 に注目し、その新規因子の油脂合成経路（アシル CoA 合成経路、ケネディ経路）への影響を遺伝子発現解析により調査した。その結果、アシル CoA 合成経路の 5 遺伝子において、遺伝子破壊株では野生株と比べて大きく遺伝子発現量が低下したが、遺伝子高発現株では軽微な遺伝子発現上昇であったことから、アシル CoA 合成系遺伝子の発現に転写コファクターとして関与している可能性が考えられた。

本研究は NEDO「植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発」の支援を受けて行われた。

Oleaginous yeast, *Lipomyces starkeyi*, Regulatory Network Analysis

発表責任者：高久洋暁（htakaku@nupals.ac.jp）

講演番号：2A12a06
講演日時：3 月 26 日 10:35～ センター2 号館 A12 会場

比較ゲノム解析による油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の油脂低蓄積原因遺伝子の同定

Identification of lipid low accumulation responsible genes of oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* using comparative genome analysis

○佐藤 里佳子[1]、山田 日向子[1]、森 一樹[2]、油谷 幸代[3,4]、荒 学志[6]、山崎 晴丈[1]、志田 洋介[5]、小笠原 渉[5]、矢追 克郎[4]、荒木 秀雄[6]、田代 康介[7]、高久 洋暁[1]([1]新潟薬大・応生科、[2]鹿児島高専、[3]産総研・CBBD-OIL、[4]産総研・生物プロセス、[5]長岡技科大・工、[6]不二製油グループ本社、[7]九州大・院生資源・遺伝子制御)

○Rikako SATO[1], Hinako YAMADA[1], Kazuki MORI[2], Sachiyo ABURATANI[3,4], Satoshi ARA[6], Harutake YAMAZAKI[1], Yosuke SHIDA[5], Wataru OGASAWARA[5], Katsuro YAOI[4], Hideo ARAKI[6], Kosuke TASHIRO[7], Hiroaki TAKAKU[1] ([1]Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., [2]Natl. Inst. Tech., Kagoshima Coll., [3]AISTCBBD-OIL, [4]AIST, [5]Nagaoka Univ. Tech., [6]FUJI OIL HOLDINGS INC., [7]Kyushu Univ., Fac., Agri., Mol.Gene Tech.)

近年の急激な世界人口増加に伴い、食・工業・エネルギー分野の油脂需要が高まっている中、日本の油脂自給率は低く、輸入に依存している状況である。さらに自然災害や異常気象によって輸入相手国からの供給が滞る可能性もあり、日本の油脂低自給率の解決は早急である。そこで本研究では、細胞内に油脂を蓄積する油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* に注目した。*L. starkeyi* は、非可食バイオマス由来の様々な糖を油脂に変換でき、その油脂は植物油に類似した脂肪酸組成を有するため植物代替油脂として利用できる。産業利用へ向け、育種や遺伝子工学的技術による油脂生産性の向上が課題であるが、改変標的遺伝子の情報となる油脂生産機構についての知見はまだまだ足りない。本研究では、油脂低蓄積変異株の原因遺伝子の同定及び機能解析を行い、油脂生産機構の知見を得ることを目的とした。

我々は、以前の大会で報告した、油脂分解能が向上したと考えられる m45, m47 株、油脂蓄積速度が低下した sr5, sr17 株、培養を通して油脂をほとんど蓄積しない sr22 株の合計 5 株の油脂低蓄積変異株を獲得している。野生株と油脂低蓄積変異株の比較ゲノム解析の結果、複数のナンセンス変異、ミスセンス変異、フレームシフト変異、スプライス部位変異が低蓄積原因候補として抽出された。上記 5 株の油脂低蓄積原因遺伝子の絞り込みを行うために、変異遺伝子の正常型遺伝子を油脂低蓄積変異株の 18S rDNA 上に導入し、油脂蓄積性を調査した。その結果、m45, m47 株では Transcript Id:6598、sr5, sr17 株では Transcript Id:70014 を導入したときに油脂蓄積性が野生株と同等となる表現型を示した。次に野生型株の各遺伝子領域上に変異型遺伝子を導入し、各油脂低蓄積変異株と同様な表現型を示すか検証した。その結果、sr17 株では変異型 Transcript Id:70014、sr22 株では変異型 Transcript Id:69187 の遺伝子導入が上記油脂低蓄積変異株と同等な表現型を示した。以上より 3 種類の油脂低蓄積原因遺伝子が同定された。また、最も強い油脂低蓄積性を示した sr22 株に注目し、sr22 株及び変異型 Transcript Id:69187 導入株の遺伝子発現解析をした結果、野生型株と比較して培養 3 日目に油脂分解に関与する *TGL4* 遺伝子の発現量が約 2 倍に上昇していた。また、脂肪酸合成に関与するアシル CoA 合成経路遺伝子の発現低下が見られ、これにより油脂蓄積性が低下したと考えられた。

本研究は NEDO「植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発」の支援を受けて行われた。

oleaginous yeast, *Lipomyces starkeyi*, comparative genome analysis

発表責任者：高久　洋暁（htakaku@nupals.ac.jp）

講演番号：2A12a07
講演日時：3 月 26 日 10:46～ センター2 号館 A12 会場

油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* のトリアシルグリセロール分解酵素の機能解析
Functional analysis of triacylglycerol lipases of oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*
○山本 大雅[1]、荒 学志[4]、山崎 晴丈[1]、志田 洋介[2]、小笠原 渉[2]、矢追 克郎[3]、荒木 秀雄[4]、高久 洋暁[1] ([1]新潟薬大・応生科、[2]長岡技科大・工、[3]産総研・生物プロセス、[4]不二製油グループ本社)
○ Taiga YAMAMOTO[1], Satoshi ARA[4], Harutake YAMAZAKI[1], Yosuke SHIDA[2], Wataru OGASAWARA[2], Katsuro YAOI[3], Hideo ARAKI[4], Hiroaki TAKAKU[1] ([1]Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., [2]Nagaoka Univ. Tech., [3]AIST., [4]FUJI OIL HOLDINGS INC.)

近年、世界人口が急増し、エネルギー・食糧問題などにより油脂需要は増加しているが、日本の油脂自給率は 12% しかない。油脂は私達の生活に欠かせないものであり、我が国の油脂の安定確保には、海外からの安定供給の確保だけでなく、油脂自給率の向上が最重要課題であると考えられる。本研究で注目した油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* は様々な糖を資化し、油脂（主に TAG：トリアシルグリセロール）を細胞内に蓄積するため、バイオマス由来糖化液を原料とした持続的な油脂生産が期待でき、自給率の向上が見込める。さらに、*L. starkeyi* の油脂は植物油と類似の脂肪酸組成を有するため、植物代替油脂として、食品および工業分野への幅広い利用が考えられる。*L. starkeyi* は産業的価値が高い酵母であるが、実用化へ向けた油脂生産性の改良に必要な油脂合成・分解・蓄積のメカニズムの知見はまだまだ足りない。そこで、本研究では *L. starkeyi* の油脂分解に注目し、その分解に関与する酵素の機能解析を介して油脂分解のメカニズムを解明することを目的とした。

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae*, 油脂酵母 *Yarrowia lipolytica* において先行研究のある TAG 分解酵素のアミノ酸配列情報を活用して、blastp 解析により *L. starkeyi* TAG 分解酵素ホモログを探索した結果、Tgl1p, Tgl3p, Tgl4p をコードする *TGL1*, *TGL3*, *TGL4* を見いだした。これらの TAG 分解酵素ホモログの *L. starkeyi* における機能を解析するために、上記 3 種類の遺伝子の単独(Δ*tgl1*, Δ*tgl3*, Δ*tgl4*)、二重(Δ*tgl1*Δ*tgl3*, Δ*tgl1*Δ*tgl4*, Δtgl3Δ*tgl4*)、三重破壊株(Δ*tgl1*Δ*tgl3*Δ*tgl4*)を作製した。各 TAG 分解酵素遺伝子破壊株の生育は、*TGL1* 破壊において生育への遅延効果が見られ、さらに *TGL1* 破壊と組み合わせた二重破壊、三重破壊において、その生育遅延は顕著であった。*TGL* 遺伝子破壊の TAG 蓄積への効果については、培養 3 日目における三重破壊株の細胞あたりの TAG 量が、野生型、単独及び二重破壊株と比較して増加していた。また、非常に興味深いことに、野生型株や三重破壊株などが培養 5 日目から 7 日目までの培地中の糖が枯渇する時期において TAG の分解が起こっているにもかかわらず、各二重破壊株において急激な TAG 分解が培養 3 日目から 5 日目にかけて起こっていた。現在、このような TAG 分解促進に関する現象の解明のため、定量 PCR を用いて、各 *TGL* 遺伝子破壊株の *TGL1*, *TGL3*, *TGL4* だけでなく、TAG 分解に関連すると考えられる遺伝子の発現を解析中である。

本研究は NEDO「植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発」の支援を受けて行われた。

Oleaginous yeast, *Lipomyces starkeyi*, Triacylglycerol lipase

発表責任者：高久 洋暁（htakaku@nupals.ac.jp）

講演番号：2A12a08
講演日時：3 月 26 日 10:57～ センター2 号館 A12 会場

YggS/PROSC タンパク質ファミリーによるビタミン B_6 恒常性維持機構
Regulation mechanism of vitamin B6 by YggS/PROSC protein family

○小河 ほのか、伊藤 智和、邊見 久、吉村 徹 (名大院・生命農)
○Honoka OGAWA, Tomokazu ITO, Hisashi HEMMI, Tohru YOSHIMURA (Nagoya Univ.)

【背景・目的】

YggS/PROSC タンパク質ファミリーは大部分の生物で高度に保存されるピリドキサール 5'-リン酸 (PLP) 結合タンパク質である。本タンパク質の分子機能は未同定であるが、その変異・欠損は、様々な生物でアミノ酸代謝やビタミン B_6 の恒常性破綻を引き起こす。例えば、ヒトの PROSC タンパク質の変異は、ビタミン B_6 依存性てんかんを引き起こす。*E. coli* の *yggS* 欠損は、アミノ酸代謝を攪乱し、菌体内に PLP 前駆体であるピリドキシン 5'-リン(PNP)を特異的に蓄積させる。我々の最近の研究結果は、*E. coli* の *yggS* 欠損株で報告されたフェノタイプの多くは、PNP の過剰蓄積に起因するグリシン開裂系の機能不全に由来する可能性を示した。本研究では、当該タンパク質の欠損が PNP の特異的蓄積を惹起するメカニズムの解明を通じ、本タンパク質ファミリーの分子機能の同定を目指している。

【結果】

E. coli とは異なるビタミン B_6 の合成経路を有する出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の Ybl036c 欠損株(YggS/PROSC オーソログ)の菌体内 B_6 ビタマーを分析したところ、同欠損株では PNP の蓄積が認められた。一方、*E. coli* や出芽酵母とは異なるサルベージ経路を有する枯草菌の欠損株(Δ*ylmE* 株)では、PNP の蓄積は認められなかった。以上の結果から、PNP の PLP への酸化反応を触媒する PNP オキシダーゼの機能発現に当該タンパク質が影響を及ぼす可能性が予想された。*E. coli* の PNP オキシダーゼ(PdxH)と YggS との二重欠損株（Δ*pdxH*Δ*yggS* ）を作製したところ、同株は LB 培地上で生育遅延を示し、ピリドキサール (PL) を含む最少培地中において致死性を示した。この合成致死性は、カザミノ酸の添加によって回復した。なお、各々の遺伝子の単独欠損株は PL を含有する最少培地において良好に生育した。菌体内ビタミン B_6 プールを分析したところ、Δ*pdxH*Δ*yggS* 株の B_6 プールは各々の遺伝子の単独欠損株（*ΔpdxH* および *ΔyggS* ）のものとは大きく異なっていた。以上の結果、YggS/PROSC ファミリータンパク質が PNP オキシダーゼの非存在下においてもビタミン B_6 の恒常性維持に関与することが示された。

vitamin B6, pyridoxine 5'-phosphate, pyridoxal 5'-phosphate

発表責任者：小河　ほのか（og.h279amy11@gmail.com）

講演番号：2A12a09
講演日時：3 月 26 日 11:08～ センター2 号館 A12 会場

安息香酸は分裂酵母の CoQ 生合成を顕著に阻害する
Benzoic acid significantly inhibits CoQ biosynthesis in *Schizosaccharomyces pombe*

○西田 郁久[1]、戒能 智宏[1,2]、松尾 安浩[1,2]、川向 誠[1,2] ([1]島根大生物資源、[2]島根大農生命系)
○Ikuhisa NISHIDA[1], Tomohiro KAINO[1,2], Yasuhiro MATSUO[1,2], Makoto KAWAMUKAI[1,2] ([1]Fac. of Life and Environ. Sci., Shimane Univ., [2]Inst. of Agric. and Life Sci., Shimane Univ.)

コエンザイム Q（CoQ、ユビキノン）は、真核生物ではミトコンドリアにおける呼吸鎖電子伝達系の必須成分としてエネルギー産生に関与する。CoQ は、キノン骨格とイソプレノイド側鎖から構成され、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* は側鎖長が 10 の CoQ_{10} を生合成する。CoQ_{10} は食品サプリメントとして広く市販されており、*S. pombe* は遺伝子工学的な CoQ_{10} 生産菌の開発に適した微生物である。我々は、上流の CoQ_{10} 生合成経路の増強、糖源枯渇や Pka1 欠損が *S. pombe* CoQ_{10} の生産性を上昇させることを報告している[1,2]。*S. pombe* で、CoQ_{10} 生合成に関与する遺伝子破壊株は、呼吸欠損、経時寿命の低下、酸化ストレス感受性、最少培地上での生育遅延、硫化水素の発生、新生 UMP 合成不能などの多面的な表現型を示す[3]。CoQ は、ポリプレニル化された *p*-aminobenzoic acid (PABA) や *p*-hydroxybenzoic acid (PHB) を初発としてキノン骨格が形成されるが、PABA・PHB の代謝経路やキノン骨格修飾経路には不明点が多い。これまでに、PABA・PHB やそれらの類縁化合物の添加は、CoQ 生産性の増加や減少を引き起こすことが種々の生物において報告されており、CoQ_{10} の欠乏に起因する疾患の治療の開発や、呼吸鎖を標的とした抗菌剤への活用が期待されている。

そこで本研究では、*S. pombe* の生育する培地に、約 20 種類の芳香族化合物を単独で添加した際の CoQ_{10} 生産性を評価した。その結果、それらの化合物の添加により CoQ_{10} の生産性が増加するものは見られなかったが、100 μg/ml の Benzoic acid（Bz、安息香酸）の添加時において、CoQ_{10} の生産量が無添加時と比較して顕著な影響を示し、約 5%に減少した。一方、Bz 添加培地に、PABA あるいは PHB を同時添加した際の影響を評価したところ CoQ_{10} の生産量が Bz 無添加時並みに回復した。また、PABA や PHB とポリプレニル 2 リン酸の結合反応を触媒する Ppt1 を過剰発現させると、Bz による CoQ_{10} の生産性の減少が緩和された。Bz が Ppt1 による結合反応を阻害していることが示唆された。

次に、Bz 添加における CoQ 生合成酵素の発現に与える影響を評価した。その結果、Bz 添加により Coq4、Coq5、Coq8 といったタンパク質の発現が低下していたことから、CoQ 生合成酵素複合体の不安定化が引き起こされている可能性が考えられた。また、CoQ 欠損を示す *S. pombe* は、一過的な硫化水素の発生が見られるが、安息香酸添加によって CoQ の生産性が低下しても、硫化水素の顕著な増加は見られなかった。現在、Bz 添加により CoQ 欠損と同様の表現型を示されるかどうか解析している。

1) Nishida I. *et al*. *Appl*. *Microbiol*. *Biotechnol*. **103**: 4899-4915 (2019)
2) Moriyama. *et al*. *Biosci*. *Biotechnol*. *Biochem*. **79**:1026-1033 (2015)
3) Kawamukai M. *Biosci*. *Biotechnol*. *Biochem*. **80**: 23-33 (2016)

Fission yeast, Coenzyme Q, Benzoic acid

発表責任者：西田郁久（i-nishida@life.shimane-u.ac.jp）

講演番号：2A12a10
講演日時：3 月 26 日 11:19～ センター2 号館 A12 会場

亜リン酸依存性による生物学的封じ込め株の pH 依存的増殖メカニズムの解明
Characterization of the pH-dependent growth mechanism of the biologically contained phosphite-dependent strain

○日野 智仁[1]、本 陽介[1]、池田 丈[2]、石田 丈典[2]、舟橋 久景[2]、黒田 章夫[2,3]、廣田 隆一[2,3]([1]広島大工、[2]広島大院統合生命、[3]JST-ALCA)
○ Tomohito HINO[1], Yousuke MOTO[1], Takeshi IKEDA[2], Takenori ISHIDA[2], Hisakage FUNABASHI[2], Akio KURODA[2,3], Ryuichi HIROTA[2,3] ([1]Hiroshima Univ., [2]Hiroshima Graduate school., [3]JST-ALCA)

【目的】現在、遺伝子組換え技術の発展によって、様々な物質を合成できる有用微細藻類が開発されている。しかし、組換え藻類の開放系での使用はカルタヘナ法で制限されており、屋外での培養に適用することは困難である。当研究室では、通常の生物が利用できないリン源である亜リン酸に生育を依存するようにリンの代謝を改変する技術を開発している。亜リン酸は環境中にはほとんど存在しないため、本手法は組換え体の拡散を防ぐ生物学的封じ込め手法として利用できる。今回、我々は本手法を適用した封じ込め株には、親株とは異なり特定の pH 領域以外では生育できなくなるという特有の表現型を示すことを見出した。一般的には、培養液の pH 変動を抑制するために、緩衝剤（バッファー）を用いる場合が考えられるが、数千リットル以上にものぼる実用規模の培養では、コストの面からバッファーの使用は望ましくない。そこで本研究は、亜リン酸依存性株において pH 依存性が生じる原因を解明し、バッファーを使用せずに効率良く培養する手法の確立を目的とした。
【方法・結果】亜リン酸依存性を与えるためには、①亜リン酸酸化酵素 PtxD の発現による亜リン酸資化能の付与、②リン酸を取り込まない亜リン酸特異的輸送体 HtxBCDE の機能的発現、③内在性リン酸輸送体遺伝子の同定と破壊が必要である。この要件を適用した *Synechococcus elongatus* PCC 7942 株を用いて、培地の初期 pH と増殖の関係を調べたところ、初期 pH が酸性側（6.5 以下）に傾くと、生育が著しく抑制された。次に、この現象の改善策として、アルカリの添加により初期 pH を調整したところ、良好な増殖が見られた。またこの現象の解析のため、リン酸と亜リン酸の両方で生育可能な株を用いて培養を行ったところ、亜リン酸条件でのみ生育できない現象が確認された。この結果より、pH 変動による増殖抑制は HtxBCDE の亜リン酸の取り込みに影響が生じていると考えられた。亜リン酸の酸解離定数(pK_{a2})は 6.79 であり、これよりアルカリ側では 2 価陰イオン（HPO_3^{2-}）の濃度が上昇する。すなわち、封じ込め株の増殖が許容される pH と HPO_3^{2-}化学種の濃度が相関するため、HtxBCDE の基質は HPO_3^{2-}であることが考えられた。そこで pH の調整によって有効な亜リン酸濃度を調整したところ、封じ込め株の増殖をコントロールができることが明らかになった。このことから、培養の経過に応じた pH 調整が封じ込め株の培養に有用であることが確認された。また pH のコントロールは封じ込め株の増殖を限定することにも有効であることが明らかとなった。

phosphite, biocontainment, pH

講演番号：2A12a11
講演日時：3 月 26 日 11:40～ センター2 号館 A12 会場

Thermus thermophillus HB27 における Acetyl-CoA synthetase の機能解析
Characterization of acetyl-CoA synthetases from *Thermus thermophillus* HB27

○高島 慶一郎[1]、吉田 彩子[1]、富田 武郎[1,2]、葛山 智久[2,3]、古園 さおり[1,2]、西山 真[1,2]([1]東大・生物工学セ、[2]東大・CRIIM、[3]東大院・農生科)
○Keiichiro TAKASHIMA[1], Ayako YOSHIDA[1], Takero TOMITA[1,2], Tomohisa KUZUYAMA[2,3], Saori KOSONO[1,2], Makoto NISHIYAMA[1,2] ([1]BRC, UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Grad. Sch. of Agri. and Life Sci. UTokyo)

Acetyl-CoA synthetase (ACS)は、酢酸と CoA から ATP 依存的に Acetyl-CoA を生成する反応を触媒する酵素であり、酢酸の資化に関わる。機能解析が多くなされている *Escherichia coli* や *Salmonella enterica* では、ACS のホモログとして ACS とは別に Propionyl-CoA synthetase が存在し、プロピオン酸だけでなく、数種の短鎖脂肪酸に対して CoA 合成活性を示すことが報告されている。一方で、我々が研究対象としている高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB27 は 4 つの ACS ホモログ（TTC0884、TTC0885、TTC0886、TTC0919）を有しており、それぞれの ACS ホモログが異なる基質特異性を示す可能性があるため、その機能や制御機構に興味が持たれた。また、TTC0885 は、特徴的なドメイン構成を持ち、ACS 領域と転写制御因子である IclR と相同性をもつ領域で構成されている。IclR は大腸菌において、ACS 遺伝子の転写調節を行なうことが知られており、IclR 領域をもつ TTC0885 が、他の ACS のホモログの転写調節や活性調節に関わるかどうかにも興味が持たれる。本研究では、*T. thermophilus* の 4 つの ACS ホモログの機能を明らかにすることを目的とした。

まず、4 つの ACS ホモログの組換えタンパク質を調製し、*in vitro* での ACS 活性を調べた。種々の短鎖脂肪酸を基質として用い、それぞれに対応する CoA 体の合成活性があるかどうかを調べることにした。TTC0884、TTC0886、TTC0919 について、酢酸、プロピオン酸、酪酸を基質として、対応する CoA 体を合成する活性を示した。そこで、それぞれの基質に対する比活性を測定したところ、TTC0884 は酢酸とプロピオン酸に対して、TTC0919 は酪酸に対して CoA 体合成活性が高かったが、TTC0886 は 3 つの基質に対して反応性を示すものの、いずれの活性も他に比べて低いことがわかった。一方、TTC0885 は全長、および IclR ドメインを欠いた ACS ドメインのみの組換えタンパク質を用いても、CoA 体の生成を確認できなかった。さらに、4 つの ACS ホモログの *in vivo* での機能を明らかにするために、それぞれの遺伝子破壊株を作製した。スクロースを単一炭素源とした最少培地では、全ての破壊株が野生株と同等の生育を示したが、酢酸を単一炭素源とした場合、Δ*TTC0884*、Δ*TTC0885* では生育が見られなかった。この結果は、Δ*TTC0884* および Δ*TTC0885* に存在している、TTC0886 と TTC0919 が酢酸に対して活性が低いことを反映した結果ということができる。また、活性を示さない TTC0885 の遺伝子破壊株 Δ*TTC0885* で生育が見られなかったことから、転写制御因子ドメインをもつ TTC0885 が *TTC0884* 遺伝子発現の活性化に必要である可能性が考えられた。このことは酢酸から acetyl-CoA の合成に TTC0884 と TTC0885 が関わることを示唆している。本発表では、現在進めている X 線結晶構造解析の結果も併せて、それぞれの ACS ホモログの機能の詳細について報告する予定である。

Acetyl-CoA synthetase, *Thermus thermophilus*, acetate metabolism

発表責任者：西山真（umanis@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A12a12
講演日時：3 月 26 日 11:51～ センター2 号館 A12 会場

高度好熱菌由来 CoA transferase の制御タンパク質 ADLP の機能構造解析
Structural and functional analyses of regulatory protein for CoA transferase from *Thermus thermophilus*

○吉田 彩子[1]、山本 寛之[1]、富田 武郎[1,2]、葛山 智久[2,3]、古園 さおり[1,2]、西山 真[1,2]([1]東大生物工学セ、[2]東大 CRIIM、[3]東大院農生科)
○Ayako YOSHIDA[1], Hiroyuki YAMAMOTO[1], Takeo TOMITA[1,2], Tomohisa KUZUYAMA[2,3], Saori KOSONO[1,2], Makoto NISHIYAMA[1,2] ([1]BRC, UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Grad. Sch. Agri. and Life Sci., UTokyo)

タンパク質翻訳後修飾の一つであるリジンアセチル化は近年バクテリアにおいても代謝酵素等にその存在が見いだされており、タンパク質アセチル化と代謝調節との関連が示唆されている。我々は高度好熱菌 *Thermus thermophilus* において高度にアセチル化されているタンパク質として、CoA transferase（CoAT）を同定した。CoAT は、1 分子のアシル CoA を CoA donor として用いて、短鎖脂肪酸から短鎖アシル CoA を ATP などのエネルギー非依存的に合成する反応を可逆的に触媒する酵素である。以前の大会で *T. thermophilus* の CoAT はアセチル化修飾を受けるだけでなく、alanine dehydrogenase（AlaDH）と相同性を持つもののその活性は示さない alanine dehydrogenase like protein（ADLP）と相互作用し、NAD^+依存的に活性阻害を受けることを報告している。CoAT 活性は ADLP·NAD^+によって阻害されるものの ADLP·NADH によっては影響を受けないことから、ADLP が細胞内の NAD^+/NADH 比のセンサーとして働くことが示唆された。そこで、我々は ADLP の NAD^+/NADH センサーとしての機能を詳細に明らかにするため、ADLP の X 線結晶構造解析や NAD^+や NADH に対する結合様式について解析を行った。

ADLP と NAD^+または NADH の共結晶化を行い、それぞれ 2.2 Å 及び 2.5 Å 分解能で結晶構造を決定することに成功した。ADLP は hexamer 構造をとっており、その fold は典型的な AlaDH のものとよく似ており、NAD(H)の結合様式についても同様であった。NAD^+結合型及び NADH 結合型の構造比較を行ったが、ADLP 単独の構造中では NAD^+や NADH の結合による構造の違いは見られなかった。続いて CoAT と ADLP の複合体に対しての NAD(H)の結合親和性を isothermal calorimetry（ITC）を用いて測定した。その結果、NAD^+の CoAT·ADLP に対する K_d が 3.1 μM であるのに対し、NADH の K_d は 0.34 μM であり、NADH に対する親和性が高いことが分かった。これと一致して、ADLP 存在下で 1 mM NAD^+添加によって低下した CoAT 活性が、10 μM の NADH 添加によって阻害が一部解除され、0.1 mM の NADH によって完全に阻害が見られなくなった。これらのことから、ADLP が、NAD^+と NADH に対する親和性の違いを利用して、細胞内の NAD^+/NADH 比を感知し、CoAT 活性を調節していることが示唆された。発表では、CoAT 反応とβ酸化経路との比較から、NAD^+/NADH 比センサーとして機能する ADLP による CoAT の活性調節機構とエネルギー代謝の関連について議論したい。

CoA transferase, alanine dehydrogenase, NAD+/NADH

発表責任者：西山真（umanis@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A12a13
講演日時：3 月 26 日 12:02～ センター2 号館 A12 会場

乳酸菌 *Enterococcus faecalis* のグリセロール代謝における糖新生の役割
Gluconeogenesis is important for glycerol metabolism in the *Enterococcus faecalis*
○土肥 裕希 [1,2] ([1] 岡山理大・工、[2] 筑波大・生命環境)
○Yuki DOI[1,2] ([1]Okayama University of Science, [2]University of Tsukuba)

Enterococcus faecalis はグリセロール資化性を特徴とする乳酸菌である。本菌のグリセロール代謝は古くから解析されてきたが、当該代謝に関与する遺伝子（タンパク質）は代謝酵素以外にはほとんど同定されていない。そこで本研究では、*E. faecalis*（W11 株）のトランスポゾン変異株作製法を構築し、それを用いて当該代謝に必要な遺伝子を網羅的に同定することで、*E. faecalis* のグリセロール代謝に重要な因子（制御系や代謝系）を見出すことを目的とした。

E. faecalis のトランスポゾン（Tn）変異株作製法として、Tn 作製用プラスミド pMOD-3 を用いた In vitro での Tn 変異株作製系を構築した。Tn 遺伝子を EZ-Tn5 Transposase と混合して Transposome を形成させ、それを *E. faecalis* にエレクトロポレーションで導入することで、およそ 3,000 株の Tn 変異株を作製した。うち、野生株（W11）と比較してグリセロール資化性が著しく低下、あるいは消失した Tn 変異株を 22 株獲得し、そのうちの 19 株で Tn が挿入された遺伝子の決定に成功した。Tn 挿入部位が最も重複した遺伝子は、フルクトース-1, 6-ビスホスファターゼ（Fbp, EC:3.1.3.11）およびピルビン酸リン酸ジキナーゼ（PpdK, EC:2.7.9.1）であった。*fbp* および *ppdK* 遺伝子変異株のグリセロール資化性の低下は、プラスミドを用いた *ppdK* または *fbp* 遺伝子の再導入によってそれぞれ相補されたことから、*fbp* および *ppdK* 遺伝子がグリセロール代謝に必要な遺伝子であることが明らかになった。グリセロール以外の炭素源に対する資化性を調べたところ、これらの遺伝子変異株は共にグルコース、フルクトース、グルコン酸、リボースに対する資化性に低下は認められなかったが、ピルビン酸の資化性に対してはグリセロールと同様に著しい低下が認められた。このピルビン酸およびグリセロール資化性の低下は、いずれかのリボヌクレオシドをわずかに添加することで回復したが、ヌクレオシドの添加では回復が認められなかった。

これらの結果から、*E. faecalis* のグリセロール代謝では、グリセロールが解糖系を経てピルビン酸に変換された後、ピルビン酸が再び解糖系を逆流してペントース・リン酸経路を介して DNA 合成のためのリボースに変換されており、そのリボースの供給が当該代謝に極めて重要であることが明らかになった。

Enterococcus faecalis, lactic acid bacteria, glycerol metabolism

発表責任者：土肥　裕希（yuki.doi.doct@gmail.com, doi.yuki.ge@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：2A12p01
講演日時：3 月 26 日 13:50～ センター2 号館 A12 会場

大腸菌代謝ステート遷移における酢酸の役割

Role of acetate in metabolic state transition in Escherichia coli

中澤 昂太[1]、太刀川 智之[1]、島田 友裕[2]、○田中 寛[1] ([1]東工大化生研、[2]明大農)
Kota Nakazawa[1], Tomoyuki Tachikawa[1], Tomohiro Shimada[2], ○Kan Tanaka[1] ([1]Tokyo Inst. Technol., [2]Meiji Univ.)

我々は大腸菌をグルコースとカザミノ酸を炭素源とした最小培地でバッチ培養し、増殖に伴う代謝ステートの遷移について解析を行なってきた。ここで培養開始時のグルコースを低濃度（0.02%-0.1%）とすると、当初はグルコースとアミノ酸が炭素源として利用され、炭素源が解糖系、アセチル CoA から酢酸へ流れて排出される酢酸オーバーフロー代謝が観察される。グルコースの枯渇後もアミノ酸を炭素源とした増殖が続くが、この際にはグルコース枯渇に伴う解糖系代謝フラックスの糖新生方向への逆転が生じている。前回の大会までに、我々は酢酸オーバーフロー代謝を欠損した大腸菌（*pta* もしくは *ackA* 変異株）ではグルコース枯渇時に増殖が顕著に阻害され、二段階増殖（ジオキシー）を示すことを報告した。そしてこれまでに、プロテオームを含むこれまでの解析結果から、酢酸オーバーフロー代謝の欠損により細胞内にピルビン酸が蓄積していること。ピルビン酸の蓄積がピルビン酸を調節因子とする PhdR レギュロンの脱抑制を引き起こし、それによりピルビン酸デヒドロゲナーゼ（PDH）が過剰発現していること。PDH の過剰発現が 2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ（OGDH）活性を抑制し、それがグルコース枯渇後の増殖阻害の直接的な原因であるとのモデルを構築している。

今回我々は、培地中に酢酸を添加することで *pta* 変異株におけるジオキシーが大きく緩和されることを見出し、その分子機構について解析を行なったので本大会で報告する。グルコースとカザミノ酸を含む本研究での培地組成では、酢酸はグルコースやアミノ酸から酢酸オーバーフロー代謝産物として生成することから、この代謝系を欠損する *pta* 変異株では培地中に低い濃度しか蓄積しない。したがって、この結果は酢酸オーバーフローの役割は上記のようなピルビン酸蓄積を防ぐことだけでなく、グルコース枯渇後に必要な酢酸の生成である可能性がある。さらに、*pta* 変異株における酢酸の役割を調べるために、酢酸の代謝系への入口にあたるアセチル CoA 合成酵素（ACS）も欠損させた二重欠損株（*pta acs*）での酢酸の効果を検討した。その結果、この株が酢酸からのアセチル CoA 生成系を欠損しているにも拘らず、酢酸の添加効果は *pta* 株と同様に観察され、酢酸は代謝系に取り込まれるのではなく、酢酸そのものとして機能している可能性が示唆された。発表では、酢酸オーバーフロー経路欠損によるジオキシー現象について、これまでの知見をまとめて紹介したい。

Metabolic state transition, acetate, Escherichia coli

発表責任者：田中　寛（kntanaka@res.titech.ac.jp）

講演番号：2A12p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ センター2 号館 A12 会場

フミン酸添加培養モデルが解明する土壌環境中での糸状菌の代謝制御
Metabolic mechanisms of filamentous fungi in soil environment elucidated by humic acid model
○宮崎 つぐみ、大泉 太於、中澤 奈美、桝尾 俊介、高谷 直樹（筑波大・生命環境・微生物サステイナビリティ研究センター）
○Tsugumi MIYAZAKI, Tao OIZUMI, Nami NAKAZAWA, Shunsuke MASUO, Naoki TAKAYA (Faculty of Life and Environemntal Sciences, Univ. of Tsukuba, Microbiology research center for sustainability)

【背景・目的】
自然環境中の糸状菌にとって土壌は最も身近な存在であるものの、これに対する糸状菌の代謝応答についてはほとんど未知である。我々は、液体培地に土壌を添加して土壌糸状菌 *Aspergillus nidulans* を培養したところ、本菌の生育が促進されることを発見した。また、このことに土壌腐植の構成成分であるフミン酸（Humic acid, HA）が関与することが示された。土壌に豊富に含まれる腐植は、土壌微生物に対して生理作用を示すことが期待されるが、土壌微生物に対する腐植の役割は全く分かっていない。そこで本研究は、主要な土壌有機物である HA をモデルとし、糸状菌に対する HA の役割を解明することで、糸状菌の土壌生態を明らかにすることを目的とした。
【結果】
液体培地に HA を添加して土壌糸状菌 *Aspergillus nidulans* を培養したところ、菌類や一部の植物において発現する代替呼吸系 Alternative oxidase（AOX）活性が上昇することを見出した。酢酸等の利用に関わる転写因子遺伝子 *acuK* と *acuM* をそれぞれ欠損させた遺伝子破壊株では、AOX 遺伝子の転写の促進が見られなかったことから、HA は AcuK と AcuM を介して AOX の発現を活性化させることが示された。また、HA の添加によって、抗酸化酵素の遺伝子発現が上昇し、細胞内活性酸素種（ROS）の蓄積が低下した。AOX が ROS 低発生型の呼吸系であることと考え合わせ、HA は ROS 消去系酵素の活性化と呼吸系の切換えを通して ROS の蓄積を低下させることが示された。抗酸化酵素遺伝子の発現誘導に関わる転写調節因子 NapA の欠損株では、HA による生育促進効果が確認されなかったことから、HA 存在下での ROS 蓄積量の低下による *A. nidulans* の酸化ストレスの緩和が、HA 存在下での指数増殖期の生育の増加に関与すると考えられる。また、HA の添加は定常期に見られる *A. nidulans* の自己溶菌を抑制した。プロテオーム解析および細胞外酵素の活性の測定の結果、HA は定常期に発現誘導される細胞壁分解酵素の生産を低下させることで自己溶菌を抑制し、定常期の生育を維持することが明らかになった。土壌を添加した場合にも AOX 活性は上昇し、*A. nidulans* 以外の 15 種の糸状菌においても HA による AOX の活性化が確認された。これは、多くの糸状菌が、土壌中では AOX を補助的ではなく主要な呼吸系としていることを示唆し、これらの結果は、土壌成分が糸状菌の代謝調節を行う初めての例である。

fungi, humic acid, alternative oxidase

講演番号：2A12p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ センター2 号館 A12 会場

糖消費速度に応じて発現変動する代謝遺伝子
Alteration of metabolic gene expression depending on glucose consumption rate in *Corynebacterium glutamicum*
山口 陽[1]、豊田 晃一[2]、乾 将行[2]、○柘植 陽太[1,3]([1]金沢大院・自科、[2]RITE、[3]金沢大・新学術)
Akira YAMAGUCHI[1], Koichi TOYODA[2], Masayuki INUI[2], ○Yota TSUGE[1,3] ([1]Natural System, Kanazawa Univ., [2]RITE, [3]InFiniti, Kanazawa Univ.)

【背景と目的】糖消費速度は微生物を用いた物質生産において重要なファクターの一つである。糖消費速度を増加させるために様々な代謝改変が試みられているが、消費速度に合わせて微生物が代謝遺伝子の発現レベルを大規模かつ精密に制御しているのか、また具体的にどの遺伝子が制御されているのかは不明である。本研究ではグルコースを単一炭素源とした場合、グルコース消費速度の増減に合わせて微生物が代謝遺伝子の発現レベルを制御しているのかを明らかにすることを目的とした。コリネ型細菌は好気条件で増殖してアミノ酸を生産する。一方、嫌気条件では増殖はしないが、グルコースから乳酸やコハク酸を生産する。本研究ではコリネ型細菌をモデルとしてグルコース消費速度の変動に応答して発現変動する代謝遺伝子を探索した。
【方法】嫌気条件下でグルコース消費速度を増加させるために、野生株に炭酸水素ナトリウムを添加して反応させた。一方、消費速度を減少させるために、乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子（*ldhA*）の欠損株とグルコースの取り込みとリン酸化に関わるホスホトランスフェラーゼシステム遺伝子（*ptsG*）の欠損株を使用した。試験菌株はグルコースを単一炭素源とする最少培地で培養した。反応開始後 2 時間の細胞から mRNA を抽出し、リアルタイム PCR で代謝遺伝子の発現量を調べた。
【結果と考察】炭酸水素ナトリウムの添加により嫌気条件下における単位菌体量あたりのグルコース消費速度は 26%増加し、乳酸・コハク酸生合成に関わる 23 遺伝子のうち、9 遺伝子の発現が 2 倍以上に増加した。一方 *ldhA* 欠損株ではグルコース消費速度は 75%低下し、8 遺伝子の発現が半分以下に低下した。*ptsG* 欠損株ではグルコース消費速度は 60%低下し、11 遺伝子の発現が半分以下に低下した。結果として、8 遺伝子の発現レベルがグルコース消費速度と正の相関を示した。また酸素の有無に関わらず同様の発現変動が見られるかを調べるために *ptsG* 欠損株を好気条件下で培養したところ、グルコース消費速度は 73%低下し、嫌気条件下と同様、12 遺伝子の発現レベルが半分以下に低下した。
以上の結果により、グルコース消費速度に合わせて細胞が代謝遺伝子の発現レベルを制御している可能性が示唆された。この制御には細胞内代謝物濃度の変動がセンサーとなっている可能性が高いが、*ldhA* 欠損株と *ptsG* 欠損株ではグルコース消費速度は共に低下するが、細胞内代謝物濃度は大きく異なるため、センサーは複数存在し、複雑に制御されている可能性が考えられる。また、*ptsG* 欠損株では嫌気条件下に加えて好気条件下でも大規模な発現レベルの低下が見られたことから、この制御機構は酸素の有無に関わらず普遍的であることが示唆された。

Corynebacterium glutamicum, gene expression, glucose consumption rate

発表責任者：柘植陽太（ytsuge@staff.kanazawa-u.ac.jp）

講演番号：2A12p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ センター2 号館 A12 会場

Light lanthanides induce methylotrophy and methanol oxidation pathway in *Bradyrhizobium* sp. strain Ce-3

○VIAGIAN PASTAWAN[1], Soya Suganuma[1], Kosuke Mizuno[1], Lun Wang[1], Masaya Shimada[1], Takashi Hayakawa[1], Nanung Agus Fitriyanto[2], Tomoyuki Nakagawa[1] ([1]Gifu Univ., [2]Gadjah Mada Univ.)

【Objective】

Lanthanide (Ln) is an important element in the Ln-dependent methanol metabolism of *Bradyrhizobium* species, because Ln is a cofactor of XoxF, which is Ln-dependent methanol dehydrogenase (MDH) [1,2]. Moreover, we had already showed that *Bradyrhizobium* sp. strain Ce-3 possesses the Ln-dependent MDH encoded by the *xoxF* gene [1]. However, there is no information about Ln-dependent methylotrophy and the enzymes participating methanol oxidation pathway; formaldehyde dehydrogenase (FLD), *S*-(hydroxymethyl) glutathione synthase (GFA) and formate dehydrogenase (FDH) in strain Ce-3. In this study, we aimed to indicate the Ln-dependent methylotrophy of strain Ce-3, and to show the induction patterns of the enzymes related methanol metabolism in strain Ce-3.

【Results and discussion】

Strain Ce-3 was able to grow on methanol media containing light Ln, *i.e.*, La^{3+}, Ce^{3+}, Pr^{3+} and Nd^{3+}, although the strain did not show any growth on the methanol media with Ca^{2+} or heavy Ln; Sm^{3+}, Eu^{3+} and others. On the other hand, we observed induction of MDH, and the enzymes participating methanol oxidation pathway, such as FLD and FDH in the cell grown on methanol or succinate media containing light Ln species in shaking incubation at 30ºC for 5 days. The strain grown on succinate media did not have any MDH, FLD, and FDH activities on the succinate media with light Ln species, and only cells grown on methanol/light Ln media showed enough levels of these enzyme activities. These results indicate that the enzymes participating methanol oxidation pathway in strain Ce-3 were induced only by methanol with light Ln species.

Finally, we identified the gene cluster encoding MDH and the enzymes participating methanol oxidation pathway on the genome of strain Ce-3. On the genome of strain Ce-3, there is a copy of gene cluster for these enzymes, including *xoxR*, *xoxF*, *xoxG*, *fldA* and *gfaA*, but *fdhA* was located on the different loci. Based on these results, we concluded that strain Ce-3 is able to utilize methanol only with light Ln species, and it possesses complete methanol oxidation pathway, which induced only by methanol/light Ln species.

[1] Fitriyanto NA *et al*. 2011. *J Biosci Bioeng*. 111:613-617.
[2] Wang L *et al*. 2019. *Enzyme Microb Technol.* 130:109371.

Bradyrhizobium, Lanthanide, methylotrophy

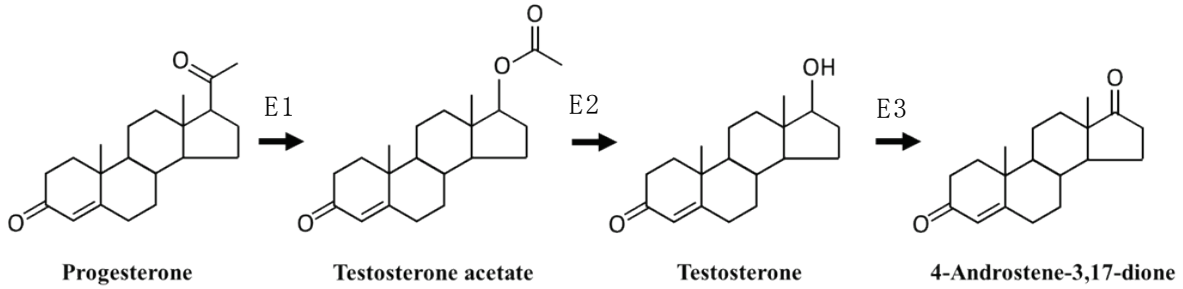
発表責任者：中川 智行（t_nakaga@gifu-u.ac.jp）

講演番号：2A16a01
講演日時：3 月 26 日 09:30～ センター2 号館 A16 会場

カビ胞子を用いた新規な非水系ステロイド変換システムの開発
Development of a novel non-aquerous bioconversion system of progesterone with fungal spores

○白松 李菜、小田 忍 (金沢工大ゲノム研)
○Rina SHIRAMATSU, Shinobu ODA (Kanazawa Inst. Technol.)

【目的】カビの胞子は多くのストレス、中でも栄養細胞が到底耐えられない中極性有機溶媒に対して優れた耐性を示す [1]。さらに筆者らは、カビの胞子が有機溶媒中で微生物還元反応を触媒し得ることを報告した [2]。本研究で有機相に用いた *tert*-butyl acetate (BuOAc)は Log *P* = 1.76 の中極性溶媒であり、基質および産物の溶解度が高いうえに、菌体由来の加水分解酵素による攻撃を受け難いという特長がある。本研究では、*tert*-BuOAc を低沸点 dimethylsilicone oil に配合することで progesterone の溶解性を大幅に向上させた、新規なステロイド変換システムを構築することを目的とした。
【方法と結果】*Penicilium* 属や *Trichoderma* 属などの胞子形成能を示す 402 株の分離カビについて、窒素源半減修正サブロー寒天平板／[*tert*-BuOAc－dimethylsilicone oil (2:8)]界面で、progesterone を testosterone acetate、testosterone 経由で 4-androstene-3,17-dione (4AD)に変換し得るカビをスクリーニングした。ヒットした 43 株より最も活性の高い未同定カビ KIT-J1037 株胞子を用いて、高濃度の progesterone 変換試験を行った。その結果、40% *tert*-BuOAc/dimethylsilicone oil 中で 1.0 g/L の progesterone から 0.3 g/L を超える 4AD が得られた。また、中間体である testosterone についても 0.03 g/L を超える蓄積濃度が得られた。培養・変換条件の最適化による 4AD 生産量の引き上げや、KIT-J1037 株の菌糸と胞子の変換活性の比較も行った。



E1, cytochrome P450 monooxygenase; E2, esterase; E3, dehydrogenase

Reference
1) S. Oda, *et al.*, Biosci. Biotechnol. Biochem., **78**, 1971-1974 (2014).
2) S. Oda, *et al.*, J. Oleo Sci., 67, 1123-1129 (2018).

fungal spore, non-aqueous bioconversion, steroid bioconversion

発表責任者：小田忍（odas@neptune.kanazawa-it.ac.jp）

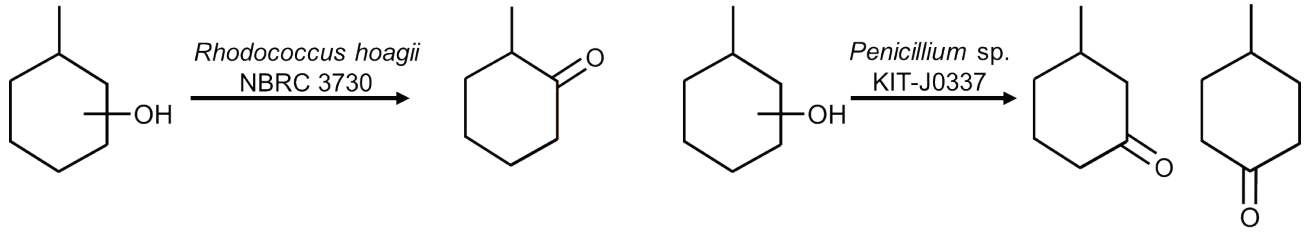
講演番号：2A16a02
講演日時：3 月 26 日 09:41～ センター2 号館 A16 会場

糸状菌胞子を用いた非水系微生物変換システム
Non-aqueous bioconversion system using fungal spores

○杉本 恭子、小田 忍 (金沢工大ゲノム研)
○Kyoko SUGIMOTO, Shinobu ODA (Kanazawa Inst. Technol)

【目 的】カビ胞子は、様々な代謝物の発酵生産や酵素生産、微生物変換のための種菌、そして生物防除剤として有用な生細胞である。昨年度の本大会では、有用な胞子を大量に生産する新規な手法の開発を目的とした、培地条件や疎水的環境場の胞子生産への影響について報告した。また、近年筆者らは、カビ胞子の新たな用途として固定化胞子の非水系微生物変換システムを報告した[1)]。本研究では、カビ胞子の有用性を確認するために酸化能を持つ株のスクリーニングを行った。そして、酸化能を持つカビ胞子を固定化し、それを用いた非水系微生物変換システムの検討を行った。
【方 法】土壌より分離した *Penicillium* sp. (KIT 株)97 株を対象に、寒天/有機溶媒(dimethylsilicone oil)界面バイオリアクターを用いて methylcyclohexanol から methylcyclohexanone を生産するカビ胞子のスクリーニングを行った。また、そのヒット株を用いた固定化胞子の非水系微生物変換について検討を行った。
【結 果】固/液界面スクリーニングにおいて 97 株中 41 株が methylcyclohexanol 酸化株としてヒットした。そのうち、2-methylcyclohexanone を生産した株は 12%、3-methylcyclohexanone を生産した株は 78%、4-methylcyclohexanone を生産した株は 83%であった。放線菌 *Rhodococcus hoagii* NBRC 3730 は 2-, 3-, 4-methylcyclohexanols のうちの C2 位を優先的に酸化することが報告されている[2)]。しかし、KIT 株の *Penicillium* sp. は主に C3 位と C4 位を酸化したため、微生物種により、secondary alcohol dehydrogenase の位置選択性が大きく異なることが判明した。また、上記反応を固定化胞子を用いたバイオリアクターにも適用した。

1) Oda S, *et al.*, J Oleo Sci., **67**, 1123-1129. (2018)
2) Oda S, *et al.*, Biosci. Biotech. Biochem, **56**(12), 2041-2045 (1992)



fungal spore, non-aqueous bioconversion, microbial oxidation

発表責任者：小田忍（odas@neptune.kanazawa-it.ac.jp）

講演番号：2A16a03
講演日時：3 月 26 日 09:52～ センター2 号館 A16 会場

界面バイオプロセスを用いた alpha-pinene の微生物変換

Microbial transformation of alpha-pinene with an interface bioreactor

○米田 亘輝、角地 孝文、小田 忍（金沢工大ゲノム研）
○Koki YONEDA, Takafumi KAKUCHI, Shinobu ODA (Kanazawa Inst. Technol.)

【目 的】テルペン類は食品や化粧品、医薬品など広く用いられる有用な化合物である。環境への配慮や消費者の天然志向から生体触媒を用いた生産が注目されている。しかしながら、テルペン類の微生物変換では基質および変換産物の微生物毒性や水不溶性が障壁となる。これらの問題点に対して有効な培養法として、固–液界面バイオリアクター(solid–liquid interface bioreactor；S/L-IBR)がある[1)]。S/L-IBR とは、親水性担体と疎水性有機溶媒との固–液界面に微生物を増殖させて有機溶媒中に溶解させた基質を変換させるシステムである[1)]。S/L-IBR は基質および変換産物の微生物毒性を著しく回避することができるため高濃度生産が可能となる[1)]。また、浮上性微粒子のマイクロスフェアー(MS)を用いた界面微生物変換法である液–液界面バイオリアクター(liquid–liquid interface bioreactor；L/L-IBR)も開発されている[2)]。本研究では、これらの界面バイオリアクターを用いてα-pinene 変換株の培養条件の最適化を実施することで、verbenone やα-pinene oxide などの有用産物を高生産することを目的とした。

【方 法】α-Pinene 変換株のスクリーニングにおいて verbenone を生産した *Armillaria tabescens* NBRC 9616 の L/L-IBR における培養条件の最適化を実施した。50 ml 容バイアルに液体培地、MS(Advancel HB2051、積水化学)、シード液の混和溶液を分注し、3 日間前培養してカビ–MS マットを形成させた。その後、1% α-pinene/dimethylsilicon oil(KF-96L-1CS、信越化学工業)を 3 ml 重層し、14 日間本培養した。7 日目および培養終了後に有機層を回収し、GLC で分析した。液体培地の炭素源、窒素源、C/N 比、pH、培養温度、基質濃度の最適化を検討した。さらに、α-pinene oxide を生産した *Nemania aenea* SF10099-1 に関しても S/L-IBR を用いて培養条件の最適化を実施した。

【結 果】Verbenone 生産のための培地組成を最適化した結果、炭素源を glycerol、窒素源を soytone、C/N 比を 4:1 にし、pH 6 に調製した培地が最適であった。また、培養温度は 28 ℃ が最適であった。基質濃度の最適化では基質濃度が 100%においても verbenone が生産できており、基質および産物の微生物毒性を著しく回避できることが確認でき、それの最高生産量は 8.46 g/L に達した。α-Pinene oxide 生産に関しては、炭素源を glucose、窒素源を peptone、C/N 比を 4:1 にし、pH 8 に調製した培地が最適であった。また、培養温度は 25 ℃ が最適であった。

1) Oda, S., Ohta, H., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **56**, 2041 (1992).
2) Oda, S., Isshiki, K., *Process Biochem.*, **42**, 1553 (2007).

interface bioreactor, terpene, microbial transformation

発表責任者：小田　忍（odas@neptune.kanazawa-it.ac.jp）

講演番号：2A16a04
講演日時：3 月 26 日 10:03～ センター2 号館 A16 会場

機能向上を狙った静岡県産農産物の乳酸菌発酵
Fermentation of products in Shizuoka prefecture by lactic acid bacteria for functional improvement
○袴田 雅俊（静岡県工業技術研究所）
○Masatoshi HAKAMATA (Industrial Research Institute of Shizuoka Prefecture)

【背景・目的】
静岡県内で生産される農林水産物の数は 1,143 品目（静岡県の調査による）であり、豊富な食材を擁する。また、静岡県の化粧品産出額は 1,776 億円（2018 年）であり、全国トップクラスとなっている。そこで、県産農林水産物を用いた付加価値の高い素材開発を目指し、化粧品素材としての機能性を評価した。また、性能を高めることを目的として、抽出液の乳酸菌処理も試みた。
【方法】
試料の調製
県内産農林水産物 13 試料を入手した。各素材は凍結乾燥したのち粉砕した。この粉末 1g に 50%エタノール水溶液 30mL を添加し、25℃で 48 時間攪拌を続けることで成分を抽出した。
コラゲナーゼ阻害活性
試料を 25μL、0.39mg/mL の Pz-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg-OH を 200μL、 0.1mg/mL のコラゲナーゼ TypeⅣを 25μL 混合し、37℃で 30 分間静置した。クエン酸溶液を加えて反応を停止し、酢酸エチルを添加して激しく振とうし 320nm の吸光度を測定した。
エラスターゼ阻害活性
試料を 50μL、0.5mg/mL の N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide を 100μL、10μg/mL エラスターゼ TypeⅢ溶液を 50μL 加えて 25℃で 50 分間振とう後、415nm の吸光度を測定した。
ヒアルロニダーゼ阻害活性
試料を 100μL、0.4mg/mL ヒアルロン酸カリウム溶液を 250μL、400units/mL ヒアルロニダーゼ Type Ⅳ-S を 50μL、Compound48/80 溶液を 100μL 加え、37℃、40 分間静置した。ホウ酸溶液を添加後沸騰水中に３分つけ、冷却後 p-ジメチルアミノベンズアルデヒド溶液 3mL を添加後 37℃、20 分間静置し、585nm の吸光度を測定した。
【結果】
コラゲナーゼ阻害活性を示したものが５試料、エラスターゼ阻害活性を示したものが２試料、ヒアルロニダーゼ阻害活性を示したものが９試料得られた。このうち前記３種類の酵素すべてにおいて阻害活性を示したものは２試料であった。このうちの１試料について、乳酸菌を添加して酵素阻害活性が増強するかどうか検討している。

lactic acid bacteria, fermentation, elastase

講演番号：2A16a05
講演日時：3 月 26 日 10:14～ センター2 号館 A16 会場

ヒト皮膚に対するフェアリー化合物の有効性・安全性

Efficacy and safety evaluation of fairy compounds for human skin

○青島 央江[1]、崔 宰熏[2]、呉 静[2]、河岸 洋和[2] ([1]ビタミン C60 バイオリサーチ株式会社、[2]国立大学法人静岡大学　グリーン科学技術研究所)
○Hisae AOSHIMA[1], JAE-HOON CHOI[2], JING WU[2], HIROKAZU KAWAGISHI[2] ([1]Vitamin C60 BioResearch Corporation, [2]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka Univ.)

我々は、フェアリーリングを形成する食用キノコ（コムラサキシメジ）から、植物の成長を制御する物質 2-azahypoxanthine（AHX）と imidazole-4-carboxamide（ICA)、そして AHX の植物体内での代謝産物 2-aza-8-oxohypoxanthine（AOH）を発見し、フェアリー化合物と命名した。これらの機能性化粧品原料としての有効性、安全性を検証した。

細胞賦活作用：正常ヒト表皮細胞を培養した後、AHX または AOH を含有する培地に交換して培養した。MTT を含有する培地に交換して培養した後、2-プロパノールに置換して得られた細胞溶解液の吸光度を測定した。550 nm における吸光度から、細胞濁度に由来する 650 nm の吸光度を差し引き、MTT 還元量を求めた。その結果、AHX では細胞障害性が認められたものの、AOH は細胞障害性を示さなかった（～500 μg/mL)。AOH は、細胞賦活作用（＜31.3 μg/mL）が認められたことから、DNA マイクロアレイを用いて、AOH が皮膚に対してどのような効果を有するか検証した。

DNA マイクロアレイ：正常ヒト表皮細胞を 24 時間培養した後、AOH 水溶液を添加した（0, 30, 100, 300 μg/mL)。培地交換後 24 時間培養した細胞に、QIAzol® reagent を加えて浸漬して溶解液を得た。miRNeasy® Mini Kit（QIAGEN）を用いて、溶解液から RNA を回収して精製した。mRNA 発現解析チップ（DNA チップ ジェノパール® NDR カスタムチップ）を用いて、約 150 種類の皮膚関連遺伝子を対象として、精製 RNA の DNA マイクロアレイを行った。各種遺伝子発現解析の結果は、コントロールの補正値を 1 とした比で表し、有意差検定を行った。その結果、AOH の添加により、細胞間接着（CLDN1 等)、角層剥離（KLK5 等)、細胞分化（KRT1 等）に関わる遺伝子群、コーニファイドエンベロープ構成タンパク質（SPRP1B)、ヒアルロン酸合成酵素遺伝子（HAS3）において、統計学的有意に発現量が増加した。この結果から、AOH は表皮の分化・成熟化に広く作用している可能性が考えられた。

AOH の化粧品原料としての安全性を調べるため、変異原性（Ames）試験、*in vitro* 皮膚刺激性試験、*in vitro* 光毒性試験、*in vitro* 皮膚感作性（DPRA 法）試験、ヒトパッチテストを実施した。その結果、いずれの安全性評価試験においても変異原性、毒性、刺激性、感作性は認められなかった。

以上の研究結果から、AOH は皮膚のターンオーバーを助ける機能性化粧品原料として有効で、安全に使用できる化合物である可能性が示唆された。

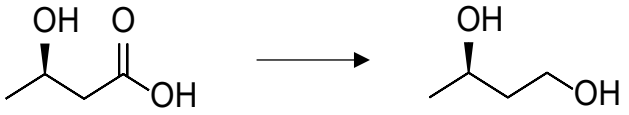
Fairy Compound, AOH, DNA Microarray

講演番号：2A16a06
講演日時：3 月 26 日 10:35～ センター2 号館 A16 会場

(*R*)-3-ヒドロキシ酪酸を(*R*)-1,3-ブタンジオールに変換する微生物の探索
Screening of microorganisms for (*R*)-3-hydroxybutyrate reduction to (*R*)-1,3-butanediol
岸野 重信[1]、○白石 大貴[1]、盤若 明日香[2]、坪田 潤[2]、小川 順[1]([1]京大院農・応用生命、[2]大阪ガス)
Shigenobu Kishino[1], ○Taiki Shiraishi[1], Asuka Hannya[2], Jun Tsubota[2], Jun Ogawa[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]OSAKA GAS Co., Ltd.)

【背景・目的】

Halomonas sp. KM-1 は、好気条件において細胞内にポリヒドロキシ酪酸（PHB）を生産・蓄積することが知られている。また本菌は、嫌気条件下では PHB を加水分解し、菌体外に単量体の(*R*)-3-ヒドロキシ酪酸（3HB）を著量放出することが見いだされている[1)]。一方、3HB のカルボキシル基の還元により得られる(*R*)-1,3-ブタンジオール（1,3-BDO）には、医薬品中間体等としての高い需要がある[2)]。そこで本研究では、3HB を 1,3-BDO に変換する微生物の探索を行った。



3HB　　1,3-BDO

【方法・結果】

約 1,200 株の研究室保存嫌気性菌、および約 600 株の土壌単離嫌気性菌を対象にスクリーニングを行った。具体的には、各菌株を 3HB 添加培地にて培養し、1,3-BDO の生産の有無を評価した。評価方法としては、生産されたジオール類をフェニルホウ酸にて誘導体化し、クロロホルムで抽出・濃縮後に、ガスクロマトグラフィーにより分離・定量した。その結果、土壌単離嫌気性菌 3 株で 3HB を 1,3-BDO に変換する活性が確認された。これら 3 株の微生物に対して 16S rDNA 解析を行ったところ、3 株とも *Clostridium* 属細菌であることが判明した。続いて培養条件を検討したところ、37 ℃, 嫌気条件下において、グルコース濃度を 50 mg/mL, 3HB 濃度を 5 mg/mL に調整した GAM 液体培地で前培養し、その培養液を同組成の寒天培地に塗布し、発生したコロニーをさらに同組成の液体培地に植菌して 3 日間培養すると、再現性よく活性を得られることがわかった。続いて、保存機関から購入した *Clostridium* 属細菌 6 株を対象に上記の培養方法で評価したところ、そのうちの 1 株が 3HB を 1,3-BDO に変換する活性を有しており、その生産量は 0.80 g/L (8.9 mM)、変換率は 1.8 %であった。

1) Kawata et al. (2012) *Applied Microbiology and Biotechnology,* 96, 913-920
2) Yang et al. (2014) *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology,* 41, 1743-1752
3) Jones, D. T. et al.(1986) *Microbiology and Molecular Biology Reviews,* 50, 484-524

Screening, (*R*)-3-hydroxybutyrate, (*R*)-1,3-butanediol

発表責任者：岸野　重信（kishino@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2A16a07
講演日時：3 月 26 日 10:46～ センター2 号館 A16 会場

紅麹菌プロテアーゼによる大豆タンパク質加水分解機能性ペプチドのオミクス解析
Proteomic study of soyprotein hydrolysates using acid proteases from *Monascus*
○橘 信二郎[1]、與儀 真衣[1]、小倉 裕太[1]、比嘉 悠貴[2]、深見 裕之[2]、為定 誠[2] ([1]琉球大・農、[2]小林製薬中央研究所)
○Shinjiro TACHIBANA[1], Mai YOGI[1], Yuta OGURA[1], Yuki HIGA[2], Hiroyuki FUKAMI[2], Makoto TAMESADA[2] ([1]Univ. the Ryukyus, Fac. Agric., [2]R&D Center, Kobayashi Pharmaceutical Co. Ltd)

【背景・目的】紅麹菌（*Monascus* 属）は、中国、台湾、東南アジアおよび琉球において発酵食品や紅酒の製造に用いられてきた有用微生物である。紅麹菌はアザフィロン色素を産生し、食品工業上重要な天然色素産生微生物とされている。沖縄県では、伝統的な大豆発酵食品である“とうふよう”の製造に紅麹菌が利用されてきた。安田らは、アンギオテンシン I 変換酵素（ACE）阻害ペプチドをとうふよう抽出物より単離し、紅麹菌由来プロテアーゼの働きにより大豆タンパク質加水分解物中に ACE 阻害ペプチドが存在することを報告している。大豆タンパク質は、酵素加水分解により様々な生理活性ペプチドを生成することが知られており、近年、その機能性ペプチドのデータベース化が進んでいる。最近、我々はインドネシアの大豆発酵食品テンペ由来ペプチドを LC/MS を用いてプロテオミクス解析することで、多数の生理活性ペプチドの存在を推定できることを報告した。比嘉らは、昨年の本大会において紅麹菌ゲノム解析により、*M. pilosus* の機能性、安全性および色素生産性の観点から食品応用に有用であることを報告している。本研究では、*M. pilosus* の酵素学的および機能性ペプチドの観点からプロテアーゼ産生、色素産生および機能性について調べるとともに、本菌株由来プロテアーゼによる大豆タンパク質加水分解物に含まれる機能性ペプチドを質量分析により網羅的に予測解析することを目的とする。
【方法と結果】供試菌株として *M. pilosus* NBRC4520 を用い PDA 平板培地で継代した。うるち米蒸煮米（121℃、20 分）に本菌を植菌し、紅麹を調製して酵素活性、色素生産性および抗酸化活性について定法に従い調べた。また、紅麹から抽出・粗分画した酵素液を用い、分離大豆タンパク質に対して作用させ、可溶性加水分解物を得た。限外ろ過、ゲルろ過および逆相カラムクロマトグラフィーにより分画した。得られた画分の LC/MS 解析によりアミノ酸配列を推定し、BIOPEP ペプチドデータベースを用いた機能性ペプチドの推定を行っている。本菌株は、*M. purpureus* に比べて紅麹特有の紅色色素の生産性が弱いことが知られている。ところが、本菌株は麹培養の際に滅菌水を加水することで紅色色素を著量産生した。麹 g 当たりのプロテアーゼ活性の産生は、加水の有無にかかわらず経時的に増大した。一方、比活性で見ると、培養後期には加水麹よりも非加水麹において約 2 倍活性が高かった。さらに、麹抽出液の ORAC 抗酸化活性は、加水した麹で培養時間の経過とともに顕著な増大を示した。現在、大豆タンパク質の紅麹プロテアーゼ加水分解物の解析を進めている。*M. pilosus* は酵素産生、色素産生および機能性の観点からも食品応用に有用であることが示唆された。

Monascus, protease, functional peptide

発表責任者：橘信二郎（tachiban@agr.u-ryukyu.ac.jp）

講演番号：2A16a08
講演日時：3 月 26 日 10:57～ センター2 号館 A16 会場

酢酸菌を用いるペリプラズミック代謝工学の試み

An attempt at periplasmic metabolic engineering in acetic acid bacteria

中村 謙太郎[1]、永木 翔[2]、松谷 峰之介[1]、片岡 尚也[1,2,3]、松下 一信[1,2,3]、足立 収生[1]、○薬師 寿治[1,2,3] ([1]山口大・院創成科学、[2]山口大・農学部、[3]山口大・中高温微研セ)
Kentaro NAKAMURA[1], Kakeru NAGAKI[2], Minenosuke MATSUTANI[1], Naoya KATAOKA[1,2,3], Kazunobu MATSUSHITA[1,2,3], Osao ADACHI[1], ○ Toshiharu YAKUSHI[1,2,3] ([1]Grad. Sch. Yamaguchi Univ., [2]Fac. Agr. Yamaguchi Univ., [3]RCTMR Yamaguchi Univ.)

酢酸菌はグラム陰性の好気性菌で，アルコール類や糖類の酸化的物質変換を定量的に行うユニークな代謝系を持つ。食酢の生産やビタミンＣ生産に用いられる。その酸化反応は本菌の細胞質膜の外側，つまりペリプラズムで行われる。生じる還元力は呼吸鎖へと流れ，最終的に酸素を水に還元する。私たちはこれをペリプラズミック酸化系と呼び，酢酸菌の特徴として報告してきた。細胞質と隔離されたペリプラズムで行われるため，この反応の利点として以下の３つを想定している。１．膜を隔てる物質輸送が軽減されるため短時間での反応が期待できる。２．細胞質の代謝と競合しないため，代謝的に短寿命の物質の生産に利用できる。３．毒性物質の生産，毒性物質を中間体とする物質生産に有利である。私たちは，酢酸菌が持つペリプラズミック酸化系を拡張する「ペリプラズミック代謝工学」の可能性を探っている。本研究では，本来細胞質内で機能する酵素をペリプラズムで機能させることによって上記の１に該当する利点を検証したので報告する。

シキミ酸は生理学的には芳香族アミノ酸合成経路の共通中間体である一方で，炭素六員環から成り３つの不斉炭素を有する事から各種の合成原料として有用である。特に抗インフルエンザ薬であるタミフル（oseltamivir）の原料として重要な化合物である。酢酸菌 *Gluconobacter oxydans* NBRC 3244 は，膜結合型のキナ酸脱水素酵素を持ち，キナ酸を酸化するペリプラズミック酸化系を持つ。生じるデヒドロキナ酸はデヒドロキナ酸脱水酵素（DHQase）によってデヒドロシキミ酸へ変換される。*G. oxydans* の DHQase は II 型（AroQ）であり，至適 pH が塩基性の 12 量体酵素である。I 型 DHQase（AroD）は，至適 pH が中性から弱酸性の２量体であるが，*Gluconobacter* 属酢酸菌は保有していない。私たちは以前，培養途中に培地の pH を AroQ の至適 pH である塩基性側にシフトすることによって，*G. oxydans* でデヒドロシキミ酸の生産速度を上げることを報告した(1)。本研究では，近縁の酢酸菌 *Gluconacetobacter diazotrophics* Pal5 株が保有する *aroD* 遺伝子を *G. oxydans* NBRC 3244 に発現させた。次に，この AroD を *G. oxydans* のペリプラズムへと分泌させるために，*G. oxydans* NBRC 3293 株の 2-ケトグルコン酸脱水素酵素遺伝子 *kgdS* 由来の TAT 依存性シグナルペプチドを人工的に融合し，*TAT-aroD* を構築・発現させた。この方法で，キナ酸からデヒドロシキミ酸への一連の変換をペリプラズムで行うことにより，デヒドロシキミ酸の産生を塩基性シフトすることなく効率的に行うことができると推測した。

(1) Nishikura-Imamura et al. (2014), Appl Microbiol Biotechnol 98: 2955.

acetic acid bacteria, periplasm, dehydroshikimate

発表責任者：薬師寿治（juji@yamaguchi-u.ac.jp）

講演番号：2A16a09
講演日時：3 月 26 日 11:08～ センター2 号館 A16 会場

メチロトロフ C1 代謝の逆反応によるグルコースからのメタノール生産
Production of methanol from glucose by reversed methylotrophy
○竹谷 友之、山木田 雅、阪井 康能、由里本 博也（京大院農）
○Tomoyuki TAKEYA, Miyabi YAMAKITA, Yasuyoshi SAKAI, Hiroya YURIMOTO (Kyoto Univ.)

【背景・目的】
天然ガスから工業的に生産されているメタノールは、様々な化成品の原料としての用途に加えて、微生物による物質生産の炭素源としても用いられる。また、メチルエステル化合物類の生産反応における基質としても用いられることから、本研究では、培地への添加に依存せず菌体内で直接メタノールを供給する方法を確立するべく、メタノール資化性細菌のメタノール代謝酵素の逆反応を利用し、グルコースなどの糖からのメタノール生成経路を異宿主に構築することを目的とした。メタノール資化性細菌では、メタノールはまずメタノールデヒドロゲナーゼ（MDH）によりホルムアルデヒド（FA）へと酸化される。FA の固定経路のひとつであるリブロースモノリン酸（RuMP）経路では、ヘキスロース 6-リン酸シンターゼ（HPS）と 6-ホスホ-3-ヘキスロイソメラーゼ（PHI）による FA のリブロース 5-リン酸（Ru5P）への固定と異性化により、フルクトース 6-リン酸（F6P）が生じる。我々は以前、*Mycobacterium gastri* MB19 由来の *hps* および *phi* 遺伝子から HPS-PHI 人工融合酵素を作製し、各反応の高効率な連続触媒を可能にした(*Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2007. 76 439.)。また、この HPS-PHI と好熱性メタノール資化性細菌 *Bacillus methanolicus* S1 由来の NAD^+依存型 MDH を大腸菌に同時発現させ、それらの逆反応（FA 生成反応と FA 還元反応）による F6P からのメタノール生成経路を大腸菌細胞内に構築することに既に成功している(竹谷ら、日本農芸化学会 2016 年度大会)。今回は、微生物による物質生産の培養基質として広く用いられ、解糖系による代謝で F6P を生じるグルコースからのメタノール生産を試みた。

【方法・結果】
MDH と HPS-PHI を同時発現させた大腸菌をグルコースを含む緩衝液に懸濁してインキュベートすると、メタノールの生成が確認され、72 時間で 0.25 mM まで蓄積した。さらに、2%のグルコースを単一炭素源とする M9 培地においても、メタノールの生成が確認された。チアミン等の微量栄養素を添加することで生産はさらに増加した。初期グルコース濃度を 4%に増やしても生産の増加は見られなかったが、菌体内の F6P 濃度は増加しており、培地条件の最適化によりメタノールの生産能をより向上できる可能性が示唆された。

methanol, reverse reaction, synthetic methylotrophy

講演番号：2A16a10
講演日時：3 月 26 日 11:19～ センター2 号館 A16 会場

シロイヌナズナ由来 UGT78D2 を導入した大腸菌を用いたフラボノイド変換反応

Flavonoid conversion reaction using *E. coli* introduced with UGT78D2 from *Arabidopsis*

松阪 祐哉[2]、○小堀 亮[1]、西村 拓哉[1]、川崎 崇[3]、齊藤 安貴子[1,2]（[1]大阪電気通信大学大学院工学研究科先端理工学専攻、[2]大阪電気通信大学工学部環境科学科、[3]京都大学生存圏研究所）
yuya Matusaka[2], ○Ryo Kobori[1], Takuya Nishimura[1], Takashi Kawasaki[3], Akiko Saito[1,2] ([1]Advanced Science & Engineering, Graduate School of Engineering, OECU, [2]Department of Environmental Science, Faculty of Engineering, OECU, [3]Research Institute for Sustainable Humanosphere, Kyoto University)

【目的】

フラボノイドは様々な植物体に含まれているポリフェノール化合物の一群で、食経験が豊富な化合物群として広く知られている。その機能性に関して、抗酸化活性をはじめ多種多様な生物活性が報告されており、食品による健康維持において重要な化合物群といえる。一方で、これらの化合物群は植物内で複雑な混合物として存在しているため、アグリコンでも純粋にそれぞれの化合物を単離・構造決定することが極めて困難であり、その配糖体はさらに単離が難しい。我々はこれまで、特にフラボノイドの微量成分に注目し、有機合成や定量分析、機能性解析に関する研究を進めてきた[1)]。また、天然に微量に存在するフラボノイド配糖体の機能性評価を最終目標とし、植物細胞などを用いた合成研究も進めている。

本発表では、シロイヌナズナ由来糖転移酵素 UGT78D2 を導入した大腸菌体を用いたフラボノイド変換反応を行ったので報告する。

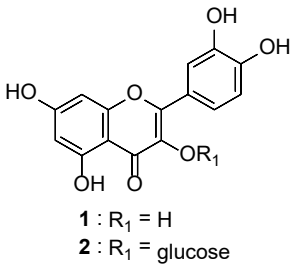


Figure 1. quercetin (**1**) と Q3G (**2**)

【方法・結果】

シロイヌナズナ由来糖転移酵素 UGT78D2 を導入した大腸菌体を LB 培地で培養した後、改良型 M9 培地[2)]に培地交換して変換反応を行った。まず、文献に従い quercetin (**1**) を基質として用いた時、3 位に糖化反応が進行した quercetin-3-*O*-glucoside (Q3G) (**2**) が生成することを確認した[3)]。そこで、我々が保有するフラバン-3-オール誘導体で配糖化反応が進行するか確認を行ったところ (+)-catechin (**3**) を基質として用いた時、配糖化反応は進行せず、オリゴマー化した procyanidin B3 (PC-B3) (**4**)が生成することを確認した。また、数種類のフラボノイドを用いた時、配糖体と考えられる生成物が確認された。本発表では、これらの結果をまとめて報告する。

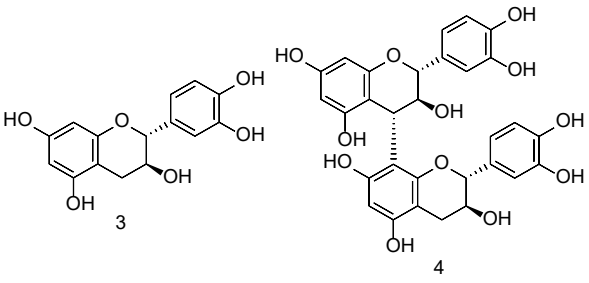


Figure 2. (+)-catechin (**3**) と PC-B3 (**4**) の構造

1) R. Kobori, *et al., Metabolites*, **9**, 56 (2019).
2) S. H. Han, *et al., Appl. Microbiol. Biotechnol*, **80**, 2754 (2014).
3) H. J. Kim, *et al., Appl Microbiol Biotechnol*, **97**, 5275, (2013).

UGT78D2, Glycation, Flavonoid

発表責任者：齊藤　安貴子（a-saito@osakac.ac.jp）

講演番号：2A16a11
講演日時：3 月 26 日 11:40～ センター2 号館 A16 会場

レスベラトロールを基質とするアグリコンの複数水酸基への選択的配糖化反応の研究

Regio-specific glucosylation of resveratrol by *Rhizobium pusense* JCM16209

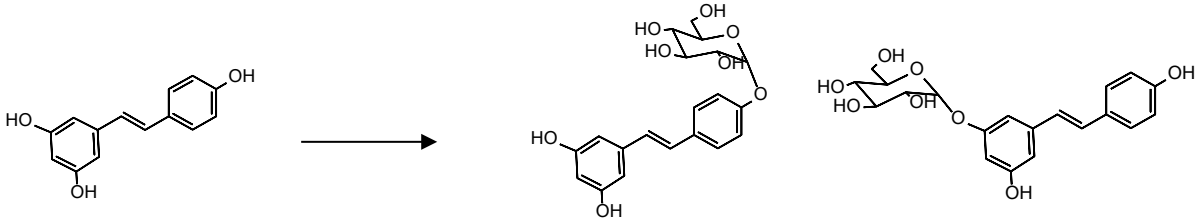
○岡崎 塁大[1]、古谷 翔[1]、竹内 道樹[2]、原 良太郎[2]、小川 順[3]、上田 誠[1,2]([1]小山高専物質工学科、[2]京大院農・産業微生物、[3]京大院農・応用生命)
○Ruidai OKAZAKI[1], Syou FURUYA[1], Michiki TAKEUCHI[2], Ryotaro HARA[2], Zyun OGAWA[3], Makoto UEDA[1,2] ([1]Oyama Kousen, [2]Kyoto Univ. Industrial Microbiology, [3]Kyoto Univ.)

【目的】レスベラトロールはポリフェノールの一種で、抗酸化作用や抗炎症作用があり、食品等で広く使われている。レスベラトロールは水溶性が低く、また pH や温度条件により不安定であるため、配糖化による利用の拡大が期待できる。先行研究のシクロデキストリン合成酵素（CGTase）によるレスベラロール配糖化では、3 位と 4'位の選択性に乏しく、マルトシル配糖体も生成する[1)]。本研究室ではこれまでに 2 級や 3 級を含むアルコール性水酸基への配糖化を報告してきたが[2,3)]、ここでは、複数のフェノール性水酸基に対する位置選択的な配糖化を目標とし、レスベラトールを基質とした微生物による配糖化反応の探索と、選択した微生物による反応条件の検討等を行う。

【方法】CGTase は天野エンザイム製（コンチザイム）を用いた。研究室で保有する配糖化活性株をマルトースを炭素源とする培地で培養し、洗浄菌体を調整後、レスベラトロールのメタノール溶液とマルトース溶液を加え反応に供した。反応条件の検討では、温度や反応時間などによる生成量や選択性への影響を調べた。生成配糖体の分析は先行研究を参考として HPLC を用いた。

【結果】CGTase はレスベラトールの 3 位と 4'位水酸基に対し、6:4 の比率で配糖化した。一方、土壌細菌である *Ensifer* 属，*Agrobacterium* 属，*Rhizobium* 属細菌では 4'位への配糖化割合が高かった。また、*Microbacterium* 属では、3 位を優先する結果が得られた。レスベラトロール 4'位配糖体は 3 位配糖体によりも抗酸化活性が高いため、4'位選択性（3:4'=5:95）と活性に優れた *Rhizobium pusense* JCM16209 による各種条件検討結果についても報告する。

1) T. Marie et al.,*Sustainable Chem. Eng*. 6, 5370-5380 (2018)
2) R. Matsumoto, et al., *J. Mol. Catal. B:Enzymatic*, 133, S200-S203 (2016)
3) K. Takahashi, et al., *Biosci. Biotech. Biochem.*, 82(12) 2205-2211 (2018)



Resveratrol　　4'-Glucosyl-resveratrol　　3-Glucosyl-resveratrol

Rhizobium pusense, microbial glucosylation, bioconversion

発表責任者：上田誠（mueda@oyama-ct.ac.jp）

講演番号：2A16a12
講演日時：3 月 26 日 11:51～ センター2 号館 A16 会場

プロトカテク酸脱炭酸反応を促進するジメチルアリルピロリン酸脱リン酸化酵素遺伝子の同定

Identification of a dimethylallyl pyrophosphate phosphatase enhancing protocatechuate decarboxylation in *Pseudomonas putida* KT2440

栗本 祐樹、田中 誠、○園木 和典（弘前大・農生）
Yuki KURIMOTO, Makoto TANAKA, ○Tomonori SONOKI (Hirosaki Univ.)

【目的】プロトカテク酸（PCA）脱炭酸反応は、農薬・医薬品などの原料として利用できるカテコールや、樹脂・繊維の原料として利用できる *cis,cis*-ムコン酸 (ccMA) といった基幹化合物を、再生可能な植物バイオマスから生産するために必須の反応ステップである。我々はこれまでに PCA 脱炭酸反応機構について解析を進め，flavin prenyltransferase (KpdB) により合成される prenylated FMN が PCA decarboxylase (Pdc) の補酵素であることを明らかにした[1]。そして *Pseudomonas putida* KT2440 株の代謝経路と PCA 脱炭酸反応を組み合わせることで，リグニンから高収率で ccMA を生産できる微生物株を作出した。しかし，ccMA 生産速度の向上にはさらなる Pdc 活性の増強が必要であった。そこで本研究では，prFMN 合成の基質であるジメチルアリルリン酸 (DMAP) の合成に関わる酵素遺伝子の同定を目的とした。

【結果】近年 *Escherichia coli* 由来の ADP-ribose pyrophosphatase (NudF) などの Nudix (Nucleoside diphosphate linked to some other moiety X) hydrolase が，ジメチルアリルピロリン酸 (DMAPP) 脱リン酸化活性を有することが報告された[2]。そこで *E. coli* BW25113 株系統の *nudF* 変異株に *pdc* と *kpdB* を組込み PCA 脱炭酸能力を評価した結果，約 30%の PCA 脱炭酸能の低下が観察された。しかしながら，KP7600 株系統の *nudF* 変異株では同能力は約 60%上昇した。すなわち，遺伝的背景により，Nudix hydrolase の PCA 脱炭酸能力に対する効果は異なる可能性が考えられた。そこで，*P. putida* KT2440 株の全 DNA 配列から Nudix hydrolase をコードする遺伝子を抽出し，それぞれの遺伝子の欠失・発現の PCA 脱炭酸能力に対する効果を評価した。Nudix hydrolase ドメイン (PS51462) を保持していた 14 遺伝子の中から DMAPP 脱リン酸化活性を示した *E. coli* 由来 Nudix hydrolase[2]とアミノ酸配列レベルで高い相同性を示した 6 遺伝子 (*PP_0260*, *PP_0565*, *PP_1348*, *PP_4013*, *PP_4919*, *PP_5146*) を選抜した。6 遺伝子をそれぞれ破壊した変異株を作出し，PCA 脱炭酸能力を測定した結果，いずれの破壊株でも PCA 脱炭酸能に変化は見られなかった。一方，6 遺伝子それぞれを発現させて PCA 脱炭酸能力を評価した結果，*PP_5146* 発現株のみ脱炭酸能力が約 20%増加した。PP_5146 タンパク質は *E. coli* 由来の nucleotide hydrolase (NudH)とアミノ酸配列レベルで 65%の相同性を示した。

本研究は科学研究費補助金の支援を受けて実施した.

[1]栗本ら，日本農芸化学会 2018 年大会, [2] Wang *et al*., *Cell Chemical Biology*, 25, 1-11 (2018)

Protocatechuate decarboxylation, Nudix hydrolase, Dimethylallyl phosphate

発表責任者：園木和典（sonoki@hirosaki-u.ac.jp）

講演番号：2A16a13
講演日時：3 月 26 日 12:02～ センター2 号館 A16 会場

リグニンからの 4-ヒドロキシ安息香酸生産への *Pseudomonas* sp. NGC7 株の適用

Application of *Pseudomonas* sp. NGC7 to the production of 4-hydroxybenzoic acid from lignin.

○阿久津 美歩[1]、上村 直史[2]、政井 英司[2]、園木 和典[1]（[1]弘前大院・農学生命、[2]長岡技大院・工・生命）
○Miho AKUTSU[1], Naohumi Kamimura[2], Eiji Masai[2], Tomonori Sonoki[1] ([1]Hirosaki Univ. of Grad. Sch. Agric. Life Sci., [2]Nagaoka Univ. Tech. of Grad. Sch. Eng.)

【目的】低炭素化社会の構築に向けて，再生可能な植物バイオマス，特に非可食バイオマスから，従来石油から製造されてきた化成品原料を代替できる様々な基幹化合物を生産する微生物株の開発が進められている。本研究では，シリンギル (S)-、グアイアシル (G)-、*p*-ヒドロキシフェニル (H)-リグニン由来の多様なフェノール類の資化能を有する *Pseudomonas* sp. NGC7 株[1)] の代謝経路を活用して，リグニンを化学的・生物学的低分子化処理することで生成する不均一なフェノール類の混合物から，液晶ポリマー原料である 4-ヒドロキシ安息香酸 (HBA) の生産に資する微生物株を作出し、その能力を評価した。

【結果】HBA hydroxylase 遺伝子 (*pobA*)を破壊した NGC704 株は， S-リグニンモデル [シリンガアルデヒド (29.9 wt%), シリンガ酸 (3.6)]、G-リグニンモデル [バニリン (33.5), バニリン酸 (2.4)], H-リグニンモデル [4-ヒドロキシベンズアルデヒド (29.3)，HBA (1.2)] の混合物を炭素源として添加した無機塩培地において，S-リグニンモデルと G-リグニンモデルを炭素源として増殖し，HBA だけを選択的に蓄積した。続いて，前記リグニンモデルの混合物を炭素源とした Fed-batch 培養による HBA の生産を検討した結果，培養開始から 40 時間付近で炭素源の消費と HBA の生産が停滞した。金属塩 ($MgSO_4$，$FeSO_4$，$CaCl_2$) の追加によりこれらの停滞は解消され，NGC704 株は前記リグニンモデルの混合物から 10 g/L 以上の HBA を蓄積することができた。しかし HBA は蓄積され続けたものの，培養の長期化に伴い炭素源の消費速度が低下して培養液中の濃度増加も観察されたので，現在，より最適な Feed 条件の設定を進めている。培養液中の HBA 濃度上昇と炭素源であるリグニンモデルの混合物との長期間の接触により，NGC704 株の代謝活性や生細胞数の減少が懸念されたが，炭素源や生産物である HBA が培養環境中に蓄積している環境でも，生細胞数の指標として測定した ATP 量は一定の範囲に維持されていた。このことから，NGC704 株はリグニン由来のフェノール類に対してロバスト性が高い可能性が示された。そこで現在，非可食バイオマスを化学処理して調製したリグニン由来フェノール類からの HBA 生産への適用可能性の評価も進めている。

本研究は JST 戦略的創造研究推進事業先端的低炭素化技術開発 (ALCA，JPMJAL1506) の支援を受けて実施した。

[1)]Shinoda et al, J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 2019.

Lignin, 4-hydroxybenzoic acid, *Pseudomonas*

発表責任者：園木和典（sonoki@hirosaki-u.ac.jp）

講演番号：2A17a01
講演日時：3 月 26 日 09:30～ センター2 号館 A17 会場

Escherichia coli における新規 *yecD-yecE* toxin-antitoxin system の解析
Identification and characterization of a novel *yecD-yecE* toxin-antitoxin system in *Escherichia coli*

○島本 望、山口 良弘 (阪市大理)
○Nozomi SHIMAMOTO, Yoshihiro YAMAGUCHI (Osaka city Univ.)

【目的】

近年、ほぼすべての原核生物に数多くの toxin-antitoxin (TA) system と呼ばれるシステムが存在し、細胞の生育及び細胞死を制御していることが明らかになってきている。一般的に toxin 及び antitoxin 遺伝子はそれぞれ非常に小さな遺伝子で (60-360 bp)、オペロンを形成している。Toxin は菌体内で発現すると宿主自身に対して毒性を示し、antitoxin は toxin と複合体を形成しその毒性を中和する。ストレス条件下において、antitoxin はストレス誘導性プロテアーゼにより分解され、toxin が複合体から遊離する。その結果、toxin により生育阻害さらには細胞死が引き起こされる。各 toxin の標的は非常に多岐に渡っており、DNA 複製、mRNA の安定性、タンパク質合成及び細胞壁合成などを阻害する。個々の TA system 及び toxin の標的の同定、作用機構及び発現制御機構の解明を含む性質解析は、原核生物の生理機能、病原性及び進化の理解に必須である。しかし、TA system を同定するモデルはまだ確立されておらず、どれほどの TA system が存在しているかさえ不明である。今回我々は、*Escherichia coli* K12 に TA system の候補遺伝子 *yecD-yecE* オペロンを見出し、YecE が toxin として機能する *yecD-yecE* TA system を同定した。さらに、YecE は殺菌的に作用し、YecE の過剰発現は *in vivo* で タンパク質合成を阻害することを見出した。

【方法及び結果】

yecD-yecE が TA system を構成しているか調べるために pET28a-*yecD* および pBAD24-*yecE* を構築し、両プラスミドを持つ大腸菌のアラビノース、IPTG および両誘導剤存在下での生育を解析した。その結果、YecE の過剰発現は大腸菌の生育を阻害した。一方、YecD と YecE を共発現させると生育は阻害されなかったことから、YecE が toxin、YecD が antitoxin の TA system として機能することが示された。また、生育曲線を測定すると YecE 誘導後およそ 3 世代後から生育は阻害された。一方、生菌数は YecE 誘導 40 分後には 0.03% に減少した。よって、YecE は大腸菌に殺菌的に作用することが明らかになった。次に、YecE の標的を同定するため、YecE 発現後の DNA、RNA 及びタンパク質合成を *in vivo* で測定した。その結果、DNA および RNA 合成はほとんど阻害されなかったが、タンパク質合成は YecE 誘導 10 分後から抑制された。YecE 発現後の RNA 安定性を Northern blotting により解析した結果、分解産物は確認なかった。現在 YecE の標的を解析中である。

toxin-antitoxin system, *Escherichia coli*, growth inhibition

講演番号：2A17a02
講演日時：3 月 26 日 09:41～ センター2 号館 A17 会場

大腸菌の新規 toxin-antitoxin system, YegX-YegW, の同定
Identification of a novel toxin-antitoxin system, YegX-YegW, in *Escherichia coli*
○原 健太、山口 良弘 (阪市大理)
○Kenta Hara, Yoshihiro Yamaguchi (Osaka city univ.)

【目的】

ほぼすべての原核生物は toxin-antitoxin (TA) system を有している。TA system は、ストレス条件下で細菌の生育を停止させ休眠状態に移行させるために重要と考えられている。非ストレス条件下では toxin と antitoxin は複合体を形成しており、toxin の毒性は antitoxin によって中和されている。一方、ストレス条件下ではストレス誘導性プロテアーゼによって antitoxin が分解され、その結果 toxin は複合体から遊離し毒性を示す。個々の TA system 及び toxin の標的の同定、作用機構及び発現制御機構の解明を含む性質解析は、原核生物の生理機能、病原性及び進化の理解に必須である。しかし、TA system を同定するモデルはまだ確立されておらず、どれほどの TA system が存在しているかさえ不明である。今回我々は、*Escherichia coli* K12 に TA system の候補遺伝子 *yegW-yegX* オペロンを見出し、YegX が toxin として機能する *yegW-yegX* TA system を同定した。さらに、YegX の過剰発現は *in vivo* で DNA、RNA およびタンパク質合成をほぼ同時に阻害することを見出した。

【方法および結果】

yegX-yegW が TA system を構成しているか調べるために pBAD24-*yegX* および pBAD24-*yegW* を構築し、両プラスミドを持つ大腸菌の 0.2%アラビノース、0.04 mM IPTG および両誘導剤存在下での生育を解析した。その結果、YegX の過剰発現は大腸菌の生育を阻害した。一方、YegW と YecX を共発現させると生育は阻害されなかったことから、YegX が toxin、YegW が antitoxin の TA system として機能することが示された。液体培地での生育を解析した結果、YegX 誘導 30 後から生育は阻害された。また、YecE は大腸菌に殺菌的に作用することが明らかになった。次に、YegX の標的を同定するため、YecE 発現後の DNA、RNA およびタンパク質合成を *in vivo* で測定した。その結果、誘導 20 分後から DNA、RNA およびタンパク質合成が阻害された。そこで、YegX は DNA ジャイレーズまたはトポイソメラーゼ I を阻害すると考え、YegX 誘導後の DNA トポロジーを解析した。しかし、DNA トポロジーに変化は見られなかった。現在、YegX による DNA への影響を解析中である。

toxin-antitoxin system, *Escherichia coli*, growth inhibition

講演番号：2A17a03
講演日時：3 月 26 日 09:52～ センター2 号館 A17 会場

大腸菌における新規 toxin-antitoxin system *fic-yhfG* の同定

Identification of a novel toxin-antitoxin system, *fic-yhfG*, in *Escherichia coli*

○中村 勇斗、山口 良弘（阪市大理）
○YUTO NAKAMURA, YOSHIHIRO YAMAGUCHI (Osaka city Univ.)

【目的】

Cyclic AMP (cAMP) は、ホルモンなどのファーストメッセンジャーに指令されて働く細胞内セカンドメッセンジャーであり、その作用は protein kinase の 活性化を通じ、次々に下位酵素群の活性を変化させ、種々の代謝調節がなされる。大腸菌において、cAMP によりその細胞分裂が阻害され、フィラメント状細胞になる変異株として *fic* (filamentation induced by cAMP) 遺伝子が同定された。その後の研究により Fic タンパク質は cAMP を介して細胞増殖を制御する因子であることが示されている。一方、ほぼすべての原核生物に数多くの toxin-antitoxin (TA) system と呼ばれるシステムが存在し、細胞の生育及び細胞死を制御していることが近年明らかになってきた。一般的に toxin 及び antitoxin 遺伝子はそれぞれ非常に小さな遺伝子で (60-360 bp)、オペロンを形成している。Toxin は菌体内で発現すると宿主自身に対して毒性を示し、antitoxin は toxin と複合体を形成しその毒性を中和する。今回我々は、*fic* 遺伝子が上流に存在する *yhfG* 遺伝子と、TA system を構成していること、YhfG の過剰発現は細菌の生育を抑制することを見出したので報告する。

【方法および結果】

fic 遺伝子が上流に存在する *yhfG* 遺伝子と TA system を構成しているか調べるために、pBAD-*fic*、pBAD-*yhfG* および pBAD-*yhfGfic* を構築し、アラビノース存在下での生育を解析した。その結果、YhfG の過剰発現は大腸菌の生育を阻害した。一方、YhfG と Fic を共発現させると生育に影響は見られなかったことから、YhfG が toxin、Fic が antitoxin の TA system として機能することが示された。興味深いことに、Fic の過剰発現は細胞形態および生育に全く影響しなかった。次に cAMP 存在下での Fic および YhfG 発現後の生育および細胞形態を pBAD24、pBAD-*fic* および pBAD-*yhfG* を用いて解析した。その結果、cAMP とアラビノース存在下では pBAD24 を有する大腸菌の生育も阻害された。そこで、pET-*yhfG* を用いて解析した結果、cAMP 存在下での YhfG の過剰発現は cAMP 非存在下より強い生育阻害を示した。現在、YhfG および Fic による大腸菌への増殖への影響をさらに解析するとともに、アラビノースと cAMP 両存在下で観察された大腸菌の生育阻害に関しても詳細な解析を行っている。

Escherichia coli, toxin-antitoxin system, growth factor

講演番号：2A17a04
講演日時：3 月 26 日 10:03～ センター2 号館 A17 会場

メチルグリオキサールによる出芽酵母の核分裂阻害機構の解析
Analysis of the methylglyoxal-induced inhibition of nuclear division in budding yeast
○野村 亘[1,2]、青木 美穂[3]、後藤 剛[1,2]、河田 照雄[1,2]、井上 善晴[3]([1]京大院・農・食品生物、[2]京大・生理化学研究ユニット、[3]京大院・農・応生科)
○Wataru NOMURA[1,2], Miho AOKI[3], Tsuyoshi GOTO[1,2], Teruo KAWADA[1,2], Yoshiharu INOUE[3] ([1]Div. of Food Sci. & Biotechnol., Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ., [2]Research Unit for Physiological Chemistry, [3]Div. of Appl. Life Sci., Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ.)

メチルグリオキサール（MG）は、解糖系から派生的に産生される 2-オキソアルデヒドである。多くの生物種において MG は細胞増殖に対して負に影響を与えることが知られているが、その作用機序は良くわかっていない。これに対して我々は、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いた解析から、細胞内 MG レベルの上昇が核分裂を阻害することを見出し（Biochem. J. 2018)、前回大会において報告した。しかしながら、MG が核分裂を阻害する機構については不明であった。一方、これまでに我々は、MG が液胞の肥大化を引き起こすことで核の形態に影響を及ぼすことを見出している (Biochem. J. 2018)。また、MG は液胞膜上に集積することが知られるホスファチジルイノシトール 3,5-二リン酸（PtdIns(3,5)P_2）レベルを上昇させた（J. Biol. Chem. 2017)。そこで今回、MG による核分裂阻害における液胞の関与に着目して検討を行った。

MG による PtdIns(3,5)P_2 レベルの上昇と核分裂阻害との関連を検証したところ、PtdIns(3,5)P_2 合成不全株では MG による核分裂阻害が緩和された。さらに、PtdIns(3,5)P_2 のエフェクター分子について検討した結果、Atg18 の関与を見出した。Atg18-GFP を用いた局在観察において、MG 処理は Atg18-GFP の液胞膜局在を増加させた。一方、液胞膜の融合に必要な因子の欠損株では、MG による液胞の肥大化は認められず、それらの欠損株では MG による核分裂阻害も起こらなくなった。これらの結果から、MG による核分裂阻害において、Atg18 および液胞の肥大化が関与する機構の存在が考えられた。

methylglyoxal, yeast, nuclear division

講演番号：2A17a05
講演日時：3 月 26 日 10:14～ センター2 号館 A17 会場

分岐鎖アルコールによる酵母生育阻害の新たな分子メカニズムの発見とイソブタノール生産への応用

Discovery of a novel mechanism underlying growth inhibition of yeast by branched-chain alcohols and its application to isobutanol production

○黒田 浩一[1]、渡邉 幸夫[1]、Gerald R. Fink[2]、Gregory Stephanopoulos[3]、植田 充美[1]、Jose L. Avalos[4]
([1]京大院農・応用生命、[2]Whitehead Institute for Biomedical Research、[3]Massachusetts Institute of Technology、[4]Princeton University)
○Kouichi KURODA[1], Yukio WATANABE[1], Gerald R. FINK[2], Gregory STEPHANOPOULOS[3], Mitsuyoshi UEDA[1], Jose L. AVALOS[4] ([1]Kyoto University, [2]Whitehead Institute for Biomedical Research, [3]Massachusetts Institute of Technology, [4]Princeton University)

【目的】酵母 *Saccharomyces cerevisiae* はエタノール耐性が高いこともあり、元来エタノール生産に優れた微生物である。しかし、同じアルコールでも炭素数が 2 つ増えたブタノール類に対しては耐性が全く異なり、高い耐性は見られない。エタノールよりも優れたバイオ燃料として期待されるイソブタノール生産を行う際、細胞自体の耐性を高めておくことが重要であるが、イソブタノール耐性を大きく向上させた例は無く、イソブタノールが毒性を発揮する機構についてもほとんど分かっていない。本研究では、イソブタノールによる生育阻害機構を明らかにし、イソブタノール耐性とイソブタノール生産能を向上させることを目的とした。

【方法と結果】酵母 1 遺伝子破壊株ライブラリーの生育比較により、イソブタノール耐性に大きな影響を与える破壊株を同定した。特にペントースリン酸経路の遺伝子破壊株ではエタノール耐性には影響せずイソブタノールにのみ高感受性を示した。一方、窒素源カタボライト抑制に関わる転写因子を破壊した株ではイソブタノール耐性が大きく向上し、分岐鎖アルコール特異的に耐性を示すというユニークな表現型を初めて見出した[1]。また、本耐性株と野生株の比較トランスクリプトーム解析を行い、その結果に基づいてイソブタノールによる生育阻害の新たな分子メカニズムを明らかにした[1]。さらに、本耐性株の代謝工学によりイソブタノール生産を行ったところ、生産量の大幅な増加も見られ、本耐性株の有用性が示された[1]。

[1] K. Kuroda et al., *Cell Systems*, in press

isobutanol tolerance, genome-wide screen, nitrogen catabolite repression

発表責任者：黒田 浩一（k_kuro@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2A17a06
講演日時：3 月 26 日 10:35～ センター2 号館 A17 会場

希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の胞子嚢開裂を制御するシグマーアンチシグマファクター系の同定と機能解析

Identification of a sigma and anti-sigma factor pair that regulates sporangium dehiscence in *Actinoplanes missouriensis*

○光山 京太[1]、手塚 武揚[1,2]、大西 康夫[1,2] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]東大・微生物連携機構)
○Kyota MITSUYAMA[1], Takeaki TEZUKA[1,2], Yasuo OHNISHI[1,2] ([1]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, Univ. of Tokyo)

【背景・目的】希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* は、栄養豊富な環境では基底菌糸を伸張して増殖するが、栄養飢餓環境では多数の胞子を内包する胞子嚢を基底菌糸上に形成して休眠する。胞子嚢は水分を感知すると開裂して胞子を放出する。放出された胞子は水中を高速で運動する遊走子となり、栄養豊富な環境に至ると運動を停止して発芽する。以前、野生株を親株とする UV 変異株ライブラリーからのスクリーニングにより、正常な形態の胞子嚢を形成するが、その胞子嚢が開裂しない表現型を示す変異株 M-12 が得られていた。M-12 株では AMIS_54230 (SipA) に S229P 変異が導入されており、Δ*sipA* 株では M-12 株同様、胞子嚢開裂能が失われていたことから、S229P 変異は SipA の機能を消失させると考えられたが、SipA の機能消失が胞子嚢開裂を阻害する分子機構は不明であった。本研究では、*sipA* と協働して胞子嚢開裂を制御する新たな遺伝子の同定と機能解析を行った。
【方法・結果】M-12 株を親株として UV 変異株ライブラリーを作製してスクリーニングを行い、胞子嚢開裂能が回復したサプレッサー変異株を 27 株得た。そのうちの 1 つ S-14 株では、*sipA* の隣の遺伝子座にコードされる AMIS_54240 (SsdA) に S100P 変異が導入されていた。Δ*sipA*Δ*ssdA* 株は S-14 株と同様に正常な開裂能を示し、また、Δ*ssdA* 株は野生株と同様の表現型を示した。SsdA は C 末端側に STAS ドメインを持つシグマ因子で、シグマ因子ドメイン中の S100P 変異によってその機能が失われていると考えられた。一方、遺伝子破壊株の表現型から、SipA は SsdA のアンチシグマ因子として機能すると予想された。そこで、大腸菌を宿主とする Two-hybrid assay を行ったところ、SipA と SsdA 間で相互作用が検出されたが、S229P 変異型 SipA と SsdA 間では相互作用は検出されなかった。以上の結果から、シグマ因子 SsdA は胞子嚢開裂を抑制する遺伝子群の転写を活性化する機能を持ち、野生株ではアンチシグマ因子 SipA によりその機能が抑制されて胞子嚢開裂が起こるという制御モデルが示唆された。そこで、Δ*sipA* 株と Δ*sipA*Δ*ssdA* 株との間で比較トランスクリプトーム解析を行った結果、101 個の遺伝子の転写が Δ*sipA* 株で 5 倍以上に活性化しており、そのうち転写開始点が同定されている遺伝子のプロモーター配列で MEME によるモチーフ探索を行ったところ、SsdA の認識プロモーター配列と思われるモチーフが得られた。さらに、上流に SsdA の認識プロモーターと推測される配列を持つ 6 つの遺伝子をプローブとして、大腸菌由来 RNA ポリメラーゼコア酵素および組換え SsdA を用いた *in vitro* 転写実験を行ったところ、2 つで転写を示すシグナルが検出された。本発表では、組換え SipA を加えて行った *in vitro* 転写実験の結果も発表する予定である。

spore, dormancy, sigma and anti-sigma factor pair

発表責任者：大西康夫（ayasuo@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A17a07
講演日時：3 月 26 日 10:46～ センター2 号館 A17 会場

希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の胞子嚢開裂を制御する Clp プロテアーゼに関する研究

Characterization of the Clp protease that regulates sporangium dehiscence in *Actinoplanes missouriensis*

○鈴木 遼太[1]、手塚 武揚[1,2]、大西 康夫[1,2] ([1]東大院・農生科、[2]東大・微生物連携機構)
○Ryota Suzuki[1], Takeaki Tezuka[1,2], Yasuo Ohnishi[1,2] ([1]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci. Univ. of Tokyo, [2]CRIIM Univ. of Tokyo)

【背景・目的】希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* は栄養飢餓状態になると数百個の胞子を内包した胞子嚢を形成し休眠する。胞子嚢は水に浸されると開裂し、放出された胞子は遊走子となって泳ぎ始める。転写阻害剤やセリンプロテアーゼ阻害剤の存在下では胞子嚢の開裂が進行しないことから、胞子嚢の開裂には何らかの遺伝子の発現とセリンプロテアーゼ活性が必要であることが示唆されていた。セリンプロテアーゼに属する Clp プロテアーゼは ATP の加水分解によって得られるエネルギーを利用して基質タンパク質のフォールディングをほどく ATPase サブユニット（ClpX）とアンフォールドされたタンパク質を分解するプロテアーゼサブユニット（ClpP）から構成される巨大なタンパク質複合体である。我々は昨年度の本大会において、ClpX が胞子嚢の形成と開裂に重要な機能を有することを発表したが、[1]本研究ではプロテアーゼ本体である ClpP に着目した。
【方法・結果】*A. missouriensis* のゲノムには ClpP をコードすると予想される遺伝子が 4 つ (遺伝子 ID の数字の小さい順に *clpP1-4* と命名) あるため、個別に遺伝子の破壊を試みた。取得出来た Δ*clpP1* 株、Δ*clpP3* 株、 Δ*clpP4* 株の表現型を観察したところ、胞子嚢形成はいずれの破壊株も正常であった。一方、Δ*clpP1* 株と Δ*clpP4* 株は胞子嚢開裂も正常であったが、Δ*clpP3* 株の胞子嚢はほとんど開裂しなかった。この結果から ClpP3 は胞子嚢の開裂に重要な機能を有するセリンプロテアーゼであることが明らかになり、これまでの結果と合わせて、ClpX と ClpP3 からなる Clp プロテアーゼ複合体が胞子嚢開裂に関わると考えられた。次に、*A. missouriensis* の ClpP1-4 をクエリーにし、他の *Actinoplanes* 属放線菌 15 種、ClpP を 1 つしか持たない細菌として大腸菌と枯草菌、ClpP ホモログを複数持つ細菌として *Streptomyces* 属放線菌を対象として Blast 検索を行い、*E*-value が 10^{-15} 以下になるものを集めて系統樹を作製した。その結果、(i) ClpP1-4 はいずれも検索した全ての *Actinoplanes* 属放線菌で高度に保存されていること、(ii) ClpP3 は他の ClpP と系統樹上で離れた位置に存在すること、(iii) 胞子嚢を形成しない大腸菌や枯草菌、*Streptomyces* 属放線菌は ClpP3 のオルソログを持たないこと、が明らかになった。この結果より、ClpP3 は *Actinoplanes* 属放線菌に特異的に保存され、胞子嚢の開裂という特殊な生命現象に関わっていると考えられる。現在、形態分化の各段階において ClpX がどの ClpP と複合体を形成しているかを示すとともに、胞子嚢開裂時における Clp プロテアーゼの基質を同定することを目指しており、その結果も合わせて発表する。

(1) 日本農芸化学会 2018 年度大会　講演番号 1C5a08

rare actinomycete, sporangium dehiscence, Clp protease

発表責任者：大西 康夫（ayasuo@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A17a08
講演日時：3 月 26 日 10:57～ センター2 号館 A17 会場

希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の胞子嚢形成・開裂を制御する FliA レギュロンの機能解析
Functional analysis of the FliA regulon that regulates sporangium formation and dehiscence in the rare actinomycete *Actinoplanes missouriensis*

手塚 武揚[1,2]、○漆間 功真[3]、大西 康夫[1,2] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]東大・微生物イノベ連携機構、[3]東大・農)
Takeaki Tezuka[1,2], ○Katsumasa Uruma[3], Yasuo Ohnishi[1,2] ([1]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, Univ. of Tokyo, [3]Fac. of Agric., Univ. of Tokyo)

【背景】希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* は、栄養豊富な環境では基底菌糸を形成して増殖するが、栄養飢餓状態に陥ると基底菌糸上に胞子嚢柄を介して胞子嚢を形成する。胞子嚢は水に触れると開裂し、内部の胞子を外部環境中に放出する。放出された胞子はべん毛により水中を運動する遊走子となり、走化性により栄養が豊富な環境にたどり着くと運動を停止し、発芽して再び栄養菌糸を形成する。我々は、胞子嚢の形成、開裂の過程で多数の遺伝子の転写を活性化するグローバルな転写制御因子 TcrA や TcrA の制御下で多数の遺伝子の転写を制御するシグマ因子 FliA1、FliA2、FliA3 に注目して解析を行ってきた。昨年度の本大会では、Δ*fliA1*Δ*fliA2* 株で胞子嚢の形成と開裂、胞子の休眠に異常が見られることを発表した。[1)] そこで、本研究では FliA1 と FliA2 の制御下にある遺伝子に注目し、胞子嚢の形成と開裂、胞子の休眠に関わる遺伝子の探索と機能解析を行った。
【方法・結果】RNA-Seq 解析の結果、Δ*fliA1*Δ*fliA2* 株では野生株と比較して 43 遺伝子の転写量が有意に減少していた。この中にはべん毛遺伝子が 10 個、走化性受容体遺伝子が 2 個含まれ、これらは胞子嚢形成や開裂、胞子の休眠には関与しないと考え解析から除外した。また、10 遺伝子はすでに研究室で破壊株が作製され、表現型が解析されていた。残り 21 遺伝子のうち 9 遺伝子は *in silico* で何らかの機能が推測される一方、12 遺伝子は機能未知であった。これら 21 遺伝子を対象として破壊株の取得を試みた。機能未知遺伝子については 6 つの破壊株を取得したものの、いずれも野生株と同じ表現型を示した。一方、機能が予測された遺伝子については 7 遺伝子の破壊株を取得し、このうち 3 つの破壊株で野生株と違う表現型が観察された。ECF サブファミリーのシグマ因子をコードする *AMIS_57590* の破壊株では、胞子嚢柄が異常に長くなった胞子嚢が多数観察され、野生株の胞子嚢が開裂しない蒸留水中においても多くの胞子嚢で開裂が進行した。また放出された遊走子の運動能が低下していた。トランスポザーゼをコードする *AMIS_42060* の破壊株は正常な形態の胞子嚢を形成するものの、開裂誘導条件下においても大部分の胞子嚢で開裂が進行しなかった。二成分制御系のセンサーキナーゼとレスポンスレギュレーターをそれぞれコードする *AMIS_79610* と *AMIS_79620* の二重破壊株では、胞子嚢の大きさが野生株の胞子嚢と比べて小さく、また胞子嚢を開裂誘導条件下においても開裂が進行しなかった。以上から、これらの遺伝子が胞子嚢形成と開裂、遊走子の運動に重要な役割を持つことが示された。

1). 橋口ら、2019 年度日本農芸化学会大会、講演番号 3C4p05

Actinoplanes missouriensis, sporangium formation, FliA regulon

発表責任者：大西康夫（ayasuo@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A17a09
講演日時：3 月 26 日 11:08～ センター2 号館 A17 会場

ピルビン酸応答二成分制御系 BtsS/R によるバイオフィルム形成制御機構の解明
Elucidation of regulatory mechanism of biofilm formation by pyruvate responsive BtsS/R two-component system in Escherichia coli
○山路 幸太郎[1]、小笠原 寛[2] ([1]信州大 繊維学部 応生、[2]信州大 基盤研究セ 遺伝子)
○Kotaro YAMAJI[1], Hiroshi Ogasawara[2] ([1]Bio Div., Shinshu Univ., Dept of Text Sci Tec.,Bio Div., [2]Shinshu Univ., Bas Res Sup Cen., Gene Res Sup Div.)

解糖系の最終産物であるピルビン酸は、発酵経路、アミノ酸生成経路のアミノ基転移反応、TCA サイクルなどの反応に関与する重要な代謝中間体である。大腸菌において、転写因子 PdhR が細胞内ピルビン酸濃度に応答してピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体や電子伝達系に関与する遺伝子発現を制御することが知られている。最近の研究において、二成分制御系 BtsS/R および PyrSR が、環境中のピルビン酸濃度に応答して遺伝子発現を制御することが明らかとされた。これまでの研究で我々は、バイオフィルム形成に関与する Curli 線毛構成因子をコードする *csgBA* 及び、バイオフィルム統括制御因子をコードする *csgD* が、二成分制御系 BtsS/R 系の制御下にあることを見出した。そこで本研究では、ピルビン酸濃度依存的なバイオフィルム形成制御の全容解明、および BtsS/R の機能的役割について明らかにすることを目的とした。

Genomic SELEX 法を用いた網羅的な標的遺伝子の探索により、BtsR は、*csgBA, csgD* を含め、多様な遺伝子発現を制御することが示唆され、それら新規標的候補遺伝子群プロモーター領域に BtsR 結合コンセンサス配列(ANCNCTAAANT)が見出された。*csgBA* について、ピルビン酸濃度依存的な遺伝子発現を確認したところ、野生株においては高濃度(10 mM)ピルビン酸存在下において著しい遺伝子発現の阻害が確認され、一方 *btsR* 欠損株についてはそれら変化が確認されなかった。同様に、高濃度ピルビン酸存在下において、BtsS/R 依存的なアミロイド線維形成および、バイオフィルム形成の阻害効果が確認された。これらの結果は、細菌細胞が環境中のピルビン酸濃度に応じてバイオフィルム形成を制御する新たな機構の存在を示唆した。

Pyruvate, Biofilm, two-component system

講演番号：2A17a10
講演日時：3 月 26 日 11:19～ センター2 号館 A17 会場

大腸菌ペリプラズムタンパク質 YccT によるアミロイド線維形成制御機構

Regulatory mechanism of amyloid fibril formation by Escherichia coli periplasmic protein YccT

小林 弘明[1]、佐野 晃太郎[1]、加藤 佑輝[1]、○小笠原 寛[2] ([1]信州大・繊維・応生、[2]信州大・基盤研究セ・遺伝子)
Hiroaki Kobayashi[1], Kotaro Sano[1], Yuki Kato[1], ○Hiroshi Ogasawara[2] ([1]Dept. Appl. Biol. Textile sci. Shinshu Univ., [2]Res. Center Supports Advanced Sci. Div. Gene Res. Shinshu Univ.)

環境中の多くの細菌種は、バイオフィルム形成能を有しており、主要成分である細胞外多糖類と共に、固体表面への付着や細菌細胞同士の凝集などに関与するアミロイド線維タンパク質からなる細胞外マトリックスを形成する。これまでの研究で我々は大腸菌のペリプラズムタンパク質 YccT が、バイオフィルム統括制御因子 CsgD の制御下にあり、アミロイド線維タンパク質 CsgA の発現、および CsgA 自己重合によるアミロイド線維形成の制御に関与することを明らかにしてきた。本発表では、YccT が、ペリプラズム領域においてセンサーキナーゼ EnvZ に作用し、*csgD* および *csgBA* 発現を制御している可能性について報告する。大腸菌野生株における YccT-sfGFP 融合タンパク質を用いた局在解析において、YccT は主に細胞の両極への局在性を示し、*csgA* 欠損株においても同様の局在性を示した。一方、*envZ* 欠損株においては、主に細胞膜付近に散在する複数の蛍光スポットが観察されたことから、EnvZ は YccT の局在性に関与することが明らかとなり、EnvZ 以外にも YccT 局在性に関与する因子が存在する可能性を示唆した。また、ランダム変異導入による YccT の機能部位の探索を行い、*csgD*、*csgBA* 発現への影響、およびアミロイド線維形成への影響を調べた。本発表では、これまでの結果を基に、YccT によるアミロイド線維形成制御の分子機構について議論したい。

Amyloid fiber, Escherichia coli, Biofilm

講演番号：2A17a11
講演日時：3 月 26 日 11:40～ センター2 号館 A17 会場

酵母に見出した一酸化窒素合成に必要な補酵素の解析

Analysis of essential coenzyme for nitric oxide synthesis in yeast cell

○吉川 雄樹、那須野 亮、高木 博史（奈良先端科学技術大学院大学）
○Yuki YOSHIKAWA, Ryo NASUNO, Hiroshi Takagi (Nara Institute of Science and Technology)

【背景と目的】

一酸化窒素（NO）は、微生物から哺乳類に至るまでの生物において、様々な生命現象に関与するシグナル伝達物質である。哺乳類では NO 合成酵素（NOS）によって、アルギニンを基質として２段階の酸化反応で NO とシトルリンを合成する。また、哺乳類の NOS は NADPH からの電子の受け渡しを行うレダクターゼドメインと、基質の結合と酸化を行うオキシゲナーゼドメインから構成される。

一方、高等生物のモデルとして、また種々の発酵・醸造食品の製造に重要な微生物である酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においては、過酸化水素処理条件下で NO が産生されるが、哺乳類型 NOS の阻害剤であるアルギニンアナログを処理することで NO 生成量が顕著に低下することから、哺乳類の NOS に類似した NO 合成機構が存在すると考えられている。しかし、酵母のゲノム上には哺乳類型 NOS のオルソログは存在しないため、酵母における NO 合成機構には未だ不明な点が多い。そこで今回は、酵母細胞内での NO 合成に必要な補酵素の解明を目的として行った研究について発表する。

【方法と結果】

まず、NADPH が NO 合成に必要であるかを検討するために、主な NADPH の産生経路であるペントースリン酸回路の初発酵素で、$NADP^+$を利用して NADPH の再生を行うグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ（G6PD）の遺伝子破壊株を作製した。野生型株と G6PD 遺伝子破壊株について、NO の蛍光プローブおよびフローサイトメーターを用いて過酸化水素処理条件下での NO 合成能を評価した。その結果、ペントースリン酸回路を介して再生される NADPH が酵母における NO 合成に重要であることが示された。

また NADPH 以外にも、哺乳類 NOS の活性に必須な補酵素としてテトラヒドロビオプテリン（H_4B）が知られているが、酵母にはこの H_4B の合成系が存在しない。そこで我々は H_4B の構造類似体であるテトラヒドロ葉酸（H_4F）に着目した。酵母においては、H_4F の合成酵素であるジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）が生育に必須であるため、DHFR の競合阻害剤であるメトトレキサートを処理した酵母細胞を用いて NO 合成能を評価した。その結果、H_4F も NO 合成に必要である可能性が示された。

以上のことから、酵母細胞内での NO 合成機構には哺乳類 NOS と類似した NO 合成機構が存在することが示唆された。現在、NADPH および H_4F の合成機構と NO 合成の関連性を明らかにするとともに、NADPH と H_4F の生理機能について解析を進めている。

Nitric Oxide, Pentose Phosphate Pathway, Tetrahydrofolate

発表責任者：吉川　雄樹（y-yoshikawa@bs.naist.jp）

講演番号：2A17a12
講演日時：3 月 26 日 11:51～ センター2 号館 A17 会場

リボフラビン合成系酵素 GTP シクロヒドロラーゼ II 依存的な新しい一酸化窒素耐性機構
A novel nitric oxide tolerance mechanism dependent on GTP cyclohydrolase II which catalyzes the first step in riboflavin synthesis
○那須野 亮、アナム カイルル、高木 博史（奈良先端大バイオ）
○Ryo NASUNO, Khairul ANAM, Hiroshi TAKAGI (Div. of Biol. Sci., Grad. Schl. of Sci. and Tech., Nara Inst. of Sci. and Tech.)

【背景・目的】一酸化窒素（NO）は、様々な生物種において多様な生命現象に関わるシグナル分子である。NO は、適度な濃度であれば血圧調節や酸化ストレス耐性などの生理的現象に関与するが、過剰な濃度では毒性を発揮し細胞死を誘導する。そのため、生体内 NO 濃度は厳密に制御される必要がある。これまでに NO の分解・解毒系としては、NO 分解酵素フラボヘモグロビン、NO による翻訳後修飾 *S*-ニトロソ化を解除する *S*-ニトロソグルタチオン還元酵素が報告されている。さらに近年、チオレドキシン/チオレドキシン還元酵素と協調して NO を補足･分解する短鎖ペプチドであるニトロソチオネインが糸状菌より見出された。このことから我々は、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて、さらなる NO 解毒・耐性機構を探索・同定・解析することを目的に研究を行った。
【結果・考察】酵母 *S. cerevisiae* のゲノム由来のマルチコピーライブラリーを野生型酵母に導入し、NO ドナーとして $NaNO_2$ を添加した酸性最少培地にて生育の早いクローンを単離した。続いて、詳細な NO 耐性試験とプラスミド依存性の確認を経て、4 クローンの NO 耐性株を取得した。この 4 クローンから抽出したライブラリープラスミドの配列を解析した結果、全てのクローンから、リボフラビン（RF）生合成の初発酵素 GTP シクロヒドロラーゼ II（GTPCH2）をコードする *RIB1* 遺伝子の配列を見出した。続いて、*RIB1* 過剰発現株の NO 耐性を評価したところ、野生型株に比べて顕著に高い NO 耐性を示した。また、RF の培地への添加は NO 耐性に影響を及ぼさず、一方、他の RF 生合成酵素をコードする遺伝子の破壊は *RIB1* 依存的 NO 耐性を変化させなかった。これらのことから、*RIB1* は RF 合成非依存的に NO 耐性を上昇させることが明らかとなった。さらに、変異を導入して GTPCH2 を失活させた *RIB1* を過剰発現しても、酵母の NO 耐性は上昇しなかったことから、GTPCH2 活性が酵母の NO 耐性に重要であることが分かった。そこで、精製した Rib1 タンパク質の NO 分解活性を評価したところ、Rib1 は NO を分解しなかった。一方、精製 Rib1 を用いた GTPCH2 反応溶液は NO を消去する活性を示した。GTPCH2 反応は、GTP をピロリン酸、ギ酸、2,5-ジアミノ-6-(5-ホスホ-D-リボシルアミノ)ピリミジン-4(3H)-オン（DARP）へと変換するが、ピロリン酸とギ酸は NO 消去活性を示さなかったことから、DARP が NO を消去すると考えられた。また、DARP のピリミジン部位に相当するトリアミノピリミジン誘導体には明確な NO 消去活性が認められた。以上のことから我々は、GTPCH2 の反応生成物 DARP がそのピリミジン部位により NO を消去し、酵母の NO 耐性に寄与すると結論付けた。

Nitric oxide, Riboflavin, Yeast

講演番号：2A17a13
講演日時：3 月 26 日 12:02～ センター2 号館 A17 会場

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における転写因子 Fzf1 による細胞内 NO レベルの調節機構
Transcription factor Fzf1-dependent regulation mechanism of intracellular nitric oxide levels in *Saccharomyces cerevisiae*

○吉岡 奈津子、那須野 亮、高木 博史（奈良先端大・バイオ）
○Natsuko YOSHIOKA, Ryo NASUNO, Hiroshi TAKAGI (NAIST)

【背景と目的】

一酸化窒素（NO）は、種々の生物種において多様な生命現象に関与するシグナル分子である。哺乳類においては、NO 合成酵素によってアルギニンから合成される NO が血圧の調節や神経伝達などに寄与することが知られている。植物においては、生育調節や光合成、感染防御などに関わることが報告されている。また、近年我々は、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、高温処理条件下でフラボタンパク質 Tah18 依存的に細胞内 NO レベルが上昇し、細胞保護に関与することを示した。一方、高濃度の NO が生育環境中に存在する場合、酵母の生育が著しく低下することが報告されている。このように、NO の機能には正負の二面性があり、その濃度は厳密に制御される必要がある。

NO 分解酵素 Yhb1 と、NO の酸化代謝物である硝酸・亜硝酸を細胞外へ排出するトランスポーター Ssu1 の発現は、転写因子 Fzf1 に制御されることが示唆されている。このことから、酵母細胞内で NO が適切に機能するためには、Fzf1 による Yhb1 や Ssu1 の発現制御を介した細胞内 NO レベルの調節が重要であると考えた。そこで本研究では、Fzf1 が NO に応答して活性化する機構を解析し、Yhb1 や Ssu1 を介して細胞内 NO レベルを調節する機構を明らかにすることを目的とした。

【方法と結果】

野生型株と *FZF1* 破壊株を NO ドナーで処理した際の *SSU1* と *YHB1* の転写量を real time-qPCR で測定した。その結果、野生型株では両遺伝子の転写量が増加したが、*FZF1* 破壊株では転写量は変化しなかった。このことから、NO に応答して Fzf1 依存的に *YHB1* と *SSU1* が誘導されることが示された。

Ssu1 は亜硫酸の輸送体として機能すると推定され、Fzf1 を介して転写調節を受けていることが報告されている。そこで、亜硫酸と Fzf1 による遺伝子発現誘導の関連性を解析する目的で、野生型株と *FZF1* 破壊株を亜硫酸で処理し、*YHB1* および *SSU1* の転写量を測定した。その結果、野生型株と *FZF1* 破壊株の両方において、亜硫酸処理条件下で *SSU1* と *YHB1* の転写量が同程度増加した。これらの結果から、*SSU1* と *YHB1* は NO と亜硫酸の両方に応答して誘導されるが、Fzf1 は NO に応答した遺伝子発現誘導にのみ関与することを見出した。一方、Fzf1 の活性調節機構を明らかにするため、細胞を NO で処理した際の *FZF1* の転写量を測定したところ、転写量に変化はなかった。このことから、Fzf1 は自身の発現量を増加させずに下流遺伝子の転写誘導を引き起こすことが明らかになった。現在、Fzf1 が翻訳後修飾により活性化されるとの仮説を立て、解析を進めている。

nitric oxide, yeast, transcription

講演番号：2A17p01
講演日時：3 月 26 日 13:50～ センター2 号館 A17 会場

複合スフィンゴ脂質生合成破綻下における酵母の生存戦略

Protection mechanisms against impaired biosynthesis of complex sphingolipids in budding yeast

坂本 理沙、瓜田 敦哉、○谷 元洋（九州大理）
Risa SKAMOTO, Atsuya URITA, ○Motohiro TANI (Kyushu Univ.)

真核生物において複合スフィンゴ脂質は、生育に必須な膜脂質である。その生合成系が破綻し、細胞内の複合スフィンゴ脂質量が減少すると、膜ダイナミクスの異常や膜タンパク質の正常な局在、活性制御が失われることで、広範囲に及ぶ細胞機能の異常が誘発されると考えられている。我々は、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において複合スフィンゴ脂質が減少し生育に重篤な影響が現れると、高浸透圧ストレス応答シグナル伝達経路（HOG 経路）が活性化されることで細胞を救済することを明らかにしており、HOG 経路が欠損した酵母では、複合スフィンゴ脂質合成酵素（Aur1）を抑制した際に生じる生育阻害が顕著に促進されることを見出している（*Mol Microbiol* (2018)107,363）。本研究では、*AUR1* 発現抑制下で救済に寄与する HOG 経路の下流因子の同定を試みた。DNA マイクロアレイによって、*AUR1* 発現抑制下で HOG 経路依存的に転写が活性化される遺伝子が 80 個程度存在することが確認された。この中より特に HOG 経路による発現誘導が強く観察された遺伝子 30 個に関して、それぞれの遺伝子を過剰発現させ *AUR1* 発現抑制による生育阻害に対する救済能を調べた。その結果、2 つの遺伝子（*FMP48*、*UIP4*）が過剰発現によって *AUR1* 発現抑制による生育阻害を抑制できることがわかった。Fmp48、Uip4 の詳細の機能はよくわかっていないが、Fmp48 はミトコンドリア機能を負に制御することが示唆されている。*AUR1* 発現抑制下における Fmp48 の発現上昇は、HOG 経路下流の転写因子である Msn2/4 に依存することが確認された。また、*MSN2* の過剰発現株では *AUR1* 発現抑制による生育低下が回復することがこれまでに分かっていたが、*FMP48* を欠損させるとその回復効果が減弱することがわかった。反対に *FMP48* を過剰発現させると、*AUR1* の発現抑制に対して抵抗性を付与し、*AUR1* 発現抑制下での活性酸素種（ROS)の増加を抑制することが分かった。また、ミトコンドリア DNA が欠損し、ミトコンドリアの呼吸鎖がはたらかない変異株（*rho0*）では、複合スフィンゴ脂質量低下による生育阻害効果が弱まり、ROS の生成も抑制された。これらの結果より、酵母は *AUR1* 発現抑制下で HOG 経路依存的に *FMP48* の発現を上昇させ、ミトコンドリア由来の ROS の生成を低減させることで、自己を救済していることが考えられた。

Sphingolipid, HOG pathway, Saccharomyces cerevisiae

発表責任者：谷 元洋（tani@chem.kyushu-univ.jp）

講演番号：2A17p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ センター2 号館 A17 会場

出芽酵母の複合スフィンゴ脂質生合成破綻下における cAMP/PKA シグナリング経路と HOG 経路の役割

Roles of the cAMP/PKA and the HOG pathways under impaired biosynthesis of complex sphingolipids in budding yeast

○瓜田 敦哉[1]、柳瀬 由起美[1]、石橋 洋平[2]、谷 元洋[1] ([1]九州大理、[2]九州大農)

○Atsuya URITA[1], Yukimi YANASE[1], Yohei ISHIBASHI[2], Motohiro TANI[1] ([1]Fac. of Sci., Kyusyu Univ., [2]Fac.of Agr., Kyushu Univ.)

複合スフィンゴ脂質は、真核生物の正常な生育に必須な膜脂質である。その生合成破綻は、広範囲に及ぶ細胞機能の異常を引き起こし、重篤な場合は死に至る。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では、セリンとパルミトイル CoA の縮合反応からいくつかの段階を経て、疎水性部分となるセラミドが合成され、更に親水性頭部の付加によって、複合スフィンゴ脂質が合成される。Aur1 は、セラミドに親水性頭部を付加して複合スフィンゴ脂質に変換する IPC 合成酵素で、*AUR1* 発現抑制により複合スフィンゴ脂質が減少すると強力な生育阻害が誘導される。

我々は複合スフィンゴ脂質生合成破綻がもたらす生育阻害と関連する遺伝子を探索する中で、cAMP/プロテインキナーゼ A(PKA)シグナル伝達経路の活性化を引き起こす遺伝子変異が、*AUR1* 発現抑制による生育阻害を促進することを明らかにした。更に、この生育阻害促進効果を抑制できるマルチコピーサプレッサー遺伝子の探索を行なうことで、*AUR1* 発現抑制下における cAMP/PKA 経路の機能解明を試みた。その結果、複合スフィンゴ脂質生合成破綻に対する救済経路として最近我々が同定した高浸透圧ストレス応答 HOG 経路の MAPKK をコードする *PBS2* 遺伝子を同定した。このことより、*AUR1* 発現抑制下において cAMP/PKA 経路が HOG 経路に影響を与えていることが考えられた。cAMP ホスホジエステラーゼをコードする *PDE2* を欠損し、cAMP/PKA 経路の活性が上昇した変異株では、*AUR1* 発現抑制下での Hog1(HOG 経路の MAPK)のリン酸化、及び HOG 経路を介した転写応答活性が低下していることが分かった。また一方で、酵母に存在する三種類の PKA (Tpk1,Tpk2,Tpk3) のうち、Tpk3 の活性が HOG 経路の下方制御に寄与することも示唆された。これらのことより、複合スフィンゴ脂質生合成破綻下において、cAMP/PKA 経路が複合スフィンゴ脂質破綻救済機構として機能する HOG 経路の適切な活性化に寄与している可能性が示唆された。

Sphingolipid, cAMP/PKA pathway, Saccharomyces cerevisiae

発表責任者：谷　元洋（tani@chem.kyushu-univ.jp）

講演番号：2A17p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ センター2 号館 A17 会場

グルコース応答経路によるスピンドルチェックポイントタンパク質 Mad1 の制御機構
Control mechanism of spindle assembly checkpoint protein, Mad1, by the glucose response signaling pathway.
○田部 卓磨[1]、明吉 純花[1]、酒井 智健[1]、川向 誠[1,2]、松尾 安浩[1,2]([1]島根大・生物資源・生命科学、[2]島根大・農生命系)
○TAKUMA TANABE[1], AYAKA AKIYOSHI[1], TOMOTAKE SAKAI[1], MAKOTO KAWAMUKAI[1,2], YASUHIRO MATSUO[1,2] ([1]Department of Life Sciences, Faculty of Life and Environmental Sciences, Shimane University, [2]Institute of Agricultural and Life Sciences, Academic Assembly, Shimane University)

炭素源は、生物が生きていく上で必要不可欠であり、モデル生物として用いている分裂酵母は細胞外環境の栄養状態をすばやく認識し、それに適応する必要がある。分裂酵母の野生株は、培養液中のグルコース濃度を 3%から 0.1%に下げたグルコース制限下で、様々なストレスへの感受性が増加する傾向がみられる。その中で有糸分裂の進行を阻害する微小管重合阻害剤への感受性に注目し、この原因を解明することを目的とした。

野生株を 3%グルコース条件下と 0.1%グルコース制限下で、微小管重合阻害剤への感受性を解析したところ、感受性が増加していた。また、染色体分配を解析したところ、グルコース制限下において染色体分配の異常が増加していた。そこで、姉妹染色体分配の監視機構であるスピンドルチェックポイント(SAC)に注目した。SAC タンパク質は、活性化時にキネトコアに局在することが明らかになっているため、その局在を解析したところ、グルコース制限下ですべての因子のキネトコア局在が低下していた。一方で、常にキネトコアに局在するタンパク質の局在は、変化していなかったため、キネトコア構造に変化はなく、SAC タンパク質が活性化されないことが示唆された。次に SAC タンパク質の発現を解析したところ、Mad1 タンパク質のみ発現が低下していた。この低下の原因を調べた結果、Mad1 の転写レベルに変化はなく、ユビキチン–プロテアソーム系依存的にタンパク質分解が行われていることが示唆された。グルコース制限下で Mad1 のタンパク質量に関係している制御系を明らかにするために、グルコースに応答するシグナル伝達経路の Pka1(cAMP/PKA 経路), Tor1(TOR 経路), Ssp2(AMPK 経路)に着目した。これらの単独欠損株で Mad1 タンパク質の発現を解析したところ、すべての欠損株で Mad1 発現が低下していた。また、これらの単独欠損株の微小管重合阻害剤への感受性を解析したところ、*pka1* 欠損株および *tor1* 欠損株が感受性を示すことがわかった。最後に、野生株で Mad1 を高発現させ、0.1%グルコース条件で微小管重合阻害剤への感受性が抑圧されるか解析したところ、抑圧はみられなかった。

以上のことから、グルコース制限下での微小管重合阻害剤への感受性の増加は SAC が活性化されないことが原因であった。また、SAC タンパク質 Mad1 はグルコース応答の複数のシグナル伝達経路によって発現制御されているが、Mad1 発現低下がグルコース制限下での微小管重合阻害剤への感受性増加の直接的な要因ではないことが示唆された。

PKA, Glucose, Mad1

発表責任者：松尾安浩（ymatsuo@life.shimane-u.ac.jp）

講演番号：2A17p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ センター2 号館 A17 会場

分裂酵母 cAMP/PKA 経路の標的因子 Mug14 の解析
Analysis of Mug14, which is the target of Pka1 in fission yeast
○稲村 真一[1]、田部 卓磨[2]、川向 誠[1,2,3]、松尾 安浩[1,2,3] ([1]島根大・自然科学、[2]島根大・生物資源・生命科学、[3]島根大・農生命系)
○Shinichi Inamura[1], takuma Tanabe[2], Makoto Kawamukai[1,2,3], Yasuhiro Matsuo[1,2,3] ([1]Graduate Sch. of Nat. Sci. and Tech., Shimane Univ., [2]Dep. of Life Sci., Fac. of Life and Environ. Sci., Shimane Univ., [3]Inst. of Agricul. and Life Sci., Shimane Univ.)

cAMP/PKA 経路は、酵母からヒトまで幅広く保存されたシグナル伝達経路であり、分裂酵母ではグルコース応答経路として知られている。cAMP/PKA 経路は細胞外の豊富な炭素源に応答して触媒サブユニット Pka1 が活性化され、ストレス応答、糖新生、有性生殖過程への移行、経時的寿命を調節することが報告されている。分裂酵母で *pka1* 欠損株は、様々なストレスや薬剤に対して感受性を示すが、その詳細なメカニズムは明らかになっていない。そこで本研究では、網羅的解析によって、Pka1 の標的因子を同定し、その詳細な制御機構を解析することで、その標的因子の細胞内での機能を明らかにすることを目的とした。

Pka1 経路の下流因子を同定するために、野生株と *pka1* 欠損株からタンパク質を抽出し、ナノ LC-MS/MS 解析によって発現量が変化する因子を探索した。その結果、野生株に比べ、*pka1* 欠損株で発現量が増加している複数のタンパク質を同定した。我々はその中で、顕著に発現量が増加していた Mug14 に焦点を置いた。まず、Mug14-GFP 株を用いて解析したところ、野生株に比べ *pka1* 欠損株では細胞全体で強い蛍光が観察され、ウェスタン解析によるタンパク質発現、および半定量的 PCR による mRNA 発現においても *pka1* 欠損株で顕著に発現が増加していた。Pka1 の下流には、転写因子 Rst2 があり、Pka1 によって負に制御されている。そこで、*pka1 rst2* 二重欠損株において解析した結果、*rst2* の欠損によって、*pka1* 欠損株の Mug14 の発現量が、野生株程度まで減少していた。この発現制御には、Rst2 の DNA 結合ドメインや *mug14* プロモータ上にある Rst2 結合ドメインが必要であることが明らかになった。これらのことから *mug14* の転写は転写因子 Rst2 により直接制御されていた。また、分裂酵母では Mug14 のホモログ Add2 が存在していたため、発現解析を行ったところ、Mug14 と同様に *pka1* 欠損株で発現が増加していた。しかし、*add2* 遺伝子の発現は Rst2 による転写制御とは異なる制御を受けていることが明らかになった。Mug14 の発現増加がどのような表現型に関係しているか解析したところ、明らかな表現型は得られなかったが、*mug14* 欠損株が camptothecin に耐性を示し、*pka1 add2* 二重欠損株が rapamycin に感受性を示した。また、*pka1* 欠損株でみられる経時的寿命の延長が、*pka1 mug14* 二重欠損株ではさらに長寿になる傾向が確認された。

以上のことから、Mug14 は転写因子 Rst2 を介して cAMP/PKA 経路によって発現制御されており、経時的寿命に関係する可能性が示唆された。

glucose-limitation, the cAMP/PKA pathway, chronological aging

発表責任者：松尾安浩（ymatsuo@life.shimane-u.ac.jp）

講演番号：2A18a01
講演日時：3 月 26 日 09:30～ センター2 号館 A18 会場

IncP-7 群プラスミド pCAR1 上に新たに見出された TA システムの機能解析
Functional analysis of Toxin-Antitoxin system encoding on IncP-7 group plasmid pCAR1

○高島 綾[1]、河野 響[1]、上田 朋美[1]、水口 千穂[1,2]、岡田 憲典[1]、野尻 秀昭[1,2] ([1]東大・生物工学セ、[2]東大・微生物連携機構)
○ Aya TAKASHIMA[1], Hibiki KAWANO[1], Tomomi UEDA[1], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1,2], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1,2] ([1]BRC, UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

【背景】Toxin-Antitoxin (TA) システムは、細胞内で安定なタンパク質である toxin と不安定なタンパク質や RNA である antitoxin をそれぞれコードする二つの遺伝子から構成される。Toxin は細胞内で生育阻害を及ぼす一方、antitoxin と複合体を形成することで無害化される。TA システムがプラスミド上にコードされる場合、細胞分裂に伴い出現するプラスミド脱落株内では antitoxin と toxin のバランスが崩れる (antitoxin が早期になくなる) ことで toxin が優勢となり、生育阻害が引き起こされることでプラスミド脱落株は細胞死を迎える。結果として、プラスミド保持株（非脱落株）の集団中での比率は向上するため、TA システムはプラスミドの安定性 (stability) を高める分子装置と言える。当グループで用いられてきた IncP-7 群プラスミド pCAR1 の stability は、四種の *Pseudomonas* 属細菌（*P. putida* KT2440, P. *aeruginosa* PAO1, *P. fluorescens* Pf0-1, *P. resinovorans* CA10dm4）で非常に高い。この現象が pCAR1 上にコードされる TA システムの存在に起因する可能性を検証するために、まずは pCAR1 上の TA システムホモログの探索を行った。

【方法・結果】まず、TA システムホモログを検索できるデータベース TADB2.0 を用いた検索の結果、pCAR1 上の ORF174 が antitoxin を、ORF175 が toxin をそれぞれコードし、二つの遺伝子はオペロンを形成していることが示唆された。そこで当該 ORF の TA システムとしての細胞内での機能の検証を、本来 pCAR1 を保持していた *P. resinovorans* CA10dm4 株内で行った。まずベクターから誘導的に ORF175 を発現させたところ、誘導剤の濃度を上げるにつれ生残性の低下、つまり生育阻害が確認された（図 A)。続いて ORF175 発現株において、異なるベクターから ORF174 を pCAR1 由来の本来のプロモーターを用いて発現させたところ、誘導剤の濃度を上げて ORF175 の発現量を増加させても先ほどとは異なり生育阻害は確認されなかった（図 B)。これらの結果から、ORF175, ORF174 の遺伝子産物がそれぞれ toxin, antitoxin として機能する、つまり pCAR1 上にも TA システムが存在することを明らかにした。本発表では、他の IncP-7 群プラスミド（pDK1, Rms148）上には当該遺伝子群のホモログが存在しないことを踏まえた上で、pCAR1 上に TA システムを有する意義を議論したい。

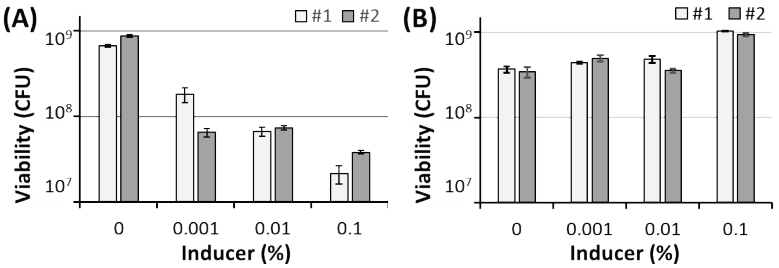


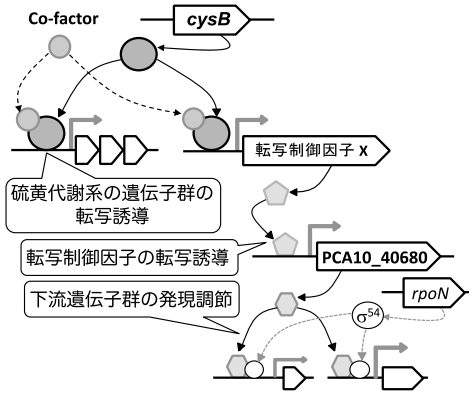
図. (A) ORF175 発現株および (B) ORF174 相補株の生残性の評価

Pseudomonas, Plasmid, Toxin-Antitoxin (TA) system

講演番号：2A18a02
講演日時：3 月 26 日 09:41～ センター2 号館 A18 会場

細菌にプラスミドへの非感受性を与える転写制御ネットワークの解明
Transcriptional regulatory network underlying the novel trait “Plasmid-Insensitivity”
○河野 響[1]、水口 千穂[1,2]、岡田 憲典[1]、野尻 秀昭[1,2]([1]東大・生物工学セ、[2]東大・微生物連携機構)
○Hibiki KAWANO[1], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1,2], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1,2]
([1]BRC, UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

【背景】プラスミドは、従来宿主細胞に「生育負荷」を及ぼすものであり、結果として集団中でのプラスミド保持株の fitness が低下すると考えられてきた。一方当グループは、実環境中でカルバゾール分解プラスミド pCAR1 を保持していた *Pseudomonas resinovorans* CA10dm4 株が各種プラスミド保持に伴う生育負荷を一切示さない、いわば「プラスミド非感受性」の宿主であることを明らかにしてきた。既存の通説には全く合致しない新規形質の分子基盤の解明を目指し、昨年度までに逆遺伝学的手法により全く異なる遺伝子が破壊された二株の「プラスミド感受的」な変異株を取得した。さらに変異株を用いた RNA-Seq 解析の結果、野生型株と比較して転写抑制される遺伝子の多くが両変異株で共通していた。ゆえに、両変異株ではある程度類似した機構で感受性を示したと推定され、本年度はその点に焦点を当てることで、プラスミド非感受性を担う分子基盤の中心部分の解明に取り組んだ。
【結果】両変異株で共通して転写抑制された遺伝子には、硫黄代謝系の遺伝子群やアミノ酸レベルでの相同性が非常に高い三つのσ^{54}依存性転写制御因子（PCA10_30000, 40590, 40680）が含まれていた。グラム陰性細菌では、転写制御因子 CysB が硫黄代謝系の遺伝子群の転写制御を司っている。実際に CA10dm4(pCAR1) 野生型株と *cysB* 破壊株を硫黄飢餓に晒したサンプルを用いて RT-PCR を行った結果、硫黄代謝系の遺伝子群が CysB 制御下に加えて、三つの転写制御因子（PCA10_30000, 40590, 40680）もまた CysB 制御下にあることを明らかにした。なお PCA10_40680 に関してはその上流のプロモーター配列から、CysB の直接の制御下にはないと推測された。次に三つの転写制御因子のプラスミド非感受性への関与を精査するため、単独・二重・三重破壊株をそれぞれ作製し各株のプラスミド保持に伴う負荷を評価した。その結果、PCA10_40680 の破壊に伴ってのみ pCAR1 を含む複数種のプラスミドに対して感受的に変化する、つまり PCA10_40680 こそがプラスミド非感受性の鍵因子であることを同定した。野生型株では、着目した硫黄代謝系遺伝子群や転写制御因子 PCA10_40680 が pCAR1 保持に伴い転写誘導されたことも踏まえると、CA10dm4 株ではプラスミド獲得に伴い CysB の転写活性化能（活性化には細胞内に存在する化合物 co-factor が必要）が上昇し、その下流の転写制御ネットワーク（図）が起動された結果、プラスミド非感受性が発揮される一連の経路が示唆された。



図．プラスミド非感受性に重要な転写制御ネットワーク

Pseudomonas, Plasmid fitness cost, Transcriptional regulation

発表責任者：野尻秀昭（anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A18a03
講演日時：3 月 26 日 09:52～ センター2 号館 A18 会場

Lanthanide dependent methylotrophic pathway in *Methylobacterium aquaticum* 22A

○Patcha YANPIRAT, Akio TANI (Okayama Univ.)

Methanol is the most abundant single-carbon compound produced by plants. It is metabolized by different methylotrophs as a carbon and energy source. *Methylobacterium* species are one of the most predominant methylotrophic bacteria in the phyllosphere. They utilize methanol by methanol dehydrogenases (MDHs), encoded by *mxaF* and *xoxF,* which are calcium (Ca^{2+})- and lanthanide (Ln^{3+})-dependent. The Ln^{3+}-dependency of XoxF has expanded knowledge on bacterial methylotrophy and posed new questions including the differences in characteristics of XoxF-type MDHs, and the whole metabolic pathways.

Methylobacterium aquaticum strain 22A contains these MDHs and ExaF (Ln^{3+}-dependent alcohol dehydrogenase) and the glutathione (GSH)-dependent formaldehyde oxidation pathway in addition to the tetrahydromethanopterin (H_4MPT)-dependent pathway that is common in the genus. Our transcriptome analysis revealed that in the presence of Ln^{3+} these formaldehyde oxidation pathways were downregulated but the whole formaldehyde degradation activity in the cells is still high, suggesting the involvement of *xoxF* in formaldehyde oxidation. The objectives of this study are to reveal the roles of XoxF and the GSH-pathway in formaldehyde oxidation process.

We examined the growth phenotypes and oxidation capability of methanol and formaldehyde of a series of formaldehyde oxidation pathway mutants (*fae1*, *fae2*, and *mch* in the H_4MPT pathway and *hgd* in the GSH pathway) generated in the wild type, Δ*mxaF*, and Δ*xoxF1*Sup genetic backgrounds. Δ*xoxF1*Sup is a suppression mutant of Δ*xoxF1* that recovered its growth on methanol, whereas Δ*xoxF1* cannot grow in the absence of La^{3+}, due to the dependency of *mxaF* expression on *xoxF1*. We found that MxaF produces formaldehyde to a toxic level in the absence of the formaldehyde oxidation pathways, XoxF1 and ExaF can oxidize formaldehyde to alleviate formaldehyde toxification *in vivo*. The GSH pathway is indeed functional in strain 22A and has a supportive role for the H_4MPT pathway that holds primary importance but not in MxaF mutants. The results of this study provide further insights on genetic and physiological diversity and differences in the methylotrophy within the plant-colonizing methylotrophs.

Methylobacterium, Lanthanide, Methanol dehydrogenases

発表責任者：TANI Akio（atani@okayama-u.ac.jp）

講演番号：2A18a04
講演日時：3 月 26 日 10:03～ センター2 号館 A18 会場

Methylobacterium aquaticum strain 22A におけるランタノイドスイッチのメカニズム
The mechanism of lanthanide switch in *Methylobacterium aquaticum* strain 22A
○宮本 稚子、谷 明生（岡山大植物研）
○Wakako MIYAMOTO, Akio TANI (Okayama Univ.)

[目的]
植物生育促進菌として分離された *Methylobacterium aquaticum* 22A 株は Ca^{2+}または La^{3+}の存在下でメタノールを炭素源として生育する。メタノール脱水素酵素（MDH）には 2 種類あり、一つは Ca^{2+}に依存しヘテロテトラマー構造を取る MxaF/I、もう一つは La^{3+}や Ce^{3+}などのランタノイドに依存しダイマーである XoxF である。この XoxF はランタノイド依存酵素として始めて発見された酵素である。本属細菌はランタノイドの存在下で XoxF を、非存在下で MxaFI を利用し、この調節機構はランタノイド・スイッチと呼ばれている。*mxaF* を欠失させた株は *xoxF* が存在しているために La^{3+}存在下でメタノールに生育する。*xoxF* を欠失させた株は *mxaF* が存在するにも関わらず、Ca^{2+}存在下で生育しない。すなわち *mxaF* の発現は *xoxF* に依存する。*xoxF* 欠失株からメタノール生育が回復した突然変異株 Δ*xoxF1*Sup 株のゲノムシーケンスにより、変異が膜局在型ヒスチジンキナーゼをコードする *mxbD* に見つかった。*mxbD* 欠失株は La^{3+}非存在下では生育しない。Δ*mxbD* 株では、*mxaF* の発現が低く、*xoxF* が La^{3+}非存在下でも高い発現を示すことから、*mxbD* は *mxaF* 発現および xoxF 抑制に関わっていることが予測された。また変異を導入した *mxbD* を導入すると La^{3+}非存在下での生育が回復したことから、ランタノイド・スイッチを司るのは MxbD であることが示唆された。モデル菌株 *M. extorquens* AM1 株では MxbD は転写調節因子 MxbM と共に二成分系シグナル伝達経路を構成する。22A 株でも両遺伝子はタンデムにゲノムにコードされている。MxbD が認識するリガンドはまだ不明であり、La^{3+}存在下で MxbM がリン酸化されるのかどうか、またリン酸化 MxbM が *mxaF, xoxF* のプロモーターに結合してそれぞれを正、負に調節するのかどうかは不明である。そこで、本研究では 22A 株のランタノイド・スイッチにおける MxbDM の役割を明らかにすることを目的とした。
[結果・考察]
MxbM 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより、MxbM は La^{3+}非存在下でリン酸化されること、Δ*xoxF* 株ではリン酸化されないこと、Δ*xoxF1*Sup 株では La^{3+}の存在にかかわらずリン酸化されることが分かった。また、野生株、Δ*mxaF*、Δ*xoxF1*Sup 株を遺伝的背景とした Δ*mxbM* 株は、La^{3+}にかかわらずメタノールに生育しなかった。このことから、MxbD は、La^{3+}が存在しないことを感知して MxbM をリン酸化し、MxaF を正に制御する。また MxbM は、La^{3+}存在下でも XoxF の発現に必要であることが分かった。現在リン酸化部位の特定を試みている。

Methylobacterium, Lanthanide, Gene regulation

発表責任者：谷 明生（atani@okayama-u.ac.jp）

講演番号：2A18a05
講演日時：3 月 26 日 10:14～ センター2 号館 A18 会場

Methylobacterium aquaticum 22A 株における Lanmodulin の機能解析
Functional analysis of Lanmodulin of *Methylobacterium aquaticum* 22A
○藤谷 良子、谷 明生（岡山大植物研）
○Yoshiko FUJITANI, Akio TANI (Okayama Univ.)

[目的]
Methylobacterium 属菌は、植物が放出するメタノールを利用して植物葉上で優占化する細菌の一種で、メタノールを酸化するための PQQ 依存 methanol dehydrogenase (MDH)を持っている。本属細菌ゲノムで MDH は *mxaF* と *xoxF* の 2 つの遺伝子にコードされている。MxaF はカルシウムを活性中心に持つ酵素であり、XoxF は近年ランタノイドを補因子として利用することがわかった酵素である。エゾスナゴケから分離された植物生育促進菌である *M. aquaticum* 22A 株の RNA Seq 解析で、La 存在下で XoxF が優先的に発現し、La 非存在下で MxaF が発現することが分かった。それ以外に La により高発現する機能未知の遺伝子がみつかり、これらのうち *lanM* 遺伝子(Maq22A_c02050)にコードされた Lanmodulin(LanM)の機能解析を行い、ランタノイドの生物学的プロセスへの関わりを解明する手がかりを得ることを本研究の目的とした。
[方法・結果]
LanM は、EF-hand と呼ばれる Ca 結合ドメインを持ち、*Methylobacterium* 属細菌の多くや *Bradyrhizobium* 属細菌のゲノム等に保存され、シグナルペプチドを持つ 12 kDa のタンパク質である。qPCR により La 存在下で発現量が上がることを確認し、大腸菌で発現させ精製した LanM タンパク質が La を結合することを確認した。22A 株細胞内で発現させた GFP タグ付 LanM は、共焦点顕微鏡観察によりペリプラズム周辺に局在を示した。また *lanM* 欠失株(*⊿lanM* 株)は、La 存在の有無に関わらず野生株よりメタノールでの生育能が高くなった。そこで、22A 株が持つ MDH 遺伝子を一つづつ残した株を背景にして *⊿lanM* 株と *lanM* 高発現株のメタノールでの生育を比較したところ、*mxaF* を残した株において、La 存在下で *⊿lanM* 株の生育が下がった。これは、プロモーターアッセイにより *mxaF* の発現が下がることによるものと分かり、LanM は *mxaF* の転写レベルでの発現調節に関与していることが示唆された。一方、*xoxF* を残した株を背景にした場合、La 存在の有無に関わらず、*⊿lanM* 株と *lanM* 高発現株のメタノールでの生育に違いがないため、XoxF の活性化や誘導には関与していないことが分かった。また細胞による La 取り込み実験では、*⊿lanM* 株は野生株に比べて La を取り込む量が少なくなり、過剰発現株では多くなった。これらのことから、LanM は細胞への効率的な La 取り込みと、La を隔離することにより La 存在下での Ca 依存 MDH である MxaF の活性化に関わっていると推察された。

Methylobacterium, Lanthanide, Lanmodulin

発表責任者：谷 明生（atani@okayama-u.ac.jp）

講演番号：2A18a06
講演日時：3 月 26 日 10:35～ センター2 号館 A18 会場

Methylorubrum 属細菌の低栄養環境下におけるランタノイド応答の分子メカニズムの解明
Molecular mechanism for response to lanthanide in *Methylorubrum* species under oligotrophic environment

○水野 洸介[1]、原田 雄斗[1]、岩本 悟志[1]、谷 明生[2]、三井 亮司[3]、島田 昌也[1]、早川 享志[1]、中川 智行[1]（[1]岐阜大自然科学、[2]岡山大植物研、[3]岡山理科大理）
○Kousuke MIZUNO[1], Yuuto HARADA[1], Satoshi IWAMOTO[1], Akio TANI[2], Ryouji MITSUI[3], Masaya SHIMADA[1], Takashi HAYAKAWA[1], Tomoyuki NAKAGAWA[1] ([1]Gifu Univ., [2]Okayama Univ., [3]Okayama Univ. of Sci.)

【目的】

自然界には「低栄養環境」が数多く存在し、「低栄養細菌」はその環境下で生育可能な細菌群である。このような細菌群が持つ低栄養環境下への適応能力は、バイオレメディエーションなど様々な分野への応用が期待できるため、その適応機構は非常に強い関心を集めている。一方、メチロトローフ細菌は水道水中にも存在するなど、低栄養環境に適応できることが知られている。これまで *Methylobacterium* sp.が低栄養環境下でランタノイド（Ln）の一種 Sm に応答し、そのコロニー径を増大させる現象が知られている。しかし、Sm に対する応答は自然界のメチロトローフ細菌における普遍性、また本応答の分子メカニズムは不明なままである。本研究では、低栄養環境下での Ln 応答のメチロトローフ細菌における普遍性とその分子メカニズムの解明を目的とした。

【方法・結果】

自然界より獲得したメチロトローフ細菌 75 株について、低栄養培地（1/100 普通栄養培地）でのコロニーの形態を観察した。そのうち 15 株は 30 μM Sm の添加によりコロニー径が増大した。よって Sm への応答はメチロトローフ細菌に普遍的な性質ではないものの、特定の菌株がもつ性質であることが示された。さらに Sm によりコロニー径が最も増大した *Mr. extorquens* GM97 株を用いてコロニー径増大の原因解明を目指した。GM97 株は Sm の有無に関わらず細胞の大きさに差異は見られなかったものの、Sm 添加によりコロニーあたりの細胞数が増加したことから、Sm は細胞増殖を活性化することが示された。また、増殖に対する Ln 特異性を観察したところ、メタノール脱水素酵素 XoxF の補因子である La や Ce ではコロニー径が増大せず、より原子量が大きい Eu などでは Sm と同様の応答を示した。また、*xoxF* 欠損株は野生株同様、Sm の添加によりコロニー径が増大した。これらのことから GM97 株は低栄養環境では比較的原子量が大きい Ln に、メタノール環境では比較的原子量が小さい La や Ce に応答するなど、生育環境に応じて Ln を使い分けていることが示唆された。一方、RNAseq 解析を用いて Sm により発現が誘導・抑制される遺伝子を同定したところ、91 遺伝子は発現が上昇し、70 遺伝子は低下した。これらには K^+輸送に関する遺伝子群が比較的多く含まれており、特に高親和性 K^+イオン輸送系 Kdp システムの遺伝子発現が上昇していた。そこで低栄養培地に K^+イオンを添加して培養を行ったところ、K^+濃度依存的にコロニー径の増大が観察された。このことから、GM97 株の低栄養環境下での増殖において K^+イオンが何らかの役割を果たすことが推測された。

Methylorubrum, Lanthanide, Oligotrophic environment

発表責任者：中川 智行（t_nakaga@gifu-u.ac.jp）

講演番号：2A18a07
講演日時：3 月 26 日 10:46～ センター2 号館 A18 会場

ブタ由来の腸内細菌 *Megasphaera elsdenii* の有機酸代謝経路の解明
Analysis of organic acid metabolic pathway of *Megasphaera elsdenii* isolated from pig feces
○板谷 かえで[1]、荒岡 亮祐[1]、宮原 平[1]、宮本 浩邦[1,2,3]、児玉 浩明[1] ([1]千葉大院園芸、[2]サーマス、[3]理研生命医科学)
○Kaede ITAYA[1], Ryosuke Araoka[1], Taira Miyahara[1], Hirokuni Miyamoto[1,2,3], Hiroaki Kodama[1] ([1]Grad. Sch. Chiba Univ, [2]Sermas, [3]IMS,RIKEN)

【背景と目的】未利用の海産資源を 70～80℃の高温下で発酵させた飼料(以下、好熱菌発酵産物)をブタに給与すると、死産率の低下、成長促進、筋肉中の余分な脂肪分の減少など様々な生理作用が認められる。同時に、ブタ排泄糞中の乳酸含量が低下することから、乳酸代謝に関わる腸内細菌叢の変化が示唆された。実際にブタ排泄糞の菌叢を解析すると、好熱菌発酵産物の給与によって *Megasphaera elsdenii* が有意に増加していた。*M. elsdenii* は乳酸を代謝(資化)し、短鎖脂肪酸を産生する乳酸資化菌の一種である。乳酸資化菌に関する研究報告例は未だ少なく、その生理学的特徴は未解明な点が多い。そこで、本研究では *M. elsdenii* の乳酸資化に関わる代謝経路について調べた。

【方法と結果】好熱菌発酵産物給与区のブタ排泄糞から単離された *M. elsdenii* について、ERIC-rep-PCR による遺伝子型をもとにグルーピングを行った。グルーピングの結果、最も多く単離された遺伝子型グループの代表菌株として Y2 株を選抜した。そこで、ヒツジのルーメン由来の *M. elsdenii* 標準菌株(JCM1772^{T}株)と、Y2 株の有機酸産性能について比較検証を実施した。その結果、標準菌株は乳酸からの最終代謝産物として、主に酢酸・プロピオン酸・酪酸を産生した。一方、Y2 株は乳酸から主に酪酸、吉草酸を産生した。酢酸や酪酸、吉草酸は宿主の腸内免疫系を刺激し、宿主の生体防御機能を制御することが報告されている。そのため、*M. elsdenii* は宿主の健康にとって有益な作用をもたらす可能性が示唆された。また、*M. elsdenii* JCM1772^{T}株と Y2 株において乳酸を基質とした時の有機酸産生量の経時的変化を調べた結果、Y2 株の乳酸資化には二つのステージがあることが示唆された。すなわち、乳酸を酢酸・プロピオン酸へと代謝する第一ステージと、酢酸およびプロピオン酸を吸収して酪酸、吉草酸へと縮合する第二ステージである。JCM1772^{T}株は第一ステージが主な乳酸資化代謝であり、対照的に Y2 株では第二ステージの活性が高いと考えられた。さらに、Y2 株は乳酸を基質として用いずに、酢酸とプロピオン酸から酪酸、吉草酸を産生させることが可能であった。興味深いことに、酢酸・プロピオン酸および糖源として利用されないグリセロールを添加することで、より多量の吉草酸を産生することも確認された。以上の結果から、*M. elsdenii* Y2 株は、従来の乳酸資化菌とは異なる特徴で、ブタの腸内環境の維持に貢献していることが示唆された。

Megasphaera elsdenii, lactate-utilizing bacterium, gut microbiota

発表責任者：児玉浩明（kodama@faculty.chiba-u.jp）

講演番号：2A18a08
講演日時：3 月 26 日 10:57～ センター2 号館 A18 会場

ブタの糞からの Bacteroidetes 門バクテリアの単離と有機酸産生能の特徴

Isolation of Bacteroidetes bacteria from pig feces and their production of short-chain fatty acids

○佐藤 茉由[1]、宮本 浩邦[1,2,3]、児玉 浩明[1] ([1]千葉大・園芸、[2]サーマス、[3]理研・生命医科学)
○Mayu SATO[1], Hirokuni MIYAMOTO[1,2,3], Hiroaki KODAMA[1] ([1]Grad.Sch.Horticul.,Chiba Univ., [2]Sermas, [3]IMS,RIKEN)

【背景と目的】好熱菌を利用し、海産資源を高温・好気条件下で発酵させた飼料（以下、好熱菌発酵産物）をブタに給与した際に、母豚の死産率の低下や子豚の成長促進などの生理作用が確認されている。好熱菌発酵産物には有芽胞子性好熱菌が含まれておりこれらが腸内で生着することにより腸内細菌叢が変動し宿主に影響することが考えられるが、好熱菌発酵産物由来のバクテリアと腸内細菌との相互作用については未だ不明な点も多い。先行研究によって好熱菌発酵産物を給与することによりブタの腸内細菌叢において Firmicutes 門の減少および Bacteroidetes 門の増加が観察されている。Bacteroidetes 門には繊維質などの分解能に優れているバクテリアが多く存在することでも知られている。演者らのグループでは、ブタ腸内フローラを持つマウスを作出し、抗生物質への反応や、プロバイオティクスによる影響を評価する実験系を構築している。好熱菌発酵産物の給与によって特徴的に増加する *Bacteroides* 属バクテリアおよびその近縁のバクテリアを単離し、ブタ腸内フローラを持つマウスに供することで、より家畜フローラのモデルとしての利用価値が高まることが期待される。そのため本研究ではブタの糞由来の *Bacteroides* 属バクテリアおよびその近縁のバクテリアの単離を試みた。
【方法と結果】ブタ糞由来の DNA を対象とした次世代シーケンス解析の結果に基づいて、Bacteroidetes 門のバクテリアの存在比率が高いサンプルを分離源として用いた。糞を生理食塩水により希釈したのち、種々の培地を用いて *Bacteroides* 属バクテリアの単離を試みた。その結果、*Bacteroides* 属バクテリアの単離用に市販されている BBE 培地を用いることで、*Bacteroides eggerthii*、と *Parabacteroides distasonis* をそれぞれ 1 株ずつ単離することに成功した。単離された *B. eggerthii*、と *P. distasonis* の有機酸産生能を GAM 培地で調べたところ、どちらの菌株もコハク酸、並びに酢酸を主に産生し、その他の有機酸としてギ酸、プロピオン酸および微量のイソ吉草酸の産生能を確認できた。さらに *B. eggerthii* では、EG 培地の組成を参考に作成したセロビオースを単一糖源とする培地で培養したところ、菌の生育とともにコハク酸の産生能も確認できた。以上の点から、本研究対象の単離株は、有機酸代謝に関与する腸内菌群であることが示唆された。

Isolation, Bacteroidetes, short-chain fatty acids

発表責任者：児玉浩明（kodama@faculty.chiba-u.jp）

講演番号：2A18a09
講演日時：3 月 26 日 11:08～ センター2 号館 A18 会場

好熱性プロバイオティクス *Bacillus hisashii* の細胞外多糖が腸内バクテリアの有機酸産生に与える影響

Effects of extracellular polysaccharides of *Bacillus hisashii* N-11 on short-chain fatty acid production by gastrointestinal bacteria.

○施 書琦[1]、佐藤 茉由[1]、須田 栞[1]、土肥 博史[1]、宮本 浩邦[1,2,3]、児玉 浩明[1] ([1]千葉大院園芸、[2]サーマス、[3]理研．生命医科学)

○Shuqi SHI[1], Mayu SATO[1], Shiori SUDA[1], Hirofumi DOHI[1], Hirokuni MIYAMOTO[1,2,3], Hiroaki KODAMA[1] ([1]Grad.Sch.Horticul.,Chiba Univ, [2]Semas, [3]IMS.RIKEN)

【背景と目的】未利用の海産物を 70 度以上の高温で発酵させた発酵産物(以下、好熱菌発酵産物)を家畜の発酵飼料としてブタに給与すると、成長促進、死産率低下など有益な結果が見られた。その後、無菌マウスを用いたスクリーニング評価の結果、好熱菌発酵産物中に生きて腸に届き、ブタの成長を促進する働きをもつ *Bacillus hisashii* N-11 株が単離された。N-11 株をブタに経口給与すると、好熱菌発酵産物の給与と似た腸内細菌叢の変化を誘導し、*Bacteroides* 属バクテリアや乳酸資化菌である *Megasphaera* 属バクテリアの割合が増加する。また、好熱菌発酵産物を給与した場合と同様に、腸管免疫の指標である糞中の IgA 含量が増加した。本研究では、このような N-11 株による生理機能のメカニズムの一端を担う分子の一つとして、N-11 株の産生する extracellular polysaccharide (EPS)に注目した。EPS はバイオフィルムの構成成分であり、環境ストレスや抗生物質から菌体を保護する働きがある細胞外多糖として知られる。そこで本研究では、N-11 株が産生する EPS がブタの腸内優占菌群の一つである、*Bacteroides* 属、 *Parabacteroides* 属、及び *Megasphaera* 属バクテリアに与える影響について調べた。

【方法と結果】*Bacillus hisashii* を 24 時間培養後、コロニーを懸濁し、遠心により菌体を除去し、上清中の多糖類は有機溶媒を用いて沈殿として回収した。得られた沈殿物を透析操作などによって濃縮し、凍結乾燥で EPS 画分を得た。NMR 分析により、EPS 画分には多糖類が含まれていることが確認された。ブタ糞から単離された *Bacteroides eggerthii*, *Parabacteroides distasonis*, *Megasphaera elsdenii* それぞれの培養液に EPS を添加した。その結果、特に、*P. distasonis* においてコハク酸、プロピオン酸、イソ吉草酸の生成量が増加することが明らかになった。こちらの結果から、好熱菌発酵産物由来のバクテリア *Bacillus hisashii* N-11 株の EPS が、腸内細菌による有機酸産生に影響を与える可能性があることが明らかになった。

extracellular polysaccharides, *Bacillus hisashii*, gut microbiota

講演番号：2A18a10
講演日時：3 月 26 日 11:19～ センター2 号館 A18 会場

自吸式通気攪拌装置が ATAD プロセス主要細菌の増殖に及ぼす影響

Effect of self-inducing aeration and stirring device on the growth of major bacteria found in the ATAD process

○坂元 俊介[1]、三島 健司[2]、田代 幸寛[1]、酒井 謙二[1] ([1]九大院・生資環、[2]福岡大学)
○Shunsuke Sakamoto[1], Kenji Mishima[2], Yukihiro Tashiro[1], Kenji Sakai[1] ([1]Grad. Sch. Bioresour. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ, [2]Fukuoka Univ)

【目的】福岡県築上町有機液肥製造施設では、町内で回収した屎尿等を自家熱型高温好気消化（ATAD）で液肥化している。築上町で行われている ATAD は他の ATAD と比べて無機窒素成分の高い液肥が製造されるとともに、未培養細菌を含む特異な細菌群集により処理が行われていることが明らかになっている（Tashiro AEM, 2018）。この要因として、築上町 ATAD では通気と撹拌を分離独立して行う曝気法（従来式）ではなく、陰圧空気供給と撹拌を同時に行うことが可能な自吸式通気攪拌法（自吸式）が採用されているためであることが示唆されている。自吸式攪拌により微細な気泡（ナノバブル）が発生し、処理槽における細菌群集構造変化に影響を与えている可能性がある。そこで本実験では、ラボスケールの従来式および自吸式処理槽を用いてナノバブルの発生特性を解明することを目的とした。また、ATAD プロセスの初期に最優勢となる分離主要細菌（*Acinetobacter towneri*）のラボスケール自吸式および従来式処理槽における増殖挙動を調査した。
【方法および結果】従来式及び自吸式ラボスケールリアクターを用いて 25°C、400-1000 rpm で脱イオン水 1000 mL を攪拌し、総括酸素移動容量係数（K_La）値を測定した。それを基に従来式と自吸式の同攪拌速度における K_La 値が同値になるように設定し、400-1000 rpm でナノバブルの粒径・累積・頻度、ゼータ電位の測定を行った。ゼータ電位の測定結果からバブルはすべて負の電荷をもっていた。攪拌速度と粒径の関係について従来式においてはナノバブルの発生は確認できたが不安定であったのに対して、自吸式では攪拌速度 500–900 rpm では安定して小さい粒径のバブルが発生した。要因として従来式では空気の供給が不安定で小さい粒径のバブルが発生する場合と大きい粒径のバブルが小さい粒径のバブルと合一する場合があるのに対し、自吸式では比較的効率よく供給された空気が同時に剪断されるため、一定の攪拌速度内では安定して小さい粒径のバブルが発生することが考えられた。また、培養挙動を調査するために両リアクターに CASO 液体培地 1000 mL を張り込んで *A. towneri* を接種し、同程度の総括酸素移動容量係数（K_La, 約 45 h^{-1}）の条件下で 48 時間培養した。濁度法及びコロニーカウンティング法を用いて 6 時間毎に菌体濃度を測定し、比増殖速度を算出した。その結果、従来式リアクターにおける最大菌体濃度は、自吸式よりそれぞれ約 2、12 倍高かった。また、従来式における最大比増殖速度は自吸式の約 2 倍であった。現在、温度変化を組み込んだ培養条件下で検定主要細菌の種類を増やしてさらに検討している。

ATAD, Self-inducing aerator, Nanobubbles

発表責任者：酒井謙二（kensak@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：2A19a01
講演日時：3 月 26 日 09:30～ センター2 号館 A19 会場

微生物を用いた熟成魚の製造とその性質

Production of aged fish(salmon) using fungus and its properties

○原田 美鶴[1]、舘野 美紗子[2]、跡部 美樹雄[3]、村上 周一郎[1,3]（[1]明治大農・農化、[2]明治大院農・農化、[3](株)ミートエポック）
○Mika HARADA[1], Misako TATENO[2], Mikio ATOBE[3], Shuichiro MURAKAMI[1,3] ([1]Meiji Univ., [2]School of agriculture, Meiji Univ., [3]Meat Epoch Ltd.)

【背景・目的】
熟成肉の製造方法の一種であるドライエイジングで肉を熟成させた場合、肉の風味や旨味の向上、脂肪の口溶けなどの嗜好性が高くなることが知られている。一方ドライエイジングでは、開放系で熟成を行うため、肉表面に様々な微生物が増殖するが、熟成に必要な優良菌株以外に様々微生物が繁殖する衛生面でのリスクが指摘されている。これまでに当研究室では、*Helicostylum* sp. JW-１株を熟成肉表面に優占的に生育している微生物として分離・同定し、本菌の胞子を布に付着させ、腐敗菌の増殖リスクを大幅に軽減させる「エイジングシート」を開発してきた[1)]。本研究では、魚の熟成に与えるエイジングシートの効果、特に血圧降下作用と脂肪の酸化に与える影響について検証し、熟成した魚の機能性を明らかにすることを目的とした。
【方法】
ノルウェー産のサーモンにエイジングシートを巻き熟成を進めるサンプルとオートクレーブ滅菌した布を巻いたコントロールを、恒温恒湿の冷蔵庫(4℃、湿度 80～90%)でインキュベートし、0、7、14、21 日目の試料を真空パックして、-80℃で保存した。保存した試料を冷蔵庫で一夜解凍し、血圧降下作用と脂肪の酸化を分析した。血圧降下作用は、アンジオテンシン変換酵素(ACE)活性の阻害から、また脂肪の酸化は、2-チオバルビツール酸反応性物質(TBARS)アッセイで評価した。
【結果・考察】
0 日目と比較して、コントロールと熟成させたサンプルでは ACE 阻害活性が有意に高くなり、特に熟成させた 21 日目のサンプルでは、0 日目と比較して ACE 活性が 75%阻害された。ACE 阻害活性を牛肉から製造した熟成肉においても評価したが、熟成肉では ACE 活性の阻害が観察されなかった。以上のことより、サーモンを熟成させることで特異的に血圧降下作用が生じることが示唆された。TBARS アッセイの結果、熟成させたサンプルと比較してコントロールの方が、過酸化物濃度が有意に高くなった。また、中心部と比較して空気に触れやすい外側の部分で、過酸化物濃度が高くなった。さらに、腹部と背部に分けて計測したところ、脂質が多い腹部の方がコントロールにおいては過酸化物濃度が有意に高くなった。以上の結果から、エイジングシートで魚を熟成させた場合、脂肪の酸化を防ぐ可能性が示唆された。

1) 日本畜産学会第 122 回大会講演要旨，p. 185（2017）.

aged fish, Ace inhibitory activity, antioxidant

発表責任者：村上周一郎（smura@meiji.ac.jp）

講演番号：2A19a02
講演日時：3 月 26 日 09:41～ センター2 号館 A19 会場

Study on food ingredients that regulate the activity of retinaldehyde dehydrogenase isozymes (RALDHs)

○Thi Bao Chau BUI, Shohei NOSAKI, Yuqun XU, Masaru TANOKURA, Takuya MIYAKAWA, Satoshi HACHIMURA (Grad. Sch. Agr. Life Sci., Univ. Tokyo)

RALDHs (i.e. RALDH1, RALDH2 and RALDH3) are enzymes that participate in the metabolism of retinol (vitamin A) into its major functional metabolite retinoic acid (RA). Activation of RALDH2 may increase the production yield of RA and enhance the RA classical signaling pathway in the immune system, thus improve gut-homing imprinting and T cells differentiation. On the other hand, inhibition of RALDHs, especially RALDH1 and RALDH3, is proposed to block the RA unclassical pathway in stem-like cancer cells, inducing apoptosis, necrosis and reducing cancer cell proliferation. However, to date, there are very few and uncharacterized activators for RALDH2, while most inhibitors for RALDHs have low/ non-specificity.

In this study, aqueous and ethanol extracts of various kinds of spices and herbs were for the first time screened against recombinant RALDH2 *in vitro* for potential activating compound(s). Two out of 47 kinds of spices and herbs extracts have been found to contain potential activator(s) and/ or alternative substrate(s) for RALDH2, and were subjected to further fractionation and assay. Extracts that exerted the most potential inhibiting effects were chosen and subjected to inhibition assay against RALDH1 and RALDH3 as well as RALDH2 and aldehyde dehydrogenase type 2 (ALDH2 – which belongs to the same family but differs in substrate specificity), as a specificity-control. Interestingly, under the current experimental conditions, most chosen extracts were shown to have relatively strong inhibition effect on RALDH isozymes and ALDH2. Furthermore, one extract was shown to exhibit highly specific inhibition against RALDH3, while two other extracts strongly inhibited three RALDH isozymes with weaker effect against ALDH2.

RALDH/ALDH, food ingredients, activator/inhibitor

講演番号：2A19a03
講演日時：3 月 26 日 09:52～ センター2 号館 A19 会場

チェリー・オブ・ザ・リオ・グランデ葉抽出物による 5-リポキシゲナーゼ阻害
Inhibitory effect of Cherry of the Rio Grande leaves on 5-lipoxygenase activity
○川上 祐生、神崎 真由香、桐岡 佐妃、津嘉山 泉、岩岡 裕二、伊東 秀之、山本 登志子、高橋 吉孝（岡山県大保福）
○Yuki KAWAKAMI, Mayuka KANZAKI, Saki KIRIOKA, Izumi TSUKAYAMA, Yuji IWAOKA, Hideyuki ITO, Toshiko SUZUKI-YAMAMOTO, Yoshitaka TAKAHASHI (Okayama Pref. Univ.)

膜リン脂質から遊離されたアラキドン酸に 5-リポキシゲナーゼが作用すると、アラキドン酸の 5 位に酸素が添加され、5-ヒドロペルオキシ酸が生成する。この 5-ヒドロペルオキシ酸に同じ酵素が作用してロイコトリエン A_4 が生成する。ロイコトリエン A_4 から生成されるロイコトリエン B_4、C_4、D_4、E_4 は炎症や免疫などの生体防御反応に関わる強力な生理活性物質であり、対応する受容体を介して、炎症細胞の遊走、平滑筋収縮、血管透過性亢進などの活性を示す。これらのロイコトリエンの生成に関係のある 5-リポキシゲナーゼの働きを制御することができれば、炎症反応やアレルギー症状の軽減につながることが期待される。本研究では、フトモモ科の植物であるチェリー・オブ・ザ・リオ・グランデの葉に焦点を当て、そこに含まれる成分の 5-リポキシゲナーゼ活性への影響を検討した。

チェリー・オブ・ザ・リオ・グランデ葉は、エタノール濃度の異なる溶媒を用いて抽出物を調製した。これらのチェリー・オブ・ザ・リオ・グランデ葉抽出物はいずれも 5-リポキシゲナーゼを濃度依存的に阻害し、とくにエタノール濃度の高い溶媒で抽出した抽出液は 5-リポキシゲナーゼ活性に対する IC_{50} が比較的低く、効果的に本酵素を阻害することを確認した。次に、5-リポキシゲナーゼ活性の阻害に貢献するチェリー・オブ・ザ・リオ・グランデ葉に含まれる成分を明らかにするために、100%エタノール抽出物を逆相 HPLC を用いて分離し、2 分ごとに 30 画分に分画した。この 30 画分について 5-リポキシゲナーゼ阻害効果を検討したところ、溶出時間 12～14 分の画分に比較的強い 5-リポキシゲナーゼ阻害効果が認められた。この画分に含まれる主ピークの吸収極大は 203 nm、262 nm、303 nm 付近であった。この画分に含まれる化合物を用いて、各種アラキドン酸代謝酵素に対する酵素阻害特異性を確認したところ、5-リポキシゲナーゼ以外に、シクロオキシゲナーゼ-1 に対して阻害効果が認められたが、シクロオキシゲナーゼ-2、白血球型 12-リポキシゲナーゼ、血小板型 12-リポキシゲナーゼについては阻害効果が認められなかった。

lipoxygenase, arachidonic acid

講演番号：2A19a04
講演日時：3 月 26 日 10:03～ センター2 号館 A19 会場

島根県西ノ島町産 褐藻ツルアラメの粉末化工程における食品品質および生理活性に関する検討

An evaluation for food quality and bioactivity in powdering process of *Ecklonia stolonifera*, a brown alga, harvested in Nishinoshima town, Shimane Prefecture

○杉浦 義正[1]、木下 陽一[2]、山谷 裕昭[3]、井上 裕三[3]、中西 正美[4]、平田 文久[4]、林 裕一[5]、村瀬 昇[1]（[1]水産機構水大校、[2]西ノ島町、[3]ノア隠岐、[4]JF しまね、[5]岡部（株）海洋事業部）
○Yoshimasa Sugiura[1], Youichi Kinoshita[2], Hiroaki Yamatani[3], Yuzo Inoue[3], Masami Nakanishi[4], Fumihisa Hirata[4], Yuichi Hayashi[5], Noboru Murase[1]（[1]Natl. Fish. Univ., [2]Nishinoshima Town, [3]Noah Oki, [4]JF Shimane, [5]Okabe Co., Ltd.）

【目的】近年、褐藻由来の多糖類やポリフェノール（フロロタンニン）による抗アレルギー効果の報告例がみられるようになり、我々は、島根県西ノ島町海域で採取された褐藻ツルアラメの抗アレルギー効果について実証実験を行った。その結果、ツルアラメはフロロタンニンを主成分とする抗アレルギー性を有し、製品原料として粉末化されたものも有効性を示すことが実証された[1-3]。本研究では、西ノ島町産ツルアラメの機能性表示食品への利用など高付加価値化を目的とし、粉末化加工工程における食品品質および残存生理活性について検討した。

【方法】粉末化の各加工工程（原料受入れ、冷蔵、洗浄、1 次乾燥、2 次乾燥、粉砕）における原料について、次の実験を行った。①品質検査：水分含量の測定は、工程法によって行った。水分活性は水分活性測定装置を用いた。細菌検査は市販のフィルム培地を用い、一般生菌、大腸菌群、腸炎ビブリオについて調べた。②生理活性評価：実験試料として、80%メタノール抽出物を調製した。有効成分の指標として、フォーリン・デニス法によりフロロタンニン含量を計測した。また、抗酸化性を DPPH ラジカル消去能にて、抗アレルギー性を RBL-2H3 細胞を用いた脱顆粒抑制試験にて評価した。

【結果】品質検査においては、1 次乾燥の後、水分含量、水分活性いずれも有意に低下し、細菌数も顕著な低下が認められた。そのため、食品衛生上の品質は粉末化の加工工程が進むごとに向上することが明らかとなった。また、生理活性に関する評価においては、フロロタンニン含量は工程毎で顕著な変化はみられなかったものの、洗浄工程後は増加する傾向がみられた。一方で、DPPH ラジカル消去能および脱顆粒抑制については、洗浄工程後に有意な有効性の上昇がみられ、加工による生理活性向上の可能性が考えられた。現在、各工程原料の 80%メタノール抽出物について、成分分析を行っている。

1) 杉浦ら, 平成 29 年度日本水産学会春季大会講演要旨集, p102.　2) 杉浦ら, 日本農芸化学会 2018 年度大会講演要旨集, 2B05a04.　3) 杉浦ら, 平成 31 年度日本水産学会春季大会講演要旨集, p26.

Ecklonia stolonifera, food processing, bioactivity

発表責任者：杉浦 義正（ysugiura@fish-u.ac.jp）

講演番号:2A19a06
講演日時:3 月 26 日 10:35～ センター2 号館 A19 会場

ボイル緑色野菜の退色抑制技術の開発

Development of color fading control technology for boiled green vegetables

○井上 萌恵、山本 純、黒瀧 秀樹、松元 一頼 (奥野製薬工業株式会社)
○Moe INOUE, Jun YAMAMOTO, Hideki KUROTAKI, Kazuyori MATSUMOTO (OKUNO CHEMICAL INDUSTRIES CO.,LTD.)

【背景】
食品産業では、コンビニエンスストアに代表される中食惣菜において、色彩豊かな野菜を取り入れた商品が多く店頭に陳列されるようになった。それに伴い、ボイル緑色野菜を材料とした惣菜はスーパーマーケットやコンビニエンスストア等にて長時間照明下に陳列されると、鮮やかだった緑色が退色し、商品価値が著しく低下してしまう問題がある。当社はボイル緑色野菜の光退色に着目し、退色を抑制する物質を検討した結果、イノシン酸等の核酸に効果を認めた。本研究では加熱した緑色野菜、及び緑色野菜の緑色素であるクロロフィル *a* へのイノシン酸の退色抑制作用について検討した。
【方法】
小松菜を無添加、及び 1 wt%イノシン酸二ナトリウム(5'-IMP)添加のボイル水:小松菜＝10:1 で 1 分間加熱後冷却した。その小松菜を 25℃約 1000 lux の蛍光灯照射下で 18 時間保存後、目視観察、及びハイパースペクトルカメラで解析した反射光スペクトルから退色抑制効果を評価した。また、5'-IMP がクロロフィル *a* に作用し光退色を抑制しているのかを評価するため、クロロフィル *a* 試薬を用いた 50 μM クロロフィル *a* -10 %エタノール溶液に 5'-IMP を添加し、光照射 18 時間後のクロロフィル *a* 残存率を吸光度(672 nm)より求めた。次に、5'-IMP を構成する D-リボース、塩基、リン酸のどの構造が退色抑制に重要か検討するため、各化合物をクロロフィル *a* に添加し、光退色試験を実施した。また 5'-IMP の抗酸化能を DPPH ラジカル消去能活性測定と H-ORAC 法で評価した。
【結果・考察】
目視において、無添加水でボイルした小松菜は光照射を受け退色していた。一方、5'-IMP 水溶液でボイルした小松菜は濃緑色を維持しており、反射光の解析においても 680 nm 付近のクロロフィル吸収が無添加よりも大きく、目視評価を支持した。また、クロロフィル *a* 試薬を用いた光退色試験では、5'-IMP 添加のクロロフィル *a* 残存率が高値となり、クロロフィル *a* に作用していることが考えられた。更に、5'-IMP を構成する各化合物の退色抑制試験より、緑色退色抑制効果には核酸の塩基構造が深く関与している可能性が示唆された。5'-IMP の抗酸化能を測定すると DPPH ラジカル消去能、及び H-ORAC 法ではいずれも強い抗酸化能を示さなかった。このことから、5'-IMP は一般的な抗酸化作用とは異なる機構でクロロフィル *a* の退色を抑制していると推測された。

chlorophyll *a*, photobleaching, nucleic acid

発表責任者:井上 萌恵(m-inoue01@okuno.co.jp)

講演番号：2A19a07
講演日時：3 月 26 日 10:46～ センター2 号館 A19 会場

Petasites japonicus 葉柄の各種あく抜き処理がピロリジジンアルカロイド類の低減に及ぼす影響
The influence of some pre-cooking treatments on the decrease of pyrrolizidine alkaloids in the leafstalk of *Petasites japonicus*

○竹中 真紀子[1]、三宅 紀子[1]、木村 俊之[2]、漆山 哲生[3]、等々力 節子[2]（[1]東京家政学院大学、[2]農研機構食品研究部門、[3]農林水産省）
○ Makiko TAKENAKA[1], Noriko MIYAKE[1], Toshiyuki KIMURA[2], Tetsuo URUSHIYAMA[3], Setsuko TODORIKI[2] ([1]Tokyo Kasei Gakuin University, [2]Food Research Institute, NARO, [3]Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries)

【目的】フキ（*Petasites japonicus*）には、肝障害を引き起こす可能性のある天然毒素であるピロリジジンアルカロイド（PA）類が含まれることが知られている。フキ中の PA 類は水溶性であるため、ゆでこぼしたり水さらしをしたりする伝統的なあく抜き処理によって、含有量を低減できることが農林水産省から報告されているが [1)]、あく抜きの方法は多種多様であり、それらの方法や条件が PA 類の低減に及ぼす影響は不明である。本研究では、各種あく抜き処理が葉柄中の PA 類含有量に及ぼす影響を調査し、PA 類の低減効果が高いあく抜き条件を見出すことを目的とした。
【方法】テレビの料理番組その他のレシピサイト、料理書等で紹介されていた 263 件のフキの葉柄の料理について、あく抜きの方法及びその方法における塩ずりの有無、ゆで時間、水さらし時間等のあく抜き条件を調査した。同一の産地銘柄・収穫時期のフキ葉柄を材料に、条件を変えてあく抜き処理を行い、あく抜き前後のフキ葉柄中の PA 類（フキ中の主要 PA であるペタシテニン、センキルキン及びネオペタシテニンの 3 種）の濃度を LC-MS/MS により定量し、PA 類の残存率を算出し、影響を調査した。
【結果】調査した各種フキ料理のあく抜き条件としては、ゆでこぼしや水さらしをするものの、その処理時間がレシピに記載されていないものが半数以上あった。時間の記載がある場合、ゆで時間は 2～3 分、水さらし時間は 1 時間未満がほとんどであった。また、ゆでこぼすだけで水さらしをしないものも、2 割程度あった。ゆで時間、水さらしの時間の他に、フキ葉柄の PA の低減に影響する可能性のあるあく抜き処理条件として選定した、ゆでる際又は水さらしの際の葉柄の長さ、ゆでる前の塩ずりの有無、ゆで水の量、ゆでる際又は水さらしの際の添加物等の有無とその種類、皮むきの有無やタイミングの影響を調べた。その結果、ゆでこぼし後の水さらしの時間が最もフキ葉柄中の PA 類の低減に影響し、水さらし時間が長いほど PA 類の残存率が下がる傾向が見られた。

1) www.maff.go.jp/j/press/syouan/nouan/180831.html （農林水産省、プレスリリース「食品中のピロリジジンアルカロイド類の含有実態調査結果について（第 2 報）」）

Petasites japonicus, pyrrolizidine alkaloids, cooking

講演番号：2A19a08
講演日時：3 月 26 日 10:57～ センター2 号館 A19 会場

蛍光灯・ＬＥＤ照射による乳製品の光劣化に対する乳化型抗酸化製剤の作用

Effects of Antioxidative Formulation against Photo-Oxidation of Dairy Products by Fluorescent and LED Irradiation

小林 康祐、○門脇 章夫、檜山 真一郎（太陽化学株式会社）
Kosuke KOBAYASHI, ○Akio KADOWAKI, Shinichiro HIYAMA (TAIYO KAGAKU Co. Ltd.)

【目的】飲食品に含まれるタンパク質・脂質・ビタミン類等は、製品を製造・販売する場面において熱や光によるダメージを受け、食品の嗜好的品質や栄養価値の低下を引き起こすことが知られている。特に近年ではコンビニエンスストアやスーパーマーケットにおいて照明の高照度化が進み、店頭での陳列時における光酸化が課題となっている。酸化防止剤は飲食品の風味劣化を防止する食品添加物として幅広く利用されており、目的に応じて水溶性、油溶性のものが用いられるが、油溶性の酸化防止剤を水系飲食品へ直接添加することは困難であるため、界面活性剤を用いて水中に分散可能な乳化組成物として調製を行う。我々はこれまでに、独自の乳化技術で油溶性酸化防止剤と水溶性酸化防止剤を一剤化した乳化型抗酸化製剤を開発するとともに、乳製品や果汁飲料など各種飲食品において効率的な酸化防止効果の発現を報告してきた[1-6]。しかしながら、飲食品の種類・保管条件や、光源の種類等によって酸化劣化の進み方が異なることも新たに明らかとなっており、酸化防止対策が未だ十分に確立していない飲食品も多く存在する。そこで本年度は光源の異なる保管条件において乳製品中の酸化劣化物質の分析を行い、乳化型抗酸化製剤による酸化防止効果について検証を行った。

【方法】油溶性、水溶性の酸化防止剤および界面活性剤を用いてこれらを一剤化した乳化型抗酸化製剤を、発酵乳・アイスクリームに添加し、蛍光灯および LED 照明の光照射による虐待試験を行った。試験サンプルはそれぞれ官能評価、および各種機器分析により酸化劣化物の測定を行った。

【結果】各種乳製品の光照射による虐待試験中において、乳タンパク質・乳脂肪成分に酸化反応による変化が認められた。乳製品に酸化防止剤を添加し、各光源・保管条件にて評価したところ、乳化粒子径や各種抗酸化素材の組み合わせによって異なる好適な酸化防止効果の発現傾向を確認した。

1）2013 年度大会 要旨集 2A16p20　2）2014 年度大会 要旨集 2B03p03
3）2015 年度大会 要旨集 2F26a02　4）2016 年度大会 要旨集 2E023
5）2017 年度大会 要旨集 3A04a08　6）2019 年度大会 要旨集 4B2a08

antioxidant, emulsion, dairy product

講演番号：2A19a09
講演日時：3 月 26 日 11:08～ センター2 号館 A19 会場

インゲンマメから抽出した水溶性多糖類の物性と走査型プローブ顕微鏡による構造解析

Studies on water-soluble polysaccharides extracted from kidney beans; physical properties and molecular structure analyzed by scanning probe microscope

○酒井 円香[1]、大星 仁美[1]、中村 彰宏[1]、長谷川 芳則[2]、西山 節子[2]([1]茨城大農、[2]不二製油グループ本社　未来創造研究所)
○ Madoka Sakai[1], Hitomi Ohboshi[1], Akihiro Nakamura[1], Yoshinori Hasegawa[2], Setsuko Nishiyama[2] ([1]Ibaraki Univ. College of Agri., [2]Fuji Oil Holdings R&D division for future creation)

【目的】マメ科植物は、脂質、タンパク質、炭水化物などの栄養成分のバランスが良いことから、農産食糧資源として注目されている。これまでの研究で大豆並びにエンドウの種子から分離した繊維質を原材料に水溶性多糖類を高収率で抽出する条件を見出し、得られた大豆多糖類(以下 SPS)或いはエンドウ多糖類(以下 PPS)に関して、分子構造の推定、物性の解析、及び食品における物性機能の解析を進め、多くの知見を得た。本研究ではインゲンマメに着目し、澱粉とタンパク質を段階的に分離して繊維(以下 KF)を調製し、KF を原材料としてインゲンマメ多糖類（以下 KPS）が高収率で得られる抽出条件の確立を試みた。さらに、KPS の物性と分子構造の解析を試みた。
【結果と考察】先ず KF から KPS を抽出する検討を行った。抽出 pH は pH 3～pH 11、温度は 80℃、100℃、120℃、135℃、時間は 30 分、60 分、120 分とし、これら条件を組み合わせて検討した。得た KPS について KF に対する収率と構成成分としてデンプン、タンパク質、全糖量、還元糖量の分析を行った。加えて、TSK-gel G6000PWXL カラム(東ソー)を用いたゲル濾過クロマトグラフィー多角光散乱検出法（SEC-MALS 法）により重量平均分子量（Mw）と分子量分布の解析を行った。抽出 pH；pH 6 以上で高分子の KPS が得られた。pH 3～pH 5 では、抽出時に加水分解を受けるため、収率は高いものの KPS が低分子化する傾向が認められた。抽出温度;80℃～100℃ではいずれの pH でも KPS の収率は 4.1％～8.6％と低く、120℃～135℃で収率は 23.6％～30.0％と高かった。但し、135℃では KPS が低分子化する傾向にあり、120℃が最適な抽出温度と考えられた。また、KPS は抽出条件に関わらず高分子多糖類の画分と分子量１万以下の低分子画分に A_{280} の吸収を持ち、糖鎖にタンパク質が結合した糖タンパク質である可能性が示唆された。これら抽出条件を検討した結果、高分子多糖類を構成成分として多く含み、デンプン、タンパク質、還元糖が低い KPS が得られる最適条件は、pH 9、120 ℃、30 分と結論付けた。本条件で得た KPS（以下 KPS-9）は、$Mw=2.5\times10^6$ であり、SPS($Mw=4.5\times10^5$)や PPS（$Mw=6.0\times10^5$)より高分子であった。Mark-Houwink-Sakurada の式に基づく Conformation plot slope（以下 CPS）は 0.41 であった。直鎖構造のプルラン P-800（CPS=0.62)、直鎖ながら分岐を有するペクチン（CPS=0.34)、分岐の多い SPS（CPS=0.18）と比較すると KPS-9 はペクチンに近い構造を持つと推定された。また、コーンプレート式回転型粘度計 DV2T（BROOKFIELD）を用いて測定した KPS-9 の粘度はペクチンと SPS の中間に位置し、pH 依存性は認められず、温度低下に伴って増粘する特性を示した。剪断速度の変化による粘度変化は認められず、ニュートン流体としての粘度挙動を示した。走査型プローブ顕微鏡（SPA300HV; SII）を用いて観察した KPS-9 の分子形状は、分岐の少ない直鎖構造と推定され、SEC-MALS 法の CPS が示唆するペクチンに近い分子構造を支持した。

kidney bean, polysaccharide, extraction

発表責任者：中村彰宏（akihiro.nakamura.daru@vc.ibaraki.ac.jp）

講演番号：2A19a10
講演日時：3 月 26 日 11:19～ センター2 号館 A19 会場

直鎖ペプチドからのプロリン含有環状ジペプチド生成機構の解明
Investigation of the formation mechanism of proline-containing cyclic dipeptide from the linear peptide

○大塚 祐季[1]、有田 光[1]、阪地 満帆[1]、山本 憲司[2]、柏木 丈拡[1]、島村 智子[1]、受田 浩之[3]([1]高知大・農、[2]サントリーホールディングス(株)、[3]高知大・地域創造セ)
○ Yuuki OTSUKA[1], Hikaru ARITA[1], Michio SAKAJI[1], Kenji YAMAMOTO[2], Takehiro KASHIWAGI[1], Tomoko SHIMAMURA[1], Hiroyuki UKEDA[3] ([1]Faculty of Agriculture and Marine Science, Kochi University, [2]Research Strategy Planning Department, Suntory Holdings Ltd., [3]Center for Regional Sustainability and Innovation, Kochi University)

【目的】 環状ジペプチドは、2 つのアミノ酸が脱水縮合して生成するジケトピペラジン構造（DKP）を基本骨格とする物質群であり、タンパク質を構成する 20 種のアミノ酸の組合せで D・L 体を区別しない場合、210 種類が存在する。従来、DKP は苦味成分として認識されてきたが、近年ではセロトニン再取り込み阻害活性や学習意欲改善効果など種々の生理活性が報告され、機能性成分としても注目されている。特に Pro 含有 DKP は焙焼食品や発酵食品に豊富に含まれることから、その生成条件として加熱や発酵の関与が示唆されてきた。しかし、Pro 含有 DKP の生成機構に関する詳しい検討例は少なく、不明な点が多いのが現状である。そこで本研究では、モデル直鎖ペプチドを用い、DKP の生成に対する各種反応条件の影響を調べるとともに、Pro 含有 DKP の生成機構について考察した。
【方法】 モデル直鎖ペプチドとして、ジペプチド 2 種類（Pro-Leu、Leu-Pro）、トリペプチド 10 種類(Gly-Pro-Leu、Leu-Pro-Gly、Leu-Gly-Pro、Gly-Leu-Pro、Pro-Gly-Leu、Pro-Leu-Gly、Gly-Pro-Gly、Leu-Pro-Leu、Phe-Pro-Gly、Leu-Pro-Phe）を用いた。DKP の定量は LC-MS/MS で行い、カラムは Waters Atlantis T3（2.1 mm i.d.×150 mm）、溶離液にアセトニトリルと 0.1% ギ酸を用いた。直鎖ペプチドの配列から生成が想定される DKP を分析対象とし、各 DKP の$[M+1]^+$を Precursor ion、検出感度の良好な Product ion を Target ion として MRM におけるピーク面積をもとに濃度を求めた。
【結果及び考察】 各種直鎖ペプチド溶液（20 μM）の加熱処理を行い、生成した DKP の定量を行った。その結果、今回用いた全ての直鎖ペプチドから DKP が生成することが判明した。また、DKP への環化は N 末端から生じていることが明らかとなった。続いて、DKP 生成に及ぼす各種反応条件の影響について調べたところ、直鎖ペプチドからの DKP 生成は加熱温度（25～100℃）に依存して増加し、特に 100℃の加熱を施すことで DKP 生成量が顕著に増加することが判明した。また、pH の影響（pH 4.0～10.0）については、直鎖ジペプチド（PL、LP）では pH 7.0 、直鎖トリペプチドでは pH 5.0～6.0 で最も高い DKP 生成量が認められた。さらに DKP の生成に対するアミノ酸配列の影響を調べたところ、ジペプチド、トリペプチドのいずれの場合も、N 末端から 2 残基目に Pro が位置する直鎖ペプチドにおいて高い DKP 生成量が認められた（LP：15%、GPL：43%、LPG：64%）。以上のことから、DKP 生成機構は直鎖ペプチドの N 末端のアミノ基窒素と N 末端から 2 残基目のカルボニル炭素とが結合する環化反応であり、N 末端から 2 残基目に Pro が位置することで構造的に安定し、DKP が生成しやすいことが示唆された。

Cyclic dipeptide, Diketopiperazine, Functional peptide

発表責任者：島村智子（tomokos@kochi-u.ac.jp）

講演番号：2A19a11
講演日時：3 月 26 日 11:40～ センター2 号館 A19 会場

シュークリームの選択行動

Cream puff choice behavior of consumer

○後藤 幸生、細川 陽子（高砂香料工業株式会社）
○Yukio GOTO, Yoko HOSOKAWA (Takasago International Corporation)

【目的】ヒトがある飲食品を選択する際に、その飲食品の″美味しさ″は重要な要素である。しかしながら、″美味しさ″には、飲食品自体の風味のプロファイルの要因のほか、「文化的なおいしさ」や「情報によるおいしさ」などヒトの側の要因も含まれるため、非常に複雑でありその全容が解明されるのは容易ではなく、ヒトが飲食品を選択する際に以前の経験による美味しさをどの程度記憶していて、購買行動に結びついているかは明らになっているとはいえない。そこで本研究では、ヒトが経験した″美味しさ″がどの程度、商品の選択行動に関係しているかを検証した。
【方法】社内一般パネル 146 人に対し、パッケージから取り出して ID を付与し、ブラインド化した 5 種類の市販のシュークリームの嗜好調査を実施して、″美味しさ″、″見た目の好み″などの評定値データを得た。また同時に、パネルのパーソナリティに関するアンケート調査データを得た。パネルは、嗜好調査実施日から約 2 週間後、嗜好調査で供したシュークリームの ID 付き写真を提示され、最もまた食べたい製品と、最も食べたくない製品を選択した。さらに、社内専門パネル（フレーバリスト）による分析型官能評価も実施し、一般パネルが再び食べたいと思う製品の風味特徴を調べた。
【結果】最もまた食べたいと思う製品を、最大効用化理論に基づき、多項ネスティッドロジットモデルで分析したところ、″美味しさ″が選択行動へ与えている影響が大きいことを確認することができた。しかし、最もまた食べたいと思う製品は、嗜好調査で最も″美味しい″と評価した製品と一致しなかった。また、パーソナリティ項目うち、″保守的″が製品選択に対する影響としては大きかった。商品の選択行動結果について、専門パネルの分析型官能評価の結果を参照すると、クリームのバニリン様の香りの強さや、皮のミルク様の香りの強さとの相関が高い結果であった。

palatability, best worst choice, multinomial nested logit model

発表責任者：後藤　幸生（yukio_gotoh@takasago.com）

講演番号：2A19a12
講演日時：3 月 26 日 11:51～ センター2 号館 A19 会場

果実の収穫時期がデラウェアワインの品質に与える影響
Effects of harvest time on Delaware wine quality
○下野 雄太、三輪 由佳、平松 和也、谷本 秀夫（大阪環農水研）
○Yuta SHIMONO, Yuka MIWA, Kazuya HIRAMATSU, Hideo TANIMOTO (Res. Inst. Environ. Agric. Fish., Osaka Pref.)

【目的】ワインの品質には、ブドウ品種、栽培地の気象条件、仕立て方や果実着果量といった栽培方法、醸造方法など様々な因子が関与している。また、特に白ワイン醸造では、早摘みから完熟・遅摘みまでの幅広い期間の果実が原料として用いられており、果実収穫のタイミングもワイン品質にとって重要なファクターである。*Vitis vinifera* 種（ヨーロッパ系醸造用品種）と *V. labrusca* 種（アメリカ系品種）との交雑種であるデラウェアでは、果実の収穫タイミングがワインの味や香りなど品質に与える影響についての報告が非常に限られているため、調査を行った。
【方法】平成 30 年と 31 年の 2 年間、（地独）大阪府立環境農林水産総合研究所の試験圃場（大阪府羽曳野市）において栽培した有核デラウェアをサンプルとした。成熟期果実の果皮色を基準として、およそ 1 週間毎に 5 段階（I:緑色（水回り直後）、II:黄緑色、III:黄色～着色初期、IV:桃色（薄い赤紫）、V:紫色）のタイミングで収穫を行い、白ワインを醸造した。製成ワインについて各種分析（酸度、有機酸組成、総フェノール等）を行い、比較した。呈味は味認識装置 TS-5000Z（(株) INSENT）を用いて分析した。香気成分は溶剤抽出物及びヘッドスペース（HS）香気について GC/MS 分析を行った。
【結果】平成 30 年の結果では、酸度、酒石酸およびリンゴ酸含量は収穫タイミング（果実成熟の進行）に合わせて段階的に低下し、総フェノール値は上昇した。味認識装置の「酸味」値は段階的に低下するとともに、「旨味」、「塩味」値は段階的に上昇し、果実成熟に伴う味わいの複雑化が示唆された。香気成分は、果実の成熟に伴い各段階を通じエステル含量が増加した。また、溶剤抽出物ではアメリカ系品種がもつ甘い特徴的な香りとして知られるフラネオールが収穫タイミング IV から、HS 香気では蜜様の香り成分である β-ダマセノンが収穫タイミング III から大きく増加した。一方で、HS 香気の柑橘様の香り成分であるデカナールは、収穫タイミング IV から大きく減少した。試飲アンケートでも、収穫タイミング III と IV を境に香りの印象が変わるという意見があり、これらの物質が影響している可能性が示唆された。現在、平成 31 年醸造分の各種分析を行っている。
本研究の香気成分分析は、三栄源エフ・エフ・アイ株式会社の支援を受けて実施された。

Wine, Delaware, Harvest time

発表責任者：下野雄太（ShimonoY@mbox.kannousuiken-osaka.or.jp）

講演番号：2A19a13
講演日時：3 月 26 日 12:02～ センター2 号館 A19 会場

二番茶葉を用いた新規乳酸発酵茶の開発

Production of post-fermented tea by lactic acid fermentation

○永嶺 海夕、大島 知也、舘野 勝洋、椎葉 究、安部 智子（東京電機大理工）
○Myu NAGAMINE, Tomoya Ohshima, Katsuhiro Tateno, Kiwamu Shiiba, Tomoko Abe (Tokyo Denki Univ.)

【背景・目的】

後発酵茶（微生物発酵茶）は苦みの少ない健康飲料として、お茶離れが進んでいる若年層にも今後普及する可能性がある。後発酵茶の新規機能性成分も報告され、その効能が注目されているが、現在、国内品としてはほとんど生産・流通がない。後発酵茶を製造するにあたり、我々はこれまでに食品製造に用いられている微生物を用いて発酵条件を検討し、その中から乳酸菌を選抜した。本研究ではいくつかの乳酸菌を用いて、発酵により特徴ある後発酵茶の製造を検討した。さらに我々は、原料として二番茶の利用を検討した。一番茶の後に摘採される二番茶や三番茶は中・下級茶扱いとなり、全国的に価格が下落している。二・三番茶の販売は加工する手間やコストに見合わず、その多くが廃棄されている現状にある。本研究では、国内の低価格な二・三番茶を原料として、安定した乳酸発酵技術により特徴ある後発酵茶を作り、その機能的価値を検証することを目的とした。

【方法・結果】

GYP 液体培地で前培養した乳酸菌と茶葉を混ぜ合わせ、重石をして 30℃で嫌気的に発酵させた（発酵区）。乳酸菌を加えずに同様の操作をした茶葉サンプルを非発酵区とした。経時的に茶葉を採取して乳酸菌数と pH を測定し、発酵条件を検討した。発酵区の茶葉において、乳酸菌数の増加と pH の低下を確認した。

発酵後、茶葉を十分に乾燥させ、80℃の熱水で成分を抽出した。茶抽出物に対して、抗酸化活性およびアンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害活性を測定した。ACE は血圧上昇に大きく関与している酵素である。後発酵茶抽出物において、抗酸化活性および ACE 阻害活性が確認された。マウスの後発酵茶飲用試験においても、高脂肪食を摂取させたマウスに対して、体重増加抑制効果および血中コレステロール濃度の増加抑制効果が見られた。また、大学生をパネラーとして行った官能評価では、非発酵茶と比較して後発酵茶では渋みが低下し、まろやかな好ましい風味になったことがわかった。

Post-fermented tea, Lactococcus, lactic acid fermentation

発表責任者：安部智子（t_abe@mail.dendai.ac.jp）

講演番号：2B01a01
講演日時：3 月 26 日 09:30～ 総合学習プラザ B01 会場

緑膿菌に活性を示す新規抗生物質の発見と構造

Discovery and structural elucidation of novel antipseudomonal antibiotics

○澤 竜一、五十嵐 雅之、梅北 まや、木村 智之、波多野 和樹、林 千草、久保田 由美子、渋谷 優子（微化研）
○Ryuichi SAWA, Masyuki IGARASHI, Maya UMEKITA, Tomoyuki KIMURA, Masaki HATANO, Chigusa HAYASHI, Yumiko KUBOTA, Yuko SHIBUYA (Bikaken)

【目的】 従来有効であった薬剤が無効となる多剤耐性菌の出現は、21 世紀の医療が抱える大きな課題の一つである。そのうちのグラム陰性病原菌（腸内細菌科細菌、緑膿菌、アシネトバクター バウマニ）は、多様な薬剤に対して耐性を獲得し著しい脅威となっている。このためグラム陰性菌に対して活性を示す新規クラスの抗生物質の登場が期待されている。緑膿菌は、ペニシリンやセファゾリンなどの第一世代セフェム薬に自然耐性を示し、テトラサイクリン系やマクロライド系抗生物質などの抗菌薬にも耐性を示す傾向が強い。これは、緑膿菌の外膜と多剤排出ポンプが発達しているため、透過障壁性と能動的排出に起因するものと考えられている。

本研究では、外膜と多剤排出ポンプの機能が低下した高感受性緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa* A3）株を用いることによりグラム陰性菌、特に緑膿菌に活性を示す新規クラスの抗生物質が得られるものと考え探索することとした。主として土壌由来放線菌培養液より探索を用い、この過程で目的の抗菌活性を示す新規クラスの物質を見出した。本報告では、本化合物の単離精製、構造決定および生物活性について報告する。

【方法・結果】 *P. aeruginosa* A3 に対する抗菌活性を指標にスクリーニングを行った。その過程で東京都品川区より採取した土壌より分離した一希少放線菌 *Lentzea* sp.MM249-141F7 株の培養液中に目的の抗菌活性を示すことを見出した。活性物質の単離は、本菌株の培養液 5 L より弱酸性陽イオン交換樹脂 Amberlite IRC50、ゲルろ過 Sephadex LH 20、ODS-HPLC により順次精製を行い 2 種の活性成分 MM249A 29.8 mg および B 56.2 mg を単離した。

MM249A および B は、高分解能 ESIMS より分子式をそれぞれ $C_{21}H_{23}N_5O_5$ および $C_{22}H_{25}N_5O_5$ と決定した。各種 2 次元 NMR スペクトルの解析から 2 化合物ともに 1,4,5,6-tetrahydro-7*H*-indol-7-one、1-methyl-1*H*-imidazole およびテトラミン酸を含む 16 員環のユニークな新規構造であると決定した。さらに A はアセトニトリル-水系で、B はメタノール-水系でそれぞれ結晶が得られ、X 線結晶回折によりそれぞれの立体構造が決定できた。MM249A および B は、*P. aeruginosa* A3 に対してそれぞれ 50 μg/ml および 6.25 μg/ml で MIC を示し、また *Escherichia coli* NIHJ に対してそれぞれ 25 μg/ml および 3.13 μg/ml で MIC を示した。

novel antibiotics, Lentzea, antipseudomonal

講演番号：2B01a02
講演日時：3 月 26 日 09:41～ 総合学習プラザ B01 会場

アリ由来放線菌の生産する新規 hydrazone 含有抗生物質に関する研究

A novel hydrazine-containing antibiotic from the ants-derived actinomycete.

○五十嵐 雅之、木村 智之、村松 秀行、澤 竜一、梅北 まや、林 千草、有坂 理恵 (微化研)
○Masayuki IGARASHI, Tomoyuki KIMURA, Hideyuki MURAMATSU, Ryuichi SAWA, Maya UMEKITA, Chigusa HAYASHI, Rie ARISAKA (BIKAKEN)

【目的】 非結核性抗酸菌とは結核菌とライ菌以外の抗酸菌の総称であり、現在 100 菌種以上が発見されており、それらの菌種によって起こる感染症のことを非結核性抗酸菌症と呼ばれている。近年、非結核性抗酸菌症、中でも *Mycobacterium avium* complex (MAC)および *Mycobacterium abscessus* complex (Mab)に起因する疾病が急増している [1)]。MAC は既存の抗菌薬のほとんどに感受性を示さず、マクロライド系抗生物質であるクラリスロマイシンおよびアジスロマイシンに感受性を示すがこれらマクロライド系抗生物質に対する耐性獲得が問題視されている。また、Mab はマクロライド系抗生物質に対して自然耐性を有しているものが多いため本菌に有効な抗生物質の創製が望まれている。アリ由来の放線菌は土壌放線菌と比べて分離報告例が非常に少なく、土壌とは異なる特異的な系統群を含むと期待され、特にアリの生活環での共生や寄生の関係にある放線菌からは抗生物質だけでなく共生・寄生に関わる生理活性物質も発見できるものと期待している。そこで我々は新しい分離源としてアリ由来放線菌に着目し、MAC および Mab に有効な新規抗生物質の探索を行った。その結果、非結核性抗酸菌に対し強い抗菌活性を示す新規 hydrazone 含有抗生物質を単離した。本発表では目的化合物の精製・単離、構造決定および生物活性について報告を行う。

【方法・結果】 スクリーニングは、マクロライド耐性 MAC および Mab を用いて抗菌活性を指標に探索を行なった。この過程で、沖縄県糸満市平和祈念公園で採集したアリ由来放線菌 MM745A-181F2 株の培養抽出液中にマクロライド耐性菌を含む MAC および Mab に強い抗菌活性を見出した。活性物質の精製・単離は、MM745A-181F2 株の培養液 5 リットルより、菌体を MeOH で抽出し濃縮後、培養上清とともに EtOAc 抽出を行い、次いで活性画分についてシリカゲルカラムを用いて精製し目的の活性物質を 132 mg 単離した。本物質は、高分解能 ESIMS より、分子式を $C_{19}H_{34}N_2O_3$ と決定した。本物質の構造は、ジエチルエーテル-ヘキサン混合液中で得られた結晶による X 線結晶解析により新規 hydrazone 含有抗生物質と決定した。本物質の抗菌活性はマクロライド耐性菌を含む *M. avium* (22), *M. intracellulare* (17) および *M. abscessus* (10) に対しそれぞれ 1-4, 0.5-1, 0.5-1 μg/ml で MIC を示した。

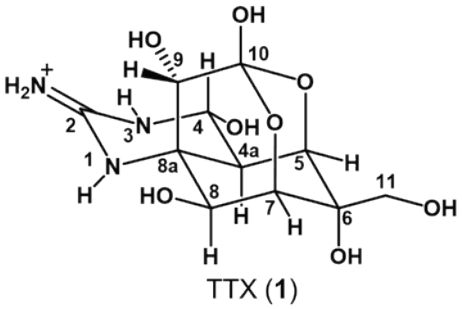
1）Namkoong H, et al. Emerg Infect Dis. 2016,**22**,1116–7.

non-tuberculousis mycobacteria, novel hydrazine-containing antibiotic, ants-derived actinomycete

講演番号：2B01a03
講演日時：3 月 26 日 09:52～ 総合学習プラザ B01 会場

フグ由来の新規テトロドトキシン関連化合物の単離と構造
Isolation and structure elucidation of novel tetrodotoxin related compounds from pufferfish
○八重樫 優士[1]、工藤 雄大[2,1]、長 由扶子[1]、此木 敬一[1]、山下 まり[1] ([1]東北大院農、[2]東北大学際研)
○ Yuji YAEGASHI[1], Yuta KUDO[2,1], Yuko CHO[1], Keiichi KONOKI[1], Mari YAMASHITA[1] ([1]Graduate School of Agricultural Science, Tohoku Univ., [2]Frontier Research Institute for Interdisciplinary Sciences, Tohoku Univ.)

【背景・目的】テトロドトキシン (TTX, **1**) は電位依存性ナトリウムチャネル (Na_V) を強力に阻害する神経毒である。TTX はフグをはじめとする海洋生物やイモリなどの両生類に広く含有される。これまで、我々はイモリから 10-hemiketal 型の TTX 類縁体や二環性グアニジノ化合物群を単離し、陸棲生物の TTX においてモノテルペン由来の生合成経路を提唱した。一方、海洋生物では、ハチノジフグよりグアニジノ基を有する新規二環性スピロ化合物群を単離し、それらの構造から、海洋生物の TTX の生合成経路として、陸棲生物の TTX とは異なる経路を提唱した [1)]。本研究では、海洋生物における TTX 生合成経路を解明するため、フグよりさらなる TTX 関連化合物を探索し、単離・構造決定を行った。


TTX (**1**)

【方法】TTX を高濃度に含有するフグの皮から、メタノールで抽出し、逆相カラムクロマトグラフィー (Cosmosil 140 C_{18}-OPN)で粗精製した後、溶出液を高分解能(HR)-LC-MS/MS で精査したところ、新規 TTX 関連化合物と推測される化合物 **2** が検出された。この化合物を逆相 HPLC で単離し、HR-ESI-MS と各種 NMR スペクトル測定に供し、構造を推定した。また、別種のフグ卵巣を、希酢酸で加熱抽出し、活性炭処理後、抽出物を HR-LC-MS/MS によって精査したところ、別の新規 TTX 類縁体と推定される化合物 **3** が検出された。化合物 **3** をさらに、弱酸性陽イオン交換樹脂と HILIC カラムで精製し、HR-ESI-MS と各種 NMR スペクトル測定に供した。

【結果・考察】化合物 **2**, **3** をそれぞれ約 20 μg 程度を単離し、HR-ESI-MS のデータから、分子式をそれぞれ $C_{11}H_{20}N_3O_3$, $C_{11}H_{17}N_3O_8$ と決定した。化合物 **2** は各種 NMR スペクトルの解析から、これまで報告したグアニジノ基を有する二環性スピロ化合物群 [1)]に類似する構造をもつと推定された。また、その推定構造を基に、これまで推定した海洋生物の TTX 生合成経路 [1)]における **2** の位置付けを考察した。化合物 **3** については、構造解析に十分な量を確保するため、さらなる単離を試みながら、各種 NMR スペクトルを解析し、構造決定を行っている。

【References】

1) Ueyama, N., Sugimoto, K., Kudo, Y., Onodera, K., Cho, Y., Konoki, K., Nishikawa, T., Yotsu-Yamashita, M., *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 7250–7258.

tetrodotoxin, structure elucidation, biosynthesis

発表責任者：山下まり（mari.yamashita.c1@tohoku.ac.jp）

講演番号：2B01a04
講演日時：3 月 26 日 10:03～ 総合学習プラザ B01 会場

有毒イモリより得られた *N*-hydroxy 型テトロドトキシン類縁体の構造解析

Structure elucidation of *N*-hydroxy-type tetrodotoxin analogues from toxic newts

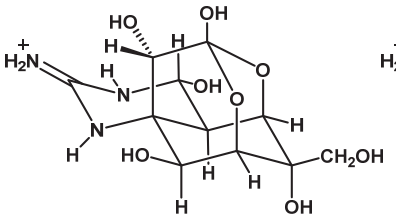
○工藤 雄大[1,2]、ハニフィン チャールス[3]、小瀧 裕一[4]、山下 まり[2]（[1]東北大学際研、[2]東北大院農、[3]ユタ州立大ユーインターベイシン校、[4]福島学院大）

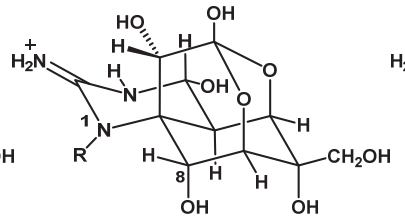
○Yuta Kudo[1,2], Charles Hanifin[3], Yuichi Kotaki[4], Mari Yotsu-Yamasita[2] ([1]Frontier Research Institute for Interdisciplinary Sciences, Tohoku Univ., [2]Graduate School of Agricultural Science, Tohoku Univ., [3]Utah State Univ. Uintah Basin, [4]Fukushima College)

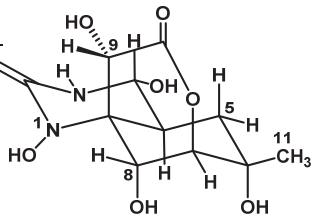
[背景] テトロドトキシン (tetrodotoxin, TTX, **1**) はフグなどの海洋生物、陸棲のイモリ、カエルに含まれる強力な神経毒である。代表的な自然毒でありながら、TTX の生合成に関わる遺伝子は一切同定されておらず、高度に架橋した構造がどのように構築されるか未だ不明である。我々は生合成経路の解明の糸口となり得る TTX 類縁体、生合成中間体を天然より探索してきた[1)]。本発表では、有毒イモリから得られた新規 TTX 類縁体の構造と既知成分の構造改訂について報告する。

[方法] オキナワシリケンイモリ (*Cynops ensicauda popei*) の抽出物を高分解能 LC-MS/MS で解析し、新規成分を探索した。検出された新規成分 (**2**) を精製し、NMR で構造解析した。また、アメリカのサメハダイモリ (*Taricha granulosa*) より得られた成分 (**3**) を単離し、NMR で構造を解析した。

[結果] 高分解能 MS、NMR による構造解析の結果、オキナワシリケンイモリより得た **2** は 1-*N*-hydroxy 体と推測された。NOESY 1D による解析から、8 位ヒドロキシ基がアキシアル配置の 8-*epi* 体であることが示され、本化合物を新規 TTX 類縁体 1-hydroxy-8-*epi*TTX (**2**) と推定した。**2** を亜鉛-酢酸による還元反応に供すると 8-*epi*TTX (**4**) [2)]が生成したことも本構造を支持している。サメハダイモリより得た **3** は、1993 年に 1-hydroxy-5,11-dideoxyTTX[3)]と報告された成分と同一の NMR スペクトルを与えたが、他の TTX 類縁体とのケミカルシフトの比較から 8-*epi* 体である可能性が示された。そこで、NOESY 1D による解析に供したところ、H8 と H9 の間で NOE が観測され、8-*epi* 体だと示された。これより本化合物を 1-hydroxy-8-*epi*-5,11-dideoxyTTX (**3**) と構造改訂した。これまで報告した 1-*N*-hydroxy 体[4)]は全て 8-*epi* 体であることから 1-*N*-hydroxy 体の生成に 8 位ヒドロキシ基の立体化学が関与している可能性がある。


tetrodotoxin (TTX, **1**)


R=OH; 1-hydroxy-8-*epi*TTX (**2**)
R=H; 8-*epi*TTX (**4**)


1-hydroxy-8-*epi*-5,11-dideoxyTTX (**3**)

[引用] 1) Kudo, Y.; Yasumoto, T.; Mebs, D.; Cho, Y.; Konoki, K.; Yotsu-Yamashita, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 8728. 2) Kudo, Y. and Yotsu-Yamashita, M. *J. Nat. Prod.* **2019**, *82*, 1656. 3) Kotaki, Y. and Shimizu, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 827. 4）Kudo, Y.; Yasumoto, T.; Cho, Y.; Konoki, K.; Yotsu-Yamashita, M. *Mar. Drugs* **2012**, *10*, 656.

tetrodotoxin, structure elucidation, newt

発表責任者：山下まり（mari.yamashita.c1@tohoku.ac.jp）

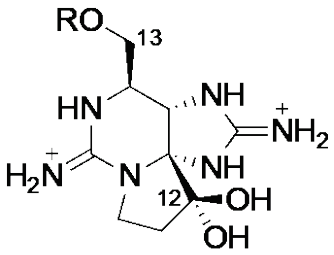
講演番号：2B01a05
講演日時：3 月 26 日 10:14～ 総合学習プラザ B01 会場

麻痺性貝毒サキシトキシンの推定生合成中間体の合成と有毒生物中の分析

Synthesis of predicted biosynthetic intermediates of paralytic shellfish toxin, saxitoxin, and analysis of these compounds in toxin producing microorganisms

○東海林 千容[1]、長 由扶子[1]、赤松 みちる[1]、安達 栞菜[2]、石塚 颯[2]、此木 敬一[1]、長澤 和夫[2]、山下 まり[1] ([1]東北大院農、[2]東農工大院工)
○Chihiro TOKAIRIN[1], Yuko CHO[1], Michiru AKAMATSU[1], Kannna ADACHI[2], Sou ISHIZUKA[2], Keiichi KONOKI[1], Kazuo NAGASAWA[2], Mari YAMASHITA[1] ([1]Tohoku Univ. Agr., [2]Tokyo Univ. of Agric. and Technol. Tech.)

[背景・目的] サキシトキシン(saxitoxin, STX, **1**)は、麻痺性貝毒(PSTs)の代表的化合物であり、強力かつ特異的な電位依存性ナトリウムチャネルの阻害剤である。PSTs は、海産渦鞭毛藻によって生産され、二枚貝に蓄積されるため、ヒトが喫食した場合に食中毒を引き起こす。また、淡水産の藍藻によっても生産される。清水らは、L-アルギニンを出発物質とする STX 生合成経路を提唱した。その後、有毒藍藻から生合成遺伝子が発見され、一部改訂された生合成経路が提案された。一部の類似の遺伝子は、有毒渦鞭毛藻からも同定されている。我々は、推定された生合成中間体を化学合成し、有毒藍藻や渦鞭毛藻中に存在することを証明した。また、その安定同位体ラベル体が、有毒藍藻により STX 類縁体に変換されることを証明し、提唱生合成経路を一部改訂した[1,2]。一方、Narayan らは数種の生合成遺伝子を異種発現し、基質特異性や反応生成物を報告した[3]。本研究では、STX の 12 位、13 位の酸化の順序についての情報を得る目的で、２種の推定生合成中間体を化学合成し、PST 生産生物中の存在を調べた。



STX (**1**) R=CONH$_2$
dcSTX (**2**) R=H

[方法]長澤らの decarbamoyl STX (dcSTX, **2**)の合成中間体[4]を、Barton-McCombie 反応によって脱酸素化し、生成物を分離後に脱保護し、12, 12, 13-trideoxy-dcSTX (**3**)と 12α, 13-dideoxy-dcSTX (**4**)を得た。次に、有毒藍藻 *Anabaena circinalis* (TA04)および有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium catenella* (120518KureAC)の培養藻体を希酢酸抽出し、HILIC 固相抽出または弱酸性陽イオン交換樹脂で粗精製し、**3**, **4** の存在を、HILIC および逆相 LC による HR-LC-MS/MS で分析した。

[結果]化合物 **3**, **4** ともに両方の PST 生産生物から一致するピークは検出されなかった。しかし、HILIC および逆相 LC で、**3** の保持時間に近接し、**3** と同じ分子式で MS/MS パターンも類似する未同定のピークが、両方の PST 生産生物から検出された。この結果は、**3** の構造に類似する未知類縁体の存在を示唆した。また、**4** と同じ分子式で、保持時間や MS/MS パターンが異なる未同定の複数のピークが、両方の PST 生産生物から検出された。これらのピークは **4** の異性体由来と考えられた。

[Reference] 1) Tsuchiya, S.; Cho, Y.; Konoki, K.; Nagasawa, K.; Oshima, Y.; Yotsu-Yamashita, M. *Sci. Rep*., **2016**, 6:20340. 2) Tsuchiya, S.; Cho, Y.; Yoshioka, R.; Konoki, K.; Nagasawa, K.; Oshima, Y.; Yotsu-Yamashita, M. *Angew. Chem. Int. Ed*., **2017**, 56, 5327–5331. 3) Lukowski, A. L.; Ellinwood, D. C.; Hinze, M. E.; De Luca, R. J.; Du Bois, J.; Hall, S.; Narayan, A. R. H. *J. Am. Chem. Soc*., **2018**, 140, 11863–11869. 4) Iwamoto, O.; Nagasawa, K. *Org. Lett*. **2010**, 12, 2150–2153.

saxitoxin, biosynthesis, LC-MS/MS

発表責任者：山下まり（mari.yamashita.c1@tohoku.ac.jp）

講演番号：2B01a06
講演日時：3 月 26 日 10:35～ 総合学習プラザ B01 会場

Isolation of Bioactive Compounds from the fruiting bodies of *Entoloma clypeatum*

○Irine Yunhafita Malya[1], Jing Wu[2], Jae-Hoon Choi[1,2], Hirofumi Hirai[1,2], Hirokazu Kawagishi[1,2]
([1]Grad. Sch. Sci. Tech., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ.)

[Background]

A wild edible mushroom, *Entoloma clypeatum* known as "*Harushimeji*" in Japan, is an entolomatoid fungus, which have been recorded in the vicinity of rosaceous plants in the spring. The edible mushroom is rich in monosodium glutamate (MSG) and 5'-nucleotides and a good source of proteins and carbohydrates[1,2)]. The morphologically uniqueness of the mushroom has been arousing researchers' interest to describe the morphological characters and isolate the pure culture to determine the contribution of this fungal species associated with rosaceous plants[3-5)]. However, there is no report about isolation of bioactive compounds from the fungus. Therefore, we tried to isolate bioactive compounds, determine their structure and examinee their biological activities.

[Methods and Results]

Fresh fruiting bodies of *E. clypeatum* were extracted with EtOH and then acetone to obtain the crude extracts. The partition method divided them into *n*-hexane, EtOAc, and EtOH soluble parts. The EtOAc soluble part was subjected to silica gel flash column chromatography, which was further purified by HPLC. As a result, some compounds were successfully isolated. Structural determination of each compounds was performed by interpretation of IR, MS and NMR data. Furthermore, a few bioassays were conducted for all the compounds.

1) Ranogajec, A., *et al.. J. Sep. Sci.*, 33, 1024–1033. (2010)
2) Beluhan, S. and Ranogajec, A.. *Food Chem.,* 124, 1076–1082. (2011)
3) Kobayashi, H. and Hatano, K.. *Mycoscience*, 42, 83–90. (2001)
4) Kobayashi, H., *et al.. Mycoscience*, 44, 331–333. (2003)
5) Shishikura, M., *et al.*. *Mycoscience*, 60, 221–227. (2019)

Entoloma clypeatum, structure determination, bioactive compound

発表責任者：Kawagishi Hirokazu（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2B01a07
講演日時：3 月 26 日 10:46～ 総合学習プラザ B01 会場

Isolation and Biological Activity Evaluation of Secondary Metabolites from *Pleurocybella porrigens*

○Arbin Sunuwar[1], Arif Yanuar Ridwan[2], Jing Wu[3], Jae-Hoon Choi[1,2,3], Hirofumi Hirai[1,2,3], Hirokazu Kawagishi[1,2,3] ([1]Grad. Sch. Inte. Sci. Tec., Shizuoka Univ., [2]Gra. Sch. Sci. Tech., Shizuoka Univ., [3]RIGST, Shizuoka Univ.)

[Background and Purpose]

In 2004, 55 peoples were poisoned by the ingestion of the wild mushroom *Pleurocybella porrigens* (Sugihiratake in Japanese). Among them, 17 people died due to acute encephalopathy.[1] The case drew the interest of several researchers to investigate the relationship between the mushroom intake and the disease. In recent years, our group has reported the isolation and characterization of a novel lectin and unusual amino acids from the mushroom which might be associated with poisoning.[2,3] Thus, further investigation led to the discovery of unstable amino acid pleurocybellaaziridine as a toxic principle.[4] Other studies also suggested the poisoning accident might involve vitamin D analogue and intoxication of cyanide and thiocyanate after Sugihiratake ingestion.[5,6] Despite its toxic nature of *P. porrigens*, there are only a few reports of metabolite production from this mushroom.[3,7,8] In this study, we attempt to isolate metabolites from the fruiting bodies as well as the mycelial culture and evaluate their biological activities.

[Methods and results]

The fruiting bodies of *P. porrigens* were extracted with ethanol and acetone, respectively. After combining the solution and concentrating it under reduced pressure, the extract was divided into *n*-hexane soluble part, EtOAc soluble part, EtOH soluble part, and water soluble part. The culture broth of *P. porrigens* was filtered and then concentrated under reduced pressure. The concentrate was also divided into *n*-hexane soluble part, EtOAc soluble part, EtOH soluble part, and water soluble part. The EtOAc soluble parts from the fruiting bodies and culture broth were subjected to repeated chromatography and several compounds were isolated. The chemical structures were determined by the interpretation of NMR, mass spectroscopy and IR spectra, and biological activity of the compounds was evaluated.

[References]

1) Suzuki, T. et al. J. Microbiol. Methods., 100, 70–76 (2014).
2) Suzuki, T. et al. Biosci. Biotechnol. Biochem., 73, 702–709 (2009).
3) Kawaguchi, T. et al. Tetrahedron, 66, 504–507 (2010).
4) Wakimoto, T. et al. Angew. Chem. Int. Ed., 50, 1168 –1170 (2011).
5) Sasaki, H. et al. Biol. Pharm. Bull., 29, 2514–2518 (2006).
6) Akiyama, H. et al. Food Safety., 3, 16–29 (2014).
7) Amakura, Y. et al. Chem. Pharm. Bull., 54, 1213–1215 (2006).
8) Hasegawa, T. et al. Chem. Pharm. Bull., 55, 1748–1749 (2007).

Pleurocybella porrigens, structure determination, biological activity

発表責任者：Hirokazu Kawagishi（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2B01a08
講演日時：3 月 26 日 10:57～ 総合学習プラザ B01 会場

キノコからの免疫チェックポイント阻害物質の探索
Search for Immune Checkpoint Inhibitors from Mushrooms
○呉 静[1]、高橋 真奈美[2]、リヅアン アリフ[3]、崔 宰熏[1,2,3]、平井 浩文[1,2,3]、二木 美咲[4]、平田 裕嗣[4]、西川 俊夫[4]、原田 栄津子[5]、小堀 一[6]、戸田 雅昭[7]、ガバザ コリナ[7]、安間 太郎[7]、ガバザ エステバン[7]、河岸 洋和[1,2,3] ([1]静大グリーン研、[2]静大院総合農、[3]静大院創造、[4]名大院生命農、[5]宮崎大農、[6]岩出菌研、[7]三重大院医)
○Jing Wu[1], Manami Takahashi[2], Arif Yanuar[3], Jae-Hoon Choi[1,2,3], Hirofumi Hirai[1,2,3], Misaki Niki[4], Yuushi Hirata[4], Toshio Nishikawa[4], Etsuko Harada[5], Hajime Kobori[6], Masaaki Toda[7], Corina D'Alessandro- Gabazza[7], Taro Yasuma[7], Esteban Gabazza[7], Hirokazu Kawagishi[1,2,3] ([1]RIGST, Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. of Inte. Sci. and Technol., Shizuoka Univ., [3]Grad. Sch. of Sci. and Technol., Shizuoka Univ., [4]Nagoya Univ., [5]Miyazaki Univ., [6]Iwade Res. Inst. of Mycol., [7]Mie Univ.)

[背景目的]
癌細胞のメカニズムにおいて免疫抑制性シグナルを誘導し得る分子は「免疫チェックポイント分子」と呼ばれており,PD-1 リガンド経路に関与する T 細胞上の PD-1 受容体及び癌細胞上で発現するリガンド PD-L1 及び PD-L2,CTLA4 経路に関与する T 細胞上の CTLA4 受容体等が知られている。PD-1 経路は，癌細胞に対する免疫の抑制に関与しているとされており，この経路を標的とした抗 PD-1 抗体や抗 PD-L1 抗体が癌治療薬候補として期待され,抗体医薬の開発が進んでいる。しかし,抗癌剤オプジーボは下垂体機能障害などの副作用が報告され，新薬の開発が求められている。本研究ではキノコ由来の免疫チェックポイント蛋白質の発現を抑制する天然の低分子化合物の探索を目的とした。
[方法と結果]
キナメツムタケ（*Pholiota spumosa*）およびチャジュタケ（*Agrocybe chaxingu*）の子実体をそれぞれ破砕し，70%エタノール，アセトンで抽出し減圧濃縮後，*n*-ヘキサン，酢酸エチルで順次抽出し，減圧濃縮して各可溶部を得た。また，コムラサキシメジ（*Lepista sordida*），ナラタケ（*Armillaria* sp.）およびヤマブシタケ（*Hericium erinaceum*）の菌糸体培養ろ液をそれぞれ *n*-ヘキサン，酢酸エチルで順次抽出し，減圧濃縮して各可溶部を得た。一般にキノコの発生時に菌糸体表面に液体が分泌される。我々はこれまで誰も注目していなかったこの液に着目し，fruiting liquid（FL）と命名した。ヤマブシタケの FL を *n*-ヘキサン，酢酸エチルで順次抽出し，減圧濃縮して各可溶部を得た。免疫チェックポイント阻害活性が確認された各可溶部をそれぞれ各種クロマトグラフィーに供し，キナメツムタケ子実体から 2 種の化合物，チャジュタケ子実体から 1 種の化合物，コムラサキシメジ菌糸体培養ろ液から 3 種の化合物，ナラタケ菌糸体培養ろ液から 9 種の化合物，ヤマブシタケ FL から 3 種の化合物，ヤマブシタケ菌糸体培養ろ液から 3 種の化合物の単離を成功した。これらの化合物の構造は MS，IR および各種 NMR スペクトルにより決定した。

Immune Checkpoint Inhibitors, mushroom, structure determination

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2B01a09
講演日時：3 月 26 日 11:08～ 総合学習プラザ B01 会場

シロオニタケ子実体機能性物質の探索

Exploration of functional compounds from the fruiting bodies of *Amanita virgineoides*

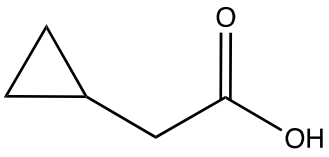
○上石 優作[1]、呉 静[2]、崔 宰熏[1,2,3]、平井 浩文[1,2,3]、河岸 洋和[1,2,3] ([1]静大院・総合農、[2]静大・グリーン研、[3]静大院・創造)
○ Yusaku KAMIISHI[1], Jing WU[2], Jae-Hoon CHOI[1,2,3], Hirofumi HIRAI[1,2,3], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,3] ([1]Grad. Sch. of Inte. Sci. and Technol., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ., [3]Grad. Sch. of Sci. and Technol., Shizuoka Univ.)

【目的】

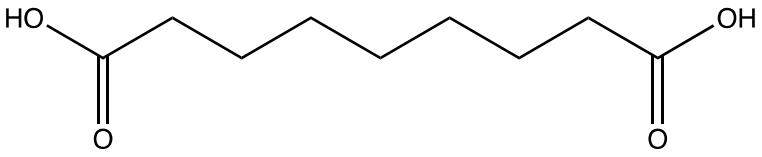
テングタケ科テングタケ属に属する一連のキノコは、現在500～600種類程が種として認められており、毒キノコとして認められているキノコが多いことで知られている。その1種であるシロオニタケ（*Amanita virgineoides*）は、夏から秋にかけてシイ・カシ林、クヌギ・コナラ林などの地上に発生し、日本・韓国・中国に分布する。シロオニタケの近縁種であるタマシロオニタケ（*Amanita shaerobulbosa*）から有毒物質の報告がなされたことから、現在では有毒なキノコとして扱われている[1]。しかし、シロオニタケからのそのような毒性物質や、その他活性物質などの単離、報告は全く行われていない。そのため本研究では、シロオニタケ子実体から、毒性を示す化合物およびその他活性のある化合物の探索を目的とした。

【方法・結果】

シロオニタケ子実体21.5 kgを80%エタノールで抽出し、減圧濃縮後、抽出物を液液分配により*n*-ヘキサン層、酢酸エチル層、エタノール層および水層に分画した。このうち酢酸エチル可溶部をフラッシュカラムクロマトグラフィーやHPLCに供することで、数種類の新規化合物および既知化合物（**1**, **2**）の単離に成功した。これらの化合物の構造はMS、IRおよび各種NMRスペクトルにより決定した。また、それらの化合物のうち収量の多いものを各種活性試験に供する予定である。



化合物 **1**



化合物 **2**

1) T. Ohta *et al.*, *Phytochemistory*, 1987, 26, 565-566.

Amanita virgineoides, mushroom, structure determination

講演番号：2B01a10
講演日時：3 月 26 日 11:19～ 総合学習プラザ B01 会場

サケツバタケ菌糸体培養濾液からの生物活性物質の探索
Search for Bioactive Compounds from the Culture Broth of *Stropharia rugosoannulata*
○篠塚 陸[1]、ゆんはふぃた まるや いりね[2]、呉 静[3]、崔 宰熏[1,2,3,4]、平井 浩文[1,2,3,4]、河岸 洋和[1,2,3,4]
([1]静大農・応生科、[2]静大院・総合農、[3]静大・グリーン研、[4]静大院・創造)
○ Riku SHINOTSUKA[1], IRINE Yunhafita Malya[2], Jing Wu[3], Jae-Hoon Choi[1,2,3,4], Hirofumi Hirai[1,2,3,4], Hirokazu Kawagisi[1,2,3,4] ([1]Dept. of Appl. Life Sci., Fac. of Agric., Shizuoka Univ, [2]Grad. Sch. of Inte. Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [3]RIGST, Shizuoka Univ., [4]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ.)

〔背景目的〕
サケツバタケ（*Stropharia rugosoannulata*）はモエギタケ科モエギタケ属の可食用キノコであり、日本、ヨーロッパ、北アメリカ、ニュージーランド等に自生している。以前に当研究室では、サケツバタケの子実体から破骨細胞形成抑制物質、植物成長調節物質、抗菌活性物質および前例のないステロイド骨格化合物 strophasterol A-D を発見した[1, 2)]。Strophasterol A は、小胞体ストレス誘導神経細胞死抑制活性および抗 MRSA 活性を持っており、サケツバタケを機能性食品として期待している。本研究ではサケツバタケ菌糸体培養濾液からさらなる生物活性物質の探索を目的とした。

〔方法と結果〕
ポテトデキストロースブロス培地で前培養したサケツバタケ菌糸体をジャーファーメンターに接種し、30 日間培養し、培養・濾過を行い、18.8 L の培養濾液を得た。その後、減圧濃縮した粗抽出物を、ヘキサンと酢酸エチルで順次液−液分配、エタノールで固−液分配し、減圧濃縮後、各可溶部を得た。酢酸エチル可溶部(1.46 g)をシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー、ＨＰＬＣにより精製した。その結果、数種の化合物の単離に成功した。各化合物の構造決定は、IR、MS、および NMR スペクトルの解析によって行った。さらに、単離した化合物は、各種活性試験に供する予定である。

1) Wu, J., *et al.. Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75, 1631–1634 (2011)
2) Wu, J., *et al.. Angew. Chem. Int. Ed.,* 51, 10820–10822 (2012)

Stropharia rugosoannulata, structure determination, bioactive compound

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2B01a11
講演日時：3 月 26 日 11:40～ 総合学習プラザ B01 会場

オオシロカラカサタケ培養濾液由来の生体機能性物質の探索

Search for biofunctional compounds from culture broth of Chlorophyllum molybdites

○小椋 隆平[1]、呉 静[3]、崔 宰熏[1,2,3,4]、平井 浩文[1,2,3,4]、河岸 洋和[1,2,3,4] ([1]静大農、[2]静大院・総合農、[3]静大・グリーン研、[4]静大院・創造)
○ Ryuhei OGURA[1], Jing WU[3], Jae-Hoon CHOI[1,2,3,4], Hirofumi HIRAI[1,2,3,4], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,3,4] ([1]Fac. of Agric., Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. of Inte. Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [3]RIGST, Shizuoka Univ., [4]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ.)

【背景・目的】

オオシロカラカサタケ（*Chlorophyllum molybdites*）はハラタケ科オオシロカラカサタケ属に属するキノコで、東海地方で春から秋にかけてみられる毒キノコである。過去に単離されてきた物質にマウス致死性毒を示すモリブドフィリシンや、細胞毒性を示すステロイド類などがある[1)]。このキノコに関する二次代謝産物の研究例は少なく、特に培養濾液の研究は行われていなかったが、昨年度、本研究室より培養濾液の酢酸エチル可溶部から植物成長調節活性物質として新規化合物の単離を報告した[2)]。

本研究では、オオシロカラカサタケ培養濾液からさらなる機能性物質の探索を目的とした。

【方法・結果】

オオシロカラカサタケ培養濾液 1.5 L をヘキサン、酢酸エチルで順次液-液分配、エタノールで固-液分配を行った。その後の水層をさらに酢酸エチルにて液-液分配を行った画分を減圧濃縮後、得られた酢酸エチル可溶部 215.7 mg を C18 Sep-Pak を用いて、30%メタノール、100%メタノール、それぞれの画分に分画した。30%メタノール画分 193.4 mg を HPLC にてさらに分画し、化合物の単離および精製を試みた。

その結果、酢酸エチル可溶部から 1 種の化合物（22.2 mg）の単離に成功した。単離された化合物の構造は MS、IR および各種 NMR スペクトルデータの解析によって同定した。現在、この化合物を植物成長調節活性に供している一方で、更なる化合物の単離を試みている。

１）大杉晃一ら『おいしいきのこ毒きのこハンディ図鑑』p. 102　主婦の友社　(2010)
２）大浦健ら、平成 30 年度日本農芸化学大会講演要旨集 p. 612

Chlorophyllum molybdites, mushroom, structural determination

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

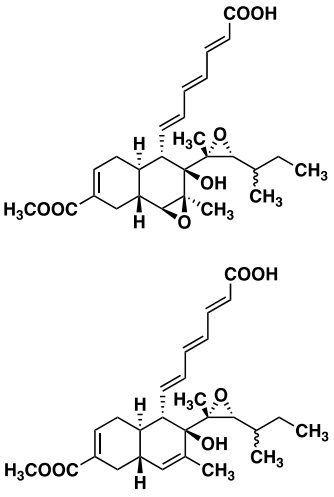
講演番号：2B01a12
講演日時：3 月 26 日 11:51～ 総合学習プラザ B01 会場

糸状菌代謝産物からの抗アスペルギルス活性物質の探索
Search for anti *Aspergillus* sp. active substances from filamentous fungal metabolites

○渡邊 善洋[1]、吉田 百合香[2]、常盤 俊之[1]、穂苅 玲[1]、石山 亜紀[1,3]、岩月 正人[1,3]、野中 健一[1,3]、矢口 貴志[4]、大村 智[1] ([1]北里生命科学研究所、[2]北里大学理学部 化学科、[3]感染制御科学府、[4]千葉大学 真菌医学研究センター)
○Yoshihiro Watanabe[1], Yurika Yoshida[2], Toshiyuki Tokiwa[1], Rei Hokari[1], Aki Ishiyama[1,3], Masato Iwatsuki[1,3], Kenichi Nonaka[1,3], Takashi Yaguchi[4], Sataoshi Omura[1] ([1]Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato University, [2]Department of Chemistry, School of Science, Kitasato University, [3]Department of Drug Discovery Sciences, Graduate School of Infection Control Sciences, [4]Medical Mycology Research Center, Chiba University)

《背景・目的》アスペルギルス症は真菌である *Aspergillus* 属によって引き起こされる感染症である。このアスペルギルス症の主要な原因菌種である *Aspergillus fumigatus* は、現在治療に用いられているアゾール系薬剤に対する耐性菌の出現が問題となっている[1)]。また、*A. fumigatus* とその隠蔽種である *A. lentulus*、*A. udagawae*、*A. felis* は、臨床現場において誤同定されることが多いにも関わらず、薬剤感受性が異なる[2-4)]。このような背景の下、本研究では *Aspergillus* 属に広域スペクトルを示す抗真菌活性物質を探索した。
《方法》スクリーニングと活性評価にはペーパーディスク法を用いた。*Aspergillus* 属各種を植菌した GY 寒天培地上にサンプルを染み込ませたペーパーディスクを置き、27℃で 48 時間培養した。その後、形成された阻止径とクリア度を測定することで *Aspergillus* 属の生育阻害活性を評価した。
《結果》糸状菌培養液 2,400 サンプルをスクリーニングした結果、*Aspergillus* 属 4 種全てに対して阻止円を形成した 24 サンプルを選択した。

スクリーニングにより選択された糸状菌 *Hypomyces* 属 FKI-9008 株培養液から抗真菌活性物質の探索を行った。米を主成分とする F36 培地 1 kg で再培養し、抗 *A. fumigatus* 活性を指標に精製を行い、FKI-9008 A および FKI-9008 B 物質を取得した。ESI-MS 解析を行い、分子量を 472 および 465 と決定した。更に ^{1}H, ^{13}C NMR データを文献値と比較したところ完全に一致したため、両物質を F2928-1 および F2928-2 であると同定した[5)]（右図）。これらは現在抗 *A. fumigatus* 活性のみが報告されており、今回新たに抗 *A. lentulus* 活性、抗 *A. udagawae* 活性、抗 *A. felis* 活性が確認された。



また、新規類縁体の取得を目的に上記の 10 倍スケールでの培養および精製を行った。その結果、UV 吸収が F2928-1 および-2 と類似する FKI-9008 C 物質を取得した。ESI-MS 解析および 1D、2D NMR 解析の結果、本物質を分子量 440 の新規 F2928 類縁体であると決定した。

《参考文献》

1)E. Snelders, *et al.*, *PLOS Med.* **5** e219, 2008.
2)S. A. Balajee, *et al.*, *J. Clin. Microbiol.* **47** 3138-3141, 2009.
3)A. Alastruey-Izquierdo, *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.* **57** 3380-3387, 2013.
4)K. Datta, *et al.*, *J. Clin. Microbiol.* **51** 3090-3093, 2013.
5)Y. Kanai, *et al.*, *J. Antibiot.* **58** 507-513, 2005.

Fungal, Microbial metabolites, *Aspergillus*

発表責任者：渡邊　善洋（yosiwata@lisci.kitasato-u.ac.jp）

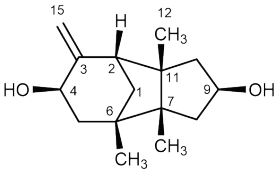
講演番号：2B01a13
講演日時：3 月 26 日 12:02～ 総合学習プラザ B01 会場

Calcarisporium arbuscular から単離した新規 Gymnomitrane

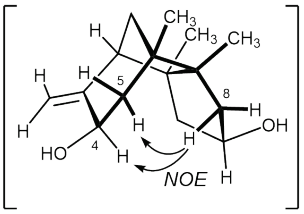
Gymnomitrane was isolated from *Calcarisporium arbuscular*

○三浦 聖美、松本 愛美、殿内 暁夫、橋本 勝 (弘前大農)
○Satomi MIURA, manami MATSUMOTO, akio TONOUCHI, masaru HASHIMOTO (Hirosaki Univ.)

当研究室では、*Calcarisporium arbuscular* の培養液から新規構造を含む複数のトリコテセン誘導体を単離、それらの構造を決定し報告してきた [1]。さらに本培養液を精査したところ、新たに新規 gymnomitrane 誘導体(**1**)を見出した。



1



1 の ESIMS スペクトル(m/z 237.1843)及び ^{13}C NMR スペクトルから分子式 $C_{15}H_{24}O_2$ を推定した。さらに二次元 NMR スペクトルの解析を行い、新規 gymnomitrane 構造を **1** と決定した。**1** は高い対称性からシグナルの重なりが多く、^{1}H スピン結合定数などから立体構造を推定することは困難であった。種々検討したところ、重ベンゼン中ではある程度のシグナルの分離が見られた。そこで Hα-8 を照射して差 NOE スペクトルを測定し、H-4 および Hα-5 にシグナル増幅を観測したことから相対立体化学を *rel*-(2*S*,4*R*,6*S*,7*R*,9*R*,11*S*)と推定した。さらに可能なすべてのジアステレオマーの ^{13}C NMR 化学シフトを密度汎関数法（ωB97X-D/6-31G*）により計算して実験値と比較したところ、**1** の構造が最も良い一致を示した (RMSD: 1.0 ppm)。また、重クロロホルム中の ^{1}H NMR データとも最も良い一致を示した。 (4*R*,7*R*,9*S*)-異性体の ^{13}C 化学シフト計算値も実験値と比較的良い一致を示したが(RMSD: 1.9 ppm)、同計算では、$^{3}J_{\text{H-9/C-7}}$ 及び、$^{3}J_{\text{H-9/C-11}}$ はともに 0.5 Hz 以下と、小さく算出された。実際の HMBC スペクトルでは強い相関を与え、これを説明できない。一方、(4*R*,7*R*,9*R*)-異性体では、$^{3}J_{\text{H-9/C-7}}$ 及び $^{3}J_{\text{H-9/C-11}}$ は共に約 6.5Hz と実測 HMBC 相関と矛盾しなかったことから、上記相対立体化学の帰属を確認した。

	No of final conformers	^{13}C NMR		^{1}H NMR	
		RMS (ppm)	Max dev. (ppm)	RMSD (ppm)	Max dev. (ppm)
(4*R*,7*R*,9*R*)-isomer	6	**1.0**	**2.9**	**0.10**	**0.20**
(4*R*,7*R*,9*S*)-isomer	8	1.9	3.8	0.18	0.45
(4*S*,7*R*,9*R*)-isomer	10	2.8	6.9	0.18	0.39
(4*S*,7*R*,9*S*)-isomer	3	3.4	7.5	0.22	0.58
(4*R*,7*S*,9*R*)-isomer	11	4.5	8.1	0.25	0.66
(4*R*,7*S*,9*S*)-isomer	7	3.4	6.3	0.28	0.68
(4*S*,7*S*,9*R*)-isomer	6	5.1	7.7	0.24	0.62
(4*S*,7*S*,9*S*)-isomer	5	4.3	7.5	0.28	0.66

1 は、210 nm 付近に負のコットン効果を与えた。これは C-3/C-15 二重結合の *n*→π*電子遷移に由来する。これを密度汎関数計算により再現することで絶対配置を決定した。

1: Matsumoto *et al*., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2019**, *29*, 982; *ibid*, *Tetrahedron Lett.* **2018**, *59*, 1992; *ibid*, *Tetrahedron,* **2017**, *73*, 5430.

gymnomitrane, isolation, DFT calculation

講演番号：2B02a01
講演日時：3 月 26 日 09:30～ 総合学習プラザ B02 会場

N-アルキルアザフラボノイドの合成及び増殖抑制活性に関する研究

Synthesis of N-Alkylazaflavonoid and study on antiproliferative activity

○武林 薫[1]、川井 悟[1]、常盤野 哲生[2]、吉澤 結子[2]([1]東電大理工、[2]秋田県大生資科)
○Kaoru Takebayashi[1], Satoru Kawai[1], Tetsuo Tokiwano[2], Yuko Yoshizawa[2] ([1]Tokyo Denki Univ, [2]Akita prefectural Univ)

【目的】生理活性物質を構成する炭素原子あるいは酸素原子を、窒素原子など異なる原子に置換することで、活性の増強や新たな活性の発現が期待されている。フラボノイドはカンキツ類など多くの植物に含まれており、抗菌活性、細胞増殖抑制活性、抗酸化作用など多様な生物活性が知られている。当研究室では、フラボノイドの C 環エーテル酸素原子を窒素原子に置換したアザフラボノイドの合成について検討を続けている。これまでに、アザフラバノン類を系統的に合成し、その前骨髄性白血病細胞 HL-60 に対する細胞増殖抑制活性を調べている。酸素原子を窒素原子に置換することより活性が増強されることを明らかにした。また、アザフラバノン B 環の 4'-位に水素原子以外の置換基を導入すると、活性が大きく低下することを報告している。

一方で、アザフラボンやアクリドンのように芳香族性 4-ピリドン骨格を有する化合物は、一般的には溶解性に乏しく、その溶解度の低さが活性発現の障害となっている可能性がある。そこで、本研究ではアザフラボノイドの溶解性向上が生物活性にどのように影響するか検討することとした。芳香族性 4-ピリドン骨格をもつ化合物はπ-π相互作用によるスタッキングが顕著なことが、低溶解性の原因と考えられたので、スタッキングを抑制するため、アザフラボンおよびアザフラバノン類の 2 級アミノ基へのアルキル基導入を試みた。

【方法】①アザフラボン類の合成　アニリン類を出発物質とし、エタノール溶媒中、酢酸存在下でベンゾイル酢酸エチル類との 24 時間加熱還流にて 3-フェニル-3-フェニルアミノプロピオン酸エチル中間体を合成し、これをフェニルエーテル溶媒中 250℃で 30 分間反応させて、目的物質とした。②アザフラバノン類の合成　2'-アミノアセトフェノンを出発物質とし、THF 溶媒中、ナトリウムアミド存在下でベンズアルデヒド類と室温で 30 分間反応させて 2'-アミノカルコン類を合成した。これをメタノール溶媒中、5%塩酸水溶液存在下で 24 時間加熱還流して、目的物質とした。③アザフラボン類およびアザフラバノン類について、THF 溶媒中 KOH 存在下で、ハロゲン化アルキルを反応させることで、*N*-アルキルアザフラボン類および *N*-アルキルアザフラバノン類の合成を試みた。

【結果】アザフラボノイド *N*-アルキル化体の前骨髄性白血病細胞 HL-60 に対する増殖抑制活性については、現在検討中である。

Azaflavonoid, n-alkylation, antiproliferative

講演番号：2B02a02
講演日時：3 月 26 日 09:41～ 総合学習プラザ B02 会場

ピラノクマリン類の合成及び増殖抑制活性に関する研究

Synthesis of Pyranocoumarins and study on the antiproliferative activity

○鈴木 杏実[1]、川井 悟[1]、常盤野 哲生[2]、吉澤 結子[2] ([1]東電大理工、[2]秋田県大生資科)
○Ami SUZUKI[1], Satoru KAWAI[1], Tetsuo TOKIWANO[2], Yuko YOSHIZAWA[2] ([1]Tokyo Denki Univ., [2]Akita Prefectual Univ.)

【目的】天然資源由来の生物活性分子には、複合分子と呼ばれる生合成系を異にする複数の構造単位から構成される化合物が知られている。その生物活性は特有の複合的構造に由来する場合も多く、活性発現のメカニズムに興味が持たれている。しかし、このような化合物は、既存の合成法の組合せではうまく合成できないことも多く、系統的合成法の開発が期待されている。

これまでに当研究室では、クマリン-*trans*-スチルベン複合分子として 3-フェニルクマリン類やスチリルクマリン類の系統的合成を行い、それらの生物活性について検討している。

本報告では、クマリン-スチルベン複合分子のさらなる展開を目指して、ピラン環を導入したクマリン-スチルベン複合分子を合成することとした。まず、ピラノクマリン-*cis*-スチルベン複合分子である 3,4-ジフェニルピラノクマリン類の合成について検討を行った。*cis*-スチルベン類は、ラン科植物等に含有される抗がん作用や抗菌作用などの生物活性を示す化合物である。

また、クマリン-*trans*-スチルベン複合分子である 3-フェニルクマリン類へのプレニル基およびピラン環の導入についても検討を行った。カンゾウに含まれる 6-プレニル-3-フェニルクマリン類の glycylcoumarin には抗酸化、抗 HIV 及び抗腫瘍活性があることが報告されている。また、カンゾウ属の植物から単離された 3-フェニルピラノクマリン類の licopyranocoumarin には、強い抗 HIV 活性があることが報告されている。

【方法】①3,4-ジフェニルクマリン類の合成　2,4-ジヒドロキシベンゾフェノンと 3-メチル-2-ブテナールを 3-メチルピリジン触媒下で Michael 付加により、ピラノヒドロキシベンゾフェノンを合成した。これを DCC,DMAP 存在下、ジクロロメタン溶媒中でフェニル酢酸類と反応させ、エステル中間体を合成した。さらに、これを DBU 触媒下で環化させ、3,4-ジフェニルピラノクマリンを合成した。
②プレニル-3-フェニルクマリンの合成　ピラノヒドロキシベンゾフェノンをプレニルブロミドと反応させて O-プレニルアセトフェノンとし、加熱下 Claisen 転位によりプレニルピラノアセトフェノン類を合成した。以後の合成は検討中である。

【結果】合成した化合物については前骨髄性白血病細胞 HL-60 に対する増殖抑制効果により生物活性を評価した。また、クマリン-カルコン複合分子の合成についても検討したので報告する。

Pyranocoumarin, structure-activity relationships, antiproliferative

講演番号：2B02a03
講演日時：3 月 26 日 09:52～ 総合学習プラザ B02 会場

キサントン類の合成及び増殖抑制活性に関する研究

Synthesis of Xanthones and study on the antiproliferative activity

○松岡 勇樹[1]、川井 悟[1]、常盤野 哲生[2]、吉澤 結子[2]([1]東電大理工、[2]秋田県大生資科)
○Yuki MATSUOKA[1], Satoru KAWAI[1], Tetsuo TOKIWANO[2], Yuko YOSHIZAWA[2] ([1]Tokyo Denki Univ., [2]Akita Prefectural Univ.)

【目的】生薬や民間伝承薬として使われている植物からは、アクリドン骨格あるいはキサントン骨格化合物が単離されている。これらは、ベンゾフェノン構造を内包する三環性化合物であり、ベンゾフェノン自体も創薬研究において重要な骨格である。当研究室では、これまでにアクリドン類やベンゾフェノン類の系統的合成を行い構造活性相関について報告している。今回、アクリドンの窒素が酸素に置換したキサントン類の合成について検討したので報告する。

キサントンはウルシ科植物やフクギ科植物などに含まれており、抗菌活性、抗 HIV 活性、細胞障害性を示すことが知られている。しかし、天然中に存在するキサントン類の構造は複雑で、含有量もわずかであることから、構造活性相関に関する研究は十分に行われているとはいいがたい。そこで本研究では、キサントン類の系統的合成を試み、それらの HL-60 増殖抑制効果を調べることで、構造活性相関に関する知見を深めることを目的とした。

【方法】一般には、キサントン類はヒドロキシ安息香酸類とヒドロキシベンゼン類を酸性条件下で反応させることで合成される。しかし、この方法では導入できる酸素官能基の位置が限定されるとともに、ピラン環導入が困難になることが予想されたため、本研究では、Ullmann 縮合によるキサントン合成を試みることとした。具体的には、ハロゲン化アリール類とフェノール類を出発物質とし、銅触媒による Ullmann 縮合によりジアリールエーテル中間体を合成し、これを PPA 中分子内 Friedel-Crafts アシル化により環化させて、キサントン誘導体を合成した。なお、Ullmann 縮合によるジアリールエーテル中間体合成の収率向上をはかるため、触媒金属の種類や配位子、溶媒等について検討を行った。

【結果】Ullmann 縮合に使用する触媒によるジアリールエーテル中間体収率への影響を検討したところ、炭酸セシウム存在下 5 mol%$[Cu(MeCN)_4]PF_4$を触媒としたとき、もっとも高い収率が得られた。合成したキサントン類および関連する化合物の生物活性については現在検討中である。

Xanthone, structure-activity relationships, antiproliferative

講演番号：2B02a04
講演日時：3 月 26 日 10:03～ 総合学習プラザ B02 会場

スチリルクロメンの合成及び増殖抑制活性に関する研究
Synthesis of Styryl chromenes and study on the antiproliferative activity
○井上 悠真[1]、川井 悟[1]、常盤野 哲生[2]、吉澤 結子[2] ([1]東電大理工、[2]秋田県大生資科)
○Yuma INOUE[1], Satoru KAWAI[1], Tetsuo TOKIWANO[2], Yuko YOSHIZAWA[2] ([1]Tokyo Denki Univ., [2]Akita Prefectural Univ.)

【目的】従来の創薬研究では、分子内に生理活性発現部位を一つ導入した天然物質をリード骨格として研究が行われてきたが、その結果新規構造の枯渇が問題となっている。そこで、すでに知られている生理活性物質を複数組み合わせることで、新たな生物活性の発現や活性増強を試みる研究に注目が集まっている。

クロメン類は創薬研究における重要な化合物であり、抗菌活性、抗腫瘍活性、細胞増殖抑制活性などの多様な生物活性が報告されている。一方、スチルベン類にはがん予防効果や抗炎症作用があることが報告されており、当研究室でもスチルベン類の系統的合成を行い、合成した化合物の前骨髄性白血病細胞 HL-60 に対する増殖抑制活性を調べ、構造活性相関に関する検討を行ってきた。

天然資源より、クロメン-スチルベン複合分子として lonchocarpene などが単離されているが、いずれも微量しか得られていないため、生物活性に関する知見は十分に得られていない。そこで、本研究ではクロメン-スチルベン複合分子の両骨格を有する複合分子の系統的合成を行い、その生物活性について検討することとした。

【方法】①ホスホニウム塩の合成　ベンズアルデヒド類をメタノール溶媒中、$NaBH_4$でヒドリド還元し、フェニルメタノール類を得た後、DCM 溶媒中、PBr_3を用いて臭素化し、ベンジルブロミド類を得た。これを、トルエン溶媒中、PPh_3と加熱攪拌を行うことで、ホスホニウム塩類を調製した。②クロメン類の合成　5-Iodovanillin を出発物質とし、DMF 溶媒中、$Pd(OAc)_2$、3-methyl-2-buten-2-ol、$NaHCO_3$存在下、Ar 雰囲気下で加熱攪拌して Mizoroki-Heck 反応によりクロメン類を合成した。③スチリルクロメン類の合成　①のホスホニウム塩類と②のクロメン類を DMF 溶媒中、t-BuOK 存在下で Wittig 反応を行い、E 体と Z 体の混合物としてスチリルクロメン類を合成した。シリカゲルクロマトグラフィーにより両者を分離し、以後の実験に供した。

【結果】天然資源由来のスチルベン類にはメトキシル基などの酸素官能基を持つものが多く報告されていることより、本研究においてもスチリルクロメンのメトキシル体を中心に合成を行った。これらの生物活性については、現在検討中である。

Styryl chromene, structure-activity relationships, antiproliferative

講演番号：2B02a05
講演日時：3 月 26 日 10:14～ 総合学習プラザ B02 会場

スギヒラタケが産生する毒性物質に関する組織学的研究
The histological studies on effect of toxic substances produced by *Pleurocybella porrigens*
○手塚 裕紀[1]、中村 瑠奈[1]、浅川 倫宏[2]、前川 文彦[3]、木村 栄輝[3]、菅 敏幸[4]、河岸 洋和[5,6]、鈴木 智大[1] ([1]宇都宮大・バイオ、[2]東海大・創造科学技術研究機構、[3]国立環境研究所・環境リスク健康研究センター、[4]静県大・薬、[5]静岡大・農、[6]静岡大・グリーン研)
○ Yuki TEZUKA[1], Luna NAKAMURA[1], Tomohiro ASAKAWA[2], Fumihiko MAEKAWA[3], Eiki KIMURA[3], Toshiyuki KAN[4], Hirokazu KAWAGISHI[5,6], Tomohiro SUZUKI[1] ([1]C-Bio, Utsunomiya Univ., [2]Tokai University Institute of Innovative Science and Technology, [3]National Institute for Environmental Studies, [4]School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, [5]Dept. of Agr., Grad. School of Integr. Sci. and Technol., Shizuoka Univ., [6]Res. Inst. of Green Sci. and Technol., Shizuoka Univ.)

【目的】
2004 年、東北・北陸地方を中心に原因不明の急性脳症が発生し、その原因としてスギヒラタケ(*Pleurocybella porrigens*)が疑われたが、その発症機構は未解明である。我々は現在までに、スギヒラタケからレクチン(PPL)の単離・精製に成功し、そのアミノ酸配列および cDNA 塩基配列情報の取得に成功しており[1)]、PPL とマウスに致死活性を示す糖タンパク質 (pleurocybellin:PC) を混合するとプロテアーゼ活性を示し、血液脳関門を破壊することを報告している[2)]。さらに、スギヒラタケエタノール可溶部よりミエリン鞘を構成するオリゴデンドロサイトに毒性を示す(pleurocybellaziridine :PA)の単離にも成功している[3)]。それら総合的な知見から、PC-PPL 複合体が血液脳関門を破壊し、その後神経細胞毒性を持った低分子化合物 (PA)がスギヒラタケ脳症に特異な脱髄病変を引き起こすという仮説急性脳症メカニズムを提唱した。そこで本研究では本急性脳症の作用機序の解明を目的とし、1)スギヒラタケ由来成分および異種発現タンパク質がマウスの脳組織に与える影響を検討すること、2)プロテアーゼ活性の詳細な生化学的検討を行うことを目的とした。
【方法・結果】
スギヒラタケ由来成分の毒性はマウス（ddY、5 週齢）に腹腔内投与することで試験した。スギヒラタケ由来成分（PC、PPL および PA）単独投与群、プロテアーゼ活性を示す 2 成分（PC および PPL）同時投与群および 3 成分同時投与群を作成し、投与 72 時間後に潅流固定した後、脳組織を採取した。得られた脳組織より切片を作成し、各種抗体で免疫染色後、3,3'-diaminobenzidine で発色させ、投与成分による影響を顕微鏡にて観察した。その結果、3 成分同時投与群のみで脳の海馬領域にアポトーシスによる細胞死が誘導されることを明らかにした。現在、脳切片の詳細な解析とプロテアーゼ活性の生化学的検討を行っている。

1) Suzuki, T., et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73, 702-709 (2009)
2) 鈴木ら、第 52 回天然有機化合物討論会講演要旨集、p. 655(2010)
3) Wakimoto, T., et al., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 50, 1168-1170 (2011)

Toxic substance(s), mushroom, *Pleurocybella porrigens*

発表責任者：鈴木智大（suzukit@cc.utsunomiya-u.ac.jp）

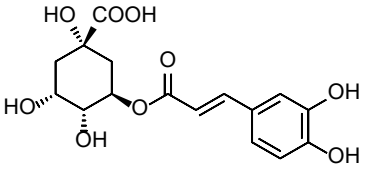
講演番号：2B02a06
講演日時：3 月 26 日 10:35～ 総合学習プラザ B02 会場

リンゴ果実における食害で誘導される二次代謝物の動態
Secondary Metabolites Induced by Feeding Damage in Apple Fruits

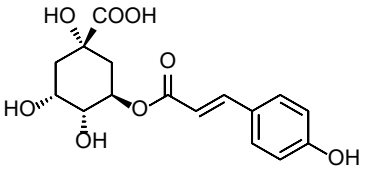
○大畑 勇統[1]、森田 沙代[1]、吉永 直子[1]、石栗 陽一[2]、森 直樹[1]([1]京大院・農、[2]青森産技セ りんご研)
○Yuto OHATA[1], Sayo MORITA[1], Naoko YOSHINAGA[1], Yoichi ISHIGURI[2], Naoki MORI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]AITC, Apple Research Institute)

【目的】

リンゴ果実は様々な昆虫の食害を受ける．中でもモモシンクイガ *Carposina sasakii* は幼虫が果実内に食入し，種子や果肉を食害するリンゴの重要害虫である．我々はモモシンクイガ幼虫の食害に応答してクロロゲン酸類（chlorogenic acid, *p*-coumaroylquinic acid）とトリテルペン類がリンゴ果実内で誘導されると明らかにした．これらは食害部近傍に局所的に誘導されるため，食害部で何らかの生理的役割を果たすと考えられる．さらに，先行研究でリンゴ果実が樹になった状態（着果）と樹から摘み取った状態（摘果）でのモモシンクイガの生存率を比較すると，着果で極めて低いことが分かった[1)]．着果で何らかの防御応答が起こっていると推測される．そこで食害部で誘導される化合物の昆虫への生理活性を調べるとともに，MALDI-TOF-MS や LCMS を用いた代謝物分析を行い，モモシンクイガ幼虫の食害による誘導の動態を明らかにする．



Chlorogenic acid



5-O-*p*-Coumaroylquinic acid

【方法・結果】

食害部で誘導される化合物を混ぜた人工飼料をモモシンクイガ幼虫に摂食させ，生育を調べた．また，化合物の果実内局在を詳細に調べるため，イオン化支援基盤『DIUTHAME®』（浜松ホトニクス）を用いて MALDI-TOF-MS による MS イメージングを行った．その結果トリテルペン類が食害部近傍約 2 mm の範囲に局所的に誘導されるとわかった．また，着果と摘果にモモシンクイガ幼虫を食入させ，化合物量の経時的変化や品種間差を測定し，モモシンクイガ幼虫の生存率との相関を調べた．その結果，着果でクロロゲン酸類が有意に多く誘導され，果実内の幼虫の生存率も低かった．さらにモモシンクイガへの抵抗性が低い品種ではクロロゲン酸類の濃度が低く，幼虫の生育とクロロゲン類量に一定の相関がみられた．

1) Ishiguri, Y., Toyoshima, S. Larval survival and development of the peach fruit moth, *Carposina sasakii* (Lepidoptra: Carposinidae), in picked and unpicked apple fruit. *Appl Entomol Zool*, **41**, 685-690 (2006).

apple fruit, insect damage, secondary metabolite

講演番号：2B02a07
講演日時：3 月 26 日 10:46～ 総合学習プラザ B02 会場

Marchantia paleacea subsp.diptera（フタバネゼニゴケ）が発する香気成分
The volatile components emitted from Marchantia paleacea subsp.diptera
○桜井 和俊[1]、富山 賢一[2]、矢口 善博[2]、浅川 義範[3]([1]静岡県立静岡がんセンター研究所、[2]高砂香料工業株式会社研究開発本部、[3]徳島文理大学生薬研究所)
○ Kazutoshi SAKURAI[1], Kenichi TOMIYAMA[2], Yoshihiro YAGUCHI[2], Yoshinori ASAKAWA[3] ([1]Shizuoka Cancer Center Research Institute, [2]Takasago International Corporation Corporate R&D, [3]Faclulty of Pharmaceutical Sciences, Tokushima Bunri University)

苔類の香りは弱くほとんど匂いはしないが、それらを手で揉む、あるいは、乳鉢で磨り潰すと種々の香りを発する。苔類から単離されたテルペン類は、多くは単一のエナンチオマーである。例えば、ゼニゴケは、マツタケ様の匂いを放ち、1-octene-3-ol や 1-octen-3-yl acetate を含んでいるものが多い。これらは、いずれも(*R*)-体が主であったと報告されている。

落合らは、フタバネゼニゴケ(*Marchantia paleacea* subsp.*diptera*、以下ＭＰＤ)を研究材料として検討していた際に、物理的な刺激を与えると「梅ガム」のような香りがする事を発見した[1)]。我々が所有していたＭＰＤ（2 種類）をＧＣ-ＭＳ分析した結果、limonene（2.5%），*β*-caryophyllene（主成分：６７%)のほか、*β*-pinene(～２%)， 1-octen-3-yl acetate(１．４%)， および*β* -selinene(～３%)等が検出された。

そこで、落合らのＭＰＤをエーテル抽出しＧＣ-ＭＳ分析を行った結果、ペリラアルデヒド（含有量約５０%）を主要香気成分として同定した。蘚苔類よりペリラアルデヒドが同定されたのは初めてである。なお、その光学異性体存在比を測定したところ、(S)-(-)-体のみが存在していた[2)]。我々のＭＰＤを中川らの方法で生育させると、ペリラアルデヒドが蓄積されていく事が判明し、さらに、新たに入手したＭＰＤを閉鎖系の状態においてＬＥＤ照射下で生育させると、水さえ存在すればペリラアルデヒドを生産していく事が明らかとなった[3,4)]。

１）落合希美ほか、日本植物学会 78 回年次大会ポスター発表（H－15）(2014)
２）Sakurai K, Tomiyama K,(2016), *Nat. Prod. Commun.* 11, 263-264.
３）Sakurai K, Tomiyama K,(2019) t*he 50th International Symposium of Essential Oils* P129.
４）浅川義範ほか、(2019) 日本ハーブ療法研究会第７回学術集会

(*S*)-(-)-perillaldehyde, *Marchantia paleacea* subsp.*diptere* , ＧＣ－ＭＳ analysis

(S)-(-)-perillaldehyde, Marchantia paleacea subsp.diptere, GC-MS analysis

発表責任者：桜井　和俊（k.sakurai@scchr.jp）

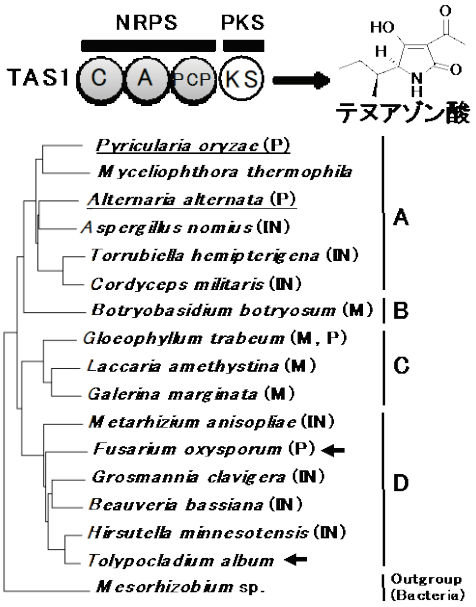
講演番号：2B03a01
講演日時：3 月 26 日 09:30～ 総合学習プラザ B03 会場

新しいタイプの二次代謝酵素 TAS1 のホモログを活用した新規生理活性天然化合物の発掘

Isolation of new bioactive natural products by using homologs of a new type secondary metabolism enzyme TAS1

○本山 高幸、野川 俊彦、清水 猛、川谷 誠、二村 友史、尹 忠鉄、長田 裕之（理研 CSRS・ケミカルバイオロジー）
○Takayuki MOTOYAMA, Toshihiko NOGAWA, Takeshi SHIMIZU, Makoto KAWATANI, Yushi FUTAMURA, Choong-Soo YUN, Hiroyuki OSADA (Chemical Biology, RIKEN CSRS)

【目的】我々はイネいもち病菌 *Pyricularia oryzae* の二次代謝を活性化し、テヌアゾン酸の生産を誘導し、生合成酵素 TAS1 を見出した（*Nature Commun.* **6**: 8758, 2015）。TAS1 は糸状菌から初めて報告された NRPS-PKS 融合酵素で、C-A-PCP-KS の特徴的なドメイン構造を持ち、KS ドメインがユニークな環化反応を行なう（図）。興味深いことに、TAS1 ホモログを持つのは全て糸状菌であり、大部分が植物糸状菌や昆虫病原菌やキノコなどの共生菌であり、生産する化合物が生物間相互作用に関与することが期待された。TAS1 ホモログはグループ A から D の 4 グループに分類され、グループ A はテヌアゾン酸生合成に関与することが示唆されていた（図）。今回、グループ D が生合成する化合物の構造を明らかにし、生物活性の解析を行った。



TAS1ホモログの系統樹

ホモログ遺伝子を持つ菌の名前を示した
P：植物病原糸状菌
IN：昆虫あるいは線虫の病原糸状菌
M：キノコ（担子菌）
下線：既知のテヌアゾン酸生産菌

【方法と結果】グループ D の TAS1 ホモログを持つテルペンドール生産菌 *Tolypocladium album* 及び植物病原菌 *Fusarium oxysporum* を用いた。TAS1 ホモログ遺伝子の破壊株及び大量発現株を作製したところ、大量発現株でのみ生産される化合物が認められた。化合物を精製し、構造決定したところ、*T. album* が新規化合物 **1**、*F. oxysporum* が新規化合物 **1** と **2** を生産していることが明らかになった。**1** と **2** の構造から、βラクトン構造の前駆体の存在が予想されたため、*T. album* の TAS1 ホモログ大量発現株を短時間培養したところ、新規化合物 **3** を生産していることが明らかになった。更に、**2** の前駆体と予想される **4** を有機合成した。**1-4** の生物活性を解析したところ、**3** に動物細胞とマラリア原虫に対する生育阻害活性が認められた。**1-4** の構造は放線菌が生産するプロテアソーム阻害剤ラクタシスチンと類似の構造であったため、プロテアソーム阻害活性を測定したところ、**3** に強力な活性、**4** に中程度の活性が認められた。以上の結果から、グループ D の TAS1 ホモログはプロテアソーム阻害活性を示す新規化合物の生産に関与し、生物間相互作用に何らかの関与をしていることが示唆された。

本研究は農研機構生研支援センター「イノベーション創出強化研究推進事業」の支援を受けて行った。

secondary metabolism, tenuazonic acid, genome mining

発表責任者：本山高幸（tmotoyam@riken.jp）

講演番号：2B03a02
講演日時：3 月 26 日 09:41～ 総合学習プラザ B03 会場

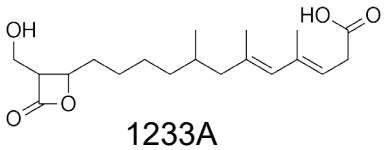
ハイグロマイシン B により生産誘導される二次代謝産物の生合成遺伝子クラスター同定及び生理活性の解析

Secondary metabolites induced by hygromycin B: Identification of biosynthetic gene clusters and analysis of physiological activity

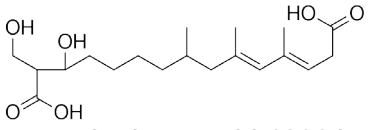
○加藤 翔[1,2]、本山 高幸[2]、二村 友史[2]、浦本 昌和[2]、長田 裕之[1,2]([1]埼玉大理工、[2]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー)
○Sho KATO[1,2], Takayuki Motoyama[2], Yushi Futamura[2], Masakazu Uramoto[2], Hiroyuki Osada[1,2]
([1]Saitama Univ., [2]Chemical Biology, RIKEN CSRS)

【背景と目的】
微生物はゲノム中に多くの二次代謝関連遺伝子を有していることが明らかとなってきたが、実験室環境下では利用できる遺伝子は少なく、新たな手法による未利用の遺伝子の活性化やそのメカニズムの解析が今なお望まれている。我々は真菌 *Fusarium* sp. RK97-94 株においてハイグロマイシン B 添加による lucilactaene の増産と、赤色色素 fusarubin および HMG-CoA 合成酵素阻害剤 1233A の生産誘導を見出している。今回、1233A の生合成遺伝子クラスターを明らかにするとともに、生産誘導された二次代謝産物の生物活性の解析を報告する。

【結果】
1233A の生合成遺伝子クラスターは未知であったため、RNA-seq データをもとに探索した。まず、ハイグロマイシン B 処理時に大幅に発現が上昇した PKS(ポリケチド合成酵素)遺伝子(*g433*)に着目し、周辺の遺伝子がコードするタンパク質を Pfam や相同性検索により機能推定した。その結果、g430 は P450、g431 は HMG-CoA 合成酵素、g432 は myb 型転写因子であることが示唆された。それぞれの生合成遺伝子はハイグロマイシン B 添加時に同調して遺伝子の発現量が上昇していることが明らかとなった。次に、各生合成遺伝子破壊株を作成し、代謝物を UPLC/MS を用いて解析した結果、*g431* 以外の遺伝子を破壊することで 1233A とβラクトンが開環した類縁体 hydroxy-acid 1233A の生産が確認されなくなった。このことから *g433* の近傍の遺伝子群が 1233A の生合成遺伝子クラスターであることが明らかとなり、生合成に必須な遺伝子は 3 つであることが明らかとなった。g431 は 1233A のターゲットの酵素であるが、高い相同性を示す同じ機能を持った遺伝がゲノム中に存在していることが明らかとなった。Δ*g431* 株と野生型株に 1233A を処理した結果、Δ*g431* 株は 1233A に対する抵抗性が低下した。これより g431 は 1233A に対して抵抗性を有している可能性が示唆された。
次に、生産誘導された二次代謝産物の生物活性を調べた。ルシラクタエンはがん細胞とマラリアに対して増殖阻害活性を示した。Fusarubin はがん細胞とグラム陽性細菌とマラリアに対して増殖阻害活性を示した。1233A はがん細胞とグラム陽性細菌と真菌に対して増殖阻害活性を示した。



1233A



hydroxy-acid 1233A

chemical biology, secondary metabolism, biosynthesis

講演番号：2B03a03
講演日時：3 月 26 日 09:52～ 総合学習プラザ B03 会場

アミロイドβの凝集阻害機構に基づいた天然物ライブラリーの分類

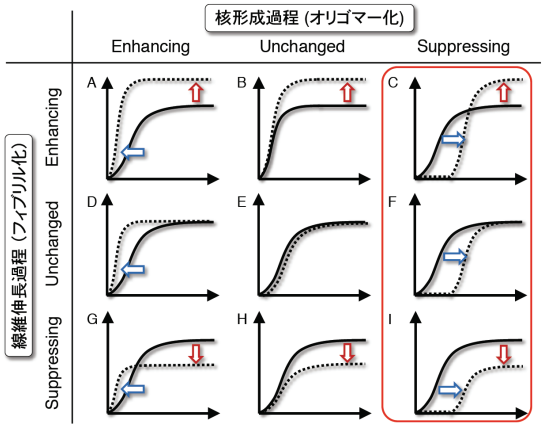
Classification of natural products library based on their inhibitory modes of amyloid β aggregation

○村上 一馬[1]、堀井 詩織[1]、定光 達斗[1]、花木 瑞穂[1]、郡司 祐樹[2]、入江 一浩[1] ([1]京大農、[2]アルプス薬品工業)
○Kazuma MURAKAMI[1], Shiori HORII[1], Tatsuto SADAMITSU[1], Mizuho HANAKI[1], Hiroki GUNJI[2], Kazuhiro IRIE[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Alps-Pharma. Co.)

【背景・目的】 アルツハイマー病 (AD) の原因物質の一つであるアミロイド β (Aβ42) は，凝集（オリゴマー化）することで神経細胞毒性を示す．これまでに，Aβ42 の凝集抑制に必要な 3 つの構造要因として，①カテコール構造，②平面構造，③カルボキシ基を明らかにしている.[1)] Aβ42 の凝集過程は詳細に分類すると，凝集核が一定の時間をかけて生成する「核形成過程」と，凝集核が連鎖的に伸長する「線維（フィブリル）伸長過程」からなる．前者はオリゴマー形成と関わりが深いことから，本過程の抑制物質は AD 創薬シーズになる可能性がある．本研究では，生薬ライブラリー（アルプス薬品工業より供与）と天然物バンク（理研・長田裕之博士より供与）などから，あわせて約 900 種の化合物をスクリーニングし，構造因子と標的となる凝集過程に基づいて分類した．

【方法】 Aβ42 の凝集能の評価は，チオフラビン T (Th-T) 蛍光法（随時法：37ºC および連続法：25ºC）を用いた．神経細胞毒性は，ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y を用いた MTT 試験で評価した．

【結果・考察】 核形成と線維伸長過程にそれぞれ対応する 4 時間と 24 時間後において，生薬ライブラリー380 種（70% EtOH 抽出物 30 μg/mL）の Aβ42 (25 μM) に対する凝集抑制活性を調べたところ，核形成を 80%以上抑制したものが 22 種，線維伸長を 80%以上抑制したものが 15 種それぞれ見いだされた．前者の抽出物の成分にはソボク中のブラジリン（カテコール構造），ヤコウトウ中のレイン（平面構造とカルボキシ基）などが知られている．続いて，天然物バンクの化合物 518 種の Aβ42 凝集抑制能を Th-T 共存下での連続測定により評価した．その結果に基づき，核形成抑制活性をもつ化合物を 3 つのグループに分けた（グループ C 1 種：オリゴマー化抑制&線維化促進，グループ F 3 種：順に抑制&変化なし，グループ I 17 種：順に抑制&抑制）．オリゴマー化阻害にカルボキシ基の関与が示唆され，トリテルペンやアントラキノン骨格の母核構造によって，標的とする凝集過程が異なっていた．グループ C に属するアシアチン酸は Aβ42 の細胞毒性を濃度依存的に抑えたが，グループ F と I に属する 3 種とアリストロキア酸 I の毒性抑制能は低かった．Aβ42 の核形成を抑えるだけでなく，毒性への寄与が低いフィブリル化を促す新しい治療戦略が示唆される．以上より，このような Th-T 試験に基づく化合物分類は，Aβ42 の毒性オリゴマー化を阻害する化合物を予測する上で有用である．



【文献】 1) Murakami, K. and Irie, K. *Molecules* **2019**, *24*, 2125.

amyloid β, aggregation, natural product

発表責任者：入江一浩（irie@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2B03a04
講演日時：3 月 26 日 10:03～ 総合学習プラザ B03 会場

放線菌由来抗生物質により生産誘導されるイネいもち病菌二次代謝産物の生理機能解析

Functional analysis of secondary metabolites of the rice blast fungus induced by actinomycetal antibiotics

○古山 祐貴[1,2]、本山 高幸[1]、野川 俊彦[1]、鎌倉 高志[2]、長田 裕之[1]([1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー、[2]東理大院理工・応生)

○Yuki FURUYAMA[1,2], Takayuki MOTOYAMA[1], Toshihiko NOGAWA[1], Takashi KAMAKURA[2], Hiroyuki OSADA[1] ([1]Chem. Biol., RIKEN CSRS, [2]Tokyo Univ. of Science, Applied Bioscience)

【背景・目的】

当研究室では糸状菌二次代謝を活性化する化合物の探索が行われてきた。その過程においてタンパク質合成阻害剤である hygromycin B を致死濃度以下で処理することによりイネいもち病菌における pyriculol 類縁体 (Fig. 1) の生産が誘導されることが見いだされた。Pyriculol 類縁体の生理機能は未だ不明である。生理機能解析の端緒となることを期待し、我々はこれまでに pyriculol 類縁体の生合成機構の解析を行ってきた。一方で、hygromycin B は放線菌由来であることから、イネいもち病菌-放線菌間の相互作用に関与していることが期待された。今回は放線菌との相互作用に pyriculol 類縁体が関与しているか検証を行った結果を報告する。

【方法・結果】

Hygromycin B と同様に放線菌由来のタンパク質合成阻害剤である cycloheximide によっても pyriculol 類縁体生産が誘導された。このことから、イネいもち病菌がタンパク合成阻害剤を介して放線菌の存在を認識し、防御応答として pyriculol 類縁体を生産していることが推定された (Fig. 2)。このことを検証するために pyriculol 類生合成に必須な PKS 遺伝子を破壊したいもち病菌株 (Δ*pyr1* 株) を用いて、PDA 培地にて hygromycin B 生産菌 *Streptomyces hygroscopicus* および cycloheximide 生産菌 *S. griseus* との対置培養を行った。どちらの放線菌株の場合でも対野生型株では生育阻害が見られたが、対Δ*pyr1* 株では生育阻害作用の緩和が認められた。また、UPLC/MS によって対置培養時に野生型株が pyriculol 類を生産していることを確認した。次に、イネいもち病菌培養抽出液を分画し、**1**、**2** それぞれの化合物を含む画分を用いてペーパーディスクアッセイを行った。その結果、活性本体はアルコール体である **2** であることが示唆された。

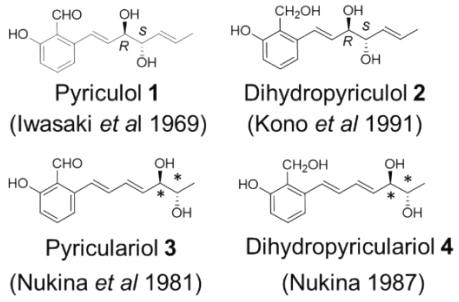


Fig. 1 Pyriculol 類縁体

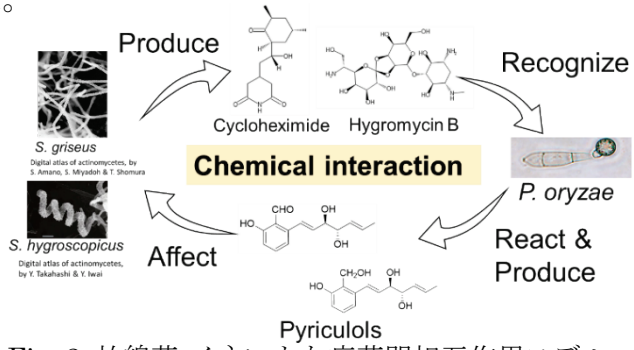


Fig. 2 放線菌-イネいもち病菌間相互作用モデル

Pyricularia oryzae, Secondary metabolism, chmical interaction

講演番号：2B03a05
講演日時：3 月 26 日 10:14～ 総合学習プラザ B03 会場

ゼニゴケ（*Marchantia polymorpha*）の精子誘引物質の同定

Identification of a sperm chemoattractant in the liverwort *Marchantia polymorpha* L.

○山崎 由美子[1]、松川 哲也[1]、竹村 美保[2]、荒木 崇[3]、大和 勝幸[1]、梶山 慎一郎[1]([1]近畿大院・生物理工、[2]石川県大生資研、[3]京都大院・生命科学)
○ Yumiko YAMASAKI[1], Tetsuya MATSUKAWA[1], Miho TAKEMURA[2], Takashi ARAKI[3], Katsuyuki YAMATO[1], Shin'ichiro KAJIYAMA[1] ([1]Grad. Sch. BOST, Kindai Univ., [2]Ishikawa Pref. Univ., [3]GSB. Kyoto Univ.)

【背景と目的】

受精における卵との融合に先立ち、精子は卵に誘引される。この現象を精子走化性と呼び、精子は卵もしくは卵付近から分泌されている精子誘引物質の濃度勾配を検知し、誘引されていると考えられている。これまで主にウニやヒトデなどの海産動物を用いて、この現象の解明が試みられてきた。しかしながら、精子走化性の分子生物学的なメカニズムについては未解明の部分が多く、生物種間にみられる多様性に関する知見も限定的である。そこで、我々は分子遺伝学的リソースが充実しているゼニゴケに注目した。ゼニゴケは、ヒトと同様に精子と卵による受精を行い、それらの採取も容易である。また、全ゲノムが解読されていること、ゲノム編集を含む形質転換法が確立されていること、生活環のほとんどを半数体で過ごすために表現型の観察が容易であること、栽培が容易であることなどからゼニゴケは精子走化性の分子機構および多様性を明らかにするモデル生物として期待できる。我々は、これまでにゼニゴケの精子誘引に雌の生殖器で生産されるアピゲニンが関与する可能性を指摘してきた。今回これを検証する目的で、アピゲニンの生合成に関与する Flavone synthase II(FSII)の KO 株の作出及び、アピゲニン類縁体の精子誘引活性について検討したので報告する。

【方法と結果】

アピゲニンはフラボノイド生合成経路の上流に位置し、ナリンゲニンＣ環 2,3 位が FSI または FSII により酸化されて二重結合となりアピゲニンが生成される。FSI はセリ科のみ存在が確認されており、ゼニゴケにおける FS は FSII として考え、既知の *Gerbera hybrids* の FSII とのシミラリティ検索結果より得られた雌生殖器において特異的に発現している FSII 遺伝子をターゲットとした。KO 株の作出には CRISP/Cas9 法及びアグロバクテリウム法を用いた。得られた KO 株の雌生殖器について抽出液のアピゲニン含量及び野生型精子との稔性の有無を調べた。

またアピゲニン及びアピゲニン類縁体であるルテオリン、アカセチン、ケンフェロール等を試料とし、それぞれについて精子誘引活性の有無を観察した。試験は、針状ガラス棒に試料を付着させ、新鮮なゼニゴケの精子懸濁液へと挿入後、直ちに顕微鏡を用いてガラス棒の先端を観察した。以上の結果について報告する。

Marchantia polymorpha, sperm chemotaxis, Apigenin

発表責任者：山崎由美子（yumchinpaw@gmail.com）

講演番号：2B03a06
講演日時：3 月 26 日 10:35～ 総合学習プラザ B03 会場

希少アルドヘキソースおよびヘキソサミンの DU-145 ヒト前立腺がん細胞株に対する増殖抑制活性

Evaluation of anti-proliferative activity of rare aldohexoses and hexosamines against DU-145 human prostate cancer cell line

○北口 菜摘[1]、柳田 亮[2]、石山 大展[3]、佐藤 正資[2]、川浪 康弘[2] ([1]香川大院農、[2]香川大農、[3]愛媛大院連合農)

○Natsumi KITAGUCHI[1], Ryo YANAGITA[2], Hironobu ISHIYAMA[3], Masashi SATO[2], Yasuhiro KAWANAMI[2] ([1]Kagawa Univ., [2]Kagawa Univ., [3]Ehime Univ.)

【目的】

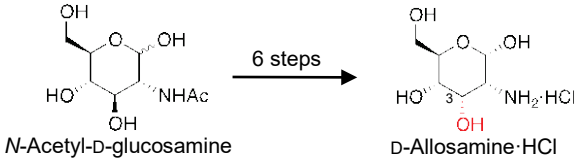
自然界に存在量が少ない単糖とその誘導体と定義される希少糖は，様々な生理活性を示すことが明らかにされている．例として，D-glucose の C-3 エピマーである D-allose は，数種類のヒトがん細胞株に対して増殖抑制活性を示す．D-Allose は正常細胞に対して毒性を示さないことから，新規抗がん剤のシードとして注目されている．この様に，希少糖は有用な生理活性物質の源として有望であると考えられるが，D-allose と D-pcicose の 2 種類以外の他の希少糖および希少糖誘導体の生理活性については，ほとんど研究が進んでいない．そこで本研究では，希少アルドヘキソースおよびその誘導体のがん細胞増殖抑制活性を評価することを目的とした．

【方法・結果】

本研究ではアルドヘキソースおよびその誘導体の DU-145 ヒト前立腺がん細胞株に対する増殖抑制活性を評価した．DU-145 細胞を播種した 96 well プレートに，終濃度が 5, 20 mM になるように調製したサンプルを添加後，37 ℃, 5% CO_2 条件下で 48 時間インキュベーションし，生細胞数を定量した．希少アルドヘキソースは 5 mM の濃度では有意な増殖抑制活性を示さなかった．一方，20 mM の濃度では，D-altrose, D-talose, および L-mannose が D-allose よりも高い増殖抑制活性 (それぞれ増殖率 45%, 44%, および 40%) を示した．

次に，希少糖誘導体としてヘキソサミンに着目し，まず，市販の D-glucosamine, D-galactosamine, および D-mannosamine の塩酸塩ならびに *N*-アセチル化体のがん細胞増殖抑制活性を同様に評価した．これらのヘキソサミン塩酸塩は濃度依存的な増殖抑制活性を示し，D-glucosamine ·HCl の GI_{50} 値は 2.3 mM であった．一方で，これらのヘキソサミンの *N*-アセチル化体は 3 mM の濃度ではほとんど増殖を抑制しなかった．次に，希少ヘキソサミンである D-allosamine を *N*-acetyl-D-glucosamine を出発原料として 6 段階で合成し，DU-145 細胞に対する増殖抑制活性を評価した. D-Allosamine·HCl は 3 mM の濃度において有意な増殖抑制活性を示した．現在，その他の誘導体の活性評価について検討中である．

GI_{50} 値: 50%細胞増殖阻害濃度



N-Acetyl-D-glucosamine　　D-Allosamine·HCl

rare sugar, hexosamine, anti-proliferative activity

発表責任者：柳田 亮（charlesy@ag.kagawa-u.ac.jp）

講演番号：2B03a07
講演日時：3 月 26 日 10:46～ 総合学習プラザ B03 会場

ヒトリシズカ抽出物および単離化合物ヒトリン A-B がヒト脂肪由来間葉系幹細胞に及ぼす影響

The effects of crude extract and hitorins A-B from *Chloranthus japonicus* on human adipose-derived mesenchymal stem cells

○國廣 建斗[1]、佐野 桂[1]、萩谷 薫[1]、金 尚永[2]、高上馬 希重[2]([1]株式会社アルビオン、[2]北海道医療大学)
○ Kento KUNIHIRO[1], Katsura SANO[1], Kaoru HAGIYA[1], Sang-Yong KIM[2], Mareshige KOJYOMA[2] ([1]ALBION Co., Ltd., [2]Health Sciences University of Hokkaido)

【背景および目的】

ヒトリシズカ (*Chloranthus japonicus*) はセンリョウ科チャラン属の多年草で、中国、韓国、日本などのアジア諸国に広く分布している。日本では北海道のアイヌ民族により茶として利用され、人々の生活と密接に関わってきた。先行研究では、*C. japonicus* の 80% EtOH 抽出物 (crude extract) から新規化合物 hitorin A および B が単離同定された。また、crude extract、hitorin A および B がヒト皮膚細胞に対して様々な生理活性作用を有することを明らかとした。皮下脂肪組織中に存在する間葉系幹細胞 (hMSC) は、自身が分泌する成長因子により、コラーゲン産生促進、線維芽細胞増殖作用等を示すことが報告されていることから、近年皮膚研究領域において注目されている。そのため本研究では、crude extract、hitorin A および B が hMSC の機能に及ぼす影響について明らかとすることを目的とした。

【実験方法および結果】

Hitorin A および B は、crude extract を EtOAc/H2O で液液分配した後、各種クロマトグラフィーに供し単離した。これら hitorin A、B および crude extract が hMSC に及ぼす影響について検証した。各試料を hMSC に添加後 24h で、calsein-AM により染色し、細胞数を測定したところ、コントロールの約 1.5 倍であった。これは、タイムラプスで細胞増殖作用を解析した結果と同様の傾向であり、いずれも hMSC に対して増殖促進作用があることが示された。次に、幹細胞性維持に及ぼす影響について、Sox2、Oct4、NANOG の遺伝子発現を qRT-PCR により検討した。どの成分もこれら幹細胞性マーカーの遺伝子発現を亢進したことから、hMSC の幹細胞性維持に影響を及ぼす可能性が示唆された。hMSC の遊走性は、スクラッチアッセイとケモカイン受容体である CXCR4 および CXCR7 の遺伝子発現により評価した。スクラッチアッセイでは、コントロールと比較して遊走性の促進が認められ、さらに CXCR4 および CXCR7 の遺伝子発現を亢進していたことから、これらの成分はケモカイン受容体の遺伝子発現の亢進を介し、hMSC の遊走性を促進することが示唆された。また、H_2O_2 により老化を誘導した hMSC に対して、いずれの成分も β-galactosidase 活性を抑制し、老化関連マーカーである p16、21、53、GLB1 の遺伝子発現を下方制御したため、細胞老化抑制作用もあることが分かった。以上より、ヒトリシズカから得られた crude extract は、hMSC の幹細胞としての機能を活性化させることが明らかとなり、hitorin A および B がこれらの作用に寄与している可能性が示唆された。

adipose-derived mesenchymal stem cells, *Chloranthus japonicus*, hitorin

発表責任者：國廣建斗（k_kunihiro@albion.co.jp）

講演番号：2B03a08
講演日時：3 月 26 日 10:57～ 総合学習プラザ B03 会場

キューバ産植物由来の抗炎症物質の探索研究

Study on anti-inflammatory compounds from Cuban plants

○蛭川 美奈子[1]、Echenique-Diaz Lazaro[2]、溝田 浩二[2]、大舘 智志[3]、Begue-Quiala Gerardo[4]、Delgado Labanino Jorge[4]、Gamez Diez Jorgelino[4]、柴田 貴広[1]、北 将樹[1]([1]名大院生命農、[2]宮城教育大教員キャリア研究機構、[3]北大低温研、[4]キューバ共和国アレハンドロ・デ・フンボルト国立公園)

○Minako HIRUKAWA[1], Lazaro Echenique-Diaz[2], Koji MIZOTA[2], Satoshi OHDACHI[3], Gerardo Begue-Quiala[4], Jorge Delgado Labanino[4], Jorgelino Gamez Diez[4], Takahiro SHIBATA[1], Masaki KITA[1] ([1]Nagoya University School of Agricultural Sciences Graduate School of Bioagricultural Sciences, [2]Research Institute for Teacher Training and Development, Miyagi University of Education, [3]Institute of Low Temperature Science Hokkaido University, [4]Parque Nacional Alejandro de Humboldt)

【目的】

熱帯地域に位置するカリブ海の島嶼国は，固有種が多く生息し，生物多様性に富む地域である．その中でもキューバ島は最大の面積を有するが，野生生物の生態学的な調査は十分には行われていない．発表者らは，これら島嶼国における固有・希少な野生生物に関する生態化学的調査を 2012 年より継続して実施し，生物活性物質の同定と進化系統解析を行ってきた．今回，現地で薬用植物として使われている固有種に注目して，有用物質の探索を行なった．

【方法・結果】

キューバ共和国グアンタナモ州に位置するアレハンドロ・デ・フンボルト国立公園およびユムリ渓谷にて採取した植物 27 種について，抗炎症活性および腫瘍細胞に対する細胞増殖阻害活性を評価した．その結果，キク科，ノウゼンカズラ科，ジャケツイバラ科の植物（計 4 種）に，リポ多糖(LPS)で刺激したマウスマクロファージ由来 RAW264.7 細胞において，炎症メディエーターである一酸化窒素の生産を抑制する作用が見られた．この活性を指標に，含水エタノールで抽出した植物エキスを液―液分配と各種カラムクロマトグラフィーで分離・精製し，活性物質として環状ジエノン構造を有する化合物２種(1，2)を単離した．1,2 はともに既知化合物であったが，これらが抗炎症活性を示すことは今回初めて明らかとなった．化合物 1 は，LPS で刺激したマクロファージとマウスの両方で炎症性サイトカインの一種である TNF-α の産生を顕著に阻害し，一方で毒性はほとんど示さなかった．1 およびその誘導体を合成して構造活性相関を調べた結果，Michael アクセプターとしての高い求電子性が 1 の活性発現に重要であることが分かった．これまでの進捗について発表する．

Natural products, Structure-activity relationships, Anti-inflammatory activity

発表責任者：北将樹（mkita@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：2B03a09
講演日時：3 月 26 日 11:08～ 総合学習プラザ B03 会場

Bacillus cereus 培養液における食中毒素セレウリドの産生と分解
Production and degradation of emetic toxin cereulide in *Bacillus cereus* culture broth.

○奈賀 俊人[1,2]、高木 結花[2]、服部 能英[3]、竹中 宏誌[3]、大田 洋一郎[3]、切畑 光統[3]、谷森 紳治[1]([1]大阪府大院生命環境、[2]東食短大、[3]大阪府大 BNCT 研究センター)
○Toshihito NAKA[1,2], Yuka TAKAKI[2], Yoshihide HATTORI[3], Hiroshi TAKENAKA[3], Yoichiro Ohta[3], Mitsunori KIRIHATA[3], Shinji TANIMORI[1] ([1]Grad. Sch. Osaka Pref. Univ., [2]Toyo College of Food Tech., [3]Research Center of BNCT, Osaka Pref. Univ.)

【背景および目的】*Bacillus cereus* が産生する嘔吐型毒素であるセレウリド（Cereulide, **1**）は、α-ヒドロキシ酸とα-アミノ酸が交互に結合した 36 員環状のシクロドデカデプシペプチド *cyclo*(L-*O*-Val-L-Val-D-*O*-Leu-D-Ala)$_3$ である(Fig. 1)。セレウリドの生合成機構や嘔吐毒性については、食品衛生や食中毒防止の視点から多くの研究が報告されているが、経時的な動態変化、特に分解消長に関する報告は見られない。本研究は、*B. cereus* の培養時間経過に伴うセレウリドの産生と分解消長の過程と機構を明らかし、食中毒のリスク管理に資するセレウリド毒素の変動プロファイルの作成を目的とする。

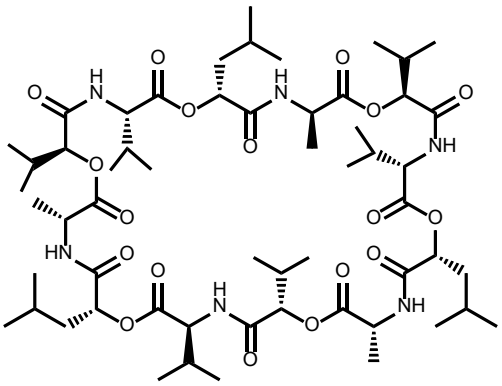


Fig. 1 Cereulide（**1**）

【方法および結果】一定時間培養した培養液を LC-TOFMS により分析し、セレウリドの加水分解産物と考えられるドデカデプシペプチドおよびテトラデプシペプチドを確認した。推定される 2 種のドデカデプシペプチド（**2**、**3**）および 2 種のテトラデプシペプチド（**4**、**5**）を、市販の L-および D-アミノ酸を出発原料に用いて液相合成した。合成 **2**～**5** を標品に用いた LC-MS 分析から、培養液中に **2** は確認されず、**3** および **4** が同定された。また、痕跡程度の **5** を認めた。培養液を用いた合成セレウリドの添加回収試験では、無処理培養液ではセレウリド回収率は 2%未満、煮沸した培養液では回収率が 92%であったことから、培養液中の分解酵素の存在が強く示唆された。また、2 種類のエステル結合の中で、立体障害の大きな部分構造 D-*O*-Leu-L-Val を有するデプシペプチドが培養液中に残存したと考えられる。

ドデカデプシペプチド
① (L-*O*-Val-L-Val-D-*O*-Leu-D-Ala)$_3$（**2**）
② (D-*O*-Leu-D-Ala-L-*O*-Val-L-Val)$_3$（**3**）
テトラデプシペプチド
③ L-*O*-Val-L-Val-D-*O*-Leu-D-Ala（**4**）
④ D-*O*-Leu-D-Ala-L-*O*-Val-L-Val（**5**）

B. cereus を TSB 培地を用いて 35℃で培養したところ、対数増殖期を過ぎた定常期にセレウリドが増加し、39 時間以降の死滅期にかけて減少した。**3** はセレウリドと同様な傾向を示し、**4** はセレウリドが減少を始めた後も増加、52 時間以降に減少した。本研究による知見は、食中毒の発症メカニズム解明に資するだけでなく、食品加工の現場におけるリスク管理や対策に貢献できると考えられる。

cereulide, Bacillus cereus, chemical biology

発表責任者：奈賀俊人（toshihito_naka@toshoku.ac.jp）

講演番号：2B03a10
講演日時：3 月 26 日 11:19～ 総合学習プラザ B03 会場

脂肪分解を促進するクアシノイドの作用機序解析

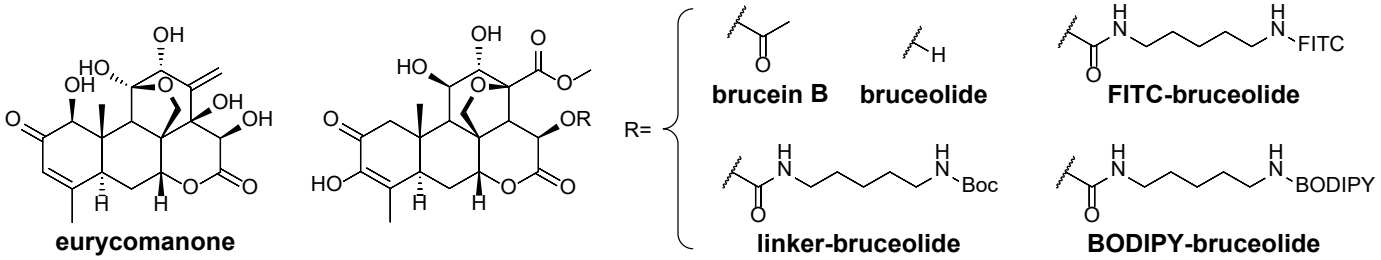
Mechanistic study of quassinoids as lipolysis activators

○岩田 稜平、加藤 英介（北大院農）
○Ryohei IWATA, Eisuke KATO (Hokkaido Univ.)

【背景・目的】　肥満は 2 型糖尿病や心血管疾患等のリスクファクターとして知られ、その治療法の開発、改良は極めて重要な課題である。体内で脂肪細胞内に貯蔵されているトリグリセリドは、細胞内リパーゼによって脂肪酸とグリセロールに分解されたのちに代謝される。したがって、この脂肪分解を促進することは肥満改善につながると考えられる。当研究室では eurycomanone や brucein B 等のクアシノイドを 3T3-L1 脂肪細胞における脂肪分解促進活性物質として見出したが（Lahrita et al., 2017; Lahrita et al., 2019)、その作用機序は不明である。そこで、クアシノイドの標的分子解析のための分子プローブ合成に加え、生物学的手法による作用機序解析を行った。

【結果】　構造活性相関研究より bruceolide の 15-OH は活性を保持しながら改変可能な箇所と判断した。そこで、標的分子の局在部位を推定するため、15-OH にリンカーを介して蛍光基を導入した蛍光プローブの合成を行った。しかし、リンカーのみを導入した linker-bruceolide は活性を示したものの、FITC を導入した FITC-bruceolide は活性を示さなかった。この要因として FITC による極性の変化や立体障害が考えられたため、FITC より極性が低くサイズの小さい BODIPY を導入した BODIPY-bruceolide の合成と活性を現在検討している。

一方、生物学的手法からクアシノイドは PKA を介して脂肪分解促進活性を示していることが確認された。しかし PKA を活性化させる cAMP の濃度には、クアシノイド添加により変化が見られなかった。この結果は、cAMP 非依存的な PKA の活性化を示唆している。そこでその機構を検討するため、PKA サブユニットの遺伝子発現を評価した。クアシノイド処理による遺伝子発現変化は見られたものの、活性化を示唆する変化に加えて抑制を示唆する変化も見られたため、PKA 活性化の直接の要因ではないと推測された。現在は他の関連経路がクアシノイドによる PKA の活性化に関わっているか検討している。



lipolysis, molecular probe, Protein kinase A

発表責任者：加藤英介（eikato@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：2B03p01
講演日時：3 月 26 日 13:50～ 総合学習プラザ B03 会場

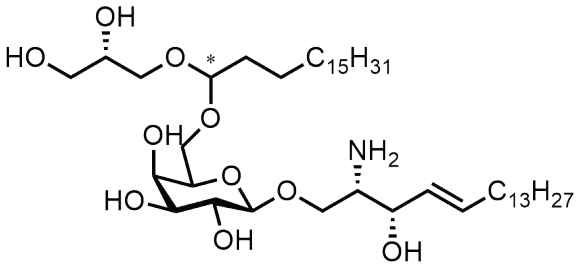
生理活性脂質を目指した Mixed Acetal の合成研究

Synthetic study of mixed acetal for the production of bioactive lipids

○田中 遼太郎[1]、石橋 洋平[2]、伊東 信[2]、安部 真人[1] ([1]愛媛大農、[2]九大院農)
○Ryoutarou TANAKA[1], Yohei ISHIBASHI[2], Makoto ITO[2], Masato ABE[1] ([1]Ehime Univ., [2]Kyusyu Univ.)

【背景と目的】

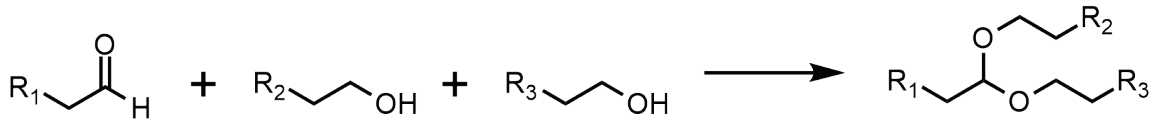
グリセロプラスマロサイコシン（Glyceroplasmalopsychosine）はガラクトシルスフィンゴシンを部分構造に持ち、mixed acetal としてグリセロールと飽和アルキル側鎖を有する新奇スフィンゴ脂質である。グリセロプラスマロサイコシンは 2001 年にウシの脳の白質から単離され、弱い PKC 阻害活性が認められたものの、細胞毒性は確認されなかった（Hikita, T. et al. 2001, *J. Biol. Chem.* 23084-23091.）。2008 年には、mixed acetal 部の立体化学の構築を目指した合成研究が報告されたものの（Ajit, P. 2008, Tetrahedron. 9821-9827.）、全合成には至らなかった。そこで本研究では、全合成のネックとなった mixed acetal の合成方法について検討した。



グリセロプラスマシコシンの化学構造

【合成方法】

先行例では mixed acetal 部の立体化学を構築するために対応する二糖の酸化開裂反応が用いられた。しかし、手順が長く、総収率において課題が残った。また、天然のグリセロプラスマサイコシンはラセミの産物であることを考慮し、下記に示すような単純なアセタール合成によってラセミ合成することができないか検討した。



本研究で検討したアセタール化反応

【結果】

主に酸触媒でのアセタール化反応を検討し、硫酸触媒下で mixed acetal を 40%の収率で得られる条件を確立した。一方で、ヘミアセタールを経由した段階的な手法も検討したが、ヘミアセタールとして単離することはできなかった。今後はさらに基質一般性の拡張やアセタール交換反応を用いた合成について検討する予定である。

Mixed Acetal, Oragnic synthesis, Lipids

発表責任者：安部真人（abe.masato.si@ehime-u.ac.jp）

講演番号：2B03p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ 総合学習プラザ B03 会場

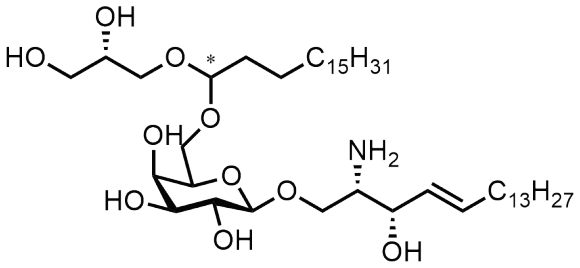
多価不飽和脂肪酸を有するホスファチジルセリンの合成研究

Synthetic study of phosphatidyl serin bearing poly unsaturated fatty acid

多田 大輝[1]、三澤 嘉久[2]、馬場 直道[2]、○安部 真人[1] ([1]愛媛大農、[2]備前化成株式会社)
Daiki TADA[1], Yoshihisa MISAWA[2], Naomichi BABA[2], ○Masato ABE[1] ([1]Ehime Univ., [2]Bizen Chemical Co. Ltd.)

【背景と目的】

グリセロプラスマロシコシン（Glyceroplasmalopsychosine）はガラクトセラミドを部分構造に持ち、mixed acetal としてグリセロールと飽和アルキル側鎖を有する新奇スフィンゴ脂質である。グリセロプラスマロシコシンは 2001 年にウシの脳の白質から単離され、弱い PKC 阻害活性が認められたものの、細胞毒性は確認されなかった（Hikita, T. et al. 2001, *J. Biol. Chem.* 23084-23091.）。2008 年には、mixed acetal 部の立体化学の構築を目指した合成研究が報告されたものの（Ajit, P. 2008, Tetrahedron. 9821-9827.）、全合成には至らなかった。

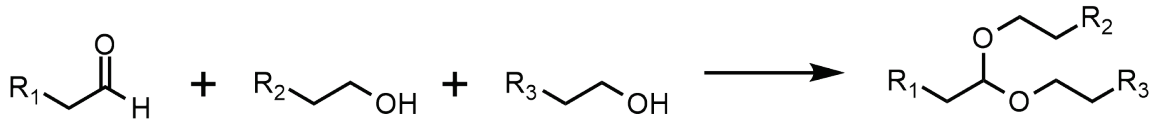


グリセロプラスマシコシンの化学構造

そこで本研究では、全合成のネックとなった mixed acetal の合成方法について検討した。

【合成方法】

先行例では mixed acetal 部の立体化学を構築するために対応する二糖の酸化開裂反応が用いられた。しかし、手順が長く、総収率において課題が残った。また、天然のグリセロプラスマシコシンはラセミの産物であることを考慮し、下記に示すような単純なアセタール合成によってラセミ合成することができないか検討した。



本研究で検討したアセタール化反応

【結果】

主に酸触媒でのアセタール化反応を検討し、硫酸触媒下で mixed acetal を 40%の収率で得られる条件を確立した。一方で、ヘミアセタールを経由した段階的な手法も検討したが、ヘミアセタールとして単離することはできなかった。今後はさらに基質一般性の拡張やアセタール交換反応を用いた合成について検討する予定である。

Phosphatidyl serin, Organic synthesis, Poly unsaturated fatty acid

発表責任者：安部真人（abemasato.si@ehime-u.ac.jp）

講演番号：2B03p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ 総合学習プラザ B03 会場

久慈市で産出される琥珀と亜炭、並びに外国産亜炭の生物活性物質の比較分析

Comparative analysis of biologically active compounds from amber and lignites in Kuji City and in the foreign countries

○島津 優人[1]、三浦 悠花[1]、越野 広雪[2]、木村 賢一[1]（[1]岩手大院・総合科学、[2]理研 CSRS）
○Yuto SHIMAZU[1], Yuka MIURA[1], Hiroyuki KOSHINO[2], Ken-ichi KIMURA[1] ([1]Grad. Sch. of Art and Sci. Iwate Univ., [2]RIKEN CSRS)

【目的】久慈産琥珀（中生代白亜紀後期：9000～8600 万年前）の約 5%のメタノール可溶性画分から、Ca^{2+}シグナル伝達に関わる遺伝子変異酵母 YNS17 株（*zds1*Δ *erg3*Δ *pdr1/3*Δ）の生育回復活性を指標に、新規抗アレルギー物質 kujigamberol を中心とした 5 種の新規物質を単離精製し、その構造と作用メカニズムを報告してきた[1)]。一方で、ロシア産やドミニカ産琥珀からは、現代の植物からも単離される既知物質ばかりであった。なぜ久慈産琥珀からのみ新規物質が単離されるのであろうか？その疑問を解決するため、植物の樹脂の化石である琥珀とは異なり、植物自体の化石である亜炭[2)]の生物活性に着目し、久慈産琥珀の生物活性物質と比較することを目的とした。同時に、外国産（ロシアとインドネシア）亜炭との比較も行なった。

【方法】久慈産亜炭は、久慈琥珀（株）の琥珀採掘場周辺から採取した。また、ロシア産とインドネシア産の亜炭は、クラスノヤルスクと南カリマンタン産のものを輸入した。久慈産亜炭粉末 592.8 g を用い、MeOH 抽出（25℃、1 日）を行った。HPLC 分析は、ODS カラム（4.6 φ ×150 mm、90%MeOH、1 ml/min）を用いて久慈産琥珀 MeOH 抽出物との比較分析を行った。活性評価は、YNS17 株を混ぜ込んだ 0.3M $CaCl_2$ 存在下の YPD 培地にサンプルをスポットし、28℃、3 日間の培養により、生育回復活性の有無や表現型の違いなどを評価した。他国産亜炭についても同様に行なった。

【結果・考察】久慈産亜炭粉末から得られた抽出物は 4.25 g（抽出効率：0.72%）であり、久慈産琥珀の約 1/5 の抽出効率であった。また、ロシア産とインドネシア産の亜炭も同程度の抽出効率を示した。HPLC を用いた比較分析では、久慈産琥珀に含まれている kujigamberol、並びに白亜紀の琥珀のバイオマーカーである amberene や 1- methylamberene のピークはいずれの亜炭の抽出物からも認められなかった。また、YNS17 株を用いて久慈産亜炭抽出物の生物活性評価を行ったところ、最小生育回復活性濃度は 0.63 μg/spot を示し、表現型は久慈産琥珀抽出物とは異なり阻止円活性が強く認められた。その活性は、ロシア産、並びにインドネシア産亜炭抽出物でも同様に認められた。尚、亜炭は現在植物栄養物質（バイオスティミュラント）として用いられていることから、腐植物質に含まれている fulvic acid[3)]の活性を調べたところ、YNS17 株に対して濃度依存的な生育活性が認められたが（1.25 μg/spot）、それは、0.3M の $CaCl_2$ 非存在下では消失した。

1) K. Kimura, J. Antibiot. (Review), **72**, 579-589 (2019)
2) T. Kawamura, *et al.*, Org.Geochem.,**120**, 12-18 (2018)
3) J. Winkler and S.Ghosh, J. Diad. Res. (Review), ID5391014 (2018)

Kuji amber, lignite, *Saccharomyces cerevisiae*

発表責任者：木村 賢一（kimurak@iwate-u.ac.jp）

講演番号：2B03p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ 総合学習プラザ B03 会場

遺伝子変異酵母株を用いたドイツ産琥珀に含まれる生物活性物質の単離精製と同定

Isolation and identification of biologically active compounds from German amber using the mutant yeast

○井上 奈々[1]、越野 広雪[2]、下田 希[1]、Menor-Salvan Cesar[3]、木村 賢一[1]（[1]岩手大院・総合科学、[2]理研 CSRS、[3]University of Alcara）
○Nana INOUE[1], Hiroyuki KOSHINO[2], Nozomu SHIMODA[1], Cesar Menor-Salvan[3], Ken-ichi KIMURA[1] ([1]Grad. Sch. of Arts and Sci. Iwate Univ., [2]RIKEN CSRS, [3]Univ. of Alcala)

【目的】Ca^{2+}シグナル伝達に関わる遺伝子変異酵母 YNS17 株（*zds1*Δ *erg3*Δ *pdr1/3*Δ）の生育回復活性を指標としたスクリーニング系を用い、久慈産琥珀（中生代白亜紀後期：9000～8600 万年前）から、新規抗アレルギー物質 kujigamberol（15,20-dinor-5,7,9-labdatrien-18-ol）を始めとする新規生物活性物質を 5 種単離同定した。その一方で、他国産琥珀（ロシア産、ドミニカ産、ミャンマー産琥珀）からは、現代の植物や他の琥珀にも含まれる既知物質のみが単離された[1)]。そこで、久慈産琥珀からのみ新規物質が単離される謎を解く手がかりを得るため、ドイツ産琥珀（Geisteltal、4500 万年前）に含まれる生物活性物質を単離精製し、その特徴を明らかにすることを目的とした。

【方法】ドイツ産琥珀メタノール抽出物の生物活性は、0.3M $CaCl_2$ を含む YPD 培地で、28℃、3 日間培養した際の YNS17 株の生育回復活性を指標とした。単離精製は、シリカゲル TLC（ヘキサン：酢酸エチル＝3:1）で分画した後、逆相 HPLC（90% MeOH）で単離した。細胞毒性活性には、ヒト急性前骨髄性白血病細胞 HL-60 を用い MTT assay にて行った。

【結果・考察】ドイツ産琥珀のメタノール抽出物 430.0 mg を、久慈産琥珀をはじめとする琥珀の TLC 分画に今まで用いてきた条件（ヘキサン : 酢酸エチル＝3:1）で展開し、13 フラクションに分画した。次に、活性を有し、且つ、ドイツ産琥珀の主要成分が最も多く含まれていると思われる TLC フラクション 6（Rf＝0.40、102.6 mg）から、ピーク X を 10.8 mg、ピーク Y を 13.3 mg 単離精製した。X および Y は、YNS17 株において kujigamberol の示す生育円と比較すると、その表現型は判別しにくいものであった。また、ドイツ産琥珀のメタノール抽出物が、HL-60 細胞において、他国産琥珀の 2 倍強い細胞毒性を示していたことから、X、Y について MTT assay により細胞毒性を調べたところ、それぞれ IC_{50}値=9.7 μg/ml、5.0 μg/ml を示した。尚、活性物質 X、Y は、EI-MS よりそれぞれ分子式が、$C_{30}H_{46}O_2$(438)、$C_{30}H_{48}O_2$(440)であると推定した。現在、さらなる生物活性の探索と、各種機器分析により構造の同定を行っている。

1) K. Kimura, J. Antibiot. (review), **72,** 579-589（2019）

German amber, *Saccharomyces cerevisiae*, Ca^{2+}-signal transduction

発表責任者：木村 賢一（kimurak@iwate-u.ac.jp）

講演番号：2B04a01
講演日時：3 月 26 日 09:30～ 総合学習プラザ B04 会場

多糖モノオキシゲナーゼ，CBP21 の変性機構と構造安定性

Unfolding mechanism and structural stability of a lytic polysaccharide monooxygenase, CBP21

○杉本 華幸[1,2]、中村 禄朗[1]、中島 優一[1]、坪田 侑里香[2]、渡邉 剛志[1,2]、鈴木 一史[1,2]([1]新潟大院・自然科学、[2]新潟大農・応生化)
○ Hayuki SUGIMOTO[1,2], Rokuro NAKAMURA[1], Yuichi NAKAJIMA[1], Yurika TSUBOTA[2], Takeshi WATANABE[1,2], Kazushi SUZUKI[1,2] ([1]Graduate School of Sci. and Tech., Niigata Univ., [2]Dept. Appl. Biol. Chem., Facul. Agri., Niigata Univ.)

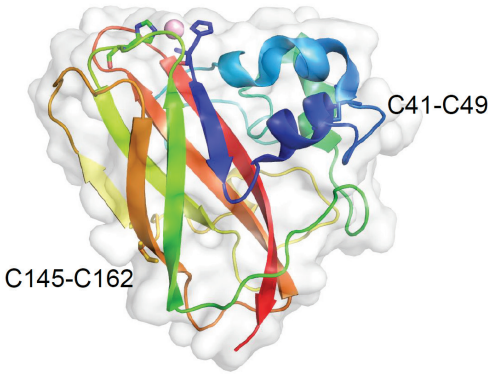


Fig. 1 Structure of CBP21
The metal ion is shown as a pink sphere. (PDB entry: 2bem)

Serratia marcescens 由来の多糖モノオキシゲナーゼ（CBP21）は，結晶性キチンのグリコシド結合を酸化分解する酵素で，CAZy データベースによる分類では Auxiliary Activities family 10 [AA10 (formerly CBM33)] に属する。本酵素の作用により，新たにキチン分子鎖末端が結晶性基質表面に生じるため，キチン加水分解酵素が効率的に基質を分解することが可能となる。CBP21 はキチンバイオマス分解のブースター酵素として注目されている。

CBP21 は 170 アミノ酸残基からなる小型球状タンパク質で (Fig. 1)，補因子として銅イオンが触媒部位に配位している。また，分子内には 2 つのジスルフィド結合（C41-C49，C145-C162）が存在する。本研究では，補因子（Cu^{2+}）結合とジスルフィド結合が CBP21 の構造安定性におよぼす影響について明らかにすることを試みた。

[補因子結合の効果] アポおよびホロ CBP21 の熱変性反応を断熱型示差走査熱量測定により測定したところ，ホロ CBP21 ではアポ型に比べて熱安定性が 9℃増大し（pH 5.0），銅イオン（Cu^{2+}）が CBP21 の構造安定化において重要な因子であることがわかった。また，ホロ CBP21 の変性機構は，$N{\cdot}Cu^{2+} \rightleftharpoons U{\cdot}Cu^{2+}$（N は天然状態，U は変性状態）である，すなわち，変性しても Cu^{2+}がタンパク質分子に配位したままであるということがわかった。

[ジスルフィド結合の効果] すでに立体構造が明らかな AA10 タンパク質について，アミノ酸配列のアライメント解析を行ったところ，ジスルフィド結合の数・分子内での位置に関連して，5 つのグループに分類されることがわかった。CBP21 には，2 枚のβ-シート構造を架橋するジスルフィド結合，C145-C162 が存在するが，これは他の多糖モノオキシゲナーゼには見られないユニークな結合であった。本ジスルフィド結合を欠損させた変異型 CBP21（C145A/C162A）について尿素による変性反応を調べた（Cu^{2+}が配位していないアポ型を用いた）。野生型アポ CBP21 の変性の中点濃度は 4.8 M であったのに対し，C145A/C162A では 3.2 M であった。C145A/C162A は野生型に比べて不安定化した。また，C41-C49 の効果についても現在解析を進めている。

lytic polysaccharide monooxygenase, structural stability, unfolding

発表責任者：杉本華幸（hayuki@agr.niigata-u.ac.jp）

講演番号：2B04a02
講演日時：3 月 26 日 09:41～ 総合学習プラザ B04 会場

ホスファチジルセリン脱炭酸酵素の結晶構造から明らかになった生体膜リン脂質生合成機構

Crystal structures of phosphatidylserine decarboxylase reveal the mechanism of phospholipid biosynthesis

○渡邊 康紀[1]、渡辺 誠也[1,2] ([1]愛媛大院・農、[2]愛媛大・CMES)
○Yasunori WATANABE[1], Seiya WATANABE[1,2] ([1]Grad. Sch. of Agricul., Ehime Univ., [2]CMES, Ehime Univ.)

細胞やオルガネラが正常に機能するには多くのタンパク質の機能の場となる生体膜を構成するリン脂質の組成が正しく保たれていることが重要である. 例えば大腸菌の細胞膜は約 70%がホスファチジルエタノールアミン(PE)から構成されており，ホスファチジルセリン (PS) から PE の生合成を担う PS 脱炭酸酵素 (PSD) をコードする遺伝子は大腸菌の生育に必須であることが知られている．PSD は前駆体として翻訳された後，自己プロセシング反応によりα, βの二つのポリペプチド鎖に分かれ成熟体となる．この反応の過程でα鎖の N 末端に活性中心となるピルボイル基が形成され，PS 頭部のアミノ基とシッフ塩基中間体を形成することで，脱炭酸反応が進行する．PSD は細菌からヒトに至るまで広く保存されており，新規抗菌薬の開発やリン脂質代謝異常による疾患の治療のための標的分子として適していると考えられるが，PSD による基質認識メカニズム等，PE 生合成の詳細な分子機構は明らかになっていない．そこで本研究では，大腸菌由来 PSD (EcPsd) に着目し，EcPsd の X 線結晶構造解析および立体構造に基づいた機能解析を行った.

EcPsd は全長では結晶を得ることはできなかったが，活性に必要のない C 末端の領域を削ったコンストラクトの結晶を得ることに成功した．セレノメチオニン誘導体結晶を用いた単波長異常分散法により位相を決定し，最終的に 2.6 Å 分解能の回折データを用いて結晶構造を決定した．EcPsd のフォールドの中心には正電荷が優勢なポケットを形成していた．α鎖の N 末端に形成されたピルボイル基はポケットの底に位置しており，負電荷を持つ PS 頭部を認識するには適した構造であることが示唆された．次に，EcPsd と PS のシッフ塩基中間体を $NaCNBH_3$ によって還元し，中間体状態で反応を停止した状態の結晶を作製し, 3.6 Å 分解能で構造決定した. 結晶中では, 実際に PS 頭部は EcPsd のポケット底部のピルボイル基とシッフ塩基中間体を形成していた．しかし，PS 頭部のカルボキシル基由来の電子密度は観測されなかったことから，脱炭酸反応後（PE 形成後）にシッフ塩基中間体が還元されたことが示唆される．構造に基づいた変異体解析から，PS 頭部の認識に関与する保存された Tyr137 および His144 が EcPsd の活性に重要であることが明らかになった．また，EcPsd の N 末端には疎水性のヘリックス領域が基質結合ポケットの近傍に形成しており，この領域が EcPsd の膜への結合に重要であることが分かった．以上のことから, EcPsd は N 末端側のヘリックス領域を介して膜に結合し，負電荷を持つ PS の頭部を正電荷が優勢な基質結合ポケットに引き込むことで脱炭酸反応を促進するという PE 生合成のモデルを構築した.

crystal structure, Phosphatidylserine decarboxylase, phosphatidylethanolamine

講演番号：2B04a03
講演日時：3 月 26 日 09:52～ 総合学習プラザ B04 会場

高分解能回折データから明らかになった制限酵素と切断された DNA のユニークな相互作用

Unique interaction of cleaved DNA with restriction enzymes revealed from high resolution diffraction data

○喜多 恵子[1]、三上 文三[2,3] ([1]京都大院農、[2]京都大エネルギー理工学研究所、[3]京都大生存圏研究所)
○Keiko KITA[1], Bunzo Mikami[2,3] ([1]Kyoto Univ., [2]IAD, Kyoto Univ., [3]RISH, Kyoto Univ.)

【背景】
制限酵素は、二本鎖 DNA の特異的な塩基配列を認識して、二価メタルイオンの存在下でホスホジエステル結合を加水分解するエンドヌクレアーゼである。私たちは、二量体を形成して(G/A)G↓GNCC(C/T)の配列を認識・切断する制限酵素 EcoO109I を対象として、DNA 結合タンパク質としての核酸との相互作用を明らかにすることを目的として研究を行っている。これまでに、野生型と認識特異性が著しく向上した変異酵素について、分解能約 2Å のデータを用い、Na^+またはCa^{2+}が結合した DNA 複合体の分子モデルを構築した。野生型と変異酵素の全体構造はよく一致しており、切断されていない DNA の切断位置近傍の同じ位置に Na^+と Ca^{2+}がそれぞれ 1 分子ずつ結合していた。今回、切断活性に必須なMn^{2+}を加えた条件下で野生型と変異酵素の DNA 複合体の結晶化を試みた結果、高分解能の回折データを取得することができ、切断型複合体の構造を明らかにした。
【方法と結果】
野生型と変異酵素の C 末端に His タグを付加した酵素遺伝子を保持する組換え体大腸菌から、アフィニティーカラムとゲルろ過カラムを用いて精製を行った。結晶化は、オリゴ DNA にMn^{2+}を加えた緩衝液中でハンギングドロップ蒸気拡散法により 20℃で行った。得られた結晶の回折データの収集を SPring-8 BL26B1 で行い、格子定数が僅かに異なる $P2_12_12_1$ の空間群に属する複数の結晶について約 1.6Å の分解能のデータを得た。構造の精密化は Phenix.refine で行った。結果、野生型と変異酵素のタンパク質の全体構造と各サブユニットの全体構造はよく一致していた（rms=0.08Å）が、複数のアミノ酸側鎖の disorder がサブユニットで異なっていた。結晶中の DNA は予想どおり切断されており、二本鎖 DNA 1 分子に対してMn^{2+}と推定される電子密度が 4 つ見いだされた。野生型複合体では 4 つのMn^{2+}のうちのひとつは disorder しており、その近傍に位置する活性に必須な Asp 側鎖も disorder していた。現在、変異酵素複合体についても詳細な解析を行っており、Mn^{2+}存在下での野生型と変異酵素の切断活性の解析結果と併せて両者の相違を議論したい。

X-ray cyrstal structure, Restriction endonuclease, Protein-DNA interaction

発表責任者：喜多恵子（kita.keiko.6a@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2B04a04
講演日時：3 月 26 日 10:03～ 総合学習プラザ B04 会場

新規アコニターゼXのX線結晶構造解析と分子進化的考察

X-ray crystallographic analysis and molecular evolution of novel aconitase X

○村瀬 陽介[1]、渡邊 康紀[1]、渡辺 誠也[1,2] ([1]愛媛大院農、[2]愛媛大 CMES)
○Yosuke MURASE[1], Yasunori WATANABE[1], Seiya WATANABE[1,2] ([1]Grad. Sch. of Agricul., Ehime Univ., [2]CMES, Ehime Univ.)

【背景・目的】アコニターゼスーパーファミリーに属するアコニターゼ X（AcnX）はシングルポリペプチドの Type I と大小サブユニットから成る Type II（細菌・カビ）があり、後者はさらに II_a（細菌）, II_b（古細菌）、 II_c（細菌）と、全部で 4 つのサブファミリーに分けられる。これまで AcnX の機能は不明であったが、我々は Type I および II_a が *cis*-3-ヒドロキシ-L-プロリン（C3LHyp）脱水酵素であることが明らかにした（Watanabe et al., Sci. Rep. 2016, 6, 38720）。また、最近 Type II_b が特殊なメバロン酸経路に関与する 5-ホスホメバロン酸（MVA5P）脱水酵素であることが報告された（Hayakawa et al., PNAS 2018, 115, 10034-10039）。しかし、両酵素の基質はアコニターゼスーパーファミリーに属する他の酵素の基質とは類似しておらず、両酵素がどのように基質を認識し、脱水反応を触媒するのかは不明である。そこで、本研究では AcnX の基質認識機構および反応触媒機構を解明することを目的として、Type I および Type II_b の X 線結晶構造解析を行った。
【方法・結果】大腸菌の系を用いて調製した *Agrobacterium tumefaciens* 由来 Type I（AtAcnX）、*Thermococcus kodakaraensis* 由来 Type II_b（TkAcnX）についてそれぞれ結晶化に成功し、SPring-8 で回折データを収集した。AtAcnX はセレノメチオニン置換体結晶を用いた SAD 法により位相決定を行い、最終的に 1.6 Å 分解能で構造を決定した。TkAcnX は AtAcnX をモデル分子（相同性 31%）とした分子置換法により位相決定を行い、最終的に 3.4 Å 分解能で構造を決定した。TkAcnX の活性中心には[3Fe-4S]クラスターが配位しており、アコニターゼスーパーファミリーに属する他の酵素と同様に[4Fe-4S]クラスターを補因子とすることが示唆された。一方、AtAcnX は予想外にも同タンパク質ファミリーには見られない[2Fe-2S]クラスターが配位していた。構造既知のウシ由来アコニターゼ、AtAcnX、TkAcnX の三者の構造を比較すると、鉄硫黄クラスターの配位様式がそれぞれ異なることが明らかになった。より詳細な反応触媒機構を明らかにするために、AtAcnX-C3LHyp 複合体および TkAcnX-MVA5P 複合体の共結晶を作製し、それぞれ 2.0 Å、1.9 Å 分解能で構造を決定した。C3LHyp および MVA5P の脱離する水酸基は AcnX の鉄硫黄クラスターの鉄原子に配位していた。両基質に共通するカルボキシ基と水酸基の認識に関与する残基、α-プロトン引き抜きを担うセリン残基はよく保存されているのに対し、C3LHyp 特異的な窒素原子や、MVA5P 特異的なリン酸基の認識に関与する残基は保存されていなかった。今後は、構造に基づいた変異体解析によりアコニターゼスーパーファミリー間における鉄硫黄クラスターの種類および配位様式の違いの意義を明らかにしたい。

aconitase X, hydroxyproline, mevalonate 5-phosphate

発表責任者：村瀬　陽介（g652018c@mails.cc.ehime-u.ac.jp）

講演番号：2B04a05
講演日時：3 月 26 日 10:14～ 総合学習プラザ B04 会場

超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* におけるレプリソームの機能変換機構
Functional conversion of replication machinery by switching interaction partner of PolD between Primase and PCNA during replication fork progression in the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakarensis*

○沖 啓輔[1]、山上 健[1]、永田 麻梨子[1]、眞柳 浩太[2]、沼田 倫征[1]、石野 園子[1]、石野 良純[1] ([1]九大院・農、[2]九大・生医研)
○ Keisuke OKI[1], Takeshi YAMAGAMI[1], Mariko NAGATA[1], Kouta MAYANAGI[2], Tomoyuki NUMATA[1], Sonoko ISHINO[1], Yoshizumi ISHINO[1] ([1]Dept. Biosci. & Biotec., Grad. School of Bioresource & Bioenviron. Sci., Kyushu Univ., [2]MIB, Kyushu Univ.)

超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* のレプリソーム構成因子としては、二本鎖 DNA の開裂を行うヘリカーゼである MCM/GINS/GAN 複合体、RNA プライマー合成を行うプライマーゼ PriL/PriS 複合体、新生鎖 DNA の伸長を行うファミリーB と D の DNA ポリメラーゼ（PolB, PolD）及びそれらと相互作用するリング状の補助因子である PCNA が考えられる。複製フォークの進行において、リーディング鎖合成とラギング鎖合成が歩調を合わせて複製フォークを進行させるために、ヘリカーゼ、プライマーゼ、ポリメラーゼが協調して効率よく働く必要があるが、それらの相互作用や複合体形成は明らかではなかった。また、*T. kodakarensis* が持つ 2 種の DNA ポリメラーゼのうち PolB の欠損株が単離され、野生型と比較して生育に遅れがないことが報告されており、PolD が単独で DNA 合成の全てを担うレプリソーム構成とその機能が注目される。

我々は精製した組換えタンパク質を用いて、Native PAGE、ゲル濾過クロマトグラフィー、SPR 法により複製因子間の相互作用を解析した。その結果、アーキア特有の DNA ポリメラーゼである PolD が、ヘリカーゼ複合体の構成因子である GINS およびプライマーゼとそれぞれ強固に相互作用し複合体形成することを発見した。続いて酵母ツーハイブリッド法によるサブユニット間での相互作用解析を行ったところ、PolD の小サブユニットである DP1 と PriS が、また大サブユニットである DP2 と PriL がそれぞれ結合することがわかった。SPR 解析により結合の強さを定量したところ、PriL がより強固に結合することが明らかになった。さらに、変異体解析の結果、PriL は DP2 の C 末端領域に存在する疎水性残基と相互作用することがわかったが、興味深いことにこの結合位置は、DP2 が PCNA との相互作用に関わる PIP (PCNA-interacting peptide)-box と推定されている部位と同一であった。このことから、真核生物ではプライマーゼが Polα と複合体を形成し、プライマーゼが合成した RNA プライマーを Polα が少し伸長した後、Polδ/ε に引き継ぐと考えられている機構と異なり、アーキアにおいては、PolD がプライマーゼと結合する Polα 様モードと、PCNA と結合する Polδ/ε 様の二役を担当し、同一部位を用いてプライマーゼから PCNA へパートナーを切り替えることによって新生鎖を効率よく合成する分子機構が示唆された。

Polymerase, DNA replication, Replisome

講演番号：2B04a06
講演日時：3 月 26 日 10:35～ 総合学習プラザ B04 会場

HBV 細胞内侵入阻害リポペプチド Myrcludex B の新規作用機構

Exploration of a novel mechanism of HBV entry inhibitior lipopeptide Myrcludex B

○七原 匡哉[1]、曽宮 正晴[2]、黒田 俊一[2] ([1]大阪大生命、[2]大阪大学産業科学研究所)
○Masaya NANAHARA[1], Masaharu SOMIYA[2], Shun'ichi KURODA[2] ([1]Osaka Univ., [2]ISIR, Osaka Univ.)

【背景】B 型肝炎ウイルス(HBV)は、ヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)及びナトリウム―タウロコール酸共輸送体(NTCP)という２種類の受容体を介して、ヒト肝実質細胞に特異的に感染する DNA ウイルスである。HBV の細胞内侵入阻害剤として開発された Myrcludex-B (Myr47) は、HBV エンベロープタンパク質に含まれる NTCP 結合ドメインの配列を持つリポペプチドである。Myr47 は HBV と受容体である NTCP との相互作用を競合的に阻害することで HBV 感染を阻害すると考えられている。一方、2016 年に Myr47 が NTCP 非発現細胞において HBV 表面抗原(HBsAg)粒子の細胞内侵入を阻害することが報告された[1]。この結果は、Myr47 の HBV 侵入阻害機構に、上記 NTCP 依存的機構に加えて、NTCP 非依存的機構が存在する可能性を示唆した。
【目的】本研究では、Myr47 の細胞への HBV 侵入阻害機構を詳細に解明することを目的に、HBsAg やリポソーム (Lp) を用いて、Myr47 との相互作用機構および Myr47 による NTCP 非依存的細胞内取り込み阻害機構の解析を行った。
【方法】AlphaScreen アッセイにより、HBsAg および Lp と、Myr47 および同変異ペプチドとの相互作用を定量的に解析した。次に、NTCP を発現しない HepG2 細胞に、Myr47 および同変異ペプチドと、蛍光標識 HBsAg および蛍光標識 Lp を添加し、37℃で 4 時間インキュベートした後、両粒子の細胞内への取り込み量をフローサイトメトリーによって測定した。
【結果】Myr47 変異ペプチドを用いた AlphaScreen アッセイから、Myr47 は N 末端のミリストイル基を介して HBsAg および Lp の脂質二重膜にアンカリングすることが強く示唆された。次に、フローサイトメトリー解析から、Myr47 と 11/ 13 番目のアミノ酸残基を光学異性体に置換した変異ペプチドは、HBsAg および Lp の細胞内取り込みを阻害したが、9 番目の Asp を Lys に置換した変異ペプチドは細胞内取り込みを阻害しなかった。
【考察】Myr47 の NTCP 非依存的なナノ粒子細胞内取り込み阻害活性は、アミノ酸配列に依存することが判明した。以上の結果より、Myr47 が HBV の脂質二重膜部分にミリストイル基を介してアンカリングし、細胞内への侵入を抑制するという新たな感染阻害機構の存在が示唆された。

1] Somiya, M. et al. Virology 497, 23-32 (2016).

HBV, entry inhibitor, lipopeptide

講演番号：2B04a07
講演日時：3 月 26 日 10:46～ 総合学習プラザ B04 会場

植物・昆虫細胞を用いた細胞膜透過性ペプチドの比較
Evaluation of cell-penetrating peptides using plant and insect cells
○大下 勝也、角田 優伍、宮下 正弘、宮川 恒（京大院農）
○Katsuya OOSHITA, Yugo TSUNODA, Masahiro MIYASHITA, Hisashi MIYAGAWA (Kyoto Univ.)

【目的】
細胞膜透過性ペプチド（CPP）は細胞内へ移行する性質をもち、タンパク質や核酸のような通常では細胞膜を透過できないような親水性物質に CPP を付加することで、それらを細胞内へ移送させることができる。これまで、CPP 研究のほとんどは哺乳動物細胞に対して行われており、植物や昆虫細胞における CPP の構造と透過性の関係については不明な点が多い。そこで本研究では、種々の CPP を用いて植物および昆虫細胞に対する細胞透過性を比較するとともに、新たな CPP の探索を行った。
【方法】
CPP としてオリゴアルギニン（R_8GC）、クモ毒由来の L17E、および当研究室で見いだした *p*VEC(R_4)を用い、CPP 候補としてサソリ毒由来の N-LaIT2 および LaCT2 を用いた（図 1）。これらのペプチドは Fmoc 固相法によって合成した。蛍光標識は、L17E、*p*VEC(R_4)、LaCT2 においては N 末端残基に 5(6)-carboxyfluorescein を導入することにより、また R_8GC、N-LaIT2 においては C 末端システイン残基に fluorescein 5-maleimide を導入することにより行った。植物細胞に対する透過性の評価にはタバコ BY-2 細胞を用い、昆虫細胞に対する評価には Sf9 細胞を用いた。終濃度が 10 μM となるようにそれぞれのペプチド溶液を 1 時間処理し、洗浄操作の後に蛍光顕微鏡および共焦点顕微鏡による観察を行った。
【結果】
植物細胞に対する測定の結果、いずれのペプチドも細胞内への移行が認められたが、中でも L17E が特に高い透過性を示した。一方、昆虫細胞に対しては、高い細胞膜透過性を示すものは見られなかった。以上の結果から、植物細胞と昆虫細胞とでは CPP の透過性に必要な構造因子が異なっていると考えられた。

R_8GC: RRRRRRRRGC-NH_2
L17E: IWLTALKFLGKHAAKHEAKQQLSKL-NH_2
*p*VEC(R_4): LLIILRRRR-NH_2
N-LaIT2: AKKPFVQRVKNAASKAYNKLKGLAMQSQYGC-NH_2
LaCT2: SFWGKLWEGVKSAI-NH_2

図 1　用いたペプチドの配列

cell-penetrating peptide, plant cell, insect cell

発表責任者：大下 勝也（ooshita.katsuya.56m@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2B04a08
講演日時：3 月 26 日 10:57～ 総合学習プラザ B04 会場

超音波で断片化した DNA の 3'端と効率的修復

Properties and efficient repairing of mechanically sheared 3' DNA ends

○大坪 嘉行、酒井 啓一郎、永田 裕二、津田 雅孝（東北大院生命）
○Yoshiyuki Ohtsubo, Keiichiro Sakai, Yuji Nagata, Masataka Tsuda (Tohoku Univ.)

DNA を超音波処理により断片化して NGS 解析等に用いることが広く行われている。断片化により生じた DNA 末端については、3’に水酸基が 5’にリン酸基が存在する(Elsner and Lidblad, DNA, p697-701 , 1989)と誤って認識されてきた。本研究では、超音波によって断片化した DNA の 3’末端について解析を行い、およそ 50%がリン酸基、20%が水酸基、残りはそのいずれでもない″異常末端″であることを明らかにするとともに、DNA3’末端を効率的に水酸基末端に変換可能な SB(scrap-and-repairing)法を構築した(Ohtsubo et. al Communications Biology 2:409,2019)。
二本鎖 DNA の片方の 5’端が蛍光ラベルされた DNA を PCR 増幅によって得て、これを超音波処理によって断片化した。断片化後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によりサイズ分画し、得られた画分を解析に用いた。得られた画分を変性条件下でキャピラリーシーケンサーで解析すると、ピーク間隔が一定でない乱雑な波形データが観察された。このことは、DNA の超音波処理によって得られた DNA の 3’末端が均一な形状でないことを意味している。当該画分を dNTP 存在下で T4 DNA polymerase(T4DP)により処理すると、波形形状は多少変化したが、なお乱雑であった。当該画分を dNTP 非存在下で T4DP 処理すると、およそ半数が分解されずに残ったが、処理前に脱リン酸化処理を行うと完全に分解された。T4DP は dNTP 非存在下では強い 3’->5’エキソヌクレアーゼ活性を示すが、3’がリン酸基である DNA に対してはこの活性を持たない。すなわち観察されたデータは 3’のおよそ半数がリン酸基末端であることを示している。脱リン酸化処理に続いて T4DP 処理すると、波形が一定程度均等になったが、水酸基末端ではない末端が 3’陥没で存在していることが考えられた。当該画分を 3’->5’エキソヌクレアーゼである exonuclease III(E3)で処理すると、完全に分解したことから、異常末端は E3 に感受性であることが明らかになった。また E3 と T4DP を同時に作用させると、分解と合成が釣り合って分解を防ぎつつ末端を水酸基に変換することができることを見出し、SB 法と命名した。3’がほぼ完全に水酸基になったことは、3’端に対する G の付加反応に次ぐ CIS 反応(Ohtsubo et. al DNA Res.25, 477-487,2018)がほぼ 100%の効率で起こることから確認された。
以上、本研究では、超音波処理によって得られた DNA の末端についての誤解を解き、より効率的な末端修復方法を提唱した。本研究で解析したのは超音波処理により得られた末端であるが、他方法により物理的に断片化した DNA 末端や調製中に断片化したような DNA 末端についても、リン酸基末端や異常末端が存在していることが考えられる。なお波形データの解析には TraceViewer を使用した。

DNA fragmentation, sonication, end repair

講演番号：2B04a09
講演日時：3 月 26 日 11:08～ 総合学習プラザ B04 会場

抗体 77-3 を用いた Aβ-HDL 複合体の ELISA

ELISA of Aß-HDL complexes using antibody 77-3

○吉濱 恵亮[1]、吉宗 一晃[1]、神野 英毅[2]、古山 裕亮[1] ([1]日大生産工、[2]星薬大)
○ KEISUKE Yoshihama[1], KAZUAKI Yoshimune[1], HIDEKI Kouno[2], HIROAKI Furuyama[1] ([1]Nihon Univ., [2]Hoshi Univ.)

認知症患者の過半数を占めるアルツハイマー病(AD)の主な病理変化の一つに、アミロイドβタンパク質(Aβ)の凝集による脳内の老人斑形成がある。AD は血中の高比重リポタンパク質(HDL)や HDL の主要なタンパク質成分である apoA-1 によって抑制されること及び、HDL の成分である ApoE4 の遺伝子はそのアイソフォームである正常型の ApoE3 との比較から危険因子であることが知られている。これらのことから、HDL と Aβ との複合体に注目した AD の診断や治療の可能性も考えられている。これまでに Aβ 凝集体表面の立体構造に特異的に反応すると予想されるモノクローナル抗体 77-3 を作製した。Aβ と HDL との複合体を作製し、この抗体 77-3 を用いた ELISA による検出を試みた。

Aβ は非常に凝集性が高いため、無水状態でモノマーであり中性水溶液中で自発的に天然の Aβ となる 26-*O*-acyl isoAβ (isoAβ) を Aβ モノマーとして使用した。可溶性 Aβ 凝集体は 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol での溶解と、凍結乾燥を２回行って作製した。複合体を形成させるため HDL (0.4 mg/ml)、LDL (0.4 mg/ml)、ApoE3 (0.1 mg/ml)、ApoE4 (0.1 mg/ml)、ApoA1 (0.1 mg/ml)、Albumin (0.1 mg/ml) に Aβ モノマー (4.6 mg/ml)または Aβ 凝集体 (0.194 mg/ml)を添加し 4℃で一晩静置した。その後、抗原として複合体を ELISA プレートに添加した後、HRP 標識抗体 77-3 を用いて検出を行った。

抗体 77-3 を用いて Aβ モノマーと HDL 複合体の検出を行った結果、380 pM Aβ モノマーを検出できた。同じ測定系において Aβ モノマーの検出には 4.9 μM 以上必要であった。HDL と Aβ との複合体が形成され、抗体が認識できるエピトープが形成されたと考えられる。この Aβ 濃度において、反応性に対する LDL、ApoE3、ApoE4、ApoA1 及び Albumin の効果は見られなかった。一方で、可溶性Aβ 凝集体の検出には 49 nM 以上の Aβ が必要であったが、この濃度において LDL や ApoE3 の添加によって反応性の向上が見られた。同じ条件で ApoE4 の添加は反応性に影響を与えなかったことから ApoE3 と ApoE4 の Aβ に対する親和性の差を検出できたと考えられる。本抗体を用いた ELISA によって生体内濃度の Aβ と HDL 複合体が特異的に測定できる。ヒト髄液中の Aβ 濃度は数百 pM であり、この方法は HDL と Aβ との複合体に注目した AD の診断や治療に向けた研究に応用できる。

Alzheimer's disease, ELISA, HDL

発表責任者：吉宗一晃（yoshimune.kazuaki@nihon-u.ac.jp）

講演番号：2B04a10
講演日時：3 月 26 日 11:19～ 総合学習プラザ B04 会場

ELISA の検出による Aβ凝集体の表面に対するエタノールの影響
ELISA for detection of the effect of ethanol on the surface of Aß aggregates
○高島 聖史[1]、吉宗 一晃[1]、神野 英毅[2] ([1]日大生産工、[2]星薬大)
○Masafumi Takashima[1], Kazuaki Yoshimune[1], Hideki Kohno[2] ([1]Nihon Univ., [2]Hoshi Univ.)

認知症の過半数を占めるアルツハイマー病(Alzheimer's Disease :AD)の患者数は世界中で増加している。AD 患者数は 2050 年に 1 億 3000 万人に達するとの予想もあり、対策が急務である。AD の発症機構は、アミロイド β(Aβ)と呼ばれるペプチドが神経細胞外に蓄積し、老人斑を形成し、神経細胞死を誘導することが原因と考えられている。Aβ は疎水性アミノ酸残基を多く含むペプチドであるため、非常に凝集しやすい。Aβ 凝集体は、繊維状と非晶質の大きく 2 つに分けられ、非晶質 Aβ 凝集体は、繊維状 Aβ よりも神経細胞への毒性が強い。

AD の発症にはアルコールの関係が示唆されている。アルコールと認知機能には主に 2 つの関係があり、アルコールによる認知機能の低下と長期にわたる多量の飲酒による認知症である。アルコールは一時的または不可逆的に認知機能を低下させる一方で、少量の摂取は認知症の予防効果がある可能性も示唆されている。アルコールと認知症との関係性は複雑であり、科学的な根拠は少ない。

これまでに、Aβ モノマーや繊維状 Aβ とは反応せず、非晶質の凝集体に特異的に反応するモノクローナル抗体 83-3 を作製した。Aβ 凝集体または Aβ モノマーにエタノールを添加し、作製した抗体 83-3 を用いた ELISA による検出を試みた。

Aβ モノマーは、酸性溶液中で安定的にモノマー状態であり、中性水溶液中で自発的に天然型 Aβ となる 26-*O*-acyl isoAβ(isoAβ)を使用した。可溶性 Aβ 凝集体は有機溶剤である 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol での溶解と、凍結乾燥を 2 回行い作製した。

Aβ 凝集体(0.194 mg/ml)または Aβ モノマー(4.6 mg/ml)にエタノール(10 mM または 30 mM)を添加し、HRP 標識抗体 83-3 を用いて検出を行った。

抗体 83-3 を用いエタノール添加した Aβ 凝集体の検出を行った結果、抗体 83-3 と反応性が高まった。エタノール添加により、非晶質 Aβ 凝集体の形成が促進され、抗体 83-3 と反応するエピトープが増加し反応性が向上したと考える。同様の測定を Aβ モノマーで行った際、抗体 83-3 の反応性に影響を与えなかった。この結果より、エタノールの Aβ 凝集体と Aβ モノマーに対する抗体 83-3 の反応性についての有意差を検出できた。

Alzheimer's disease, ELISA, ethanol

講演番号：2B04a11
講演日時：3 月 26 日 11:40～ 総合学習プラザ B04 会場

C 型レクチン様タンパク質 RegIV の可溶化と糖鎖との結合性

Solubilization and carbohydrate-binding properties of C-type lectin-like protein RegIV.

○田中 浩志、竹内 彩佳、郷田 秀一郎、海野 英昭、畠山 智充（長崎大院・工）
○ Koshi TANAKA, Ayaka TAKEUCHI, Shuichiro GODA, Hideaki UNNO, Tomomitsu HATAKEYAMA (Nagaski Univ.)

【目的】C 型レクチンファミリーに属する Reg タンパク質は、細胞が傷害を受けた際に発現するが、中でも Reg IV は発ガンの際に胃や腸の粘膜細胞で高発現することが知られている。RegIV は C 型レクチンと類似した立体構造をもつが、C 型レクチンとは異なり Ca^{2+}を介さずに糖と結合することが示唆されている。これまでに、NMR によって Reg IV の糖結合部位として、分子表面の 2 ヶ所が提案されたが、糖結合メカニズムは完全には解明されておらず、Reg IV の生理活性との関係も不明である。我々はこれまでに、大腸菌を用いて組換え hReg IV を発現させたが、得られたタンパク質は会合性が強くモノマーを得ることが困難であった。そこで本研究では、組換え hRegIV の N-末端の疎水性残基を削除するとともに、His-tag を付加した組換え体の発現を試みた。また、糖鎖との結合特異性を調べることを目的として、酵母細胞壁からマンノースオリゴ糖を調製し、組換え hRegIV との結合性を検討した。

【方法・結果】hRegIV の N 末端部分の連続した疎水性アミノ酸が凝集の原因であると考え、N 末端部分を除去し、プラスミド pET-19b を用いて His-tag 融合タンパク質（His-hReg IV）として発現させ、精製を行ったところ可溶性が向上した。His-hReg IV と糖との結合は、100 種類の糖鎖が固定化されたグリカンアレイによって検討したが、いずれの糖鎖とも結合が確認されなかったことから、末端にガラクトースやグルコースなどを含むオリゴ糖鎖には親和性を示さないことが分かった。さらに酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)から調製したオリゴ糖鎖との結合性について検討した。酵母細胞壁からマンナンを抽出し、限定加水分解により二糖から四糖程度までのマンノースオリゴ糖を調製した。その後、ゲルろ過クロマトグラフィー及び高速液体クロマトグラフィーを用いて純粋なマンノースオリゴ糖を精製した。得られたマンノースオリゴ糖をポリアミドアミン（PAMAM）デンドリマーの末端に結合させたポリマーと His-hRegIVとの結合試験を行った結果、His-hReg IV は、より長いマンノースオリゴ糖鎖に親和性を示すことが示唆された。一方、His-hRegIV は濃縮や凍結後に凝集しやすい性質が認められたため、糖の添加などによる凝集抑制効果についても検討を行った。

C-type lectin, Mannose oligosaccharide, Polyamidoamine dendrimer

発表責任者：畠山　智充（thata@nagasaki-u.ac.jp）

講演番号：2B04a12
講演日時：3 月 26 日 11:51～ 総合学習プラザ B04 会場

タンパク質異常凝集形成に対する未利用海藻の有用性

Effects of unused seaweeds on abnormal protein aggregation.

○八木 寿梓[1]、三輪 明日香[2]、伊藤 佑夏[2]、川本 仁志[3]、三木 康成[3]、大城 隆[1]([1]鳥取大工、[2]鳥取大院持社創科、[3](株) 海産物きむらや)
○Hisashi YAGI[1], Asuka MIWA[2], Yuka ITO[2], Hitoshi KAWAMOTO[3], Yasunari MIKI[3], Takashi OHSHIRO[1] ([1]Tottori Univ., [2]Grad. Sch. of Tottori Univ., [3]Marine Products KIMURAYA)

【目的】タンパク質の異常凝集は加齢に伴い発症する多くの疾患に関与している。健康寿命の重要性が問われる中で、タンパク質異常凝集疾患の予防・治療方法の開発は課題である。特にタンパク質の異常凝集体の一つであるアミロイド線維は，アルツハイマー病等の神経変性疾患から、眼・皮膚さらには生活習慣病の一部にも関与しており、総称してアミロイドーシスと呼ばれる。アミロイド沈着が原因とされる疾患の多くは発症後の治療が困難なため、予防方法の開発が重要と考えられている。それぞれの疾患の発症に関わる初期の要因・原因タンパク質は異なるけれど、原因タンパク質がアミロイド線維を形成するという共通の機構は変わらず、その形成過程が疾患発症の引き金になっていることは過去の知見からも明らかである。我々はアミロイド線維の形成を阻害するために、海藻に着目した研究を展開している。

日本には約 2000 種類の海藻（緑藻・紅藻・褐藻）が生育しており、食用として流通しているのは約 100 種類である。多くの海藻は未利用あるいは低利用海藻であり、本研究では未利用・低利用あるいは廃棄される海藻の部位から抽出液を調製し、アミロイド線維に対する形成阻害効果を調べた。

【方法・結果】阻害効果の検証として、インスリノーマ原因タンパク質であるインスリンのアミロイド線維形成に対する阻害効果を調べた。インスリンは一般的に血糖値を調製する薬剤としても知られているが、その一方でアミロイド線維を形成し、疾患の発症にも関与する。現在報告されている線維形成阻害物質の抽出には有機溶媒を用いた系が多い。本実験でも未利用海藻から有機溶媒で抽出した海藻成分をインスリンの線維形成に及ぼす効果を調べた。線維の有無は、線維特異性蛍光色素チオフラビン T による蛍光測定と透過型電子顕微鏡で確認した。結果として、未利用海藻の有機溶媒抽出物は 0.5%（w/v）以上で線維形成の抑制・阻害効果を示した。

次に、海藻の廃棄部位から海藻抽出物を調製し、その阻害効果を調べた。チオフラビン T 蛍光測定において海藻抽出物存在下では蛍光強度の増加が認められなかった。しかし、透過型電子顕微鏡観察において線維の形成は認められなかったが、不定形凝集物を形成した。この不定形凝集物が毒性を有すると海藻成分の効果が期待できないために、培養細胞を用いた毒性評価を行った。結果、不定形凝集物は細胞に対する毒性がアミロイド線維と比較してかなり軽減されることがわかった。本研究から、アミロイド線維形成阻害に対する未利用海藻等の有用性が示唆された。

Amyloid fibril, Seaweed

発表責任者：八木寿梓（yagi@tottori-u.ac.jp）

講演番号：2B04a13
講演日時：3 月 26 日 12:02～ 総合学習プラザ B04 会場

scyllo-inositol dehydrogenase アラニン変異体の基質特異性解析

Alanine-substituted *scyllo*-inositol dehydrogenase altered the substrate specificity

○鈴木 麻佑[1]、佐々木 康幸[2]、伊藤 晋作[2]、中村 顕[3]、矢嶋 俊介[2] ([1]東京農業大院農、[2]東京農業大生命、[3]筑波大生命)
○Mayu Suzuki[1], Yasuyuki Sasaki[2], Shinsaku Itou[2], Akira Nakamura[3], Shunsuke Yajima[2] ([1]Graduate School of Tokyo Univ of Agriculture, [2]Tokyo Univ of Agriculture, [3]Univ of Tsukuba)

【背景･目的】

L-glucose は、D-glucose とは異なり自然界にほとんど存在せず、長らく L-glucose を資化できる生物は存在しないと考えられていた。しかし、近年 L-glucose を資化可能な微生物が複数単離された。その中の一つである *Paracoccus laeviglucosivorans* から、NAD^+依存的に L-グルコースを酸化する活性を有する *scyllo*-inositol dehydrogenase (Pl-sIDH)が同定された。生物が栄養源とすることが無いとされていた L-グルコースと反応することから、その反応の仕組みを解明することで、糖と酵素の反応における新たな知見が得られると考えられた。我々は既に、野生型 Pl-sIDH の立体構造をすでに報告している。その結果から、活性部位の入り口付近にある 178 番目のアルギニン残基が基質結合に重要な役割を果たしていることが示唆された。そこで今回、そのアルギニン残基の役割を明らかにすることを目的とし、そのアラニン置換変異体を作成し、立体構造解析を行った。また基質となることが既に明らかとなっている L-glucose 、*myo*-inostol との三者複合体の立体構造解析も行った。同時に L-glucose、D-glucose、*scyllo*-inositol、*myo*-inositol との活性測定を試み、比較を行った。

【方法】

Paracoccus. laeviglucosivorans 株由来の *lgdA* 遺伝子に C 末端に 6xHis-tag をつけた遺伝子を pET21a(+)に組み込み、 *Escherichia coli* BL21(DE3)に導入した株を用いた。精製タンパクを濃縮し、ハンギングドロップ蒸気拡散法により 20°C で結晶を得た。約 5 日で 250 μm ほどの菱形の結晶が得られた。X 線照射実験は Photon Factory の BL17A にておこなった。空間群は野生型と同様の $P2_12_12_1$ であった。その後のモデリングおよび構造精密化には、ArpWarp, Refmac5, Coot を用い、最終的に 2.1 Å 分解能で構造を得ることに成功した。酵素活性測定は、生成する NADH の量の変化を波長 340 nm にて吸光度を計測することによって行った。

【結果】

R178A 変異体と野生型との間で大きな構造の変化は見られなかったが、基質結合部位にて L-glucono-1,5-lactone では結合の様式は変化しなかったが、*myo*-inositol では結合の様式が変化することが判明した。活性測定でも同様に、野生型では最も高い活性を示す *scyllo*-inositol や *myo*-inositol で活性が著しく下がった一方で、同じく高い活性が見られた L-glucose は変異体では野生型とほぼ同じ程度の活性を示した。

chiral conformation, sugar metabolism, x-ray crystallography

講演番号：2B04p01
講演日時：3 月 26 日 13:50～ 総合学習プラザ B04 会場

麹菌界面活性蛋白質ハイドロフォビン RolA の自己組織化構造形成過程の可視化・解析

Visualization and analysis of self-assembled process of *Aspergillus oryzae* hydrophobin RolA

○寺内 裕貴[1]、齋藤 有美[1]、田中 拓未[1]、三ツ石 方也[2]、藪 浩[3]、吉見 啓[4]、七谷 圭[1]、阿部 敬悦[1,4] ([1]東北大農、[2]東北大・多元研、[3]東北大・材料研、[4]東北大・未来研)
○Yuki TERAUCHI[1], Yumi SAITO[1], Takumi TANAKA[1], Masaya MITSUISHI[2], Hiroshi YABU[3], Akira YOSHIMI[4], Kei NANATANI[1], Keietsu ABE[1,4] ([1]Tohoku Univ., [2]Tohoku Univ. IMRAM, [3]Tohoku Univ. AIMR, [4]Tohoku Univ. NICHe)

【目的】糸状菌が特異的に分泌する低分子界面活性蛋白質ハイドロフォビンは、保存された 8 個のシステイン残基からなる 4 つの S-S 結合を有し (システインループ)、固体表面に吸着して β-アミロイド様の棒状自己組織化構造 rodlet を形成する。麹菌 *Aspergillus oryzae* ハイドロフォビン RolA は生分解性ポリエステル polybutylene succinate-*co*-adipate (PBSA) に吸着し、その後 PBSA 分解活性を持つ酵素クチナーゼ CutL1 と相互作用して CutL1 を PBSA 表面に濃縮することで PBSA 分解を促進する [1)]。ハイドロフォビンが固体表面吸着後に形成する自己組織化構造や生物学的機能については研究されてきているが、自己組織化の分子機構に関する研究はシステインループ中のアミノ酸配列の関与が示唆されている他は不明である。また、我々は 固体表面に吸着した RolA と CutL1 の相互作用が主にイオン的相互作用に依存することを明らかにしたが [2)]、一方で、CutL1 が固体表面上の RolA 自己組織化膜を通り抜けて下層の固体基質に到達する分子機構は未だ不明である。本報告では、RolA-CutL1 間相互作用の分子機構の可視化を目指すため、まず、界面化学的手法を用いて RolA の自己組織化の過程を可視化・解析することを目的とした。
【方法】RolA を *A.oryzae* を用いて組換え体として分泌生産させ、カラムクロマトグラフィーにより精製した。精製 RolA を用いて、空気-液体界面膜 (Langmuir 膜； L 膜) を pH5 条件下で作製し、RolA L 膜の膜表面圧の変化および弾性率の変化から、RolA の自己組織化構造形成過程を解析した。次に、各相転移前後の RolA L 膜を、UV-O_3 洗浄で親水化した SiO_2 基板またはシランカップリング剤で疎水化した SiO_2 基板に転写して、原子間力顕微鏡 (AFM) で RolA L 膜を観察した。また、転写した RolA L 膜の水静止接触角を測定することで、RolA L 膜の親水性・疎水性の変化を評価した。
【結果・考察】RolA L 膜の膜表面圧および弾性率の変化の解析から、RolA は 2 段階の相転移を経て緻密な自己組織化膜を形成することが示唆された。さらに、親水化 SiO_2 基板に転写した RolA L 膜の AFM 観察結果から、RolA L 膜が気体膜から液体膜、固体膜への相転移を経て、自己組織化して緻密な rodlet 膜を形成することが判明した。しかし、疎水化 SiO2 基板に転写した RolA L 膜では、rodlet とは異なる棒状構造が観察された。このことから、RolA L 膜には、空気側に接する層と液体側に接する層の 2 種類の層が存在し、それらの層を構成する RolA の複合体構造が異なることが示唆された。

1) Takahashi T. et al. *Mol Microbiol* 57:1780-96, 2005
2) Takahashi T. et al. *Mol Microbiol* 96:14-27, 2015

hydrophobin, Langmuir film, atomic force micriscopy

発表責任者：寺内裕貴（yuki.terauchi.s8@dc.tohoku.ac.jp）

講演番号：2B04p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ 総合学習プラザ B04 会場

SH-SY5Y 細胞のキノリン酸刺激によるアポトーシスと核小体タンパク質 B23 の動態
Regulation of B23 and apoptotic activity on quinolinic acid stimulation in SH-SY5Y cells
○西尾 昌洋、鬼頭 健斗、栗谷 健志、梅川 逸人（三重大院生物資源）
○Masahiro NISHIO, Kento KITO, Kenji KURIYA, Hayato UMEKAWA (Grad. Sch. Bioresources, Mie Univ.)

【目的】
核小体タンパク質 B23 は増殖細胞で発現が多く見られ，増殖細胞でのアポトーシスにおける B23 の関与は報告されている。しかし，神経細胞等の非増殖細胞での B23 とアポトーシスの関係性の報告はほとんどされていない。今回，キノリン酸:QA 刺激を介した Ca^{2+}-チャネルの活性化とそれに引き続きおこる p38 MAPK の活性化（リン酸化）と神経細胞死（アポトーシス）における B23 の役割を明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】
ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y をレチノイン酸によりニューロンへ分化させ，100 μM QA 刺激による B23 の発現と p38 のリン酸化（p-p38）を検討した。QA 刺激により，p-p38 量が非刺激群と比較して有意に増加しており，アポトーシスを誘導していた。
B23 の Thr199→Ala 変異体あるいは intact B23 を SH-SY5Y に導入し，非導入群と比較検討したところ，p-p38 量は，intact B23 群と非導入群において有意に増加した。B23 の Thr199 のリン酸化は p38 のリン酸化を control 群と比較して有意に抑制した。B23 の Thr199 のリン酸化が QA 刺激によるアポトーシスと関係性があることが示唆された。SH-SY5Y の QA 刺激群は非刺激群と比較して B23 の発現量が細胞質では有意に増加し，核質では有意に減少した。
レチノイン酸刺激をした SH-SY5Y を QA でアポトーシスを誘発させた際，核小体タンパク B23 の Thr199 がリン酸化され， 核質から細胞質に局在変化することでアポトーシスに対して抵抗性を示すことが考えられた。

B23/Nucreophosmin, neuronal cell, quinolinic acid

発表責任者：西尾　昌洋（nishio@bio.mie-u.ac.jp）

講演番号：2B04p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ 総合学習プラザ B04 会場

TGF-β シグナル伝達因子 SMAD2 および SMAD3 の MH2 ドメインにおける性質比較

Characteristics of MH2 domains of SMAD2 and SMAD3 in TGF-β signaling

○楠林 和貴[1]、宮園 健一[1]、伊藤 友子[1]、栗崎 晃[2,3]、浅島 誠[2]、田之倉 優[1] ([1]東大農、[2]産総研、[3]奈良先端大バイオサイエンス)

○Kazuki KUSUBAYASHI[1], Ken-ichi MIYAZONO[1], Tomoko ITO[1], Akira KURISAKI[2,3], Makoto ASASHIMA[2], Masaru TANOKURA[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]AIST, [3]NAIST)

あらゆる生命現象には多種多様なタンパク質の作用が密接に関係している。例えば、サイトカインは細胞から分泌される低分子のタンパク質で、細胞の様々な機能を調節する作用を持つ。細胞の増殖や分化に関わるサイトカインとして、Transforming growth factor (TGF) -β スーパーファミリーが存在する。TGF-β はこのファミリーに属するサイトカインのひとつで、細胞内ではそのシグナルは転写因子 SMAD2 及び SMAD3 (SMAD2/3) を介して伝達される。細胞外の TGF-β が細胞膜上のセリン/スレオニンキナーゼ型受容体に結合すると、細胞質内の SMAD2/3 の C 末端 Ser のリン酸化が誘導される。このリン酸化によって活性型となった SMAD2/3 は細胞質内の SMAD4 と 2:1 の複合体を形成し、核内へ移行する。SMAD 複合体は核内の様々な転写因子、コアクチベーターやコリプレッサーと会合することが知られており、この組み合わせで幅広い種類の遺伝子発現を制御し、多種多様な生命現象をコントロールしている。しかしながら、細胞内における TGF-β シグナル伝達の詳細は未だ不明な点も多い。

細胞内 TGF－β シグナル伝達のハブタンパク質として機能する SMAD2/3 は、生物種間で保存された 2 つのドメインを持つ。一つは、N 末端側に保存された、配列特異的な DNA 結合能を有する MH1 ドメインで、もう一つは、C 末端側に保存された、タンパク質分子間相互作用にかかわる MH2 ドメインである。SMAD2/3 は MH2 ドメインを利用し、SMAD4 と結合する。SMAD2 および SMAD3 の MH1 ドメインは、その DNA 結合能に違いが存在することがすでに知られていたが、アミノ酸配列の相同性が SMAD2 および SMAD3 の間で 96%である MH2 ドメインは、ほぼ同じ機能を持つと考えられてきた。しかしながら本発表では、これらの SMAD2 および SMAD3 の MH2 ドメインの物性に確かな差があることを報告する。

本研究では SMAD2 及び SMAD3 の MH2 ドメインの大量発現および精製を行い、これらのタンパク質を用いて、熱変性実験、ゲル濾過クロマトグラフィー、及び SMAD4 との結合実験を行った。ゲル濾過実験では、SMAD2 の MH2 ドメインは SMAD3 の MH2 ドメインよりも自己三量体形成能が高いことが示された。一方、SMAD4 との結合力は、SMAD3 の MH2 ドメインが SMAD2 のそれよりも三倍近く強く結合することが示された。熱変性実験では、SMAD2 の MH2 ドメインは SMAD3 の MH2 ドメインよりも熱安定性が高いことが示されており、この動的揺らぎの差異によって、SMAD2/3 の多量体形成能が変化することが予想される。SMAD2/3 の多量体形成は、細胞内 TGF-β シグナルを理解する上で欠かせない情報である。本研究の成果は、SMAD2 及び SMAD3 の MH2 ドメインの間で異なるわずか数残基の違いでも、SMAD2 及び SMAD3 の機能が巧みに調節されている可能性を示唆している。

TGF-β, Smad, cell signaling

発表責任者：宮園健一（amiyaz@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2B04p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ 総合学習プラザ B04 会場

抗真菌性ディフェンシンにおけるアポトーシス誘導機構の解析
Analysis of apoptosis induction mechanism in antifungal defensin
○落合 秋人[1]、小川 広大[1]、田中 孝明[1]、提箸 祥幸[2]、谷口 正之[1]([1]新潟大・自然研、[2]農研機構・北農研)
○Akihito OCHIAI[1], Kodai OGAWA[1], Takaaki TANAKA[1], Yoshiyuki SAGEHASHI[2], Masayuki TANIGUCHI[1] ([1]Grad. Sch. of Sci. Technol., Niigata Univ., [2]NARO Hokkaido Agr. Res. Cent.)

【目的】ディフェンシンは、先天性免疫系において機能する抗菌ペプチド質の一種である。我々は、これまでの研究において、長い食経験を持つイネからヒト病原性真菌 *Candida albicans* に対して強力な抗真菌活性を発揮するディフェンシン OsAFP1 を見出した。免疫染色解析および細胞膜を構成する脂質との結合性を検証する PIP Strip による解析から、OsAFP1 は *C. albicans* の細胞膜成分の一つであるフォスファチジルイノシトールリン酸(PIP)と相互作用することが示唆された。また、OsAFP1 処理した細胞においてポリカスパーゼが活性化されていたことから、OsAFP1 はアポトーシスを引き起こすことにより殺菌的に作用することがわかった。本研究では、蛍光観察法によりカスパーゼの活性化を評価し、アポトーシス誘導における主要経路を明らかにした。また、X線結晶構造解析により OsAFP1 の立体構造を決定し、PIP の認識機構を解析した。
【方法と結果】本研究で使用する OsAFP1 は、大腸菌発現系を用いて組換えタンパク質として調製した。まず、アポトーシス経路において開始型として機能するカスパーゼ 8 および 9、実行型として機能するカスパーゼ 3 の活性化を評価した。*C. albicans* 細胞（OD_{650} = 0.01）に終濃度 16 μM の OsAFP1 を処理し、各カスパーゼと結合する FLICA (Fluorescent-Labeled Inhibitor of Caspases)を処理後、蛍光顕微鏡を用いて観察した。その結果、カスパーゼ 9 および 3 の蛍光が強く観察され、カスパーゼ 8 の蛍光がほとんど観察されなかったことから、OsAFP1 は内因性経路によってアポトーシスを誘導することが示唆された。次に、500 種類以上の結晶化条件をスクリーニングすることにより、ポリエチレングリコール 3350 を含む条件下において針状の OsAFP1 結晶を得た。X線結晶構造解析の結果、OsAFP1 は植物のディフェンシンで高度に保存されたシステイン安定化αβ構造を有し、馬蹄形状の二量体構造を示すことを明らかにした。SDS-PAGE 解析により、架橋剤処理後の OsAFP1 は二量体を形成していた。そのため、OsAFP1 は二量体を形成することにより機能を発揮すると考えられた。また、二量体の間隙に結晶化条件に含まれるリン酸分子が結合しており、この部位に PIP が結合することが示唆された。

1) A. Ochiai *et al.*, *Scientific Reports*, 8, 11434 (2018)

defensin, Candida albicans, antifungal peptide

発表責任者：落合秋人（ottie@eng.niigata-u.ac.jp）

講演番号：2B05a01
講演日時：3 月 26 日 09:30～ 総合学習プラザ B05 会場

抗生物質 resormycin 生合成遺伝子群の同定および機能解析
Identification and functional analysis of resormycin biosynthetic gene cluster
○茅根 千湖[1]、山中 一也[2]、五十嵐 雅之[3]、濱野 吉十[1]、丸山 千登勢[1]([1]福井県大院・生物資源、[2]関西大・化生工、[3]微化研)
○Yukiko CHINONE[1], Kazuya YAMANAKA[2], Masayuki IGARASHI[3], Yoshimitsu HAMANO[1], Chitose MARUYAMA[1] ([1]Fukui Pref. Univ., [2]Kansai Univ., [3]BIKAKEN)

［**目的**］放線菌 *Streptomyces platensis* MJ953-SF5 によって生産される resormycin[1] (RSM)は 3 残基の非タンパク性アミノ酸（phenylalanine 類縁体、hydroxy-valine、β-homolysine (β-hLys)）からなるトリペプチド化合物であり、植物病原性真菌に特異的な抗真菌活性を有する。構成成分の一つであるβ-hLys は医薬品中間体として有用であり、有機合成品が既に市販されているが、天然物としてβ-hLys を含む化合物は RSM およびその類縁化合物以外に見つかっておらず、その生合成機構には大変興味が持たれた。そこで本研究では、RSM の生合成遺伝子群の同定およびβ-hLys 生合成経路の解明を目的とした。
［**方法と結果**］*S. platensis* MJ953-SF5 ゲノム情報の antiSMASH 解析によって見出した約 50 kbp の遺伝子群を TAR 法[2]にてクローニングし、放線菌を宿主とした異種発現を試みたところ、RSM の生産が確認された。したがって、本遺伝子群には RSM 生合成に関わる全ての遺伝子セットが含まれていることを明らかにした。次に、本遺伝子群が有する非リボソーム型ペプチド合成酵素(NRPS)の adenylation domain (A domain)について、組換え酵素を用いて基質特異性を調べた結果、3 つの A domain のうちの 1 つがβ-hLys を特異的にアデニル化することが判明した。以上のことから、RSM のペプチド構造は NRPS によって形成されること、また、β-hLys はペプチド構造が形成される前に、前駆体として生合成されることが明らかになった。そこで次に、β-hLys の生合成遺伝子候補を探索したところ、lysine-2,3-aminomutase に相同性を示す *orf10* の他に明らかな候補遺伝子は見出せなかった。しかし、agmatine から putrescine を生成する agmatinase に相同性を示す *orf14* を見出した。そこで、agmatine の前駆体である arginine のラベル体([U-^{13}C]-L-Arg)を用いた添加実験を行ったところ、興味深いことに、生産された RSM に putrescine の炭素数と一致する 4 Da の分子量増加が確認された。さらに Orf14 組換え酵素を用いた *in vitro* 反応においても、agmatine から putrescine の生成が観察されたことから、β-hLys の炭素骨格の一部 は、putrescine に由来することが判明した。また、*orf14* の近傍には、valine から leucine への炭素骨格形成に関わる酵素遺伝子のホモログが見出され、これら遺伝子群が putrescine からβ-hLys への炭素骨格形成を触媒することが予想された。本発表では、これら遺伝子の破壊実験および組換え酵素を用いた酵素反応の結果について紹介する。
［**文献**］[1] M. Igarashi *et al., J. Antibiot. Tokyo,* 50(12): 1020-1025 (1997).
[2] K. Yamanaka *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 111:1957-1962 (2014)

β-homolysine, biosynthesis, antibiotics

発表責任者：丸山千登勢（c-maruyama@fpu.ac.jp）

講演番号：2B05a02
講演日時：3 月 26 日 09:41～ 総合学習プラザ B05 会場

細胞膜透過に寄与する抗生物質 streptothricin の oligo(β-Lys)構造
Cell membrane permeability of the oligo(β-Lys) moiety in streptothricin
○兼田 康平[1]、武内 大和[1]、加藤 康夫[2]、丸山 千登勢[1]、濱野 吉十[1]([1]福井県大院・生物資源、[2]富山県大・生医工研セ)
○Kohei KANEDA[1], Yamato TAKEUCHI[1], Yasuo KATO[2], Chitose MARUYAMA[1], Yoshimitsu HAMANO[1] ([1]Fukui Pref. Univ., [2]Toyama Pref. Univ.)

【目的】放線菌 *Streptomyces rochei* NBRC12908 によって生産される streptothricin（ST）は、その側鎖構造に β-lysine（β-Lys）あるいは 2~7 残基の β-Lys がイソペプチド結合で直鎖状に結合した oligo(β-Lys) 構造を持つ抗生物質である（*J. Bacteriol.,* 46, 299, 1943）。ST は原核生物と真核生物の両者に生育阻害活性を示すため医薬品として利用されておらず、また oligo(β-Lys) のペプチド鎖長が長くなるほど、細胞毒性が強くなることも知られている。我々はこれまでの研究によって、oligo(β-Lys) 構造自体には毒性がないことを明らかにしていることから、ポリカチオン性ペプチドである oligo(β-Lys) 構造が ST の細胞膜透過性に寄与する構造モチーフであると考えている。そこで本研究では、ST 生合成酵素を利用して oligo(β-Lys) の誘導体を合成し、oligo(β-Lys) 構造の細胞膜透過性について検証した。
【方法と結果】oligo(β-Lys) 構造の細胞膜透過性を検証するためには著量の oligo(β-Lys) が必要である。しかし、有機化学的な手法で oligo(β-Lys) を合成するためには保護基を多用した高度な合成技術が必要である。そこで、本研究では oligo(β-Lys) の生合成酵素の一つである Orf19 の応用利用による著量合成を検討した。ST の生合成において、Orf19 はフリーの β-Lys（伸長基質）と Orf18 に phosphopantetheine 基（PPT 基）を介して結合した β-Lys（アクセプター基質）を基質としてペプチド合成（オリゴマー化）を触媒する（*Nat. Chem. Biol.,* 8, 791, 2012）。そこで、アクセプター基質（β-Lys-PPT-Orf18）の構造アナログとして、β-Lys-PEG_3-azide を用いて酵素反応を行ったところ、興味深いことに、β-Lys のオリゴマー合成活性を検出した。さらに、アクセプター基質として β-homoLys-PEG_3-azide、α-Lys-PEG_3-azide を用いて酵素反応を行ったところ、β-homoLys-PEG_3-azide を用いた場合に最も効率よく β-Lys の鎖長伸長が起こった。また、α-Lys-PEG_3-azide を用いた場合にオリゴマー合成活性がほとんど確認できなかったことから、アクセプター基質の β-amino 基が Orf19 のオリゴマー合成活性において重要であることが示唆された。さらに、酵素反応の至適条件を確立することで、azide 基を有する oligo(β-Lys)$_n$-PEG_3-azide を著量合成することができた。合成した oligo(β-Lys)$_n$-PEG_3-azide についてペプチド鎖長ごとに分離精製し、azide 基を利用したクリックケミストリーで蛍光色素（FAM）標識を行った。そして、それぞれの化合物を用いて、HeLa 細胞への取り込み実験を行ったところ、4 mer 以上の oligo(β-Lys) は高い細胞膜透過性を示し、β-Lys のペプチド鎖長が長くなるほど細胞膜透過性が向上することを明らかにした。以上の結果から、ST の oligo(β-Lys) 構造が ST の細胞膜透過性に寄与している構造モチーフであることが判明した。

nrps, cell penetrating peptide, amino-acid polymer

発表責任者：濱野吉十（hamano@fpu.ac.jp）

講演番号：2B05a03
講演日時：3 月 26 日 09:52～ 総合学習プラザ B05 会場

放線菌 *Streptomyces celluloflavus* における poly-L-diaminobutyric acid 生合成機構の解析
Biosynthesis of poly-L-diaminobutyric acid in *Streptomyces celluloflavus*

○山中 一也[1]、轟 万悦子[1]、竹原 宗範[2]、濱野 吉十[3]、老川 典夫[1] ([1]関西大・化生工、[2]滋賀県大・工、[3]福井県大・生物資源)
○Kazuya YAMANAKA[1], Maeko TODOROKI[1], Munenori TAKEHARA[2], Yoshimitsu HAMANO[3], Tadao OIKAWA[1] ([1]Kansai Univ., [2]Univ. Shiga Prefecture, [3]Fukui Prefectural Univ.)

【緒言】これまでに天然から見出されるカチオン性ホモポリアミノ酸としては、数種の *Streptomyces* 属放線菌が生産するε-poly-L-lysine (Poly-L-Lys)、その類縁体である poly-L-diaminopropionic acid (Poly-L-Dap)、 poly-L-diaminobutyric acid (Poly-L-Dab)、及び D 体の Dab のみから構成される Poly-D-Dab の僅か 4 例が報告されているに過ぎない。これらに加えて、我々はゲノムマイニングによる新規類縁ポリアミノ酸探索研究の過程で、天然物としては 5 例目となる L-β-Lys を構成残基とする新規カチオン性ポリアミノ酸 Poly-L-β-Lys を見出している。これらのカチオン性ポリアミノ酸は、何れも極めて強い抗菌活性や細胞膜透過性を示すことから、抗菌剤やドラッグデリバリーキャリアとしての応用が期待でき、更にそれらの生合成酵素及び遺伝子もまた、新規バイオポリマー創生を目指した生合成工学へも応用できる期待度の高い素材であると言える。しかしながら、Poly-L-Lys と Poly-L-Dap を除いてその生合成酵素及び遺伝子は未同定なままであった。そこで本研究では､Poly-L-Lys に加えて著量の Poly-L-Dab を生産する放線菌 *Streptomyces celluloflavus* USE31 株における Poly-L-Dab 生合成酵素の同定を試みた。

【方法】Poly-L-Dab はその構造的特徴から Poly-L-Lys と同様に膜結合型の NRPS 様酵素 Pls のホモログによって生合成されると予想された。そこでまず初めに *S. celluloflavus* ゲノムデータから Pls ホモログを探索した。次に候補 Pls ホモログにおいて基質アミノ酸の活性化及びポリマーへの取り込みを担うアデニル化（A-）ドメインのみを大腸菌を宿主として組換え酵素として調製し、その基質特異性を解析した。更に推定生合成酵素遺伝子破壊株を造成し、ポリアミノ酸生産に与える影響を解析した。

【結果及び考察】*in silico* 解析の結果、*S. celluloflavus* ゲノム上には 2 つの Pls ホモログがコードされており、その一方は周辺の遺伝子配置から Poly-L-Lys 生合成に、もう一方はエクトイン生合成に見られる L-Dab 生合成関連酵素遺伝子とクラスターを形成していたことから Poly-L-Dab 生合成に関与すると推定された。そして実際に、組換え酵素として調製した両 Pls ホモログの A-ドメインはそれぞれ L-Lys 及び L-Dab を最良の基質として認識し、更に両 *pls* ホモログ遺伝子の破壊は、それぞれ対応するポリアミノ酸生産の完全な消失を導いた。以上の研究により、*S. celluloflavus* において Poly-L-Lys 及び Poly-L-Dab の生合成を担う Pls ホモログ及びその遺伝子を同定することに成功した。

Poly-amino acid, Biosynthesis, Non-ribosomal peptide

発表責任者：山中　一也（kazuyay@kansai-u.ac.jp）

講演番号：2B05a04
講演日時：3 月 26 日 10:03～ 総合学習プラザ B05 会場

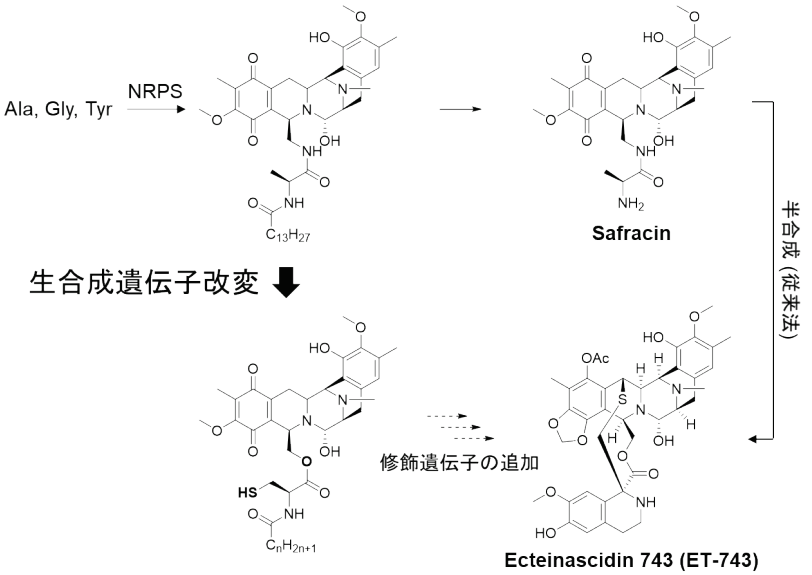
海洋性難培養微生物が生産する有用物質の異種生産技術に関する研究

Heterologous production of bioactive compounds produced by marine-derived unculturable microorganisms

○工藤 慧[1]、西田 みち代[2]、酒井 紀子[2]、末永 光[1]、池田 治生[3]、新家 一男[1,4]([1]産総研、[2]次世代天然物化学技術研究組合、[3]北里大生命研、[4]東大生物工学セ)
○Kei KUDO[1], Michiyo NISHIDA[2], Noriko SAKAI[2], Hikaru SUENAGA[1], Haruo IKEDA[3], Kazuo SHIN-YA[1,4] ([1]AIST, [2]N2PC, [3]Kitasato Univ., [4]UTokyo)

有用な天然化合物の発酵生産法の確立は、安定供給や誘導体展開にあたって極めて重要な課題の一つである。抗がん薬として上市されている天然化合物 ecteinascidin 743 (ET-743、商品名 Yondelis) は、群体ホヤに共生する難培養微生物が生産者であることが示唆されており、従来の発酵法では化合物供給は不可能である。現在、半合成法によって供給されているが、その収率は極めて低く、医薬品供給のボトルネックとなっている。我々は、*Pseudomonas* 属細菌由来の safracin 生合成遺伝子クラスターを用い、生合成遺伝子の改変と、不足している ET-743 生合成遺伝子を補填することで人工生合成遺伝子クラスターを構築し、ET-743 の異種発現系の構築を目指している。

はじめに土台となる safracin 異種生産株を樹立した。まず、safracin を生産する *Pseudomonas* のゲノム配列を決定し、既知の safracin 生合成遺伝子と非常に高い相同性を示す領域を同定した。次に同菌株のゲノム DNA から染色体組込み型 BAC ベクターを用いてライブラリーを構築し、safracin 生合成遺伝子クラスター全長を含むクローンを取得した。このクローンを染色体改変した *Pseudomonas putida* KT2440 に導入することで、safracin 類の異種生産を確認した。さらに、非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS) を含むオペロンのプロモーターを交換すること によって生産性を向上させることができた。現在 NRPS の遺伝子改変に着手している。



ecteinascidin, safracin, marine natural product

発表責任者：新家一男（k-shinya@aist.go.jp）

講演番号：2B05a05
講演日時：3 月 26 日 10:14～ 総合学習プラザ B05 会場

BAC を利用した 200 kb を超える quinoliidomicin 生合成遺伝子クラスターの異種発現
Heterologous expression of biosynthetic gene cluster of quinolidomicin over 200 kb using BAC vector.

○橋本 拓哉[1]、橋本 絢子[2]、小曽根 郁子[2]、酒井 紀子[3]、高橋 俊二[4]、池田 治生[5]、新家 一男[1]（[1]産総研・創薬基盤、[2]JBIC、[3]天然物組合、[4]理研 CSRS・天然物生合成、[5]北里大・北里生命科学研）
○ Takuya HASHIMOTO[1], Junko HASHIMOTO[2], Ikuko KOZONE[2], Noriko SAKAI[3], Shunji TAKAHASHI[4], Haruo IKEDA[5], Kazuo SHINYA[1] ([1]AIST, [2]JBIC, [3]NNPC, [4]RIKEN, [5]Kitasato Univ.)

【背景と目的】

微生物の二次代謝産物生合成遺伝子はその多くがゲノム上で遺伝子クラスターとなって存在しており、I 型ポリケチド化合物の生合成遺伝子クラスターでは 100 kb を超える物も多数存在することが知られている。このような巨大な二次代謝産物生合成遺伝子群の全長を一挙に取得するため、我々は BAC (Bacterial Artificial Chromosome) ベクターを利用した DNA ライブラリーの調製法を開発し、目的のクローンを適切な宿主に導入することで生合成遺伝子クラスターの異種発現を行ってきた（異種発現実験のボトルネックのひとつは BAC のクローニングサイズ）。BAC を利用したクローニング技術のサイズの限界を検討するため、陸上微生物由来で最も大きいラクトン骨格を有する 60 員環マクロライド化合物 quinolidomicin A_1 の 200 kb を超える生合成遺伝子クラスターを取得し、その異種発現を試みた。

【方法と結果】

Quinolidomicin A_1 生産菌である *Micromonospora* sp. AK-AN57 株のゲノムシーケンスを行い、ゲノム上に 13 の PKS 遺伝子を含む遺伝子群を見出した。周辺遺伝子の詳細な機能推定から本クラスターのサイズは 214 kb 前後と見積もった。本クラスターを含む領域の取得のため、染色体組込み型 BAC ベクターpKU518 を用いてインサート長が 250 kb 程度の DNA ライブラリーを調製し、クラスター領域を含む BAC クローン pKU518quiP9-L5 を取得した。本 BAC クローンを宿主放線菌である *Streptomyces lividans* TK23Δ*redDX* 株へと導入した。形質転換体の培養抽出物を LC/MS にて分析したが化合物の生産は確認できなかったため、本クラスター内の遺伝子を見直した。その結果、正の転写制御因子と考えられる、LuxR type regulator と相同性を示す 2 つの遺伝子、*qnmRI*、*RII* が本クラスター内に並んでいることを見出した。これらの転写因子をクローニングし、形質転換体で強制発現させた結果、quinolidomicin A_1 の生産を確認することができた。質量分析から得られた quinolidomicin A_1 の推定組成式 $C_{83}H_{133}NO_{22}S$ は野生株の値と一致したが、報告されていた組成式 $C_{83}H_{132}O_{23}S$ とは不一致だった。そこで野生株から精製した quinolidomicin A_1 について ^{1}H-^{15}N HMBC 測定を行った。その結果、71 位のプロトンから ^{1}H-^{15}N の相関ピークが検出されたことから、発色団の 70 位の水酸基がアミノ基に置き換わった訂正構造を提示した。以上の結果から、200 kb を超える遺伝子クラスターについても、BAC ベクターの利用によって完全長の遺伝子クラスターをクローン化できることを明らかにした。

Streptomyces, BAC, polyketide

講演番号：2B05a06
講演日時：3 月 26 日 10:35～ 総合学習プラザ B05 会場

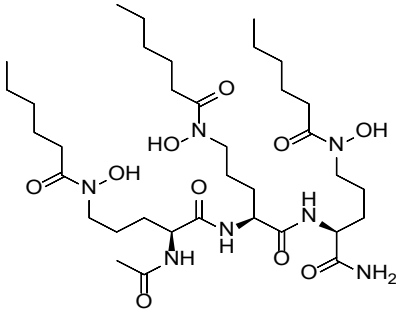
キノコ形成促進物質 coprinoferrin の担子菌における普遍性証明と生合成解明

Study of mushroom-forming bolster coprinoferrin uncovering biosynthesis and broadened distribution in Basidiomycota

○高西 潤[1]、桝谷 貴洋[1]、恒松 雄太[1]、礒谷 智輝[2]、早川 一郎[2]、坂倉 彰[2]、渡辺 賢二[1]([1]静岡県大薬、[2]岡山大院自然)
○Jun TAKANISHI[1], Takahiro MASUYA[1], Yuta TSUNEMATSU[1], Tomoki ISOGAI[2], Ichiro HAYAKAWA[2], Akira SAKAKURA[2], Kenji WATANABE[1] ([1]Univ. of Shizuoka, [2]Okayama Univ.)

【目的】キノコ(担子菌類)は他の生物種とは異なるユニークな二次代謝産物を生産することが知られている。しかし、キノコのゲノム情報が解読されるにつれ、既にキノコより単離されている二次代謝産物よりも多くの二次代謝産物生合成遺伝子がゲノム中に存在すると示唆されたため、多くの生合成遺伝子は休眠型であると考えられた。これら休眠型生合成遺伝子を強制的に発現させることで、構造新規な二次代謝産物の獲得が期待される。実際に我々はウシグソヒトヨタケ *Coprinopsis cinerea* の生合成遺伝子の発現量を抑制するグローバルレギュレーター遺伝子である CC1G_00498 遺伝子(*Cc1aeA*)を破壊することで二次代謝系を撹乱し、新規化合物 coprinoferrin(CPF)の取得に成功した。また CPF 生合成遺伝子（*cpf1*）の破壊を通じて CPF が *C. cinerea* の菌糸成長・子実体形成促進に関与していることを前回大会（2019 年度東京大会）にて報告した。非リボソーム性ペプチド合成酵素遺伝子（CC1G_04210）をコードする *cpf1* は、その相同性検索の結果から、200 種類以上の担子菌類で高度に保存されており、その中には私たちが普段から食するマイタケやブナシメジなども含まれていた。そこで本研究では担子菌における CPF の存在及び生理機能の普遍性の確認を行った。加えて *cpf1* 以外の CPF 生合成遺伝子の働きを解明することを目指し、*cpf1* 周辺の遺伝子破壊を行った。

【方法・結果】食品として市販されているブナシメジやシイタケなど計 10 種類のキノコをメタノールで抽出し、LC-MS 分析にて CPF の生産確認を行った。するとブナシメジ、しいたけ、マイタケなどより CPF 及び CPF の鉄結合体の生産が確認された。また *cpf1* 近傍に存在する遺伝子、例えば lysine/ornithine *N*-monooxygenase 遺伝子(CC1G_04211 等の破壊株を作製し、CPF の生産確認を行った。一方、CPF の化学合成にも成功し、本合成品は天然物と同じ活性を示すことを確認した。以上より、CPF の化学構造を確定するとともに、今後の機能解明研究に重要な化合物大量供給法を樹立した。



Coprinoferrin

【考察】*Cc1aeA* の破壊により生産性が劇的に向上した CPF は多くのキノコでも同様に生産されており、キノコの成長・分化にとって重要な化合物であることが予想される。今後はこの CPF を用いてマツタケなどの難培養性のキノコの培養・栽培に役立てることができないかを検討中である。

mushroom, siderophore, biosynthesis

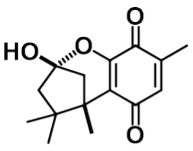
講演番号：2B05a07
講演日時：3 月 26 日 10:46～ 総合学習プラザ B05 会場

担子菌キノコを宿主とした外来遺伝子発現に基づく新規天然物生産系の確立

Establishing heterologous expression system in mushroom for engineered biosynthesis of basidiomycetous product

○浅井 しほり、恒松 雄太、高西 潤、渡辺 賢二 (静岡県大薬)
○Shihori ASAI, Yuta TSUNEMATSU, Jun TAKANISHI, Kenji WATANABE (Univ. of Shizuoka)

【目的】担子菌類は医薬品として有用な化合物を産生する。一方でそのゲノム上に多数の生合成遺伝子がコードされているものの、種によっては栽培や培養が容易でないことや、菌糸体・子実体のそれぞれの世代にて代謝産物が変動することから、天然物の探索資源として未開拓な領域が残されている。これに対し、生育が旺盛なウシグソヒトヨタケ *Coprinopsis cinerea* を宿主とし、栽培・培養の困難な担子菌の生合成遺伝子を異種発現させることができれば、生産性に乏しい代謝物の安定的な獲得や、未だ情報の少ない担子菌代謝産物の生合成経路解明につながる。我々は先行研究にてテルペン環化酵素遺伝子の過剰発現株を獲得したが、取得クローン間にて化合物生産性の不一致が確認されただけでなく、同一クローンを用いても生産性の再現性が認められず、培養・生産が安定しない点に問題を抱えていた。そこで、以下の二通りの方法で生産性の安定化および増産化を目指すとともに担子菌由来の機能未知生合成遺伝子を異種発現させることを通じて新規化合物の取得を目指した。
【方法】本研究では *C. cinerea* にテルペン環化酵素遺伝子 *cop6* を発現させ、その生産物である lagopodin B (**1**)の産生量を調べた。先行研究で構築した過剰発現カセットを用いて以下の二つの方法で生産性の安定化および増産化について検討を行った。方法①は *C. cinerea* に目的遺伝子を複数コピーにて導入する方法で、過剰発現カセットの選択マーカーのプロモーター配列を一部欠損させることで転写活性を低下させ、コピー数増加により薬剤耐性を維持させる効果を用い、形質転換体の成長速度を調べることで複数コピーが導入されたと考えられるクローンを獲得した。方法②は *C. cinerea* の染色体上の特定箇所に目的遺伝子を 1 コピーにて安定的に導入する方法で、液体培養時に転写量の多い領域を RNA-seq 解析にて見出し、この領域の非遺伝子部位に過剰発現カセットを相同組み換え法により導入した。
【結果・考察】方法①において **1** は、野生株に対し際立った生産性の増加が認められず、同一クローンを複数回培養した場合にも異なった生産性を示した。また、方法②においては、一定の割合で例外も認められたが、全体的には高い生産性を示した。これらの方法を比較すると、方法②での培養再現性および **1** の生産性が高く、クローン間での生産の差異も少なかった。今回の見出した方法は、培養再現性の低い微生物の代謝安定化に成功した点で有益であり、他の微生物研究にも応用可能と期待される。現在、方法②で同定した染色体上特定箇所に機能未知生合成遺伝子の導入を検討中である。



lagopodin B (**1**)

mushroom, heterologous expression, basidiomycete

講演番号：2B05a08
講演日時：3 月 26 日 10:57～ 総合学習プラザ B05 会場

ブテノライド型シグナル分子 SRB の生合成遺伝子破壊株における代謝産物解析
Metabolite analysis of biosynthetic gene mutants of butenolide-type signal molecules SRBs
○手島 愛子[1]、西浦 凜貴斗[1]、丸山 千登勢[2]、濱野 吉十[2]、荒川 賢治[1,3] ([1]広島大院・先端研、[2]福井県大・生物資源、[3]広島大院・統合生命)
○Aiko TESHIMA[1], Rikito NISHIURA[1], Chitose MARUYAMA[2], Yoshimitsu HAMANO[2], Kenji ARAKAWA[1,3] ([1]Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., [2]Fac. Biotechnol, Fukui Pref. Univ., [3]Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ.)

【目的】*Streptomyces rochei* 7434AN4 株は二次代謝産物として抗生物質ランカサイジン(LC)およびランカマイシン(LM)を生産し、それらの生合成はシグナル分子 SRBs(*Streptomyces rochei* butenolides)により厳密に制御されている。培養初期には SRB のレセプターSrrA が転写活性化因子 *srrY* の上流に結合して転写抑制が行なわれている。培養中期に入ると SrrX が SRB を合成し、本分子が SrrA と結合する。その結果 SRB-SrrA 複合体が遊離し *srrY* の転写が開始されることで LC 生産を誘導する。さらに、SrrY はもう一つの転写活性化因子 SrrZ のプロモーター領域に結合し、その結果 *srrZ* の転写が活性化され LM 生産が誘導される。

当研究室ではこれまでに SRB1 および SRB2 の化学構造を決定している。また、*S. rochei* の SRB 合成遺伝子 *srrX* 近傍には還元酵素遺伝子 *srrG*, リン酸化遺伝子 *srrP*, P450 水酸化酵素遺伝子 *srr0* などがコードされており、SRB 生合成に関与していると考えられた。これまでに *srr0, srrG* の機能解析を進めており、今回は中間体の取得を試みるため、遺伝子破壊株の網羅的代謝産物解析を行った。

【方法および結果】

中間体の探索を行うために親株（51252）と SRB 生合成遺伝子破壊株（Δ*srrX*, Δ*srrG*, Δ*srrP*, Δ*srr0*）について、LC-MS により代謝産物の比較解析を行った。すると、遺伝子破壊株のみでいくつかの特異的なピークが確認された。現在、分取および構造解析を進めている。

また、これまでの研究により中間体の存在が示唆されていた Δ*srrG* 株の 8L 抽出物を精製し、バイオアッセイしたところ、LC, LM 非生産であるにも関わらず阻止円が検出された。親株では LC, LM を含む fraction のみしか阻止円が検出されないことから、変異株のみで生産される抗菌物質であることが示唆された。そこで、SRB 非生産菌 Δ*srrX*, SRB 生産菌 Δ*srrY* においてもバイオアッセイを行ったところ、どちらも LC, LM 非生産であるが Δ*srrG* と同様に阻止円が検出された。特に抗菌活性の強かった Δ*srrY* (LC, LM 非生産)の抗菌物質を精製し MS 解析したところ、$C_{13}H_{24}O_4$ の化合物であることが強く示唆された。現在、NMR により構造解析を進めており、その結果も併せて報告する。

signal molecule, secondary metabolite, Streptomyces

発表責任者：手島愛子（teshima-ai@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：2B05a09
講演日時：3 月 26 日 11:08～ 総合学習プラザ B05 会場

アゾキシ化合物の生合成機構および生物活性に関する研究
Research on biosynthesis pathway and biological activity of azoxy compounds

○田中 悠[1]、達川 綾香[2]、藤田 昂大[3]、岸本 拓也[2]、福本 敦[4]、安齊 洋次郎[4]、荒川 賢治[1,2,3] ([1]広島大・工、[2]広島大院・先端研、[3]広島大院・統合生命、[4]東邦大・薬)
○ Yu Tanaka[1], Ayaka TATSUKAWA[2], Kota FUJITA[3], Takuya KISHIMOTO[2], Atsushi FUKUMOTO[4], Yojiro ANZAI[4], Kenji ARAKAWA[1,2,3] ([1]Fac. Eng, Hiroshima Univ., [2]Grad. Sch. AdSM, Hiroshima Univ., [3]Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ., [4]Toho Univ.)

【目的】

放線菌は抗生物質を含めた多種多様な二次代謝産物を生産し、ゲノム上には約 30 種類もの二次代謝生合成遺伝子群を有しているが、通常培養では 2 割程度しか生産しない。当研究室では *Streptomyces rochei* の休眠二次代謝の覚醒を目指し、主要二次代謝産物であるランカサイジン(LC)、ランカマイシン(LM)の生合成遺伝子および転写リプレッサー*srrB* に変異を加えた三重破壊株 KA57 を構築したところ、親株非生産のアゾキシアルケン化合物 KA57-A が得られた。本化合物のアゾキシ結合形成メカニズムは興味深く、さらに *Chromobacterium violaceum* の quorum sensing を阻害することも明らかとなっている。KA57-A 類縁体である Maniwamycin 生産菌の TOHO-M025 株との生合成遺伝子比較解析により、共通の遺伝子をいくつか見出した。そこで、KA57-A のアゾキシ結合生合成メカニズムの解明および生理活性の向上を指向した構造リデザインを目指した。

【方法・結果】

KA57-A は $C_{10}H_{20}N_2O_3$ のアゾキシアルケン化合物であり、標識酢酸やアミノ酸などの取り込み実験を行ったところ、本化合物の生合成起源は ①Hexylamine と Serine の縮合, ②酢酸 C-2 位で serine 分子との縮合, ③C-3 位の脱水あるいは脱リン酸を介して C-3, 4 位での二重結合の形成, ④C-4 位での還元、脱水反応, ⑤C-1', 2'位での二重結合の形成という一連の流れで生合成されることがわかった。また、KA57-A と他のアゾキシアルケン化合物である valanimycin および maniwamycin の生合成遺伝子クラスターを比較したところ、共通の遺伝子群を見いだすことができた。そこで、アゾキシ結合形成への関与が疑われる遺伝子の破壊株を構築し、代謝産物解析を行なったところ、キナーゼ、N-ヒドロキシラーゼを含む 3 つの遺伝子の破壊株において KA57-A 生産が認められず、これら遺伝子の KA57-A 生産への関与が示唆された。現在、デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の破壊を行なっている。また、この酵素発現株の構築および基質添加実験も試みており、本発表ではその経緯についても報告する。

Streptomyces, azoxyalkene, biosynthesis

発表責任者：荒川賢治（karakawa@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：2B05a10
講演日時：3 月 26 日 11:19～ 総合学習プラザ B05 会場

抗ガン活性向上を目指したランカサイジン誘導体の構造リデザインと計算機シミュレーションによる最適化

Structural redesign and computational simulation of lankacidin analogues to improve anti-tumor activity

○西浦 菜摘[1]、ムスリミン ルクマン[2]、エルレファイ モハメド[3]、森田 洋行[4]、アヨブ アフマド[5]、荒川 賢治[1,2,6] ([1]広島大・工、[2]広島大院・先端研、[3]ズウェイル市立科学技術院大学、[4]富山大院・和漢医薬学総合研究所、[5]ヘリオポリス大学、[6]広島大院・統合生命)
○ Natsumi NISHIURA[1], Rukman MUSLIMIN[2], Mohamed ELREFAIY[3], Hiroyuki MORITA[4], Ahmed AYOUB[5], Kenji ARAKAWA[1,2,6] ([1]Fac. Eng, Hiroshima Univ., [2]Grad. Sch. AdSM, Hiroshima Univ., [3]Zewail City of Science and Technology, [4]Toyama Univ., [5]Heliopolis Univ., [6]Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ.)

【目的】*Streptomyces* 属放線菌は多くの二次代謝産物を生産し、実用化されている微生物由来の約 7 割の抗生物質を生産することが知られている。放線菌 *Streptomyces rochei* 7434AN4 株は 17 員環カルボサイクリックポリケチド Lankacidin C (LC)と 14 員環マクロライド Lankamycin を生産する。

微小管安定化作用を持つ抗がん剤に着目して計算機シミュレーションを行ったところ、候補化合物 M51 が算出された(J. Mol. Graph. Model. 2013, 44, 188-96)。M51 は新規骨格であり化学合成に相応の労力を要すると考えられたため、構造重ね合わせで天然物データベースから探索したところ、LC が該当した。さらに、我々は実験的に LC の微小管安定化作用を証明した(J. Med. Chem. 2016, 59 , 9532–9540)。そこで標的化合物を LC に設定し、さらなる抗腫瘍活性向上のため、LC 誘導体を構築し、本化合物群の高機能化を目指した。

【方法・結果】まず LC の微小管安定化作用を調べたところ、IC_{50}＝200 μ M 程度の活性を示した。そこで LC を出発原料に様々な誘導体の取得を試みた。

活性発現における δ ラクトン構造の必要性を評価するため、これを有さない化合物 Lankacyclinone C の化学合成を試みた。まずは LC に対して直接脱炭酸反応を行ったところ複雑な化合物を与えた。そこで出発原料に 24 位が水酸基である Lankacidinol A を用い、メタノール中炭酸カリウムで処理することにより脱炭酸生成物 Lankacyclinol, 2-*epi*-lankacyclinol を取得した。その後、LC 生合成において Lankacidinol を LC へと最終段階の生合成するキノン要求性デヒドロゲナーゼ Orf23 を用いて Lankacyclinol の水酸基をカルボニル基に変換し、Lankacyclinone C を取得した。本化合物の抗腫瘍活性を調べたところ、活性が低減し、δ ラクトン構造が必要不可欠であると判明した。

また、計算機シミュレーションを行い、LC の 7 位水酸基誘導体化が微小管への結合アフィニティを高めることが示唆された。そこで 7 位のアセチル体を取得して活性評価したところ、計算機シミュレーションの予測と一致した。さらに、計算機シミュレーションの再評価を行ったところ、7 位を嵩高い化合物に変換すると結合活性が上がると予想された。リガンドとチューブリンの結合を強化すると予測された 3’-(4’-フルオロフェニル) プロパノイルエステルを合成した。本化合物の抗腫瘍活性を調べたところ、活性が向上し、水酸基を嵩高い置換基に変換することで活性が向上すると判明した。現在、7 位の各種エステル誘導体を用いた構造活性相関なども行っており、本発表ではその経緯について報告する。

anticancer agents, secondary metabolites, Actinomycetes

発表責任者：荒川賢治（karakawa@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：2B05a11
講演日時：3 月 26 日 11:40～ 総合学習プラザ B05 会場

typeII AmCP を介して生合成されるマレイマイシン類の生合成機構に関する研究
Studies on biosynthesis pathway by Type II Amino-group Carrier Protein in Streptomyces.
○曽根 祐輔[1]、Muhammad Prima PUTRA[1]、松田 研一[1]、葛山 智久[1,2]、古園 さおり[1,2]、西山 真[1,2] ([1]東大・生物工学セ、[2]東大・微生物イノベ連携機構)
○Yusuke SONE[1], Muhammad Prima PUTRA[1], Kenichi MATSUDA[1], Tomohisa KUZUYAMA[1,2], Saori KOSONO[1,2], Makoto NISHIYAMA[1,2] ([1]BRC, UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

好熱菌や古細菌のリジン・アルギニン生合成から見出された特殊なキャリアタンパク質（Amino-group carrier protein: AmCP）は、放線菌において二次代謝の生合成にも関与していることが明らかとなっている。これまでに知られている AmCP（type I AmCP）はいずれも、C 末端に「EDWGE」という保存されたモチーフを有しており、この C 末端にあるグルタミン酸と基質とがイソペプチド結合することによりキャリアタンパク質として機能する。しかしながら C 末端の保存モチーフが「RDWGQ」となっている特異な AmCP（type II AmCP）を発見した。さらに type II AmCP を含む遺伝子クラスターは天然では非常に珍しいマレイミド骨格を有するマレイマイシン生合成に関与していた。そこで本研究では type II AmCP を介するマレイマシンの生合成機構の解明を目指した。
type II AmCP はアミド基転移酵素の一部と相同性を示す Orf12 により C 末端のグルタミンがグルタミン酸に翻訳後修飾され活性型になると予想された。*orf12* 遺伝子破壊株を作製し代謝物の解析 LCMS を用いて解析した結果、マレイマイシンの生産が消失した。また*Δorf12* 株に対し *orf12* の遺伝子相補実験を行ったところ生産能が回復した。Orf12 は AmCP から生合成中間体の放出も担っていると予想されたことから*Δorf12* 株において Strep-tag 付き AmCP Q61E を過剰発現させ AmCP を Strep-tactin にて精製し LC-MS で解析することで AmCP 上にロードされている中間体の検出を行った。その結果、複数の中間体と予想されるスペクトルが検出された。一方野生株において AmCP Q61E を過剰発現させても中間体と予想されるスペクトルは検出されなかった。以上より Orf12 は、AmCP のグルタミンをグルタミン酸に翻訳後修飾するだけでなく AmCP からの中間体の切り離しも触媒していると推測している。さらに、各種組換えタンパク質を調製し *in vitro* 再構築を行った結果、AmCP にグルタミン酸がロードされ、さらにそのグルタミン酸のカルボキシル基がアルデヒドに変化した化合物に相当する質量を LC-MS および MS/MS で観察した。以上よりマレイマイシン類が AmCP を介して生合成され、グルタミン酸が AmCP 上にロードされアルデヒド体になることが破壊株を用いた発現と *in vitro* 反応により明らかとなった。天然物においてマレイミド骨格を有するものは数種類しか知られておらず非常に稀である。さらに、既知のマレイミド骨格を有する遺伝子群と本生合成クラスターに相同性はなかったことから新規な機構により生合成されていることが予想できる。
本発表では、他の生合成遺伝子の機能も含めてマレイマイシンの生合成に関する最新の知見について報告する。

AmCP, natural product, streptomyces

発表責任者：西山真（umanis@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2B05a12
講演日時：3 月 26 日 11:51～ 総合学習プラザ B05 会場

Serratia sp. ATCC 39006 におけるアミノ基キャリアタンパク質を介した生合成についての研究
Studies on the biosynthesis using amino-group carrier protein in *Serratia* sp. ATCC 39006

○平島 佑樹[1]、曽根 祐輔[1]、菊池 恒志郎[1]、富田 武郎[1,2]、葛山 智久[1,2]、古園 さおり[1,2]、西山 真[1,2] ([1]東大・生物工学セ、[2]東大・微生物イノベ連携機構)
○ Yuki HIRASHIMA[1], Yusuke SONE[1], Koshiro KIKUCHI[1], Takeo TOMITA[1,2], Tomohisa KUZUYAMA[1,2], Saori KOSONO[1,2], Makoto NISHIYAMA[1,2] ([1]BRC, UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

全く新しいリジン・アルギニン生合成経路が好熱菌や古細菌より見出されており、同生合成経路では基質のα-アミノ基に LysW と呼ばれるキャリアタンパク質が結合し、以降の反応が効率的に進行する。最近、放線菌 *Streptomyces* sp. SANK 60404 株において LysW と相同性を有するキャリアタンパク質 AmCP (Amino-group Carrier Protein) が新規の非タンパク質性アミノ酸である(2*S*,6*R*)-diamino-(5*R*,7)-dihydroxy-heptanoic acid (DADH) の生合成に関与し、その後 vazabitide A へと導かれることが明らかとなっている。これにより、AmCP を介した反応が二次代謝産物にも関与することが示され、天然化合物の構造多様性を創出する機構として利用されていることがわかってきている。

LysW ホモログの相同性検索の結果より、*Serratia* sp. ATCC 39006 を含む複数の細菌において DADH 生合成遺伝子のほかに 3 つの機能未知遺伝子(*ser39006_009280, ser39006_009295, ser39006_009330*) が高度に保存されているクラスターを見出した。本研究では、グラム陰性菌 *Serratia* sp. ATCC 39006 を研究対象とし、AmCP を介して生合成される代謝産物の探索およびその生合成機構の解明を目的とした。まず、本遺伝子クラスターにより DADH が合成されるかを調べるために *in vitro* 反応にて再構築をおこなった。組換えタンパク質を調製し AmCP 上の変換反応を LC-MS にて観察した。その結果、AmCP へのグルタミン酸の付加とグルタミン酸セミアルデヒド体への変換、更に C2 単位が伸長したケト体の付加が観察された。また、反応物をトリプシンによって消化し、生じたペプチドを LC-MS/MS で解析することにより、それぞれの C 末端への付加を確認した。これにより、ケト体の付加までの反応は DADH と同様に反応したがその後のアミノ基転移および AmCP 上からの切り離しが観察されなかったことから、本遺伝子クラスターは DADH とは異なる化合物を生産すると予想している。そこで、大腸菌内での異種発現系を構築し AmCP 上にどのような変化が起こるのかを観察した。AmCP ケト体を生産する株に対しアミノ基転移酵素および機能未知酵素 Ser39006_009295 を共発現させ AmCP を精製し LC-MS にて分析を行ったところ。289.06 Da の質量増加が観察された。同様にトリプシン消化産物の LC-MS/MS 解析を行うことにより、これらが C 末端への付加であることを確かめた。現在、この質量増加に相当する低分子を探索中である。

以上より、TK による C2 単位の増炭反応でケト体が合成されるまでは DADH 生合成と同様の経路を辿るが、以降の反応は機能未知遺伝子が修飾に関与している可能性があり、目的遺伝子群が新規のアミノ酸あるいはアミノ酸誘導体を生合成すると予想している。

AmCP, *Serratia*, biosynthesis

発表責任者：西山真（umanis@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2B05a13
講演日時：3 月 26 日 12:02～ 総合学習プラザ B05 会場

放線菌の生産するアザビシクロ環含有化合物 vazabitide A 生合成におけるアジリジン環合成経路に関する研究

Studies on the biosynthetic machinery to form the aziridine ring in vazabitide A biosynthesis

○黒澤 菫[1]、松田 研一[1]、長谷部 文人[1]、富田 武郎[1,2]、葛山 智久[2,3]、西山 真[1,2]（[1]東大・生セ、[2]東大・微生物イノベ連携機構、[3]東大院・農生科）
○ Sumire KUROSAWA[1], Kenichi Matsuda[1], Fumihito Hasebe[1], Takeo Tomita[1,2], Tomohisa Kuzuyama[2,3], Makoto Nishiyama[1,2] ([1]BRC, UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Grad. Sch. Agri. & Life Sci., UTokyo)

我々はこれまでにアミノ基キャリアタンパク質 AmCP を指標として、放線菌の生産する二次代謝産物を探索し、1-azabicyclo[3.1.0]hexane ring（以降、アザビシクロ環）を含む新規化合物 vazabitide A を発見した。アザビシクロ環構造は DNA アルキル化の活性本体として働くことが報告されているが、当該構造を有する天然化合物は他に azinomycin B と ficellomycin しか発見されておらず、環形成機構は不明であった。当研究室では、vazabitide A のアザビシクロ環が AmCP を介して生合成される新規アミノ酸 DADH を前駆骨格として形成されることを既に示してきた。本発表では、アザビシクロ環の形成機構の解明を目的として、その形成過程にあると予想されるアジリジン環の合成機構に関して報告する。

vazabitide A, ficellomycin, azinomycin B の生合成遺伝子クラスターをそれぞれ *vzb, fic, azi* クラスターと呼ぶ。各遺伝子クラスターには *amcp* ホモログを含む DADH 生合成遺伝子群が高度に保存されていたことから、いずれの化合物においてもアザビシクロ環は DADH を中間体とした類似の機構で形成されることが推測された。DADH 生合成遺伝子群に加え、*amcp* ホモログ周辺に 3 つの遺伝子クラスター中に共通して保存される遺伝子群が環形成に関与すると推定した。そのうち、*fic, azi* クラスターにおいてもホモログが隣接して保存されていた機能未知遺伝子 *vzb10, vzb11* の産物について、組換え酵素を調製しプルダウンアッセイを行った。結果、Vzb10 と Vzb11 が相互作用し、複合体を形成することが確認された。また、当研究室において、DADH は最初に硫酸化され、sulfo DADH へ変換されることが示唆されている。そこで、*vzb10* の遺伝子破壊株の培養液上清を LC-MS にて分析した結果、*N*-acetyl sulfo DADH に相当する質量を示す化合物が特異的に蓄積していた。Vzb10/11 複合体を用いて *N*-acetyl sulfo DADH と推定される化合物を基質に *in vitro* 反応を行い、LC-MS にて分析した結果、*N*-acetyl compound X の生成がみられた。*N*-acetyl compound X はアジリジン環を形成した化合物に相当する質量を示し、Vzb10/11 がアジリジン環合成を触媒する酵素であることが示唆された。本発表では以上の結果に併せて、*N*-acetyl compound X の構造決定および Vzb10/11 の結晶構造解析について報告する予定である。これまでにアジリジン環合成を触媒する酵素は発見されておらず、本研究によりアジリジン環を含む天然化合物の生合成に新たな知見を与えると考えている。

biosynthesis, amino-group carrier protein, aziridine ring

発表責任者：西山真（umanis@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2B05p01
講演日時：3 月 26 日 13:50～ 総合学習プラザ B05 会場

dCas9 トランスアクチベーターシステムを用いたニワトリオボアルブミン遺伝子座の活性化

Activation of chicken ovalbumin gene using dCas9 transactivator system

○上平 正道、石 銘、河邉 佳典（九州大工）
○Masamichi KAMIHIRA, Ming Shi, Yoshinori Kawabe (Kyushu Univ.)

トランスジェニック鳥類は、バイオ医薬品タンパク質生産のための生体バイオリアクターとしての利用が期待されている。鳥類のトランスジェニックバイオリアクターの開発にとって導入遺伝子の正確な組織特異的発現システムの開発は重要な課題である。現在、非常に効率的かつ特異的な発現のための汎用なベクターは存在していない。近年、CRISPR/Cas9 システムなどのゲノム編集技術が、効率的で使いやすい部位特異的な遺伝子導入ツールとして利用できるようになった。ここでは、CRISPR/Cas9 システムをトランスジェニックニワトリの開発に適用するために、卵白アルブミン（OVA）遺伝子座の CRISPR/Cas9 システムのガイド RNA 配列（gRNA）を、外因性遺伝子の卵管特異的発現について評価しました。相同性に依存しない標的化統合により媒介される CRISPR/Cas9 システムを使用して、ニワトリ DF-1 およびニワトリ胚性繊維芽細胞の OVA 遺伝子座に EGFP 遺伝子発現カセットを導入した。ノックイン細胞については、dCas9-VPR トランスアクチベーターシステムを使用した内因性 OVA プロモーターの活性化により導入した EGFP 遺伝子の発現が正常に誘導された。 OVA TATA ボックスを中心に設計された複数の gRNA を同時に作用させることが、内因性 OVA 遺伝子発現を高効率で誘導するために重要であった。これらの方法は、トランスジェニックニワトリバイオリアクターの作製および組織特異的プロモーターの活性化に関する研究に役立つものと思われる。

transgenic chicken, ovalbumin, CRISPR/Cas9

発表責任者：上平正道（kamihira@chem-eng.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：2B05p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ 総合学習プラザ B05 会場

鶏卵卵黄膜およびカラザ由来新規美容素材エッグプラセンタ ™ の開発

Development of a new beauty material egg placenta ™ derived from egg yolk membrane and calaza.

○嵯峨根 里穂[1]、中村 紀夫[1]、山田 裕晃[1]、草川 太郎[2]、山津 敦史[1]、金 武祚[1]、佐藤 健司[3]([1]株式会社ファーマフーズ、[2]株式会社フューチャーラボ、[3]京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻)
○ RIHO SAGANE[1], TOSHIO NAKAMURA[1], HIROAKI YAMADA[1], TARO KUSAKAWA[2], ATSUSHI YAMATSU[1], MUJO KIM[1], KENJI SATO[3] ([1]PHARMA FOODS INTERNATIONAL CO., LTD., [2]FUTURE LABO, Inc., [3]Division of Applied Biosciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University.)

【目的】

卵黄はカラザによって卵の中心部に固定され、卵黄膜やカラザ層といった構造によりその周囲を取り囲まれている。これらの構造は、哺乳類における「胎盤(プラセンタ)」に非常に類似しており、生命を育む上で重要な役割が秘められている可能性がある。実際、栄養学的に見ても、ミネラルやビタミン等を豊富に含み、また、特徴的な機能性成分であるシアル酸なども含んでいることから、食品や化粧品への利用が期待される。しかしながら、加工卵製造工程においては上記の卵黄周辺部位は大部分が取り除かれ、未利用のままで産業利用には至っていない。本研究では未利用となっている卵黄周辺部位を原料とし、化粧品素材の訴求ポイントである成長因子に着目して、新規の機能性化粧品素材「エッグプラセンタ ™」を開発した。

【方法】

エッグプラセンタ ™ の調製　鶏卵の卵黄膜およびカラザ部分を原料とした。原料に加水し、一定時間の攪拌ののちろ過して得られた可溶部を EgP 水抽出物、不溶部に再加水後パパインで消化し可溶化したものを EgP 酵素分解物とし、EgP 水抽出物、EgP 酵素分解物の調合物をエッグプラセンタ ™(EgP)とした。

ウエスタンブロット（WB）　原料を SDS-PAGE に供し、PVDF 膜に転写ののち IGF-1、NGF 等の成長因子に対する抗体を用いて検出した。

培養細胞試験　ヒト由来の線維芽細胞(HS68)および角化細胞(HaCaT)を用いた。1%FBS を含む培地中に細胞を培養し、テトラゾリウム塩発色試薬を用いてエッグプラセンタ ™ 添加の有無による細胞増殖の様子を検証した。また、細胞内因性増殖因子の遺伝子転写量をリアルタイム PCR で検証した。

【結果・考察】

WB の結果から、原料の卵黄周辺部位には IFG-1 等が含まれていた。また、エッグプラセンタ ™ は肌細胞の増殖を促進した。更に、その機序の一つとして、ヒト由来の肌細胞において FGF-7 などの内因性の成長因子遺伝子量を増加させる効果が確認された。これらの結果より、エッグプラセンタ ™ は肌細胞中の成長因子の発現を活性化し、美容に寄与する可能性が示された。

Eggplacenta, Culture cell, Beauty effects

講演番号：2B05p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ 総合学習プラザ B05 会場

試験管内試験によるエッグプラセンタ ™ の美容効果の検証

The beauty effect of Egg placenta™ in vitro

○原 由洋[1]、中村 紀夫[1]、草川 太郎[2]、山津 敦史[1]、金 武祚[1]、佐藤 健司[3]([1]株式会社ファーマフーズ、[2]株式会社フューチャーラボ、[3]京都大学大学院農学研究科応用生物科学専攻)
○Yoshihiro HARA[1], Toshio NAKAMURA[1], Taro KUSAKAWA[2], Atsushi YAMATSU[1], Mujo KIM[1], Kenji SATO[3] ([1]Pharma Foods International Co., Ltd., [2]FUTURE LABO, Inc., [3]Division of Applied Biosciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University.)

【目的】

「エッグプラセンタ ™」(EgP) は鶏卵の卵黄膜およびカラザ層を原料として開発された化粧品素材である。これまでの研究の結果、既存の化粧品素材である哺乳類プラセンタと同様に各種成長因子を含有する可能性が示唆された。また、肌由来細胞の増殖を促進することが明らかとなった。これらの検証から、EgP が化粧品素材として有用な機能性を有することが期待される。そこで、本研究では、主に培養細胞を用いて種々の美容効果に関する検討を行い、哺乳類由来プラセンタを対象として比較検討を行うこととした。

【方法】

エッグプラセンタ ™の調製　鶏卵の卵黄膜およびカラザ部分を原料とした。原料に加水し、一定時間の攪拌ののちろ過して得られた可溶部を EgP 水抽出物、不溶部に再加水後パパインで消化し可溶化したものを EgP 酵素分解物とし、EgP 水抽出物、EgP 酵素分解物の調合物をエッグプラセンタ ™(EgP) とした。

培養細胞試験　線維芽細胞(HS68)、角化細胞(HaCaT)、メラノーマ細胞(B16)を用いた。エッグプラセンタ ™を添加した際の、細胞増殖因子遺伝子、コラーゲンⅠ遺伝子、チロシナーゼ遺伝子の転写量への影響をリアルタイム PCR で検証した。また、ELISA 法を用いてヒアルロン酸産生及びコラーゲン産生への効果を検証した。

肌常在細菌培養試験 肌の常在菌のうち善玉菌(*S. epidermis*)及び悪玉菌(*S. aureus*)を培養し、そこに EgP を添加して菌体増殖への影響を検証した。

【結果・考察】

EgP は角化細胞のヒアルロン酸産生を促進し、メラノーマ細胞のチロシナーゼ遺伝子の転写量を抑制した。また、EgP は線維芽細胞のヒアルロン酸産生及びコラーゲン産生を促進した。いずれの試験においても比較対象である哺乳類プラセンタより高い効果を有していた。肌常在菌培養試験においては、EgP は善玉菌の増殖を促進する一方、悪玉菌の増殖に寄与しなかった。これらの結果から、エッグプラセンタ ™は哺乳類プラセンタと同等以上の多彩な美容効果を有する事が示された。

Eggplacenta, Culture cell, Beauty effects

講演番号：2B05p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ 総合学習プラザ B05 会場

エッグプラセンタ ™のヒトにおける美容効果

Beauty effects of Egg Placenta™ in humans

○草川 太郎[2]、中村 紀夫[1]、山津 敦史[1]、金 武祚[1]、佐藤 健司[3]([1]株式会社ファーマフーズ、[2]株式会社フューチャーラボ、[3]京都大学大学院農学研究科応用生物科学専攻)
○ Taro KUSAKAWA[2], Toshio NAKAMURA[1], Atsushi YAMATSU[1], Mujo KIM[1], kenji SATO[3] ([1]PHARMA FOODS INTERNATIONAL CO.,LTD., [2]FUTURE LABO Inc., [3]Division of Applied Biosciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University.)

【目的】

「エッグプラセンタ ™」(EgP) は鶏卵の卵黄膜およびカラザを原料として開発された化粧品素材である。これまでの研究の結果、ヒアルロン酸産生やコラーゲン産生の促進効果、チロシナーゼ遺伝子転写抑制による美白効果、肌細菌叢の改善効果など、多彩な機能を有する事が明らかとなった。そこで本研究ではヒト試験を実施し、化粧品素材としてのヒトにおける有効性を検証した。

【方法】

エッグプラセンタ ™の調製　鶏卵の卵黄膜およびカラザ部分を原料とした。原料に加水し、一定時間の攪拌ののちろ過して得られた可溶部を EgP 水抽出物、不溶部に再加水後パパインで消化し可溶化したものを EgP 酵素分解物とし、EgP 水抽出物、EgP 酵素分解物の調合物をエッグプラセンタ ™(EgP) とした。

顔面塗布試験　23 名の女性(36.7±8.0 歳)を対象に 12 週間の顔面塗布試験を実施した。エッグプラセンタ ™を 0.5%配合したクリーム（EgP クリーム）と EgP を含まない基材のみのクリーム（プラセボクリーム）の 2 種類を半顔ずつ塗布した。塗布は普段使いのクリームに置き換える形で毎日朝晩 2 回おこなった。評価項目として、画像解析（シミ、シワ、毛穴、色ムラ)、肌水分量、経皮水分蒸散量、pH、メラニン量、紅斑、肌弾力を計測した。また、効果の実感を検証するため VAS アンケートも実施した。

テープストリッピング試験　前内腕部皮膚を対象に EgP の角層バリア保護効果を検証した。テープストリッピングにより角層を剥離し、その後 4 週間に渡って EgP クリーム及びプラセボクリームを毎日朝晩 2 回塗布した。定期的に経皮水分蒸散量を測定するとともに、剥離した角層の形態（重層剥離）を確認した。

【結果・考察】

顔面塗布試験において、VISIA 測定の結果から 2 週間目には EgP の明確なシミ減少効果が確認された。また角層水分量や、メラニン量、紅斑の測定においても EgP の良好な効果が確認された。一方、テープストリッピング試験より重層剥離の改善が見られ EgP の角層バリア保護効果が明らかとなった。これらの結果から、エッグプラセンタ ™をヒトに塗布した場合においての有効性が示され、機能性化粧品として有効な新規素材であることが明らかとなった。

Eggplacenta, Human, Beauty effects

講演番号：2B06a03
講演日時：3 月 26 日 09:52～ 総合学習プラザ B06 会場

植物は毒針で昆虫を撃退する？－シュウ酸カルシウム針状結晶が植物防御タンパク質・防御物質の働きを劇的に増強する効果
Calcium oxalate needle crystals in plant dramatically enhance the anti-insect defense activity of plant defense proteins
○今野 浩太郎、松本 信弘、行弘 文子（農研機構　生物機能利用研究部門）
○Kotaro Konno, Nobuhiro Matsumoto, Fumiko Yukuhiro (Institute of Agrobiological Sciences, NARO)

シュウ酸カルシウム針状結晶(raphide、以下針状結晶)はパイナップル、キウイ、サトイモ、ヤマノイモ等多くの植物に含まれる 0.1mm 程度の針状構造体で異形細胞に蓄えられている。その役割として植食動物（昆虫等）に対する防御仮説が有力であったが同量の針状結晶でも効果の強弱が一定せず、実験的にその耐虫効果と作用メカニズムを明快に示した例はなかった。針状結晶がしばしばシステインプロテアーゼと共存する（キウイ・パイナップル）ことから、針状結晶が昆虫の組織・細胞に穴を開け耐虫物質の作用点への到達を容易にするという毒針効果の検証を試みた。針状結晶をキウイフルーツから精製しその耐虫効果をヒマ葉に塗りエリサン幼虫に摂食させ検定した。その結果、針状結晶とシステインプロテアーゼは単独では成長阻害活性が弱いが、両者共存下では極めて強い相乗的殺虫・成長阻害・防御効果が観察された。また針状結晶の存在でシステインプロテアーゼの殺虫性が 16-32 倍程度増強された。シュウ酸カルシウム不定形結晶では全く相乗効果が無く、針状形状の重要性が示された。一方ヤマノイモ葉では針状結晶がキチナーゼの耐虫防御活性を顕著に増強していた。エリサン・ヒマ葉塗布検定では、針状結晶を除去したヤマノイモの葉抽出液単独あるいは針状結晶単独では耐虫活性を示さなかったが、両者共存時に顕著な成長阻害活性を示した。ヤマノイモ葉抽出液を Native-PAGE でバンドを切り出し検定したところ、針状結晶と相乗効果を示す耐虫性画分とキチナーゼ活性バンドが一致したことからヤマノイモ葉ではキチナーゼが針状結晶と相乗的耐虫活性を示すことが判明した。また、市販 *Streptomyces* キチナーゼの殺虫活性も針状結晶の存在で 16-32 倍以上に増強された。サトイモ科植物では、針状結晶がヒトに対する強いえぐみ（痛み）の原因であることが知られていたが、昆虫に対する耐虫性効果の詳しい報告はなかった。そこで、サトイモ科植物のポトスの葉を与えたところ、エリサンは葉を短時間囓った後、摂食を急に止め頭部を持ち上げ左右に振り大顎の開閉を繰り返す痛がっているかのような特徴的な行動を繰り返した。キウイやヤマイモの針ではこの特徴的な摂食拒否行動や人に対する痛みを示さないため針が人虫共通の痛み物質と共存している可能性が示された。ポトスの針状結晶は中央部が連結されているが両端が尖ったピンセットのように二又に分かれた特徴的な形で、その溝に毒（痛み物質）を保持している毒針である可能性も示唆された。以上の結果は針状結晶が耐虫物質の効果を増強する効果（相乗効果）を持つ毒針であることを明確に示した。(参考文献：今野浩太郎（2016）化学と生物 54(11)847-852)。

calcium oxalate needle crystal raphide, anti-insect defense protein, synergistic plant defense against insect herbivores

発表責任者：今野　浩太郎（konno@affrc.go.jp）

講演番号：2B06a04
講演日時：3 月 26 日 10:03～ 総合学習プラザ B06 会場

イネ立枯病菌 Rhizopus oryzae キシラナーゼに対するイネ XIPs の阻害活性

Inhibitory activity of rice XIPs on Rhizopus oryza xylanases.

○大沼 貴之、今岡 駿、三井 圭吾、田中 盾 (近畿大農)
○Takayuki OHNUMA, Shun IMAOKA, Keigo MITSUMI, Jyun TANAKA (Kindai Univ.)

植物病原菌は植物への感染を成立させる際，植物細胞壁に含まれるヘミセルロースの構成糖鎖であるアラビノキシランを加水分解するファミリーGH10 および GH11 キシラナーゼを分泌する．一方植物は，病原菌の細胞壁構成糖鎖であるキチンを分解するファミリーGH18 および GH19 キチナーゼを分泌し，溶菌により抵抗性を示す．さらに植物は，立体構造やアミノ酸配列が GH18 キチナーゼに類似しているものの，キチナーゼ活性に重要なアミノ酸残基の置換によりキチナーゼ活性を欠失した GH18 キチナーゼ様タンパク質を分泌する．同タンパク質は病原菌の分泌するキシラナーゼに直接結合することによりキシラナーゼ活性を阻害する，キシラナーゼ阻害タンパク（XIP, Xylanase Inhibitor Protein）として機能することが報告されている．

主要作物であるイネには 34 個の GH18 遺伝子が存在するものの，その内 20 個がキチナーゼ活性に必須なアミノ酸残基を欠いていることから，XIP として機能し，イネの細胞外における生体防御機構の一端を担っている可能性が考えられる．しかし，各 XIP の機能について生化学的に調べられた事例は少なく，特異性や阻害様式等，阻害活性に関する知見は乏しい．

本研究では，イネ XIP の一つである OsHI-XIP（AK062114）のイネ立枯病菌 *Rhizopus oryzae* の分泌する GH10 および GH11 キシラナーゼ RXyn1 および RXyn2 に対する阻害活性評価を行った．その結果，OsHI-XIP は RXyn1 および RXyn2 の両方の活性を阻害するデュアルキシラナーゼインヒビターであることがわかった．また，ゲル濾過カラムクロマトグラフィーを用いた解析の結果，OsHI-XIP は両酵素とそれぞれと安定な二量体を形成することがわかった．さらに，OsHI-XIP は RXyn1 および RXyn2 と同時に結合して三量体を形成し，両キシラナーゼの活性を同時に阻害する可能性が示された．当研究グループではこれまでに他のイネ XIP である OsXIP（AK073843）と riceXIP（BAA77780）のキャラクタリゼーションを行い，それらは Rxyn2 に対するシングルキシラナーゼインヒビターとデュアルキシラナーゼインヒビターであることを明らかにしている．本発表では両イネ XIP およびコムギ XIP である XIP-1 との比較についても述べる．

chitinase, xylanase inhibitor protein, rice

発表責任者：大沼貴之（ohnumat@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：2B06a05
講演日時：3 月 26 日 10:14～ 総合学習プラザ B06 会場

トマト斑葉細菌病菌と軟腐病菌に対するシロイヌナズナの耐病性を付与する小松菜内生細菌の同定とその効果の評価

Disease resistance against bacterial pathogens of *Arabidopsis thaliana* treated with endophytes isolated from *Brassica rapa* var. *perviridis*.

○黒川 摩利[1]、中野 正貴[1]、北畑 信隆[2]、朽津 和幸[1]、古屋 俊樹[1] ([1]東京理科大・理工、[2]東大院・農生科)
○Mari KUROKAWA[1], Masataka NAKANO[1], Nobutaka KITAHATA[2], Kazuyuki KUCHITSU[1], Toshiki FURUYA[1] ([1]Fac. Sci. Tec., Tokyo Univ. Sci., [2]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. Tokyo)

【背景・目的】植物の内部に共生する植物内生菌の中には、植物免疫を活性化して病害抵抗性を高めるものがいる。この種の微生物は、植物内に安定に定着してその効果を発揮することから、微生物農薬への応用に期待が寄せられている。我々はこれまでに、有機農法で栽培された小松菜の内部から 31 株の細菌を単離し、植物培養細胞を利用した評価により 8 株が免疫応答の指標の 1 つである活性酸素種（ROS）生成を亢進することを見いだしている [1)]。本研究では、この一次評価で陽性を示した株について、植物体を用いた病害抵抗性試験を実施した。
【方法・結果】タバコ BY-2 細胞に卵菌由来タンパク質性エリシターのクリプトゲインを作用させると免疫応答により ROS を生成するが、小松菜から単離した 31 株の細菌のうち 8 株は BY-2 細胞とインキュベーションすると、このクリプトゲイン誘導性 ROS 生成を亢進した [1)]。これらの 8 株をシロイヌナズナの幼芽の根に接触させたところ、2 株の細菌 *Delftia* sp. BR1R-2 と *Arthrobacter* sp. BR2S-6 はシロイヌナズナの生育に影響を与えずに内生した。さらに、内生させたシロイヌナズナにトマト斑葉細菌病菌 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 と軟腐病菌 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* NBRC14082 を感染させたところ、BR1R-2 株と BR2S-6 株はどちらもシロイヌナズナに両病原菌に対する抵抗性を付与することができた（図 1）。また、BR1R-2 株はシロイヌナズナに内生することでサリチル酸経路とジャスモン酸経路の両マーカー遺伝子の発現を誘導し、両病原菌感染時にその発現を亢進した。これらの結果から、BR1R-2 株は多様な病原種に有効である可能性が示唆された。

1) 黒川摩利、他、2019 年度日本農芸化学会大会（講演要旨集 3E6a04）.

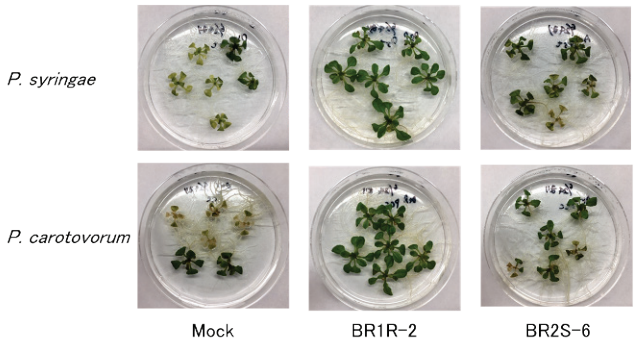


図 1　内生菌処理後にトマト斑葉細菌病菌と軟腐病菌を感染させたシロイヌナズナ

Arabidopsis thaliana, biocontrol agent, endophyte

発表責任者：古屋俊樹（tfuruya@rs.tus.ac.jp）

講演番号：2B06a06
講演日時：3 月 26 日 10:35～ 総合学習プラザ B06 会場

好熱菌発酵産物を施用した人参の機能性と根圏微生物群集、並びに土壌代謝物に関する統合オミクス解析

Omics analyses of the rhizobacteria and soil metabolites with relation to the fecundity and function of carrot amended with thermophile-fermented compost

○松浦 真紀子[1,2]、守屋 茂春[3]、坪井 亜里沙[2,3]、富永 直樹[4]、石井 千歳[2]、中熊 照乃[2]、児玉 浩明[1]、澤田 有司[3]、平井 優美[3]、宮本 浩邦[1,2,5]、茂田 勝美[4]([1]千葉大院・園芸、[2]サーマス、[3]理研・環境資源、[4]タキイ種苗、[5]理研・生命医科学)

○Makiko MATSUURA[1,2], Shigeharu MORIYA[3], Arisa TSUBOI[2,3], Naoki TOMINAGA[4], Chitose ISHII[2], Teruno NAKAGUMA[2], Hiroaki KODAMA[1], Yuji SAWADA[3], Yumi HIRAI[3], Hirokuni MIYAMOTO[1,2,5], Katsumi SHIGETA[4] ([1]Chiba Univ., [2]Sermas Co., Ltd., [3]RIKEN CSRS, [4]TAKII CO., LTD., [5]RIKEN IMS)

好熱菌 *Bacillaceae* によって海産資源を高温発酵した産物を栽培土壌に添加すると、土壌の微生物叢が変化し、葉菜類の植物体内の窒素化合物の代謝、並びに生体防御関連遺伝子の発現を制御する傾向がある（***Appl. Microbiol. Biotechnol.***, **97**:1349-1359, 2013、日本農芸化学会報告等）。昨年、並びに一昨年の本学会では、当該発酵産物の施用が、ニンジンに対して土壌固有の根圏微生物群集を変動させた上で、作物の生産性と機能性を制御する可能性があることを示唆した。本研究では、これまで同様、根菜類のモデルとして抗酸化活性の高い品種である機能性ニンジン(タキイ種苗ファイトリッチシリーズ・京くれない)を用いて、土壌の代謝物との相関関係を包括的に評価したので報告する。これまでの研究によって、慣行区に対して発酵産物施用区では、収穫根重の増加し、一部のアミノ酸、カロテノイド、並びにポリフェノールの一種であるフラボノイドの増加傾向が確認され、さらに土壌菌叢を調べると、窒素固定菌 *Paenibacillus* 属菌の増加、並びに青枯病菌 *Ralstonia* sp. の近縁種の減少などの特徴的な菌群のポピュレーションの変化が確認された。これらの結果を踏まえて、土壌のメタボローム解析を実施した結果、施用区ではフェニルアラニン、アスパラギン酸やメチオニンの誘導体、並びにインドール酢酸などの顕著な増加傾向が確認された。さらに、同様の結果が得られるのか否か、他の作物について検証を実施した。これらの観察から、根圏微生物と植物との相互作用の中での土壌代謝物の相関関係について推察し、その普遍性について議論する。

thermophillic bacteria, plant, metabolism

講演番号：2B06a07
講演日時：3 月 26 日 10:46～ 総合学習プラザ B06 会場

代謝物を介した根圏微生物叢形成のモデル実験系の構築

A simple method for analyzing the effects of plant metabolites on rhizosphere assemblage

○豊福 美和子、中安 大、奥谷 芙季、矢崎 一史、杉山 暁史（京都大生存研）
○Miwako TOYOFUKU, Masaru NAKAYASU, Fuki OKUTANI, Kazufumi YAZAKI, Akifumi SUGIYAMA (Kyoto Univ.)

植物の根から影響を受ける土壌領域を根圏といい、根から根圏へ分泌される糖、アミノ酸や二次代謝物は、根圏における微生物と植物の相互作用に重要である。植物微生物相互作用に重要な役割を担う植物代謝物の根圏での動態は精力的に解析が進められている。例えば、ダイズ（*Glycine max*）の主要な二次代謝産物であるダイゼインは、シミュレーション及び根箱栽培による検証の結果、圃場土において根から 2 mm 以内の移動が確認されており、この領域がダイゼインの影響する根圏領域であると示唆された。また、ダイゼインをダイズ栽培圃場土に添加すると、微生物叢への影響が認められ、特にダイゼイン濃度に相関してコマモナス科の相対存在比が増加することが明らかとなった。しかし、その他の植物代謝物の微生物叢への影響や、微生物の動態に関する知見は未だ限られているのが現状である。そこで本研究では、植物代謝物による根圏微生物の動態への影響を、高い再現性で評価できる新しい実験系の確立を目指した。

根圏分泌のモデル実験系として、ムライトセラミックチューブを用いた装置を開発した。セラミックチューブを植物の根に見立て、溶液を注入すると、溶液が浸透して周囲に充填した砂に代謝物の濃度勾配が形成される。本研究では、溶液の注入量、注入方法を検討し、ダイゼインと土壌微生物を用いて根圏モデルの検証を行った。方法は、食紅水溶液またはダイゼイン溶液を注入し、1 日後にセラミックチューブからの距離が 5 mm～30 mm の地点の砂をコルクボーラーで回収した。食紅水溶液の拡散は視覚的にセラミックチューブから 10 mm までと確認した。また、豊浦砂中のダイゼインを HPLC で定量したところ、ダイゼインの濃度勾配が認められた。次に、ダイズ圃場の微生物を加えた豊浦砂に、ダイゼイン溶液をセラミックチューブから 1 日毎に 1 mL ずつ 14 日間注入した結果、セラミックチューブ近傍では微生物の存在量が増加した。さらに、16S rRNA アンプリコンシーケンス解析と PCoA 解析により微生物叢を比較したところ、ダイゼイン処理区とコントロール区で違いが認められた。また、ダイゼイン処理区では、セラミックチューブ近傍でコマモナス科の相対存在比が増加傾向を示し、ダイズ根分泌物による根圏微生物叢形成の一部が再現された。

代謝物の種類により拡散速度は異なるため、幅広く本手法を適用するために、現在ダイゼイン以外の代謝物や圃場土を用いた実験系の確立を試みている。

Rhizosphere, Root exudation, Microbe

講演番号：2B06a08
講演日時：3 月 26 日 10:57～ 総合学習プラザ B06 会場

圃場栽培トマト根からのトマチン分泌と根圏細菌叢への影響
Tomatine secretion by field-grown tomato roots and its effect on the bacterial community in the rhizosphere

○中安 大[1]、大野 滉平[1]、青木 裕一[2]、山﨑 真一[2]、髙瀬 尚文[3]、庄司 翼[4]、矢﨑 一史[1]、杉山 暁史[1] ([1]京都大・生存研、[2]東北大・ToMMo、[3]京都先端大・バイオ環境、[4]奈良先端大・バイオサイエンス)
○Masaru NAKAYASU[1], Kohei OHNO[1], Yuichi AOKI[2], Shinichi Yamazaki[2], Hisabumi TAKASE[3], Tsubasa SHOJI[4], Kazufumi YAZAKI[1], Akifumi SUGIYAMA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Tohoku Univ., [3]KUAS, [4]NAIST)

根圏は植物の根近傍の土壌領域であり、根が分泌する一次代謝産物、特化代謝物により、根から離れたバルク土壌とは異なる環境を形成する。微生物や昆虫、他植物に対して生物活性を示す特化代謝物の根からの分泌はこれまで多数報告されているが、根圏の生物間相互作用における特化代謝物の機能解明には至っていない。これまでにトリテルペノイド配糖体のソヤサポニンとステロイド配糖体のトマチンが、水耕栽培ダイズ(*Glycine max*)とトマト(*Solanum lycopersicum*) の根からそれぞれ分泌されることを明らかとした（Tsuno et al, Plant Cell Physiol, 2018; 大野ら、日本農芸化学会 2019 年度大会)。本研究では、これらサポニン類の根圏における機能解明を目的として、圃場栽培トマトが水耕栽培と同様にトマチンを分泌するかを検証し、トマチンが根圏細菌叢に与える影響を評価した。

開花期、緑色果実期、赤色果実期の圃場栽培トマト根圏土壌とバルク土壌のメタノール抽出物の LC-MS 分析を行った結果、根圏土壌中のトマチン含量はバルク土壌に比べ顕著に高かった。また、生育段階間で大きな差異は無く、水耕栽培とは異なる傾向であった。次に、3 日おきにトマチン標品を添加し、15 日間培養した圃場土壌の 16S rRNA アンプリコン解析を行った。標品添加量の増加にしたがって科レベルの相対存在比が増加する細菌叢の変化を見出した。続いて、標品添加により相対存在比が増加した科に属する細菌を複数単離した。休止菌体反応により全ての単離株がトマチン分解活性を示した。また、レサズリン色素を用いた細胞増殖の評価により、トマチン資化性を示す菌株も見出した。以上の結果より、圃場栽培条件においてもトマト根はトマチンを分泌し、根圏土壌中の含量が生育期間を通じて同程度に維持されることを明らかとした。トマチンは毒性物質であるため生体防御物質として位置付けられてきたが、トマチン標品添加による細菌叢変化とトマチン資化性細菌の存在は、トマチンがトマト根圏の微生物叢形成因子として機能することを示唆した。現在、標品添加土壌と圃場栽培トマト根圏土壌の細菌叢の比較解析およびトマチン生合成が抑制された *jre4* 変異体を用いた根圏細菌叢への影響の解析を進めている。

tomato, rhizosphere, tomatine

発表責任者：中安 大（masaru_nakayasu@rish.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2B06a09
講演日時：3 月 26 日 11:08～ 総合学習プラザ B06 会場

イネに対してプライミング機構を誘導するシグナル物質の探索

Mechanism of disease resistance induced by an endophytic bacterium in rice.

○藤田 萌香[1]、草島 美幸[2]、仲下 英雄[1] ([1]福井県大院・生資、[2]東大院・農生科・応生化)
○Moeka FUJITA[1], Miyuki KUSAJIMA[2], Hideo NAKASHITA[1] ([1]Dept. Biosci., Fukui Pref. Univ., [2]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. of Tokyo.)

植物は、様々な病原体に晒されているが、それらに対する独自の防御機構を備えている。一方、植物共生微生物との相互作用が宿主植物の病害抵抗性の増強や生育促進に寄与することが知られている。そのメカニズムの 1 つであるプライミング機構では、防御関連遺伝子の発現を伴わないため植物の生育は抑制されないが、病原菌感染に対して通常よりも早くあるいは強く応答することにより病害抵抗性が発現することが明らかになっている。本研究では、細菌エンドファイトの共生によるプライミング機構の誘導に関与するシグナル物質の特定を目的として、イネ葉鞘抽出液からプライミング関連遺伝子の誘導活性を有する画分を精製し、更にイネいもち病に対する病害抵抗性誘導活性の解析を行った。

イオン交換水のみで 7 日間生育させたイネ幼苗に対して精製したサンプルを 2 日間処理し、第 2 葉葉身における 3 種のプライミング関連遺伝子の発現を解析することにより、プライミング誘導活性を評価した。シグナル物質の抽出材料としては、Azospirillum sp. B510 株懸濁液を処理してプライミングを誘導したイネの葉鞘部分を用いた。病害抵抗性誘導活性は、播種 8 日目のイネ幼苗に精製したサンプルを灌注処理し、播種 12 日目の第 4 葉にイネいもち病菌胞子懸濁液を噴霧接種して、5 日後に現れた罹病性病斑数により評価した。イネ葉鞘の MeOH 抽出液から酸性画分を分離した後、DOWEX 1 及び Sep-Pak C18 カラムにより活性成分の分離および精製を行った。DOWEX 1 カラムの 0.2M NaCl および 0.8M NaCl 溶出画分にプライミング関連遺伝子の誘導活性が認められたため、Sep-Pak C18 カラムを用いて更に精製を進めた。その結果、両精製画分はプライミング誘導活性およびイネいもち病抵抗性誘導活性を有することが確認された。現在、これらの画分に含まれる活性物質の分析を進めている。

priming, disease resistance, rice

発表責任者：藤田　萌香（s1893001@g.fpu.ac.jp）

講演番号：2B06a10
講演日時：3 月 26 日 11:19～ 総合学習プラザ B06 会場

植物免疫抑制剤がアグロバクテリウムと植物の相互作用に及ぼす影響
Analysis of mechanism of plant immunosuppressant NAS1
○草島 美幸、青木 智史、高橋 郁夫、姜 凱、中村 英光、浅見 忠男（東大院農生科）
○Miyuki KUSAJIMA, Satoshi AOKI, Ikuo TAKAHASHI, Kai JIANG, Hidemitsu NAKAMURA, Tadao ASAMI (Univ. of Tokyo)

【背景・目的】
病原菌感染時の植物にサリチル酸を介して誘導される全身獲得抵抗性（SAR）は、様々な病原体に対して効果を発揮する免疫機構の一つである。SAR の誘導機構および誘導剤は農薬開発を目的として多くの研究が行われてきたが、抑制剤に関する報告は少ない。植物の免疫抑制剤の選抜および作用機構の解明は、植物免疫機構の更なる理解に繋がると同時に、植物と有用微生物の相互作用促進に寄与することが考えられる。本研究では、新たに選抜した免疫抑制剤 NAS1 が植物に及ぼす影響を解析すると同時に、抑制剤の処理がアグロバクテリウムの感染および形質転換効率に及ぼす影響の解析を行った。
【方法】
免疫抑制剤 NAS1 含有 1/2MS 培地にシロイヌナズナを播種し、10 日後に SA 及び SAR 誘導剤 BIT を噴霧処理して解析に用いた。シロイヌナズナを育苗培土に播種し、免疫抑制剤の処理 3 日後にアグロバクテリウムの接種試験を行った。イネのカルスを免疫抑制剤含有培地で培養し、pIG121 ベクターを持つアグロバクテリウムによる形質転換の効率を確かめた。
【結果】
免疫抑制剤 NAS1 は SA と BIT 処理時の PR1 遺伝子の発現誘導を抑制することを明らかにした。また、NAS1 処理区は接種後のアグロバクテリウムの増殖が促進され、NAS1 は植物の免疫を抑制することによってアグロバクテリウムの感染を促進することが示された。免疫抑制剤 NAS1 を前培養時に処理したイネのカルスは、形質転換効率が向上する傾向が見られた。

本研究は農研機構生研支援センター「イノベーション創出強化研究推進事業」の支援を受けて行った。

Salicylic acid, Agrobacterium, Transformation

講演番号：2B06a11
講演日時：3 月 26 日 11:40～ 総合学習プラザ B06 会場

病原細菌鞭毛タンパク質フラジェリンの CD2－1 領域を認識するイネ受容体の同定

Identification of receptor for CD2-1 within bacterial flagellin in rice

○安田 宜剛[1]、今尾 優吾[1]、村上 貴彦[1]、桂木 雄也[2]、平井 洋行[2]、蔡 晃植[1,2,3]([1]長浜バイオ大院・バイオ、[2]長浜バイオ大・バイオ、[3]長浜バイオ大・ゲノム編集研究所)
○Takamasa YASUDA[1], Yugo IMAO[1], Takahiko MURAKAMI[1], Yuya KATSURAGI[2], Hiroyuki HIRAI[2], Fang-Sik CHE[1,2,3] ([1]Graduate School of Bioscience, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology, [2]Bio-science, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology, [3]Genome Editing Research Institute, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology)

多くの植物は病原性細菌のフラジェリンを認識し、免疫反応を誘導する。これまでの研究で、シロイヌナズナは、N 末端領域の flg22 を認識して免疫反応を誘導するが、イネは C 末端側の CD2-1 領域を認識して免疫反応を誘導することが明らかとなっている。また、flg22 の受容体である FLS2 のイネオルソログ OsFLS2 をノックダウンしたイネ変異体は CD2-1 認識能を有していることも明らかとなっており、イネは FLS2 とは異なる受容体を用いて CD2-1 を認識することが示されている。そこで、イネにおける CD2-1 受容体を同定することを目的として研究を行った。植物では、様々なリガンドを処理するとそれに対する受容体の発現量が上昇することが報告されている。そこで、イネ培養細胞に CD2-1 を処理した後に発現上昇する遺伝子を、44K オリゴマイクロアレイを用いて解析したところ、16 個の受容体型キナーゼ遺伝子が CD2-1 処理により発現上昇することが示された。この 16 遺伝子がコードするタンパク質の構造を調べたところ、細胞膜に局在し、細胞外に LRR ドメインを、細胞内にキナーゼドメインを持つタンパク質をコードする遺伝子が 2 つ存在した。そこで、この 2 つの遺伝子をイネプロトプラストに一過的に過剰発現させ、CD2-1 認識能が増加するかどうかを調べたところ、*Flagellin-induced receptor kinase2 (FliRK2)* と名付けた遺伝子を発現させた時に CD2-1 認識能が上昇することが示された。そこで、FliRK2 がイネの CD2-1 受容体であるかを明らかにするため、*FliRK2* に *T-DNA* が挿入されたイネ挿入変異体（*flirk2*）と、この変異体に FliRK2 を再導入した相補体(*cFliRK2*)を作製し、CD2-1 認識能について解析した。その結果、*flirk2* は CD2-1 認識能を失っており、*cFliRK2* では認識能が回復していた。また、*flirk2* にキナーゼドメインを欠損している *FliRK2* を導入したイネ形質転換体では、CD2-1 認識能を失っていることも示された。次に、FliRK2 と CD2-1 との相互作用を明らかにするため、*FliRK2* 高発現培養細胞から膜画分を抽出し、この膜画分に CD2-1 を処理後、FliRK2 抗体を用いて免疫沈降を行い、CD2-0 抗体を用いてウエスタンブロット解析を行ったところ、FliRK2 が CD2-1 と相互作用することが明らかとなった。これらのことから、FliRK2 がイネにおけるフラジェリン CD2-1 領域を認識するための受容体として機能していることが明らかとなった。

Flagellin-induced receptor kinase2 (FliRK2), Flagellin, PTI

講演番号：2B06a12
講演日時：3 月 26 日 11:51～ 総合学習プラザ B06 会場

葉枯れ病菌に感染したトウモロコシ葉に生産される抗菌性ジテルペノイドとベンゾキサジノイドの誘導機構

Inductive system of antifungal diterpenoids and benzoxazinoids produced in leaves of maize infected with Bipolaris maydis

○鶴嶋 鉄[1]、森 直樹[2]、宮川 恒[2] ([1]阪南大、[2]京都大農)
○Tetsu Tsurushima[1], Naoki Mori[2], Hisashi Miyagawa[2] ([1]Hannan Univ., [2]Kyoto Univ.)

(目的)トウモロコシには、ファイトアレキシンとしてジテルペノイド化合物のカウラレキシン類(KAX)ならびにポストインヒビチン(ファイトアンティシピン)としてベンゾキサジノイド化合物(BX)の DIMBAO (2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one)とDIM_2BOA (2,4-dihydroxy-7,8- dimethoxy-1,4-benzoxazin-3-one)の２種が生産されることが知られている。本研究ではトウモロコシ葉身における病原菌感染および組織傷害後の両化合物の生産を経時的に調べ、防御応答における役割を検討した。また両化合物の前駆体からの酵素的な誘導についても検討した。
(方法)トウモロコシ(品種;ゴールデンバンタム)の初生葉にトウモロコシごま葉枯れ病菌(*Bipolaris maydis*)の分生胞子懸濁液(10^4 個胞子/ml)を噴霧接種し、感染葉をメタノールで抽出した。また、健全葉あるいは根を乳鉢中で常温摩砕し水溶液を得た。感染葉の抽出液および組織の摩砕液を TLC にスポットし、展開後にウリ類炭そ病菌(*Colletotrichum orbicular*)の分生胞子を懸濁した PDA 培地溶液を噴霧することで抗菌性化合物の生成を検出した。
(結果および考察)KAX と BX は、接種 24 時間後の感染葉の抽出液から検出され、時間経過とともに生産量は増大した。葉および根を摩砕すると、KAX と BX は 5 分以内に検出され始め、その後急速に検出量は増大した。20 分後の摩砕液から検出される KAX と BX の量は、接種 48 時間後の感染葉抽出液の 10 倍以上であった。液体窒素中で摩砕した葉および根のメタノール抽出物を、トウモロコシ根摩砕液の限外濾過によって得られたタンパク質画分で処理すると、速やかに DIMBOA とDIM_2BOA が生成し、あわせて KAX の生産も誘導された。生成した KAX,BX および抽出液に含まれる BX 配糖体の化学構造については、機器分析により確認した。これらの結果は、健全組織中には KAX および BX の前駆体が含まれており、菌類感染に対応して速やかに抗菌性物質に変換されるポストインヒビチンとしてトウモロコシの防御応答に関与していることを示す。現在、KAX の前駆体についての検討を行っている。

maize, diterpenoid, post-inhibitin

発表責任者：鶴嶋　鉄（tsuru@hannan-u.ac.jp）

講演番号：2B06a13
講演日時：3 月 26 日 12:02～ 総合学習プラザ B06 会場

ヘテロキトオリゴ糖受容体のタンパク質同定に向けた光アフィニティープローブの開発

Development of photoaffinity probe for the identification of hetero-chitooligosaccharides receptor protein

○廣岡 健太朗、野島 耕陽、秋山 康紀（阪府大・院生命）
○Kentaro HIROOKA, Koyo NOJIMA, Koki AKIYAMA (Osaka Pref. Univ)

アーバスキュラー菌根菌（arbuscular mycorrhizal fungi, AM 菌）が生産するシグナル物質は Myc factor と呼ばれ，リポキトオリゴ糖（Myc-LCO）とキチンオリゴ糖が知られている。これらに加えて，我々は部分 *N*-脱アセチルキチン（partially *N*-deacetylated chitin, DAC）3 糖およびキトサン 3 糖がイネにおいて LysM 型キチン受容体である OsCERK1 非依存的に AM 共生初期マーカー遺伝子の発現を誘導することを見出している。AM 菌の細胞壁キチンは *N*-アセチルグルコサミンだけでなく，グルコサミンを含むヘテロ多糖の構造を有していることから，これらオリゴ糖は AM 菌自身あるいは植物由来のキチナーゼやキトサナーゼにより遊離されると考えられる。しかし，DAC オリゴ糖やキトサンオリゴ糖がイネ以外の植物に対して共生応答を誘導するのかは明らかにされていない。マメ科モデル植物であるミヤコグサは Myc-LCO や 4 糖以上のキチンオリゴ糖に対して共生応答を示すが，DAC オリゴ糖やキトサンオリゴ糖については調べられていない。そこで今回，DAC4 糖やキトサン 4 糖に対するミヤコグサの共生応答誘導を調べると共に，これらオリゴ糖が AM 菌から分泌されているか調べた。さらに，ヘテロキトオリゴ糖受容体の同定に向けた光アフィニティープローブ (photoaffinity probe, PAP) の開発を開始した。

始めにDAC4糖がミヤコグサに対して共生応答を誘導するのか調べた。キトサンから塩酸加水分解によりキトサンオリゴ糖を調製した後，アセトン沈殿，カラムクロマトグラフィーによる精製を経てキトサン4糖を調製した。これをメタノール-水中で無水酢酸を用いて部分*N*-アセチル化して3種類の異なるアセチル化度（25, 50, 75%）のDAC4糖を調製した。ミヤコグサ実生を用いた*pCbp*1-GUSレポーターアッセイにより，これらDAC4糖の共生応答誘導活性を調べたところ，アセチル化度に関係なくすべてのDAC4糖が同程度の活性を示し，キトサン4糖は極弱い活性しか示さなかった。次に，AM菌からDAC4糖が分泌されているか調べた。AM菌*Rhizophagus irregularis*を合成ストリゴラクトンであるGR24を添加したMilliQ水及び改変M培地で静置培養した後，菌体を濾別し菌分泌物を得た。これをメタノール-水中で重水素無水酢酸を用いて*N*-重アセチル化した後，LC-MS/MS分析を行った。結果，MilliQ水と改変M培地では分泌されるキチン・キトサン・DACオリゴ糖の組成は変わったが，両培地でもDAC4糖は検出されなかった。続いて，イネにおけるキトサン・DACオリゴ糖の新規受容体タンパク質の同定に向けたPAPを開発した。光反応性基には最近開発された疎水性が低く，コンパクトな2-チエニル置換型α－ケトアミド構造を採用することにした。

N-deacetylated chitin, chitooligosaccharides receptor protein, photoaffinity probe

発表責任者：秋山康紀（akiyama@biochem.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：2B06p01
講演日時：3 月 26 日 13:50～ 総合学習プラザ B06 会場

発育低下のみられる骨格筋における TNF 関連受容体の発現異常

Abnormal expression of TNF-related receptor in skeletale muscle showing hypotrophy

○井上 敬夫[1]、萩山 満[1]、前西 修[2]、木村 雅友[2]、水口 信行[3]、峯 嘉宏[3]、筑後 孝章[2]、伊藤 龍生[4]、佐藤 隆夫[2]、伊藤 彰彦[1]([1]近畿大医、[2]近畿大病院、[3]近畿大ライフサイエンス研、[4]近畿大農)
○ Takao INOUE[1], Mitsuru HAGIYAMA[1], Osamu MAENISHI[2], MASATOMO KIMURA[2], Nobuyuki MIZYGUCHI[3], Yoshihiro MINE[3], Takaaki CHIKUGO[2], Tatsuki ITOH[4], Takao SATOU[2], Akihiko ITO[1] ([1]Kindai Univ. Fac. Med., [2]Kindai Hosp., [3]Kindai Univ. Life Sci. Inst., [4]Kindai Univ. Fac. Agric.)

【目的】 正常血圧ラット(WKY)、高血圧ラット SHR 及び脳卒中発症ラット(SHRSP)において血圧と体重に負の相関関係があり、組織学的解析より遅筋特異的な発育低下がみられることが明らかとなった。骨格筋は身体の恒常性に重要な役割を果たしていることが知られているため、骨格筋の発育低下が高血圧及び高血圧関連疾患の増悪に関与している可能性が考えられた。本研究では発育低下の原因となる分子の特定を試みた。

【方法】 12 週齢雄性の WKY 及び SHRSP 由来のヒラメ筋より RNA を抽出してマイクロアレイに供し、Ingenuity Pathway Analysis(IPA)解析を行った。これらの結果に基づき、更にウェスタンブロットによるタンパク質解析及び、免疫染色を行った。

【結果】 マイクロアレイ解析より、骨格筋特異的ユビキチンリガーゼである MuRF1 が有意に発現上昇していたが、Atrogin-1 に関しては発現上昇がみられなかった。タンパク質発現解析においても同様の結果が得られた。しかしながら、速筋主体の足底筋において両タンパク質の発現上昇はみられなかった。これは遅筋において特異的に MuRF1 が発現上昇していることを示唆している。更に IPA による MuRF1 の上流因子の解析を行ったところ、腫瘍壊死因子（TNF）が予測されたが、TNFalpha の受容体である TNFR1 の発現には差がみられなかった。他の TNF 関連受容体を調べた結果、TWEAKR の発現上昇が確認された。両ラット間における TWEAKR のタンパク質発現量に有意な差はみられなかったが、免疫染色の結果は、WKY では速筋特異的染色が示したが、SHRSP では速筋のみならず、遅筋においても染色がみられた。

【考察】 生理的条件では速筋特異的に発現する TWEAKR が、SHRSP においては遅筋に異所性発現することで MuRF1 の発現上昇を促し、遅筋特異的な発育低下が引き起こされたと考えられる。TWEAKR-MuRF1 経路は SHRSP における骨格筋の発育低下に対する治療標的になりうる可能性が考えられた。

SHRSP, skeletal muscle hypotrophy, TNF-related receptor

発表責任者：井上敬夫（takao@med.kindai.ac.jp）

講演番号：2B06p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ 総合学習プラザ B06 会場

フタホシコオロギにおける成育中の個体群密度が成虫の形態および行動に与える影響
Effects of larval population-density on morphology and behavior in adult of the two-spotted cricket, *Gryllus bimaculatus*
○清家 瞳、永田 晋治（東京大学）
○Hitomi SEIKE, Shinji NAGATA (Univ. of Tokyo)

【目的】昆虫において、成育中の個体群密度は、形態形成に関わる重要な要素となる。トノサマバッタ *Locust migratoria* やサバクトビバッタ *Scistocerca gregaria* では、異なる個体群密度により、同種であるにも関わらず、形態が別種のように劇的に変化する。この現象は相変異と呼ばれ、1921 年に初めて報告された。しかしながら、どのように各個体が個体群密度を認識し、最終的に形態が変化するかという現象の分子レベルでの詳細なメカニズムは未だ明らかにされていない。そこで、本研究ではバッタと同じ直翅目昆虫であるフタホシコオロギ *Gryllus bimaculatus* を用いて、分子レベルで相変異を明らかにすることを最終目的とした。本発表では、個体群密度による成虫の形態および行動への影響を解析したことを報告する。
【方法・結果】フタホシコオロギは個体群密度の違いにより体色が異なるため、まず、人為的に体色の異なるフタホシコオロギの成虫を調製する条件を検討した。その結果、孵化直後から幼虫を 1 匹あるいは 10 匹で飼育することで、成虫の体色の変化が認められた。低密度での飼育（単独飼育）では黒色に、高密度での飼育（集団飼育）では茶色になった。体色の変化を数値化するため、翅の画像を RGB 分解し色を数値化した結果、オス、メスともに単独飼育に比べて、集団飼育の個体の翅の色の R 値が顕著に高かった。オス成虫において、飼育密度の違いにより、単独飼育した個体は、集団飼育した個体に比べて、体重と体サイズが増加し、運動量も活性化し上昇した。さらに、飼育密度により、摂食量は変化しなかったものの、異なる栄養分選好性行動が認められ、単独飼育した個体は集団飼育した個体に比べて糖質を選好した。また、単独飼育した個体は、集団飼育した個体より、早く成虫になった。一方で、メス成虫においては、体色以外の顕著な変化は見られなかった。次に、どの時期の個体群密度が成虫の体色に影響があるかを調べるために、孵化後に一定期間集団飼育した後、単独飼育した個体の、成虫の体色を観察した。実際には、孵化後からの集団飼育の期間が 0 日（単独飼育）、2 週間（2w）、4 週間（4w）、成虫になるまで（集団飼育）の 4 群を調製して、それぞれ成虫での翅の色を調べた。その結果、2w の個体は単独飼育した個体と同様に黒色、4w の個体は集団飼育した個体と同様に茶色を示した。以上の結果から、フタホシコオロギにおいて、成虫の体色は、孵化後 2 週間から 4 週間の期間の個体群密度が影響していることが考えられ、この時期に個体群密度が感知されることが示唆された。

Gryllus bimaculatus, population-density, morphology

講演番号：2B06p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ 総合学習プラザ B06 会場

A novel endocrine control of blood sugar homeostasis in the two spotted cricket, *Gryllus bimaculatus*.

○Yijun ZHOU, Shinji NAGATA (Tokyo Univ.)

【目的】Normal growth and development in insects are carried out by preferable and appropriate diets to satisfy their adequate energy. Different from mammals, trehalose, other than glucose, is the 'blood sugar', which is a nonreducing disaccharide composed of two glucose moieties. This trehalose is present in the hemolymph with relatively higher level, allocating to all tissues as a nutrient source. Insulin-like peptide/Adipokinetic hormone (ILP/AKH) is famous as high homology to vertebrate Insulin/Glucagon and their cooperative regulation on energy homeostasis. However, for insects, little obvious proof account for AKH to be involved in glucose metabolism. Here we report that Crustacean cardioactive peptide (CCAP) and Myosuppressin (MS) exert as a complementary system of ILP/AKH in the regulation of carbohydrate homeostasis in the two-spotted cricket, *Gryllus bimaculatus*.

【方法・結果】Injection of CCAP or injection of MS elevated hemolymph carbohydrate level in the cricket. By contrast, injection of mixture of CCAP and MS did not influence on the hemolymph carbohydrate level. Data indicated that these peptides counteract in the maintenance of lipid and carbohydrate levels. Also, knockdown crickets by RNA interference revealed no evidences of direct stimulation of CCAP on AKH signaling, while function of MS on carbohydrate and lipid mobilization were confirmed to be mediated by AKH signaling. Together, we assumed that the secretion of AKH by CCAP appears to be regulated by different pathway from the previous report. Furthermore, detailed analyses revealed that transcriptional level of CCAP was altered in response to glucose, while that of MS was altered in response to trehalose. We therefore assumed that glucose in the digested diet delivered into the midgut alters CCAP expression level and circulating trehalose alters the expression level of MS, which implies that these two neuropeptides counteract as the feedback regulation by modulating the carbohydrates in the circulating system in this species. As this system is independent of known feedback system by ILP/AKH, we provide the evidence of a new insight of homeostatic endocrine control, by which enriched our understanding of the functions of neuropeptides related to energy homeostasis.

Crustacean cardioactive peptide, Myosuppressin, Homeostasis

発表責任者：Zhou Yijun（0228757079@edu.k.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2B06p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ 総合学習プラザ B06 会場

変態阻害物質を用いたミズクラゲのストロビレーションの組織化学的解析
Histochemical analysis of strobilation in the moon jellyfish, *Aurelia coerulea*, using metamorphosis-inhibiting substances
○藤井 夏鈴[1]、荒川 賢治[2]、国吉 久人[2]（[1]広島大・生物圏、[2]広島大院・統合生命）
○Karin FUJII[1], Kenji ARAKAWA[2], Hisato KUNIYOSHI[2]（[1]Grad. Sch. Biosphere Sci. Hiroshima Univ., [2]Grad. Sch. Integr. Sci. Life. Hiroshima Univ.）

［背景］刺胞動物ミズクラゲ *Aurelia coerulea* の生活環は、雌雄異体の成体クラゲが有性生殖を行う有性世代と出芽や分裂によって無性的に増殖するポリプの無性世代から成る。ポリプは冬季に海水温が低下すると、胴体部分に複数の分節を持ったストロビラへと変態する。その後、各分節は 8 個の弁を持ったディスクに変化し、ディスクは 1 枚ずつ遊離してエフィラ(クラゲ形態の最初期幼生)となる。ポリプからエフィラ(クラゲ)への変態過程をストロビレーションと呼ぶ。ストロビレーションは、口側から反口側に向かって順に一つずつ分節が増える分節形成期と各分節がエフィラへと形態を変える形態形成期に分けられる。研究室内では、低温処理または indomethacin などの薬剤投与によりストロビレーションを誘導できる。演者らのグループでは、これまでに細胞増殖阻害剤の投与実験により、分節形成に細胞増殖が必要であることを明らかにし、BrdU ラベル法によるストロビレーション中の細胞増殖の可視化に成功した(2019 年度大会にて発表)。一方、インドール化合物の構造活性相関研究の過程で、分節形成阻害物質として tryptamine (TAM)などを見出した(2018 年度大会にて発表)。本研究では、TAM の分節形成阻害活性を利用し、分節形成と細胞増殖との関係を解析した。
［方法］低温処理によって調製した分節形成期ストロビラを TAM と BrdU を含む海水中で 23℃にて 24 h 培養した。培養後 4 % formaldehyde/人工海水により固定し、パラフィン切片を作製し、抗 BrdU 抗体を用いて細胞増殖を可視化した。同時に、隣接切片を HE 染色し、内部形態を観察した。
［結果］分節形成期ストロビラに TAM を投与すると、24 h 後には分節形成が停止しており、48 h 後では分節間のくびれ部分から触手様の突起が生じた。HE 染色による内部構造の観察の結果、24 h 後では分節形成が停止しているにも関わらず形態異常は認められなかった。48 h 後に生じたくびれ部分の突起については、異所性の触手であることが確認できた。BrdU ラベル法の結果、TAM 投与後 24 h 以内の細胞増殖は、既に形成された分節とその次の分節が形成される予定領域で検出された。TAM を投与しない control 群のストロビラの BrdU ラベル染色においても、全く同様の結果が得られた。これらの結果から、TAM による分節形成の停止は細胞増殖阻害に起因したとは考えられず、細胞増殖後に働く分節形成誘導因子の存在が示唆される。現在、異所性触手の形成と細胞増殖の関係を調べるため、TAM 投与後 24～48 h の間に BrdU を投与し、この間の細胞増殖の検出を進めている。

jellyfish, metamorphosis, cell proliferation

発表責任者：国吉　久人（hkuni@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：2B07a01
講演日時：3 月 26 日 09:30～ 総合学習プラザ B07 会場

霊長類味蕾オルガノイドを用いたうま味評価系構築の試み

Generation umami detecting system using primate taste organoid

○中安 亜希[1]、金丸 青里香[1]、稲葉 明彦[1]、佐藤 幸治[2]、今井 啓雄[3]、山根 拓実[1]、大石 祐一[1]、岩槻 健[1] ([1]東農大、[2]生理研、[3]京都大)
○Aki Nakayasu[1], Serika Kanemaru[1], Akihiko Inaba[1], Kouji Sato[2], Hiroo Imai[3], Takumi Yamane[1], Yuiti Ooisi[1], Ken Iwatsuki[1] ([1]TUA, [2]NIPS, [3]Kyoto Univ.)

【背景・目的】

5 基本味の一つであるうま味は食に満足感を与えるだけでなく、減塩や減脂などに寄与する味質であり、現代社会においてうま味の重要性は増している。しかし、客観的にうま味を評価することは容易ではない。我々は最近、マウスに続いて霊長類の味蕾オルガノイドの作製に成功し、幹細胞と分化した味細胞を *in vitro* において長期に培養することを可能にした。マウスなどのげっ歯類と霊長類とではうま味物質に対する反応が異なるため、うま味についての研究には霊長類味蕾オルガノイドを用いるのが適切であると考える。本研究では、作製した霊長類味蕾オルガノイドにてうま味受容細胞の有無を確認するとともに、うま味物質に対する応答やうま味反応の特徴である相乗効果が観察できるか調べることを目的とする。

【方法】

ニホンザル有郭乳頭のトレンチ部位より味蕾オルガノイドを作製し、継代を繰り返し培養 1 ヶ月、2 ヶ月、18 ヶ月後にトランスクリプトーム解析を行い味蕾オルガノイドが維持されるかを確認した。次に、in situ hybridization 法により *TAS1R1*、*TAS1R3*、*PLCb2*、*TRPM5*、*GNAT3* などうま味受容とそのシグナル伝達に必要な分子の mRNA が同オルガノイドで発現するかを調べた。続いて Ca^{2+}イメージング法にて、サル味蕾オルガノイドにおいてうま味の検出を試みた。Poly-L-lysine およびラミニンコーティングしたガラス底皿に同オルガノイドを播種した後、Ca^{2+}蛍光プローブである Fura2-AM を導入し、グルタミン酸カリウム（MPG）などのうま味物質の添加後において細胞内の Ca^{2+}濃度に変化が起こるかを観察した。また、うま味の相乗効果も期待できるため、MPG と供にイノシン酸ナトリウム（IMP）を添加して反応を調べた。

【結果・考察】

トランスクリプトーム解析により、1 年半を超える長期にわたり安定して味蕾オルガノイド培養系が維持可能であることが確認された。同培養系は、他の組織由来のオルガノイド培養系と比較し、うま味受容体をはじめとする味細胞関連因子を選択的に発現していた。In situ hybridization 法では、サル味蕾組織および味蕾オルガノイドにて特定の細胞がうま味受容に関わる mRNA を発現していることが示された。また、Ca^{2+}イメージング法によるうま味応答試験では 50 mM MPG に対する応答が認められた。同 MPG に IMP を加えると、うま味の相乗効果が観察でき、応答は繰り返し観察された。サル味蕾オルガノイドによるうま味応答が再現性よく検出できれば、これまでにない生体の味細胞と同等の “うま味センサー”としての利用が期待でき、新規調味料や食品の開発に役立つ魅力的なアッセイ系が構築できる。

taste, umami, organoid

発表責任者：岩槻　健（ki204886@nodai.ac.jp）

講演番号：2B07a02
講演日時：3 月 26 日 09:41～ 総合学習プラザ B07 会場

サル消化管オルガノイドを用いた霊長類特異的 Tuft 細胞機能の探索
Exploration of primate-specific tuft cell function using enteroids derived from monkey
○稲葉 明彦[1]、有永 理峰[2]、早津 徳人[3]、岡崎 康司[3]、遠藤 高帆[3]、今井 啓雄[4]、山根 拓実[1,2]、大石 祐一[1,2]、岩槻 健[1,2] ([1]東農大院農、[2]東農大応生、[3]理研 IMS、[4]京大霊長類研)
○Akihiko INABA[1], Ayane ARINAGA[2], Norihito HAYATSU[3], Yasushi OKAZAKI[3], Takaho ENDO[3], Hiroo IMAI[4], Takumi YAMANE[1,2], Yuichi OISHI[1,2], Ken IWATSUKI[1,2] ([1]Grad. Sch. of Tokyo Univ. of Agric., [2]Tokyo Univ. of Agric., [3]RIKEN IMS , [4]Kyoto Univ.)

消化管は口腔より続く器官であり、上皮細胞は常に多くの外来因子に晒されている。管腔内の環境は、栄養素や機能性成分など有益なものばかりでなく、化学物質や病原微生物、寄生虫など有害となるものも存在するため非常に複雑であるが、様々な要因により恒常性は高度に保たれている。その一端を担う腸管上皮に存在している Tuft 細胞は、味覚関連分子を発現する味細胞様の細胞であることが知られているが、上皮のわずか 1%未満しか存在しないため、詳細な機能は不明であった。

最近、Tuft 細胞が寄生虫感染により 2 型自然免疫を活性化することが明らかとなったが、機能解析は主にげっ歯類を用いて進められている。しかしながら、げっ歯類とヒトでは味覚感受性が異なっている他、食性の差より腸内環境も異なると推測される。そこで我々は、ヒトへの応用を見据え、新たな解析モデルとして霊長類であるニホンザルより消化管オルガノイドを確立した（熊木ら, 農芸化学会 2018）。今回我々は、サル消化管オルガノイドを用いて存在比の少ない Tuft 細胞の分化誘導を試みた。Tuft 細胞は 2 型自然リンパ球(ILC2)を活性化することが報告されているが、活性化した ILC2 から分泌されるインターロイキン(IL)-4 などの Th2 サイトカインにより Tuft 細胞数が増加するというフィードバック機構が存在する。そこで、培養したサル小腸オルガノイドに対して IL-4 刺激を行うことで Tuft 細胞への分化を誘導した。その後、Tuft 細胞マーカーである DCLK1 に対する抗体にて免疫組織化学染色を行い Tuft 細胞の存在を確認するとともに、分化誘導によって変動する遺伝子を特定するため次世代シーケンサーによる網羅的解析を行った。免疫染色の結果より、通常の分化誘導条件に比べ、IL-4 刺激によってオルガノイド中に存在する Tuft 細胞数が有意に増加していた。また IL-4 刺激によって発現が変動した遺伝子を解析した結果、Tuft 細胞特異的マーカー遺伝子の発現が有意に増加するとともに、味覚受容関連遺伝子の有意な増加を確認した。しかし、げっ歯類において Tuft 細胞に選択的に発現すると報告のある IL-25 については、遺伝子発現を確認できなかった。このことから、これまでげっ歯類にて報告されているメカニズムとは異なる、霊長類特異的な Tuft 細胞メカニズムが存在することが示唆された。さらに、げっ歯類では確認されなかった多数のケモカインや抗菌ペプチドの遺伝子発現の増加を認めたことから、Tuft 細胞への分化が亢進するとともに異なる免疫反応が惹起される可能性も示唆された。

現在得られている霊長類に特徴的な応答及び Tuft 細胞特異的な遺伝子情報をもとに、げっ歯類との違いや、これまで明らかになっていない Tuft 細胞の機能に迫りたい。

organoid, tuft cell, primate

発表責任者：岩槻 健（ki204886@nodai.ac.jp）

講演番号：2B07a03
講演日時：3 月 26 日 09:52～ 総合学習プラザ B07 会場

老化傾向にある筋芽細胞の分化不全・筋萎縮形質は細胞外小胞（エクソソーム）を介して周辺細胞に伝播し得る

Muscle atrophy phenotype of senescence myoblast can be transmitted to surrounding cells via extracellular vesicles, exosomes.

杉村 友梨、服部 秀美、○江藤 望（宮崎大農）
Yuri SUGIMURA, Hidemi HATTORI, ○Nozomu ETO (University of Miyazaki)

【背景】老化関連疾患の 1 つであるサルコペニアは、加齢に伴う骨格筋の量や機能の低下を特徴とする。サルコペニア発症における老化細胞の役割を検討するため、我々はマウス骨格筋芽細胞（C2C12）の *BubR1* を低発現させた老化誘導筋芽細胞（C2C12BKD）を樹立し、その性質を報告してきた。サブクローンである C2C12BKD12（BKD12）は、細胞増殖能の低下、サイクリン依存性キナーゼ阻害因子（$p16^{INK4a}$ や $p19^{Arf}$）発現の増加、SA-β-gal 染色の陽性を示し、老化傾向を有していた。更に、BKD12 を分化誘導しても、筋分化関連遺伝子（*MyoD* や *Myogenin*）がほとんど発現せず、分化の程度を表す fusion index も有意に低かった。また、筋タンパク質同化経路を抑制する *IGFBP7* や *IL-6* 発現の増加、筋特異的ユビキチンリガーゼ *MuRF-1* や *Atrogin-1* 発現の増加、サルコペニア筋組織で発現量が増加する *CCN1* 発現の増加が各々認められた。一部の miRNA の発現パターンも mRNA 発現と連動していた。以上より BKD12 は、筋修復能力の低下や筋タンパク質代謝バランスの不均衡を示すサルコペニアと類似した特徴を持つことが示唆されている。

【目的】老化関連疾患の発症を促進する一因として、老化細胞と周辺細胞との細胞間作用が考えられている。そこで、BKD12 の形質が他の細胞に伝播し得るかどうか解析することを目的とした。

【方法・結果】BKD12 由来馴化培地（BKD-CM）を用いて C2C12 の培養を行うと、BKD12 側で生じていた分化能の低下や異化経路に傾く筋タンパク質代謝バランスの不均衡が、C2C12 側でも同様に観察された。BKD12 由来細胞外小胞（Extracellular Vesicles or Exosome）の関与を検討したところ、BKD12 由来 EV が C2C12 の分化能や筋タンパク質代謝に負の影響を及ぼすことが観察された。また、BKD12 側で発現変動していた miRNA が BKD-CM で培養した C2C12 側でも同様に発現変動していた。これは、BKD12 由来 EV を介して輸送されたものが C2C12 の筋タンパク質代謝関連遺伝子を負に制御することを示唆するものと考えられた。

【結論】老化細胞の細胞老化関連分泌現象（SASP）は一般的に細胞から直接分泌されるタンパク質を指すが、本研究では EV を介しても負の影響を周辺の細胞に及ぼしている可能性が示唆された。

extracellular vesicles, senescent cell, sarcopenia

発表責任者：江藤　望（neto@cc.miyazaki-u.ac.jp）

講演番号：2B07a04
講演日時：3 月 26 日 10:03～ 総合学習プラザ B07 会場

pH とグルコース濃度の違いが C2C12 の筋分化に与える影響
Effects of pH and glucose concentration on myogenic differentiation of C2C12.
○野口 翔平、山口 貴史、江藤 望、服部 秀美（宮崎大農）
○Shohei NOGUCHI, Takafumi YAMAGUCHI, Nozomu ETO, Hidemi HATTORI (Miyazaki Univ.)

【目的】加齢に伴い筋肉量減少や、筋力低下が起こる病気をサルコペニアという。サルコペニアは 65 歳以上の高齢者の５人に１人が発症していることが知られており、大きな社会問題となっている。我々は、このサルコペニアの治療及び予防のために研究を行っている。筋組織は、グルコースをエネルギー源として利用するためグルコース濃度の違いによる筋分化能の評価に関する報告は存在するが、そのメカニズムに関する報告は少ない。また、乳酸の発生によって細胞内の pH が酸性になり、筋機能が低下するという報告もある。そこで本研究では、pH とグルコース濃度の違いが筋分化に影響を与えるのか *in vitro* で検討した。
【材料および方法】細胞はマウス由来筋芽細胞株 C2C12 を用いた。筋分化誘導培地として２% 牛胎児血清を含む、低濃度（1.0 g/L）、および高濃度（4.5 g/L）のグルコース D-MEM を用い、HEPES の有無による影響も検討した。分化 5 日目の細胞を回収し、筋分化マーカーである Myf-5、MyoD、myogenin、ミオシン重鎖(MHC)、及びグルコーストランスポーター（GLUTs）である GLUT1、4 の messenger RNA（mRNA）の発現量を RT-qPCR によって比較した。また、培養上清中の IGF-1 の量を ELISA で測定した。
【結果】培地条件の違いによる筋分化マーカーと GLUTs の mRNA 発現量を調べたところ、Myf-5 と GLUT4 は、どの条件でも有意な差は出なかった。MyoD と MHC は HEPES の有無にかかわらず高濃度のグルコース培地において発現量は有意に増加したが、myogenin は HEPES 含有高濃度のグルコース培地で有意に増加した。GLUT1 は HEPES の有無にかかわらず高濃度のグルコース培地において発現量は有意に減少した。また、培養上清中の IGF-1 のタンパク質量を比較したところ、HEPES の有無にかかわらず高濃度のグルコース培地において分泌量は有意に増加していた。
【考察】培地中のグルコース濃度が高いほど筋分化が促進されることがわかった。また、pH の安定化のために HEPES を加えた培地条件下では myogenin の発現量が有意に上がったことから、筋組織だけでなく、筋芽細胞の分化においても安定した pH の条件が重要であるということも明らかになった。GLUT1 の発現は細胞内グルコース濃度と逆相関するため、今回の結果からグルコースを多く取り込んでいることが示された。以上のことより、グルコースが多く取り込まれると筋分化が促進し、さらに IGF-1 のオートクリン作用によって筋分化がさらに加速するということが示唆された。しかし、pH の安定化と筋分化促進との関係性に関する詳しいメカニズムは不明なため、その解明は今後の課題である。

sarcopenia, myogenic differentiation, glucose concentration

発表責任者：服部秀美（h-hattori@cc.miyazaki-u.ac.jp）

講演番号：2B07a05
講演日時：3 月 26 日 10:14～ 総合学習プラザ B07 会場

速筋由来の筋サテライト細胞の性質を決定する因子の解析

Analysis of factors that define the properties of muscle satellite cells derived from fast-type muscle

○瀧川 花穂[1]、藤田 真理子[1]、小野 悠介[2]、亀井 康富[1]([1]京府大院生命環境、[2]熊本大発生医学研究所)
○ KAHO TAKIGAWA[1], MARIKO HUJITA[1], YUSUKE ONO[2], YASUTOMI KAMEI[1] ([1]Kyoto Prefectural Univ., [2]Kumamoto Univ.)

［背景・目的］
骨格筋は運動・糖取り込み・エネルギー代謝に重要である。加齢により骨格筋の萎縮と筋機能低下（サルコペニア）が生じ、寝たきりや車いす生活など生活の質の低下につながる。超高齢社会を迎えた我が国において、サルコペニアの予防・改善は健康寿命延伸の観点から重要な課題である。骨格筋線維は遅筋線維と速筋線維に大別される。遅筋線維はミトコンドリアを多く含むことから酸化系酵素活性が高く持久力に優れるが、収縮速度が遅い。速筋線維はミトコンドリア含有量が少ないがグリコーゲン顆粒が多く含まれ、解糖系酵素活性が高く、収縮速度が速い。筋サテライト細胞は未分化の骨格筋幹細胞であり、骨格筋の再生に深く関わっている。遅筋由来・速筋由来の筋サテライト細胞はそれぞれ遅筋線維・速筋線維に分化することが報告されている。しかし、成体の筋サテライト細胞において、遅筋線維、速筋線維の性質を規定する因子は完全には明らかになっていない。本研究では、遅筋・速筋由来の筋サテライト細胞における遺伝子発現を網羅的に解析し、筋サテライト細胞において速筋の性質を規定する因子を探索した。
［方法・結果］
C57BL/6J マウスの長趾伸筋（速筋）とヒラメ筋（遅筋）から筋サテライト細胞を単離し、分化培地で 2 日間培養し、マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析を行った。その結果、ヒラメ筋由来の筋サテライト細胞に比べて長趾伸筋由来の筋サテライト細胞において、複数の転写因子類(Tbx1、Hoxa1、Six2、Cited1)の遺伝子発現が増加していた。次に長趾伸筋（速筋）由来の筋サテライト細胞において Tbx1、Hoxa1、Six2、Cited1 をノックダウンし、速筋由来の筋サテライト細胞が遅筋様の遺伝子発現を示すかどうかを調べた。Tbx1、Hoxa1、Cited1 のノックダウンにより MyHC-Ⅰ（遅筋型）の遺伝子発現が高くなり、MyHC-Ⅱb（速筋型）の遺伝子発現が低くなったため、遅筋様の性質を示したと考えられる。したがって、Tbx1、Hoxa1、Cited1 は筋サテライト細胞において速筋の性質を規定する因子である可能性が示唆された。一方で Six2 のノックダウンにより MyHC-Ⅰ、MyHC-Ⅱa、MyHC-Ⅱx、MyHC-Ⅱb の遺伝子発現が低くなった。したがって、Six2 は筋分化自体を規定している可能性が示唆された。これらのことから、速筋および速筋由来の筋サテライト細胞の形成を規定する因子に関する有力な手がかりを得た。これらの結果は速筋量が低下する老齢時のサルコペニアの予防改善法の開発に役立つ可能性がある。

muscle satellite cells, fast-type myofiber, transcription factors

講演番号：2B07a06
講演日時：3 月 26 日 10:35～ 総合学習プラザ B07 会場

G タンパク質共役受容体 LGR6 は筋分化調節に関与する
G protein-coupled receptor LGR6 is involved in regulation of myogenic differentiation

○山口 真由[1]、北風 智也[2]、原田 直樹[1]、乾 博[3]、山地 亮一[1] ([1]大阪府大院・生命環境、[2]神戸大院・農、[3]大阪府大・栄養)
○Mayu YAMAGUCHI[1], Tomoya KITAKAZE[2], Naoki HARADA[1], Hiroshi INUI[3], Ryoichi YAMAJI[1] ([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Grad. Sch. Agri. Sci., Kobe Univ., [3]Grad. Sch. Nutr., Osaka Pref. Univ.)

【目的】

骨格筋は損傷を受けると、骨格筋幹細胞のサテライト細胞が活性化し筋芽細胞へと分化する。単核の筋芽細胞はさらに分化し、筋芽細胞同士あるいは筋管細胞と融合することで多核の筋管細胞へと分化を遂げ、筋線維を形成し再生する。活性型ビタミン A である all-*trans* retinoic acid（ATRA）は筋分化促進作用を有し、その作用には核内受容体である retinoic acid receptor（RAR）を介して発現の上昇する遺伝子が関与すると推測されるが、これまでに筋分化に関与する RAR の標的遺伝子の情報はほとんどない。本研究グループではマウス C2C12 筋管細胞において ATRA に応答する遺伝子を RNA シークエンスにより網羅的に解析し、G タンパク質共役受容体 leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 6（LGR6）の発現が上昇することを見出した[1)]。しかし、骨格筋における LGR6 の機能は不明であることから、本研究では筋分化における LGR6 の役割について検討した。

【方法と結果】

C2C12 筋芽細胞を増殖培地において ATRA で刺激したところ、3 時間後に *Lgr6* mRNA の発現が上昇したが、RAR アンタゴニスト共存下では ATRA 刺激による *Lgr6* mRNA の発現上昇は抑制された。一方、筋分化中における LGR6 の発現パターンを解析するため、C2C12 筋芽細胞を筋管細胞に分化誘導したところ、3 時間後に *Lgr6* mRNA の発現が一過的に上昇した。さらに筋分化における LGR6 の役割を評価するため、siRNA を用いて LGR6 をノックダウンした筋芽細胞を分化させた。LGR6 のノックダウンにより筋芽細胞の分化の指標（differentiation index）と融合の指標（fusion index）が有意に低下したことから、LGR6 が筋分化に関与することが推測された。LGR6 には N 末端側にロイシンリッチリピートが繰り返された巨大な細胞外ドメイン（ECD）が存在する。そこで LGR6 の ECD が筋分化に関与するかを検討するため、可溶性の組換え LGR6-ECD 存在下で C2C12 筋芽細胞を分化させたところ、differentiation index と fusion index が有意に低下した。以上の結果から、LGR6 は RAR を介して発現が上昇する ATRA 応答遺伝子であり、また筋分化に必要な因子であると推測された。

1) Kitakaze T, *et al., BBA-Mol. Cell Res*. in press

Lgr6, retinoic acid, myogenic differentiation

講演番号：2B07a07
講演日時：3 月 26 日 10:46～ 総合学習プラザ B07 会場

老化促進モデルマウス SAMP1 の骨格筋においてβ-cryptoxanthin はオートファジーを活性化する

β-cryptoxanthin activates autophagy of skeletal muscle in senescence-accelerated mouse SAMP1

○野口 真里[1]、北風 智也[2]、向井 克之[3]、原田 直樹[1]、乾 博[4]、山地 亮一[1] ([1]大阪府大院・生命環境、[2]神戸大院・科技イノベ、[3]（株）ダイセル、[4]大阪府大院・栄養)
○Mari NOGUCHI[1], Tomoya KITAKAZE[2], Katsuyuki MUKAI[3], Naoki HARADA[1], Hiroshi INUI[4], Ryoichi YAMAJI[1] ([1]Dept. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Dept. Sci. Tech. and Innov., [3]Daicel Corporation, [4]Dept. Nutr., Osaka Pref. Univ.)

【目的】

加齢に伴い骨格筋は萎縮し、筋量や筋力が低下する。骨格筋を構成する筋線維でのタンパク質の合成と分解のアンバランスによるタンパク質量の減少が、加齢性筋萎縮の要因の一つとして考えられる。細胞内での不要なタンパク質を分解するオートファジーの活性は、加齢とともに低下する。オートファジー活性の低下による凝集タンパク質の蓄積は骨格筋の量的・質的な低下の原因となる。したがって、オートファジー活性の低下を防ぐ、あるいは改善する食品成分を摂取することは加齢性筋萎縮の予防に寄与すると期待される。高齢者において β-cryptoxanthin（β-CX）を含むカロテノイドの血中濃度が高いと筋力が強く、また歩行速度が速いという疫学調査結果がある。そこで本研究では骨格筋のオートファジーにおよぼす β-CX の影響を培養筋管細胞と老化促進モデルマウス（SAMP1）で検討した。

【方法・結果】

マウス由来筋芽細胞株 C2C12 細胞を筋管細胞に分化させた後、β-CX 存在下で 48 時間培養し、ウエスタンブロット法によりオートファジー関連因子の発現を評価した。β-CX はオートファジーマーカータンパク質である LC3-II のレベルを低下させ、選択的オートファジーの鍵因子である p62 の発現も低下させた。また、オートファゴソームとリソソームの融合を阻害するオートファジー阻害剤である bafilomycin A1 存在下で β-CX による LC3-II と p62 の減少は消失した。さらに加齢時の骨格筋におけるオートファジー関連因子の発現レベルを評価するため、20 週齢の SAMP1 に 10 週間 β-CX を経口投与（1 日あたり 0.5 mg）した。30 週齢時においてコントロールマウス（SAMR1）に比べて SAMP1 ではグリップテストによる筋力が低下していたが、β-CX 投与により筋力が増加した。また SAMR1 に比べて SAMP1 では有意にヒラメ筋の筋断面積が低下しており、β-CX 投与により筋断面積が増加傾向を示した。ヒラメ筋おけるオートファジー関連因子を測定したところ、SAMR1 に比べて SAMP1 で LC3-II、LC3-I、Beclin-1 そして p62 の発現レベルは高く、β-CX 投与により LC3-II、LC3-I、Beclin-1、p62 の発現レベルは減少した。これらの結果から、β-CX は C2C12 細胞においてオートファジーを活性化し、また SAMP1 で低下したオートファジー関連因子の発現を β-CX が緩和すると推測された。

autophagy, β-cryptoxanthin, aging

講演番号：2B07a08
講演日時：3 月 26 日 10:57～ 総合学習プラザ B07 会場

構造解析に基づいた筋形成型オリゴ DNA の短縮化

Shortening and structural analysis of myogenetic oligodeoxynucleotide

○池田 玲奈[1]、梅澤 公二[2]、二橋 佑磨[3]、進士 彩華[4]、下里 剛士[2]、鏡味 裕[1]、高谷 智英[1]([1]信州大農、[2]信州大バイオメディカル研、[3]信州大院総合医理工、[4]信州大院総合理工)
○Rena IKEDA[1], Koji UMEZAWA[2], Yuma NIHASHI[3], Sayaka SHINJI[4], Takeshi SHIMOSATO[2], Hiroshi KAGAMI[1], Tomohide TAKAYA[1] ([1]Fac. Agr., Shinshu Univ., [2]IBS, Shinshu Univ., [3]Grad. Sch. Med. Sci. Tech., Shinshu Univ., [4]Grad. Sch. Sci. Tech., Shinshu Univ.)

【背景】超高齢化社会では、加齢性の筋萎縮であるサルコペニアが増加している。サルコペニアによる運動能力の低下は、健康寿命を阻害する要因の一つである。筋組織の恒常性は、筋芽細胞と呼ばれる前駆細胞の増殖と分化によって保たれる。しかし、筋芽細胞の分化能は加齢とともに減弱する。我々は、筋芽細胞の分化を亢進する分子をスクリーニングした結果、テロメア配列を有する 18 塩基のオリゴ DNA 群（ODNs）が、極めて強力に筋分化を促進することを見出し、myoDNs（myogenetic ODNs）と命名した。最も活性の高い myoDN である iSN04 は、立体構造依存的に筋分化を誘導することが明らかになっている。本研究では、iSN04 と類似の構造をとると推測される、11-16 塩基のオリゴ DNA（iMyo01-08）を設計し、それらの筋分化促進作用を検討した。
【方法】初代培養したヒト、マウス、およびニワトリの筋芽細胞を 96 穴プレートに播種し、最終濃度 10-30 μM の ODN を添加した培地で筋分化を誘導した。48 時間後、骨格筋の最終分化マーカーであるミオシン重鎖（MHC）で蛍光免疫染色し、細胞あたりの MHC の蛍光強度を算出した。また、iMyo の立体構造を分子動力学的にシミュレーション解析した。
【結果】iMyo01 と 03 は、ヒト筋芽細胞の分化を有意に促進した。また、iMyo03 と 04 はマウス筋芽細胞の、iMyo01-04 はニワトリ筋芽細胞の分化を有意に増進した。いずれの筋芽細胞においても、iMyo05-08 は筋分化を促進しなかった。iMyo03 の立体構造をシミュレーションした結果、9-12 塩基目の GGGG が分子内で互いに近接していることがわかり、活性との関連性が示唆された。
【考察】iSN04 と iMyo03 は全ての筋芽細胞の分化を促進したが、iMyo01, 02, 04 の作用は動物種によって異なった。iMyo01-04 は、iSN04 の活性部位に相当する箇所に GGGG 配列を有する。一方、活性を示さなかった iMyo05-08 の当該配列は GGG である。すなわち、iMyo の GGGG 配列が寄与する構造が、筋分化促進作用に必須であると考えられた。iMyo01, 03, 04, 07 の立体構造を計算した結果、iMyo03 と 04 では配列後半の GGGG がスタックしていることがわかった。しかし、iMyo07 の GGG 配列はスタックしていなかった。iMyo03 と 04 は、iSN04 の活性部位と同様の局所構造を有するため、筋分化促進作用を示したと考えられる。今後、分子構造をさらに詳細に比較することで、筋形成型オリゴ DNA の活性に重要な構造的特徴を特定できると期待される。本研究により、従来 18 塩基であった myoDN を最短 12 塩基まで短縮することに成功した。myoDN の短縮化は、合成コストの削減、摂取後の吸収や細胞内輸送の効率化など、筋萎縮の予防・治療薬としての応用展開に有用であると期待される。

myoblast, oligodeoxynucleotide, myogenic differentiation

発表責任者：高谷智英（ttakaya@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2B07a09
講演日時：3 月 26 日 11:08～ 総合学習プラザ B07 会場

軟骨細胞分化マーカーSox9 の発現に及ぼす一酸化炭素ドナーCORM2 の影響

Effects of carbone monoxide donor CORM2 on chondrogenic differentiation via regulating Sox9

○関本 純輝[1]、井上 博文[2]、田中 未央里[2]、高橋 信之[1]、上原 万里子[1]([1]東農大院農、[2]東農大応生)
○Junki SEKIMOTO[1], Hirofumi INOUE[2], Miori TANAKA[2], Nobuyuki TAKAHASHI[1], Mariko UEHARA[1] ([1]Dept. of Food Nutr. Sci., Graduate School, Tokyo Univ. of Agric., [2]Dept. of Nutr. Sci. Food safty, Tokyo Univ. of Agric.)

【背景・目的】我が国では老若男女を問わず、生活習慣病や加齢性疾患に対する予防・改善効果について社会的関心が高く、超高齢社会という背景からも「ロコモティブシンドローム」に対する有効成分の探索が求められている。変形性関節症はロコモティブシンドロームの一種であり、加齢に伴う軟骨破壊と慢性的な軟骨の変性や骨性増殖(軟骨石灰化) が起こることで関節痛や運動障害を引き起こす疾患である。軟骨前駆細胞は、分化初期時に転写因子である Sox9 によりⅡ型コラーゲンやアグリカンを誘導することで軟骨機能を維持・亢進する。その一方で、軟骨細胞が肥大化し、アルカリフォスファターゼ(ALP)の発現増加を介して骨性増殖シグナルが増大した結果、変形性関節症が発症する。このような背景から Sox9 の発現は増加させるが骨性増殖を誘導しない代謝改善を利用した新規治療法に期待が高まっている。そこで我々は、生体内で産生されるガス状分子であり、抗酸化能を有する一酸化炭素(Carbone monoxide: CO)に着目した。先行研究において、急性肺傷害や敗血症の患者に対し、CO ドナーである CO-releasing molecule(CORM)を投与することで炎症を緩和することが明らかとなっているが、CO による変形性関節症の改善効果については未だ報告がない。そこで本発表では、CO ドナー投与が軟骨細胞の初期分化に関わる Sox9 の発現および ALP 活性増大を抑制するか否かについて明らかにすることを目的とした。【方法・結果】まず、マウス軟骨前駆細胞株 ATDC5 細胞に一酸化炭素ドナーとして CORM2 を終濃度 1～100μM となるように 24 時間処理後、WST-8 法による細胞毒性評価を行った。その結果、無処理群に比し、CORM2 濃度 10μM までは細胞毒性を示さなかったが、30μM より著しい生存率の低下を認めた。そこで CORM2 処理濃度を最大 10μM とし、Sox9 の発現が CORM2 処理濃度(1～10μM)により誘導されるのか否かについて western blot 法を用いて解析した。さらに、CORM2 処理時間(3h, 6h, 24h)が Sox9 発現に及ぼす影響についても検討した。その結果、Sox9 タンパク質は CORM2 濃度依存的に発現量が増大したが、時間依存的な発現量の変動に差はなく、6 時間処理から Sox9 の発現は上昇した。続いて、軟骨細胞の骨性増殖に対する CORM2 の影響を解析するために、骨性増殖のマーカーである ALP 活性を 4 週間の長期培養にて解析を行った。その結果、無処理群に比し、CORM2 処理では 2 週目より ALP 活性が有意に低下し、3 週目、4 週目においても CORM2 処理群は無処理群に比し有意に低値を示した。【結論】以上より、CORM2 投与は軟骨細胞の初期分化を促進するが、軟骨石灰化の亢進には影響しない可能性が示唆された。現在、CORM2 処理による Sox9 発現制御シグナルについて解析中である。

Carbone monoxide, Chondrocyte, Osteoarthritis

発表責任者：上原 万里子（mari@nodai.ac.jp）

講演番号：2B07a10
講演日時：3 月 26 日 11:19～ 総合学習プラザ B07 会場

空気暴露に刺激される表皮分化のメカニズム解析
Studies of epidermal differentiation by the air-liquid interface stimulation
○手島 裕文、伊藤 帆南、加藤 まなみ、栗林 美樹、辰川 英樹、人見 清隆 (名大院創薬科学)
○Hirofumi Teshima, Honami Ito, Manami Kato, Miki Kuribayashi, Hideki Tatsukawa, Kiyotaka Hitomi (Grad. Sch. of Pharm. Sci., Nagoya Univ.)

【背景・目的】
ヒト表皮は外環境に対するバリアとして機能する多層の細胞層である。表皮基底部の未分化な細胞が立体的に分化増殖し、最外層に脱核した死細胞から構成される角質層を形成することで表皮は完成する。この一連の分化過程は細胞培養で再現できるが、ヒト表皮モデルの培養では、細胞を気相に接触させる空気暴露という操作を必須とする。液体培地中で行う通常の細胞培養と比較すると、空気暴露は細胞の生存を妨げるような刺激にも関わらず、本環境下で表皮細胞の立体的な分化増殖が亢進する。培養系の確立から数十年経過し、再現された表皮自体に利用価値は見出されてきたが、空気暴露が表皮分化を刺激するメカニズムについては明らかにされてこなかった。そこで本研究では、この特異な培養系を通して表皮分化メカニズムの解明を目指す。
【方法・結果】
空気暴露が表皮分化に及ぼす影響を明らかにするため、空気暴露を行う群（以下、Air）と空気暴露を行わない群（以下、Liq）の対照実験を行った。まず形態学的解析として表皮の Hematoxylin・Eosin 染色を行ったところ、Liq で形成される表皮は薄層化し、角質層に核が残存することが明らかとなった。加えて、分化マーカーである Transglutaminase3・Involucrin、増殖マーカーである Keratin14・ΔNp63 の発現を定量 PCR で評価したところ、Air に対し Liq で分化・増殖マーカー遺伝子の発現が低下した。これらのことから空気暴露を行わないと表皮細胞の分化増殖が遅滞することを明らかにした。また空気暴露に起因する変動を見出すために Air・Liq それぞれのトランスクリプトーム解析を行った。形態的な変化がはじめて観察された空気暴露後 2 日目を対象とした。この結果 2 群間で変動のあった遺伝子を計 78 個同定し、パスウェイ解析から Liq において低酸素応答シグナルの関連因子が変動していることを明らかにした。同定した遺伝子群の中でも、低酸素応答因子である HIF1a を負に制御する EGLN3（PHD3）が顕著に変動していた。そのため本因子に着目し、表皮形成過程における経時的な発現変動を Immunoblotting および定量 PCR にて解析した。その結果、表皮が正常に形成される Air において EGLN3 は著しく低下し、異常な表現型を示す Liq において発現が増加することを明らかにした。以上の結果から、EGLN3 が空気暴露依存的にその発現を変動させ、表皮の分化増殖に影響を与えることが示唆された。現在その詳細なメカニズムについてさらなる解析を進めるとともに、網羅的解析で検出した他の因子についても検討している。

epidermis, cell differentiation, EGLN3 (PHD3)

発表責任者：手島裕文（hirofumi.teshima1@gmail.com）

講演番号：2B07a11
講演日時：3 月 26 日 11:40～ 総合学習プラザ B07 会場

粘膜型マスト細胞の分化機構の解明
Differentiation mechanism of mouse mucosal mast cells
○中野 信浩[1]、才田 一樹[1,2]、北浦 次郎[1]、八代 拓也[2]、西山 千春[1,2]、奥村 康[1]、小川 秀興[1]([1]順天堂大院医、[2]東理大基工)
○ Nobuhiro NAKANO[1], Kazuki SAIDA[1,2], Jiro KITAURA[1], Takuya YASHIRO[2], Chiharu NISHIYAMA[1,2], Ko OKUMURA[1], Hideoki OGAWA[1] ([1]Juntendo Univ., [2]Tokyo Univ. of Science)

【背景】マスト細胞には粘膜型と結合組織型の 2 種類のサブタイプが存在する。腸管粘膜の粘膜型マスト細胞は、食物アレルギーにおける主要なエフェクター細胞であり、炎症時に著しく増加することが知られている。粘膜型マスト細胞は、粘膜組織内でマスト細胞前駆細胞から最終分化して形成されると考えられているが、その分化誘導因子や分化機構ははっきりとしていない。我々は以前に、マウスのマスト細胞上に発現する Notch 受容体を介したシグナルが、粘膜型マスト細胞分化に寄与していることを明らかにした。一方で、以前から TGF-β も粘膜型マスト細胞の分化を誘導する因子ではないかと考えられてきた。
【目的】粘膜型マスト細胞分化における Notch シグナルと TGF-β シグナルの関係、及びそれらによる分化機構を明らかにする。
【方法】マウス骨髄由来マスト細胞（BMMC）を Notch リガンド強制発現 CHO 細胞、または TGF-β 存在下で培養し、粘膜型マスト細胞のマーカー分子 mouse mast cell protease (mMCP)-1, mMCP-2, CD103 の発現を解析した。
【結果】Notch リガンド及び TGF-β は、それぞれ単独で各マーカー分子発現を誘導したが、両者が共存することでその効果は相乗的に増加した。興味深いことに、TGF-β による各マーカー分子の発現誘導は、Notch シグナル阻害剤により抑制された。また、Notch リガンドによるマーカー分子発現誘導は、TGF-β 受容体阻害剤により顕著に抑制された。さらに、TGF-β シグナル伝達分子 SMAD4 を siRNA によりノックダウンさせた BMMC では、Notch リガンドによるマーカー分子発現誘導が有意に抑制された。これらの結果から、粘膜型マスト細胞分化において、Notch シグナルと TGF-β シグナルは相互に作用し合っていることが示された。次に、これらのシグナルが各マーカー分子発現を誘導する機序を明らかにするため、各遺伝子のプロモーター領域におけるエピジェネティック修飾をクロマチン免疫沈降法により解析した。mMCP-1 及び mMCP-2 をコードする遺伝子のプロモーターは Notch シグナルにより、CD103 をコードする遺伝子のプロモーターは TGF-β シグナルにより、それぞれ転写を活性化させるヒストン修飾が誘導された。
【結論】Notch シグナルと TGF-β シグナルは、粘膜型マスト細胞の形質を決定する遺伝子のプロモーター領域のエピジェネティック修飾を介し、協調的に作用することで粘膜型マスト細胞分化を誘導していることが示された。

Mucosal mast cell, Notch, TGF-β

発表責任者：中野信浩（nbnakano@juntendo.ac.jp）

講演番号：2B07a12
講演日時：3 月 26 日 11:51～ 総合学習プラザ B07 会場

細胞内 cAMP は NAD^+合成系酵素 NAMPT の発現を介して脂肪細胞分化を制御する
Intracellular cAMP contents regulate adipogenesis via induction of NAMPT expression
○三谷 塁一[1]、渡邉 駿[1]、和田 憲次郎[2] ([1]信州大院・総合理工(農学専攻)、[2]信州大農)
○Takakazu MITANI[1], Shun Watanabe[1], Kenjiro Wada[2] ([1]Dept. of Biosci. and Biotech., Grad. Sch. of Agric., Shinshu Univ., [2]Faculty of Agric., Shinshu Univ.)

【目的】Nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT)は NAD^+合成経路の律速酵素である。慢性的な高脂肪食摂取は NAMPT の発現量を低下し、細胞内 NAD^+量の減少に繋がる。NAD^+は、ATP 産生をはじめ生体内の多くの酸化還元反応の補酵素として働くことから、NAD^+量の減少は細胞や組織の機能低下を介して様々な病態を引き起こす。近年、脂肪組織における NAMPT の発現量の低下は、インスリン抵抗性の発症に繋がることが報告された。従って、脂肪細胞の機能維持にも NAMPT が関与することが示唆される。しかしながら、脂肪細胞における NAMPT の機能と発現制御メカニズムに関しては未だ不明な点が多い。そこで、本研究では、NAMPT が脂肪細胞の分化に及ぼす影響と脂肪細胞における NAMPT の発現制御メカニズムを解明することを目的とした。
【方法】マウス線維芽細胞株 (3T3-L1)をインスリン、デキサメタゾン、イソブチルメチルキサンチン(IBMX)の存在下で脂肪細胞へと分化させて解析に用いた。*Nampt* 遺伝子のプロモーター領域を組込んだベクターを作製し、*Nampt* のプロモーター活性をルシフェラーゼ活性として測定した。
【結果と考察】3T3-L1 細胞において、分化に伴い NAMPT の発現量は転写レベルで増加した。NAMPT の阻害剤である FK866 を添加することで、3T3-L1 細胞の脂肪細胞への分化は阻害された。また、インスリン様作用を持つアディポネクチンの分泌も FK866 の処理で減少した。分化に伴って NAMPT の発現量が転写レベルで増加したので、分化誘導剤が NAMPT の発現に及ぼす影響を *Nampt* のプロモーター活性を指標として解析した。その結果、*Nampt* のプロモーター活性は、IBMX によって増加することが示された。IBMX は、cAMP の分解を抑制することで PKA を活性化し、下流のシグナル伝達を行う。cAMP 誘導体である bucladesine の添加によっても *Nampt* のプロモーター活性は増加され、これらの活性増加は PKA 阻害剤によって抑制された。PKA シグナルは脂肪細胞の分化に関わる転写因子 C/EBPβ の発現を誘導する。C/EBPβ を siRNA でノックダウンすることで、分化に伴う NAMPT の発現量の増加は抑制された。さらに、3T3-L1 細胞で C/EBPβ を一過的に高発現させることで *Nampt* のプロモーター活性は亢進した。C/EBPβ が *Nampt* のプロモーター領域のどの位置に結合するのかをクロマチン免疫沈降法で解析した結果、C/EBPβ は *Nampt* プロモーターの−138/−42 の領域に結合することが示された。以上の結果から cAMP によって発現が誘導された C/EBPβ は *Nampt* のプロモーター領域に結合することで NAMPT の発現を誘導することが明らかとなった。そして、C/EBPβ による NAMPT の発現誘導が脂肪細胞の分化に必要であることが示された。

adipogenesis, NAMPT, cAMP

発表責任者：三谷塁一（mitani@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2B07a13
講演日時：3 月 26 日 12:02～ 総合学習プラザ B07 会場

脂肪細胞分化における Ca^{2+}活性型カリウムチャネル KCa3.1 の役割

The role of KCa3.1 on adipocyte differentiation

○西塚 誠[1]、中野 友香[2]、野崎 未紗[1]、今川 正良[2] ([1]弘前大農生、[2]名市大薬)
○Makoto NISHIZUKA[1], Tomoka Nakano[2], Misa Nozaki[1], Masayoshi Imagawa[2] ([1]Hirosaki Univ., [2]Nagoya city Univ.)

カリウムチャネルは、細胞内のカルシウムイオン濃度やシグナル伝達を制御することにより、細胞の分化、増殖に関与していることが知られている。しかし、カリウムチャネルと肥満形成ならびに脂肪細胞分化の関連性については不明な点が多い。そこで本研究では、肥満形成における各種カリウムチャネルの発現を検討した。さらに、Ca^{2+}活性型カリウムチャネルに属する $K_{Ca}3.1$ に着目し、脂肪細胞分化における役割について検討を行った。

高脂肪食負荷により肥満を誘発したマウスの白色脂肪組織を採取し、各種カリウムチャネルの発現量を定量 PCR により検討した。電位依存性カリウムチャネルである $K_V7.1$ や内向き整流性カリウムチャネルである $K_{ir}2.2$ などは、普通食を負荷したマウスに比べ、高脂肪食を負荷したマウスの白色脂肪組織において有意に発現が低下した。一方、Ca^{2+}活性型カリウムチャネルである $K_{Ca}3.1$ や Two-pore 型カリウムチャネルである $K_{2P}3.1$ などは高脂肪食負荷により発現が有意に増加した。これらの結果より、肥満形成において多くのカリウムチャネルの発現が変動していることが明らかになった。次に、Ca^{2+}活性型カリウムチャネルである $K_{Ca}3.1$ に着目し、脂肪細胞分化との関連について検討を行った。脂肪細胞分化過程において $K_{Ca}3.1$ は分化誘導後 6 時間に一過性に発現が増加することが分かった。さらに、前駆脂肪細胞が含まれる stromal vascular fraction (SVF) と成熟脂肪細胞が含まれる adipocyte fraction (AF) に分画を行った結果、$K_{Ca}3.1$ は SVF 画分において発現が高いことを見出した。

次に、KCa3.1 の脂肪細胞分化における役割について検討した。$K_{Ca}3.1$ の発現抑制により、脂肪滴の蓄積量やトリグリセリド量が増加に加え、脂肪細胞分化関連遺伝子の発現増加が観察された。その一方、KCa3.1 の過剰発現により脂肪細胞分化が抑制されることも明らかになった。以上の結果より、Ca^{2+}活性型カリウムチャネルである $K_{Ca}3.1$ は脂肪細胞分化を負に制御する機能を有することを明らかにした。

adipocyte differentiation, potassium channels

発表責任者：西塚　誠（nishizuka@hirosaki-u.ac.jp）

講演番号：2B07p01
講演日時：3 月 26 日 13:50～ 総合学習プラザ B07 会場

転写因子 EHF はランゲルハンス細胞の分化に関与する

Transcription factor EHF is involved in the differentiation of Langerhans cells

○矢野 堅士[1,2]、八代 拓也[2]、西山 千春[1,2]、北浦 次郎[1]、奥村 康[1]、中野 信浩[1] ([1]順天堂大院医、[2]東理大基礎工)
○Kento YANO[1,2], Takuya YASHIRO[2], Chiharu NISHIYAMA[1,2], Ziro KITAURA[1], Ko OKUMURA[1], Nobuhiro NAKANO[1] ([1]Juntendo Univ., [2]Tokyo Univ. of Science)

【目的】Ets ファミリーに属する Ets homologous factor (EHF)は上皮特異的な転写因子として同定され、上皮の分化・増殖や腫瘍の形成に関わることが報告されている。最近 EHF が血球系細胞である樹状細胞にも発現していることが示されたが、樹状細胞における EHF の機能は多くが不明なままである。我々はマウス皮膚に存在する樹状細胞である表皮ランゲルハンス細胞や真皮樹状細胞に *Ehf* 遺伝子が高発現していることを見出した。そこで、本研究では皮膚に特異的な樹状細胞の機能や遺伝子発現に EHF が果たす役割を明らかにすることを目指した。
【方法】レトロウイルスベクターを用いてマウス骨髄由来樹状細胞に *Ehf* 遺伝子を導入し、細胞特異的な表面分子や各種転写因子の発現レベルを測定した。また、ゲノム編集を用いて *Ehf* 欠損マウスを作出し皮膚樹状細胞の表面分子発現を指標に分化を観察すると共に、ランゲルハンス細胞が病態形成に関わる疾患である接触性皮膚炎のマウスモデルを作製して、EHF 欠損が皮膚の免疫応答に及ぼす影響を解析した。
【結果】*Ehf* 遺伝子を強制発現させた骨髄由来樹状細胞では、樹状細胞の細胞表面マーカーである CD11b、CD11c、MHC class II (MHCII) の発現量が顕著に増加し、ランゲルハンス細胞に特異的な Langerin (CD207)の発現が誘導されることがフローサイトメトリーによる解析で明らかになった。樹状細胞分化に対して抑制的に働く転写因子 GATA-1 及び GATA-2 の発現は顕著に低下した。EHF がランゲルハンス細胞の分化促進に関与していることを示唆する結果が得られたことから、次に *Ehf* 欠損マウス表皮のランゲルハンス細胞について細胞表面分子の発現を解析した。野生型マウス表皮のランゲルハンス細胞は $MHCII^{high}CD11b^{+}CD207^{+}$の単一な細胞群であったが、*Ehf* 欠損マウスでは $MHCII^{high}CD11c^{+}CD207^{+}$と $MHCII^{int}CD11b^{-}CD207^{-}$の 2 つの細胞集団が検出された。*Ehf* 欠損マウスを用いた接触性皮膚炎モデルでは、野生型マウスと比較してハプテン塗布により惹起される耳介の肥厚が軽減された。
【結論】転写因子 EHF がランゲルハンス細胞の分化に寄与することが示された。EHF を欠損すると、ランゲルハンス細胞の分化に異常をきたし、ハプテンによって惹起される接触性過敏症反応が減弱されたと考えられる。

Ets homologous factor, Langerhans cells, Differentiation

発表責任者：中野信浩（nbnakano@juntendo.ac.jp）

講演番号：2B07p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ 総合学習プラザ B07 会場

T-box ファミリー転写因子 Eomesodermin による IFN-γ遺伝子の発現調節機構の解析

Regulation of IFN-γ gene expression by T-box family transcription factor Eomesodermin

○中尾 彩香、原田 美鈴、東 幸奈、谷垣 里穂、片岡 孝夫（京工繊大院・応用生物）
○Ayaka NAKAO, Misuzu HARADA, Yukina HIGASHI, Riho TANIGAKI, Takao KATAOKA (Kyoto Institute of Technology)

【目的】

Interferon-γ (IFN-γ)は、Th1 細胞や細胞傷害性 T 細胞などの免疫細胞から産生されるサイトカインであり、ウイルス感染や腫瘍細胞に対する免疫応答の調節に関わっている。マウス IFN-γ遺伝子の制御領域は、プロモーター領域の他に、遠位の制御領域である 9 か所の非コード保存領域 conserved noncoding sequence (CNS)を含む約 140 kb からなる。T-box ファミリー転写因子 Eomesodermin (Eomes)は、IFN-γ の発現を調節する役割を有しているが、その IFN-γ の発現調節機構は十分に理解されていない。我々は、マウスリンパ腫由来 BW5147 細胞において、カルシニューリン経路を阻害する FK506 が IFN-γ遺伝子のプロモーター領域や CNS への Eomes の結合を減少させることを見出した[1)]。これらの結果は、IFN-γ 遺伝子の転写には、Eomes 及びカルシニューリン経路によって活性化される転写因子 nuclear factor of activated T cells (NF-AT)が関与していることを示している。本研究では、Eomes 依存的な IFN-γ の発現調節機構を解明することを目的として、2 種類のマウスリンパ腫 BW5147 細胞と EL4 細胞を用いて、IFN-γ遺伝子の発現における Eomes、NFAT、NF-κB の関与を解析した。

【方法と結果】

本研究では、Eomes を安定発現させたマウスリンパ腫 BW5147 細胞に加えて、Eomes を安定発現させた EL4 細胞を作製し、phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)と ionomycin(IM)で共刺激した後、3 つの転写因子である Eomes、NFATc2、NF-κB サブユニット RelA の IFN-γ遺伝子への結合量を ChIP アッセイにより解析した。その結果、Eomes を強制発現させた BW5147 細胞や EL4 細胞では、Eomes だけでなく、NFATc2 や RelA が IFN-γ遺伝子のプロモーター領域や特定の CNS へ結合することが観察された。したがって、Eomes は NFAT 及び RelA の IFN-γ遺伝子の発現を調節していると考えられた。次に、Eomes を発現させたリンパ腫における PMA と IM の共刺激時の IFN-γ の mRNA の発現量をリアルタイム PCR により解析した。BW5147 細胞において、NF-κB 経路を阻害する TPCA-1 で処理すると、PMA と IM の共刺激による IFN-γ の mRNA 発現は IL-2 mRNA 発現に比べて弱いが抑制された。一方、EL4 細胞では、TPCA-1 によって、IL-2 の mRNA 発現は減少したが、逆に IFN-γ の mRNA 発現は亢進することが観察された。これらの結果から、NF-κB は IFN-γ の産生を正または負の調節していることが示唆された。

【参考文献】

[1] Fukuoka, N. et al., Genes to Cells, 21, 146-162 (2016)

Eomesodermin, Interferon-γ, NF-κB

講演番号：2B07p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ 総合学習プラザ B07 会場

マウス海馬由来 HT22 細胞における酸化ストレス依存的なエクソソーム修飾

Oxidative stress modifies exosomes in HT22 murine hippocampal cells

○佐藤 飛翔[1]、田辺 岳海[2]、宮西 伸光[3,4]、根建 拓[1,2]([1]東洋大学生命科学部応用生物科学科、[2]東洋大学大学院生命科学研究科、[3]東洋大学食環境科学部食環境科学科、[4]東洋大学大学院食環境科学研究科)

○Tsubasa SATO[1], Takemi TANABE[2], Nobumitsu MIYANISHI[3,4], Taku NEDACHI[1,2] ([1]Graduate School of Life Sciences Toyo Univ., [2]Department of Life Sciences Toyo Univ., [3]Graduate School of Food Sciences Toyo Univ., [4]Department of Food Sciences Toyo Univ.)

神経変性疾患の進行に酸化ストレスの増大が関与することは広く知られている。近年、神経細胞における酸化ストレスの増大が細胞間コミュニケーション分子の動態に影響を与えることが明らかとなり、これらが神経変性疾患の進行制御に重要であることが示唆されている。例えば、当研究室では、マウス海馬由来神経細胞株 HT22 が酸化ストレス状態になることで、成長因子であるプログラニュリンをはじめとする分泌タンパク質の発現変動が生じることを明らかにしてきた。一方、核酸やタンパク質などの情報伝達に関与することが知られているエクソソームが、酸化ストレスの増大に伴いどのような動態変化を示すかについては不明な点が多い。そこで本研究では、HT22 細胞を用いて、酸化ストレス依存的なエクソソームの放出量変化及び質的変容を明らかにすることを目的とした。

はじめに、超遠心法を用いてエクソソームの精製を行った。エクソソーム精製度の確認は、透過型電子顕微鏡による形態観察、動的光散乱法 (Dynamic Light Scattering; DLS)による粒子計測定、そしてウェスタンブロットによるエクソソームマーカーの発現解析により行った。同時に、細胞障害性及び ROS 生産量を指標として HT22 細胞への最適な酸化ストレス負荷条件を設定した。

次に、酸化ストレスがエクソソーム放出量に影響を与えるかについて DLS 分析を用いた検討を行ったところ、酸化ストレス負荷によってエクソソーム放出量は有意に増加することが分かった。また、酸化ストレス依存的なエクソソーム含有タンパク質の変化について二次元電気泳動及び質量分析 (MALDI/TOFMS)を用いた解析を行ったところ、酸化ストレスに応答してエクソソーム含有量が変化する 2 つのタンパク質の同定に成功した。さらに近年、病態進行に伴って脳内で特殊な構造糖鎖変化が観察されることが報告された。そこで、エクソソーム表面の糖鎖変化についてもピリジルアミノ蛍光標識法を用いた分析を進めている。

以上、神経細胞における酸化ストレスの増大は、エクソソームの放出量を増加するのみならず、質的な変化を誘導することが明らかとなった。今後さらに研究を進めることで、神経変性疾患の進行メカニズムの理解に繋がるだけでなく、脳内の酸化ストレスを可視化する手法の開発につながる可能性も考えられる。

Exosome, Oxidative stress, Extracellular vesicle

発表責任者：根建 拓（nedachi@toyo.jp）

講演番号：2B07p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ 総合学習プラザ B07 会場

低分子量 G タンパク質 RhoJ の発現抑制は TGF-β1 誘導性 EMT を促進する

Knockdown of RhoJ enhances TGF-ß1-mediated EMT in cancer cells

○野崎 未紗、西塚 誠（弘前大農生）
○Misa NOZAKI, Makoto NISHIZUKA (Hirosaki Univ.)

【目的】RhoJ は、細胞のアクチン骨格形成を制御する Rho ファミリーに属する低分子量 G タンパク質であり、神経突起形成の誘導などに寄与することが知られている。がんの浸潤・転移に関わる重要なプロセスとして上皮間葉転換 epithelial to mesenchymal transition (EMT)が知られている。EMT とは、上皮細胞が高い移動能を持つ紡錘状の形態をした間葉系細胞様に形質を変化させる現象である。EMT が誘導されると、がん細胞の移動能・浸潤能が上昇するだけでなく、抗がん剤に対する抵抗性も惹起されることにより、悪性度がより高くなると考えられている。しかしながら、RhoJ の EMT における役割はこれまで不明であった。そこで本研究では、TGF-β1 誘導性 EMT における RhoJ の役割について検討した。

【方法】ヒト肺がん細胞由来 A549 細胞に TGF-β1 を添加し、EMT を誘導した。さらに、RhoJ を標的とした siRNA を用いて RhoJ の発現を抑制し、RhoJ が EMT に与える影響について、アクチンストレスファイバーの形成、細胞の形態変化、EMT 関連遺伝子の発現に着目し検討した。

【結果・考察】RhoJ を標的とした siRNA の導入により、RhoJ の発現を抑制した細胞に TGF-β1 を添加した。まずはじめに、F-actin に結合するファロイジンを用いてアクチンストレスファイバーを染色した。その結果、Luciferase を標的とする siRNA を導入したコントロール細胞と比較し、RhoJ 発現抑制細胞ではアクチンストレスファイバーの増強が観察された。また、細胞の長径と短径の比を計測することにより、細胞の紡錘形態への変化を評価した。その結果、RhoJ 発現抑制細胞ではコントロール細胞と比較して、より紡錘形態へ変化することが明らかになった。さらに、EMT に関連する遺伝子の発現について検討した。その結果、RhoJ 発現抑制細胞ではコントロール細胞に比べ、E-cadherin の発現が低下することがわかった。また EMT を制御する転写因子の 1 つである Snail の発現が増加することが明らかになった。

以上の結果から、RhoJ の発現抑制により A549 細胞の TGF-β1 誘導性 EMT が促進されることが示唆された。

EMT, RhoJ, Cancer

発表責任者：西塚誠（nishizuka@hirosaki-u.ac.jp）

講演番号：2B08a03
講演日時：3 月 26 日 09:52～ 総合学習プラザ B08 会場

光化学系 I-鉄欠乏ストレス誘導タンパク質超複合体の構造解析
Structural analysis of Photosystem I-Iron stress inducible protein A supercomplex
○秋田 総理[1,2]、長尾 遼[1]、加藤 公児[1]、中島 芳樹[1]、横野 牧生[3]、植野 嘉文[4]、鈴木 健裕[5]、堂前 直[5]、沈 建仁[1]、秋本 誠志[4]、宮崎 直幸[6]([1]岡大異分野、[2]JST さきがけ、[3]日本製粉、[4]神戸大院理、[5]理研 CSRS、[6]筑波大生存ダイナミクス)
○Fusamichi AKITA[1,2], Ryo Nagao[1], Koji Kato[1], Yoshiki Nakajima[1], Makio Yokono[3], Yoshifumi Ueno[4], Takehiro Suzuki[5], Naoshi Dohmae[5], Jian-Ren Shen[1], Seiji Akimoto[4], Naoyuki Miyazaki[6] ([1]Okayama Univ., [2]PRESTO, JST., [3]Nippon Flour Mills Co., Ltd., [4]Grad. Sch. Sci., Kobe Univ., [5]CSRS, RIKEN., [6]TARA, Tsukuba Univ.)

背景　鉄は光化学反応において、非常に重要な役割を持つ元素である。例えば、光化学系 II の電子伝達成分や補因子であるヘムや非ヘム鉄、光化学系 I(PSI)や電子伝達タンパク質であるフェレドキシンの鉄硫黄クラスターなどの構成成分であり、光合成生物にとって必要不可欠である。光合成細菌であるシアノバクテリアは鉄欠乏下において、分子質量 36kDa の鉄ストレス誘導タンパク質 IsiA(Iron-stress-inducible A)を発現する。発現した IsiA は PSI 三量体を取り囲み、巨大な PSI-IsiA 超複合体を形成することが報告されている。しかし、PSI-IsiA 超複合体は巨大さ故に精製・結晶化が困難なため、X 線結晶構造解析ではその構造を解明することは難しい。そこで、近年劇的な進歩を遂げたクライオ電子顕微鏡を用いて、PSI-IsiA 超複合体の単粒子構造解析を試みた。得られた構造を基に、PSI-IsiA 超分子複合体のエネルギー移動や構造構築の機構について議論する。
方法　シアノバクテリア *Thermosynechococcus vulcanus* (*T. vulcanus*)を鉄欠乏条件で 1 ヶ月培養した。菌体を凍結融解で破砕し、回収したチラコイド膜から界面活性剤を用いて PSI-IsiA 超複合体を可溶化し、ショ糖密度勾配遠心分離法によって精製した。ネガティブ染色試料の電顕観察によって、構造解析に適した PSI-IsiA 超複合体の均一な粒子が観察された。精製した試料を用いてクライオグリッドを作成した。最先端クライオ電顕 FEI Titan Krios で合計 20,799 枚のイメージを撮影した。収集したイメージからタンパク質粒子像をピックアップし、3 次元再構築を行った。得られた 3 次元密度分布図を基に原子モデルの構築・精密化を行った。
結果　最終的に 303,983 粒子を用いて 3 次元再構築を行い、2.74Å分解能の PSI-IsiA 超複合体の電子顕微鏡マップが得られた。このマップを用いて、PSI 三量体とそれを取り囲む 18 個の IsiA のモデル構築に成功した。PSI-IsiA 超複合体は中心に三回回転対称軸を持ち、1 つの PSI あたり 6 つの IsiA(1～6)が結合していた。IsiA は 6 回膜貫通タンパク質であり、17 個のクロロフィル a と 4 個の β-カロテンを結合していた。PSI-IsiA 超複合体のクロロフィルの配置からエネルギー移動経路を解析したところ、それぞれの IsiA から PSI への経路が見つかり、特に IsiA1 から PSI へとエネルギーが移動していることがわかった。また、IsiA4 は PSI の PsaF サブユニットと強く相互作用しており、PSI-IsiA4 の相互作用を足場に、IsiA-IsiA 同士の相互作用で PSI 三量体を取り囲んで行く構造構築の機構を提唱した。

Photosynthesis

講演番号：2B08a04
講演日時：3 月 26 日 10:03～ 総合学習プラザ B08 会場

光合成活性調節に関与する藍藻 Na^+/H^+ アンチポーターの解析

Functional analysis of Na^+/H^+ antiporter regulating photosynthesis

○辻井 雅[1]、狩野 文香[1]、小林 歩夢[1]、解良 康太[1]、児島 征司[2]、小口 理一[2]、彦坂 幸毅[2]、園池 公毅[3]、魚住 信之[1] ([1]東北大院・工、[2]東北大院・生命、[3]早稲田大学・教育科学学術院)
○Masaru Tsujii[1], Ayaka Kano[1], Ayumu Kobayashi[1], Kota Kera[1], Seiji Kojima[2], Riichi Oguchi[2], Kouki Hikosaka[2], Kintake Sonoike[3], Nobuyuki Uozumi[1] ([1]Graduate School of Engineering, Tohoku Univ, [2]Graduate School of Life sciences, Tohoku Univ., [3]Faculty of Education, Waseda university)

【背景】植物は光エネルギーを葉緑体で受け取り、チラコイド膜を介したプロトン濃度勾配と膜電位の和で定義されるプロトン駆動力を形成して、化学エネルギーの生産を行っている。植物は外部から得られる光エネルギーの強さに応じて、プロトン濃度勾配と膜電位をそれぞれ制御することで、変動する外部環境に適応する。プロトン駆動力の制御には、葉緑体の包膜とチラコイド膜に局在する K^+/H^+ アンチポーター (KEA: K^+ efflux antiporter) が重要であることが明らかとなっている。包膜に局在する KEA1 と KEA2 の二重欠損株では、強光時の光合成活性の低下が見られ (Kunz *et al*., 2014)、チラコイド膜に局在する KEA3 の欠損株では、弱光での光合成活性の低下が見られた (Armbruster *et al*., 2014, Tsujii *et al*., 2019)。我々は葉緑体の祖先であり、光合成研究のモデル生物であるシアノバクテリア (*Synechosystis* sp. PCC6803) が保持する、KEA ホモログの Na^+/H^+ アンチポーターである NhaS1-NhaS6 に着目して、イオン輸送体による光合成制御機構の解明をめざした。
【手法と結果】NhaS1-NhaS6 の輸送活性は測定された報告はない。NhaS1-NhaS6 を大腸菌の Na^+/H^+ アンチポーター欠損株に異種発現させた後、pH 指示薬であるアクリジンオレンジを用いた輸送活性の測定を行った。その結果、NhaS1-NhaS6 が Na^+/H^+ アンチポート活性を示すことを明らかにした。次に、この輸送体の細胞内局在性を明らかにするために、Nha-GFP 融合タンパク質の発現株を作製した。ショ糖密度勾配遠心法による原形質膜とチラコイド膜の分画を行い、ウエスタンブロッティングによる検出を行なった結果、原形質膜に NhaS1、NhaS2、NhaS4、NhaS5、チラコイド膜には NhaS1、NhaS3、NhaS6 が発現することが明らかとなった。各欠損株の作製を行い、クロロフィル蛍光測定による光合成活性の測定を行った結果、Δ*nhaS2* 株、Δ*nhaS4* 株、Δ*nhaS5* 株と Δ*nhaS6* 株では光化学系の収率が低下していた。生育試験を行った結果、Δ*nhaS2* 株では低 Na^+ 濃度における生育が著しく阻害された。強光下での生育試験では、Δ*nhaS1* 株と Δ*nhaS2* 株で生育阻害が見られ、Δ*nhaS2* 株では 200 mM NaCl の添加により強光条件で生育の回復がみられた。同じく強光条件における細胞内活性酸素種 (ROS) の測定を行った結果、Δ*nhaS2* 株では強光での ROS の蓄積量が増大していた。光化学系タンパク質量の測定を行った結果、Δ*nhaS2* 株では 光化学系のタンパク質量が変動していることが明らかとなった。これらの結果から、藍藻は原形質膜に局在する NhaS2 による Na^+/H^+ 対向輸送を利用して、光化学系タンパク質の発現の制御を行うことで、正常な光合成や活性酸素種の発生の抑制を行っていることを明らかとした。

Na^+/H^+ antiporter, Photosynthesis, Microbes

発表責任者：魚住信之（nobuyuki.uozumi.d7@tohoku.ac.jp）

講演番号：2B08a05
講演日時：3 月 26 日 10:14～ 総合学習プラザ B08 会場

BSD2 は酸化失活ルビスコを還元再活性化し，光合成反応を促進する

Reactivation of oxidatively inactivated Rubisco by BSD2 in plants

Busch Florian, A.[1]、冨永 淳[2]、高橋 俊一[3]、矢守 航[4]、Milward Sara, E.[1]、西村 浩二[5]、戸田 陽介[6,7]、高見 常明[8]、渡邊 俊介[9]、木下 俊則[6]、坂本 亘[8]、坂本 敦[2]、○島田 裕士[2] ([1]RSB, ANU、[2]広島大・院統合生命、[3]基生研、[4]東大・院農学生命科学、[5]島根大・生物資源、[6]名大・ITbM、[7]JST さきがけ、[8]岡山大・植物研、[9]理研 CSRS)

Florian, A. Busch[1], Jun Tominaga[2], Shunichi Takahashi[3], Wataru Yamori[4], Sara, E. Milward[1], Kohji Nishimura[5], Yosuke Toda[6,7], Tsuneaki Takami[8], Shunsuke Watanabe[9], Toshinori Kinoshita[6], Wataru Sakamoto[8], Atsushi Sakamoto[2], ○Hiroshi Shimada[2] ([1]RSB, ANU, [2]Hiroshima Univ., [3]NIBB, [4]Tokyo Univ., [5]Shimane Univ., [6]Nagoya Univ, [7]JST PRESTO, [8]Okayama Univ., [9]RIKEN CSRS)

【背景と目的】2015 年において 73 億人の世界人口は，2050 年までには 90 億人を突破すると予想されている。それに伴う世界規模での食糧危機は，農作物生産にさらなる収量増大と安定化を迫っている。更に COP21 による宣言では，世界共通の長期目標として地球平均気温上昇を抑える努力追求が挙げられており，CO_2 を含む温室効果ガスの排出削減が求められている。植物の光合成は CO_2 の吸収源かつバイオマス生産の源であり，光合成能力の増強は上記問題解決方法の一つと考えられる。ルビスコ (Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase) は光合成において CO_2 を固定する酵素であり，光合成反応の律速酵素の一つである。そのため，光合成活性増強とバイオマス増産を目指してルビスコの改変が世界中で試みられたが，これまでルビスコの改変による上記の目的達成は成功していない。BSD2 はルビスコの生合成に関与する因子としてトウモロコシ *bsd2* 変異体より最初に同定され，これまではルビスコの複合体形成に関与するシャペロンであると認識されてきた。ルビスコは光合成における CO_2 固定の律速酵素であり，BSD2 の過剰発現はルビスコの蓄積量増加とそれに伴う光合成活性の上昇が期待されたため，我々はシロイヌナズナ BSD2 過剰発現株の作出を行い，その解析を行った。
【方法と結果】BSD2 過剰発現株は、葉内 CO_2 濃度当たりの CO_2 同化速度がコントロールに対して有意に高く，植物乾燥重量も最大で 34%増加した。しかし，触媒部位当たりの最大カルボキシル化速度はコントロールに対して過剰発現株では増加していたが，総触媒部位の数とルビスコ含有量についてはコントロールとの違いは観察されなかった。BSD2 タンパク質は Protein disulfide reductase (PDR) 活性がある CYO1 同様に C4 型 zinc finger motif を有しており，*in vitro* において BSD2 タンパク質は酸化失活しているルビスコのジスルフィド結合を還元開裂し再活性化することが示された。さらに，非ストレス条件下で生育されたシロイヌナズナのルビスコの約 15%は酸化失活状態であるのに対して，BSD2 過剰発現株ではほぼ全てのルビスコが還元活性状態であった。これらの結果より，BSD2 の過剰発現はシロイヌナズナの光合成と生産性を改善させうることを示しており，BSD2 は新奇ルビスコ活性化機構に寄与していることが示唆された。

【参考文献】Overexpression of BUNDEL SHEATH DEFECTIVE 2 improves the efficiency of photosynthesis and growth in *Arabidopsis* (2019) Florian A. Busch *et al., Plant J. in press*

Rubisco, BSD2, Photosynthesis

発表責任者：島田裕士（hshimada@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：2B08a06
講演日時：3 月 26 日 10:35～ 総合学習プラザ B08 会場

生きた植物細胞の中で膜内在性タンパク質のトポロジーを評価する新規な蛍光レポーター系の開発に関する研究

Study on the development of a novel fluorescence reporter system for evaluating membrane topology of integral membrane proteins in living plant cells

○久我 一弘、龍田 怜奈、吉原 えりか、吉田 昇平、清水 英寿、地阪 光生、横田 一成、西村 浩二 (島根大・生物資源)
○Kazuhiro Kuga, Reina Tatsuda, Erika Yoshihara, Shohei Yoshida, Hidehisa Shimizu, Mitsuo Jisaka, Kazushige Yokota, Kohji Nishimura (Fac. Life Env. Sci., Shimane Univ.)

膜内在性タンパク質の膜に対するトポロジーの評価を行うことで、細胞内でのタンパク質の機能を解析する上で重要な情報を得られることが期待される。その解析方法として、対象となる膜内在性タンパク質が通常の細胞内の膜に存在する状態と同じトポロジーのままで膜画分ごと調製し、その膜内在性タンパク質のプロテアーゼ感受性を調べるなどの生化学的手法がよく知られている。しかし、解析対象となる膜内在性タンパク質の存在量が微量な場合や存在する膜画分の調製が困難な場合には、このような解析が容易ではないことも知られている。演者らは、蛍光タンパク質を用いて、生きた植物細胞中で膜内在性タンパク質のトポロジーを評価できるバイオイメージングツールの開発を行ってきた。蛍光タンパク質を適切な位置で切断して得られる二つの断片（N 末端側と C 末端側）が自己集合能をもつことがある。この性質を利用して、膜タンパク質のトポロジーや細胞内区画を同定することが可能である。演者らは、黄色蛍光タンパク質の Venus に自己集合能を持たせた split Venus 断片（interactive Venus、 iVenus）を用いて、膜タンパク質の膜に対するトポロジー解析ができるアッセイ系（iVenus システム）の開発を行ってきた。二つのうちどちらか一方の iVenus 断片だけでは蛍光を発しないが、もう一方の iVenus 断片が共存すると、自己集合が起こるために、切断されていない完全長 Venus がとるような立体構造が再構築され、蛍光を発するようになる。そこで、解析対象の膜タンパク質に一方の iVenus 断片を、細胞内局在の既知なマーカータンパク質にはもう一方の iVenus 断片を融合させ、それぞれの融合タンパク質を植物細胞内に一過的に同時に発現導入させると、両者の iVenus 断片部分が同じ細胞内区画にある場合には、iVenus 断片が自己集合を起こすことにより、黄色蛍光を発するが、異なる場合には蛍光が発生しない。解析対象の膜内在性タンパク質が存在する膜に対してトポロジー的に真逆な細胞内区画にある二つのマーカータンパク質を用いて発現解析を行うことにより、トポロジー未知な膜内在性タンパク質のトポロジーを明らかにすることが可能である。本大会では、iVenus システムを用いて、細胞膜やさまざまな内膜に局在する膜貫通タンパク質のトポロジーを解析したので、報告したい。

plant, fluorescence protein, topology

発表責任者：西村 浩二（knishimu@life.shimane-u.ac.jp）

講演番号：2B08a07
講演日時：3 月 26 日 10:46～ 総合学習プラザ B08 会場

GPI-アンカーの付加は、アラビノガラクタンタンパク質の正常な糖鎖形成や細胞内輸送に必要である。
GPI-anchoring is required for proper glycosylation and intracellular transport of arabinogalactan protein.

○永里 太暉[1]、杉田 雄斗[1]、津野 雄平[1]、松岡 健[1,2] ([1]九大院生資環、[2]九大院農)
○Daiki NAGASATO[1], Yuto SUGITA[1], Yuhei TSUNO[1], Ken MATSUOKA[1,2] ([1]Kyushu Univ., Grad. Sch. Bio-Environ. Sci., [2]Kyushu Univ., Fac. Agr.)

アラビアガムに代表される植物由来の水溶性ガムの主成分であるアラビノガラクタンタンパク質(AGP)は、O-結合型糖鎖修飾と GPI-アンカーと呼ばれる糖リン脂質構造の付加を受ける植物の代表的なプロテオグリカンである。多くの AGP の前駆体は、シグナルペプチド、多数の O-結合型糖鎖が付加される糖鎖付加ドメイン、及び C 末端に GPI-アンカーの付加配列で構成される。GPI-アンカーの化学切断処理により、アラビアガムの乳化作用が減退することが報告されていることから、アラビアガム中の AGP は GPI-アンカーを持つことが示唆されている。しかし、AGP の生合成機構や細胞内輸送経路はほとんど解明されていない。そこで、タバコの AGP の 1 種の NtAGP1 は典型的な AGP であるため、サツマイモ貯蔵タンパク質スポラミン(SPO)をタグとして NtAGP1 に導入した SPO-AGP、さらにこれから C 末端の GPI 付加配列を欠失させた SPO-AGPΔC を発現させたタバコ培養細胞を用いて、GPI-アンカーの付加による AGP 前駆体への糖鎖修飾や細胞内輸送に果たす役割を解析した。

定常期の細胞を材料とした細胞分画により、SPO-AGP は糖鎖が多数付加したと考えられる状態で細胞膜に局在することが示唆された。一方、SPO-AGPΔC は高・中・低サイズの 3 種の分子として検出され、高サイズ分子は糖鎖が多数付加した状態で細胞外や細胞壁と細胞膜の間隙に、中サイズ分子は小胞体やゴルジ体に、低サイズ分子は分解産物として液胞に局在することが示唆された。また、糖鎖部分構造を認識するモノクローナル抗体への反応性の違いから、SPO-AGP の糖鎖とは異なり、SPO-AGPΔC の高サイズ分子はラムノースが付加されていないグルクロン酸残基を含む糖鎖を持つことが示唆された。これらの結果から、小胞体上で GPI-アンカーが付加されない SPO-AGPΔC は、適切に糖鎖が形成されず液胞に輸送され分解されるが、一部の糖鎖修飾を受けたものは細胞外に分泌されると推定された。従って GPI-アンカーの付加は、AGP の正常な糖鎖構造形成と細胞内輸送に必須であると考えられた。

また、Triton X-114 による二相分配実験において、定常期迄増殖した細胞に存在する殆どの SPO-AGP は界面活性剤相に回収された。ホスホリパーゼ処理により水相への SPO-AGP の回収率が増加したため、SPO-AGP は GPI-アンカーを保持していると考えられた。一方、一部の SPO-AGP は細胞外に分泌されていたが、対数増殖期細胞から分泌されたものの半量程度は GPI-アンカーを有することが示唆された。このことから、動物等で知られる内在性ホスホリパーゼ活性に起因する GPI-アンカーの切断による分泌とは異なる機構で、AGP は植物細胞から分泌される可能性が考えられた。

post-translational modification, GPI-anchor, proteoglycan

講演番号：2B08a08
講演日時：3 月 26 日 10:57～ 総合学習プラザ B08 会場

SPL7 は *SULTR2;1* の発現促進を介して植物の硫黄欠乏・銅欠乏耐性に寄与するのか

Possible involvement of SPL7 in promotion of *SULTR2;1* expression under sulfur or copper deficient conditions in *Arabidopsis thaliana*

○牛渡 司[1]、光田 展隆[3]、鹿内 利治[4]、丸山 明子[2] ([1]九大院生資環、[2]九大農、[3]産総研、[4]京都大院理)

○Tsukasa USHIWATARI[1], Nobutaka MITSUDA[3], Toshiharu SHIKANAI[4], Akiko MARUYAMA[2] ([1]Kyushu Univ., Grad. Sch. Bio-Environ. Sci, [2]Kyushu Univ., Fac. Agr., [3]AIST, [4]Kyoto Univ., Grad. Sch. Sci.)

硫黄(S)は生物の必須栄養素である。植物の S 同化は硫酸イオン(SO_4^{2-})輸送体(SULTR)による SO_4^{2-}吸収に始まり、吸収された SO_4^{2-}はシステインへと同化される。低親和型硫酸イオン輸送体 SULTR2;1 は地上部では維管束系で発現し、SO_4^{2-}の古い葉から若い葉への輸送を担う。根では木部柔細胞や内鞘細胞で発現し、SO_4^{2-}の根から地上部への輸送を促進する。S 欠乏(−S)下では根における遺伝子発現が上昇し、皮層でも発現することで土壌からの硫酸イオン吸収にも寄与する。

−S 下の根における *SULTR2;1* の発現促進は、3'領域に存在する S 応答性シス配列 SUlfur Responsive Element (SURE21)により制御されている。つまり、SURE21 と相互作用して *SULTR2;1* の−S 応答を担う転写因子を単離することは、 SO_4^{2-}吸収・輸送の調節機構を明らかにすることに繋がる。

SURE21 をおとりとしてシロイヌナズナ由来の転写因子 1904 種に対する酵母ワンハイブリッドスクリーニングを行ったところ、SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE7 (SPL7)が候補として見出された。SPL7 は銅(Cu)欠乏に応じた遺伝子発現調節を担い、Cu 欠乏(−Cu)耐性に寄与する転写因子である。

本研究では、S と Cu 量を変化させた4つの条件[①S 十分(+S),Cu 十分(+Cu), ②+S,−Cu, ③−S,+Cu, ④−S,−Cu]で SPL7 欠損株(*spl7*)、SPL7 高発現株(OX)、野生型株(WT)、および SULTR2;1 欠損株(*sultr2;1*)を育成し、植物の生育、根における *SPL7* と *SULTR2;1* の発現を解析した。WT において *SPL7* の発現は、④−S,−Cu で①+S,+Cu の 1.2 倍に上昇した。 *SULTR2;1* の発現は、条件によらず *spl7* で WT よりも低い傾向にあり、逆に OX では WT よりも高かった。このことは、SPL7 が *SULTR2;1* の発現を促進することを示唆している。

現在、同条件で植物の生重量、含硫代謝物量、SO_4^{2-}量、S および Cu 量の測定を行っている。それら結果を合わせて、SPL7 による *SULTR2;1* 発現促進を介した S 吸収や同化の促進と、植物の−Cu 耐性への SULTR2;1 の寄与について議論したい。

sulfate transporter, SPL7, nutritional stress response

講演番号：2B08a09
講演日時：3 月 26 日 11:08～ 総合学習プラザ B08 会場

Sulfur Deficiency Induced Phosphate Uptake, Root-to-Shoot Transport, and Accumulation in Shoots *Arabidopsis thaliana*

○ Alaa ALLAHHAM[1], Akiko MARUYAMA-NAKASHITA[2] ([1]Kyushu Univ., Grad. Sch. Bio-Environ. Sci., [2]Kyushu Univ., Fac. Agr.)

Improving plant growth requires a comprehensive understanding of the diverse processes of nutrient uptake, transport, metabolism, and storage. Recent studies indicated the correlations between sulfur (S) and phosphorus (P) in metabolic and transcriptomic aspects. While the interaction between S and P has mostly focused on studying the effects of phosphate (Pi) availability and P signaling pathways on S signaling and homeostasis, the effects of S availability on P signaling and homeostasis remain largely unstudied.

In this context, we investigated the effects of S availability on Pi uptake, accumulation, root-to-shoot transport, and transcript levels of phosphate transporters in *Arabidopsis* grown under S sufficient (+S) and deficient (−S) conditions. Pi level was significantly increased in *Arabidopsis* shoots under −S accompanied with increased Pi uptake. In addition, Pi levels in xylem sap was increased by −S, indicating the enhancement of root-to-shoot Pi transport under −S. The transcript levels of two main Pi uptake transporters (*PHT1;2* and *PHT1;4*) were increased by −S as well as those of some other Pi transporters (*PHT1;8*, *PHO1*, *PHO1-H1*).

To find the transporters involved in −S-increased Pi uptake and root-to-shoot transport, T-DNA insertion mutants of *PHOSPHATE TRANSPORTER 1* (*PHT1*) family members and *PHOSPHATE1* (*PHO1*) were grown under +S and −S conditions and analyzed for Pi levels in xylem sap and shoots. The −S-increased Pi level in xylem sap was interrupted in *pht1;9* and *pho1*, indicating the involvement of these transporters in the −S-increased Pi level in xylem sap.

Our findings indicate a new aspect of the interaction between S and P by listing Pi accumulation in shoots as a part of −S responses in plants and highlighting the impacts of −S on Pi transport and homeostasis. The −S-increased Pi level might be required to sustain plant growth under −S or it can be an indirect consequence of plant responses and adaptations to −S. Now we are trying to clarify the physiological meaning of this Pi accumulation under −S.

Sulfur deficiency, Phosphate accumulation, Phosphorus-sulfur interaction

発表責任者：Alaa Alahham（allahham.alaa.706@s.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：2B08a10
講演日時：3 月 26 日 11:19～ 総合学習プラザ B08 会場

STP1 を介した糖シグナルによる側枝形成制御機構の解明
Control of shoot branching by sugar signaling via Sugar Transporter Protein 1 (STP1)
○西岡 真歩[1]、平野 慎吾[2]、佐古 香織[1,2]、重岡 成[1,2]、田茂井 政宏[1,2] ([1]近畿大院農、[2]近畿大農)
○ MAHO NISHIOKA[1], SHINGO HIRANO[2], KAORI SAKO[1,2], SHIGERU SHIGEOKA[1,2], MASAHIRO TAMOI[1,2] ([1]Grad.Sch,Kindai Univ., [2]Kindai Univ.)

【目的】
植物の形態形成は、様々な植物ホルモンにより制御されていることが知られている。これら植物ホルモンの生合成制御機構や植物ホルモンによる遺伝子発現制御機構に関しては多くの研究が行われてきたが、植物ホルモン自身が成長段階や栄養状態に応じてどの様に調節されているのかは不明な点が多く残されている。これまで我々は、ショ糖合成能を強化した形質転換シロイヌナズナ AcF 株は側枝数が増加すること、ショ糖とヘキソース量の増加と共に、オーキシン、ストリゴラクトン関連遺伝子および側枝形成を統合的に制御する TCP 転写因子ファミリー（TCP18/BRC1）の発現量が減少していることを明らかにした（Otori et al. 2017)。さらに、糖輸送体である STP1（Sugar Transport Protein 1)が糖による *BRC1* 遺伝子発現制御に関与していることを明らかにした(Otori et al. 2019)。しかし、STP1 は膜局在タンパク質であり、核での *BRC1* 遺伝子発現を直接制御することはできないことから、糖シグナル伝達を行う別の因子が存在すると考えられる。そこで本研究では、糖シグナルによる側枝形成制御機構を明らかにするために、STP1 の相互作用因子の探索を行った。
【方法および結果】
pGBKT7 に STP1 の細胞内部に突出した部位の cDNA（STP1-PP）を連結したプラスミド DNA を構築し、酵母ツーハイブリット法により STP1 と相互作用する因子をシロイヌナズナ全 cDNA ライブラリーから探索した。QDO/X/A 培地を用いて二度の選抜を行った結果、STP1 との相互作用を示唆する 74 個の青色の陽性コロニーを得た。シークエンス解析の結果、細胞質と核の両方に局在が予想されるクローンが含まれていることが明らかとなり、これらが細胞膜上で受け取った糖シグナルを核へと伝達する因子である可能性が考えられた。現在、BiFC 法により細胞内局在および *in vivo* での相互作用解析を試みている。一方、他の STP ファミリーでは Ser のリン酸化が情報伝達に関与することが報告されている。そこで現在、STP1 の細胞内部に突出した部位に存在する 4 つの Ser 残基を Ala に変異させたシロイヌナズナ変異株を作出しており、糖による BRC1 遺伝子発現制御に及ぼす影響を検討する予定である。

sugar signaling, hormone, morphogenesis

発表責任者：田茂井　政宏（tamoi@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：2B08a11
講演日時：3 月 26 日 11:40～ 総合学習プラザ B08 会場

ダイズおよびツルマメのプロテオーム解析

Proteome Analysis of Cultivated and Wild soybean.

○橋口 拓勇、橋口 正嗣、田中 秀典、権藤 崇裕、明石 良（宮崎大農）
○Takuyu HASHIGUCHI, Masatsugu HASHIGUCHI, Hidenori TANAKA, Takahiro GONDO, Ryo AKASHI (Univ. of Miyazaki)

【目的】ダイズ(*Glycine max*)は主要なマメ科作物であり、種子にタンパク質や脂質の他、二次代謝物を豊富に含み、特に我が国においては味噌、醤油などの発酵食品の原料として利用されている。ダイズの祖先野生種であるツルマメ(*Glycine soja*)は栽培化の過程で失ったとされる有用な形質を含んでいると考えられているため、ダイズの品質改良のための育種材料として重要である。しかしながら、ダイズとツルマメのタンパク質発現（プロテオーム）の比較解析については報告されていない。そこで、ラベルフリー定量法によりダイズ及びツルマメのプロテオーム解析を実施することで、ダイズ育種に利用可能なタンパク質発現情報の取得を目指した。

【方法】ダイズ(Williams 82)およびツルマメ(B01167)粉末を可溶化後、プロタミン硫酸沈殿により種子貯蔵タンパク質を除去した。タンパク質を TCA アセトン沈殿後再溶解し、トリプシン消化、脱塩濃縮したものを NanoLC-MS/MS 分析に供した。得られたデータを Proteome Discoverer 2.2 により比較定量した。発現量に差異のあるタンパク質について mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR 法により比較定量した。

【結果および考察】ダイズおよびツルマメから種子貯蔵タンパク質を除去して得られた微量タンパク質についてプロテオーム解析を行った。同定された計 1,396 個のタンパク質について、トータルペプチドイオン強度による補正を行い比較解析した結果、65 個のタンパク質において 1.5 倍以上の有意な発現量の差異が見出された。それらのタンパク質について遺伝子オントロジー解析を行った結果、生物学的プロセスのカテゴリーの中で、代謝および細胞プロセスに関わるタンパク質が多いことが分かった。また、ツルマメにおいて環境ストレスに関わるタンパク質の発現量が高い一方で、ダイズにおいては脂質輸送やスクロース代謝に関わるタンパク質の発現量が高いことが分かった。qPCR アッセイによる mRNA 発現量解析の結果、複数の遺伝子発現量がタンパク質発現量と相関性を示した。
以上のことから、ダイズの品種改良の際に重要な材料となりえるプロテオーム情報が整備された。なお、本研究は国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED)のナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)の支援を受けて行われたものである。

Soybean, Proteome, Seed

講演番号：2B08a12
講演日時：3 月 26 日 11:51～ 総合学習プラザ B08 会場

VTC3 を介した植物アスコルビン酸生合成調節機構の解明
Regulation mechanism of ascorbate biosynthesis mediated by VTC3 in plants
○田中 泰裕[1]、高尾 理穂[1]、小川 貴央[1]、重岡 成[2]、丸田 隆典[1]、石川 孝博[1] ([1]島根大院・自然科学、[2]近畿大・附属農場)
○ Yasuhiro TANAKA[1], Riho TAKAO[1], Takahisa OGAWA[1], Sigeru SIGEOKA[2], Takanori MARUTA[1], Takahiro ISHIKAWA[1] ([1]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Shimane Univ., [2]Exp. Farm, Kindai Univ.)

【目的】植物のアスコルビン酸は、D-マンノース/L-ガラクトース経路により生合成される。アスコルビン酸の生合成は光合成電子伝達系依存的な光制御を受けるが、その調節機構の詳細は不明である。*VTC3* は、モデル植物シロイヌナズナよりアスコルビン酸欠乏変異体 (*vtc3*) の原因遺伝子として同定され、N 端側にプロテインキナーゼおよび C 端側にプロテインフォスファターゼというユニークなキメラタンパク質をコードしている。したがって VTC3 は、タンパク質のリン酸化/脱リン酸化を介してアスコルビン酸生合成の調節に関与することが示唆されているが、リン酸化の標的を含めそのメカニズムは不明である。そこで本研究では VTC3 を介したアスコルビン酸生合成調節機構の解明を目的に、光照射前後の *VTC3* 遺伝子破壊株 (VTC3_KO) を用いて包括的リン酸化プロテオーム解析を行い、標的タンパク質の探索を試みた。

【結果】シロイヌナズナ野生株および VTC3_KO を 2 日間暗適応させた後、100 μmol/m^2/s の光照射を行い、経時的に葉のアスコルビン酸量を測定した。その結果、光照射 24 時間までに野生株のアスコルビン酸量は顕著に増加したのに対し、VTC3_KO ではその程度が抑制されており、VTC3 は光によるアスコルビン酸生合成調節に関与することが確認された。次に、光照射前および光照射 6 時間後の各植物体を用いてリン酸化プロテオーム解析を実施した。その結果、総数 4,963 のリン酸化ペプチド (1,582 タンパク質相当) の情報を得た。このうち、光条件に対して有意差 ($p<0.05$) を持って変動したリン酸化ペプチド数は 676 (464 タンパク質相当) であり、GO エンリッチメント解析の結果、タンパク質キナーゼ関連のタンパク質が多く見られた。また、D-マンノース/L-ガラクトース経路構成酵素に注目すると、GDP-D-マンノースエピメラーゼと GDP-L-ガラクトースホスホリラーゼにおいて、野生株よりも VTC3_KO においてリン酸化レベルの低下が認められ、VTC3 は両酵素のリン酸化レベルに影響する可能性が強く示唆された。現在、GDP-D-マンノースエピメラーゼおよび GDP-L-ガラクトースホスホリラーゼについてリン酸化と酵素活性の関係について解析を進めている。

Ascorbic acid, Biosynthesis, Phosphorylation

講演番号：2B08a13
講演日時：3 月 26 日 12:02～ 総合学習プラザ B08 会場

アフィニティー樹脂によるシロイヌナズナアスコルビン酸結合タンパク質の探索

Screening of ascorbic acid-binding proteins in Arabidopsis utilizing affinity resins

○西原 好美[1]、西野 耕平[1]、岩岡 裕二[2]、丸田 隆典[1]、小川 貴央[1]、重岡 成[3]、田井 章博[4]、澤 嘉弘[1]、石川 孝博[1] ([1]島根大院・自然科学、[2]岡山県大・保健福祉、[3]近畿大・附属農場、[4]徳島大院・社会産業理工)

○Yoshimi NISHIHARA[1], Kouhei NISHINO[1], Yuji IWAOKA[2], Takanori MARUTA[1], Takahisa OGAWA[1], SHIGERU SIGEOKA[3], Akihiro TAI[4], Yoshihiro SAWA[1], Takahiro ISHIKAWA[1] ([1]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Shimane Univ., [2]Fac. Health Welf. Sci., Okayama Pref. Univ., [3]Exp. Farm, Kindai Univ., [4]Grad. Sch. Technol. Ind. Soc. Sci., Tokushima Univ.)

【目的】植物組織には mM オーダーの高濃度でアスコルビン酸が含まれているが、その生理的意義はまだ充分に理解されていない。最近、我々はアスコルビン酸の C2 位あるいは C6 位に官能基を導入した新規安定型アスコルビン酸プローブ (2-amino-2-deoxy-L-ascorbic acid; 2-AA および 6-amino-6-deoxy-2-*O*-methyl-L-ascorbic acid; 6-AA) の合成に成功し、これらを固定化したアフィニティー樹脂は、新規のアスコルビン酸結合タンパク質探索に非常に有用なツールとなることを報告している [1)]。そこで本研究では、植物におけるアスコルビン酸の新規生理作用の解明を目的に、安定型アスコルビン酸プローブを用いて、モデル植物のシロイヌナズナにおけるアスコルビン酸結合タンパク質の探索を試みた。

【実験材料および方法】実験材料のシロイヌナズナは、アスコルビン酸量が野生株の約 20%まで低下したアスコルビン酸欠乏変異体 *vtc2-4* を用いた。*vtc2-4* の葉から調整した粗抽出液を透析後、2-AA および 6-AA アフィニティーカラムに供した。カラム洗浄後、2-*O*-methyl-L-ascorbic acid で結合タンパク質を溶出した。各カラムからの溶出タンパク質画分は、トリプシン処理後 nanoLC/MS を用いて分析し、得られたデータを Progenesis QI により解析した。

【結果】アフィニティー溶出画分のプロテオミクス解析の結果、樹脂のみのネガティブコントロールに較べ、2-AA もしくは 6-AA カラムで結合量の増加が認められた複数のアスコルビン酸結合タンパク質候補を得た。得られた各候補タンパク質について、大腸菌で組換え体タンパク質を作製し、2-AA および 6-AA 樹脂に対する結合性を評価した。その結果、いくつかの候補タンパク質において再現性が得られ、アスコルビン酸との結合性が支持された。これらのタンパク質のうち、鉄スーパーオキシドジスムターゼ (FSD1) に着目した。統合計算化学システム MOE によるドッキングシュミレーションの結果、FSD1 はアスコルビン酸と結合する可能性が強く示唆された。現在、組換え体 FSD1 の酵素活性におよぼすアスコルビン酸の影響等について検討を進めている。

[1)] Iwaoka *et al. Analyst*, 143: 874-882 (2018)

Arabidopsis thaliana, Ascorbic acid, Affinity resin

講演番号：2B08p01
講演日時：3 月 26 日 13:50～ 総合学習プラザ B08 会場

苔類ゼニゴケにおけるジベレリン類縁化合物のメチル化による成長制御

Regulation of growth by gibberellin-related compounds methylation in the liverwort *Marchantia polymorpha*

○川村 昇吾、孫 芮、山岡 尚平、鈴木 かおり、吉竹 吉洋、西浜 竜一、河内 孝之（京都大学生命科学研究科）
○SHOGO KAWAMURA, Rui Sun, Shohei Yamaoka, Kaori Suzuki, Yoshihiro Yoshitake, Ryuichi Nishihama, Takayuki Kohchi (Kyoto Univ.)

植物ホルモンであるジベレリン（GA）のコケ植物における知見は少なく、これまでに、*ent*-gibberellane 骨格を持つ活性型 GA の存在は確認されていない。蘚類ヒメツリガネゴケでは、活性型 GA は存在せず、前駆体である *ent*-kaureonic acid の 3 位の水酸化物が活性をもっていることが明らかにされている。ゼニゴケにおいては GA 初発生合成経路が保存されており、そのノックアウト株では生殖成長が遅延するという表現型が見られた。このことから、ゼニゴケでは活性型 GA が機能することが示唆された。しかし、被子植物にみられる活性型 GA はゼニゴケにおいて活性を持たないことから、ゼニゴケにおいて新奇活性型 GA（GAx）が機能していることが示唆されたが、その分子実体は明らかではなかった。そこで、本研究では、GAx を同定し、その機能を明らかにするため、植物ホルモンをメチル化することによって不活性化する植物全体で保存された酵素群 SABATH ファミリーに着目した。ゼニゴケには 11 分子種の SABATH ファミリー遺伝子が存在する。その中で、Mp*SABATH2* はシロイヌナズナにおける GA のメチル基転移酵素に系統的に近縁であり、生殖成長に関連して発現が制御されていることがわかっている。Mp*SABATH2* の機能解析を行うため、CRISPR/Cas9 nickase システムを用いて Mp*SABATH2* の遺伝子全長が欠損した Mp*sabath2*^{ld} 株を作出した。この変異株では、葉状体の形態が異常になるとともに栄養成長が抑制された。また、無性生殖器官である杯状体の形成が抑制された。さらに、非誘導条件下で生殖成長が開始されるという表現型が見られた。この Mp*sabath2*^{ld} 株の表現型の多くは GA 生合成阻害剤の投与、あるいは GA 初発生合成遺伝子のノックアウトによって抑圧されたことから、Mp*SABATH2* は GA のメチル基転移酵素をコードしており、Mp*sabath2*^{ld} 株では GAx が高蓄積していることが示唆された。Mp*sabath2*^{ld} 株の植物体粗抽出液を加えた培地でゼニゴケを生育させると、栄養成長が阻害されることが分かった。これらのことから、ゼニゴケにおいて GAx は栄養成長を阻害し、生殖成長を促進すること、MpSABATH2 による GAx の不活性化が栄養成長と生殖成長のバランスを制御するうえで重要であることが示唆された。今後、Mp*sabath2*^{ld} 株での GAx 高蓄積を利用して、GAx の実体を明らかにしたい。

gibberellin, methyltransferase, plant hormone

講演番号：2B08p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ 総合学習プラザ B08 会場

無性生殖する植物は遺伝的にどう変化するか？
Genetic changes in asexualy reproducing plants
○永野 幸生、山本 ちひろ (佐賀大)
○Yukio NAGANO, Chihiro YAMAMOTO (Saga Univ.)

接ぎ木や挿し木では、有用な植物を枝単位で栄養繁殖させる。つまり、交雑を経ずに、体細胞を無性的に増殖させる。これらは、クローン技術の元祖とも言える技術である。他にも、交雑胚ではなく、親細胞由来の胚、つまり珠心胚を活用する繁殖方法がある。

体細胞は遺伝的に均質であると考えられがちである。だからこそ、接ぎ木・挿し木・珠心胚実生が農業に活用されている。しかし、ヒト等の動物でみられる「がん」は体細胞の遺伝的変化である。また、植物でも枝変わりという現象がよく知られており、これも体細胞の遺伝的変化である。つまり、体細胞は必ずしも遺伝的に均質ではないと考えられる。従って、体細胞が遺伝的に変化をするメカニズムを知ることは農業においても科学においても重要である。

植物科学の多くの教科書では、DNA 複製の際のミスや化学物質・放射線による DNA の損傷が遺伝的変化の原因であるとされている。他にもトランスポゾンの転位が説明されている。前者で起こる変化は、主に、ヌクレオチドが別のヌクレオチドに変わる点変異や、一つ以上のヌクレオチドの挿入または欠失である。この変化は、近年のゲノム解析の手法では、ホモ接合からヘテロ接合への変化として検出できる。

さて、私たちは過去に無性的に増殖するカンキツの一つメキシカンライムのいくつかの系統を部分ゲノム解析法 RAD-Seq で解析した（Sci Rep 4:4853 (2014)）。その結果、次のことがわかった。①ヘテロ接合性が高度に保存されているので、交雑は起こっていない。②少なくとも二群に分けることができる。③二群間の違いは、ヘテロ接合からホモ接合への変化による。

ヘテロ接合からホモ接合への変化は、ヘテロ接合性喪失と言われる現象である。相同組換え等のメカニズムで起こる。この現象は腫瘍学の教科書には、体細胞が変化するメカニズムとして記載されている。例えば、がん抑制遺伝子が機能を失う上で重要な役割を果たしている。

本研究では、メキシカンライムの二群間でおこっている遺伝的変化を全ゲノム解析法で検証した。これまでバリアントコールの精度が低いことが研究遂行の妨げになっていたが、ディープラーニングを用いる計算手法を活用することで問題を克復できた。この計算結果に基づいて、「ホモ接合からヘテロ接合への変化」と「ヘテロ接合からホモ接合への変化」の何れが高頻度なのかについて、本研究では考察する。

grafting, genome, Citrus

発表責任者：永野幸生（nagano@cc.saga-u.ac.jp）

講演番号：2B08p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ 総合学習プラザ B08 会場

全ゲノム解析による尾上菜の特徴解析

Characterization of Onoena by whole genome sequencing

○中島 遼太[1]、中川 幸彦[2]、古川 岳人[2]、池田 直樹[2]、小倉 淳[1,2]、蔡 晃植[1,2,3]([1]長浜バイオ大院・バイオ、[2]長浜バイオ大・バイオ、[3]長浜バイオ大・ゲノム編集研究所)
○Ryota NAKAZIMA[1], Yukihiko NAKAGAWA[2], Takehito FURUKAWA[2], Naoki IKEDA[2], Atsushi OGURA[1,2], Fang-Sik CHE[1,2,3] ([1]Grad. Sch. of Biosci., Nagahama Inst. of Biosci and Tech., [2]Dept. of Biosci., Nagahama Inst. of Biosci and Tech, [3]Genome Editing Research Institute, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology)

尾上菜は、滋賀県長浜市の尾上地区のみで古くから栽培されてきた伝承野菜である。しかし、尾上菜についての解析は全くされておらず、生理活性物質の有無のみならずその植物種も不明である。尾上菜について分子レベルでの知見を得、得られたゲノム配列について BUSCO で評価したところ、Core gene set の 98%を含んでいることが明らかになったため、まず、尾上菜の全ゲノム配列解析を行った。尾上菜から得た DNA を次世代シーケンサーで解析し。さらに、BRAKER2 により遺伝子予測を行った結果、ミトコンドリアと葉緑体の遺伝子補完率が 99%であることから、得られた尾上菜のドラフト配列は、ほぼ全ゲノムをカバーしているものと推察された。このような解析の結果、尾上菜のゲノムは 423Mbp で構成されており、68,408 個の遺伝子を含むことが明らかになった。また、Rubisco 大サブユニットと 18S rRNA の ITS2 領域を基に相同性配列解析を行ったところ、尾上菜は *Brassica rapa* であることが明らかとなった。

これまでに、アブラナ科植物の多くは、胞子体型の自家不和合性を有することが知られている。また、アブラナ科の自家不和合性は、*S* 遺伝子座に存在する花粉側因子 S-locus protein 11（SP11）と雌蕊側因子 S-receptor kinase（SRK）の配列多様性により制御されていることも報告されている。そこで、尾上菜のゲノム配列を詳細に解析したところ、SP11 と SRK 様配列が存在していたことから尾上菜も自家不和合性を示す可能性が示唆された。そこで、尾上菜の自家受粉を行ったところ、種子が得られなかったことから、尾上菜は自家不和合性を有することが示された。そこで、各株の *S* 遺伝子型を同定するため、尾上菜 8 株を用いた交配実験を行った結果、8 株の尾上菜に 14 種の *S* 遺伝子型が存在していることが示された。そこで、交配実験に用いた 8 株の柱頭から RNA を抽出して各株の *SRK* の cDNA 配列を解析した。その結果、*S* 遺伝子型に依存した異なる配列を有する *SRK* の配列が認められたことから、尾上菜の自家不和合性は *SP11* と *SRK* の配列多様性により制御されていることが明らかとなった。

Brassica rapa, whole genome sequencing, self-incompatibility

講演番号：2B08p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ 総合学習プラザ B08 会場

2017 年中に発表されたゲノム編集イネのオフターゲット効果に関する評価
Evaluation of off-target effect on genome-edited rice published in 2017

○成島 純平[1]、中村 公亮[1]、木俣 真弥[1]、志波 優[2]、秋本 智[1]、曽我 慶介[1]、権藤 崇裕[3]、明石 良[3]、近藤 一成[1] ([1]国立衛研、[2]東京農大、[3]宮崎大)
○Jumpei NARUSHIMA[1], Kosuke NAKAMURA[1], Shinya KIMATA[1], Yuh SHIWA[2], Satoshi AKIMOTO[1], Keisuke SOGA[1], Takahiro GONDO[3], Ryo AKASHI[3], Kazunari KONDO[1] ([1]NIHS, [2]Tokyo Univ. of Agri., [3]Miyazaki Univ.)

【背景・目的】2019 年 10 月よりゲノム編集食品の届出制度が開始され、国内での流通・販売が可能となった。従来の育種方法より短期間で有用品種を作出することができる一方で、意図しない切断（オフターゲット）による影響を予測することは難しく、食品としての安全性を懸念する声がある。CRISPR-Cas9 システム利用時のオフターゲット解析には、CRISPRdirect 等オンラインツールが汎用されており、予測された箇所についてサンガーシークエンスをして変異を確認するといった事例が見られるが、オフターゲット箇所を網羅できているかは不明である。そこで本研究では Selective enrichment and identification of tagged genomic DNA ends by sequencing （SITE-seq）法を用いて、イネを対象とした CRISPR-Cas9 システム利用時の切断箇所を網羅的に予測する手法を開発したので報告する。

【方法】日本晴イネの幼植物体より CTAB 法で DNA を抽出し、*in vitro* にて sgRNA-Cas9 複合体で切断した後、シークエンス用のアダプターを付加して Illumina MiSeq でシークエンスを行った。sgRNA は、2017 年に掲載されたジャポニカイネを対象とした CRISPR-Cas9 の論文を PubMed で検索し、4 報から 5 種の sgRNA を選定した。シークエンスデータの解析には、我々が開発した Galaxy に実装させた SITE-seq 専用の解析ツールを用いた。切断の確認は、SITE-seq 解析によって予測された切断箇所を含むように設計したプライマーを用いてリアルタイム PCR を行い、ΔΔCq 法で評価した。

【結果・考察】イネにおける *a class 1 formin*（*OsFH15*）を標的とした sgRNA を用いた結果、エクソン内で 10 リード以上マッピングされた箇所が、Cas9 濃度 64 nM では 4 か所、256 nM では 12 か所、1024 nM では 43 か所で、オンターゲットはいずれの濃度でも検出された。この中から、256 nM 及び 1024 nM に共通して検出されたオフターゲットを 3 か所選定し、リアルタイム PCR を用いて切断を確認したところ、いずれも 1024 nM のサンプルで ΔΔCq 値が 1 以上であったことから、切断されていることが確認された。これらのオフターゲットは、検証した 5 種類のオンライツールを用いることで 1 か所を予測できたが、残りの 2 か所は予測不能であった。以上の結果から、既存のオンラインツールでは予測されないオフターゲットの検出には SITE-seq 法が有効であることが示唆された。

【謝辞】本研究は H31 年度厚労科研費補助金「食品の安全確保推進事業」の助成により実施された。

CRISPR-Cas9, Off-target, SITE-seq

講演番号：2B09a01
講演日時：3 月 26 日 09:30～ 総合学習プラザ B09 会場

GABA 測定キットの開発

Development of GABA assay kit

西山 辰也[1,2]、Woro Triarsi Sulistyaningdyah[2]、○上田 賢志[1]、日下部 均[2]([1]日大生資科、[2](株) エンザイムセンサ)
Tatsuya Nishiyama[1,2], Woro Triarsi Sulistyaningdyah[2], ○ Kenji Ueda[1], Hitoshi Kusakabe[2]
([1]College of Bioresource Sciences, Nihon Univ, [2]Enzyme Sensor, Co Ltd)

【背景・目的】γ-アミノ酪酸（GABA）は抑制性の神経伝達物質である。GABA は摂食によってリラックス効果等が期待されることから、サプリメントならびに高含量の米やトマトなどの農作物やチョコレートなどの加工食品が開発され、注目されている。様々な需要が高まる一方、本物質の定量分析方法は蛍光標識して HPLC で測る方法や質量分析装置を用いる方法が主流であり、装置が大型で高額であることや、分析方法が煩雑で専門知識や訓練が必要であるなどの問題点がある。この問題の解決には、化合物を測定する際に最も一般的に使用される手法である吸光度測定を用いた方法を見いだすことが有効と考えられた。本法は、複数物質の検出には不向きであるが、測定が容易で装置も小型である。そこで、吸光度を測定することで GABA 濃度を簡便に定量する酵素キットの開発を行った。

【方法・結果】我々が以前に開発した、L-グルタミン酸オキシダーゼ（GLOD）を用いた比色法による L-グルタミン酸定量系を応用した。GLOD は L-グルタミン酸の酸化反応を触媒する酵素であり、非常に厳密な基質特異性を示す。パーオキシダーゼ、4-アミノアンチピリン(4-AA)、フェノール化合物存在下で、本酵素が基質である L-グルタミン酸を酸化すると、生成した過酸化水素によりフェノール化合物と 4-AA とが酸化縮合し、色素化合物が生産される。この色素を測定することで間接的に L-グルタミン酸を定量できる。そこで、GABA を L-グルタミン酸に変換する GABA 転移酵素（GABA-AT）を取得し、上記の系に加えることで、GABA を定量する酵素反応系を構築した。

まず放線菌から GABA-AT の探索を行った。その結果、*Streptomyces decoyicus* が強い GABA-AT 活性を示した。本菌の完全長ゲノム情報には、GABA-AT 活性を示すと予想される酵素遺伝子が 8 つ見いだされたことから、それらを別々に大腸菌で組換え生産し、活性を確認した。その結果、顕著な GABA-AT 活性を示す酵素遺伝子が一つ見いだされた。次に、本組み換え酵素を各種カラムクロマトグラフィーで精製し、キット化に向けた本酵素の諸性質を調べた。さらに各酵素および発色試薬の組み合わせや濃度の検討を行い、最適な組成を見出した。開発したキットを用いて、農場やスーパーマーケットで入手したトマトの GABA 濃度を測定したところ、全ての試料について LC-MS/MS の結果と同様の値が得られたことから、本キットの正確性が実証された。

GABA, aminotransferase, assay kit

発表責任者：上田賢志（ueda.kenji@nihon-u.ac.jp）

講演番号：2B09a02
講演日時：3 月 26 日 09:41～ 総合学習プラザ B09 会場

タバコ細胞において発現する PR タンパク質の質量分析計による定量
Quantification of PR proteins expressed in tobacco cells by mass spectrometry
○安藤 大悟、宮下 正弘、宮川 恒（京大院農）
○Daigo ANDO, Masahiro MIYASHITA, Hisashi MIYAGAWA (Kyoto Univ.)

【目的】
植物は病原体の感染を認識し、様々な防御反応を誘導する。その一つとして、抗菌活性などを示す PR タンパク質（Pathogenesis-related protein）が合成される。しかし、その定量は遺伝子の発現量をもとにおこなわれることが多く、タンパク質そのものを正確に定量した研究は少ない。そこで本研究では、タバコ細胞において発現する PR タンパク質の厳密な定量を目的として、質量分析計を用いた測定手法を検討した。また、各種 PR タンパク質の細胞における局在にも注目し、細胞質、細胞壁、培地の 3 つ画分に分けて定量を行った。
【方法】
実験にはタバコ懸濁細胞（Xanthi）を用いた。防御誘導物質（エリシター）として、当研究室で発見された PIP-1（YGIHTH-NH_2）を用いた。PIP-1 を終濃度が 100 μM となるよう細胞に処理し、24 時間振とう培養した。培地画分をろ過によって得た後、細胞を液体窒素中で破砕し、細胞質画分と細胞壁画分を遠心により分離した。三つの画分からそれぞれタンパク質を抽出した後、トリプシン消化をおこなった。得られた消化ペプチドを LC-MS/MS を用いた SRM 法に供し、各 PR タンパク質由来の消化ペプチドを定量した。分析対象は PIP-1 処理によって遺伝子レベルでの発現誘導が引き起こされることが分かっている PR2 (basic β-1,3-glucanase)、PR3 (chitinase)、PI-II (proteinase inhibitor II) とした。
【結果・考察】
PR2 と PR3 については、エリシター処理によってそれぞれ約 1.3～1.7 倍増加することが分かった。また、これらは液胞局在型の PR タンパク質であるにも関わらず、細胞壁画分に多く検出された。これは細胞質と細胞壁を分離する際に、細胞質中のタンパク質が細胞壁に吸着されたためと考えられた。一方、PI-II は、エリシター処理によって細胞質ならびに培地画分に検出されたが、無処理の場合はどの画分からも検出されなかった。以上の結果から、PIP-1 処理による遺伝子レベルの発現によって、PR タンパク質が合成されていることが確かめられた。また、その合成量を正確に定量するためには、すべての画分を用いて測定し、その総和をもとに比較する必要があることが分かった。

PR protein, MS/MS, tabacco

発表責任者：宮下正弘（miyamasa@kais.kyoto-u.ac.jp）

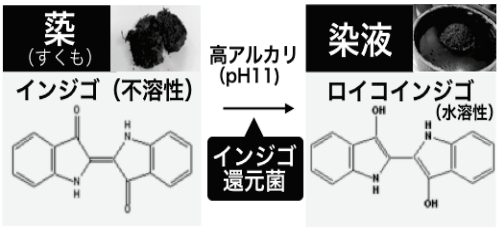
講演番号：2B09a03
講演日時：3 月 26 日 09:52～ 総合学習プラザ B09 会場

電気化学的解析による藍染液中のインジゴ測定

Measurement of indigo by electrochemical analysis of indigo dye-staining solution

○中川 香澄[1]、多田 真奈巳[1]、阪本 鷹行[1,2]、竹内 道樹[3]、加納 健司[4]、小川 順[3,4]、櫻谷 英治[1,2]（[1]徳島大院・先端技術、[2]徳島大・生物資源、[3]京大院農・産業微生物、[4]京大院農・応用生命）
○Kasumi NAKAGAWA[1], Manami TADA[1], Takaiku SAKAMOTO[1,2], Michiki TAKEUCHI[3], Kenji KANOU[4], Jun OGAWA[3,4], Eiji SAKURADANI[1,2] ([1]Grad. Sch. Adv. Technol. Sci., Tokushima Univ., [2]Fac. Biosci. Bioind., Tokushima Univ., [3]Ind. Microbiol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [4]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【背景・目的】



徳島県の伝統工芸である「藍染め」は微生物発酵によって、繊維を藍色に染める染色技法である。非水溶性のインジゴを繊維に吸着させるためには、水溶性のロイコインジゴへと還元する必要がある。伝統的な藍染めでは原料となる「すくも」にアルカリ性の木灰汁や石灰を加え、pH 10 以上の高アルカリ溶液とし、温度や pH などを管理することで、微生物によるインジゴ還元反応を促す（上図）。現場では職人（藍師）の感覚によって染液が管理されており、染液の状態を知るための明確な指標がなかった。これまで、還元されたインジゴの量を定量的に測定するため、吸光法や HPLC を用いた測定が試されてきた。しかし、染液中には複数の化合物が存在していること、またロイコインジゴは空気中の酸素により、速やかにインジゴへと酸化されることから、染液中の状態を維持したまま、正確にロイコインジゴの量を測定することが難しかった。そこで、我々は電気化学的な手法であるサイクリック・ボルタンメトリー(CV)を用い、水溶液中のインジゴとロイコインジゴの測定を試みた。

【方法・結果】

2 kg のすくもを使用し、45 L 容量の密閉式ポリバケツで藍染液を作製した。染液を作製した日を 0 日目とし、pH、酸化還元電位(ORP)、溶存酸素濃度(DO)、布の染色度合いを測定した。pH は 10～12 の範囲になるように石灰を加えて調整した。ORP は 0 日目には 7 mV であったが、2 日目には-493 mV と低い値を示し、以降は-500 mV～-600 mV の間を推移した。布は ORP が下がった 2 日目には染まらず、4 日目に染まることが確認された。5 日目の布は 4 日目より染まったが、その後、染色度の差に変化は見られなかった。同期間の染液に直接電極を設置し、CV 測定を行った。0 日目には触媒電流は見られなかったが、4 日後に酸化・還元の両方向に特徴的なピークが見られ、経時的にそのピークは増大した。ピークが観察された時期と染色が可能となった時期は一致していた。そこで、ピークは還元されたインジゴの酸化還元によるものであると予想し、インジゴを化学的にロイコインジゴに還元して CV を測定した。染液中のボルタモグラムと同様の位置に酸化還元ピークが確認され、酸化ピークは微生物によって還元されたインジゴの量を反映することが明らかになった。布の染色強度が同程度でも、CV 測定では還元されたインジゴの量に差を確認した。今後、CV 測定が染液の維持管理に役に立つことが期待される。

indigo, electrochemical analysis, microbial consortia

講演番号：2B09a04
講演日時：3 月 26 日 10:03～ 総合学習プラザ B09 会場

高導電性ディスポーサブル電気化学ウイルス検出センサーによる E 型肝炎ウイルス様粒子の高感度かつ迅速な検出

Development of high conductive electrochemical sensing platform for rapid and sensitive detection of Hepatitis E virus-like particles (HEV-LPs)

○竹村 謙信[1]、チョードリ アンカン ダッタ[2]、李 天成[3]、鈴木 哲郎[4]、朴 龍洙[1,2] ([1]静岡大院・創造院・バイオサイエンス、[2]静大グリーン科技研、[3]ウイルス第 2 部・国立感染研、[4]浜医大・医・医学科)

○Kenshin Takemura[1], Ankan Dutta Chowdhuly[2], Tian-Cheng Li[3], Tetsuro Suzuki[4], Enoch Y Park[1,2] ([1]Dept. Biosci., Grad. Sch. Sci. Technol., Shizuoka Univ., Japan, [2]Res. Inst. Green Sci. Technol. Shizuoka Univ., Japan, [3]Dept. Virol. II, Nat'l Inst. Infect. Dis., Japan, [4]Dept. Infect. Dis, Hamamatsu Univ. Sch. Med.)

【背景・目的】種々な感染症原因ウイルスは、依然世界的に猛威を振るっており、社会的な脅威である。この感染症被害を最小限にくい止めるためには、感染初期速やかにウイルスを検出し、感染拡大を防止する対策を講じる必要がある。正確性，簡便性及び迅速性を兼ね備えたウイルス検出技術や感染症診断法の開発は、安全・安心な社会の実現のための喫緊の課題である。本研究では、高導電性グラフェン量子ドット(GQD)－金ナノ粒子－ポリアニリンナノワイヤー(AuPAni)を基盤とした電極を作製し、電気化学的シグナルを捉えウイルス検出を行い、報告する。

【方法】窒素および硫黄でドープされたグラフェン量子ドット（N,S-GQD）は、チオ尿素とクエン酸との標準的な水熱法によって調製した。ウイルス検出のために GQD の N とウイルス特異的な抗体を修飾した。また、AuPAni は水層と有機層を用いた界面重合法により合成された。AuPAni は Ab-GQD 上にドープされた S 分子と Au が保持する S への親和性により結合し、Ab-GQD-AuPAni 複合体を形成した。本研究では使い捨て可能な導電性シリコンゴム(SR)上に前述のナノ複合体をコーティングしており、複合体のコーティングによりセンサーの導電性は劇的に向上した。この抗原抗体反応の段階では外部電気パルスを導入し、検出感度を向上した。ウイルス粒子の電極上への結合による検出は電気化学インピーダンス分光法（EIS）によってセンサー上の電荷移動抵抗値を測定した。本研究では標的ウイルスとして E 型肝炎ウイルス様粒子（HEV-LP）を用いた。

【結果】SR 上にコーティングされたナノ複合体は界面における導電性を著しく向上させ、感度高く抵抗値の変化を測定可能にした。電極は標的HEV-LPs と特異的に抗原抗体反応により結合し 10 fg/ml ～100 pg/ml の範囲でウイルス濃度依存的なウイルス検出が可能であり、その検出限界は 2.3 fg/ml であった。本研究では導電性の高い基盤上に高導電性を有する複合体をコーティングすることで、高い感度で標的ウイルスの検出を可能にするセンサーを構築することができ、ポイントオフケアやオンサイト検出への応用可能性が示された。

Biosensor, Nanobio technology, Electro chemical

発表責任者：竹村　謙信（takemura.kenshin.16@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2B09a05
講演日時：3 月 26 日 10:14～ 総合学習プラザ B09 会場

プローブ粒子液中拡散挙動に基づいた画像解析による MRSA DNA センサの構築

Development of MRSA DNA sensor based on in-liquid Diffusibility analysis of probe particles by image processing

○松島 雛子[1]、一木 啓志[1]、童 俞靜[2]、莊 漢聲[2]、高村 映一郎[1]、里村 武範[3,4]、坂元 博昭[1,4]、末信一朗[1,2,3]（[1]福井大院・工・繊維、[2]台湾國立成功大、[3]福井大院・工・生物応用化、[4]福井大学・生命セ）

○Hinako Matsushima[1], Keishi Ichiki[1], yujing tong[2], hansheng zhuang[2], Eiichirou Takamura[1], Takenori Satomura[3,4], Hiroaki Sakamoto[1,4], Shin-itiro Suye[1,2,3] ([1]Dept. Front. Fib., Grad. Sch. Eng., Univ. Fukui, [2]NCKU, [3]Dept. Appl. Chem. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Univ. Fukui, [4]Res. Edu. Prog. Life Sci., Sch. Eng., Univ. Fukui)

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)はゲノム中に外来性 DNA 由来の *mecA* 領域を持っている。この *mecA* 領域は細胞壁の架橋酵素 Penicillin Binding Protein 2 prime(PBP2')を産生する。PBP2'は β -ラクタム系抗生物質との親和性が低いため、MRSA は架橋反応が阻害されず抗生物質が作用しない。したがって、免疫力が低下している患者は日和見感染し重症化してしまう。そこで、MRSA の感染を防ぐためには、MRSA を迅速・簡便に検出する必要がある。現在の検出法にはディスク拡散法、凝集塊、電気泳動法などがあるが、いずれの方法も時間・手間を要し、その場での分析は困難である。

これまでに我々は MRSA の全ゲノムの内、薬剤耐性を示す遺伝子領域の内 25bp を MRSA 補足用プローブ及び電子メディエータをシグナル分子として固定化したナノ粒子を用いて、MRSA に由来する DNA を選択的に補足し、ピコモルレベルの高感度なバイオセンシングシステムを構築した(Watanabe, et. al., *Biosens. Bioelectron.* (2015))。しかし、B/F 分離が必要であること、複数の検出項目の同時検出が不可能であるといった課題がある。

そこで、溶液中におけるナノ粒子の拡散度に着目した。拡散度とは、溶液中で物体がブラウン運動により生じた運動性の指標である。生体分子がナノ粒子と複合体を形成することによって、体積増大により粒子全体として拡散度が低下することが報告されている。本研究では、プローブ修飾ナノ粒子が DNA と複合体を形成する際の粒子の拡散度を画像解析から算出することで DNA 検出するこどができる様な新規バイオセンサを構築した。

DNA プローブを粒径 200 nm の蛍光粒子表面と 60 nm の金ナノ粒子にそれぞれ固定化した。プローブナノ粒子、プローブ金ナノ粒子、ターゲット DNA を 1 時間ハイブリダイゼーションさせることによって、DNA プローブナノ粒子複合体を形成させた。その溶液を蛍光顕微鏡で、1 秒 15 フレームで 20 秒間撮影し、その画像から拡散度解析プログラムソフトを利用して拡散度を算出した。

実験の結果、ターゲット DNA が存在する場合、粒子の拡散度が減少することが確認された。これは、粒子がターゲット DNA とハイブリダイゼーションし複合体を形成し、体積増大をすることで、拡散度が減少したと考えられる。また、通常の黄色ブドウ球菌では拡散度の低下は見られなかったことから、本方法は MRSA に対して特異的であるといえる。以上より画像解析に基づいた MRSA の検出が可能であることがわかった。

bio sensor, MRSA, image processing

講演番号：2B09a06
講演日時：3 月 26 日 10:35～ 総合学習プラザ B09 会場

新規抗真菌活性物質探索系の構築
Development of a novel evaluation system for antifungal active compounds.
○小山 菜穂[1]、森 英里子[1]、伊藤 早紀[2]、喜田 亜由美[1]、堤 杏子[2]、飯田 泰広[1,2] ([1]神奈川工大院、[2]神奈川工大・応用バイオ)
○Naho Koyama[1], Eriko Mori[1], Saki Ito[2], Ayumi Kida[1], Anzu Tsutsumi[2], Yashuhiro Iida[1,2] ([1]Kanagawa Inst. of Tech. Dept. of Appl. Chem. and Biosci., [2]Kanagawa Inst. of Tech. Dept. Appl. Biosci.)

【背景・目的】
カビや酵母などの真菌がヒトに感染することによって起きる疾患は真菌症と総称される。真菌症の中でも、特に重症化し問題となっているのは臓器や組織に感染する深在性真菌症である。深在性真菌症の治療には現在 4 クラス 11 種類の抗真菌剤が用いられているが、種類が少なく治療の選択肢が限られている。また、真菌とヒトは細胞構造が似ているため、既存の抗真菌剤にはヒトへの副作用が報告されている。また、薬剤の長期の使用により耐性真菌の出現も問題となっており、新たな作用機作を有する抗真菌剤の開発が求められている。そこで、本研究室では真菌に特異的な成長方法である先端成長に着目した。先端成長とは、細胞壁の先端部(成長点)のβ-1,3-D-Glucan を細胞壁分解酵素により分解し、内部からの膨圧による伸長、そしてβ-1,3-D-Glucan を再合成することで細胞を伸長する。この先端成長に関与する細胞壁分解酵素β-1,3-D-Glucanase(BGL2)は、細胞内から成長点まで小胞輸送されることが知られており、先端成長時に行われる小胞輸送をターゲットとすることで真菌に対する選択毒性が得られると考えている。本研究室では、真菌の先端成長時に行われる小胞輸送をターゲットとした新規抗真菌剤の開発を目的としている。本研究では、成長点へ輸送される BGL2 の下流に緑色蛍光タンパク質 GFP を融合させ、酵母内で発現させることで、小胞輸送を可視化する評価系を構築した。また、この評価系を用いて 100 種類以上の生薬抽出物を対象とした小胞輸送阻害活性のスクリーニングを行った。さらに、*Candida albicans* を用いて同様の評価系の構築を試み、実際の真菌症の原因菌となる菌糸を形成する真菌での評価を行うことを目的とした。
【方法・結果】
BGL2 を保持する pTOWug2836 から BGL2 をクローニングし、pYES2 ベクターに導入し、pYES2-BGL2 を構築し、BGL2 の下流に EmGFP を付加した pYES2-BGL2-EmGFP を構築した。構築したベクターを *S. cerevisiae* INVSC1 にエレクトロポレーション法を用いて形質転換した。 次に、酵母形質転換体を誘導培地 SC Ura-(2 %ガラクトース,1 %ラフィノース)で培養し、BGL2-EmGFP を誘導発現させ、共焦点レーザー顕微鏡にて酵母の観察を行ったところ、酵母内での BGL2-EmGFP の局在を確認することができた。この評価系を用いて、生薬スクリーニングを行った結果、8 種類の生薬抽出物に小胞輸送阻害活性が見られた。現在、*C. albicans* を用いた小胞輸送阻害評価系の構築を目指している。

antifungal agent, drug screening, tip growth

発表責任者：飯田 泰広（iida@bio.kanagawa-it.ac.jp）

講演番号：2B09a07
講演日時：3 月 26 日 10:46～ 総合学習プラザ B09 会場

高次構造を保持した毛髪・体毛の物理化学データ解析
Analysis of physical chemistry data in intact hair
○塚本 楓[1]、坂田 研二[2]、菊地 淳[1,2,3] ([1]横市大院・生命医、[2]理研・環境資源、[3]名大院・生命農)
○Kaede Tsukamoto[1], Kenji Sakata[2], Jun Kikuchi[1,2,3] ([1]Grad. Sch. Med. Life Sci., Yokohama City Univ, [2]RIKEN CSRS, [3]Grad. Sch. Bioagri. Sci., Nagoya Univ)

【背景・目的】毛髪や体毛は血液[1]、尿[2]、唾液[3]、汗[4]、糞便[5]に比べ中長期的な情報を有しサンプリングが簡易であり、非常に複雑な高次構造を形成するが、その高次構造の特徴抽出を試みた研究は少ない。また複数の動物毛を用いた研究は法医学的な観点から形態や遺伝子に注視しているものが多く、体毛・毛髪中における物理化学的データを評価した報告は殆どない。そこで、我々は様々な種の体毛・毛髪を採取し、各種分析装置から得られたデータを統合解析し、体毛・毛髪中における物理化学的特徴の抽出を試みた。
【方法】ヒト・ブタ・ウシ・ネコより採取した体毛・毛髪試料をそのまま用い Autograph、FT-IR、TD-NMR(solid-echo 法・CPMG 法)により計測を行った。更に細かく切った試料を用いて固体 NMR(500MHz)で CP-MAS・異方性スペクトルを取得した。TG-DTA 計測については凍結破砕をした試料を用いた。FT-IR と TG-DTA については上記の動物の他にトリから採取した試料も計測した。Autograph では引張り試験を実施し、切断強度と歪みのデータを取得した。TD-NMR においては solid-echo 法と CPMG 法で計測した T_2 緩和減衰曲線を用いて緩和時間の異なる 3 成分、TG-DTA からは水分の含有量を算出した。FT-IR、CP-MAS、異方性スペクトルに対しては PKSP[6]等の解析ツールを用いてピーク分離を行い、ケラチン成分やタンパク質の二次構造情報、運動性の異なる水状態等の情報を抽出した。
【結果】FT-IR による表面化学構造の評価からはネコは他種に比べ Amide Ⅰ・Ⅱの含有量が少ないことがわかった。異方性スペクトルから得られた 3 成分の水を動物種間で比較したところ、ヒトにおいて男女差はなく他種に比べてケラチン線維に会合している水が少ないことがわかった。各種分析装置のデータの解析に加え、分析データ間の相関解析を行った結果、ネコ・ウシに関しては TG-DTA により得られたケラチン成分のスペクトル領域と切断強度に強い相関がある傾向が見られたが、ヒト毛髪に関しては、相関性が弱い傾向が見られた。更に緩和減衰曲線から抽出した成分のうち 1 成分を異方性スペクトルで予測できることを見出した。今回の学会では他の分析機器データ用いた抽出成分の予測についても報告したい。
1 Motegi, H. *et al. Sci Rep* 5, 15710, (2015). **2** Shiokawa, Y.et al. *Anal Chem* 88, 2714-2719, (2016). **3** Misawa, T. et al. *J. Proteome Res*. 14, 1526-1534 (2015). **4** Tsutsui, S. et al. *J. Comp. Aided Chem*. 18, 31-41 (2017). **5** Shima, H. et al. *Nutrients* 9, e1307 (2017). **6** Yamada et al. *ACS Omega.* 4, 3361-3369 (2019).

Intact hair, Physical chemistry property, Data analysis

講演番号：2B09a08
講演日時：3 月 26 日 10:57～ 総合学習プラザ B09 会場

モデル細胞集合体におけるシグナルの伝播挙動
Signal propagation in the model cell aggregate

笠井 一生、○白井 理、北隅 優希、加納 健司（京都大農）
Issei KASAI, ○Osamu SHIRAI, Yuki KITAZUMI, Kenji KANO (Kyoto Univ.)

【目的】

筋細胞では、K+ チャネル及び Na+ チャネルの働きによる膜電位変化を受けて伸縮運動を行う。平常時の膜電位は細胞内外の K+ 濃度比によって決定されており、静止電位と呼ばれている。神経から刺激を受けると Na+ チャネルが開き、細胞内外の Na+ 濃度比に起因する活動電位に変化する。複数の細胞が活動電位となり、ギャップジャンクションを介して近接する細胞にも膜電位変化が伝播する。外部電気刺激を与えた場合には細胞集合体（筋肉組織）が同期するように活動電位へ変化する。本研究では、各チャネルの機能を模倣した液膜型セルを複数個並列に設置した筋肉組織モデル系を構築し、ある細胞で発生した活動電位が他の細胞へどのように伝播するかを解明する。さらに、ギャップジャンクションの役割や外部電気刺激による膜電位変化の伝播挙動についても議論する。

【方法】

ニトロベンゼンを含浸させた四弗化エチレンポリマー製多孔質フィルターを有機液膜として用い、水相（W1）｜膜相（M）｜水相（W2）からなる有機液膜型セルを構築した。各セルにおいて、W1 を細胞外液、W2 を細胞内液、M を細胞膜と見立て、K+ チャネル及び Na+ チャネルの機能を模擬できるように各相のイオン組成を調整した。それらのセルを並列に設置したものを複数組並列に接続することで一細胞を模擬した。複数の細胞体について液抵抗を模擬した電気抵抗を介して連結し、多細胞体のモデル系を構築した。ある細胞体の膜電位を、スイッチにより切り替えて静止電位から活動電位へ変化させて、近接するのセルの膜電位と膜電流の変化を記録した。また、外部電気刺激を与えた際の膜電位変化の伝播挙動についても同様にして検討した。

【結果と考察】

一細胞体の膜電位を静止電位から活動電位に切り替えると、膜電位変化時に回路上で環電流が発生した。その際、近接する細胞体においても環電流の発生による局所的な膜電位変化が観察され、閾値を越えると活動電位に変化した。このとき、細胞間の抵抗が小さいほど伝播が生じやすいことが判明した。また、細胞間にギャップジャンクションが存在するとみかけの表面積が増大するため、膜電位の変化分は小さくなるが、迅速に離れた細胞体へ活動電位が伝播することが判った。また、外部電気刺激は電流値が大きいほど活動電位の伝播が促進された。細胞間では液抵抗はあるものの外部電気刺激を印加時にほぼ全体が同期して、活動電位へ変化した。

Cell aggregate, Signal propagation, Model system

発表責任者：白井　理（shiraio@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2B09a09
講演日時：3 月 26 日 11:08～ 総合学習プラザ B09 会場

Microsatellite capture sequencing 法を用いた *in silico* 多型解析パイプラインの構築

Construction of *in silico* polymorphism analysis pipeline using the Microsatellite capture sequencing method

○田中 啓介（東農大ゲノムセ）
○Keisuke TANAKA (NGRC, Tokyo Univ. of Agric.)

マイクロサテライト（SSR）領域の多型情報を利用した分子系統解析や集団遺伝解析は、一塩基多型情報と肩を並べて幅広く活用される有効な研究アプローチである。これら解析には非モデル系植物が対象とされるケースも多く、その場合にはSSRマーカーを開発することが必要とされる。ところが、従来の方法ではキャピラリーシーケンサーを介していたため、現実的に数～数十数遺伝子座の候補を挙げるのが時間的・コスト的・労力的に限界だった。以前、発表者を含む研究グループは、制限酵素もしくはソニケーションによるDNA断片化、SSR領域を含むDNA断片濃縮と次世代シーケンサーを用いたTarget capture sequenceとして「Microsatellite capture sequencing法」を展開した[1, 2]。今回、発表者はこの方法によって得られるデータから、比較するサンプル間の多型解析を *in silico* で行うために構築した解析パイプラインについて発表する。

パイプラインの流れは、以下のとおりである。アダプタートリミングとクオリティーフィルタリング後、FLASh を用いてペアーリードを一本化し、全てのサンプルを一つのマルチ FASTA ファイルとしてまとめた。そして、CD-HIT を用いて同一の配列をクラスタリングし、リファレンスデータとした。続いて、Bowtie2 を用いてこのリファレンスに対して、各サンプルのシーケンスデータをマッピングした。コンセンサス配列を抽出後、SSRIT を用いて SSR 領域を探索した。各遺伝子座が、サンプル間でどのような反復数になっているか、自作のスクリプトを用いて、テーブルデータを構築した。さらに、データ形式を加工し、populations を用いて分子系統解析を行った。

結果として、ソニケーションを用いるよりも制限酵素を用いた方が、個々の領域のリードデプスが高くなるうえに、ヘテロ接合型の遺伝子型を効果的に検出することができた。制限酵素の場合、多くの断片化部位がサンプル間で揃うため、上記の方法に適合したと考えられる。したがって、サンプル間比較を行う目的では、制限酵素によるアプローチが有効的といえる。

[1] Tanaka, K. *et al*. BioTechniques 62.4 (2017): 180-182.
[2] Tanaka, K. *et al*. Genotyping. IntechOpen. (2018).

microsatellite polymorphism, target capture sequence, NGS data analysis

発表責任者：田中啓介（kt205453@nodai.ac.jp）

講演番号：2B09a10
講演日時：3 月 26 日 11:19～ 総合学習プラザ B09 会場

機械学習支援によるタンパク質の効率的進化工学

Machine-learning-guided evolution process for protein

○中澤 光[1]、及川 未早来[1]、斎藤 裕[2,4]、亀田 倫史[3,4]、津田 宏治[3,4]、梅津 光央[1,4]([1]東北大　院工、[2]産総合研　人工知脳、[3]東大院　新領域、[4]理研　革新知能)
○Hikaru NAKAZAWA[1], Misaki OIKAWA[1], Yutaka SAITO[2,4], Tomoshi Kameda[3,4], Kouji TSUDA[3,4], Mitsuo UMETSU[1,4] ([1]Tohoku Univ., [2]AIST, [3]Tokyo Univ., [4]Reken)

生物は多種多様なタンパク質の機能によって支えられている。タンパク質は非常に精巧につくられた微小な生物機械として振る舞う場合もあることから、現在も研究者の興味の的である。医療および食品分野などでは産業化されているものも数多く、特に抗体医薬などは近年目覚ましい発展を遂げており本庶佑氏およびジェームズアリソン氏のノーベル賞受賞も相まって、さらに開発が加速している。このような中、産業にタンパク質を用いる場合、目的の機能や安定性について増強する必要がしばしば生まれる。一般にランダム変異が用いられるが、かなりの規模のはずれクローンの中から極わずかの機能向上クローンを見つけなければならず、成功確率が低いうえに労力も甚大である。
我々は本講演において、今後、蛋白質を自動設計することを想定して、高効率に目的の高機能蛋白質をできるだけ考えずに、取得する方法として機械学習支援アプローチを提案する。

Protein, Machine learning, Directed evolution

講演番号：2B09a11
講演日時：3 月 26 日 11:40～ 総合学習プラザ B09 会場

β-secretase 活性評価用新規 FRET 基質の開発とその応用

Development of novel FRET substrate for the evaluation of β-secretase (BACE1) and its application

○Lui Zhi Ling[1]、石川 雄大[2]、藤平 大介[2]、安達 稔[1]、宮内 玲奈[1]、山村 晃[1,2]、山口 淳一[1]、飯田 泰広[1,2] ([1]神奈工大院、[2]神奈工大・応用バイオ)

○Zhi Ling Lui[1], yudai ishikawa[2], daisuke touhei[2], minoru adachi[1], rena miyauchi[1], akira yamamura[1,2], jyunichi yamaguchi[1], yasuhiro iida[1,2] ([1]kanagawa ins. of tech. dept. of appl. chem. and biosci., [2]kanagawa ins. of tech. dept. of appl. biosci.)

「背景」 Alzheimer Disease (AD) は、β-secretase (BACE1) が起点となって産生された Amyloid-β (Aβ) 42 が疎水性高く凝集しやすい性質を持つ、神経細胞毒性を示す事で発症する。また、AD の神経病理学的診断では、amyloid plaque、不溶性線維で構成される Aβ のかたまりの検出に依存している。BACE1 および γ−secretase による連続切断により、Aβ peptide fragments が生成され、それが凝集して amyloid plaque になると考えらえている。これらの理由から、この BACE1 を阻害する事で AD を根本的に治療できると考えられているが、有効な阻害物質はまだ見つかっていない。従来の BACE1 阻害剤はすべて基質類似体であるため、これらの阻害剤は競合的で可逆的な阻害剤である。したがって、BACE1 の非競合的酵素阻害剤は新しい抗 AD 薬になる可能性がある。これまでに、BACE1 の非競合酵素阻害剤を検索するために、固定化した BACE1 を用いて、BACE1 阻害物質のスクリーニングを試みているが、BACE1 とその基質は高価であるため、スクリーニングには不向きである。そこで本研究は、構築した Donor に青色蛍光タンパク質(ECFP)、acceptor に黄色蛍光タンパク質(EYFP)と linker に BACE1 認識配列を用いた FRET 基質を使って作成した pColdI BACE1 の活性評価を試みた。ECFP と EYFP が FRET による蛍光波長の変化を計測することをよって、この pColdI BACE1 の活性評価が出来ると考えた。一方、これまでの知見から pColdI BACE1 は不溶タンパク質となり回収効率が著しく低かったため、膜貫通領域を欠く BACE1(BACE1 w/o TMR) 配列を含む発現ベクターを構築することにした。この基質と BACE1 w/o TMR は *E.coli* によって、安価で大量に得る事が可能となり、BACE1 阻害剤のスクリーニングに有用であると考えている。

「方法・結果」 BACE1 substrate と BACE1 w/o TMR の形質転換体の発現誘導行った後、菌体を溶菌させ、His-Trap 精製を行い、SDS-PAGE によって分子量を確認した。その後、精製した BACE1 substrate の蛍光スペクトラムを評価するとともに、精製した BACE1 の活性を市販の kit によって評価した。BACE1 substrate の電気泳動と蛍光光度計で得られた結果から、目的の基質が構築されたと考えられた。また、BACE1 w/o TMR の活性測定結果から、以前の BACE1 より高い活性が得られた。また、BACE1 substrate に BACE1 w/o TMR を作用させたところ、FRET が観察されなくなったため、作製した BACE1 substrate が基質として機能していることが示された。これらの結果から、BACE1 w/o TMR を固定化し、フローインジェクション分析システムと組み合わせることにより BACE1 阻害剤のスクリーニングを行う事が出来ると考えられる。

FRET, Alzheimer's disease, Drug screening

発表責任者：飯田泰広（iida@bio.kanagawa-it.ac.jp）

講演番号：2B09a12
講演日時：3 月 26 日 11:51～ 総合学習プラザ B09 会場

Ecobody 技術を用いたウサギモノクローナル抗体サンドイッチ ELISA システムの開発

Development of rabbit monoclonal antibody sandwich ELISA using Ecobody technology

○中野 秀雄、DAORUNG Sila-on、CHERTCHINNAPHAT Phornnaphat、兒島 孝明（名大院生命農）
○Hideo NAKANO, Sila-on DAORUNG, Phornnaphat CHERTCHINNAPHAT, Takaaki KOJIMA (Nagoya Univ.)

【目的】　モノクローナル抗体を用いた Sandwich Enzyme Immunosolvent Assay(mAb Sandwich ELISA)は、2 つの異なるエピトープで標的物質を認識できるため、高感度で選択性の高い検出システムを作成することができる。さらには、簡便なイムノクロマトグラフィー検査キットを作ることができる。当研究グループではこれまで Ecobody 技術と称している、単一 B 細胞から RT-PCR、PCR、および無細胞タンパク質合成系を用いることで、非常に短時間にウサギやヒトモノクローナル抗体を作製する技術を開発した 1)。本研究では、Swain Influenza Virus を対象として、一般にマウスより優れた親和性・特異性を有するとされるウサギ mAb Sandwich ELISA システムの開発を試みた。

【方法・結果】　Swain Influenza Virus (SIV)ワクチンをウサギに投与し、同抗原に対する免疫価上昇を確認後、ウサギ末梢血を採取した。得られた末梢液から、密度勾配遠心により白血球成分を単離後、大腸菌膜成分およびアビジンをコートした磁性ビーズに結合する細胞を除去した。得られた細胞より、ビオチン化 SIV ウィルスを結合させた磁性アビジンビーズに結合する細胞を集めた。顕微鏡下で磁性ビーズに結合している細胞を、細胞ピッカーにより一細胞ずつ PCR チューブに採取した。その後一細胞 RT-PCR、PCR、により cDNA 増幅後、Gibson Assembly により、再構成大腸菌無細胞タンパク質合成系（PURE system）による発現に必要な、T7 プロモーター、タンパク質発現増強タグである SKIK タグ、CL あるいは CH1、ロイシンジッパー(LZA あるいは LZB)、検出用タグ配列（6xHis,PA,HA）、T7 ターミネーター配列を融合させた。得られた Fab 領域発現遺伝子断片を、PURE System で合成した。まずそれぞれの抗原に対する結合活性を、ELISA で評価した。また PA タグと 6xHis タグで ELISA の検出感度を比較したところ、PA タグを用いた方が高い ELISA シグナルが得られた。そこで 6xHis タグを付加した Fab をプレートに固定し、PA タグを検出 Fab として、HRP 結合抗 PA 抗体を mAb Sandwich ELISA を組み、Fab の組み合わせを検討した。最も良い結果を与えた Fab の組み合わせを用いて、抗原濃度を希釈して検出限界を求めたところ、0.125ng/ml であった。

Ecobody 技術を用いることで、簡便・迅速にウサギモノクローナル抗体をもちいたサンドイッチ ELISA システムを構築できることがわかった。

1) Ojima-Kato et al. Scientific Rep. 7, 13979.(2017)

sandwich ELISA, cell-free protein synthesis, rabbit monoclonal antibody

発表責任者：中野秀雄（hnakano@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：2B09a13
講演日時：3 月 26 日 12:02～ 総合学習プラザ B09 会場

機能的ナノボディ探索プラットフォームとしての酵母表層提示システム
Yeast surface display system as a platform for screening of functional nanobodies

○梶原 果穂[1,2]、青木 航[1,2]、植田 充美[1,2] ([1]京大院・農・応用生命、[2]JST-CREST)
○Kaho KAJIWARA[1,2], WATARU AOKI[1,2], MITSUYOSHI UEDA[1,2] ([1]Kyoto Univ., [2]JST-CREST)

酵母表層提示システムは、タンパク質工学において広く使用されているスクリーニングプラットフォームである。この方法では、提示タンパク質の発現量はプロモーターによって調節され、分泌効率は分泌シグナルに影響を受ける。また、提示タンパク質の基質へのアクセサビリティおよび酵素活性はアンカータンパク質の長さに影響を受ける。すなわち、目的に応じてシステムを最適化することが必要である。本研究では、ラクダ科動物が持つ単鎖抗体の可変部位であるナノボディの変異体ライブラリーを評価するために、酵母表層提示システムのプラットフォーム化を行った。

我々はモデルとして抗ニワトリ卵白リゾチームナノボディ（HEN Nb）を用いた[1]。HEN Nb の表層提示を最適化するために、プロモーター・分泌シグナル・足場タンパク質の組み合わせを検討した。プロモーターとして、恒常発現プロモーターまたはガラクトース誘導性プロモーターを比較した。また、アンカータンパク質の長さとして 320 または 649 アミノ酸を、分泌シグナルとしてグルコアミラーゼまたはアルファ接合因子由来の配列を比較した。それぞれの酵母株に対して、HA-tag に対する免疫染色と蛍光標識リゾチームを用いた染色を行い、FACS を使用して蛍光強度を測定した。これにより酵母一細胞におけるナノボディの総提示量およびナノボディのアクセサビリティと活性を評価した。恒常性プロモーターとガラクトース誘導性プロモーターを比較すると、酵母一細胞あたりのナノボディの総提示量は恒常性プロモーター下の方が優ることがわかった。一方、培養によって増殖した酵母のうちナノボディを提示している酵母の割合は、ガラクトース誘導性プロモーター下において高くなることがわかった。また、アルファ接合因子由来の分泌シグナルを使用することで酵母に提示されているナノボディの活性が向上すること、および長いアンカータンパク質を使用することでナノボディの抗原へのアクセサビリティが改善することも示された。本研究で得られた結果は、ナノボディの活用に最適な酵母表層提示システムのプラットフォーム化につながることが期待される[2]。

[1] Lauwereys et al., EMBO Journal. 1998. 17: 3512–3520.
[2] Kajiwara et al., submitted.

Yeast surface display, Protein engineering, Nanobody

発表責任者：梶原　果穂（kajiwara.kaho.32a@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2B09p01
講演日時：3 月 26 日 13:50～ 総合学習プラザ B09 会場

酸化銅ナノ粒子結合ペプチドを活用した細胞毒性の低減

Reduction of the Cytotoxicity of Copper (II) Oxide Nanoparticles by Coating with a Surface-binding Peptide

○石田 亘広、細川 洋一、今枝 孝夫、畠中 孝彰（豊田中央研究所）
○Nobuhiro ISHIDA, Yoichi Hosokwa, Takao Imaeda, Takaaki Hatanaka (Toyota Cent. R&D Labs.)

【背景と目的】

酸化銅（CuO）ナノ粒子は、触媒、バッテリー、太陽電池等への活用を目指した研究が進んでいるが、一方で、他のナノ粒子と同様、細胞毒性効果も報告されている。本現象は細胞内に残存したナノ粒子によって生じる活性酸素が、ヒト細胞や有用微生物に悪影響を及ぼすことが要因として考えられている。我々はこれまでに複数の金属結合ペプチドを報告しているが [1), 2)]、本発表では酸化銅結合ペプチドを活用した細胞毒性の低減技術について提案したい [3)]。

【方法】

T7 ファージを用いたファージディスプレイシステムによって、CuO ナノ粒子に結合するペプチドを同定した。選抜ペプチドを合成し、CuO ナノ粒子への結合状態を酵素結合免疫吸着法（ELISA）、エネルギー分散型 X 線分析（EDX）、フーリエ変換赤外分光法（FT-IR）、動的光散乱法（DLS）で評価した。本ペプチドで処理した CuO ナノ粒子について、バクテリア（8 種）、酵母、並びにヒト培養細胞（HEK293）に対する細胞増殖能への影響を評価した。

【結果と考察】

ペプチドファージライブラリからのバイオパンニングにより、CuO に結合するペプチドを提示したファージを単離した。ELISA、EDX、FT-IR での分析により、選抜したペプチドが CuO ナノ粒子表面に結合していることを明らかにした。我々の知る限りにおいて、今回報告するペプチドは CuO 粒子に結合能を示す初めての事例である。本ペプチドをコーティングした CuO ナノ粒子を用いて各種細胞（大腸菌、乳酸菌等のバクテリア、酵母、ヒト培養細胞 ; HEK293）に対する毒性を評価した結果、いずれの細胞においても、未コーティング粒子で処理した場合と比較して高い細胞増殖能を示し、CuO ナノ粒子の毒性低減が示された。DLS による粒径分析の結果、ペプチドをコーティングした場合では CuO ナノ粒子の凝集が認められ、本効果が毒性低減の要因の一つと考えられた。

1) Hatanaka et.al, *Nat. Commun.*, 8:15670, 2017.
2) Hatanaka et.al, *Biomater. Sci.*, Vol. 6, p.2316, 2018.
3) Ishida et.al, *Appl. Biochem. Biotech.*, DOI: 10.1007/s12010-019-03108-9, 2019.

copper oxide, cytotoxicity, metal binding peptide

発表責任者：石田亘広（n-ishida@mosk.tytlabs.co.jp）

講演番号：2B09p02
講演日時：3 月 26 日 14:01～ 総合学習プラザ B09 会場

遊離状態のナノボディの結合能をハイスループットに評価できる「ペプチドバーコーディング法」
Peptide barcoding for high-throughput evaluation of affinities of free nanobodies

○松崎 友星[1]、青木 航[1,2]、植田 充美[1,2]（[1]京大院農、[2]JST CREST）
○Yusei MATSUZAKI[1], Wataru AOKI[1,2], Mitsuyoshi UEDA[1,2] ([1]Grad. Sch. of Agr., Kyoto Univ., [2]JST CREST)

【背景】ファージや酵母を用いた抗体ディスプレイ法は、ハイスループットに抗体を取得するための優れた方法論であるが、弱点もある。例えば、提示された抗体は安定化されることが多く、遊離状態の抗体と異なる性質を示すことがある。また、avidity 効果により、結合力が弱い抗体が取れることがある。そこで当研究室では、遊離状態の抗体の結合能をハイスループットに評価するための新規方法論「ペプチドバーコーディング法」を開発してきた[1]。本手法では、DNA バーコードを付加した抗体遺伝子ライブラリーを分泌発現させ、ペプチドバーコードと抗体の融合タンパク質ライブラリーを取得する。次に、結合能の高い抗体からペプチドバーコードを切り出し、質量分析機で同定する。本手法は、遊離状態の抗体の結合能を評価できるため、より優れた抗体スクリーニング法になる。本研究では、ペプチドバーコーディング法の拡張を目的に、モデルケースとして抗 GFP ナノボディのアラニンスキャニングを試みた。
【方法と結果】物性が異なる 6 つのペプチドをバーコードとしてそれぞれ付加した抗 GFP ナノボディをメタノール資化性酵母 Pichia pastoris で分泌発現させ、表面プラズモン共鳴により解離定数を測定した。これらの抗 GFP ナノボディの解離定数は同程度であったため、ペプチドバーコードの付加は抗体の結合能に影響を与えないと考えられた。また、抗 GFP ナノボディの 5 つのアラニン置換変異体を作製し、野生型よりも結合能が減少した抗 GFP ナノボディ変異体を得た。ユニークなペプチドバーコードを付加した抗 GFP ナノボディ変異体の発現・精製を行い、GFP との一斉結合アッセイを行った。GFP に結合したナノボディからペプチドバーコードを切り出し、質量分析機で分析することで、遊離状態のナノボディ変異体の結合能を一斉評価できることを示した。
[1] Miyamoto K, Matsuzaki Y et al. PLOS ONE 14(4): e0215993, 2019

Peptide barcoding, nanobody, alanine scanning

講演番号：2B09p03
講演日時：3 月 26 日 14:12～ 総合学習プラザ B09 会場

半導体特性を持つ黄鉄鉱ナノ粒子のヘムタンパク質を用いた合成メカニズムの解明

The study on the formation mechanism of semiconductor pyrite nanoparticles using hemoprotein

○山下 達也[1]、松田 大輝[1]、岡田 至崇[2]、アーサン ナズムル[2]、鈴木 庸平[3]、鈴木 道生[1]([1]東大院農学生命、[2]東大先端研、[3]東大院理)

○Tatsuya YAMASHITA[1], Hiroki MATSUDA[1], Yoshitaka OKADA[2], Nazmul AHSAN[2], yohey SUZUKI[3], Michio SUZUKI[1] ([1]Graduate School of Agricultural and Life Sciences, [2]Research Center for Advanced Science and Technology, The University of Tokyo, [3]Graduate School of Science)

【背景・目的】ウロコフネタマガイ（*Chrysomallon squamiferum*）の外殻は炭酸カルシウム層上が硫化鉄層で覆われており、一部にナノ粒子状の硫化鉄（pyrite, FeS_2）を含んでいる。pyrite ナノ粒子は優れた光起電力特性を持ち、太陽光発電などへの応用が期待されている物質である。しかし、その安価かつ安定した化学的合成手法は未だ確立していない。金属ナノ粒子の生成には、粒子が凝集し、マクロ化することを防ぐ分散剤が必要であると考えられている。我々はこれまでの研究においてウロコフネタマガイの外殻からミオグロビン様タンパク質を同定し、市販のウマ由来のミオグロビンを分散剤として用いることで pyrite ナノ粒子の合成に成功した。そこで、本研究では合成した pyrite ナノ粒子の光学的な評価および pyrite ナノ粒子合成機構の解明を目的とした。

【概要】半導体の評価に用いられるフォトルミネッセンス法（PL 法）によって、ミオグロビンを用いて合成した pyrite ナノ粒子を評価したところ、半導体由来と思われる蛍光を検出することに成功した。このことから合成した pyrite ナノ粒子は半導体素子としての機能を有し、さらに粒子径が揃っている球状の粒子であることから、簡便に工学的な応用が可能であることが示唆された。

ミオグロビンが pyrite ナノ粒子の合成にどのように寄与しているかを解明するために pyrite ナノ粒子合成後のミオグロビンを解析した。pyrite ナノ粒子を溶解し、SDS-PAGE で分析したところ、ミオグロビンが分解されていることが判明した。またプロテアーゼにより分解されたミオグロビンにおいても pyrite ナノ粒子が合成されたことから、ミオグロビンの特定の部分構造が pyrite ナノ粒子の合成に関与していることが示唆された。

次に、ミオグロビンのトリプシン消化産物を逆相 HPLC で分離した画分を用いて pyrite ナノ粒子を合成した。合成可能な画分を MALDI-TOF MS/MS で質量分析を行ったところ pyrite ナノ粒子の合成に関与しているペプチドを同定した。ペプチドを人工合成し、pyrite ナノ粒子合成に供したところ、pyrite ナノ粒子が合成できる濃度範囲が広く、ミオグロビンよりも優秀な分散剤であることが示された。さらに、ペプチドの変異体を用いることで pyrite ナノ粒子合成において重要であると思われるアミノ酸残基の特定に成功した。

以上の結果から、ヘムは鉄と結合することでアミノ酸配列を pyrite ナノ粒子の周囲に集める働きをしており、ミオグロビンのアミノ酸配列は水溶性の溶液中で球状の膜を形成し、球状結晶の合成に寄与していることが示された。

pyrite, Chrysomallon squamiferum, hemoprotein

講演番号：2B09p04
講演日時：3 月 26 日 14:23～ 総合学習プラザ B09 会場

生命科学分野の卒業論文研究の広範な教育的意義と新たな教育評価の工夫

Multiplicity of educational significance in research works for a bachelor's thesis in Life-Sciences Majors and a new rubric evaluation-method for the thesis research works.

○高橋 勇二[1,2]、矢野 眞和[3]、東京薬科大学 AP 事業推進室[3] ([1]東京薬科大学生命、[2]東京薬科大 AP 事業推進責任者、[3]東京薬科大学)
○Yuji Takahashi[1,2], Masakazu Yano[3], Toyaku AP Project Team[3] ([1]Dep. Life Sci., Tokyo Univ. Pharm & Life Sci, [2]AP Project Leader, Tokyo Univ. Pharm & Life Sci, [3]Tokyo Univ. Pharm & Life Sci)

【背景】農芸化学および生命科学分野の学部教育の特徴として「卒業論文研究」があげられる。この学修課程を通じて学生は大きく成長することが可能であり、さらに、「卒業論文研究」の履修経験は、専攻した専門分野に限らず、多様な分野に卒業後のキャリアーを展開した卒業生が能力を発揮する基盤ともなっていると推察される。日本の農芸化学・生命科学分野の発展を下支えした教育システムとしての「卒業論文研究」に対して、経験的にはその教育的重要性が認識されているが、その詳細な要素の解析はほとんどなされていない。今後の 20 年において多くの革新的技術が社会を激変させることが予想される中で、「卒業論文研究」の教育的要素を明らかにし、さらに新たな時代に向かう学生の成長を支える「卒業論文研究」を構築することは、農芸化学・生命科学分野の学部教育を発展させる上で欠くことが出来ない。本研究は、「卒業論文研究」の教育的な解析が新たな教育的工夫に繋がるとの仮説に基づき、卒業生に対するアンケート調査を実施し、その解析結果に基づき、「卒業論文研究」に対するルーブリック表を用いた形成的学修評価を行い、それらの有効性の検証を試みたので報告する。
【方法】東京都八王子市の生命科学分野の 4 年生学部教育課程を修了した卒業生（22 歳から 42 歳）２８６４人にアンケート調査を実施した。また、卒業生アンケート調査結果と当該教育課程の学位授与方針とを踏まえ、「卒業論文研究」で身につける資質能力を、5 の基本資質（コンピテンス）と、１５の測定可能な能力（コンピテンシー）に分類し、各々について 5 段階で経時的に評価することを学生に課した。
【結果・考察】卒業生へのアンケート結果解析から、１）「卒業論文研究」は、専門知識の深い理解のみならず、教養的知識から社会的スキルなどの汎用能力まで、幅の広い複合的な効用をもたらし、２）こうした複合的効用は、「卒業論文研究」の達成水準に大きく規定されており、達成水準の評価の重要性が確認できることが明らかになった。さらに、在学生に対して行ったルーブリック表を用いた形成的学修評価から、３）学修成果の見える化と教員や学生仲間からの他己評価が学生の成長を促す上で有効であることが示唆された。本研究の結果は、農芸化学・生命科学分野の「卒業論文研究」を含めた学部教育課程のさらなる充実に役立つものと考えられる。

education Research, bachelor thesis, rubric evaluation

発表責任者：高橋勇二（yuji@toyaku.ac.jp）

講演番号：2B11a01
講演日時：3 月 26 日 09:30～ 総合学習プラザ B11 会場

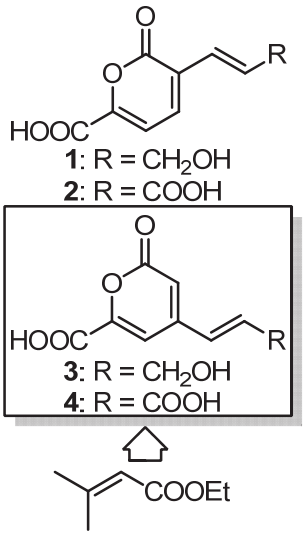
シロイヌナズナに含まれるα-ピロン型代謝物，アラビドピロン類の全合成

Total synthesis of arabidopyrones, α-pyrone metabolites in *Arabidopsis thaliana*

○松本 拓也[1]、張間 沙希[1]、クリント チャップル[2]、二瓶 賢一[1] ([1]宇都宮大農、[2]パデュー大)
○ Takuya Matsumoto[1], Saki Harima[1], Chapple Clint[2], Ken-ichi Nihei[1] ([1]Utsunomiya Univ., [2]Purdue Univ.)

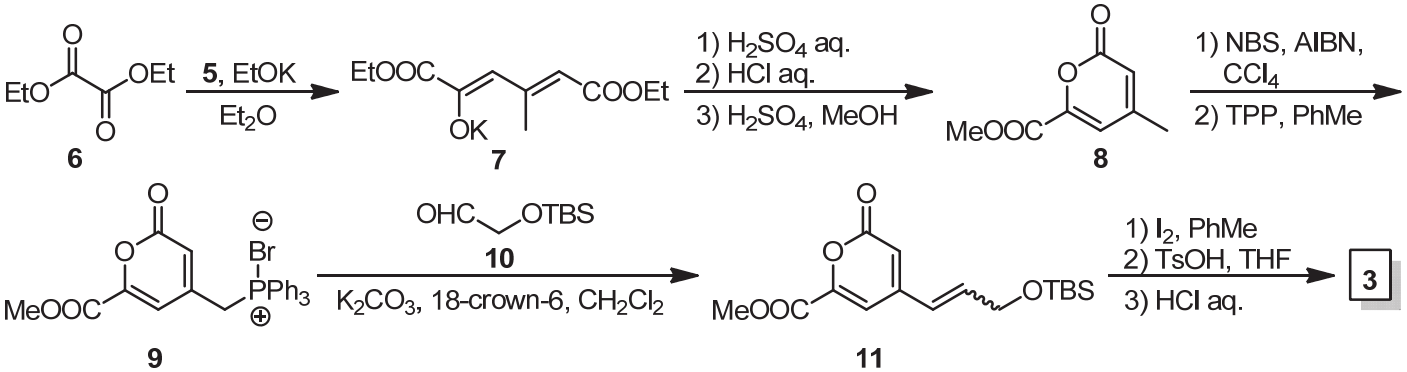
【目的】

イソアラビドピルアルコール(**1**)，イソアラビドピック酸(**2**)，アラビドピルアルコール(**3**)およびアラビドピック酸(**4**)は，2012 年にシロイヌナズナから単離・構造決定されたアラビドピロン類である(右図)。最近，当研究室では Claisen 縮合と Wittig 反応を鍵段階として，天然物 **1** および **2** の全合成を達成した。本研究では，アラビドピロン類の体系的な化学合成経路の確立を目指し，3-メチルクロトン酸エチル(**5**)を出発物質に用いて，天然物 **3** および **4** の全合成を行った。



【結果および考察】

Claisen 縮合により，**5** とシュウ酸ジエチル(**6**)からジエステル **7** を合成した(下図)。この **7** をラクトン化した後，Fischer エステル化を行い，α-ピロン **8** を得た．*N*-ブロモスクシンイミド(NBS)を用いて，アリル位を臭素化し，さらにトリフェニルフォスフィン(TPP)を使って Wittig 試薬 **9** に導いた。次に，**9** と市販のアルデヒド **10** との Wittig 反応を行い，オレフィン **11** を合成した。その ^{1}H-NMR を解析したところ，*cis* 型と *trans* 型の比率は 1:1 であることが分かった。天然物 **3** および **4** は *trans* 体であると報告されているため，ヨウ素処理により，**11** の *cis* 体を *trans* 体へ異性化した。最後に酸性条件下で，*trans*-アルケン **11** の TBS 基の除去と，得られたメチルエステルの加水分解を行い，天然物 **3** を全合成した。本発表ではさらに，酸化反応を用いた **4** の全合成研究についても報告する。



Claisen condensation, Wittig reaction, α-pyrone

講演番号：2B11a02
講演日時：3 月 26 日 09:41～ 総合学習プラザ B11 会場

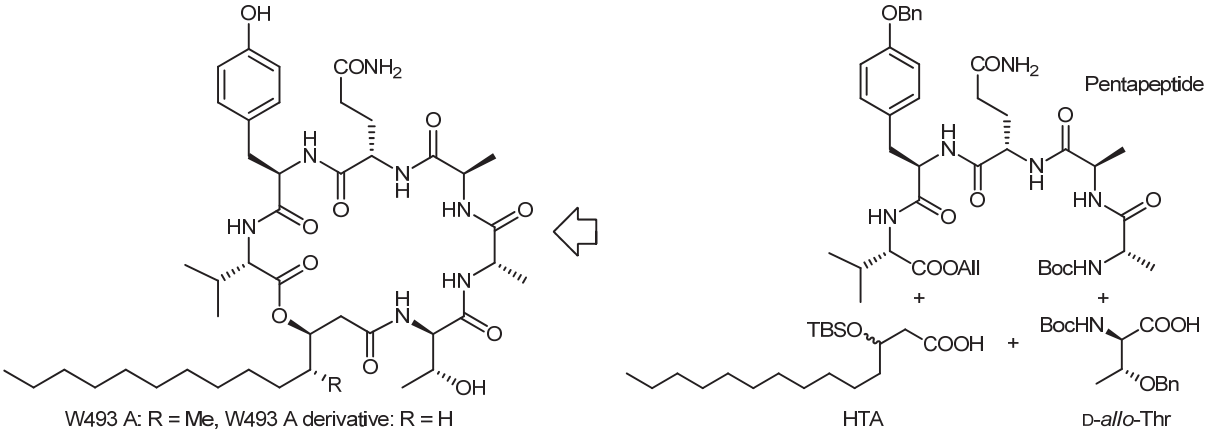
W493 A 誘導体の化学合成

Chemical synthesis of W493 A derivatives

○モウ ウェン ジ、三井 美彩、二瓶 賢一 (宇都宮大農)
○Wen Tze Mow, Misa Mitsui, Ken-ichi Nihei (Utsunomiya Univ.)

【目的】

Fusarium sp.の代謝産物である W493 A は，様々な植物病原菌の菌糸に対して形態異常を誘導する抗真菌性シクロデプシペプチドである。このような形態異常は，化合物が真菌の細胞壁や細胞膜に対して特異的に作用することで観察される。したがって，W493 A は生物選択性の高い農薬の開発のためのリード分子に位置づけられる。しかしながら，W493 A の全合成のためには，3-ヒドロキシ-4-メチルテトラデカン酸(HMTA)残基の不斉合成などを含め 20 段階以上の工程が必要となる。そこで本研究では，HMTA を 3-ヒドロキシテトラデカン酸(HTA)へと単純化した W493 A 誘導体の化学合成を行うことを計画した。



【結果および考察】

L-Val アリルエステルを起点とし，HBTU を縮合剤に用いたペプチド鎖の伸長と，酸処理による Boc 基の除去を繰り返し，ペンタペプチドを得た。それに別途調製した D-*allo*-Thr 残基を導入し，ヘキサペプチドを合成した。一方，メルドラム酸を用いて，ラウロイルクロリドを増炭し，さらに脱炭酸，ヒドリド還元および保護基の導入を行うことで，HTA 残基を得た。HTA 残基とヘキサペプチドを連結し，その後，L-Val のアリル基と HTA 部分の TBS 基を脱保護し，直線状のセコ酸を合成した。そのセコ酸のラクトン化を種々検討したところ，椎名マクロラクトン化により，高収率でシクロペプチド保護体が得られることが分かった。最後に保護基を除去して，W493 A 誘導体の化学合成を達成した。

Antibacterial, Cyclopeptide, Shiina macrolactonization

講演番号：2B11a03
講演日時：3 月 26 日 09:52～ 総合学習プラザ B11 会場

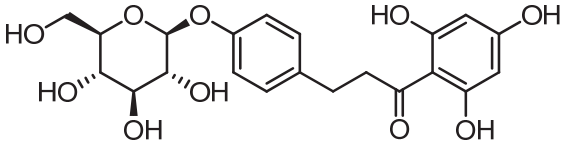
Homalium stenophyllum から単離されたフロレチン配糖体の化学合成と構造決定

Chemical synthesis and structure determination of phloretin glucoside isolated from *Homalium stenophyllum*

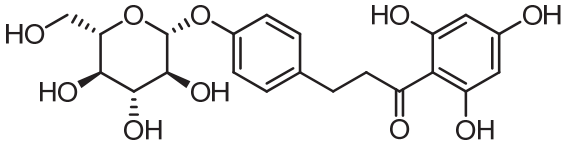
○島影 凌、二瓶 賢一 (宇都宮大農)
○Ryo Shimakage, Ken-ichi Nihei (Utsunomiya Univ.)

【目的】

2017 年，ヤナギ科の *Homalium stenophyllum* から，フロレチン-4-*O*-β-D-グルコピラノシド(**1**)が単離・構造決定された(下図)。この化合物のアグリコン部分は，フロログルシノール骨格を持ち，チロシナーゼ阻害活性を示す可能性が高い。しかしながら，その全合成は，現在まで行われていない。そこで，アルドール縮合と配糖体化反応を経由し，**1** の全合成を行った。



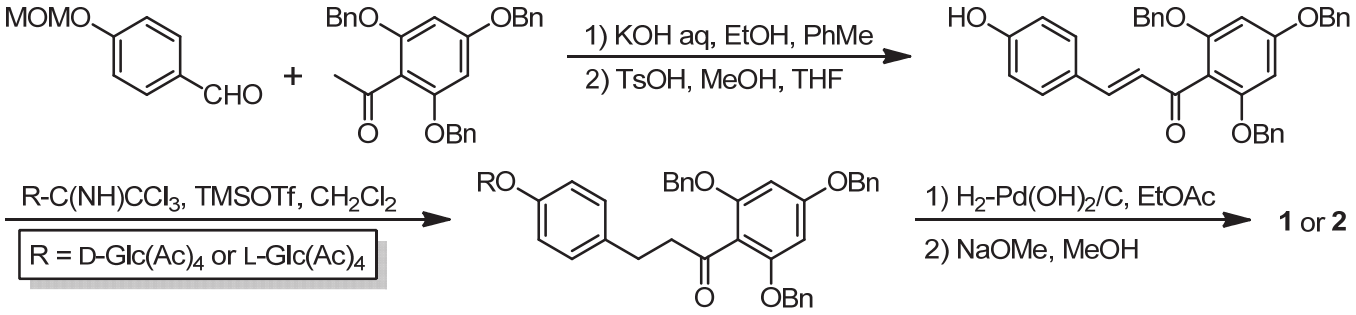
1



2

【結果および考察】

塩基性条件で，2,4,6-トリベンジルオキシフェニルエタノンと 4-メトキシメトキシフェニルアルデヒドとのアルドール縮合を行い，カルコンを得た(下図)。そのメトキシメチル基を酸存在下で除去し，フェノールに誘導した。Schmidt 配糖体化により，水酸基部分に D-グルコースユニットを導入した後，全ての保護基を除去して **1** を合成した。各種スペクトルを測定したところ，**1** の NMR は，すでに報告されている天然物のデータと一致した。



しかしながら，その旋光度の符号は，天然物のものとは逆であった[**1**: -36.7，天然物: +57.0 (ともに *c* 0.12，24 °C)]。そこで，**1** と同様のルートで，L-グルコースユニットを糖ドナーに用い，**2** を合成した。その比旋光度は，+28.3 (*c* 0.12，24 °C)を示し，符号が天然物のデータと一致した。したがって，天然物の構造は **2** ではないかと推定している。

Schmidt glycosylation, Aldol reaction, Tyrosinase

発表責任者：島影凌（mc196659@cc.utsunomiya-u.ac.jp）

講演番号：2B11a04
講演日時：3 月 26 日 10:03～ 総合学習プラザ B11 会場

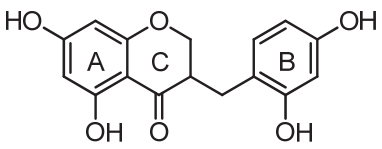
ディスポロプシンの全合成とそのチロシナーゼ阻害活性

Total synthesis of disporopsin and its tyrosinase inhibitory activity

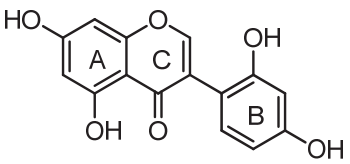
○関下 帆乃香、馬酔木 奈々、二瓶 賢一 (宇都宮大農)
○Honoka Sekishita, Nana Asebi, Ken-ichi Nihei (Utsunomiya Univ.)

【目的】

Disporopsis aspera は，中国南部から東南アジアに分布するユリ科植物である。2006 年，その根茎よりディスポロプシン(**1**)が単離・構造決定された(右図)。先に当研究室では，**1** の構造類似体であるアピオスイソフラボン **2** の全合成を行い，それが 1 mM で 30%程度の弱いチロシナーゼ阻害活性を示すことを明らかにした。また，最近の合成チロシナーゼ阻害剤の活性相関研究により，レゾルシノール骨格と糖の間にアルキルスペーサーを導入することで，活性が増強されることが分かった。したがって，B 環と C 環の間にメチレン鎖が挿入された天然物 **1** は，強いチロシナーゼ阻害剤として働く可能性が高いと判断される。そこで，Bischler-Napieralski 型環化反応を鍵段階として，**1** の全合成に取り組んだ。



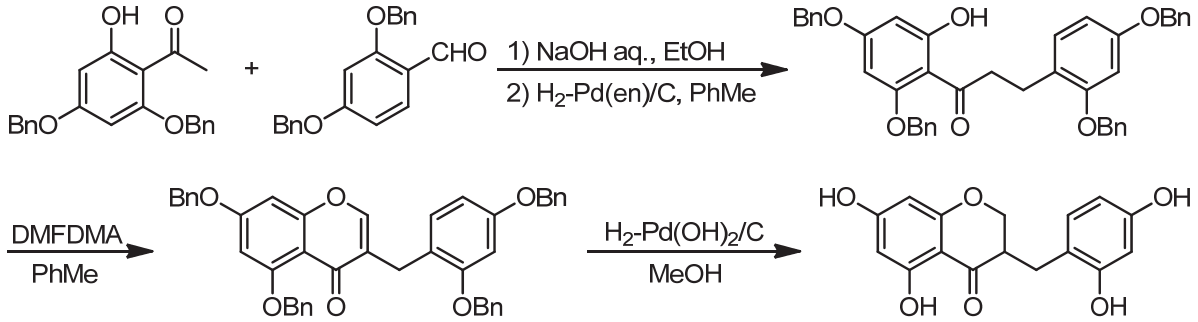
ディスポロプシン(**1**)



アピオスイソフラボン**2**
(チロシナーゼ阻害剤)

【結果および考察】

出発物質である 2,4,6-トリヒドロキシフェニルエタノンの 2 つの水酸基を，選択的にベンジル基で保護した(下図)。水酸化ナトリウムの存在下，このアセトフェノン保護体と別途調製した 2,3-ジベンジルオキシベンズアルデヒドとのアルドール縮合を行った。パラジウム-エチレンジアミン複合体を用いた水素添加により，合成したカルコンの二重結合を還元した後，*N,N*-ジメチルホルムアミドジメチルアセタールを増炭剤として，Bischler-Napieralski 型環化反応を行った。最後に，水酸化パラジウムを用いた水素添加によって，得られたホモイソフラボン保護体のベンジル基の除去と二重結合の還元を行い，天然物 **1** の全合成を達成した。本発表では，そのチロシナーゼ阻害活性についても報告する。



Bischler-Napieralski, disporopsin, tyrosinase inhibitory activity

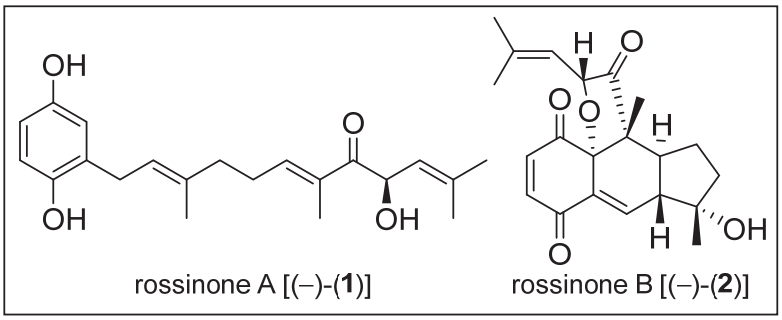
講演番号：2B11a05
講演日時：3 月 26 日 10:14～ 総合学習プラザ B11 会場

南極産ホヤ由来メロテルペン Rossinone 類の合成研究

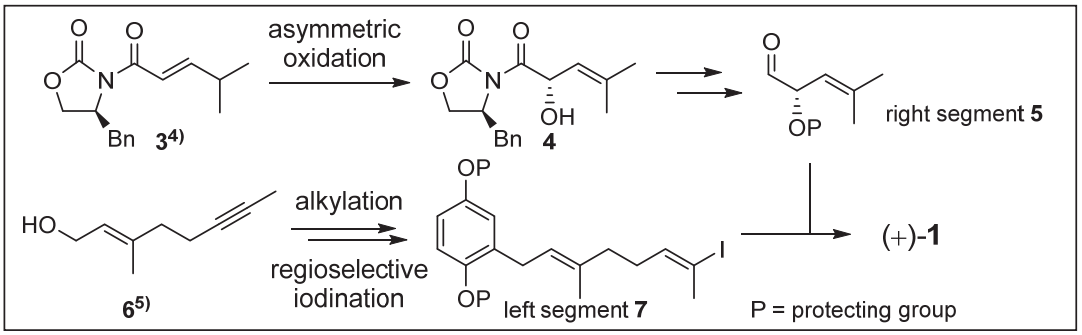
Synthetic Study of Rossinones, Bioactive Meroterpenoids Isolated from an Antarctic Ascidian

○齋藤 克哉、倉沢 一輝、滝野 ちあき、桑原 重文、榎本 賢（東北大学大学院農学研究科）
○Katsuya SAITO, Kazuki KURASAWA, Chiaki TAKINO, Shigefumi KUWAHARA, Masaru ENOMOTO (Tohoku University Graduate School of Agricultural Science)

【背景・目的】Rossinone A [(−)-(**1**)]と B [(−)-(**2**)]は 2009 年に Copp らによって、南極のロス海に生息するホヤ *Aplidium* sp.から単離・構造決定されたメロテルペンの一種であり[1]、抗炎症作用やマウス白血病細胞 P388 に対する増殖抑制活性、抗 DNA ウイルス活性などが報告されている。また、**2** の特徴的な四環性骨格は、**1** が酸化された化合物から vinyl quinone Diels-Alder(VQDA)反応によって生合成されると提唱されている[2]。実際、2010 年に Tang らによって VQDA 反応を利用した(±)-**2** の全合成が報告されたが[3]、光学活性体合成への適用には困難が予想される合成経路であった。そこで、本研究では **1** 及び **2** の初の不斉全合成を目指して研究を行った。



【方法・結果】天然型アミノ酸から容易に調製可能な既知化合物 **3** を出発原料として **1** の合成経路確立を目指した[4]。まず、**3** から二重結合の異性化を伴う立体選択的な酸化反応により **4** を調製し、さらに数工程を経て右側セグメント **5** へと導いた。次に、既知のアルコール **6** を出発原料とし[5]、ヒドロキノン誘導体との芳香族求電子置換反応を含む数工程の変換で左側セグメント **7** を得た。これらをカップリング後に脱保護して(+)-**1** の初の全合成を達成した。今後は各反応条件の最適化を行い、(−)-**1** と(−)-**2** の初の全合成を目指す。



1) B. R. Copp *et al.*, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 9195. 2) D. Trauner *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 6199. 3) Y. Tang *et al. Org. Lett.* **2010**, *12*, 5554. 4) S. G. Davis *et al. Tetrahedron: Asymmetry*. **2010**, *21*, 1635. 5) D. L. Nelsen *et al. Organometallics*, **2009**, *28*, 950.

rossinone, vinyl quinone Diels-Alder reaction, meroterpenoid

発表責任者：榎本賢（masaru.enomoto.a2@tohoku.ac.jp）

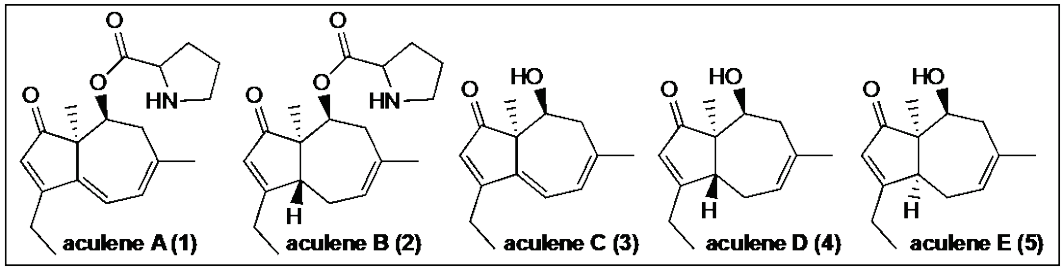
講演番号：2B11a06
講演日時：3 月 26 日 10:35～ 総合学習プラザ B11 会場

クォラムセンシング阻害物質 aculene 類の合成研究

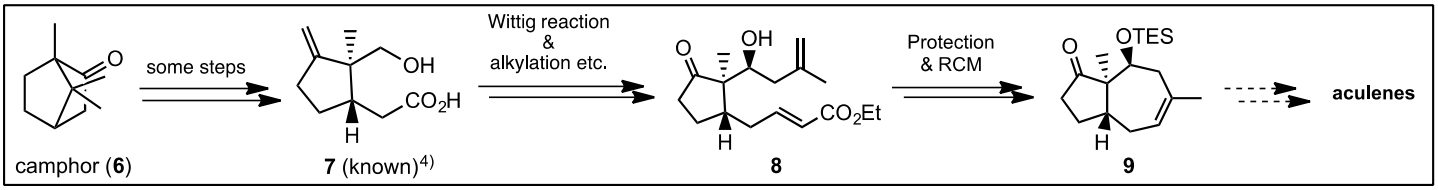
Synthetic study of aculenes

○横川 陽向[1]、石澤 誠也[1]、齋藤 克哉[2]、桑原 重文[2]、榎本 賢[2] ([1]東北大農、[2]東北大院農)
○Hinata YOKOKAWA[1], Seiya ISHIZAWA[1], Katsuya SAITO[2], Shigefumi KUWAHARA[2], Masaru ENOMOTO[2] ([1]Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, [2]Faculty of Agriculture, Tohoku University)

【背景・目的】 細菌はオートインディーサーという低分子化合物を分泌して，自分と同種別個体の生育密度を感知している。この機構はクォラムセンシング (QS) と呼ばれており，これによって特定の遺伝子の発現が制御され，菌種によってはバイオフィルム形成や病原因子産生などが引き起こされる。この機構を阻害することができれば，選択圧を高めることなく，細菌の増殖や病原因子産生を防げることが期待されるため，QS 阻害物質は新たな作用機序をもつ抗菌物質へと発展する可能性を秘めている。Aculene 類は，2014 年に Larson らによって *Aspergillus aculeatus* から単離・構造決定された化合物である[1]。これらはその後，複数のグループによっても相次いで単離され[2,3]，Zhao らは **3**–**5** が *Chromobaterium violaceum* に対して QS 阻害活性を示すことを報告した[3]。我々は構造活性相関研究への展開も視野に入れ，aculene 類の網羅的合成を目指して本研究に着手した。



【方法・結果】 Camphor (**6**)を出発原料として既知の方法に従ってカルボン酸 **7** へと導いた[4]。その後，Wittig 反応やメタリル基の導入を含む数工程の変換により **8** を得た。続いて，閉環メタセシス(RCM)による 7 員環の構築を試みたところ，**8** に対する RCM は進行しなかったが，**8** のヒドロキシ基を保護した化合物では望みの反応が進行し，5 / 7 二環式構造を有する **9** の合成に成功した。今後は，**9** に対して酸化や 5 員環へのエチル基導入を含む種々の変換を行い，aculene D (**4**)の初の全合成を達成する予定である。また，**9** を中間体としてその他の aculene 類の網羅的全合成を達成する予定である。



1) T. O. Larson, *et al*. *Molecules*, **2014**, *19*, 10898. 2) J.-M. Gao, *et al*. *Molecules*, **2015**, *20*, 325. 3) Y. X. Zhao, *et al. Arch. Pharm. Res.* **2017**, *40*, 25. 4) H. Hutchinson. *et al*. *Can. J. Chem*. **1986**, *64*, 854.

total synthesis, quorum sensing, aculenes

発表責任者：榎本　賢（masaru.enomoto.a2@tohoku.ac.jp）

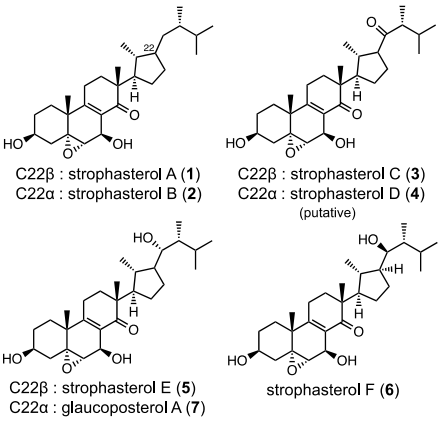
講演番号：2B11a07
講演日時：3 月 26 日 10:46～ 総合学習プラザ B11 会場

Strophasterol D, E, F 及び glaucoposterol A の合成研究

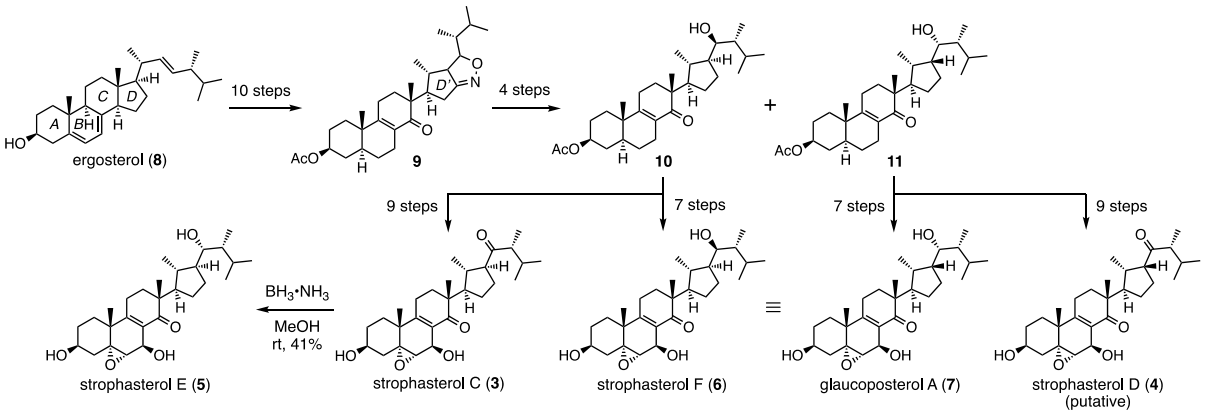
Synthetic studies on strophasterols D, E, F and glaucoposterol A

○佐藤 俊太郎、桑原 重文（東北大院農）
○SHUNTARO SATO, SHIGEFUMI KUWAHARA (Tohoku Univ.)

【背景】Strophasterol A-F (**1-6**)及び glaucoposterol A (**7**)は数種のキノコから単離された新規ステロイド誘導体である [1,2,3]。**1** はキノコ子実体形成誘導活性を示し, 分類学的に異なる 82 種類のキノコにおける内在も確認されたことから, 世界初のキノコホルモンである可能性を秘めている（**2-7** の生物活性は不明）。我々は **1-7** の量的供給の実現と, 詳細な活性評価の実施を目的として合成研究を行っており, これまでに **1-3** の合成が完了している [4,5]。



【方法・結果】昨年度大会では,出発原料の ergosterol (**8**)から 1,3-双極子付加環化反応の含む 14 工程を経て **10** 及び **11** を得, **10** から **3** の合成を達成したことを報告した [5]。今回我々は, 中間体 **10** 及び **11** を用いた strophasterol 類の網羅的合成を行った。すなわち、**10** に対して 7 工程を経て B 環に官能基修飾を施し, **6** の初の合成を達成した。また **3** に対し BH_3•NH_3 を用いると, 側鎖のケトンを優先的に還元できることを見出し, **5** の初の合成を達成した。一方, **11** に対して同様の変換により, 7 工程を経て **7** を合成したが, 各種 NMR データは天然物の glaucoposterol A とは一致しなかった。その後より詳細な NMR 解析を行った結果, glaucoposterol A の真の構造は **6** と同一であることが強く示唆された。また, **11** から 9 工程を経て **4** を合成したが, 各種 NMR データは天然物の strophasterol D とは一致しなかった。現在, strophasterol D の真の構造の合成に取り組んでいる。



1) H. Kawagishi, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10820. 2) H. T. Aung, *et al.*, *Chem. Biodivers.* **2017**, *14*, e1600421.
3) T. Kikuchi, *et al., Bioorg. Chem.* **2019**, *89*, 103011. 4) S. Sato, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 10911.
5) 日本農芸化学会 2019 年度大会講演要旨 1D4p08

total synthesis, strophasterol, mushroom

講演番号：2B11a08
講演日時：3 月 26 日 10:57～ 総合学習プラザ B11 会場

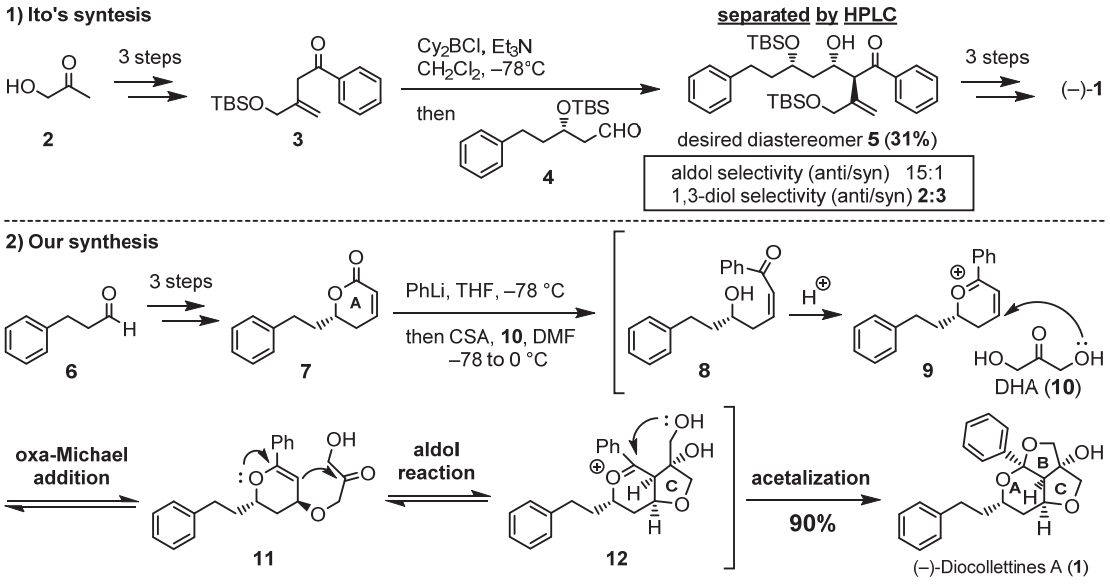
(−)-Diocollettines A の全合成

Total synthesis of (−)-Diocollettines A

○川元 美咲、佐藤 俊太郎、桑原 重文（東北大農）
○MISAKI KAWAMOTO, SHUNTARO SATOU, SHIGEFUMI KUWAHARA (Tohoku Univ.)

【目的】(−)-Diocollettines A(**1**)は、5 つの不斉炭素原子と、天然物としては非常に珍しい、2 つの THF 環（B、C 環）と 1 つの THP 環（A 環）が縮環した新規三環性骨格を有しており、有機合成化学的に挑戦的な化合物である。また、(−)-**1** はヒト肺がん細胞に対する細胞毒性を持つことが知られている [1)]。しかし、(−)-**1** の天然からの単離は極めて微量であることから、その後の詳細な生物学的研究は行われていない。ごく最近、伊藤らによって(−)-**1** の不斉全合成が達成されたが、**3** と **4** のアルドール反応における立体選択性が十分でなく、他のジアステレオマーとの分離も容易でないことから合成上の課題が残る結果となった。そこで、私たちは(−)-**1** の効率的な合成法の確立と生物活性試験への標品供給を目的とし、本研究に着手した。

【方法・結果】市販のアルデヒド **6** からケック不斉アリル化を含む 3 工程の変換によって、既知の α,β-不飽和ラクトン **7** を調製した。**7** にPhLi を付加した後、ワンポットで酸と DHA(**10**) を作用させたところ、生成したオキソニウムイオン中間体 **9** に対する **10** の立体選択的な oxa-Michael 付加とアルドール反応、アセタール化が連続的に進行し、(−)-**1** を単一異性体として、極めて高収率で得ることに成功した。これにより、既存の合成法に比べ、遥かに効率的な合成ルート（市販の **6** より 4 工程、通算 63%）を確立した。



1) W.-Y. Gao *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57*, 3215-3217.
2) H. Ito *et al.*, *Org. Lett.* **2019**, *21*, 5813-5816.

total synthesis, natural product chemistry, Diocollettines A

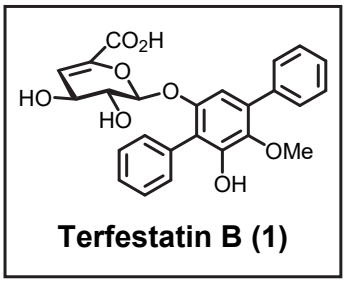
講演番号：2B11a09
講演日時：3 月 26 日 11:08～ 総合学習プラザ B11 会場

Terfestatin 類の網羅的合成研究

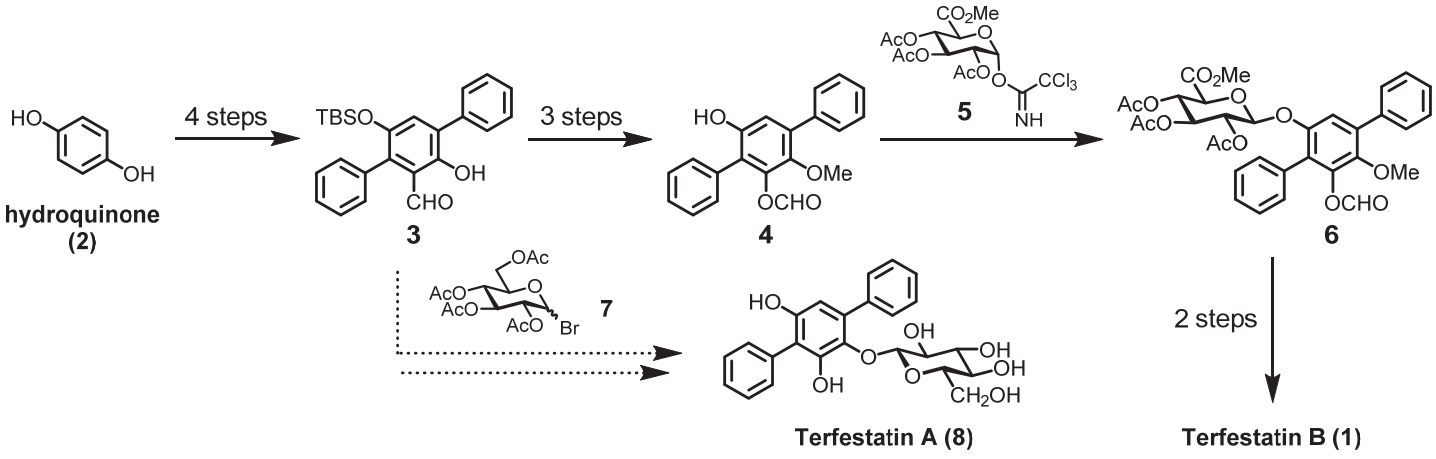
Synthetic study on Terfestatins

○菅原 駿[1]、桑原 重文[1]、小倉 由資[2]、十和田 諒[1]、佐藤 俊太郎[1] ([1]東北大農、[2]東大農)
○Shun SUGAWARA[1], Shigehumi KUWAHARA[1], Yusuke OGURA[2], Ryo TOWADA[1], Shuntaro SATO[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Tokyo Univ.)

【目的】Terfestatin 類は *p*-テルフェニル骨格の中央ベンゼン環の 3 ヶ所が酸素官能基化された共通基本骨格に種々の糖部位が連結した特徴的な構造を有し、様々な生物活性を示す。我々は本化合物群の網羅的合成法の確立を志向し、糖部位を合成終盤で導入する計画を立案した。これに従い、まずは 2015 年に *Streptomyces* sp. RM5-8 より神経保護作用を有する化合物として単離・構造決定された Terfestatin B (**1**)[1)]の合成研究に着手した。



【方法】ヒドロキノン (**2**)を出発原料とし、鈴木カップリングによる 2 つのフェニル基の導入を含む 4 工程の変換を経て、テルフェニル **3** を合成した。次に **3** に対し、アルデヒドのバイヤー・ビリガー酸化を含む 3 工程の変換を行い、所望の位置に無保護の水酸基を有する **4** へと導いた。そしてイミデート糖 **5** による **4** のシュミッドグリコシル化を行って **6** を得た後に、糖部位への二重結合の導入と脱保護により Terfestatin B (**1**)の合成を達成した。現在は Terfestatin B (**1**)の合成過程で得られたテルフェニル **3** に対して、ブロモ糖 **7** を用いたグリコシル化の検討を行っている。グリコシル化を行った後に、バイヤー・ビリガー酸化を含む数工程の変換を行うことで、類縁体である Terfestatin A (**8**)の合成を達成しようと考えている。



1)Thorson, J. S. *et al., Org. Lett.* **2015**, *17*, 2796-2799.

total synthesis, Terfestatins, terphenyl glycosides

講演番号：2B11a10
講演日時：3 月 26 日 11:19～ 総合学習プラザ B11 会場

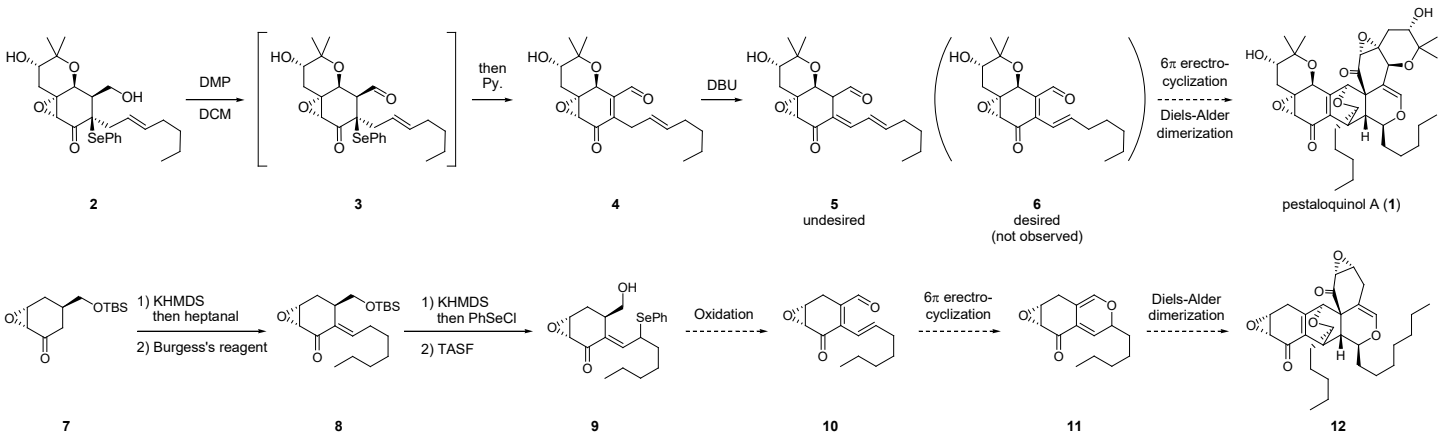
pestaloquinol 類の合成研究

synthetic studies of pestaloquinols

○日戸 誠也[1]、小倉 由資[1]、滝川 浩郷[1]、桑原 重文[2] ([1]東大農、[2]東北大農)
○Seiya NITTO[1], Yusuke OGURA[1], Hirosato TAKIKAWA[1], Shigefumi KUWAHARA[2] ([1]Tokyo Univ., [2]Tohoku Univ.)

【目的】Pestaloquinol A (**1**)および B は針葉樹イヌマキに内生する Pestalotiopsis 属の子嚢菌より単離・構造決定された化合物である。同時に cytosporin D が単離されており、その酸化と続く二量体化による生合成経路が推定されている。生物活性として HeLa 細胞に対する毒性のみが報告されているが、詳細な活性評価を行うことで、創薬のリード化合物としてさらに有用な生物活性が見出される可能性がある。また pestaloquinol 類は 9 つの環と 14 個の不斉点を有する非常に複雑な骨格を有しており、有機合成化学的にも魅力的な化合物である。本研究では pestaloquinol 類の初の全合成の達成と活性試験に向けた試料供給を目指し、合成に着手した。

【方法・結果】2018 年の本大会において、**2** の合成までを報告した。**2** の 1 級水酸基を Dess-Martin 試薬によって酸化してアルデヒドとし、続いてピリジンを作用させるとフェニルセレネニル基が脱離して **4** が得られた。次に DBU による二重結合の異性化を試みたが、望みの **6** ではなく **5** のみが得られた。この手法での **6** の合成は困難であると判断し、フェニルセレネニル基の脱離に伴うエノンの異性化により環化前駆体へと変換する合成計画に移行した。鍵反応である 6π 電子環状反応と Diels-Alder 反応による二量体化の検討を行うため、まずモデル化合物 **12** の合成を目指した。既知の手法により 3 工程の変換で得られた **7** に対し、Aldol 反応と Burgess 試薬を用いた脱水により **8** へと導いた。続いてカルボニルγ位へのフェニルセレネニル基の導入と TBS 基の除去により **9** を合成した。現在、**9** の酸化と続く鍵反応の検討を行っている。

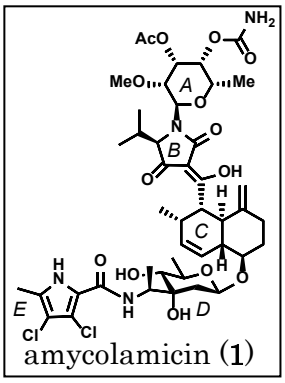


pestaloquinol, cytosporin D, Diels-Alder

講演番号：2B11a11
講演日時：3 月 26 日 11:40～ 総合学習プラザ B11 会場

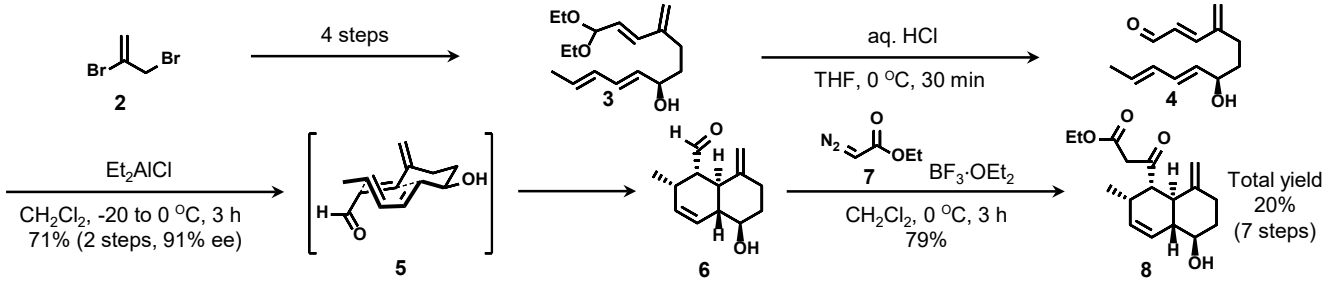
Amycolamicin の全合成研究
Synthetic Study of Amycolamicin

○目黒 康洋、桑原 重文（東北大院農）
○Yasuhiro Meguro, Shigefumi Kuwahara (Tohoku Univ. Grad. Sch. Agric.)

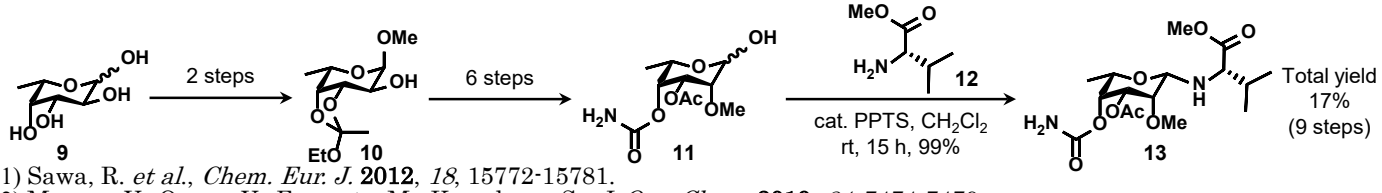


amycolamicin(**1**)は希少放線菌 *Amycolatopsis* sp. MK575-fF5 が生産する抗生物質であり MRSA、VRE を始めとして極めて広範なグラム陽性・陰性の薬剤耐性菌に対して強力な抗菌作用を示す[1]。これまで **1** の構造活性相関を含めて，有機合成化学的アプローチは皆無である。我々は、各種誘導体の合成にも柔軟に対応できる収束的合成経路を開拓して **1** の初の全合成に挑む。昨年度の大会では **1** の DE ユニットの合成について発表を行った[2]。本発表では、**1** の C および AB ユニットの合成について報告する。

まず、C ユニットの合成を行った。2,3-ジブロモプロペン **2** から不斉還元を含む 4 工程で **3** を調製した。塩酸により **3** のジエチルアセタール部位の脱保護を行うことでアルデヒド **4** を合成した。**4** の分子内 Diels-Alder 反応に関して反応条件を種々検討した結果、Lewis 酸として Et_2AlCl を用いたときのみ遷移状態 **5** を経由して良好な収率で **6** を得ることに成功した。最後にジアゾ酢酸エチル **7** との Roskamp 反応に付すことで C ユニット(**8**)の合成を完了した。



続いて、AB ユニットの合成を行った。L-フコース **9** からグリコシル化とオルトエステル化により **10** へと変換した。**10** に対して各保護基の調整を行った後、糖アノマー位の加水分解によりヘミアセタール体 **11** へと導いた。最後に L-バリンメチルエステル **12** との *N*-グリコシル化により AB ユニット(**13**)の合成を完了した。今後は合成した各ユニットの連結により **1** の初の全合成を目指す。



1) Sawa, R. *et al.*, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 15772-15781.
2) Meguro, Y.; Ogura, Y.; Enomoto, M.; Kuwahara, S.; *J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 7474-7479.

Natural product, Synthetic organic chemistry, Antibiotic

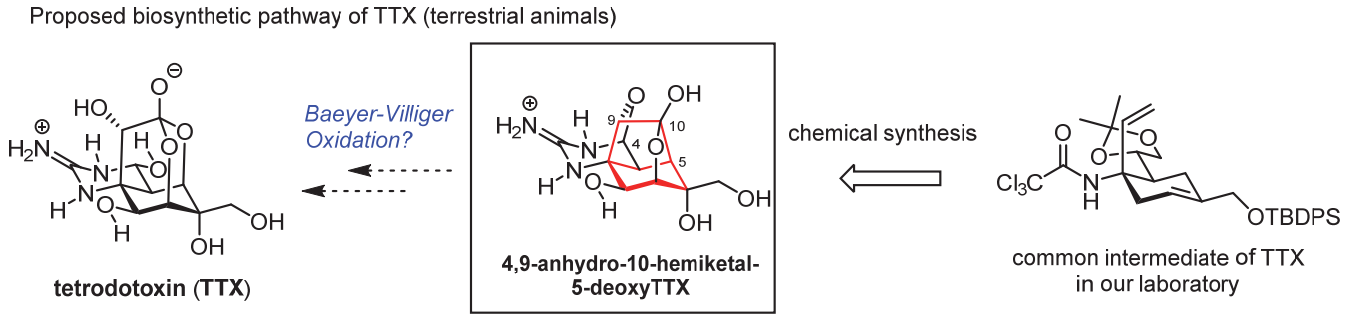
発表責任者：目黒 康洋（yasuhiro.meguro.t4@dc.tohoku.ac.jp）

講演番号：2B11a12
講演日時：3 月 26 日 11:51～ 総合学習プラザ B11 会場

テトロドトキシンの推定生合成中間体の合成研究
Synthetic study on a predicted biosynthetic intermediate of tetrodotoxin
○宮坂 忠親[1]、安立 昌篤[2]、西川 俊夫[1] ([1]名大院生命農、[2]東北大院薬)
○Tadachika MIYASAKA[1], Masaatsu ADACHI[2], Toshio NISHIKAWA[1] ([1]Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, [2]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University)

【目的】
フグ中毒の原因物質として知られるテトロドトキシン(TTX)は、フグだけでなくイモリやカエル、タコなど様々な生物が保有していることが明らかとなっている。しかし、TTX の生合成は古くから研究されているにも関わらず、現在もその生合成経路は未解明である。近年、東北大学の山下らは、オキナワシリケンイモリ(*Cynops ensicauda popei*)から 4,9-アンヒドロ-10-ヘミケタール-5-デオキシテトロドトキシン(ヘミケタール TTX)を単離した[1)]。ヘミケタール TTX は、その構造的特徴から TTX の生合成前駆体であると予想され、Baeyer-Villiger 様の反応によって TTX に変換されていると推測された。しかし、天然から単離されたヘミケタール TTX の単離量は数百μg と極僅かである。そこで、本研究では、ヘミタール TTX の化学合成を行い、その構造を確認するとともに、TTX への化学変換試みることを目的とした。

【方法・結果】
当研究室で開発された TTX の合成中間体を出発原料として、ヘミケタール TTX の合成を目指した。本大会では、その詳細について発表する。



Reference
1) Kudo, Y.; Yotsu-Yamashita, M. *et al*. *Angew. Chem. Int. Ed*. **2014**, *53,* 14546.

tetrodotoxin, biosynthesis, chemical synthesis

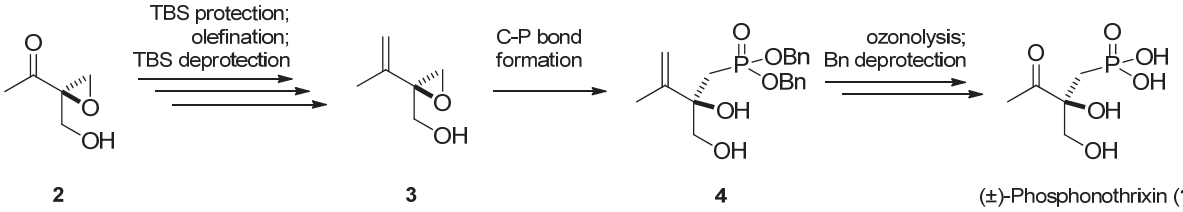
講演番号：2B11a13
講演日時：3 月 26 日 12:02～ 総合学習プラザ B11 会場

除草活性を有する抗生物質ホスホノトリキシンの合成研究

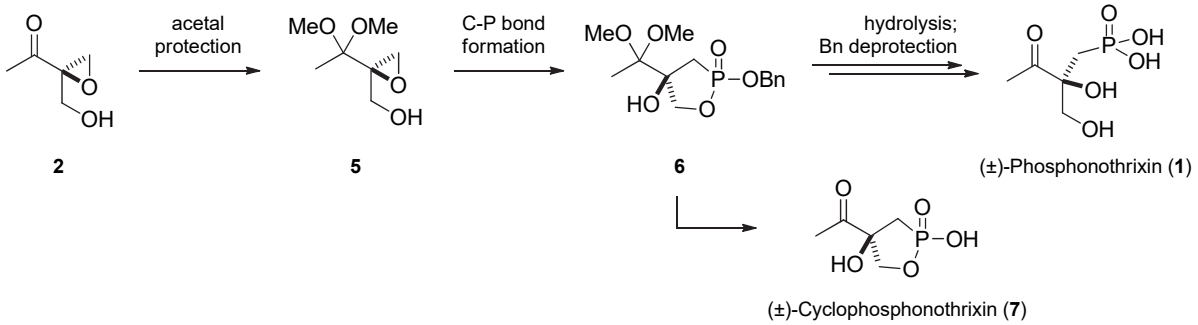
Synthetic studies of phosphonothrixin, a herbicidal antibiotic

○中村 皓毅、松島 芳隆（東京農業大学・農芸化学科）
○Kouki NAKAMURA, Yoshitaka MATSUSHIMA (Tokyo Univ of Agriculture, Dept of Agricultural Chemistry)

【背景・目的】ホスホノトリキシン **1** は、*Saccharothrix sp.* ST-888 から単離された除草活性を有する抗生物質である。過去に報告されている光学活性体合成は出発物質の調製が容易ではなく、再現性に乏しいため、効率的な合成とはいえない。本研究では **1** の効率の良い合成経路の確立を目的とする。
【方法・結果】一昨年度大会にて、大量合成可能なエポキシケトン **2** をオレフィン化した後、鍵反応である C-P 結合形成反応を含む、文献既知の三工程を経てホスホノトリキシン **1** へと導く合成経路を確立したことを報告した [1)]。



しかし、本合成経路では、ヒドロキシ基の保護・脱保護を必要とし、またカルボニル基を一旦オレフィンとした後にオゾン分解によって戻すため、工程数が多くなる難点があった。そこで、より効率的な合成経路を立案・確立したため詳細を報告する。エポキシケトン **2** をアセタール保護した化合物 **5** 対して、C-P 結合形成反応を行ったところ、C-P 結合の形成を伴って環化が進行した化合物 **6** が得られた。これを加水分解によって開環および、アセタール脱保護し、Bn 基を除去することでホスホノトリキシン **1** へと導いた。また、化合物 **6** に対するアセタールと引き続く Bn 基の脱保護によって環状ホスホノトリキシンを得た。



1) 中村ら、平成 30 年度日本農芸化学会大会講演要旨集、P565

phosphonothrixin, herbicidal antibiotic, C-P bond formation

発表責任者：松島芳隆（ym205308@nodai.ac.jp）

講演番号：3A01a01
講演日時：3 月 27 日 09:30～ センター2 号館 A01 会場

中性子小角散乱法によるダイズ種子貯蔵タンパク質の構造解析を目指した技術開発

Technological development for structural analysis of soybean seed storage proteins by small-angle neutron scattering

○奥田 綾、佐藤 信浩、守島 健、井上 倫太郎、裏出 令子、杉山 正明（京大複合研）
○Aya OKUDA, Nobuhiro SATO, Ken MORISHIMA, Rintaro INOUE, Reiko URADE, Masaaki SUGIYAMA (KURNS)

【目的】ダイズの主要種子貯蔵タンパク質であるグリシニンおよびβ-コングリシニンは、ゲル化や乳化などの優れた食品加工特性を持つ。ジスルフィド結合や非共有的な分子間相互作用により凝集体やゲルを形成して加工特性を発揮する。加工時の物理的・化学的な条件の違いにより異なる構造を形成し、様々な物性が発現すると考えられる。したがって凝集体構造と物性の関係が明らかになれば、ダイズタンパク質を用いた新しい食品加工技術の開発や品質管理技術への応用が期待できる。X 線および中性子の小角散乱法は物性に寄与するナノスケール領域の構造解析に適している。特に中性子の小角散乱法では同位体である軽水素と重水素の中性子散乱能力が大きく異なる性質を利用して、サンプルを重水素化することで混在系の特定のタンパク質のみに着目してその構造を観察する事が可能である(コントラスト同調中性子小角散乱(SANS)法)。この方法では、サンプルの重水素化率を精密に制御することが標的タンパク質の散乱を選択的に測定するために必須である。そのためには、目的タンパク質の重水素化率を正確に測定する必要があるが、その手法は未だ十分に確立されていない。本研究ではダイズ種子貯蔵タンパク質のコントラスト同調 SANS 法による構造解析のための基礎的技術である、タンパク質の重水素化率精密測定法を確立することを目的とした。

【方法・結果】

SANS 測定には大量のタンパク質が必要である。そのため、ダイズ種子貯蔵タンパク質の大腸菌発現系を用いて、重水および重水素化グルコースを含む M9 培地において重水素化タンパク質を大量に発現させるための最適な培養条件の検討を行った。そして、確立した最適な条件で発現させたダイズ種子貯蔵タンパク質を精製した。タンパク質の重水素化率の精密測定のために、軽水素と重水素の質量差を利用し、質量分析により軽水素化タンパク質と重水素化タンパク質の質量差を測定することにした。ダイズ種子貯蔵タンパク質を含む複数種類の重水素化タンパク質と軽水素化タンパク質を MALDI-TOF/MS を用いた質量分析に供試した。重水素化タンパク質は軽水素化タンパク質と比較して水素が重水素に置換されたために質量が大きくなったイオンが検出され、その質量差から重水素化率を算出することに成功した。今後は重水素化および軽水素化したリコンビナントダイズ種子貯蔵タンパク質の X 線小角散乱(SAXS)解析を行い、構造情報を得る予定である。

Soybean, Seed storage protein, Small-angle neutron scattering

講演番号：3A01a02
講演日時：3 月 27 日 09:41～ センター2 号館 A01 会場

X 線小角散乱でみる大豆タンパク質のナノ構造に対する緩衝剤および塩の影響
Effects of buffer and salt on nanostructure of soybean storage protein as revealed by small-angle X-ray scattering
○佐藤 信浩、裏出 令子、奥田 綾、守島 健、井上 倫太郎、杉山 正明（京大複合研）
○Nobuhiro SATO, Reiko URADE, Aya OKUDA, Ken MORISHIMA, Rintaro INOUE, Masaaki SUGIYAMA (Kyoto Univ.)

【目的】大豆は種子に 30%以上の豊富なタンパク質を含み、その栄養価の高さからそのまま食に供されるだけではなく、豆腐や湯葉のような加工食品としても古くより利用されてきた。また近年は、大豆タンパク質を分離し、他の食品の物性を改善するために添加する食品素材としての利用も広く行われている。大豆加工食品や大豆タンパク質添加食品の品質向上のためには、温度変化や塩の添加、凝固剤との反応などの際に、分子レベルでどのようなタンパク質の構造の変化が生じているかを詳しく調べることが不可欠である。我々はこれまで、不透明な凝集体のナノ構造解析に有用な X 線小角散乱（SAXS）を用いて、小麦タンパク質や大豆タンパク質の凝集構造解析を行い、その特徴を明らかにしてきた。本研究では、SAXS を用いて、大豆タンパク質 β-コングリシニン(7S)とグリシニン(11S)について SAXS による構造解析を行い、異なる温度で熱処理を行った際の構造の相違から、両者の熱変性の温度依存性の違いを調べるとともに、緩衝剤や NaCl の添加がそれぞれのタンパク質の構造もたらす影響について調べた。
【方法】乾燥大豆（エンレイ）粉末をヘキサンにより脱脂し、2-メルカプトエタノール添加による還元条件下で蒸留水中に大豆タンパク質を抽出した後、等電点沈殿により 11S、7S の順に回収した。SAXS 測定は X 線小角散乱装置 NANOPIX（リガク）を用いて行った。それぞれのタンパク質は、純水およびリン酸カリウム緩衝溶液（KPi buffer; 35 mM, pH 7.5）に溶解し、目的に応じて 0.1 – 0.8 M となるよう塩化ナトリウムを添加した。熱処理に関する実験については、試料を所定の温度で 5 分間保持した後 25℃に冷却し、SAXS 測定を行った。
【結果】7S および 11S の 0.5%リン酸カリウム緩衝溶液中で測定した SAXS プロファイルには、サブユニット 3 量体が形成する環状構造に基づくピークが見られたが、純水中ではこのピークは見られなかったことから、純水中では環状構造が失われることがわかった。また、塩化ナトリウムを添加すると、7S では塩化ナトリウムの濃度増加に伴い 3 量体 2 つで形成される 6 量体構造が単独の 3 量体構造に解離したが、11S についてはこのような変化は見られなかった。濃度 3%の 7S リン酸緩衝溶液について、種々の温度で熱処理した試料の SAXS 測定を行ったところ、未処理時に見られるサブユニット 3 量体の環状構造に基づくピークが、熱変性によって 60℃付近から徐々に失われ、80℃以上で完全に失われることがわかった。一方、11S は、熱変性の生じる温度が 7S と比較して高く、より安定な構造を形成していた。一方、塩化ナトリウムを 0.4M となるよう添加したリン酸緩衝溶液中では、7S、11S ともに熱変性の影響が生じる温度が塩化ナトリウムを添加しない場合よりも高くなり、塩化ナトリウムの添加が環状構造の安定化をもたらすことがわかった。

Soybean storage protein, glycinin, small-angle X-ray scattering

発表責任者：佐藤信浩（sato.nobuhiro.5u@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3A01a03
講演日時：3 月 27 日 09:52～ センター2 号館 A01 会場

液卵白の予備加熱処理が加熱ゲルの特性に及ぼす影響
Effect of preheating on the heat-induced liquid egg white gel properties
○小山 翔大[1]、岡 大貴[2]、辻井 良政[2]、半田 明弘[3]、高野 克己[4]([1]東京農大院農・農化、[2]東京農大応生・農化、[3]キユーピー株式会社、[4]東京農大)
○Shota KOYAMA[1], Daiki OKA[2], Yoshimasa TSUJII[2], Akihiro HANDA[3], Katsumi TAKANO[4] ([1]Agrichem., Agr., Grad. Sch., Tokyo Univ. Agric., [2]Dept. Agrichem., Fac. Biosci., Tokyo Univ. Agric., [3]Kewpie Corp., [4]Tokyo Univ. Agric.)

【目的】 卵白の主成分はタンパク質(約 10%w/w)で加熱ゲル化性などの加工特性に優れ、食品加工に広く利用される。加熱ゲルはタンパク質の加熱変性および凝集、ネットワーク構造化を経て形成される。従来、加熱ゲルの特性改変を目的とした予備加熱によるタンパク質の構造変化に着目した研究がなされてきた。乾燥卵白の乾熱殺菌による機能改変はその代表例である。一方、溶液状態では、主要タンパク質のオボアルブミン (OVA) の予備加熱によるゲルの特性改変に関する研究が行われてきた。本報告では、液卵白の予備加熱が加熱ゲル物性に与える影響について検討した。

【方法】 試験には採卵 3 日後の鶏卵を使用した。割卵後分離した卵白を均質化したのち、pH を 9.0、タンパク質濃度を 105 mg/mL に調整後、70℃にて 5～120 分加熱し、予備加熱卵白を調製した。予備加熱卵白およびその遠心分離した上澄液を 90℃, 30 分で本加熱し、加熱ゲルを調製し、Tensipressor MyBoyⅡ（タケトモ電機）を用いた破断荷重および破断歪率の測定を行った。予備加熱卵白を可溶性タンパク質量測定および電気泳動に供し、予備加熱により加熱ゲルの特性が変化した要因について考察した。

【結果】 予備加熱した卵白より調製した加熱ゲル（予備加熱ゲル）においては、破断荷重は 5 分間の予備加熱により増加したが、それ以降徐々に減少した。また、破断歪率は予備加熱時間増加に伴い減少傾向を示した。予備加熱卵白を遠心分離し得られた上澄液より調製した加熱ゲルにおいては、破断荷重は予備加熱 60 分間以内で予備加熱ゲルより大きく、破断歪率は加熱 120 分以内で予備加熱ゲルより大きかった。上澄液のタンパク質量に相当する可溶性タンパク質量は 5 分間の予備加熱で顕著に減少し、以降徐々に減少した。電気泳動の結果から、5 分間の予備加熱によりオボトランスフェリン (OT) およびリゾチーム (LY) が凝集し、予備加熱卵白の可溶性タンパク質はオボアルブミン (OVA) が主体であることが認められた。またそれ以上の予備加熱をしても可溶性タンパク質の組成に大きな変化は認められなかった。一方、OVA も予備加熱時間に伴い凝集が進むことが明らかになった。以上より、70℃予備加熱による卵白ゲル物性値の低下は、予備加熱初期では予備加熱で形成された OT と LY の凝集体による本加熱での OVA ネットワークの形成阻害により、後期ではそれに加えて本加熱でネットワークを形成する OVA 量が減少することにより生じると示唆された。

thermal denaturation, ovalbumin, gelation

発表責任者：小山翔大（44518002@nodai.ac.jp）

講演番号：3A01a04
講演日時：3 月 27 日 10:03～ センター2 号館 A01 会場

乳中のカルシウムイオンがヨーグルトカード形成に与える影響
Effect of calcium ion in milk on yogurt curd formation

○寺内 広行[1]、岡 大貴[2]、野口 智弘[3]、高野 克己[2]（[1]東京農大院農・農化、[2]東京農大応生・農化、[3]東京農大応生・食加技セ）
○Hiroyuki TERAUCHI[1], Daiki OKA[2], Tomohiro NOGUCHI[3], Katsumi TAKANO[2] ([1]Agrichem., Agr., Grad. Sch., Tokyo Univ. Agric., [2]Dept. Appl. Biol. chem., Fac. Biosci. Tokyo Univ. Agric., [3]FPC, Fac. Biosci., Tokyo Univ. Agric.)

【目的】　高度の加熱処理を施した乳ほど良好で強固なヨーグルトカードが形成される。高加熱によってカゼインミセル表面に存在するκ-カゼイン（κ-CN）が乳清中のβ-ラクトグロブリン（β-Lg）と SS 結合することでミセルから脱離するが、我々は同現象によってカゼインミセル間の結合が強くなり、その結果カード強度が高くなることを明らかにした[1), 2)]。しかし、乳を加熱することにより、κ-CN の脱離以外にもカルシウムやリンをはじめとするミネラルの形態も変化することから、これらもカード強度を高めるのではないかと推察される。そこで本報告では、乳中ミネラルの加熱がヨーグルトカードの形成性にどのような影響を及ぼすのか検討を行った。
【方法】　本学富士農場(静岡県富士宮市)で搾乳された生乳をクリームセパレーターにて脱脂したものを非加熱脱脂乳とした。これを 80℃、30 分間加熱したものを加熱脱脂乳とした。非加熱脱脂乳および加熱脱脂乳を超遠心分離(33,000g, 20℃, 65 分)に供し、乳清とカゼインミセルを分画した。乳清をさらに限外濾過膜に供し、ミネラル溶液（非加熱・加熱ミネラル）を分画した。両ミネラル溶液中におけるカゼインミセル間の相互作用性を QCM 法にて測定した。また非加熱ミネラル溶液を 80℃で 0～60 分間加熱し、同試料とカゼインミセルを乳中濃度になるように再構成後、グルコノデルタラクトン(GDL)にてヨーグルトカードを調製した。カード強度は圧縮型物性測定機にて破断時の荷重(mN)として求めた。試料中のミネラル濃度は ICP 発光分光分析法、Ca2+濃度はカルシウムイオンメーターにて求めた。
【結果】　QCM 法にてカゼインミセル間の相互作用性を測定したところ、非加熱ミネラルよりも加熱ミネラル溶液中にて相互作用性が上昇した。また、非加熱ミネラル溶液を加熱したところ、全ミネラル量に差異はなかったが、加熱時間が長くなるに従い Ca2+量が低下した。再構成後ヨーグルトカードを調製したところ、カード強度は Ca2+量が低下するに従い上昇した。最も加熱時間の長い 60 分間加熱のミネラル溶液にて調製したヨーグルトは、加熱乳にて調製したヨーグルトに最も近いカード強度を示した。

(1)　日本食品科学工学会第 62 回大会 3Ep10
(2)　日本農芸化学会 2018 年度大会 1B2p02

Casein micelle, structure, mineral

講演番号：3A01a06
講演日時：3 月 27 日 10:35～ センター2 号館 A01 会場

LC-MS/MS ショットガン法による麹カビチーズの網羅的ペプチド解析
Exhaustive analysis of peptides in *Aspergillus* mold-ripened cheese by shotgun LC-MS/MS
○長尾 春那[1]、飯田 季里子[2]、齋藤 伽苗[1,2]、川上 浩[1,2] ([1]共立女大家政、[2]共立女大院)
○Haruna NAGAO[1], Kiriko IIDA[2], Kanae SAITO[1,2], Hiroshi KAWAKAMI[1,2] ([1]Kyoritsu Women's Univ., [2]Kyoritsu Graduate School)

【目的】カビ系チーズ（カマンベール・ブルー等）は、欧州で開発された乳製品製造技術を基盤に *Penicillium* 属のカビを用いて生産される。我々は、日本独自の技術を活用したナチュラルチーズの開発を目指し、国菌である *Aspergillus oryzae* 等のカビに注目した研究を進めている。*Aspergillus* 属のカビは、和食の風味を生み出す様々な調味料の生産に必須の微生物であり、これまでにチーズ製造で使用されてきたカビとは異なる酵素分解特性をもつ可能性がある。そこで、*Aspergillus* 属のカビで製造したチーズの熟成過程における乳タンパク質の加水分解特性を調べるために、LC-MS/MS を用いたショットガン解析で、生成ペプチドを網羅的に明らかにすることを目的に実験を行った。
【方法】チーズ試料は、日本獣医生命科学大学で製造した麹カビチーズ、および市販のカマンベールチーズを用いた。ホモジナイズしたチーズ水溶液を遠心分離で脱脂した後、水層を Oasis PRiME HLB カラムに通した。このチーズ水層画分に尿素、ジチオスレイトールおよびヨードアセトアミドを添加した後、遮光下で撹拌した。さらに、1%トリフルオロ酢酸（TFA）含有酢酸エチルを添加した後、遠心分離で上層を除去し、下層を GL-Tip SDB で脱塩した。0.1%TFA 含有 80%アセトニトリルで溶出した吸着画分を減圧乾固した後、0.1%ギ酸含有 5%アセトニトリルで再溶解し、Millex-GV PVDF でろ過して得たろ液を LC-MS/MS 分析用検体とした。Acclaim PepMap™ Trap カラムおよび NANO HPLC キャピラリーカラムを用いて、質量分析計 Q Exactive™ Plus を接続したダイレクトフローnanoLC システム Easy-nLC 1000™ で分析した。移動相は 0.1%ギ酸／水および 0.1%ギ酸／アセトニトリル、イオン化モードは ESI Positive、測定範囲は MS1（*m/z* 350～1,750）とした。解析ソフト Proteome Discoverer™ 1.4、検索エンジン Mascot およびデータベース Swiss Prot を用いて解析した。
【結果】麹カビチーズおよびカマンベールチーズのいずれにおいても、キモシンおよびプラスミンによる加水分解で生成したペプチドが数多く検出された。麹カビチーズで検出されたペプチドの種類は、熟成期間が長くなるに従って増加し、カマンベールチーズのペプチドよりも多かった。乳タンパク質別に分類すると、β-カゼイン由来のペプチドが最も多く、κ-カゼイン由来のペプチドが最も少なかった。検出されたペプチドを分子量別にみると、1～2.5kDa の範囲のペプチドが最も多かったが、10kDa 以上のものも検出された。これらペプチド断片の N 末端および C 末端は、麹カビおよびスターター乳酸菌に由来するアミノペプチダーゼやカルボキシペプチダーゼで、さらに加水分解を受けたものと考えられた。

cheese, peptide, *Aspergillus*

発表責任者：川上浩（hkawakami@kyoritsu-wu.ac.jp）

講演番号：3A01a07
講演日時：3 月 27 日 10:46～ センター2 号館 A01 会場

甘味タンパク質の全網羅ペプチドライブラリーを用いた“コク味”受容体相互作用領域の解析と高活性ペプチドの創製

Analysis of CaSR-activation region of sweet proteins using a synthetic peptide library

○山本 深月、寺田 祐子、伊藤 圭祐（静県大院・薬食）
○Mizuki YAMAMOTO, Yuko TERADA, Keisuke ITO (Univ. Shizuoka)

【背景・目的】 Calsium-sensing receptor（CaSR）は「基本味を増強し味の厚みと持続性を増す」“コク味”の受容体であり（T. Ohsu 2010 JBC）、我々は新規 CaSR 活性化成分として、甘味タンパク質であるリゾチームおよびソーマチンを見出した（M. Yamamoto 2019 BBRC）。リゾチーム 、ソーマチンによる CaSR 活性化メカニズムの解明は、一般に無味とされているタンパク質の“コク味”機能を理解する上で非常に有用な知見を与えると期待できる。そこで本研究では、これら甘味タンパク質の全網羅ペプチドライブラリーを用いて、CaSR との相互作用領域を解析した。

【方法・結果】リゾチームのアミノ酸配列を全網羅するペプチドライブラリーを合成し、ヒト CaSR/Gα15 共発現細胞を用いて CaSR 応答を解析した。その結果、リゾチーム（EC_{50}=590 μM） よりも 12 倍高活性な orthosteric agonist として CAAKFESNFNTQATN（EC_{50}=49 μM）を見出した。本ペプチドにおいてリゾチームの分子表面に存在する C1、F5、E6、N8、F9 及び Q12 の Ala 置換により CaSR 応答が消失したことから、これらのアミノ酸残基で構成されるリゾチーム領域が CaSR との相互作用に重要である可能性が示唆された。また Ala 置換により、野生型ペプチドの 2 倍、リゾチームと比較して 25 倍高活性なペプチド K4A（EC_{50}=24 μM）が取得された。リゾチームと同様に、ソーマチンのアミノ酸配列を全網羅するペプチドライブラリーを解析した結果、ソーマチン（EC_{50}=71 μM）よりも高活性な positive allosteric modulator として PPTTLAEFSL（EC_{50}=43 μM）を見出した。ソーマチンの分子表面クレフトを形成する本ペプチド領域が CaSR との相互作用に重要である可能性が示唆された。一方、P2A（EC_{50}=29 μM）及び S9A（EC_{50}=19 μM）は野生型ペプチドの 2 倍、ソーマチンと比較して 3 倍高い活性を示した。また P2、S9 を 20 種類のアミノ酸によって置換した結果、野生型ペプチドの 4 倍、ソーマチンと比較して 16 倍高活性な P2W（EC_{50}=5.3 μM）及び S9L（EC_{50}=4.4 μM）を取得できた。

以上の結果より、本研究では、リゾチームおよびソーマチンの両甘味タンパク質において、CaSR を活性化する分子表面ペプチドを見出し、またさらに高活性な改変型ペプチドの創製に成功した。

sweet protein, CaSR, peptide library

発表責任者：伊藤圭祐（sukeito@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：3A01a08
講演日時：3 月 27 日 10:57～ センター2 号館 A01 会場

発芽大豆中のニコチアナミン合成酵素に関する研究

Studies on Nicotianamine synthase from germinated soybeans

○佐々木 瞳、金内 誠（宮城大食産）
○Hitomi SASAKI, Makoto KANAUCHI (Miyagi Univ.)

【背景及び目的】近年、大豆タンパク質による脂質代謝改善効果や血圧上昇抑制効果、イソフラボンによる抗酸化作用など大豆の機能性成分に関する研究が進み、機能性食品にも応用されている。そこで、本研究は大豆の機能性成分の一つである「ニコチアナミン」に着目した。ニコチアナミンは ACE 阻害作用を持つことが多数報告される。そして、ニコチアナミンは高等植物中に存在し、生体内において、S-アデノシルメチオニン合成酵素(SAMS)とニコチアナミン合成酵素(NAS)の 2 つの酵素の働きにより、L-メチオニンから生合成される。

大豆を塩ストレス条件下で発芽させると強い ACE 阻害活性を示すことが報告され、発芽によるニコチアナミン合成酵素の活性化が示唆された。しかし、2 つの合成酵素の詳細な検討に至るものは少ない。そこで本研究は、SAMS 及び NAS の合成酵素の酵素化学的特性を明らかにし、ニコチアナミンの高生産条件について検討を行うこととした。

【方法】試料大豆は国産大豆（2018 年産、トヨマサリ）を用い、滅菌水及び滅菌した 1～5%NaCl 水溶液に浸漬後、発芽させた。大豆中のメチオニン、S-アデノシルメチオニン(SAM)及びニコチアナミン量は LC-MS/MS を用いて定量した。SAMS 活性は、発芽大豆を粉砕して、遠心分離後の上清を粗酵素液とし、L-メチオニン及び ATP を添加し 37℃で反応させた。反応後に残存している ATP を呈色させマイクロプレートで吸光度測定し、ATP の減少量で酵素活性を求めた。NAS 活性は、ニコチアナミン量を LC-MS/MS で測定後、その増加量から算出した。また、酵素精製は定法に従い、硫酸アンモニウムによる塩析後、各種クロマトグラフィー（陰イオン交換クロマトグラフィー及びゲルろ過クロマトグラフィー）に依った。得られた精製酵素は、酵素化学的特性を検討した。

【結果】大豆中のニコチアナミン量及び SAMS 活性測定の結果、塩分濃度 5%で発芽 2 日目の大豆で最大となった。このことより、塩ストレス下における発芽は、合成酵素を活性化させることが示唆された。また、精製後の SAMS の分子量は約 102kDa であり、二量体であると推察された。SAMS の至適温度は 50℃、至適 pH は pH8.0 であり、比較的高温域中性に近い pH で活性が高くなることが明らかとなった。温度安定性においては 30℃までは 80%以上、40℃では 63%の活性を保持していた。また、金属イオンに対しては、Zn 及び Ag で活性が賦活し、N-エチルマレイミド添加で活性が阻害された。シロイヌナズナ由来の SAMS 活性特性の報告とは異なる性質であった。

Nicotianamine tynthase, soybeans, germination

講演番号：3A01a09
講演日時：3 月 27 日 11:08～ センター2 号館 A01 会場

トリプシン阻害活性を有する亜麻仁アルブミンの特性
Characteristics of flaxseed albumin with trypsin inhibitory activity
○山口 勇将[1]、野崎 優司[1]、池ヶ谷 紫苑[1]、二宮 和美[2]、熊谷 仁[2]、熊谷 日登美[1] ([1]日大生資科、[2]共立女子大家政)
○ Yusuke YAMAGUCHI[1], Yushi NOZAKI[1], Shion IKEGAYA[1], Kazumi NINOMIYA[2], Hitoshi KUMAGAI[2], Hitomi KUMAGAI[1] ([1]Nihon Univ., [2]Kyoritsu Women's Univ.)

【目的】
亜麻仁から搾取される亜麻仁油は必須脂肪酸である α-リノレン酸を豊富に含むため、様々な食品に使われている。一方で、搾油後の亜麻仁残渣はそのほとんどが廃棄されており、有効に利用されているとは言い難い。亜麻仁残渣には食物繊維やタンパク質が豊富に含まれるため、それらから有用な機能が見いだせれば亜麻仁残渣の利用価値を高めることができる。我々はこれまでに穀物類の水溶性タンパク質画分であるアルブミンに着目し、様々な機能性成分を見出してきている。例えば、コメおよびソバのアルブミンは血糖値上昇抑制作用を有し、耐熱性の高いタンパク質であることを明らかにしている（Kumagai *et al. J. Agric. Food Chem.* **2016**, 64, 4882−4890. Kumagai *et al. Nutrients* **2018**, 10, 1503−1514.）。これらのアルブミンは無味無臭であり耐熱性と水溶性を併せ持つことから、様々な食品へ利用できる。我々は亜麻仁残渣から得られるアルブミンの機能性の探索と食品利用への可能性を検討し、脱脂された亜麻仁粉末から得られるアルブミンは強いトリプシン阻害活性を有することを既に明らかにしている（日本農芸化学会関東支部 2018 年度大会)。トリプシン阻害剤は水産加工品の物性改良に利用できると期待されている。本研究では、亜麻仁残渣から見出されたトリプシンインヒビターの機能特性を解明し、その食品への利用を検討する。
【方法】
脱脂された亜麻仁残渣の粉末を NaCl 水溶液中で撹拌し、遠心分離後に上清を回収し、硫安分画によりアルブミンとグロブリンを含む画分を得た。これを水に対して透析し、水溶性画分であるアルブミンを得た。アルブミン画分中のタンパク質の分子量を SDS-PAGE により評価した。トリプシンに対する阻害活性は、トリプシンにより N^{α}-benzoyl-DL-arginine-*p*-nitroanilide から生じる 405 nm に吸収を持つ *p*-nitroaniline の吸光度により評価した。さらに、アルブミン画分を加熱条件下で処理したのちにトリプシン阻害活性を測定することで熱耐性を検討した。このとき比較対象として、既にトリプシン阻害活性を有することが報告されている大豆グロブリンを用いた。
【結果と考察】
SDS-PAGE より、亜麻仁から得られたアルブミン画分の主要なタンパク質は 6-10 kDa であった。アルブミン画分はウシ膵臓由来トリプシンに対して阻害活性を示し、その熱耐性は、大豆グロブリンよりも高いことが明らかになった。

Flaxseed, Albumin, Trypsin inhibitor

講演番号：3A01p01
講演日時：3 月 27 日 13:50～ センター2 号館 A01 会場

醸造工程中に失われる香りから見出されたビールらしさに寄与する香気成分
The lost flavor compounds which was found during brewing processes:New contributors to a nuance of real beer flavor.
○成瀬 史子[1]、二関 倫太郎[1]、蛸井 潔[1]、原田 紘祐[2]、飛田 康貴[2]、堀内 政宏[2]、清崎 俊博[1]、野村 真弘[1] ([1]サッポロビール株式会社、[2]高田香料株式会社)
○ Fumiko Naruse[1], Rintaro Ninoseki[1], Kiyoshi Takoi[1], Kosuke Harada[2], Yasutaka Tobita[2], Masahiro Horiuchi[2], Toshihiro Kiyosaki[1], Masahiro Nomura[1] ([1]SAPPORO BREWERIES LTD., [2]Takata Koryo Co.,Ltd.)

【背景、目的】
ノンアルコールビールテイスト飲料市場は消費者の健康志向を背景に成長を続けており、最近ではアルコール 0.00%に加えて特定の機能が付与された特定保健用食品や機能性表示食品などの新商品も続々と発売されている。一方で、ビール代替飲料としては本物のビールとの香味上の違いが依然存在しており、さらなる改良の余地がある。
ノンアルコールビールテイスト飲料の香味を決定付けている原材料の一つに香料があるが、ビールの醸造において生成する複雑な香気成分のマトリクスを完全に再現することは非常に難しいのが現状である。そこで今回、香料開発の元となるビール醸造工程への新たなアプローチを行ない、より「ビールらしい」香料を開発するための知見を得ることを目的とした。
【方法、結果】
従来のビール香料は、ビールの製品（例えば市販のスタンダードビール）に含まれる香気成分を分析し、その結果をもとに香料会社の持つ独自のノウハウも併せて設計していた。今回は新たなアプローチとして、これまで見過ごされていたような香気成分に着目するべく、製品だけでなく、ビールの醸造工程（仕込、発酵、貯酒）から、製品、さらに製品の保存で生成した香気成分をサンプリングし、分析した。醸造工程中の香気成分については、各工程（仕込、発酵、貯酒)、製品の液体サンプルからの抽出に加え、仕込～貯酒の間に工程外へ揮散していく香気成分をキャニスターで捕集・サンプリングした。それらの香気成分を分析し、GC-O 分析により検出された特徴的な約 50 成分にまず着目した。さらにこの 50 成分を製品から検出された成分と、製品からは検出されなかった成分に分け、前者から従来型モデル香料を作成した。
この従来型モデル香料を対照として、製品からは検出されなかった成分を各々単独で添加した試験飲料サンプルを作成し、8 名の訓練されたパネルにより「麦芽」「穀物感」「ホップ感」「発酵・熟成感」「味の厚み」「キレ」「ビールらしさ」の 6 項目について官能評価を実施した。その結果、12 成分において「ビールらしさ」に寄与する何らかの効果が確認された。そこでこの従来型モデル香料にこの 12 成分を加えた試験香料を作成し、対照の香料を用いたサンプルと官能評価で比較した結果、評価項目いずれにおいてもモデル香料単独よりスコアが高くなるという結果を得ることができた。今回の手法を活用することで、より本物に近いノンアルコールビールを開発することができると期待される。

flavor compounds, brewing processes, beer flavor

発表責任者：成瀬史子（fumiko.naruse@sapporobeer.co.jp）

講演番号：3A01p02
講演日時：3 月 27 日 14:01～ センター2 号館 A01 会場

本格麦焼酎のフルーティーな香りに 4-Ethylguaiacol が及ぼす影響
Effect of 4-Ethylguaiacol on fruity aroma of barley shochu
○熊丸 陽奈[1]、丸山 一樹[1]、滝沢 隆一[2]、金子 剛[1]、土屋 陽一[1]([1]サッポロホールディングス（株）、[2]サッポロビール（株））
○ Haruna Kumamaru[1], Kazuki Maruyama[1], Ryuuichi Takizawa[2], Takeshi Kaneko[1], Yoichi Tsuchiya[1] ([1]SAPPORO HOLDINGS LTD., [2]SAPPORO BREWERIES LTD.)

【背景・目的】
単式蒸留焼酎である本格焼酎は、原料由来の独特な風味を持っており、業界では消費者嗜好にあった焼酎の開発・研究が進められてきた。中でも麦焼酎は、他原料と比較して癖のないすっきりした味わいが特徴である。本格麦焼酎である「和ら麦」は、福岡県久留米市田主丸町にある楽丸（たのしまる）酒造で製造され、りんごやバナナを思わせるフルーティーな香りの特徴がある。しかし、「和ら麦」の香気形成に関与する成分の詳細は明らかになっていない。「和ら麦」の香りについて明らかにすることは、「和ら麦」の品質や魅力を理解する上で重要であると考えられる。演者らは日本食品科学工学会第 66 回大会において、におい嗅ぎ分析により明らかとなった「和ら麦」の香気寄与成分について報告した。本研究では、引き続き「和ら麦」の香りの特徴に関与する香気成分の解明を目的とし、「和ら麦」の香りの再構成を試みた。また、オミッション試験により、香気寄与成分が「和ら麦」の香りに及ぼす影響について調査を行った。
【方法】
「和ら麦」と市販の麦焼酎 2 種について①Headspace Dilution Analysis（HDA）法および②Aroma Extract Dilution Analysis（AEDA）法によって香気寄与成分を探索し、GC-MS にて同定・定量した。また、各成分の閾値を測定し、Odor Active Value（OAV）を算出した。再構成試験は各成分の OAV をもとに、「和ら麦」の香気寄与成分を「和ら麦」に含まれる濃度と同じ濃度で添加した再構成液を調製し、官能評価を実施した。オミッション試験は、再構成液から特定の香気成分を除いた試料を調製し、官能評価を実施した。
【結果】
既報で明らかとなった「和ら麦」の香気寄与成分（エステル類、アルコール類、Diacetyl、4-Ethylguaiacol（4EG））を添加した再構成液は、「和ら麦」のフルーティーな香気特徴をよく再現できていた。また、オミッション試験では、再構成液からクローブ・薬品様の香気を有する 4EG を除くと、フルーティーな香気特徴が有意に減少する傾向が見られた。一般に、4EG のようなフェノール系化合物の香りは焼酎においてネガティブな香りとして評価される。しかし、本研究においては、4EG はフルーティーな香りをエンハンスする効果があり、「和ら麦」の香気形成に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

barley shochu, 4-ethylguaiacol, AEDA

発表責任者：熊丸　陽奈（Haruna.Kumamaru@sapporoholdings.co.jp）

講演番号：3A01p03
講演日時：3 月 27 日 14:12～ センター2 号館 A01 会場

キムチ製品で発生するワサビ様刺激臭の原因成分探索

Identification of volatile compounds responsible for wasabi-like pungent odor in kimchi products

○岩佐 悟[1]、飛田 啓輔[1]、冨田 理[2]、池田 未果[3]([1]茨城県産業技術イノベーションセンター、[2]農研機構食品研究部門、[3]東海漬物(株)漬物機能研究所)
○Satoru IWASA[1], Keisuke TOBITA[1], Satoru TOMITA[2], MIKA IKEDA[3] ([1]Industrial Technology Innovation Center Of Ibaraki Prefecture, [2]Food Res. Inst., NARO, [3]Research Institute of Pickles Function, Tokai Pickling Co.Ltd.)

【背景と目的】

キムチは白菜などの野菜を塩，トウガラシ，魚介塩辛などと共に漬け込んだ食品であり，我が国の漬物産業の中で最も生産量が多い。キムチ製品では，ツンとしたワサビ様の刺激臭が発生することがあるが，その原因成分は国内向けのキムチでは特定されてこなかった。そこで本研究ではワサビ様刺激臭の原因成分の探索を行ったので報告する。

【方法】

製造方法が同じで生産工場の異なる 4 つのキムチを，5 月から翌年 2 月まで毎月サンプリングし，GC-O/MS による香気成分の探索，食味試験による各サンプルのワサビ様刺激臭の有無の評価，およびワサビ様刺激臭の有無の結果に寄与する香気成分の選抜を OPLS 判別分析により行った。

【結果と考察】

GC-O/MS 分析の結果，43 成分からにおいを感知した。次に，これら成分の GC/MS 検出値と，ワサビ様刺激臭の有無の結果について OPLS 判別分析を行った結果，4 成分の寄与が大きいことが示された。さらに 4 成分について標品のにおいを評価した結果， 3-Butenyl isothiocyanate と 4-Pentenyl isothiocyanate がワサビ様刺激臭の主原因であると考えられた。ワサビ様刺激臭有りと無しにおける検出値の比較を行うと，3-Butenyl isothiocyanate で 2.1 倍，4-Pentenyl isothiocyanate で 1.5 倍の差があった。これら成分は白菜裁断時に生成する香気成分であることが報告されており，ワサビ様刺激臭は，原料白菜に由来する香気成分のバランスが崩れることで発生するものと考えられた。

そこで，キムチを構成する白菜について，主脈（中肋）と葉身部（側脈，細脈等を含む）に分けて 3-Butenyl isothiocyanate と 4-Pentenyl isothiocyanate の濃度を定量分析した結果，両成分とも主脈に比べて葉身部において 2 倍以上高く検出された。これらの結果から，ワサビ様刺激臭の原因成分は白菜の葉身部に多く分布していることが分かった。

pungent odor, kimchi, isothiocyanate

講演番号：3A01p04
講演日時：3 月 27 日 14:23～ センター2 号館 A01 会場

発酵乳のフレーバーリリース分析モデル系構築と継時的な定量分析について

The successive and quantitative analysis system for the flavor release by the fermented milk model.

○西川 卓、安永 元樹、佐野 恵右（曽田香料）
○Suguru Nishikawa, Motoki Yasunaga, Keisuke Sano (Soda aromatic Co.,Ltd.)

【目的】我々が普段感じている食品の香りには、直接鼻で嗅いだオルソネーザルアロマと喫食後に喉から鼻に抜けて香るレトロネーザルアロマの 2 種類があり、喫食時に感じるおいしさにはレトロネーザルアロマが大きく寄与している。これまでヒト鼻腔内呼気の分析は、呼気サンプラーを鼻腔に挿入して測定するため被験者への負担が大きいことが課題であった。そこで当社ではヒトのレトロネーザルアロマを再現可能な非侵襲性の「DAS™（Drinking Aroma Simulator）」を開発し、これまでに各種飲料のフレーバーリリース分析に活用してきた。DAS™ は喉元から食道の構造をモデル化した装置であり、液だまりに溜めた飲料を重力によってスリットから均一に流して香気を拡散させることを特徴としている。しかし粘性のある食品はスリットから均一に流れず、装置内に香気が十分拡散ができないことが問題となっていた。そこで本研究では DAS™ を粘性のある食品に応用できるよう改良して、ヒトのレトロネーザルアロマの再現を試みた。

【方法】DAS™ のスリットを無くして、食道部分にワイパーを備えた回転部を設置した（以降 DAS-Ⅱと表記する）。粘性のある食品として発酵乳を用いたが、市販発酵乳は生菌タイプのために乳酸菌が産生する香気成分量が変化する。そのため、各種乳製品等を混合して栄養成分および粘度を近似させた発酵臭を含まない「ヨーグルトモデル」を調製して、これにジアセチルまたはエタノールを添加したものを測定試料に用いることとした。この時 DAS-Ⅱの下部から窒素ガスを流入して上部へ抜ける香気成分（フレーバーリリース）を PTR-TOF（プロトン移動反応質量分析計）に導入することで経時的に定量分析した。

【結果】ジアセチルを含むヨーグルトモデルについてフレーバーリリースを測定した結果、ヒトのレトロネーザルアロマと同様のリリース挙動が見られた。また測定間の誤差について、分散分析の結果ヒト試験では相対的なばらつきが見られたが、DAS-Ⅱを用いることでばらつきが改善されたことから、本法は再現性の高い分析手法であることが判明した。またエタノールを追添加することでレトロネーザルアロマ中のジアセチルの濃度が低くなる傾向が見られたことから、同時に添加される溶剤などの影響で香気成分のフレーバーリリースが変わる可能性が示唆された。

DAS™ Drinking Aroma Simulator, PTR-TOF, fermented milk model

発表責任者：西川　卓（suguru_nishikawa@soda.toray.co.jp）

講演番号：3A01p05
講演日時：3 月 27 日 14:34～ センター2 号館 A01 会場

各種抗酸化物の併用によるレモングラス香気成分の劣化抑制効果の解析

The combination effect of various antioxidants on the degradation of aroma components from lemongrass

○宮崎 真緒[1]、太田 香穂[1,2]、宮野 敬之[2]、小林 弘司[1]、石川 洋哉[1] ([1]福岡女子大院人栄、[2]株式会社 クマモト敬和)
○Mao Miyazaki[1], Kaho Ohta[1,2], Takayuki Miyano[2], Hiroshi Kobayashi[1], Hiroya Ishikawa[1] ([1]Fukuoka women’s Univ. Health, [2]KUMAMOTO KEIWA CORPORATION)

【目的】

ラジカルによる食品の香気劣化は、食品品質に大きなダメージを与える。当研究室では、各種抗酸化物を用いて、食品の香り保持に関わる研究を進めている。今回は、ハーブ類レモングラスの香り劣化抑制を目的として、各種抗酸化物の適用を試みた。なお、本研究では各種抗酸化物を単独で使用した場合の効果を検討するとともに、2 種の抗酸化物の併用を試み、両者の相乗効果の発現挙動についても検討を行った。

【試料及び方法】

抗酸化物として、ロスマリン酸、カフェ酸、α-トコフェロール等の化合物を用いた。各抗酸化物を単一あるいは 2 成分併用下で、レモングラス精油エマルジョンに対して AAPH を添加し、37℃・5 時間反応させた。生成した揮発性成分は固相マイクロ抽出法（SPME）法により捕集し、超高速 GC（電子嗅覚ノーズ HeraclesⅡ）に供した。超高速 GC では MXT-5・MXT-WAX カラム（並列配置）を用いた。抗酸化物 2 成分の相互作用解析は median effect analysis を用いて行った。得られた Median effect plot の結果に基づいて、Combination Index (CI) 値を算出し、相乗(CI＜1)、相加(CI≒1)、相殺効果(1＞CI)を判定した。

【結果】

まず、各種抗酸化物を単独で用いた際の香気成分劣化抑制挙動を比較した。その結果、レモングラスの主要香気成分である beta-Myrcene、Neral、Geranial、Geraniol 等に対して、ロスマリン酸が高い劣化抑制効果を示すことが判明した。また、カフェ酸、α－トコフェロール、クロロゲン酸等においても劣化抑制効果が確認されたが、Neral など一部の香気成分の劣化抑制挙動が異なることが明らかになった。なお、α－トコフェロールの抑制効果は上記と比較して比較的弱いことが明らかになった。続いて、ロスマリン酸と各種抗酸化物の 2 成分併用効果を検証した。その結果、単独では劣化の抑制効果が弱かった香気成分に対しても、併用時には効率的に抑制可能であることが示された。ロスマリン酸とクロロゲン酸の併用時には、いずれの条件下でも香気成分の抑制効果において高い相乗効果が認められた（CI 値、0.4～0.9）。また、α－トコフェロールとの併用においても一定の相乗効果の発現が確認され、2 成分の併用がレモングラス香気の保持に有効である可能性が示唆された。

antioxidant, flavor, GC

発表責任者：石川洋哉（ishikawa@fwu.ac.jp）

講演番号：3A01p06
講演日時：3 月 27 日 14:45～ センター2 号館 A01 会場

グレードの異なるマダガスカル産バニラビーンズより調製したエキスの香気分析
Aroma analysis of extracts prepared from different grades of Madagascar vanilla beans

○小林 宏成、宮沢 紀雄、大西 俊朗、西井 郁子、長野 和種、石崎 享（長谷川香料（株））
○ Hironari KOBAYASHI, Norio MIYAZAWA, Toshiro ONISHI, Fumiko NISHII, Kazutane NAGANO, Susumu ISHIZAKI (T.HASEGAWA CO.,LTD.)

1. 緒言

バニラビーンズは水分含量（black、red など）や形状（whole、split など）から品質グレードが分類される。グレードが異なることにより香気特性も異なるため、それらより調製したバニラエキスも異なる香気を有する。そこでグレードの異なるマダガスカル産バニラビーンズ 4 種（①black whole、②black split、 ③red whole、④red split）より調製したバニラエキスの香気分析を行い、それぞれの香気特性を明らかにすることを試みた。

2. 香気濃縮物の調製

バニラエキスをジエチルエーテルにて抽出後、抽出液を減圧蒸留し、回収した留出液を濃縮することで香気濃縮物を得た。得られた濃縮物を GC-MS/FID 分析、並びに GC-O (AEDA※ : Aroma Extract Dilution Analysis) に供した。
※ 濃縮物を 3^n 倍希釈し GC-O を実施

3. 結果

1) 各エキスの特徴成分

各香気濃縮物の GC-MS/FID 分析の結果、試料間において存在量が異なる成分があることが明らかになった。Guaiacol を例に挙げると、存在量は③red whole、①black whole、④red split、②black split の順に多かった。検出されたほとんどの成分はいずれのエキスからも確認されたことから、上記のような存在量の違いが各エキスの香気特性に寄与する要素の 1 つとして示唆された。

2) 各エキスにおける香気貢献度の高い成分

AEDA の結果、全ての試料において Vanillin が最も高い FD (Flavor Dilution) 値を示した。その他 3-Phenylpropanoic acid, Guaiacol, *p*-Cresol, Phenylacetic acid, Eugenol などはいずれの試料からも検知されたものの、各エキスについて FD 値は異なった。いずれの成分もバニラビーンズの特徴香気として知られている化合物であるが、これらの香気貢献度の違いが各エキスの香気特性に寄与していることが示唆された。

Vanilla extract, Madagascar vanilla beans, aroma extract dilution analysis

発表責任者：小林宏成（hironari_kobayashi@t-hasegawa.co.jp）

講演番号：3A01p07
講演日時：3 月 27 日 15:06～ センター2 号館 A01 会場

加熱によるスイカ果汁の香気成分の変化
Volatile changes in heated watermelon juice
武者 采輝[1]、太田 智弥[1]、佐藤 寛人[2]、村山 哲也[1]、○網干 貴子[1] ([1]山形大農、[2]山形農総研)
Saiki MUSYA[1], Tomoya OHTA[1], Hiroto SATO[2], Tetsuya MURAYAMA[1], ○Takako ABOSHI[1]
([1]Yamagata Univ., [2]Yamagata Integrated Agricultural Research Center)

【目的】山形県はスイカの産地であるが、規格外品の有効活用が長年の課題となっている。スイカの加工品開発を困難としている原因の１つは、加熱加工の過程で発生する不快臭である。そこで本研究では、加熱による果汁香気成分の変化を調査し、不快臭の原因物質とその発生機構の解明を目的とした。

【方法および結果】スイカ（祭りばやし７７７）は夏季に収穫されたものを用い、剝皮、カット後、ジューサーで果汁を搾汁し、冷凍保存した。冷凍果汁は実験直前に解凍し、100℃で 30 分間加熱後に香気成分を SPME で捕集した。その後、におい嗅ぎ GCMS で分析し、加熱による香気成分の変化を調べた。非加熱果汁からは(*E*)-2-nonenal や(*E*,*Z*)-2,6-nonadienal など油っぽい瓜臭や青臭さを感じる成分が検出された。これらの成分に加えて、加熱果汁からはココナッツのような甘い香りのするピークが検出された。この成分はγ-nonalactone であった。本成分は脂肪酸の酸化などにより生じると推測された（図１）。

においかぎ GCMS による分析では、匂いがするのにも関らずピークが検出されない部分があったため、果汁の香気成分をペンタンで抽出し、抽出液をシリカゲルカラムで 10 本のフラクションに分画した。このうち、加熱処理果汁に特徴的な匂いのするフラクションを窒素ガスで濃縮し、GCMS で分析した結果、揮発性含硫化合物を検出した。揮発性含硫化合物は果汁中の含硫アミノ酸が加熱により変化したものであり、不快臭の一因と考えられた。

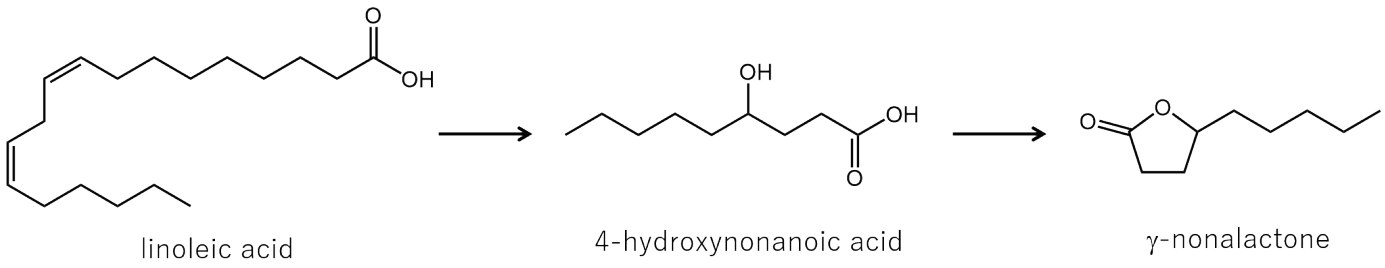


図１．γ-Nonalactone の予想生成経路

watermelon, heat, volatile

講演番号：3A01p08
講演日時：3 月 27 日 15:17～ センター2 号館 A01 会場

醤油米菓咀嚼中の香気特徴研究

Study on characteristic aroma compounds during mastication of soy sauce-flavored rice crackers

○川村 知世[1]、竹井 亮[1]、鷲尾 英明[1]、小林 史幸[2]、小竹 佐知子[2] ([1]亀田製菓（株)、[2]日本獣医生命科学大学)
○Tomoyo KAWAMURA[1], Ryo TAKEI[1], Hideaki WASHIO[1], Fumiyuki KOBAYASHI[2], Sachiko ODAKE[2] ([1]KAMEDA SEIKA CO., LTD., [2]Nippon Veterinary and Life Science Unicersity)

【背景・目的】
香りは食品の美味しさに欠かせない成分であり、鼻から直接嗅ぐ「オルソネーザルアロマ」と咀嚼中に発生し口腔から鼻に抜ける「レトロネーザルアロマ」がある。後者は美味しさに深く関わっているとされるが、未解明な点も多くあり、近年研究が増えてきている。米菓はかたさを特徴とする食品であり、咀嚼嚥下過程において、気泡構造を持つ状態から咀嚼によって大きく物性変化し嚥下に至るため、レトロネーザルアロマも特徴的なものと考えられる。米菓の特徴香気を把握し咀嚼中の風味変化を捉える事で、美味しさの要因把握につながると考えられるが、米菓における香気成分研究は 1960～70 年代に報告されている数報のみであり、咀嚼中の香気成分は明確になっていない。また伝統的調味料の一つである醤油の香気研究は数多くなされているが、加熱乾燥工程を経た醤油米菓のような食品についての知見は少ない。一方でレトロネーザルアロマの測定は咀嚼頻度や唾液分泌量などパネリストの体調変化に大きく影響を受けるため、それらの要因を制御できる咀嚼模擬装置の開発が進んでいる。そこで本研究では、GC/MS および咀嚼模擬装置を用いて醤油米菓の香気特徴を明らかにすることを目的とした。
【方法】
オルソネーザルアロマの分析として、米菓を粉砕し、含まれる香気成分を固相マイクロ抽出（SPME）法による GC/MS にて分析（GC 測定①）を行った。また連続蒸練抽出（SDE）法により香気成分を抽出し、Aroma Extract Dilution Analysis（AEDA）法により Flavor Dilution factor（FD ファクター）を求めた。レトロネーザルアロマの分析として、米菓粉砕物に水を添加し、咀嚼物を模したものの GC/MS 分析（GC 測定②）と、咀嚼模擬装置を用いた人工咀嚼中の香気成分分析を行った。
【結果・考察】
GC/MS で見られなかった化合物が咀嚼模擬装置測定において検出された。これは、人工唾液を添加したのち破砕する瞬間を捉えるという咀嚼模擬装置の特徴が反映された結果であると考えられる。また、GC 測定①と GC 測定②においてもクロマトグラフに変化が見られ、測定サンプルが水分を含むことによって香気成分のリリース挙動が変わったと考えられた。それぞれの分析手法の結果は、醤油米菓の香りを多面的にとらえる事に有用であり、ヒトが醤油米菓を食べる際に感じているおいしさの要因を理解することにつながると考えられる。

Mastication simulator, retoronasal, aroma release

講演番号：3A01p09
講演日時：3 月 27 日 15:28～ センター2 号館 A01 会場

小麦生地中の揮発性成分生成における LOX アイソザイムの影響
The effect of LOX isozymes for the formation of the volatile compounds in wheat dough
○成澤 朋之[1,2]、酒井 孝一朗[2]、仲島 日出男[1]、山下 治之[2]、杉山 健二郎[3]、乙部 千雅子[4]、椎葉 究[5]、山田 昌治[3]、朝倉 富子[2]([1]埼玉県産技セ北部、[2]東大院農応生化、[3]工学院大先進工応化、[4]農研機構作物研、[5]東京電機大理工)
○ Tomoyuki Narisawa[1,2], Koichiro Sakai[2], Hideo Nakajima[1], Haruyuki Yamashita[2], Kenjiro Sugiyama[3], Chikako Otobe[4], Kiwamu Shiiba[5], Masaharu Yamada[3], Tomiko Asakura[2] ([1]SAITEC NL, [2]Univ. Tokyo, [3]Kogakuin Univ., [4]NARO, [5]Tokyo Denki Univ.)

【背景】国産麺用小麦として長年栽培されてきた農林 61 号は，後継品種さとのそらや外国産小麦 ASW にはない独特な風味があるとの評価を受けてきた。一般的に農林 61 号は製粉時の皮離れが悪く，小麦種皮近傍成分の混入が多いため，独特な風味が出るものと考えられてきた。我々は，ゆで麺の持つ揮発性成分がリポキシゲナーゼ(LOX)による不飽和脂肪酸酸化生成物によるものであることを見出し、農林 61 号においてこれらの揮発成分量が多く，LOX 活性が高いことを示した[1)]。しかしながら，同程度の LOX 活性を持つ小麦粉間でも揮発性成分のプロファイルが異なるケースが見られ，LOX アイソザイム組成の違いが揮発性成分プロファイルへ影響していることが示唆された。そこで，LOX の生成物である過酸化脂肪酸の異性体を解析することで，小麦粉生地の揮発性成分生成における品種間差に対する LOX アイソザイム組成の違いの影響を推定した。
【実験】小麦試料については，(国研)農研機構 次世代作物開発研究センターの実験圃場で栽培された小麦試料(農林 61 号、さとのそら、あやひかり、関東 139 号)を用いた。ブラベンダー社製テストミルを用い，低灰分粉の A 粉およびふすまを得た。ふすまから得た LOX 抽出液を用い，リノール酸およびα-リノレン酸基質と反応させ,生成される過酸化脂肪酸の構造異性体組成を HPLC にて分析した。また，A 粉を用いて小麦生地を調製し，GC/MS を用いて揮発性成分分析を行った。
【結果】過酸化脂肪酸の分析の結果，農林 61 号では 9-過酸化リノール酸(HPODE)や 9-過酸化リノレン酸(HPOTrE)の生成割合が 4 種の小麦粉試料の中で最も高いことが確認された。小麦 LOX アイソザイムのうち，LOX-1 が 13-HPODE や 13-HPOTrE を，LOX-3 が 9-HPODE や 9-HPOTrE を主に生成する。このことから，農林 61 号では LOX-3 の割合が高いと推定された。A 粉から調製した生地について GC/MS を用いて揮発性成分の分析をしたところ，農林 61 号において多くのアルデヒド類やケトン類，フラン類の寄与が高かった。これらの揮発性成分は，LOX 活性や 9-HPODE や 9-HPOTrE の割合と正の相関を示した。このことから，これらの揮発性成分生成に対して LOX アイソザイムの中でも LOX-3 の寄与が高いことが示唆された。特に農林 61 号では，C_9～C_{10} の長鎖不飽和アルデヒド類が寄与していたことから，総 LOX 活性の高さだけでなく，LOX-3 の割合の高さが農林 61 号において評価されてきた独特な風味の形成要因であることが示唆された。

【参考文献】1) Narisawa *et al.*, (2019) *J. Cereal Sci.* 87, 231-238.

Wheat, Volatile compound, LOX isozyme

発表責任者：成澤　朋之（narisawa-t@saitama-itcn.jp）

講演番号：3A01p10
講演日時：3 月 27 日 15:39～ センター2 号館 A01 会場

油脂劣化による不快臭に応答する嗅覚受容体の同定と抑制香料の探索

Identification of olfactory receptors that respond to unpleasant odors caused by fat and oil degradation and search for inhibitory aroma ingredients

○寺田 育生、村井 正人、三木 あずさ、三原 尚、小林 剛、佐野 昇、石田 賢哉、星野 邦秀（高砂香料工業株式会社 研究開発本部）
○Ikuo TERADA, Masato MURAI, Azusa MIKI, Hisashi MIHARA, Tsuyoshi KOBAYASHI, Noboru SANO, Kenya ISHIDA, Kunihide HOSHINO (Takasago International Corporation, Corporate R&D Division)

【目的】

油脂の劣化によって生じる匂いは、食品においてオフフレーバーとして、身体においては不快な体臭として好ましくないとされており、これらの匂いの抑制方法が望まれている。不快な匂いを抑制する方法としては、他の好ましい匂いを加えることによって感じにくくさせる、感覚的消臭法が挙げられる。近年では、悪臭に応答する嗅覚受容体を発現する細胞を用いて、受容体応答を抑制する匂い物質を探索するという手法が、感覚的消臭効果を示す香料を開発するための効率的かつ客観的な手法として注目されている。そこで、油脂の劣化によって生じる匂い物質に応答する嗅覚受容体を同定し、さらにその匂いを抑制する香料を探索することとした。

【方法及び結果】

はじめに、油脂の劣化に起因する悪臭成分に応答する嗅覚受容体を探索した。HEK293T 細胞に約 400 種のヒト嗅覚受容体を、それぞれリポフェクション法により一過的に発現させた。悪臭成分を培地に溶解して細胞に 3 時間の暴露を行った後に、受容体応答をルシフェラーゼアッセイ法により発光検出した。その結果、食用油脂の劣化臭であり加齢臭としても知られる(*E*)-2-nonenal、(*E*)-2-octenal、および同じく食用油脂の劣化臭で金属臭、腋臭成分でもある 1-octen-3-one、1,5-octadien-3-one が共通してヒト嗅覚受容体 OR2C1 を活性化することが判明した。

次に OR2C1 の(*E*)-2-nonenal への応答を低減させる化合物を、数百種類の香料原料からスクリーニングした。その結果、幾つかの化合物が応答抑制効果を示した。これらの化合物は、OR2C1 の 1-octen-3-one への応答も同様に低減させた。

また、これらの化合物は、官能評価においても(*E*)-2-nonenal、1-octen-3-one および 1,5-octadien-3-one の匂いを抑制する傾向を示した。これらの化合物は油脂の劣化によるオフフレーバーや体臭のマスキング香料としての活用が期待される。

olfactory receptor, malodor/off-flavor, masking

発表責任者：寺田育生（ikuo_terada@takasago.com）

講演番号：3A01p11
講演日時：3 月 27 日 15:50～ センター2 号館 A01 会場

大豆の青臭さの感知に関わるヒト嗅覚受容体の特定

Analyzing human olfactory receptors to identify ORs activated by n-hexanal.

○伊藤 圭祐、佐藤 茅乃、土屋 さくら、小塚 康平、中野 祥吾、伊藤 創平、寺田 祐子（静県大院・薬食）
○Keisuke ITO, Kayano SATO, Sakura TSUCHIYA, Kohei KOZUKA, Shogo NAKANO, Sohei ITO, Yuko TERADA (Univ. Shizuoka)

【背景・目的】 世界的な健康志向の高まりとともに植物性タンパク質の需要が増える中、タンパク質資源として特に重要な大豆の利用拡大には、しばしば青臭さの低減（マスキング）が課題となっている。青臭さの原因物質として脂質の酸化によって生じる n-ヘキサナールが特定されており、脂質の酸化を抑制するためにリポキシゲナーゼ欠損大豆が開発されている。一方、近年では匂いの感知に関わるヒト嗅覚受容体（olfactory receptors）の解析により、受容体応答を指標としたマスキング技術も開発可能である。そこで本研究では、大豆の青臭さのマスキング技術開発を目的として、389 種類のヒト嗅覚受容体から n-ヘキサナール応答受容体を探索した。

【方法・結果 】 ヒト嗅覚受容体の応答に寄与することが報告されているアクセサリータンパク質を安定的に共発現する細胞を作製し、さらに同細胞に 389 種類の最適化ヒト嗅覚受容体人工遺伝子と cAMP 濃度変化検出用のバイオセンサー遺伝子を導入することで、各受容体の応答評価システムを構築した。代表的なヒト嗅覚受容体として OR1A1 の応答を検討した結果、既知アゴニストである (+)-carvone の応答が成功裏に検出され、EC_{50} 値は 25 μM と算出された。続いて、立体構造既知の GPCR の中で最もヒト嗅覚受容体とのアミノ酸配列相同性が高いアデノシン A2a 受容体をテンプレートとして、OR1A1 のシミュレーション構造モデルを構築した。A2a 構造と重ね合わせることで基質結合ポケット構成アミノ酸残基を抽出し、それらのアミノ酸残基のみを使用した配列アライメントの結果に基づき、独自の分子系統樹を作成した。系統樹上で分類された 17 グループからそれぞれ代表的なヒト嗅覚受容体を選抜し、n-ヘキサナールに対する応答を評価した結果、明確な応答を示す受容体として OR2W1 を見出した。n-ヘキサナールによる濃度依存的な応答において、EC_{50} 値は 100 μM、応答閾値は 30 μM と算出された。これらの値は官能評価による n-ヘキサナールの検出閾値（1～10 μM）と近似していたことから（PLoS One 2017）、OR2W1 が n-ヘキサナールの匂い感知に関わる受容体であることが示唆された。本研究で見出したヒト嗅覚受容体 OR2W1 の応答評価系を用いることで、大豆の青臭さのマスキング技術開発が期待できる。

olfactory receptor, soybean, n-hexanal

発表責任者：伊藤圭祐（sukeito@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：3A01p12
講演日時：3 月 27 日 16:01～ センター2 号館 A01 会場

ヒト味覚・嗅覚受容体応答の統合的理解のための新規な網羅的受容体解析法の開発
Development of a microraft array-based comprehensive analysis system to identify taste and olfactory receptors
○土屋 さくら、松山 南、伊藤 豊実、寺田 祐子、伊藤 圭祐（静県大院・薬食）
○Sakura TSUCHIYA, Minami MATSUYAMA, Toyomi ITO, Yuko TERADA, Keisuke ITO (Univ. Shizuoka)

【背景・目的】 味と香りは食品のおいしさを決定づける重要な要素であり、これらを感知するためにヒトは 400 種類以上の味覚・嗅覚受容体を有している。食品成分による全受容体応答の統合的理解は食品のおいしさを分子レベルで制御するために不可欠である。しかし、一つの成分が複数の受容体を活性化するなど、食品成分と受容体の対応パターンは膨大な数存在することから、その全貌はほとんど解明されていない。この課題の解決を目指し、本研究では、422 種類のヒト味覚・嗅覚受容体発現細胞とその応答評価系、また単一細胞分取ツール“マイクロラフトアレイ”を活用することで、特定の食品成分に応答するヒト味覚・嗅覚受容体を迅速・簡便に特定できる新規な網羅的受容体解析法を開発した。

【方法・結果】 422 種類のヒト味覚・嗅覚受容体の最適化人工遺伝子を用いて各受容体発現細胞を構築した。また GPCR 型、イオンチャネル型に関わらず味覚・嗅覚受容体応答に伴って惹起される細胞内セカンドメッセンジャーの濃度変化を、GFP 蛍光により検出する系（Ca^{2+}、cAMP 検出系）を構築した。Ca^{2+}検出系を導入した辛味受容体 TRPV1、TRPA1 発現細胞、清涼感受容体 TRPM8 発現細胞、甘味受容体 T1R2/T1R3 発現細胞では、各受容体のアゴニスト（Capsaicin、Cinnamaldehyde、l-Menthol、Aspartame）依存的に GFP 蛍光を示す細胞数が顕著に増加した。また cAMP 検出系を導入した嗅覚受容体 OR1A1 発現細胞においても、アゴニストである(+)-Carvone 依存的に GFP 蛍光を示す細胞数が顕著に増加した。これらの結果から、本系によりヒト味覚・嗅覚受容体の応答検出が可能であることが示された。

次に受容体解析モデルとして、TRPV1、TRPA1、TRPM8 発現細胞を混合し、Capsaicin 投与後に GFP 蛍光を示した細胞をマイクロラフトアレイにより分取し、リアルタイム RT-PCR により受容体遺伝子の発現を解析した。その結果、TRPA1、TRPM8 遺伝子は全く検出されず、TRPV1 遺伝子の発現のみが確認された。このことから、本システムを用いることで任意のアゴニストに応答する受容体を高精度に特定できることが示された。

本研究で開発に成功した新規な網羅的受容体解析法は、食品成分によって引き起こされる、400 種類以上のヒト味覚・嗅覚受容体応答の統合的理解に役立つと期待される。

taste, odorant, receptor

発表責任者：伊藤圭祐（sukeito@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：3A01p13
講演日時：3 月 27 日 16:21～ センター2 号館 A01 会場

主観的香気強度と胃電図決定論性との相関関係

Relationship between perceived odor intensity and deterministic degree of electrogastrogram signal

○高井 英司[1]、青柳 隆大[1]、濱田 梓之佑[2]、市川 敬太[2]、松浦 康之[3]、木下 史也[4]、高田 宗樹[2] ([1]曽田香料(株)、[2]福井大院・工、[3]岐阜市女短大・国際文化、[4]富山県大・工)
○ Eiji TAKAI[1], Takahiro AOYAGI[1], Shinnosuke HAMADA[2], Keita ICHIKAWA[2], Yasuyuki MATSUURA[3], Fumiya KINOSHITA[4], Hiroki TAKADA[2] ([1]Soda Aromatic Co., Ltd., [2]Univ. of Fukui, [3]Gifu City Women's Col., [4]Toyama Pref. Univ.)

【目的】

食品の香り（フレーバー）は濃度により嗜好性や香調が変化するため、その濃度設定は食選択や食行動、さらには消化活動にも影響を及ぼし得る。胃運動は食欲や消化活動に影響を及ぼすにも関わらず、香りのヒト胃運動への影響はほとんど報告例がない。そこで、胃運動を制御する胃電気活動が測定可能な胃電図を選択し、濃度の異なる香料を呈示した時の胃電図を測定した。また、胃活動を支配する副交感神経活動を調べるため、心電図についても併せて測定した。

【方法】

健常若年男性 8 名（平均年齢±SD：23.3±0.8）を被験者とし、食後 2 時間以降に仰臥位で香りを 20 分間呈示し、呈示時の胃電図および心電図を測定した。測定終了後、呈示した香りについて視覚的アナログ尺度（VAS）による官能評価を実施した。呈示した香料はバニラフレーバーとし、濃度は、無臭サンプル（Control）、低濃度バニラフレーバー（LV）、高濃度バニラフレーバー（HV）の 3 段階に設定した。なお、LV と HV の濃度差は 100 倍とした。

【結果】

心拍変動解析および胃電図周波数解析のいずれにおいても、呈示した香料間で統計学的な有意差はみられなかった。胃電図は、胃電気信号に、腸電気信号や他臓器・筋由来の不規則な微弱信号などが共鳴する、確率共鳴現象と見做せることが提案されている[1)]。しかしながら、上記の解析は線形解析（高速フーリエ変換（FFT））であり、解析手法として適していない可能性が考えられた。そこで、非線形確率過程の解析に適した Wayland アルゴリズム[2)]により算出した並進誤差（E_{trans}）により、香りを呈示した時の胃電図の決定論性を評価した。その結果、呈示した香料濃度の増加に伴い E_{trans} が増加した。そこで、被験者が実際に感じている香りの強度（主観的香気強度）と E_{trans} との相関を調べたところ、強い正の相関関係（$r = 0.876$）がみられた。E_{trans} の増加は、決定論性の減少（=無規則性の増加）を意味することから、香りを強く感じると胃電図の無規則性が増加したと考えられた。つまり、嗅覚刺激が副交感神経活動等を介し、胃と腸の連動性や、他臓器・筋由来の微弱信号などにそれぞれ影響を及ぼし、胃電図の無規則性を増加させたと考えられた。以上の結果から、胃電図の決定論性は、香りの新たな客観的評価指標となり得ることが示唆された。

1) Kinoshita F, Mori Y, Matsuura Y, Takada H, and Miyao M, *IEEJ Trans. EIS*, **136**, 1261-1267 (2016)
2) Wayland R, Bromley D, Pickett D, and Passamante A, *Phys. Rev. Lett*. **70**, 530–582 (1993)

electrogastrogram, nonlinear analysis, aroma evaluation

発表責任者：高井英司（Eiji_Takai@soda.toray.co.jp）

講演番号：3A01p14
講演日時：3 月 27 日 16:32～ センター2 号館 A01 会場

油脂が鼻腔内香気成分到達性に及ぼす影響

The effect of oil on orthonasal and retronasal odorant transport

○中田 勇二、杉山 真悟、林 和寛（味の素株式会社）
○Yuji NAKADA, Shingo SUGIYAMA, Kazuhiro HAYASHI (AJINOMOTO.CO.,INC.)

【目的】スープやだしのような液状食品に油脂を加えると口当たりを向上させるだけでなく、呈味や香気の強度や質にも変化をもたらすように感じられる。香気成分は、試料を口に含む前は容器上の気相（ヘッドスペース）に放散され、鼻孔からオルソネーザル経路で鼻腔内に到達し、試料を口に含んだ後は口腔内の気相に放散され、呼気とともにレトロネーザル経路で鼻腔内に到達し、鼻腔上の嗅上皮で受容される。演者らは香気成分の物理化学特性と香気成分の鼻腔内到達性との関連性について報告した。[1)]また、香料水溶液に増粘剤を添加すると香気成分の鼻腔内到達性に変化が生じ、香気成分の物理化学特性に応じてその効果が異なることを報告した。[2)]本研究では、香料水溶液に油脂を添加したときの香気成分の鼻腔内到達性に及ぼす影響を把握することにした。
【方法】香気成分は、Nonanal、Ethylbenzoate、2−Methylpyrazine、油脂はひまわり油を用いた。香気成分及び油脂を水に添加し試料とした。まず、バイアル瓶に試料を入れ密封し平衡化させ、容器内ヘッドスペースに放散された香気成分量を測定した。次に、試料 10ml を口に含みアダプターを鼻孔に装着し、約 20 秒口中に保持した後に１回で嚥下し、３秒に一回の呼吸サイクルで約１分間の呼気中香気成分量を測定した。測定には、Micromass 社製 APCI-MS （Atmospheric Pressure Chemical Ionization - Mass Spectrometry）を用いた。
【結果】ヘッドスペースに放散される香気成分量は、測定開始後瞬時に最大値を示し、その後頭打ちとなった。呼気中に含まれる香気成分量は、口に含み嚥下した直後に最大値を示し、その後減少した。何れの試料においても呼気中香気成分量は、ヘッドスペース香気成分量より低値であった。ヘッドスペース香気成分量に関しては、油脂添加により高揮発性/疎水性成分は顕著に減少したのに対し、低揮発性/親水性成分の減少量は僅かであった。呼気中香気成分最大量に関しては、油脂添加により高揮発性/疎水性成分は顕著に減少したのに対し、低揮発性/親水性成分においては変化が認められなかった。しかしながら、呼気中香気成分残存率に関しては油脂添加により、高揮発性/疎水性成分は顕著に上昇し、低揮発性/親水性成分においては変化が認められなかった。本検討から、香気成分の物理化学特性の違いに応じて、油脂添加による香気成分の鼻腔内到達性への影響は異なることが明らかとなり、油脂添加により感じられる香気強度や香気質の変化の違いを理解する手掛りになる可能性が示された。

１）中田勇二ほか、日本食品科学工学会第 65 回大会講演集、3Aa7
２）中田勇二ほか、日本農芸化学会 2019 年度大会講演集、3B2a11

oil, aroma release, retronasal odorant transport

発表責任者：中田勇二（yuuji_nakada@ajinomoto.com）

講演番号：3A01p15
講演日時：3 月 27 日 16:43～ センター2 号館 A01 会場

食品全体の複合的な辛味を定量評価できるヒト TRPV1 応答評価系の開発

Development of advanced hTRPV1 assay system to evaluate the pungency of whole foods

○松山 南、伊藤 豊実、寺田 祐子、中野 祥吾、伊藤 創平、伊藤 圭祐（静県大院・薬食）
○Minami MATSUYAMA, Toyomi ITOU, Yuko TERADA, Syougo NAKANO, Souhei ITOU, Keisuke ITOU (Univ. Shizuoka)

【背景・目的】 食のグローバル化に伴い、人種や個人に依存しない味の客観的評価の重要性が増している。近年では、蛍光指示薬を用いたカルシウムイメージングによる味覚受容体応答評価法（蛍光法）が利用されつつあるが、本法はメイラード反応生成物などの蛍光成分を含む多くの食品に適用できず、そのような食品の場合は抽出した個別の成分を用いて解析せざるを得ない。そこで本研究では、混合物である食品全体の複合的な味の評価を可能とするため、カルシウム依存性の発光タンパク質であるイクオリンを利用し、蛍光成分存在下でも利用できる味覚受容体の応答評価系を開発した。特に、官能評価や味覚センサーでの解析が困難な辛味に着目し、イクオリン-辛味受容体（TRPV1）応答評価系を構築し、実際の食品を用いて有効性を検証した。

【方法・結果】 ヒト TRPV1 安定発現細胞にイクオリンを共発現させ、イクオリンの基質であるセレンテラジンを取り込ませた後、サンプル投与による発光強度の変化を継時的に測定した。メイラード反応によって生じた蛍光成分を含む味噌をサンプルとともに添加した場合、蛍光法においてはバックグラウンドが顕著に増加し、応答測定は不可能であった。その一方、発光法では味噌の有無に関わらず同等の TRPV1 応答が検出された。また、味噌や醤油、様々な香辛料を含む 6 種の激辛カップラーメンの辛味を本発光法により評価した結果、いずれのサンプルにおいても濃度依存的な TRPV1 応答が検出され、また得られた値は官能評価によって見積もられた辛味強度と相関が見られた。以上より、本発光法は、蛍光成分を含む場合でも食品全体の複合的な辛味を定量的に評価できる新たな評価系であることが示唆された。

続いてさらなる応答感度の向上を目指し、鍵要素となるセレンテラジンとイクオリンの最適化を検討した。8 種のセレンテラジン（*hcp*、*fcp*、*ip*、*f*、*cp*、*h*、*i*、*n*）について、発光に関する様々な特性と TRPV1 応答強度との関連を調べた結果、これらの中ではセレンテラジン *hcp* が最も高い応答強度を示し、それ以上に Relative Luminescence capacity 値が高いセレンテラジン native が最適である可能性も示唆された。また、独自に開発した INTMSAlign（配列解析プログラム）と Rosetta を融合した新規手法により人工設計イクオリン（RC5、RC15、RC30）を作製した。その結果、特に人工設計イクオリン RC30 を用いた場合に応答感度の改善が期待される結果を得ることができた。現在、さらなる感度向上を目指し、人工設計イクオリンの最適化を進めている。

taste evaluation, TRPV1, Aequorin

発表責任者：伊藤圭祐（sukeito@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：3A01p16
講演日時：3 月 27 日 16:54～ センター2 号館 A01 会場

TRPV1 アゴニストであるピペリン類の調製と相対モル感度を利用した HPLC 定量法の開発
Preparation of piperine analogous, TRPV1 agonists, and development of quantitative analysis method for these compounds by HPLC using relative molar sensitivity

○水本 俊行[1]、中野 扶佐子[1]、齋藤 豪紀[1]、大野 裕和[1]、村上 敏之[1]、寺田 祐子[2]、伊藤 圭祐[2]、増本 直子[3]、西﨑 雄三[3]、杉本 直樹[3]([1]丸善製薬、[2]静県大院・薬食、[3]国立医薬品食品衛生研究所)
○Toshiyuki MIZUMOTO[1], Fusako NAKANO[1], Hideki SAITO[1], Hirokazu OHNO[1], Toshiyuki MURAKAMI[1], Yuko TERADA[2], Keisuke ITO[2], Naoko MASUMOTO[3], Yuzo NISHIZAKI[3], Naoki SUGIMOTO[3] ([1]MARUZEN PHARMACEUTICALS CO., LTD., [2]Univ. Shizuoka, [3]National Institute of Health Sciences)

【目的】ヒハツはコショウ科の植物であり、果穂の熱水抽出物は国内において健康食品原料として利用されている。その主要成分はピペリン類［piperanine および piperine *cis-trans* 異性体（piperine、chavicine、isopiperine、isochavicine)］ である。このうち分析用標準品が市販されているのは piperine のみであり、piperine の光異性化で生じる chavicine、isopiperine、isochavicine については、試薬が市販されておらず、特に chavicine は異性化しやすいため、純度が確かなサンプルを調製することは困難であった。そこで本研究では、piperine から高純度な piperine 異性体を調製することを目的とした。一方、piperine の定量分析法は多数報告されているが、その他の piperine 類も測定対象としている研究報告はほとんどなく、それらの定量分析は困難であった。本研究では、^{1}H-qNMR により求めた絶対純度に基づき、piperine に対するその他のピペリン類の相対モル感度 （*RMS*）を明らかとし、*RMS* を利用して piperine を単一基準物質とし 5 種のピペリン類を HPLC/UV にて定量する手法（RMS 法）についても検討した。
【方法】市販の piperine 試薬の MeOH 溶液を光照射し（95000 lx × 4 hr)、piperine 異性体混合物を得た。これを遮光下、分取 HPLC を用いて精製した。piperanine はヒハツより精製した。得られた piperine 異性体、piperine 試薬及び piperanine は DSS-d_6 を内部標準物質とした定量 NMR 法でそれぞれの絶対純度を測定した。これらを HPLC-UV（270 nm）で分析し、それぞれの絶対純度を反映したモル濃度を独立変数、ピーク面積を従属変数とした回帰分析を行い、piperine に対する各 piperine 類の回帰係数の比を算出し *RMS* とした。*RMS* の妥当性を評価するため、ヒハツ抽出物を RMS 法と絶対検量線法で分析し、定量値を比較した。
【結果】^{1}H-qNMR による絶対純度は piperanine：98.0%、piperine：99.1%、chavicine：89.7%、isopiperine：98.9%、isochavicine：99.7%であると算出した。piperine に対する各 piperine 類の *RMS* は piperanine：0.3693、chavicine：1.138、isopiperine：0.9164、isochavicine：1.277 であると算出した。絶対検量線法と RMS 法による各 piperine 類の定量値の相対誤差は 1.98%以下であり、piperine 類の合計定量値の両分析法間の相対誤差は 0.35%であった。
【考察】本研究の手法により、高純度な piperine 異性体を調製可能と考えられた。また、絶対検量線法と RMS 法の定量値の差異はほとんどなかったことから、RMS 法は piperine 類の定量に有用であると考えられた。

Piperine analogous, Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1), Relative molar sensitivity (*RMS*)

発表責任者：水本俊行（t-mizumoto@maruzenpcy.co.jp）

講演番号：3A01p17
講演日時：3 月 27 日 17:05～ センター2 号館 A01 会場

ナガコショウ ヒハツの TRPV1, A1 活性におけるピペリン類の寄与

TRPV1 and TRPA1 activation potencies of piperines contained in Piper longum L.

○寺田 祐子[1]、中野 扶佐子[2]、大野 裕和[2]、村上 敏之[2]、伊藤 圭祐[1] ([1]静県大院・薬食、[2]丸善製薬株式会社)
○Yuko Terada[1], Fusako Nakano[2], Hirokazu Ohno[2], Toshiyuki Murakami[2], Keisuke Ito[1] ([1]Univ. Shizuoka, [2]MARUZEN PHARMACEUTICALS)

ヒハツは別名ナガコショウと呼ばれ、辛味のある果穂はスパイスとして用いられる。これまでに我々は、ヒハツ果穂の抽出物が冷え改善効果を示すことを、ヒトとマウスを用いた試験で明らかにしてきた。本研究では、その作用機序の解明を目指して、ヒハツ抽出物とその含有成分が、体熱産生に関わる受容体であるtransient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) とTRP ankyrin 1 (TRPA1) を活性化するかを調べた。

ヒハツ果穂の熱水抽出物を濾過、濃縮後、デキストリンを混ぜて噴霧乾燥し、パウダー状にしたものをヒハツ抽出物とした。TRPV1またはTRPA1を発現させたHEK細胞にヒハツ抽出物を投与し、Ca^{2+}イメージングによる測定を行った結果、ヒハツ抽出物はTRPV1, A1の両方を活性化した。ヒハツには代表的なTRPV1, A1アゴニストであるpiperineが含まれていることから、piperine類のTRP活性への寄与を調べるためにヒハツ抽出物をpiperine類含有画分と非含有画分にわけ、TRP活性を測定した。piperine類含有画分はTRPV1, A1の両方を強く活性化した一方で、piperine非含有画分はTRPA1のみを弱く活性化した。これらの結果は、ヒハツ抽出物のTRPV1活性はpiperine類によること、TRPA1活性についてはpiperine類の寄与が大きいが、piperine類以外のTRPA1アゴニストも含有されることを示唆した。

次にpiperine類含有画分の成分分析を行ったところ、piperine類5種（piperine, piperanine, isopiperine, chavicine, isochavicine）が含まれており、これらをHPLCで精製した。続いて、これらpiperine類のTRP活性を測定したところ、全てがTRPV1, A1を活性化した。chavicine以外の4化合物についてはTRPV1, A1活性が報告されているが [1, 2]、chavicineのTRPV1, A1活性を示した報告はない。本研究では、独自の技術により高純度なchavicineを調製できたことで、TRP活性の評価が可能となった。TRPV1活性については、piperineが最も強くEC_{50} は0.5 μMで、他4化合物 (EC_{50} 2.9～5.8 μM) の1/10程度であった。TRPA1活性に関してはisopiperine (EC_{50} 3 μM) とisochavicine (EC_{50} 5.4 μM) が、他3化合物 (EC_{50} 13～21 μM) に比べてやや強い活性を示した。ヒハツ抽出物のTRP活性における各piperine類の寄与率を、それらの含有量とTRP活性化能から算出すると、抽出物のTRPV1活性はpiperineとpiperanineの寄与が大きいこと、TRPA1活性には5種のpiperine類が寄与していると考えられた。

[1] McNamara. F. N. et al, *Brit. J. Pharmacol.*, 2005, **144**, 781-790
[2] Okumura Y. et al, *Biosci. Biotechnol. Biochem.,* 2010, **74**, 1068-1072

piperine, TRPV1, TRPA1

発表責任者：寺田祐子（yukoterada@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：3A02a01
講演日時：3 月 27 日 09:30～ センター2 号館 A02 会場

表面筋電図法と動的粘弾性測定を用いた増粘多糖類ゲルの嚥下難易度の評価

Evaluation of difficulty in swallowing of polysaccharide thickener gel using surface electromyography and dynamic viscoelasticity

○梅谷 華奈[1]、上田 玲子[1]、小西 史子[2]、舟木 淳子[3]、安岡 顕人[1]、阿部 啓子[1,4]、朝倉 富子[1]（[1]東大院・農生科、[2]女子栄養大・栄、[3]福岡女子大、[4]KISTEC）
○Kana UMETANI[1], Reiko UEDA[1], Fumiko KONISHI[2], Junko FUNAKI[3], Akihito YASUOKA[1], Keiko ABE[1,4], Tomiko ASAKURA[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Kagawa Nutrition Univ., [3]Fukuoka Women's Univ., [4]KISTEC)

（背景・目的）近年、高齢者の誤嚥性肺炎が増加傾向にあり、高齢化が進んでいる日本において嚥下しやすい食品開発への社会的ニーズが高まっている。現在、嚥下調整食の物性基準や感覚的な指標による区分がいくつか設けられているが、その区分は摂食者の生体応答を反映していない現状にある。これまでに我々は、官能特性とヒトの生体応答の対応を解析するために、市販されている嚥下調整食を用いて飲みこみやすさの評価系の構築を行った。しかし、この評価系には、物性・味・匂いなど様々なファクターが存在するため、どの要素が飲みこみやすさに影響を与えているかは不明であった。そこで、個別のファクターと飲みこみやすさの関係を解明することとした。これまで味に着目し、嗜好性と生体応答の対応関係を昨年度の本大会で報告した。そこで、本年度は、ヒトによる官能評価・オトガイ舌骨筋の表面筋電図、動的粘弾性による食品の物性評価を行った。これらの関連性を解析することにより、物性における飲みこみやすさに寄与する生体応答パラメーター、または、物性測定パラメーターを明らかにすることを目的とした。
（方法）嚥下調整食に使用されることの多い増粘多糖類であるカラギーナン、ジェランガムについて、ゲルを形成する限界値を下限、舌でつぶせる硬さを上限とした各サンプルの濃度を検討し設定した。各サンプルの強度、嗜好、飲みこみやすさについてマグニチュード推定法を用いた尺度構成による官能評価を実施した。次に、パネルが各サンプル 5 g を嚥下する際のオトガイ舌骨筋の筋電図を表面筋電位計 P-EMG plus を用いて測定した。一方、同試料各 5 g の動的粘弾性を HAAKE MARS I を用いて測定した。飲み込みやすさを目的変数、表面筋電図測定パラメーターまたは動的粘弾性測定パラメーターを説明変数とした PLS 回帰分析を適用することにより、飲みこみやすさに寄与しているそれぞれの重要要素を検証した。なお、今回は口腔内に障害のない 20 代～60 代の男女 3 名ずつをパネルとして用いた。
（結果・考察）増粘多糖類 2 種について、5 段階の濃度水準を設定した。PLS 回帰分析の結果、飲みこみやすさを説明する表面筋電図測定パラメーターおよび動的粘弾性測定パラメーターの重要要素はカラギーナンとジェランガムで共通のものと、異なるものが見られた。例えば、表面筋電図測定パラメーターで嚥下に要した時間を示す継続時間はジェランガム単独で重要要素として抽出された。このことより、ゲル構造が異なることに起因する飲みこみやすさの違いを筋電図測定、動的粘弾性測定で評価できる可能性が示唆された。

sensory evaluation, surface electromyography, dynamic viscoelasticity

発表責任者：朝倉富子（asakura@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3A02a02
講演日時：3 月 27 日 09:41～ センター2 号館 A02 会場

高脂質ゲルの冷凍耐性における油脂種類の影響

Effect of the kind of liquid fat on the freeze-thaw stability of high liquid fat containing gel

○松本 拓矩、中島 聡史、秋山 亜希子、増田 麻衣、崎谷 宣孝、渡邉 裕一、上田 佳宏（ソマール株式会社）
○Takunori MATSUMOTO, Satoshi NAKAJIMA, Akiko AKIYAMA, Mai MASUDA, Nobutaka SAKIYA, Yuichi WATANABE, Yoshihiro UEDA (SOMAR Corp.)

【目的】油脂を含有するエマルションは食品・医薬品・化粧品等様々な分野に用いられる。水溶性多糖類ゲル化剤を用いて油脂を高濃度に含有する高脂質ゲルの報告は少なく、我々のグループでは液体油脂を最大 85%含有する高脂質ゲルにおける多糖類ゲル化剤の選択と基本的な物理的特性について過去に報告した[1]。さらに前回大会では高脂質ゲルにおける油脂種類の影響を主に評価し、高脂質ゲルの物理的特性を明らかにした。

応用に向けた高脂質ゲルの更なる解明が必要であり、本研究では油脂種類が与える冷凍-解凍における高脂質ゲルの安定性への影響について検討した。

【方法】本研究においては高脂質ゲルにおける油脂種類と冷凍-解凍における安定性への影響の評価を目的とし、数種類の液体油脂（キャノーラ油など）を用いて高脂質ゲル（液体油脂含有量：85%）を作製した。冷凍-解凍による離油のメカニズムを検証するため①X 線結晶回折(XRD)による低温(-25℃)時の高脂質ゲル内部結晶構造変化観察、②高速液体クロマトグラフィーによる液体油脂のトリアシルグリセロール組成分析などで検証し、冷凍-解凍における安定性との関連性を評価した。

【結果】高脂質ゲルの冷凍-解凍における安定性を評価したところ、高脂質ゲルの冷凍-解凍における安定性は油脂種類によって大きな差が確認された。よって高脂質ゲルの冷凍-解凍による安定性に油脂種類が影響することが示唆され、液体油脂内部組成がエマルションに影響を与えることが示唆された。

[1] Nakajima, S., *et al.*, *J. Home Econ. Jpn.* (2019)

food, emulsion, gel

発表責任者：上田　佳宏（ueda.yoshihiro.42@somar.co.jp）

講演番号：3A02a03
講演日時：3 月 27 日 09:52～ センター2 号館 A02 会場

米菓への油脂浸透度と食感の関係

Relationship between oil permeation into rice crackers and their texture.

○山谷 健太[1,3]、近藤 沙李[2]、原 伊織[3]、竹井 亮[1]、勝野 那嘉子[3]、西津 貴久[3] ([1]亀田製菓株式会社、[2]岐阜大院、[3]岐阜大)
○Kenta YAMAYA[1,3], Sarii KONDO[2], Iori HARA[3], Ryo TAKEI[1], Nakako KATSUNO[3], Takahisa NISHIZU[3] ([1]KEMEDA SEIKA CO., LTD., [2]Grad. Sch. of Natl. Sci.&Tech, Gifu Univ., [3]Gifu Univ.)

[緒言]

米菓は原料や製法によりソフトなものからハードなものまで様々な食感を形成する日本の伝統的な菓子である。米菓はたとえ同一の原料配合であっても、その生地製造工程、焼成方法によって多様な食感が生み出され、調味によりさらにその幅は広げられる。著者らはこれまで、咀嚼により米菓が急速に溶け崩壊する様子を「口どけ感」として、微細構造と物理特性の視点から研究してきたが[1]、油脂が米菓内部の気泡構造に入り込み、消化性や吸水性に影響を与えることで、食感(口どけ感)を変化させている可能性を見出した。そこで本研究では、油脂の浸透度が食感に与える影響を明らかとすることを目的に、可視化した油脂分布と食感の官能評価との相関解析を行った。

[手法]

新潟県産コシヒカリのみを用いて均一な気泡構造をもつように素焼き米菓を作製した。減圧含浸を用いて素焼き米菓に菜種油を段階的に浸透させ、モデル米菓群とした。作製したモデル米菓の内部構造、および油脂の浸透分布を X 線 μ Computed Tomography (CT) にて解析した。油脂分布はまず、サンプル全体の region of interest (ROI) を作成し、サンプルを外側から一定比率で縮小した ROI を差し引き、第 1 層、第 2 層…とした時のそれぞれの層の油脂含量として求めた。また、油脂の浸透度合いと食感との関係を解明するため、脂質量が 13.5%～39.8% までの菓子を用い、成人男女 20 名 (20 代～40 代) を対象に油脂に関わる食感評価用語を抽出した。クラスター分析により分類、選定した用語を用いて、上述のモデル米菓に対し官能評価を行った。

[結果]

単一原料を用い作製した素焼き米菓は、一様に同じ大きさの気泡を同程度有し、壁厚も同等であった。これに菜種油を減圧含浸することにより、10%～50% 台の油脂含量のモデル米菓を作製した。内部の油脂の局在は浸透度に比例して、内側から外側に拡散している傾向が X 線 μ CT により観測された。官能評価により油脂に関わる食感用語は 14 語抽出され、クラスター分析にて「サクサク」「しっとり」等 8 群に分類することができた。発表では油脂分布との相関解析の結果について報告する。

[参考文献]

[1] K.YAMAYA, *et al.* Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, 66(3), 90-99, 2019.

rice crackers, oil, texture

発表責任者：山谷健太（k_yamaya@sk.kameda.co.jp）

講演番号：3A02a04
講演日時：3 月 27 日 10:03～ センター2 号館 A02 会場

各種乳化剤がアミロース脂質複合体形成と老化抑制効果に及ぼす影響

Effect of food emulsifiers on relations between formation of amylose-lipid complexes and starch retrogradation

○永田 幹太朗[1]、勝野 那嘉子[2]、西津 貴久[2]([1]岐阜大院・自然研、[2]岐阜大・応生)
○Kantaro NAGATA[1], NAKAKO KATSUNO[2], TAKAHISA NISHIZU[2] ([1]Graduate School of Natl. Sci. Tech, Gifu Univ., [2]Gifu Univ.)

【目的】小麦粉を主原料とするスポンジケーキやパンケーキなどの工場生産品には，生地の乳化，油脂の分散性や起泡性の向上を期待し，乳化剤が添加されている．さらに，乳化剤には焼成後の澱粉老化を抑制する効果もあることが報告されている．これまでの研究から，澱粉老化抑制にはアミロース脂質複合体が関与し，複合体形成度が高いほど老化抑制効果が高いことを明らかにした[1)]．本研究では，グリセリン脂肪酸エステル系乳化剤の脂肪酸に着目し，その炭素数と不飽和度が，アミロース脂質複合体と老化抑制効果の関係に及ぼす影響について検討した．

【試料と方法】乳化剤試料として，パルミチン酸，ステアリン酸，オレイン酸，リノール酸の 4 種のモノグリセリンモノ脂肪酸エステルを使用した．小麦澱粉，グラニュー糖，乳化剤の混合物 4 g に水 25 g を加え，粘度測定（RVA）に供した．また RVA で糊化したゲルを 5 ℃で 72 時間冷蔵した後，粉末 X 線回折測定（XRD，Cu-Kα線）に供した．

【結果と考察】DSC の複合体解離ピークと相関のある XRD の 2θ＝13° ピークからアミロース脂質複合体形成度を評価し，17° ピーク面積から糊化澱粉の老化度を評価したところ，以前報告したステアリン酸系乳化剤を用いた実験結果[1)]と同様，老化抑制効果が高い乳化剤ほど複合体形成度は高く，RVA の最高粘度および保持粘度は低くなり，最高粘度に到達するまでの時間は長くなった．このことはアミロース脂質複合体が澱粉の糊化特性に影響することを示唆するものと考えられる．乳化剤を添加したパンケーキにおいて顕著な外観変化はみられなかったが，乳化剤が澱粉と複合体を形成すると，水の吸水・膨潤を抑制し，糊化を遅延することで，澱粉内容物の溶出が抑制され，最終的に老化抑制を引き起こす可能性があると考えられる．
乳化剤の種類に着目すると，老化抑制効果は飽和脂肪酸（ステアリン酸，パルミチン酸）からなる乳化剤で高く，不飽和脂肪酸（オレイン酸，リノール酸）からなる乳化剤で低かった．また飽和脂肪酸系では鎖長の長いステアリン酸が高く，不飽和脂肪酸系では不飽和度の高いリノール酸が高かった．

1）永田幹太朗ら，日本食品科学工学会中部支部，2018

wheat starch, amylose-lipid complex, starch retrogradation

発表責任者：西津　貴久（nishizu@gifu-u.ac.jp）

講演番号：3A02a05
講演日時：3 月 27 日 10:14～ センター2 号館 A02 会場

パン冷却時におけるデンプンの糊化状態に与える冷却速度の影響

Effect of cooling rate on starch gelatinization during bread cooling

○齋藤 凱暉[1]、野口 智弘[2]、伊賀 大八[3]、井上 好文[3]、高野 克己[4]([1]東京農大院農、[2]東京農大応生食加セ、[3]日本パン技研、[4]東京農大応生)
○Gaiki SAITOU[1], Tomohiro NOGUCHI[2], Daihachi IGA[3], Yoshihumi INOUE[3], Katsumi TAKANO[4] ([1]Tokyo Univ. of Agri Agriculture, [2]Food Processing Technology Center, [3]Japan bread technical laboratory, [4]Tokyo Univ. of Agri Applied biological science)

【目的】

パンは焼成直後の品温は 100℃程度であり、室温まで冷却されて包装される。この冷却時間は食パンなど大型のパンでは 90 分間程度要し、製造効率を妨げる要因の一つになっている。これらの問題を解決するため、近年真空冷却が注目されている。真空冷却とは、焼成直後のパンを真空（減圧）状態に置き、蒸発潜熱にて冷却行う技術であり、数分で冷却が可能となる。真空冷却は冷却時間短縮の他、クラムのソフト化も報告されパンの品質向上効果も期待されている。しかしながら、真空冷却によるクラムのソフト化の機序は不明であり、その解明が真空冷却の普及に大きく寄与するものと思われる。そこで本研究では、パンクラムへの冷却時に付与される熱量に着目し、冷却速度の差異によるデンプンの糊化状態の変化や老化性を解析するため、これまで検討を行って来た食パンでの試験に加え、デンプンゲルでの検討および乾燥粉末化したパンでの解析を行い、冷却速度の違いによるデンプンの性状変化を評価することで、真空冷却によるクラムソフト化の要因を解明することを目的とした。

【方法】

製パン試験は、ストレート法にて油脂添加量を *Baker's%*で 0, 10, 20%と添加した、プルマン型食パンを焼成し、パンの中心温度が 35℃になるまで室温にて常圧冷却または真空冷却（35hPa まで減圧）後、室温で 24 時間保存したパンを凍結乾燥させ、パン乾燥粉末とした。また、ストレート法にて 75㎜四方のプルマン型食パンを焼成し、減圧レベルを段階的に変えて真空冷却を行った後、パン粉末を調製した。ラピットビスコアナライザー（RVA）にてパン粉末の糊化粘度特性値を測定した。また、小麦デンプンを RVA にて加熱糊化させ、得られた糊液を室温下(緩慢冷却)、氷水中(急速冷却)で冷却し、4℃、24 時間保存後、ワンバイト法にてゲル破断時の硬度を測定した。

【結果】

パン粉末を RVA に供した結果、何れも糊化デンプンであることからブレークダウンは確認されなかったが、真空冷却を行った試料の粘性が常圧冷却に比べ高く、また真空強度に従いその増加量も増大した。さらに、製パン時に油脂を添加し同様の検討を行ったところ、油脂添加量が増えるほど常圧冷却と真空冷却との粘性の差が縮小した。また、小麦デンプンゲルの破断強度は、緩慢冷却に比べ急速冷却で有意に低い値を示した。

Vacuum cooling, Starch, Cooling rate

講演番号：3A02a06
講演日時：3 月 27 日 10:35～ センター2 号館 A02 会場

X 線小角・高角散乱と DSC の同時測定によるコメの糊化過程の解明
A study on structural changes during gelatinization of rice using simultaneous SAXS/WAXS/DSC experiments
○高木 秀彰（KEK 物構研）
○Hideaki TAKAGI (KEK-IMSS)

X 線や中性子線といった量子ビームを使った散乱法は試料を非破壊で in-situ 測定を行うのに適した手法である。小角 X 線散乱法はナノサイズの構造評価に適した手法であり、高角散乱と併用することで原子レベルのÅオーダーから分子集合体の nm オーダーまでの構造を評価できる。大型の放射光施設で発生させる X 線は非常に強力で、数ミリ秒～数分程度でデータが取得できるために、数秒間隔の時間分解実験が可能である。また試料部に in-situ 計測用の測定装置、例えば加熱冷却装置や引っ張り試験機、レオメーターなどを設置することが可能である。

食品はÅオーダーからμm オーダーまでに多様な階層構造を形成する複雑な系であることが知られている。例えば、日本の主食であるコメのでんぷんは直鎖状のアミロースと枝分かれ部分を持つアミロペクチンからなり、乾燥状態のコメはアミロペクチンとアミロースが結晶化しているため非常に硬い。この時でんぷんが持つ階層構造はμm オーダーの成長リング、nm オーダーの結晶ラメラ、Åオーダーの結晶がある。コメに水を加えて炊くことで、アミロペクチン内に水が浸入することにより硬い結晶が融解し、柔らかいご飯となる。構造的にはμm オーダーの成長リングは崩壊し、ナノサイズの結晶ラメラが融解し､非晶のアミロペクチンの数 10nm オーダーの網目凝集部分の不均一性､数 nm オーダーの網目メッシュサイズの不均一性構造、アミロペクチンの非晶のように階層構造が劇的に変化する。

でんぷんの糊化過程は水との相互作用によって熱量変化が生じ、示差走査熱量測定(DSC)などを用いて熱力学的観点から研究が行われている。そこで本研究ではコメのでんぷんが示す熱力学的挙動と結晶構造及びナノ構造体の相間を調査するために､放射光 X 線を利用した小角/高角 X 線散乱法と DSC の同時測定を行った。それにより DSC による熱量計測変化と結晶ラメラ・結晶構造の変化を関連づけることができた。

gelatinization, small angle X-ray scattering, DSC

発表責任者：高木　秀彰（takagih@post.kek.jp）

講演番号：3A02a07
講演日時：3 月 27 日 10:46～ センター2 号館 A02 会場

6-α-グルコシルトランスフェラーゼを利用して得られた新規高分子デキストリンは老化しない

A novel dextrin produced by the enzymatic reaction of 6-α-glucosyltransferase does not retrograde

○宮田 学、十川 達文、岸下 誠一郎、安田 亜希子、山本 拓生、阿賀 創、牛尾 慎平（株式会社 林原）
○ Manabu MIYATA, Tatsufumi SOGO, Seiichiro KISHISHITA, Akiko YASUDA, Takuo YAMAMOTO, Hajime AGA, Shimpei USHIO (HAYASHIBARA CO., LTD.)

【目的】現在、市販デキストリンの多くは、主に粉末化基材、増粘、ボディ感付与、艶出しといった物性コントロールの他、流動食、介護、スポーツ用途食などでのエネルギー源として広く利用されている。近年、デキストリンにもさらなる多様性が求められ、新しい食品の設計に貢献できるユニークな特性を持つデキストリンの創出が期待されている。そこで我々は、市販デキストリンの重量平均分子量（Mw）が大きくても 10 万程度であるにも関わらず、高分子になるほど老化しやすく食品中で沈殿物が生成するなどの課題を抱えていることに着目し、市販デキストリンよりも高分子でかつ老化しないデキストリンを創出できれば新しい食品の設計が可能となると考え、その製法の確立を試みた。
【方法】ワキシーコーンスターチにα-アミラーゼを僅かに作用させて Mw が 100 万程度のデキストリンを調製し、さらに 6-α-グルコシルトランスフェラーゼ（*Paenibacillus alginolyticus* 由来、AGT）を作用させた。AGT 作用前後のデキストリンについて、GPC による分子量分布測定と、イソマルトデキストラナーゼあるいはβ-アミラーゼ処理をおこない、非還元末端にα-1,6 グルコシル残基が導入された高分子デキストリン（ARX）が生成しているかどうかを検討した。また、Mw が 100 万の ARX（ARX-100）をキログラムスケールで調製し、外観、分子量分布、α-1,6 グルコシル残基の導入の程度を調べるとともに、老化性の評価を水溶液の冷蔵保存および冷解凍の繰り返し試験によりおこなった。
【結果と考察】ワキシーコーンスターチから調製したデキストリンに AGT を作用させ得られた生成物を分析した結果、①AGT 作用前と比較して Mw に大きな変化がないこと、②イソマルトデキストラナーゼ処理によりイソマルトースが生成することと、③β-アミラーゼ処理により生成するマルトース量が AGT を作用させない場合よりも減少することが確認できた。このことから、得られた生成物は、ARX であった。キログラムスケールにスケールアップして ARX-100 を調製し、白色粉末、10 kg を得た。そこで、30%(w/w)水溶液を調製し、6℃で 4 週間保存したところ、老化による濁度の上昇は確認されなかった。また、溶液について凍結解凍を 5 回繰り返したが、濁度の上昇は確認されず、粘度の低下も確認できなかった。
以上の結果より、本研究により得られた生成物は、市販デキストリンよりも遥かに高い Mw であるにも関わらず、老化しない特性を有することから、新規な老化しない高分子デキストリンとして新しい食品の設計に貢献できると期待される。

dextrin, retrogradation, 6-α-glucosyltransferase

発表責任者：宮田学（manabu.miyata@hb.nagase.co.jp）

講演番号：3A02a08
講演日時：3 月 27 日 10:57～ センター2 号館 A02 会場

老化しない新規高分子デキストリンは高い水和特性に起因するユニークな物性を示すとともに消化吸収されエネルギー源になる

A novel non-retrograding dextrin has unique physical properties due to its high hydration characteristics and is digested and absorbed to become an energy source

○安田 亜希子、伊藤 理恵、小川 亨、石橋 真紀、西田 毅弘、日野 克彦、三皷 仁志、阿賀 創、牛尾 慎平（株式会社 林原）
○Akiko YASUDA, Michie ITO, Toru OGAWA, Maki ISHIBASHI, Yoshihiro NISHIDA, Katsuhiko HINO, Hitoshi MITSUZUMI, Hajime AGA, Shimpei USHIO (HAYASHIBARA CO., LTD.)

【目的】食品用途の市販デキストリンは、粉末化基材、粘度を活かした物性のコントロールの他、エネルギー源としても広く活用されているが、食品設計の多様化に伴い、新しい特性を持つデキストリンの創出が期待される。これまでに我々は、市販デキストリンよりも分子量の大きい老化しない高分子デキストリン（ARX）の製法を確立した。本研究では、ARX の基本的な物性を評価するとともに、消化性を評価し、新しい食品設計に貢献できる可能性を検討した。
【方法】重量平均分子量（Mw）が 100 万の ARX（ARX-100）について、まず水への溶解性を確認した。粘度およびせん断速度依存性は、動的粘弾性測定装置にて調べた。水和特性は、パルス NMR にて調べた。pH 安定性は、各 pH の 10%（w/w）水溶液を 100℃・30 分間加熱し、加熱前後の粘度変化により評価した。熱安定性は 10%（w/w）水溶液を 120℃・30 分間加熱し、加熱前後の粘度および着色度の変化により評価した。耐塩性は、10 w/w%水溶液に 10 mmol/L 塩化ナトリウムあるいは塩化カルシウムを添加し、添加前後の粘度変化により評価した。ラット小腸粘膜酵素を用いた *in vitro* 消化性試験、およびラットを用いた *in vivo* 消化吸収性試験をおこなった。
【結果と考察】ARX-100 は、50%（w/w）程度までは撹拌のみで水に溶解することができた。さらに、65%（w/w）まで濃度を上げると撹拌のみでは溶解しなかったが、加温すると均一になり、透明のゲル状固体へと変化した。ARX-100 水溶液の粘度は、市販デキストリンよりも高く、ニュートン流体であった。ARX-100 の水溶液について、パルス NMR で測定した結果、10%（w/w）でも結合水が約 90%を占め、市販デキストリン（DE；2-5）より高い水和力を示した。ARX-100 水溶液は、pH 3-10 の範囲において加熱前後で粘度変化はなく、安定であった。熱安定性試験においても、加熱前後でほとんど粘度変化および着色も見られず、高い安定性を示した。また、ARX-100 水溶液は、塩の添加による粘度変化はなく、耐塩性があることが確認できた。ARX-100 は、*in vitro* 消化性試験において高い消化性を示した。*in vivo* 消化吸収性試験では、ARX-100 の経口投与後の血糖は、市販デキストリンと同様に推移し、消化吸収されるデキストリンであることが確認された。
以上の結果より、ARX-100 は高い水和特性を持つために、高濃度でも水と均一に混合することができ、高い粘度を示すと考えられた。さらに、消化吸収されるため、流動食、介護食、スポーツ用途など、エネルギー供給をターゲットとした食品への配合も可能である。これらの特性と、安定で老化しないことを活かすことで、新しい物性や用途の食品設計に貢献できると期待される。

digestible dextrin, hydration characteristic, retrogradation

発表責任者：安田亜希子（akiko.yasuda@hb.nagase.co.jp）

講演番号：3A02a09
講演日時：3 月 27 日 11:08～ センター2 号館 A02 会場

老化しない新規高分子デキストリンはユニークな分子構造と高い水和特性に起因した新しいテクスチャーを創出することができる

A novel non-retrograding dextrin has the potential to create new texture with its unique structure and high hydration characteristic

○溝手 晶子、安田 亜希子、伊藤 理恵、西田 毅弘、日野 克彦、三皷 仁志、阿賀 創、牛尾 慎平（株式会社 林原）
○Akiko MIZOTE, Akiko YASUDA, Michie ITO, Yoshihiro NISHIDA, Katsuhiko HINO, Hitoshi MITSUZUMI, Hajime AGA, Shimpei USHIO (HAYASHIBARA CO., LTD.)

【目的】我々は新しい食品の設計に貢献できるユニークな特性を持つデキストリンの創出を検討し、老化しない高分子デキストリン(ARX)を得た。ARX の基本特性は市販デキストリンに比べて、高い水和特性と粘度を持ち、安定性が非常に高いこと、また、消化吸収されてエネルギー源となることが示された。今回は、重量平均分子量 100 万の ARX （ARX-100)の食品応用における特性を見極めることを目的とし、味質の評価やゲル化剤への影響を検討し、さらにはいくつかの食品への配合を試みた。
【方法】味質の評価は選抜されたパネルを用いておこなった。ゲル化剤への影響は、寒天 0.5%、カラギーナン 0.8%、ペクチン 1.5%あるいは、ジェランガム 0.2%の中に、ARX-100 を 5%添加したゲルを作成し、テクスチャー測定（動的粘弾性測定装置、クリープメーター)、離水量測定、およびパルス NMR による水和特性の評価をおこなった。食品への応用では、メレンゲあるいはそばのほぐれ剤に添加し、添加による食品の変化を観察した。
【結果と考察】各種濃度の ARX-100 水溶液を食味評価した結果、甘味はほとんど感じられなかったが、濃度が高くなるにつれ、とろみとボディー感を強く感じ、ARX-100 の粘度が寄与すると推察された。各種ゲル化剤に添加すると、粘り（tan δ）が上昇したが、その他のテクスチャーの変化はゲル化剤により異なった。パルス NMR により ARX-100 を添加したゲルの水和特性を検討した結果、カラギーナンやジェランガムは、ゲル中の水分子の 8-9 割が自由水として存在したが、ARX-100 を添加すると自由水を捕捉し結合水へと変化させ、ゲル強度の上昇や、離水抑制につながることが示唆された。ペクチンゲルや寒天ゲルは、ゲル中の自由水の割合が 5%以下と少なく、ARX-100 を添加しても結合水の増加は見られなかった。しかし、テクスチャーへの影響は、ペクチンでは僅かであったのに対し、寒天ゲルでは貯蔵弾性率（G’）が大幅に減少したことから、ARX は、寒天の架橋構造形成を阻害したと推察された。寒天ゲルを冷凍後解凍すると、ゲル中の自由水は大幅に増加したが（8 割程度)、ARX-100 を添加しておくと顕著に自由水の増加が抑制され、ゲル構造の維持につながると推察された。さらに、ARX-100 は、メレンゲの泡保持や、ゆでそばのほぐれをよくする効果が認められ、高い水和特性を活かした用途が可能であった。
　以上の結果より、ARX-100 は老化しないだけでなく、食品へ配合することで、甘味を変化させずにテクスチャーをコントロールできる新しい食品素材として幅広い用途が期待される。また、このような特性は ARX-100 の分子構造と高い水和特性に起因すると推察された。

hydration characteristic, high molecular weight dextrin, texture

発表責任者：溝手晶子（akiko.mizote@hb.nagase.co.jp）

講演番号：3A02a10
講演日時：3 月 27 日 11:19～ センター2 号館 A02 会場

α-1,6 グルコシル残基の高分子デキストリンへの導入はガラス転移温度曲線に影響せず老化しない性質を与える
Modification of α-1,6 glucosyl residues to dextrin gives a non-retrograding property with no effect to the glass transition temperature curve of dextrin
○川井 清司[1]、住田 梨嘉[1]、岸下 誠一郎[2]、安田 亜希子[2]、溝手 晶子[2]、山本 拓生[2]、三皷 仁志[2]、阿賀 創[2]、牛尾 慎平[2] ([1]広島大学、[2]株式会社 林原)
○Kiyoshi KAWAI[1], Rika SUMIDA[1], Seiichiro KISHISHITA[2], Akiko YASUDA[2], Akiko MIZOTE[2], Takuo YAMAMOTO[2], Hitoshi MITSUZUMI[2], Hajime AGA[2], Shimpei USHIO[2] ([1]Hiroshima Univ., [2]Hayashibara CO., LTD.)

【目的】前報において、ARX（非還元末端に α-1,6 グルコシル残基を導入した高分子デキストリン）は老化しないことを濁度および粘度測定によって示した。このことについてより詳しく理解するため、本研究では ARX と α-1,6 グルコシル残基を導入前の高分子デキストリンとを試料に用い、示差走査熱量計（DSC）および X 線回折測定（XRD）によって老化特性の相違を比較した。また、高分子デキストリンに対する ARX の老化抑制効果をトレハロースと比較した。一方、乾燥状態での物性を比較するため、ガラス転移温度（T_g）の水分含量依存性を DSC によって調べた。
【方法】ワキシーコーンスターチから調製した重量平均分子量が 100 万のデキストリン（MD-100）と、α-1,6 グルコシル残基を導入した ARX（ARX-100）とを前報にしたがって調製し、噴霧乾燥物を得た。 それぞれの乾燥粉末から 30%（w/w）水溶液を調製し、沸騰水中で加熱処理した後、5ºC で最大 30 日間保存した。各試料の融解エンタルピー（ΔH）を DSC によって調べた。また、30 日間保存した試料から凍結乾燥粉末を調製し、XRD を行った。MD-100 に対して、最大 20%の ARX-100 およびトレハロースを添加した試料についても同様の実験を行った。一方、それぞれの乾燥粉末を減圧乾燥によって十分に乾燥させた後、様々な飽和塩を共存させたデシケーター内で 7 日間以上、25℃で保持し、粉末の水分含量を調節した。各試料の T_g を DSC によって、水分含量を常圧乾燥減量法によって、それぞれ調べた。
【結果および考察】MD-100 の ΔH は保持時間の経過とともに増加したが（老化の進行）、ARX-100 は 30 日経過後も融解挙動を示さなかった。X 線回折パターンにおいて、MD-100 は老化を表す微小なピークを示したが、ARX-100 は保存前と同様にハローパターンを示した。MD-100 に対する ARX-100 およびトレハロースの添加効果を比較した結果、トレハロースは濃度依存的に顕著な老化抑制効果を示したが、ARX-100 の効果はそれよりも低かった。一方、T_g 曲線の比較において、MD-100 と ARX-100 との間に大きな相違は無かった。ARX-100 は高分子デキストリンと同程度の T_g 曲線を示しながら、低分子デキストリンのように老化しない性質を持つユニークな多糖素材といえる。

dextrin with α-1,6 glucosyl residues, glass transition temperature, retrogradation

講演番号：3A02a11
講演日時：3 月 27 日 11:40～ センター2 号館 A02 会場

フード 3D プリンタにより食感を作り出す
Designing Food texture using Food 3D printer

清水 純平、○武政 誠（東京電機大院理工）
Junpei SHIMIZU, ○Makoto TAKEMASA (Tokyo Denki Univ.)

【背景】 食は栄養源であるばかりか、文化として食産業を大きく発展させる原動力となっている。天然物をカットして混合し、また加熱調理するという太古から続く調理法は、トップダウン式の調理といえる。一方、分子レベルでの化学反応や自己組織化を積極的に利用するボトムアップ法による分子調理学の概念も確立してから久しい。両者を組み合わせて、近年様々な添加剤の利用や加工法が開発されており、ここ数十年の食産業の発展は目覚ましいものがある。トップダウンで実現可能な数mmスケールの構造と、ボトムアップで通常構築可能な数nmの中間は、食感を支配する不均一構造の源となっている。食のおいしさのうち、60%超は食感に支配されるとも言われており、この10^{-9}～10^{-3}mの6桁に及ぶ空間スケールをどのように設計、及び製造するか、は大きな課題である。この溝を埋める事が究極の調理になると我々は考えており、3Dプリンタを利用した解決法を模索しながら必要な要素技術開発を行っている。機械や建造物をCADで設計するように、PC上で自在に食感を設計し、その場で３Dプリントする未来を実現するために、必要な要素技術を特定し、開発を行っている。フード3Dプリンタを使用して食感を制御した造形が可能となれば、全く新しい食品製造技術となり、前述のメゾスケールの構造構築にも貢献できるばかりか、実際の応用、例えば、個人の健康状態や嗜好に応じて食感や外観を変えることができる介護食はもちろん、新食感の食品造形、機能性を付与した次世代を担う食品製造および調理法になると期待される。

【方法】 市販の付加造形法に３Dプリンタ、特に熱可塑性樹脂を利用するFFF(Fused Filament Fabrication)式の装置をベースに改造を施し、ペースト状食品を押し出す装置を取り付けて、食品を同時に複数素材出力可能なシステムを構築して、食品の内部構造を設計通りに作りこむことにより、食感を設計、制御することを試みた。

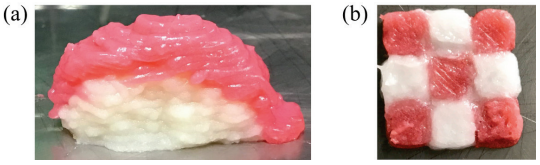


Fig.1 Typical printed 3D food objects. (a) Sushi based on protein- and carbohydrate-based food ink, and (b) Structure and rheological heterogeneity fabricated by using two food ink.

【結果】 フードインクとして、我々が開発した大豆分離タンパク質を主成分としたタンパク質インクAとラードを主成分とした脂質インクBの2種類を利用した。炭水化物インクCも利用して自在な形状での造形(Fig1.aの寿司など)が可能である。構造異方性を起源とした食感設計、および造形(Fig.1b)を行い、造形した食品を、圧縮試験機（テクスチャーアナライザ）を利用して、食感の評価を行った。単一のフードインクを利用しても、不均一構造による食感の創生は可能であったが、異なるレオロジー特性を有する2種類のフードインクを使用することで、さらに幅の広い食感を再現、また新しい食感を産みだす自由度が広がった。食感は、大変形、つまり非線形領域におけるレオロジー特性を直接反映しており、理論やモデルに基づいて意図した食感を設計することは必ずしも容易ではないが、要素となる構造不均一性として、多層構造やシリンダー構造を造形し、その構造による効果を実証するとともに、フードインクのレオロジー特性の影響を調べた。

Food 3D printing, Texture, Rheology

発表責任者：武政誠（takemasa@dendai.ac.jp）

講演番号：3A02a12
講演日時：3 月 27 日 11:51～ センター2 号館 A02 会場

フード３D プリンタ用フードインクのレオロジー特性測定装置開発

Development of rheological properties of food ink for food 3D printing

○渡邊 健太、武政 誠（東京電大）
○Kenta WATANABE, makoto Takemasa (TDU)

【背景】　３D プリンタは、迅速にかつ安価に複雑な形状を製造可能にする技術であり、モノづくりの革命を担うといわれるなど、近年食品製造技術としても注目を集めている。我々は積層造形方式のプラスチック造形用３D プリンタをベースに、フード３D プリンタの試作機を開発した。シリンジポンプを利用して、ペースト状食材（フードインク）を細径のニードルから、指定した平面座標に指定量押し出し、多層に積層することで立体造形を行う方法を採用している。積層造形方式のフード３D プリンタ開発の障害となるのは、食材の持つ複雑なレオロジー特性と、造形時におけるレオロジー特性への要請である。フードインクを細径のニードルから押し出す際は、低粘度化が求められるが、押し出し直後に高粘度化しなければ、造形物の形状を保持できない。また、造形物に歯ごたえを付与するためには弾性率についても、押し出し前と比較して数桁高めることが、食品の触感再現、造形幅を拡大するために必須である。このような要請の中、ゲル化剤や増粘剤などの添加により、フードインクのレオロジー特性を調整することが必要である。これらのレオロジー改質により、応力緩和が生じるなどにより、押し出し時の制御法として単純な変異や荷重制御を利用しても、インクを設計通り設計場所で押し出すことができず、造形精度が低下する。一方、スクリューポンプによる送液では、３D プリンタが大型化することや、衛生面での課題があり、シリンジポンプ式のペーストエクストルーダーを、フードインクのレオロジー特性に合わせて制御する簡便な方法が求められている。
【方法】　ペースト状食材をシリンジから押し出す際にピストンに加わる、荷重の時間依存性を測定する装置を開発した。細径ニードルからの押し出しに加え、シリンジ出口付近におけるフードインクの流動など、様々なレオロジー特性を総合的に判定可能な、フードインクの実践的な物性評価データが得られる。シリンジ内食材の押し出しはパルスモーターにより制御し、押し出し時の力の測定には、ロードセルを用いた。パルスモーターによる押し出し制御が正常に動作しているかは、ポテンショメータによる位置測定によりモニターした。
【結果】　荷重の経時変化を各種フードインクについて測定を行ったところ、材料の粘弾性特性を反映していた。押し出しを開始直後、また停止直後に、応力緩和挙動など粘弾性体特有の挙動がみられた。これらの実測データをもとにシリンジポンプの押し出し制御へとフィードバックさせることで、シリンジポンプを利用して精度よく３D プリントできる食材の種類を増加させたり、造形を高速化することが期待できる。

food 3d printer, rheology, stress relaxation

発表責任者：武政誠（takemasa@mail.dendai.ac.jp）

講演番号：3A02a13
講演日時：3 月 27 日 12:02～ センター2 号館 A02 会場

機械学習によるスナック菓子の食感分析

Texture analysis of snacks by machine learning

○吉田 駿介、武政 誠（東京電機大理工）
○Shunsuke YOSHIDA, Makoto TAKEMASA (Tokyo Denki Univ.)

【背景】　食感は、おいしさの 6 割を支配するともいわれており、食においての重要な要素である。しかし、その定量化および分析法については問題もあり、解析法の改良が継続的に行われている。一般に、テクスチャーアナライザーを利用して特定のプロトコルによる食品の圧縮試験を実施し、その際記録された、圧縮に必要な力の時間依存性（テクスチャープロファイル）に基づいた解析が行われる。このテクスチャープロファイルから、特徴値を数点抽出して、それらの絶対値や比率を利用する従来の解析法では、実態を反映しない解析結果となるケースが問題となっている。例えば、粘弾性体の付着性評価を、介護食に適用して安全性を評価できるか、などのケースが該当する。また、実際には異なる食感であるにもかかわらず、破断力と破断変異で比較すると同じ食感と判断されてしまう場合が報告されている。このような問題は、食品が多成分系であり、大変形が主となる食感分析においては圧縮試験の結果が複雑になりすぎて解析が不可能という問題が背景にある。圧縮に利用する器具の形状を、前歯を模した形状とするか、奥歯の形状とするか、舌を模した器具を使うかによってもテクスチャープロファイルは大幅に変わる。このような複雑系に対する解析法の欠如が、系を単純化し、モデル系による評価を重視する方向へと過去 50 年、食感分析法自体が推移してる背景である。

【目的】　機械学習を用いてテクスチャープロファイルにおける力の全データを基に、食感を分析する。特に、テクスチャープロファイルから、圧縮された食品を判別させる方法を確立する。

【方法】　市販のスナック菓子（コーンやポテトを材料として成型したもの、また天然物をカットして揚げたものなど）を、形状やサイズをそろえることなく、そのまま試料として利用した。テクスチャーアナライザーでスナック菓子の圧縮試験データを取得した。深層学習によりテクスチャープロファイルを教師ありで学習させ、スナック菓子の食感を判別するニューラルネットワークを構築した。

【結果・考察】　１００～１０００回程度のテクスチャープロファイルを用いて各種ネットワーク構造を用いて学習を行い、学習に用いていないテクスチャープロファイルを与えた際に、どの食品を圧縮したデータであるかの推論を行った。9 割以上の正確度(accuracy)で、ポテトチップの種類（製品）を判別することなど、一連のスナック菓子の判別に成功した。従来の TPA と多変量解析に対して、機械学習による食感分析の利点として、特徴値を食品毎に規定する必要がない点があげられる。今後より広い食品へと適用が期待される。

Texture analysis, Machine learning, Snacks

発表責任者：吉田駿介（yoshishun0303@gmail.com）

講演番号：3A02p01
講演日時：3 月 27 日 13:50～ センター2 号館 A02 会場

食餌脂肪量の違いがオリゴ糖摂取ラットの大腸 ALP 活性誘導をはじめとする腸内環境に及ぼす影響
Effects of different levels of dietary fats on the induction of colonic ALP activity and the modulation of gut luminal environment in rats fed oligosaccharides

○岡崎 由佳子、鈴木 毬那、東海林 綾香（藤女子大人間生活）
○Yukako OKAZAKI, Marina SUZUKI, Ayaka SHOJI (Fuji Women's Univ.)

【目的】Alkaline phosphatase (ALP) は，アルカリ性条件下でリン酸化合物を分解する糖タンパク質酵素で，細菌から高等動物まで幅広く分布している。近年，小腸型の Alkaline phosphatase(ALP)は，腸管内での抗炎症作用が指摘され，栄養条件による変動も報告されている。我々は，高脂肪食摂取ラットにおいて，水溶性食物繊維や難消化性オリゴ糖といった発酵性難消化性糖質が共通して，大腸特異的に ALP 活性と遺伝子（*IAP-I*）の発現を特異的に増加させることを明らかにした[1),2)]。また，このとき大腸 ALP 活性は，腸管バリア機能の指標である糞中 Mucin 含量と正の相関関係にあることや，腸内細菌叢の変動と関連性がある可能性を示した。さらに最近，オリゴ糖摂取による高脂肪食摂取ラットの大腸 ALP 活性をはじめとする腸内環境関連因子への影響は，摂取する脂質の種類によって異なり，特に Lard 食の条件で顕著であることを示した。本研究では，食餌脂肪として Lard の添加レベルを変えた条件下で，難消化性オリゴ糖摂取の大腸 ALP 活性と遺伝子発現に及ぼす影響を検討した。

【方法】4 週齢の SD 系雄ラットを用いた。実験食として低脂肪（5% Lard）食または高脂肪（30% Lard）食を用い，それぞれの飼料に 4%フルクトオリゴ糖（FOS）をセルロースに置き換えて添加した 4 群を設け，14 日間飼育した。飼育終了後，大腸，小腸及び糞中 ALP 活性の測定と，大腸 ALP 遺伝子（*IAP-I*, *Akp3*, *Alpl*）の発現解析（RT-PCR 法）を行った。さらに，糞中 Mucin（蛍光光度法），盲腸有機酸（HPLC 法），糞中の腸内細菌叢（qPCR 法）を解析した。

【結果】FOS 無添加群においては，食餌脂肪量の違いによる大腸 ALP 活性をはじめとする腸内環境関連因子への顕著な影響は認められなかった。一方，高脂肪食では FOS 添加により大腸 ALP 活性と ALP 遺伝子（*IAP-I*）発現が有意に増加したが，低脂肪食では FOS 摂取による影響は認められなかった。同様に，FOS 摂取による糞中 Mucin 含量，盲腸重量と盲腸内酪酸含量の増加および盲腸内容物 pH と *Clostridium coccoides* の低下も低脂肪食と比較して高脂肪食の条件下で顕著であった。小腸 ALP 活性については本実験条件による影響は認められなかった。以上より，FOS 摂取による大腸 ALP 活性と遺伝子発現の影響は，Lard の添加レベルが高い条件下で顕著であり，Mucin，有機酸，腸内細菌叢についても同様な影響が示された。

1) Nutrition Research, 2017, 43, 43-50　2) British Journal of Nutrition, 2019, 121, 146-154

Alkaline phosphatase, Levels of dietary fats, Rats

講演番号：3A02p02
講演日時：3 月 27 日 14:01～ センター2 号館 A02 会場

食用きのこの種類別による腸内細菌叢に与える影響の比較

Effect of different types of edible mushrooms on the gut microbiota

○清水 崇光[1]、森 光一郎[1]、小林 仁[1]、都築 毅[2] ([1]ホクト株式会社きのこ総合研究所、[2]東北大農)
○ TAKAMITSU SHIMIZU[1], KOICHIRO MORI[1], HITOSHI KOBAYASHI[1], TSUYOSHI TSUDUKI[2] ([1]Hokuto Corp., [2]Tohoku Univ.)

【目的】きのこは日本では馴染みのある食材であり、多くの種類が存在する。きのこは食物繊維やビタミン類が多く含まれ、きのこの食物繊維は野菜とは異なる種類が含まれる。近年の日本の食生活は脂質の多い欧米の食文化の普及により、肥満の増加や腸内環境の悪化が懸念されている。きのこは食物繊維が多く含まれることから抗肥満作用、腸内細菌叢改善作用などの報告があるが、きのこの種類別による腸内細菌叢に及ぼす影響を比較・検討した報告は殆どない。そこで本研究では、マウスに種類の異なる食用きのこを含む高脂肪食を摂取させ、腸内細菌叢の変化を比較した。
【方法】日本で一般的な食用きのこであるブナシメジ (Hm)、エリンギ (Pe)、マイタケ (Gf) をそれぞれ加熱後、凍結乾燥した。また、きのこの単体と複合の影響の差を検証するために 3 種のきのこの凍結乾燥物を等量混合した (Mmix)。さらに、きのこと野菜の影響の違いを検証するために、日本で消費量の多い大根、玉ねぎ、キャベツ、白菜、人参をそれぞれ加熱後、凍結乾燥し等量混合した (Vmix)。高脂肪食に凍結乾燥物をそれぞれ 3.0 % 加え、試験食を作製した。C57BL/6J マウス (5 週齢、雄性) に通常食 (ND)、高脂肪食のみ (HD) および混合食をそれぞれ 4 週間自由摂食させ、4 週間後の体重、臓器重量、血中脂質量および糞便中の腸内細菌叢の変化を検証した。
【結果】HD 群に対し、きのこおよび野菜を摂取した群で、終体重および血中脂質量に有意な差は見られなかったが、Pe 群は内臓脂肪量の増加が有意に抑制され、血中の脂質過酸化を抑える傾向が見られた。腸内細菌叢の全体的な変化を検証するために多変量解析を行った結果、ND 群に対し、HD 群で顕著な変化が見られたが、Pe 群は HD 群と異なり、ND 群に近い細菌叢が見られた。腸内細菌の科および属レベルの解析において、Hm 群および Pe 群では、多糖類を分解し、短鎖脂肪酸を産生する *Lachnospiraceae* の増加が見られた。また、Vmix 群では食物繊維を分解する *Prevotella* が顕著に増加したが、きのこの摂取では増加しなかった。
【考察】きのこの種類の違い、およびきのこと野菜の違いにより、体内および腸内細菌叢に及ぼす影響に差があることが示唆された。この要因として、それぞれに含まれる食物繊維の量、種類および構造の違いによるものと推測した。群間の中で Pe 群は高脂肪食により変化した腸内細菌叢を通常食の腸内細菌叢に近づける傾向が見られ、また、肥満抑制効果のある短鎖脂肪酸産生菌の増加が見られたことから、群間の中で高い内臓脂肪蓄積抑制効果が見られたと考えられた。以上のことから、きのこの中でもエリンギは抗肥満および腸内環境改善効果が高いことが示唆された。

mushroom, gut microbiota, obesity

発表責任者：清水　崇光（takamitsu.shimizu@tohoku.ac.jp）

講演番号：3A02p03
講演日時：3 月 27 日 14:12～ センター2 号館 A02 会場

Preventive Effects and Mechanisms of Garlic on Dyslipidemia and Gut Microbiome Dysbiosis

○Keyu CHEN, De-xing Hou (Kagoshima Univ.)

Introduction: Garlic (Allium sativum L.) has long been used for both culinary and medicinal purposes by many cultures. Many functions of garlic have been reported, but the influence on gut microbiome is unclear. Fructan is a polymer of fructose molecules in garlic, short chain fructan is known as fructo-oligosaccharides, which is indigestible food fiber hardly to be utilized by human been and has potential effect to modify gut microbiome. Garlic organosulfur compounds (OSCs) are mainly responsible for the biological activities. The complex ingredients of garlic seem to impart a paradoxical result on the gut microbiome. Therefore, it is necessary to know the effect of garlic supplements on gut microbiome, and we challenge to clarify the effects and mechanisms of garlic on gut microbiome using a mouse model with normal or high-fat diet, supplementing garlic and positive control, dextrin.

Methods: The C57BL/6N male mice (5-week-old) were housed separately with free access to water and feed. After acclimatization for 10 day (6 weeks age), the mice were randomly divided into 6 groups (n=5): ND (normal diet), NDA (5% garlic), NDD (4% dextrin in ND), HFD (high-fat diet), HFDA (5% garlic), HFDD (4% dextrin in HFD), and fed for 12 weeks. The faeces were collected at 0 and 12 weeks. Serum transaminases were measured by clinical analyser, insulin was examined by ELISA. The short chain fatty acid concentration of cecum content was measured by HPLC. The sections of ileum were stained with H&E and observed using electron microscope. Genomic DNAs from faeces were extracted using the Fast DNA spin kit and were used to identify the gut microbiome by sequencing 16S rRNA genes.

Results: Supplementation with whole garlic attenuated HFD-enhanced ratio of serum GPT/GOT (glutamic-pyruvic transaminase/glutamic-oxaloacetic transaminase), levels of T-Cho (total cholesterol) and LDLs (low-density lipoproteins), and index of homeostatic model assessment for insulin resistance (HOMA-IR), but had no significant effect in the levels of serum HDL-c (high density lipoprotein cholesterol), TG (total triacylglycerol), and glucose. Moreover, garlic supplementation meliorated the HFD-reduced ratio of villus height/crypt depth, cecum weight, and the concentration of cecal organic acids. Finally, gut microbiota characterization by high throughput 16S rRNA gene sequencing revealed that whole garlic supplementation increased the α-diversity of the gut microbiome, especially increasing the relative abundance of f_*Lachnospiraceae* and reducing the relative abundance of g_*Prevotella*.

Taken together, our data demonstrated that whole garlic supplementation could meliorate the HFD-induced dyslipidemia and disturbance of gut microbiome.

gut microbiome, garlic

講演番号：3A02p04
講演日時：3 月 27 日 14:23～ センター2 号館 A02 会場

サツマイモ焼酎粕を用いた麹菌培養物のコレステロール代謝と腸内細菌叢に与える影響
Effects of fermented products using *koji* mold and sweet potato-*shochu* derived distillery by-product on cholesterol metabolism and gut microbiota

○小境 敏揮[1,2]、加藤 寛隆[3]、章 超[2]、河野 邦晃[2]、岩井 謙一[2]、髙瀬 良和[2]、小川 健二郎[4]、西山 和夫[1,3]、山﨑 正夫[1,3] ([1]宮崎大院・農工総合、[2]霧島酒造、[3]宮崎大・農、[4]宮崎大・テニュアトラック推進機構)
○Toshiki KOSAKAI[1,2], Hirotaka KATO[3], Cho SHO[2], Kuniaki KAWANO[2], Ken-ichi IWAI[2], Yoshikazu TAKASE[2], Kenjiro OGAWA[4], Kazuo NISHIYAMA[1,3], Masao YAMASAKI[1,3] ([1]Interdiscip. Grad. Sch. of Agric. and Eng., Univ. of Miyazaki, [2]Kirishima shuzo Co., Ltd., [3]Grad. Sch. of Agric., Univ. of Miyazaki, [4]Organization for Promotion of Tenure Track, Univ. of Miyazaki)

＜背景・目的＞
麹菌は、焼酎や清酒、味噌、醤油など日本の伝統的な醸造・発酵食品に広く用いられてきた微生物の 1 つである。我々はこれまでに、サツマイモ焼酎粕の液体部分を培地として利用し、麹菌を液体培養して得られた麹菌培養物（FPs）が通常食飼育条件下において、体重増加抑制作用や血清コレステロール低下作用を有することを明らかにした[1, 2]。さらにコレステロール負荷条件で FPs を与えたときのコレステロール代謝への影響を評価したところ、仮説に反して血清及び肝臓コレステロールの値が有意に増加したこと、コレステロール代謝に関わるタンパク発現には影響しなかったことを報告した[3]。本研究では、糞中の胆汁酸組成や腸内細菌叢、短鎖脂肪酸について解析したので、報告する。
＜方法＞
サツマイモ焼酎粕は、霧島酒造本社工場よりサンプリングし、圧搾濾過した液体部分を培地として用いた。種麹より調製した分生子懸濁液を培地に接種し、麹菌を培養した。得られた菌体を凍結乾燥後に粉砕して、実験サンプルとした。実験動物として C57BL/6N マウスを用い、AIN-93G に準拠した通常食と 10%FPs 混合食、また 0.5%コレステロールと 0.25%コール酸ナトリウム添加食を与える 4 群に分けて、それぞれ給餌した。飼育 8 週間後の糞を回収し、解析に供した。
＜結果・考察＞
FPs を摂食させることにより、2 次胆汁酸が有意に減少した。FPs 摂食は酪酸生産菌である *Clostridium* cluster IV と XIVa の相対量が増加させる傾向がみられた。さらに糞中の短鎖脂肪酸レベルを解析すると、FPs によって酪酸レベルが有意に増加した。以上の結果から、2 次胆汁酸の減少と短鎖脂肪酸レベルの増加に伴う腸内細菌叢の変化は、FPs 中に含まれている食物繊維による効果であることが示唆された。

1) 小境ら，2018 年度日本農芸化学会大会
2) 小境ら，醸協，114(5): 294-301. (2019)
3) 加藤ら，2019 年度日本生物工学会大会

koji, cholesterol, gut microbiota

発表責任者：山崎正夫（myamasaki@cc.miyazaki-u.ac.jp）

講演番号：3A02p05
講演日時：3 月 27 日 14:34～ センター2 号館 A02 会場

整腸作用を有する食品による便臭低減評価～便臭の主観・客観評価の乖離～

Evaluation of fecal odor reduction by improving intestinal environment with foods ~ Deviation of subjective and objective evaluation of fecal odor ~

○小田 由里子[1]、水木 将[2]、関 忍[1]、野見山 哲生[2]([1]富士フイルム、[2]信州大医)
○ Yuriko ODA[1], Masaru MIZUKI[2], Shinobu SEKI[1], Tetsuo NOMIYAMA[2] ([1]FUJIFILM Corporation, [2]Shinshu Univ.)

【目的】デチンムル科のサラシア属植物の有効成分（サラシノール等）は、小腸のα-グルコシダーゼ活性を阻害し、吸収抑制された糖類は消化管内で腸内環境改善作用をもたらす。我々はサラシア属植物エキス（以下 SE）の腸内細菌叢変化を通じた生体調整機能に着目し、他食品との作用比較試験や、ヒト免疫機能に対する評価を行い、SE は、他の整腸食品と比較し強い腸内細菌叢に対する作用を有していること、加齢に伴い低下する免疫機能を活性化することを示してきた。

腸内細菌叢変化による影響の一環として、腸内産生物の変化及びそれに伴う便臭の変化が考えられるが、客観的な便臭原因物質量と体感について比較した研究は少ない。そこで、本研究においては、モデル食品として SE を用い、SE 摂取が便臭に与える作用を主観的手法と客観的手法で評価し、両者の結果を比較することとした。

【方法】健常な中高齢男女を対象とし、二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験を実施した。1 日 3 回（毎食前）、4 週間の試験食品摂取を行い、摂取前と試験開始 2 週間後、試験終了後に糞便採取とアンケート（便のにおい、排便状態）を実施した。便については、アンモニア量、腐敗産物（フェノール、インドール、p-クレゾール、スカトール、4-エチルフェノール）量、pH、水分量の測定を行った。

【結果・考察】プラセボ摂取群との比較の結果、SE 摂取群において、アンモニア量、腐敗産物量の有意な低下が認められた。また、水分量の上昇傾向を合わせて確認した。一方、主観的評価項目である排便時の便自体のにおいや排便後感覚に関しては、SE、プラセボ両摂取群において改善傾向が見られ、群間で差は認められなかった。さらに、全研究対象者において客観・主観両評価結果を比較したところ、両者には乖離が見られ、便臭原因物質が増加しているにも関わらず、においは感じにくくなるなど、食品摂取という行為自体が体感（主観評価）に影響を与える、プラセボ効果と思われる作用が多く見られた。

以上の結果から、SE は中高齢健常者において便中の便臭原因物質を減少させることが明らかになった。また、現在用いられている便臭評価において、客観的手法と主観的手法による評価結果は一致しないことも明らかになった。今後、腸内環境・排便状態の評価を行う際には、試験参加人数の検討や事前トレーニングによる評価基準統一など、評価者の感覚の個人差を是正する工夫を行うとともに、現状の評価手法の不足部分を補う新規評価方法の開発が重要であると考える。

Salacia, intestinal environment, fecal odor

発表責任者：小田　由里子（yuriko.oda@fujifilm.com）

講演番号：3A02p06
講演日時：3 月 27 日 14:45～ センター2 号館 A02 会場

ヒト腸内細菌培養モデルを用いた複合プロバイオティクスの評価
Evaluation of Complex Prebiotics Using Human Intestinal Mocrobiota Culture Model
○山口 大貴[2]、藤田 絢弥子[1]、金谷 忠[2]、河野 麻実子[2]、児玉 高幸[2]、川上 宏智[2]、稲垣 瑞穂[1] ([1]岐阜大・応用生物、[2]森下仁丹株式会社 ヘルスケア事業本部 ヘルスケア研究開発部)
○ Taiki YAMAGUCHI[2], Ayako FUJITA[1], Tadashi KANAYA[2], Mamiko KOHNO[2], Takayuki KODAMA[2], Hirosato KAWAKAMI[2], Mizuho INAGAKI[1] ([1]Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University, [2]Morishita Jintan Co.,Ltd. Health Care Product Department)

【目的】
健康志向の高まりに伴い，プロバイオティクス効果を期待する食品が数多く販売されている。しかしながら，プロバイオティクスの摂取がヒト腸内環境にどのような影響を与えるのかは不明である。本研究では，ヒト糞便を用いた腸内細菌培養モデル用いて（Takagi *et al.*, PLoS ONE, 2016），複合プロバイオティクス摂取が腸内 pH や有機酸産生に与える影響を明らかにすることを目的とした。
【方法】
被験者は便秘傾向の女性 4 名 vol.1（69F），vol.2（53F），vol.3（55F），vol.4（40F）をリクルートした。プロバイオティクスは *Bifidobacterium* 属 3 種，*Lactobacillus* 属 3 種の計 6 種の菌末を滅菌水に懸濁して用いた。GAM 培地 99 mL を 3 つ用意し，滅菌水 1 mL（コントロール），菌末液 1 mL（P-1；総菌数 約 3 億個/GAM 100 mL），菌末液 1 mL（P-10；総菌数 約 33 億個/GAM 100 mL）のいずれかを加えた。糞便は生理食塩水に懸濁したのちに 100 µL ずつ播種して嫌気培養を開始した。培養液 pH を継続的に記録し，培養開始から 0，10，24 時間後にサンプリングした。培養液は，主要 5 種の有機酸解析，*Bifidobacterium* 属および *Lactobacillus* 属の菌数の定量に供した。岐阜大学医学倫理審査委員会 承認 No.29-382
【結果】
pH 変化：すべての被験者で P-10 処方の投与による pH の低下が観察された。この pH 低下は培養 4～8 時間後から始まっていた。その後，vol.1 と vol.3 では培養 15 時間以降から pH の上昇が見られたが，vol.2 と vol.4 では培養 15 時間以降も pH の上昇が見られなかった。この培養 15 時間以降の P-10 処方に対する pH 変動の特徴から，被験者を 2 つのタイプに分類した［Type A：pH 回復が見られる/ Type B：pH 回復が見られない］。有機酸解析：培養 10 時間では，すべての被験者においてプロバイオティクス投与量依存的に乳酸の比率が上昇していた。P-1 処方の 24 時間培養液から，Type A では酪酸，Type B ではコハク酸が特徴的に検出された。定量 PCR：P-1 および P-10 処方の投与による培養 24 時間での *Lactobacillus* 属の顕著な増加が被験者に共通して観察された。コントロールの培養開始前と培養 10 時間の *Bifidobacterium* 属の菌数を比較したところ， Type A では 10^2 程度の増加であったのに対して Type B では 10^4 レベルの急激な増加が見られた。以上より，個人によって腸内細菌叢による代謝プロファイルが異なり，プロバイオティクスの作用機構に影響を与える可能性が考えられた。

Probiotics, Gut microbiota, Human Intestinal Model

講演番号：3A02p08
講演日時：3 月 27 日 15:17～ センター2 号館 A02 会場

OLL1073R-1 乳酸菌で発酵したヨーグルトの摂取による、睡眠の改善および消化器症状への影響を介した精神系 QOL への効果

Consumption of yogurt fermented with Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus OLL1073R-1 improve psychological quality of life in women's healthcare workers: a randomized controlled trial

○丸山 広達[1]、木下 徹[2]、狩野 宏[3]、牧野 聖也[3]、陶山 啓子[4]、西嶋 真理子[4]、赤松 公子[4]、城賀本 晶子[4]、片上 貴久美[4]、斉藤 功[5] ([1]愛媛大農、[2]ちいき進かがく株式会社、[3]株式会社 明治 研究本部 乳酸菌研究所、[4]愛媛大医、[5]大分大医)
○Koutatsu MARUYAMA[1], Tetsu Kinoshita[2], Hiroshi Kano[3], Seiya Makino[3], Keiko Suyama[4], Mariko Nishijima[4], Kimiko Akamatsu[4], Akiko Jogamoto[4], Kikumi Katagami[4], Isao Saito[5] ([1]Graduate School of Agriculture, Ehime University, [2]Institute of Community Life Sciences Co., Ltd., [3]Food Microbiology Resarch Laboratories, R&D Division, Meiji Co. Ltd., [4]Ehime University Graduate School of Medicine, [5]Oita University)

【目的】

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* OLL1073R-1(OLL1073R-1 株)で発酵したヨーグルトを摂取することによる、睡眠状態、主観的健康感、胃腸の状態への効果を検証するため、女性医療従事者を対象とするオープン無作為化並行群間比較試験を行った。

【方法】

愛媛県内の医療機関に勤務する成人女性 961 名(20−71 歳)を対象に、ヨーグルト群 479 名(39.3±11.5 歳)および対照群 482 名(39.4±11.4 歳)への無作為割付を行った。ヨーグルト群は OLL1073R-1 株で発酵したヨーグルトを 1 日 1 本 16 週間摂取し、その他のヨーグルトや乳酸菌飲料等の摂取を禁止した。一方、対照群はすべてのヨーグルトや乳酸菌飲料の摂取をしなかった。16 週間の前後で、ピッツバーグ睡眠質問票(PSQI)による睡眠状態の評価、Eight-item Short Form Health Survey (SF-8)による心身の QOL の評価、Gastrointestinal Symptom Rating Scale (GSRS)による胃腸の状態の評価をそれぞれ行った。

【結果】

PSQI スコアにおいて、ヨーグルト群は対照群に比べ、大きく低下した(ヨーグルト群 5.50→5.03、対照群 5.33→5.22、$p < 0.01$)。また、SF-8 スコアに関しては GH(全体的健康感)および VT(活力)において、ヨーグルト群は非摂取群に比べ大きく上昇した(GH：ヨーグルト群 49.2→50.1、対照群 49.1→48.9、$p = 0.02$、VT：ヨーグルト群 49.6→50.5、対照群 49.4→49.2、$p = 0.01$)。GSRS の「便秘尺度」においてヨーグルト摂取群は対照群よりも便秘症状が抑えられていた(ヨーグルト群 1.74→1.72、対照群 1.76→1.84、$p = 0.03$)。さらに、ヨーグルト群において SF-8 スコアの変化量と PSQI スコアの変化量の相関分析を行ったところ、緩やかながら有意な負の相関が認められた(r=-0.26、$p < 0.0001$)。

【結論】

本試験の結果、OLL1073R-1 株発酵ヨーグルトによる睡眠状態や精神系 QOL に良好な変化が、また便秘症状が抑えられる効果が示された。睡眠の質が向上や胃腸の状態が維持されることによる、全体的健康感や疲労などなど精神系の QOL に効果が見られたものと考えられる。

Yogurt, OLL1073R-1, QOL

講演番号：3A02p09
講演日時：3 月 27 日 15:28～ センター2 号館 A02 会場

Lactobacillus crispatus KT-11 のヒト表皮角化細胞における皮膚保護能の検討
Evaluation of skin protective potential of *Lactobacillus crispatus* KT-11 on Human epidermal keratinocytes
○星 芙美香、渡邉 樹（株式会社キティー）
○Fumika HOSHI, Itsuki WATANABE (KITII Corporation)

【背景・目的】*Lactobacillus crispatus* KT-11（KT-11 株）は、マウス細胞培養系において Th1 を強く誘導する乳酸菌株としてスクリーニングされ、これまでにアレルギーの改善作用や感染症に対する予防的作用などが示されている。しかしながら、KT-11 株の肌に対する機能の詳細は明らかになっていない。そこで本研究では、KT-11 株の化粧料としての有用性を検討することを目的とし、KT-11 株がヒト表皮角化細胞に与える影響を検討した。
【方法】ヒト表皮角化細胞を 1×10^5cells/ml/well に調製し培養した。培養後、KT-11 株を添加して 24 時間および 48 時間培養した。24 時間培養後の細胞から total RNA を回収し、そのうち無添加群と KT-11 株 添加群の total RNA を対象に DNA マイクロアレイ解析を行い、KT-11 株添加による mRNA 発現の変化を網羅的に解析した。DNA マイクロアレイにより発現変動が認められた遺伝子に関して、同 total RNA を用いて定量 RT-PCR 法による mRNA 発現解析を行った。また、48 時間培養後の培養上清を用いて、ELISA 法によりヒアルロン酸量を測定した。
【結果・考察】DNA マイクロアレイ解析の結果、KT-11 株 はヒアルロン酸合成酵素 3(Hyaluronan synthase:*HAS3*)、スーパーオキシドジスムターゼ 2(superoxide dismutase 2: *SOD2*)の発現量を増加させ、マトリックスメタロプロテイナーゼ-3(Matrix metalloproteinase-3: *MMP-3*)の発現量を減少させた。これらの遺伝子を定量 RT-PCR 法により解析した結果、KT-11 株濃度依存的な *HAS3* および *SOD2* の発現増加、*MMP-3* の発現減少が示された。さらに、培養上清のヒアルロン酸量も KT-11 株濃度依存的な増加が認められた。以上の結果により、KT-11 株の保湿効果をはじめとした皮膚機能改善効果が期待される可能性が示唆された。

Lactobacillus crispatus KT-11, keratinocyte, hyaluronic acid

講演番号：3A02p10
講演日時：3 月 27 日 15:39～ センター2 号館 A02 会場

腸管上皮尿酸トランスポーターABCG2 の発現を制御する食品成分の探索・解析
Search and analysis of food components enhancing intestinal epithelial urate transporter ABCG2 expression

○榎本 泰大[1]、近藤 泰嗣[2]、豊田 優[3]、鈴木 洋史[3]、高田 龍平[3]、仁科 淳良[4]、薩 秀夫[2]([1]前工大院・工、[2]前工大・工、[3]東大病院・薬剤部、[4]日大・理工)
○Yasuhiro ENOMOTO[1], Taishi KONDO[2], Yu TOYODA[3], Hiroshi SUZUKI[3], Tappei TAKADA[3], Atsuyoshi NISHINA[4], Hideo SATSU[2] ([1]Grad. Sch. of Eng., Maebashi Inst., of Technol., [2]Maebashi Inst., Technol., [3]The univ. of Tokyo Hospital, [4]Nihon univ.)

【目的】尿酸はヒトにおけるプリン体の最終代謝産物であるが、現代の食生活や運動不足といった生活習慣などの要因により血清尿酸値の上昇が懸念されている。血清尿酸値が高値になると痛風や尿路結石を発症しやすくなることに加え、近年では高血圧・糖尿病などの発症との関連性が報告されている。尿酸トランスポーターABCG2 は腸管における尿酸排出に大きく関与しており、腸管上皮細胞において尿酸を細胞内から管腔側細胞外（消化管内）へ排泄することが報告されている。したがって小腸における ABCG2 の発現活性を亢進することは、血清尿酸値を低下させることに繋がると考えられる。しかしながら、ABCG2 の発現を制御する食品成分に関する報告はあまりなされていない。そこで本研究では、ABCG2 の発現を制御する食品成分を探索し、さらにその制御機構を解析することとした。
【方法】ホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に hABCG2 のプロモーター領域を含むレポーターベクターをヒト腸管上皮モデル Caco-2 細胞に一過的に遺伝子導入した後、フィトケミカルまたはミャンマー生薬抽出物を添加し、ルシフェラーゼ活性を測定して ABCG2 プロモーター活性を評価した。また Caco-2 細胞にフィトケミカルまたはミャンマー生薬抽出物を添加してインキュベートした後、Real-time PCR 法および Western blot 法を用いて ABCG2 の mRNA 発現量およびタンパク質発現量を測定した。
【結果】およそ 35 種類のフィトケミカルの中から、ABCG2 プロモーター活性を亢進するフィトケミカルのスクリーニングをレポーターアッセイにて検討した結果、フラボノイドである Baicalein および Tamarixetin が ABCG2 プロモーター活性を有意に亢進した。さらに、いずれのフラボノイドも ABCG2 の mRNA 発現量とタンパク質発現量を増加することを見出した。また、ABCG2 の転写を制御することが知られる芳香族炭化水素受容体（AhR）に着目しその応答安定高発現株を用いて AhR への作用を検討したところ、いずれのフラボノイドも AhR 依存的な転写活性を亢進した。これより、Baicalein 及び Tamarixetin は AhR を介して ABCG2 の転写活性・mRNA 発現を亢進することが示唆された。並行して、ミャンマー生薬のメタノール抽出物 20 種類の中から、ABCG2 mRNA 発現を亢進する抽出物を Real-time PCR 法にてスクリーニングした結果、*Mansonia gagei*（Mg）の抽出物が有意に ABCG2 の mRNA 発現を亢進することを見出した。またレポーターアッセイの結果、Mg は ABCG2 プロモーター活性も有意に亢進した。現在、*Mansonia gagei* のメタノール抽出物に含まれる ABCG2 の転写および mRNA 発現を亢進する成分の単離・同定を進めている。

uric acid, ABCG2, intestinal epithelial cell

発表責任者：薩　秀夫（satsu@maebashi-it.ac.jp）

講演番号：3A02p11
講演日時：3 月 27 日 15:50～ センター2 号館 A02 会場

ガーリック由来 diallyl trisulfide によるアセトアミノフェン誘導性肝障害抑制機構の解明

Elucidation of the inhibitory mechanism of acetaminophen-induced liver injury by diallyl trisulfide

○細野 崇[1,2]、折原 陸[2]、三浦 徳[2]、増澤（尾﨑） 依[2]、関 泰一郎[1,2] ([1]日大院・生資科・応生科、[2]日大・生資科・生命化)
○Takashi HOSONO[1,2], Riku ORIHARA[2], Atsushi MIURA[2], Yori OZAKI-MASUZAWA[2], Taiichiro SEKI[1,2] ([1]Nihon Univ. Grad. School of Bioresouce Sci., [2]Nihon Univ. Coll. Bioresouce Sci.)

【目的】 解熱鎮痛薬 acetaminophen (*N*-acetyl-*p*-aminophenol, APAP)は、肝臓でグルクロン酸転移酵素によりグルクロン酸抱合されたあと、尿中から体外に排出される。その一部は肝臓で酸化酵素の cytochrome P450 2E1 (CYP2E1)によって代謝され、毒性のある *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine (NAPQI)に変換されるが、直ちにグルタチオン抱合されて無毒化されたあと、尿中に排出される。しかし、過剰量の APAP を摂取すると、NAPQI が無毒化されずに生体内に残存し、急性肝障害が引き起こされることが知られている。これまでに我々はガーリック香気成分 diallyl trisulfide (DATS)をラットに 5 日間、経口投与すると、APAP の過剰投与による急性肝障害から肝臓を保護することを報告してきた (2016, 農芸化学会)。本研究では、DATS 経口投与による肝障害保護作用メカニズムを明らかにすることを目的に、薬物代謝酵素に及ぼす直接的な影響について検討した。
【方法】 Wistar ラット、オスに DATS を 500 μmol/kg 体重で 1 日 1 回、5 日間経口投与した(DATS 投与群)。Vehicle 投与群には溶媒として使用したコーン油を経口投与した。6 日目に APAP を 500 mg/kg 体重で腹腔内投与し､その 24 時間後に炭酸ガスによる安楽死と血液と肝臓のサンプリングを行った。血中の aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT)活性の測定、肝臓組織のヘマトキシリン・エオジン染色を行い、APAP 投与による肝障害を評価した。また、DATS 投与ラットに CYP2E1 の基質である chlorzoxazone (CLZ)を 50 mg/kg 体重で腹腔内投与し、経時的に血中濃度を測定することで肝臓の CYP2E1 活性を評価した。さらに肝臓ミクロソームと DATS を混合し、LC-MS/MS を用いて CYP2E1 と DATS のタンパク質修飾について検討した。
【結果】 Vehicle 投与群では APAP 投与により AST, ALT 活性が正常値と比べて高値を示した一方、DATS 投与群では、肝障害マーカーは vehicle 投与群と比べて低値を示した。また、肝臓の組織染色の結果、APAP 投与により中心静脈を中心に重篤な細胞障害が認められたのに対し、DATS 投与群で肝臓の障害部位が小さかった。さらに、DATS 投与は肝臓の CYP2E1 活性を低下させること、CYP2E1 のヘム鉄に配位したシステイン残基が酸化修飾されることを見出した。
【結語】DATS の経口投与は CYP2E1 活性を阻害することで APAP 投与による急性肝障害を抑制することが明らかとなった。現在、CYP2E1 以外の薬物代謝酵素に及ぼす影響について解析中である。

garlic, detoxification enzyme, acetaminophen

発表責任者：関 泰一郎（seki.taiichirou@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3A02p12
講演日時：3 月 27 日 16:01～ センター2 号館 A02 会場

食品中の活性硫黄の定量解析

Quantitative analysis of reactive sulfur in foods.

○菱山 純一、居原 秀、笠松 真吾（大阪府大）
○Junichi HISHIYAMA, Hideshi IHARA, Shingo KASAMATSU (Osaka Prefecture Univ.)

【背景】古来より、ニンニクやニラなどの硫黄成分を豊富に含む食品を摂取することは、さまざまな疾病の予防や健康増進につながると考えられている。これまでにニンニクなどに含まれるさまざまな硫黄化合物が同定され、その薬理活性についての研究が行われきた。例えば、ニンニク中の硫黄成分の一つであるアリインより生成されるジアリルジスルフィドやジアリルトリスルフィド (DATS)は、抗酸化活性を持つことが報告されている。近年、ヒトを含む哺乳動物や大腸菌、酵母などで、システインなどのチオール基に硫黄原子が過剰に付加したシステインパースルフィドなどの活性硫黄分子種 (reactive sulfur species)が生体内に酵素的に産生され、豊富に存在していることが明らかとなった。さらに、活性硫黄は高い求核性・抗酸化活性を介して、強力なレドックスシグナル制御因子として機能していること、ミトコンだおリアにおけるエネルギー代謝を制御していることが分かった。しかし、植物中での活性硫黄の生成動態や食品に含まれる活性硫黄については未だ明らかとされていない。そのため本研究では、植物性食品（野菜）や動物性食品（精肉・もつ）中の総硫黄化合物量および活性硫黄量を定量的に解析し、食品中の活性硫黄分子を含む硫黄化合物の含有量を評価した。
【方法】食品を湿式灰化処理し、発光分光分析装置を用いて食品中の総硫黄量を定量した。食品をアルカリ条件下で還元処理することで遊離する硫化物イオンを *N*-エチルマレイミド (NEM)で捕捉し、その生成物 硫化ジマレイミド(NEM-S-NEM)を質量分析装置を用いて総活性硫黄量として定量した。また、還元剤未処理の食品に NEM を処理し、生成される NEM-S-NEM を検出することで、活性硫黄の中でもさらに反応性の高い高活性硫黄量を定量した。
【結果・考察】本研究で測定したすべての植物性・動物性食品から活性硫黄が検出された。植物性食品中ではヒガンバナ科のニンニク、ニラ、タマネギ、アブラナ科のブロッコリーにおいて、動物性食品中では肝臓において総活性硫黄量が高いレベルで検出された。しかし、食品によって総硫黄と活性硫黄の存在比が異なり、総硫黄量と総活性硫黄量に相関はあまりみられなかった。また興味深いことに、ブロッコリースプラウトが総硫黄量、総活性硫黄量、高活性硫黄量すべてで高い値を示す一方で、ブロッコリーのこれらの数値はいずれもブロッコリースプラウトよりも低かった。これらの結果からから、ブロッコリーの発芽・成長の過程において活性硫黄量が変化する可能性が示唆された。現在、ブロッコリースプラウトを栽培し植物の成長段階と活性硫黄の連関について解析中である。

Reactive sulfur species, Sulfur, Antioxidant

講演番号：3A02p13
講演日時：3 月 27 日 16:21～ センター2 号館 A02 会場

非アルコール性脂肪肝を予防する食品成分の *in vitro* モデル系を用いた探索および解析

Search and analysis of food components which prevent non-alcoholic fatty liver disease using *in vitro* model system

○波津 優花[1]、本松 由衣[2]、山本 晃久[1]、仁科 淳良[3]、薩 秀夫[2]（[1]前工大院工、[2]前工大工、[3]日大理工）
○Yuka HAZU[1], Yui Motomatsu[2], Akihisa Yamamoto[1], Atsuyoshi Nishina[3], Hideo SATSU[2] ([1]Grad. Sch. of Eng., Maebashi Inst. Technol., [2]Maebashi Inst. Technol., [3]Nihon Univ.)

【目的】メタボリックシンドロームの中でも、飲酒歴がないにもかかわらずアルコール性脂肪肝症状に類似した症状である非アルコール性脂肪肝（非アルコール性脂肪性肝疾患、NAFLD）の患者数が近年増加している。NAFLD は非アルコール性脂肪肝炎へと進展すると、肝硬変・肝がんへと悪化するリスクが報告されている。そこで本研究では、NAFLD の予防作用が期待される食品成分などを探索する in vitro 評価系を構築し、実際に機能性成分の探索・解析を進めることとした。
【方法】ヒト肝モデル HepG2 細胞を 24 well plate に播種して 24 時間後、遊離脂肪酸不含培地（control）、遊離脂肪酸のパルミチン酸（PA）、オレイン酸（OA）、Mix（PA+OA の混合物）、またはフルクトースをそれぞれ含む培地を加えて、さらに 24 時間培養した。HepG2 細胞をパラホルムアルデヒドで固定化した後、Oil Red O で染色して脂肪滴の蓄積を観察した。さらにイソプロパノールを加えてインキュベートし、Oil Red O を溶出させてその吸光度を測定した。並行して、遊離脂肪酸及びフルクトース添加後の HepG2 細胞より細胞を可溶化し、細胞内トリグリセライド量(TG)を測定した。また、遊離脂肪酸 Mix を加える 3 時間前に食品成分を添加しさらに遊離脂肪酸 Mix と食品成分を添加して 24 時間インキュベートした後、脂肪滴の蓄積などを観察した。
【結果・考察】HepG2 細胞に遊離脂肪酸である PA、OA、Mix を 0.5 mM の濃度で添加した結果、Mix 添加群で脂肪滴の蓄積が確認された。さらに、Mix の PA：OA の濃度比率を 1：4 で添加した際に強い脂肪滴の蓄積が誘導され、実際に細胞内 TG 量の増加も明らかとなった。並行して、HepG2 細胞に 100mM のフルクトースを含んだ培地で 24 時間インキュベートしたところ、脂肪滴の蓄積が観察され、細胞内 TG 量の増加も確認された。そこで、ミャンマー生薬粗抽出物 13 種について、遊離脂肪酸 Mix による脂肪滴形成に対する影響を検討した結果、2 種の抽出物が脂肪滴蓄積を抑制することが見出された。現在、脂肪滴蓄積を抑制した粗抽出物 1 種をさらに分画したヘキサン抽出物、メタノール抽出物、酢エチ抽出物を用いて、脂肪滴蓄積を抑制する機能性成分の単離・同定を進めている。

NAFLD, HepG2, fructose

発表責任者：薩秀夫（satsu@maebashi-it.ac.jp）

講演番号：3A02p14
講演日時：3 月 27 日 16:32～ センター2 号館 A02 会場

肝星細胞における β カロテンの線維化抑制効果

The inhibitor effects of β-carotene on fibrosis in hepatic stellate LX-2 cells

○田代 純輝、橋本 堂史（神戸大院農）
○Junki TASHIRO, TAKASHI HASHIMOTO (Kobe Univ.)

【背景と目的】肝線維化は慢性肝炎に対する長期的な創傷治癒の過程であり、I 型コラーゲンなどに代表される細胞外マトリックス（extracellular matrix：ECM）が過剰に蓄積することで起こる。この肝線維化が進行すると肝硬変を引き起こし、肝星細胞（hepatic stellate cells：HSC）が大きく寄与することが知られている。正常な肝臓において HSC は静止状態にあるが、肝臓に傷害が起きたときに産生する活性酸素種やトランスフォーミング増殖因子-β（TGF-β）などの線維化促進性のサイトカインの影響を受けて活性化することで ECM を産生する。そのため HSC の活性化の抑制は肝線維化予防または治療においての有効なターゲットであると考えられる。肝線維化を予防または修復する食品成分には抗酸化作用をもつ成分を中心に報告されている。本研究では抗酸化作用を示すことが知られているβ-カロテンに着目し、ヒト肝星細胞株 LX-2 細胞の線維化に及ぼす影響を調べた。
【方法】LX-2 細胞を β-カロテンを含む無血清の D-MEM 培地で前処理したのち、線維化を誘導するため TGF-β1 を添加することで LX-2 細胞の活性化を誘導した。β-カロテンの予防効果は、細胞からタンパク質を抽出し、COL1A1（Ⅰ型コラーゲン α 鎖）の発現量をウェスタンブロッティング法により比較することで評価した。また、線維化のシグナル伝達に関与するタンパク質ついても免疫沈降法およびウェスタンブロッティング法を用いて調べた。
【結果】β-カロテンの前処理は濃度依存的（5～20 μM）に LX-2 細胞の TGF-β1 誘導性 COL1A1 の増加を抑制した。この抑制効果は TGF-β1 処理時に培地から β-カロテンを除去しても確認できたことから、β-カロテンが培養液中の TGF-β1 に作用することなく、肝線維化を抑制すると考えた。また β-カロテンの前処理は Smad3 のリン酸化を抑制しなかったが、その下流にある Smad3 と Smad4 の複合体形成を抑制すると共に、その複合体形成に関わる Erk1/2 のリン酸化を抑制した。一方、I 型コラーゲンの分解系において、TGF-β1 は I 型コラーゲンを分解する matrix metalloproteinase-1（MMP-1）の発現を阻害すると共に、MMP-1 の活性を阻害する tissue inhibitors of metalloproteinase-1（TIMP-1）の発現を促進することで、線維化が促進することが知られている。しかし、β-カロテンは TGF-β1 処理による MMP-1 の発現抑制や TIMP-1 の発現促進に影響を及ぼさなかった。以上のことから、β-カロテンは I 型コラーゲンの分解系を促進するのではなく、TGF-β1 シグナルによる Erk1/2 の活性化を抑制すると共に Smad3 と Smad4 の複合体形成を抑制し、その結果として I 型コラーゲンの増加を抑制していると考えた。

β-carotene, liver fibrosis, hepatic stellate cell

講演番号：3A02p15
講演日時：3 月 27 日 16:43～ センター2 号館 A02 会場

タウリンがケモカイン受容体の遺伝子発現に及ぼす影響
Effects of taurine on gene expression of chemokine receptors
○福村 みどり[1]、和多利 研二[1]、薩 秀夫[2] ([1]前工大院工、[2]前工大工)
○Midori FUKUMURA[1], Kenji WATARI[1], Hideo SATSU[2] ([1]Grad. Sch. of Eng., Maebashi Inst. Technol., [2]Maebashi Inst. Technol.)

【目的】β-アミノ酸の一種であるタウリンは、通常生体内では遊離した状態で高濃度存在し、食品中ではイカやタコといった魚介類に多く含まれている。タウリンは、抗酸化や抗炎症といった多彩な生理作用を示すことが報告されている一方で、遺伝子発現に及ぼす影響、およびその制御機構については未だ不明な点が多い。当研究グループではこれまでタウリンが遺伝子発現に及ぼす影響を解析し、ヒト腸管上皮モデル Caco-2 細胞およびヒト肝モデル HepG2 細胞においてタウリンがレドックス制御に関与する thioredoxin interacting protein（TXNIP）あるいはがん抑制遺伝子 p16 の mRNA 発現を亢進することを見出してきた。そこで本研究では、新たにタウリンが免疫関連分子の遺伝子発現に及ぼす影響について、マクロファージモデル細胞を用いて解析することとした。
【方法】マクロファージモデル細胞株として、マウス由来 J774.1 細胞を用いた。J774.1 細胞を播種して培養した後、タウリンを添加し 37℃で一定時間インキュベートした。インキュベート後 RNA を回収して real-time PCR をおこない、mRNA 発現レベルの変化を検討した。
【結果】免疫関連分子の中でもケモカイン受容体に注目することとし、タウリンがケモカイン受容体の mRNA 発現に及ぼす影響を調べた。その結果、タウリンは C-X-C chemokine receptor type 4（CXCR4）の mRNA 発現量を、添加したタウリンの濃度依存的に増加させることを見出した。そこで次にタウリンの構造類似体を中心にその他のアミノ酸が CXCR4 の mRNA 発現に及ぼす影響を検討することとした。タウリンの吸収を司るタウリントランスポーターの基質であるヒポタウリン、β-アラニン、GABA についてタウリンと同様に検討したところ、CXCR4 の mRNA 発現量はタウリンで最も顕著な増加がみられた。またヒポタウリン、GABA でも有意な増加がみられた一方で、β-アラニンでは変化がみられなかった。さらに新たなタウリン構造類似体として、ホモタウリン、N-メチルタウリン、チオタウリンが CXCR4 mRNA に与える影響についても検討した。その結果、チオタウリンは CXCR4 mRNA 発現をタウリンより顕著に亢進し、またホモタウリンと N-メチルタウリンにおいてもタウリンと同程度の亢進がみられた。以上より、マクロファージモデル細胞におけるタウリンによる CXCR4 の mRNA 発現亢進は、タウリンのスルホン基が重要であることが示唆され、さらにスルホン基の-OH が-SH になることでその亢進がより増強されることが示唆された。現在さらに、タウリンが CXCR4 のタンパク質発現に及ぼす影響について検討を進めている。

taurine, CXCR4, macrophage

発表責任者：薩秀夫（satsu@maebashi-it.ac.jp）

講演番号：3A02p16
講演日時：3 月 27 日 16:54～ センター2 号館 A02 会場

GABA 摂取による持久運動能力増強効果
Enhancement of exercise endurance capacity by GABA intake
○金 有宏[1]、山田 裕晃[1]、坂下 真耶[1]、山津 敦史[1]、金 武祚[1]、青井 渉[2]([1]株式会社ファーマフーズ、[2]京都府立大学大学院生命環境科学研究科)
○Yugweng KIM[1], Hiroaki YAMADA[1], Maya SAKASHITA[1], Atsushi YAMATSU[1], Mujo KIM[1], Wataru AOI[2] ([1]Pharma Foods International Co., Ltd., [2]Graduate School of Life and Environmental Sciences Kyoto Prefectural University)

【目的】γ-アミノ酪酸（GABA）はアミノ酸の一種であり、野菜、穀物、発酵食品等に広く含まれる成分である。ペルオキシソーム増殖因子活性化レセプターγ 共役因子-1α（PGC-1α）は、骨格筋ミトコンドリア量や毛細血管密度を増加させて遅筋特性を獲得させるなど、持久運動能力と密接な関係があるといわれている。我々は昨年、トレーニングをさせたマウスに GABA を摂取させることにより、骨格筋中の PGC-1α量が増加し、持久運動能力を向上させることを報告した（2019 年日本農芸化学会大会）。しかし、GABA 混餌量はヒトに換算すると 1 日当たり 1800 mg 相当であり、一般的にヒトがサプリメント等から摂取する量（100mg/day 程度）とは乖離があったため、実用化においてはより低用量での検証が必要と考えられた。そこで本研究ではマウスを用いて低用量の GABA 摂取による持久運動能力に与える効果を検討した。
【方法】
実験①10 週齢 ICR 雄性マウス 24 匹をコントロール群（C 群, n=12）、GABA 摂取（G 群, n=12）の 2 群に分けた。C 群には通常飼料を、G 群には GABA0.025%混餌食（ヒト換算で 1 日当たり GABA 100 mg 相当）を自由摂取させた。摂取開始時、2 週後、4 週後に、疲労困憊になるまでの走行時間を測定した。
実験②10 週齢 ICR 雄性マウス 24 匹をトレーニング群（T 群, n=12）、GABA 摂取トレーニング群（GT 群, n=12）の 2 群に分けた。T 群には通常飼料を、GT 群には GABA0.025%混餌食を自由摂取させた。摂取期間中、週 3 回のトレッドミル走行運動（25 m/min の速度で 1 時間走行）を負荷した。実験①と同様に走行試験を実施した。
【結果・考察】実験①2 週間後における試験開始時からの走行時間増加量は C 群 1119 秒、G 群 1386 秒であった。また、4 週間後における試験開始時からの走行時間増加量は C 群 2336 秒、G 群 2541 秒であった。
実験②T 群と GT 群の摂取開始 2 週間後における試験開始時からの走行時間増加量はそれぞれ 4451 秒、7449 秒であった（T 群 vs GT 群, $p<0.01$）。また、T 群と GT 群の試験開始時からの 4 週間後の走行時間増加量は 4834 秒、9458 秒であった（T 群 vs GT 群, $p<0.01$）。これらの結果から、低用量の GABA の摂取はトレーニングによる持久運動への適応効果を増強させた可能性が示唆された。

Gaba, endurance performance, exercise

発表責任者：金　有宏（y-kim@pharmafoods.co.jp）

講演番号：3A02p17
講演日時：3 月 27 日 17:05～ センター2 号館 A02 会場

in vitro 運動モデルによる筋収縮時のメタボローム解析

Effects of muscle contraction on metabolomic profiling using *in vitro* exercise model

○佐藤 聡子、野村 充、青野 恵（ライオン株式会社 研究開発本部）
○Satoko SATO, Mitsuru NOMURA, Megumi AONO (Research and Development Headquarters, Lion Corporation)

【背景と目的】筋力の増強及び筋肉量の増加には，筋タンパク質合成を向上させるレジスタンス運動が効果的である．これまで筋収縮による筋タンパク質合成能の評価にはヒトや動物が用いられていたが，より簡便な評価法として我々は新たな *in vitro* 運動モデルを確立し，報告している（Sato S *et al.* 2019 Biosci Biotechnol Biochem.）．本モデルは骨格筋培養細胞に電気刺激を負荷してレジスタンス運動時の筋肉と同様に強縮様の筋収縮を生じさせることにより骨格筋合成シグナル（mTORC1 経路）が顕著に活性化する．今回，本モデルを用いて筋収縮が骨格筋の代謝物に与える影響を網羅的に解析した．また，近年スポーツ・ロコモケア食品素材として注目されており，mTORC1 経路を活性化させるロイシン代謝物の β-ヒドロキシ-β-メチル酪酸（HMB）についても同様にメタボローム解析を行い，筋収縮時との比較を行った．
【方法】1)筋収縮時の代謝物変動：ラット骨格筋由来 L6. C11 細胞を筋管細胞に分化させた後，電気刺激負荷（100 Hz, 50 V, 10 分）による筋収縮を実施した．筋タンパク質合成の指標である p70S6K のリン酸化が有意に上昇した筋収縮 3 時間後に細胞を回収し，CE-TOFMS によるメタボローム解析を実施した．
2) HMB 添加時の代謝物変動：L6. C11 細胞を筋管細胞に分化させた後，HMB を培地に添加した．p70S6K のリン酸化が有意に上昇した HMB 添加 15 分後に細胞を回収し，解析に供した．
【結果】CE-TOFMS により，240 種の代謝物が検出された．1)筋収縮によりグルコース-6-リン酸，フルクトース-6-リン酸，フルクトース-1,6-ビスリン酸，グリセルアルデヒド-3-リン酸等，解糖系の代謝物が変動した．2)HMB 添加時も同様に解糖系の代謝物が変動した．
【結論と考察】ヒトでレジスタンス運動後に mTORC1 経路が活性化し(Terzis G *et. al.* 2008 Eur J Appl Physiol.)，解糖系の代謝物が変動する（Berton R *et. al.* 2017 J Sports Sci.）ことが報告されている．これらの既報と同様に，我々が確立した *in vitro* 運動モデルは，mTORC1 経路の活性化に加えて解糖系を活性化させることが示され，本モデルがレジスタンス運動を模倣していることが示唆された．また，これまでにロイシンの代謝物である HMB 添加による網羅的な代謝物解析が実施されていなかったが，今回，筋収縮と同様に解糖系を活性化させることが新たに示された．

contraction, beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB), metabolome

講演番号：3A02p18
講演日時：3 月 27 日 17:16～ センター2 号館 A02 会場

L-Theanine の不安抑制効果はマウスの系統によって異なる

Anxiolytic effects of L-Theanine differ depending on mouse strain

○松尾 契吾[1]、渡邊 佑[1]、中村 孝博[2]、直井 実穂[2]、竹中 麻子[2]([1]明治大学大学院・農学研究科、[2]明治大学・農学部)
○ Keigo MATSUO[1], Tasuku WATANABE[1], Takahiro J. NAKAMURA[2], Miho NAOI[2], Asako TAKENAKA[2] ([1]Graduate school of agriculture , Meiji University, [2]Faculty of agriculture, Meiji University)

【背景・目的】マウスの不安行動には系統差があり、脳内の抗酸化関連酵素 Glyoxalase 1 (Glo1) と Glutathione reductase 1 (Gsr) の遺伝子発現量が系統差を決定する可能性が報告されている。また、これらの酵素によって代謝される Methylglyoxal (MG) は $GABA_A$ 受容体に作用し、不安を減少させることが知られている。以上のことから、マウスにおける不安行動の系統差は、Glo1 と Gsr の発現量の差による脳内 MG 濃度と $GABA_A$ 受容体活性化の違いによって生じると考えることができる。一方で、お茶の旨味成分である L-Theanine も $GABA_A$ 受容体に作用し、リラックス効果や抗ストレス作用を示す。そこで本研究では、L-Theanine の不安抑制効果が、マウスの系統によって異なる可能性を検討した。
【方法】Glo1 と Gsr の発現量が低く不安行動が少ない系統の C57BL/6 (B6) と、Glo1 と Gsr の発現量が高く不安行動が多い系統の DBA/2 (D2) を用いた。両系統のマウスを水道水を自由摂取する W 群と L-Theanine を 100 μg/mL 含むテアニン水を自由摂取する T 群の 2 群に分け、B6+W 群、B6+T 群、D2+W 群、D2+T 群の 4 群 (n=6) で実験を行った。AIN93G 準拠食を与えて 2 週間飼育し、高架型十字迷路試験（EPM 試験）とオープンフィールド試験（OF 試験）の 2 つの行動試験を行った後、解剖して血液と臓器を採取した。
【結果】B6 と D2 はぞれぞれ平均して 11.0 mg/kgBW/day、8.6 mg/kgBW/day のテアニンを摂取し、D2 で有意に少なかった。EPM 試験及び OF 試験において、B6 に比べて D2 で有意に不安が大きく、不安行動の系統差を確認できた。また、系統内の W 群と T 群の 2 群間で比較すると、2 つの行動試験とも B6 では差がなかったのに対し、D2 では L-Theanine 摂取による不安抑制効果が認められた。Glo1 と Gsr の遺伝子発現量において系統差が確認できたが、L-Theanine 摂取による変化は見られなかった。L-Theanine 摂取による脳由来神経栄養因子 (Brain-derived neurotrophic factor：BDNF) や GABA の増加が報告されていることから、脳内の BDNF 遺伝子発現量と GABA 濃度を測定したところ、いずれも B6 に比べて D2 で低いという系統差が見られたが、L-Theanine 摂取による影響はなかった。
【結論】D2 系統のマウスでのみ、L-Theanine 摂取による不安行動の減少が見られた。L-Theanine の不安抑制効果は内因性の GABA 活性が低い場合に強く表れる可能性が示された。

Anxiety-like behavior, Mouse strain, L-Theanine

講演番号：3A03a02
講演日時：3 月 27 日 09:41～ センター2 号館 A03 会場

AMP キナーゼを介した食後高脂血症改善作用メカニズムの解明

Improvement of postprandial lipidemia by intestinal AMP-kinase activation.

○松田 真英[1]、津山 博之[1]、菊池 真優[1]、田中 未央里[2]、井上 博文[2]、上原 万里子[1]、高橋 信之[1]([1]東農大院農、[2]東農大応生)
○Manae MATSUDA[1], Hiroyuki TSUYAMA[1], Mayu KIKUCHI[1], Miori TANAKA[2], Hirofumi INOUE[2], Mariko UEHARA[1], Nobuyuki TAKAHASHI[1] ([1]Tokyo Univ. Agri Grad, [2]Tokyo Univ. Agri)

現在、日本の死因の上位である心筋梗塞や脳梗塞の多くに動脈硬化が関与しており、その予防・改善が重要な課題となっている。近年、空腹時血中中性脂肪濃度よりも食後濃度の過剰な上昇（食後高脂血症の悪化）が動脈硬化のリスクと高い相関があると報告されており、食後高脂血症悪化の抑制が動脈硬化の予防･改善に効果的であると考えられる。食事由来の中性脂肪は、小腸上皮組織を経由し、リンパ管から血液循環に入り、肝臓に送られる。そのため、小腸上皮組織において中性脂肪を消費させる、つまり脂肪酸の酸化を亢進させることができれば食後高脂血症悪化を抑制できると考えた。

これまでに、脂肪酸酸化関連遺伝子の転写に関わる受容体であるペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体α（PPARα）を、そのアゴニスト Bezafibrate や食品成分 DHA の継続的摂取により活性化させると、脂肪酸酸化の亢進が起こり、食後高脂血症が改善されることを明らかにした。そこで本研究では、新規食品成分による食後高脂血症悪化の抑制を目指して、PPARα 活性化能を持つことが知られている Resveratrol（RSV）に着目し、食後高脂血症に対する作用について検討した。これまでに我々は、高脂肪食に RSV を混餌して継続的に与えたマウスで、16 時間の絶食後、経口脂肪投与負荷試験を行い、食後高脂血症が改善するという結果を得ている。

一方、RSV は、AMP-activated protein kinase（AMPK）も活性化する。この AMPK の活性化は一過性に脂肪酸酸化を亢進させることが知られており、PPARα を介した作用とは時間軸の異なる食後高脂血症改善効果がある可能性が考えられる。

この可能性を検証するために、本実験では、AMPK の活性化剤である Metformin を用いて、マウスへの単回投与実験を行った。1 週間高脂肪食を与えた 10 週齢 C57BL/6J 雄性マウスに Metformin を経口投与し、その 2 時間後から経口脂肪投与負荷試験による食後高脂血症の評価をおこなったところ、食後高脂血症の悪化が抑制された。この結果を踏まえて現在、Metformin 投与から経口脂肪負荷試験開始までの時間を調整し、Metformin が効果を発揮するまでに要する時間を検討するとともに小腸上皮組織での AMPK の活性化をそのリン酸化抗体を用いて検討している。さらに、RSV が Metformin と同様の効果を示すかについて検討していく予定である。

postprandial lipidemia, intestine, AMPK

発表責任者：高橋信之（nt204885@nodai.ac.jp）

講演番号：3A03a03
講演日時：3 月 27 日 09:52～ センター2 号館 A03 会場

12α水酸化胆汁酸と脂肪肝の関係
Association between 12α-hydroxylated bile acids and hepatic steatosis
○堀 将太[1]、阿部 隆行[1]、李 東根[1]、吹谷 智[1]、横田 篤[1]、麻生 菜央[2]、城内 文吾[2]、佐藤 匡央[2]、石塚 敏[1] ([1]北大農、[2]九大農)
○Shota Hori[1], Takayuki Abe[1], DongGeun Lee[1], Satoru Fukiya[1], Atsushi Yokota[1], Nao Aso[2], Bungo Shirouchi[2], Masao Sato[2], Satoshi Ishizuka[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Kyusyu Univ.)

【背景と目的】 ヒト長期追跡調査によると糖尿病やメタボリックシンドロームの発症に先立って脂肪肝が起こるとされており、脂肪肝の予防・治療の重要性が増しつつある。コレステロールの排泄形態として肝臓で合成される胆汁酸 (Bile acid, BA) は、12α-hydroxylase (CYP8B1) によってステロイド骨格の 12 位が水酸化を受けるか否かによって、12α 水酸化胆汁酸 (12αOH BAs) と非 12α 水酸化胆汁酸 (non-12αBAs)の 2 種類に大別される。我々は LC-MS を用いて胆汁酸分子種を測定することにより、高脂肪 (HF) 食摂取ラットにおいて糞中に排泄される 12αOH BAs が特異的に増加すること、12αOH BAs であるコール酸をラットに与えると肝脂質蓄積が誘導されることを明らかにしてきた。本研究では、HF 食摂取における 12αOH BAs 増加機構、および 12αOH BAs と脂肪肝の関係を調べた。
【方法】 5 週齢の WKAH/HkmSlc 雄性ラットに AIN-93G 準拠のコントロール食 (7% fat from soybean oil, wt/wt) もしくは HF 食 (7% fat from soybean oil and 23% fat from lard oil, wt/wt) を与えて 8 週間飼育し、肝臓の脂質パラメータ、肝臓、門脈血、大動脈血、糞中における胆汁酸組成、肝臓の酸化コレステロール濃度を測定した。
【結果】HF 食の摂取により肝臓コレステロール濃度が上昇し、胆汁酸合成の律速酵素である cholesterol 7α-hydroxylase (*Cyp7a1*) の遺伝子発現レベルの亢進をともなって胆汁酸前駆体の 7α-hydroxycholesterol が有意に増加した。また、肝臓 *Cyp8b1* 遺伝子発現レベルの上昇に伴い、門脈血、糞中における 12αOH BAs が特異的に増加した。さらに、門脈血中におけるコール酸、タウロコール酸の濃度上昇に伴い、見かけの食事脂肪吸収率が有意に上昇した。一方、食事脂質の吸収にほとんど寄与しないデオキシコール酸も糞中で増加していた。
【考察】HF 食摂取は肝臓に過剰に蓄積したコレステロールを排泄する手段として、*Cyp7a1* および *Cyp8b1* の遺伝子発現レベルを上昇させることで 12αOH BAs を特異的に増加させることが示唆された。こうして増加したタウロコール酸やコール酸などの肝臓由来の 12αOH BAs は、脂肪吸収促進により肝脂質蓄積に寄与する可能性が示された。先行研究において、デオキシコール酸を与えたラットでも肝脂質蓄積が観察されたことを考慮すると、デオキシコール酸は脂肪吸収以外の機構で脂肪肝の発症に寄与する可能性がある。本研究により、HF 食摂取により増加する 12αOH BAs の中でも、宿主由来・腸内細菌由来の双方が異なる機構で脂肪肝の発症に寄与する可能性が推察された。

high fat diet, bile acid, fatty liver

発表責任者：石塚敏（horisho@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：3A03a04
講演日時：3 月 27 日 10:03～ センター2 号館 A03 会場

脱脂大豆は PPARγ/SHP 経路を介して高脂肪食誘導性の肝臓脂肪蓄積を抑制する

Soybean meal prevents high fat diet-induced hepatic steatosis via activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ (PPARγ)/Small heterodimer partner (SHP) pathway in Sprague-Dawley rats

○松本 雄宇[1]、石見 佳子[2]、鈴木 司[1]、小林 謙一[3]、井上 順[1]、山本 祐司[1] ([1]東農大・応生・農化、[2]東農大・総合研究所、[3]ノートルダム清心女子大学・食品栄養)
○Yu MATSUMOTO[1], Yoshiko ISHIMI[2], Tsukasa SUZUKI[1], Ken-Ichi KOBAYASHI[3], Jun INOUE[1], Yuji YAMAMOTO[1] ([1]Tokyo Univ. of Agriculture, Agricultural chemistry, [2]Tokyo Univ. of Agriculture, [3]Notre Dame Seishin Univ.)

【背景・目的】

脱脂大豆（SBM）は、大豆から油脂を抽出した後の残渣のことで、主に醤油や大豆タンパク質などの原料や家畜の飼料として使用されている。SBM は食用大豆加工品と同様に豊富なタンパク質や種々の生物活性物質が残存していることから、ヒトに有益な効果を及ぼす素材であると考えられる。特に、SBM は脂質代謝への効果が予想されるが、その詳細は明らかとなっていない。本研究では SBM が高脂肪食摂取による肝臓への脂肪蓄積に対する影響とその分子メカニズムについて検討する。

【方法】

5 週齢の雄性 Sprague-Dawley ラットを標準食群、高脂肪食群（脂質エネルギー比率 40%）、高脂肪食に重量ベースで 30%の SBM を混餌した群に無作為に分け、それぞれの飼料を 28 日間摂取させた。飼育終了後に血液と各臓器を採取し、肝臓の総脂質量、トリグリセリド量、コレステロール量、脂質代謝関連酵素の発現量、血漿中インスリン濃度を測定した。

【結果・考察】

肝臓中総脂質量、トリグリセリド量およびコレステロール量は SBM 摂取により有意に減少した。この結果から、肝臓における脂質代謝関連遺伝子の発現量を解析したところ、SBM 摂取により SREBP-1 やその標的遺伝子である脂質代謝関連酵素（FAS、SCD-1、GPAT）の発現量が減少していた。SREBP-1 はインスリンによって発現が制御されているため、血漿中のインスリン濃度を測定したところ、SBM 摂取により低下していた。しかしながら、血漿中インスリン濃度と SREBP-1 発現量との間に有意な相関関係は認められなかった。一方、様々な核内受容体や転写因子の活性を負に制御する SHP の肝臓中発現量を測定したところ、SBM 摂取により有意に増加し、かつ SREBP-1 の遺伝子発現量との間に有意な負の相関を示した。次に、SHP の発現を制御する因子の一つである PPARγについて解析したところ、SBM 摂取により発現量が増加する傾向を示した。そこで、PPARγの遺伝子発現量と SHP の遺伝子発現量の相関関係を確認したところ、有意な正の相関を示した。

以上より、SBM は高脂肪食によって誘導される肝臓の脂肪蓄積を抑制することが示された。さらに、これらの一連の代謝変動には、SHP を介したインスリン非依存的な脂質合成関連遺伝子の抑制が関与していることが推察された。Matsumoto Y et al, *J Nutr Biochem*. 2019 Oct 15;75:108250.

Soybean meal, Hepatic steatosis, Small heterodimer partner

講演番号：3A03a05
講演日時：3 月 27 日 10:14～ センター2 号館 A03 会場

ガーデンクレススプラウトおよびベンジルイソイオシアネートの中性脂肪代謝制御
Triglyceraide lowering effect of garden cress sprout and benzyl isocyanate
○横山 慎一郎[1]、小寺 美有紀[1]、平井 晶子[3]、中田 光彦[3,4]、上野 有紀[2]、大澤 俊彦[2] ([1]岐阜食科研、[2]愛知学院大、[3]サラダコスモ、[4]野菜で健康研究所)
○Shin-ichiro Yokoyama[1], Miyuki Kodera[1], Akiko Hirai[3], Mitsuhiko Nakada[3,4], Yuki Ueno[2], Toshihiko Osawa[2] ([1]GRIFS, [2]Aichigakuin Univ., [3]Salad Cosmo Co., Ltd., [4]Yasaidekenkou R&D Co., Ltd)

【目的】ベンジルグルコシノレート（BG）を豊富に含むガーデンクレススプラウトの摂取による生理作用について明らかにするために、ガーデンクレススプラウト乾燥粉末（GC）添加給餌によるマウスを用いた動物実験にて検証した結果、中性脂肪低減効果を見出した。また、本効果における BG のアグリコンであるベンジルイソチオシアネート（BITC）の担う役割について細胞実験による検証を行った。
【方法】発芽 6 日目のガーデンクレススプラウトを凍結乾燥し粉砕した粉末を RC として使用した。BG の定量は高速液体クロマトグラフィー（HPLC）にて行った。AIN93G 飼料に GC を 0.01%（w/w）添加した餌（GC0.01）および 0.05%（w/w）添加した餌（GC0.05）を調製し、８週齢の C57BL/6J 雄性マウスに自由摂食させ、体重および摂食量を測定した（各群 n=6-8)。実験開始 8 週間後に 16 時間の絶食を行った後屠殺し、血液採取および肝臓の摘出を行った（絶食後評価実験)。他方、絶食を行わずに屠殺した実験も同様に行った（食後評価実験)。調製した血漿を用い、血糖、血中中性脂肪、血中コレステロール類、ALT および AST の測定を行った。肝臓は秤量後クロロホルム:メタノール（2:1）混液にて抽出し、得られた下層を窒素ガス雰囲気化で乾固、秤量し、総脂質量とした後、TritonX-100：メタノール（2:1）混液にて溶解し、中性脂肪およびコレステロール類の測定に用いた。細胞実験にはヒト肝臓由来の HepG2 を用いた。通常濃度グルコース(1500mg/L)、高濃度グルコース（4500mg/L)、および 1mM オレイン酸含有 D-MEM 培地を調製し、BITC を終濃度 1～5μM となるよう添加し、培養開始 5 日後に MTT 法による細胞毒性の評価およびオイルレッド O 染色法による脂肪蓄積評価試験を行った。
【結果】HPLC 分析の結果、実験に用いた GC 中の BG は、59.1±1.0mg/g、BITC 相当量で 21.6±0.4mg/g であった。動物実験の結果、GC0.05 群においてコントロール群に比して有意な体重および食後肝臓重量の減少が認められた。一方、絶食後の肝臓重量には差は認められなかった。食後肝臓中の総脂質および中性脂肪量においては、両 GC 添加群で有意な減少が見られた。また、食後血液マーカーには差が見られないものの、絶食後では、GC0.05 群で ALT、中性脂肪および遊離脂肪酸において有意な減少が認められた。細胞実験の結果、1～5μM の範囲では BITC の毒性は認められなかった。一方で、高濃度グルコース含有培地群では濃度依存的な、またオレイン酸含有培地群では、２μM 添加において脂肪蓄積抑制効果が認められた。

gardencress sprout, benzyl isothiocyanate, triglyceride

発表責任者：横山　慎一郎（yokoyama-shinichiro@rd.pref.gifu.jp）

講演番号：3A03a06
講演日時：3 月 27 日 10:35～ センター2 号館 A03 会場

果糖ブドウ糖液糖の過剰摂取が若年 2 型糖尿病発症に与える影響
Effects of excessive intake of high fructose corn syrup on early-onset type 2 diabetes
○花井 悠真、西本 沙弥香、江藤 望、服部 秀美（宮崎大農）
○Yuma HANAI, Sayaka NISHIMOTO, Nozomu ETO, Hidemi HATTORI (Miyazaki Univ.)

【目的】2 型糖尿病は、インスリン分泌能の低下およびインスリン抵抗性により、相対的にインスリンが不足することで高血糖を有する生活習慣病として知られている。近年、この 2 型糖尿病の中でも比較的若い年齢で発症する若年 2 型糖尿病が増加していると報告されているが、若年 2 型糖尿病に対する研究はほとんど行われていない。また、果糖ブドウ糖液糖(HFCS)はグルコースとフルクトースを含む甘味料として清涼飲料水に使用されており、HFCS の過剰摂取は 2 型糖尿病発症の一因として考えられている。これらのことから、我々は若年 2 型糖尿病発症に HFCS の過剰摂取が関与しているのではないかと推測している。そこで本研究では、HFCS の過剰摂取による若年 2 型糖尿病の誘発について検討した。
【方法】清涼飲料水と同じ HFCS 濃度となるように 10% HFCS 水を調製し、コントロールとして脱イオン水を準備した。3 週齢 ICR 雄マウスにそれぞれを 9 週間自由摂取させ、週 1 回体重を測定した。8 週間後、絶食 6 時間させた後にグルコース・フルクトース負荷試験を行い、0，15，30，60，120 分後の血糖値を測定した。その 1 週間後、グルコース負荷試験 0，30 分後の血清を採取し、血中インスリン・トリグリセリド(TG)濃度を測定した。全ての試験終了後、肝臓・皮下脂肪・内臓脂肪を採取し、質量を測定した。
【結果】HFCS 摂取群は、コントロール群と比較して体重および肝臓・皮下脂肪・内臓脂肪質量に差はみられなかった。グルコース・フルクトース負荷試験において、HFCS 摂取群ではコントロール群と比較して 30 分後の血糖値が有意に高くなった。しかし、血中インスリン濃度を測定したところ 2 群間に差はみられなかった。また HFCS 摂取群の血中 TG 濃度は、コントロール群と比較して高かった。
【考察】HFCS 水の過剰摂取は、体重及び肝臓・皮下脂肪・内臓脂肪質量を増加させないものの、グルコース負荷試験において血糖値の上昇を導き、さらには血中 TG を増加させた。またフルクトース負荷試験において血糖値が上昇したことから、摂取されたフルクトースがグルコースに変換されたと考えられる。これらのことから、HFCS の過剰摂取は肥満にならないが、糖尿病や脂質異常症を誘発する可能性が示唆された。2 型糖尿病における高血糖は一般的にインスリン分泌能の低下やインスリン抵抗性が原因と考えられているが、今回、血中インスリン濃度に変化はみられなかったことから、HFCS の過剰摂取による高血糖の原因は、インスリン分泌能の低下によるものではないことが示唆された。

diabetes, dyslipidemia, high fructose corn syrup

発表責任者：服部秀美（h-hattori@cc.miyazaki-u.ac.jp）

講演番号：3A03a07
講演日時：3 月 27 日 10:46～ センター2 号館 A03 会場

概日リズム依存的なプロシアニジン高含有食品素材の食後高血糖抑制効果の検証
Procyanidins suppressed postprandial hyperglycemia depending on the circadian rhythm.
○廣直 賢勇、光橋 雄史、芦田 均、山下 陽子（神戸大院・農）
○Ken-yu HIRONAO, Yuji MISTUHASHI, Hitoshi ASHIDA, Yoko YAMASHITA (Kobe Univ.)

【背景・目的】 プロシアニジンはカテキンやエピカテキンが重合したフラバン-3-オールであり、グレープシードやカカオ、黒大豆種皮などに多く含まれるポリフェノールの一種である。我々はこれまでにプロシアニジン高含有食品素材を用いた実験を通して、食後の血糖の上昇が緩和されることを報告している。我々は、プロシアニジンが筋肉組織中の 5' AMP-activated protein kinase (AMPK) のリン酸化を介して、glucose transporter type 4 (GLUT4) の細胞膜への移行を促進することで、高血糖抑制効果を発揮することを明らかにした (1, 2)。また、プロシアニジンは膵 β 細胞におけるインスリン分泌量を増大し、それは小腸 L 細胞から分泌される glucagon-like peptide-1 (GLP-1) の分泌促進効果を介している可能性も報告してきた(3)。一方、地球上の哺乳類に備わっている血糖調節に関わる代謝活性は、約 24 時間周期のリズム、すなわち概日リズムを形成していることが様々な研究で報告されている。このことから、ポリフェノールの摂取タイミングによって、食後の血糖上昇に対する抑制効果にも差がある可能性が考えられるが、その詳細については不明である。そこで本研究では、プロシアニジンによる高血糖抑制効果について、概日リズムによる影響を考慮した実験を試みた。
【方法】 明暗周期 12 時間で飼育した ICR マウス (雄性) に、ZT1 または ZT13 (明期開始時刻を Zeitgeber Time 0 (ZT0) と定義する) のタイミングに、プロシアニジン高含有食品素材であるカカオ由来ポリフェノール (CLPr) を経口投与し、その1時間後に経口糖負荷試験を行った。また、ZT1 または ZT13 のタイミングにマウスにCLPrを投与し、その1時間後にマウスを屠殺し、血糖調節因子として重要とされる筋肉組織中のGLUT4の細胞膜への移行量を評価した。
【結果・考察】 経口糖負荷試験の結果では、ZT1 に CLPr を投与した群において、糖負荷による血糖上昇を抑制した。それに対して ZT13 に CLPr を投与した群では抑制効果は認められなかった。また、それぞれのタイミングで CLPr を投与してから 1 時間後の筋肉組織中の GLUT4 の細胞膜への移行量を評価した場合に、ZT1 に CLPr を投与した群では GLUT4 の細胞膜への移行量が増加したが、ZT13 に CLPr を投与した群では同様の効果は認められなかった。すなわち、プロシアニジンは哺乳類の概日リズムに依存する形で筋肉組織中の GLUT4 の細胞膜への移行を促進し、食後の血糖上昇を抑制する可能性が示唆された。

(1) Y. Yamashita, et al., Journal of Nutritional Science (2012). (2) Y. Yamashita, et al., PLOS ONE (2016). (3) Y. Yamashita, et al., Journal of Nutritional Science (2019).

Procyanidin, Circadian rhythm, Hyperglycemia

講演番号：3A03a08
講演日時：3 月 27 日 10:57～ センター2 号館 A03 会場

ブルーベリー葉抽出物の高血糖改善作用

anti-hyperglycemic effect of brueberry leaf extract

○松本 悠[1]、矢野 善久[1]、山﨑 正夫[2]、藤田 裕之[1]([1]京都先端科学大学バイオ環境、[2]宮崎大学農)
○Haruka MATSUMOTO[1], Yoshihisa YANO[1], Masao YAMASAKI[2], Hiroyuki FUJITA[1] ([1]Kyoto University of Advanced Science, [2]Univ. Miyazaki)

目的)近年、食品による生活習慣病の改善作用について多くの検討がなされている。その中でもブルーベリーの実はアントシアニンを豊富に含むことから、機能性表示食品の素材として注目を集めているが、ブルーベリーの葉の生理機能についてはほとんど研究がなされていない。そこで、このブルーベリーの葉に着目して検討することとした。
ところで、α-アミラーゼはデンプンなどの炭水化物をマルトースに加水分解する酵素であり、本酵素を阻害することにより、炭水化物の吸収を抑制し、血糖値の上昇を抑制することが期待される。そこで、種々のブルーベリー葉抽出エキスについて、本酵素に対する阻害活性について検討することとした。
方法)素材として、入手可能であったブルーベリー葉、及び宮崎大学より提供されたブルーベリー葉エキスを使用した。α-アミラーゼ阻害活性の評価には、ブタ膵臓由来の α-アミラーゼを用い、基質に可溶性デンプンを使用して、α-アミラーゼの作用により遊離する還元糖の量を DNS(3,5-ジニトロサリチル酸)試薬により発色、定量することで行った。
結果及び考察)各種ブルーベリー葉抽出物のα-アミラーゼ阻害作用について比較検討した結果、宮崎大学より入手したサンプルが最も強い阻害活性を示した(IC_{50}=0.759 mg/mL)。そこで、本抽出物から活性成分を単離・構造決定するため、各種クロマトグラフィーにより分画し精製を行った。その結果、ODS カラムにより分画したところ、60 本のフラクションに分画できたが、そのうち活性のあったフラクションは 9 本であった。その中で、最も活性の強かったフラクションについてフェニルカラム、さらにコレスターカラムにより単一の活性フラクションにすることができた。そこで本フラクションを大量に分取し、Orbitrap-MS、及び NMR 解析を行った結果、カテキン誘導体であることがわかった。本物質は、α-グルコシダーゼ阻害活性のあることは報告されているが、α-アミラーゼ活性については報告がなく、本活性を示すことを初めて明らかにした。さらに、現在 ODS カラムにおいて活性を示した他のフラクションについても単一成分にまで精製し、NMR による構造解析を行っている。また、実際に本ブルーベリー葉抽出物が血糖値の上昇を抑制するかについて検討するため、ラットにデンプンを経口投与し、その後の血糖値に対する影響についても検討中である。

blueberry leaf extract, α-amylase inhibitor, anti-hyperglycemic effect

発表責任者：藤田裕之（fujita.hiroyuki@kuas.ac.jp）

講演番号：3A03a09
講演日時：3 月 27 日 11:08～ センター2 号館 A03 会場

小豆抽出物に含まれる食後高血糖抑制成分の分析
Characterization of Antihyperglycemic Compounds from *Vigna angularis* Extracts
○栗谷 健志[1]、西尾 昌洋[1]、大野 菜々子[1]、増田 裕一[1]、勝崎 裕隆[1]、近藤 修司[2]、園 淳平[2]、中村 昌弘[2]、梅川 逸人[1] ([1]三重大生資、[2]井村屋株式会社)
○Kenji KURIYA[1], Masahiro NISHIO[1], Nanako ONO[1], Yuichi MASUDA[1], Hirotaka KATSUZAKI[1], Shuji KONDO[2], Junpei SONO[2], Masahiro NAKAMURA[2], Hayato UMEKAWA[1] ([1]Mie Univ., [2]Imuraya Co. Ltd.)

【目的】小豆 (Adzuki Bean, *Vigna angularis*) にはビタミン類、食物繊維、カリウムや鉄分などのミネラル、およびポリフェノールが豊富に含まれていることが知られている。これまでの報告から、小豆煮汁抽出物は血糖値上昇抑制や抗腫瘍、抗炎症、脂質代謝改善、抗アレルギー、骨代謝改善などの作用を有することが明らかになっている。各種の機能性のうち血糖値上昇抑制について、食後血糖の急激な上昇を抑制することは、糖尿病やメタボリックシンドロームなどの生活習慣病の発症予防に繋がるため、血糖値の上昇を穏やかにする食品や食事の開発が望まれている。一方、小豆の加工時には大量の煮汁が発生するため、廃棄物削減の観点からもその有効活用が求められている。本研究では小豆の加熱加工を想定し、加熱による成分の変化を分析するとともに、それらの成分の機能性を評価した。合わせて、小豆煮汁の有効利用を目的として、糖代謝酵素を阻害する小豆成分の特定を目指した。
【方法】加熱に伴う成分の変化を調べるため、小豆を一晩超純水に浸漬して得た小豆水抽出物 (Adzuki Bean Water Extract, ABWE) と、ABWE を 90 分間加熱したサンプル (boiled ABWE) を HPLC にて分析した。HPLC と ODS カラムを使用して各成分に単離後、LC-MS と NMR にて成分の分析と構造決定を行った。小豆抽出物および単離した各成分について、糖代謝酵素であるα-アミラーゼおよびα-グルコシダーゼに対する阻害作用を *in vitro* にて評価した。
【結果】HPLC 分析の結果、いくつかのポリフェノールを同定したことに加え、boiled ABWE には加熱前には存在しなかった特有の成分が出現することが明らかになった。次に、これらの成分の糖代謝酵素に対する阻害作用を検討した結果、加熱後に特異的に増加する成分はα-アミラーゼおよびα-グルコシダーゼ活性を共に阻害し、小豆に含まれる機能性成分の 1 つであることが示唆された。

adzuki bean, antihyperglycemic, polyphenol

講演番号：3A03a10
講演日時：3 月 27 日 11:19～ センター2 号館 A03 会場

緑茶カテキン主用代謝物である 5-hydroxyphenyl-γ-valerolactone の L6 骨格筋細胞における糖取り込み促進作用

Glucose uptake in L6 skeletal muscle cells by 5-hydroxyphenyl-γ-valerolactone, the main microbial metabolite of epigallocatechin gallate

○高垣 晶子[1,2]、吉岡 泰淳[1]、山下 陽子[1]、長野 智哉[1]、池田 真規[1]、芦田 均[1]（[1]神戸大院農・生命機能科学、[2]三井農林・R&D）
○Akiko Takagaki[1,2], Yasukiyo Yoshioka[1], Yoko Yamashita[1], Tomoya Nagano[1], Masaki Ikeda[1], Hitoshi Ashida[1] ([1]Kobe Univ., [2]MITSUI NORIN)

主要な緑茶カテキンであるエピガロカテキンガレート（EGCg）の腸内細菌による代謝物として 5-hydroxyphenyl-γ-valerolactone が報告されている。近年、このような腸内細菌代謝物の生体機能性が注目されている。本研究では EGCg の主要な腸内細菌代謝物である 5-(3,4,5-trihydroxyphenyl)-γ-valerolactone（EGC-M7）と、5-(3,5-dihydroxyphenyl)-γ -valerolactone（EGC-M5）の機能性評価として、抗高血糖作用について調査した。ターゲットとしてインスリンによる糖取り込みの最大の臓器である骨格筋に着目し、代謝物の骨格筋における糖取り込み促進作用、糖輸送担体 Glucose transporter type 4（GLUT4）の活性化作用、およびマウスにおける糖負荷試験を行い、代謝物の抗高血糖作用を検討した。

ラット骨格筋由来Ｌ6 細胞をウシ胎児血清 MEM 培地中で 5～6 日間インキュベーションし、L6 筋管細胞に分化誘導した。無血清 MEM 培地中に EGC-M5、EGC-M7 をそれぞれ終濃度 0.1、1、3μM で添加し、L6 骨格筋細胞に 4 時間作用させた。洗浄後に 1mM の 2-デオキシグルコース(2DG)を加えて 20 分間加温し、細胞内に取り込まれた 2DG 量を測定した。その結果、EGC-M5、EGC-M7 処理区において有意な糖取り込み促進作用が見出された。また、L6 筋管細胞の糖取り込みに関わる細胞膜上の GLUT4 の発現と、GLUT4 の膜移行に関わるシグナル伝達経路の発現をウェスタンブロット法により検討した。その結果、EGC-M5、EGC-M7 処理区において有意な GLUT4 の膜移行促進作用が見出された。また GLUT4 の活性化に関わるシグナル伝達経路では、インスリン依存型 Phosphatidylinositol-3-Kinase,（PI3K）、Atypical Protein kinase C（aPKC）のシグナル伝達経路の活性化は確認されなかったが、非インスリン依存型の 5'-AMP-activated protein kinase（AMPK）シグナル伝達経路の有意な活性化が確認され、EGC-M7、EGC-M5 が AMPK 活性化により GLUT4 の膜移行を促進することが明らかになった。

次に生体での血糖値調整作用を確認する目的で、ICR マウスにおける糖負荷試験を行なった。EGC-M5 および EGC-M7 をそれぞれ 0.32、3.2、32mg/kg になるように ICR マウスに経口投与し、60 分後に 1g/kg のグルコースを経口投与した。投与前、投与後 30、60、90、120 分後に尾静脈より採血を行い、グルコーステストワコーCII（和光純薬㈱）により血糖値を測定した。その結果、EGC-M5、EGC-M7 の投与群において有意な食後血糖値の上昇抑制作用が確認されたことから、EGC g 主用代謝物である EGC-M5、EGC-M7 の生体での血糖値上昇抑制作用が確認された。

catechin, metabolite, L6 skeletal muscle

発表責任者：高垣晶子（tgaki@mitsui-norin.co.jp）

講演番号：3A03a11
講演日時：3 月 27 日 11:40～ センター2 号館 A03 会場

HYA (10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid)の食品向け実用化開発

Practical development of HYA (10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid) for food

○柴田 光治[1]、藤村 俊夫[1]、北尾 浩平[1]、木村 郁夫[2]、岸野 重信[3]、小川 順[3] ([1]日東薬品工業、[2]東京農工大農、[3]京大院農・応用生命)
○Koji Shibata[1], Toshio Fujimura[1], Kohey Kitao[1], Ikuo Kimura[2], Shigenobu Kishino[3], Jun Ogawa[3] ([1]Nitto Pharmaceutical Industries, [2]Tokyo Agri Tech Univ., [3]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

食事由来の脂質は腸内細菌の代謝を受け、様々な脂肪酸誘導体に変換されることが判ってきている。近年、これらの脂肪酸について、宿主の健康との関連性や、その生理機能について、関心が高まっている。

これらの脂肪酸のうち、HYA (10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid)は、植物油に多く含まれるリノール酸が腸内細菌の代謝によって産生される代謝物である。宮本らは、高脂肪食負荷による肥満モデルマウスにおいて、HYA の長期投与が脂肪酸受容体 GPR40・120 を介した糖代謝改善効果を有することを報告した[1)]。その他、HYA を始めとする脂肪酸群に様々な保健機能が認められ、医薬品及び機能性食品としての応用が期待されている。

そこで、我々は HYA を量産化する実用化開発を実施した。リノール酸含量の高い植物油を基質に、HYA 変換活性の高い乳酸菌を加えて反応させることで、HYA を約 50 %含有する植物油乳酸菌代謝物の合成に成功した。次に、HYA の有効性評価として、純度 50 %品を用いて、食後の血糖値上昇を抑える効果について臨床試験を行った。被験者は食後 30 分の血糖値が高めの方（140～199 mg/dl) 60 名を対象とし、プラセボ対照無作為化二重盲検クロスオーバー試験により実施した。その結果、HYA 摂取群において、食後の血糖値の上昇が有意に抑えられることを認めた[2)]。

1) Miyamoto J, *et al.*, *Nature communications*, 2019, 10.1: 1-15
2) Yonejima Y, *et al.*, *Progress in Medicine*, 2019, 39: 1147-1154

functional fatty acid, 10-hydroxy-cis-12-octadecenoic acid, microbiome

発表責任者：柴田光治（k.shibata@nitto-ph.com）

講演番号：3A03a12
講演日時：3 月 27 日 11:51～ センター2 号館 A03 会場

腸内細菌叢由来水素ガスが高強度運動時のエネルギー代謝に及ぼす影響
Effects of hydrogen gas produced by intestinal microbiome on energy metabolism in high intensity exercise

○角 沙樹[1]、枝 伸彦[2]、赤間 高雄[3]、松本 光晴[1] ([1]協同乳業、[2]国立スポーツ科学センター、[3]早稲田大学　スポーツ科学学術院)
○Saki TSUNO[1], Nobuhiko EDA[2], Takao AKAMA[3], Mitsuharu MATSUMOTO[1] ([1]Kyodo Milk Industry Co. Ltd., [2]Japan Institute of Sports Sciences, [3]Faculty of Sport Sciences, Waseda University)

【背景】水素ガス（H_2）が酸化ストレス誘発性の病態を予防、軽減することが多くの研究により示され、現在では抗酸化作用にとどまらず、抗炎症作用、抗アポトーシス作用、エネルギー代謝の活性化等、多様な作用が報告されている。エネルギー代謝においては、H_2 が Peroxisome proliferator activated receptor-γcoactivator-1α の発現を誘導し、脂肪酸代謝を活性化することが報告されている。我々は、腸内細菌叢が生体への H_2 の重要な供給源と考え、殆どの日本人の腸内細菌叢で H_2 産生が誘導できる食物繊維類の組合せを探索し、それらを混合添加した H_2 産生飲料を作製した（*J Functional Food* 35: 13－23, 2017）。本研究では、この飲料を用いて、腸内細菌叢由来 H_2 が運動時のエネルギー代謝へ与える影響を検討した。
【方法】①ヒト試験：健常成人男性 8 名（平均年齢 25.6 歳）を対象に、H_2 産生飲料（ガラクトオリゴ糖、マルチトール、グルコマンナン含有牛乳）とプラセボを作製し、二重盲検ランダム化クロスオーバーデザインにて実施した。各試験飲料摂取 4 時間後に、自転車エルゴメーター（AEROBIKE75XL Ⅱ，コンビウェルネス社製）を用いて 75%VO_2max 負荷の自転車ペダリング運動を毎分 60 回転のペダリング頻度で 60 分間実施し、血中乳酸濃度およびエネルギー代謝分析器（エアロモニタ AE-310S, ミナト医科学社製）にて測定した呼気ガス（酸素摂取量および二酸化炭素排出量）データを用いた呼吸交換比、脂質酸化量、糖質酸化量を求めた。②マウス実験： 雄性 C57BL/6J マウスを用いて、腸内 H_2 産生成分（上記成分）溶解水または水道水の経口投与 2 時間後からトレッドミル走行し、直ちに後肢の筋肉組織（ヒラメ筋、足底筋、前頸骨筋、長趾伸筋）を採取し、脂質代謝関連遺伝子発現を RT-qPCR にて評価した。
【結果と考察】①ヒト試験：全被験者で H_2 産生飲料摂取時に呼気中 H_2 の増加が確認された。血中乳酸は、両試行で運動直後に有意に増加したが、H_2 産生飲料試行でプラセボ試行より低い傾向を示した。運動時の脂質の総酸化量を曲線化面積で評価した結果、H_2 産生飲料試行でプラセボ試行よりも有意に多かった（$p < 0.01$）。これらの結果から腸内細菌由来の H_2 が運動時の脂質代謝の亢進に関与している可能性が示唆された。②マウス実験：筋肉中の脂質代謝関連遺伝子の発現が、腸内 H_2 産生成分溶解水投与群で高いことが確認された。
　以上のことから、運動前に腸内細菌叢の H_2 産生を誘導することで、運動中の筋肉の脂質代謝が活性化されることが示唆された。

intestinal microbiome, hydrogen gas, energy metabolism

発表責任者：松本 光晴（m-matumoto@meito.co.jp）

講演番号：3A03a13
講演日時：3 月 27 日 12:02～ センター2 号館 A03 会場

脱脂ごまパウダー（リピスマート ™）の食後中性脂肪吸収抑制効果（無作為化二重盲検プラセボ対照クロスオーバー試験）

Inhibitory effect of defatted sesame powder (Lipismart™) on postprandial neutral fat absorption：a randomized, double-blind, placebo-controlled crossover study

○山田 裕晃[1]、森田 沙代[1]、古賀 啓太[1]、山津 敦史[1]、古田 到真[2]、金 武祚[1]（[1]株式会社ファーマフーズ、[2]三井製糖株式会社）
○Hiroaki YAMADA[1], Sayo MORITA[1], Keita KOGA[1], Atsushi YAMATSU[1], Toma Furuta[2], Mujo Kim[1]（[1]Pharma Foods International., LTD., [2]Mitsui Sugar Co.,Ltd.）

【目的】食生活や生活習慣の変化などにともない肥満人口は年々増加している。肥満は糖尿病、高血圧、がんなど様々な健康リスクを増加させる要因であり、年間 340 万人が肥満に起因する疾患で死亡しているといわれている。現在、肥満に対する治療薬としては中枢神経系に作用するものと、脂肪分解酵素であるリパーゼを阻害するものの 2 種類が販売されているが、いずれも副作用の問題から重篤な肥満患者に対してのみ使用されている。

ゴマは日本で年間 15 万トン以上消費され、中国最古の薬草書「神農本草経」では不老長寿の薬として紹介されている食品である。我々はゴマ種子から脂質を除去して粉砕した脱脂ごまパウダー（リピスマート ™）を開発し、in vitro におけるリパーゼ阻害活性、マウスにおける脂肪吸収抑制作用（単回摂取）と長期摂取による抗肥満効果を報告した（2019 年日本農芸化学会大会）。本研究ではヒトにおける脱脂ごまパウダーの脂肪吸収抑制効果を検討した。

【方法】

脱脂ごまパウダーに 20 倍量（w/v）の 50%エタノールを加え、3 時間撹拌した。上清をろ過し、エバポレーション、凍結乾燥により脱脂ごまパウダー抽出物を作製した。試験デザインは無作為化二重盲検プラセボ対照クロスオーバー試験とした。被験者として空腹時血中中性脂肪値が 150 mg/dL 以下の健康な成人男女 30 名（平均年齢：35.7±8.3 歳）を対象とした。試験食品にはデキストリン 810 mg に脱脂ごまパウダー抽出物 90 mg を配合したものを用いた（Active 群）。プラセボ食品にはデキストリンを用いた（Placebo 群）。被験者は検査前日から絶食とし、試験食品の摂取後、すぐに脂質負荷食品（脂質として 41.2g）を摂取した。試験食品摂取前、脂質負荷食品摂取 2、3、4、6 時間後に採血した。主要アウトカムに血中中性脂肪値（TG 値）、血中中性脂肪変化量（ΔTG 値）、ΔTG の AUC 値を設定した。

【結果】

負荷食品摂取後 3 時間後、6 時間後のΔTG 値において、Active 群が Placebo 群に対して有意に低値を示した（$p<0.05$）。また、ΔTG 値の AUC 値において Active 群が Placebo 群に対して有意に低値を示した（$p<0.05$）。本研究の結果より、脱脂ごまパウダー抽出物に食後中性脂肪上昇抑制効果がみとめられ、食後の中性脂肪の吸収を抑える肥満予防食品素材として有望であることが示唆された。

Sesame, clinical trial, neutral fat absorption

発表責任者：山田　裕晃（h-yamada@pharmafoods.co.jp）

講演番号：3A03p01
講演日時：3 月 27 日 13:50～ センター2 号館 A03 会場

魚介類のセレン源であるセレノネイン摂取は脂肪性肝疾患モデルマウスの病態を改善する

Feeding of selenoneine which is a selenium source of seafood improves pathology in model mice of fatty liver disease

○宮田 昌明、進藤 龍之介、松下 功暉、上田 裕香子、杉浦 義正、山下 倫明（水産機構水大校）
○Masaaki MIYATA, Ryunosuke SHINDOU, Kouki MATSUSHITA, Yukako UEDA, Yoshimasa SUGIURA, Michiaki YAMASHITA (Nat. Fisheries Univ.)

【目的】セレノネインはマグロ、ブリ、サバ類等の血合筋や血液に高レベル（5 mg Se/kg 以上）で分布しているセレン含有化合物である。セレノネインは抗酸化作用を有し、高いラジカル消去活性を有することが最近明らかにされ、生活習慣病の予防、改善作用を有する可能性が考えられ、機能性食品開発に利用出来るのではないかと考えられているが、生活習慣病の病態モデル等への摂取の影響に関する知見は未だ少ない。そこで本研究では、肝臓に脂肪が蓄積し、肝肥大、肝障害が認められ、血清中の脂質レベルも高く脂肪性肝疾患モデルと考えられる、胆汁酸受容体 farnesoid X receptor (FXR)の欠損マウスに低濃度のセレノネイン含有食を摂取させ、肝障害等の病態の改善が認められるかどうかを明らかにすることを目的とした。
【方法】６ヶ月齢の雄性 *Fxr* 欠損マウスに NMF 飼料あるいは 0.3 ppm セレノネイン含有 NMF 飼料を４ヶ月間摂取させた。１ヶ月おきに採血を実施し、４ヶ月目で解剖した。肝障害マーカー、脂質レベルは市販キットを用いて解析した。
【結果・結論】セレノネイン群の血餅中のセレン含量は４ヶ月間のセレノネイン摂取により 2.5 倍に増加し、肝臓中でもコントロール群に比べ有意な増加が認められた。セレノネイン群の肝障害マーカーの ALT, ALP の両活性はセレノネイン摂取後１ヶ月から４ヶ月目までコントロール群に比べ有意な低値を示し、肝障害の軽減が認められた。またセレノネイン群の肝重量体重比はコントロール群に比べ有意に減少し、肝肥大の改善が認められた。肝臓のトリグリセリド、総胆汁酸レベルはセレノネイン群で有意な低値を示した。セレノネイン群で肝臓の酸化ストレスマーカーである Hmox1 や Gsta1、脂肪酸合成関連の Fasn や Scd1 の mRNA レベルが有意に低値を示した。これらの結果より低濃度のセレノネイン摂取は脂肪性肝疾患を改善することが示唆された。

selenoneine, fatty liver disease, FXR

発表責任者：宮田昌明（mmiyata@fish-u.ac.jp）

講演番号：3A03p02
講演日時：3 月 27 日 14:01～ センター2 号館 A03 会場

新規ビフィズス菌株の肥満抑制効果
Effect of *Bifidobacterium* fermented milk on anti-obesity
○丸田 ひとみ[1]、中村 昇二[2]、藤井 祐介[2]、豊川 直樹[2]、山下 広美[1]([1]岡県大・保福・栄養、[2]オハヨー乳業(株))
○ Hitomi MARUTA[1], syoji Nakamura[2], Yusuke Fujii[2], Naoki Toyokawa[2], hiromi Yamashita[1] ([1]Okayama-pref. Univ., [2]Ohayo Dairy Products Co., Ltd.)

【背景・目的】肥満及び２型糖尿病は生活習慣によって引き起こされる疾患で、世界中で大きな問題となっている。近年、これらの疾患と腸内細菌叢の関与が報告されており、ビフィズス菌は腸内環境や脂質代謝の改善に寄与する機能性食品素材として注目されている。一方で、ビフィズス菌を関与成分とするヨーグルトの作用はほとんどが整腸作用を謳ったものであり、新たな機能性ヨーグルトの開発が望まれている。ビフィズス菌は最終産物として酢酸を生成することが知られているが、酢酸にはこれまで肥満抑制効果が報告されている。こうした状況のもと、ビフィズス菌が生成する酢酸に着目し、ヒト乳児糞便由来の新規ビフィズス菌株の中から酢酸の生成能が高く、且つ乳中での生育性と生残性に優れたビフィズス菌株を得るためにスクリーニングを行った。その結果、肥満抑制効果が期待できるビフィズス菌株 Bif-15 を見出した。そこで本研究では Bif-15 のより詳しい特性を明らかにするために、市販株である *Bifidobacterium longum* BAA-999 と肥満抑制効果を比較検討した。
【方法・結果】12%脱脂乳に懸濁したビフィズス菌 Bif-15（5.8×10^{7}C.F.U/ml）と BAA-999（4.5×10^{7}C.F.U/ml）の生菌試料を動物実験に供試した。過食により肥満と糖尿病を発症する 2 型糖尿病モデル動物である OLETF ラットに各ビフィズス菌懸濁液を 5mL/Kg-体重で週 5 日間、胃ゾンデを用いて 8 週齢から 15 週齢まで投与を行い、16 週齢にて解剖を行った。解剖時には肝臓、白色脂肪、骨格筋などを回収し、定量的リアルタイム PCR 法による遺伝子発現解析および HE、オイルレッド染色による組織学的解析を行った。水投与群と比較して Bif-15 投与群では体重増加が有意に抑制され、脂肪組織では脂肪合成系遺伝子が有意に抑制されていた。また脂肪肝の抑制、さらに肝臓における脂肪合成系遺伝子の発現の抑制がみられた。その他の結果についても報告する。

bifidbacterium, acetic acid, obesity

講演番号：3A03p03
講演日時：3 月 27 日 14:12～ センター2 号館 A03 会場

肥満抑制と腸内細菌叢に与えるセルロースナノファイバー摂取と運動の影響
Effect of dietary cellulose nanofiber and exercise on obesity and gut microbiota in mice fed a high-fat-diet
○長野 隆男[1]、矢野 博己[2]([1]石川県大食品、[2]川崎医福大体育)
○Takao NAGANO[1], Hiromi Yano[2] ([1]Ishikawa Pref. Univ., [2]Kawasaki Univ. Med. Welf..)

【目的】 セルロースナノファイバー（CN）は、植物セルロースを微粒子化した製品であり、その特徴として比表面積が広く、分散性と粘度が高いことが挙げられる。前回私たちは、高脂肪食肥満モデル動物実験系を用いて CN の摂取効果について調べ、CN 摂取は腸内細菌叢を改善して肥満を抑制することを示した。運動にも、腸内細菌叢を改善して肥満を抑制する効果が知られている。そこで今回は、CN 摂取と運動の併用が肥満抑制と腸内細菌叢に与える影響について検討した。
【方法】 マウスは、8週齢雄 C57BL/6N を使用した。実験は、運動なし群（SE 群, n = 8）、運動群（EX 群, n = 8）、CN 摂取運動なし群（CSE 群, n = 8）、CN 摂取運動群（CEX 群, n = 8）の 4 群で行った。運動群にはマウス回転式運動量測定装置(夏目製作所)を使用した。飼料として、高脂肪食（脂肪エネルギー比率 60%）を用い、CN は 0.2%分散液をマウスに給水瓶で自由摂取させた。実験期間は、7週間とした。グルコース負荷試験（GTT）では、マウスにグルコースを経口投与した後、15 分、30 分、60 分、90 分、120 分後に血液を採取し、血糖値を測定した。腸内細菌叢の解析は、結腸便を試料として次世代シーケンサーを使用して 16S リソソーム RNA 遺伝子のメタゲノム解析により行った。短鎖脂肪酸の定量は、盲腸便を試料としてガスクロマトグラフィーを用いて行った。

【結果】 CN 摂取により、マウスの自発運動量は増加した。高脂肪食摂取によるマウスの体重増加、副睾丸と内臓脂肪の蓄積は、CN 摂取または運動で抑制された（$p < 0.01$）。一方、皮下脂肪の蓄積は、運動により抑制され、CEX 群では EX 群と CSE 群よりも抑制された（$p < 0.05$）。さらに、GTT の結果から、グルコース耐性は運動により改善され、CEX 群では EX 群と CSE 群よりも改善された（$p < 0.05$）。腸内細菌叢解析結果について主成分解析を行った結果、腸内細菌叢の組成は CN 摂取によって変化しないが、運動により変化することが示された。また、運動により、肥満との関係が報告されている *Erysipelotrichaceae* と *Rikenellaceae* の腸内細菌の減少、酪酸産生菌である *Ruminococcaceae* の増加が観察された（$p < 0.05$）。さらに、酪酸産生菌である *Eubacteriaceae* は運動により増加し（$p < 0.05$）、CEX 群では EX 群と CSE 群よりも増加した。盲腸便の酢酸量は、運動による有意な増加が観察され（$p < 0.01$）、他の短鎖脂肪酸（プロピオン酸、酪酸、吉草酸）において違いは見られなかった。以上のことから、CN 摂取はマウスの自発運動量を増加させ、腸内細菌叢のバランスを改善することにより肥満を抑制することが示された。したがって、CN 摂取と運動の併用は、生活習慣病予防に有効であることが示唆される。

cellulose nanofiber, exercise, obesity

発表責任者：長野隆男（naganot@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：3A03p04
講演日時：3 月 27 日 14:23～ センター2 号館 A03 会場

The regulation effects of Ampelopsis Grossedentata Derived dihydromyricetin on bile acids secretion and microbiota metabolites in metabolic syndrome

○KUN XIE[1], Kozue Sakao[1,2], De-Xing Hou[1,2] ([1]1 United Grad. Sch. of Agric. Sci.,Kagoshima Univ., Japan, [2]2 Dept. of Food Sci. & Biotech., Fac. of Agric.,Kagoshima Univ., Japan)

Objective: Dihydromyricetin (DMY) is the principle bioactive compound in *Ampelopsis grossedentata* (Vine tea), vine tea has more than 20% content of DMY. In our previous study, we have investigated the preventive effects of vine tea polyphenols (VTP) on Western diet-induced metabolic syndrome, and the results have showed that VTP prevented fatty liver disease, improved lipids metabolism and regulated gut microbiota compostion. To clarify the mechanism of the preventive effect of DMY on metabolic syndrome, in this study, we focused on the gut-liver axis communication, and further investigated the effect of DMY on lipids-associated bile acid secretion, lipoprotein synthesis, gut microbiota metabolites and lipogenesis in obesity-induced metabolic disorder.

Methods: The C57BL/6N 5-week-old male mice were divided into 6 groups: Normal diet (ND), ND+1%VTP, ND+1%DMY, Western diet (WD), WD+1%VTP, WD+1%DMY with free access to water and feed. Feed intake and body weight were recorded per week. The feces were collected in the begining and 12-weekvof experiment. After the mice were sacrificed, livers were collected for Western blot and hepatic histology analysis. Blood serum were collected for transaminases, blood lipids, glucose, insulin and cytokines assays. Bile acids were determined in liver and intestine. LPS in intestine and liver were evaluated by Elisa kit. DNAs from feces were extracted to identify the gut microbiome by sequencing 16S rRNA genes.

Results: Body weight of mice in WD group is significantly higher than in WD with supplementation DMY or VTP ($p < 0.05$), but feed intake has no significant difference. Hepatic histological assay revealed that a number of lipid droplets were observed in liver of WD group, and are reduced in the mice provided with VTP or DMY. Furthermore, we are investigating the gut microbiome composition by sequencing 16S rRNA genes and bile acids synthesis condition, the results will show how vine tea-derived DMY interaction with gut microbiota and host metabolism to prevent the metabolic syndrome induced by WD.

Conclusion: Our data indicated that *Ampelopsis grossedentata* VTP and its major bioactive compound DMY could prevent WD diet-induced metabolism syndrome by regulating bile acids secretion, microbiota compositions and metabolites

Dihydromyricetin, lipids metabolism, gut microbiota

発表責任者：De-Xing Hou（k8469751@kadai.jp）

講演番号：3A03p05
講演日時：3 月 27 日 14:34～ センター2 号館 A03 会場

スルフォラファンの肥満抑制効果に対する腸内細菌叢の変化の解析
Analysis of changes in the intestinal flora for obesity suppression of sulforaphan
○小高 愛未[1]、正路 健太[2]、松谷 峰之介[3]、志波 優[3,4]、松本 雄宇[1,2]、鈴木 司[1,2]、山本 祐司[1,2]、井上 順[1,2] ([1]東農大・応生化・農化、[2]東農大院・農・農化、[3]東農大・生物資源ゲノム解析セ、[4]東農大・生命科)
○ Manami KODAKA[1], Kenta SHOJI[2], Minenosuke MATSUTANI[3], Yuh SHIWA[3,4], Yu MATSUMOTO[1,2], Tsukasa SUZUKI[1,2], Yuji YAMAMOTO[1,2], Jun INOUE[1,2] ([1]Tokyo Univ. of Agric., [2]Tokyo Univ. Agric., Grad. Sch. of Agric., [3]NGRC, Tokyo Univ. of Agric., [4]Fac. Life Sci., Tokyo Univ. of Agric.)

【目的】メタボリックシンドロームを代表とする生活習慣病の原因の一つとして脂質代謝異常が挙げられる。その調節機構の中心的な役割を担っているのが転写因子 SREBP である。SREBP の過剰な活性化は、脂質合成の亢進やインスリンシグナルの低下を引き起こし、脂肪肝やインスリン抵抗性に繋がることが知られている。したがって SREBP は生活習慣病改善のターゲットとして有効であると考えられる。私たちの研究グループではこれまでに、SREBP 活性を抑制する食品成分としてスルフォラファン(SFaN)を見出している。SFaN は抗酸化作用やがん抑制効果が報告されており、これまでに私たちは SREBP の分解を亢進させることによりその活性を抑制することや肥満抑制効果を示すことを明らかにしている。また、近年、肥満のヒトの腸内細菌叢を移植されたマウスが肥満になることが明らかになり、腸内細菌叢が太りやすさに関係していると考えられている。そこで本研究では、SFaN の肥満抑制効果に腸内細菌叢が関与しているか個体レベルでの解析を目的とした。
【方法】マウスに高脂肪食を 7 週間与え肥満状態にした後、3 群に分け、高脂肪食、SFaN を 0.03%もしくは 0.1%(w/w)含む高脂肪食のいずれかを 8 週間与えた。飼育期間中は肥満の指標として経時的に体重を測定し、腸内細菌叢のゲノム DNA を抽出するため糞を回収した。15 週の飼育後、肝臓、脂肪組織、盲腸内容物を摘出し、血液を採取して各種パラメーターを測定した。
【結果】高脂肪食を摂取したマウスは体重の増加が見られたが、SFaN を含む高脂肪食を摂取したマウスではそれが抑制された。現在、肝臓中のトリグリセリド量の変化や SREBP のタンパクおよび mRNA 量、血中のコレステロール量等を測定している。また、糞および盲腸内容物から腸内細菌叢のゲノム DNA を抽出し、腸内細菌叢の変化を解析中である。

sulforaphan, SREBP, intestinal flora

講演番号：3A03p06
講演日時：3 月 27 日 14:45～ センター2 号館 A03 会場

食事脂質由来腸内細菌代謝産物と宿主エネルギー代謝制御

Gut microbiota conferes host resistance to obesity by metabolizing dietary polyunsaturated fatty acids

○向山 広美[1]、宮本 潤基[1,2]、五十嵐 美樹[1]、木村 郁夫[1,2]（[1]東京農工大学大学院 農学研究院 応用生命化学専攻、[2]AMED-CREST）
○ Hiromi MUKOUYAMA[1], Junki MIYAMOTO[1,2], Miki IGARASHI[1], Ikuo KIMURA[1,2]
([1]Department of Applied Biological Science, Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, [2]AMED-CREST)

【背景・目的】

近年の欧米食の普及に伴い、食用油として用いられる植物性脂肪の内、大豆油や菜種油に多く含まれるリノール酸のような ω6 系多価不飽和脂肪酸の摂取量が増加する一方、えごま油やシソ油などに多く含まれる α リノレン酸のような ω3 系多価不飽和脂肪酸の摂取量は減少しており、ω6 / ω3 バランスの破綻は代謝性疾患の発症と関連することが明らかにされている。また、食事中の多価不飽和脂肪酸は腸内細菌叢の構成を変化させることが知られており、近年の腸内細菌研究によって、食事中の多価不飽和脂肪酸の新規な代謝経路が同定されたが、その代謝産物が宿主の生体恒常性維持に及ぼす影響は不明なままである。我々は先行研究において、食事中の多価不飽和脂肪酸の一つであるリノール酸の腸内細菌初期代謝産物が、長鎖脂肪酸受容体に対してリノール酸よりも高い親和性を示すことを見出した。次なる検討として、食事脂質－腸内細菌との相互作用、さらにはその代謝産物による長鎖脂肪酸受容体を介した宿主エネルギー代謝制御機構の解明を目的として検討を行った。

【方法】

食事脂質由来の多価不飽和脂肪酸およびその代謝産物をマウスに投与し、各種代謝パラメータや腸内細菌叢への影響を解析した。また、遺伝子改変マウスや無菌マウスを用いて分子メカニズムの検討を行った。

【結果・考察】

腸内細菌が食事中の多価不飽和脂肪酸の代謝を制御することで、宿主の高脂肪食誘導性肥満に対する抵抗性に関与することが明らかとなった [1)]。近年の食の欧米化に伴う肥満症患者の増加は社会的な問題となっているが、本研究によって腸内環境を制御する食習慣や腸内細菌代謝産物が、代謝性疾患の新たな治療法につながる可能性が示された。また、本研究は食－腸内細菌－宿主の相互連関が、宿主のエネルギー恒常性維持に寄与することを示唆しており、腸内細菌や代謝産物が病態に対してだけでなく、我々の日常生活においても重要な役割を果たしている可能性が示された。

1) Miyamoto J, Igarashi M, Watanabe K, Karaki SI, and Mukouyama H et al., Nat commun. 2019.

Polyunsaturated fatty acids, Free fatty acid receptors, Gut microbiota

講演番号：3A03p07
講演日時：3 月 27 日 15:06～ センター2 号館 A03 会場

肝星細胞の活性化及びコラーゲン産生に対するブラジル産プロポリスの効果の検討

Study on effect of Brazilian propolis for activation and collagen production of hepatic stellate cells

○小川 智弘（近大工）
○Tomohiro OGAWA (Kindai Univ.)

【諸言】近年、食の欧米化に伴い高カロリー食による慢性的な脂肪肝や肝炎から派生する肝硬変の発症例が増加している。脂肪肝や肝炎は可逆的な疾患であるのに対し肝硬変は不可逆的であり、その治療は困難であるため、その予防が重要視されている。プロポリスには天然化合物が数百種類含まれており、これらの肝疾患を予防する効果が期待される。本研究ではプロポリスに含まれる成分に着目し、プロポリス成分の肝星細胞に対する作用機序を明らかにするとともにプロポリス成分の肝星細胞のコラーゲン生産や活性化、細胞増殖に対する影響を検討した。
【実験方法】マウス肝臓から分離・培養した肝星細胞及びヒト肝星細胞株 LX-2 を実験に使用した。プロポリスまたは各種プロポリス成分を肝星細胞に作用させ、肝線維化関連遺伝子及びタンパク質の発現解析、細胞増殖に対する効果を検討した。また、プロポリス成分添加濃度や反応時間によるそれらの変化も検討した。解析には、定量性 PCR 法や細胞増殖アッセイキット（CCK-8）、ウエスタンブロット法、カスパーゼの活性測定を行った。
【結果と考察】プロポリス及びプロポリス成分であるクリシンやケンフェロールを肝星細胞に添加すると、細胞増殖が顕著に抑制された。同様に、肝星細胞の活性化マーカーである smooth muscle alpha-actin 遺伝子及び I型コラーゲン遺伝子がプロポリス及びプロポリス成分添加により減少することも確認された。また、線維化関連遺伝子である MMP-2 や MMP-9 の遺伝子発現が 25～50%にまで有意に減少しており、肝星細胞の遊走性も顕著に抑制されていることも明らかにした。さらに、カスパーゼ-3 の活性はケンフェロール添加により増加したため、ケンフェロールは肝星細胞のアポトーシスを誘導することも明らかにした。以上のことより、ブラジル産プロポリスには肝星細胞の活性化を抑制し、肝硬変の原因となるコラーゲン産生の減少及び肝星細胞のアポトーシスを誘発する成分が含まれていることが示唆された。このことから、プロポリスには肝線維化を抑制する効果が期待された。

Hepatic stellate cell, Propolis, Liver fibrosis

講演番号：3A03p08
講演日時：3 月 27 日 15:17～ センター2 号館 A03 会場

骨格筋エネルギー代謝と脂肪代謝におけるエゾウコギの影響

Effect of *Eleutherococcus senticosus* on skeletal muscle energy metabolism and fat metabolism

○山中 敦詞[1]、小野 夏彦[1]、瓜生 圭介[1]、丸 勇史[1]、岡田 陽子[2]、橋本 健志[2]([1]備前化成、[2]立命館大)
○Atsushi YAMANAKA[1], Natsuhiko ONO[1], Keisuke URYU[1], Isafumi MARU[1], Yoko OKADA[2], Takeshi HASHIMOTO[2] ([1]Bizen Chemical Co., Ltd., [2]Ritsumeikan University)

【目的】

エゾウコギ(*Eleutherococcus senticosus*)(ES)は、ウコギ科の植物で古くから薬用植物として食されており、eleutheroside B などのテルペノイド類や、sesamin、isoflavidin、chlorogenic acid などの存在が明らかにされている。また、ES の経口摂取により運動機能の向上や脂肪の低減が、ヒト試験により明らかにされている。これは、ES がエネルギー産生や脂質代謝に関与することを示唆しているが、メカニズムについては明らかにされていない。そこで本研究では、ES のマウス横紋筋細胞(C2C12 細胞)におけるエネルギー代謝およびマウス前駆脂肪細胞(3T3-L1 細胞)の分化誘導や脂質代謝への影響について検討したので報告する。

【方法および結果】

(1)骨格筋細胞のエネルギー代謝：ES を添加した DMEM 培地で培養した C2C12 細胞では、AMPK(AMP-activated protein kinase)のリン酸化が促進した。一方、脂肪代謝に係る CPT1 やエネルギー産生に関与する UCP3 の発現に変化がなかった。

(2)脂肪細胞の分化および脂質代謝：ES を添加した DMEM 培地で培養した 3T3-L1 細胞において、顕著に細胞内の脂肪滴が縮小した。また、ES 添加で培養した同細胞は、脂肪分解に関連する ATGL の発現が ES 無添加と比較して有意に増加した。一方、ES 添加で培養した同細胞は、ACC のリン酸化が促進したが、脂肪合成酵素 FAS も増加した。

【考察】

(1)：C2C12 細胞では、ES の添加により AMPK のリン酸化が促進した。このことから、骨格筋におけるエネルギー産生を促進することで運動機能を向上させる可能性が示唆された。

(2)：3T3-L1 細胞では、ATGL の発現が増加したことから、脂肪分解の亢進作用により、脂肪蓄積を抑制する可能性が示唆された。

Eleutherococcus senticosus, Ampk, lipid

発表責任者：山中敦詞（atsushi-yamanaka@bizen-c.co.jp）

講演番号：3A03p09
講演日時：3 月 27 日 15:28～ センター2 号館 A03 会場

発酵乳ケフィアが筋肉細胞に及ぼす効果

Effects of fermented milk Kefir in muscle cells

○木下 将人[1]、本郷 玲奈[2]、大友 剛[3]、徳丸 浩一郎[3]、照屋 輝一郎[1,2,4]([1]九大院シス生、[2]九大院生資環、[3]日本ケフィア、[4]九大院農院)
○Masato KINOSHITA[1], Reina HONGO[2], Tsuyoshi OTOMO[3], Koichiro TOKUMARU[3], Kiichiro TERUYA[1,2,4] ([1]Grad. Sch. Sys. Life Sci., Kyushu Univ., [2]Grad. Sch. Biores. Bioenv. Sci., Kyushu Univ., [3]Nihon Kefir Co. Ltd., [4]Fac. Agr., Kyushu Univ.)

【目的】

ケフィアは世界三大長寿地域であるコーカサス地方発祥の発酵乳であり、複数の乳酸菌に加え酵母も発酵に関わることが特徴となっている。当研究室では、発酵乳ケフィアの健康への有用性に関して研究を行ってきた。近年、問題となっているメタボリックシンドロームは、内臓脂肪の蓄積に加え、動脈硬化危険因子が一個人に重積している状態であり、その要因の一つとして、エネルギー代謝異常が挙げられる。本研究では、ケフィアが筋肉細胞のエネルギー代謝に及ぼす効果を検討した。

【方法】

ケフィア標品は、日本ケフィア株式会社から提供された NKG ケフィア HPT 粉末（高タンパク質ケフィア）を使用した。分化誘導処理を行ったマウス由来 C2C12 筋管細胞に高タンパク質ケフィア処理を行った後、WST-1 assay ならびに Hoechst 33342 染色を行い、細胞呼吸活性評価を行った。次に、高タンパク質ケフィアに存在するエネルギー代謝亢進活性成分の探索を行うために、透析膜を用いた分子量分画を行った後、細胞呼吸活性評価を行った。また、タンパク質合成阻害剤シクロヘキシミドを用いて、タンパク質合成阻害状況下における細胞内 ATP 量の変化を時間依存的に検証した後、タンパク質合成に関わるシグナル経路に及ぼす効果を Western blotting にて検証した。

【結果・考察】

WST-1 assay と Hoechst 33342 染色の結果より、高タンパク質ケフィア処理によって筋肉細胞 1 個当たりのエネルギー代謝の亢進効果が確認された。また、主要なエネルギー代謝亢進活性成分は、発酵により生じた分子量 25,000 以下の成分であると示唆された。高タンパク質ケフィア処理時の細胞内 ATP 量の減少がシクロヘキシミド処理により抑制されたこと、そしてタンパク質合成関連因子の増加から、高タンパク質ケフィア処理はタンパク質合成促進により ATP を消費した結果、エネルギー代謝の亢進が生じていると考えられた。以上のことから、高タンパク質ケフィアはエネルギー代謝亢進を介したメタボリックシンドロームの予防・改善効果を有することが示唆された。

Kefir, skeletal muscle, energy metabolism

発表責任者：照屋輝一郎（kteruya@grt.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3A03p10
講演日時：3 月 27 日 15:39～ センター2 号館 A03 会場

8R-ヒドロキシエイコサペンタエン酸（8R-HEPE）、8R-ヒドロキシエイコサテトラエン酸（8R-HETE）、10R-ヒドロキシドコサヘキサエン酸（10R-HDHA）供給源としてのツノナシオキアミ活用

Euphausia pacifica as a source of 8(R)-hydroxy-eicosapentaenoic acid (8R-HEPE), 8(R)-hydroxy-eicosatetraenoic acid (8R-HETE) and 10(R)-hydroxy-docosahexaenoic acid (10R-HDHA)

○山田 秀俊、熊谷 加奈子、植村 亜衣子、結城 彩花（岩手生物工学研究センター）
○ Hidetoshi Yamada, Kanako Kumagai, Aiko Uemura, Sayaka Yuki (Iwate Biotechnology Research Center)

ツノナシオキアミは ppm オーダーの 8-HEPE, sub-ppm オーダーの 8-HETE と 10-HDHA を含有する珍しい生物である。8-HEPE, 8-HETE, 10-HDHA はヒトの健康増進に寄与する可能性を有する化合物であるが、動物試験に用いるために必要な量の 8-HEPE, 8-HETE, 10-HDHA を得るのが難しいことがボトルネックとなり、研究が十分に進展していない。

本研究では、8-HEPE, 8-HETE, 10-HDHA 研究のボトルネック解消のために、ツノナシオキアミに内在する酵素を利用した 8-HEPE, 8-HETE, 10-HDHA の効率的取得方法について検討した。ツノナシオキアミを 20℃で 20 時間インキュベートすることで 8-HEPE を 45 倍、8-HETE を 19 倍、10-HDHA を 38 倍に増加させることができ、1 kg のツノナシオキアミから 199.4mg の 8-HEPE, 2.1mg の 8-HETE, 5.6mg の 10-HDHA を効率的に精製することができた。

8-HEPE, 8-HETE, 10-HDHA は不斉炭素を有しているが、ツノナシオキアミに含有される 8-HEPE, 8-HETE, 10-HDHA の立体化学構造は同定されていなかった。我々はキラルカラムを用いた LC/QTOFMS 解析による HETE, HEPE, HDHA の立体化学構造分析方法を開発し、ツノナシオキアミに含有する 8-HEPE, 8-HETE, 10-HDHA が 8*R*-HEPE, 8*R*-HETE, 10*R*-HDHA であることを明らかにした。哺乳動物や植物に含有される水酸化脂肪酸の多くが *S* 型であり、*R* 型の水酸化脂肪酸は非常に珍しい。

ツノナシオキアミは有用な 8*R*-HEPE, 8*R*-HETE, 10*R*-HDHA 供給源であり、本方法を用いることで効率的に精製することができる。

8-HEPE, Krill, 10-HDHA

発表責任者：山田秀俊（hyamada@ibrc.or.jp）

講演番号：3A03p11
講演日時：3 月 27 日 15:50～ センター2 号館 A03 会場

琥珀抽出物の生活習慣病に対する多機能効果について

The multifunctional effects of amber extracts on lifestyle-related diseases

○山本 卓也[1,2,3]、武田 令子[1,2]、岡崎 一眞[1,2]、関田 真理絵[1,2]、五十嵐 則夫[2]、山野 幹夫[1,2]、オスマン ムハンマド[3]、十河 衿香[3]、坂本 和一[3]([1]琥珀バイオテクノロジー、[2]ヤマノビューティケミカル、[3]筑波大生命環境)
○Takuya YAMAMOTO[1,2,3], Reiko TAKEDA[1,2], Kazuma OKAZAKI[1,2], Marie SEKITA[1,2], Norio IGARASHI[2], Mikio YAMANO[1,2], Mahmoud OTHMAN[3], Erika SOGOU[3], Kazuichi SAKAMOTO[3]
([1]Kohaku Bio Technology, [2]Yamanobeautychemical, [3]Tsukuba Univ.)

【背景・目的】数千万年前の松柏科植物の樹液の化石である琥珀は、ネックレスなどの装飾品や工芸品に使用されているが、古くから民間伝承的に様々な薬理効果があるといわれてきた。しかしながらそれらはどのようなメカニズムで効果があるのかほとんど研究されていない。そこで我々は、琥珀の生活習慣病に対する効果について検討を行ってきており、日本農芸化学会関東支部 2017 年度大会において、琥珀抽出物の糖質の分解・吸収抑制効果について、細胞レベルで効果があることをすでに報告している。今回はさらに脂質代謝、血圧に対する効果についても調べた。
【方法】ロシア産琥珀の粉末 100ｇを、1.8L の 50%エタノール水溶液を用いて常温で 1 週間抽出し、減圧乾固、凍結乾燥したものを被験サンプルとして用いた。3T3-L1 細胞を DMI（2.5μM デキサメサゾン、0.5μM 3-イソブチル-1-メチルキサンチン及び 1.7μM インスリン）で脂肪細胞に分化誘導後、琥珀抽出物を添加して、培地中に放出されてくるグリセロール量を測定した。また血圧上昇に関するアンジオテンシン-Ⅰ変換酵素（ACE）活性に対する影響も調べた。続いて高脂肪食で 5 週間飼育した C57BL/6J マウスについて、生活習慣病に関連する各指標を調べた。
【結果】培養脂肪細胞から放出されるグリセロール量は、添加した琥珀抽出物の濃度依存的に増加した。すなわち、脂肪の分解を促進する効果が認められた。ACE 活性は、琥珀抽出物の濃度依存的に抑制され、血圧上昇を抑制する可能性が認められた。高脂肪食飼育マウスに対して、体重増加の抑制、脂肪組織量・血中中性脂肪量・コレステロール値の減少、血糖値の上昇抑制効果が認められた。以上の結果より、琥珀抽出物は生活習慣病に対して多機能な効果を有することが示唆された。現在、詳細な作用メカニズムの検討と有効成分の同定を行っている。

amber, lifestyle-related disease, metabolic syndrome

発表責任者：山本卓也（t-yamamoto@kohaku-lab.com）

講演番号：3A03p12
講演日時：3 月 27 日 16:01～ センター2 号館 A03 会場

超硬質米と黒米のロウカット玄米の特性
Characteristis of wax-free brown rice from super-hard rice and black rice
○中村 澄子[1]、雑賀 慶二[2]、部屋 泰伸[2]、西山 直希[2]、小林 和幸[3]、松井 崇晃[3]、板谷越 重人[3]、大坪 研一[1] ([1]新潟薬大、[2]東洋ライス株式会社、[3]新潟県農総研)
○ Sumiko NAKAMURA[1], Keiji SAIKA[2], Yasunobu HEYA[2], Naoki NISHIYAMA[2], Yasuyuki KOBAYASHI[3], Takaaki MATSUI[3], Shigeto ITAYAGISHI[3], Ken'ichi OHTSUBO[1] ([1]Niigata Univ. Pharm. A.LS, [2]Toyo Rice Co., [3]Niigata Agr. Res. Ins.)

【目的】我が国は超高齢社会を迎え、食による生活習慣病の予防が必要とされている。本研究では、食後血糖上昇の抑制と抗酸化性の付与による糖尿病・認知症複合予防効果のある米加工品の開発を目的に研究を行った。本年度は、超硬質米「新潟 129 号」と紫黒米「おくのむらさき」の金芽ロウカット玄米の理化学特性と機能性の評価を行った。
【方法】原料米として、一般良食味米である「コシヒカリ」、アミロペクチン長鎖型の超硬質米として「新潟 129 号」、紫黒米「おくのむらさき」を用いた。原料米の吸水率、酵素活性測定キットによるアミラーゼ活性測定を行い、色差計による色調測定、キット法による遊離糖含量測定、テンシプレッサー（バルク法）による米飯物性測定および官能検査を行った。また、RVA による糊化特性試験を行った。機能性の評価として、難消化性澱粉（RS）、抗酸化性（ORAC 値）を測定した。
【結果および考察】各種ロウカット玄米の吸水率は、コシヒカリ精米とほぼ同等か、それ以上であることが明らかとなった。各種ロウカット玄米米飯の物性値は、未処理玄米に比べ、「硬さ」と「こし」が低下し、「粘り」と「付着」が増加する傾向が認められた。また、ロウカット玄米米飯は、未処理玄米米飯に比べ、白度（WB）、明度（L*）が高く、赤味（a*）、黄味（b*）が低下する傾向を示し、玄米米飯の外観が向上することが明らかとなった。原料玄米粒のα-アミラーゼおよびβ-アミラーゼ活性値は、ロウカット玄米の方が、未処理玄米に比べて非常に高い値を示した。この結果、玄米米飯の遊離糖含量は、各品種とも、ロウカット玄米の方が未処理玄米より高い値を示した。新潟 129 号玄米米飯の RS 含量は、コシヒカリ玄米米飯の約 25 倍高い値を示し、一方、ロウカット新潟 129 号玄米米飯の RS 含量は、原料玄米とほぼ同じ値を示した。総 ORAC 値は、ロウカットコシヒカリ玄米米飯およびロウカット新潟 129 号玄米米飯の各値が、未処理玄米米飯に比べ、やや低い値を示したが、ロウカットおくのむらさき玄米米飯は、未処理玄米米飯に比べ、約 1.1 倍高い値を示した。また、玄米およびロウカット玄米の糊化開始温度は、ほぼ同じ値を示し、老化指標の Consistency の値は、各品種ともロウカット玄米が玄米に比べ、やや高い値を示した。コシヒカリロウカット玄米の官能検査では、コントロール（玄米 18 時間浸漬）に比べ、18 時間浸漬して炊飯した米飯は、1 時間浸漬して炊飯した米飯に比べ、 「香り」、「味」、「硬さ」、「粘り」において高い評価が得られた。この結果、各種ロウカット玄米の食味には、適切な浸漬時間を探求する必要があることが明らかとなった。以上の結果、3 品種の金芽ロウカット玄米を配合し、適正条件で炊飯することで目的達成が有望と思われる。

rice, texture, anti-oxidation

発表責任者：大坪研一（ohtsubok@nupals.ac.jp）

講演番号：3A03p13
講演日時：3 月 27 日 16:21～ センター2 号館 A03 会場

分岐鎖アミノ酸は骨格筋・肝臓の糖代謝を制御し、低タンパク質食摂取による肝臓脂肪蓄積を抑制する

Branched chain amino acids suppress hepatic fat accumulation induced by low protein diet via regulating hepatic and muscle glucose metabolism

○内田 海登[1]、加来 香苗[2]、竹中 麻子[2] ([1]明治大院農学研究科、[2]明治大農)
○Kaito UCHIDA[1], Kanae KAKU[2], Asako TAKENAKA[2] ([1]Meiji Univ Graduate School, [2]Meiji Univ)

【背景・目的】我々は、低タンパク質食摂取によって誘発される肝臓脂肪蓄積が、分岐鎖アミノ酸 (BCAA) を通常食と同量になるまで添加することで抑制されることを見い出した。本研究では、BCAA による肝臓脂肪蓄積抑制機構を検討する目的で、BCAA が脂肪酸合成の基質となるグルコースの肝臓と筋肉への取り込みに及ぼす影響を解析した。
【実験】8 週齢雄性 C57BL/6 マウスに、カゼインを 15%含む通常食 (CON) もしくは、カゼインを 3%含む低タンパク質食に BCAA を通常食と同量になるように添加した食餌 (LP+BCAA) 、LP+BCAA の BCAA をグルタミン酸に置き換えた食餌 (LP+Glu) を 10 日間給餌した。最終日に 12-15 時間絶食させたのち、各食餌を 1 時間再給餌後に 2-deoxyglucose (2DG) を 10 μmol 腹腔内に投与した。30 分間絶食下で各組織に 2DG を取り込ませ、その後血漿・肝臓・白色脂肪・褐色脂肪・ヒラメ筋・腓腹筋を採取した。各組織中の 2-deoxyglucose-6-phosphate (2DG6P) 濃度および、肝臓以外の組織では 2DG6P 濃度・血糖値・血中 2DG 濃度から糖取り込み率 (Rg) を算出し、各組織の糖取り込み活性を評価した。さらに肝臓の、脂肪酸合成系遺伝子である SEREBP1c・ACC・FAS・SCD1 および糖新生の最終段階の律速酵素である G6Pase の遺伝子発現量をリアルタイム PCR により測定した。
【結果】肝臓中性脂肪濃度は、LP+Glu 群では CON と比較し有意に増加し、LP+BCAA 群では LP+Glu 群と比較し有意に減少した。肝臓の 2DG6P 濃度は LP+BCAA 群で LP+Glu 群より有意に低下した。ヒラメ筋の Rg は LP+Glu 群では CON 群と比較し有意に低下し、LP+BCAA 群では LP+Glu 群と比較し有意に増加した。また肝臓の脂肪酸合成系の遺伝子発現量は LP+Glu 群で CON 群より有意に増加したが、LP+BCAA 群においても LP+Glu 群と同様であった。一方で、G6Pase 遺伝子発現量は LP+BCAA 群では LP+Glu 群と比較し有意に増加した。
【考察】BCAA は肝臓の脂肪酸合成系の遺伝子発現を抑制しなかったが、G6Pase の遺伝子発現増加を介してグルコースの細胞外への放出を促進した。同時に BCAA は骨格筋における糖取り込みを増大し、間接的にグルコースの肝臓への流入量を低下させて、新規脂質合成を介した肝臓脂肪蓄積を抑制する可能性が示された。

low protein diet, BCAA, fatty liver

発表責任者：竹中麻子（takenaka@meiji.ac.jp）

講演番号：3A03p14
講演日時：3 月 27 日 16:32～ センター2 号館 A03 会場

食事誘導性肥満ラットにおける GLP-1 分泌応答の増強には回腸部が寄与する

The Ileum contributes to increased postprandial GLP-1 response in diet-induced obese rats

○佐野 杏莉、比良 徹（北海道大農）
○Anri SANO, Tohru HIRA (Hokkaido Univ.)

GLP-1(Glucagon-like peptide-1)は食事摂取に応じて分泌される消化管ホルモンで、下部消化管に多く分布する L 細胞から分泌される。インスリン分泌促進作用や膵臓β細胞の保護作用、食欲抑制作用などが知られ、糖尿病治療のターゲットとしても知られている。食事に対する GLP-1 分泌応答が、肥満者や糖尿病患者で減弱しているとの報告もあるが、これを支持しない試験報告もあり、コンセンサスは得られていない[(1)]。当研究室では食事誘導性肥満ラットにおいて、栄養素刺激に対する GLP-1 分泌応答の増大が観察されているが、そのメカニズムは不明である。ここでは、GLP-1 分泌応答の増大が小腸のどの部位で生じているのかを明らかにするため、食事誘導性肥満ラットの小腸上部と下部それぞれに栄養素を投与した際の GLP-1 分泌の応答を検討した。

実験には Sprague Dawley 系雄性ラット 5 週齢を用いた。馴化後、普通食(AIN-93G 準拠食)と水道水を与える C 群、30%(w/w)高脂肪食と水道水に加えて 30%スクロース水を与える H 群に分け 5 週間飼育した後、小腸内に直接栄養素を投与して経時的に門脈血を採取するための *in situ* 試験を実施した。*in situ* 試験では、C 群と H 群をさらに液体食を十二指腸(小腸上部)または回腸(小腸下部)に投与する群に分けた。麻酔下にて腸管内に液体食を投与し、あらかじめ留置しておいた門脈カテーテルより 0～120 分まで経時的に採血し、血漿中の GLP-1 濃度を測定した。また、解剖時に十二指腸から結腸までを採取し、GLP-1 含量を部位別に測定した。

液体食投与に対する GLP-1 分泌応答は、C 群、H 群ともに十二指腸投与に比べて回腸投与の方が大きく、L 細胞が小腸下部に多く存在することを反映すると考えられた。十二指腸投与では C 群と比較して H 群で GLP-1 の分泌応答が小さく、一方回腸投与では投与後 15 分から H 群で GLP-1 の分泌応答が大きかった。この結果から食事誘導性肥満における GLP-1 分泌応答の増大には回腸の寄与が大きいことが示唆された。また、腸組織中の GLP-1 含量は、空腸部、回腸部とも C 群、H 群の間に差は見られなかった。従って、食事誘導性肥満ラットにおける GLP-1 分泌応答の増大には回腸の寄与が大きく、それには組織中 GLP-1 含量ではなく、L 細胞の栄養素への感受性が亢進している可能性が考えられた。

【参考文献】

(1) Hira, T.; Pinyo, J.; Hara, H. What Is GLP-1 Really Doing in Obesity? Trends in Endocrinology & Metabolism, 2019.

Glucagon-like peptide-1, diet induced obesity, postprandial GLP-1 response

発表責任者：佐野杏莉（anri_xer@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：3A03p15
講演日時：3 月 27 日 16:43～ センター2 号館 A03 会場

ビートファイバー摂取はラットの摂取エネルギーを減少させ、胆汁酸プールと小腸粘膜プレプログルカゴン遺伝子発現を増加させる
Beet dietary fiber decreases energy intake, and increases bile acid pool size and preproglucagon mRNA.
○藤谷 美菜、越智 博介、前野 元希、長森 公寛、岸田 太郎 (愛媛大農)
○mina fujitani, hirosuke ochi, genki maeno, masahiro nagamori, taro kishida (Ehime Univ.)

【目的】我々は、高脂肪飼料で飼育したラットにビートファイバー(BF)を摂取させると、摂取エネルギー(EI)が低下することを見出し、その機構解明を目指している。レプチンレセプター(Ob-Rb)機能欠損ラットを用いた検討で本効果には Ob-Rb が必須であることが示唆されたため、視床下部での Ob-Rb 遺伝子発現増加による機構を検討してきたが、明確な結果は得られていない。それらの検討の中で、3 食制により摂食パターンを揃えた状態でサンプリングし、小腸粘膜の消化管ホルモンの遺伝子発現を測定すると、GLP-1 の前駆体プレプログルカゴンの遺伝子発現の増加がみられた。GLP-1 がレプチンの作用を増強することが報告されており、プレプログルカゴン遺伝子発現の増加が BF の効果に重要である可能性が考えられた。我々の先の研究で、高スクロース飼料で飼育したラットに BF を与えると胆汁酸プールが増大することが明らかとなっており、胆汁酸が TGR5 を介してプレプログルカゴン遺伝子発現を増加させることが報告されていることから、本研究では、BF 摂取が高脂肪食摂取ラットでも胆汁酸プールを増大させることを確認し、それによってプレプログルカゴン遺伝子発現を増加させ、EI を減少させるのかを検討した。
【方法】実験 1: 6 週齢の SD 系雄ラットを脂質含量 20%の高脂肪無繊維(C)飼料またはそれに BF を 7%添加した飼料で 56 日間飼育した(n=10)。実験 2: 同様のラットと飼料を用いた。実験開始 14、28、42 日間飼育した (n=10)。
【結果・考察】56 日間の BF 摂取により総 EI が有意に低下した。この際、小腸内容物中およびの胆汁酸量を測定したところ、有意な増加がみられた。糞中胆汁酸排泄量も有意に増加した。14、28、42 日間の BF 摂取により回腸粘膜プレプログルカゴン遺伝子発現に有意な増加または増加傾向がみられた。BF 摂取により胆汁酸プール量が増加し、それによってプレプログルカゴン遺伝子発現が増加することで EI が低下するのかもしれない。血中総 GLP-1 濃度には BF 摂取による影響はみられなかったが、GLP-1 は主に求心性迷走神経を介して食欲を低下させることから、血中濃度だけではなく組織形態学的な解析が必要であると考えられる。

dietary fiber, GLP-1, bile acid pool size

講演番号：3A03p17
講演日時：3 月 27 日 17:05～ センター2 号館 A03 会場

イヌリンの高脂肪食マウスの血糖値に与える影響

Effect of　inulin on blood glucose level of mice fed high-fat diet

○滝口 泰之、田中 祐輔、清水 佳純、竹島 妃七（千葉工大生命）
○Yasuyuki TAKIGUCHI, Yusuke TANAKA, Kasumi SHIMIZU, Hina TAKESHIMA (Chiba Institute of Tech.)

背景および目的　イヌリンはフルクタンの一種で，乾燥キクイモに 35 から 50%程度含まれる水溶性食物繊維である。イヌリンには血糖値を下げる効果が報告されているが，その作用機作については明確になっていない。今回，高齢マウスに高脂肪食を与え，イヌリン，キクイモの添加効果を検証したので報告する。

実験方法　BALB/c マウス（日本クレア，6 周齢，メス）9 匹を通常食（オリエンタル酵母，MF）を与えて 24 週間飼育した。その後，これらのマウスを 3 匹ずつ 3 群に分けて，高脂肪食（オリエンタル酵母，HFD60）投与群，高脂肪食＋5%イヌリン投与群，高脂肪食＋5%キクイモ粉末投与群とした。45 日間これらの飼料を用いて飼育し，体重変化と投与前後の血糖値を測定した。マウスの血糖値は実験動物用血糖値測定器（フナコシ，ラボグルコ）を使用して測定した。また，グルコース負荷試験では，BALB/c マウス（日本クレア，6 周齢，メス）に，グルコース 25 mg，グルコース 25 mg＋イヌリン 25 mg，グルコース 25 mg＋イヌリン 50 mg を経口投与し，30 分ごとに 120 分間の血糖値測定を行った.

結果及び考察　高脂肪食投与群，高脂肪食＋イヌリン投与群，高脂肪食＋キクイモ投与群の体重変化を比べると，高脂肪食投与群の平均体重が最も高く，イヌリン投与群とキクイモ投与群はやや低い傾向が見られたが，有意差は無かった。また，高脂肪食投与群，イヌリ投与群，キクイモ投与群の高脂肪食投与前のそれぞれの平均血糖値が 119，130，116 mg/dL，投与後のそれぞれの平均血糖値が 176，140，171 mg/dL となった。高脂肪食投与前の血糖値を合わせていなかったため，比較することは難しいが，イヌリン投与群の血糖値の投与前後の変化量が小さかったことから，イヌリンに血糖値の上昇抑制効果があると考えられる。また，キクイモ投与群に効果が見られなかったのは，イヌリン含量がイヌリン投与群より低かったことやキクイモのイヌリン以外の成分の影響が考えられる。また，グルコース負荷試験では，グルコース 25 mg 投与したマウスおよびグルコース 25 mg＋イヌリン 25 mg を投与したマウスでは血糖値が 30 分後に上昇したが，グルコース 25 mg＋イヌリン 50 mg を投与したマウスでは血糖値の 30 分後増加は観察されず，変動幅も小さくなった。

Inulin, blood glucose level, high-fat diet

発表責任者：滝口　泰之（takiguchi.yasuyuki@p.chibakoudai.jp）

講演番号：3A04a01
講演日時：3 月 27 日 09:30～ センター2 号館 A04 会場

Piper longum が含有する新規化合物を含むネオリグナンとその生理活性評価
Four neolignan analogs from Piper longum L. and their biological activities

○仁科 淳良[1]、西澤 一輝[1]、浮谷 基彦[1]、深津 誠[1]、ニュン ペイ[2] ([1]日大理工、[2]パセイン大)
○Atsuyoshi NISHINA[1], Kazuki Nishizawa[1], Motohiko Ukiya[1], Makoto Fukatsu[1], Phay Nyunt[2] ([1]Nihon Univ., [2]Pathein Univ.)

【目的】
ミャンマー伝統医薬の 1 アイテム *Piper longum* L.（英名 Long pepper）は、同国で抗炎症、消化促進の用途で用いられている。*P. longum* はコショウ科コショウ属の植物でコショウに似た風味をもち、沖縄県では「ピパーチ」等の名で利用され「ヒハツ」と呼ばれることもある。ミャンマー伝統医薬の成分探索研究の一環として同植物の抽出物を精製した結果、新規物質を含む 4 種のネオリグナン類縁体を単離・同定した。また、培養細胞を用いて単離化合物の生理活性を測定した結果、抗肥満、抗がん、メラニン産生抑制等の作用が認められた。今回、*P. longum* から単離したネオリグナン類の生理活性を *in vitro* 実験系で評価した結果を報告する。
【方法】
ヤンゴンの生薬マーケットで購入し、パセイン大学で品種を特定した *P. longum* の乾燥物から得た粗メタノール抽出物からヘキサン画分、酢酸エチル画分、メタノール画分を調製した。生理活性が認められた画分に含まれる成分の単離には各種クロマトグラフィーを使用した。単離化合物の化学構造は NMR スペクトル、MS および単結晶Ｘ線構造解析によって同定した。抽出物と単離化合物の①抗肥満作用はインスリンで脂肪細胞分化した 3T3-L1 細胞の脂肪蓄積量を陽性対照のチアゾリジン系抗糖尿病剤（ロシグリタゾン）または陰性対照のベルベリンと比較することにより、②抗がん作用は 4 種の人由来がん細胞と正常細胞に対する細胞毒性を MTT 法で比較することにより、③メラニン産生抑制は B16 メラノーマ細胞の α-MSH 誘導メラニン産生阻害を測定することにより把握した。被験化合物で各細胞を刺激した時の脂肪分化誘導、アポトーシス誘導、メラニン産生誘導に関連する遺伝子の増減をリアルタイムＰＣＲ、たんぱく質の量またはリン酸化レベルの増減を、ウエスタンブロット、フローサイトメーターを用いて測定し、作用メカニズムの推定を試みる。
【結果と考察】
P. longum の酢酸エチル画分を順相カラムクロマトグラフィー、逆相 HPLC 等を用いて精製し、4 化合物を単離した。各化合物の MS や NMR スペクトルを先行文献と比較することによりそれぞれを licarin(**1**)、新規物質(**2**)、eupomatenoid 7、1(**3**、**4**） と同定した。単離化合物の立体構造は単結晶Ｘ線構造解析によって決定した。4 種の単離化合物には抗肥満、抗がん、メラニン産生抑制の各作用が認められた。今後、リアルタイムＰＣＲ、ウエスタンブロッティング、フローサイトメーター等で特に化合物 **3** の抗肥満、抗がん、メラニン産生抑制のメカニズムを明らかにしていきたい。*P. longum* に単離化合物 **1**~**4** が含まれている点は新たな知見と考えており、本研究により、長期の食経験を有する同植物の新たな生理活性を提案できる可能性がある。

Piper longum, neolignan, biological activities

発表責任者：仁科淳良（nishina.atsuyoshi@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3A04a02
講演日時：3 月 27 日 09:41～ センター2 号館 A04 会場

Effects of extrinsic PlsEtn on Caco-2 and differentiated Caco-2: PlsEtn in human intestinal cancer cells and impaired intestinal lining

○EPHANTUS BERNARD[1], Shinji YAMASHITA[1], Ayaka YAMAMOTO[2], Kiyotaka NAKAGAWA[3], Teruo MIYAZAWA[3], Mikio KINOSHITA[1] ([1]Obihiro Univ., [2]Yaizu Suisankagaku Ind., [3]Tohoku Univ.)

Introduction: Ethanolamine plasmalogen (PlsEtn) is a unique ethanolamine glycerophospholipids (PE) due to the vinyl ether bond (alkenyl linkage) at the *sn*-1 position, which is more susceptible to oxidative stress therefore protects the cells by acting as an antioxidant. PlsEtn also acts as a reservoir for second messengers and is involved in membrane fusion. We have previously shown that dietary intake of marine and land-source derived PlsEtn supplemented with fish oil suppresses the formation of aberrant crypt foci (ACF) *in vivo*. Additionally, both intrinsic and extrinsic apoptosis pathways *in vivo* were attenuated. Formation of ACF and apoptosis induction are characteristics of intestinal inflammation and carcinogenesis, which are associated with oxidative stress. Therefore, in the present study, we aim at investigating the underlying mechanisms of PlsEtn and its molecular species actions on apoptosis modulation and intestinal inflammation using Caco-2 cancer cells differentiated Caco-2 cells, respectively.

Material and methods: Caco-2 cells were cultured for 4 days (cancer cells) and 21 days (differentiated Caco-2) in DMEM with 10% FBS and maintained in a humidified 5% CO_2 incubator at 37 ℃. The cells were treated with 10, 50 and 100 μM of PE obtained from ascidian (*Halocynthia roretzi*) muscle (87.3 mol% PlsEtn of PE) and porcine liver (7.2 mol% PlsEtn of PE), respectively by adding to DMEM medium with 0.1% bovine serum albumin (BSA). Differentiated Caco-2 cell were stimulated with LPS (1 μg/mL) for inflammation. Apoptosis-related proteins were determined using Human Apoptosis Array kit and TNF-α using Human TNF-α ELISA kit.

Results: Ascidian muscle PE used to treat the cells mainly contained EPA and DHA (n-3) and a high alkenyl chains level (16:0 and 18:0) while that of porcine liver PE mainly contained AA (n-6) and low alkenyl chains level. Extracellular treatment of Caco-2 cancer cells with PE for 24 h suppressed the cell viability, with 50 μM showing significant suppression than control. Interestingly, 50 μM PE treatment from ascidian muscle had significant cell viability suppression than that from porcine liver. On the other hand, extracellular treatment of differentiated Caco-2 cells stimulated with LPS led to a significant increase in cell viability. These preliminary findings suggest that PlsEtn may have the potential to modulate apoptosis in intestinal cancer cells and have anti-inflammatory effect in inflammatory bowel disease. It is also plausible to postulate that the abundance of alkenyl chains and PUFA components in PlsEtn have differences in their biological activities. We are currently conducting further studies to understand the underlying mechanisms.

Plasmalogen, Colon cancer, Inflammation

講演番号：3A04a03
講演日時：3 月 27 日 09:52～ センター2 号館 A04 会場

がん幹細胞に対する酵素消化低分子化フコイダン抽出物と抗がん剤の併用効果

Effects of combined use of enzymatically digested low-molecular weight fucoidan extract and anti-cancer drug on cancer stem cells

○橋本 真奈[1]、徳永 佐和[1]、江藤 博[2]、照屋 輝一郎[1,3] ([1]九大院シス生、[2]第一産業(株)、[3]九大院農院)
○Mana HASHIMOTO[1], Sawa TOKUNAGA[1], Hiroshi ETO[2], Kiichiro TERUYA[1,3] ([1]Grad. Sch. Sys. Life Sci., Kyushu Univ., [2]Daiichi Sangyo Co., Ltd, [3]Fac. Agr., Kyushu Univ.)

【目的】フコイダンはコンブやモズクなどの褐藻類に多く含まれる粘性硫酸化多糖類であり、特に酵素消化低分子化フコイダン抽出物（LMF）では抗腫瘍効果が認められている。現在のがん治療において、腫瘍の再発や転移が問題となっており、その原因としてがん幹細胞の存在が考えられる。そこで、本研究では、LMF と抗がん剤の併用によって、がん幹細胞にどのような効果が得られるか検証することを目的とした。
【方法】細胞は、ヒト線維肉腫由来細胞株 HT1080、ヒト結腸腺がん細胞由来 HCT116 を使用した。LMF は第一産業株式会社から提供されたトンガ王国産モズクより調製したもの、抗がん剤は臨床の現場で広く使用されている Calboplatin（CBDCA）を使用した。がん細胞を単層培養した場合とスフェロイド培養した場合において、CBDCA、LMF で単独処理、または併用処理を行い、WST-1 法と細胞内 ATP 量の測定により細胞の増殖抑制効果を検証した。また、スフェロイドの大きさを Image J で解析し、CBDCA と LMF 併用処理による足場非依存性増殖抑制効果を評価した。そして、定量 RT PCR および Flow cytometry を用いてがん幹細胞マーカーの発現量を調べ、がん幹細胞に対する CBDCA と LMF 併用処理の効果を検討した。
【結果・考察】がん細胞において、CBDCA および LMF を用いた単独処理、併用処理で単層培養では処理濃度依存的な細胞増殖抑制効果が確認されたが、スフェロイド培養では明確な増殖抑制効果が確認できなかった。しかし、LMF 処理を行った細胞からスフェロイドを形成させ CBDCA 処理を行った結果、LMF 単独処理、そして CBDCA との併用処理において有意な増殖抑制効果が確認できた。また、LMF 前処理をした HCT116 細胞において、CBDCA および LMF の単独処理、そしてそれらの併用処理による足場非依存性増殖の抑制効果が確認された。がん幹細胞マーカーに関する mRNA 発現量および膜タンパク質発現量の変化を調べたところ、CBDCA 処理により増加、LMF 処理により減少、そして併用処理によって増加している傾向がみられた。これらのことから、LMF が現在のがん治療における問題を改善する可能性が示唆された。

fucoidan, anti-cancer, cancer stem cells

発表責任者：照屋輝一郎（kteruya@grt.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3A04a04
講演日時：3 月 27 日 10:03～ センター2 号館 A04 会場

がん細胞に対するコラーゲンペプチドの効果

The effect of collagen peptide on cancer cell

○倉田 淳代[1]、木村 泰久[1]、松尾 道憲[2]、木岡 紀幸[1] ([1]京都大農、[2]京都女子大家政)
○Atsuyo KURATA[1], Yasuhisa KIMURA[1], Michinori MATSUO[2], Noriyuki KIOKA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Women Univ.)

コラーゲンは生体の中で全タンパク質の約 30%を占め、全身に分布している細胞外マトリックスタンパク質である。近年、コラーゲンなどの細胞外マトリックスの硬さが細胞機能の調節を行うことが明らかになってきている。例えば、間葉系幹細胞は軟らかい基板上で培養すると脂肪細胞に、硬い基板上で培養すると骨芽細胞に分化しやすくなる。また、硬い基板上では線維芽細胞をはじめ様々な細胞の増殖や遊走が促進される。一方で、コラーゲンを食物として摂取した場合、コラーゲンは Pro-Hyp 繰り返し配列を多く含むために Pro-Hyp ジペプチドとして吸収されそれが血漿中に現れることがわかっている。また、Pro-Hyp ジペプチドは細胞の増殖や分化など細胞の機能に影響を与えることも知られている。興味深いことに、この効果は細胞が硬い基板上にいるときの表現型に似ている。例えば、Pro-Hyp ジペプチドを添加すると線維芽細胞は軟らかい基板上で増殖が促進されることがわかっている。さらに、Pro-Hyp ジペプチドの添加は、前骨芽細胞から骨芽細胞への分化を促進する。また、コラーゲン加水分解物であるコラーゲンペプチドの添加により、前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化が抑制される。また、生体内で細胞外マトリックスとして存在するコラーゲンは、創傷治癒やがん細胞の浸潤時には分解され Pro-Hyp ジペプチドも生成されると予想される。このときコラーゲンを含む組織の硬さが変化している可能性があり、Pro-Hyp ジペプチドが組織の硬さに依存した役割を持つ可能性も考えられる。

そこで、本研究では生体内での状況に着目し、Pro-Hyp ジペプチドが、がん細胞の挙動に与える効果を異なる硬さの培養基板上で調べた。細胞としては、がんの中でも特に多くのコラーゲンを集積させ硬い組織をつくるがんであるすい臓がん由来の細胞株 AsPC-1 を用いた。培養基板は硬い基板としてはプラスチックシャーレ、軟らかい基板としてはコラーゲンゲルを用いた。AsPC-1 細胞を培養基板に播種後、培地に Pro-Hyp ジペプチドを 200 μM と 1 mM あるいは Pro と Hyp 混合物を 200 μM と 1 mM を添加した。増殖の評価は、生細胞の脱水素酵素による還元を指標とした Cell Counting kit-8 を用いて行った。

その結果、FBS 0%添加時のゲル上において、Pro-Hyp ジペプチドあるいは Pro と Hyp 混合物添加で細胞数が減少した。また、FBS 2%添加時のゲル上において、Pro-Hyp ジペプチド添加で AsPC-1 細胞の増殖促進の傾向がみられた。現在これらのメカニズムについて検討中である。

collagen peptide, cancer cell, proliferation

講演番号：3A04a05
講演日時：3 月 27 日 10:14～ センター2 号館 A04 会場

卵由来スフィンゴミエリンによる肝癌細胞への細胞死誘導機構の解析

Mechanism for hepatoma cell death induced by egg-derived sphingomyelin

○畠中 直人、山田 可奈子、三浦 豊（農工大院農）
○Naoto HATANAKA, Kanako YAMADA, Yutaka MIURA (Tyokyo Univ. of Aglic. and Techno.)

【目的】スフィンゴミエリン（SPM）はスフィンゴ脂質の一種であり、卵や牛乳などの動物性食品に多く含有されている。近年の研究によって、スフィンゴ脂質の脂質メディエーターとしての機能が明らかにされつつあり、SPM にも注目が集まっている。すでに我々は、卵由来 SPM が肝癌細胞特異的に細胞死を誘導し、その作用が生体内でも有効である可能性を見出している。そこで本研究では、ラット腹水肝癌細胞 AH109A 細胞をモデルとして SPM による細胞死誘導機構の解明を試みた。

【方法】ラット腹水肝癌細胞 AH109A 細胞をモデル肝癌細胞として用いた。SPM は、培地に添加して 48 時間培養することで AH109A 細胞に取り込ませた。実際に SPM が細胞に取り込まれているかは、LC-MS/MS を用いた解析によって確認した。このように SPM を取り込ませた AH109A 細胞を回収・洗浄し、通常の維持培地に再播種することで細胞死を誘導した。細胞増殖は WST-8 法にて測定し、細胞死形態の検出には Annexin V/PI 二重染色法を用いた。詳細な細胞死誘導機構を解析するため、各種細胞死阻害剤を用いるほか、細胞内活性酸素量を指標に検討を行った。さらに細胞内活性酸素の細胞死への関与について、抗酸化剤を用いて検討した。

【結果・考察】SPM を培地に添加して培養した AH109A 細胞では、細胞内 SPM 量の有意な増加が見られ、この AH109A 細胞には細胞死が誘導されていた。また Annexin V/PI 二重染色法の結果から、SPM によってネクロプトーシスまたはアポトーシスが誘導されている可能性が考えられたが、SPM 誘導性の細胞死はネクロプトーシス阻害剤（NSA）やカスパーゼ阻害剤（Z-VAD-FMK）の影響を受けなかった。また AH109A 細胞では、SPM 取り込み時に細胞内 ROS の増加という特徴も見られた。そこで疎水性抗酸化物質（*t*-BHQ と *α*-Tocopherol）を添加したところ SPM による増殖抑制作用は強く阻害され、また *α*-Tocopherol の添加によって SPM 取り込みの際に発生する ROS の上昇は抑えられる傾向がみられた。以上の結果から SPM 誘導性の細胞死は典型的なネクロプトーシスやアポトーシスとは異なり、細胞膜などの疎水性部分での ROS 上昇が細胞死を誘導するフェロトーシス様細胞死である可能性が示唆された。現在 SPM によりフェロトーシス様細胞死が誘導される詳細な機構について検討している。

hepatoma, sphingomyelin, cell death

講演番号：3A04a06
講演日時：3 月 27 日 10:35～ センター2 号館 A04 会場

ホモアンセリンおよび酸化ホモアンセリンの測定方法の確立と生体内局在の解明

Development of quantification method for homoanserine and 2-oxo-homoanserine and elucidation of their tissue distributions.

○垣花 優希[1,2]、笠松 真吾[1]、内田 浩二[3]、居原 秀[1]([1]大阪府大理、[2]学振 DC2、[3]東大農)
○ Yuki KAKIHANA[1,2], Shingo KASAMATSU[1], Koji UCHIDA[3], Hideshi IHARA[1] ([1]Osaka Prefecture Univ., [2]JSPS Research Fellow, [3]The Univ. of Tokyo)

【目的】イミダゾールジペプチド（IDPs）はヒスチジンを含むジペプチドの総称であり、中でもカルノシンやアンセリンは抗酸化作用をはじめ様々な生理機能があることが知られている。しかし、IDPsの一つであるホモアンセリンは、カルノシンやアンセリンと比較してほとんど研究されておらず、生体内局在や生理機能は不明である。我々はこれまでに、酸化ストレスに伴う新規の機能性修飾体である酸化カルノシンや酸化アンセリンの生体内産生を同定し、強力な抗酸化因子として機能することを報告している。このことから、酸化ホモアンセリンも同様に生体内に存在し、機能している可能性が考えられるが、その存在様式は不明である。

既報のホモアンセリン測定方法では一度に 19 kg もの牛の脳が必要であり、ホモアンセリンの生体内局在および機能解析を行うためにはより高感度な検出系の確立が必須である。また、酸化ホモアンセリンは測定方法および標準物質もない。そこで本研究では、タンデム型質量分析装置を用いた多重反応モニタリング法（MRM 法）と安定同位体希釈法による高感度な絶対定量法を確立し、ホモアンセリンおよび酸化ホモアンセリンの生体内局在を明らかとすることを目的とした。

【方法】GABA、3-メチルヒスチジンを用いてホモアンセリンを化学合成し、HPLC で精製した。調製したホモアンセリンを用いて、銅・アスコルビン酸反応により酸化ホモアンセリンを合成し、HPLC で精製した。同様に、安定同位体標識された GABA を用いてホモアンセリンおよび酸化ホモアンセリンの安定同位体標識標準品物質を調製した。上記の標準物質を用いて MRM 法の最適化を行った後、マウス臓器中のホモアンセリンおよび酸化ホモアンセリン量を安定同位体希釈法にて定量的に解析した。

【結果・考察】本研究で構築した検出系のホモアンセリンおよび酸化ホモアンセリンの定量下限はそれぞれ 50 fmol および 10 fmol であり、非常に高感度な定量系の確立に成功した。安定同位体希釈法による生体試料の定量解析の結果、ホモアンセリンは脳や筋肉など様々な臓器に存在することが分かった。また、酸化ホモアンセリンは脳に存在することが初めて明らかとなった。今後、酸化ストレス時における産生動態の解析を行うことで、ホモアンセリンおよび酸化ホモアンセリンの新規の生理機能が明らかになると考えられる。少量の臓器での測定を可能にした本研究の成果により、ホモアンセリンや酸化ホモアンセリンの生理機能解析への貢献と広範な IDPs 分野の発展が期待できる。

Homoanserine, Histidine-containing dipeptides, LC-MS/MS

講演番号：3A04a07
講演日時：3 月 27 日 10:46～ センター2 号館 A04 会場

2-オキソ-イミダゾールジペプチドの抗酸化活性
Antioxidant activity of 2-oxo-imidazole-containing deipeptides
○居原 秀[1]、垣花 優希[1]、内田 浩二[2] ([1]大阪府大理、[2]東京大農)
○Hideshi Ihara[1], Yuki Kakihana[1], Koji Uchida[2] ([1]Osaka Pref. Univ., [2]Univ. of Tokyo)

【背景、目的】アスコルビンやグルタチオンなど生体内には様々な内因性抗酸化物質が存在する。カルノシンやアンセリンなどのイミダゾールジペプチド（IDP）も抗酸化物質として知られている。一方、試験管内において、銅/アスコルビン酸/酸素に依存してイミダゾール基の 2 位が酸化された 2-オキソ-イミダゾールが産生されることが知られている。我々は、高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析装置（HPLC-MS/MS）を用いた多重反応モニタリング法と安定同位体希釈法により、生体内 IDP および 2-オキソ-IDP の高感度かつ定量的測定法を開発し、IDP および 2-オキソ-IDP の生体内分布を解析した。2-オキソ-IDP は、生体内の様々な臓器に存在し、酸化ストレスに依存して産生されることを明らかにした。しかし、IDP の抗酸化活性に関しては不明な点が多く、2-オキソ-IDP の抗酸化活性に関する知見はない。そこで、本研究では、2-オキソ-IDP の抗酸化活性について検討することを目的とした。
【方法】市販のカルノシン、アンセリンを原料にして、銅/アスコルビン酸反応により 2-オキソ-カルノシン、2-オキソ-アンセリンを合成し、HPLC で精製した。2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) を用いて IDP および 2-オキソ-IDP の抗酸化活性を測定した。また、様々なラジカル種と IDP または 2-オキソ-IDP をインキュベートし、残存量を HPLC-MS/MS で定量して、ラジカル種との反応性を解析した。パーオキシナイトライト、チロシンと IDP または 2-オキソ-IDP を混合し、産生されるニトロチロシンを HPLC-MS/MS で定量して、ニトロ化反応に及ぼす効果を検討した。さらに、ヒト神経芽細胞腫 (SH-SY5Y) を用いて、酸化ストレス誘発剤であるロテノンに対する IDP および 2-オキソ-IDP の細胞保護効果を解析した。
【結果・考察】DPPH を用いた抗酸化活性測定の結果、2-オキソ-IDP の抗酸化活性は IDP の 10,000 倍以上という非常に高い活性を示し、既知の内在性抗酸化物質であるグルタチオン、アスコルビン酸よりも数倍高い活性を示した。また、2-オキソ-IDP は、ペルオキシナイトライト、一酸化窒素、次亜塩素酸と反応した。さらに、2-オキソ-IDP は、パーオキシナイトライトによるチロシンのニトロ化反応を阻害し、同濃度の IDP は阻害しなかった。SH-SY5Y 細胞に対するロテノン誘発性細胞毒性は、2-オキソ-IDP で抑制されたが、同濃度の IDP では抑制されなかった。以上の結果から、2-オキソ-IDP は IDP の抗酸化活性に深く関与していることが示唆された。2-オキソ-IDP のさらなる機能解析により、IDP の抗酸化活性の全容解明が期待される。

Antioxidant activity, 2-oxo-imidazole-containing deipeptides, imidazole-containing deipeptides

発表責任者：居原　秀（ihara@b.s.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：3A04a08
講演日時：3 月 27 日 10:57～ センター2 号館 A04 会場

エゴマ油の抗酸化能を向上させる抽出法の検討およびその生理作用

Extraction and characterization of perilla oil from its seeds

○宮田 恵多[1]、大森 菜々穣[1]、山下 雄一郎[1]、山口 大貴[2]、三浦 紀称嗣[2]、浜口 昂大[3]、長谷川 浩一[3]、松本 義信[1]、奥 和之[1]、宮田 富弘[1]([1]川福大臨床栄養、[2]川福大院健康科学、[3]中部大応用生物)
○Keita MIYATA[1], Nanami Omoir[1], Yuichiro Yamashita[1], Hiroki Yamaguchi[2], Kiyoshi Miura[2], Takahiro Hamaguchi[3], Koichi Hasegawa[3], Yoshinobu Matsumoto[1], Kazuyuki Oku[1], Tomihiro Miyada[1] ([1]Kawasaki Univ. Medi. Welf., [2]Kawasaki Univ. Grad. School Health Scie. Techn., [3]Chubu Univ. Biosci. Biote.)

シソ科植物のエゴマ（*Perilla frutescens*）の種子から抽出した油は、n-3 系不飽和脂肪酸の α-リノレン酸が豊富に含まれており、その摂取は健康保持・増進に効果があると考えられている。そのため、その需要は急増している。しかしながら、不飽和脂肪酸は構造上、熱や光等の刺激により活性酸素種になりやすい性質を有しているため使用法や保存法等に注意が必要である。本研究では、酸化が進行しにくいエゴマ油の抽出方法の検討とエゴマ油の生理作用をモデル生物の *Caenorhabditis elegans*（*C. elegans*）を用いて調べた。

先ず、エゴマ油の抽出法の検討を行った。乾燥エゴマ種子から圧搾法で抽出した油を生油、種子を焙煎（140℃、15 分間）してから抽出した油を焙煎油とした。それぞれの油を 60℃で加熱し、その酸化速度を POV および TBA 試験紙を用いて定性試験した。POV 試験では違いは観察されなかったが、TBA 試験では焙煎油の方が生油よりも酸化速度が遅い傾向にあった。さらに、重量法および TBA 法によりカルボニル化合物量の測定により油の酸化程度を評価した。定性試験の結果と同様、焙煎油の方が生油に比べ酸化が抑制されていた。DPPH ラジカル試験によりそれぞれの抗酸化能を評価した結果、有意な差は認められなかったが、焙煎油の方が生油に比べラジカル消去能が強い傾向にあった。これらの結果から焙煎油は生油よりも酸化の進行が遅いことが明らかとなった。これは、おそらくエゴマ種子を焙煎した際に生じた褐変物質あるいは熱変性物質に抗酸化作用があると考えられるため、今後その物質同定を試みる。

エゴマ油（生油）の生理作用を調べるために *C. elegans* にエゴマ油を摂取させ、その寿命および寿命に関わる遺伝子の発現変動を調べた。L1 ステージに揃えた *C. elegans* をエゴマ油存在下で 2 日間培養後、成虫となった *C. elegans* を、FUdR を含む培地上で飼育・観察し、寿命測定した。エゴマ油を摂取した *C. elegans* の寿命はコントロール群に比べ延伸しているとは認められなかった。さらに、活性酸素除去系およびヒートショックプロテイン遺伝子の発現を調べた結果、それらの発現が上昇していた。また、同様に焙煎油を摂取させた *C. elegans* の寿命を測定した結果、コントロール群に比べ有意に延伸していた（$P<0.05$）。今後、寿命関連遺伝子の発現変動を調べる。

本研究成果から、エゴマ種子を焙煎してから抽出した油には抗酸化能を示す物質が含まれるため、乾燥種子から抽出した油よりも健康保持・増進に対する効果が高いと考えられた。

ω3 fatty acid, oxidation, antioxidation

発表責任者：宮田恵多（miyatak@mw.kawasaki-m.ac.jp）

講演番号：3A04a09
講演日時：3 月 27 日 11:08～ センター2 号館 A04 会場

培地中の硫酸塩がユーグレナの活性イオウ分子の生成動態に及ぼす影響

Effects of sulfate in culture medium on endogenous production of reactive sulfur species in Euglena.

○神田 彩華[1]、笠松 真吾[1]、中野 長久[2]、居原 秀[1]([1]大阪府大理、[2]大阪府大生命環境)
○Ayaka KANDA[1], Shingo KASAMATSU[1], Yoshihisa NAKANO[2], Hideshi IHARA[1] ([1]Grad. Sch. of Sci., Osaka Prefecture Univ., [2]Grad. Sch. of Life and Env. Sci., Osaka Prefecture Univ.)

【目的】植物および動物の両方の性質を持つユーグレナは環境中の硫酸塩を取り込み、イオウ化合物を同化する。そのため、硫酸塩欠乏培地での培養によって、ユーグレナ内のグルタチオン（GSH）などのイオウ化合物が減少することが報告されている。近年、ヒトを含む哺乳動物や大腸菌などにおいて、システイン（CysSH）や GSH などのチオール基にイオウ原子が過剰に付加した構造を持つ、システインパースルフィド(CysSSH)やグルタチオンパースルフィド(GSSH)などの活性イオウ分子(reactive sulfur species, RSS）が生体内で酵素的に産生されていることが明らかにされた。また、RSS は高い抗酸化活性および求核性を有し、酸化ストレスに対して細胞保護効果を示すことが報告されている。現在、植物やユーグレナにおける RSS 生成機構についてはよくわかっていない。そこで、本研究では、ユーグレナの独特なイオウ代謝系に注目し、培地中の硫酸塩濃度が GSH や GSSH などのイオウ化合物生成動態および抗酸化物質生成レベルに及ぼす影響を解析した。

【方法】Koren-Hutner（KH）培地または硫酸塩濃度（0～2 g/L）調製培地でユーグレナの培養を行った。培養条件は光度 2000 lux、温度 24 ℃、振とう回数 100 stroke/min とした。培養液の濁度測定（OD780）および細胞数カウントにより、ユーグレナの増殖曲線を作成した。培養 4 日目と培養 8 日目のサンプルについて、湿式灰化法を用いて総イオウ量を定量した。また、タンデム型質量分析装置を用いた多反応モニタリング法および安定同位体希釈法により、ユーグレナ内のチオール化合物（CysSH、GSH)、活性イオウ分子（CysSSH、GSSH)、イオウ代謝物（硫化水素、二硫化水素）を定量的に解析した。

【結果・考察】増殖曲線を作成した結果、KH 培地での培養に比べ、硫酸塩濃度依存的に増殖遅延が観察された。硫酸塩欠乏群において総イオウ量の減少が認められた。また、KH 培地で培養したユーグレナ内において GSSH や CysSH などの活性イオウ分子が検出され、ユーグレナ内で活性イオウ分子が生成されていることが初めて明らかになった。現在、硫酸塩濃度調製培地で培養したユーグレナについても同様に活性イオウ分子の定量解析を行うとともに、ラジカル試薬である 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl （DPPH） を用いた抗酸化活性測定を行っている。

Euglena, reactive sulfur species, antioxidant

発表責任者：神田彩華（syc04025@edu.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：3A04a10
講演日時：3 月 27 日 11:19～ センター2 号館 A04 会場

好熱性子嚢菌 *Myceliopathora thermophila* 産生する糖化抑制物質の探索
Search of glycation inhibitor producing by thermophilic ascomycetes *Myceliopathora thermophila*
○吉井 一晴[1]、高野 真希[2]、星野 一宏[2] ([1]富山大工、[2]富山大院理工)
○Kazuharu Yoshii[1], Maki Takano[2], Kazuhiro Hoshino[2] ([1]Univ. of Toyama, [2]Graduate school. of Toyama)

【目的】
糖化は、メイラード反応とも呼ばれており、還元糖のカルボニル基とタンパク質のアミノ基との非酵素的な反応である。生体内での糖化反応によって生成されたジカルボニル化合物や最終糖化産物(AGEs)は、網膜症や腎障害といった糖尿病の合併症や動脈硬化などの発症および進行に関係する原因物質である。このような背景から、体内で AGEs の産生を抑制する物質の探索が進められている。現在、糖化抑制物質としてポリフェノール類やフラボノイドなどがよく知られている。一方、担子菌や子嚢菌は、様々な生理活性物質を生成分泌するが、糖化抑制物質についての検討は少ない。そこで本研究では、担子菌および子嚢菌における培養液の糖化抑制効果について検討した。
【方法】
本研究では、担子菌 29 株および子嚢菌 3 株を使用した。これらの菌株は、 YM 培地(pH 5.0、25 mL)を用いて 28℃あるいは 37℃で 10 日間液体静置培養した。得られた培養液の糖化抑制効果は、以下の反応系で評価した。BSA(10 mg/mL)、グルコース(25 mM)、フルクトース(25 mM)、リン酸緩衝液(50 mM、pH 7.4)を総体積 1.0 mL になるよう調製した溶液中に各培養液を 10 μL 添加し、50℃で 5 日間インキュベート後、蛍光強度を測定することで評価した。糖化抑制物質同定のため、顕著な抑制効果を示した 3 菌種を用いて大量培養(約 2 L)を行った。得られた培養液をヘキサンおよび酢酸エチルなどによって抽出し、各層の抽出物における糖化抑制効果について評価した。
【結果】
32 種の培養液の糖化抑制効果について分析した結果、通常 5～10%の抑制効果であったが、好熱性子嚢菌 *Myceliopathora thermophila* NBRC 9219、31843、31962 はそれぞれ 28.2、12.1、12.8%と顕著な抑制効果を示した。大量培養後、ヘキサン層、酢酸エチル層、および水層に分画し、その抽出物の抑制効果を評価した。その結果、3 菌種の全てにおいて、ヘキサン分画および酢酸エチル分画に比べ水分画は顕著な抑制効果を示した。*M.thermophila* NBRC 9219 および 31843 の水分画を終濃度 0.5 g/L としてそれぞれ評価した結果、約 53%、79%の糖化抑制効果を示した。またこれらは、492 および 250 mM アミノグニジン相当量であった。現在、水分画中の糖化抑制物質の分離・同定について検討中である。

AGEs, Glycation, *Myceliopathora thermophila*

講演番号：3A04a11
講演日時：3 月 27 日 11:40～ センター2 号館 A04 会場

カルボキシメチルリジンをターゲットとしたフロロタンニン類の抗糖化活性の評価

Evaluation of anti-glycation activity of phlorotannins againt Nε-(carboxymethyl) lysine formation

○村田 直輝[1]、東 満寛[2]、山内 浩資[2]、三宅 英雄[1,3]、田中 礼士[1,3]、柴田 敏行[1,3] ([1]三重大院・生資、[2]カイゲンファーマ（株）、[3]三重大・海藻バイオ研)
○ Naoki MURATA[1], Mitsuhiro AZUMA[2], Hiroshi YAMAUCHI[2], Hideo MIYAKE[1,3], Reiji TANAKA[1,3], Toshiyuki SHIBATA[1,3] ([1]Grad. Sch. Bioresour., Mie Univ., [2]Kaigen Pharma Co., Ltd., [3]Seaweed Biorefin. Res. Ctr., Mie Univ.)

【目的】カルボキシメチルリジン（CML）は，非蛍光性・非架橋性の終末糖化産物（AGEs）である．CML は，加齢に伴い皮膚コラーゲンへ蓄積することが分かっており，アテローム性動脈硬化や糖尿病，アルツハイマー型認知症の発症と進行への関与も指摘されている．これまでに演者らの研究グループでは，メチルグリオキサールとグリセルアルデヒドを用いた *in vitro* 糖化反応試験から，海藻ポリフェノールのフロロタンニン類が抗糖化剤のアミノグアニジンを凌駕する蛍光性 AGEs 形成阻害活性を持つことを報告した [1,2]．本研究では，CML 形成に対するフロロタンニン類の作用について評価試験を行った．
【方法】アラメ属（アラメ，サガラメ）とカジメ属（カジメ，クロメ，ツルアラメ）褐藻類の粉末から Folch 法に準じて抽出を行い，水溶性画分を得た．さらに等量の酢酸エチルを加えて分配を行い，得られた酢酸エチル層を減圧濃縮したものをフロロタンニン混合物とした．ケイ酸カラムクロマトグラフィーと分取 HPLC を用いて，Eckol，Fucofuroeckol A，Phlorofucohuroeckol A，Dieckol，8,8′-Bieckol を精製した．フロロタンニン類の混合物と精製物をそれぞれサンプルとして用いた．グリオキサールとコラーゲンとの反応により生じる CML は，ELISA 法を用いて検出した．ポジティブコントロールには，アミノグアニジンを用いた．
【結果と考察】フロロタンニン混合物の CML 形成阻害活性を評価した結果，ツルアラメを除き，いずれのサンプルも 0.16 μg/mL の濃度で 0.4 mM アミノグアニジンを上回る活性を持つことが分かった．精製サンプルでは，いずれの化合物も CML 形成阻害活性を示し（$p<0.01$），特に Dieckol と 8,8′-Bieckol は，1.08 μM の化合物濃度で 2.0 mM アミノグアニジンの示す阻害活性を上回っていた．フロロタンニン類は，アルブミンに加えコラーゲンの糖化反応に対しても，優れた AGEs 形成阻害活性を持つことが分かった．

[1]Shingo Sugiura et al. Nat. Prod. Commun., 12, 1793-1796 (2017).
[2]Shingo Sugiura et al. Nat. Prod. Commun., 13, 1007-1010 (2018).

Phlorotannins, Anti-glycation activity, Nε-(carboxymethyl) lysine

発表責任者：柴田敏行（shibata@bio.mie-u.ac.jp）

講演番号：3A04a12
講演日時：3 月 27 日 11:51～ センター2 号館 A04 会場

線虫 *C.elegans* を用いたシアニジン 3-グルコシドの抗糖化活性評価
Antiglycative evaluation of Cyanidin 3-glucoside using *C.elegans*
○瀬戸山 央、廣川 隆彦（（地独）神奈川県立産技総研）
○ Ou SETOYAMA, Takahiko HIROKAWA (Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology)

【目的】
シアニジン 3-グルコシド（C3G）はアントシアニンの１つであり、黒大豆、ベリー類、ブドウなどに含まれている食品機能性成分である。C3G の機能性は、in vitro において抗酸化活性や抗糖化活性を有していることが報告されている。また in vivo において、糖尿病モデルマウスにおける糖尿病抑制作用があることが明らかとなっている。一方、in vivo における C3G の抗糖化活性については、これまでに明らかになっていない。本研究では、モデル生物である線虫を用いて、in vivo における C3G の抗糖化活性を明らかにすることを目的とした。

【方法】
in virto 抗糖化活性測定は、蛍光性 AGEs 生成抑制作用測定にて行った。アントシアニジン類として、C3G の他にマルビジン 3-グルコシド、マルビジン 3-ガラクトシド、デルフィニジン 3-ガラクトシドを用いた。また既知の抗糖化活性化合物としてアミノグアニジンを用いた。
in vivo 抗糖化活性測定は線虫を用いて行った。線虫培地へ終濃度 200mM となるようにグルコースを添加し、糖化促進条件とした。糖化促進条件下において C3G を終濃度 0（コントロール）、10、50μM となるように添加し、液体培養（20℃、100rpm）を行った。培養 10 日目に線虫を回収、抽出し、体内の糖化ストレスの指標として蛍光性 AGEs、カルボキシメチルリジン（CML）、メチルグリオキサール（MG）、3-デオキシグルコソン（3-DG）およびカルボニル化タンパク質を測定した。

【結果】
in vitro 抗糖化活性測定の結果、C3G は今回用いたアントシアニジン類の中で最も高い抗糖化活性を示した。またアミノグアニジンよりも高い抗糖化活性を示した。
in vivo 抗糖化活性測定の結果、C3G を添加し培養した線虫では、添加していない線虫（コントロール）に対して体内の蛍光性 AGEs、CML、MG が減少する傾向が見られた。
以上のことから C3G は、in vivo において糖化促進条件下の線虫の体内糖化を抑制することが明らかとなった。

Cyanidin 3-glucoside, *C.elegans*, Antiglycative evaluation

発表責任者：瀬戸山央（setoyama@kistec.jp）

講演番号：3A04a13
講演日時：3 月 27 日 12:02～ センター2 号館 A04 会場

コリアンダーシードに含まれる機能性成分の皮膚老化に対する効果
Effect on skin aging of functional compounds included in *Coriandrum sativum.* L seed
○沢辺 昭義[1,2]、山下 敦之[1]、友尻 真理恵[2]、竹田 竜嗣[3] ([1]近畿大院農、[2]近畿大農、[3]関西福祉科学大・健康福祉)
○Akiyoshi SAWABE[1,2], Atsuyuki YAMASHITA[1], Marie TOMOJIRI[2], Ryuji TAKEDA[3] ([1]Graduate school of Agriculture, Kindai Univ., [2]Faculty of Agriculture, Kindai Univ., [3]Faculty of Health and Welfare, Kansai Univ. of Welfare Sci.)

【目的】
私たちは，未利用植物資源，また食品加工などで産出される「食用資源」の皮や種などの残渣を用いて，より価値が付加されたエキスや成分を見出し，健康食品や化粧品への利用を目的に研究を行っている．その一環として，本研究では，スパイス種子であるコリアンダーについて皮膚のアンチエイジング効果を検討した．評価としては，AGEs 生成阻害阻試験および皮膚細胞に対する抗糖化活性試験を行った．
【方法および結果】
(a) コリアンダーシードに含まれる成分
コリアンダーシードを 70%メタノールで抽出し，得られた抽出物をヘキサン，ブタノールを用いて分配抽出を行った．得られたブタノール抽出物に高い AGEs 生成阻害活性を示したため，シリカゲルカラムクロマトグラフィーおよびゲル濾過を用いて単離・精製した．
その結果，hexyl-β-glucopyranoside [1], chlorogenic acid [2], querucetin 3-*O*-glucopyrano- side [3], (2*E*,6*R*)-2,6-dimethyl-2,7-octadien-6-ol-1-*O*-β-glucopyranoside [4], adenosine [5] および dehydroconiferyl alcohol-4-β-glucopyranoside [6] の 6 種の単離に成功した．
(b) AGEs 生成阻害活性試験（抗糖化活性試験）
糖化による皮膚への影響について検討する目的で AGEs 生成阻害活性試験（抗糖化試験）について検討した．その結果，それぞれの抽出物に高い AGEs 生成阻害活性が認めた画分を分離・精製したところ，単離物にポジティブコントロールの aminoguanidine と同等あるいは，より高い活性が認められた．
(c) 糖化（グリオキサール添加）条件下における AGEs 生成抑制実験
糖化進行による皮膚の老化をターゲットに実験系の確立とその評価を行った．その結果，CML の蓄積を細胞内の免疫染色により確認することができ，これらの化合物を添加することによって，CML の蓄積は抑えられていることが示された．
以上のことから，得られた化合物や材料は化粧品や食品添加物，健康食品，医薬品原料などへの有効利用の可能性が示唆され，将来その利用が期待される．

Coriandrum sativum. L seed, AGEs inhibitory activity, Anti-aging effects

発表責任者：沢辺昭義（sawabe@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：3A04p01
講演日時：3 月 27 日 13:50～ センター2 号館 A04 会場

低密度リポタンパク質の酸化に対する褐藻類由来フコイダンの効果

Effect of fucoidan in brown algae on oxidation of low-density lipoprotein

○邱 釋漫[1]、山岸 喬[2]、西澤 信[2]、高杉 美佳子[3]、新井 博文[1] ([1]北見工業大学、[2]ファイナルフューチャーインターナショナル株式会社、[3]九州産業大学)
○Shiman Qiu[1], Takashi Yamagishi[2], Makoto Nishizawa[2], Mikako Takasugi[3], Hirofumi Arai[1] ([1]Kitami Institute of Technology, [2]Final Future International Co.,Ltd., [3]Kyushu Sangyo Univ.)

【目的】喫煙やストレス等によって体内で生成する活性酸素種(ROS)および活性窒素種(RNS)による低密度リポタンパク質(LDL)の酸化は、アテローム性動脈硬化症の発症に関与することが示唆されている。近年、機能性食品の摂取による生体酸化ストレスの抑制効果が注目されており、様々な有効成分が報告されている。フコイダンは主に L-フコースを構成糖とする硫酸多糖であり、食品では褐藻類に多く含まれ、様々な生理機能が報告されている。本研究では、北海道産を中心とする様々な産地のアカモク、ワカメ等 13 種の褐藻類からフコイダン画分を調製し、それらの LDL 酸化抑制作用を *in vitro* で調べた。
【方法】各褐藻類の粉末に 2.5%酢酸を加えて 75℃、3 時間加熱抽出した。抽出液を限外ろ過および精密ろ過に供し、低分子化化合物を除去してフコイダン画分を調製した。^{1}H-NMR および GPC-HPLC によってフコース含量および平均分子量を求めた。各フコイダン画分のラジカル捕捉能を DPPH 法および H-ORAC 法で評価した。ヒト血漿から超遠心分離法で単離・精製した LDL を生理的リン酸緩衝液に懸濁し、各フコイダン画分を加えて、37℃で 5 分間インキュベートした。ここに ROS としてペルオキシルラジカル（$ROO^{\cdot}$）、遷移金属イオン（Cu^{2+}）、RNS としてペルオキシナイトライト($ONOO^{-}$)を発生する試薬を加えて LDL の酸化を誘導した。LDL の脂質過酸化の指標としてコレステロールヒドロペルオキシド(CE-OOH)を HPLC-UV 検出で、チオバルビツール酸反応性物質(TBARS)を HPLC-蛍光検出で経時的に測定した。また、アポリポタンパク質(apo)B-100 の酸化修飾を SDS-PAGE/ウエスタンブロッティングで解析した。
【結果】アカモク由来フコイダン画分は、DPPH 法および H-ORAC 法において最も強いラジカル捕捉能を示した。また、アラメ、カジメ、マコンブ由来フコイダン画分にも比較的強いラジカル捕捉能能が認められた。アカモク由来フコイダン画分は、$ROO^{\cdot}$または$ONOO^{-}$による LDL 酸化における CE-OOH の生成およびCu^{2+}による LDL 酸化における TBARS の生成を他の 12 種の褐藻類由来フコイダン画分よりも強く抑制した。さらに、アカモク由来フコイダン画分は、$ROO^{\cdot}$、Cu^{2+}、$ONOO^{-}$による LDL 酸化における apoB-100 の酸化修飾を抑制した。これらの結果から、アカモク由来フコイダンは、ROS および RNS による LDL 酸化における脂質およびタンパク質の酸化修飾を抑制し、酸化ストレス抑制に寄与することが示唆された。

fucoidan, antioxidant, low-density lipoprotein

発表責任者：新井 博文（araihrfm@mail.kitami-it.ac.jp）

講演番号：3A04p02
講演日時：3 月 27 日 14:01～ センター2 号館 A04 会場

植物色素 betanin の強力な peroxynitrite 消去能による細胞保護機能の検証
Betanin, a plant pigment from red beetroot, protects from peroxynitrite-induced oxidative and/or nitrosative stress in mammalian cells
○加藤 嵩士、薬師 葉、橋本 誠、橋床 泰之、崎浜 靖子（北大院農）
○ Takashi KATO, Yo YAKUSHI, Makoto HASHIMOTO, Yasuyuki HASHIDOKO, Yasuko SAKIHAMA (Hokkaido Univ.)

【背景・目的】 活性窒素は、活性酸素と同様に細胞傷害を引き起こす反応性の高い分子種である。最も毒性の高い活性窒素種である peroxynitrite ($ONOO^-$) は、炎症疾患における細胞酸化傷害や生活習慣病の発症、発がん促進に関与することが示唆されている。レッドビート (ビーツ) は栄養価が非常に高くスーパーフードとして近年注目されている野菜である。レッドビートの特徴的な赤い色は betanin という水溶性植物色素によるものであり、天然食品着色料として菓子や氷菓に使用されている。我々はこれまでに、レッドビートから精製した betanin を用い、活性窒素に対する効果を検討してきた。その結果、betanin は高い $ONOO^-$ 消去能を有し、さらに $ONOO^-$ による DNA 損傷やタンパク質ニトロ化修飾を抑制することを明らかにした。しかし、培養細胞レベルでの betanin の $ONOO^-$ 消去能についての知見はない。そこで、レッドビートから精製した高純度 betanin を用い、動物培養細胞に対する $ONOO^-$ の細胞毒性軽減および細胞保護効果を検討した。

【方法】 マウス胎児皮膚線維芽細胞 NIH3T3 を 8×10^3 cells / well となるように 96 穴プレートに播種し、24 時間プレ培養後、betanin または抗酸化剤である quercetin 処理および $ONOO^-$ ドナーである 3-morpholinosydnonimine (SIN-1) 処理を施し、細胞生存率を測定 (MTT アッセイ) した。また、細胞内 ROS / RNS の蓄積を 2', 7'-dichlorodihydrofluorescin diacetate (DCFH-DA) を用いて蛍光顕微鏡により検出した。

【結果および考察】 MTT アッセイの結果、SIN-1 濃度依存的に細胞生存率が減少し、1.5 mM SIN-1 処理区ではコントロール区の約 50%まで低下した。Betanin または quercetin と SIN-1 を同時処理することにより、細胞生存率の減少が有意に抑制され、SIN-1 の細胞毒性から細胞を保護することが示された。このときの細胞形態を検鏡したところ、betanin 同時処理区ではコントロール区と差異が見られなかったのに対し、quercetin 同時処理区では仮足の退縮した細胞が多数観察された。さらに、細胞内 ROS/RNS の蓄積を検出したところ、betanin 同時処理区では細胞内蛍光シグナルがコントロール区と同レベルまで低く抑えられ、その効果は quercetin よりも高い傾向が確認された。以上の結果は、betanin が quercetin よりも高い $ONOO^-$ からの細胞保護機能を有することを示唆している。現在、細胞構成成分への影響を評価するため、脂質過酸化物やタンパク質ニトロ化修飾の検出・定量を試みている。

reactive nitrogen species, betalain, cell protection

発表責任者：崎浜靖子（sakihama@abs.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：3A04p03
講演日時：3 月 27 日 14:12～ センター2 号館 A04 会場

黄ニラ抽出物の酸化ストレス軽減作用

Yellow Chinese chive extract reduced oxidative stress.

○川上 賀代子[1]、守谷 智恵[1]、畑中 唯史[2]、洲崎 悦子[1]、坪井 誠二[1] ([1]就実大薬、[2]岡山生物研)
○ Kayoko KAWAKAMI[1], Chie MORITANI[1], Tadashi HATANAKA[2], Etsuko SUZAKI[1], Seiji TSUBOI[1] ([1]Shujitsu Univ., [2]RIBS, Okayama)

【目的】グルタチオンは生体内で産生される抗酸化物質であり、酸化ストレスに対する防御をはじめ、細胞内の酸化還元状態の制御、毒物や薬物の解毒など様々な生理作用を有している。よって、グルタチオンの細胞内濃度を上昇させることにより、酸化ストレスを軽減し、さまざまな疾病の予防することができると考えられる。岡山県産農産物をスクリーニングした結果、黄ニラに細胞内グルタチオン上昇作用があることを明らかにした[1)]。解熱鎮痛剤であるアセトアミノフェン（APAP）は、一部が親電子化合物である *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine（NAPQI）へと代謝され、さらにグルタチオン抱合をうけて尿中へと排泄される。しかし、過剰に摂取すると肝臓中のグルタチオンが枯渇し、NAPQI が肝細胞のタンパク質と共有結合することで酸化ストレスを引き起こし、肝障害を誘導することが分かっている。そこで、マウスを用いて黄ニラ抽出物の APAP 誘導肝障害抑制作用について検討した。
【方法】黄ニラを 50%エタノールで抽出し、ろ過後にろ液を凍結乾燥して黄ニラ抽出物を調製した。ICR 雄性マウスに 7 日間、黄ニラ抽出物（25 mg/kg または 100 mg/kg）を経口投与した。18 時間絶食後に APAP を 700 mg/kg 腹腔内投与し急性肝障害を誘導した。6 時間後に解剖を行い、血液と肝臓を採取した。血清 AST、ALT、ALP および LDH と肝臓中のグルタチオン量を測定した。また、肝臓はホルマリンで固定後、HE 染色により病理学的評価を行った。さらに、肝臓中の抗酸化酵素である hemeoxygenase-1（HO-1）、NAD(P)H quinone oxidoreductase1（NQO1）、glutathione peroxidase（GPx）、cysteine uptake transporter（xCT）やそれらの発現制御に関わる転写因子 nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)のタンパク発現量をウエスタンブロッティングを用いて検出した。
【結果】マウスに APAP を腹腔内投与することにより、肝機能のマーカーである AST、ALT、ALP および LDH は有意に上昇したが、黄ニラ抽出物をあらかじめ摂取することにより、濃度依存的に低下した。また、肝臓中のグルタチオン量は APAP 投与群と比較して、黄ニラ抽出物摂取群では上昇がみられた。さらに、黄ニラ抽出物の摂取により APAP による中心静脈周囲の肝細胞の壊死の抑制がみられた。次に、抗酸化酵素群の発現量を調べたところ、黄ニラ抽出物摂取により HO-1、NQO1、GPx、xCT、および、Nrf2 発現の誘導が見られた。以上の結果から、黄ニラ抽出物は Nrf2 を介して抗酸化酵素を誘導し、APAP 肝障害の抑制作用を示すことが示唆された。

[1)] 川上ら, 就実大学薬学雑誌, 2017;4:32-36.

glutathione, yellow Chinese chive, acetaminophen

講演番号：3A04p04
講演日時：3 月 27 日 14:23～ センター2 号館 A04 会場

GABA による脳腸相関活性化とその分子基盤
Brain-intestinal correlation activation by GABA and its molecular basis
○原口 瑞木[1]、蓮塚 涼[2]、内村 佳奈子[3]、金 武祚[4]、片倉 喜範[2,3,5] ([1]九大農・食化工、[2]九大院・生資環、[3]九大院・シス生、[4]株式会社ファーマフーズ、[5]九大院・農院)
○Mizuki Haraguchi[1], Ryou Inotsuka[2], Kanako Uchimura[3], Mujo Kim[4], Yoshinori Katakura[2,3,5] ([1]Kyushu Univ., [2]Grad.Sch.Biores.Bioev.Sci.,Kyushu Univ., [3]Grad.Sch.Sys.LifeSci.,Kyushu Univ., [4]Pharma Foods International Co.,Ltd., [5]Fat.Agric.,Kyushu Univ.)

【目的】
GABA は、穀物や野菜類などに含まれるアミノ酸の一種で脳や脊髄で抑制系の神経伝達物質として働いている。近年、GABA の摂取が、抗ストレス作用、睡眠改善効果をもたらすことが明らかとなっているが、どのようなメカニズムで作用するのかこれまで明らかになっていない。そこで本研究では、GABA による脳腸相関活性化の可能性とその分子基盤について検証した。

【方法】
本研究においては、腸管モデル細胞としてヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞を、神経細胞モデルとしてヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を用いた。SH-SY5Y 細胞における神経突起伸長は免疫染色を行い、IN Cell Analyzer 2200 を用いて定量した。神経関連遺伝子の発現は qRT-PCR により検証した。GABA による脳腸相関活性化の可能性は、GABA 処理した Caco-2 細胞上清を SH-SY5Y 細胞に添加する系により評価した。また、脳腸相関活性化の分子基盤としてエクソソームに着目し、Caco-2 細胞上清から MagCapture エクソソームアイソレーションキットによりエクソソームの単離を行った。

【結果】
GABA 処理をした Caco-2 細胞上清を SH-SY5Y 細胞に添加し培養したところ、神経突起が伸長する様子が観察された。また SH-SY5Y 細胞において、Nestin、NEFM、BDNF、 PGC-1α、Vimentin の発現が増強させることも明らかとなった。また上記複合培養システムにより検証した結果においても、Apical 側への GABA の添加により SH-SY5Y 細胞における BDNF および Nestin の遺伝子発現が増強する傾向が認められた。以上の結果から、GABA は腸管を活性化し、その結果として、神経細胞における神経細胞活性化関連因子の発現を増強すると共に、神経細胞の突起伸長を促すことが明らかとなった。

GABA, brain-gut interaction, intestinal cell

講演番号：3A04p05
講演日時：3 月 27 日 14:34～ センター2 号館 A04 会場

担子菌 *Trametes versicolor* 熱水抽出液の Glutamate 誘発酸化ストレス抑制効果
Suppressiion effect of glutamate-induced oxidative stress by boiled-water extract of basidiomycete *Trametes versicolor*
○高井 智貴[1]、高野 真希[2]、星野 一宏[2] ([1]富山大工、[2]富山大理工)
○Tomoki TAKAI[1], Maki TAKANO[2], Kazuhiro HOSHINO[2] ([1]Univ. of Toyama, [2]Graduate school. of Toyama)

《背景・目的》酸化ストレスとは生体内酸化反応によって引き起こされる有害な作用のことで、細胞内に活性酸素種 (ROS)が蓄積されることによって引き起こされる。過剰に産生され細胞内で蓄積した ROS はタンパク質や DNA などを変性させることで老化につながる。これにより、アルツハイマー病や心疾患などが引き起こされる。酸化抑制物質として、天然素材から抽出したポリフェノールやカロチノイドなどを活用する方法がある。一方、担子菌を起源とした抗酸化物質の研究は少ない。そこで本研究では、Glutamate 誘発酸化ストレス状態の細胞に対して各種担子菌抽出液を添加し、ROS 捕捉作用および蓄積軽減効果を検討した。
《方法》本研究室に保存している担子菌 21 株を 28℃で 10 日間液体静置培養した。得た菌糸は凍結乾燥し粉砕した。この菌糸を 1 h、100℃の熱水で処理しサンプルを得た。酸化ストレスは脳神経細胞である PC12 に対して Glutamate を添加することで誘発させた。熱水抽出サンプルの効果は Glutamate 添加と同時に加えインキュベート後、細胞生存率、細胞内の ROS 蓄積、O_2^-蓄積および Glutathione peroxidase (GPx)活性を比較することにより評価した。また、熱水抽出サンプルの過酸化脂質蓄積抑制効果について検討した。
《結果》Glutamate 誘発酸化ストレスを与えた PC12 に対して 21 株の担子菌熱水抽出液を添加した 48 h 後の細胞生存率を調べた結果、Glutamate 無添加の場合の細胞数は 1.89×10^5 cells/mL であるのに対して、20 mM Glutamate 添加時は約 44%まで減少した。しかし、*Trametes versicolor* NBRC4937 および *Hericium coralloides* NBRC 7716 のサンプルは約 64%にまで回復できた。この結果に基づき、これら 2 株のサンプルを選択し、細胞内の ROS 蓄積、O_2^-蓄積、および GPx 活性を評価し、ROS と O_2^-蓄積では Glutamate 添加時と比較してそれぞれ約 60%軽減でき、GPx 活性は Glutamate 添加時と比べて向上した。さらに、*in vitro* 試験での過酸化脂質の発生を 40-50%抑制できた。これらの結果から、選択した 2 株の担子菌熱水抽出液中には、ROS と過酸化脂質の蓄積を抑制するとともに SOD および GPx の発現を促進する物質が存在すると推察される。

Trametes versicolor, Oxidative stress, Antioxidant

講演番号：3A04p06
講演日時：3 月 27 日 14:45～ センター2 号館 A04 会場

ほうじ茶に特異的に含まれる成分の機能解析

Functional analysis of characteristic compounds in roasted green tea

○山田 康枝[1]、沖田 裕司[1]、矢吹 智[1]、西居 和哉[1]、笹木 哲也[2] ([1]近畿大、[2]石川県工試)
○Yasue YAMADA[1], Yuji Okita[1], Tomo Yabuki[1], Kazuya Nishii[1], Tetsuya Sasaki[2] ([1]Kindai Univ., [2]IRII)

【緒言】ほうじ茶は 200℃前後で数分間焙煎した茶であり，緑茶と比べて香ばしい香気を有している．茶は殺菌作用・高血圧の予防・動脈硬化の予防・老化防止など様々な効能を有していることが知られており，その中でもほうじ茶独特の芳ばしい香気にはリラックス効果があると言われている．一方で，ほうじ茶には緑茶にない特有の物質が含まれており，これらの生理活性には不明な点が多い。本研究では，ほうじ茶に含まれるピラジン類等の香気成分について，リラックス効果に関与する $GABA_A$ 受容体への効果や，マウスによる抗不安効果の評価を検討した．また，ほうじ茶に特異的に含まれる異性化カテキンにも着目し，神経細胞への保護効果を検証するため，神経細胞毒性を有する 6-ヒドロキシドパミン(6-OHDA)，Ca_2^+-ATPase(SERCA)阻害剤として小胞体ストレスを誘導するタプシガルギン(TG)，および過酸化水素(H_2O_2)に対するヒト神経芽細胞腫株 SK-N-SH への保護効果を評価した．
【方法】$GABA_A$ 受容体α1，β1サブユニットの mRNA をアフリカツメガエルの卵母細胞に導入し，20℃，24～48 時間のインキュベートで発現させ，受容体活性測定に使用した．10 μM GABA 存在下の $GABA_A$ 受容体に，ほうじ茶の香気成分であるピラジン類，ゲラニオール，フラネオールを潅流させ，膜電位を - 70mV に固定して，二電極膜電位固定法により電流変化を測定した．各香気成分の抗不安作用の評価には，マウスを用いた高架式十字迷路試験を行った．異性化カテキンの細胞保護効果の評価のため，1.0×10^5 cells/ml に調整した SK-N-SH 細胞を 96well マイクロプレートに播種し，24 時間培養した。これに異性化カテキンを添加して 10 分間インキュベートした後， 5 mM H_2O_2 の添加と 10 分間の培養，または 100 μM 6-OHDA の添加と 24 時間の培養，1 μM TG の添加と 24 時間の培養をそれぞれ行った．その後，MTT assay 法により，細胞生存率を求めた．
【結果・考察】$GABA_A$ 受容体にほうじ茶の香気成分を添加した結果，ピラジン A が高い活性を示し，その活性化率は 533%であった．ほうじ茶成分であるピラジン B，C，ゲラニオール，フラネオールも活性化効果を示した。高架式十字迷路試験では，ピラジン A，ピラジン C，水出しほうじ茶が抗不安効果を示した。異性化カテキンの細胞保護効果については，5 mM H_2O_2 による細胞死に対する保護効果，および TG による細胞死に対する保護効果が確認された．一方で，100 μM 6-OHDA による細胞死には細胞保護効果を示さなかった．以上の結果から、ほうじ茶の香気成分には、抗不安効果があることが明らかになった。また，ほうじ茶特有の異性化カテキンにも抗酸化効果，小胞体ストレス保護効果があることが示された．

roasted green tea, $GABA_A$ receptor, SK-N-SH

講演番号：3A04p07
講演日時：3 月 27 日 15:06～ センター2 号館 A04 会場

フェルラ酸-4’-*O*-グルクロニドはラジカル消去活性が極めて低いがアミロイドβ誘導性神経細胞死を抑制する
Ferulic acid-4'-*O*-glucuronide with the almost no potential for radical scavenging activity was found to prevent Amyloid ß-induced neurotoxicity
○外山 華恵[1]、原 崇[2]、三亀 啓吾[2]、中村 澄子[4]、池内 健[3]、城 斗志夫[2]、大坪 研一[4]([1]新潟大院自然科学、[2]新潟大農、[3]新潟大脳研、[4]新潟薬大応用生命)
○ Hanae TOYAMA[1], Takashi HARA[2], Keigo MIKAME[2], Sumiko NAKAMURA[4], Takeshi IKEUCHI[3], Toshio JOH[2], Ken'ichi OHTSUBO[4] ([1]Gad. Sch. Sci. & Technol., Niigata Univ., [2]Fac. Agric., Niigata Univ., [3]Brain Res. Inst., Niigata Univ., [4]Appl. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci.)

【目的】 フェルラ酸（FA）は穀類や野菜，果物に存在する抗酸化物質であり，アルツハイマー病予防効果が期待されている。しかし，生体内で FA はフェルラ酸-4-*O*-グルクロニド（FA4G）などの抱合体となり，ラジカル消去活性の減弱など，生理活性の消失が懸念されている。本研究では，ヒト神経芽腫 SK-N-SH 細胞に及ぼすアミロイドβ（Aβ）の神経毒性に対し，FA4G が抑制作用を示すか検討した。また，FA4G 処理した SK-N-SH 細胞内に FA4G および FA が存在するか調べた。

【方法】 Aβペプチドとして $A\beta_{25\text{-}35}$ を用いてヒト神経芽細胞腫 SK-N-SH 細胞に細胞死を誘導し，FA または FA4G による前処理の影響を調べた。細胞生存率と細胞内活性酸素種（ROS）レベルは，MTT 法および FACS 解析により評価した。NRF2 とヘムオキシゲナーゼ 1（HO-1）は，イムノブロット法により検出した。また，RNA 干渉法により NRF2 をノックダウンし，$A\beta_{25\text{-}35}$ 誘導性細胞死に及ぼす FA および FA4G の影響を評価した。SK-N-SH 細胞内に存在する FA および FA4G は，FA の極大吸収波長（322 nm）を指標として分画し，LC/MC 解析により検出した。

【結果】 FA は DPPH ラジカル消去活性を示し，FA 前処理（1～10 μM）は $A\beta_{25\text{-}35}$ 誘導性細胞死を有意に抑制した。FA4G は DPPH ラジカル消去活性をほぼ示さないが，FA と同様に，FA4G 前処理（1～10 μM）も $A\beta_{25\text{-}35}$ 誘導性細胞死を有意に抑制した。また，$A\beta_{25\text{-}35}$ 誘導性細胞死に伴う細胞内 ROS レベル亢進が確認され，この亢進は FA および FA4G 前処理により有意に抑制された。さらに，FA と FA4G の両者は，抗酸化酵素の発現を誘導する転写因子 NRF2 の核移行を促し，HO-1 の発現を増大させた。NRF2 siRNA により NRF2 をノックダウンすると，FA および FA4G 前処理による $A\beta_{25\text{-}35}$ 誘導性細胞死抑制効果は大幅に減弱した。この結果は，FA の Aβ誘導性神経細胞死抑制作用には，自身のラジカル消去活性よりも内因性酸化ストレス防御機構の増強がより重要であることを示唆する。LC/MC 解析の結果, FA4G 処理した SK-N-SH 細胞において FA に由来するピーク（m/z = 193）が検出され，少なくとも遊離型 FA の存在が確認された。FA は，体内で抱合反応を受けて FA4G となってもアルツハイマー病予防に寄与する可能性がある。

本研究は，生研機構イノベーション創出強化研究推進事業「超高齢化社会対応と輸出促進のための認知症・糖尿病複合予防効果のある米加工食品の開発」の一部として実施した。

Ferulic acid-4'-*O*-glucuronide, Amyloid ß, NRF2

発表責任者：原　崇（harata@agr.niigata-u.ac.jp）

講演番号：3A04p08
講演日時：3 月 27 日 15:17～ センター2 号館 A04 会場

アシベニイグチ（*Caloboletus calopus*）に含有される神経細胞保護作用物質の探索研究
Variegatic acid, isolated from *Caloboletus calopus* , inhibits Amyloid ß-protein aggregation and H_2O_2-induced neurotoxicity
○木船 頌一朗[1]、南園 祈[2]、吉川 航平[2]、菅野 有紀[2]、須長 直斗[2]、菅谷 紘一[2]、小野瀬 淳一[1,2]、阿部 尚樹[1,2] ([1]東農大院・健康、[2]東農大・応生・健康)
○ Syoichiro KIBUNE[1], Inori MINAMIZONO[2], Kohei YOSHIKAWA[2], Yuki KANNO[2], Naoto SUNAGA[2], Kouichi SUGAYA[2], Jun-ichi ONOSE[1,2], Naoki ABE[1,2] ([1]Dept. of Nutri. Sci. & Food Safety, Grad. Sch. of Agric., Tokyo Univ. of Agric., [2]Dept. of Nutri. Sci. & Food Safety, Faculty of Applied Bio-Sci., Tokyo Univ. of Agric)

【目的】現在、超高齢社会を迎え認知症の患者が増加していることから、認知症を引き起こす原因疾患のうち 6 割以上を占めるアルツハイマー病（AD）の早期発見並びに早期治療が求められている。AD の原因物質としてアミロイドβ（Aβ）が強く示唆されている。Aβは凝集体を形成し、活性酸素を産生し、これにより神経細胞のアポトーシスが誘導され、AD が誘発されると考えられている。

一方、食品成分由来のサプリメントや特定保健用食品などが注目されており、食材中の成分による健康への寄与に対する期待が高まっている。

そこで本研究では、様々な食材を対象に抗酸化作用を指標としたスクリーニングを行った。その結果、イグチ科イグチ属アシベニイグチ（*Caloboletus calopus*）に強い抗酸化作用が認められたことから、ヒト由来ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を用いてアシベニイグチの Aβの細胞毒性並びに凝集の阻害作用を評価することで AD 予防につながる成分の探索を目的に研究を行った。

【方法】アシベニイグチ乾燥子実体（100 g）を 80%含水アセトンにて浸漬し、中・酸性画分（7.67 g）を得た。中・酸性画分と SH-SY5Y 細胞における過酸化水素に対する神経細胞保護作用についての評価を行った。試験には細胞生存率が測定できる Cell Counting Kit-8（同仁科学研究所）を用いた。

また、活性物質の精製のため中・酸性画分（1.5 g）をメタノールを溶出溶媒とした Sephadex LH-20（200 g）にて Fr.A-E に分画した。HPLC 分析を行った結果、アシベニイグチの主要成分が含まれていた Fr.C（153.5 mg）をさらに ODS-MPLC で分画し、化合物 **1**（58.0 mg）を得た。

得られた化合物 **1** の機器分析並びに神経細胞保護試験、Aβの凝集阻害試験を行った。凝集阻害試験には Thioflavin T β-Amyloid (1-42) Aggregation Kit (funakoshi) を用いた。

【結果】SH-SY5Y 細胞を用いた神経細胞保護試験においてアシベニイグチ中・酸性画分は、濃度依存的に細胞保護効果が確認された。そのため、アシベニイグチの活性物質の精製を試みた。活性を示した中･酸性画分より DAD による UV スペクトルを指標に精製することで 58 mg の化合物 **1** を単離した。^{1}H-NMR 分析での解析の結果、この化合物 **1** を variegatic acid と同定した。

得られた variegatic acid を用いて神経細胞保護試験、Tiofulavin T Assay を行った結果、variegatic acid が濃度依存的に Aβの細胞毒性並びに凝集を阻害することが確認された。

以上の結果から、variegatic acid は Aβの凝集並びに細胞毒性の異なる作用点において阻害が認められたことから、AD 予防効果を有する可能性が示唆された。

Caloboletus calopus, variegatic acid, amyloid beta

発表責任者：阿部尚樹（abe@nodai.ac.jp）

講演番号：3A04p09
講演日時：3 月 27 日 15:28～ センター2 号館 A04 会場

糖尿病がアルツハイマー病態に与える影響とロスマリン酸の効果の検証

Effect of Rosmarinic acid on Diabetes and Alzheimer's Disease.

○宮脇 里奈、山下 玲、伯野 史彦、高橋 伸一郎、岡田 晋治、小林 彰子（東大院農）
○Rina MIYAWAKI, Rei YAMASHITA, Fumihiko HAKUNO, Shin-Ichiro TAKAHASHI, Shinji OKADA, Shoko KOBAYASHI (Univ. of Tokyo)

【目的】
アルツハイマー病（AD）の罹患者数は増大の一途をたどっているが、未だ根本治療薬は存在せず、食品成分による予防が期待されている。シソ科植物に含まれるポリフェノールであるロスマリン酸(RA)は、当研究室の AD モデルマウスを用いた検討において、12 ヶ月にわたる RA 摂食で AD 病態および認知機能低下が抑制されることが明らかになった。これらマウスの肝臓及び腓腹筋の DNA マイクロアレイ解析を行ったところ、RA 摂食におけるⅡ型糖尿病（T2DM）に関するシグナルの改善が示唆された。T2DM は AD の発症リスクを 2 倍に引き上げることが知られていることから、RA 摂食が糖尿病の発症を抑制することで、副次的に認知機能低下を抑制する可能性を考えた。そこで本研究では、AD モデルマウスに T2DM を発症させ、T2DM が AD にどのような影響をもたらすのかを明らかにするとともに、RA の AD および T2DM に対する効果を検証することを目的とした。
【方法】
9～10 週齢の AD モデルマウス(3×Tg)をコントロール群(C 群)、高脂肪食群(HF 群)、0.5%RA 含有高脂肪食群(HF-RA 群)に分け、25 週間飼育した。HF 群及び HF-RA 群には、本飼育開始 8、9、および 13 週後に低容量ストレプトゾシンを腹腔内投与し、本飼育開始 16 週目の経口糖負荷試験(OGTT)により糖尿病状態にあると判断したマウスを以下の実験に用いることとした。本飼育開始 21 および 25 週に認知行動試験(Y 字迷路試験)を、24 週にインスリン耐性試験(ITT)を実施し、その後解剖に供した。脳におけるアミロイドβおよびリン酸化タウ免疫組織化学染色により AD の病理進行を確認するとともに、海馬のインスリン様シグナル伝達経路に関わるタンパクをウエスタンブロッティングにより定量化した。さらに、海馬および視床下部の DNA マイクロアレイ解析を行った。
【結果・考察】
免疫組織化学染色により、HF 群における海馬でのリン酸化タウの蓄積の増大と HF-RA 群における減少が確認された。さらに、インスリン様シグナル伝達に重要なタンパクであるインスリンシグナル受容体基質(IRS-1)が、HF 群で減少し HF-RA 群で増加した。インスリン様シグナル伝達経路の抑制はタウのリン酸化の促進に繋がることから、T2DM によって引き起こされる IRS-1 の発現量減少を RA が抑制することによって、AD が予防される可能性を見出した。現在、DNA マイクロアレイ解析により詳細なメカニズムを検討中である。本研究の一部は、一般財団法人旗影会の助成によって実施された。

Alzheimer's Disease, Diabetes, Rosmarinic acid

講演番号：3A04p10
講演日時：3 月 27 日 15:39～ センター2 号館 A04 会場

オルトジヒドロキシイソフラボンを含む発酵大豆イソフラボンの脳機能に及ぼす影響

The effect on brain function by *ortho*-dihydroxyisoflavone in which is contained in fermented soybean isoflavone

○平松 直人、梅田 周佑、呉 暁紅、岡田 利孝（株式会社東洋発酵）
○Naoto HIRAMATSU, Syusuke UMEDA, Xiaohong WU, Toshitaka OKADA (toyohakko)

【背景と目的】
糖化とはタンパク質と還元糖が非酵素的な反応を経て結合し、終末糖化産物(AGEs)を生成することである。糖化は生体内においても起こり、その反応によって蓄積した AGEs は生体組織において様々な機能障害を引き起こすが、その中の 1 つにアルツハイマー病がある。わが国では高齢化の進行に伴いアルツハイマー病等の認知症患者数は増え続けており、その数が 2012 年の 462 万人から 2025 年には 730 万人へ増加し、65 歳以上の 5 人に 1 人が認知症を発症すると推計されている。老化に伴う認知機能の低下には、遺伝的要因以外に生活習慣も大きく関与しており、特に糖化ストレスの高い糖尿病患者のアルツハイマー病発症リスクは健常者の約 2 倍にまで上昇すると言われている。このような背景の中、我々は食品用抗糖化素材の開発を目的として新規成分探索を実施した結果、大豆イソフラボンの黒麹菌発酵物に強い抗糖化作用を見出した。さらに研究を進めた結果、抗糖化作用を示す有効成分は発酵過程おいて生成されるオルトジヒドロキシイソフラボン(ODI)であることが明らかとなった。そこで、今回抗糖化作用に基づく機能の一つとして、ODI を主成分とする発酵大豆イソフラボンの脳機能に及ぼす影響について調べた。
【方法及び結果】
アミロイドβ(Aβ)は、アルツハイマー患者の脳に見られる老人班の主成分として発見されており、Aβの凝集により神経機能の異常が現れると考えられている。そこで、ODI の Aβ凝集阻害作用についてチオフラビン T(ThT)色素を用いた ThT 蛍光アッセイ法によって評価した結果、ODI では明らかな Aβ凝集阻害作用が確認された。続いて健康な成人男女 18 名を対象として、経口摂取による神経栄養因子(BDNF、NGF、NT-3)上昇効果についての評価を行った。被験者を低用量摂取群及び高用量摂取群の 2 群に分け、ODI を含む試験食を 16 週間摂取した後の血漿中における神経栄養因子濃度を ELISA 法にて測定した結果、いずれの因子においても経時的な上昇が確認され、またその効果は用量依存的に高くなった。次に同様の試験食を使用し、60 歳以上 75 歳以下の健常な日本人男性および女性において、自己申告により物忘れを自覚する者を対象としたアーバンス神経心理テストを実施した。試験デザインは試験食摂取 8 週間の前後比較試験とし、総合評価点は 5 つの認知領域の粗点をもとに算出した。その結果、総合評価点においては摂取前と比べて有意に高値を示し、また 5 つの認知領域のうち遅延記憶の領域においても有意な改善効果が確認された。

AGE, Amyloid ß, isoflavone

発表責任者：平松直人（naoto_hiramatsu@toyohakko.co.jp）

講演番号：3A04p11
講演日時：3 月 27 日 15:50～ センター2 号館 A04 会場

アピオス食餌負荷による膵ラ氏島への影響

Effect of an apios-rich diet on pancreatic islets

○渡邉 理江[1]、梶岡 陽菜[1]、山本 悠介[1]、山本 鈴[1]、砂辺 梨湖[1]、安達 沙希[1]、赤嶺 三奈[1]、儀間 章託[1]、馬越 阿佑美[1]、森岡 優衣[1]、松永 祐輔[2]([1]美作大食物、[2]（株）津山工業原料)
○ Rie WATANABE[1], Haruna KAJIOKA[1], Yusuke YAMAMOTO[1], Rin YAMAMOTO[1], Rico SUNABE[1], Saki ADACHI[1], Mina AKAMINE[1], Shouta GIMA[1], Ayumi UMAKOSHI[1], Yui MORIOKA[1], Yusuke MATSUNAGA[2] ([1]Mimasaka Univ., [2]Tsuyama Kogyo Genryo Co., Ltd.)

【背景・目的】
アピオス(Apios americana Medikus)は、北アメリカ北西部が原産地とされるマメ科のつる性多年草で、可食部は塊茎部分であり、栄養価が高く、加熱調理する。ヤーコン・キクイモとともに三大健康野菜として知られてはいるが、知名度や商品の流通性は高くはなく、日常的な一般食品としては出番の少ない野菜である。近年の研究から、塊茎成分や花弁成分による活性酸素からの生体防御作用・抗ガン作用・抗炎症作用・血糖値上昇抑制作用・血圧上昇抑制作用などが報告されているが、それら作用に対する詳細なエビデンスはまだ乏しい。塊茎部における機能性成分・活性としては、抗酸化物質であるゲニステインを含むイソフラボンや抗酸化作用/SOD 様活性を持つ DDMP サポニン等の含有、弱めのα-グルコシダーゼ阻害活性が報告されている。私たちは昨年度本学会にて、津山産アピオスの特徴として水溶性食物繊維が豊富であることを報告し、更なる機能評価を継続研究として行っており、今回その報告を行う。

【方法・結果】
津山市内で収穫されたアピオスをフリーズドライ製法にて加工・粉砕後、C57BL/6 マウス経口食餌負荷実験用のアピオス含有食餌を作成した。対照としてジャガイモ含有食餌を作製し、アピオス食・ジャガイモ食・通常食(CE-2)を食餌負荷実験に使用した。1 年以上に及ぶ長期的な経口食餌負荷実験を行い、体調変化に対する観察や血糖コントロール・消化器系組織への影響を検討した。通常食に比し、HbA1c 値や体重はアピオス食群・ジャガイモ食群で低下していた。長期的な飼育により、通常食では肥満度の亢進や膵ラ氏島の肥大が認められたが、アピオス食では、膵ラ氏島の肥大に加えて数の増加も認められた。ジャガイモ食では膵ラ氏島の肥大や数の増加は認められなかった。加えて、血液成分分析・腸管組織解析を行っており、合わせて報告したい。

Apios, islets

発表責任者：渡邉理江（watanabe-rie@mimasaka.ac.jp）

講演番号：3A04p12
講演日時：3 月 27 日 16:01～ センター2 号館 A04 会場

EGCG による SMP30 の発現上昇は酸化剤 t-BHP 誘導性肝障害の誘発を抑制する
Up-regulation of "senescence marker protein 30" (SMP30) by EGCG protects against t-BHP-induced acute oxidative stress
○荒川 航太[1]、井上 博文[2]、田中 未央里[2]、高橋 信之[1]、上原 万里子[1]([1]東農大院農、[2]東農大応生)
○ Kota ARAKAWA[1], Hirofumi INOUE[2], Miori TANAKA[2], Nobuyuki TAKAHASHI[1], Mariko UEHARA[1] ([1]Tokyo Univ. agri Grad Sch agri, [2]Tokyo Univ. agri dept. of applied biosci)

【目的】我が国では老若男女を問わず、生活習慣病や加齢性疾患に対する予防・改善効果について社会的関心が高く、超高齢社会という背景からも「健康寿命の延伸」に対する食品成分の有効性が求められている。そこで我々は加齢とともに発現が減少する senescence marker protein 30 (SMP30)に着目した。SMP30 は、ラット肝臓において加齢と共に減少するタンパク質として見出された加齢指標タンパク質であり、Nrf-2 活性化を介した抗酸化能を発揮する。しかしながら、食品成分による SMP30 タンパク質の発現変動の評価および抗老化機能については未だ検討が行われていない。そこで我々は抗酸化能を有する代表的な食品成分である Epigallocatechin-3-gallate (EGCG)に着目し、EGCG による SMP30 発現制御が抗老化能に寄与するのか否かについて明らかにすることを目的とした
【方法/結果】まず、ラット肝臓由来細胞株である FAO 細胞に対して、EGCG を終濃度 10-100 μM で 24 時間処理し、SMP30 タンパク質の発現変動を解析した。その結果、無処理に比し、30 μM EGCG 処理から SMP30 タンパク質発現は上昇した。先行研究において、tert-butyl hydroperoxide (t-BHP)誘導型の急性酸化ストレスは ERK1/2 の活性化を介して老化を促進することが報告されている。そこで t-BHP により SMP30 発現が低下するのか、また、その t-BHP による SMP30 の発現低下が EGCG、抗酸化剤 (NAC: *N*-acetyl-L-cysteine)または ERK1/2 活性阻害剤 PD98059 処理により抑制されるか否かの検討を行った。その結果、t-BHP 処理による SMP30 タンパク質発現低下は EGCG、NAC または PD98059 処理により抑制された。続いて、被験動物として 7 週齢 ICR 雄マウスに 50 mg/kg EGCG を一週間経口投与後、t-BHP 単回投与による急性酸化ストレスモデルを作成し、肝臓中 SMP30 の発現変動および肝障害(AST/ALT)について解析した。その結果、t-BHP 単回投与は肝障害 (AST/ALT)の増大とともに、肝中 SMP30 発現を低下させたが、EGCG を経口投与することで共に抑制した。
【結論】本研究の結果から、EGCG は ROS-ERK1/2 シグナルの活性化を抑制することで、SMP30 の発現を正に制御することを明らかにした。同様に動物試験の結果からも、EGCG が t-BHP による SMP30 の発現低下および肝障害の誘発を抑制することを明らかにした。以上をまとめると、EGCG による SMP30 の発現調節と酸化ストレスの抑制を介して抗老化に寄与する可能性が示唆された。現在、もう一つの擬似老化モデルとして報告される d-galactose 反復投与モデルに対する EGCG の効果を SMP30 発現変動とともに解析中である。

SMP30, EGCG, t-BHP

発表責任者：荒川航太（10218001@nodai.ac.jp）

講演番号：3A04p13
講演日時：3 月 27 日 16:21～ センター2 号館 A04 会場

イソα酸の Nrf2 を介したアルコール性肝障害予防効果

Dietary iso-α-acids prevent alcoholic liver disease injury through Nrf2 signaling

○高瀬 貴仁[1]、豊田 集[2]、小林 直之[1]、井上 孝司[1]、石島 智子[2]、土屋 陽一[1]、岡田 晋治[2]([1]サッポロホールディングス(株)、[2]東大院農生科・応生化)
○Takahito TAKASE[1], Tsudoi TOYODA[2], Naoyuki KOBAYASHI[1], Takashi INOUE[1], Tomoko ISHIJIMA[2], Youichi TSUCHIYA[1], Shinji OKADA[2] ([1]SAPPORO HOLDINGS LTD., [2]The Univ. of Tokyo)

【目的】アルコール代謝の過程で生じるアセトアルデヒドは、抗酸化物質であるグルタチオンと結合して、グルタチオンの抗酸化機能を低下させることで、活性酸素種（ROS）の産生を促す。また飲酒の継続により、シトクロム P450E1 活性が亢進しスーパーオキシドが産生、スーパーオキシドはスーパーオキシドジスムターゼ（SOD）により過酸化水素に変換され、強力な酸化ストレス発生源となる。産生した ROS は脂質の過酸化などを介して肝細胞に障害を与える。またアセトアルデヒドは肝星細胞を介して、肝臓の線維化を亢進させる。肝障害を生じると AST（アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ）や ALT（ア ラニンアミノトランスフェラーゼ）などのトランスアミラーゼが血液中に流れ出すため、肝機能のマーカーとして広く扱われる。本研究では肝機能改善に寄与する機能性食品への応用を目標に、ビールの苦味成分（ホップ由来）であるイソα酸摂取によるアルコール性肝障害予防効果を評価した。
【方法】雄性 C57BL/6NCrSlc マウスにイソα酸を含む飼料で飼育後、アセトアルデヒドを腹腔投与し、経時採血を行い、肝機能マーカー（AST と ALT）を測定することで、アルコール性肝障害予防効果を評価した。また試験に供したマウスの肝臓から RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ法による遺伝子発現解析を実施した。さらに発現が変動した遺伝子とその上流の転写因子との関係を調べるため、マウス肝癌由来細胞 Hepa-1c1c7 を用いて、転写因子のタンパク質発現量及び発現が変動した酵素の活性を測定した。
【結果】ビールの苦味成分であるイソα酸を摂取したマウスにおいて、アセトアルデヒド投与による血清 AST と ALT の上昇を有意に抑えることが確認された。また DNA マイクロアレイ法による GO（遺伝子オントロジー）解析の結果、グルタチオン代謝（抗酸化や解毒に寄与）に関連する遺伝子の発現上昇が認められ、IPA（パスウェイ）解析の結果では転写因子 Nrf2 を介した酸化ストレス応答経路の活性化が認められた。この結果をもとに、培養細胞における Nrf2 のタンパク質発現量、及び発現が変動した酵素の活性を測定した結果、イソα酸添加により、有意に Nrf2 の核内移行が亢進し、GST（グルタチオン s-トランスフェラーゼ）活性と ALDH（アルデヒドデヒドロゲナーゼ）活性が促進されることが確認された。以上のことから、イソα酸は Nrf2 を介して、抗酸化酵素を活性化し、アルコール代謝時に生じる酸化ストレスを低減させることで、アルコール性肝障害を低減させることが推察された。

Iso-α-acids, Nrf2, Alcoholic liver disease

講演番号：3A04p14
講演日時：3 月 27 日 16:32～ センター2 号館 A04 会場

ラットを用いた腹膜中皮細胞移植の検討

Development of peritoneal mesothelial cells transplantation using rat model

○大崎 雄介[1,2]、高橋 知香[2]、伊藤 貞嘉[2]、森 建文[2] ([1]東北大・院農・栄養学、[2]東北大・院医・統合腎不全医療)
○ Yusuke OHSAKI[1,2], Chika Takahashi[2], Sadayoshi Ito[2], Takefumi Mori[2] ([1]Tohoku Univ. Agricultural Science, [2]Tohoku Univ. School of Medicine)

【背景】
末期腎不全患者に施行される腎代替療法の一つである腹膜透析療法(PD)は、血液透析療法と比べて拘束時間が短く通院回数が少ないため、患者 QOL の高い療法とされる。一方で腹膜の障害に伴う透析効率低下により PD の継続が困難となる場合があり、普及が広がらない一因となっている。腹膜障害機序の一つにブドウ糖分解産物による上皮間葉形質転換(EMT)の関与が指摘されている。我々は腹膜劣化機序の解明並びに培養した腹膜中皮細胞の移植の可能性を解明するため、腹膜障害モデルラットを使用して検討を行った。
【方法】
Wistar 系雄性ラットにブドウ糖分解産物として 0 mM, 1 mM, 20 mM メチルグリオキサール(MG)を腹腔内投与し、3 日後にラット大網より調製した腹膜中皮初代培養細胞中の EMT 関連遺伝子発現量を RT-PCR 法により評価した。また、Wistar 系 GFP 過剰発現ラットより調製した腹膜中皮初代培養を 0 mM, 1 mM, 20 mM の MG 投与 3 日後のラット腹腔内へ注入した。細胞移植後 7 日目にレシピエントラット大網より腹膜中皮初代培養細胞を調製して蛍光顕微鏡により観察した。また、抗 GFP 抗体を用いて肝臓組織の免疫染色を行い、移植細胞の定着について組織学的に観察した。
【結果】
0 mM ならびに 1 mM MG 投与群と比較して 20 mM MG 投与群において、腹膜中皮細胞の上皮系マーカー遺伝子として測定したサイトケラチン 18 ならびに ZO-1 発現の有意な低下を認め、間葉系マーカー遺伝子として測定した TGF-β, TNF-α, Mmp2 発現の有意な上昇を認めた。
また、20 mM MG 投与群では移植 1 週間後に調製した腹膜中皮初代培養細胞に GFP 陽性細胞を認め、肝臓表面の一部に 1 層の GFP 陽性細胞を認めた。一方で、0 mM, 1 mM MG 投与群においては蛍光顕微鏡並びに免疫染色の両方において GFP 陽性細胞を認めなかった。
【結語】
ブドウ糖分解産物により腹膜中皮細胞が EMT を引き起こし、この状態においては移植した腹膜中皮細胞が定着しうる可能性が示された。

Glucose degradation products, peritoneal mesothelial cell, transplantation

講演番号：3A04p15
講演日時：3 月 27 日 16:43～ センター2 号館 A04 会場

水溶性食物繊維イヌリンを用いた健常高齢者の腸内菌叢変動解析
Effects of dietary fiber inulin on gut microbiota in healthy elderly people.
○千々岩 樹佳[1,2]、Pui Shan Wong[2]、井手 圭吾[1,2]、伊藤 智子[3]、川上 涼子[3]、村田 浩子[3]、樋口 満[3]、柴田 重信[4]、油谷 幸代[2]、竹山 春子[1,2]([1]早大院先進理工生命医科、[2]産総研 CBBD-OIL、[3]早大院スポーツ科学、[4]早大院先進理工電子生命)
○Rieka CHIJIIWA[1,2], Wong Pui Shan[2], Keigo Ide[1,2], Tomoko Ito[3], Ryoko Kawakami[3], Hiroko Murata[3], Mitsuru Higuchi[3], Shigenobu Shibata[4], Sachiyo Aburatani[2], Haruko Takeyama[1,2] ([1]Dept. Life Sci. Med. Biosci., Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]CBBD-OIL, AIST, [3]Dept. Sports Sci., Grad. Sch. Sports Sci., Waseda Univ., [4]Dept. Physiol. Pharm., Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

近年、医療技術の進展や生活環境の充足によって日本の高齢化は飛躍的に進んできた。しかしながら、高齢化社会の抱える問題点として、高齢化により身体的な機能低下が引き起こり、生活の QOL 低下につながることが危惧されている。この問題を解決するためには単なる寿命ではなく健康年齢の延伸が必須であり、栄養学的・医学的に高齢者の機能改善の実現を目的とした研究が行われている。高齢者の機能改善のための方法として、腸内細菌叢の改善は重要な因子として注目されている。腸内環境は食事によって制御されており、摂取した栄養によって腸内細菌の菌叢組成や機能活性が変化することが知られている。さらに、食事は体内時計の制御にも関わっていることから、摂取栄養の種類のみならず、時間栄養学的視点も含めた腸内細菌叢解析が必要である。そこで本研究では、未だ知見の少ない健常な高齢者を対象として、時間栄養学的視点を考慮したうえで食事に伴う菌叢変動メカニズムの解明を目的とした。

実験手法として健常な男女中高齢者 57 名を対象に、腸内細菌叢の発酵基質となるイヌリンもしくはプラセボを対象者に 3 ヶ月間摂取してもらった。摂取時間の影響を調べるため、摂取時間が朝と夜の群に分け、それぞれの群において介入前後で糞便中腸内細菌叢データ、腸内細菌叢の活性指標となる有機酸データ、生活習慣因子の取得を行った。腸内細菌叢データは 16S アンプリコンシーケンスにより取得し、有機酸データは GC-MS を用いて取得した。取得したメタ 16S rRNA 解析データと有機酸データについて、群間で他群検定を実施することで、イヌリン摂取による腸内細菌叢の変動を摂取時間の差異も含め同定した。同定した腸内細菌叢の変化を、様々な生活習慣因子データと統合的に解析し、イヌリンによる健常な高齢者の腸内細菌叢への影響について総合解析を行った。

その結果、健常な高齢者における腸内細菌叢を比較したところ、個人差が大きいことが明らかになった。そしてイヌリンが腸内細菌叢と有機酸産生に及ぼす影響について、摂取の有無と摂取時間の違いから検定した結果、イヌリン摂取の有無による影響より摂取時間による影響の方が大きいことが明らかになった。健常な被験者を全体的に統計解析すると、個人差による影響より食事による影響が小さくなり観察できない可能性が示唆された。そこで次に、被験者をレスポンダー・ノンレスポンダーに分け、食事による腸内細菌叢の変動と他因子との関連を探索した。その結果、レスポンダーの腸内細菌叢において、いくつかの生活習慣因子との関連が示唆された。このように本研究は、高齢者の身体的機能向上を考えていく上で、重要な知見の一つになりうると期待できる。

healthy elderly people, gut microbiome, inulin

発表責任者：千々岩樹佳（rieca.chijiiwa@asagi.waseda.jp）

講演番号：3A05a01
講演日時：3 月 27 日 09:30～ センター2 号館 A05 会場

冷えの症状に対する冷感覚の感受性の関与

Involvement of cold sensitivity in 'feeling of Cold'

○森 紀之[1,2]、青木 美優[2]、中江 美沙子[2] ([1]同女大・生活、[2]滋賀県大・人間文化)
○Noriyuki MORI[1,2], Miyu Aoki[2], Misako Nakae[2] ([1]DWCLA, [2]the Univ. Shiga Pref.)

【背景と目的】　冷え性は，通常の人が苦痛を感じない程度の温度環境下において，身体の一部，特に四肢末端や腰部などが他に比べて異常に冷たく感じる症状であり，末梢血管の収縮による末梢部の皮膚血流量減少が主因と考えられているが，その発生機序には不明な点も多い．冷え性には環境温度の変化に対する末梢体表温調節の不良という要因だけでなく,冷感覚が過敏であるために,通常苦痛を感じない温度条件下でも苦痛を感じてしまうという要因が存在する可能性がある.本研究では,ヒトにおいて低温の感受に関与する温度受容体である Transient Receptor Potential (TRP) M8 に着目し,冷感覚の感受性を評価・解析し,冷温に対する体温変化にて評価した体温調節反応との関連性について検討を行い,冷えの自覚症状とその要因の関係を解明することで,冷え性の改善につなげることを目的とする.

【方法】健常な女子学生を対象に試験を行った.冷え性の調査用問診票を用いたアンケートにより自覚の伴う冷えの症状について評価した．冷感覚の感受性について TRPM8 の活性化成分であるメントールに対する閾値で評価した．また緩慢冷却試験により体表温，鼓膜温を測定し，緩慢冷却による末梢体表温変化や末梢体表温と深部温の温度差を評価し，冷水負荷試験により低温に対する体温調節反応(末梢体表温回復率)を評価した．以上の試験から，冷えの自覚症状と冷感覚や冷温に対する体温調節反応との関連性について解析を行った.

【結果と考察】冷え性の要因である末梢体表温調節の不良に関連する事項では,「末梢体表温の回復が不良である」ことと「末梢-深部温度差が大きい」ことの間には関連性があった．緩慢冷却により末梢体表温が低下する程度と末梢体表温の回復不良の程度との間にも関連性があった.また，アンケートにより分類される,強く冷えを感じる群は他の群と比べて末梢体表温の回復率が低かった.しかし,自覚がない群と冷えを感じる群との間に有意な差はなかった.冷感覚の感受性と冷えの自覚症状の関連性を見ると,自覚がない群は他の群と比べてメントールの閾値が高かった．従って,冷感覚が鈍いことが冷えの自覚を失わせている可能性が示唆された.以上の結果から冷え性の改善には,冷温に対する体温調節反応の改善だけでなく冷感覚の感受性も重要であることが考えられた.

TRPM8, Thermo regulation, feeling of cold

講演番号：3A05a02
講演日時：3 月 27 日 09:41～ センター2 号館 A05 会場

ジリノレオイルホスファチジルコリン(DLPC)によるミトコンドリア増強を介した Neuro2a 細胞に対する酸化ストレスからの保護効果

Dolinoleoylphosphatidylcholine (DLPC) protects Neuro2a cells from oxidative stress via mitochondrial enhancement

○長井 薫、加留部 真紀、中嶋 新菜、八木 夏海、山内 加奈恵 (千里金蘭大生活科学)
○Kaoru NAGAI, Maki KARUBE, Niina NAKASHIMA, Natsumi YAGI, Kanae YAMAUCHI (Senrikinran Univ.)

大豆レシチンは、様々な健康効果が知られている。その一つに、認知症を予防する効果が期待されているが、主に神経伝達物質であるアセチルコリンの供給源としての役割が考えられているのみである。つまり、認知症に代表される神経変性疾患における神経細胞死を抑制する作用の有無についてはあまり明らかになっていない。多くの神経変性疾患では、酸化ストレスが神経細胞死の原因となっており、酸化ストレスは細胞内ミトコンドリアを障害することが知られている。また、老化に伴い脳内の細胞ではミトコンドリアが減少し、認知症患者ではよりミトコンドリア量が少ないことが知られている。本研究では大豆レシチンに含まれるジリノレオイルホスファチジルコリン(DLPC)について、ミトコンドリア増強作用を介した酸化ストレスの抑制作用の有無を検討した。

神経細胞のモデルとして、マウス神経芽細胞腫 Neuro2a 細胞を用い、脳内の酸化ストレスのモデルとして NO ドナーである Sodium Niitroprusside を用いた。

まず、Neuro2a 細胞に対する NO 毒性誘導細胞死に DLPC が保護効果を示すかについて検討を行ったところ、有意な細胞保護効果が認められた。活性酸素種に対する直接の抗酸化作用の可能性について、DPPH 法により確認したところ、細胞保護効果が見られた条件では、直接の抗酸化作用は認められなかった。酸化ストレスによるミトコンドリア障害に対する作用を、ミトコンドリア膜電位感受性色素 JC-1 染色によるサイトメトリー解析により検討したところ、酸化ストレスの有無に関わらず DLPC の処理は細胞内のミトコンドリア量を増やすことが分かった。また、ミトコンドリア生合成調節因子である Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1α (PGC1α)への影響を検討したところ、DLPC 処理により核への移行が促進されることが観察された。これは、DLPC が何らかの細胞内シグナルを介して PGC1α を活性化し、その結果としてミトコンドリアを増加させることを示唆している。

本研究では、DLPC が神経系細胞のミトコンドリアを増やし、酸化ストレスからの保護効果を示すという結果が得られた。本結果は、大豆レシチンの摂取が、認知症におけるミトコンドリア減少に歯止めをかけ、神経細胞死を抑制することで認知症予防効果を示す可能性を示唆している。

Lecithin, Oxidative stress, Mitochondria

発表責任者：長井薫（k-nagai@cs.kinran.ac.jp）

講演番号：3A05a03
講演日時：3 月 27 日 09:52～ センター2 号館 A05 会場

酸化ストレスに対するダイゼインの AMPK 活性化を介したミトコンドリア機能亢進作用による神経細胞保護効果

Soy isoflavone daidzein protects Neuro2a cell from oxidative stress via AMPK and mitochondrial enhancement

○伊藤 章悟[1]、長井 薫[2] ([1]甲子園大栄、[2]千里金蘭大生活科)
○Shogo Ito[1], Kaoru Nagai[2] ([1]Koshien Univ., [2]Senrikinran Uviv.)

酸化ストレスは、アルツハイマー病やパーキンソン病をはじめとする多くの神経変性疾患の発症に関与していることが知られていることから、抗酸化物質の摂取は神経変性疾患の予防につながる可能性が考えられている。大豆イソフラボンは、その抗酸化作用が様々な実験モデルにおいて報告されており、一般的には、その作用は抗酸化剤として直接活性酸素種に作用していると考えられている。一方、大豆イソフラボンのダイゼインは、サーチュインファミリーに属する Sirt1 の活性化を介してミトコンドリア生合成調節因子である Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1α (PGC1α) を活性化することが報告されている。従って、ダイゼインは酸化ストレスによって障害を受けるミトコンドリアを増強することで、直接作用だけでなく細胞内シグナルを介しても酸化ストレスによる細胞死を抑制している可能性が考えられる。

本研究では、ダイゼインがミトコンドリアを増強する細胞内シグナルを介して、酸化ストレス誘導細胞死を抑制すると仮説を立て、関与する細胞内シグナルの検討を行うこととした。まず、マウス神経芽細胞腫 Neuro2a 細胞を神経細胞モデルとし、Sodium nitroprusside (SNP) による酸化ストレスに対してダイゼインが細胞保護効果を示すかどうか解析したところ、有意な細胞保護効果が観察された。さらに、ダイゼイン処理による細胞内ミトコンドリア量への影響をミトコンドリア膜電位感受性色素 JC-1 染色後のサイトメトリー解析によって検討したところ、SNP 処理の有無に関わらず、ミトコンドリア量の増加が観察された。

ダイゼインによる細胞保護効果及びミトコンドリア増強作用のメカニズムを明らかにする為、まずは報告されている Sirt1 阻害剤である Sirtinol の影響を解析したが、予想に反して影響はみられなかった。次に我々は PGC1α 活性を調整することが報告されている AMP-activated protein kinase (AMPK) に着目し、AMPK 阻害剤である Dorsomorphin 存在下におけるダイゼインの作用を解析したところ、AMPK 阻害下においては、ダイゼインによる細胞保護効果及びミトコンドリア増強作用は抑制されることが分かった。従って、ダイゼインはAMPK活性化を介してミトコンドリアを増強することによって酸化ストレスから細胞を保護していることが示唆された。実際に、PGC1α の発現量と細胞内局在について解析したところ、ダイゼイン処理後によって PGC1α の発現上昇および核移行が起こることが観察された。また、DPPH 法によりダイゼインの抗酸化能を解析したところ、ラジカル消去活性は確認されなかった。

本研究の結果により、ダイゼインは活性酸素に対する直接作用ではなく、AMPK 活性化を介して PGC1α の発現上昇及び核移行による活性亢進を誘導することで、それに続くミトコンドリアの増殖を誘導し、酸化ストレスから神経細胞を保護する作用があることを示唆している。

Daidzein, Oxidative stress, Mitochondria

講演番号：3A05a04
講演日時：3 月 27 日 10:03～ センター2 号館 A05 会場

マウスの脳内モノアミン及び行動は給餌される標準飼料に影響を受ける
Basal diet influences brain monoamines, gene expression and behavior in mice.
○松元 沙樹[1]、山本 咲希[1]、椛島 奈津美[1]、市瀬 嵩志[1]、古屋 茂樹[1,2] ([1]九州大農、[2]イノベイティブバイオアーキテクチャーセンター)
○ Saki MATSUMOTO[1], Saki YAMAMOTO[1], Natsumi KABASHIMA[1], Takashi ICHINOSE[1], Shigeki FURUYA[1,2] ([1]Kyushu Univ., [2]Innovative Bio-Architecture Center)

［目的］ 近年、食品成分の機能性を活用した脳機能改善素材の開発に多くの関心が集まっている。その評価を実験動物で行うことは作用機序の理解や安全性の検証に不可欠である。マウスに給餌する標準飼料は、共通に各種の必須栄養素を含むが、タンパク質については多様な成分と組成のものが利用されている。しかし、これまで標準飼料の違いが脳内代謝や行動に及ぼす影響は十分に理解されていない。そこで本研究では、一般的に使用されているタンパク質源の全く異なる標準飼料として AIN-93M（カゼイン含有）と CE-2（大豆粕その他複数のタンパク質種含有）を選択し、これらの標準飼料の給餌がマウスの脳内代謝，遺伝子発現および行動に及ぼす影響について比較解析を行った。

［方法］ 8 週齢の C57BL/6 J 雄性マウスを CE-2 摂食群、AIN-93M 摂食群に分け、各飼料を自由摂食させた。まず、飼料組成が脳内神経伝達物質代謝と関連遺伝子発現に及ぼす影響を明らかにするため、飼育 8 日目に脳組織を取り出し、HPLC-ECD 系にてモノアミン分析、qRT-PCR にて遺伝子発現解析を行った。また、4 日目、8 日目、14 日目には、尾懸垂試験にてうつ様行動を評価した。

［結果］ モノアミン含量は複数の脳内領域において 2 群間で有意な違いを示した。モノアミン受容体も特定のサブタイプについて遺伝子発現が 2 群間で有意に変化していた。さらに尾懸垂試験の結果、いずれの試験日においても両群間でうつ様行動に有意な違いが確認できた。以上の結果から、給餌する標準飼料そのものが、脳内モノアミン類の代謝及び関連受容体遺伝子発現に影響を及ぼしており、さらにうつ様行動においても明瞭な違いを生じさせる要因となっていることが示された。そのため、食品成分による脳高次機能への作用を評価する際には、給餌する標準飼料が及ぼす脳への作用を踏まえた上で選定することが重要であると考えられた。

basal diet, monoamine, depression

発表責任者：古屋茂樹（shigekifur@brs.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3A05a05
講演日時：3 月 27 日 10:14～ センター2 号館 A05 会場

ロスマリン酸摂取による脳内モノアミン変動の解析
Effect of increasing monoamine secretion in mice brain by rosmarinic acid
○貫間 春圭[1]、長谷 知輝[1]、平 修[2]、阿部 啓子[1,3]、小林 彰子[1] ([1]東大院農、[2]福大農、[3]産技総研)
○Haruka NUKIMA[1], Tomoki HASE[1], Shu TAIRA[2], Keiko ABE[1,3], Shoko KOBAYASHI[1] ([1]Univ.of Tokyo, [2]Fukushima Univ., [3]KISTEC)

【背景・目的】
我々のグループは、アルツハイマー病（AD）の主病態であるアミロイドβ（Aβ）沈着を抑制する成分としてシソ科植物に含まれるポリフェノールであるロスマリン酸（RA）を見出している。しかし、RA は血液脳関門の透過率が低いことから、RA が脳内に移行し直接 Aβ 凝集を抑制する以外の抗 AD メカニズムが予想された。そこで当研究室では、10 か月間 RA を摂取した AD モデルマウス（Tg2576）の脳を用いた DNA マイクロアレイ解析を行い、RA 摂取により Dopamine（DA）合成経路が活性化されることを明らかにした(1)。これより、RA 摂取による DA 合成活性化を介した抗 AD 作用の可能性が考えられた。そこで本研究では、RA 摂取後のモノアミン変動を詳細に解析すること、また、モノアミンの Aβ 凝集抑制作用を明らかにすることを目的とした。
【方法】
野生型マウス（C57BL/6J）を、AIN93G を与えるコントロール（C）群（n=5）と 0.5%RA 含有 AIN93G を与える RA 群（n=6）に分けて 11 日間飼育した。飼育後、大脳皮質、線条体、海馬を分けて採取し、高速液体クロマトグラフィー電気化学検出器（HPLC-ECD）を用いて部位ごとのモノアミン濃度を測定した。同様に飼育したマウスの黒質、腹側被蓋野におけるモノアミン代謝酵素の mRNA 発現量を RT-PCR を用いて測定した。加えて、RA（60 mg/kg）を単回投与した野生型マウスの脳のモノアミン濃度測定および DA 合成酵素の免疫組織化学染色を実施した。また、11 日間の RA 摂取により濃度が上昇したモノアミンの Aβ 凝集抑制効果をチオフラビン T（ThT）蛍光測定法により測定した。
【結果・考察】
HPLC-ECD による測定の結果、11 日間 RA を摂取させたマウスの大脳皮質において、DA、L-3,4-dihydroxyphenylalanine（L-DOPA）、3,4-Dihydroxyphenylacetic acid（DOPAC）、Norepinephrine（NE）の濃度が上昇し、黒質、腹側被蓋野において、DA 分解酵素遺伝子の発現量低下が見られた。ThT 蛍光測定法により、これら 4 種のモノアミンが Aβ 凝集抑制作用を示すことが明らかとなり、DA 分解酵素低下によるモノアミン濃度上昇を介した Aβ 凝集抑制効果が示唆された。一方、RA は摂食後速やかに体外に排泄されることから、摂取後短時間でモノアミン変動が生じる可能性を考え、RA 投与後短時間後のマウスの脳内モノアミン濃度および合成酵素の変動を解析中である。
（1）Hase *et al*., *Scientific Reports*. 9, 8711, (2019)

Monoamine, Rosmarinic acid, Alzheimer's Disease

講演番号：3A05a06
講演日時：3 月 27 日 10:35～ センター2 号館 A05 会場

神経変性疾患モデル線虫における酵素合成フェルラ酸ルチノシドの神経保護作用
Neuroprotective effects of enzymatically synthesized ferulic acid rutinoside in C. elegans model of neurodegenerative diseases

○松本 果楠子[1]、Park Hyun Young[2]、Vattem A. Dhiraj[2]、中村 宗一郎[1]、片山 茂[1,3] ([1]信州大学院農、[2]オハイオ大、[3]信大バイオメディカル研究所)
○Kanako MATSUMOTO[1], Hyun Young Park[2], Dhiraj Vattem A.[2], Soichiro NAKAMURA[1], Shigeru KATAYAMA[1,3] ([1]Shinshu Univ. Agri., [2]Ohio Univ., [3]Shinshu Univ. Biomol.)

【目的】本研究室ではこれまでに、フェルラ酸（FA）の機能改変を目的として、酵素合成法を用いて誘導体の作製に取り組んできた。フェルラ酸ブチルエステル（FA4）はアミロイド凝集抑制作用を示すこと、フェルラ酸ルチノシド（FAR）は脳由来神経栄養因子（Brain-derived neurotrophic factor：BDNF）産生促進作用を示すこと、さらにはこれらのフェルラ酸誘導体の Caco-2 細胞透過性は FA よりも増加することを報告した。本研究では、神経変性疾患モデル線虫を用いて、フェルラ酸誘導体の神経保護効果を検討することを目的とした。また、各種フェルラ酸誘導体の血液脳関門（Blood-brain barrier: BBB）透過性を評価した。
【方法】FAR はダッタンソバ由来ルチナーゼの逆反応、FA4 はリパーゼの逆反応を用いて合成した。線虫 *C. elegans* を用いた試験では、β-アミロイドペプチド（Aβ）遺伝子導入系統 CL2006 および野生型線虫 N2 を使用した。パーキンソン病モデルの作製には、ドーパミン作動性ニューロンに対する神経毒 MPP^+および 6-OHDA、Paraquat を使用した。酸化ストレスモデルとして過酸化水素を使用した。同調培養した線虫に各試料の存在下でインキュベーションし、生存率の測定および遺伝子発現解析を行った。BBB 透過性試験では、脳毛細血管内皮細胞、周皮細胞およびアストロサイトにより構成された in vitro 再構成系モデル（ファーマコセル社）を使用した。各試料をインサート内側（血管腔側）に添加し 30 分後、ウェル内（脳実質側）に移行した試料濃度を HPLC により測定した。
【結果】ヒト型 Aβ発現系統 CL4176 を用いて Aβ毒性に対する神経保護効果を検討した。その結果、FA による効果は認められなかったのに対して、FAR は生存率の低下を抑制することが示された。分子シャペロン HSP の遺伝子発現解析において、Hsp60 および Hsp70 の発現量は FAR 処理により増加した。続いて、MPP^+、6-OHDA、Paraquat 毒性に対する保護効果を検討した結果、いずれの毒性に対しても、FA では変化が見られなかったのに対して、FAR 処理によって線虫の生存率低下は抑制されることが示された。一方、過酸化水素を添加した場合では、FAR だけでなく FA においても生存率の低下が抑制したが、FAR の方が抑制効果は高かった。BBB 透過性試験においては、FAR で最も高い透過係数が得られ、次いで FA4、FA の順になった。FA は検出限界以下であったことから、糖鎖および脂肪鎖導入が BBB 透過性の改善に大きく寄与することが示唆された。以上の結果より、フェルラ酸ルチノシドは優れた BBB 透過性を有するとともに、アルツハイマー病及びパーキンソン病の線虫モデルにおいて神経保護効果を発揮することが示された。

Neuroprotection, C. elegans, Ferulic acid

発表責任者：片山　茂（skata@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3A05a07
講演日時：3 月 27 日 10:46～ センター2 号館 A05 会場

こんにゃく由来セラミドの血液脳関門透過性及び脳内アミロイドβ蓄積低減効果の検討
Examination of blood brain barrier permeability and reduction of amyloid ß accumulation in brain by konjac ceramides

○江口 晃一[1]、高橋 香織[1]、三上 大輔[2]、湯山 耕平[2]、向井 克之[1,2]、五十嵐 靖之[2]([1]（株）ダイセル、[2]北海道大)
○Koichi EGUCHI[1], Kaori TAKAHASHI[1], Daisuke MIKAMI[2], Kohei YUYAMA[2], Katsuyuki MUKAI[1,2], Yasuyuki IGARASHI[2] ([1]Daicel Corp., [2]Hokkaido Univ.)

【背景・目的】
アルツハイマー病（AD)は、認知機能の低下を引き起こす進行性の神経変性疾患である。AD はアミロイドβ（Aβ)が脳細胞外に蓄積することで病理が進み、老人斑形成やシナプス脱落、最終的には認知機能の低下に繋がることが知られている。これまでの研究により、こんにゃく由来セラミドを神経細胞に投与することでエクソソーム産生が促進され、そのエクソソームに Aβのクリアランス作用があることが明らかとなっている。今回、こんにゃくセラミドが脳内で機能性を発揮することを確認するため、①血液脳関門の透過性、②AD モデルマウスへの投与効果について検討した。

【方法・結果】
①血液脳関門の透過性
血液脳関門(blood-brain barrier:BBB)の透過性検討は BBB キット(ファーマコセル社製)で評価した。このキットはラット脳毛細血管内皮細胞、ペリサイト及びアストロサイトの 3 種類の培養細胞を用いて BBB を再現したもので、ウェルプレートのインサート内(血管側)に被験物質を投与し、インサート外(脳側)で被験物質を検出できるかで BBB 透過性を評価することができる。被験物質としてこんにゃく由来セラミドを用いて検討したところ、脳側でセラミドを検出できた他、セラミド代謝物であるスフィンゴミエリン(SM)も検出された。この結果より、こんにゃく由来セラミドはセラミド及び SM の構造で BBB を透過し、脳内へ移行することが示唆された。

②AD モデルマウスへの投与効果
AD モデルマウス(ヒト APP^{SweInd} 遺伝子導入マウス、12 カ月齢)を試験群と対照群に分け、14 日間飼育した。この間、試験群には 1 mg/day となるようにこんにゃく由来グルコシルセラミドを、対照群にはヴィークルのみ(トラガカントゴム水溶液)を 1 日 1 回、強制経口投与した。14 日目の投与終了後、脳組織を回収し、海馬と大脳皮質における Aβ蓄積量を ELISA 法で測定した。その結果、対照群と比較して試験群では海馬・大脳皮質共に Aβ蓄積量の有意な減少を確認できた。

ceramide, blood brain barrier, amyloid ß

講演番号：3A05a08
講演日時：3 月 27 日 10:57～ センター2 号館 A05 会場

黒ショウガ(*Kaempferia parviflora*)による脳認知機能改善効果

Black ginger (*Kaempferia parviflora*) improves cognitive brain function

○吉田 泉[1]、吉田 香[2]、井出 将博[1]、高橋 有志[1]、藤田 和弘[1]、五十嵐 友二[1] ([1]日本食品分析セ、[2]同志社女子大)
○Izumi Yoshida[1], Kaoru Yoshida[2], Masahiro Ide[1], Yushi Takahashi[1], Kazuhiro Fujita[1], Tomoji Igarashi[1] ([1]JFRL, [2]Doshisha W. Col)

【目的】高齢化社会となり，認知症の患者数は増加し，社会的問題となっている。認知症の半分以上を占めるアルツハイマー病の発症においては，アミロイドβやリン酸化タウ蛋白の蓄積による神経変性，神経細胞死が関与することが知られているが，認知症の発症には，脳における酸化ストレス，炎症が関与しているとも言われている。そこで，今回，抗酸化，抗炎症作用のある黒ショウガに認知機能改善効果があるかを神経前駆モデル細胞として広く利用されている PC-12 細胞を用いた神経突起伸長誘導試験，加齢マウスを用いた動物行動試験により調べた。また，黒ショウガの有効成分であるポリメキシフラボン(PMF)が脳に吸収されているかを確認するため，マウスに PMF を経口投与し，PMF の体内動態も調べた。
【方法】PC-12 細胞に黒ショウガ抽出液を添加し，神経突起伸長作用を調べた。神経細胞特異的遺伝子 neurofilamentL (*NfL*)，tubulin beta 3 (*Tubb3*)， synaptophysin (*Syp*)の発現は Real-time PCR により調べた。加齢マウス(30 週齢)に黒ショウガを添加した飼料を 20 週間投与し，行動試験(Y 字迷路試験，受動回避試験，新奇物質探索試験)により認知機能の評価を行った。また，PMF の脳への吸収は，PMF の一種である 5,7,4’-トリメトキシフラボン(TMF)をマウスに経口投与し，6 時間後の脳における薬物動態を LC-QTOF-MS により調べた。解析は，SCIEX 社の Metabolite Pilot(MP)を用いた。
【結果】黒ショウガを添加することによって,PC-12 細胞は神経突起を伸長した。神経細胞特異的遺伝子 *NfL* および *Tubb3* は濃度依存的な発現上昇が認められた。動物行動試験により黒ショウガの認知機能改善効果を評価した。短期記憶を評価する Y 字迷路試験，長期記憶を評価する受動回避試験では普通食と黒ショウガ食の間に有意差は認められなかったが，視覚的認知記憶を評価する新奇物体探索試験においては黒ショウガの改善効果が認められた。脳に TMF が吸収されるかを，投与した 5,7,4’-TMF を親化合物として代謝産物を MP で解析したところ,脳ではごく一部分酸化されるが,大部分は 5,7,4’-TMF の形で吸収されることが確認された。以上のことにより，黒ショウガに認知機能改善効果がある可能性が示唆された。

black ginger, cognitive, PC12

講演番号：3A05a09
講演日時：3 月 27 日 11:08～ センター2 号館 A05 会場

飼料の違いが社会的敗北 BALB/c マウスの行動に与える影響
Effects of differences in standard diets on the behaviors in social defeated BALB/c mice
○石其 慧太[1]、佐藤 瑞穂[1,2]、谷島 優平[1]、豊田 淳[1,2] ([1]茨大農、[2]農工大連農)
○KEITA ISHISONO[1], MIZUHO SATO[1,2], YUHEI YAJIMA[1], ATSUSHI TOYODA[1,2] ([1]Ibaraki Univ., [2]TUAT)

【背景・目的】げっ歯類を用いた社会的敗北ストレスモデルはうつ病の症状と似た社会的忌避行動を示すことから、有用なうつ病モデルとして広く利用されている。我々は、社会的敗北ストレスを暴露した C57BL/6 マウスの社会的忌避行動は、飼料の質により影響を受けることを明らかにした[1]。そこで、動物実験に一般的に使用されている標準飼料の違いがストレス関連行動に影響を与えることが予想される。本研究では，社会的敗北ストレスの影響を受けることが報告されているマウスの巣作り行動や社会的忌避行動を指標とし、標準飼料の違いがこれらの行動に与える影響を評価した。

【材料・方法】マウス（BALB/c、7 週齢、オス、$n = 52$）を AIN-93G ペレット給与群(対照群; $n = 6$, ストレス群; $n = 7$)、AIN-93M ペレット給与群(対照群; $n = 6$, ストレス群; $n = 7$)、MF ペレット給与群（対照群; $n = 6$, ストレス群; $n = 7$）および CRF-1 ペレット給与群（対照群; $n = 6$, ストレス群; $n = 7$）の 8 群に分けた。7 日間の馴致期間にそれぞれの標準飼料を給餌した。その後、ICR マウス（リタイア、オス）による 3 日間の社会的敗北ストレスを暴露し、ストレス暴露 3 日目に巣作り行動試験を実施した。4 日目に社会行動試験（Social interaction test, SI）でストレス抵抗性を評価した。行動試験翌日に各臓器のサンプリングを行った。

【結果・考察】対照群と比較して、ストレス暴露により 4 つの標準飼料群で巣作り行動の遅延と脾臓重量の増加が確認された。一方で、AIN-93G、MF、CRF-1 を給餌した群ではストレス暴露による SI スコアの有意な低下が観察されたが、AIN-93M を給餌した群ではストレス群だけでなく対照群における SI スコアの低下が観察された。血中コルチコステロン濃度を測定したところ、どの飼料群においてもストレス暴露による変化は観察されなかった。

以上の結果より、AIN-93M の給餌では、対照群において社会的忌避行動が顕在化し、ストレスの影響評価が困難となった。つまり、選択した標準飼料によって行動試験の結果が左右されることが明らかになった。一方で、どの標準飼料を給餌した場合においても敗北モデルの巣作り行動は遅延した。このことから、社会的敗北ストレスの影響を評価する行動指標として、巣作り行動は有用であると考えられた。

1. Goto T, Tomonaga S, Toyoda A. Effects of Diet Quality and Psychosocial Stress on the Metabolic Profiles of Mice. J Proteome Res. 2017;16(5):1857-1867.

Depression, Social defeat stress, Nest building

講演番号：3A05a10
講演日時：3 月 27 日 11:19～ センター2 号館 A05 会場

社会的敗北ストレスモデルにおけるコラーゲン分解物の抗うつ作用と神経炎症への影響
Effects of collagen hydrolysate on depressive behavior and neuroinflammation in a social defeat stress model

○野木村 大[1]、水重 貴文[2]、多賀 祐喜[3]、楠畑 雅[3]、蕪山 由己人[2]([1]宇都宮大学大学院農学研究科、[2]宇都宮大学学術院、[3]株式会社ニッピ)
○Dai NOGIMURA[1], Takahumi MIZUSHIGE[2], Yuki TAGA[3], Masashi KUSUBATA[3], Yukihito KABUYAMA[2] ([1]Utsunomiya Univ., [2]Utsunomiya University academy, [3]Nippi,Incorporated)

【目的】我々はこれまで、生姜由来酵素コラーゲン分解物（GDCH）の経口投与により、抗うつ作用を示すことを見出した。近年、うつ様行動にストレス誘導性の神経炎症が影響を及ぼすことが報告されている。本研究では、社会的敗北ストレスモデルを用いて、GDCH がうつ様行動や神経炎症に影響を及ぼすか明らかにすることを目的とした。ミクログリアとアストロサイトの活性化や神経炎症との関連が高い神経栄養因子発現について解析を行った。
【方法】モデル作製にあたり、攻撃マウスとして 10 週齢雄性の ICR マウスを、標的マウスとして 5 週齢雄性の C57BL/6J マウスを用いた。標的マウスは 3 群に分け、そのうち 2 群に社会的敗北ストレスを負荷した。ストレス負荷群では、標的マウスを攻撃マウスの飼育ケージの中に 1 日 10 分間入れた。その他の時間は攻撃マウスと隣り合う網目ケージで飼育した。これを 12 日間繰り返した。ストレス負荷群の 1 群には GDCH（100 mg/kg 体重）を、残りの 1 群とストレス非負荷群には生理食塩水を 12 日間経口投与した。［実験 1］ストレス負荷 11 日目に尾懸垂試験を、12 日目に強制水泳試験をそれぞれ 6 分間行い、無動時間の測定によりうつ様行動を評価した。無動時間が短縮した場合に抗うつ活性ありと判定した。その変化が自発行動の影響によるものか調べるため、5 分間の Y 字迷路試験により自発行動を評価した。［実験 2］標的マウスの攻撃マウスからの忌避行動を評価するため、ストレス負荷 11 日目に 10 分間の社会的相互作用試験を行った。［実験 3］12 日目の行動試験終了後に灌流固定を行い、脳を摘出した。脳の凍結切片を作成し、海馬歯状回のミクログリアマーカーである Iba、アストロサイトマーカーである GFAP を蛍光染色した。Iba および GFAP の陽性細胞数と細胞面積を Image J を用いて計測した。さらに、12 日目の行動試験終了後に海馬を摘出し、4 種類の神経栄養因子（BDNF、NGF、NT-3、NT-4/5）の mRNA 発現量を測定した。
【結果・考察】［実験 1］社会的敗北ストレス負荷によりうつ様行動が増加し、GDCH 投与はそれを改善した。ストレス負荷と GDCH 投与による行動量への影響は認められなかった。［実験 2］社会的敗北ストレス負荷により攻撃マウスからの忌避行動が増加したが、GDCH 投与による影響は認められなかった。［実験 3］社会的敗北ストレス負荷により海馬の Iba と GFAP の陽性細胞数および面積が有意に増加し、BDNF と NT-4/5 の発現量は有意に減少した。GDCH 投与はそれらを改善した。以上より、GDCH は、社会的敗北ストレス負荷による海馬神経炎症の活性化を抑制し、抗うつ様作用を有することが示唆された。

Depression, Collagen, Neuroinflammation

発表責任者：水重貴文（mizushige@cc.utsunomiya-u.ac.jp）

講演番号：3A05a11
講演日時：3 月 27 日 11:40～ センター2 号館 A05 会場

乳由来βラクトリンの継続摂取による注意集中力の向上

Supplementations of milk-derived ß-lactolin improve attention

○阿野 泰久[1]、喜多 真弘[1]、渡邉 順史[2]、梅田 聡[3] ([1]キリン HD 健康研、[2]協和発酵バイオ、[3]慶応大)
○Yasuhisa ANO[1], Masahiro KITA[1], Junji WATANABE[2], Satoshi UMEDA[3] ([1]Kirin Holdings, [2]Kyowa Hakko Bio, [3]Keio Univ.)

【背景・目的】高齢化が進む国内において、加齢に伴う認知機能低下や認知症は大きな社会課題となっている。認知症には十分な治療方法が開発されておらず、食事や運動など日常生活を通じた予防に注目が集まっている。我々は、牛乳や乳製品の摂取が老後の認知機能低下抑制に繋がるという久山町でのコホート研究に着目し、カマンベールチーズのアルツハイマー病予防効果を報告した(引用 1)。発酵乳製品中の認知機能改善の有効成分として Gly-Thr-Trp-Tyr テトラペプチドであるβラクトリンを見出した。βラクトリンは経口摂取後に脳へ移行し、モノアミンオキシダーゼ阻害により前頭皮質および海馬のドーパミン量を増やし、認知機能を改善することを確認している(引用 2)。さらにβラクトリンの長期摂取で、アルツハイマー病モデルの Aβ沈着抑制、認知機能低下抑制などの認知症予防効果を示すことを確認している。しかしながら、ヒトの認知機能に及ぼす影響の報告はなかった。今回、βラクトリン高含有なホエイ酵素分解物を独自に開発し、ヒトの認知機能への作用を評価した。
【方法】もの忘れやうっかりミスの多さを自覚する 50～75 歳の健常中高年 294 名より 114 名を選抜し、βラクトリンを含むホエイ酵素分解物含有錠剤の摂取群(βラクトリン群、57 名)もしくはプラセボ錠剤の摂取群(プラセボ群、57 名)に無作為に割り付け、12 週間摂取させるランダム化比較試験を実施した。注意機能は、標準注意検査法(CAT)の抹消検出課題を用いて摂取 0、6、12 週目に評価した。記憶機能は、日本語版ウェクスラー記憶検査(WMS-R)を摂取 0、12 週目に評価した。
【結果】抹消検出課題(図形)に要した時間の摂取 0 週目からの変化値が、βラクトリン群ではプラセボ群と比較して、摂取 6 週目で有意に高い数値($p = 0.024$)、12 週目でも高い数値を示した($p = 0.066$)。抹消検出課題(図形)の正答率は、βラクトリン摂取群では摂取 0 週目との群内比較で、摂取 6 週および 12 週目で有意に増加した一方、プラセボ群内での増加は認められなかった。また、抹消検出課題(か)の正答率では摂取 6 週目と 0 週目の変化値がラクトリン群でプラセボ群と比較して高い数値を示した($p = 0.091$)。これらの結果より、βラクトリン摂取は、注意集中力を要する情報処理作業における作業効率を高めることが確認された。記憶機能に関しては、WMS-R の視覚性対連合検査の摂取 12 週目と 0 週目の変化値が、βラクトリン群はプラセボ群と比較して有意に高かった($p = 0.021$)。
【結論】発酵乳製品より新たに見出されたβラクトリンの摂取は、背外側前頭前野の関わりが強い注意力および記憶力を高めることが確認された。今後、ヒトでの詳細な作用機序の解明が期待される。
【文献】引用 1 Ano et al., PLoS ONE, 2015、引用 2 Ano et al., Neurobiol. Aging, 2018

peptide, cognitive function, ß-lactolin

講演番号：3A05a12
講演日時：3 月 27 日 11:51～ センター2 号館 A05 会場

脳特異的セリン合成不全マウスにおいて惹起される Ca シグナル関連分子の脳内発現変化
Brain-specific *Phgdh* KO deletion causes altered expression of calcium-signaling molecules in the brain.

○内海 真[1]、濱野 桃子[2]、古屋 茂樹[3] ([1]九州大学大学院生資環、[2]九州大学農学研究院、[3]九州大学イノベーティブバイオアーキテクチャーセンター)
○Shin UTSUMI[1], Momoko HAMANO[2], Shigeki FURUYA[3] ([1]Grd. Sch. Bioenv. Sci, Kyushu Univ., [2]Kyushu Univ., [3]Innov. Bio-Arch., Kyushu Univ.)

【背景・目的】

ヒトにおいて非必須アミノ酸の一種である L-セリンの *de novo* 合成第 1 段階を触媒する酵素である 3-phosphoglycelate dehydrogenase (PHGDH)をコードする遺伝子に変異を持つセリン合成不全疾患は、小頭症や精神発達遅滞など通常の生活が困難な重度の中枢神経機能障害を呈す。マウスでは Phgdh 遺伝子を全組織で不活性化すると胎生 13.5 日以降に脳形態形成異常および全身における成長遅滞を伴って胎生致死に至る（Yoshida et al, 2004）。これらの全身性 KO マウスの表現型は胎生期 *de novo* L-セリン合成の必須性を実証しているが、生後以降の解析は不可能である。そこで我々は生後脳内での *de novo* L-セリン生合成の生理機能を解明するため、Phgdh を Cre-loxP システムを用い脳特異的に不活性化した BKO マウスを作製し解析を進めてきた。BKO マウスは脳内での L、D 体セリンの減少に伴い、小頭症様脳形態形成不全を引き起こす（Yang et al, 2010）。さらに各種の高次行動異常を呈す。

L-セリンは D-セリンおよびグリシンに転換される。この 2 種類のアミノ酸は NMDA 型グルタミン酸受容体の NR1 サブユニットのコアゴニストとして作用することが知られている。我々は BKO 脳において NMDA 型グルタミン酸受容体活性化よって誘導される最初期遺伝子発現が低下していることを見いだし、同受容体機能の減弱を明らかにした（Yang et al, 2010）。以上の先行研究結果を踏まえ、NMDA 型グルタミン酸受容体が Ca イオンを流入させることに着目し、BKO マウス脳での Ca イオンシグナリングに関連する因子の発現解析を行った。

【方法】

1 年齢雄性 BKO (Gfap-Cre; Phgdh flox/flox) および同腹対照群 (Phgdh flox/flox) マウス脳を採取し、Western Blotting ならびに qRT-PCR によりタンパク質および mRNA の発現を解析した。

【結果・考察】

BKO 脳の複数の領域において Ca イオン流入により活性化されるタンパク質分子 A の有意な発現低下を確認した。分子 A は神経伝達物質の放出や細胞骨格の形成、転写因子の活性制御などに関わることが知られている。以上の結果より、脳内における L-セリンの合成能低下が Ca イオンシグナルの減弱を促し、それが小頭症や高次機能障害発症を導く分子機序の一端である可能性が示唆された。今回の結果より、BKO はセリン合成不全としてだけでなく、NMDA 受容体機能不全に起因する精神疾患の病態機序解明に貢献するモデルマウスとしても有用であることが明らかとなった。

serine, brain, calcium

発表責任者：古屋　茂樹（shigekifur@brs.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3A05a13
講演日時：3 月 27 日 12:02～ センター2 号館 A05 会場

発達期におけるタンパク質栄養制限は成熟期脳内神経伝達シグナル系の発現・機能異常を惹起する
Maternal protein restriction elicits dysregulation of neuronal signal transduction system in the adult brain of F1 generation.

○北野 楽[1]、椛島 奈津美[1]、渡邊 貴美[1]、最上 侑佑盛[1]、日比 亜佑実[1]、古屋 茂樹[1,2] ([1]九州大農、[2]九大イノベイティブバイオアーキテクチャーセンター)
○Gaku KITANO[1], Natsumi KABASHIMA[1], Takami WATANABE[1], Yusei MOGAMI[1], Ayumi HIBI[1], Shigeki FURUYA[1,2] ([1]Kyushu Univ., [2]Kyushu Univ. Innovative Bio-Arch. Center)

統合失調症はうつ病と並ぶ 2 大精神疾患の一つである。これまで患者特有の遺伝子変異が複数報告されているが、未だ詳細な発症機序は解明されておらず、遺伝要因に加えて環境要因の関与が指摘されている。ヒトの疫学的研究報告より発達期の栄養飢餓が成熟期の統合失調症発症リスクを倍加させることが報告されており、さらにラットを用いた実験的研究からは、栄養素の中でもタンパク質を妊娠期及び哺乳期母体へ制限することで（対照 25%から 6%へ低下）、F1 世代成熟期の統合失調症様行動異常を引き起こすことが報告されており、発達期におけるタンパク質栄養の不足が同疾患発症に関わる環境要因の 1 つである可能性が強く示唆されている。

我々はマウスを用い、通常食（AIN-93G、カゼイン 20%含有）に対しタンパク質含量が半分である制限食（AIN-93G 準拠、カゼイン 10%、通常食と等カロリー）を妊娠・哺乳期母体に給餌し、さらに離乳以降は通常食給餌へと切り替えることで、胎児期から離乳までの発達初期においてのみタンパク質栄養が制限された F1 世代マウス（以下制限群とする）を作製して同疾患環境要因モデルとしての解析を進めている。F1 世代制限群は雌雄共に子宮内発達不全を呈し、その後発達が回復しても成熟期において統合失調症関連行動異常である感覚情報フィルター機能障害を雌性特異的に発症することを見出している。しかし、発達期のタンパク質栄養制限が上記の行動異常へ至る詳細な分子機序は不明である。

本研究では上記発達期タンパク質栄養制限により作製した環境要因モデルマウスにおいて情報処理の中枢である大脳皮質前頭前野の機能低下が生じている可能性を検討するべく、脳内神経伝達シグナル経路構成因子の発現解析を行った。その結果、神経伝達物質受容体や神経栄養因子の下流シグナル伝達経路の中心的役割を果たしているキナーゼを含む複数の神経伝達シグナル経路構成因子の性的二型性を呈す発現・活性変化を同定した。以上の結果より、発達期におけるタンパク質栄養制限は成熟期脳の神経伝達機能関わるシグナル経路に影響を及ぼすことが明らかとなり、それらが統合失調症様行動異常発症の一端となっている可能性が示唆された。

maternal protein restriction, signal transduction, brain

発表責任者：古屋茂樹（shigekifur@brs.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3A05p01
講演日時：3 月 27 日 13:50～ センター2 号館 A05 会場

食品成分抱合型代謝産物の質量分析解析法の確立

Establishment of LC/MS analysis method for conjugate metabolites of polyphenols

○中野 悠[1]、黒木 勝久[1]、リュー ミンチー[2]、水光 正仁[1]、榊原 陽一[1] ([1]宮崎大農、[2]トレド大薬)
○ Yu NAKANO[1], Katuhisa KUROGI[1], Ming-Cheh LIU[2], Masahito SUIKOH[1], Youichi SAKAKIBARA[1] ([1]Univ. of Miyazaki, [2]Univ. of Toledo)

【目的】硫酸化はホルモンや食品成分などの低分子化合物の生理活性物質の機能制御を担う重要な代謝反応である。しかし、低分子の代謝解析の主流である LC/MS において陰イオン性の強い硫酸化代謝物は殆ど対象にならない。理由の一つとして、硫酸基がついているため脱プロトン化しやすく陰イオン性が非常に強い為、positive モードでの検出が困難な点が挙げられる。その為、従来は脱抱合後に解析を行っていたが、その手法だと脱抱合効率により定量値が異なるため、ロスが多くなり定量性が担保できない問題点がある。加えて脱抱合をすると、元々の硫酸基がどこについていたかの確認が取れない点で定性解析には不向きある。そこで本研究では、抱合状態のままでの低分子化合物の代謝解析を行うことを目的に、その解析条件の検討を行った。モデル食品成分として daidzein ,equol , apigenin , genistein , resveratrol の代謝物(硫酸抱合体とグルクロン酸抱合体)を LC/MS にて解析ための前処理条件と解析条件を検討した。

【方法】サンプル前処理法について固相抽出カラムと抽出溶媒の検討を行った。固相抽出法を選択することにより、抱合状態で分離を行うための条件を検討した。固相抽出法として、逆相やイオン交換樹脂の検討を行った。食品成分抱合体を分離するため逆相 HPLC の条件検討を C18 カラムを用いて行った。最適化した条件を用いて実際に食品成分の代謝物を解析した。HepG2(ヒト肝癌由来)細胞に対してそれぞれの食品成分を添加し、経過時間と濃度ごとに回収を行いサンプル調整後、LC/MS で代謝物の解析を行った。

【結果及び考察】固相抽出法においてはサンプル前処理製品として高親水性逆相水湿潤性ポリマー担体の「Oasis PRiME HLB」を用いると最も効率良くサンプル調整が行えることが確認できた。HPLC の条件は有機溶媒にメタノールを用いて 30～70%のグラジエントが最も適していることがわかった。次に、それぞれの食品成分抱合体の検出限界値と定量限界値を Orbitrap 型質量分析計(Q-Exactive)を用いて決定した。HepG2 細胞における代謝は現在解析中である。本研究ではポリフェノール型の食品成分抱合体を対象として代謝物解析の条件を検討したが、今後は食品成分のみならず硫酸化が機能制御を行なっているステロイドホルモンなどに対しても同様にアプローチし、分析の条件の最適化を行なっていきたい。

LC/MS, conjugate metabolites, polyphenols

発表責任者：中野　悠（gc16026@student.miyazaki-u.ac.jp）

講演番号：3A05p02
講演日時：3 月 27 日 14:01～ センター2 号館 A05 会場

ラット門脈ならびに回腸部腸間膜静脈における食後のグルコース濃度と消化管ホルモン濃度の変動
Changes in postprandial glucose and gastrointestinal hormone concentrations in rat portal vein and ileal mesenteric vein

○蒲地 美南[1]、原 博[2]、比良 徹[1] ([1]北海道大農、[2]藤女子大)
○Minami KAMACHI[1], Hiroshi HARA[2], Toru HIRA[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Fujijyoshi Univ.)

＜背景＞食後に消化を受けた糖質から遊離したグルコースは、主に小腸上部で吸収され、GLP-1 や PYY などの消化管ホルモンは下部小腸から分泌されると考えられている。これらは管腔内からのグルコースの消失や腸管組織を用いた in situ、ex vivo 試験に基づいている。しかし、食後や覚醒下といった生理的条件下において消化管部位別の栄養素吸収や消化管ホルモン分泌を観察した例はない。本研究では、門脈または回腸部腸間膜静脈にカテーテルを留置したラットを用い、より生理的な条件下で上部消化管・下部消化管における栄養素の吸収やホルモン分泌の違いを調べた。
＜方法＞7 週齢の SD 系雄性ラットを AIN-93G 準拠標準飼料にて馴化後、外科手術によって門脈または回腸部腸間膜静脈へカテーテルを留置した。その後 3 日間の回復期間を経て食事負荷試験を実施した。AIN-93G 準拠標準飼料のタンパク源を 25%とした飼料をコントロール食、AIN-93G 準拠標準飼料のタンパク源をデキストリンに置換した飼料を無タンパク食とした。試験前日より絶食させ、3 g/kg 体重にて試験食を経口投与し、門脈ならびに回腸部腸間膜静脈より覚醒下・無拘束で経時的に採血し、血漿中のグルコース濃度、GLP-1 濃度を測定した。
＜結果と考察＞【血漿中グルコース濃度】試験食に関わらず、門脈では投与 15 分後ピークに達した後、徐々に低下して基礎レベルに近づく応答を示した。対して回腸部腸間膜静脈ではピークに達した後に急激に値が低下し、門脈血よりも低い値を維持した。このような部位間の違いは、上部小腸でグルコースの吸収が盛んであることを示すものと考えられる。また採血部位に関わらず、無タンパク食投与の方がコントロール食投与よりも高い値で推移し、食事中の糖源の含有量が吸収に反映したと考えられる。【血漿 GLP-1 濃度】無タンパク食を投与すると、採血部位に関わらずピーク値がコントロール食投与よりも高くなる傾向が見られ、食事の糖質含量を反映した。また同じ試験食を投与した群において、採血部位による分泌の差が見られなかったことから消化管下部からの GLP-1 分泌が反映されていると考えられた。
これらの結果より、本モデルラットは、食後の栄養素吸収や消化管ホルモン分泌を生理的条件下で観察することを可能とし、今後様々な食品成分の吸収や消化管ホルモン分泌作用を消化管部位別に明らかにできるものと考えられた。

Postprandial blood glucose level, GLP-1, Glucose absorption

講演番号：3A05p03
講演日時：3 月 27 日 14:12～ センター2 号館 A05 会場

魚油乳化物摂取はリンパ脂質輸送を促進させる
Intake of emulsified fish oil promotes lymphatic lipid transport

○中山 恵理子[1]、武山 藍[1]、城内 文吾[2]、加藤 綾華[3]、柳本 賢一[3]、佐藤 匡央[2]（[1]九大院生資環、[2]九大院農、[3]日水食機研）
○ Eriko NAKAYAMA[1], Ai TAKEYAMA[1], Bungo SHIROUCHI[2], Ayaka KATO[3], Kenichi YANAGIMOTO[3], Masao SATO[2] ([1]Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu Univ., [2]Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Graduate School, Kyushu Univ., [3]Functional Ingredient Research Section Food Function R&D Center, Nippon Suisan Kaisha, Ltd.）

【緒言】
脂質は胃内で撹拌され粗エマルションを形成し、胆汁中のリン脂質やコレステロール（Chol）により乳化された後、小腸上皮細胞に吸収される。また、脂肪酸の一種である n-3 系多価不飽和脂肪酸（n-3 PUFAs）は魚油中に多く含まれ、様々な疾患予防作用を有することが知られている。したがって、事前に乳化した魚油の摂取により、n-3 PUFAs の生物学的利用能の向上が期待される。本研究では、胸管リンパカニュレーション手術を施したラットを用いて、脂質の事前乳化がリンパ脂質輸送および脂質消化に与える影響を評価した。

【方法】
9 週齢雄性 Sprague-Dawley 系ラットに胸管リンパカニュレーション手術を施した。術後 3 日目、魚油（Control 群）または、魚油乳化物（Emulsified oil 群）を経口投与し、7 時間経時的にリンパ液を採取した。採取したリンパ液中脂質輸送量を測定した。また、同様の投与後 2 時間目に大動脈採血により屠殺を行い、胃内容物および小腸内容物を採取した。これらの脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィーで分画した後、グリセロ脂質を定量した。

【結果および考察】
Emulsified oil 群は、リンパ流量およびリンパ液中の脂質［トリアシルグリセロール（TAG）、ホスファチジルコリン（PC）、Chol および n-3 PUFAs ］輸送量が有意に増加した。よって、事前乳化した魚油の摂取は、リンパ液中への脂質輸送を促進し、n-3 PUFAs 吸収率を上昇させることが示された。また、Emulsified oil 群の小腸内容物中モノアシルグリセロールの割合が有意に増加したことから、事前乳化した魚油の摂取は TAG の消化を促進することが示された。Emulsified oil 群は胃内容物の脂質量が多く、小腸内容物の脂質量が少なかったことから、胃から小腸への脂質移行速度が遅延していることが示唆された。さらに Emulsified oil 群において小腸内容物総脂質に対する胆汁由来 PC および Chol の割合が有意に高値を示した。以上の結果から、事前乳化した魚油の摂取によって胃排出が調節され、小腸において胆汁が消化・吸収しやすい脂質の割合が保たれることで消化速度が上昇し、脂質輸送が促進されたことが示唆された。

n-3 polyunsaturated fatty acids, emulsion, lymph

講演番号：3A05p04
講演日時：3 月 27 日 14:23～ センター2 号館 A05 会場

ヒマワリの脱脂種子の活用を目指した生体調節機能の探索

Screening of biofunction for utilization of defatted sunflower seeds

○佐藤 咲希[1]、川添 華菜[2]、南 雄二[1,2]、加治屋 勝子[1,2]([1]鹿児島大学農学部食料生命科学科、[2]鹿児島大学大学院農林水産学研究科)
○ Saki SATO[1], Haruna KAWASOE[2], Yuji MINAMI[1,2], Katsuko KAJIYA[1,2] ([1]Faculty of Agriculture, Kagoshima University, [2]Graduate School of Agriculture, Forestry and Fisheries, Kagoshima University)

【目的】

鹿児島県志布志市では、家庭から出る生ごみを発酵させて約４～５ヶ月かけて完熟堆肥を作り、これを利用して栽培したヒマワリを観賞資源として活用した後に、収穫したヒマワリ種子を乾燥・脱粒して油を搾って食用油や化粧品材料として環境循環させている。ヒマワリオイルを精製する過程では大量の搾油粕が副産物として生産され、一部は肥料として使用されているが、多くの脱脂種子は廃棄されることが多く、廃棄にかかるコストや保管場所が問題となっている。そこで、脱脂種子の食品としての利用を期待し、本研究では、搾油後に残る脱脂種子の特性解析ならびに生体調節機能の探索をおこなった。

【方法】

ヒマワリ種子から圧搾法にて搾油し、脱脂種子の回収率を求めた。脱脂種子を乾燥・粉砕後、50%エタノールを用いて抽出液を調製した。まず、ヒマワリの脱脂種子の基本的性質を把握するために、タンパク質含量の指標となる窒素含量を燃焼法にて、アミノ酸含量を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)ならびにアミノ酸自動分析法にて測定した。また、ナタネやゴマの脱脂種子を比較対象として、抗酸化活性試験およびアンジオテンシン変換酵素阻害活性試験を行った。これらの活性成分を探索するため、HPLC や固相抽出法を用いた分画・精製を行い、活性成分の同定をおこなった。

【結果と考察】

ヒマワリ種子は、オイルとして利用できるのは全体の 15%にも満たず、残りの 80%が脱脂種子、それ以外は加工ロスであった。これは、種子全体に占める廃棄の多さを証明している。ヒマワリ脱脂種子の生体調節機能を調べたところ、他の脱脂種子と比較して抗酸化活性が高く、過去３年間の収穫時期による差は見られなかった。また、アンジオテンシン変換酵素阻害活性も高いことが明らかになった。アンジオテンシン変換酵素は、昇圧物質であるアンジオテンシンⅡを産生し高血圧を誘発するため、ヒマワリの脱脂種子は血圧調節に関与している可能性が示唆された。すなわち、ヒマワリの脱脂種子による高血圧をはじめとした生活習慣病の予防が期待できる。

本研究では、ヒマワリの脱脂種子の再資源化により、産業廃棄物の低減につながるだけではなく、機能性素材としての新しい分野での産業創生にも期待できる可能性があることを見出せた。

sunflower seed, angiotensin converting enzyme inhibiting activity, antioxidative activity

発表責任者：加治屋　勝子（kajiya@chem.agri.kagoshima-u.ac.jp）

講演番号：3A05p05
講演日時：3 月 27 日 14:34～ センター2 号館 A05 会場

ヒマワリオイルの特性解析と血流改善効果

Characteristic analysis and blood flow improvement effect of sunflower oil

○川添 華菜[1]、佐藤 咲希[2]、南 雄二[1,2]、加治屋 勝子[1,2] ([1]鹿大院農、[2]鹿大農)
○Haruna KAWASOE[1], Saki SATO[2], Yuji MINAMI[1,2], Katsuko KAJIYA[1,2] ([1]Kagoshima Grad.Sch., [2]Kagoshima Univ.)

【背景・目的】現在、日本人口の 7 割以上が冷え性をかかえており、特に女性は 8 割以上が冷え性や冷えが原因で起こる様々な症状に悩まされている。冷え性は血流量の低下で冷たさを感じるものであり、血液の質の低下や運動不足による筋力の低下などが主な原因である。冷えは、むくみや便秘だけでなく、重篤な疾患の原因にもなり得るため侮れない。我々の先行研究において、ヒマワリオイルを皮膚に塗布することで血流改善効果を示すことをレーザードップラー血流計(LDF)にて明らかにした。しかしながら、LDF を用いた測定には様々な年齢・性別の被験者を確保する必要があり、血流改善に寄与するヒマワリオイルの活性成分を同定するにあたり、この方法を血流改善の評価として恒常的に利用することは困難である。そこで、新たな評価方法を用いてヒマワリオイルが示す血流改善効果の中心的な活性成分の探索をおこなうと共に、ヒマワリオイルの特性を解析した。

【方法と結果】高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いたニトロフェニルヒドラジン誘導体化による脂肪酸組成を調べたところ、オレイン酸を多く含んでいた。また、HPLC(蛍光検出)によるα-トコフェロール(VE)量を定量したところ、ヒマワリオイルはナタネオイル等に比べて VE 量が多く、種子の処理による VE 量への影響はないことが明らかとなった。さらに、血流に大きな影響を与える血液(全血、血漿、血球)の粘度測定をおこなった。全血の粘度は電磁スピニング粘度計を用いて測定し、0.1%(v/v)濃度のヒマワリオイル添加群においてコントロールよりも有意に粘度低下した。次に、血液中のどの成分に作用しているのか明らかにするため、血漿と血球に分けて評価した。血漿粘度の評価には細管式粘度計(キャノン・フェンスケ逆流計)を用いた。多くの植物オイルは血漿粘度を増加させることが報告されているが、ヒマワリオイルは血漿粘度に影響を与えなかった。血球粘度は、毛細血管を通過する際の赤血球膜弾性を測定することにより評価し、原子間力顕微鏡(AFM)を用いて血球中心部におけるカンチレバーのたわみとプローブの変位を測定することで、膜弾性をヤング率として求めた。

【考察】本研究により、ヒマワリ種子の処理により脂肪酸量や VE 量には影響を与えないことを明らかにした。また、ヒマワリオイルの血流改善効果は血液粘度の低下によることが示唆された。

fatty acid, Sunflower oil, blood flow improvement

発表責任者：加治屋勝子（kajiya@chem.agri.kagoshima-u.ac.jp）

講演番号：3A05p06
講演日時：3 月 27 日 14:45～ センター2 号館 A05 会場

桜島大根による血管機能改善効果および活性成分トリゴネリンの解析
Improvement effect of vascular endothelial function by *Raphanus sativus* cv. Sakurajima Daikon and analysis of active ingredient “Trigonelline”
○佐々木 真歩[1]、加治屋 崇[2]、南 雄二[1]、加治屋 勝子[1]([1]鹿児島大農食料生命、[2]天陽会中央病院)
○Maho Sasaki[1], Takashi Kajiya[2], Yuji Minami[1], Katsuko Kajiya[1] ([1]Fuculty of Agriculture, Kagoshima University., [2]Tenyoukai Central Hospital.)

【目的】
血管の最も内側に存在する血管内皮細胞からは一酸化窒素が放出され、血管の収縮・弛緩の調節や血栓形成の防御など、血管機能保持を担っている。しかし、加齢や酸化ストレスにより血管内皮細胞が傷害されNO 産生が抑制されると、動脈硬化を始めとした血管関連疾患が引き起こされる。これまでに、約 300 種類の農産物の中から、血管内皮機能改善作用がある「桜島大根」を見出し、その活性成分がトリゴネリンであることを明らかにした。本研究では、トリゴネリンについての詳細解析及び臨床試験について報告する。
【方法】
(1)トリゴネリンの詳細解析：高速液体クロマトグラフィーを用いて、桜島大根をはじめとした 14 種のダイコン類の成長過程におけるトリゴネリン量を測定し、加えて、トリゴネリンの調理・加工処理における影響についても調べた。
(2)臨床試験：14 名の被験者(健常ボランティア、男性 7 名、女性 7 名、平均年齢 33.9±6.7 歳)に、桜島大根 170g/日(トリゴネリン換算 61.2mg)を 10 日間摂取してもらった。臨床試験期間中の運動や飲酒は制限せず、通常の生活を送ってもらった。桜島大根の摂取前と 10 日間摂取した後に、採血(一般生化学検査及び血中トリゴネリン量)、血管内皮機能(Flow-mediated dilation; FMD) 及び脈波伝播速度(brachial-ankle pulse wave velocity; baPWV)を測定して比較した。なお、170g の桜島大根は、1 回で摂取しても数回に分けても良いこととし、調理法についても限定しなかった。
【結果】
調理・加工処理による影響を調べたところ、生の桜島大根に含まれるトリゴネリン量に対して、茹で、揚げ、レトルト加工、急速冷凍等においてもほとんど影響を受けず、安定性が高いことを明らかにした。また臨床試験においては、桜島大根摂取前には血中トリゴネリンが検出されなかったが、10 日間摂取後は有意に血中濃度が上昇していた。また、血管内皮機能(%FMD、正常値6%以上)は、摂取前6.7±1.6%が摂取後9.4±1.9%に有意に増加した。また、動脈硬化を示すbaPWV(正常値1,400cm/s未満)も、摂取前1184.4±201.4cm/sから摂取後1179.8±197.8cm/sに変化したが、有意差は見られなかった。
【考察】
本研究では、トリゴネリンの高い安定性を実証し、桜島大根の調理の幅を拡げると共に、新しい加工食品の創出に繋がった。さらに、臨床試験により、ヒトが桜島大根を摂取することによって、実際に血管内皮機能を改善できることを世界で初めて証明した。

Sakurajima Daikon, Trigonelline, vascular endothelial function

発表責任者：加治屋　勝子（kajiya@chem.agri.kagoshima-u.ac.jp）

講演番号：3A05p07
講演日時：3 月 27 日 15:06～ センター2 号館 A05 会場

血管異常収縮に対するマルベリー由来成分の機能的作用

Functional effects of components from mulberry on vasospasm.

○鶴留 奈津子[1]、東 かなた[2]、南 雄二[1,2]、加治屋 勝子[1,2] ([1]鹿児島大院農、[2]鹿児島大農)
○Natsuko TSURUDOME[1], Kanata HIGASHI[2], Yuji MINAMI[1,2], Katsuko KAJIYA[1,2] ([1]Kagoshima Grad. Sch., [2]Kagoshima Univ.)

【目的】血管病は，心疾患や脳血管疾患のような血管が直接関係している病気の総称で，長年，日本人の死因の約 3 割を占めてきた．その原因は，「動脈硬化」と「異常収縮」とで約 7 割を占め，残る「出血・炎症等」も合わせ 3 つに大別されるが，昨今，世界的に「異常収縮」の増加が危機的である．異常収縮は，老若男女問わず誰もが発症するリスクの高い身近な病であるが，明確な予防法や治療法，薬の開発が遅れているため，致死率が高い．たとえ救命できたとしても後遺症や長い通院生活により医療費の増大が社会的な課題となっている. そこで異常収縮を予防することが出来れば，人々の健康増進に大きく貢献できると考え，異常収縮を予防可能な天然物を探索してきた．その結果，約 200 種類の天然物の中からマルベリーの異常収縮抑制・予防効果を見出した．既にマルベリーの生体調節機能については多数の報告があるが，血管への機能的作用を発揮する活性成分や分子メカニズムについては未解明である. そこで本研究では，マルベリーの特性解析と異常収縮への機能的作用について解明することを目的とした.

【方法】マルベリーは, 葉や果実などの各部位を加工方法や樹齢により細分化し, それぞれエタノール抽出により評価試料を得た．特性解析のため，抗酸化活性や総ポリフェノール量を測定し，高速液体クロマトグラフィーを用いたカテキン類やカフェインの定量等も実施した. 異常収縮への機能的作用は, テトラゾリウム塩法により, 正常ヒト冠状動脈平滑筋細胞に対する至適濃度を決定した．次に異常収縮に対する抑制・予防作用を調べるため，血管収縮剤で異常収縮を誘発し，マルベリーの影響を蛍光顕微鏡にて観察した．さらに，異常収縮を抑制・予防した活性成分を同定するためゲルろ過クロマトグラフィーや固相抽出により分画・精製し，質量分析計にて絞り込んだ.

【結果】マルベリーは抗酸化活性を示し，特に老木(樹齢 20 年以上)のマルベリーリーフが最も高かった．総ポリフェノール類も老木に最も多く含まれていたが，カテキン類を含んでいないことから抗酸化活性を示す主要成分はその他のポリフェノール類である可能性が示唆された. 次に異常収縮に対する抑制及び予防作用の検討結果, 老木のマルベリーリーフが最も高い効果を示したことから，活性成分の同定を試みた．なお，血管の異常収縮に対する予防効果は持続性を示さなかったことから，異常収縮を予防するためには，常に活性成分の存在が必要であることを明らかにした.

Mulberry leaf, Vasospasm

発表責任者：加治屋勝子（kajiya@chem.agri.kagoshima-u.ac.jp）

講演番号：3A05p08
講演日時：3 月 27 日 15:17～ センター2 号館 A05 会場

ガーリック由来有機硫黄化合物が tissue factor ならびにプラーク形成に及ぼす影響
The effect of garlic-derived organosulfur compound on tissue factor and plaque formation
○奥江 紗知子[1]、矢口 真実[1]、三浦 徳[2]、増澤（尾﨑）依[2]、細野 崇[1,2]、関 泰一郎[1,2]（[1]日大院 生資科 応生科、[2]日大 生資科 生命化）
○Sachiko OKUE[1], Manami YAGUCHI[1], Atsushi MIURA[2], Yori OZAKI-MASUZAWA[2], Takashi HOSONO[1,2], Taiichiro SEKI[1,2] ([1]Dept. of Appl. Life Sci., Nihon Univ. Grad. Sch. of Bioresource Sci., Japan, [2]Dept. of Chem. and Life Sci., Coll. of Bioresource Sci., Nihon Univ., Japan)

【目的】虚血性心疾患および脳血管疾患などの血栓性疾患による死亡者数は、わが国の死亡原因の第一位であるがんに匹敵する。アテローム性動脈硬化を基盤とした血栓性疾患の発症には、外因系凝固因子である Tissue Factor（TF）が関与する。したがって、TF 発現やその活性化の抑制は、重篤な血管合併症の予防につながる。我々はガーリック由来有機硫黄化合物 diallyl trisulfide（DATS）が、血小板凝集を抑制することを明らかにしてきたが、DATS が TF により惹起される血液凝固に及ぼす影響は不明である。本研究では、DATS が TF の活性および発現に及ぼす影響を *in vitro* 実験系で検討した。さらに、DATS が血管におけるプラーク形成に及ぼす影響について動脈硬化モデルマウスを用いて明らかにしようとした。
【方法】ヒト急性前骨髄球性白血病細胞 HL60 に phorbol 12-myristate 13-acetate を添加培養して TF の発現を誘導後、$HgCl_2$ を添加して TF を活性化した。活性化 TF を発現した細胞の懸濁液に、DATS あるいは vehicle として DMSO を処理後、血漿を添加してフィブリンクロット形成時間を測定した。次に、DATS が血管内皮細胞の TF 発現に及ぼす影響についてヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC を用いて検討した。HUVEC に種々の濃度の DATS を添加して 30 分培養後、TNFα を添加して TF 発現を誘導した。TF mRNA 発現は real-time PCR により測定し、TF タンパク質の発現および JNK のリン酸化は western blotting により解析した。さらに、ApoE ノックアウトマウス（ApoE KO, 6 週齢、雄性）に通常食（CRF-1; オリエンタル酵母）を給餌し、DATS（75 μmol/kg b.w.）あるいは vehicle を 2 日に 1 回腹腔内投与する DATS 群と control 群に群分けした。18 週齢時に解剖し、心臓の三尖弁の薄切標本を作製して H&E 染色ならびに oil red O 染色を行い、プラークの大きさや脂質蓄積について評価した。
【結果】DATS は、TF により惹起されるフィブリンクロット形成時間を濃度依存的に有意に抑制した。また、HUVEC における TF mRNA 発現およびタンパク質発現は TNFα 刺激 2-4 時間後に増加したが、この増加は DATS により有意に抑制された。さらに、TNFα による TF 発現誘導シグナルである JNK のリン酸化も DATS により抑制された。ApoE KO の三尖弁におけるプラークの大きさや脂質の蓄積量は control 群と比較して DATS 群で減少する傾向を示した。
【結論】DATS は血小板凝集の抑制に加えて、プラークの形成を予防するとともに TF の発現および活性化を抑制することで抗血栓作用を示す可能性が明らかになった。

garlic, organosulfur compound, anti-thrombotic activity

発表責任者：関 泰一郎（seki.taiichirou@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3A05p09
講演日時：3 月 27 日 15:28～ センター2 号館 A05 会場

ナス粉末の継続摂取は血圧高めのストレス被験者の血圧を改善する
Continuous intake of eggplant powder improved blood pressure in stressed individuals with higher blood pressure

○中村 浩蔵[1]、鈴木 美穂[1]、高橋 伶仁[1]、山口 翔平[1]、椿 和文[2]、藤田 智之[1]、西村 三恵[3]、西平 順[3] ([1]信州大農、[2]株式会社 ADEKA、[3]北海道情報大学)
○Kozo NAKAMURA[1], Miho SUZUKI[1], Ryuto TAKAHASHI[1], Shohei YAMAGUCHI[1], Kazufumi TSUBAKI[2], Tomoyuki FUJITA[1], Mie NISHIMURA[3], Jun NISHIHIRA[3] ([1]Shinshu Univ., [2]ADEKA Co., Ltd., [3]Hokkaido Information Univ.)

【背景・目的】我々は高血圧自然発症ラット（SHR）を用いた研究により、乳酸発酵食品に含まれるアセチルコリン(ACh)が経口摂取により抗高血圧作用を示すことを発見した。その後、ナス（*Solanum melongena*）には他の栽培作物より 1000 倍以上の ACh が含まれることを明らかにし、ナス摂取が SHR において降圧作用を示すことを報告した[1]。ナスは栄養価に乏しい野菜と考えられてきたが、ナス由来コリンエステル（ACh）を新規な食品機能性成分とする機能性野菜として利用できる可能性がある。そこで、ヒトにおけるナスの食品機能性を実証すべく、ナス由来コリンエステルを含むナス粉末の食品機能性をプラセボ対照ランダム化二重盲検並行群間比較試験により評価した。本発表ではナスの血圧改善効果について報告する。
【方法】ストレスを感じている正常高値血圧者および I 度高血圧者に該当する 35 歳以上 65 歳未満の日本人男女 100 名を被験群（50 名）およびプラセボ群（50 名）にランダムに割り付けた。被験群には被験食品としてナス由来コリンエステル 2.3 mg/人・日を含むナス粉末（生鮮ナス 22g 相当）含有カプセルを、プラセボ群にはデキストリン含有カプセルを 12 週間毎日摂取させた。主要評価項目として来所時血圧を、副次評価項目として家庭血圧（起床時、就寝時）を、摂取開始日および摂取開始 4、8、12、16 週後に測定した。試験結果に対して、全被験者および血圧分類によるサブグループ解析を実施し、有効性を評価した。
【結果】ナス粉末摂取により以下の血圧改善効果が認められた[2]：全被験者における来所時拡張期血圧（8 週後）、来所時収縮期血圧（12 週後）、家庭起床時収縮期および拡張期血圧（4 週後）の有意な低下；正常高値血圧者における来所時拡張期血圧（4 週後）、家庭起床時収縮期および拡張期血圧（4 週後）、家庭就寝時拡張期血圧（4,8 週後）の有意な低下；I 度高血圧者における来所時収縮期および拡張期血圧（12 週後）の有意な低下。摂取期間中に試験食由来の副作用や有害事象は認められなかった。本結果により、ナス由来コリンエステルを関与成分とするナスの摂取が、安全かつ有効に高めの血圧を改善することが実証された。ヒトにおけるナスの食品機能性をプラセボ対照群間比較試験で明らかにしたのは世界で初めての事例である。本研究は農研機構生研支援センター「革新的技術開発・緊急 展開事業（うち経営体強化プロジェクト）」の支援を受けて実施した。

[1] Yamaguchi, S., et al. (2019) *Food Chem.* 276, 376-382.
[2] Nishimura, M., et al, (2019) *Nutrients*, 11, 2797.

acetylcholine, eggplant, blood pressure

発表責任者：中村浩蔵（knakamu@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3A05p10
講演日時：3 月 27 日 15:39～ センター2 号館 A05 会場

ナス粉末の継続摂取は血圧高めのストレス被験者の心理状態を改善する
Continuous intake of eggplant powder improved psychological state in stressed individuals with higher blood pressure

○山口 翔平[1]、高橋 伶仁[1]、鈴木 美穂[1]、椿 和文[2]、藤田 智之[1]、西村 三恵[3]、西平 順[3]、中村 浩蔵[1]([1]信州大農、[2]株式会社 ADEKA、[3]北海道情報大学)
○Shohei YAMAGUCHI[1], Ryuto TAKAHASHI[1], Miho SUZUKI[1], Kazufumi TSUBAKI[2], Tomoyuki FUJITA[1], Mie NISHIMURA[3], Jun NISHIHIRA[3], Kozo NAKAMURA[1] ([1]Shinshu Univ., [2]ADEKA Co., Ltd., [3]Hokkaido Information Univ.)

【背景・目的】我々はナス（*Solanum melongena*）の経口摂取が、高血圧自然発症ラットの交感神経活動の指標である尿中カテコールアミン排泄量と血圧を低下させ、その有効成分がアセチルコリン(ACh)であることを報告した[1]。経口摂取 ACh は、消化管上 M3 ムスカリン性 ACh 受容体に作用し、副交感神経活動を亢進させ、全身の交感神経活動を低下させると推定された。交感神経活動の抑制は、精神的なストレスや気分状態を緩和させると考えられる。そこで、プラセボ対照二重盲検並行群間比較試験により、ヒトにおけるナス由来コリンエステルを含むナス粉末の食品機能性の評価を実施した。本発表ではナスの心理状態改善効果について報告する。
【方法】ストレスを感じている正常高値血圧者および I 度高血圧者に該当する 35 歳以上 65 歳未満の日本人男女 100 名を被験群（50 名）およびプラセボ群（50 名）にランダムに割り付けた。被験群には被験食品としてナス由来コリンエステル 2.3 mg/人・日を含むナス粉末（生鮮ナス 22g 相当）含有カプセルを、プラセボ群にはデキストリン含有カプセルを 12 週間毎日摂取させた。摂取開始日および摂取 4、8、12、16 週後に気分プロフィール検査を行った。気分プロフィール検査には POMS-2 成人用全項目版を使用し、ネガティブな心理状態として「怒り―敵意」、「混乱―当惑」、「抑うつ―落込み」、「疲労―無気力」、「緊張―不安」、ポジティブな心理状態として「活気―活力」、「友好」、ネガティブな気分状態の総合指標である「TMD」について評価した。試験結果の全被験者解析および血圧分類によるサブグループ解析により有効性を評価した。
【結果】ナス粉末の継続摂取により以下の心理状態改善効果が認められた[2]：全被験者における「混乱―当惑」（8 週後）の有意な低下；正常高値血圧者における「抑うつ―落込」（8 週後）、「混乱―当惑」、「怒り―敵意」および「TMD」の有意な低下（12 週後）；I 度高血圧者における「活気―活力」（4 週後）および「友好」（8 週後）の有意な増加。本結果によりナスの日常摂取がヒトに対してネガティブな心理状態を改善し、ポジティブな心理状態を向上させ、ナスの心理状態改善への有効性が明らかになった。本試験では血圧改善効果も認められ、ナス由来コリンエステルを含むナス摂取の血圧および心理状態改善のヘルスケアへの利用が期待される。本研究は農研機構生研支援センター「革新的技術開発・緊急 展開事業（うち経営体強化プロジェクト)」の支援を受けて実施した。

[1] Yamaguchi, S., et al. (2019) *Food Chem.* 276, 376-382.
[2] Nishimura, M., et al, (2019) *Nutrients*, 11, 2797.

acetylcholine, eggplant, psychological state

発表責任者：中村浩蔵（knakamu@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3A05p11
講演日時：3 月 27 日 15:50～ センター2 号館 A05 会場

ナス加工食品の継続摂取による血圧、心理状態改善作用
Continuous intake of processed eggplant food improved blood pressure and psychological state.
○鈴木 美穂[1]、高橋 伶仁[1]、山口 翔平[1]、猪野 亜矢[2]、髙田 梨沙[3]、冨田 邦彦[4]、髙木 智矢[4]、藤田 智之[1]、西村 三恵[5]、西平 順[5]、中村 浩蔵[1] ([1]信州大農、[2]高知県農業技術センター、[3]株式会社サラダコスモ、[4]三井食品工業株式会社、[5]北海道情報大学)
○Miho SUZUKI[1], Ryuto TAKAHASHI[1], Shohei YAMAGUCHI[1], Aya INO[2], Risa TAKADA[3], Kunihiko TOMITA[4], Tomoya TAKAGI[4], Tomoyuki FUJITA[1], Mie NISHIMURA[5], Jun NISHIHIRA[5], Kozo NAKAMURA[1] ([1]Shinshu Univ., [2]Kochi Prefectural Agricultural Technology Center, [3]Salad Cosmo Co., Ltd., [4]MITSUI SHOKUHIN KOGYO Co., Ltd., [5]Hokkaido Information University)

【背景・目的】昨年度行われた、ストレスを感じている血圧が高めの被験者に対するプラセボ対照ランダム化二重盲検並行群間比較試験（プラセボ対照 RCT）において、ナス粉末（ナス由来コリンエステル（アセチルコリン）用量 2.3 mg/日・人）の 12 週間の継続摂取により来所持血圧、家庭血圧、心理状態の有意な改善が見られ[1]、世界で初めてナスの食品機能性をプラセボ対照 RCT で明らかにするとともに、ナス由来コリンエステルが新規な食品機能性成分であることを示した。本試験では、一般食品形態のナス加工食品（浅漬けナス）の継続摂取による血圧改善作用をプラセボ対照 RCT により検証した。
【方法】来所持血圧が正常高値血圧または I 度高血圧で、日頃からストレスを感じている 35 歳以上 65 歳未満の男女 50 名を被験群（25 名）とプラセボ群（25 名）に分け、被験群には被験食品（ナス由来コリンエステル 2.87±5.7 mg/日・人)、プラセボ群にはプラセボ食品（ナス由来コリンエステル 0.06 mg/日・人）を 1 日 1 回 8 週間継続摂取させた。被験食品は、生鮮ナスの可食部（40 g）を、一夜下漬けした後、調味液（25 mL）を加えて真空パックしたものをブランチング（90℃、15 分）して調製した。プラセボ食品は、ナス由来コリンエステルを低減させたナスを用いて、被験食品と同様に調製した。試験食摂取開始日、摂取 4 週後及び 8 週後に主要評価項目として来所持血圧測定を行い、副次評価項目として家庭血圧、脈拍数、ストレスに関する VAS アンケート、POMS-2 成人用全項目版、食物摂取頻度調査を行った。
【結果】摂取 8 週後に、被験群の就寝時収縮期家庭血圧、起床時収縮期家庭血圧の有意な低下を確認した。また、POMS-2 による心理状態評価では、被験群で「怒り-敵意」(8 週後)、「当惑-混乱」(4、8 週後)、ネガティブな気分状態を総合的に表す「TMD」(8 週後）の有意な低下を確認し、一般食品形態ナス加工食品の継続摂取による血圧、心理状態の改善が示され、ナス粉末継続摂取の効果が再現された。本研究は農研機構生研支援センター「革新的技術開発・緊急 展開事業（うち経営体強化プロジェクト)」の支援を受けて実施した。

[1] Nishimura, M., et al, (2019) *Nutrients*, 11, 2797.

processed eggplant food, blood pressure, psychological state

発表責任者：中村浩蔵（knakamu@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3A05p12
講演日時：3 月 27 日 16:01～ センター2 号館 A05 会場

in situ マウス脳灌流法による血液脳関門透過性ジペプチドの探索と脳蓄積部位の解明
Elucidation of blood-brain barrier transportable dipeptides by *in situ* mouse perfusion

○芳野 温子[1]、清原 隼人[1]、駒林 玄軌[1]、道具 伸也[2]、高田 芙友子[2]、韮澤 崇[3]、田中 充[1]、松井 利郎[1] ([1]九大院農、[2]福大薬、[3]Bruker Japan)
○Atsuko Yoshino[1], Hayato Kiyohara[1], Genki Komabayashi[1], Shinya Dohgu[2], Fuyuko Takata[2], Takashi Nirasawa[3], Mitsuru Tanaka[1], Toshiro Matsui[1] ([1]Kyushu Univ., [2]Fukuoka Univ., [3]Bruker Japan)

【目的】

低分子ペプチドがそのままの形で血液脳関門 Blood-Brain Barrier（BBB）を透過し、脳移行することを実証した先行研究は皆無である。本研究では、*in situ* マウス脳灌流試験により BBB 透過可能なペプチド体を明らかにするとともに、脳実質への移行および脳局在部位の解明を試みた。

【方法および結果】

in situ マウス脳灌流試験は、下大動脈および下大静脈を結紮した雄性 ICR マウス（7–9 wk）の左心室より被験ペプチド溶液（0.2 mM）を脳内へ灌流（2 mL/min、0.5, 1.0, 1.5, 2.0 min）させることで実施した。摘出した脳組織は LC-TOF/MS 分析に供し、脳移行クリアランス値 (K_i：μL/g-brain·min)で脳移行性を評価した。本研究では、ペプチドトランスポーター（PHT1）を介した *in vitro* における脳切片への取り込みが報告されている Gly-Sar を鋳型ペプチド、FITC-albumin をネガティブコントロールとした。まず、BBB 透過ペプチドの探索のため、Gly-Sar を基本骨格として 13 種類のジペプチドを合成し、脳灌流試験を実施した。その結果、Gly-Pro（*Ki* =3.53±0.66 μL/g-brain·min）の脳移行クリアランス値は FITC-albumin と比較して有意に高値を示し、BBB を透過していることが示された。そこで、Gly-Sar および Gly-Pro の構造に共通するイミノ基に着目し、Pro 含有ジペプチドを同様に灌流試験に供したところ、Tyr-Pro（*Ki* =3.49±0.66 μL/g-brain·min）が BBB を透過していることが示された。一方、逆配列である Pro-Tyr は脳移行性を示さなかった。さらに、Gly-Sar あるいは Tyr-Pro 灌流後の脳実質画分を分離・獲得し、LC-TOF/MS 分析に供したところ、両ペプチドの存在が確認されたことから、両ペプチドは、BBB を透過し脳実質へ移行していることが初めて実証された。

次いで、Tyr-Pro 灌流後の脳組織より凍結切片を作製し、MALDI-MS/MS imaging 分析に供した。その結果、Tyr-Pro は海馬、視床下部、線条体、大脳皮質ならびに小脳周辺部位に局在していることが初めて可視化によって明示された。

以上、本研究によって、Gly-Pro および Tyr-Pro は BBB を透過可能なペプチドであることが初めて示され、特に Tyr-Pro は脳内において脳実質に移行し、記憶や摂食行動を司る領域に局在することが判明した。

peptide, blood-brain barrier

講演番号：3A05p13
講演日時：3 月 27 日 16:21～ センター2 号館 A05 会場

ユーグレナ・グラシリス EOD-1 株の摂取が若年女性の整腸作用に及ぼす影響

Effect of Euglena gracilis EOD-1 strain intake on bowel regulation in young women

○平松 智子[1]、内藤 淳子[2]、西岡 満智子[2]、西田 典永[2]、高橋 円[2]、田淵 朱莉[1]、三宅 加奈子[1]、岩岡 裕二[1]、伊東 秀之[1]([1]岡山県立大栄養、[2]神鋼環境ソリューション)
○SATOKO HIRAMATSU[1], JUNKO NAITO[2], MACHIKO NISHIOKA[2], NORIHISA NISHIDA[2], MADOKA TAKAHASHI[2], AKARI TABUCHI[1], KANAKO MIYAKE[1], YUJI IWAOKA[1], HIDEYUKI ITO[1] ([1]Okayama Prefectural Univ., [2]Kobelco Eco-Solutions Co., Ltd.)

【背景と目的】
微細藻類の 1 種であるユーグレナ・グラシリス EOD-1 株（EOD-1 株）は、ビタミンやアミノ酸等の 50 種類以上の多彩な栄養素とユーグレナ由来の特徴成分であるパラミロン（β-1,3-グルカン）を 70%以上と他のユーグレナよりも高い割合で含有しており、その機能性が注目されている。パラミロンには、免疫賦活作用、糖質、脂質代謝促進作用をはじめとした様々な作用が報告されている。また、パラミロンは不溶性食物繊維に位置づけられることから、整腸改善作用が期待されている。先行研究において、成人女性による便秘改善効果をユーグレナの摂取量で検討した報告があるが、休止期間がないなど試験デザインに課題があった。そこで本研究では便秘傾向の女子学生を対象として EOD-1 株の摂取が整腸作用に与える影響について評価した。
【方法】
排便回数が 3～5 回/週の 18 歳以上の健常な若年女性 33 名を対象に、月経周期を考慮したプラセボ対照ランダム化二重盲検クロスオーバー試験を行った。試験食品は、EOD-1 株を 500mg/日を含有し、対照食品にはデキストリンを含有するサプリメントとした。被験者を無作為に 2 群に分け、前観察期間（1 週間）、1 期摂取期間（2 週間）、休止期間（2 週間）、2 期摂取期間（2 週間）として試験を行った。試験期間は 2019 年 1 月から４月のうち 7 週間である。試験期間中、排便日誌をつけるとともに、1 期摂取期間の前後、2 期摂取期間の前後に便通評価アンケート（日本語版便秘評価尺、CAS - MT）、便性状評価（ブリストルスケール）、糞便中の腸内細菌叢検査を行った。また、各検査日前の 3 日間の食事内容をすべて記録させ、栄養価計算を行った。解析は脱落、月経不順、試験期間中に生活環境の大きく変化のあった者等など除外し、23 名を対象とした。
【結果】
EOD-1 株を摂取した群では摂取前後で有意に排便回数が増加し、特に排便回数が少ない群では顕著であった。食習慣との関連性を検討した結果、日頃から乳酸菌を含む食品を摂取している群において、EOD-1 株を摂取することで、より顕著に排便回数の増加が認められた。
以上の結果から、ユーグレナ・グラシリス EOD-1 株の摂取は便秘傾向の若年女性の整腸作用の改善に寄与した可能性が示唆された。

Euglena gracilis EOD-1, Paramylon, bowel regulation

発表責任者：平松智子（shiramatu@fhw.oka-pu.ac.jp）

講演番号：3A05p14
講演日時：3 月 27 日 16:32～ センター2 号館 A05 会場

ケルセチンの吸収機構における細胞外小胞の役割

Possible roles of extracellular vesicles in absorption mechanism of quercetin

○杉元 亮介、丸毛 遥、石坂 朱里、村上 明 (兵庫県立大学大学院・環境人間学研究科)
○Ryosuke SUGIMOTO, Haruka MARUMO, Akari ISHISAKA, Akira MURAKAMI (Dept. of Food Sci. Nutr., Sch. Of human Sci. and Environ., Univ. of Hyogo, Japan)

＜背景・目的＞ファイトケミカルは植物由来の二次代謝産物であり、様々な生理機能性を示す化合物群である。これらは、生体利用能(bioavailability)が極めて低いにもかかわらず、末梢組織においても機能性を示すことが報告されている。その一方で、細胞が構成的に放出している細胞外小胞(extracellular vesicles: EV)は、放出細胞由来の mRNA などの情報を内包し、他の組織へ送達されることにより細胞間のコミュニケーションに関与していることが知られている[1]。また、EV は脂質二重膜を有するため、分解酵素の影響を受けにくく、含まれる生体高分子群などの安定性が高いと考えられる。そこで本研究では、消化管上皮細胞に取り込まれたファイトケミカルが EV に内包され、血中に放出される可能性について検討することを目的とした。
＜方法・結果＞ヒト結腸がん細胞 HT29 を無血清培地で 48 時間培養し、培地上清を超遠心分離することで EV 画分を回収した。EV マーカーである CD9 及び CD63 は EV 画分で選択的に検出され、細胞質画分では検出されないことをウエスタンブロット法により確認した。一方、α-tubulin は細胞質画分でのみ検出された。次に HT29 細胞をケルセチン(QUE, 100μM)を含む培地中で 1 時間培養した。その後、細胞を洗浄し、QUE を含まない培地で 24 時間培養し、EV を回収後、LC-MS/MS 分析を行った。その結果、EV 画分から QUE アグリコンが検出された。同様に QUE 代謝物(3'-*O*-methylQUE, QUE-3-glucuronide, QUE-3'-sulfate, QUE-4'-sulfate)の分析も試みたが検出限界以下であった。次に、無処理の HT29 細胞の培養上清から EV を回収し、QUE(100 μM)を含む PBS 中で 1 時間インキュベートした。その後、EV 外の QUE を洗浄・除去することで調製した QUE を含む EV(QUE-EV)を用いて、無血清培地中での QUE の安定性を経時的に観察した。その結果、QUE-EV の安定性は free-QUE に比べて有意に高いことが判明した。
＜考察＞本研究は、細胞に取り込まれたファイトケミカルが EV に内包され、放出されることを明らかにした初めての例であると考えている。EV は血液脳関門を通過可能と示唆されている[2]ため、ファイトケミカルの脳への送達機構に EV が関与している可能性が示唆された。
＜参考文献＞
[1] Valadi H, *et al.*: *Nat Cell Biol.* 2007, 9:654-659.
[2] Alvarez-Erviti L, *et al. Nat Biotechnol.* 2011, 29:341-345.

Extracellular vesicles, Quercetin, Bioavailability

発表責任者：村上　明（akira@shse.u-hyogo.ac.jp）

講演番号：3A05p15
講演日時：3 月 27 日 16:43～ センター2 号館 A05 会場

コラーゲン架橋分子ピリジノリンの腸管透過経路の解析
Permeation pathway for pyridinoline, a collagen crosslink, across the intestinal epithelium.
○尾上 真純、村上 庸人、赤尾 菜々子、山本 菜々美、早瀬 文孝、渡辺 寛人（明治大学）
○Masumi Onoue, Yoto Murakami, Nanako Akao, Nanami Yamamoto, Fumitaka Hayase, Hirohito Watanabe (Meiji Univ.)

【目的】ピリジノリンは、細胞外マトリクスのコラーゲン線維を架橋する分子であり、組織の物性に関与する。コラーゲンを主要成分とする骨の分解にともなって遊離することから、ピリジノリンは骨吸収マーカーとして臨床的に利用されているが、その生理作用については全く報告が無かった。一方、われわれは、糖尿病合併症に関与する最終糖化産物受容体 RAGE（Receptor for AGE）のリガンド特性を解析する過程で、ピリジノリンが RAGE の内在性リガンドとして機能しうることを最近明らかにしている[1)]。このことから、食品中のコラーゲンに含まれるピリジノリンが体内に吸収されて RAGE との結合を介した作用を発揮する可能性が考えられる。しかしながらピリジノリンの腸管上皮における吸収経路などの詳細は明らかになっていない。そこで本研究では、ピリジノリンの腸管吸収特性を明らかにすることを目的とし、ヒト腸管上皮細胞モデル Caco-2 を用いた解析を行った。

【方法および結果】ウシアキレス腱の塩酸加水分解物から各種クロマトグラフィーによりピリジノリンを精製した。透過性膜上で 3 週間培養し、腸管上皮様に分化させた Caco-2 細胞層の管腔側にピリジノリンを添加し、一定時間後に基底膜側へ透過したピリジノリンを HPLC により分離、定量した。その結果、ピリジノリンの透過係数は 2.16×10^{-7}cm/sec であった。また能動輸送を抑制した場合でもピリジノリンの透過量に大きな変化は見られなかった。

次にペプチド態のピリジノリンの吸収について解析するため、グリシンを付加したグリシルピリジノリン（Gly-Pyr）を合成、単離した。ペプチド輸送担体の関与を考慮して管腔側の pH を 6.0 とし、同様に Caco-2 細胞層における透過について解析した結果、Gly-Pyr の透過量は、ペプチド類似物質である Ceftibuten よりも有意に小さかった。

これらのことから、食品由来の遊離ピリジノリンあるいはペプチド態ピリジノリンが、腸管上皮細胞層を透過しうること、その経路は輸送担体に依存しないものであることが示唆された。

1) Murakami Y et al. *Biosci Biotechnol Biochem*. 82, 1508-1514 (2018)

pyridinoline, collagen, permeation

講演番号：3A05p16
講演日時：3 月 27 日 16:54～ センター2 号館 A05 会場

イメージング質量分析を用いたロスマリン酸のマウス小腸における吸収と分布の可視化

Visualization of mouse small intestinal absorption and distribution of Rosmarinic acid via Imaging Mass Spectrometry.

○小松澤 里帆[1]、平 修[2]、岡田 憲典[3]、阿部 啓子[1,4]、小林 彰子[1] ([1]東大院農、[2]福大農、[3]東大生セ、[4]産技総研)
○Riho KOMATSUZAWA[1], Shu TAIRA[2], Kazunori OKADA[3], Keiko ABE[1,4], Shoko KOBAYASHI[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Fukushima Univ., [3]Tokyo Univ., [4]KISTEC)

【目的】

我々は金沢大学医学部と共同で、シソ科植物に含まれるポリフェノールであるロスマリン酸（RA）のアルツハイマー病予防機構について研究を行っている。RA の腸管吸収性は低く、摂取後の腸管における代謝及び詳細な腸管吸収機作は明らかになっていない。また、RA は摂取後腸内細菌により代謝されると報告されているが、代謝される腸管部位及びその後の挙動については明らかにされていない。これまでに RA の腸管吸収については、主に細胞株を用いた *in vitro* での実験が行われており、RA はタイトジャンクション（細胞間隙）からわずかに、拡散により吸収されることが示唆されている（Konishi Y et al., 2005）。そこで本研究では、イメージング質量分析（IMS）及び液体クロマトグラフィー質量分析（LC-MS）により、RA の腸管における代謝及び RA の代謝物を含めた吸収挙動について明らかにすることを目的とした。

【方法】

8 週齢の C57BL/6J マウスを用い、RA の投与実験を行った。RA（36 mg/kg）を単回経口投与し、血漿と小腸を採取した。小腸は上部、中部、下部に分け、それぞれ IMS 用と LC-MS 用のサンプルを採取した。IMS では、MALDI-TOF MS 装置を用いて分析を行った。マトリックスとして 1,5-ジアミノナフタレン（1,5-DAN）を使用し、ネガティブイオンモードで測定した。サンプルは、厚さ 10 μm の凍結切片を作成し、RA 及びその関連代謝物を測定した。LC-MS は、エレクトロスプレーイオン化法（ESI）によりイオン化し、全化合物をネガティブイオンモード、多重反応モニタリング（MRM）モードで分析を行った。臓器サンプルについては、ホモジナイズ後サンプル調製し、RA 及びその代謝物を測定した。

【結果・考察】

RA 36mg/kg 投与マウスの小腸における IMS では、RA 及びその代謝物であるカフェ酸が、腸管上部または中部に多く分布することが示唆された。また血液採取後、灌流をしなかったサンプルでは RA が検出されたが、灌流をしたサンプルでは検出されなかったことから、IMS で観察された RA は、血中に存在する可能性が考えられた。LC-MS については、RA 及びその代謝物の測定系を立ち上げた。小腸の各部位についての定量結果は現在検討中である。また、RA の投与量を増やしたサンプル、及び血液と臓器の採取時間を変更したサンプルについても検討中である。

Imaging mass spectrometry, Rosmarinic acid, Small intestine

講演番号：3A05p17
講演日時：3 月 27 日 17:05～ センター2 号館 A05 会場

Ca^{2+}バイオセンサーマウスを用いた微細藻類ユーグレナの腸管センシングの可視化解析

Visualization of *Euglena*-mediated Ca^{2+} signaling in gut of calcium biosensor transgenic mice

○中島 綾香[1]、安田 光佑[1]、村田 阿子[1]、鈴木 健吾[1]、安達 貴弘[2]([1]株式会社ユーグレナ、[2]東京医科歯科大学)
○ayaka NAKASHIMA[1], kosuke YASUDA[1], ako MURATA[1], kengo SUZUKI[1], takahiro ADACHI[2]
([1]euglena Co.,Ltd., [2]Tokyo Medical and Dental University)

【背景・目的】
腸管は、免疫細胞や、末梢神経の半数以上が集まっており、生体の恒常性維持に大切な役割を果たしている。微細藻類ユーグレナは、植物と動物両方の性質を兼ね備えていることから、ビタミン類、ミネラル、アミノ酸、脂肪酸など幅広い栄養素を含んでおり、食品やサプリメントとして活用されている。ユーグレナの貯蔵多糖パラミロンは、免疫機能亢進、腸内環境の改善などさまざまな効果があるとされているβ-1,3-グルカンの一種である。本実験は、ユーグレナ及びパラミロンが腸管内において認識される機構を理解することを目的として、腸管上皮、免疫系におけるマウス個体レベルの生体イメージング、および神経系の初代培養細胞のイメージングを用いて観察した。
【方法】
１） 全身にカルシウムバイオセンサーYellow Cameleon 3.60(YC3.60)を発現させた YC3.60^{flox}/ CAG-Cre マウスを用いて、麻酔下で腸管の一部を開き、ユーグレナ粉末および、パラミロン粉末を腸管上皮に直接投与して、腸管上皮の細胞内 Ca^{2+}濃度変化を顕微鏡下で経時的に観察した。２） 樹状細胞特異的に YC3.60 を発現させた YC3.60^{flox}/ CD11c-Cre マウスを用いて、ユーグレナ粉末および、パラミロン粉末を腹腔内投与後に、小腸パイエル板に局在する樹状細胞の Ca^{2+}濃度変化を観察した。３） 神経細胞特異的に YC3.60 を発現させた YC3.60^{flox}/ Nestin-Cre マウスを用いて、末梢感覚神経細胞である脊髄後根神経節ニューロンを分散培養して、ユーグレナ粉末および、パラミロン粉末を投与して、Ca^{2+}濃度変化を観察した
【結果・考察】
１）マウス個体内の腸管上皮において、ユーグレナ粉末の投与により一過性の Ca^{2+}シグナルが惹起され、パラミロン粉末を投与したとき、腸管上皮の一部に局在した緩やかな細胞内 Ca^{2+}シグナルの上昇が見られた。２）樹状細胞が局在するパイエル板では、ユーグレナ粉末およびパラミロンを腹腔内投与後１時間後に、Ca^{2+}シグナルが上昇していることが観察された。３）脊髄後根神経節ニューロンの初代培養細胞において、ユーグレナ粉末の投与により Ca^{2+}シグナルが惹起された一方、パラミロンを投与した場合には、Ca^{2+}シグナル応答は見られなかった。これらの結果は、ユーグレナおよびパラミロンが腸管を起点として様々な効果を示す作用機序を解明するための一助となることが期待される。

Euglena, Paramylon, *in vivo* imaging

講演番号：3A05p18
講演日時：3 月 27 日 17:16～ センター2 号館 A05 会場

ヒト腸内細菌によるクルクミン代謝に関する化学的研究（３）

Metabolism of curcumin by human feces. Part 3.

○丹羽 利夫[1]、横山 慎一郎[2]、望月 美佳[3]、大澤 俊彦[3] ([1]修文大健康栄養、[2]岐阜県食品科学研究所、[3]愛知学院大心身科学)
○Toshio Niwa[1], Shinichiro Yokoyama[2], Mika Mochizuki[3], Toshihiko Osawa[3] ([1]Shubun Univ., [2]Gifu Pref. Res. Inst. for Food Sci., [3]Aichi Gakuin Univ.)

【目的】われわれは近年、クルクミンが１C と名付けたヒト由来腸内細菌群により 3-hydroxy-1,7-bis(3,4-dihydroxyphenyl)heptane に変換されることを報告するとともに（Niwa *et al*., 2019）、昨年の本大会においてヘキサハイドロクルクミンがこの代謝中間体であることを示唆するデータを報告した。そこで、ヒト由来腸内細菌群１C にヘキサハイドロクルクミン産生菌が存在するかを調べることとした。

【方法】ヒト由来腸内細菌群１C から各種培地を用いて得られたコロニーを、6 穴プレート上で基質（100 μM）を含む Gifu Aerobic Medium 8 mL に播種し、嫌気条件下三日間程度培養した。この培地 1 mL は 24 穴プレートに取り-80 ℃のディープフリーザーにて保存。残りの培地については 5 mL の酢酸エチルにて抽出後濃縮を行った。この濃縮サンプルを 0.3 mL のメタノールに溶解し TLC 分析を行い、菌を入れていないサンプルと比べ何らかの代謝が見られた菌（コロニー）についてはディープフリーザーより取り出し、さらにプレート播種から始まる同様の手法を繰り返し、テストしたコロニーがすべて同様に反応することが確認できるまで操作を繰り返した。

【結果と考察】当初クルクミンを基質としてヘキサハイドロクルクミンを産生する菌の探索を行ったが、現在まで該当する菌を見出せていない。しかしながらヒト由来腸内細菌群１C により 3-hydroxy-1,7-bis-(3,4-dihydroxyphenyl)heptane へと変換されることが確認されている（昨年本大会）デメチルテトラハイドロクルクミンを基質として探索を行ったところ 2a1-2b と名付けたグラム陽性球菌が得られた。この菌はクルクミンに対してはほとんど反応を示さなかったがテトラハイドロクルクミンをヘキサハイドロクルクミンへと変換することが確認された。現在この菌についてさらなる解析を進めている。

参考文献

1) *J. Funct. Foods,* **61**, (2019) doi.org/10.1016/j.jff.2019.103463.

Curcumin, metabolite, microbiota

発表責任者：丹羽利夫（niwa.to@shubun.ac.jp）

講演番号：3A06a01
講演日時：3 月 27 日 09:30～ センター2 号館 A06 会場

食餌量制限の免疫老化抑制効果：体重減少率に着目した解析
A relationship between anti-aging effects on immune systems and body weight loss induced by dietary restriction
○徳留 亮[1]、角田 紗希[1]、関根 玲奈[1]、扇野 道弘[1]、須田 瞭太[1]、小方 優弥[1]、榎本 淳[1,2] ([1]群大院理工、[2]群大食健康セ)
○Ryo TOKUDOME[1], Saki KAKUTA[1], Reina SEKINE[1], Michihiro OUGINO[1], Ryota SUDA[1], Yuya OGATA[1], Atsushi ENOMOTO[1,2] ([1]Gunma Univ., [2]Gunma University Center for Food Science and Wellness)

【目的】カロリー制限を含む食餌量制限は、免疫系の老化などの加齢に伴うさまざまな疾病の発症リスクを低減させ、長寿や健康寿命の延伸に有効であるといわれている。演者らはこれまでに 9～100 週齢の健康なオスの NOD マウスを用いて、リポ多糖（LPS）刺激を与えてこれらの脾臓細胞を培養した際に産生される IL-6 と IL-10 のモル比（IL-6/IL-10）が加齢に伴い、一次関数的に単調増加すること（r = 0.954）を見出し、これを（マウス）免疫系の老化を定量的に評価することができる指標として新たに提案した。本研究では食餌量制限が免疫系の老化、すなわちこの指標に及ぼす抑制効果について、特に IL-6/IL-10 低減率と体重減少率の関係に着目して検討した。
【方法】 1 型糖尿病未発症の健康なオスの NOD マウスを二群に分け、これらのマウスが 45～65 週齢の期間に市販の飼料を自由摂取させた対照群と 1、3、5 週間、食餌量をその 70 %に制限した食餌量制限群を用意した。なお、両群とも飲料水（水道水）は一切制限することなく、自由摂取させた。食餌量制限終了後、これらのマウスから脾臓細胞を取り出し、それらを LPS と共に培養した際の IL-6 および IL-10 の産生量を ELISA により求め、IL-6/IL-10 を計算し、両群間で比較した。
【結果および考察】自由摂取群では個体差はあるものの、マウス 1 匹が 1 日あたり平均して 3.9～4.4 g の飼料を摂食したのに対し、食餌量制限群ではちょうどその 70 %の食餌を摂取した。食餌量制限期間中、自由摂取群のマウスの体重がほとんど変化しなかったのに対し、食餌量制限群のマウスでは実験条件により異なるものの、食餌量制限開始時と比較して終了時では、体重が 6.6～31 %減少した。しかしこれらのマウスを経時的に観察したところ、自由摂取群と比較して、食餌量制限群の方がその動きが活発であり、毛並みも比較的良いことが見出された。さらに脾臓細胞に関しても、その細胞数に両群間で有意差は無く、食餌量制限群においても抗 CD3 抗体および LPS 刺激に対する増殖応答も認められたため、食餌量制限群の健康状態に特に問題はないと考えられた。
　食餌量制限終了後、これらのマウスの脾臓細胞を用いて IL-6/IL-10 を求めたところ、それが自由摂取群と比較して、食餌量制限群では 4.1～50 %低下すること、その主な要因が食餌量制限群における IL-6 の産生量の低下であることが明らかとなった。さらにこの IL-6/IL-10 低減率は体重減少率が大きくなるにつれ、一次関数的に単調増加することが見出された。これらの結果より、食餌量制限は白色脂肪組織の減少、すなわち炎症が起こりにくい状態を促し、その結果 IL-6/IL-10 が低下したと推測された。現在、食餌を与える時刻を変化させた実験も行っており、その結果も併せて報告したい。

Dietary restriction, Immunosenescence, Anti-aging effect

発表責任者：榎本淳（enomoto@gunma-u.ac.jp）

講演番号：3A06a02
講演日時：3 月 27 日 09:41～ センター2 号館 A06 会場

マスト細胞は脂肪細胞の分化・成熟を正負両方向に制御する

Mast cells regulate adipocyte maturation in both positive and negative manners

○祖父江 春菜、今村 玲奈、高野 真衣、中西 祐輔、高橋 恭子（日大生物資源）
○Haruna SOBUE, Reina IMAMURA, Mai TAKANO, Yusuke NAKANISHI, Kyoko TAKAHASHI (Nihon Univ.)

【目的】マスト細胞はアレルギー炎症を誘導することで知られるが、近年その多彩な生理機能が注目されている。本研究では、脂肪組織中にマスト細胞が存在することに着目し、脂肪細胞の分化・成熟に対するマスト細胞の作用を明らかにすることを目的とした。
【方法】C57BL/6 マウスより調製した骨髄細胞を IL-3 存在下で 5-10 週間培養し、骨髄由来マスト細胞（BMMC）を得た。マウス線維芽細胞株（3T3-L1）にインシュリン、デキサメタゾン、3-イソブチル-1-メチルキサンチンを添加して脂肪細胞へ分化誘導する系を用い、BMMC との共培養が脂肪細胞の成熟に及ぼす影響を解析した。BMMC を添加する際、トランズウェルインサートの有無により、3T3-L1 と BMMC が物理的に接触する条件としない条件により培養を行った。分化誘導した 3T3-L1 における Adiponectin, GLUT4, aP2 の mRNA 発現を定量 RT-PCR により解析した。また、脂肪滴の蓄積をオイルレッド O 染色により評価した。次に、BMMC の培養上清を 3T3-L1 の分化誘導系に添加し、Adiponectin, GLUT4, aP2 の発現を定量 RT-PCR により解析した。さらに、A23187, PMA, IgE および抗原でそれぞれ刺激した BMMC の培養上清を 3T3-L1 の分化誘導系に添加して同様の実験を行った。
【結果・考察】3T3-L1 の脂肪細胞への分化系において BMMC を添加して共培養することにより、脂肪滴の蓄積が促進された。この促進作用は、脂肪細胞への分化の前期段階より後期段階に BMMC を添加した場合のほうが大きく、また、トランズウェルインサートを使用した場合には促進作用が認められなかった。一方、Adiponectin, GLUT4, aP2 の発現について、脂肪細胞への分化の初期段階に BMMC を添加して共培養することにより、トランズウェルインサートの有無にかかわらず、それらの発現が抑制された。さらに、BMMC の培養上清を添加した場合においてもそれらの分化マーカーの発現が抑制された。抑制の度合いは、A23187 刺激、PMA 刺激、IgE および抗原刺激、無刺激の培養上清の順に強かった。一方、3T3-L1 の脂肪細胞への分化の後期段階に BMMC を添加して共培養した場合には、Adiponectin, GLUT4, aP2 の発現に対して BMMC を初期段階に添加した際のような強い抑制は観察されなかった。しかし、トランズウェルインサートを使用した場合には、それらの分化マーカーの発現が強く抑制された。これらの結果より、BMMC は、脂肪細胞の分化・成熟に対して促進作用と抑制作用を有しており、分化・成熟の前期では抑制作用、後期では促進作用が働くと考えられる。また、抑制作用は BMMC の活性化により産生が誘導される液性因子に、促進作用は BMMC と 3T3-L1 の物理的接触に依存することが示された。

mast cell, adipocyte, maturation

発表責任者：高橋恭子（takahashi.kyoko@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3A06a03
講演日時：3 月 27 日 09:52～ センター2 号館 A06 会場

慢性社会的敗北ストレスモデルマウスを用いたビフィズス菌 *Bifidobacterium bifidum* TMC3115 株給与の評価

Evaluation of *Bifidobacterium bifidum* TMC3115 administration using a chronic social defeat stress model

○依田 一豊[1]、佐藤 瑞穂[2,4]、原田 岳[1]、大澤 夏樹[3]、何 方[1]、豊田 淳[2,3,4] ([1]タカナシ乳業（株)、[2]東農工大連農、[3]茨城大院農、[4]茨城大農)
○Kazutoyo YODA[1], Mizuho SATO[2,4], Gaku HARATA[1], Natsuki Ohsawa[3], Fang HE[1], Atsushi TOYODA[2,3,4] ([1]Takanashi Milk Prodcuts, [2]TUAT, [3]Grad. Sch. Ibaraki Univ., [4]Ibaraki Univ.)

【背景・目的】

近年、ストレスによって惹起された炎症反応が、うつ病などの精神疾患を引き起こすと考えられている。うつ病患者の末梢血では TNF-α や IL-6 のような炎症関連因子が増加している。それゆえ、ストレスによる炎症反応を抑制することは、これらの精神疾患を予防する有効なアプローチになり得ると考えられる。そこで、他のビフィズス菌や乳酸菌と比較して抗炎症作用が高いことが報告されている *Bifidobacterium bifidum* TMC3115（TMC3115）株に着目した。今回の研究では、慢性社会的敗北ストレスモデルマウスに本菌株を給与し、その評価を行った。

【方法】

TMC3115 株の凍結乾燥粉末を AIN-93G 粉末に混合し、C57BL/6J マウス（8 週齢、♂）に 20 日間給与した（TMC3115 群)。試験開始 11 日目からは ICR マウス（繁殖リタイア後の♂）を用いて 10 日間の社会的敗北ストレスに暴露した。対照にはストレスに暴露しない群（通常群）と暴露した群（ストレス群）を設け、これらの群には AIN-93G 粉末のみ給与した。試験開始 21 日目に社会性行動を評価、22 日目にイソフルラン麻酔下で血液を採取した後、各臓器を採取した。

【結果と考察】

10 日間のストレス暴露期間において、ストレス群の摂食量と増体量が有意に低く（$p < 0.05$ vs 通常群；$p < 0.01$ vs 通常・TMC3115 群)、飲水量が有意に増加していた（$p < 0.01$ vs 通常・TMC3115 群)。つまり、TMC3115 摂取はストレス暴露による増体量の低下と飲水量の急激な上昇を抑制することが考えられた。また、ストレス群では血清中 IL-6 の有意な上昇（$p < 0.01$ vs 通常・TMC3115 群）が観察されたが、TMC3115 群では IL-6 濃度の上昇が抑制されていた。一方で社会性行動試験では群間有意差は観察されなかった。本研究において、TMC3115 株の給与がストレス暴露によって誘発される増体量や飲水量の変化や炎症反応を抑制することが示されたことから、本菌株の新たな機能性として抗ストレス効果や抗うつ効果が期待される。

stress, *Bifidobacterium bifidum* TMC3115, IL-6

発表責任者：依田　一豊（k-yoda@takanashi-milk.co.jp）

講演番号：3A06a04
講演日時：3 月 27 日 10:03～ センター2 号館 A06 会場

乳酸菌 *Lactobacillus sakei* のメンブランベシクルによる腸管 IgA 産生増強メカニズムの解明
Mechanisms of enhancement of intestinal IgA production by membrane vesicles derived from *Lactobacillus sakei*

○山崎 思乃[1,3]、三好 柚紀[2,3]、雑賀 あずさ[3]、長竹 貴広[3]、松永 安由[3]、國澤 純[3]、片倉 啓雄[1]([1]関西大化生工、[2]関西大院理工、[3]医薬健栄研)
○Shino YAMASAKI-YASHIKI[1,3], Yuki MIYOSHI[2,3], Azusa SAIKA[3], Takahiro NAGATAKE[3], Ayu MATSUNAGA[3], Jun KUNISAWA[3], Yoshio KATAKURA[1] ([1]Kansai Univ. of Fac. Chem. Mater. Bioeng., [2]Kansai Univ. of Grad. Sch. Sci. Eng., [3]NIBIOHN)

【目的】ヒトの腸内には多種多様な腸内細菌が腸内細菌叢を形成して共生している。そのバランスの破綻は様々な疾病の引き金となるため、宿主の健康の維持には腸内環境の維持・改善が重要となる。中でも、腸内細菌叢が宿主に及ぼす影響の多くが免疫系に関与することから、プロバイオティクスの免疫調節作用が期待されている。我々は、腸管免疫系を活性化して免疫グロブリン A（IgA）産生を増強するプロバイオティクスの獲得を目的とし、マウス腸管パイエル板（PP）細胞を用いたスクリーニングを行い、日本酒きもと由来の乳酸菌 *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* NBRC 15893 を見出した。本菌株の特性について解析を進める中、興味深いことに、菌体培養液中に含まれる難沈降性のメンブランベシクル（MV）が PP 細胞からの IgA 産生を増強することを発見した。MV は細菌が放出する直径 20～500 nm の膜小胞であり、細菌間の相互作用のみならず、細菌－宿主間の相互作用にも関与する。ここでは、乳酸菌の MV による新たな腸管 IgA の産生増強メカニズムについて報告する。
【方法・結果】*L. sakei* NBRC 15893 は MRS 培地で 24 h 培養した。培養液を遠心分離（8,500×g, 5 min）し、フィルターろ過（0.45 μm）で菌体を除いた。超遠心分離（100,000×g, 1 h）で回収した沈殿を密度勾配超遠心分離で分画し、MV を得た。まず、MV が作用する PP 細胞の細胞種を特定するため、PP 細胞から樹状細胞（DC）を除去したところ、MV による IgA 産生増強作用が消失し、MV の標的細胞が DC であることがわかった。次に、IgA 産生増強因子を特定するため、骨髄由来樹状細胞において関連遺伝子発現を調べたところ、MV は IL-6 などの炎症性サイトカイン、誘導型一酸化窒素（NO）合成酵素、レチナール脱水素酵素 2 の遺伝子発現を増加させた。そこで、これらの中和抗体や阻害剤を PP 細胞に添加したところ、MV による IgA 産生増強にはレチノイン酸（RA）、NO、IL-6 の順で寄与することがわかった。以上から、MV は DC を活性化し、NO および RA による B 細胞の IgA クラススイッチ組換えの誘導、IL-6 による抗体産生細胞への分化を促進することで、PP 細胞からの IgA 産生を増強することが明らかとなった。さらに、この作用はグラム陽性菌の細胞壁成分を認識する TLR2 を介してもたらされ、MV に保持された細胞壁成分が重要な役割を果たすことが示唆された。これらの結果は、プロバイオティクスによる腸内環境の制御を目指すには、菌体のみならず MV がもたらす作用についての理解が必須であることを示している。

Membrane vesicle, Intestinal IgA, Lactic acid bacteria

発表責任者：山崎　思乃（shino.ya@kansai-u.ac.jp）

講演番号：3A06a05
講演日時：3 月 27 日 10:14～ センター2 号館 A06 会場

ヒロメ（*Undaria undarioides*）から調製したエクソソーム様微小胞の免疫賦活能
Immunomodulatory effects of exosome-like nanoparticles isolated from *Undaria undarioides* on murine macrophage cells.

○伊藤 智広[1]、世古 夏実[2]、伊藤 裕子[3]、赤尾 幸博[4]（[1]三重大院生資、[2]三重大生資 、[3]大阪医大、[4]岐阜大院連合創薬）
○Tomohiro ITOH[1], Natsumi SEKO[2], Yuko ITO[3], Yukihiro AKAO[4]（[1]Mie Univ. Grad. Sch. Bioresour., [2]Mie Univ., [3]Osaka Med. Col., [4]Gifu Univ. Grad. Sch. Drug Discov. Med. Info. Sci.）

【目的】近年，植物に含まれるエクソソーム様微小胞（plant exosome-like nanoparticles, PELNs）が樹状細胞による抗原提示能を増強することが分かり，免疫賦活剤としての利用が期待されている。我々は，食経験のある海産物に含まれるエクソソーム様膜微小胞の機能研究を進めており，今回，三重県の熊野灘沿岸で採取したヒロメから調製したエクソソーム様微小胞（*Undaria undarioides* exosome-like nanoparticles, 以下 UELNs）の免疫賦活能について検討した。
【方法】三重県尾鷲市熊野灘沿岸にて採取したヒロメを氷冷したリン酸緩衝液中で粉砕後，遠心分離にて上澄みを回収した。この上澄みをさらに超遠心に供し，UELNs を調製した。UELNs の粒子径は Nanosight により測定し， UELNs の外観および細胞内における UELNs の局在状況の確認を走査型および透過型電子顕微鏡により観察した。UELNs によるマクロファージの活性化の評価は，マウスマクロファージ RAW264.7 細胞に添加することで産生される一酸化窒素の濃度を指標とした。また，誘導型一酸化窒素合成酵素（iNOS）や炎症性サイトカインの mRNA 発現量については，定量的リアルタイム PCR 法にて検討した。さらに，UELNs 刺激した細胞と LPS により刺激した細胞における mRNA および miRNA の発現比較解析を東レ 3D Gene micro array にてそれぞれ行い，作用機構を推察した。
【結果および考察】超遠心法により回収した UELNs の平均粒子径は 197 nm であった。走査型電子顕微鏡像からも比較的均一な粒子増であることが確認された。また，この UELNs はヒロメの細胞における微細構造体である褐藻胞に多く観察された。この回収 UELNs を 0.45 μm のフィルターにて処理後，UELNs のマクロファージの活性化を RAW264.7 細胞からの一酸化窒素濃度により評価したところ，3 μg/mL の処理濃度までは濃度依存的に一酸化窒素の産生を促進させた（最大 LPS 刺激により産生される一酸化窒素濃度の 60%程の産生量であった）。また，q RT-PCR 法により iNOS, COX2, TNF α および IL-6 のｍRNA 発現解析を行ったところ，いずれも LPS により刺激した細胞の発現量よりも顕著に低い発現量であったが，UELNs 処理により発現誘導が確認された。miRNA 発現比較解析では，興味深いことに UELNs により処理した細胞と LPS により処理した細胞では共通に発現変動したのはたった 2 つであった。一方で mRNA の発現比較解析では 6 割弱の遺伝子が共通して同じような変動を示すことを確認した。現在 UELNs の構成成分や内包物質などをさらに詳細に解析し，UELNs による免疫賦活機構について検討を進めている。

exosome-like nanoparticles, Immunomodulatory effects, Undaria undarioides

発表責任者：伊藤智広（titoh@bio.mie-u.ac.jp）

講演番号：3A06a06
講演日時：3 月 27 日 10:35～ センター2 号館 A06 会場

Lactobacillus plantarum 06CC2 株の *Helicobacter pylori* によるヒト胃上皮細胞株炎症誘導に対する抑制作用

The effect of *Lactobacillus plantarum* 06CC2 on suppression of proinflammation induced by *Helicobacter pylori* in human gastric epithelial cell line

○李 怡然[1]、竹下 正彦[1]、中野 智木[1]、有馬 勇夫[1]、ツェンドアユシ チュルーンバト[2]、オユンスレン ツェンデスレン[3]、井越 敬司[4]、古賀 泰裕[5]([1]南日本酪農協同(株)、[2]蒙科技大、[3]蒙バイオテクノ協会、[4]東海大農、[5]東海大医)

○Yiran Li[1], Masahiko Takeshita[1], Tomoki Nakano[1], Yuo Arima[1], Chuluunbat Tsend-Ayush[2], Tsendsuren Oyunsuren[3], Keiji Igoshi[4], Yasuhiro Koga[5] ([1]Minami Nihon Rakuno Kyodo Co. Ltd, [2]Mongolian Sci. Technol. Univ., [3]Mongolian Biotechnol. Assoc., [4]Tokai Univ. Agri., [5]Tokai Univ. Med.)

[背景と目的]

Helicobacter pylori（ピロリ菌）感染は胃の炎症や潰瘍などの慢性炎症疾患に深く関与しており、胃炎や胃ガンのリスクが高くなることが知られている。我々は今までにモンゴル伝統的乳製品から分離したプロバイオティクス乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* 06CC2（06CC2）株の整腸、アレルギーの軽減、及び免疫賦活効果等を報告した。本研究では、病原性タンパク質 CagA の発現を有する *Helicobacter pylori* No.130（HP130）株を用い、MKN45 細胞における 06CC2 株の IL-8 産生抑制作用とその作用機序を検討した。

[研究方法]

10%FBS を含む RPMI-1640 培地で培養したヒト胃上皮細胞株 MKN45 細胞に、BHI で培養した HP130 と MRS で培養した 06CC2 を加え共培養し、培養上清中の IL-8 の濃度を測定した。また、MKN45 細胞の核内における NF-κB の挙動を western blot で評価した。さらに、HP130 株と 06CC2 株共培養後の CagA についても測定を行った。

[結果と考察]

MKN45 細胞における HP130 株添加による IL-8 産生誘導を検討したところ、コントロールに比べ、HP130 株添加による培養上清中の IL-8 濃度が著しく増加した。さらに、06CC2 株を添加することで、IL-8 濃度が 06CC2 株添加に伴い、用量依存的に減少した。細胞核内の NF-κB 量は HP130 株添加によって有意に上昇したが、06CC2 株の添加で、NF-κB の核内移行が抑えられた（$p<0.001$）。また、MKN45 細胞内の CagA 量を評価したところ、HP130 株添加に比べ、HP130+06CC2 混合添加において、CagA の減少が確認された。以上の結果から、06CC2 株は HP130 株による誘導された炎症因子の産生を抑制する効果が示され、06CC2 株が HP130 の活性を抑えることが示唆された。

Lactic acid bacteria, *Helicobacteria pylori*, inflammatory cytokine

発表責任者：竹下正彦（m-takeshita@dairy-milk.co.jp）

講演番号：3A06a07
講演日時：3 月 27 日 10:46～ センター2 号館 A06 会場

SUMO 種依存的 SNPs 活性に対する vialinin A の影響
Inhibitory effects of vialinin A against SENPs activity depending on SUMO species
○國井 僚介[1]、中澤 侑子[2]、菅谷 紘一[2]、小野瀬 淳一[2]、阿部 尚樹[1,2]([1]東農大院・健康、[2]東農大・応生・健康)
○Ryousuke KUNII[1], Yuko NAKAZAWA[2], Kouichi SUGAYA[2], Jun-ichi ONOSE[2], Naoki ABE[1,2]([1]Dept. of Nutri. Sci & Food Safety, Grad. Sch. of Agric., Tokyo Univ. of Agric., [2]Dept. of Nutri. Sci & Food Safety, Faculty of Applied Bio-Sci.,Tokyo Univ. of Agric.)

【目的】 我々はこれまでに中国産食用茸ツブイボタケ（*Thelephora vialis*）含有 *p*-terphenyl 化合物 vialinin A が抗原刺激好塩基球系 KU-812 細胞並びに RBL-2H3 細胞において TNF-α の分泌抑制活性を有することを明らかにしてきた。さらに、vialinin A は TNF-α の産生と放出の 2 段階において阻害活性を有する可能性が予想された。分子プローブを用いた標的分子の探索により見出された vialinin A 標的分子である脱ユビキチン化酵素 USP5 の酵素活性阻害は産生阻害に関与することが強く示唆された。一方、放出阻害の作用機序はまだ明らかとなっていない。インスリンの分泌小胞からのエキソサイトーシスについては SUMO 化及び脱 SUMO 化により制御されることが報告されている。脱 SUMO 化に関連しては 6 種類の SENP アイソザイムと 3 種類の SUMO アイソザイムが発見され、各 SENP において SUMO に対する反応性が異なることが報告されている。本研究では、異なる SUMO を用いた場合の SENP1 並びに SENP2 の脱 SUMO 化活性に対する vialinin A の酵素阻害活性を明らかにすることを目的とした。
【方法】 触媒ドメイン SENP1 並びに SENP2 は市販されているが、SENPs は細胞内で完全長の状態で存在することから、完全長の SENP1 並びに SENP 2 に対する vialinin A の効果を検討するため、大腸菌を用いてヒト組み換え完全長 SENP1（hfSENP1）並びに SENP2（hfSENP2）を作製し、vialinin A の酵素阻害活性を検討した。それぞれの SENPs に対する阻害活性は、蛍光基質 SUMO1-AMC 並びに SUMO2-AMC を用いて SENPs 酵素活性を測定し、50%阻害濃度値を求めることにより評価した。
【結果】 TNF-α の放出は SUMO 化及び脱 SUMO 化を介するエキソサイトーシスで調節されていることが予想されることから、hfSENP1 並びに hfSENP2 に対する vialinin A の阻害効果を検討した。異なる SUMO を用いた SENP アイソザイム活性に対する vialinin A の酵素阻害活性は SUMO1-AMC を用いた場合 hfSENP1 に対して IC_{50}値 3.6 μM を与え、hfSENP2 に対する IC_{50}値は 30.0 μM を示した。一方、vialinin A は SUMO2-AMC を用いた場合 500 μM までの濃度において hfSENP1, hfSENP2 に対してともに 50%阻害を示さなかった。この結果は vialinin A は hfSENP1 並びに hfSENP2 いずれに対しても SUMO1 を用いた場合のほうが、SUMO2 を用いた場合よりも強く阻害することを示した。従って、異なる SUMO により SENPs に対する阻害剤の酵素阻害活性は著しく異なる事が予想された。

Vialinin A, SENPs, SUMOs

発表責任者：阿部 尚樹（abe@nodai.ac.jp）

講演番号：3A06a08
講演日時：3 月 27 日 10:57～ センター2 号館 A06 会場

IL-12 発現を制御するバイオジェニクスのマクロファージモデル細胞を用いた探索および解析
Search and analysis for Biogenics which could regulate the expression of IL-12 in macrophage-like J774.1 cells

○日浦 月穂[1]、梅谷 華奈[2]、鈴木 政彦[3]、辻川 勇治[3]、坂根 巌[3]、薩 秀夫[2] ([1]前工大院・工、[2]前工大・工、[3](株)伊藤園・中央研究所)
○Tsukiho HIURA[1], Kana UMETANI[2], Mahiko SUZUKI[3], Yuji TSUJIKAWA[3], Iwao SAKANE[3], Hideo SATSU[2] ([1]Grad. Sch. of Eng., Maebashi Inst., of Technol., [2]Maebashi Inst., of Technol., [3]Central Research Institute, ITO EN Ltd.)

【目的】現在の日本では少子高齢化が急速に進んでおり、特に免疫力が低い高齢者や子どもにとって感染症は深刻な問題である。さらには、加齢やストレス、運動不足によっても免疫力が低下することが報告されている。したがって、毎日手軽に摂取できる食品による免疫力の強化、感染症の予防が望まれている。近年、ある種の乳酸菌などプロバイオティクスは樹状細胞やマクロファージに作用してインターロイキン 12(IL-12)の分泌を亢進し、CD4T 細胞からのインターフェロン γ(IFN-γ)産生を介してナチュラルキラー(NK)細胞を活性化することで生体防御能を高めることが報告されている。そこで本研究では IL-12 に注目し、マウス由来マクロファージモデル細胞を用いて IL-12 産生を亢進するプロバイオティクスの探索及び作用機構の解析をおこなうこととした。
【方法】本研究ではマクロファージモデル細胞としてマウス由来 J774.1 細胞を使用した。乳酸菌は 24 時間嫌気培養をおこなった後、PBS で２回洗浄し再度 PBS に懸濁した菌体を、121℃、15 分間オートクレーブ処理して死菌体を調製した。J774.1 細胞に乳酸菌死菌体を添加して一定時間インキュベートした後、RNA および培養上清を回収した。回収した RNA より cDNA を合成し、real-time PCR 法によって IL-12 の mRNA 発現量を定量した。また培養上清中に含まれる IL-12 分泌量を sandwich-ELISA 法により測定した。さらに、調製した死菌体に DNase および RNase 処理をおこない、同様に IL-12 発現に及ぼす影響を検討した。
【結果】J774.1 細胞における乳酸菌の IL-12 mRNA 発現量に及ぼす影響を検討した結果、BIC1 株が IL-12 の mRNA 発現量を亢進した。また、BIC1 株は J774.1 細胞からの IL-12 分泌量も有意に増加させることが見出された。そこで、IL-12 発現亢進に関与する菌体成分を明らかにするために各種酵素処理をおこなった結果、IL-12 発現亢進は DNase 処理では変化がみられなかったのに対し、RNase 処理によって有意に抑制された。これらの結果から、BIC1 株による IL-12 発現亢進の一部には、菌体の RNA が関与していることが示唆された。現在、RNA による IL-12 発現亢進の作用機序を明らかにするべく、パターン認識受容体である Toll-like receptor の関与などを中心に RNA 干渉法などを用いて解析を進めている。

Lactic acid bacteria, IL-12, macrophage

発表責任者：薩　秀夫（satsu@maebashi-it.ac.jp）

講演番号：3A06a09
講演日時：3 月 27 日 11:08～ センター2 号館 A06 会場

Procyanidin B2 gallate の mTOR 経路を介した T 細胞機能制御
Procyanidin B2 gallate regulates T cell effector function through mTOR signaling pathway
○遠藤 勝紀、松井 莉奈、杉山 李奈、浅見 拓哉、稲葉 千尋、真壁 秀文、田中 沙智（信州大農）
○Katsunori ENDO, Rina MATSUI, Momona SUGIYAMA, Takuya ASAMI, Chihiro INABA, Hidefumi MAKABE, Sachi TANAKA (Shinshu Univ.)

【目的】プロシアニジンB2（PCB2）は様々な植物に含まれるポリフェノールの一種で、マクロファージに対して免疫抑制効果をもつことが報告されている。先行研究において、PCB2に2つのガレート基を付加したPCB2 3,3”-di-O-gallate（PCB2DG）をヘルパーT細胞であるCD4陽性T細胞に添加したところ、解糖系およびサイトカイン産生の抑制が確認された。しかしながら、その詳細なメカニズムについては明らかになっていない。そこで本研究では、PCB2DGによる細胞代謝調節を介したCD4陽性T細胞のサイトカイン産生制御機構の解明を目的とした。

【方法】マウスより単離したCD4陽性T細胞に、抗CD3抗体および抗CD28抗体刺激下でPCB2DGを添加し、培養を行った。解糖系の抑制を確認するため、培養上清中に含まれる乳酸量および蛍光標識したグルコースである2-NBDGを用いて細胞の糖取り込みに対する影響を評価した。また、培養後のCD4陽性T細胞におけるサイトカイン産生、mRNA発現を解析した。さらに、PCB2DGの解糖系およびT細胞機能の抑制メカニズムを解明するため、解糖系上流のmTORシグナルの阻害剤または活性化剤を添加し、サイトカイン産生を測定した。加えて、mTOR活性の指標であるp70S6Kinase（p70S6K）のリン酸化をウェスタンブロットで解析した。

【結果・考察】CD4 陽性 T 細胞において抗 CD3/CD28 抗体刺激で増加する乳酸産生量および糖取り込みは、PCB2DG の添加で有意に低下した。また、サイトカイン産生量は PCB2DG の添加によって Th1 サイトカインの産生量は顕著に抑制されたが、その他のサイトカイン産生に差は認められなかった。さらに、mRNA 発現はいずれのサイトカインにおいても有意な変化はみられなかったことから、PCB2DG は Th1 が産生するサイトカインの翻訳を抑制することが示された。加えて、mTOR 阻害剤の添加によってもサイトカイン産生は低下し、PCB2DG の添加で抑制されたサイトカイン産生は mTOR 活性化剤との共刺激で回復することが示された。また、PCB2DG は mTOR 下流の p70S6K のリン酸化を抑制することが確認された。以上のことから、PCB2DG は解糖系の抑制を伴って CD4 陽性 T 細胞機能を制御することが示唆され、そのメカニズムとして mTOR シグナルの抑制が関与することが予想された。今後は、PCB2DG による Th1 サイトカイン産生抑制の詳細なメカニズムを明らかにし、PCB2DG が作用する標的分子を同定したいと考えている。

Procyanidin B2 gallate, T cell, mTOR signaling

講演番号：3A06a10
講演日時：3 月 27 日 11:19～ センター2 号館 A06 会場

Fermented rice bran supplementation enhances intestine restoration in a mice model of ulcerative colitis using dextran sodium sulfate-induced inflammation

○Afifah Zahra Agista[1], Jahidul Islam[1], Yusuke Ohsaki[1], Takuya Koseki[2], Michio Komai[1], Hitoshi Shirakawa[1] ([1]Grad. Sch. Agri. Sci, Tohoku Univ, [2]Fac. Agri., Yamagata Univ)

Background: Rice bran (RB) is known as a great source of bioactive compounds. Dual fermentation with *A. kawachii* and a mixture of *L. brevis*, *L. rhamnosus*, and *E. faecium* was conducted to enrich the nutritional quality of rice bran and improve its sensory aspect. Fermented rice bran (FRB) supplementation was found to be able to protect mice intestine against dextran sodium sulfate (DSS)-induced inflammation. Yet whether the same diet would restore the intestinal homeostasis after inflammation occurred remained unclear.

Method: Fifty six female mice (C57BL//6N, 10-11 weeks) were given 1.5% DSS in their drinking water for 5 days. Eight mice were sacrificed right after the DSS treatment ended. The next 16 mice were fed with control diet and divided into two groups. One group was sacrificed 2 weeks after the DSS treatment was over. The remaining control group was sacrificed 5 weeks after the end of DSS treatment. The 32 mice that were still being left behind after DSS treatment were divided into two groups, and fed with either RB or FRB supplemented diet. Mice were then observed and sacrificed in the same manner as the control groups.

Results: Compared to the control diet, RB and FRB supplementation did not have any significant effect on mice body weight at the end of the experiment. FRB supplementation alleviated the diarrhea and bloody stool in mice, two parameters of disease activity index (DAI), an assessment to gauge the severity of DSS-induced intestinal inflammation. FRB was also found to be able to restore the colon length after colon shortening occurred in inflamed intestine. RB and FRB supplementation reduced the level of *Il-1β*, and increased the level of *Il-10* and *IκBα*.

Conclusion: FRB supplementation was able to improve the intestinal reparation process after DSS-induced inflammation occurred in mice.

fermentation, inflammation, rice bran

講演番号：3A06a11
講演日時：3 月 27 日 11:40～ センター2 号館 A06 会場

小腸と大腸の腸管関連リンパ組織における種々の抗原に対する IgA 産生応答の比較
Comparison of IgA production in response to various antigens by immune cells of gut-associated lymphoid tissue from small and large intestine

○岡田 開[1]、津田 真人[1]、小島 菜月[1]、宇野 直哉[1]、池田 大貴[1]、八村 敏志[2]、高橋 宜聖[3]、高橋 恭子[1]、上野川 修一[1]、細野 朗[1] ([1]日大・生資科、[2]東大・院・食の安全研究セ、[3]感染研・免疫)
○ Hiraku Okada[1], Masato Tsuda[1], Natsuki Kojima[1], Naoya Uno[1], Taiki Ikeda[1], Satoshi Hachimura[2], Yoshimasa Takahashi[3], Kyoko Takahashi[1], Shuichi Kaminogawa[1], Akira Hosono[1] ([1]Nihon Univ., [2]Univ. of Tokyo, [3]National Institute of Infectious Diseases)

【目的】免疫グロブリン A（IgA）は腸管内の病原体、食品抗原、腸内細菌などに結合し、腸内の恒常性維持にはたらいている。小腸部位に存在する腸管関連リンパ組織のパイエル板は IgA 産生の代表的な誘導組織であるが、大腸に存在するリンパ組織の役割には不明な点が多い。特に、腸管の部位ごとに存在する食品抗原や腸内細菌の数や種類が大きく異なっているため、それぞれのリンパ組織は機能を有することが推察される。本研究では、食品抗原が豊富な小腸と腸内細菌が多く存在する大腸の腸管関連リンパ組織の IgA 産生能と産生される IgA の結合性の比較を行った。

【方法】卵白オボアルブミン（OVA）特異的 T 細胞受容体トランスジェニックマウスである OVA23-3 マウスに、OVA を含む 20%卵白配合飼料を 1 週間自由摂取させた後、パイエル板（PP）、盲腸リンパ節（CeP）、結腸リンパ（CoP）から細胞調製し、OVA 刺激下で 1 週間培養後、上清中の総 IgA 量と OVA 特異的 IgA 量を ELISA 法で測定した。BALB/c マウスの各リンパ組織から細胞調製し、菌体成分（LPS 、Pam3CSK4、CpG DNA）刺激下で 1 週間培養後、上清中の総 IgA 量を ELISA 法により測定した。また、各リンパ組織において全 B（$B220^{+}$）細胞中の IgA 発現をフローサイトメトリーにより解析した。

【結果】経口摂取したタンパクに対する IgA 産生を解析するため、OVA23-3 マウスの各リンパ組織を OVA 刺激下で培養したところ、各リンパ組織で同レベルの総 IgA 産生がみられた。一方で、OVA 経口摂取により PP では OVA 特異的 IgA 産生が顕著に誘導されたのに対して、CeP、CoP ではほとんど検出されなかった。したがって、経口摂取したタンパク抗原に特異的な IgA 産生には CeP と CoP の役割は大きくないと考えられた。次に、腸内細菌に対する IgA 産生を解析するため、BALB/c マウスの各リンパ組織細胞を菌体成分刺激下で培養したところ、各リンパ組織で同レベルの総 IgA 産生が認められた。このとき、培養前の各リンパ組織の全 B 細胞の IgA 発現は PP が最も高く、それに比べて、CeP と CoP では有意に低い IgA 発現を示した。以上より、大腸の腸管関連リンパ組織である CeP と CoP では、PP と比較して IgA 発現 B 細胞の割合は少ないにも関わらず、PP と同様に菌体成分の刺激に対して総 IgA 産生を誘導する特徴が示唆された。現在、各リンパ組織が産生する IgA の腸内細菌への結合性についても検討を進めている。

IgA, gut-associated lymphoid tissue, intestinal bacteria

発表責任者：細野朗（hosono.akira@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3A06a12
講演日時：3 月 27 日 11:51～ センター2 号館 A06 会場

高糖野菜発酵液由来の新種乳酸菌 *Lactobacillus kosoi* の粘膜免疫増強活性の評価
Immunological activity of *Lactobacillus kosoi*, isolated from Kôso, a Japanese sugar-vegetable fermented beverage

○中島（前田） 由香里[1]、山口 ひかる[1]、松崎 千秋[1]、東村 泰希[2]、邱 泰瑛[3]、山本 憲二[4]、高橋 知也[5]([1]石川県大・資源研、[2]石川県大・生資環、[3]北見工大、[4]和歌山大、[5]アルソア R&D)
○ Yukari NAKASHIMA(MAEDA)[1], Hikaru YAMAGUCHI[1], Chiaki MATSUZAKI[1], Yasuki HIGASHIMURA[2], Tai-Ying CHIOU[3], Kenji YAMAMOTO[4], Tomoya TAKAHASHI[5] ([1]Ishikawa Pref. Univ., [2]Ishikawa Pref. Univ., [3]Kitami Tech., [4]Wakayama Univ., [5]ARSOA R&D)

【目的】野菜や糖分を主原料として発酵させた高糖野菜発酵液は日本の伝統発酵食品のひとつであり、その健康増進効果が期待され、各地で愛飲されている。しかしながら健康増進に寄与する成分に関しては未だ不明な点が多い。我々は自然発酵にて製造した高糖野菜発酵液において、発酵液中の菌叢の50%以上を占める最優勢菌種として、新種の乳酸菌 *Lactobacillus kosoi* を見出している[1, 2)]。本研究ではこの乳酸菌の健康への寄与を明らかにするため、マウスを用いて、粘膜免疫増強効果を *in vitro* および *in vivo* で検証した。
【方法】*in vitro* の評価では、BALB/cA マウスより調製したパイエル板細胞（1.25 $\times 10^6$ cells/ml）を、乳酸菌（OD_{600}=0.01）またはその菌体成分（250μg/ml）と共培養し、分泌されたイムノグロブリン A（IgA）の量を測定した。またマウス骨髄由来樹状細胞（$CD11c^+$）を MACS 法によって精製し、菌体成分の刺激によって誘導される免疫関連遺伝子の発現を qRT-PCR にて解析した。*in vivo* の評価では、乳酸菌生菌粉末（10.7×10^9 cfu/g）または死菌粉末（70℃で 30 分加熱処理）を 0.38%混餌投与して、腸内に分泌される IgA 量を評価した。
【結果】*in vitro* による IgA 産生誘導能を、15 菌種の乳酸菌やビフィズス菌の JCM 株および ATCC 株と比較したところ、*L. kosoi* において最も強い IgA 産生誘導活性が認められた。また 70℃で 30 分処理した加熱死菌体、および菌体破砕によって得られた菌体成分についても、高い IgA 産生誘導活性を有していた。そこで、免疫担当細胞として初動する樹状細胞に対する刺激の効果を調べるため、菌体成分を骨髄由来 $CD11c^+$細胞に作用させたところ、RALDH2, IL-6, IL-10, IL-12, iNOS, TGF-β の遺伝子発現が強く誘導され、菌体成分による粘膜免疫系を刺激する効果が示唆された。乳酸菌生菌体または加熱死菌体をマウスへ経口投与し､腸内に分泌した IgA 量を乳酸菌無投与マウスと比較したところ、いずれの場合も投与 10 日目に上昇傾向が、24 日目には有意な増加が認められた。これらの結果、高糖野菜発酵液中の最優勢菌種である *L. kosoi* 乳酸菌は粘膜免疫系を増強する効果を有し、その活性成分は加熱に対する耐性を有していることが明らかとなった。

関連文献
１）Chiou T. Y. et al. Antonie van Leeuwenhoek, 111(7):1149-1156, 2018
２）Chiou T. Y. et al. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 81(2), 403-410, 2017

Lactobacillus kosoi, IgA, immunological activity

発表責任者：松崎千秋（chiaki@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：3A06a13
講演日時：3 月 27 日 12:02～ センター2 号館 A06 会場

IL-22 を介して皮膚バリア機能を改善する発酵食品由来の菌株のスクリーニング

Screening of fermented food-derived strains that improve skin barrier function via IL-22

○小竹 久仁彦[1,2]、熊澤 利彦[1,2]、西村 篤寿[1]、浅井 紀之[1]、安達 貴弘[2]([1]イチビキ（株）、[2]東京医科歯科大・難研)
○Kunihiko KOTAKE[1,2], Toshihiko KUMAZAWA[1,2], Atsuhisa NISHIMURA[1], Noriyuki ASAI[1], Takahiro ADACHI[2] ([1]Ichibiki Inc., [2]Tokyo Medical and Dental Univ.)

【背景・目的】日本の伝統的な発酵食品である味噌や醤油などには、さまざまな微生物が含まれている。我々は、これまでに味噌由来の耐塩性乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* LTK-1 が、B 細胞の IL-22 産生を誘導することを明らかにしてきた。IL-22 は、腸、肺、肝臓、腎臓、胸腺、膵臓、皮膚などのさまざまな組織で確認されており、特に腸と皮膚のバリア機能に重要な役割を果たす。本研究では様々な食品由来の微生物から IL-22 の生産を誘導する菌を新たにスクリーニングし、IL-22 高生産誘導菌を同定することを目的とした。
【方法】味噌、醤油、甘酒などの発酵食品から乳酸菌および *Bacillus* 属細菌の菌株 366 株を分離した。得られた菌株の殺菌菌体をマウス脾臓細胞と共培養し、フローサイトメトリーにより IL-22 陽性 B 細胞の割合を評価した。IL-22 高誘導生産菌について、通常マウスを、コントロール群、IL-22 静脈投与群、IL-22 高生産誘導菌 1%含有餌給餌群、IL-22 高生産誘導菌 1%含有餌給餌かつ IL-22 中和抗体静脈投与群の 4 群に分け、経皮水分蒸散量(TEWL)を測定した。また、無菌マウスに通常の餌および IL-22 高生産誘導菌 1%含有の餌を給餌し、TEWL を測定して皮膚バリア機能を評価した。さらに IL-22 産生細胞特異的に Ca^{2+}バイオセンサーを発現するマウスを作製し、IL-22 産生細胞の動態・活性化を生体イメージングにて調べた。
【結果・考察】発酵食品から得られた菌株について、*in vitro* で B 細胞において強力な IL-22 誘導機能を有する菌株を同定した。これらのうち、IL-22 陽性 B 細胞の割合が最も高い、味噌由来の *Bacillus coagulans* sc-09 を IL-22 高生産誘導菌とし、通常マウスに与えると、皮膚バリア機能が上昇した。*B. coagulans* sc-09 を与えた通常マウスに IL-22 中和抗体を投与した場合皮膚バリア機能が低下した。このことから、*B. coagulans* sc-09 がマウス生体内において IL-22 に依存して、皮膚バリア機能が改善されたことが強く示唆された。さらに、無菌マウスにおいて *B. coagulans* sc-09 を給餌した結果、同様に皮膚バリア機能が上昇しており、*B. coagulans* sc-09 の IL-22 の誘導機能は、腸内細菌非依存的に作用することが示唆された。また IL-22 産生細胞特異的 Ca^{2+}バイオセンサーを発現するマウスを調べたところ、生体内での IL-22 産生細胞がリンパ球で活性化されることが示唆された。今後このマウスを用いて、菌株の IL-22 陽性細胞に与えるリアルタイムでの影響の解析や、IL-22 陽性細胞が活性化する部位の特定などが期待される。

IL-22, bacteria, skin barrier

講演番号：3A06p01
講演日時：3 月 27 日 13:50～ センター2 号館 A06 会場

抗炎症作用を指標とした破骨細胞分化評価系の確立
Establishment of osteoclast differentation evaluation system using anti-inflammatory action as an index
○伊東 侑亮[1]、高橋 信之[1]、森川 未織[1]、田中 未央里[2]、井上 博文[2]、上原 万里子[1]([1]東農大院農、[2]東農大応生)
○Yusuke ITO[1], Nobuyuki TAKAHASHI[1], Miori MORIKAWA[1], Miori TANAKA[2], Nobuyuki TAKAHASHI[2], Mariko UEHARA[1] ([1]Tokyo Univ. Agri Grad, [2]Tokyo Univ. Agri)

【背景】 我が国において、急速な高齢化に伴う骨粗鬆症患者は年々増加している。骨粗鬆症の発症メカニズムの１つとして骨吸収速度が骨形成速度を上回ることが挙げられるが、その骨吸収を担うのが破骨細胞である。破骨細胞分化に関わるシグナル伝達経路には先行研究により免疫細胞における炎症反応と共通する部分が多いことが判明しているため、炎症反応を制御することで破骨細胞分化も抑制することが可能である。そこで本研究では、抗炎症作用を主な指標として破骨細胞分化に抑制効果を示す新規食品成分のスクリーニング系の確立を目的とし、以下の実験を行なった。
【方法】
①抗炎症作用評価系の確立
抗炎症作用を評価するため、マウス由来マクロファージ様細胞である RAW264.7 細胞に、炎症時に活性化される転写因子 Nuclear Factor-kappa B(NF-κB)の応答配列をレポーター遺伝子であるルシフェラーゼに繋げたプラスミド DNA を安定導入したレポーター細胞を作製した。その細胞を 96-well plate に播種、サンプルによる 24 時間の前処理を行った後、炎症の誘導刺激である LPS をサンプルとともに添加し、3 時間培養した。その後、ルシフェラーゼアッセイを行ない、NF-κB の活性を測定した。
②破骨細胞分化評価系の確立
次に破骨細胞分化に対する作用を評価するため、RAW264.7 細胞に破骨細胞分化における主要な転写因子 Nuclear Factor of Activated T cell(NFAT)の応答配列をルシフェラーゼに繋げたプラスミド DNA を安定導入したレポーター細胞を作成した。その細胞を 96-well plate に播種し 24 時間培養後、破骨細胞分化誘導因子である RANKL とともにサンプルを添加した。24 時間後、ルシフェラーゼアッセイを行ない、NFAT の活性を測定した。
また、このレポーター評価系が適切であるか評価するため、既存の破骨細胞分化評価系である TRAP 染色および遺伝子解析を行い、比較検討した。
【結果】
DHA やレスベラトロールなどの既に抗炎症作用が確認されている成分について破骨細胞分化抑制効果が確認できた。さらに、いくつかの新規成分を予備的にスクリーニングしたところ、同様に破骨細胞分化抑制効果が確認できたため、これらについても TRAP 染色や遺伝子解析なども行なっている。

osteoclast, bone, luciferase

発表責任者：高橋信之（nt204885@nodai.ac.jp）

講演番号：3A06p02
講演日時：3 月 27 日 14:01～ センター2 号館 A06 会場

大豆イソフラボン代謝物エクオールの関節リウマチ抑制作用

The repressive effect of equol, a soy isoflavone metabolite, on rheumatoid arthritis

○井上 千尋、林 宜蒨、山下 修矢、宮本 恵美、藤村 由紀、立花 宏文（九大院農院・生機科）
○Chihiro INOUE, Yi Chen LIN, Shuya YAMASHITA, Emi MIYAMOTO, Yoshinori FUJIMURA, Hirofumi TACHIBANA (Kyushu Univ.)

大豆イソフラボンは大豆に含まれる植物性フラボノイドであり、抗炎症作用や骨保護作用、抗酸化作用など多彩な生理作用を有することが知られている。なかでも、代表的な大豆イソフラボンの一種であるダイゼインの腸内代謝物エクオールは、抗アレルギー作用や骨代謝改善作用などの様々な生理活性を示すことが報告されている。一方、関節リウマチとは慢性関節炎による関節軟骨や骨破壊を主な病状とする自己免疫疾患であり、その有効な治療法は未だ確立されていない。そこで本研究では、マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 および関節リウマチのモデルマウスとして用いられるコラーゲン誘導性関節炎（collagen-induced arthritis：CIA）マウスを用いて、エクオールが関節リウマチに及ぼす影響について検討した。

エクオールで処理したマウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 において、 関節リウマチの発症に中心的な役割を果たす IL-6 の受容体である IL-6R の発現量を測定したところ、IL-6R の発現量が低下した。また、II 型コラーゲンおよびリポポリサッカライド（LPS）の投与により関節炎が誘導された CIA マウスにエクオールを経口投与した結果、エクオール投与群において IL-6R 遺伝子発現量が低下した。さらに、関節炎評価法により CIA マウスの四肢関節炎症を評価し、四肢の関節組織における骨密度を測定したところ、コントロール群の CIA マウスと比較してエクオール投与群の関節炎点数は有意に低値を示し、CIA 誘導により惹起された骨密度低下は顕著に抑制された。また、破骨細胞および未熟な骨芽細胞のマーカー、軟骨破壊関連遺伝子など骨密度低下に関わる遺伝子の発現量もエクオールの経口投与により有意に減少した。

以上の結果より、関節リウマチモデル CIA マウスにおいて、エクオールの経口投与は IL-6R の発現を低下させるとともに、関節炎ならびに炎症性骨破壊を抑制することが示された。

Equol, Rheumatoid arthritis, IL-6

講演番号：3A06p03
講演日時：3 月 27 日 14:12～ センター2 号館 A06 会場

クルクミンの抗炎症作用機構の解明
Elucidation of anti-inflammatory mechanism of Curcumin
○西尾 沙絵香[1]、中島 史恵[2]、ルイス ポーラ[2]、シュナイダー クラウス[2]、内田 浩二[3]、柴田 貴広[1] ([1]名大院生命農、[2]バンダ―ビルト大学、[3]東大院農生科)
○Saeka NISHIO[1], Fumie NAKASHIMA[2], Paula LUIS[2], Claus SCHNEIDER[2], Koji UCHIDA[3], Takahiro SHIBATA[1] ([1]Grad. Sch. of Bioagric. Sci. Nagoya Univ., [2]Vanderbilt Univ., [3]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., The Univ. of Tokyo)

【背景・目的】
ウコン（*Curcuma longa*）に含まれる黄色の色素成分であるクルクミンは、抗炎症活性や抗腫瘍作用を有することが知られており、古くからアジアの民間薬として用いられてきた。近年、*in vitro* においてクルクミンの自動酸化により生成するクルクミン酸化物が新たに同定され、クルクミンよりも強い抗炎症活性を有することが明らかにされているものの、その作用メカニズムに関しては不明な点が多く残されているのが現状である。そこで本研究ではクルクミン酸化物に着目し、クルクミンと細胞内タンパク質の直接的な相互作用を解析することにより、クルクミンの抗炎症作用メカニズムを明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】
マウスマクロファージ様細胞株である RAW264.7 において、酸化クルクミン誘導体の抗炎症活性を評価したところ、クルクミンよりも強力に誘導型 NO 合成酵素の発現、NO 産生、および TNF-α 放出を抑制することが確認された。酸化クルクミン誘導体による抗炎症作用には、細胞内タンパク質のシステイン残基における直接的な相互作用が関与するものと予想し、細胞内の GSH 合成を促進する NAC または抑制する BSO を事前処理した RAW264.7 細胞において抗炎症活性を評価したところ、クルクミンの抗炎症活性がそれぞれ減弱または増強される結果が得られた。続いて、クルクミンのアルキン誘導体（アルキニルクルクミン）を用いて、クルクミン標的タンパク質の解析を行うこととした。RAW264.7 細胞において、アルキニルクルクミンはクルクミンと同様の抗炎症活性を有することが確認された。このアルキニルクルクミンを用いて、RAW264.7 細胞における標的タンパク質の検出を試みた。クリックケミストリーにより、修飾タンパク質をビオチン標識し、ビオチン-アビジン相互作用により検出したところ、アルキニルクルクミンの投与濃度依存的に標的タンパク質が検出された。また、クルクミンを事前投与することにより、アルキニルクルクミンによる修飾が競合的に阻害されることを確認した。現在、プルダウンアッセイおよび免疫沈降法を用いて、炎症に関わるクルクミン標的タンパク質の同定を進めている。

Curcumin, anti-inflammation, click-chemistry

講演番号：3A06p04
講演日時：3 月 27 日 14:23～ センター2 号館 A06 会場

光センシングによる簡便な未病マーカーの開発
Development of an easy-to-use presymptomatic disease marker by optical sensing

○數村 公子[1]、波多野 薫子[1]、竹内 康造[1]、松下 悦史[2]、吉田 晃浩[3]、阿部 新[4,5]、朝倉 富子[6]、斎藤 芳和[6]、美和 登志幸[7]、服部 将貴[8]、大澤 俊彦[9]([1]浜松ホトニクス・中研、[2]中津川市民病院・循環器内科、[3]中津川市民病院・検査科、[4]多摩総合・脳血管内科、[5]日本医大・脳神経内科、[6]東大院農生科・応生化、[7]浜松ホトニクス・電子管、[8]浜松ホトニクス・GSCC、[9]愛知学院大・心身)
○Kimiko KAZUMURA[1], Yukiko HATANO[1], Kozo TAKEUCHI[1], Etsushi MATSUSHITA[2], Akihiro YOSHIDA[3], Arata ABE[4,5], Tomiko ASAKURA[6], Yoshikazu SAITO[6], Toshiyuki MIWA[7], Masaki HATTORI[8], Toshihiko OSAWA[9] ([1]Hamamatsu Photonics CRL, [2]Nakatsugawa Munic Gen Hosp CM, [3]Nakatsugawa Munic Gen Hosp, [4]Tokyo Metropolitan Tama Med Ctr, [5]Nippon Med Sch, [6]the Univ of Tokyo, [7]Hamamatsu Photonics ETD, [8]Hamamatsu Photonics GSCC, [9]Aichi Gakuin Univ)

【目的】超高齢社会に突入した日本では、医療費の増大が大きな問題となっている。解決策の一つとして「予防医療」に大きな期待が寄せられており、病気を発症する前の兆候を察知でき、「食」や「運動」による軽微な効果が判別出来る指標が求められている。そこで我々は、自然免疫の最大の担い手である好中球に着目し、疾患発症や老化促進に関与する活性バランスの乱れ（酸化ストレス、免疫低下等）を早期に簡便に検出できる手法の開発に取り組んだ。これまで、複数のパイロットスタディによる本手法の有効性の検証について報告してきた。今回は、慢性炎症性疾患患者を対象とした臨床試験により発見した新しい指標について報告する。
【方法】好中球の活性化指標となるスーパーオキシド（$O_2^{\cdot-}$）産生とミエロペルオキシダーゼ（MPO）活性を、$O_2^{\cdot-}$検出用化学発光試薬 MCLA による化学発光と、次亜塩素酸イオン（OCl^-）検出用蛍光試薬 APF による蛍光の、二つの光情報に変換して検出する技術を開発した。指先からランセットを用いて自己採取した極微量の血液中の好中球活性を、細胞分離することなく希釈のみで測定可能とするために、赤血球や血液中の夾雑物による影響を最小限にした光学系として新たにディスポーザブルの樹脂製角型計測セルと計測装置を開発した。本システムを用いて、中津川市民病院の協力を得て研究参加への同意が得られた下肢閉塞性動脈硬化症患者 30 名の末梢血管カテーテル治療前と治療 1 ケ月後の好中球活性を評価した。また、日本医科大及び多摩総合医療センターの協力を得て研究参加への同意が得られた重症筋無力症患者 26 名の好中球活性を評価した。
【結果】動脈硬化症患者の治療前の測定結果では、好中球活性化剤である PMA を添加してから$O_2^{\cdot-}$及びOCl^-産生が始まるまでの時間が、健常者と比較して有意に遅い（平均比較で 1 分以上）ことが判明した。重症筋無力症患者でも同様の傾向がみられ、また産生開始が遅くなるにつれて産生量を表す積算値が小さくなる傾向がある事も判明した。さらに、昨年報告した 1000 名の横断研究においても、加齢とともに産生開始が遅くなり積算値が小さくなる傾向が確認された。これは、慢性的な炎症状態に晒されることにより、新たな刺激に対する好中球の反応が鈍くなっているためと考えられ、現在細胞試験等でメカニズム解明を進めている。様々な疾患の原因となる慢性的な炎症性の変化を反映する新たな指標として確立できれば、有効な未病マーカーとして予防医療に貢献できると考えている。
本研究は、(国研)農業・食品産業技術総合研究機構、SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」（管理法人：生研支援センター）によって実施された。

in vivo, presymptomatic disease, innate immune response

発表責任者：數村公子（kimiko-k@crl.hpk.co.jp）

講演番号：3A06p05
講演日時：3 月 27 日 14:34～ センター2 号館 A06 会場

ハニーブッシュ抽出物が sIgA 産生に及ぼす影響の解析

The effects of Honeybush extracts on sIgA production

○増田 美咲[1]、ジュベール エリザベス[2]、三浦 豊[1] ([1]農工大農、[2]農業研究評議会)
○Misaki MASUDA[1], Elizabeth Joubert[2], Yutaka Miura[1] ([1]Tokyo University of Agriculture and Technology, [2]Agricultural Research Council)

[背景・目的] ハニーブッシュは南アフリカ原産のハーブであり、我が国でも消費量が増加しつつある。ハニーブッシュ抽出物中に含まれる成分は抗炎症作用や抗酸化作用、抗糖尿病作用などを持つことが報告されている。このことからハニーブッシュは機能性食品として注目されており、その抽出物は実際に抗酸化作用や抗肥満作用、皮膚保護作用などを有することが示されている。我々は生体防御能に焦点を当て、ハニーブッシュ抽出物の摂取が腸管免疫応答を担う sIgA 産生能に及ぼす影響について検討を行ってきた。その結果、脾臓細胞にハニーブッシュ抽出物を添加すると、通常我々がハーブ茶として摂取している用量で sIgA 産生能が上昇する可能性が明らかとなった。そこで今回は実際にマウスにハニーブッシュ抽出物を摂取させた際の影響について検討を行った。
[方法] 4 週齢の Balb/c マウスを 3 日間馴化し、(1)通常飼料を与える CON 群、(2)通常飼料に *Cyclopia genistoides* 由来のエタノール抽出物 ARC190 を 0.01%の割合になるように加えた飼料を与える LD 群、(3)0.1%になるように抽出物を加えた飼料を与える HD 群に群分けを行った。その後各群にそれぞれの飼料を 9 週間摂取させ、脾臓、腸間膜リンパ節、小腸内容物、盲腸内容物、糞便を採取した。脾臓、腸間膜リンパ節はそれぞれを摘出した後、sIgA 産生細胞への分化を促す LPS、TGF-β、IL-2 をそれぞれの濃度が 0.2μg/ml、0.4ng/ml、2ng/ml になるように添加した群(Inducer(+)群)と添加しない群(Inducer(-)群)を作製し、7 日間培養した後に上清を回収し、ELISA 法により各群における sIgA 産生量の測定を行った。小腸内容物、盲腸内容物、糞便については PBS 中で懸濁し、遠心分離したものの上清を回収し、Bradford 法による糞便中タンパク質濃度の測定と、ELISA 法による sIgA 濃度の測定を行った。
[結果]それぞれの sIgA 産生量及び含有量の測定を行った結果、CON 群と比較して LD 群、HD 群で糞便中の sIgA 含有量に有意な増加が見られ、in vitro で観測された抽出物の作用が経口摂取においても見られることが確認された。一方で、脾臓細胞の sIgA 産生量は誘導剤を加えない Inducer(-)群において、CON 群と比較して HD 群で有意な減少が見られた。また、腸間膜リンパ節細胞の sIgA 産生量は Inducer(-)群、Inducer(+)群共に 3 群間で有意な差は見られず、盲腸内容物及び小腸内容物のタンパク質 1g 中の sIgA 含有量についても 3 群間で有意な差は見られなかった。以上の結果より、経口摂取したハニーブッシュ抽出物が腸管に作用することで、生体防御能を向上させる可能性が示唆された。現在 sIgA 産生誘導の上昇効果が抽出物中のどの成分によるものであるかや、ハニーブッシュ抽出物による sIgA 産生誘導のメカニズムについて検討を行っており、その結果も合わせて報告する。

IgA, immunity, HoneyBush

発表責任者：三浦豊（eiyouym@cc.tuat.ac.jp）

講演番号：3A06p06
講演日時：3 月 27 日 14:45～ センター2 号館 A06 会場

緑茶カテキン EGCG の血管内皮細胞由来細胞外小胞を介した生体調節作用

The effects of green tea polyphenol EGCG are mediated by small extracellular vesicles microRNAs derived from endothelial cells

○小川 史代、疋田 愛、両角 麻衣、熊添 基文、藤村 由紀、立花 宏文（九大院農院・生機科）
○Fumiyo OGAWA, Ai HIKIDA, Mai MOROZUMI, Motofumi KUMAZOE, Yoshinori FUJIMURA, Hirohumi TACHIBANA (Kyushu Univ.)

【目的】緑茶カテキンの主成分である（－)-epigallocatechin-3-*O*-gallate（EGCG）は抗がん作用や抗炎症作用など様々な生体調節作用を発揮する。また、EGCG の受容体である 67 kDa Laminin Receptor (67LR)は、内皮細胞で高発現することが知られている。一方、細胞外分泌小胞（small extracellular vesicle, sEV)は血中を循環し、標的組織に取り込まれることで生体調節作用を発揮すること、また、その生理作用には sEV に内包されたマイクロ RNA （miRNA） が深く関与することが報告されている。本研究では、EGCG の生体調節作用に内皮細胞由来 sEV 中の miRNA が関与しているのではないかと考え、EGCG で処理した血管内皮細胞が分泌する sEV 内の miRNA 発現およびその機能の解析を行った。

【方法および結果】蛍光染色したヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC 由来 sEV を C57BL/6 マウスに尾静脈投与し、臓器指向性を生体イメージング装置にて解析したところ、HUVEC 由来 sEV は肺に多く取り込まれた。EGCG が HUVEC の miRNA 発現調節作用に与える影響を評価するため、EGCG 処理した HUVEC 由来 sEV における miRNA 発現をマイクロアレイ （3D-Gene® Human miRNA Oligo chip） にて解析した。その結果、EGCG 処理した HUVEC 由来 sEV において複数の miRNA の発現が上昇し、発現が低下する miRNA は観察されなかった。EGCG の sEV を介した生体調節作用を検討するため、血管内皮細胞由来の sEV miRNA のうち、EGCG により有意に発現上昇し、かつ、線維化抑制作用が期待できる miRNA に着目した。ヒト胎児肺由来線維芽細胞 HFL-1 に各 miRNA mimic を導入後、TGFβを添加し、線維化の指標である Fibronectin および α-smooth muscle actin（αSMA）の遺伝子発現量を測定した。その結果、TGFβ誘導性の Fibronectin, αSMA の両方の発現量を低下させる miRNA が複数見つかった。

【結論】EGCG はヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC の sEV における miRNA の発現を上昇させることが示された。また、EGCG により発現上昇した血管内皮細胞由来 sEV 中の miRNA が線維化抑制作用を有する可能性が示された。

EGCG, sEV, microRNA

講演番号：3A06p07
講演日時：3 月 27 日 15:06～ センター2 号館 A06 会場

マウス大腸粘膜固有層単核球において 1 ーケストース摂取により増加した microRNA が T 細胞の遺伝子発現に及ぼす影響

Effect of microRNA increased by dietary 1-kestose in murine large intestinal lamina propria lymphocytes on the gene expression in T cells

○逢坂 文那[1]、門田 吉弘[2]、栃尾 巧[2]、園山 慶[1]（[1]北海道大農、[2]物産フードサイエンス）
○Fumina OHSAKA[1], Yoshihiro KADOTA[2], Takumi TOCHIO[2], Kei SONOYAMA[1]（[1]Hokkaido Univ., [2]B Food Science Co., Ltd.）

【背景・目的】microRNA（miRNA）は約 20 塩基のノンコーディング RNA であり、RNA 誘導サイレンシング複合体(RISC)を介して標的遺伝子の発現を制御する。我々はこれまでに、フラクトオリゴ糖(FOS)の一種である 1-ケストース（KES）の摂取がマウス大腸の粘膜固有層単核球（LPL）の miRNA プロファイルを変化させること、FOS の摂取がマウスの小腸および大腸の LPL における Th17 および Treg の割合を増加させることを観察した。そこで本研究では、KES 摂取により増加した LPL の miRNA のうち代表的な miR-X に着目し、これの過剰発現が T 細胞における mRNA 発現におよぼす影響を調べた。
【方法】AIN-93G 飼料を摂取させた C57BL/6JJcl マウスの盲腸および結腸から LPL を分離し、磁気細胞分離により $CD4^+$T 細胞を得た。これを抗 CD3/CD28 抗体による刺激条件下で培養し、二本鎖の合成 miR-X mimic あるいは negative control（NC）mimic をリポフェクションにより導入した。３日間培養後に細胞を回収してトータル RNA を分離し、マイクロアレイにより mRNA プロファイルを解析した。
【結果】miR-X を導入した細胞では NC mimic を導入した細胞に比べて miR-X 発現レベルが高いことを RT-qPCR により確認した。また、RT-qPCR および培養上清の ELISA によりそれぞれ IL-2 mRNA および IL-2 レベルを比較したところ、抗 CD3/CD28 抗体供刺激により増加していたので、$CD4^+$T 細胞が活性化していると考えた。マイクロアレイ解析の結果、NC mimic および miR-X を導入した細胞の間に mRNA プロファイルの変化はみられず、活性化 $CD4^+$T 細胞において miR-X が過剰発現したとしてもトランスクリプトームレベルにおける変化は生じないことが明らかとなった。miRNA が RISC において翻訳レベルで遺伝子発現を制御することを考慮し、RISC を構成するタンパク質の一つである AGO2 に対する抗体を用いた免疫沈降後の mRNA プロファイルを解析中である。また、miR-X の過剰発現下において $CD4^+$T 細胞を Th1/2/17/Treg それぞれに分化誘導した際のサイトカインおよび転写因子の mRNA レベルについての解析を進めている。

microRNA, prebiotics, lymphocyte

講演番号：3A06p08
講演日時：3 月 27 日 15:17～ センター2 号館 A06 会場

腸内細菌叢への介入による腸管 GABA 濃度の変化とその作用
Effects of intervention in gut microbiota on intestinal GABA concentration
○池上 美音[1]、福本 凛太郎[1]、土居 玄武[1]、蛭田 莉央[1]、原田 岳[2]、何 方[2]、藤 佑志郎[1]、松藤 寛[1]、中西 祐輔[1]、高橋 恭子[1] ([1]日大生物資源、[2]タカナシ乳業（株）・商品研究所)
○Mion IKEGAMI[1], Rintaro FUKUMOTO[1], Genbu DOI[1], Rio HIRUTA[1], Gaku HARATA[2], Fang HE[2], Yushiro FUJI[1], Hiroshi MATSUFUJI[1], Yusuke NAKANISHI[1], Kyoko TAKAHASHI[1] ([1]Nihon Univ., [2]Takanashi milk products Co.,Ltd.)

[目的]
γ-アミノ酪酸(GABA) は、哺乳類における主要な抑制性神経伝達物質である。腸内細菌の中には GABA 産生能を有するものが存在することが知られているが、腸内細菌叢と腸管 GABA 濃度との関係や腸管内 GABA の生理作用については十分明らかにされていない。本研究では、腸内細菌叢への介入が腸管 GABA 濃度に及ぼす影響とその生理的意義を明らかにすることを目的とした。
[方法]
6 週齢の雌性 BALB/c マウスを 1 週間の馴化飼育の後、*Bifidobacterium bifidum* TMC 3115（3115）あるいは *Lactobacillus rhamnosus* GG(LGG)を 10^9 cfu/head にて 2 日に一度、2 週間経口投与した。対照群には生理食塩水を同様に経口投与した。各個体別に経時的に糞便を摂取し、また、投与 2 週間後に高架式十字迷路を用いた行動試験、血液および盲腸内容物の採取を行った。GABA 濃度の測定には、糞便を熱水/超音波処理して得た抽出液を用い、AccQ-Tag Ultra システム(Waters 社)による誘導体化反応を行った後、UPLC-MS/MS により分析した。一方、糞便および盲腸内容物より DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子配列の次世代シークエンスにより菌叢解析を行った。血清中のコルチゾール濃度、糞便抽出液および血清中のセロトニン濃度は ELISA で測定した。
[結果]
3115 投与群では投与開始後 2 週間にかけて、糞便中の GABA 濃度が上昇し、投与開始 2 週間後の GABA 濃度が対照群と比べて有意に高いことが明らかになった。さらに、十字迷路試験では 3115 投与群で対照群に比べてオープンアームへの侵入回数が上昇する傾向がみられた。LGG 投与群ではこれらの変化は確認されなかった。血清中のコルチゾール濃度、糞便および血清中のセロトニン濃度に各群間で顕著な差は認められなかった。また、16S rRNA 遺伝子配列を用いた菌叢解析により TMC3115 投与により特定の腸内細菌の減少が確認された。
[考察]
3115 の投与により腸管内の GABA 濃度が上昇することが明らかになり、さらに行動特性に影響を及ぼす可能性が示唆された。3115 株には既知の GABA 産生酵素遺伝子は存在せず、この作用は腸内細菌叢の変化を介すると推測され、3115 投与により GABA を消費する菌が減少する可能性が考えられた。

γ-aminobutyric acid, gut microbiota, Bifidobacterium

発表責任者：高橋　恭子（takahashi.kyoko@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3A06p09
講演日時：3 月 27 日 15:28～ センター2 号館 A06 会場

無菌 ODS ラットにおけるアスコルビン酸欠乏による腸管と肝臓での炎症様変化の解析

Ascorbic acid deficiency induces hepatic and intestinal expressions of inflammation-related genes in both SPF and germ-free ODS rats.

○川出 野絵、村井 篤嗣、鈴木 若奈、竹内 健三郎、小林 美里、堀尾 文彦（名古屋大院生命農）
○ Noe KAWADE, Atsushi MURAI, Wakana SUZUKI, Kenzaburo TAKEUCHI, Misato KOBAYASHI, Fumihiko HORIO (Nagoya Univ.)

【目的】ビタミン C であるアスコルビン酸（AsA）を生合成不能の ODS ラットにおいて、AsA が欠乏すると腸管で炎症性サイトカイン（IL-1β、IL-6）と CD68（マクロファージマーカー）の発現が上昇し、門脈血の IL-6 濃度も上昇する。また、AsA 欠乏により肝臓で急性期タンパク質（APPs）である C 反応性タンパク質（CRP）や α2 マクログロブリン（A2m）の発現が上昇する。よって、AsA 欠乏時には腸管で産生上昇した IL-6 が門脈を介して肝臓に作用し、APPs 発現を誘導すると考えられる。近年、腸管での炎症には腸内細菌が関与することが指摘されている。本研究では、AsA 欠乏時に起こる腸管や肝臓での炎症様変化に対する腸内細菌の関与を検証することを目的とし、無菌の ODS ラットを用いて AsA 欠乏時の炎症様変化の解析を行った。
【方法】無菌の ODS ラット（6 週齢、雄）に基本飼料（AsA 600mg/kg 添加）を与える対照群（GF-C 群）と AsA 無添加飼料を与える欠乏群（GF-D 群）とを設けて 18 日間飼育した。また、SPF 環境下で腸内細菌が存在する通常の ODS ラットを用いて、対照群（SPF-C 群）と欠乏群（SPF-D 群）とを設けて 18 日間飼育した。空腸、回腸下部、盲腸、結腸より 5 部位の粘膜と腸間膜リンパ節、パイエル板、門脈血を採取し、炎症性サイトカインと CD68 の発現について解析した。また肝臓を採取し、APPs の遺伝子発現量を測定した。
【結果】SPF-D 群では SPF-C 群に比べて、空腸では IL-1β、IL-6、TNFα、IL-7、LIF、CD68 の、回腸下部では LIF の、盲腸では IL-1β の、パイエル板では IL-7、CD68 の mRNA レベルが上昇していた。一方、GF-D 群については GF-C 群に比べて、空腸では IL-6 の、回腸下部では IL-7 の、盲腸と結腸では IL-6 の mRNA レベルが上昇あるいは上昇傾向を示した。さらに、門脈血の IL-6 濃度は GF-C 群に対して GF-D 群で上昇していた。肝臓では、GF-C 群に対して GF-D 群においても、SPF-C 群に対して SPF-D 群においても、APPs（CRP、A2m、他）の mRNA レベルがほぼ同様に上昇していた。
【結論】無菌の ODS ラットでも有菌の通常 ODS ラットと同様に、AsA 欠乏により腸管や肝臓での炎症関連因子の発現が上昇した。よって、腸内細菌非存在下でも AsA 欠乏により腸管や肝臓で炎症用変化が起こることが明らかとなり、腸管で産生された IL-6 が肝臓の APPs 発現を誘導することが示唆された。

ascorbic acid, inflammation, germ-free

講演番号：3A06p10
講演日時：3 月 27 日 15:39～ センター2 号館 A06 会場

Lactobacillus plantarum OLL2712 株の経口投与による高脂肪食を短期摂取したマウスの脂肪組織および腸管における抗炎症作用の検討

Anti-inflammatory effects on adipose tissue and intestine of mice fed short-term high-fat diet by oral administration of *Lactobacillus plantarum* OLL2712

○王 イバイ[1]、高野 智弘[1]、周 英ギョク[1,2]、王 蓉[1,2]、田之倉 優[1,2]、宮川 拓也[2]、足立（中嶋） はるよ[1]、八村 敏志[1]（[1]東大院農生科・食の安全研セ、[2]東大院農生科・応生化）

○Yimei WANG[1], Tomohiro TAKANO[1], Yingyu ZHOU[1,2], Rong WANG[1,2], Masaru TANOKURA[1,2], Takuya MIYAKAWA[2], Haruyo ADACHI(NAKAJIMA)[1], Satoshi HACHIMURA[1] ([1]Res. Cent. Food Safety, Univ. Tokyo, [2]Dept. Appl. Biol. Chem. , Univ. Tokyo)

【目的】近年、肥満によって慢性炎症状態が引き起こされることが報告されており、この炎症状態の持続が生活習慣病の増悪を招くと考えられている。乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* OLL2712 株は骨髄由来樹状細胞（DC）と腹腔マクロファージにおいて抗炎症性サイトカイン interleukin（IL）-10 の産生誘導能が高いことが報告され、炎症抑制作用を持つ可能性が考えられる。我々は肥満誘発性炎症の予防効果に注目し、短期間高脂肪食を摂取させた前肥満マウスに *L. plantarum* OLL2712 株を経口投与した。脂肪組織および腸管における炎症性変化を調べ、本菌株の抗炎症作用メカニズムを検討した。

【方法】C57BL/6 マウスに、脂肪分 60%カロリー比高脂肪食を計 4 週間自由摂取させた。高脂肪食摂食開始 1 週間後から、*L. plantarum* OLL2712 株加熱死菌体を 3 週間、1 日 1 回 4 mg を胃ゾンデにより経口投与し、対照群には滅菌水を同様に 3 週間経口投与した。実験最終日に、精巣上体脂肪組織（epididymal adipose tissue; EAT）と腸間膜脂肪組織（mesenteric adipose tissue; MAT）から免疫細胞を含む集団である間質血管細胞群（stromal vascular fraction: SVF）を分画した。フローサイトメトリーにより SVF の細胞表面分子を解析し、炎症性を示す M1 マクロファージおよび炎症抑制性を示す M2 マクロファージの割合を調べた。EAT SVF、MAT SVF と結腸から RNA を抽出し、各炎症性サイトカイン・ケモカインの発現量を qPCR 法で定量した。

【結果】本乳酸菌株の 3 週間の経口投与により、対照群と比較して EAT SVF における M2 マクロファージの割合が増加し、脂肪組織 SVF および結腸における炎症性サイトカインとケモカインの遺伝子の高発現が抑制された。特に、MAT SVF において、炎症性サイトカインである IL-1β と、マクロファージの浸潤に関わる C-C motif chemokine 2（CCL2）の発現が抑制された。これらの結果から、本乳酸菌株がマクロファージの浸潤を抑制して、肥満誘発性炎症を予防・緩和する可能性が示された。

anti-inflammation, adipose tissue, *Lactobacillus plantarum*

発表責任者：八村敏志（ahachi@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3A06p11
講演日時：3 月 27 日 15:50～ センター2 号館 A06 会場

β-Elemene alleviates the formation of fat tissue-related inflammation

○Yingyu ZHOU[1,2], Tomohiro TAKANO[1,2], Yimei WANG[1,2], Xuyang LI[2], Rong WANG[1,2], Haruyo ADACHI(NAKAJIMA)[1,2], Masaru TANOKURA[1,2], Takuya MIYAKAWA[2], Satoshi HACHIMURA[1,2]
([1]Res. Cent. Food Safety, Univ. Tokyo, [2]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. Tokyo)

【目的】The beneficial effects of β-elemene, which is a sesquiterpene contained in food substances, have been primarily reported in treating a series of tumors. Although strong relationships between inflammation and tumors have been observed, its anti-inflammatory function is poorly understood. In this study, we used a mouse model to examine the anti-inflammatory effects of β-elemene in high fat diet (HFD)-induced obesity, a kind of chronic inflammation focusing on adipose tissue and the intestinal immune system.

【方法】Male C57BL/6N mice were assigned to a control, HFD or HFD with 21 day-oral administration of β-elemene group. Flow cytometry analysis and real-time PCR were used to assay immune cell subsets' status and inflammatory cytokines' expression respectively in cells and tissues of each treatment group. In some experiments, β-elemene was added directly to cell cultures.

【結果】Oral administration of β-elemene inhibited the expression of the inflammatory cytokines TNF-α, IFN-γ, IL-1β, IL-6 and CCL2 while promoting the anti-inflammatory cytokines TGF-β1 and IL-10 in the stromal vascular cells (SVCs) of epididymal adipose tissue (EAT) and mesenteric adipose tissue (MAT) in obese mice. Similar results were obtained when β-elemene was added in vitro to LPS-simulated SVCs, which suggested that β-elemene could directly regulate inflammation-related cytokines in EAT and MAT of mice. Additionally, β-elemene feeding significantly decreased inflammation-dominant M1 adipose tissue macrophages and increased $Foxp3^{+}CD4^{+}$ T cells of EAT and MAT. In the jejunum tissue, oral administration of β-elemene up-regulated the expression of TGF-β1 and IL-10. For the intestinal immune system, we found that oral administration of β-elemene upregulated $Foxp3^{+}CD4^{+}$ T cells in mesenteric lymph nodes (MLN) and Peyer's patches (PP) and enhanced the gene expression of TGF-β1, RALDH2, integrin αvβ8 and IL-10 in $CD11c^{+}$ dendritic cells of MLN and PP in HFD-induced obesity model mice. Taken together, the results of this study suggested the therapeutic effects of β-elemene on treating experimental obesity-induced chronic inflammation by possibly acting directly to SVCs in adipose tissue and by modulating intestinal dendritic cell function, thereby adjusting the balance of immune cell populations in fat tissue through the generation of regulatory T cells in the intestinal immune system.

β-elemene, obesity, anti-inflammation

発表責任者：八村敏志（ahachi@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3A06p12
講演日時：3 月 27 日 16:01～ センター2 号館 A06 会場

酪酸は FBP1 を介して腸管上皮バリア機能を高める
Butyrate enhances the intestinal epithelial barrier function via FBP1

○宮下 采佳、浅野 かおり、杉 由高、中田 一彰、藤 佑志郎、大槻 崇、松藤 寛、中西 祐輔、花澤 重正、高橋 恭子（日大生物資源）
○Saika MIYASHITA, Kaori ASANO, Yutaka SUGI, Kazuaki NAKATA, Yushiro FUJI, Takashi OTSUKI, Hiroshi MATSUFUJI, Yusuke NAKANISHI, Shigemasa HANAZAWA, Kyoko TAKAHASHI (Nihon Univ.)

【目的】

腸管上皮バリア機能は抗菌ペプチドの産生やタイトジャンクションの形成を含む様々な要因によって維持され、その破綻は様々な疾患の要因となることが知られている。これまでに、腸内細菌代謝産物である酪酸に、抗菌ペプチドα-defensin 5 遺伝子の発現を増強させる作用があることを報告している。本研究では、酪酸によるα-defensin 5 の発現増強機構を明らかにすることを目的とした。

【方法】

ルシフェラーゼ遺伝子上流にα-defensin 5 遺伝子 5′領域を挿入したレポータープラスミドを腸管上皮細胞株 Caco-2 に導入し、酪酸 Na を添加してα-defensin 5 遺伝子の転写プロモーター活性に及ぼす影響を測定した。さらに、Caco-2 に酪酸 Na を添加し、ウエスタンブロッティングおよび定量リアルタイム PCR で FBP1 の発現を解析した。また、タイトジャンクション関連タンパク質である Occludin および Claudin-4 の発現をウエスタンブロッティングで解析した。マウス盲腸内容物中の酪酸濃度は、<3kDa 画分をメチルエステル化後に GC-MS により測定した。

【結果】

Caco-2 細胞を用いたレポーターアッセイの結果、α-defensin 5 遺伝子の発現は 1~5mM の酪酸濃度で強く増強され、低濃度および高濃度では逆に抑制された。腸内細菌叢が異なるマウスの盲腸内容物においてα-defensin 5 遺伝子の転写活性化能に違いが認められており、実際に、盲腸内容物中の酪酸濃度を測定した結果、これらのマウス間で有意な差があることが示された。また、α-defensin 5 遺伝子の転写活性化因子として以前に同定した FBP1 の発現を解析した結果、酪酸(1mM)を添加した Caco-2 細胞ではコントロールと比較して核画分における FBP1 の発現が有意に上昇した。一方、FBP1 の mRNA 発現には、酪酸添加による影響は認められなかった。したがって、酪酸によるα-defensin 5 遺伝子の発現増強には至適濃度が存在すること、その作用は転写後段階での FBP1 の発現上昇を介することが明らかになった。

FBP1 には、α-defensin 5 に加えタイトジャンクションタンパク質の発現を促進する機能があることをこれまでに明らかにしている。そこで、タイトジャンクションタンパク質の発現に及ぼす影響を評価したところ、至適濃度の酪酸を添加した Caco-2 細胞ではコントロールと比較して、Occludin と Claudin-4 の発現が上昇した。

以上の結果から、至適濃度の酪酸は、FBP1 を介して抗菌ペプチド産生およびタイトジャンクションの形成を促進することで腸管上皮バリア機能を高めると考えられる。

α-defensin 5, butyrate, tight junction

発表責任者：高橋恭子（takahashi.kyoko@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3A06p13
講演日時：3 月 27 日 16:21～ センター2 号館 A06 会場

IgE が腸管のメタボロームと炎症に及す影響についての解析
The influence of IgE on the development of inflammation and its associated metabolome in experimental allergic enteritis
○戸田 雅子[1]、Blanco Frank[2]、Barker-Tejeda Thomas Clive[3]、Perez Gordo Marina[3]、Rojo David[3]、Villasenor Alma[3]、Vieths Stefan[2]、Barber Domingo[3] ([1]東北大農、[2]ポールエーリッヒ研究所、[3]CEU サンパブロ大)
○Masako Toda[1], Frank Blanco[2], Thomas Clive Barker-Tejeda[3], Marina Perez Gordo[3], David Rojo[3], Alma Villasenor[3], Stefan Vieths[2], Domingo Barber[3] ([1]Tohoku Univ., [2]Paul-Ehrlich-Institut, [3]CEU San Pablo Uni.)

[Background] Allergic enteritis (AE) is a clinical phenotype of food-induced intestinal allergy. The major allergenic foods inducing AE is cow's milk, soy, hen's egg, and wheat. Compared to other phenotypes of the intestinal allergy, pathological mechanism of AE is not well known. Evidence has suggested that IgE is a poor prognostic factor of AE, although the onset of this disease is associated with non-IgE mediated mechanism. To investigate the role of IgE in the development of persistent AE, we used IgE knockin (ki) mice expressing the IgE heavy chain instead of IgG1 and analyzed their immunological and metabolic features in the inflammatory condition.
[Materials and Methods] BALB/c wild type (WT) mice and IgE ki mice received sensitization of ovalbumin (OVA) and egg white (EW) diet to develop clinical symptoms (e.g. reduction of body temperature) and AE. The levels of AE in mice were analyzed by histological analysis. Profiles of accumulated leucocytes in their AE tissues were analyzed by FACS. In addition, metabolome analysis using their stool samples were performed by GC-MS.
[Results] IgE ki mice developed higher levels of OVA-specific IgE and more severe clinical symptoms and AE than WT. FACS analysis showed an enhanced eosinophil ($CD11b^+SiglecF^+Ly6G^+$ cells) and neutrophil ($CD11b^+SiglecF^-Ly6G^+$ cells) accumulation in the inflamed tissues of IgE ki mice. Metabolome analysis showed that, among other many metabolites, the concentration of butyrate was reduced in IgE ki mice. Our results suggest that the role of IgE in the development of persistent AE is (i) the recruitment of inflammatory cells (i.e. eosinophils and neutrophils) into the inflamed tissues and (ii) adverse influence on gut microbiome producing butyrate, a short chain fatty acid promoting development of regulatory T cells.
[Conclusion] This study advances our knowledge about pathological mechanism for persistent AE and provides insight into a dietary strategy to suppress the development of such a disease, e.g. by taking diet increasing butyrate producing gut microbiome.

Allergy, metabolome, butyrate

講演番号：3A06p14
講演日時：3 月 27 日 16:32～ センター2 号館 A06 会場

海洋病原菌 *Vibrio metschnikoviili* の鉄吸収と増殖を阻害する化合物のスパイス抽出物からの探索

Screening of iron uptake and growth inhibitors of a marine pathogenic bacterium, *Vibrio metschnikoviili*, from spice extracts

○陸 鵬、王 夢瑶、神谷 岳洋、張 米敏、岡本 研、鈴木 道生、朝倉 富子、藤原 徹、永田 宏次（東京大学 大学院農学生命科学研究科）

○Peng LU, Mengyao Wang, Takehiro Kamiya, Mimin Zhang, Ken Okamoto, Michio Suzuki, Tomiko Asakura, Toru Fujiwara, Koji Nagata (Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo)

Vibrio. spp is considered as a genus of human infectious Gram-negative bacteria that exists mainly in seawater. The European Food Safety Authority (EFSA) has been highlighting the emerging threat of *Vibrio* spp. as a result of climate change. Specifically, the increased temperature of the surface seawater and the increased nutrients input in the ocean have led to a growing spread of the indigenous marine bacteria, *Vibrio* spp. causing outbreaks of seafood contamination. *V. metschnikovii*, though it is less frequently reported for causing diseases than *V. parahaemolyticus*, *V. cholera,* and *V. vulnificus*, will also be a potential emerging issue.

In *V. metschnikovii*, a unique periplasmic Fe^{3+} binding protein (Fbp) A is involved in iron uptake. The purpose of this study is to inhibit the growth of *V. metschnikovii* by inhibiting its iron uptake by VmFbpA protein. First, the compounds that can inhibit the Fe^{3+} binding by VmFbpA were screening from water extracts of 20 different spices. The water extracts of rosemary and cinnamon showed significant inhibitory activity toward VmFbpA. An active compound was identified and its mode of action was analyzed by UV-Vis spectroscopy, isothermal titration calorimetry (ITC), docking simulation, *etc*. Secondly, the growth inhibition of *V. metschnikovii* by the identified VmFbpA-inhibiting compound was assessed using the liquid culture method. The compound actually inhibited the growth of *V. metschnikovii*, but not that of *Escherichia coli.* This can be explained by the different iron uptake mechanisms between these bacterial species.

The modern medical challenge will be to discover new strategies to combat multidrug-resistant bacteria. The restriction of iron uptake is a promising way to inhibit the growth of pathogenic bacteria. The results obtained here demonstrated that the identified compound could be a promising anti-bacterial compound that specifically inhibits the growth of pathogenic bacteria with fewer effects on indigenous gastrointestinal bacteria.

Rosemarinic acid, VmFbpA, ABC transporter

講演番号：3A06p15
講演日時：3 月 27 日 16:43～ センター2 号館 A06 会場

ユーグレナ・グラシリス EOD-1 株の長期摂取における影響

Effects of long-term intake of Euglena gracilis EOD-1

○石橋 健一[1]、西岡 満智子[2]、大中 信輝[2]、髙橋 円[2]、山中 大輔[1]、安達 禎之[1]、大野 尚仁[1]([1]東京薬大薬、[2]神鋼環境ソリューション)
○Ken-ichi ISHIBASHI[1], Machiko NISHIOKA[2], Nobuteru ONAKA[2], Madoka TAKAHASHI[2], Daisuke YAMANAKA[1], Yoshiyuki ADACHI[1], Naohito OHNO[1] ([1]Tokyo Univ. of Pharm. and Life Sciences, [2]Kobelco Eco-Solutions Co.,Ltd.)

【背景と目的】

ユーグレナ・グラシリスは微細藻類の1種であり、近年、その機能性が注目されている。ユーグレナ・グラシリス EOD-1 株（EOD-1 株）は、主要 β-1,3-グルカンであるパラミロン（PM）を 70%以上の高い割合で含有する。我々はこれまでに、ヒト血中および唾液中に PM と反応性を示す抗体が存在すること、それらは男性を対象とした EOD-1 株の乾燥粉末含有カプセルの 4 週間の摂取試験により、力価が上昇することを報告した。また、β-グルカン受容体である dectin-1 は EOD-1 株由来の PM（EOD1PM）を認識し結合することを報告した。これらのことから EOD1PM は免疫系への作用が期待されている。一方、EOD-1 株の長期摂取における報告はまだない。そこで本研究では、EOD-1 株の長期摂取における安全性と抗 PM 抗体価への影響を評価した。

【方法】

健常者 40 名（男性 20 名、女性 20 名）を対象に、被験者を無作為に被験食群とプラセボ食群に分け、無作為化二重盲検プラセボ対照試験を実施した。被験食群には EOD-1 株の乾燥粉末 500 ㎎（EOD1PM として 350 ㎎）/日を含むカプセル、プラセボ食群にはデキストリンを含むカプセルを 12 週間毎日摂取させた。試験食摂取前（0 週）、試験食摂取から 4、8、12 週目に血液検査、尿検査等を行い、採取した唾液中の抗 PM IgA 抗体価等を測定した。

【結果】

EOD-1 株の乾燥粉末の摂取に伴う臨床上問題となる変動・有害事象は認められなかったことから、1 日当たり 500 ㎎の EOD-1 株の乾燥粉末（EOD1PM は 350 ㎎）を 12 週間連続摂取した際の安全性が確認された。また、唾液中の抗 PM IgA 抗体価は EOD-1 株摂取群においてプラセボ摂取群と比較して有意に上昇、維持されていたことから、EOD1PM は長期摂取においても感染防御能を向上・維持させる可能性があることが示唆された。

Euglena gracilis, paramylon, food safety

発表責任者：石橋健一（ishiken@toyaku.ac.jp）

講演番号：3A07a01
講演日時：3 月 27 日 09:30～ センター2 号館 A07 会場

米糠培地における麹菌培養条件による酵素生産能の違いについて

Analysis of enzyme productivity by the differences in culture conditions and components in *Aspergillus oryzae*

○飯泉 湧、相良 純一（金工大）
○Yu IIZUMI, Jun-Ichi SAGARA (kinkou Univ)

【目的】

麹菌（*Aspergillus oryzae*）は、日本の国菌に指定され、発酵産業の根幹となっており、中でも発酵食品は日本の伝統文化を伝える重要な食品となっている。麹菌は二次代謝産物の生産に関する遺伝子を有しており、様々な二次代謝産物を生産することができる。しかしながら、麹菌の代謝経路の詳細はすべて明らかにされていない。生育培地の成分の違いによる代謝産物の相違について検討することにより、生産する物質を産業および工業的に有効活用できることが期待されている。

一方、酒造産業で使用される麹は米を培地として麹菌を生育したものであり、この時に使用される米はお酒の質に合わせて 4~7 割磨かれている。そのため、大量の米糠が副産物として産出されている。米糠には油脂成分や水溶性成分の栄養成分が含まれているが、産業廃棄物として廃棄されている。本研究では、米糠に含まれている水溶性有用成分に着目し、米糠を培地として麹菌を培養し、生産された酵素を有効利用することを目的とした。

【方法と結果】

YPD 培地と米糠（未滅菌）YPD 培地、米糠（高熱滅菌）YPD 培地の液体培地を作製した。米糠 YPD 培地には米糠液の最終濃度を 5%と 10%とした。YPD 培地で増殖させた麹菌を植菌し、18 時間振盪培養を行った。その後、SDS-PAGE を用いて、生産されたタンパク質の相違の検討を行った。

SDS-PAGE の結果より、麹菌は YPD 培地と米糠培地とは異なるバンドが見られた。このことにより、麹菌は培地の異なる栄養成分によって、異なる物質を生産した。しかし、確認できたバンドは米糠に含まれている元々の成分の可能性がある。滅菌米糠は米糠の成分が失活していると考えられる。

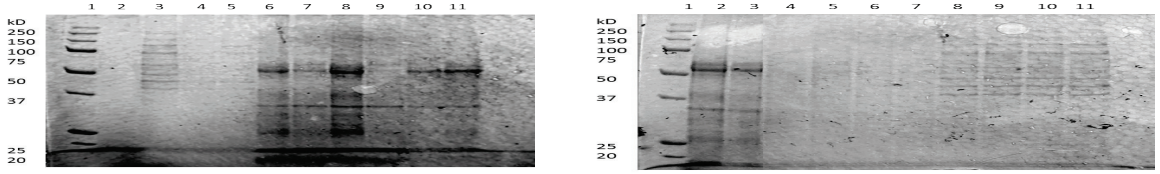


Figure. Right: Lane 1 Maker, Lane 2.3.4.5 YPD medium, Lane 6.7.8.9 rice bran YPD medium (10%), Lane 10.11 rice bran YPD medium (5%). Left: Lane 1 Maker, Lane 2.3 rice bran YPD medium (5%), Lane 4.5.6.7 rice bran sterilization YPD medium (10%), Lane 8.9.10.11 rice bran sterilization YPD medium (5%).

【今後の展望】

実験結果より、麹菌は米糠の成分によって YPD 培地では生産されていない物質を生産していると考えられる。今後、米糠の滅菌法や米糠の成分と麹菌が生産した物質の比較、菌体外だけではなく菌体内でのタンパク質生産能の違いを調べるとともに、高速液体クロマトグラフィー等によるタンパク質成分の同定を行い、米糠添加培地の有用性について検討を行う。

Aspergillus oryzae, rice bran, enzyme

発表責任者：飯泉湧（b1527375@planet.kanazawa-it.ac.jp）

講演番号：3A07a02
講演日時：3 月 27 日 09:41～ センター2 号館 A07 会場

紅麹色素高産生株の探索と機能性食品開発に関する研究

Studies on fungal red pigments high-producing strain of genus Monascus and development of functional foods

○喜屋武 大誠[1]、川野 喬之[1]、仲宗根 健一[1]、安田 正昭[2]、橘 信二郎[1]([1]琉球大農、[2]沖縄大健康栄養学部)
○ Taisei KYAN[1], Takayuki KAWANO[1], Kenichi NAKASONE[1], Masaaki YASUDA[2], Sinjiro TACHIBANA[1] ([1]Ryukyu Univ., Fac. Agric., [2]Okinawa Univ., Fac. Health Nutr.)

【研究背景・目的】

紅麹菌（*Monascus* 属）は、中国、台湾および琉球において古くから発酵飲食品の製造に利用されてきた食歴の長い有用食品微生物である。本菌の産生する色素を含む多様な二次代謝産物は、多面的な生理活性を有し、漢方やサプリメントとして利用されている。近年、合成着色料の発ガン性に対する懸念が広く知られるようになり、天然色素として紅麹色素が再び注目されている。紅麹色素の高産生株に関する研究は多数報告がある。また、培養時の培地組成や pH を制御することで色素産生能を向上できる技術なども報告されている。当研究室では、これまでに多数の紅麹菌株を単離し、その諸性質について調べてきた。本研究では、紅麹色素の高生産菌株のスクリーニングを行った。さらに、沖縄県では、泡盛蒸留後のもろみをもろみ酢として利用しているが、現状では未だに大量に破棄されていることから、機能性食品素材開発への応用を検討するため、紅麹菌の培養基質として蒸留粕を利用し、紅麹色素の産生能と機能性について調べた。

【方法】

紅麹菌寄託菌 34 株および研究室単離菌 5 株の計 39 株を供試菌株として用いた。各菌株の継代は PDA（pH 5.6）を用いて 30℃で 7～10 日間静置培養し、保管は 4℃で行った。液体培地には PD 培地（pH 5.6）、PD 培地組成に酵母抽出物を 1%添加した PDY 培地（pH 5.6）および泡盛蒸留粕を遠心分離して得られた上清を無調整のまま用い、30℃、200 rpm で旋回培養した。培養液を濾過し、各培地を対照として吸収スペクトルを測定して色素産生量を解析した。また、培養液の色素を TLC にて展開し、産生色素の性質について調べた。培養液の抗酸化活性は ORAC 法により測定した。

【結果】

各種液体培養による色素産生をスクリーニングした結果、菌体のみが赤色になる菌株が 4 株、培養液中に赤色色素が産生された菌株が 1 株それぞれ観察された。培養液中に色素を産生する菌株は研究室単離菌株の *Monascus* sp. B-3-1-1 であった。本菌株を、泡盛蒸留粕上清培地を用いて培養したところ、培養後期まで色素産生が保持されることが分かった。得られた培養ろ液を TLC で展開した結果、産生された赤色色素は高極性であることが示唆された。各培養液の抗酸化活性は、泡盛蒸留粕上清培地で培養したときに高い活性を示した。これらのことから、紅麹色素の高産生株が見出され、泡盛蒸留粕の選抜された紅麹菌株培養により、機能性食品展開への可能性が見出された。

Monascus, fungal pigments, antioxidant

講演番号：3A07a03
講演日時：3 月 27 日 09:52～ センター2 号館 A07 会場

界面バイオプロセスを用いた *Monascus* 色素の生産研究
Production of *Monascus* pigments in an interface bioprocess
○村川 穂奈美[1]、橘 信二郎[2]、岩月 正人[3]、渡邊 善洋[3]、小田 忍[1] ([1]金沢工大ゲノム研、[2]琉球大農、[3]北里生命科学研)
○Honami MURAKAWA[1], Shinjirou TACHIBANA[2], Masato IWATUKI[3], Yoshihiro WATANABE[3], Shinobu ODA[1] ([1]Kanazawa Inst. Technol., [2]Univ. Ryukyu, [3]Kitasato Univ.)

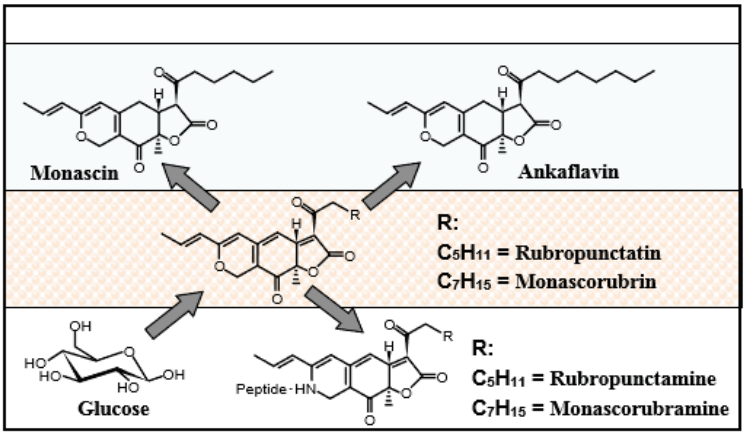
【目的】

Monascus 色素には、赤色色素 (rubropunctamine、monascorburamin)、オレンジ色素(rubropunctatin、monascorubrin)、黄色色素(monascin、ankaflavin)が含まれるが、特に黄色色素は抗アルツハイマー、抗高脂血症、抗肥満などの重要な生物活性を有している[1)]。本研究では界面バイオプロセス[2)]を用いて、培地組成ならびに培養条件の最適化を通じて黄色色素の高生産システムを開発することを目的とした。

【方法と結果】

Monascus purpreus B-3-1-1 株による黄色色素の生産性向上のため、界面バイオプロセスにおける培地組成、培養条件の最適化を図った。炭素源を fructose、窒素源を polypeptone とした場合に、最も多くの黄色色素が有機層(dimethylsilicone oil)中に蓄積した。本培養日数 1 日(前培養日数 3 日)での黄色色素の生産量は 400 ｎｍ の吸光度として 16.50 であった。また、同条件下でステンレスポット(180 ｍｍφ× 85 ｍｍ)をもちいて 3 週間培養をしたところ、カビマット表面に大量の黄色固形物の析出が確認された(overall yield = 223 mg/pot)。

以上の結果より従来の液体培養法と比べ、界面バイオプロセスを用いることで大量の *Monascus* 黄色色素の生産が可能であることが示唆された。



References

1) Zheng, Y., *et al.*, J. Agric. Food Chem.,**58**, 9523 (2010)
2) Oda, S. and Isshiki, K. Process Biochem.,**42**, 1553 (2007)

interface bioreactor, Monascus pigment, fermentation

発表責任者：小田　忍（odas@neptune.kanazawa-it.ac.jp）

講演番号：3A07a04
講演日時：3 月 27 日 10:03～ センター2 号館 A07 会場

Autophagy deficiency boosts the production of kojic acid in the filamentous fungus Aspergillus oryzae

○Junlin CHEN[1], Minoru YOSHIDA[1,2,3], Manabu ARIOKA[1,2] ([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]RIKEN CSRS)

[Background] Autophagy is a well-known recycling pathway induced by nutrient starvation in which cytoplasmic components and organelles are degraded via vacuoles/lysosomes. Autophagy is widely conserved in eukaryotes and plays a vital role in cell adaptation to stresses, thus promoting the survival of cells. In the previous study we demonstrated that *Aspergillus oryzae* mutants deficient in autophagy showed retarded growth, defect of aerial hyphae generation, and extremely low sporulation rate. Recently, we found that the expression of two genes involved in kojic acid (KA) production, *AO090113000136* (*kojA*) and *AO090113000138* (*kojT*), was highly elevated (50 times and 42 times, respectively) in Δ*Aoatg8*, an *A. oryzae* strain deleted for *Saccharomyces cerevisiae ATG8* ortholog. KA is a kind of secondary metabolites which is induced by nitrogen starvation. Despite its widespread application in the cosmetic industries, the molecular mechanism of KA biosynthesis is still obscure. Studies have shown that, in addition to *kojA* and *kojT*, *kojR* is also involved in KA biosynthesis, and they form a gene cluster in which these three genes encode a catalytic enzyme, a transporter, and a transcription factor, respectively.

[Methods] Conidia of Δ*Aoatg8*, Δ*Aoatg15*, and the control strain were inoculated onto KA-producing (nitrogen starvation) and non-producing solid media. The morphology and KA production of each strain were evaluated. After 3 days of incubation, qRT-PCR was performed to compare the expression level of KA-related genes.

[Results and Discussion] In two autophagy-deficient strains of *A. oryzae*, Δ*Aoatg8* and Δ*Aoatg15,* the production of KA was highly elevated in both nitrogen-depleted and -repleted conditions. Under nitrogen-depleted condition, while the control strain did not produce KA until the 6th day of incubation, Δ*Aoatg8* and Δ*Aoatg15* started to produce KA at the 2nd and 3rd day, respectively. In the nitrogen-repleted condition, both Δ*Aoatg8* and Δ*Aoatg15* started to produce KA at the 4th day, but no production was observed in the control strain up to the last day of incubation (9 days). The expression of *kojA* and *kojT* was also significantly increased in Δ*Aoatg8* and Δ*Aoatg15* under both nitrogen-depleted and -repleted conditions. It has been shown that, besides *kojA*, *kojT*, and *kojR*, 11 genes are related to KA biosynthesis. Interestingly, except 3 uncharacterized genes, other 8 genes are all related to sugar metabolism. Within these 8 genes, one gene predicted to encode a β-glucosidase showed significantly higher expression in Δ*Aoatg8* and Δ*Aoatg15* only in the nitrogen-depleted condition. The analysis of other genes is now being conducted. Taken together, these results suggest that in Δ*Aoatg8* and Δ*Aoatg15* KA production is induced by a more severe nitrogen starvation caused by malfunction of autophagy recycling system.

Autophagy, Kojic acid, Nitrogen starvation

発表責任者：Manabu ARIOKA（arioka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3A07a05
講演日時：3 月 27 日 10:14～ センター2 号館 A07 会場

Fusarium oxysporum 由来 *ycjR* を用いたプロトカテク酸の発酵生産
Fermentation of Protocatechuic acid by *ycjR* from *Fusarium oxysporum*
○勝木 希、桝尾 俊介、高谷 直樹（筑波大・生命環境・微生物サステイナビリティ研究センター）
○Nozomi KATSUKI, Shunsuke MASUO, Naoki TAKAYA (Univ. of Tsukuba, Life Environ. Sci., MiCS)

【背景・目的】
プロトカテク酸 (PCA)は医薬品、農薬、香料等の原料として利用されるとともに、プラスチック等の汎用化成品の原料としても期待されている芳香族化合物である。現在利用されている PCA の多くは石油を原料として生産されている。グルコースを原料とした PCA の微生物生産については様々な研究が行われており、3- dehydroshikimate (DHS) dehydratase を発現させた大腸菌等を用いてシキミ酸経路の中間代謝物であるデヒドロシキミ酸を PCA へと変換することで PCA を生産する手法が開発された。これまでに、*Klebsiella pneumoniae* の 3- DHS dehydratase をコードする *aroZ* 等の利用が報告されているが、他の生物由来の 3-DHS dehydratase を利用した PCA の生産の報告は少ない。本研究では、新規の AroZ 様タンパク質をコードする遺伝子を探索し、大腸菌に導入することによって、より高効率な PCA の発酵生産系の構築を試みた。
【方法・結果】
まず、3- DHS dehydratase として機能する既知の酵素を選抜し、それらとアミノ酸配列の相同性を示す推定酵素をデータベース上から探索した。具体的には、*Klebsiella pneumoniae* の 3- DHS dehydratase と 20%~50%の相同性を示す 8 種の微生物由来の *aroZ* 様酵素遺伝子を選抜した。これらをコードする遺伝子を大腸菌に導入し、得られた形質転換体を 48 時間培養後、培養上清を HPLC 解析に供し、PCA 生産の有無を判別した。その結果、*Podospora anserina* S mat 株、*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 4287 株の 3- DHS dehydratase をそれぞれ導入した株が PCA を生産することが確認できた。これらの株をフラスコを用いた培養によって、発現宿主、培地、温度条件の検討を行い、基質となるグルコースを逐次添加して培養を行った。その結果、DHS の生合成に関与する遺伝子である *aroG* を高発現させた大腸菌株をより多くの菌体量が得られる FB 培地を用いて、28℃の条件下でグルコースを原料として培養することによって 0.6 g L^{-1} の PCA を生産することができた。この条件下でジャーファーメンターを用いて培養を行ったところ、1.9 g L^{-1} の PCA を生産することができた。

fermentation, Protocatechuic acuid, *Fusarium oxysporum*

発表責任者：高谷直樹（takaya.naoki.ge@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3A07a06
講演日時：3 月 27 日 10:35～ センター2 号館 A07 会場

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるポリケチド生産への *kojA* プロモーターの使用：長期間生産への応用の見通し

Use of the *kojA* promoter, involved in kojic acid biosynthesis, for polyketide production in *Aspergillus oryzae*: implications for long-term production

○玉野 孝一[1,2]、國永 万保子[1]、小島 直[3]、梅村 舞子[1,2]、町田 雅之[1]、小池 英明[1]（[1]産総研生物プロセス、[2]産総研 CBBD-OIL、[3]産総研バイオメディカル）

○Koichi Tamano[1,2], Mahoko Kuninaga[1], Naoshi Kojima[3], Myco Umemura[1,2], Masayuki Machida[1], Hideaki Koike[1] ([1]AIST BPRI, [2]AIST CBBD-OIL, [3]AIST BMRI)

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は日本古来、日本酒・味噌・醤油といった様々な発酵食品の製造に利用されてきた有用な糸状菌である。本来、アミラーゼ・プロテアーゼ・リパーゼといった加水分解酵素の分泌生産能力が高く、しかも安全である。2005 年に全ゲノムが解読されたことにより、遺伝子のターゲッティングが可能になった。そこで代謝の改変により、従来の加水分解酵素以外にも、代謝産物で産業的に有用なものの生産への利用も、遺伝子組換え技術を用いて研究されてきた。

黄麹菌はコウジ酸という二次代謝産物以外は、二次代謝産物をほとんど生産しないことが知られている。したがって、他の糸状菌に比べて、有用な二次代謝産物を遺伝子組換えにより異種生産させる場合に、他の糸状菌よりも生産後の精製が容易であると考えられ、したがってクリーンな宿主として利用が期待される。特にコウジ酸を非生産にした変異株は、バックグラウンドとして作られる二次代謝産物がほとんどなくなる事から、野生株よりもさらに二次代謝産物の生産に適するものと考えられる。

二次代謝産物には医薬品として利用されていたり、利用の可能性があったりするものが多数存在している。そこでこれまでも黄麹菌による二次代謝産物生産の研究が行われてきており、それには一次代謝に関連した構成的で非常に強いプロモーターが利用されている。しかし二次代謝産物は一般的に、菌体増殖が定常期に到達して一次代謝が落ち着いた後、二次代謝が活性化して、培地中に残存している栄養源から合成される。そこで今回我々は、黄麹菌のコウジ酸生合成に関わる酵素遺伝子 *kojA* のプロモーターを、他の二次代謝産物であるポリケチド YWA1 の生産に適用した。また、宿主の黄麹菌には、従来使われている野生株よりもクリーンな宿主として、コウジ酸非生産の *kojA* 破壊株を使用した。その結果、*kojA* プロモーターは培養開始から 10 日目までの長期間にわたり、ポリケチド YWA1 を生産し続けることを見出した。コウジ酸は分子内に窒素原子を有しておらず、培地の窒素源が少ない条件下でのみ合成される発現制御を受けている。したがって、今回は *kojA* プロモーターを働かせるため、窒素源が少ないコウジ酸生産培地をポリケチド生産に用いた。ポリケチドも分子内に窒素を含まないことから、本研究では、ポリケチドやその他窒素非含有の代謝産物を黄麹菌で生産させる場合、*kojA* 破壊株と *kojA* プロモーターの使用はその長期間の生産に有意義であることを示すことができた。

本研究成果は Tamano *et al.* (2019) *BMC Biotechnology* **19**:70 にて論文報告済である。

Aspergillus oryzae, *kojA* promoter, long-term metabolite production

発表責任者：玉野 孝一（tamano-k@aist.go.jp）

講演番号：3A07a07
講演日時：3 月 27 日 10:46～ センター2 号館 A07 会場

Aspergillus nidulans の二次代謝とオルニチン代謝間における関連性
Analysis of relationships between secondary metabolism and ornithine metabolism in *Aspergillus nidulans*

○門岡 千尋[1,2]、浅井 禎吾[3]、森 一樹[4]、奥津 果優[2]、吉﨑 由美子[1,2]、髙峯 和則[1,2]、後藤 正利[1,5]、玉置 尚徳[1,2]、二神 泰基[1,2] ([1]鹿児島大院連農、[2]鹿児島大農、[3]東北大薬、[4]鹿児島高専、[5]佐賀大農)
○Chihiro KADOOKA[1,2], Teigo ASAI[3], Kazuki MORI[4], Kayu OKUTSU[2], Yumiko YOSHIZAKI[1,2], Kazunori TAKAMINE[1,2], Masatoshi GOTO[1,5], Hisanori TAMAKI[1,2], Taiki FUTAGAMI[1,2] ([1]Unit. Grad. Sch. Agric. Sci. Kagoshima Univ., [2]Fac. Agric., Kagoshima Univ., [3]Grad. Sch. Pharmaceutical Sciences, Tohoku Univ., [4]Nat. Inst. Tech. Kagoshima Col., [5]Fac. Agric., Saga Univ.)

モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* において、最少培地において生育が遅延し、コロニーの色調が変化した株を取得した。当該株を解析したところ、オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼをコードする *argB* の変異（*argB*^{mut}）を見出した。ArgB は、オルニチンとカルバモイルリン酸からシトルリンを合成する酵素である。*argB*^{mut} は、1038 番目の G が A に変異し、活性中心のコード領域より上流に未熟終止コドンが出現していた。また、*argB*^{mut} 株はコロニーの色調が変化したことから、二次代謝生産性が変化したと推察された。そこで本研究は、*A. nidulans* におけるオルニチン代謝と二次代謝の関連性について明らかとすることを目的とした。
A. nidulans に *argB*^{mut} を導入した株（*argB*^{mut} 株）は、アルギニン未添加の最少培地においてコントロール株（*argB*^{wt} 株）と比べて生育遅延を示すもののコロニーを形成した。一方、*argB* の活性中心のコード領域を欠損させた株は、アルギニン未添加の最少培地において生育できなかった。また、ArgB ^{mut} の本来の C 末端に S タグを融合させたタンパク質（ArgB ^{mut}-S）を発現させ、抗 S タグ抗体を用いたイムノブロット解析を行った結果、野生型 ArgB（ArgB ^{wt}-S）と同じ位置に弱いバンドが確認されたことから、*argB*^{mut} は未熟終止コドンをリードスルーして低発現した可能性が示唆された。次に、LC-MS/MS により二次代謝物を解析した結果、*argB*^{mut} 株は *argB*^{wt} 株と比較してステリグマトシスチン生産量が約 3%に低下し、オルセリン酸生産量が約 8 倍増加した。また、ArgB の基質であるオルニチン添加培地で培養した場合、*argB* ^{wt} 株においてもオルニチン未添加培地と比較して、ステリグマトシスチン生産量が約 30%に低下し、オルセリン酸生産量が約 8 倍増加した。そこで、オルニチン添加条件におけるステリグマトシスチンとオルセリン酸の生産に関与する遺伝子の発現を real time RT-PCR により比較した結果、ステリグマトシスチン合成に関与する *aflR* の発現が約 0.16 倍低下し、オルセリン酸合成に関与する *orsA* の発現が約 1.3 倍増加していた。以上の結果より、*argB* ^{mut} 株は ArgB の機能低下によりオルニチンが蓄積した可能性があり、オルチニンは *aflR* および *orsA* の遺伝子発現に関与する可能性が示唆された。

Aspergillus nidulans, orsellinic acid, ornithine

発表責任者：二神泰基（futagami@chem.agri.kagoshima-u.ac.jp）

講演番号：3A07a08
講演日時：3 月 27 日 10:57～ センター2 号館 A07 会場

麹菌におけるゲノム編集を利用した多重代謝改変による異種天然物生産性の向上
Productivity enhancement of heterologous natural products in *Aspergillus oryzae* by metabolic engineering based on multigene targeted-genome editing

○齋藤 直也[1]、片山 琢也[1,2]、南 篤志[3]、及川 英秋[3]、丸山 潤一[1,2]（[1]東大院・農生科・応生工、[2]東大・微生物連携機構、[3]北大院・理）
○Naoya SAITOH[1], Takuya KATAYAMA[1,2], Atsushi MINAMI[3], Hideaki OIKAWA[3], Jun-ichi MARUYAMA[1,2] ([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Grad. Sch. Sci., Hokkaido Univ.)

【目的】
麹菌 *Aspergillus oryzae* は近年、異種天然物の生合成研究に利用されており[1)]、今後工業的生産のための宿主としての利用も期待される。有用な天然物について工業的利用が見込める高い生産性を実現するためには、異種経路に代謝を集中させる必要があると考えられる。そのためには、異種生合成遺伝子群の導入に加え、さらなる多重の遺伝子改変が不可欠である。我々が確立した *A. oryzae* におけるゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 システムにより高効率な遺伝子改変が可能となり、さらにゲノム編集プラスミドのリサイクリングにより多重の遺伝子改変[2)]を行うことで、異種生産を行ったうえでの大規模な代謝改変を試みることが可能になっている。この技術によって、担子菌由来の抗生物質であるジテルペン pleuromutilin の 7 個の生合成遺伝子の導入による異種生産株の効率的な取得に成功した[3)]。本研究では、代謝経路に対する多重遺伝子改変を行うことによって、*A. oryzae* における異種天然物の生産性向上を目的とした。
【結果】
取得された pleuromutilin 生産株（収量 25.4 mg/L）を用い、異種天然物生合成につながる代謝経路について多重遺伝子改変を行った。メバロン酸経路の主要な酵素であり、*A. oryzae* では 5 個存在する HMG-CoA レダクターゼ(HMGR)遺伝子について、高発現プロモーターによる過剰発現を行った。真核生物で広く保存されている遺伝子にあたる *Aohmg1* については、フィードバック制御を解除するために膜貫通領域を除去して過剰発現を行い、他の 4 個の HMGR 遺伝子のうちの 1 個との二重過剰発現によって生産量が 2.3 倍まで増加した。また、上流のアセチル CoA の供給量を増やすためにアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子 *adh* の破壊を組み合わせた三重代謝改変株において 3.0 倍、さらに HMGR 遺伝子のコピー数を増加させることで生産量を 4.8 倍（収量 122.1 mg/L）まで増加させることに成功した。現在、異種経路に代謝を集中させるための遺伝子破壊および遺伝子のコピー数倍加による生産性のさらなる向上と、取得された高生産株の他の天然物生産への適用について検討している。

1) 南ら、日本醸造協会誌、Vol. 112、592-597 (2017)
2) Katayama *et al.* (2019) *Appl. Environ. Microbiol.*
3) 齋藤ら、日本農芸化学会 2019 年度大会講演要旨集 1D1a12

Aspergillus oryzae, genome editing, natural products

発表責任者：丸山潤一（amarujun@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3A07a09
講演日時：3 月 27 日 11:08～ センター2 号館 A07 会場

共培養による *Aspergillus niger* の黄色色素生産誘導の発見
Discovery of induction of yellow pigment production in *Aspergillus niger* by co-culture
○辻 晴佳[1]、二宮 章洋[2]、甲斐 建次[3]、浦山 俊一[2,4]、萩原 大祐[2,4] ([1]筑波大院・生命環境、[2]筑波大・生命環境系、[3]阪府大・生命環境、[4]筑波大・MiCS)
○ Haruka TSUJI[1], Akihiro NINOMIYA[2], Kenji KAI[3], Syun-ichi URAYAMA[2,4], Daisuke HAGIWARA[2,4] ([1]Grad. Sch. of Life and Env., Univ. of Tsukuba, [2]Fac. of Life and Env., Univ. of Tsukuba, [3]Grad. Sch. of Life and Env., Osaka Pref. Univ., [4]MiCS, Univ. of Tsukuba)

【背景・目的】 糸状菌には膨大な数の二次代謝産物の生合成遺伝子が存在する一方で、その大半は通常の培養条件では発現しない休眠状態であり、未利用のままである。この休眠遺伝子の発現を促す手法の一つとして、生物間の相互作用に着目した共培養が挙げられる。近年、糸状菌の共培養による新規二次代謝産物の発見が多数報告されているが、その分子メカニズムが解明された例はほとんどない。そこで本研究では、複数の *Aspergillus* 属糸状菌を組み合わせた共培養を行い、糸状菌の共培養による二次代謝誘導メカニズムの解明を目的とした。

【方法･結果】 我々は 4 種の *Aspergillus* 属糸状菌(*A. niger, A. fumigatus, A. nidulans, A. oryzae*)のうち 2 種を選んで寒天培地上で対峙培養すると、*A. niger* とその他の種との対峙面に黄色色素が生産されることを見出した。この黄色色素は、*A. niger* と他種 *Aspergillus* 属糸状菌を液体培地で共培養した場合でも産生し、特に菌体に蓄積されることが確認された。また、両者の分生子を混合して寒天培地に植菌し共培養した場合も、黄色色素が産生された。興味深いことに、いずれの条件においても培養初期に強く呈色し、培養の経過と共に黄色色素の減退が確認された。

この化合物の同定を目指し、色素が蓄積した菌体の粗抽出物を LC-MS 分析に供した。その結果、*m/z* 473 に分子イオンピークを与え、波長 400 nm 付近に極大吸収を示す化合物を発見した。この化合物が培養期間における色素の消長と一致して検出されることから、当該化合物の候補とした。また、本化合物は *A. niger* 単独培養でも微量ながら生産されていることが確認された。色素化合物の分子量をもとに対峙培養条件でイメージング MS を行ったところ、対峙面の菌糸先端及び *A. niger* 単独面の菌糸先端に分布を示した。このことから、当分子量の化合物の分布とともに、*A. niger* によって生産されることが明らかとなった。

続いて、当該化合物の生合成遺伝子を同定するために、RNA-seq 解析を行った。単独培養と比較して、共培養時に強く活性化する *A. niger* 二次代謝遺伝子クラスターを探索すると、一つのクラスターに候補が絞られた。今後は、このクラスターの遺伝子破壊株の作製により、当該化合物の生産の有無の確認から、生合成遺伝子の特定を行う予定である。

co-culture, *Aspergillus niger*, secondary metabolism

発表責任者：萩原大祐（hagiwara.daisuke.gb@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3A07a10
講演日時：3 月 27 日 11:19～ センター2 号館 A07 会場

トティウイルスによるイネいもち病菌のカビ毒テヌアゾン酸産生誘導
Totivirus-induced production of a mycotoxin tenuazonic acid in a rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*

○二宮 章洋[1]、浦山 俊一[1,2]、周防 玲[3]、藤 晋一[4]、森山 裕充[5]、萩原 大祐[1,2]（[1]筑波大生命環境、[2]筑波大 MiCS、[3]日大生物資源、[4]秋田県大生物資源、[5]東農工大農）
○Akihiro Ninomiya[1], Syun-ichi Urayama[1,2], Rei Suo[3], Shin-ichi Fuji[4], Hiromitsu Moriyama[5], Daisuke Hagiwara[1,2] ([1]Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, [2]MiCS, University of Tsukuba, [3]College of Bioresource Sciences, Nihon University, [4]Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University, [5]Department of Applied Biological Sciences, Tokyo University of Agriculture and Technology)

環境中の糸状菌にはしばしば RNA ウイルスが感染しており（菌類ウイルス），感染率は高いものでは 70%にも及ぶ。菌類ウイルスの性状解析は主に植物病原菌に感染するウイルスで進んでおり，近年，植物病原菌を宿主とする菌類ウイルスが宿主の毒素や色素の産生に影響を与えることが報告されている。[1], [2]糸状菌が産生する二次代謝産物が，植物と動物への感染や食品汚染に深く関与することを考慮すると，菌類ウイルスが糸状菌の二次代謝に及ぼす影響の評価は産業，医学，および公衆衛生の観点から重要であると言える。しかしながら，先述の研究例を除き，糸状菌の二次代謝に与える影響については未解明の部分が多い。そこで本研究では，イネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* を用いて，菌類ウイルスが宿主の二次代謝に与える影響を評価することを目的とした。

まず，4 種のウイルス（トティ，クライソ，ナルナ，パルティティ）が重感染したイネいもち病菌 *M. oryzae* APU10-199A-Q（4 重感染株），および，4 重感染株からトティとクライソが脱落した株 APU10-199A-D（2 重感染株）[2]を用いて，ウイルスが物質産生に与える影響を調べた。その結果，トティあるいはクライソ（あるいはその両方）の影響で，複数の化合物の産生量が増加，あるいは減少することが示唆された。本研究ではこれらの化合物のうち，ウイルスによって産生が誘導される化合物に着目し，当該化合物を MS および NMR データに基づきテヌアゾン酸と決定した。テヌアゾン酸は過去にイネいもち病菌や *Alternaria* 属糸状菌から見出されたカビ毒である。次に，テヌアゾン酸産生を誘導するウイルスを同定するため，2 重感染株に対してウイルス再感染実験をおこなった結果，トティウイルスが当該作用を有することが明らかになった。さらに，ウイルスが二次代謝関連遺伝子の発現に与える影響を RNA-seq によって解析した。その結果，トティウイルスによってテヌアゾン酸生合成遺伝子，[3]および，当該遺伝子の発現を正に調節する転写因子[4]が活性化することが明らかになった。また，クライソウイルスによって機能未知のテルペン生合成酵素の発現が抑制されることが示唆された。以上の結果から，トティウイルスがテヌアゾン酸生合成遺伝子の転写因子を正に調節することで，潜在的な当該化合物の産生能を活性化することが示された。

[1] Okada, R. *et al*. *Virology* **519**, 23−32, (2018), [2] Higashiura, T. *et al*. *Virology* **535**, 241−254, (2019), [3] Yun, C.-S. *et al*. *Nat*. *Commun*. **6**, 8758, (2015), [4] Yun, C.-S. *et al*. *ACS Chem*. *Biol*. **12**, 2270−2274, (2017).

mycovirus, *Magnaporthe oryzae*, tenuazonic acid

発表責任者：萩原大祐（hagiwara.daisuke.gb@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3A07a11
講演日時：3 月 27 日 11:40～ センター2 号館 A07 会場

Aspergillus terreus のイタコン酸生産に及ぼす金属イオンの影響（第 3 報）
Effect of metal ion on itaconic acid production in *Aspergillus terreus* (3rd report)
柿崎 徹也[2]、南 智之[2]、浜田 勇和[2]、吉川 侑太朗[1]、江場 祐貴[1]、横前 滉太[1]、○林 大三[1]、金政 真[1,2] ([1]中部大・環生科、[2]中部大院・応生)
Tetsuya KAKIZAKI[2], Tomoyuki MINAMI[2], Hayato HAMADA[2], Yutaro YOSHIKAWA[1], Yuki EBA[1], Kota YOKOMAE[1], ○Daizo HAYASHI[1], Shin KANAMASA[1,2] ([1]Dept. Envi. Biol., Chubu Univ., [2]Grad. Sch. Biosci. Biotech., Chubu Univ.)

【背景・目的】イタコン酸は不飽和基を有する二価の水溶性有機酸である。その構造から重合や共重合によって線状高分子を形成できる特性があり、合成樹脂や接着剤等、工業製品の原料や添加剤として幅広く利用されている。イタコン酸の工業生産には生産速度の観点からもっぱら *A. terreus* が使用されている。我々は、これまでに本菌においてイタコン酸はクエン酸回路において生成するシス・アコニット酸を基質としてシス・アコニット酸デカルボキシラーゼ（CAD）により生成されることを、CAD をコードする *CAD1* 遺伝子の解析を通じて明らかにした。*A. terreus* におけるイタコン酸生産性は培地の pH、金属イオンや塩類の濃度に影響されることが知られている。しかし，イタコン酸の生物学的機能は不明な点が多く、その生合成制御等が明らかになればイタコン酸の機能の一端を解明できると期待される。我々は、イタコン酸と金属イオンの関係およびイタコン酸の静菌作用に着目した。本研究では、イタコン酸が有害な重金属イオンをキレートすることや、他の菌の生育を阻害することによって生体防御に役立っていると仮定して、各種金属イオンがイタコン酸生産性に与える影響を調べた。また、イタコン酸高生産性変異株のゲノムの変異部位を次世代シーケンサーにて特定し、変異のあった代謝酵素の活性の変化を調べた。
【方法・結果】前培養した *A. terreus* を、ポテトデキストロース培地を基本とし、酸性および中性の pH にて、鉄、マンガン、銅、コバルトおよびニッケルの各金属イオンを含む培地にシフトして培養を行った。培養後、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて培養液のイタコン酸濃度を定量した。その結果、コバルトイオンおよびニッケルイオンによりイタコン酸の生産性が大きくなった。また、実験を行った金属イオン全てにおいて、添加によりイタコン酸生産が遅れる傾向が見られた。
　次いで、前培養した大腸菌および枯草菌を、イタコン酸を含む培地にて培養し、経時的に濁度計を用いて培養液の濁度（OD 値）を測定した。その結果、イタコン酸濃度に依存して大腸菌および枯草菌の生育抑制が見られた。
　さらに、イタコン酸高生産性変異株のゲノム解析によりリンゴ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子に変異が入っていることが分かった。そこで、リンゴ酸デヒドロゲナーゼの活性測定を行った。その結果、野生株と変異株で明確な活性の違いは見られなかったことから、他の変異部位がイタコン酸生産性に影響していると考えられた。

itaconic acid, *Aspergillus terreus*, metal ion

発表責任者：金政　真（kanamasa@isc.chubu.ac.jp）

講演番号：3A07a12
講演日時：3 月 27 日 11:51～ センター2 号館 A07 会場

糸状菌が生産する適合溶質エクトインに関する研究

Study of conpatible solute ectoine produced by filamentous fungi

○土谷 敬多郎[1]、榔野 準希[2]、村田 紋奈[2]、山下 暁史[2]、山口 大輝[2]、佐藤 龍一[3]、小島 千怜[1]、堤内 要[2,3]、金政 真[1,2]([1]中部大・環生科、[2]中部大院・応生、[3]中部大・応生化)
○ Keitaro TSUCHIYA[1], Junki NAGINO[2], Ayana MURATA[2], Akihumi YAMASHITA[2], Daiki YAMAGUCHI[2], Ryuichi SATO[3], Chisato KOJIMA[1], Kaname TSUTSUMIUCHI[2,3], Shin KANAMASA[1,2] ([1]Dept.Envi.Biol.Chubu Univ., [2]Grad.Sch.Biosci.Biotech.Chubu Univ., [3]Dept.Biol.Chem.Chubu Univ.)

【目的】生物は様々な環境ストレスから細胞を保護するために、ストレスの種類に応じた防御機構を有している。浸透圧ストレスは塩や糖などが高濃度の環境や低水分活性環境に生物が暴露されることによって引き起こされ、細胞外に水が移動するのと同時にナトリウムイオンなどホメオスタシスに必要な無機イオンの流出を促し、死に至らしめる。これを防ぐため、生物は様々な適合溶質(compatible solute）を細胞に蓄積することで浸透圧耐性を実現している。原核生物では、好塩細菌 *Ectothiorhodospira halochloris* 等においてエクトインが適合溶質として知られている。エクトインは環状アミノ酸構造の双性イオンであり、細胞外の塩濃度依存的に細胞内エクトイン濃度が調整されることで浸透圧耐性に貢献している。また、タンパク質、核酸、細胞膜等の生体高分子を安定化することにより、ストレスから細胞を保護すると考えられている。エクトインはその特性を活かして、タンパク質安定剤、化粧品添加物などにも応用されている。エクトインは複数の細菌に存在することが報告されているが、糸状菌を含め真核微生物には存在しないと長らく考えられてきた。しかし、我々はイタコン酸やロバスタチンの生産菌として知られる糸状菌 *Aspergillus terreus* を CE-MS により網羅的に解析し、さらに LC/MS/MS で詳細に解析することで、真核微生物として初めて生産を確認したことを 2018 年度の本大会で報告した。しかし、本菌を始めとする真核生物におけるエクトインについては解明すべき課題が多い。そこで本研究では、各種ストレス条件におけるエクトインやエクトインと関連する代謝物を分析したことや、他の糸状菌におけるこれら代謝物の生産性について調べた。
【方法、結果】塩ストレス等の各種ストレス条件で液体培養した *A. terreus* の菌体を回収し、乳鉢で破砕し、Bligh-Dyer 法にて精製した後に LC/MS/MS 分析を行った。その結果、エクトインや、細菌においてその前々駆体とされる L-2,4-ジアミノ酪酸を検出した。また、エクトインを前駆体として合成されるヒドロキシエクトインを検出した。これは真核微生物において初めての成果である。さらに、*Aspergillus nidulans* および *Aspergillus aculeatus* におけるこれら代謝物を分析したことについても報告する。

compatible solute, filamentous fungi, ectoine

講演番号：3A07a13
講演日時：3 月 27 日 12:02～ センター2 号館 A07 会場

ダイズおよび根粒菌における適合溶質の分析に関する研究
Study on compatible solute in *Glycine max* and *Bradyrhizobium japonicum*
○小島 千怜[1]、土谷 敬多郎[1]、榔野 準希[2]、村田 紋奈[2]、山口 大輝[2]、堤内 要[2,3]、佐藤 龍一[3]、金政 真[1,2] ([1]中部大・環生科、[2]中部大院・応生、[3]中部大・応生化)
○ Chisato KOJIMA[1], Keitaro TSUCHIYA[1], Junki NAGINO[2], Ayana MURATA[2], Daiki YAMAGUCHI[2], Kaname TSUTSUMIUCHI[2,3], Ryuichi SATO[3], Shin KANAMASA[1,2] ([1]Dept.Envi.Biol.Chubu Univ., [2]Grad.Sch.Biotech.Chubu Univ., [3]Dept.Biol.Chem.Chubu Univ.)

【目的】エクトイン（1,4,5,6-tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid）は浸透圧ストレスから細胞を保護するための適合溶質（compatible solute）の一つであり、好塩細菌 *Ectothiorhodospira halochloris* 等の細菌においてその存在が知られている。浸透圧ストレスは塩や糖などが高濃度の環境や低水分活性環境に生物が暴露されることによって引き起こされ、細胞外に水が移動するのと同時にナトリウムイオンなどホメオスタシスに必要な無機イオンの流出を促し、死に至らしめる。エクトインは環状アミノ酸構造の双性イオンであり、好塩細菌では細胞外の塩濃度依存的に細胞内エクトイン濃度が調整されることで浸透圧耐性に貢献している。また、タンパク質、核酸、細胞膜等の生体高分子を安定化することにより、ストレスから細胞を保護すると考えられている。エクトインは複数の細菌に存在することが報告されている。一方、真核微生物にエクトインは存在しないと考えられてきたが、我々は糸状菌 *Aspergillus terreus* からエクトインを初めて検出したことを 2018 年度の本大会において報告した。また、エクトインが持つ保護機能や保湿機能を活かして、タンパク質安定剤や化粧品添加物等に応用されている。さらに、エクトインは細胞成分を保護するヒートショックプロテインを誘導する機能や、経口投与により消化器官の炎症を抑える作用も報告されており、これらの機能利用も期待される。そこで、我々は身近な発酵食品に関わる生物に含まれるエクトインを分析してきた。我々は 2019 年度の本大会にて、ダイズにエクトインが含まれることを報告した。しかし、ダイズのゲノムには細菌のエクトイン生合成遺伝子と相同性の高い塩基配列は存在しない。そこで本研究では、ダイズに共生する細菌であるダイズ根粒菌に着目し、我々が改良した LC-MS/MS 高感度分析法を用いてエクトインの検出を試みたことを報告する。
【方法と結果】市販の乾燥大豆中のエクトイン分析を行うために、破砕および Bligh-Dyer 法による抽出・精製を行い、LC-MS/MS 分析を行った。また、液体培養したダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* を集菌し、凍結乾燥してから破砕および Bligh-Dyer 法による抽出を行い、LC-MS/MS で分析を行なった。その結果、乾燥大豆および根粒菌からそれぞれエクトインが検出された。これらの結果から、大豆（ダイズの種子）に含まれるエクトインは共生する根粒菌由来であると示唆された。

compatible solute, ectoine, soybeans

発表責任者：小島　千怜（fs16046-1813@sti.chubu.ac.jp）

講演番号：3A07p01
講演日時：3 月 27 日 13:50～ センター2 号館 A07 会場

環状バクテリオシン、ラクトサイクリシン Q の生合成遺伝子群の解析
Characterization of the biosynthetic gene cluster of a circular bacteriocin, lactocyclicin Q
○加唐 諭、星 優美、吉村 京一、高城 博也、沢 稔彦、園元 謙二、善藤 威史（九大院・農）
○Satoshi KAKARA, Yumi HOSHI, Kyoichi YOSHIMURA, Hiroya TAKI, Naruhiko SAWA, Kenji SONOMOTO, Takeshi ZENDO (Fac. Agric., Kyushu Univ.)

【背景・目的】乳酸菌が生産するバクテリオシンは、リボソーム上で合成される抗菌性のペプチドで、一般に近縁のグラム陽性菌に対して、低濃度で抗菌活性を示す。また、人の消化酵素や環境中で容易に分解されるため、耐性菌が出現しにくく、熱や幅広い pH に対して安定で、乳酸菌が長く食経験があることからも、食品保存料や医薬品への応用が期待されている。種々の乳酸菌バクテリオシンの中でも N/C 末端が結合した環状バクテリオシンは、一般的なバクテリオシンに比べて、より熱や幅広い pH に対して安定で、強い抗菌力や広い抗菌スペクトルを有するため、さらに広い用途への応用が期待される。先の研究において、乳酸菌 *Lactococcus* sp. QU 12 が生産する環状バクテリオシン lactocyclicin Q（LycQ）の生合成に関与する一連の遺伝子群 *lycQBCDXIEFGH* と、環状化、分泌、自己耐性を伴う生合成に必要な最小の遺伝群 *lycQBCDXI* が明らかにされた。また、*lycI* は自身を LycQ による抗菌活性から守る自己耐性を担う遺伝子であることが示唆された。本研究では、LycQ 生合成機構の解明を目的とし、各生合成遺伝子の機能をまず LycQ への自己耐性能に着目して解析した。
【方法】乳酸菌で構成的に働く P_{32} プロモーターを有する pMG36c を用い、LycQ 生合成遺伝子を種々の組み合わせで含む発現用プラスミドを作製した。各プラスミドを *Lactococcus lactis* NZ9000 に導入し、種々の LycQ 生合成遺伝子発現株を構築した。各発現株および空ベクターpMG36c を保持するネガティブコントロール株に対する LycQ の抗菌活性を spot-on-lawn 法で試験し、各株の自己耐性能を比較し、自己耐性に関わる遺伝子の特定を試みた。
【結果および考察】抗菌活性試験の結果、*lycC*、*X* を同時に含む *lycCX*、*BCX*、*CDX*、*BCDX* 発現株および *lycEFGH* 発現株は、LycQ への感受性が低下し、自己耐性能の上昇が認められた。これより、*lycC*、*X* が協調して自己耐性に関与していること、*lycEFGH* が独立して自己耐性を担うことが示唆された。データベース検索で LycC は ABC トランスポーターと高い相同性を示し、膜貫通予測においては LycC が可溶性タンパク質、LycX が膜貫通タンパク質という結果が得られたことから、LycC と LycX は複合体を形成して、排出型の自己耐性を担うことが推察された。また、LycF、LycG、LycH はいずれもトランスポーターを構成するタンパク質と高い相同性を示し、LycG のみ可溶性タンパク質であったことから、これらも複合体を形成し、排出型の自己耐性を担うことが推察された。以上により、単独で自己耐性能を示す LycI も加え、LycQ 生合成機構には 3 種の自己耐性機構が存在することが示された。排出型自己耐性機構には LycQ 分泌機構との関連が予想されており、さらに解析を進めている。

Bacteriocin, Lactic acid bacteria, Circular peptide

発表責任者：善藤威史（zendo@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3A07p02
講演日時：3 月 27 日 14:01～ センター2 号館 A07 会場

多成分バクテリオシントランスポーターEnkT の分泌機構の解明

Elucidation of the secretory mechanism of the multiple bacteriocin transporter, EnkT

○竹内 愛子、和田 夏美、須志田 浩稔、野見山 泰成、園元 謙二、善藤 威史（九大院・農）
○ Aiko TAKEUCHI, Natsumi WADA, Hirotoshi SUSHIDA, Taisei NOMIYAMA, Kenji SONOMOTO, Takeshi ZENDO (Fac. Agric., Kyushu Univ.)

【背景・目的】バクテリオシンとは、細菌のリボソーム上で合成される抗菌性ペプチドであり、低濃度で抗菌活性を示し、熱や酸に安定であるといった優れた特徴を有する。中でも乳酸菌の生産するバクテリオシンは、その安全性から食品保存料や医薬品への応用が期待されている。タイの発酵魚から分離された乳酸菌 *Enterococcus faecium* NKR-5-3 は、異なる 5 種のバクテリオシン enterocin NKR-5-3A, B, C, D, Z (Ent53A, B, C, D, Z)を生産する。一般に、バクテリオシンは菌体内で前駆体として合成され、それぞれに専用の ABC トランスポーターによってリーダーペプチドを切断され、活性型となり菌体外へ分泌される。しかし、本菌の有する ABC トランスポーターである EnkT は、Ent53A, C, D, Z の 4 種の前駆体のリーダーペプチド切断および活性型ペプチドの菌体外分泌を担う。さらに、EnkT は異種バクテリオシン enterocin A、lactococcin A および Q、pediocin PA-1 の分泌も可能であることが確認されており、その基質認識における高い寛容性から、EnkT を応用した様々なペプチドの分泌生産系の構築も期待される。先行研究において、EnkT の N 末端ペプチダーゼドメイン中の 3 つのαーヘリックス構造と 4 つの高保存性アミノ酸残基の重要性が明らかとなった。そこで、本研究では EnkT によるバクテリオシン分泌機構の解明を目的とし、重要部位の機能の特定を試みた。
【方法・結果】本研究では、Ent53C 前駆体構造遺伝子（*enkC*）、EnkT 遺伝子（*enkT*）、Ent53C に対する自己耐性遺伝子（*enkIc*)を *Lactococcus lactis* NZ9000 株に導入した Ent53C 発現株と、これを鋳型として構築された EnkT ペプチダーゼドメイン中のαーヘリックス構造破壊株、および各保存アミノ酸残基置換株を用いた。これらの変異株の培養液上清(菌体外画分)と菌体(菌体内画分)から Ent53C およびその前駆体が含まれると予想される画分を粗精製し、抗菌活性試験および LC/MS 解析を行うことで、各重要部位の変異による EnkT の基質認識やリーダーペプチド切断部位の特異性、切断活性への影響を評価した。LC/MS 解析の結果、Ent53C 発現株および抗菌活性が高い変異株の菌体外画分には、抗菌活性と相関した量の Ent53C が確認され、すべての株の菌体内画分に Ent53C 前駆体が確認された。Ent53C や Ent53C 前駆体とは異なる分子量のペプチドも菌体外および菌体内画分から検出されたものの、アミノ酸シーケンス解析の結果、Ent53C 前駆体由来のものではないことが確認された。以上より、各重要部位は切断部位の特異性には影響せず、基質となる Ent53C 前駆体全体の認識あるいは切断効率に関与することが示唆された。さらに、各重要部位による基質認識あるいは切断効率への関与の解明を目指し、EnkT ペプチダーゼドメインおよび基質ペプチドの精製を試みている。

transporter, protease, bacteriocin

発表責任者：善藤威史（zendo@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3A07p03
講演日時：3 月 27 日 14:12～ センター2 号館 A07 会場

部位特異的変異によるバクテリオシンの改変とその影響

Effects of site-direct mutagenesis on bacteriocins

○小山 遼[1]、PEREZ Rodney Honrada[1,2]、竹内 啓記[1]、園元 謙二[1]、善藤 威史[1] ([1]九州大農、[2]フィリピン大学・ロスバニョス校)
○Haruka KOYAMA[1], Rodney Honrada PEREZ[1,2], Haruki TAKEUCHI[1], Kenji SONOMOTO[1], Takeshi ZENDO[1] ([1]Fac. Agric., Kyushu Univ., [2]BIOTECH,Univ.the Philippines Los Banos)

【背景・目的】近年、医療現場や動物飼料への抗生物質の無秩序な使用により抗生物質耐性菌が急速に増加している一方、ここ 35 年間で新しいタイプの抗生物質の発見はなく、この問題に対する新たなアプローチが求められている。乳酸菌が生産する抗菌ペプチドであるバクテリオシンは、迅速かつ強力な作用機構や遺伝子変異による改変の容易さなどの特性から、新しい抗菌物質として有望と考えられる。当研究室で発見されたリーダーレスバクテリオシンである lacticin Q（LnqQ）と環状バクテリオシンである enterocin NKR-5-3B（Ent53B）は、いずれも 4 つのαヘリックス構造を有し、標的細菌に対して非常に強力な抗菌活性を示す。様々な分野への利用が期待されるが、改変によって抗菌活性がさらに向上する可能性もある。そこで本研究ではこれら 2 種の乳酸菌バクテリオシンを部位特異的変異によって改変し、抗菌活性に重要な部位を特定するとともに、抗菌活性の向上を目的とした。
【方法】LnqQ については、nisin 誘導プロモーターP_{nisA}を持つベクターである pIL-Pnis に LnqQ 構造遺伝子（*lnqQ*）を組み込んだプラスミドと、乳酸菌と大腸菌のシャトルベクターである pMG36c に生合成遺伝子群を組み込んだプラスミドを同時に発現させるデュアルプラスミド発現系、Ent53B については、pMG36c に Ent53B 構造遺伝子（*enkB*）と生合成遺伝子群を組み込んだシングルプラスミド発現系を用いて、*L. lactis* NZ9000 および *E. faecalis* JH2-2 をそれぞれ宿主とした各バクテリオシンの発現株を構築した。これらの発現系において、LnqQ と Ent53B の構造遺伝子に対して inverse PCR と NNK scanning などの手法を用いて部位特異的な変異導入を行い、抗菌活性への影響が予想された特定のアミノ酸残基を置換した改変体を生産する変異株の構築を試みた。取得された変異株について DNA シーケンス解析によってアミノ酸配列を確認した後、direct colony 法などによる抗菌活性試験を行い、変異による抗菌活性への影響を評価した。
【結果および考察】LnqQ においては、4 番目のαヘリックス端に存在する 40 残基目のアミノ酸であるアスパラギン酸のグルタミン酸への変異株（D40E）に WT の約 1.3 倍の活性が見られた一方、グリシンへの変異株（D40G）では活性の消失が見られた。Ent53B においては、2 番目のαヘリックス両端に位置する 25、32、35 残基目のバリン、33 残基目のスレオニン、2 番目と 3 番目のαヘリックス間に存在する 40 残基目のロイシン、42 残基目のスレオニンの変異株において抗菌活性の増強が見られた。これらの結果から、バクテリオシン活性におけるαヘリックス構造の重要性が示唆されたことから、さらにαヘリックス周辺領域の置換とその評価を試みている。

bacteriocin, site-directed mutagenesis, antimicrobial peptide

発表責任者：善藤威史（zendo@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3A07p04
講演日時：3 月 27 日 14:23～ センター2 号館 A07 会場

たくあん漬から分離した *Lactococcus lactis* PJR24 が生産するバクテリオシンの特性と精製

Characterization and purification of the bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* PJR24 isolated from pickled Japanese radish

○高橋 孝太郎[1]、河原 あい[1]、松崎 弘美[1,2] ([1]熊本県大院環境共生、[2]熊本県大環境共生)
○Koutaro TAKAHASHI[1], Ai KAWAHARA[1], Hiromi MATSUSAKI[1,2] ([1]Grad. Sch. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [2]Fac. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto)

【目的】乳酸菌が生産する抗菌性タンパク質のバクテリオシンは、安全な天然の食品保存料として期待されている。バクテリオシンの中で唯一食品保存料として使用が認められているナイシン A は、酸性領域でのみ安定で、グラム陰性菌に対しては単独では抗菌活性を示さない。そのため、新たな特徴をもつ新規バクテリオシンの探索が重要である。本研究では、熊本県阿蘇郡で製造された伝統的発酵保存食品のたくあん漬から分離した乳酸菌 *Lactococcus lactis* PJR24 のバクテリオシン生産における培養条件を検討し、生産されるバクテリオシンの精製および特性を調べることを目的とした。
【方法および結果】たくあん漬からバクテリオシン生産乳酸菌を分離し、16S rRNA 遺伝子の解析と生理学的特性評価（糖類資化性試験および乳酸発酵試験）から本菌を *Lactococcus lactis* PJR24 と同定および命名した。PJR24 株の培養液上清の抗菌スペクトルおよびナイシン構造遺伝子に特異的なプライマーによる PCR の結果から、PJR24 株はナイシン以外のバクテリオシンを生産すると予想された。そこで、*L. lactis* が生産する代表的な 10 種類のバクテリオシンの構造遺伝子（lacticin 3147, Q, RM および lactococcin A, B, 972, 513, M, G, Q）に特異的なプライマーを用いた PCR を行ったが、特異的増幅は見られず、PJR24 株は新規バクテリオシンを生産すると予想した。そこで、PJR24 株が生産するバクテリオシンを培養液上清から精製することにした。PJR24 株のバクテリオシン生産における培養条件を検討した後、PJR24 株を M17G 培地（100 mL）で、37˚C、100 strokes/min、18 h 培養した。次に、培養液上清に硫酸アンモニウム量を 70%飽和量で添加とした。続いて、MWCO 3,500 の透析膜を用いて透析した。この透析液の抗菌スペクトルを調べたところ、近縁種の細菌のみならず、*Listeria* 属細菌などに対しても抗菌活性を示した。トリシン SDS-PAGE およびゲルバイオアッセイから、PJR24 株バクテリオシンの分子量は約 10 kDa であった。これは一般的なバクテリオシンよりも比較的大きな分子量であった。次に、PJR24 株バクテリオシンの pH 安定性を調べた結果、pH 7-11 の範囲で安定であり、pH 3-11 の幅広い領域で、少なくとも 50%以上の抗菌活性を保持していることがわかった。現在、バクテリオシンの精製を進めている。

bacteriocin, lactic acid bacteria, *Lactococcus lactis*

講演番号：3A07p05
講演日時：3 月 27 日 14:34～ センター2 号館 A07 会場

味噌漬け豆腐由来 *Lactobacillus plantarum* PUK6 の多成分バクテリオシン遺伝子クラスターの解析
Analysis of the gene cluster encoding multiple bacteriocins of *Lactobacillus plantarum* PUK6 isolated from *tofu* pickled in *miso*.

○河原 あい[1]、善藤 威史[2]、松崎 弘美[3] ([1]熊本県大院環境共生、[2]九州大農、[3]熊本県大環境共生)
○Ai KAWAHARA[1], Takeshi ZENDO[2], Hiromi MATSUSAKI[3] ([1]Grad. Sch. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [2]Grad. Sch. Agric., Kyushu Univ., [3]Fac. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto)

【目的】食経験豊富な乳酸菌が生産する抗菌ペプチドのバクテリオシンは、食品の風味に影響を与えず無味無臭であること、ヒトの腸管内の消化酵素で分解されるなど安全性が高いことから、天然の食品保存料として期待されている。本研究では、熊本県球磨地方の伝統的発酵食品「味噌漬け豆腐」から分離した *Lactobacillus plantarum* PUK6 が生産する多成分バクテリオシンを精製・同定し、バクテリオシン構造遺伝子を含む遺伝子クラスターの塩基配列を決定および遺伝子解析を行うことを目的とした。

【方法および結果】*L. plantarum* PUK6 の培養液上清について、70%飽和硫安分画、透析（MWCO 1,000）、逆相 HPLC を用いてバクテリオシンを精製した。HPLC で得られた Fraction 1~7 について *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM1157^T を用いたバイオアッセイを行い、抗菌活性の見られた複数のピークについてアミノ酸配列分析を行った。その結果、plantaricin A, NC8β および F と相同性を示した。そこで、これらバクテリオシン遺伝子に特異的なプライマーを用いて PCR を行い、得られた増幅産物の塩基配列を決定した。その結果、plantaricin A, NC8 および EF の構造遺伝子を見出した。さらに、PCR によって PUK6 株の各バクテリオシン構造遺伝子は、*plnNC8*、*plnA* および *plnFE*（逆向き）の並びで位置していることが明らかとなった。これらの遺伝子の位置や BLAST 検索の結果から、PUK6 株の多成分バクテリオシンの構造遺伝子および生合成関連遺伝子は、これまでに報告されている *L. plantarum* の J51 株および 8P-A3 株の *pln* locus と同様の遺伝子クラスターを有していると考えられた[1)]。そこで、それらのゲノム情報を参考にプライマーを設計し、プライマーウォーキングによって、PUK6 株の plantaricin 生合成関連遺伝子群 *pln* locus（約 20 kb）の塩基配列を決定した。次に、PUK6 株 *pln* locus 上の遺伝子について、InterPro を用いたドメイン解析を行った結果、複数の推定 plantaricin 生合成関連遺伝子をさらに見出した。現在、各遺伝子の詳細な機能解析を進めている。

1) Navarro *et al*., *Int. J. Food Microbiol.,* 2008

lactic acid bacteria, bacteriocin, *Lactobacillus plantarum*

発表責任者：松崎弘美（matusaki@pu-kumamoto.ac.jp）

講演番号：3A07p06
講演日時：3 月 27 日 14:45～ センター2 号館 A07 会場

海底流木から分離された細菌が産生するバクテリオシン

Bacteriocins produced by a bacterium isolated from driftwood on deep-sea floor

○大町 一実[1]、小林 武志[1]、寺原 猛[1]、今田 千秋[1]、亀井 加恵子[2]、和久 友則[2]、長沼 毅[3] ([1]東京海洋大学、[2]京都工芸繊維大学、[3]広島大学)
○Hitomi OMACHI[1], Takeshi KOBAYASHI[1], Takeshi TERAHARA[1], Chiaki IMADA[1], Kaeko KAMEI[2], Tomonori WAKU[2], Takeshi NAGANUMA[3] ([1]Tokyo univ. of Marine science and tech., [2]Kyoto institute of tech., [3]Hiroshima univ.)

【目的】細菌類が産生する抗菌ペプチドであるバクテリオシンは、以前から食品分野において合成保存料に代わる保存料として期待されている。これまでの当研究室の研究で、南海トラフの海底流木より分離された *Virgibacillus salexigens* NT N53 株（以下本株）が産生する 2 種のバクテリオシンが、食中毒細菌 *Listeria monocytogenes* に対し抗菌活性を持つことが明らかとされてきた。本研究では両バクテリオシンの立体構造を推定するため、以下の実験を行うこととした。

【方法】本株を 5%NaCl-Tryptic Soy Broth を用いて培養した。この培養液から各種クロマトグラフィーに供して両バクテリオシンを精製した。バクテリオシンの完全なアミノ酸配列を明らかとするため、デブロッキング操作を行ったバクテリオシンを作製し、ペプチドシークエンサーに供した。また、本株 DNA を次世代シーケンサーによって解析し、その結果からバクテリオシンのアミノ酸配列を推定した。以上の結果とこれまでに得られていた MALDI-TOF MS などの情報を合わせて比較、検討を行った。さらに、高次構造解析を行うため精製バクテリオシンを円偏光二色性測定（以下 CD）に供した。得られた全アミノ酸配列の結果を用いてバクテリオシンの立体構造モデルを作成し、CD の結果と比較した。

【結果】デブロッキング操作の結果、不明瞭であった両バクテリオシンの N 末端側アミノ酸配列を解析することが出来た。また、次世代シーケンサーによる解析の結果、両バクテリオシンに対応する構造遺伝子がゲノム配列上に認められた。これらの結果と、これまでの当研究室の研究結果から、両バクテリオシンの全アミノ酸配列が明らかとなり、立体構造も推定することができた。

bacteriocin, *Virgibacillus salexigens*, antibacterial peptide

発表責任者：大町一実（htm.omachi@gmail.com）

講演番号：3A07p07
講演日時：3 月 27 日 15:06～ センター2 号館 A07 会場

発酵食品由来乳酸菌からのフェルラ酸エステラーゼ生産菌のスクリーニング

Screening of feruloyl esterases produced by lactic acid bacteria from fermented foods

○矢野 嵩典、中西 陽香、三井 亮司（岡山理大理）
○Takanori YANO, Haruka NAKANISHI, Ryoji MITSUI (Okayama Univ. of Sci.)

【目的】一部の乳酸菌は植物細胞壁からフェルラ酸などの機能性物質を遊離・生成する能力を有している。植物性発酵食品の原料（米、小麦、大豆）には細胞壁に結合した形でフェルラ酸が豊富に含まれているが、製造された発酵食品中に遊離態フェルラ酸やその類縁体が多く検出されたという報告は少ない。フェルラ酸エステラーゼ（FE）高生産菌を選抜し使用することで、植物性発酵食品製造時における乳酸菌酵素の活性を生かして食品中に含まれる遊離態フェルラ酸類の量を増やせると考えられた。以上の背景から、発酵食品由来乳酸菌からの FE 生産菌のスクリーニングを実施した。
【方法と結果】培養プレート上でクリアゾーン生成の有無により FE 活性（モデル基質のフェルラ酸エチルからフェルラ酸が遊離する活性）を判別する簡便なスクリーニング系を確立した。活性の強弱についても同時に調査するために、糖源としてのグルコースを含む培地と含まない培地を用意してスクリーニングに用いた。スクリーニングでは、NITE バイオテクノロジーセンター（NBRC）より入手した属および分離源の情報が開示されている発酵食品由来乳酸菌の RD 株（スクリーニング株）115 株を調査対象とした。また、グルコースの有無に関わらず酵素活性を示す強い FE 活性を有するヒト糞便由来 *Lactobacillus reuteri* NBRC 15892、グルコース有りの条件でのみ酵素活性を示す弱い FE 活性を有する漬物由来 *L. plantarum* を対照菌株とした。その結果、Lactobacillaceae（ラクトバシラス科）に属する菌株 11 株に FE 活性が認められた。内訳は *Lactobacillus* 属 8 株、*Pediococcus* 属 3 株であり、中でも *Lactobacillus* 属 2 株、*Pediococcus* 属 1 株は *L. reuteri* NBRC 15892 と同様に強い FE 活性を示した。FE 活性を示した乳酸菌において、分離源に明確な共通性は見られなかった。
さらに RD 株とは別に市販の生みそ・キムチを分離源として、集積培養法により植物性発酵食品から乳酸菌を分離し、培養性状などで乳酸菌と推定される 42 株を取得した。取得菌株を対象に FE 生産菌のスクリーニングを行った結果、*L. reuteri* NBRC 15892 と同様の強い FE 活性を示す株が 8 株、*L. plantarum* と同様の弱い FE 活性を示す株が 12 株得られた。全体の約 48%を占める 20 株が FE 保有菌であったことから、種類にもよるが発酵食品中には FE 保有菌が一定数存在することが明らかとなった。現在、本研究で見いだされた FE 高生産菌 11 株（RD 株 3 株、分離菌株 8 株）を対象に 16S rRNA 塩基配列に基づく微生物同定を行っている。

Feruloyl esterase, Lactic acid bacteria, Fermented food

発表責任者：矢野嵩典（tyano@dbc.ous.ac.jp）

講演番号：3A07p08
講演日時：3 月 27 日 15:17～ センター2 号館 A07 会場

Pseudomonas chlororaphis subsp. *aurantiaca* が生産するフェナジン誘導体による植物保護活性の解析

Biocontrol effect of phenazine derivatives produced by *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca*

○櫻岡 良平[1]、染谷 信孝[2]、諸星 知広[1] ([1]宇大院工、[2]農研機構)
○Ryohei SAKURAOKA[1], Nobutaka SOMEYA[2], Tomohiro MOROHOSHI[1] ([1]Grad. Sch. Eng., Utsunomiya Univ., [2]NARO)

【目的】蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌の多くは、植物病原菌に対する多様な抗菌物質を生産し、植物保護効果を発揮することが明らかになっている。本研究グループでは、シロツメクサから単離した蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌である *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* Tre132 株が、オレンジ色を示す複数種のフェナジン誘導体を生産し、植物病原性真菌の増殖を抑制可能であることを明らかにしている。本研究では、次世代シークエンサーを用いて Tre132 の全ゲノム配列を決定し、ゲノム情報を基に生産されるフェナジン誘導体の構造を明らかにするとともに、植物保護効果に対する主要な役割を示すフェナジン誘導体を特定することを目的とした。

【実験方法及び結果】次世代シークエンサーを用いて Tre132 株の全ゲノム配列を決定したところ、約 7 Mbp の単一の染色体から構成されていることが明らかとなった。全ゲノム配列からフェナジン誘導体生産経路を推察したところ、フェナジン誘導体生産のコア遺伝子である *phzA-phzG* により phenazine-1-carboxylic acid （PCA）が生産され、アクセサリー遺伝子である *phzO* により PCA から 2-hydroxy-PCA（2OH-PCA）と 2-hydroxyphenazine（2OH-PHZ）に変換される可能性が示唆された。Tre132 株培養上清からフェナジン誘導体を抽出し、HPLC により検出を行ったところ、推定経路と同じく PCA、2OH-PCA、2OH-PHZ の 3 種類の誘導体が検出された。次に、フェナジン誘導体生産のコア遺伝子を破壊した Δ*phzCD* 株、アクセサリー遺伝子を破壊した Δ*phzO* 株を作成し、培養上清中のフェナジン誘導体を解析したところ、Δ*phzCD* 株はフェナジン誘導体生産が完全に消失し、Δ*phzO* 株は PCA のみが検出された。これらの破壊株を用いて、植物保護効果を検証したところ、親株と比較して Δ*phzCD* 株は大幅に保護効果が減少したが、Δ*phzO* 株は親株との有意な差は生じなかった。以上より、Tre132 株では、アクセサリー遺伝子を通じて変換される 2OH-PCA、2OH-PHZ は主要な抗菌物質ではなく、PCA 生産のみで高い植物保護効果を示すことが明らかとなった。

Pseudomonas chlororaphis, phenazine, biocontrol

発表責任者：諸星知広（morohosi@cc.utsunomiya-u.ac.jp）

講演番号：3A07p09
講演日時：3 月 27 日 15:28～ センター2 号館 A07 会場

顕微ラマン多変量スペクトル分解法を用いた二次代謝産物 penicillin 及び avermectin の菌体内検出
In situ Detection of Penicillin and Avermectin in Microbes by Raman Microspectroscopy and Multivariate Analysis

○堀井 俊平[1,2]、安藤 正弘[3,4]、中島 琢自[3,5]、Ashok Samuel[3]、松本 厚子[5]、高橋 洋子[5]、竹山 春子[1,2,3,6] ([1]早大院先進理工、[2]産総研 CBBD-OIL、[3]早大ナノライフ創新研、[4]JST さきがけ、[5]北里大生命科学研、[6]早大先進生命動態研)
○ Shumpei HORII[1,2], Masahiro ANDO[3,4], takuji NAKASHIMA[3,5], Samuel Ashok[3], Atsuko MATSUMOTO[5], YOKO TAKAHASHI[5], HARUKO TAKEYAMA[1,2,3,6] ([1]Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]CBBD-OIL, AIST-Waseda Univ., [3]Res. Org. Nano Life Innov., Waseda Univ., [4]PRESTO, JST., [5]Kitasato Ins. for Life Sci., Kitasato Univ., [6]Inst. Adv. Res. Biosyst. Dynam., Waseda Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ.)

【研究背景】
環境微生物が産生する二次代謝産物は抗生物質や生理活性物質として医療の現場で幅広く利用されている。しかし、現行の二次代謝産物の生産能評価は、培養・分離精製などの煩雑な工程を含み、微生物内の二次代謝産物を直接的に検出する手法はない。そこで、本研究では、顕微ラマン分光法を用いて、微生物内で産生される二次代謝産物の *in situ* 検出を試みた。顕微ラマン分光法は、非標識・低侵襲に物質の分子構造を明らかにできるため、蛍光ラベリングや遺伝子操作などの行程を踏まずに生体分子の細胞内分布を可視化できるため、二次代謝産物の迅速な生産評価が可能となる。さらに、我々はスペクトル解析手法として多変量スペクトル分解法(MCR-ALS)を用い、複雑な生体由来のラマンスペクトルから単一の生体成分に由来するスペクトル成分を抽出することで、各生体内物質の生産能評価と菌体内分布の可視化を試みた。
【実験方法】
抗生物質 penicillin を産生する真菌 *Penicillium chrysogenum* 及び抗生物質 avermectin を産生する放線菌 *Streptomyces avermectinius* を研究対象とし、各菌株の培養を行った。共焦点顕微ラマン分光計を用いて、培養後の各菌体のラマンスペクトルを測定し、複数成分が重層したラマンスペクトルデータに対して多変量解析 MCR-ALS を行い、各生体成分及び抗生物質に由来するスペクトル成分の抽出を行った。
【実験結果】
MCR-ALS により、重畳したラマンスペクトルから単一物質に由来するスペクトル成分の抽出及び各成分の強度変化を算出できる。MCR-ALS 解析の結果、複雑なマッピングデータから生体成分及び抗生物質に由来するラマンスペクトルをそれぞれ抽出することができ、抗生物質の菌体内検出及び局在の可視化に成功した。また、*Streptomyces avermitilis* を寒天培地で培養した場合、気菌糸から胞子鎖が形成される。この形態変化における avermectin の生体内動態を経日的にモニタリングしたところ、avermectin が胞子鎖に局在することが明らかとなった。以上より、本手法が、微生物内の二次代謝産物の産生を迅速に評価できるだけでなく、二次代謝産物の菌体内分布情報から生物学的に新たな知見を得ることを示した。よって、本手法を抗生物質の生体モニタリングや生理活性物質生産菌体のスクリーニングへ適用できることが示唆された。

Raman microspectroscopy, MCR-ALS, secondary metabolite

発表責任者：堀井俊平（pater.basket@akane.waseda.jp）

講演番号：3A07p10
講演日時：3 月 27 日 15:39～ センター2 号館 A07 会場

一次代謝関連遺伝子の導入によるリベロマイシン生産改善

Improved production of reveromycin by gene introduction on primary metabolism

○高木 海[1]、白井 智量[2]、岡村 英治[1]、近藤 昭彦[2]、長田 裕之[3]、高橋 俊二[1] ([1]理研 CSRS・天然物生合成、[2]理研 CSRS・細胞生産研究チーム、[3]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー)
○ Hiroshi TAKAGI[1], Shirai Tomokazu[2], Okamura Eiji[1], Kondo Akihiko[2], Osada Hiroyuki[3], Takahashi Shunji[1] ([1]Nat. Prod. Biosynth., RIKEN CSRS, [2]RIKEN CSRS Cell Factory Research Team, [3]Chem. Biol., RIKEN CSRS)

【目的】リベロマイシン A (RM-A)は、放線菌 *Streptomyces reveromyceticus* が生産するポリケチド化合物であり、破骨細胞選択的アポトーシス誘導活性、がん細胞の骨転移抑制活性を有する。これまでに、遺伝子破壊解析・生化学解析により post-PKS 代謝産物は、ポリケチド鎖切断、スピロアセタール立体特異的環化、水酸化、サクシニル化を経て RM-A が生合成されることを明らかにしている。生物活性を広く評価するためには、目的化合物の高生産化は重要課題である。そこで本研究では、一次代謝系の理解、及び生合成遺伝子クラスターの発現誘導により RM-A 生産性の向上を目的とした。
【方法および結果】 RM-A 生産改善には、一次代謝系の理解が重要である。そこで、ゲノムスケール代謝モデルを構築し理論収率を推定したところ、20 g/L グルコース添加の場合、約 8 g/L の生産が可能と推測された。代謝バランスを理解するために、[1-^{13}C]グルコースを用いたフラックス解析を行い、解糖系とペントースリン酸経路の寄与度を調べたところ、培養後期に、ペントースリン酸経路が強まる傾向が確認できた。また、中心代謝経路のメタボローム解析を行ったところ、TCA 回路に代謝産物の蓄積が確認された。そこで、NADPH 型のグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ導入による解糖系強化と生合成に必要とされる還元力供給、及び NADPH 型リンゴ酸デヒドロゲナーゼ導入による TCA 回路からの再構成系を検討した。各遺伝子を *S. reveromyceticus* に導入後、RM-A 生産評価を行った結果について報告する。

reveromycin, secondary metabolite, primary metabolism

講演番号：3A07p11
講演日時：3 月 27 日 15:50～ センター2 号館 A07 会場

放線菌由来新規β-カルボリン類の探索

Identification of ß-carboline alkaloids from rare actinomycetes

○砂田 礼菜、山田 誠久、上田 祥平、高橋 瞭、仁平 卓也、木谷 茂（阪大・生物工学国際交流セ）
○Reina SUNADA, Masahisa YAMADA, Shohei UEDA, Ryo TAKAHASHI, Takuya NIHIRA, Shigeru KITANI (ICBiotech. Osaka Univ.)

【背景】

β-カルボリン類は、抗腫瘍活性や抗 HIV 活性など多様な生理活性を示す。この生理活性は、β-カルボリン骨格の側鎖に起因することから、側鎖構造の多様化が新たな生理活性を産み出すと考えられる。我々は、β-カルボリン類キタセタリンの生合成遺伝子（*kslA-kslC*）を放線菌 *Kitasatospora setae* より同定し、KslB はβ-カルボリン骨格の形成に関与すると考えた。また、キタセタリンは、その構造中に、*N*-アセチルシステイン残基を有する。キタセタリン生合成遺伝子をアミド加水分解酵素 Mca の機能欠失株にて異種発現させたところ、キタセタリン生産の消失と共に、新たな化合物ピークが検出された。一方、放線菌 *Marinactinospora thermotolerans* 由来 McbB は、1-アセチル-3-カルボキシ-β-カルボリンを生成する。これらβ-カルボリン骨格合成酵素 KslB／McbB と相同性を示すタンパク質の多くが機能未知であることから、構造多様なβ-カルボリン類を発掘できる可能性がある。本研究では、β-カルボリン骨格合成酵素またはそのホモログを異種発現させることにより、新たなβ-カルボリン類を探索することを目的とした。

【方法・結果】

Streptomyces avermitilis SUKA22 Δ*mca* 株にキタセタリン生合成遺伝子を導入した結果、親株背景では検出されない化合物群を見出した。これらの化合物を逆相オープンカラムクロマトグラフィーと逆相 HPLC により精製した。質量分析の結果、精製化合物の分子量は 298 と推定され、また、その紫外吸収スペクトルは、β-カルボリン骨格特有のものを示した。現在、詳細な構造を NMR などにより解析している。

次に、McbB ホモログタンパク質を検索した結果、希少放線菌である *Actinoalloteichus spitiensis* NBRC102582 株と *Actinoalloteichus cyanogriseus* NBRC14455 株に見出し、それぞれを SpiB と CyaB と命名した。SpiB または CyaB の代謝産物を解析するため、各遺伝子を pET-15b に連結し、大腸菌 BL21 (pLysS)株に導入した。各形質転換株を培養し、SpiB または CyaB を IPTG 添加により発現誘導させた結果、β-カルボリン類と推定される代謝物ピークを見出した。この代謝物ピークを精製し、構造解析した結果、1-アセチル-3-カルボキシ-β-カルボリンであることが分かった。希少放線菌やアグロバクテリウム属細菌のゲノムには、いくつかの KslB／McbB ホモログがコードされていることから、これらのホモログタンパク質についても、その代謝産物の解析を進めている。

actinomycetes, ß-carboline, genome mining

発表責任者：砂田礼菜（reina_sunada@icb.osaka-u.ac.jp）

講演番号：3A07p12
講演日時：3 月 27 日 16:01～ センター2 号館 A07 会場

放線菌 *Streptomyces lavendulae* FRI-5 株が生産する新規ポリエンマクロライド化合物の同定

Lavencidin A, a new polyene macrolide produced by *Streptomyces lavendulae* FRI-5

○池阪 昂平[1]、吉岡 拓哉[1]、五十嵐 康弘[2]、難波 卓司[3]、仁平 卓也[1]、木谷 茂[1] ([1]生物工学国際交流セ、[2]富山県立大工、[3]高知大農林海洋科学)
○Kohei IKESAKA[1], Takuya YOSHIOKA[1], Yasuhiro IGARASHI[2], Takushi NAMBA[3], Takuya NIHIRA[1], Shigeru KITANI[1] ([1]ICBiotech Osaka Univ., [2]Toyama Prefectural Univ., [3]Kochi Univ.)

【目的】

ポリエンマクロライド系抗生物質は、4～7 個の共役二重結合を含む多員環ラクトンを有しており、共役二重結合を含む疎水性領域と水酸基に富む親水性領域を有する。また、当化合物の多くは、*Streptomyces* 属放線菌より単離され、抗真菌活性を示す。D-サイクロセリン生産菌 *Streptomyces lavendulae* FRI-5 株の代謝物を逆相 HPLC にて解析したところ、ペンタエン構造に特徴的な極大吸収波長（318 nm, 334 nm, 350 nm）を示す化合物（**1** と **2**）が生産されていることが分かった。本研究では、化合物 **1** と化合物 **2** の構造を解析し、その生合成経路を解明することを目的とした。

【方法と結果】

S. lavendulae FRI-5 株の培養液 2.5 L を *n*-ブタノールにて抽出し、濃縮物を逆相カラムと逆相 HPLC により精製した結果、3.1 mg の化合物 **1** と 3.7 mg の化合物 **2** を得た。質量分析と NMR 解析により、化合物 **1** と化合物 **2** の構造を同定した結果、両化合物ともペンタエン構造を有するポリエンマクロライド系化合物であることが分かった。化合物 **2** は *Streptomyces* sp. A2215 P21293 株より単離された RKGS-A2215A であったのに対し、化合物 **1** は新規物質であることが明らかになった。したがって、化合物 **1** をラベンシジン A と命名した。次に、ラベンシジン A の生理活性を評価するため、酵母に対する生育阻害活性を測定した。その結果、*Saccharomyces cerevisiae* の生育を 10 μg／ディスクにて阻害することがわかった。RKGS-A2215A が抗腫瘍活性を示すことから、ラベンシジン A の細胞毒性をヒト骨肉腫細胞株（U2OS 株）とヒト子宮頸癌株（HeLa 株）を用いて評価した結果、各 IC_{50} 値は、6.6 nM、22.5 nM を示した。ポリエンマクロライド系化合物は幅広い抗菌スペクトルを示すため、その生合成系を改変すれば、新たな生理活性を示す類縁体を創製できる可能性がある。現在、ラベンシジン生合成遺伝子群を同定するため、*S. lavendulae* FRI-5 株のゲノム情報を解析している。

polyene macrolide, *Streptomyces lavendulae* FRI-5, antibiotic

発表責任者：池阪昂平（kohei_ikesaka@icb.osaka-u.ac.jp）

講演番号：3A07p13
講演日時：3 月 27 日 16:21～ センター2 号館 A07 会場

中心代謝改変による有用物質生産への応用
Improvement of secondary metabolite production in engineered *Streptomyces* host by primary metabolic modification
○土居 志織[1,2]、小松 護[2]、池田 治生[2] ([1]慶應大、[2]北里大・生命研)
○Shiori Doi[1,2], Mamoru Komatsu[2], Haruo Ikeda[2] ([1]Keio Univ., [2]Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato Univ.)

［目的］*Streptomyces* 属放線菌は多種多様な二次代謝産物を生産する産業微生物として知られ、これらの二次代謝産物は、抗生物質や農薬などの有用な化合物として利用されている。

二次代謝産物は一次代謝産物を前駆物質として、また、一次代謝経路で生産されるエネルギーや補酵素を利用して生合成される。すなわち、*Streptomyces* 属放線菌の工業レベルでの効率的な二次代謝産物の生産は、生合成遺伝子群の発現のみならず、前駆体として利用される一次代謝産物の供給に大きく依存すると考えられる。そこで本研究では、*S. avermitilis* 大規模染色体欠失株 SUKA38 株の種々の一次代謝遺伝子改変株を作成し、一次代謝改変による二次代謝産物生産への応用を検討した。

［方法・結果］*S. avermitilis* SUKA38 株の一次代謝（解糖系、ペントースリン酸系、および TCA 回路）に関与する遺伝子欠失株の取得に成功している。各欠失株に chloramphenicol(Cp)生合成クラスターを導入し、HPLC 分析により生産量を定量した。この結果、解糖系における fructose-6-phosphate(F-6-P)から fructose-1,6-bisphosphate(F-1,6-bisP)への反応を触媒する 6-phosphofructokinase の 2 重遺伝子欠失株（*ΔpfkA1/ΔpfkA3*）で顕著に Cp 生産が増加した。*pfkA* は 3 つのパラログからなるが、3 重遺伝子欠失株は得られなかったため、必須遺伝子であると推測された。*ΔpfkA1/ΔpfkA3* 株では生育の減少が観察された。そこで乾燥菌体重量を測定し、specific production を算出した結果、*ΔpfkA1/ΔpfkA3* 株では最終的に、親株に対して Cp 生産が 2 倍となった。一方で、erythrose-4-phosphate(E-4-P)の生成反応を触媒する transaldolase の 2 重遺伝子欠失株（Δ*tal1*/Δ*tal2*）で顕著な Cp 生産の減少がみられた。Cp 生合成では、前駆体としてペントースリン酸経路の中間体 E-4-P を利用するため、*tal* の欠失による E-4-P の供給の低下が示唆された。これらの結果から、*ΔpfkA1/ΔpfkA3* 二重遺伝子破壊により解糖系へのフラックスが減少し、これに伴いペントースリン酸経路側へのフラックスが増加したことで、Cp 生産が大きく上昇したと示唆された。

primary metabolism, secondary metabolism, metabolic modification

講演番号：3A07p14
講演日時：3 月 27 日 16:32～ センター2 号館 A07 会場

リンコマイシンにより放線菌の二次代謝能が高まる仕組みの解明に向けたリボソームプロファイル解析

Analysis of ribosome profiles for elucidating the mechanism by which lincomycin potentiates secondary metabolite production by *Streptomyces* strains

○向井 慶一郎[1]、小林 桃子[1]、石塚 美咲[1]、今井 優[2]、保坂 毅[1,3]([1]信州大院・総合理工、[2]Northeastern Univ.、[3]信州大・バイオメディカル研)
○Keiichiro MUKAI[1], Momoko KOBAYASHI[1], Misaki ISHIZUKA[1], Yu IMAI[2], Takeshi HOSAKA[1,3] ([1]Grad. Sch. of Sci. and Technol., Shinshu Univ., [2]Northeastern Univ., [3]IBS-ICCER, Shinshu Univ.)

［目的］ リンコマイシン (LIN) は, 細菌のリボソーム 50S サブユニットに結合することによってタンパク質合成を阻害する抗生物質である。これまでに我々は, 低濃度の LIN が放線菌の二次代謝能を高めることを報告してきた[1,2]。放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2) においては, 5 μg/mL の LIN を対数増殖期中期で添加すると, 青色色素抗生物質の高生産化が起こる。この現象の理解に向けた遺伝子発現解析から, LIN の作用標的であるリボソームの量的および質的変化が, LIN 存在下での二次代謝活性化に大きく寄与している可能性が判ってきている。本研究の目的は, その可能性を実験的に証明することにある。

［方法］ *S. coelicolor* A3(2)を 30˚C で 36 時間振とう培養し, 5 μg/mL の LIN を添加した。その後培養を続け, 経時的に回収した菌体から無細胞抽出液を調製し, これをリボソームパターン解析の試料とした。2～4 units の試料を 10-40%のショ糖密度勾配遠心法に供し, モノソームおよびポリソームを分画した。TRIAX Gradient Profiling System を用いてそれらを検出することでリボソームのパターンを解析した。なお, LIN 非添加の条件も同様に実験し, 比較対照とした。

［結果・考察］ LIN (5 μg/mL) 添加後のポリソームの経時的な変化を解析した。その結果, LIN 存在下におけるポリソームは, LIN 添加後 1 時間で減少するが, 3 時間後には再形成され始め, 12 時間後では LIN 非存在下と同レベルまで回復することが明らかになった。興味深いことに, LIN 非存在下に比べて LIN 存在下では, 培養後期 (LIN 添加後 24 時間以降) のポリソームレベルが高いこと, 更には細胞内のリボソーム量が多いことも判明した。これらの結果は, LIN 存在下において, 長時間にわたりリボソームが安定かつ活発に働いていることを示唆した。LIN を添加してから 24 時間後以降では, 青色色素抗生物質の生合成を正に調節するタンパク質 ACTII-ORF4 の mRNA が高発現することも確認している。この時期に活発なリボソームが多いことは, それら mRNA の高効率的な翻訳を可能にし, 結果的に青色色素抗生物質の生合成酵素群の高発現に繋がると推察した。LIN によるリボソームの安定化や, ACTII-ORF4 の mRNA が高発現することの仕組みの解明は今後の課題であるが, 本研究より, リボソームの質的・量的変化が放線菌の二次代謝活性化に深く関与していることが明らかになってきた。

[1] Imai Y., et al., Applied Environmental Microbiology, 81:3869-3879 (2015).
[2] Ishizuka M., et al., Antonie Van Leeuwenhoek, 111:705-716 (2018).

Streptomyces, secondary metabolism, ribosome-targeting antibiotic lincomycin

発表責任者：保坂毅（thosaka@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3A07p15
講演日時：3 月 27 日 16:43～ センター2 号館 A07 会場

生育初期に抗菌物質を生産する放線菌の探索と特性解析
Exploration and characterization of actinomycetes that produce antibacterial compounds in the early growth stage
○内田 牧歩[1]、北川 輝弥[2]、保坂 毅[3] ([1]信州大・農、[2]信州大院・総合理工、[3]信州大・バイオメディカル研)
○Makiho UCHIDA[1], Teruya KITAGAWA[2], Takeshi HOSAKA[3] ([1]Fac. of Agric., Shinshu Univ., [2]Grad. Sch. of Sci. and Technol., Shinshu Univ., [3]IBS-ICCER, Shinshu Univ.)

[背景･目的]

典型的な放線菌は胞子が発芽し, 基底菌糸 (栄養菌糸) とそれに次いで気中菌糸を伸長させ, 最後に胞子を成熟させる*。予備検討において我々は, 栄養菌糸形成開始直後のような生育初期に抗菌物質を生産する放線菌の存在を確認した。生育初期の放線菌が抗菌物質を生産することは, これまでほとんど着目されてこなかった。本研究では以上のことを踏まえた上で, 生育初期に抗菌物質を生産する放線菌が新しい抗生物質の探索源となり得るか否かについて検証することを目的として, そのような放線菌の探索と特性解析に着手した。

[方法]

土壌分離放線菌 1786 菌株を供試菌株とした。GYM 寒天培地を用いて, それらの放線菌を 30℃で 12 ~ 24 時間培養した。得られた培養物を大腸菌 (*Escherichia coli* W3110) と黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus* 209P) を検定菌として抗菌試験に供し, 各放線菌の抗菌物質生産性を評価した。抗菌物質の生産が認められた放線菌については, 16S rRNA 遺伝子の配列を解析し, 簡易同定した。

[結果・考察]

供試菌株の抗菌物質生産性を調べたところ, 1786 菌株中 32 菌株の放線菌が生育初期に抗菌物質を生産することが明らかになった。それらの抗菌物質生産性放線菌は, 全て *Streptomyces* 属に属し, 多くが *S. bungoensis*, その他は *S. asenjonii, S. cellostaticus*, *S. cinerochromogenes, S. costaricanus*, *S. fuscichromogenes, S. pseudogriseolus, S. seoulensis* の近縁種であることが判った。*Streptomyces* sp. UCHIM-2 や *Streptomyces* sp. UCHIM-3 のように, 栄養菌糸形成開始直後から, 極めて強い活性を示す抗菌物質を生産する放線菌もいくつか取得できた。現在, それらの放線菌が生産する抗菌物質が新規化合物であるか否かの解析を進めている。本発表では, その結果についても報告する。加えて, それらの結果を基に, 新しい抗生物質探索において, 生育初期の放線菌が生産する抗菌物質に着目することの重要性について考察する。

[文献] *宮道慎二. 放線菌の分類と同定. 2001

early growth stage, actinomycetes, antibacterial compounds

発表責任者：保坂毅（thosaka@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3A07p16
講演日時：3 月 27 日 16:54～ センター2 号館 A07 会場

放線菌由来の新規カチオン性ポリペプチド: ポリ(L-ジアミノプロピオン酸)の単離，構造決定と特性評価

Novel Cationic Polypeptide Produced by a Strain of *Streptomyces* sp.: Isolation and Characterization of Poly(L-diaminopropionic acid)

加藤 芳尚、稲葉 悠、室 尚吾、吉田 修、○竹原 宗範（滋県大工）
Yoshinao KATO, Haruka INABA, Shogo MURO, Osamu YOSHIDA, ○Munenori TAKEHARA (Univ. Shiga Pref.)

【緒言】Poly(ε-L-lysine)（ε-PL）は塩基性アミノ酸 L-lysine がイソペプチド結合を介して縮合重合したカチオン性ポリペプチドである。ε-PL はいくつかの *Streptomyces* 属放線菌株により二次代謝産物として分泌生産され[1]、幅広い抗菌スペクトルを示すことから、天然の食品保存剤として利用されている。当研究室では、ε-PL を生産する二株の *S. celluloflavus* が ε-PL の類縁ペプチドである poly(γ-L-diaminobutyric acid) を併産することを見出し[2]、ε-PL と類似の機能を有することを示してきた。さらに、*Streptomyces* sp. USE-33 株が ε-PL とともに新規なカチオン性ペプチドを生産していることを発見した。そこで、本研究ではこのペプチドの構造決定と機能解析を試みた。

【方法】二段階培養[1]した放線菌 *Streptomyces* sp. USE-33 株の培養ろ液から、メタノール–アセトン混合溶媒を用いた沈殿分画法により新規ペプチドを精製した。当該ペプチドのプロテアーゼ A「アマノ」による加水分解物について、HPLC を用いたアミノ酸分析と NMR 分光法により構成アミノ酸の同定を行った。また、二次元 NMR 測定によりペプチドの結合様式を決定するとともに、NMR 滴定法でカチオン性ペプチドの pK_a 値を決定した。さらに、MALDI-TOF MS によりその重合度を解析した。種々の真正細菌および真菌類に対する抗菌活性を IC_{50} で評価した。

【結果と考察】分離精製物は、L-diaminopropionic acid（DAP）を唯一の構成アミノ酸とし、比旋光度 $[\alpha]_D^{25}$ +34.1° (*c* 1.18, 6 M HCl) を示す光学活性なポリペプチド poly(L-diaminopropionic acid)であった。このカチオン性ポリペプチドは、NMR 解析により、L-DAP の α 位のカルボキシ基と β 位のアミノ基がイソペプチド結合により主鎖を形成し、それぞれの側鎖に対し L-DAP が一つずつグラフト化した poly[β-(L-diaminopropionyl-L-diaminopropionic acid)] (PAP)であることがわかった。PAP の α 位および β 位のアンモニウム基の pK_a はそれぞれ 4.7 と 8.7 を示した。PAP の MALDI-TOF MS 測定より重合度 n = 11 に極大値をもつ正規分布型のイオンピークが検出され、6–16 個の L-DAP 単位から構成されていることがわかった。また PAP はいくつかの真正細菌に抗菌性を示すだけでなく、*Saccharomyces cerevisiae* に対しても抗真菌作用（IC_{50} = 0.30 mg/mL）を有していた。これらカチオン性ポリペプチドは酸性条件下で生産されることから生産菌体の pH 恒常性の制御にも寄与していることが考えられる。

1) M. Takehara, H. Hirohara, *Microbiol. Monogr.* **2010,** *15,* 1. 2) M. Takehara, M. Saimura, H. Inaba, H. Hirohara, *FEMS Microbiol. Lett.* **2008,** *286,* 110.

cationic polypeptide, poly(ε-L-lysine), poly(L-diaminopropionic acid)

発表責任者：竹原宗範（takehara@mat.usp.ac.jp）

講演番号：3A07p17
講演日時：3 月 27 日 17:05～ センター2 号館 A07 会場

放線菌 *Streptomyces vietnamensis* の単コロニーの表現型が多様化する仕組みの解析

Analysis of the fundamental mechanisms of single-colony diversification in *Streptomyces vietnamensis* NBRC 104153

○保坂 毅[1,2,3]、森本 諒[1,2]、小林 匠[3]、丸山 友子[1,2]、濱渦 亮子[1] ([1]信州大バイオメディカル研、[2]信州大総合理工、[3]信州大農)
○Takeshi HOSAKA[1,2,3], RYO MORIMOTO[1,2], TAKUMI KOBAYASHI[3], Tomoko MARUYAMA[1,2], Ryoko HAMAUZU[1] ([1]IBS-ICCER, Shinshu Univ., [2]Grad. Sch. of Sci. and Technol., Shinshu Univ., [3]Fac. Agric. Shinshu Univ.)

［背景・目的］

寒天培地上で放線菌の単コロニーを形成させると、形態や性状が劇的に変化したコロニーが出現することがある。先行研究において我々は、放線菌 *Streptomyces vietnamensis* NBRC 104153 ではそのようなコロニーが極めて高頻度で出現することを明らかにしている。本研究では、寒天培地上で放線菌の単コロニーの表現型が多様化する仕組みを明らかにすることを目的に、*S. vietnamensis* NBRC 104153 の遺伝学的および生理学的性質を解析した。

［方法・結果・考察］

性質変化が認められた単コロニーの遺伝学的性質

S. vietnamensis NBRC 104153 のフリーズストックを改変 R5 寒天培地上に低密度で播種し、単コロニーを出現させた。各単コロニーの形態や性状を観察したところ、青色色素抗生物質グラナチシンを高生産するタイプ（SVDC-1）と全く生産しないタイプ（SVDC-2）の存在を確認できた。各コロニーの遺伝学的性質を明らかにするためにそれぞれの全ゲノム配列を解析した。その結果、SVDC-1 では染色体 DNA 末端の大規模な欠失と 4 つの 1 塩基置換、SVDC-2 は 1 塩基欠失と 1 塩基置換が 1 つずつ検出された。この結果は、寒天培地上で *S. vietnamensis* NBRC 104153 の単コロニーが多様化する現象が、同菌の遺伝的不安定性に起因することを示唆した。

単コロニーの表現型が安定化する培養条件

寒天培地上で *S. vietnamensis* NBRC 104153 の単コロニーの形態や性状が安定化する培養条件を検討した。その結果、培地 pH5～5.5 の条件で単コロニーの表現型が安定であり、SVDC-2 のようにグラナチシン生産を示さない単コロニーは出現しないことが判明した。このことから、*S. vietnamensis* NBRC 104153 の遺伝的不安定性は培地 pH 依存的であることが示唆された。現在、詳細な仕組みの更なる解明のために、pH が *S. vietnamensis* NBRC 104153 の変異発生に及ぼす影響について解析中である。本発表では、この結果についても報告する予定である。

Actinomycetes, *Streptomyces vietnamensis*, Single colony

発表責任者：保坂毅（thosaka@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3A08a01
講演日時：3 月 27 日 09:30～ センター2 号館 A08 会場

マコモタケの共存に関わる遺伝子の探索
Analysis of the molecular mechanism of coexistence of Makomotake, *Zizania latifolia* infected with *Ustilago esculenta*.

○青木 大地[1]、伊藤 綾乃[1]、堤 祐大[1]、小野 晶子[1]、佐藤 千裕[1]、崔 宰熏[2,3]、河岸 洋和[2,3]、鈴木 智大[1] ([1]宇都宮大・バイオ、[2]静岡大・農、[3]静岡大・グリーン研)
○Daichi AOKI[1], Ayano ITO[1], Yudai TSUTSUMI[1], Akiko ONO[1], Chihiro SATO[1], Jae-Hoon CHOI[2,3], Hirokazu KAWAGISHI[2,3], Tomohiro SUZUKI[1] ([1]C-Bio, Utsunomiya Univ., [2]Dept. of Agr., Grad. School of Integr. Sci. and Technol., Shizuoka Univ., [3]Res. Inst. of Green Sci. and Technol., Shizuoka Univ.)

【目的】

イネ科の植物であるマコモ（*Zizania latifolia*）に、黒穂菌（*Ustilago esculenta*）が感染すると共存が始まり、茎部に異常な肥大が生じる。この肥大した茎部は菌えいと呼ばれ、マコモタケと称する。黒穂菌がマコモに感染することで花芽が形成されず不稔となる。先行研究では、数種の黒穂菌を使用し、マコモタケの肥大化に関する遺伝子の発現差解析がなされている[1)]。しかしながら、感染・共生、不稔に関わる遺伝子やその分子機構についての詳細は未だ明らかになっていない。

そこで本研究では、全生育ステージのマコモタケを使用し、共存過程における黒穂菌由来の網羅的遺伝子発現差解析を行うこととした。

【方法・結果】

黒穂菌の ITS2（internal transcribed spacers 2）領域でプライマーを設計し、マコモタケの各生育段階（活着・分げつ期 : 6 月～成熟期 : 10 月）の菌えい部における黒穂菌の存在量を定量した。その結果、黒穂菌は分げつ盛期（7 月）から緩やかに増加を開始し、分げつ停止期（8 月）から収穫適期（9 月）にかけて最も増加することが明らかにした。そこで、黒穂菌の存在量が増加し始める分げつ盛期（7 月）から成熟期（10 月）までの全生育段階のマコモタケ（植物-菌共存体）から total RNA を取得した。取得した total RNA からライブラリを作成し、HiSeqX を用いたシーケンスに供した。現在、取得したデータから植物体および黒穂菌のそれぞれの遺伝子を区別した遺伝子発現差解析を行うため、マコモ（植物体）および黒穂菌それぞれのゲノム情報を参照配列とした遺伝子発現差解析を行っている。

また別途、これまでにトウモロコシに感染する黒穂菌である *Ustilago maydis* で報告されている感染・寄生に関わる遺伝子を選抜し、1) *Ustilago esculenta* のゲノム配列上に存在するか否か、2) 遺伝子クローニング、3) リアルタイム PCR を用いた各生育段階での発現プロファイルを検討した。

Makomotake, *Zizania latifolia* infected with *Ustilago esculenta*

発表責任者：鈴木智大（suzukit@cc.utsunomiya-u.ac.jp）

講演番号：3A08a02
講演日時：3 月 27 日 09:41～ センター2 号館 A08 会場

冬虫夏草サナギタケ（*Cordysceps militaris*）の各交配型における比較ゲノム解析

The comparative genome analysis between different mating types of *Cordysceps militaris*.

○鈴木 智大[1]、鈴木 貴也[2]、小野 晶子[1]、鈴木 稔之[1]、崔 宰熏[3,4]、河岸 洋和[3,4]、道羅 英夫[2,4] ([1]宇都宮大・バイオ、[2]静岡大・理、[3]静岡大・農、[4]静岡大・グリーン研)

○Tomohiro SUZUKI[1], Takaya SUZUKI[2], Akiko ONO[1], Toshiyuki SUZUKI[1], Jae-Hoon CHOI[3,4], Hirokazu KAWAGISHI[3,4], Hideo DOHRA[2,4] ([1]C-Bio, Utsunomiya Univ., [2]Dept. of Sci., Grad. School of Integr. Sci. and Technol., Shizuoka Univ., [3]Dept. of Agr., Grad. School of Integr. Sci. and Technol., Shizuoka Univ., [4]Res. Inst. of Green Sci. and Technol., Shizuoka Univ.)

【目的】

冬虫夏草は昆虫などから生じるキノコの総称で、節足動物の病原体として世界的に約 400 種以上が確認されており、その 1 種である子嚢菌サナギタケ(*Cordyceps militaris*)は鱗翅目昆虫の蛹の病原体である。現在までにサナギタケは MAT-α型および MAT-HMG 型の交配型が存在することが確認されているが、両交配型のゲノム情報が解読されているが、それらの詳細な比較ゲノム解析は行われていない[1-2]。そこで本研究では、各交配型に特異的なゲノム構造を明らかにすることを目的とし、サナギタケから単離した各交配型のゲノム解読および比較ゲノム解析を行った。

【方法及び結果】

これまで我々は、NBRC に登録されているサナギタケ全 18 株の交配型の確認を行うとともに、異核共存体（NBRC103759 株および NBRC100741 株）を選抜し、相補的な交配型の計 4 株のドラフトゲノム配列を決定した[3]。更に交配型におけるゲノム構造・の比較および BLAST Reciprocal Best Hits (RBH)を用いた各交配型・株特異的な遺伝子の同定を行った。詳細な比較ゲノム解析の結果、1) 交配型に特異的な遺伝子が交配型遺伝子（MAT 遺伝子）のみであること、2) HMG 型に特異的な新規交配型遺伝子（MAT1-2-3-a および b）が存在すること、3) NBRC103759 株および NBRC100741 株の各交配型間で heterozygosity の低下が見られることが明らかになった。さらに、カイコの蛹にサナギタケを接種後、経時的にサンプリングした検体を使用して、上記の MAT 遺伝子の発現定量を行い、それら遺伝子が交配型特異的に発現していることを確認した。

1）Zheng P., et al., Genome Biol, 1, R116. (2011)
2）Kramer GJ., et al., BMC Genomics, 18, 912. (2017)
3）鈴木ら、2018 年度農芸化学会大会講演要旨集

mushroom, comparative genome analysis, *Cordysceps militaris*

発表責任者：鈴木智大（suzukit@cc.utsunomiya-u.ac.jp）

講演番号：3A08a03
講演日時：3 月 27 日 09:52～ センター2 号館 A08 会場

冬虫夏草サナギタケ（*Cordyceps militaris*）由来レクチンの糖特異性解析

Analysis of sugar-binding specificity of a lectin from the mushroom *Cordyceps militaris*.

○小野 晶子[1]、佐藤 千裕[1]、鈴木 稔之[1]、崔 宰熏[2,3]、平井 浩文[2]、道羅 英夫[2]、河岸 洋和[2,3]、鈴木 智大[1] ([1]宇都宮大・バイオ、[2]静岡大・グリーン研、[3]静岡大・農)

○Akiko ONO[1], Chihiro SATO[1], Toshiyuki SUZUKI[1], Jae-Hoon CHOI[2,3], Hirofumi HIRAI[2], Hideo DOHRA[2], Hirokazu KAWAGISHI[2,3], Tomohiro SUZUKI[1] ([1]C-Bio, Utsunomiya Univ., [2]Res. Inst. of Green Sci. and Technol., Shizuoka Univ., [3]Dept. of Agr., Grad. School of Integr. Sci. and Technol., Shizuoka Univ.)

【目的】

冬虫夏草は昆虫などから生じるキノコの総称であり、世界的に約 600 種が確認されている。その 1 種である *Cordyceps militaris* はサナギタケと呼ばれ、中国医学で癌患者の治療薬として古くから用いられてきた[1)]。しかし、この菌の感染から寄生そして子実体形成における詳細なメカニズムは未だ不明である。本研究ではサナギタケ由来レクチン（*C. militaris* lectin、CmLec）が、菌と昆虫との相互作用に関与しているのではないかという仮説のもと、現在までに新規サナギタケ由来レクチン CmLec4 の精製・諸性質決定、カイコ中の CmLec4 に結合する物質の探索を行った。その結果、CmLec4 の一次アミノ酸配列・諸性質を決定し、CmLec4 がカイコ中の性特異的貯蔵タンパク質に結合することを見出した。さらに酵母（*Kluyveromyces lactis*）を用いた CmLec4 の異種発現系を構築にも成功している。そこで本研究では、recombinant CmLec4（rCmLec4）を用いて詳細な糖特異性を明らかにすることおよび標的タンパク質 Sex-specific storage-protein 2（SP2）の糖鎖構造解明を目的とした。

【方法・結果】

CmLec4 の糖認識特異性　サナギタケ子実体より *cmlec4* 遺伝子のクローニングを行った後、*K. lactis* Protein Expression Kit を用いて *K. lactis* GG799 株に導入し、形質転換体を取得した。得られた形質転換体を YPGal 培地で培養後、培養上清を His Tag 精製により精製 rCmLec4 を得た。精製 rCmLec4 を SDS-PAGE に供したところ、目的の 15 kDa 付近にシングルバンドが確認された。赤血球凝集活性試験では rCmLec4 が糖認識能を有していることが確認できた。赤血球凝集反応阻害試験の結果より、rCmLec4 はキトサンオリゴ糖（4 糖および 5 糖）、 キチンオリゴ糖（2 糖および 3 糖）を特異的に認識することが明らかになった。また、Biacore を用いた分子間相互作用解析により分子間のアフィニティーを測定し、CmLec4 がキチンオリゴ糖（3、5 糖）を強く認識することを明らかにした。糖タンパク質では特に *N* 型糖鎖を主に持つ asialo fetuin を認識した。

SP2 タンパク質の構造解析　精製した SP2 タンパク質を用いて PNGase F を用いた *N* 型糖鎖の切出し処理を行った。今後、LC-MS/MS を用いた糖鎖構造解析およびヒドラジン分解法を用いた糖鎖切出し処理を検討する予定である。

1) Yue.K., et al,. *J Pharm Pharmacol,* 65:474-493 (2013)

lectin, sugar-binding specificity, *Cordyceps militaris*

発表責任者：鈴木智大（suzukit@cc.utsunomiya-u.ac.jp）

講演番号：3A08a04
講演日時：3 月 27 日 10:03～ センター2 号館 A08 会場

麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるヌクレオファジーレセプターの探索
Screening of nucleophagy receptors in *Aspergillus oryzae*
○髙橋 慶晃、武田 陽一、菊間 隆志（立命館大生命科学）
○Yoshiaki TAKAHASHI, Yoichi TAKEDA, Takashi KIKUMA (Ritsumeikan Univ.)

真核生物ではミトコンドリア、ペルオキシソームなどの様々なオルガネラがオートファジー（選択的オートファジー）によって分解されることが知られている。多核細胞からなる糸状菌においては核全体を分解するヌクレオファジーが報告されており、なかでも麹菌 *Aspergillus oryzae* は、核を丸ごとオートファゴソームで囲い込み、液胞へ輸送し分解する過程が観察されている唯一の生物である。これまでに我々は、*A. oryzae* におけるヌクレオファジーの評価系を確立し、ヌクレオファジーが炭素源および窒素源枯渇により誘導されることを見出した [1)]。またオートファゴソーム膜と核膜、小胞体膜との位置関係などを観察した [1)]。しかし、どのようにして複数ある核の中から特定の核を選別するのか、ほかのオルガネラと区別するのかなどその分子機構は不明である。一般に選択的オートファジーは、分解基質に存在するレセプタータンパク質と、隔離膜/オートファゴソーム膜上のタンパク質である Atg8 とが結合することによってその特異性が生じると考えられている。そのため、*A. oryzae* においてもヌクレオファジーのレセプタータンパク質が AoAtg8（Atg8 の *A. oryzae* オルソログ）に結合すると仮定した。以前我々は、Tandem Affinity Purification (TAP) タグを AoAtg8（Atg8 の *A. oryzae* オルソログ）の N 末端に付加した TAP-AoAtg8 により、6 個の相互作用候補タンパク質を単離した [2)]。今回、TAP タグを AoAtg8 の C 末端に付加した AoAtg8-TAP を発現する株を作製し、TAP 精製により AoAtg8 と結合するタンパク質の精製および同定を試みた。

AoAtg8 の C 末端は、AoAtg4 によりプロセシングを受けグリシン残基が露出することが知られている。そのため、このグリシン以降の 3 アミノ酸（G, D, L）を欠損した AoAtg8 に TAP タグを付加し、さらに *Aoatg4* 破壊株での発現を試みた。抗 calmodulin binding protein 抗体を用いたウエスタンブロッティングを行ったところ、AoAtg8-TAP のバンドが検出され、TAP タグが切断されないことが確認された。これらの株は親株と比較して、生育阻害などは見られなかった。この株において炭素源飢餓によりヌクレオファジーを誘導させ、TAP タグを用いた相互作用タンパク質の精製を行った。得られた相互作用タンパク質を LC-MS/MS で解析し、候補レセプタータンパク質を単離した。現在、これらの遺伝子破壊株の作製を試みている。また、野生型株での AoAtg8-TAP 発現株を作製中であり、同様に TAP タグによる精製、相互作用タンパク質の単離を行う予定である。

1)Kikuma et al., J. Gen. Appl. Microbiol., 63, 139-146 (2017)
2)湯浅ら，日本農芸化学会大会要旨集 4C3a04 (2019)

autophagy, *Aspergillus oryzae*, Atg8

発表責任者：菊間隆志（tkikuma@fc.ritsumei.ac.jp）

講演番号：3A08a05
講演日時：3 月 27 日 10:14～ センター2 号館 A08 会場

糸状菌 *Aspergillus nidulans* の細胞壁形成及び維持における AP2 複合体の機能
Functions of AP2 complex in the cell wall synthesis and maintenance of *Aspergillus nidulans*
○金 京運[1]、岩間 亮[1,2]、堀内 裕之[1,2] ([1]東大院・農生科、[2]東大・微生物連携)
○Jingyun JIN[1], Ryo IWAMA[1,2], Hiroyuki HORIUCHI[1,2] ([1]Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, Univ. of Tokyo)

AP2 複合体は高等真核生物から菌類までよく保存されたα、β2、μ2、σ2の 4 つのサブユニットから成るヘテロテトラマーである。動物細胞ではクラスリン依存性エンドサイトーシスにおいて、特異的なアミノ酸配列を持つカーゴを認識して結合し、細胞内に取り込むことに関与していることが知られている。糸状菌では菌糸生長がタンパク質分泌能、病原性等と密接に関連していることが知られており、近年ではエンドサイトーシスが菌糸の先端付近において菌糸先端生長並びに先端の細胞壁合成に関与するタンパク質の菌糸最先端部位へのリサイクリングに関与することが示されている。糸状菌 *Aspergillus nidulans* において、AP2 複合体が脂質フリッパーゼである DnfA、B の菌糸先端への局在に関与することが報告されており、最近、植物病原性糸状菌 *Fusarium graminearum* では、AP2 複合体各サブユニットの欠失により病原性の低下が見られることが報告された。しかし、依然糸状菌における AP2 複合体の機能は未解明の部分が多い。演者らのグループでは *A. nidulans* における β2、μ2、σ2 サブユニットのオルソログをコードする遺伝子をそれぞれ破壊した株を作製し、その表現型の解析についてすでに報告しているが [1)]、今回、α サブユニットのオルソログをコードする遺伝子の破壊株も加え、さらに詳細な解析を行った。

AP2 複合体サブユニットをコードする遺伝子の破壊株にいて細胞壁構成成分の 1 つであるキチン含量を検討したところすべての株において上昇しており、cell wall integrity（CWI）経路の MAP キナーゼである MpkA のリン酸化レベルも上昇していた。また、キチン合成酵素遺伝子 *chsA*、*chsB*、*chsC*、*chsD*、*csmA*、*csmB*、α-1,3-グルカン合成酵素コード遺伝子 *agsB* 発現量の上昇も見られた。これらのことから AP2 複合体の欠損株では細胞壁に異常が生じ、CWI 経路が活性化していることが示された。糸状菌の菌糸生長においてキチン合成酵素 ChsB、CsmA は重要な機能を担っており、AP2 複合体により認識されるアミノ酸配列が ChsB、CsmA のアミノ酸配列上において複数存在することから、μ2 サブユニットと ChsB、CsmA の相互作用について免疫沈降法を用いて検討した。その結果、μ2 サブユニットと ChsB、CsmA それぞれの共免疫沈降が確認された。さらに μ2 サブユニットをコードする遺伝子破壊株（Δμ2 株）での ChsB の局在について検討したところ異常が見られた。これらのことから ChsB が AP2 複合体のカーゴタンパク質であることが強く示唆された。現在 Δμ2 株における CsmA の局在について検討を行っている。

1) 金ら、2017 年日本農芸化学回大会講演要旨 2C18p08

Aspergillus, cell wall, AP2 complex

発表責任者：堀内　裕之（ahhoriu@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3A08a06
講演日時：3 月 27 日 10:35～ センター2 号館 A08 会場

糸状菌の持つ分泌型ホスホリパーゼ A_2 の構造および機能解析
Functional and structural analyses of secretory phospholipases A_2 in filamentous fungi

○関口 永莉[1]、宮川 拓也[2]、田之倉 優[2]、吉田 稔[1,3,4]、有岡 学[1,3] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]東大院・農生科・応生化、[3]東大・微生物連携機構、[4]理研環境資源セ)
○ Eri SEKIGUCHI[1], Takuya MIYAKAWA[2], Masaru TANOKURA[2], Minoru YOSHIDA[1,3,4], Manabu ARIOKA[1,3] ([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]Dept. of Appl. Biol. Chem., The Univ. of Tokyo, [3]CRIIM, UTokyo, [4]RIKEN CSRS)

【背景と目的】ホスホリパーゼ A_2 (PLA_2) はリン脂質の *sn*-2 位のエステル結合を加水分解し、1-アシルリゾリン脂質と脂肪酸を遊離する酵素である。PLA_2 のうち分泌型 (secretory PLA_2; $sPLA_2$) は構造的特徴等により十数のサブグループに分けられ、その中で微生物由来の酵素はグループ XIV に分類されているが、動物由来の酵素に比べ生理学的・酵素学的な知見に乏しい。当研究室では麹菌 *Aspergillus oryzae* が持つ 2 つの $sPLA_2$ (sPlaA、sPlaB) の解析を行っているが、sPlaA が配列から予想された通り PLA_2 活性を示すのに対し、sPlaB はリン脂質の *sn*-1 位を加水分解する PLA_1 であることを最近見出した。これまで数多くの $sPLA_2$ が研究されてきたが、いずれも厳密な PLA_2 活性を持つとされ、sPlaB は「PLA_1 活性を示す $sPLA_2$」として初の酵素であった。sPlaA/sPlaB の分子モデリングおよび変異体酵素を用いた実験を行ったところ、活性中心近傍配列の 1 アミノ酸 (R または Q) の違いが PLA_2/PLA_1 活性の違いに寄与する可能性が見出された。本研究では糸状菌における $sPLA_2$ の機能の解明を目的として、その酵素学的・構造学的解析と生理学的解析を試みた。
【方法】活性測定の基質として *sn*-1 位にパルミチン酸、*sn*-2 位にオレイン酸を持つ合成リン脂質を用いた。$sPLA_2$ 遺伝子欠損株は CRISPR-Cas9 システムを用いて取得した。
【結果】活性中心近傍配列に Q を持つ糸状菌 *Metarhizium anisopliae* 由来 MaSP の組換えタンパク質を大腸菌で生産・精製した。質量分析計を用いた実験の結果、これまでの知見と一致して MaSP が PLA_1 活性を持つことがわかった。PLA_2/PLA_1 活性の違いを生む構造学的基盤を解明するため、R を持ち PLA_2 活性を示す *Helicosporium* sp.由来 p15 と、Q を持ち PLA_1 活性を示す *Trichoderma reesei* 由来 XM006968 について、His-Asp 活性残基のうち Asp を Ala に置換した不活性型変異体を作製した。現在、これらの酵素と短鎖脂肪酸を持つ基質ホスファチジルエタノールアミンとの共結晶の取得を試みている。一方、イネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* は $sPLA_2$ を 2 つ持ち、いずれも Q 型の PLA_1 である。*M. oryzae* は発芽菅の先端にイネに侵入・感染するための付着器を形成するが、その際に 2 つの $sPLA_2$ のうち MGG01367 の発現量が上昇するとの報告がある。そこで MGG01367 と、もう 1 つの $sPLA_2$ である MGG09019 の欠損株、および二重欠損株を作製し、イネへの感染実験を行うことを計画している。すでに MGG09019 の欠損株を取得しており、MGG01367 の欠損株および二重遺伝子欠損株の取得も試みている。得られた欠損株の生育検定や感染特異的器官である付着器の形成率を測定する予定である。

Magnaporthe oryzae, phospholipase, phospholipid

発表責任者：有岡学（arioka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3A08a07
講演日時：3 月 27 日 10:46～ センター2 号館 A08 会場

多重遺伝子破壊による黄麹菌 *Aspergillus oryzae* が有するハイドロフォービン遺伝子群の機能解析
Functional analysis of hydrophobins by multiple disruption in *Aspergillus oryzae*

○近藤 永治、山川 結、安藤 祐人、瀬川 亜美、金井 優斗、中島 春紫（明治大農・農化）
○Eiji KONDO, Yui YAMAKAWA, Yuto ANDO, Ami SEGAWA, Yuto KANAI, Harushi NAKAJIMA (Meiji Univ.)

ハイドロフォービンは糸状菌や担子菌が生産する両親媒性のタンパク質であり、単量体として分泌された後、菌体表面に自己集合して単層を形成することにより、気中菌糸や分生子に撥水性を付与している。単一の菌株は複数のハイドロフォービン遺伝子を保有しているが、ハイドロフォービンに特徴的な 8 つのシステイン残基によるパターン配列が保存されている。一方で、アミノ酸配列の相同性が低く、特異的な C 末端ドメインを有するものも存在する。このことから、個々のハイドロフォービンがそれぞれ固有の機能や役割を有していると考えられる。

筆者らは黄麹菌 *A. oryzae* のゲノムから 9 種類のハイドロフォービン遺伝子 *hypA*～*hypI* を単離しており、それぞれの遺伝子が異なるパターンで発現することを確認している。これまでに、*hyp* 遺伝子群の生態的な機能を解析するために作成した 3 重破壊株(⊿*hypA, B, C*)では、大きな表現型の変化が見られないことを報告している。本研究では、黄麹菌におけるハイドロフォービン遺伝子群の生理的意義について詳細な解析を行うために、9 つの *hyp* 遺伝子群の破壊株を系統的に作製し、表現型の観察を行った。また、破壊株と野生株の形態のわずかな差を検出するために、突然変異誘発処理を行わずに育種した専用の菌株 HiMe10(⊿*ligD*, ⊿*pyrG*)を宿主として用いている。

現在、9 種のハイドロフォービン遺伝子について順次、破壊株の作製を進め、7 重破壊株(⊿*hypA, B, C, D, E, F, G*)の構築まで完了しており、一部にコロニーの生育速度や分生子形成の差が認められている。残りの *hyp* 遺伝子の欠失を進めるとともに、既に作製に成功した多重破壊株と表現型解析用宿主の表現型を比較することで、黄麹菌におけるハイドロフォービン遺伝子群の生態学的な役割について考察する。

Aspergillus oryzae, Hydrophobin, conidial production

講演番号：3A08a08
講演日時：3 月 27 日 10:57～ センター2 号館 A08 会場

麹菌におけるイトラコナゾール耐性を指標とした形質転換用マーカーの開発
Development of a new marker for *Aspergillus* transformation using Itraconazole resistance
○渡嘉敷 直杏[1]、水谷 治[1,2]、外山 博英[1,2] ([1]鹿児島連大・農、[2]琉球大学・農)
○Jikian TOKASHIKI[1], Osamu MIZUTANI[1,2], Hirohide TOYAMA[1,2] ([1]Kagoshima Univ., [2]Univ. Ryukyus)

【目的】
糸状菌である黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は味噌や醤油といった醸造食品から酵素剤といった産業利用まで幅広く利用されている重要な産業微生物である。糸状菌は種々の抗生物質に対して強い耐性を持つためセレクションに利用可能な薬剤と耐性マーカー遺伝子に制限があり、遺伝子組換え等の実験には一般的に栄養要求性のある実験室株を用いることが多い。しかしながら、全ての糸状菌に栄養要求性株が取得されているわけではないため、薬剤耐性マーカー遺伝子の開発は重要である。そこで本研究では、エルゴステロール生合成を阻害するアゾール系薬剤とその耐性遺伝子の開発を行い、麹菌用マーカーとして機能するかどうかを検討した。
【方法・結果】
はじめに野生型黒麹菌・黄麹菌がアゾール系薬剤であるイトラコナゾール感受性であることを確認した。黒麹菌由来の 14 alpha demethylase をコードする *cyp51A* を麹菌高発現プロモーター下に連結した。同時に、*A. fumigatus* のアゾール薬剤耐性株で変異が入ることが多い 54 番目のグリシンをコードする塩基配列をアルギニンに変化し、イトラコナゾールに耐性遺伝子となるよう塩基置換した *cyp51A*-T を作成した。イトラコナゾール耐性遺伝子導入の為の供試菌株には硝酸資化遺伝子（*niaD*）を部分欠損し、イトラコナゾール感受性である黄麹菌株（niaD300）を用いた。はじめに *niaD* 遺伝子をターゲットにイトラコナゾール耐性遺伝子を導入した形質転換株を得た。次に、イトラコナゾール耐性が付与できるのか調べるために、イトラコナゾール含有培地上でセレクションし、生育した候補株に対して、PCR を用いて染色体上に組込まれたかの確認を行った。その結果、イトラコナゾール耐性をしめす候補株では目的位置で相同組換えされた事が検出された。更に、形質転換において、直接的にイトラコナゾールが使用できるかも調べた。その結果、問題なくセレクションが可能で有ることが示された。以上から、*cyp51A*-T 遺伝子がイトラコナゾール耐性マーカーとして機能することを明らかとした。現在、黒麹菌においても本遺伝子がマーカー遺伝子と機能するかの検討を行っている。

Aspergillus, Itraconazole, cyp

発表責任者：水谷治（mizutani@agr.u-ryukyu.ac.jp）

講演番号：3A08a09
講演日時：3 月 27 日 11:08～ センター2 号館 A08 会場

クエン酸生産糸状菌 *Aspergillus tubingensis*（*A. niger*）WU-2223L を宿主とした CRISPR/Cas9 システムによる高効率かつ迅速な遺伝子置換

Efficient and rapid gene replacement of citric acid-producing *Aspergillus tubingensis* (*A. niger*) WU-2223L by CRISPR/Cas9 system

○吉岡 育哲、桐村 光太郎（早大・先進理工・応化）
○Isato YOSHIOKA, Kohtaro KIRIMURA (Dept. Appl. Chem., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

【背景と目的】

クエン酸は糸状菌 *Aspergillus* Section *Nigri* （*A. niger*）等を用いた発酵で工業的に生産される。演者らは、100 g/L を超えるグルコースから高収量（>50% (w/w)）でクエン酸を生産する *A. tubingensis*（以前は *A. niger*）WU-2223L を保有しており、本菌を基盤とした有用有機酸生産菌の育種を行っている[1,2]。一方、糸状菌の従来の遺伝子工学的育種では、遺伝子ノックアウト効率の低さや選択マーカーが限定されることが問題となり、有機酸生産菌の育種などを目的とした大規模なゲノム改変は困難であった。*Aspergillus* 属糸状菌では、前述の問題の解決のために CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集法が検討されているが、迅速な遺伝子置換法は未だ報告されていない。本研究では、WU-2223L 株を宿主として gRNA 発現カセット（DNA）と Cas9 タンパクを使用した共形質転換による迅速かつ高効率な遺伝子置換法を確立した。

【結果】

演者らは、gRNA 発現カセットを gRNA 源として直接形質転換に供し、ATP-sulfurylase 遺伝子（*sC*）のノックアウトに成功している [2]。本研究では、*sC* のノックアウトを指標として共ゲノム編集による nitrate reductase 遺伝子座（*niaD* 遺伝子座）の置換を行った。WU-2223L 株由来の Δ*ku80* 株を宿主に、*sC* と *niaD* に対する gRNA の発現カセットを Cas9 と *sC* および *niaD* 破壊カセット（ノックインドナー）と共形質転換した。セレン酸耐性を指標に *sC* ノックアウト株を選抜し、塩素酸カリウム耐性を指標とした *niaD* ノックアウト株の選抜を行った。*sC* ノックアウト株の 96%が塩素酸カリウム耐性を示し、高効率で遺伝子置換に成功した。さらに、分子内相同組換えによる簡便な *sC* 遺伝子の再生が可能なノックインドナーを作製した。Cas9 タンパクによる再切断を防ぐためにサイレント変異を含む相同部位を導入したノックインドナーを *sC* 遺伝子座にノックインし、得られた形質転換体（Δ*sC* 株）の分生子を硫酸塩を唯一の硫黄源とした培地に接種して sC^+ 株を選抜した。単離した sC^+ 株の *sC* 遺伝子座を解析すると全株でノックインドナー由来の変異が導入されており、目的とする分子内相同組換えが起こっていることを確認した。以上より、演者らは gRNA 源を DNA とした共ゲノム編集とマーカー遺伝子の簡便な再生法を組み合わせた高効率かつ迅速な遺伝子置換法を確立した。

[1] Kirimura, K. and Yoshioka, I., Comprehensive Biotechnology (3rd ed.), vol. 3., 158-165 (2019).
[2] 吉岡育哲, 脇本紗梨, 桐村光太郎、第 71 回日本生物工学会大会、岡山、1Gp16 要旨集 p126 (2019).

Aspergillus tubingensis (*A. niger*), CRISPR/Cas9, gene replacement

発表責任者：桐村　光太郎（kkohtaro@waseda.jp）

講演番号：3A08a10
講演日時：3 月 27 日 11:19～ センター2 号館 A08 会場

マーカーリサイクル法を用いた Rhodosporidium toruloides 二倍体株における KU70 破壊株の作出
Creation of KU70 deletion strain in Rhodosporidium toruloides diploid strain using marker recycling method

○箕崎 悠貴[1]、高見沢 健留[1]、志田 洋介[1]、森 一樹[2]、田代 康介[4]、油谷 幸代[5]、山崎 晴丈[3]、髙久 洋暁[3]、小笠原 渉[1] ([1]長岡技大、[2]鹿児島高専、[3]新潟薬科大、[4]九州大学、[5]産総研・創薬基盤)
○Yuki HAKOZAKI[1], TAKERU TAKAMIZAWA[1], YOSUKE SHIDA[1], KAZUKI MORI[2], KOSUKE TASHIRO[4], SACHIYO ABURATANI[5], HARUTAKE YAMAZAKI[3], HIROAKI TAKAKU[3], WATARU OGASAWARA[1] ([1]Nagaoka Univ. of Tech., [2]Kagoshima NIT, [3]Nigata Univ. of PALS, [4]Kyushu Univ., [5]AIST)

近年、健康維持に効果的である機能性食品の需要が急速に高まっている。中でも特に注目されているのがω-3 脂肪酸とカロテノイドである。ω-3 脂肪酸は生体内において多くの効能を発揮する機能性食用油脂の原料であり、動脈硬化や心臓病などのリスクを低減させるほか記憶力の向上や生活習慣病の予防などにも効果があると報告されている。カロテノイドは緑黄色野菜などに多く含まれる天然色素であり、強力な抗酸化作用とそれに由来するガン抑制効果や老化防止などの効能が報告されている。しかし、これらの機能性食品はある特定の魚や堅果、野菜などを原料に生産されているために安定した供給が難しく、拡大する需要量に対してその供給量は将来的に大きく不足するであろうことが予測されている。このような背景から、近年では微生物を用いた ω-3 脂肪酸およびカロテノイド生産に関する研究が積極的に行われている。微生物の培養系は外界から遮断されており、その培養条件は機械により厳密に定められるため、動植物のように日照時間や降雨量、気温の変化などに左右されず安定した収量を継続して確保することが可能である。また、微生物は培養槽やタンクなどを用いて立体的に培養するため、国土が狭い我が国においてもより小さい面積で高収量を実現することができ、かつ需要拡大による供給量の増大にも設備の増設や拡張により比較的柔軟に対応することが出来る。現在研究が進められている有用微生物の中で、油脂酵母 *Rhodosporidium toruloides* は極めて高い油脂生産能力を有し、かつカロテノイド合成能も有していることから、従来の動植物に代わる新たなω-3 脂肪酸、カロテノイドの供給源として利用できる可能性が高い。しかし、*R. toruloides* 自体はω-3 脂肪酸合成能力を有さず、複数の外来遺伝子の導入が不可欠となっている。またカロテノイド生産に関しても、細胞内での合成量は産業的な実用水準には達していない。そのため、遺伝子操作による *R. toruloides* の油脂生産能力の向上や、カロテノイド生産経路の解明、増強が急務である。我々は他の野生株と比較して油脂生産量が高い特徴を有する *R. toruloides* NBRC10032 株に着目した。ゲノム解析の結果、当該株はホモ接合型の二倍体株であることが判明している。*R. toruloides* は相同組換えの発生頻度が低いという性質があり、これは外来遺伝子の導入や、遺伝子破壊による機能解析において大きな障壁となっている。NBRC10032 株の場合、すべての遺伝子座が二つ存在することから、その効率はさらに低下するものと考えられた。そこで本研究では、二倍体株における高効率な遺伝子ターゲッティング系の構築のために、*URA3* マーカーリサイクル法を用いて DNA 非相同末端修復に関与する遺伝子 *RtKU70* を破壊し、同遺伝子の破壊が相同組換え効率に与える影響、並びに遺伝子破壊におけるマーカーリサイクル法の有用性を検討した。

Rhodosporidium toruloides, Ku70, Marker recycling method

講演番号：3A08a11
講演日時：3 月 27 日 11:40～ センター2 号館 A08 会場

分裂酵母の巨大な中心体タンパク質 Spo15 はどのようにして胞子細胞膜形成に関わるか

How is a fission yeast centrosomal protein, Spo15 involved in spore membrane formation?

○新美 柊子、石橋 尚実、中村 太郎（大阪市大・院理）
○Touko NIIMI, Naomi ISHIBASHI, Taro NAKAMURA (Osaka City Univ.)

【背景】

中心体（酵母ではスピンドル極体）は微小管形成中心としてよく知られている。しかし、もう１つの役割として「細胞膜新生の足場」としての働きを持つ。この働きは、例えばヒトの一次繊毛膜や酵母の胞子細胞膜の形成においてみられる。興味深いことに、いずれの過程においても中心体に新たな付加構造が形成され、そこに細胞膜形成に必要なタンパク質がリクルートされ、膜小胞が集まることにより胞子細胞膜が形成される。そのため、中心体を起点とした細胞膜形成は進化を超えた普遍的かつ重要な現象である。しかし、その分子メカニズムはまだ完全には明らかにされていない。

これまで、私たちの研究対象である分裂酵母の胞子細胞膜形成において、いくつもの必須タンパク質（以下、中心体因子とする）が取得・解析されてきた。その中の１つである Spo15 は 1957 アミノ酸（aa）からなる非常に巨大なタンパク質であり、その大部分がコイルドコイル領域で占められている。先行研究により Spo15 は別の中心体因子である Spo2 を中心体に留めること・カルモジュリン Cam1 の変異株において Spo15 は中心体に局在できなくなることが明らかにされている（Nakase *et al.*, 2008、Itadani *et al.*, 2010）。この巨大なサイズと構造的特徴から Spo15 は中心体の構造維持においても重要なものであると推測した。本大会では Spo15 を領域ごとの役割について報告する。

【結果】

様々な領域を部分的に欠損させた Spo15 タンパク質を発現させ、その機能を調べたところ、以下の 3 点が明らかになった：1. Spo15 の C 末端側 1500-1957 aa で Ca^{2+}依存的に Cam1 と結合し、また Cam1 との結合は、自身が中心体に局在するために必要である 2. Spo15 の N 末端側 132-209 aa は Spo2 と直接的に結合し、SPB に留めるのに必要である 3. Spo15 の中間領域（210-1489 aa）は欠失しても胞子細胞膜形成を開始できる。

以上の結果から、Spo15 は C 末端領域で Cam1 と Ca^{2+}依存的に結合し、これにより中心体に局在する、そして、N 末端側で Spo2 と直接結合することで胞子細胞膜形成を開始させていることが示された。また、細胞膜形成中の中心体の構造を維持し、正常な細胞膜形成の進行に関わる働きも持つ可能性が示唆された。

yeast, centrosome, plasma membrane

講演番号：3A08a12
講演日時：3 月 27 日 11:51～ センター2 号館 A08 会場

Saccharomyces cerevisiae におけるイントロンによるタンパク質発現増強に関与する遺伝子のゲノムワイドスクリーニング

Genome-wide screening of the genes involved in intron-mediated enhancement in *Saccharomyces cerevisiae*

○菊田 浩希[1]、星田 尚司[1,2,3]、赤田 倫治[1,2,3]([1]山口大院・創成科学・化学、[2]山口大中高温微生物セ、[3]山口大生命医工学セ)

○Hiroki KIKUTA[1], Hisashi HOSHIDA[1,2,3], Rinji AKADA[1,2,3] ([1]Yamaguchi Univ.,dev.appl.chem, [2]Yamaguchi Univ.,RC-TMR, [3]Yamaguchi Univ.,YUBEC)

イントロンは、真核生物の遺伝子中の要素で、pre-mRNA としてコード配列とともに転写されるが、mature-mRNA になるときにスプライシングにより除去されるのでアミノ酸配列はコードしていない。しかし、イントロンは真核生物でいくつかの重要な機能を持つ。その一つは intron-mediated enhancement (IME) であり、これはイントロンを含む遺伝子のタンパク質発現を増強する効果である。これまでに、分泌型ルシフェラーゼをコードし、酵母コドンに最適化した yCLuc の発現が、イントロンを含むプロモーターを用いるとイントロンを含まないプロモーターと比較して約 40 倍増加したことを示した。これを利用して IME のメカニズムを解明するために、約 4800 株からなる *S. cerevisiae* の遺伝子破壊株セットを使用して、IME に影響を与える遺伝子のスクリーニングを行った。

S. cerevisiae の破壊株セット（*MAT*a）に、*TDH3* プロモーターと yCLuc の間に *RPS25A* のイントロンを含む発現ベクターを形質転換し、ルシフェラーゼ活性を測定した。破壊株セットのうち 4464 株の形質転換体が得られ、ルシフェラーゼ活性を測定した結果、発現量が増加した 46 株、低下した 233 株を得た。これらの合計 279 株を再度一つずつ活性測定し、発現量が野生株に比べて約 2 倍以上高い 41 株、約 0.5 倍以上低い 38 株を選んだ。これらの合計 79 株に対して再度同じプラスミドとプロモーター部分にイントロンを含まない yCLuc 発現ベクターをそれぞれ形質転換し、野生株と発現量を比較した。その結果、*CDC73* の破壊株はイントロンを含む yCLuc の発現のみを抑制し、イントロンを与えていない yCLuc の発現には影響しなかった。また 6 つの破壊株はイントロンを含む場合よりも、イントロンを与えていない yCLuc の発現量を大きく増強させ、野生株に比べ 5 倍～35 倍に増強することが分かった。まず PCR 法を用いて各株の破壊遺伝子を確認した。次に、発現の変化が実際にこれら遺伝子の破壊によるものか調べるために各破壊株に野生型遺伝子を導入して相補させルシフェラーゼ発現を調べた。その結果 *CDC73* と、6 つの破壊株のうち *SSN8*、*LRP1*、*UBP3*、*FYV6* では相補することにより発現量が野生型のレベルに戻った。これらの結果より、*CDC73* は IME を引き起こすのに必要な遺伝子であり、また *SSN8*、*LRP1*、*UBP3*、*FYV6* は yCLuc の発現抑制に関わる遺伝子であると考えられる。*CDC73* と *SSN8* は RNA ポリメラーゼに関わるタンパク質、*LRP1* は RNA に結合するタンパク質をコードしている。これらの遺伝子は RNA レベルで IME による発現増強又は、イントロンのない時の発現抑制を行っていることを示唆している。

intron-mediated enhancement, genome-wide screening, *Saccharomyces cerevisiae*

発表責任者：星田　尚司（hoshida@yamaguchi-u.ac.jp）

講演番号：3A08a13
講演日時：3 月 27 日 12:02～ センター2 号館 A08 会場

炭素源により凝集・分散変化を示すキシロース代謝酵素のアミノ酸配列の解析
Amino acid sequences involved in aggregation of the xylose-metabolizing enzyme in Kluyveromyces marxianus
○本薗 尚悟[1]、片平 くるみ[1]、前田 比呂[1]、星田 尚司[2,3,4]、赤田 倫治[2,3,4] ([1]山口大工、[2]山口大院創成科学・化学、[3]山口大中高温微生物セ、[4]山口大生命医工学セ)
○ Shogo MOTOZONO[1], Kurumi KATAHIRA[1], Hiro MAEDA[1], Hisasi HOSIDA[2,3,4], Rinzi AKADA[2,3,4] ([1]Yamaguchi Univ.,Dept.Appl.Chem., [2]Yamaguchi Univ.,Dev.Appl.Chem., [3]Yamaguchi Univ.,RC-TMR, [4]Yamaguchi Univ.,YUBEC)

近年、第二世代と称される稲わらや廃材などのリグノセルロース系バイオマスに含まれる糖質の発酵生産への利用が注目を浴びている。耐熱性酵母である *Kluyveromyces marxianus* (Km)は、リグノセルロース系バイオマス中のヘミセルロースに含まれるキシロースを代謝できるが、グルコースに比べるとキシロースの代謝速度は遅い。そこでキシロース代謝酵素の挙動を調べることにした。

キシロースは酵母の細胞内に取り込まれたのち、キシロース還元酵素(Xyl1)、キシリトールデヒドロゲナーゼ(Xyl2)、 キシルロキナーゼ(Xks1)で順に代謝されてペントースリン酸経路を経由して、解糖系に入ると考えられる。Km でこれら 3 つの酵素の細胞内局在を調べた。Km*XYL1*、Km*XYL2* 、Km*XKS1* を GFP と融合させた遺伝子を Km で発現させ、グルコース培地で 1 日培養し、顕微鏡で観察した。KmXyl1、KmXks1 は細胞質に存在していたのに対し、KmXyl2 は凝集していた。一方、キシロース培地で培養、観察をしたところ、3 つすべての酵素が細胞質に分散した。また、KmXyl2－GFP 株を炭素源を変えて培養するとフルクトース、ガラクトースでは凝集し、アラビノース、ソルビトール、グリセロール、キシリトールでは細胞質に分散した。このことから、KmXyl2 は発酵性の糖で凝集し、非発酵性の糖で細胞質に分散することが分かった。キシロース資化性酵母である *Scheffersomyces stipites* (Ss)のキシロース代謝酵素も GFP と融合して Km で発現させグルコース培地とキシロース培地で培養、観察すると、SsXyl2 は、Km と同様の凝集と分散を示し、SsXks1 は同様に分散していた。一方、SsXyl1 はどちらの培地でも凝集した。KmXyl2 の凝集と分散を制御する配列を調べるために、KmXyl2 と相同性の高い配列を検索したところ、*Aspergillus oryzae* (Ao)のキシリトールデヒドロゲナーゼ(AoXdh)、*Homo sapiens* (Hs)と *Arabidopsis thaliana* (At)のソルビトールデヒドロゲナーゼ(HsSdh、AtSdh)が見つかった。これらを Km で発現させグルコース培地とキシロース培地で培養、観察すると、AoXdh、AtSdh は Km と同様に凝集と分散を示し、HsSdh はグルコース培地でも細胞質に分散した。KmXyl2 と HsSdh のグルコース培地での存在状態が異なったことから、KmXyl2 の C 末側から段階的に HsSdh に置換すると、KmXyl2 の N 末側の 28 アミノ酸残基以降を HsSdh のアミノ酸配列で置換したキメラ酵素がグルコース培地で細胞質に分散した。このことから、KmXyl2 の N 末が凝集に関与することが示唆された。一方、凝集を示さない KmXyl1 の C 末を凝集性の SsXyl1 の C 末に置換すると、SsXyl1 の C 末側の 8 アミノ酸残基を置換しただけで凝集を示した。

Kluyveromyces marxianus, Xylitol dehydrogenase, Xylose reductase

講演番号：3A08p01
講演日時：3 月 27 日 13:50～ センター2 号館 A08 会場

プラスミド・宿主染色体由来の MvaT ホモログの DNA 結合能の評価
Analysis of DNA-binding affinities of MvaT-homologous proteins encoded on the chromosome of Pseudomonas putida KT2440 and plasmid pCAR1.
○津島 和生[1]、角埜 裕基[1]、水口 千穂[1,2]、岡田 憲典[1,2]、野尻 秀昭[1,2]([1]東大・生物工学セ、[2]微生物連携機構)
○Kazuki TSUSHIMA[1], Yuki KADONO[1], Chiho MINAKUCHI[1,2], Kazunori OKADA[1,2], Hideaki Nojiri[1,2] ([1]BRC, UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

【背景・目的】核様体タンパク質 (NAPs) は、DNA の構造を変化させることにより数百もの遺伝子の転写制御を行う global regulator として働く。NAPs はプラスミドにもコードされており、宿主がプラスミドを獲得すると、プラスミド・宿主由来の NAPs により協調的に転写制御ネットワークの再構築が起こる。当研究室では、プラスミド pCAR1 とその宿主 *Pseudomonas putida* KT2440 株をモデルに、この現象を追究してきた。pCAR1 にコードされる Pmr と、KT2440 株染色体にコードされる TurA, TurB の 3 つの MvaT ホモログ (NAPs の一種で、腸内細菌に存在する H-NS の機能的ホモログ) は、C 末端側の DNA 結合ドメインで標的塩基配列を認識して DNA に結合し、N 末端側の二量体／多量体化ドメインでホモ・ヘテロ多量体を形成して遺伝子の転写制御を行う。過去の研究において、ATATAT、AAAAAA、GCGCGC を含む 6 塩基の二本鎖 DNA に対して、Pmr, TurA, TurB の DNA 結合ドメインの配列嗜好性を評価するため表面プラズモン共鳴法を用いた解析が行われた。その結果、配列嗜好性の違いは見られなかった一方で、TurB>TurA>Pmr の順に結合力が強いことが明らかとなった [角埜ら、2017 年度本大会]。MvaT は AT-pincer と呼ばれる DNA 認識モチーフを DNA の副溝に挿入し、そのモチーフ周辺のリジン残基が DNA のリン酸骨格と静電相互作用により結合している。Pmr, TurA, TurB のアミノ酸配列を比較すると、TurA に対し TurB では、残基番号 82 のリジンがバリンに、残基番号 103 のリジンがアルギニンになっており、TurA に対し Pmr では、残基番号 82 のリジンがアラニンになっていた。そこで本研究では、TurA の DNA 結合ドメインである TurA_ct 及び、TurA_ct-K82A, TurA_ct-K82V, TurA_ct-K103R を用いて、これらの残基の違いが DNA 結合能に与える影響を評価した。
【方法】N 末端側にヒスチジンタグを融合した各タンパク質を大腸菌で発現させ、アフィニティー精製後、CD スペクトルの比較により各置換体が TurA_ct と同様の二次構造を有していることを確認した。これらのタンパク質をアナライトとして、リガンドに ATATAT を含む二本鎖 DNA を用いて、表面プラズモン共鳴法により解離定数を算出した。
【結果・考察】TurA_ct, TurA_ct-K82A, TurA_ct-K82V, TurA_ct-K103R の順に 5.15 μM, 38.4 μM, 42.2 μM, 4.03 μM の解離定数が得られた。TurA_ct と TurA_ct-K82A の比較から、Pmr の結合力が TurA より弱いのは、残基番号 82 のリジンが Pmr ではアラニンになっているためと考えられた。一方、TurA_ct-K82V と TurA_ct-K103R は、TurB の配列を模しているにもかかわらず結合力が強くならなかったことから、TurB の結合力が TurA より強いのは DNA と直接相互作用する残基以外に原因があると考えられた。

nucleoid-associated proteins, H-NS family proteins, Pseudomonas

発表責任者：野尻　秀昭（anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3A08p02
講演日時：3 月 27 日 14:01～ センター2 号館 A08 会場

Pseudomonas 属細菌の H-NS ファミリータンパク質における翻訳後修飾部位の同定
Post-translational modification of H-NS family proteins in pseudomonads

ヴァシレヴァ デリアナ[1]、○水口 千穂[1,2]、孫 悦[1]、古園 さおり[1,2,4]、吉田 稔[2,3,4]、岡田 憲典[1]、野尻 秀昭[1,2] ([1]東大・生物工学セ、[2]東大・微生物連携機構、[3]東大院農生科・応生工、[4]理研 CSRS・ケミカルゲノミクス)
Delyana VASILEVA[1], ○Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1,2], Yue SUN[1], Saori KOSONO[1,2,4], Minoru YOSHIDA[2,3,4], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1,2] ([1]BRC, UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Dept. Biotechnol., UTokyo, [4]Chem. Genomics, RIKEN CSRS)

【背景・目的】真核生物の DNA がヒストンに折り畳まれて存在するように、細菌の DNA は核様体タンパク質 (NAPs) に折り畳まれて存在する。NAPs は染色体だけでなくプラスミドにもコードされており、細菌がこのようなプラスミドを獲得すると、染色体由来の NAPs とプラスミド由来の NAPs が協調的に機能するようになる。我々は土壌細菌 *Pseudomonas putida* KT2440 株とカルバゾール分解プラスミド pCAR1 をモデルとして、接合前に宿主内で形成されていた染色体由来の H-NS ファミリータンパク質 (TurA と TurB) による転写制御ネットワークを、pCAR1 由来の Pmr が再構築するメカニズムについて研究を進めてきた。最近、KT2440 株とその pCAR1 保持株を対象にアシル化修飾タンパク質の網羅的解析を実施したところ、各種 NAPs がアセチル化やスクシニル化を受けていることが明らかとなった [Vasileva *et al.*, 2018, *Environ. Microbiol. Rep.*, 10: 299-309]。本研究では、上述の H-NS ファミリータンパク質における翻訳後修飾部位の網羅的同定を目的とした。
【方法】実験は細胞内のタンパク質量が多く、免疫沈降用の良好な抗体が得られていた TurA を対象に行った。KT2440 株の対数増殖期の細胞を用いて、抗 TurA 抗体による免疫沈降後のサンプルを SDS-PAGE に供し、ゲル内消化後のサンプルを LC-MS/MS により解析した。
【結果・考察】**図**に示す 9 つの残基が、アセチル化、メチル化、リン酸化の修飾を受けていることが明らかとなった。このうち K39 と K49 は TurB や Pmr でも保存されており、以前実施した解析 [Vasileva *et al.*, 2018] においても、TurA と TurB で K39 の、TurA と Pmr で K49 のアセチル化が検出されていた。TurB の結晶構造解析の結果から、両残基は水素結合により多量体形成に寄与することが明らかとなっている。また K15 は Pmr で保存されており、Pmr においてアラニン置換を導入すると多量体形成能が低下することが分かっている。一般に H-NS ファミリータンパク質は、DNA 上で多量体を形成することで RNA ポリメラーゼの接近を妨げる転写制御様式を持つ。以上より、上述の残基のアセチル化が TurA の多量体形成能を変化させ、結果として制御する遺伝子群を変化させる可能性が示唆された。

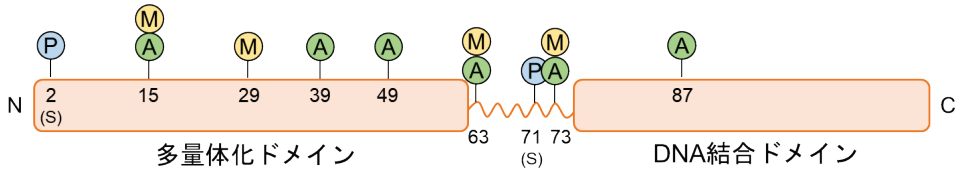


図. TurA において修飾が検出されたアミノ酸残基。番号は N 末端側からの残基数を表し、(S)はセリン残基を、それ以外はリジン残基を表す。A はアセチル化の、M はメチル化の、P はリン酸化の修飾が検出されたことを示す。

H-NS family proteins, *Pseudomonas*, post-translational modification

発表責任者：野尻秀昭（anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3A08p03
講演日時：3 月 27 日 14:12～ センター2 号館 A08 会場

緑膿菌において亜硝酸で誘導発現する遺伝子群の機能解析

Studies on the nitrite-inducible gene cluster in *Pseudomonas aeruginosa*

○岡本 洸彰[1]、石田 菜津美[1]、亀谷 将史[1,2]、石井 正治[1,2]、新井 博之[1,2] ([1]東大院・農生科、[2]東京大学微生物科学イノベーション連携研究機構)
○Hiroaki OKAMOTO[1], Natsumi ISHIDA[1], Masafumi KAMEYA[1,2], Masaharu ISHII[1,2], Hiroyuki ARAI[1,2] ([1]Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo, [2]CRIIM)

緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）は、自然界に広く分布するグラム陰性細菌である。日和見感染を引き起こすことから、院内感染の原因菌として問題視される。緑膿菌は好気呼吸鎖の末端酸化酵素の 1 つとして、*cbb*$_3$ 型の cytochrome *c* oxidase を持つ。この酵素には isosubunit が複数種類存在し、その内の 1 つをコードする *ccoN3* は、*ccoQ3* とオペロンを形成する。

ccoN3Q3 は、近傍にコードされている亜硝酸応答性の転写調節因子 NirY により誘導されるが、*ccoN3Q3* 下流と *nirY* との間の領域には、機能未知の *PA1854* が存在する。本研究ではこの遺伝子に注目し、*PA1854* が *ccoN3Q3* とオペロンを形成するかどうかの検証、及びその遺伝子産物の機能解析を目的とした。

PA1854 と *ccoN3Q3* が 1 つの転写単位として存在するかどうかを、*lacZ* プロモーターアッセイにより評価した。実験の結果、*ccoQ3* と *PA1854* の間にはプロモーターがなく、亜硝酸存在下で NirY により誘導される 1 つのオペロンであることが示された。

PA1854 の機能を予測するため、アミノ酸配列に基づいたインフォマティクス解析を行った。ドメイン検索の結果、N 末側の領域に HPP family、C 末側の領域に 2 つの CBS ドメインがヒットした。HPP family は機能が未確定だが、トランスポーターであることが予想されている。さらに、ラン藻の一種において HPP family のタンパク質が亜硝酸トランスポーターとして働くという報告があり、この株と *P. aeruginosa* PAO1 株との間で BLAST 検索をおこなったところ、ラン藻の亜硝酸トランスポーターと PA1854 が双方向ベストヒットした。*PA1854* が亜硝酸応答性のオペロン上に存在するという実験結果も踏まえ、「PA1854 は亜硝酸トランスポーターである」という仮説を立てた。

PA1854 の亜硝酸トランスポーターとしての機能を調べるため、野生株と変異株（Δ*PA1854*）の生育比較を行った。LB 培地に亜硝酸を添加した条件と、合成培地に N 源として亜硝酸のみまたは硝酸のみを添加した条件のそれぞれについて、添加濃度を変えて生育を調べた。いずれの場合も、野生株と変異株は異なる生育を示した。野生株と変異株で亜硝酸の感受性に違いが見られるという結果から、PA1854 が亜硝酸トランスポーターであることが示唆された。

Pseudomonas aeruginosa, hpp family, nitrite

講演番号：3A08p04
講演日時：3 月 27 日 14:23～ センター2 号館 A08 会場

リボソームタンパク質 S14 の進化と 30S サブユニットの多様化
Evolution of the ribosomal protein S14 causes diversity of the 30S subunit
○赤沼 元気[1,2]、河村 富士夫[2]、渡辺 智[3]、渡辺 正樹[3]、大川 典哉[3]、朝井 計[3]、千葉櫻 拓[3]、吉川 博文[3]、山田 康之[2] ([1]学習院大生命、[2]立教大生命、[3]東京農大バイオ)
○ Genki AKANUMA[1,2], Fujio KAWAMURA[2], Satoru WATANABE[3], Masaki WATANABE[3], Fumiya OKAWA[3], Kei ASAI[3], Taku CHIBAZAKURA[3], Hirofumi YOSHIKAWA[3], Yasuyuki YAMADA[2] ([1]Gakusyuin Univ., [2]Rikkyo Univ., [3]Tokyo Univ. of Agriculture)

【背景と目的】30S リボソームサブユニットを構成するリボソームタンパク質 S14 はリボソーム機能に必須であり、S14 を欠損した細胞は増殖できない。自然界に存在する S14 は 3 種のタイプに分類することができる。1 つ目は亜鉛結合型の C+ type、2 つ目は亜鉛非結合型で C+ type よりも 30 アミノ酸残基大きな C- short type、そして 3 つ目は C+ short type よりもさらに 10 アミノ酸残基大きな C- long type である。C+ type が、真核、アーキア、バクテリアの 3 ドメイン全てに保存されているのに対し、C- type はバクテリアでのみ存在が確認されていることから、原始的な S14 は C+ type であると予想できる。従ってバクテリアの S14 は亜鉛に対する依存から脱却するために C+ type から C- type へと進化してきたと考えられている。枯草菌は C+ type （S14BsC+）と C- short type（S14BsC-）の 2 種の S14 を持っており、通常は S14BsC+がリボソームに結合しているが、細胞内亜鉛濃度の低下により S14BsC-が発現し、リボソームに結合する。そこで両タイプの S14 を使い分ける枯草菌が、C- long type の大腸菌 S14（S14Ec）及びシアノバクテリア S14（S14Se）を利用できるのか、言い換えれば進化の過程を再現できるのかについて検証するとともに、S14 を置換したリボソームの特性を理解することを目的とした。
【結果と考察】 S14Ec、又は S14Se をコードする遺伝子を枯草菌に導入し、それぞれの S14 の発現を誘導した条件で S14BsC+遺伝子の欠失に成功した。S14Ec と S14Se はそれぞれ枯草菌 70S リボソーム中に検出されたことから、S14Ec、S14Se はともに枯草菌 30S サブユニットに結合可能であり、S14BsC+の機能を相補可能であると言える。しかしながら S14Ec 置換株と S14Se 置換株の増殖速度は低下し、翻訳活性の高い細胞で検出されるポリソームの量も著しく低下していた。*in vitro* の解析からも、これらの異種 S14 を含む 70S リボソームの翻訳活性が低下することが分った。さらに、S14Ec 置換株と S14Se 置換株で異常に蓄積する 30S サブユニットでは、S3 と S2 の存在量が低下していた。S3、S2 は 30S 中で S14 の近傍に位置していることから、サイズの大きな S14Ec、S14Se が結合した周辺の構造が変化し、S3 と S2 の 30S に対する結合親和性が低下したことが、翻訳活性低下の一因であると考えられる。この結果を受け、枯草菌リボソームにおける S14Se と S3Se の関係を調査した。すると、S14BsC+の結合したリボソームでは S3Se は機能できないが、S14Se の結合した枯草菌リボソームでは S3Se が機能することが分った。この結果は、S14 の進化に伴い、S3 もそれに適応するために進化を遂げてきた可能性を強く示唆するものである。

Ribosome, Ribosomal protein, Bacillus subtilis

発表責任者：赤沼元気（genki.akanuma@gakushuin.ac.jp）

講演番号：3A08p05
講演日時：3 月 27 日 14:34～ センター2 号館 A08 会場

超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* における IA 型 DNA トポイソメラーゼ機能の遺伝学的解析

Genetic analysis of type IA DNA topoisomerase function in the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakarensis*

○山浦 昂大[1]、松見 理恵[2]、John Reeve[3]、石野 良純[2]（[1]九州大農、[2]九州大院農、[3]オハイオ州立大）
○Kodai Yamaura[1], Rie Matsumi[2], John Reeve[3], Yoshizumi Ishino[2] ([1]Kyushu Univ., [2]Grad. Sch. Kyushu Univ., [3]OSU)

(背景)

DNA は二重らせん構造を取っているため、その代謝を理解するにはそのトポロジーを考える必要がある。例えば、複製や転写などにおける DNA 二本鎖を解く過程では高次コイル構造（スーパーコイル）が発生し、その解消無しには正常な進行が妨げられる。したがって、遺伝情報の維持と発現の過程で適切な DNA 構造変換が必要であり、そのために細胞内において DNA トポイソメラーゼが重要な働きをしている。

DNA トポイソメラーゼは、その反応機構や構造で分類されており、IA 型トポイソメラーゼは全生物に存在する。そのため、IA 型トポイソメラーゼは生命活動に重要な役割を持つと推測できるが、詳細な細胞内機能は未解明のままである。また、IA 型トポイソメラーゼに分類されるリバースジャイレース（RGY）が、好熱菌特有のトポイソメラーゼであることもたいへん興味深い。すなわち、RGY は全超好熱菌および一部の好熱菌に存在し、高温環境での生命活動に重要だと考えられているが、細胞内でどのような役割を果たすのか、未だわかっていない。

(目的)

本研究では、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* に存在する 2 種の IA 型トポイソメラーゼの遺伝子破壊株を作製し、その性質を解析することにより、それぞれの細胞内機能を明らかにする手がかりを得ることを目的とした。

(方法)

T. kodakarensis は IA 型トポイソメラーゼとして、DNA トポイソメラーゼ III (TopIII) と RGY を持つ。これらの単独および二重遺伝子欠損株を作製し、表現型を検討した。環境ストレス応答を見るために、温度依存的な細胞増殖特性、DNA 損傷感受性を調べた。また、細胞内のスーパーコイル状態を比較するために、各細胞にプラスミドを導入し、細胞内におけるスーパーコイル状態を二次元電気泳動法により解析している。

(結果)

TopIII と RGY をコードする遺伝子をそれぞれ破壊した株の単離に成功し、TopIII と RGY が *T. kodakarensis* の生育に必須でないことが判明した。さらにこれらの遺伝子の二重欠損株の単離にも成功し、IA 型 DNA トポイソメラーゼがなくても、本菌は生存可能であることが明らかとなった。また、これら破壊株の種々の温度における細胞増殖特性を調べた結果、RGY 欠損株には高温感受性が、TopIII 欠損株には低温感受性が認められた。DNA 損傷感受性テストにおいて、二重遺伝子欠損株では UV 感受性が、TopIII 欠損株では methyl methanesulfonate(MMS)感受性が見られた。以上より、*T. kodakarensis* の細胞内における TopIII と RGY の機能分担が示唆された。

Hyperthermophile, DNA topoisomerase, Reverse gyrase

講演番号：3A08p06
講演日時：3 月 27 日 14:45～ センター2 号館 A08 会場

次世代型プレバイオティクス・ガラクトシル-β-1,4-ラムノースのビフィズス菌特異的な増殖促進機構の解析
Analysis of mechanism of selective promotion of growth in bifidobacteria with next generation prebiotic Galactosyl-β1,4-rhamnose
○平野 里佳[1,2]、阪中 幹祥[1,3]、杉本 直久[4]、江口 省吾[4]、奈良 未沙希[1]、片山 高嶺[5]、北岡 本光[4,6]、中井 博之[4]、栗原 新[2]([1]石川県大生資環、[2]近畿大生物理工、[3]デンマーク工大食品、[4]新潟大農、[5]京大院生命、[6]農研機構・食品研)
○Rika HIRANO[1,2], Mikiyasu SAKANAKA[1,3], Naohisa SUGIMOTO[4], Syogo EGUCHI[4], Misaki NARA[1], Takane KATAYAMA[5], Motomitsu KITAOKA[4,6], Hiroyuki NAKAI[4], Shin KURIHARA[2]([1]Ishikawa Prefectural Univ., [2]Kindai Univ., [3]Technical Univ. of Denmark, [4]Niigata Univ., [5]Kyoto Univ., [6]NARO)

【背景】近年、ヒト腸内常在菌叢における最優勢種が報告され、常在菌最優勢種のほとんどが「善玉菌」でも「悪玉菌」でもない、機能不明の「日和見菌」に分類されることが明らかとなった。また、これらの日和見菌の一部が食物繊維が不足した食餌を摂取した際に腸管バリア機構を破壊すること（Cell 2016. 167:1339-1353.）等が報告されるなど、「日和見菌」に分類された腸内細菌の新しい機能が日々明らかとなっている。我々の研究により、既存のプレバイオティクスの一部は、善玉菌に加え、日和見菌に含まれる一部の常在菌最優勢種の増殖促進効果を持つことが明らかとなった。そこで、我々は、「日和見菌・悪玉菌を増殖させず、善玉菌のみを増殖させる」という、新しい機序を持つ次世代型プレバイオティクスの開発と、その特異的な増殖促進機構の解明を目的とした。また、この応用として、次世代型プレバイオティクスを用いた善玉菌の増殖促進による腸内環境改善作用を介した偽膜性腸炎原因菌の生育抑制を目的として研究を行った。
【実験方法・結果】次世代型プレバイオティクス候補物質として、数十種類のオリゴ糖について、腸内常在菌最優勢 13 種（Nature 2010. 464: 59−65.）および善玉菌・悪玉菌による資化性を解析した。その結果、加リン酸分解酵素（ホスホリラーゼ）の逆反応を利用したオリゴ糖の大量合成・生産技術により合成したガラクトシル-β-1,4-ラムノース （Galβ1,4Rha）は、ビフィズス菌を特異的に増殖させた。この特異的な増殖促進機構を明らかにする目的で、*Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 105-A 株の糖質 ABC トランスポーターの基質結合タンパク質の遺伝子変異株ライブラリ（計 11 株）を作製し、Galβ1,4Rha による生育促進効果を解析したところ、BL105A_0502 遺伝子の変異株のみで Galβ1,4Rha による増殖促進効果が低下した。このことから *B. longum* 105-A 株は BL105A_0502 が基質結合タンパク質として働く ABC トランスポーターを介して Galβ1,4Rha を資化すると考えられた。Galβ1,4Rha により増殖促進効果のあった *B. longum* subsp. *infantis* JCM 1222^T 株と偽膜性腸炎の原因菌 *Clostridium difficile* JCM1296^T を共培養したところ、Galβ1,4Rha を添加した場合の *C. difficile* の菌数が添加しなかった場合の 3000 分の 1 に抑制された。一方で、*B. infantis* BLIJ_2090（BL105A_0502 ホモログ）の変異株では上記の *C. difficile* の生育抑制効果は見られなかった。
【考察】Galβ1,4Rha のビフィズス菌特異的な増殖促進機構として、BL105A_0502 及びそのホモログを持つビフィズス菌だけが Galβ1,4Rha を資化することが考えられた。*In vitro* で *B. infantis* は BLIJ_2090 を介して Galβ1,4Rha を資化し、*C. difficile* の生育を抑制すると考えられる。

prebiotic, Bifidobacteria, *Clostridium difficile*

発表責任者：栗原　新（skurihara@waka.kindai.ac.jp）

講演番号：3A08p07
講演日時：3 月 27 日 15:06～ センター2 号館 A08 会場

エンドヌクレアーゼ *Taq*I の直接導入で得られた産業用酵母の再編成ゲノムの構造解析
Structural analysis of the rearranged genomes in industrial yeast strains obtained by direct protein transfection with endonuclease *Taq*I
○安川 泰史[1]、小田 有沙[2]、増尾 直久[1]、太田 邦史[2]([1]三菱商事ライフサイエンス株式会社、[2]東大院総合文化)
○Taishi YASUKAWA[1], Arisa ODA[2], Naohisa MASUO[1], Kunihiro OHTA[2] ([1]Mitsubishi Corporation Life Sciences Limited, [2]Grad.Sch.of Arts and Sci., The Univ. of Tokyo)

【目標・課題】当社では産業用酵母のトルラ酵母 *Candida utilis*（以下 Cu）を用いて、グルタチオンなどのバイオ素材を発酵生産している。本研究の目標は、微生物プラットフォームとして有用な Cu を育種で創出することである。Cu は高密度培養でもアルコール発酵しないことから、物質生産性に優れる。一方でゲノムは高次倍数性であり、有性生殖様式も未解明なことから、従来の組換え DNA 技術は適用しづらい。古典的な突然変異育種には多くの時間と労力が必要で、また得られる形質も既に飽和しつつある。よって産業用酵母にも適用できる新しい育種技術の開発が課題であった。
【経緯】東京大学太田研が開発した TAQing システムは、体細胞分裂期に発現させた耐熱性制限酵素 *Taq*I でゲノムをランダムに切断／再結合（シャッフリング）させ、多数の遺伝子が関わる量的形質を高速改良する技術である[1]。また活性 *Taq*I を直接生細胞内に導入するタンパク質導入型 TAQing システムも確立されており[2, 3]、我々は後者を Cu に適用して、継代安定的で凝集度合の異なる二種類の Cu 凝集株を取得した。昨年の本大会では、染色体 PFGE パターンが Cu 野生型のそれと互いに異なることを報告している[4]。本発表では、その後に実施したゲノムリシーケンス解析について報告する。
【方法・結果・考察】Cu NBRC0988（以下 WT）と Cu 凝集株 a4、a9 からゲノムを精製し PCR フリーでライブラリー調製した。Illumina NovaSeq を用いて 2×150 base ペアエンドシーケンシングを行い、ゲノムサイズ 13 Mb に対して 4-12 Gb のデータ量を取得した。リファレンスには *Cyberlindnera jadinii* NRRL y-1542 あるいは WT の PacBio Sequel による de novo アセンブル配列を用いた。TAQing によって生じたゲノム再編を検出するために、a4、a9 株のリシーケンス情報のうち、複数の染色体領域（またはコンティグ）にまたがってマッピングされたリード（chimeric alignment）に着目し、異なるコンティグ間での転座が起こっている領域の候補を探索した。さらに、これらの境界配列（breakpoint）が *Taq*I 認識配列 TCGA である領域を抽出した。またカバレッジが大きく変わる領域を抽出することで、コンティグレベルでの倍数性の変化や転座が検証できるので、a4、a9 株におけるカバレッジを WT のカバレッジで正規化して、抽出領域の染色体構造を定量的に推定した。結果、a4 では転座が少なくとも一か所、a9 では欠失と転座が少なくとも一か所ずつ検出された。現在、構造変異をより詳細に決定するため解析を継続している。
[1] Muramoto N., *et al.*, *Nat Commun.*, 9:1-15, 2018　[2] 日本公開特許、特開 2017-104082
[3] 日本公開特許、特開 2018-130116　[4] 日本農芸化学会 2018 年度大会 3C5p09

genome rearrangement, protein transfection, industrial yeast

発表責任者：安川泰史（taishi.yasukawa@mcls-ltd.com）

講演番号：3A08p08
講演日時：3 月 27 日 15:17～ センター2 号館 A08 会場

アスタキサンチン生産緑藻 *Haematococcus lacustris* のゲノム解析
Genome sequence of the astaxanthin-producing green algae *Haematococcus lacustris*
○森本 大地、吉田 天士、澤山 茂樹 (京都大学)
○Daichi MORIMOTO, Takashi YOSHIDA, Shigeki SAWAYAMA (Kyoto Univ.)

目的

Haematococcus lacustris は *Chlorophyceae* 綱に属する真核微細藻類の一種で、生育に不利な環境条件下でアスタキサンチンを蓄積しながら赤色シストを形成する。アスタキサンチンは強力な抗酸化活性を有するカロテノイドの一種で、免疫賦活作用や光老化防止効果等の様々な生理活性を示す。そのため、*H. lacustris* は天然のアスタキサンチン供給源として、商業生産に広く用いられてきた。しかし、本種のゲノム情報は近年報告された *H. lacustris* SAG192.80 株に限られており、分子生物学的知見は不足している。そこで、本研究では本種ゲノム情報の拡大を目的とし、*H. lacustris* NIES-144 株のシーケンス解析および遺伝子アノテーションをおこなった。

方法

H. lacustris NIES-144 株を 14/10 時間明暗周期、25℃の条件下で C 培地を用いて培養した。対数増殖期の細胞から DNA を抽出し、ペアエンドライブラリーとメイトペアライブラリー（3 kb と 10 kb）を調整後、Illumina HiSeq でのシーケンス解析に供した。得られたリードは ALLPATHS-LG によりアセンブリし、得られたドラフトゲノムの Completeness を BUSCO を用いて算出した。さらに AUGUSTUS、SNAP、GeneMark-ES を内包した MAKER パイプラインに基づき *H. lacustris* NIES-144 株の遺伝子構造予測をおこなった。

結果

シーケンス解析の結果、215,289,986 のペアエンドリードと平均 105,701,143 のメイトペアリードが得られた。これを用いてアセンブリをおこなった結果、9,693 のスキャフォールドで構成される 172 Mb のドラフトゲノムを構築した。BUSCO を用いた解析の結果、Completeness は 57.7%であり、既報の *H. lacustris* SAG192.80 株と同等の精度（59%）でドラフトゲノムが構築できたことが明らかとなった。また遺伝子構造予測およびアノテーションの結果、18,176 の遺伝子が機能予測され、278 の tRNA と 9 の rRNA 遺伝子も見出された。また機能予測された遺伝子を COG（Cluster of Orthologous Group）カテゴリーに基づき分類した結果、翻訳後修飾やタンパク質ターンオーバー、シャペロンに関与する遺伝子（1,054 個）、シグナル伝達に関与する遺伝子（1,021 個）、リボソームや翻訳関連遺伝子（645 個）が特にゲノム上に多く認められた。また、既知のアスタキサンチン生合成遺伝子を探索したところ、いずれも本種 SAG192.80 株より遺伝子数が少ないことが明らかとなった。

Haematococcus lacustris, astaxanthin, genome annotation

発表責任者：森本大地（dai.mrmt@gmail.com）

講演番号：3A08p09
講演日時：3 月 27 日 15:28～ センター2 号館 A08 会場

ハチ消化管由来新規フルクトフィリック乳酸菌 3 菌種の生化学的特徴及びゲノム構造の解析
Biochemical and genomic characteristics of three novel fructophilic lactic acid bacteria found in guts of bees

○前野 慎太朗[1]、西村 洋哉[2]、遠藤 明仁[2] ([1]農大院生物産業、[2]農大食香粧)
○ SHINTARO MAENO[1], HIROYA NISHIMURA[2], AKIHITO ENDO[2] ([1]Graduate school of bioindustry, Tokyo University of Agriculture, [2]Department of Food, Aroma and Cosmetic Chemistry, Tokyo University of Agriculture)

【背景】
フルクトフィリック乳酸菌 (FLAB) は花や果物などフルクトース豊富な環境に生息および適応している乳酸菌である。これまでに FLAB として、*Fructobacillus* 属全 5 菌種と *Lactobacillus kunkeei*、*Lactobacillus apinorum* の合計 7 菌種が報告されている。近年、ハチ消化管内から *L. kunkeei* に系統的に近縁な乳酸菌が 3 菌種分離され、それらは代謝可能な糖の種類が少ないという FLAB と類似した特徴を有している。そこで、本研究ではフルクトース豊富な環境から見出されたこれらの菌種の生育特性の解析とゲノム解析を行い、典型的な FLAB の特徴を有しているのか明らかにした。

【結果と考察】
本研究ではハチから分離された *Lactobacillus timberlakei*、*Lactobacillus quenuiae*、*Lactobacillus micheneri* を用いた。まず、ハチから分離された 3 菌種の生育特性を評価したところ、いずれもグルコースを糖源とする培地ではほとんど生育せず、フルクトースを糖源とする培地での培養か、電子受容体存在下で良好な生育を見せるというフルクトフィリック様の特徴を示した。この生育の特徴から、これら 4 菌種はフルクトフィリック乳酸菌である可能性が強く示唆された。

またこれらの 4 菌種のゲノム解析を行ったところ、ゲノムサイズが 1.5 Mbp で、CDS 数が 1,500 個程度しかなく、糖代謝関連遺伝子をゲノム中にある遺伝子のうち 3.5% 程度しか保存していなかった。これはこれまでに明らかにしてきた FLAB のゲノムの特徴と合致している。また、KEGG により代謝関連遺伝子を予測し、それの遺伝子保持数でクラスタリングを行った結果、FLAB は系統的には距離にかかわらず、1 つのグループで収束した。これは、フルクトース豊富な環境に誘導された結果、非常によく似た代謝系を残しているということを強く示唆している。

FLAB のフルクトフィリックな特徴なアルコール脱水素酵素 (Adh) とアセトアルデヒド脱水素酵素 (Aldh) の活性を有する二機能性タンパク質 AdhE をコードする遺伝子 *adhE* の欠損によるものであることを明らかにしているが、今回解析した 3 菌種はいずれも *L. kunkeei* と同様に Aldh ドメインのみの部分欠損した *adhE* を有していた。この *adhE* の部分的な欠損により、これら 3 菌種はグルコースを代謝できず、フルクトフィリックな特徴を有していることが示唆された。

lactic acid bacteria, environmental adaptation, evolution

発表責任者：遠藤　明仁（a3endou@nodai.ac.jp）

講演番号：3A08p10
講演日時：3 月 27 日 15:39～ センター2 号館 A08 会場

サンゴ共在微生物を対象とした一細胞選択的な全ゲノム解析技術の開発
Development of accurate single-cell whole genome sequencing method for coral commensal bacteria

○西川 洋平[1,2]、細川 正人[2,3]、井手 圭吾[1,4]、小川 雅人[1,4]、竹山 春子[1,2,3,4] ([1]産総研-早大 CBBD-OIL、[2]早大ナノライフ創新研、[3]早大先進生命動態研、[4]早大院先進理工)
○Yohei NISHIKAWA[1,2], MASAHITO HOSOKAWA[2,3], KEIGO IDE[1,4], MASATO KOGAWA[1,4], HARUKO TAKEYAMA[1,2,3,4] ([1]CBBD-OIL, AIST-Waseda Univ., [2]Res. Org. Nano Life Innov., Waseda Univ., [3]Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ., [4]Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

環境微生物の 99%以上は実験室環境下での培養が困難であるとされており、難培養微生物の特徴や生態を明らかにするためには、単一細胞レベルでのゲノム解析が有用であると考えられる。近年では、Multiple displacement amplification (MDA) に代表される全ゲノム増幅法の開発および次世代シーケンサーの発展により、様々な環境中に生息する微生物の単一細胞ゲノム情報の取得が可能となりつつある。しかしながら、従来までのフローサイトメトリーを用いた単一細胞ゲノム解析手法では、細胞の分取、溶菌、全ゲノム増幅の効率が低く、特に環境微生物を用いた検証においては目的外 DNA の混入やキメラ配列の生成により、効率的なゲノム解析を行うことが困難であった。また、従来までのランダムな単一細胞解析技術では、集団中で存在比の低い細胞のゲノム情報を獲得するために多量の細胞を解析する必要があり、標的細胞のゲノム情報の獲得には膨大なコストが必要であった。

そこで本研究では、環境微生物を対象として、選択的かつ高精度に単一細胞レベルでのゲノム解析を可能とする技術の開発を目的とし、ピコリットル容量の油中水滴 (W/O)液滴を反応場として用いた全ゲノム解析手法を開発した。マイクロ流体デバイスにより作製される均質な微小液滴内に単一細胞を連続的に封入することにより、一度に 10^5 個以上の単一細胞に対して網羅的な全ゲノム増幅が可能とした。本手法では微小空間を用いて全ゲノム増幅を行うため、目的外 DNA の混入リスクを極限にまで抑制することが可能である。さらに本研究では、増幅反応後の液滴内に含まれる DNA に対し、PCR を用いた配列検出技術を組み合わせることにより、標的となる細胞のゲノム情報を選択的に取得することを可能とした。

本技術の環境サンプルへの応用例として、サンゴ組織内に共在する微生物を対象とした単一細胞ゲノム解析を実施した。サンゴの組織内には *Endozoicomonas* 属細菌をはじめとする多種類の細菌が共在していることがこれまでに明らかにされているが、組織懸濁液中には宿主由来のミトコンドリアが多量に混入するため、メタゲノム法および従来の単一細胞解析ではミトコンドリアの配列が優先的に取得され、細菌由来のゲノム情報を獲得することが困難であった。そこで、本研究で開発した標的細胞特異的な全ゲノム解析を実施した結果、*Endozoicomonas* 属に分類される細菌の高精度なゲノム情報が新規に獲得され、得られた配列情報を用いて遺伝子の機能解析や系統解析が可能であることが実証された。本手法を用いることにより、環境微生物を対象とした網羅的なゲノム解析および標的細胞特異的なゲノム解析が実施可能であり、今後は幅広い種類の環境微生物に適用が可能であると考えられる。

single-cell genomics, droplet microfluidics, whole genome sequencing

講演番号：3A08p11
講演日時：3 月 27 日 15:50～ センター2 号館 A08 会場

発酵食品由来の乳酸菌ゲノムにおける地域性の探索

Search for regionality of lactic acid bacteria genome from fermented food

○木野 裕太[1]、澤田 和典[2]、小谷野 仁[1]、山田 拓司[1] ([1]東工大生命理工学院、[2]（株）ぐるなび)
○ Yuta KINO[1], Kazunori SAWADA[2], Hitoshi KOYANO[1], Takuji YAMADA[1] ([1]Tokyo Tech, [2]Gurunavi, Inc)

【背景・目的】

日本各地には、発酵を利用した伝統的な食品が多く存在し、伝統的な発酵食品にはそれぞれの土地特有の微生物が存在することが想定される。しかしながら、地域性と発酵微生物の関連についてはあまり研究が進んでいない。そこで、本研究では特に乳酸菌に着目し、乳酸発酵していると考えられる漬物サンプルを、日本各地の 9 府県 24 メーカーより収集した。そのうち広く共通して存在していた乳酸菌である *Lactobacillus plantarum, Lactobacillus pentosus*, *Tetragenococcus halophilus* の 3 種について比較ゲノム解析を行い、ゲノムレベルで地域性の探索を行った。

【方法】

乳酸菌選択培地により各サンプルより乳酸菌のみを単離し、コロニーPCR により目的の 3 種を計 6 府県から 132 サンプル単離した。全サンプルのシーケンスを Illumina 社 Hiseq により行い、ドラフトゲノム配列を構築した。さらに、公開データベースより、地域情報と紐付いている同 3 種のゲノム配列を全て取得し、合わせてゲノム比較解析を行った。

【結果】

本研究で単離した乳酸菌について、*Lactobacillus* 属の近縁 2 種で比較した場合は、地域差よりも種による差異が大きかった。しかしながら、同一種間で比較した結果、地域特異的に共有されている、または欠損している遺伝子が複数発見された。現時点では、特異性が見られた遺伝子の具体的な遺伝子機能については解明出来ていないが、乳酸菌の同一種における地域毎のゲノム特異性が存在することが示唆された。

lactic acid bacteria, genome, fermented food

発表責任者：木野 裕太（kino.y.aa@m.titech.ac.jp）

講演番号：3A08p12
講演日時：3 月 27 日 16:01～ センター2 号館 A08 会場

メタ発酵主要菌の性状解析および比較ゲノム解析
Characterization and comparative genome analysis of predominant bacterial strains in meta-fermentation

○平野 香花[1]、田代 幸寛[1]、児玉 浩明[2]、宮本 浩邦[2,3,4]、須田 亙[3]、服部 正平[3,5]、酒井 謙二[1]（[1]九大院・生資環、[2]千葉大・園芸、[3]理研・生命医科学、[4]（株）サーマス、[5]早稲田大・先端理工）
○Kyoka HIRANO[1], Yukihiro TASHIRO[1], Hiroaki KODAMA[2], Hirokuni MIYAMOTO[2,3,4], Wataru SUDA[3], Masahira HATTORI[3,5], Kenji SAKAI[1] ([1]Grad. Sch. Bioresour. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ., [2]Fac. Horticul., Chiba Univ., [3]IMS,RIKEN, [4]Sermas co.ltd., [5]Waseda Univ.)

【背景・目的】
我々は、複合微生物系による未利用資源からの有価物生産のための発酵法として『メタ発酵』を提唱し（Tashiro et al., Bioresour. Technol., 2016）、生ゴミを原料とするメタ L-乳酸発酵では、*B. coagulans* MN-07 株、*B. thermoamylovorans* OM-556 株、*B. hisahii* N-11 株が主要 3 株であることを示した。一方、堆肥由来微生物系抽出液を投与したマウスから分離された *B. hisahii* N-11 株は飼料効率増加などの効果が報告されている。従って、*B. hisahii* N-11 株を含む生ゴミ L-乳酸発酵残渣は高機能性飼料としての新たな利用が期待できる。しかし *B. thermoamylovorans* OM-556 株と *B. hisahii* N-11 株は 16S rRNA 遺伝子配列で 99%以上の高い相同性を示すため、従来の 16S rRNA 遺伝子による識別・定量が困難である。そこで本発表では、固体培地による 3 株の生菌数計測法を検討するとともに、ドラフトゲノムに基づく機能性遺伝子を比較することを目的とした。

【方法】
B. coagulans MN-07 株、*B. thermoamylovorans* OM-556 株、*B. hisahii* N-11 株について API-50CH 試験による糖利用性を調べた。その結果に基づき、Glucose、Xylitol、Methyl-α-D-Mannopyranoside、CMC を糖源とした培地を用いて 3 株を好気的、嫌気的に培養し、菌のコロニー形成を調べた。また、Illumina MiSeq による *B. coagulans* MN-07 株、*B. thermoamylovorans* OM-556 株のドラフトゲノム解析を行い、*B. hisashii* N-11 株との比較ゲノムを行った。

【結果・考察】
API-50CH 試験では *B. hisahii* N-11 株のみが資化性を持つ糖は確認できなかった。用いた全ての培地で 3 株全ての生育が確認され、好気培養において、高い増殖能を示した。よって、生菌数計測法では、3 株を定量することが困難であることが示唆された。ドラフトゲノム解析により、*B. hisahii* N-11 株と *B. thermoamylovorans* OM-556 株の ANI (Average Nucleotide Identity)は 99.15%と類似した遺伝特性を有することが明らかとなった。3 株すべてにおいてアミノ酸代謝および炭素代謝についての機能遺伝子が多く確認された。*B. coagulans* MN-07 株、*B. hisahii* N-11 株のみにグリコーゲンを生合成する関連遺伝子群が確認され、*B. thermoamylovorans* OM-556 株との違いとして示唆された。現在、これらの特異的遺伝子をターゲットとした定量 PCR 法の確立を目指している。

comparative genomic analysis, meta-fermentation, functional gene

講演番号：3A08p13
講演日時：3 月 27 日 16:21～ センター2 号館 A08 会場

黒麹菌由来発現タンパク質のプロテオーム解析
Proteomic analysis of koji culture by *Aspergillus luchuensis*.
○植松 千暁[1]、愛川 もも[2]、作田 萌奈[2]、片岡 涼輔[1]、渡邉 泰祐[1]、荻原 淳[1]([1]日大院生資研究科、[2]日大生資科・生命化)
○ Chiaki UEMATSU[1], Momo AIKAWA[2], Moena SAKUTA[2], Ryosuke KATAOKA[1], Taisuke WATANABE[1], Jun OGIHARA[1] ([1]Nihon University, [2]Nihon Univ.)

【目的】沖縄県の伝統的な蒸留酒である泡盛醸造用麹には黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* が利用されている。黒麹菌は酒の生成の過程でクエン酸を大量に生成するため、清酒、味噌、醤油で使用される黄麹菌に比べてもろみの酸度を高くすることができ、雑菌による腐敗を抑制できるという大きな特徴がある。また、泡盛に含まれる成分の特徴から黒麹菌は糖質分解、有機酸生や香気成分の生成、さらに蒸留粕成分にも影響を与えていることが明らかとなっている。

我々は、泡盛酒質と黒麹菌の関係について検討している。これまでに麹中の麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来タンパク質の網羅的プロテオーム解析については報告されていない。また、*Aspergillus luchuensis* 製麹時における黒麹菌由来タンパク質の網羅的プロテオーム解析については報告されていない。さらに、製麹時の遺伝子発現変化および酒質解析結果と製麹時特異的発現タンパク質の相関性を調べた知見は得られていない。そこで我々は、黒麹菌由来発現タンパク質の網羅的タンパク質の基礎的な知見を得ることを目的として、黒麹菌の寒天平板培地および黒麹における発現タンパク質のプロテオーム解析を行った。

【方法及び結果】*A. luchuensis* NBRC 4314 **株をタイ米に植菌し製麹した麹と** Potato Dextrose Agar **平板培地で培養した菌体を調製した。麹および平板培地は** 48 **時間、**96 **時間培養した麹および菌体をそれぞれ調製した。それぞれの菌体および麹を破砕後、粗タンパク質を煮沸抽出した。各粗タンパク質を定量後、** SDS-PAGE **により分画した。各分画したゲルは網羅的に切り出し、還元アルキル化、ゲル内消化後、各画分からペプチド断片を調製し、**nanoLC-ESIMS/MS(Q Exactive)**により分析した。発現タンパク質の解析は、検索エンジンに** SEQUEST HT **を用いて** NCBI_Protein_fungi.fasta **等データベースに対して検索した。さらに、** Proteome Discoverer 2.3 **を用いた発現タンパク質の** LFQ **解析は、**volcano plot **による二群間比較解析により行った。その結果、**麹特異的に各種糖質分解酵素タンパク質の発現量が上昇していた。一方、invertase、α-amylase、chitinase、1,3;1,4-β-D-glucanendohydrolase 、β-glucosidase などの酵素タンパク質の発現量が減少していた。培養 96 時間経過時において、endo-1,3-β-glucanase、α-glucosidase、lipase 、アミノ酸代謝関連酵素タンパク質が発現上昇していることが明らかとなった。一方 1,4-α-glucan-branching enzyme の発現量は減少していることがわかった。また、解糖系およびペントーススリン酸系などエネルギー獲得系に関連する酵素タンパク質の発現量が減少していることが明らかとなった。

Aspergillus luchuensis, Proteomic analysis, koji

発表責任者：荻原淳（ogihara.jun@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3A08p14
講演日時：3 月 27 日 16:32～ センター2 号館 A08 会場

トキイロヒラタケ単胞子分離単核体株における遺伝子発現差解析
De novo transcriptome analysis during monokaryons from *Pleurotus salmoneostramineus*
○福田 泰久[1]、平山 朋美[2]、白坂 憲章[1] ([1]近畿大農、[2]近畿大院農)
○Yasuhisa FUKUTA[1], Tomomi HIRAYAMA[2], Norifumi SHIRASAKA[1] ([1]Fac. of Agr., Kindai Univ., [2]Grad. School of Agr., Kindai Univ.)

【背景と目的】担子菌の単胞子分離によって得られる単核体は，菌糸体及び子実体の表現型がそれぞれ異なっている。近年の遺伝子工学研究では全ゲノム解析データは必要不可欠であるが，二核菌糸体(N+N')から抽出した DNA を次世代シーケンサーで解析した際，異なる核由来の配列をアセンブルするため，うまく繋がらないという問題が発生する。それに対し，単核体ではシーケンス解析後のアセンブルにより得られるコンティグ数は二核体に比べて大幅に減少し，データベース構築が容易になる。以上のことから，単胞子分離株は子実体形成に関わる因子探索の実験材料として優れていると考えられる。本研究では，単胞子分離株に着目し,菌糸伸長速度の似通った子実体形成および非形成単核体を RNA Seq 解析し，生育段階ごとの発現遺伝子を比較することで子実体形成に必要な遺伝子の探索を試みた。
【材料と方法】供試菌株には *P. salmoneostramineus* NBRC31859 株由来単胞子分離株を多数獲得後，その中でスクリーニングを行い，菌糸身長速度は同程度だが子実体形成の有無がある 2 株を実験に用いた。各生活環の発現遺伝子解析は，シーケンシングに Next Seq500 を，解析処理は CLC Genome Workbench を用いた。
【結果と考察】子実体形成に関わる mRNA のスクリーニングのため、菌糸生長期から単核体原基形成期までの RNAseq 解析を行った。発現遺伝子データベース構築のため，得られたリード配列を De novo アセンブルしたところ,子実体形成株と非形成株でおよそ 4000 本の contig が得られた。
子実体形成株 N13 と子実体非形成株 N81 では,RFPK 値を基にした遺伝子発現差解析において大きくその発現遺伝子が異なっていた。まず Endlichi 計算式で解析された個別サンプルの比較解析では，各株間で特徴的に発現している遺伝子をスクリーニングした。次に N13 株と N81 株の二群間での発現遺伝子を p-value と Fold change のボルケーノ図で解析し，それぞれの菌株特徴的な発現遺伝子を選抜した。
最終的に、N13 株では Contig3433, 2479, 2144, 1107 が，N81 株では Contig2031, 4428 が Heat-map 解析と 2 群間ボルケーノ図の別の発現差解析の両方で選抜された。それぞれの Contig 配列を BLAST 検索したところ，いずれも Hypothetical protein もしくは no significant homology gene であった。

Pleurotus salmoneostramineus, RNA seq, Single spore isolates

発表責任者：福田泰久（yfukuta@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：3A08p15
講演日時：3 月 27 日 16:43～ センター2 号館 A08 会場

微生物 *de novo* ゲノム解析におけるアノテーションツール比較
Comparison of automatic annotation tools for *de novo* genome analysis of microorganisms
○藤浪 俊、福長 一鈴（アメリエフ株式会社）
○Shun FUJINAMI, Isuzu Fukunaga (Amelieff Corporation)

DNA シーケンス解析にかかる費用は年々低価格化しており、今後ますます大量のデータが取得されるようになると考えられる。大量のデータをより効率的に解析するため、多様なツールが開発・公開されており、研究者は自分の研究目的に対応した適切なツールを選択する必要がある。

例えば、微生物の *de novo* ゲノム解析においては、オートアノテーションツールを用いて、ゲノム配列に遺伝子情報などを付与することが一般的である。そこで、本研究では PGAP、DFAST といったいくつかの公開されているオートアノテーションツールの比較を行った。

まず、公開されているいくつかの細菌の全ゲノム配列をテストデータとして、実行にかかる時間や、出力フォーマットについて比較した。アノテーションツールによって出力フォーマットは異なるが、データを論文で使用するためにはまず DNA データベースに登録する必要があり、そのためにはデータを登録用フォーマットにする必要がある。そのため出力フォーマットとしてどのようなフォーマットが選択できるか精査した。

次に出力結果の講評を行った。アノテーションについては一つの正解があるわけではなく、各研究者の考えや流儀によって命名の方針が異なるため、出力結果についてそのクオリティを客観的に判断することは難しい。また、すべてのアノテーション結果を人の目で確認することは時間的制約から現実的ではないが、ある程度、研究者が自身の研究目的や興味のある領域についてマニュアルで修正を行うことが必要とされる場合が多い。例えば、オペロン内で遺伝子命名法を統一したり、基質が異なる場合には異なる命名を行うことが定番となっている遺伝子（例：細菌べん毛モータ固定子遺伝子 *motAB* と *motPS* など Fujinami *et al.* (2009)）については区別して命名したりする必要がある。そこで、これらの点に注目して各オートアノテーションツールの出力結果を精査した。また、オートアノテーションの結果について、研究者がマニュアルでチェックしたほうがよい点についてまとめた。

これによってゲノム配列のアノテーションやデータベースへの登録を効率的に行うことができる研究フローについて検討した。結果の詳細については当日報告する。

automatic annotation tool, genome analysis, bioinformatics

発表責任者：藤浪　俊（fujinamis@amelieff.jp）

講演番号：3A08p16
講演日時：3 月 27 日 16:54～ センター2 号館 A08 会場

ヒトマイクロバイオーム解析のための Mock Community の開発
Development of mock community for human microbiome research
○三浦 隆匡[1]、島村 麻美子[1]、内野 佳仁[1]、山副 敦司[1]、坂本 光央[2,3]、関口 勇地[4]、成田 興司[5]、亀山 恵司[5]、久田 貴義[5]、笠原 堅[5]、寺内 淳[5]、川﨑 浩子[1]([1]NITE・NBRC、[2]理研 BRC-JCM、[3]日本医療研究開発機構, PRIME、[4]産総研、[5]日本マイクロバイオームコンソーシアム)
○ Takamasa MIURA[1], Mamiko SHIMAMURA[1], Yoshihito UCHINO[1], Atsushi YAMAZOE[1], Mitsuo SAKAMOTO[2,3], Yuji SEKIGUCHI[4], Koji NARITA[5], Keishi KAMEYAMA[5], Takayoshi HISADA[5], Ken KASAHARA[5], Jun TERAUCHI[5], Hiroko KAWASAKI[1] ([1]NITE/NBRC, [2]RIKEN BRC-JCM, [3]PRIME, AMED, [4]AIST, [5]JMBC)

【背景及び目的】多様な微生物種で構成されるマイクロバイオームは、環境から宿主の健康に至るまで様々な場面で重要な役割を担っており、特に、ヒトマイクロバイオームは、疾患の診断用マーカーや創薬ターゲットとして注目を集めるだけでなく、食品開発や衛生、美容など様々な分野において新たな高機能製品開発への応用が期待されている。一般的に用いられているマイクロバイオーム解析では、サンプル採取に始まり、輸送、DNA 抽出、ライブラリー調製、シーケンス、データ解析と多くの工程を必要とする。各工程における方法は研究機関によって異なるため、結果の信頼性、解析機関間のデータの比較互換性の乏しさが懸念されている。そこで、本研究では、各解析工程の精度管理用の比較参照用標準サンプルとして複数の微生物種を一定量ずつ混合した Mock Community の開発を行った。
【方法及び結果】ヒトマイクロバイオーム解析用の Mock Community として、日本人の糞便、皮膚、口腔から検出される微生物種（*Akkermansia muciniphila*、*Blautia producta*、*Cutibacterium acnes* subsp. *acnes*、*Streptococcus mutans* など）を中心に 20 株を選定し、それらの細胞あるいは DNA を等量混合した Mock Community を作成した。特に Cell Mock Community の製造では、顕微鏡観察及びフローサイトメーターによる測定値を組み合わせて細胞数を測定し、等量細胞数となるよう混合した。製造した Mock Community に対し、シングルコピー遺伝子をターゲットに、各微生物株に特異的なプライマーおよびプローブを設計し、デジタル PCR により混合結果の検証を行った。その結果、製造ロット間誤差が 4.6%以下で、ロット内誤差が 0.4%以下の Mock Community を作成することができた。さらに、DNA Mock Community については、デジタル PCR 解析の結果、均質でほぼ等量モル濃度に混合できていることが検証された。さらにショットガンシーケンス解析の結果、個々のゲノムの定量値は平均で理論値から 5%以下、デジタル PCR の値からは 15%以下の変動係数（CV）が得られ、シーケンスの精度管理用として利用できることが示唆された。
尚、本研究は、NEDO 先導研究プログラム／新産業創出新技術先導研究プログラム「ヒトマイクロバイオーム関連計測の標準基盤整備（平成 30 年～令和 2 年)」において実施したものである。

mock community, microbiome, metagenome

発表責任者：三浦隆匡（miura-takamasa@nite.go.jp）

講演番号：3A09a01
講演日時：3 月 27 日 09:30～ センター2 号館 A09 会場

分子内安定同位体プロービングを用いた好熱性独立栄養性細菌の炭酸固定経路の検証
Identification of CO_2 fixation pathway of a thermophilic bacterium using a position-specific stable isotope probing

○千葉 洋子[1,2]、澄田 智美[2]、力石 嘉人[3]、布浦 拓郎[2]([1]理研、[2]海洋研究開発機構、[3]北海道大低温研)
○Yoko CHIBA[1,2], TOMOMI SUMIDA[2], YOSHITO CHIKARAISHI[3], TAKURO NUNOURA[2] ([1]RIKEN, [2]JAMSTEC, [3]Hokkaido Univ.)

これまでに 6 種類の炭酸固定経路が知られており、中でも還元的 TCA (rTCA)回路と Wood–Ljungdahl (WL)経路が進化的に最も古いと考えられている。経路全体の熱力学的特徴および関与する酵素の活性中心の特徴といった観点からは WL 経路の方が更に古く、始原的であるという「WL 経路最古仮説」が提唱されているが、WL 経路が進化系統樹上で早くに分岐した系統群に見つからないという弱点があった。近年、始原的な系統とされる Thermodesulfobacteria 門に属す好熱性独立栄養性細菌 *Thermodesulfatator indicus* のゲノムが解読され、本菌には WL 経路の酵素遺伝子セットが存在する一方で rTCA 回路の鍵酵素がないことが報告された。一方で、*T. indicus* に近縁な独立栄養性細菌 *Thermodesufidibacter takaii* が rTCA 回路の鍵酵素を欠くにも関わらず酸化的 TCA 回路の酵素を用いて rTCA 回路を機能させていることも明らかになった。したがって、*T. indicus* がゲノムから予測される WL 経路を炭酸固定経路として用いているのか、それとも実は rTCA 回路もしくは全く別の経路を用いているのかを実験的に明らかにすることは、炭酸固定経路の出現とその進化を理解する上で非常に重要である。

本研究では、安定炭素同位体標識を用いた分子内安定同位体プロービングを用いて *T. indicus* 細胞内における代謝の流れを可視化した。本手法は標識された部位を特定可能であり、また感度が高く微量の試料で分析可能であるという利点がある。^{13}C 標識化合物を添加して培養した本微生物中のタンパク質を濃塩酸にて加水分解し、得られたアミノ酸をピバロイル/イソプロピルエステル誘導体化後、GC-MS 分析に供した。その結果、ギ酸もしくは一酸化炭素を取り込ませた標品からは WL が機能している場合に想定される代謝フローと矛盾しない標識パターンが得られた。一方、酢酸標識標品からは TCA 回路が回路として機能しておらず、一部が酸化方向に、別の一部が還元方向に機能する分岐型 TCA 回路であることが示された。本結果は本菌がコハク酸とスクシニル CoA 間の変換反応をつかさどる酵素遺伝子を欠くことと矛盾しない。以上の結果は、*T. indicus* において WL 経路が主要な炭素固定経路として実際に機能していることを示す。

carbon fixation, metabolome, thermophile

発表責任者：千葉洋子（yoko.chiba.ey@riken.jp）

講演番号：3A09a02
講演日時：3 月 27 日 09:41～ センター2 号館 A09 会場

発芽玄米を培養基とした *Lachancea thermotolerans* と *Saccharomyces cerevisiae* の発酵特性の比較

Comparison of fermentation characteristics of *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* using germinated brown rice as culture medium

○小鷹 晶[1]、粂井 貴行[1]、三井 亮司[2] ([1]ファンケル、[2]岡山理大理)
○Aki KOTAKA[1], Takayuki KUMEI[1], Ryoji MITSUI[2] ([1]FANCL Corp., [2]Okayama Univ. of Science)

【背景】　近年、化粧品業界において発酵が注目され、発酵液を配合した化粧品が多く上市されている。発酵素材として色々なものが用いられるが、玄米を発芽させた米（以下「発芽玄米」という）には GABA など有用な成分が多く含まれることから、通常の白米よりも発芽玄米を発酵させることにより高付加価値な発酵液の産生が期待される。本研究では、2 種類の発酵特性の異なる出芽酵母で発芽玄米を発酵させ、得られた産生物についてメタボローム解析を実施し、検出された代謝物からそれぞれの菌株の発酵特性の検証を行った。

【方法】　使用した菌株は、乳酸産生を特徴とする出芽酵母である *Lachancea thermotolerans* と、一般的な出芽酵母である *Saccharomyces cerevisiae* を用いた。米は、北海道産ななつぼしに加水して発芽させた発芽玄米を用いた。粉砕した発芽玄米に水を加えて加熱滅菌し、さらにアミラーゼを添加して糖化後、各出芽酵母を加え酸度が定常状態になる 18 時間前後まで微好気条件下で発酵させた。その後、再度加熱滅菌し発酵を停止したのち、メンブランろ過したものを発酵液とした。この発酵液を用い、CE-TOFMS 及び LC-TOFMS にてメタボローム解析を行った。

【結果】　*L. thermotolerans* および *S. cerevisiae* の発酵液中に含まれるライブラリーにヒットした産生物の成分数は、それぞれ約 460、約 470 とあまり差が見られなかった。一方、産生量についてスペクトルの総面積を比較すると、*S. cerevisiae* で得られた産生物は発酵前の発芽玄米に比べて減少したが、*L. thermotolerans* は約 1.38 倍に増加していた。その内訳は、*L. thermotolerans* の特徴である乳酸が一番多かった。また、両菌株の中央代謝に関与する中間代謝物を比較すると、*S. cerevisiae* ではピルビン酸までの解糖系の中間代謝物の検出量が少なく、TCA サイクル上の代謝物が検出された。*L. thermotolerans* では逆に解糖系の中間代謝物の検出量が *S. cerevisiae* と比べて多く、TCA サイクルに関係する代謝物の検出量は少なかった。このことから、*L. thermotolerans* ではピルビン酸から乳酸産生に向かう経路を優先していることが示唆された。これらの結果より、出芽酵母間の発酵特性の違いを知ることで、さらに特徴的な発酵液の産生の可能性が示唆された。

Lachancea thermotolerans, Metabolome, Germinated brown rice

発表責任者：小鷹　晶（akkotaka@fancl.co.jp）

講演番号：3A09a03
講演日時：3 月 27 日 09:52～ センター2 号館 A09 会場

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* におけるアルギニンによるプロリン資化抑制機構の解析
Inhibitory mechanism of proline utilization by arginine in *Saccharomyces cerevisiae*
○谷川 翼、西村 明、高木 博史（奈良先端大・バイオ）
○Tsubasa TANIKAWA, Akira Nishimura, Hiroshi Takagi (Grad. Sch. Sci. Tech., NAIST)

【背景と目的】
酵母 *Saccharomyces cerevisiae* はワインや清酒などの醸造に用いられ、酵母による原料の資化や香味成分の生合成が酒類の味や風味を決める大きな要因となっている。プロリンはワインの原料であるブドウ中に最も豊富に含まれるアミノ酸であるが、発酵中の酵母はプロリンをほとんど資化することができず、発酵後も多量に残存することが知られている。残存したプロリンは苦味の増加や酸味の減少を引き起こし、最終製品であるワインの酒質を低下させると考えられている。これまでの研究から、ブドウ中に含まれる資化効率の良い窒素源が nitrogen catabolite repression（NCR）を介して、資化効率の悪いプロリンの資化を抑制することが示唆されている。しかし、プロリン資化の抑制機構については未だ不明な点が多い。本研究では、発酵環境下においてプロリンを効率良く資化できる菌株の創製を目的とし、プロリン資化抑制に関わる因子の同定とその作用機序の解析を行った。
【方法と結果】
まず、プロリンの細胞内取り込みを酵母の生育によって評価するために、プロリン要求性株の構築を行った。酵母のプロリン生合成経路はグルタミン酸とアルギニンからの二つの経路が存在するため、それぞれの経路に関与するグルタミルキナーゼ（Pro1）とオルニチンアミノトランスフェラーゼ（Car2）をコードする遺伝子を破壊した二重欠損株を作製した。このプロリン要求株を用いて、様々な窒素源を含む培地において生育試験を行ったところ、興味深いことに一般的な NCR の因子であるアンモニウムイオンとグルタミン酸はプロリンの資化をほとんど抑制せず、過去に報告のないアルギニンがプロリンの資化を完全に抑制することを見出した。また、プロリンの取り込みに関与するトランスポーター群（Gap1, Gnp1, Put4）およびプロリンの分解に関与する酵素（Put1, Put2）をコードする遺伝子の発現がアルギニンによって抑制されることが判明した。さらに、アルギニンによるプロリン資化抑制機構を解明するために、アルギニン存在下でもプロリン資化が可能な自然突然変異株をスクリーニングし、2 株を取得した。現在、これらの株の全ゲノム解析を通して、プロリン資化抑制機構に関与する遺伝子の同定を試みている。今後、同定した遺伝子を解析することで、プロリン資化抑制の詳細な機構を明らかにする予定である。将来的には、実験室酵母で得られた知見をワイン酵母の育種に応用することで、プロリン含量の低い高品質なワインの製造が期待される（本研究は、農研機構生研支援センター「イノベーション創出強化研究推進事業」の支援を受けて実施した）。

Yeast metabolism, Nitrogen catabolite repression, Proline utilization

講演番号：3A09a04
講演日時：3 月 27 日 10:03～ センター2 号館 A09 会場

メタボローム解析が明らかにする低酸素濃度におけるコリネ型細菌の芳香族化合物代謝促進機構と代謝改変によるソルガム搾汁液からの物質生産

Metabolome analysis of engineered *Corynebacterium glutamicum* cells for enhanced production of 3-amino-4-hydroxybenzoic acid under low dissolved oxygen conditions from sorghum juice

○川口 秀夫[1]、宮崎 翔子[1]、蓮沼 誠久[1,2]、荻野 千秋[2,3]、佐塚 隆志[4]、近藤 昭彦[1,2] ([1]神戸大院科技イノベ、[2]神戸大先端バイオセ、[3]神戸大院工、[4]名古屋大生物機能セ)
○Hideo KAWAGUCHI[1], Shoko MIYAZAKI[1], Tomohisa HASUNUMA[1,2], Chiaki OGINO[2,3], Takashi SAZUKA[4], Akihiko KONDO[1,2] ([1]Grad. Sch. Sci. Tech. Innov., Kobe Univ., [2]EGBRC, Kobe Univ., [3]Grad. Sch. Eng., Kobe Univ., [4]Biosci. Biotech. Cent., Nagoya Univ.)

【背景と目的】芳香族化合物は優れた耐熱性と機械的強度を持つスーパーエンジニアリングプラスチックの前駆体であり、化石資源に依存しない発酵による再生可能資源からの生産体系の確立が期待されている。これまでに我々は、組換えコリネ型細菌 *Corynebacterium glutamicum* による糖類からの 3-アミノ-4-ヒドロキシ安息香酸（3,4-AHBA）生産を報告している[(1)]。発酵生産による 3,4-AHBA 終濃度は 1 g/L に達したが、生産速度が低くまた多くの副生物が蓄積した。そこで本研究では、3,4-AHBA の生産性を向上させるために、培養最適化による 3,4-AHBA 代謝促進状態をメタボロームで解析し、解析情報をもとに代謝工学による組換え第二世代株を育種して、ソルガム搾汁液からの発酵生産に応用した。

【結果と考察】3,4-AHBA 生産型組換え *C. glutamicum* の培養条件を Jar を用いて最適化し、溶存酸素濃度（DO）を低下させることで生産性が 4.3 倍増加することを明らかにした。この低 DO における 3,4-AHBA 代謝促進作用をメタボロームにより解析した結果、低 DO 特異的な代謝中間体濃度の変化点を、解糖系、TCA サイクル、アミノ酸代謝の各生合成経路で特定することができた。メタボロームの解析結果から、各経路のボトルネックを改変した遺伝子組換え第 2 世代株を複数作製し、代謝改変による 3,4-AHBA 増産の有効性を評価した。生産性向上が認められた第 2 世代株を用いて、バイオマス植物であるソルガムの搾汁液を原料に 3,4－AHBA 発酵生産を行った結果についても、あわせて報告を予定している。

【謝辞】本研究は科学技術振興機構（JST）による未来社会創造事業および CREST、JSPS 科研費 基盤研究（B）19KT0009 の助成の助成を受けて実施した。

【参照論文】

(1) Hideo Kawaguchi, et al., (2015) 3-Amino-4-hydroxybenzoic acid production from sweet sorghum juice by recombinant *Corynebacterium glutamicum*. Bioresource Technology, 198:410-417.

metabolome analysis, *Corynebacterium glutamicum*, dissolved oxygen

発表責任者：川口　秀夫（kawaguchi_h@port.kobe-u.ac.jp）

講演番号：3A09a05
講演日時：3 月 27 日 10:14～ センター2 号館 A09 会場

漬物由来乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* 22A-3 によるフェルラ酸還元と 4-VG 生成抑制機構の解析
Redox regulation by ferulic acid in *Lactobacillus plantarum* 22A-3 isolated from Japanese pickles
○若槻 壮哉[1]、西谷 洋輔[2]、向田 潤[2]、阿波 里佳[2]、川上 秀昭[2]、桑原 浩誠[2]、矢野 嵩典[1]、三井 亮司[1] ([1]岡山理科大理、[2]丸善製薬株式会社)
○ Masaya WAKATSUKI[1], Yosuke NISHITANI[2], Jun MUKAIDA[2], Rika AWA[2], Hideaki KAWAKAMI[2], Hiroshige KUWAHARA[2], Takanori YANO[1], Ryoji MITSUI[1] ([1]Okayama Univ. of Sci., [2]Maruzen pharma. Co., Ltd.)

【目的】漬物などから分離される乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* は植物細胞壁に含まれるフェニルプロペン酸を分解する 2 つの経路が明らかになっている。例えばフェニルプロペン酸の一種で米ぬかなどに含まれるフェルラ酸(FA)を培地に添加して培養すると、プロペン酸部分が還元されたジヒドロフェルラ酸(DFA)と、FA が脱炭酸され、食品・酒類などではオフフレーバーとされる 4-ビニルグアヤコール(4-VG)が検出される。しかし我々は溶存酸素を除いた培地中に FA を添加して培養すると DFA が優先的に生成することを明らかにしてきた。この DFA はマウスを用いた実験において抗肥満･血糖値改善などの生理活性を発現することから、発酵食品中の機能性因子のひとつとして、また食経験を有する新たな機能性食品素材として注目している。そこで本研究では *L. plantarum* 22A-3 を用い、発酵条件下で優先的に DFA を生成し、4-VG 生成を抑制する機構を明らかにすることを目的とした。
【方法と結果】低溶存酸素下の培養で FA の添加により誘導をうける遺伝子を RNA-seq 解析により探索した結果、３つの酵素遺伝子(*hcrA, B, pdc*)が強く誘導されていた。*hcrA, B* はオペロン構造を取っており、*hcrA* は FAD レダクターゼ、*hcrB* はフマル酸レダクターゼをコードする遺伝子とアノテーションされた。最近 HcrB はフェニルプロペン酸の還元活性が報告されており、*L. plantarum* 22A-3 においても DFA 生成に関与することが示唆された。また、強く誘導された遺伝子の 1 つ *pdc* がコードするフェノール酸脱炭酸酵素(PDC)は FA を脱炭酸して 4-VG を生成する活性を有する。しかし、*L. plantarum* 22A-3 において、この培養条件下で 4-VG はほとんど生成しないため、PDC を発現してはいるものの FA に作用していないことが考えられた。そこで HcrA、HcrB、PDC をそれぞれ大腸菌内で発現させて精製酵素を取得し、検討を行った。まず HcrA を用いて NADH を補酵素とした FAD レダクターゼ活性を測定したが活性は検出できなかった。次に HcrB による FA 還元活性を測定したところ、NADH に加えて FAD あるいは FMN を同時に添加しておくことで検出された。さらに、単体では活性が検出できなかった HcrA を HcrB と混合して FA 還元活性を測定したところ、FA 還元活性が 2 倍程度まで上昇した。このことから DFA の生成は *L. plantarum* 22A-3 が発酵的な環境下で過剰となった NADH から HcrA を介して FAD を還元し、これを HcrB が利用して FA を電子受容体とする菌体内のレドックスバランスの調節機構であると考えられる。また PDC の FA に対する *Km* 値は極めて大きく、NADH が過剰な発酵条件下では HcrA, B による DFA 生成反応が優勢になることが示唆された。これにより漬物などの乳酸発酵過程では 4-VG の生成は抑制されていると考えられる。

Lactobacillus plantarum, Ferulic acid, 4-VG

発表責任者：三井亮司（rmitsui@dbc.ous.ac.jp）

講演番号：3A09a06
講演日時：3 月 27 日 10:35～ センター2 号館 A09 会場

土壌微生物によるリボフラビンの生分解機構の解析

Analysis of Biodegradation Mechanism of Riboflavin by Soil Microorganisms

○尾崎 紗代子、金澤 拓史、土肥 裕希、桝尾 俊介、高谷 直樹（筑波大・生命環境・微生物サステイナビリティ研究センター）
○Sayoko Ozaki, Hiroshi Kanazawa, Yuki Doi, Shunsuke Masuo, Naoki Takaya (Tsukuba Univ Microbiology Research Center for Sustainability)

［目的］リボフラビンはビタミン B_2 として知られており、それは多くの生物にとって必須な栄養素のひとつである。リボフラビンが欠乏すると、細胞は脂質、タンパク質、炭水化物などを正常に代謝することができず、ヒトでは貧血、白内障、偏頭痛、甲状腺の機能障害などが引き起こされる。ルミクロムは酸化あるいは光によってリボフラビンからリボースが乖離して生じる物質であり、ヒトの体内から食品、自然環境中まで広く存在している。これまでに当研究室において、土壌から複数種のリボフラビン分解菌とルミクロム分解菌が単離され、リボフラビン分解菌 *Microbacterium paraoxydans* R16 とルミクロム分解菌 *Nocardioides nitrophenolicus* L16（L16 株）が複合微生物系を形成し、リボフラビンをルミクロムを経て分解・資化していることが示された。また、リボフラビンからリボースを乖離する酵素として、リボフラビン分解菌 *Devosia riboflavina* JCM 13427 の Flavin-dependent monooxygenase の同定に成功した。本研究では L16 株のルミクロムの代謝経路を同定することによって、環境中におけるビタミン B_2 の生分解機構を解明することを目的とした。

［結果］ルミクロム分解菌 L16 株のドラフトゲノム解析の結果、そのゲノム DNA 中に Hydantoinase と類似の Amidohydrolase をコードする遺伝子 GL000138 を見出し、これがルミクロムのイソアロキサジン環を開裂すると予想した。その周辺の遺伝子を解析した結果、GL000138 は Nicotinamidase と相同性を示すタンパク質をコードする遺伝子 GL000139 などと共に遺伝子クラスターを形成していることが明らかになった。大腸菌を用いて異種発現させた GL000138 タンパク質をルミクロムと反応させたところ、ルミクロムが加水分解されて分子量 260 の物質（Ⅰ-１）が生じた。続いて、同じく大腸菌を用いて異種発現させた GL000139 タンパク質をⅠ-１と反応させたところ、分子量 217 の化合物（Ⅰ-２）の生成が認められた。これらの結果から、GL000138 と GL000139 を含む遺伝子クラスターはルミクロムの代謝に関わっており、L16 株のルミクロム代謝の初発反応は GL000138 タンパク質によるルミクロムのイソアロキサジン環の開裂である可能性が示された。また、GL000138 タンパク質とルミクロムの反応産物であるⅠ-１は、GL000139 タンパク質によって開裂部位のカルバミン酸が解離されてⅠ-２に変換されることが示された。

riboflavin, lumichrome, hydantoinase

発表責任者：高谷直樹（takaya.naoki.ge@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3A09a07
講演日時：3 月 27 日 10:46～ センター2 号館 A09 会場

ラビリンチュラ類のミトコンドリアにおける脂肪酸β酸化系の破壊は代謝性アシドーシスを引き起こす

Disruption of mitochondrial fatty acid beta-oxidation induces metabolic acidosis in thraustochytrids

○丹生谷 颯人、石橋 洋平、伊東 信、沖野 望 (九州大農)
○Hayato NYUNOYA, Yohei ISHIBASHI, Makoto ITO, Nozomu OKINO (Kyushu Univ.)

海洋性の油糧微生物であるラビリンチュラ類は、ドコサヘキサエン酸（DHA）をはじめとする有用な高度不飽和脂肪酸（PUFA）を、中性脂質であるトリアシルグリセロール（TG）として油滴に蓄積する。ラビリンチュラ類の中性脂質代謝に関わる代表的な遺伝子としてジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ 2（*dgat2*）が知られているが、中性脂質の分解系をはじめ、脂質代謝の全貌は明らかになっていない。本研究では薬剤耐性遺伝子をラビリンチュラ類のゲノム中にランダムに挿入し、細胞内の中性脂質量が野生株と比較して大きく変化した変異株をスクリーニングすることで、新たな脂質代謝関連遺伝子を同定することを目的として実験を開始した。

ラビリンチュラ類の一種 *Aurantiochytrium limacinum* MYA-1381 にエレクトロポレーション法によりネオマイシン耐性遺伝子カセットを導入し、G418 を含む PDA 平板培地で変異株を選抜した。各変異株を 96 穴プレートで一週間液体培養し、培養液の濁度（細胞増殖）とナイルレッドで染色した培養液の蛍光強度（中性脂質量）を指標として、中性脂質量が変化したと考えられる変異株を選抜した。その結果、野生株と比較して増殖速度が低下し、中性脂質量が著しく減少した変異株として Mut17 株を取得した。また、蛍光顕微鏡観察により、Mut17 株では油滴の形成に異常が見られた。次に、全ゲノムシークエンス解析により本変異株の原因遺伝子を探索したところ、ミトコンドリアにおける脂肪酸のβ酸化に関わる遺伝子（電子伝達フラビンタンパク質―ユビキノン酸化還元酵素:ETFQO）が破壊されていることが推測された。β酸化系は中性脂質から切り出された脂肪酸の最終的な分解系であり、Mut17 株では ETFQO が破壊された為に、生存に関わる細胞損傷が起きたことが考えられた。さらに、Mut17 株に ETFQO を過剰発現させることで細胞の増殖速度と油滴の形成は大きく回復した。

一方、Mut17 株の培養液から腐敗臭がしたことから、脂肪酸β酸化分解系の中間産物である短鎖・中鎖脂肪酸が培地中に漏出していることが示唆された。そこで、液体クロマトグラフィー質量分析計（LC-MS/MS）を用いて遊離脂肪酸を解析した結果、Mut17 株の培地中には酪酸が顕著に蓄積していた。さらに、pH 緩衝剤として培地に酢酸ナトリウムまたは炭酸ナトリウムを加えたところ、Mut17 株の増殖速度と油滴形成能力が回復した。これらのことから、Mut17 株では細胞内に短鎖脂肪酸が蓄積することで、細胞内が酸性に傾く細胞内アシドーシスになり、細胞損傷が引き起こされていることが推測された。

Thraustochytrids, beta-oxidation, acidosis

発表責任者：丹生谷颯人（hayaton@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3A09a08
講演日時：3 月 27 日 10:57～ センター2 号館 A09 会場

in silico 代謝デザインに基づく非酸化的解糖系依存の大腸菌株の創出
Creation of artificial non-oxidative-glycolysis dependent *Escherichia coli* strains based on *in silico* metabolic design

○三吉 健太[1]、川井 隆太郎[1]、堀之内 貴明[2]、戸谷 吉博[1]、清水 浩[1]([1]阪大院・情報・バイオ情報、[2]理研)
○ Kenta MIYOSHI[1], Ryutaro KAWAI[1], Takaaki HORINOUCHI[2], Yoshihiro TOYA[1], Hiroshi SHIMIZU[1] ([1]Dept. Bioinfo. Eng., Grad. Sch. IST, Osaka Univ., [2]RIKEN)

【目的】
今日、燃料アルコールやアミノ酸、プラスチック原料など、さまざまな有用物質が微生物を利用して生産されており、基質から目的物質への変換収率の向上が求められている。本研究では、大腸菌にビフィズス菌由来の二機能性ホスホケトラーゼを導入することで、非酸化的解糖系（NOG）経路を構築し、ピルビン酸からアセチル CoA を合成する際の炭素ロスを軽減することを試みた。また、シミュレーションを利用して細胞増殖と NOG 経路のフラックスが連動するように代謝経路をデザインした。
【方法】
大腸菌 MG1655(DE3)株を宿主として用い、*Bifidobacterium adolescentis* 由来の *fxpk* 遺伝子を T7 プロモーター下で発現させた。また、フラックスバランス解析により増殖最大時における NOG 経路のフラックスを予測し、NOG 経路のフラックス強化に有効な遺伝子破壊を探索した。染色体上の遺伝子の欠失は P1 トランスダクションにより実施した。構築した菌株についてグルコース単一炭素源の合成培地を用いて回分培養を行い、対数増殖期における比速度を評価した。
【結果】
NOG 経路を導入した株とそのコントロール株を回分培養した結果、細胞の増殖速度や到達菌体濃度に違いは見られなかった。導入した NOG 経路が機能することを確認するため、NOG 経路を経由して代謝しなくては生育できないように代謝経路を改変した。フラックスバランス解析の結果、解糖系下流のエノラーゼを欠失することで、細胞が増殖するためには NOG 経路の利用が強いられることが予測された。大腸菌の元来の代謝経路ではエノラーゼなしにホスホエノールピルビン酸が合成できないが、エノラーゼを欠失した NOG 経路導入株では、NOG 経路を経由してホスホエノールピルビン酸を供給することができる。実際に、NOG 経路非導入株ではエノラーゼ遺伝子を欠失できなかったが、NOG 経路を導入することでエノラーゼ遺伝子の欠失に成功した。培養結果から求めた比速度に基づいてフラックス分布を予測した結果、エノラーゼ破壊株における NOG 経路フラックス値は、理論最大値の 80%程度まで上昇したと推定された。また、エノラーゼ破壊株では酢酸の比生産速度と炭素収率が欠失前よりも改善された。野生株よりも高収率にグルコースからアセチル CoA に変換できる同株を用いることで、アセチル CoA を前駆体とする有用物質生産の収率向上が期待される。

Flux balance analysis, Non-oxidative-glycolysis, essential gene disruption

発表責任者：三吉 健太（kenta_miyoshi@bio.eng.osaka-u.ac.jp）

講演番号：3A09a09
講演日時：3 月 27 日 11:08～ センター2 号館 A09 会場

ルシフェラーゼ発光による枯草菌細胞内 NADPH レベルの非破壊的観測

Monitoring NADPH levels by luciferase luminescence in *Bacillus subtilis*

○吉田 健一[1]、石川 周[1]、田中 寛[2] ([1]神戸大科技イノベ、[2]東工大)
○Ken-ichi YOSHIDA[1], Shu ISHIKAWA[1], Kan TANAKA[2] ([1]Kobe Univ., [2]Tokyo Tech)

【目的】枯草菌のイノシトール異化遺伝子の改変により、*myo*-イノシトール（MI）をその立体異性体である *scyllo*-イノシトール（SI）に変換することができる。この変換は 2 種のイノシトール脱水素酵素、IolG および IolW によって触媒される 2 つの反応の組み合わせに基づいており、特に IolW 反応には NADPH の細胞内再生が必要である。おそらく、NADPH の再生供給には一定の限界があり、これは MI/SI 変換の律速要因の 1 つである。一方、枯草菌ゲノムには、$NAD(P)^+$トランスヒドロゲナーゼをコードする遺伝子が見いだされず、また NADPH 再生の主なメカニズムは未だ不明である。そこで、枯草菌における NADPH 再生メカニズムを明らかにするため、細胞内 NADPH レベルを非破壊的に観測する方法論の開発を目指した。

【方法】MI/SI 変換を行う枯草菌において、本来は胞子形成中にのみ機能し NADPH の再生を伴うグルコース脱水素酵素をコードする *gdh*、さらにグルコース輸送担体をコードする *glcP* を栄養細胞において過剰かつ構成的に発現させたところ、細胞内の NADPH レベルが有意に上昇した。また、この強制発現によって MI/SI 変換も強化された。すなわち、Gdh によって触媒される反応が細胞内 NADPH の再生を促すことができ、またそれが IolW 反応を促進したと考えられた。一方、細菌型ルシフェラーゼの発光強度は細胞内の NADH や NADPH の濃度変化に起因する $FMNH_2$ レベルの変動に呼応すると考えられている、そこで、*Photorhabdus luminescence* のルシフェラーゼを上記 *gdh* 発現細胞に導入したところ、その発光に顕著な増強が見られた。すなわち、細胞内の NADPH レベルの上昇がルシフェラーゼの発光強度の変化としてとらえられたと考えられた。

【結果】この結果は、ルシフェラーゼ発光を指標として枯草菌の NADPH 再生が非破壊的に観測できることを示している。今後はこのルシフェラーゼによる観測系を応用して、ルシフェラーゼ発光強度を変化させるランダムな変異を解析することにより、枯草菌の NADPH 再生メカニズムの解明を進めることができると考える。

Bacillus subtilis, NADPH, luciferase

発表責任者：吉田　健一（kenyoshi@kobe-u.ac.jp）

講演番号：3A09a10
講演日時：3 月 27 日 11:19～ センター2 号館 A09 会場

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の CoQ 生合成に関与する Pos5 の解析
Analysis of Pos5 that involves CoQ biosynthesis of *Schizosaccharomyces pombe*
○西原 昇瑚[1]、西田 郁久[2]、柳井 良太[2]、戒能 智宏[3]、川向 誠[3]([1]島根大院・自然科学、[2]島根大・生物資源、[3]島根大・農生命科学系)
○ Shogo NISHIHARA[1], Ikuhisa NISHIDA[2], Ryota YANAI[2], Tomohiro Kaino[3], Makoto Kawamukai[3] ([1]Graduate Sch. of Nat. Sci and Tech., Shimane Univ., [2]Fac. of Life and Environ. Sci., Shimane Univ., [3]Inst. of Agricul. and Life Sci., Shimane Univ.)

コエンザイム Q (CoQ, ユビキノン）は、脂溶性の抗酸化物質であり、ミトコンドリア電子伝達系の必須因子である。当研究室では、これまでに CoQ_{10} を生合成する分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の 10 個の CoQ 生合成酵素遺伝子を同定してきた。CoQ のキノン骨格は、水酸化、メチル化、脱炭酸化などの修飾が行われるため、CoQ 生合成には様々な基質や補酵素などが必要と考えられるが、その詳細はいまだ解明されていない。そこで、CoQ 生合成に関与する新規遺伝子の同定を目的に、分裂酵母の遺伝子破壊株ライブラリーを用いて、CoQ 欠損株が示す非発酵性炭素源培地での呼吸欠損、最少培地での生育遅延、硫化水素発生、酸化ストレス感受性の 4 つの表現型を指標としてスクリーニングを行い、CoQ 生合成に影響を与える遺伝子破壊株の取得を試みた。その結果、CoQ_{10} 量が野生株の約 0.2 倍に減少していた *Δpos5* 株を見出した。

分裂酵母の Pos5 と相同性がある出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の Pos5 (ScPos5) は、活性測定や構造解析から NADH キナーゼであることが分かっている。そこで、ScPos5 を用いた相補試験を行い、分裂酵母の Pos5 の機能を解析することにした。*ScPOS5* を分裂酵母の *Δpos5* 株に導入したところ、細胞数あたりの CoQ_{10} 量が野生株の約 0.9 倍に回復しており、機能的な相補が見られた。このことから、分裂酵母の Pos5 が NADH キナーゼとしての機能をもつことが示唆された。

CoQ 生合成の水酸化反応を触媒する Coq6 の反応には、NAD(P)H が関与していることが示唆されている。そこで、*Δcoq6* 株の CoQ 生合成を回復させることが知られているバニリン酸や、キノン骨格部分の基質である *p*-ヒドロキシ安息香酸 (PHB) をそれぞれ単独で培地に添加した時の *Δpos5* 株の CoQ_{10} 量を測定した。その結果、0.5 mM のバニリン酸を添加したときの細胞数あたりの CoQ_{10} 量は、無添加時と比較して約 1.7 倍に増加し、PHB を培地に添加した場合には、約 2.4 倍に増加していた。このことから、Pos5 が PHB の生合成や、キノン骨格部分の水酸化反応に関与していることが示唆された。また、*pos5* の破壊が、CoQ 生合成タンパク質の発現に影響しているかどうかを調べるために、ウェスタンブロッティングによるタンパク質発現解析を行った。その結果、*Δpos5* 株では調べた 4 つの CoQ 生合成タンパク質の発現にほとんど変化が見られなかったため、*pos5* の破壊は CoQ 生合成タンパク質の発現に影響を与えないことが示唆された。以上のことから、CoQ 生合成には、Pos5 が関与していることが示唆された。

Coenzyme Q, Fission yeast, NAD(P)H

発表責任者：戒能智宏（tkaino@life.shimane-u.ac.jp）

講演番号：3A09a11
講演日時：3 月 27 日 11:40～ センター2 号館 A09 会場

代謝経路の動的モデルを使った in vitro の酵素反応系による複数酵素 Vmax の予測

Vmax estimation of multiple enzymes based on in vitro reactions and the kinetic model

北村 さや香、○戸谷 吉博、清水 浩 (阪大院・情報・バイオ情報)
Sayaka KITAMURA, ○Yoshihiro TOYA, Hiroshi SHIMIZU (Dept. Bioinfo. Eng., Grad. Sch. IST, Osaka UnivOsaka Univ)

【背景・目的】微生物を使った有用物質において、多くの場合その実用化において代謝フラックスの強化が課題となっている。一連の代謝経路全体における反応速度の向上には、律速段階となっている反応の特定・解消が必要である。酵素比活性（Vmax）は、各酵素が触媒できる最大の反応速度を表すパラメータであり、フラックスと比較することで、経路のボトルネックを特定するための重要な手がかりとなる。しかし、Vmax の測定は各酵素について別々の測定を必要とするためスループットが低く、経路全体の活性を調べるのは多大な労力を伴う。本研究では、大腸菌の解糖系を対象とし、粗酵素抽出液を使って *in vitro* で一連の代謝経路を駆動し、中間代謝物の濃度時系列を取得した。このデータを既存の速度論モデルに当てはめることで、複数酵素の Vmax を一度に予測できるか検討した。

【手法】大腸菌野生株をグルコース炭素源の合成培地を用いて回分培養し、超音波破砕により粗酵素抽出液を得た。*in vitro* の反応実験では、基質として 5 mM グルコース 6 リン酸、補酵素（1 mM ATP, 5 mM ADP, 2.5 mM NAD^+）、および粗酵素抽出液を加え、反応液を経時的に回収した。代謝物濃度は液体クロマトグラフィー・質量分析計を用いて測定した。既存の大腸菌解糖系のモデルを MATLAB 2019a 環境下に実装し、制約付き非線形最適化により代謝物の時系列濃度データから Vmax の値を推定した。

【結果】本手法の理論実証のため、既存の解糖系上流の 3 酵素反応に関する *in vitro* 実験のデータと動的モデル（Ishii, *et al.*, 2007）を用いて、代謝物濃度時系列データから各 Vmax の値とその信頼区間を評価した。この結果より、推定できた信頼区間の幅は酵素によって異なるが、遅い反応については狭い幅の信頼区間として予測できることを示すことができた。また、*in vitro* の反応実験では、反応開始 30 分間の間にグルコース 6 リン酸の大部分が消費され、経路下流のホスホエノールピルビン酸やピルビン酸が生成されていることを確認した。本発表では、取得した濃度時系列データと動的モデル（Chassagnole, et al., 2002）から予測された各酵素の Vmax の値について、その妥当性を議論する。

Escherichia coli, Glycolysis, Kinetic model

講演番号：3A09a12
講演日時：3 月 27 日 11:51～ センター2 号館 A09 会場

ジアシルグリセロール高蓄積納豆菌の創生の試み
An attempt to creation of *Bacillus subtilis natto* that accumulates high diacylglycerol content
○松岡 聡[1]、鈴木 祥太[2]、河村 富士夫[3] ([1]埼玉大院理工研、[2]法政大生命、[3]立教大理)
○Satoshi MATSUOKA[1], Shota SUZUKI[2], Fujio KAWAMURA[3] ([1]Saitama Univ., [2]Hosei Univ., [3]Rikkyo Univ.)

ジアシルグリセロール(DAG)は、血中中性脂肪の上昇を抑える効果などが報告されており、昨今の健康志向の高まりに伴い注目されている。そこで微生物による DAG 生産に着目した。グラム陽性菌モデル生物である枯草菌は通常 DAG キナーゼ遺伝子(*dgkB*) の発現抑制によって膜脂質の構成成分である DAG が蓄積し、結果として致死となる。しかしながら、我々は脂質生合成経路を改変し、野生型の約 4.8 倍（9.6% → 46.2%）もの DAG を高蓄積する枯草菌の作製に成功した(Matsuoka *et al.*, Genes genet. Syt. 2011)。そこで、より簡便に DAG を摂取できるようにすることを念頭に置いて納豆菌に注目した。納豆菌は分類学上枯草菌と同種であるため、枯草菌での研究成果がそのまま適応できると期待される。しかしながら、同種に分類されているが枯草菌は納豆を作れないなどの差異が見られるため、実証実験が必要とされる。そこで、本研究では、枯草菌(*Bacillus subtilis*)での DAG 蓄積を同種である納豆菌(*Bacillus subtilis natto*)で(再)構築できることを実証することを目的とした。納豆菌は実験室株である枯草菌 168 株（基準株）と異なり、外来 DNA を取り込む形質転換能力が不活化されているため、遺伝子破壊が困難である。そこで、*mecA* が破壊されて形質転換能力を有するようになった納豆菌株を用いて、DAG 蓄積に関係する遺伝子改変を行った。現在、*dgKB* の抑制により生育が抑制、リポテイコ酸合成酵素遺伝子 *ltaS* との組み合わせにより生育抑制が抑圧されることを確認した。現在これらの株における脂質組成を解析している。

diacylglycerol, lipid, Bacillus

発表責任者：松岡　聡（matsuoka@mail.saitama-u.ac.jp）

講演番号：3A09a13
講演日時：3 月 27 日 12:02～ センター2 号館 A09 会場

Bacillus coagulans のポリアミン代謝経路
Biosynthetic pathway of polyamines of *Bacillus coagulans*
藤原 有希[1]、松浦 健人[2]、原口 健司[2]、○鈴木 秀之[1] ([1]京都工繊大、[2]京都茶研)
Yuki FUJIWARA[1], Kento MATSUURA[2], Kenji HARAGUCHI[2], ○Hideyuki SUZUKI[1] ([1]Kyoto Inst. Technol., [2]KAFF)

【研究の背景】動物の健康寿命の伸長に生体のポリアミン（特にスペルミジン）濃度を一定に保つことが重要であることが分かって来た。動物は、若い頃は十分量のスペルミジンを生合成できるが、加齢に伴ってその合成能が衰えることが、生活習慣病の一因とされている。しかし、スペルミジンは食事から摂ることができ、あるいは腸内細菌が生成したスペルミジンを取り込むことでも補うことができる。演者らはポリアミン含量が多い食品を探す中で、本学の所在地である京都市の松ヶ崎地区に古くから伝わる菜の花漬にスペルミジンが多く含まれていることを見出した。菜の花漬は、菜の花を塩漬けし、乳酸発酵させたものである。漬け物樽の底と一番上に糠袋を置くため、糠からポリアミンが浸出する。しかし、菜の花漬は原料以上の高濃度のスペルミジンを含んでいるため、乳酸菌がスペルミジンを合成していると考えた。
【結果】菜の花漬から分離した乳酸菌の 1 菌株は、嫌気条件下で MRS 寒天培地に生育し炭酸カルシウムを溶かしたこと、好気条件でも生育できること、グラム陽性桿菌であること、芽胞を形成すること、16S rDNA 解析の結果から *Bacillus coagulans* と同定した。さらに、最少培地で生育させた際に本菌株がスペルミジンを合成していることを確認した。ポリアミン、中でもスペルミジンを合成できる乳酸菌はプロバイオティクスとして期待できるが、*B. coagulans* は乳酸菌の中で例外的に芽胞を形成し、胃酸に耐えて生きた状態で腸に到達できるという特徴がある。細菌のポリアミン生合成は、これまでに複数の経路が知られているが、乳酸菌のポリアミン代謝経路の研究は不十分であることから、プロバイオティクスとして有望な *B. coagulans* のポリアミン生合成経路を調べた。
B. coagulans は形質転換効率が極めて悪く、遺伝子のノックアウトが難しい。そこで、本研究では、*B. coagulans* のタイプカルチャーである DSM1 のゲノムよりポリアミン生合成酵素をコードしていると予想される遺伝子をクローニングし、ポリアミン生合成経路の遺伝子を全て欠失した大腸菌株（SH1994 株：Δ*ggt-2* Δ*speAB*-FRT Δ*speC*-FRT Δ*adiA*::*kan*^{R}-FRT Δ*cadA*-FRT Δ*ldcC*-FRT Δ*speF*-FRT Δ*puu*(*PA-DR*)::*tet*^{R} Δ*speE*-FRT Δ*pat*-FRT）に導入し、予想される反応を行うか調べた。その結果、アルギニンからアグマチン経由でプトレッシンが生合成される経路を持つことが分かった。一方、大腸菌や哺乳類に見られるように、プトレッシンにアミノプロピル基を転移することでスペルミジンが生合成されるのではなく、プトレッシンからカルボキシスペルミジン経由でスペルミジンが生合成されることが明らかとなった。

spermidine, polyamine, healthy longevity

発表責任者：鈴木秀之（hideyuki@kit.ac.jp）

講演番号：3A09p01
講演日時：3 月 27 日 13:50～ センター2 号館 A09 会場

コリネ型細菌を用いた物質生産を指向した誘導プロモーターの探索
Evaluation of inducible promoters for industrial material production using *Corynebacterium glutamicum*
○小林 雅規[1,2]、久保田 健[1]、乾 将行[1,2]（[1]RITE、[2]奈良先端大・バイオ）
○Masaki KOBAYASHI[1,2], Takeshi KUBOTA[1], Masayuki INUI[1,2] ([1]RITE, [2]NAIST)

【目的】遺伝子組換え微生物を用いた発酵生産技術は有用物質生産における重要な技術の一つとして知られている。我々の研究グループはアミノ酸生産微生物として工業生産に利用されているコリネ型細菌を用い、遺伝子発現制御や物質生産についてこれまで研究を行ってきた。微生物を用いた物質生産効率の向上の手段の一つに遺伝子の高発現があり、一般的に発現量を常時増加させる構成的プロモーターが利用されている。構成的プロモーターを挿入した微生物で物質生産を行う場合、微生物は細胞増殖と同時に物質生産を行う。しかし生成物が微生物自身に対して毒性を示す場合、微生物は細胞増殖や基質代謝が阻害され物質生産効率の向上に寄与しない可能性がある。
一方、構成的プロモーターの代わりに誘導プロモーターの利用が考えられる。これは特定物質の有無によって遺伝子発現を制御できるため、細胞増殖時に物質生産関連遺伝子を抑制し微生物の生成物毒性を回避できると考えられる。しかしこれまでにコリネ型細菌を用いた物質生産において誘導プロモーターはほとんど用いられていなかった。
本研究では複数の誘導プロモーターについてレポーター遺伝子を用い誘導活性を調査し、複数の評価基準から産業利用で実用的と考えられる誘導プロモーターを選抜することを目的とした。
【方法と結果】シキミ酸またはキナ酸の添加により誘導可能な誘導プロモーターである QsuR-Pqsu を対象に検討した。該当の領域を PCR で増幅し、さらに大腸菌由来の *lacZ* 遺伝子をプロモーター下流に結合させベクターに挿入した。これをコリネ型細菌に導入しβ－ガラクトシダーゼ活性を指標にレポーターアッセイを行った。その結果、シキミ酸を添加し 2 時間培養した系では非添加系と比べ 0.5 mM 添加系で 19 倍、5 mM 添加系で 24 倍の誘導活性を示した。同じくキナ酸の系では 0.5 mM 添加系で 18 倍の誘導活性を示した。
これらの誘導活性はベクターに挿入する誘導プロモーターの種類によって変化することが考えられるため、他の誘導プロモーターについてもレポーターアッセイを行う。更に転写活性、翻訳量を測定することで多面的に誘導活性を比較する。また誘導物質添加後の培養条件についても検討し、有効添加濃度、添加後の発現誘導応答時間、培養時の誘導物質の安定性を評価する。
さらに誘導物質の基質競合性、取り扱い時の安全性、価格、制御因子と誘導物質の特異性等様々な要因について網羅的に調査する。以上の結果を比較し、コリネ型細菌の産業利用において実用的だと考えられる誘導プロモーターを選抜する。

gene regulation, inducer, beta-galactosidase

講演番号：3A09p02
講演日時：3 月 27 日 14:01～ センター2 号館 A09 会場

コリネ型細菌におけるアスパラギン代謝オペロン発現制御因子 AnsR の結合配列の同定

Identification of the binding site of AnsR, a transcriptional regulator of asparagine metabolic operon in *Corynebacterium glutamicum*.

菅谷 理貴[2]、○豊田 晃一[1]、乾 将行[1,2] ([1]RITE、[2]奈良先端大・バイオ)
Riki SUGAYA[2], ○Koichi TOYODA[1], Masayuki INUI[1,2] ([1]RITE, [2]NAIST)

【目的】コリネ型細菌 *Corynebacterium glutamicum* はアミノ酸生産に利用されている有用工業微生物である。アスパラギン酸は核酸や補酵素そして産業的に有用な L-リジン、L-メチオニンの生合成に利用されるため、その代謝制御機構の理解は生理学的、応用微生物学的に重要である。*C. glutamicum* におけるアスパラギン酸の生成経路として、オキサロ酢酸のアミノ化、アスパルターゼによるフマル酸のアミノ化、アスパラギナーゼによるアスパラギンの脱アミノ化が挙げられる。当研究室が取得した R 株のゲノムにはこれらに加えて細胞外のアスパラギンの取り込み・利用に関与する *ansR-ansA2-aspA2-ansP* オペロンがコードされている。本オペロンはアスパラギンの添加によって誘導され、オペロンによってコードされるパーミアーゼ AnsP によって取り込まれたアスパラギンは、アスパラギナーゼである AnsA2、アスパルターゼである AspA2 による段階的な脱アミノ化によりフマル酸となり炭素源として利用される。本菌のアスパラギン酸代謝経路の理解を深めるべく、本オペロンの発現制御機構の解析を進めている。昨年度、AnsR がオペロンのプロモーターへ結合することでリプレッサーとして機能することを報告した。本研究では AnsR の結合配列の同定を目的に解析を実施した。
【方法と結果】Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)により組換えタンパク質として精製した AnsR の DNA 結合能を評価した。段階的に DNA プローブの領域を削除することにより結合領域の絞り込みをした結果、転写開始点を基準として+1 から+21 の範囲に結合配列が存在することが推測された。AnsR が GntR ファミリー内の FadR サブファミリーに属することから特徴的回分配列を探索した結果、ほぼ完全な回分配列が見いだされた。本オペロンの先頭遺伝子 *ansR* は転写開始点が開始コドン ATG の A と一致する、リーダーレス mRNA として転写される。そのため、自身のコード領域に結合配列を有することが明らかとなった。現在、変異導入実験によりこの配列の機能について検証を進めている。

Corynebacterium glutamicum, transcriptional regulation, repression

講演番号：3A09p03
講演日時：3 月 27 日 14:12～ センター2 号館 A09 会場

低温培養下におけるコリネ型細菌 RNase J の発現制御解析

Regulation of the expression of RNase J at low temperature condition in *Corynebacterium glutamicum*

○田中 裕也[1]、濱本 渚[2]、澤 誠人[2]、乾 将行[1,2] ([1]RITE、[2]奈良先端大・バイオ)
○Yuya TANAKA[1], Nagisa HAMAMOTO[2], Masato SAWA[2], Masayuki INUI[1,2] ([1]RITE, [2]NAIST)

【目的】我々は有用工業微生物 *Corynebacterium glutamicum* を用いて様々な物質生産に取り組んでいる。遺伝子発現の制御には RNA 分解酵素(RNase)による mRNA の分解が重要な役割を果たしているが、*C. glutamicum* での RNase の解析は進んでいない。今回我々は主要 RNase のひとつである RNase J の発現解析を行ったので報告する。

【方法と結果】我々はこれまでの研究で *C. glutamicum* の RNase J をコードする *rnj* の発現は mRNA の分解段階で自己制御されていることを示してきた。今回 *rnj* 破壊株を様々なストレス条件下での生育を比較したところ、特に低温培養条件でコロニー形成が阻害されることを見出した。また、3'-5'エキソヌクレアーゼをコードする *pnp* の破壊株でも生育が阻害されており、低温環境での生育にこれらのエキソヌクレアーゼ活性が重要であることが示された。
低温培養条件での *rnj* の発現解析を行ったところ、培養液の培養温度を 33℃から 16℃に温度低下後 1 時間をピークとした一過的発現上昇を示すことが判明した。この発現上昇は *rneG* 等の RNase 破壊株でも野生株と同様に見られたが、RNase J の活性部位に変異を導入し活性低下した株では温度低下による一過的な変化は観察されなかった。以上の結果から低温環境での発現誘導は RNase J による *rnj* mRNA 分解を介した自己制御機構が関与していると考えられる。

RNase, cold shock stress, Corynebacterium glutamicum

講演番号：3A09p04
講演日時：3 月 27 日 14:23～ センター2 号館 A09 会場

DNA 構造情報による麹菌由来転写因子の結合メカニズムの解析
Binding mechanism analysis of transcription factor in *Aspergillus oryzae* by using DNA shape information

○岡 大椰[1]、兒島 孝明[1]、井原 邦夫[2]、小林 哲夫[1]、中野 秀雄[1] ([1]名古屋大学生命農学研究科、[2]名古屋大学遺伝子解析施設)
○ Hiroya Oka[1], Takaaki Kojima[1], Kunio Ihara[2], Tetsuo Kobayashi[1], Hideo Nakano[1] ([1]Bioagriculture science, Nagoya Univ., [2]Center for Gene Res, Nagoya Univ.)

【目的】　当研究グループではこれまで Genomic SELEX-Seq (gSELEX-Seq)と発現変動解析によって得られる情報を統合することで、転写因子によって直接的に発現制御される遺伝子をゲノムワイドで同定してきた。この過程で、開始コドン上流領域に結合 DNA モチーフを保有するにも関わらず、標的転写因子の高発現に応答しない遺伝子が多数検出された。このことから、転写因子-DNA 間相互作用には、DNA 配列に加え未知の要因が関与していることが示唆された。そこで本研究では、配列毎に異なる DNA の３次元構造情報に着目し、先行研究によって得られた *Aspergillus oryzae* におけるキシラン・セルロースやペントース代謝などに関与する転写因子 AoXlnR の転写制御情報を基に、各遺伝子の DNA 結合モチーフ付近の配列を比較し、配列環境が転写制御に与える影響を網羅的に解析する。さらにはこれら DNA 構造情報を用いた機械学習による転写因子-DNA 結合メカニズム予測モデルの構築を目的とする。
【方法・結果】 先行研究における gSELEX-Seq と DNA マイクロアレイ解析によって得られた AoXlnR 転写制御に関わる遺伝子に対して DNA 構造情報解析を行なった。具体的には、麹菌遺伝子プロモーター中に存在する二つの AoXlnR 結合モチーフ 5’-GGCTAA-3’、5’-GGCTGA-3’を検出し、それら結合モチーフの前後 25 bp を抽出、DNA 構造に関連するパラメーターHelT, ProT, MGW, Roll を R パッケージ ”DNAshapeR”を用いて算出した。その後、各配列の DNA 構造値をマイクロアレイ解析によって明らかとなった実際の発現制御の有無、gSELEX-Seq によって明らかとなった転写因子−DNA 結合の有無によって分類分けし、それぞれ比較解析を行った。その結果、いくつかのパラメーターにおいて AoXlnR による実際の発現制御の有無、もしくは DNA 結合の有無によってその DNA 構造値が大きく異なることが明らかとなった。現在、DNA 構造パラメーターから、AoXlnR による配列毎の発現制御や DNA 結合を高精度で予測する機械学習モデルの構築を試みている。このモデルの構築は、将来的により高精度な転写因子結合部位解析法への活用が期待され、さらには転写因子制御メカニズムの解明に大きく寄与すると考えられる。

bioinfomatics, transcription factor, Aspergillus oryzae

発表責任者：兒島孝明（kojimat@nuagr1.agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3A09p05
講演日時：3 月 27 日 14:34～ センター2 号館 A09 会場

糸状菌 *Aspergillus nidulans* におけるプロテアーゼの生産制御
Regulation of protease production in *Aspergillus nidulans*
○柴山 智洋[1]、浅野 圭祐[1]、金丸 京子[2]、木村 真[1]、國武 絵美[3]、小林 哲夫[1]([1]名大院生命農学、[2]中部大応用生物、[3]三重大院生物資源)
○Tomohiro SHIBAYAMA[1], Keisuke ASANO[1], Kyoko KANAMARU[2], Makoto KIMURA[1], Emi KUNITAKE[3], Tetsuo KOBAYASHI[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Chubu Univ., [3]Mie Univ.)

【目的】
糸状菌 *Aspergillus nidulans* は様々な菌体外酵素を分泌する。これらの酵素遺伝子発現制御機構の一つに、カーボンカタボライト抑制(CCR)がある。CCR は長年にわたって転写抑制因子 CreA 依存的に制御されると考えられて来たが、我々はセルラーゼ遺伝子の CCR にはこれと独立して cAMP 依存性プロテインキナーゼ A(PkaA)や三量体 G タンパク質のαサブユニット GanB を介した cAMP シグナリングも関与することを明らかにした。一方、*A. nidulans* における主要プロテアーゼ PrtA の遺伝子発現は飢餓条件で誘導され CreA が発現抑制に部分的に関与するが、GanB については上記のセルラーゼとは逆にプロテアーゼ生産を正に制御する因子として報告されている。
このような違いが何故生じるのかを明らかにする第一歩として、本報告では三量体 G タンパク質の三種のαサブユニット GanA、GanB、FadA ならびに PkaA によるプロテアーゼ生産制御について検証した。また、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においてプロテインキナーゼ A 標的の一つとして知られる SFL1 の *A. nidulans* における相同因子(SflA と命名した)についてもプロテアーゼ生産制御への関与を検証した。
【方法及び結果】
ganA、*ganB*、*fadA* ならびに *pkaA* 遺伝子破壊株におけるプロテアーゼ生産についてカゼインを単一炭素源としたプレートアッセイにより確認した結果、*ganB* と *pkaA* の破壊株でプロテアーゼ生産性が消失していた。この結果は GanB から PkaA への cAMP シグナリング経路がプロテアーゼの飢餓誘導に必要であることを示しており、本経路がグルコース応答に関わるとする現在の知見と矛盾することが確認された。また、出芽酵母におけるプロテインキナーゼ A の標的である SFL1 の相同因子をデータベースで検索したところ DNA 結合ドメインが極めて類似した SflA が見出された。本因子の破壊はセルラーゼやプロテアーゼのグルコースによる CCR には影響を与えなかったが、グルコース非添加のカゼインプレートにおけるプロテアーゼ生産性が著しく向上していた。*sflA* 破壊株の培養上清を用いた活性測定でも、プレートアッセイほど顕著ではないが生産性の向上が認められた。これより GanB-PkaA-SflA の経路でプロテアーゼ生産が制御されることが示唆された。
現在、各遺伝子破壊株におけるプロテアーゼの転写解析を行っており、これについてもあわせ報告する予定である。

Aspergillus nidulans, protease, cAMP signaling

発表責任者：小林哲夫（koba@nuagr1.agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3A09p06
講演日時：3 月 27 日 14:45～ センター2 号館 A09 会場

Aspergillus nidulans における cAMP シグナリング関連因子のヘミセルラーゼ発現抑制への関与
Repression of hemicellulase gene expression by cAMP signaling-related factors in *Aspergillus nidulans*

○國武 絵美[1]、木村 哲哉[1]、小林 哲夫[2] ([1]三重大院生資、[2]名大院生命農)
○Emi KUNITAKE[1], Tetsuya KIMURA[1], Tetsuo KOBAYASHI[2] ([1]Mie Univ., [2]Nagoya Univ.)

【目的】糸状菌の多糖類分解酵素遺伝子はカーボンカタボライト抑制（CCR）により制御される。我々はこれまでに *Aspergillus nidulans* におけるセルラーゼ遺伝子の CCR に cAMP シグナリングが関与すること，また，この抑制機構は従来知られていた C_2H_2 型転写因子 CreA による抑制とは独立して働くことを示した。グルコースによる CCR には CreA と cAMP シグナリングの両方が関わり，キシロースによる CCR は CreA による制御が主要である。一方，ヘミセルラーゼ遺伝子については cAMP シグナリングが関与する CCR についての詳細は明らかでない。本研究ではキシラナーゼとマンナナーゼの CCR に関する知見を深めるため CreA 依存的・cAMP シグナリング依存的 CCR の関与について解析した。
【結果】*creA* 破壊株，cAMP 依存性プロテインキナーゼ触媒サブユニット遺伝子(*pkaA*)破壊株，三量体 G タンパク質 α サブユニット遺伝子(*ganA*, *ganB*, *fadA*)破壊株を用いて，プレートアッセイによる酵素生産性と液体培養時の酵素生産性並びに酵素遺伝子発現を解析することにより各因子の CCR への関与を調べた。グルコース存在下におけるマンナナーゼ生産性はプレートアッセイでは *creA* 破壊株，*pkaA* 破壊株，*ganB* 破壊株で観察されたが液体培養では *creA* 破壊株でのみ見られた。しかし *creA*/*pkaA* 二重破壊株ではより強い脱抑制が観察されたため，CreA だけでなく PkaA も部分的に関与していることが示唆された。β-マンノビオースを誘導物質に使用した液体培養での転写解析の結果，マンナナーゼ遺伝子の発現は *creA* 破壊株，*pkaA* 破壊株，*ganB* 破壊株で部分的に脱抑制した。これらの結果より培養条件により各因子の強度は異なるものの CreA と GanB を介した cAMP シグナリングの両方がマンナナーゼ遺伝子のグルコース抑制を制御していることが示された。キシロース抑制は *creA* 破壊株でほぼ完全に脱抑制した。以上の結果より，マンナナーゼの CCR はセルラーゼと類似していると考えられる。一方，キシロースを誘導物質としたキシラナーゼ生産性は，グルコースの添加に関わらず野生株よりも *creA* 破壊株，*pkaA* 破壊株，*ganB* 破壊株で大幅に，*fadA* 破壊株で僅かに増加した。これはキシロースが同時に抑制物質としても働くためである。ザイモグラフィー及び転写解析により遺伝子毎の発現を調べたところ，グルコース添加条件では *xlnB* が特に強く cAMP シグナリング因子依存的に抑制されることが判明した。また他のキシラナーゼ遺伝子に関しても脱抑制率は *creA* 破壊株よりも *pkaA* 破壊株，*ganB* 破壊株で高くなっていた。これはキシラナーゼ遺伝子のグルコースによる CCR が cAMP シグナリングの影響を強く受けているためであると考えられる。

carbon catabolite repression, hemicellulase, Aspergillus nidulans

講演番号：3A09p07
講演日時：3 月 27 日 15:06～ センター2 号館 A09 会場

黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* における転写因子 AmyR の活性化機構の解析
Analysis of activation mechanism of AmyR in the black koji-mold *Aspergillus luchuensis*.
○橋本 渉[1]、渡部 昭[1]、水谷 治[2]、山田 修[3]、五味 勝也[1] ([1]東北大院農、[2]琉球大学、[3]酒総研)
○Wataru Hashimoto[1], Akira Watanabe[1], Osamu Mizutani[2], Osamu Yamada[3], Katsuya Gomi[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Ryukyu Univ., [3]Natl. Res Inst. Brew.)

産業上重要なアミラーゼの生産制御に必須な転写因子 AmyR の活性化機構が、麹菌 *Aspergillus oryzae* とモデルカビ *A. nidulans* では異なることが報告されている。*A. oryzae* ではマルトース資化クラスターの機能により環境中のマルトースが細胞内に取り込まれ、菌体内α-グルコシダーゼによりイソマルトースへと変えられる。このイソマルトースにより細胞質に局在する AmyR が核に移行し、アミラーゼ遺伝子の転写を促進する。一方、*A. nidulans* ではマルトース資化クラスターのホモログクラスターを有するものの、マルトースは菌体外α-グルコシダーゼの糖転移反応によって AmyR の直接の活性化基質であるイソマルトースに変換されていると考えられている。また、焼酎醸造に用いられる黒麹菌 *A. luchuensis* では麹菌や *A. nidulans* に存在するマルトース資化クラスターは見出されない。このように同じアスペルギルス間でもアミラーゼの生産制御において異なる分子機構を有していることが考えられる。本研究では黒麹菌における AmyR の活性化機構解析を通して、アスペルギルス属間におけるアミラーゼの生産制御機構の多様性の解明を目指した。

黒麹菌をマルトースまたはイソマルトースを単一炭素源とした培地で培養し、経時的に HPLC を用いて解析を行った結果、どちらの炭素源も 10 時間後には培養液中から見られなくなった。しかし、培地にα-グルコシダーゼ阻害剤を添加したところ、それらの濃度は 10 時間後にもほとんど変化が見られなかった。従って、黒麹菌では *A. nidulans* 同様に菌体外α-グルコシダーゼの糖転移反応により生じたイソマルトースにより AmyR が活性化していることが示唆された。また、AmyR の細胞内局在を観察するために黒麹菌の AmyR に GFP を結合し黒麹菌に発現させた。非誘導性の炭素源であるカザミノ酸を単一炭素源とした培地でも AmyR は核に局在しており、麹菌とは AmyR の局在性が異なっていた。そこで GFP を結合させた麹菌の AmyR を黒麹菌で発現させると、同様の培養条件において AmyR が細胞質に局在していた。このことから黒麹菌の AmyR はアミノ酸配列依存的に核に局在していることが示唆された。麹菌では AmyR の C 末端領域（512-604 残基）を欠損させると AmyR が核に局在することが報告されており、C 末端領域が局在化に関与する可能性が考えられている。そこで黒麹菌の AmyR の 1-507 残基と麹菌の AmyR の 512-604 残基を連結したキメラタンパク質に GFP を結合し黒麹菌に発現させた。カザミノ酸を単一炭素源とした培地において観察した結果、キメラタンパク質は核に局在しており、黒麹菌の AmyR の局在性は C 末端領域によるものではないことが示唆された。現在、核移行シグナルを含む N 末端領域について解析を進めている。

Aspergillus luchuensis, amylase

講演番号：3A09p08
講演日時：3 月 27 日 15:17～ センター2 号館 A09 会場

5′ CAGE データに基づく *Aspergillus* 属真菌種間の一次代謝酵素遺伝子群における転写開始点の比較解析
Comparative analysis of transcription start sites of primary metabolic genes in *Aspergillus spp.* based on the 5' CAGE data
○井上 大志、新谷 尚弘、五味 勝也（東北大院農）
○Taishi Inoue, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi (Tohoku Univ.)

選択的プロモーター(AP) は、環境の違いによって使い分けられる複数の転写開始点(TSSs) を含むプロモーターであり、環境に応答した精密な転写調節を可能にする。動物や植物では、異種間のオルソログ遺伝子における AP の TSSs 使用様式はしばしば異なることが知られており、このような AP の多様化は真核生物の転写段階における進化機構の一つと考えられている。しかし、真菌類では近縁種間における包括的な AP の比較解析例がなく、AP 多様化の意義は明確でない。一方、我々は麹菌 *Aspergillus oryzae* の解糖系酵素であるエノラーゼ遺伝子の炭素源の違いに応答する AP の 2 つの TSSs の使用法が *Aspergillus nidulans* と異なることを示し、その違いが 2 種間における糖炭素源と非糖炭素源条件の発現量比の違いに関連する可能性を示した（2019 年農芸化学会)。そこで本研究では、TSSs 毎の転写量情報をゲノム網羅的かつ定量的に取得可能な 5′CAGE を *A. oryzae* と *A. nidulans* においてそれぞれ行い、一次代謝（解糖系/糖新生、ピルビン酸代謝、TCA サイクル、ペントースリン酸回路）の酵素遺伝子群について、その発現量と TSSs 情報を網羅的に比較した。*A. oryzae* RIB40 と *A. nidulans* FGSCA4 について、グルコースおよび酢酸培養条件下の 5′CAGE データをそれぞれ取得し、オルソログな関係にある 59 の一次代謝遺伝子について、2 種間における酢酸培養条件下の発現量に対するグルコース培養条件下の発現量の比の違いに基づき、*A. oryzae* において *A. nidulans* よりもグルコース条件下で高発現する傾向を示す遺伝子群（G1)、*A. oryzae* において *A. nidulans* よりも酢酸条件下で高発現する傾向を示す遺伝子群（G2)、2 種間で類似した発現量比パターンを示す遺伝子群（G3）に分類した。その結果、G1 には 17 遺伝子（17/59, 29%)、G2 には 10 遺伝子（10/59, 17%）がそれぞれ分類され、特に G1 においては解糖経路に関連する 12 遺伝子が含まれていた（12/17, 71%)。一方、59 遺伝子における TSSs の特徴を 2 種間で比較したところ、7 遺伝子について明瞭な TSSs 使用様式の違いが認められ、そのうち 4 遺伝子は G1 に含まれる解糖系のエノラーゼ（ENO)、アルドラーゼ（ALD)、ホスホフルクトキナーゼ（PFK)、ピルビン酸キナーゼ（PK）の遺伝子であった。ENO と ALD の遺伝子では、*A. oryzae* で認められる炭素源の違いに基づく 2 つの TSSs の厳密な使い分けが、*A. nidulans* で曖昧になる傾向が認められた。PFK と PK 遺伝子では、2 種間で TSSs の数が異なっており、新たな TSSs の獲得または既存の TSSs の消失が起こっていることが考えられた。以上の結果から、*A. oryzae* における複数の解糖系酵素遺伝子のグルコース存在下における高発現機構の獲得には、AP の TSSs 使用法の変化や TSSs の新規獲得・消失が関連することが考えられた。

Aspergillus, Transcription start sites, Glycolysis

発表責任者：井上大志（taishi.inoue.t3@dc.tohoku.ac.jp）

講演番号：3A09p09
講演日時：3 月 27 日 15:28～ センター2 号館 A09 会場

固体培養特異的発現に関与する転写因子 FlbC の麹菌バイオマス分解酵素遺伝子発現への影響

The impact of the transcription factor FlbC on the expression of biomass degrading enzyme genes in *Aspergillus oryzae*

○大沼 司、荒井 啓、藤田 翔貴、新谷 尚弘、五味 勝也（東北大農）
○Tsukasa ONUMA, Hiraku ARAI, Syoki HUJITA, Takahiro SHINTANI, Katsuya GOMI (Tohoku Univ.)

【目的】
麹菌 *Aspergillus oryzae* は我が国の国菌として清酒や味噌、醤油といった日本の伝統的な醸造産業に利用される重要な糸状菌である。麹菌は様々なデンプン分解酵素やタンパク質分解酵素を多量に生産・分泌する特徴を持ち、その酵素生産は液体培養に比べ固体培養において高いことが知られている。我々は、*Aspergillus nidulans* において分生子形成に関与する転写因子 FlbC が、麹菌における固体培養特異的な遺伝子の発現（グルコアミラーゼ B 遺伝子 *glaB* や酸性プロテアーゼ遺伝子 *pepA* など）に関与することを明らかにしてきた（１）。一方で、固体培養におけるセルラーゼやキシラナーゼなどのバイオマス分解酵素遺伝子の発現に FlbC の及ぼす影響については明らかになっていないことから、今回は、バイオマス分解酵素遺伝子の発現が FlbC により制御されているかに着目して解析することとした。
【方法及び結果】
小麦ふすま培地で培養させた麹菌野生株及び Δ*flbC* 株から mRNA を抽出し、定量 PCR により各種バイオマス分解酵素遺伝子の発現解析を行ったところ、キシラナーゼ遺伝子の *xynG2* や *xynF1*、セルラーゼ遺伝子の *celA* や *celB* が野生株よりも Δ*flbC* 株では発現量が上昇することが示された。Δ*flbC* 株では野生株に比較してキシラナーゼ活性やセルラーゼ活性が上昇することが示されており、これらの遺伝子発現の増加が関連していると示唆される。一方で、FlbC により正にも負にも制御されないバイオマス分解酵素遺伝子も存在しており、それらは XlnR をはじめとする他の転写因子により発現が制御されていることが示唆された。*xynF1* や *celA* といった FlbC 存在下で発現低下を示した遺伝子について、FlbC がこれらのプロモーター上に結合して発現を制御しているか否かを解析することが今後の課題となる。そこで、現在 FlbC の DNA 結合配列について、*glaB* プロモーターを用いたゲルシフトアッセイ（EMSA）や GUS レポーターアッセイにより詳細な同定を行っているところである。
（１）Tanaka et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **100**, 5859–5868 (2016).

Aspergillus oryzae, transcription factor, Solid-state culture

発表責任者：五味勝也（katsuya.gomi.a6@tohoku.ac.jp）

講演番号：3A09p10
講演日時：3 月 27 日 15:39～ センター2 号館 A09 会場

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるペプチダーゼ遺伝子の転写に窒素源が与える影響
Effect of nitrogen source on peptidase gene transcription in *Aspergillus oryzae*
○白石 敦士、田中 優花子、山形 洋平（東京農工大院）
○Atsushi SHIRAISHI, Yukako TANAKA, Yohei YAMAGATA (Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

【背景と目的】硝酸ナトリウムを唯一の窒素源として培養した *Aspergillus oryzae* RIB40 株を様々な窒素源に切り替えて振盪培養したところ、L- ロイシンや大豆タンパクなどを窒素源とした場合に多くのペプチダーゼ遺伝子の転写量が誘導されることを見出した [1)]。そこで本研究では *A. oryzae* における窒素源の変化に対するペプチダーゼ遺伝子の転写応答制御機構を解明するために、 L- ロイシンを窒素源とした時の転写応答に着目して解析を行うこととした。

【方法と結果】 *A. oryzae* RIB40 株を硝酸ナトリウムを窒素源として 48 時間培養した後、窒素源を硝酸ナトリウムと L- ロイシンにそれぞれ切り替えて 1、2、3、4、8、12 時間培養した。この条件下で、数種のペプチダーゼ遺伝子や、窒素代謝に関わると考えられている既知の転写因子をコードする遺伝子の転写量を定量 PCR によって調べた。その結果ペプチダーゼ遺伝子は、窒素源を L- ロイシンに切り替えてから 3 及び 8 時間後に転写量が増加するものと、 3 時間後にのみ増加するものに分類することができた。また、転写因子の中では PrtR をコードする遺伝子の転写が 3 及び 8 時間後に強く誘導されていることや、その他の転写因子をコードする遺伝子が多様な経時的転写変動プロファイルを示していることなどが明らかとなった。このことから、L- ロイシンに切り替えてから 3 時間と 8 時間で転写誘導が見られたペプチダーゼは転写因子 PrtR によって強い制御を受けている可能性が示唆された。
本研究室田中が作製した PrtR 欠損株の試験の結果、無機窒素源や有機窒素源を用いた液体培地で 48 時間培養を行った際のペプチダーゼ遺伝子 *ocpA* の転写量が減少していたことから *ocpA* は PrtR によって強い制御を受けている可能性が示唆された。
これを受けて、PrtR 欠損株を 硝酸ナトリウムと L- ロイシンを窒素源とした培地に切り替えて *ocpA* の転写解析を行った結果野生株で見られていた 3 時間後と 8 時間後の転写上昇がどちらも消失していた。
このことから、 *ocpA* は PrtR によって直接の転写制御を受けている可能性が示唆された。窒素代謝に関わると考えられている他の転写因子を欠損した *A. oryzae* における、窒素源変化への転写応答についても報告する予定である。
本研究の一部は（公財）野田産研研究助成の支援によって実施したものである。
1）白石敦士ら 第 18 回糸状菌分子生物学コンファレンス要旨集 p.65 (2018)

Aspergillus oryzae, Peptidase, Nitrogen source

発表責任者：白石敦士（s188456s@st.go.tuat.ac.jp）

講演番号：3A09p11
講演日時：3 月 27 日 15:50～ センター2 号館 A09 会場

麹菌 *Aspergillus oryzae* における有性生殖関連遺伝子の高発現による有性生殖誘導の試み

Study on induction of sexual reproduction by overexpressing sexual reproduction-related genes in *Aspergillus oryzae*

○菅原 由香[1]、片山 琢也[1,2]、丸山 潤一[1,2] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]東大・微生物連携機構)
○Yuka SUGAWARA[1], Takuya KATAYAMA[1,2], Jun-ichi MARUYAMA[1,2] ([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

【目的】

麹菌 *Aspergillus oryzae* は古来より日本酒や味噌、醤油の醸造に用いられてきた糸状菌である。*A. oryzae* において有性世代は発見されていないが、株によって異なる接合型遺伝子 *MAT1-1* あるいは *MAT1-2* をもつことから、ヘテロタリックな有性生殖を行う可能性がある[1)]。*A. oryzae* で有性生殖が発見されれば、異なる株の優良な形質を併せもつ菌株の育種に役立つと期待される。菌核は気中菌糸が凝集して無性的に形成される耐久構造であり、*A. oryzae* と近縁な *Aspergillus flavus* では菌核内での有性生殖器官、有性胞子の形成が報告されている。我々は以前、栄養要求性マーカーを用いて染色体交換・組換えを検出できる系を構築し、MAT1-1 型株と MAT1-2 型株間で菌核を形成させ、その内部で染色体交換の起こった細胞の有無を検討したが、検出には至らなかった[2)]。この原因として、*A. oryzae* では有性生殖関連遺伝子の発現に異常があるのではないかと考え、本研究では有性生殖関連遺伝子の高発現による、有性生殖の誘導を目的をした。

【方法と結果】

構築した実験系では、MAT1-1 型のウリジン・ウラシルおよびリボフラビン二重栄養要求性（Δ*pyrG* Δ*riboB*）株と MAT1-2 型のウリジン・ウラシルおよびピリドキシン二重栄養要求性（Δ*pyrF* Δ*pyroA*）株を使用している。特定の培地では、染色体交換が起こった株は生育できるが、それぞれの親株とそれらが融合してできた異核共存体および 2 倍体は生育できないため、染色体交換を特異的に検出できる。

本研究では、有性生殖関連遺伝子として *Aspergillus nidulans* の有性生殖を促進する主要因子 LaeA、酵母における有性生殖の主要制御因子 Ime2 を選択した。そして、ゲノム編集技術を用いてこれらの遺伝子の高発現カセットをそれぞれの二重栄養要求性株の *wA* 遺伝子座に導入することで、有性生殖関連遺伝子の高発現株を作製した。今後は、作製した有性生殖関連遺伝子が高発現している二重栄養要求性株間で菌核を形成させ、染色体交換検出実験および菌核内構造の観察を行い、有性生殖関連遺伝子 *laeA* および *ime2* の *A. oryzae* における有性生殖誘導への効果を解析する予定である。これらの実験により、*A. oryzae* における有性生殖の誘導が期待される。

1) Wada *et al*. (2012) *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 2819-2829.
2) 菅原由香ら、2019 年日本農芸化学会大会講演要旨 3C5p02

Aspergillus oryzae, sexual reproduction

発表責任者：丸山　潤一（amarujun@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3A09p12
講演日時：3 月 27 日 16:01～ センター2 号館 A09 会場

糸状菌 *Aspergillus aculeatus* における *uge5* 破壊はカーボンカタボライト抑制を解除する
The expression of cellulase genes was relieved from carbon catabolite repression in the *Aspergillus aculeatus uge5* deletion mutant
○谷 修治、角谷 朝香、炭谷 順一、川口 剛司（阪府大院・生環科）
○Shuji TANI, Asaka KAKUTANI, Jun-ichi SUMITANI, Takashi KAWAGUCHI (Osaka Prefecture Univ.)

【目的】
糸状菌 *Aspergillus aculeatus* におけるセルラーゼおよびマンナン分解酵素遺伝子の発現は、セロビオースやマンノビオースなどの二糖により誘導され、その分解産物である単糖が蓄積すると抑制される。*A. aculeatus* における上述の二種の誘導物質に応答した遺伝子発現誘導は、$Zn_2(II)Cys_6$ タイプの転写因子 ManR により制御されている。最近我々は、*A. aculeatus* の UDP-glucose 4-epimerase 遺伝子(*uge5*)破壊株では、ManR 制御下の遺伝子の内、locust bean gum (LBG)に応答したセルラーゼ遺伝子の発現量が減少する一方で、LBG に応答したマンナン分解酵素遺伝子の発現は影響を受けないことを見出した。そこで本研究は、ManR および Uge5 が関与する誘導物質に応答した選択的遺伝子発現誘導機構を解明することを目的とした。
【方法および結果】
uge5 破壊により遺伝子発現が減少する要因として、誘導物質に応答したセルラーゼ遺伝子発現誘導能が低下する可能性、或いは抑制物質の単糖に対してより感受性になることで遺伝子発現量が減少する可能性を検証した。まず、マンノビオース誘導条件下における各種酵素遺伝子の発現に *uge5* 破壊は影響が無かった。次に、マンノビオース誘導条件に 0.1, 1.0, 10 mM のグルコース、ガラクトース、またはマンノースをそれぞれ添加した際の遺伝子発現への影響を定量した。興味深いことに、コントロール株では 10 mM の各糖を添加した場合にセルラーゼおよびマンナン分解酵素遺伝子の発現が有意に減少したのに対し、*uge5* 破壊株では各単糖添加により各酵素遺伝子の発現量が増大した。また、ガラクトース資化に関わる Uge5 が ManR を介した遺伝子発現制御に関与することから、ガラクトース代謝経路の酵素遺伝子の発現誘導に関わる $Zn_2(II)Cys_6$ 転写因子ホモログ (GalX) の機能を遺伝学的に解析した。*A. aculeatus galX* 破壊株では、セロビオースに応答したセルラーゼ遺伝子の発現誘導能が低下する一方で、マンノビオースに応答したセルラーゼおよびマンナン分解酵素遺伝子の発現量が増大したことから、GalX が ManR を介した選択的遺伝子発現制御に関与していることが遺伝学的に示された。
今後は、Uge5 破壊株で観察された単糖によるカタボライト抑制解除と GlaX と ManR を介した遺伝子発現制御機構を解析することで、転写因子間の協調と競合による複雑な遺伝子発現制御機構の一端が解明できるものと期待される。

Cellulase, Gene regulation, Induction mechanisms

発表責任者：谷　修治（shuji@biochem.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：3A09p13
講演日時：3 月 27 日 16:21～ センター2 号館 A09 会場

Kocuria rhizophila DC2201 の有機溶媒耐性メカニズムの解明

Organic solvent tolerant mechanism of *Kocuria rhizophila* DC2201

○戸田 弘、伊藤 伸哉（富山県大生医工研セ）
○Hiroshi TODA, Nobuya ITOH (Toyama Pref. Univ.)

【背景・目的】

Kocuria rhizophila DC2201 は放線菌属に属するグラム陽性細菌であり、高い有機溶媒耐性および塩濃度耐性を有する。また全ゲノム配列が明らかにされており、様々な有用物質生産宿主として有望な菌株である。我々はこれまでに、本菌株を宿主として用いた直鎖エポキシアルカン生産バイオプロセスを構築し、大腸菌と比較して有意に高い生産効率を達成している [1]。本菌株を用いたバイオプロセスの効率を向上させることを目的とし、その有機溶媒耐性メカニズムの解明と向上を目指した。

【実験方法】

次世代シーケンスによる全 RNA 解析を行い、有機溶媒曝露時における遺伝子発現量の変化を解析した。有機溶媒への曝露条件を決定するため、*K. rhizophila* DC2201 を様々な濃度の有機溶媒を含む SOB 培地で培養し、生育速度への影響を検討した。その結果、DMF10%添加培地において生育遅延が確認されたものの、最終的に非添加条件と同程度の生育を示したことから終濃度 10%の DMF への曝露をストレス条件とした。*K. rhizophila* DC2201 を SOB 培地で培養し、OD_{660} が 2.0 に到達した時点で終濃度 10%になるように DMF を添加した。DMF 添加後、30 分および 2 時間後に菌体を回収し、ISOGENE を用いて全 RNA を調製した。次世代シーケンスにより全 RNA の網羅的解析を行い、DMF 添加後に転写量が大きく上昇する遺伝子の探索を行った。

【結果】

K. rhizophila DC2201 を様々な有機溶媒存在下で培養した結果、溶媒の種類ごとにその生育度合いに変化が見られた。DMF および DMSO では 10%程度まで添加しても、最終的に非添加条件と遜色ない生育が見られた。一方、イソプロパノール、2-メチル THF などは 10%添加で著しい生育阻害が確認された。そこで終濃度 10%の DMF への曝露を、RNA 調製のためのストレス条件として決定した。*K. rhizophila* DC2201 を SOB で培養し、終濃度 10%の DMF に曝露後 30 分および 2 時間後に調製した RNA を解析した結果、いくつかの二成分制御系遺伝子、分子シャペロン、およびトランスポーターの転写量が 30 分後に大きく上昇していた。また興味深いことに、細胞壁合成関連酵素や糖転移酵素、マンノース代謝関連の遺伝子が正の制御を受けることが明らかとなった。一部の微生物では親水性の高い菌体外多糖類(EPS)を生産し、親水性のバリアを張ることで有機溶媒耐性を示すことが報告されている。このことから、*K. rhizophila* DC2201 においても同様のメカニズムにより有機溶媒耐性を獲得していることが推測された。現在これらの遺伝子と有機溶媒耐性の関連について、詳細を解析中である。

1) H. Toda, T. Ohuchi, R. Imae, N. Itoh, Appl. Environ. Microbiol., 81:1919-1925 (2015)

Kocuria rhizophila, organic solvent tolerant, extracellular polysaccharides

発表責任者：戸田　弘（htoda@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：3A09p14
講演日時：3 月 27 日 16:32～ センター2 号館 A09 会場

H-NS ファミリータンパク質のレギュロンはプラスミド保持に伴い劇的に変化する
H-NS family proteins drastically change their regulons in response to horizontal gene transfer of the catabolic plasmid pCAR1.

○中村 泰輔[1]、河野 響[1]、兼崎 友[2]、川崎 信治[3,4]、水口 千穂[1,5]、岡田 憲典[1]、野尻 秀昭[1,5]（[1]東大・生物工学セ、[2]東農大・ゲノム解析セ、[3]東農大・バイオ、[4]東農大・微生物、[5]東大・微生物連携機構）
○ Taisuke NAKAMURA[1], Hibiki KAWANO[1], Yu KANESAKI[2], Shinji KAWASAKI[3,4], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1,5], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1,5] ([1]BRC, UTokyo, [2]NODAI Genome Reseach Center, [3]TUA bio., [4]TUA microbiol., [5]CRIIM, UTokyo)

【背景】プラスミド保持に伴う宿主細胞内の環境の変化に関わる因子として核様体タンパク質 (NAPs) が存在する。その一種である H-NS 様タンパク質群は、低 GC 含量を特徴とする外来遺伝子領域に結合することで当該領域の転写を抑制し、さらにはハウスキーピング遺伝子の転写にも影響を及ぼすことが知られている。プラスミド獲得時を考えると、DNA 量の増加に伴い染色体由来の H-NS 様タンパク質は相対的に不足すると考えられる。その際、プラスミド上にコードされる同タンパク質がその不足を補うことで、プラスミドの保持に伴う宿主細胞内の状態変化を軽減する、いわば染色体由来の同タンパク質の「バックアップ」のような役割を果たすという説が提唱された。他方、プラスミド由来の H-NS 様タンパク質の機能は宿主由来の同タンパク質とは異なるという報告もされており、単にプラスミド保持による変化の軽減に留まらず、転写制御ネットワークの再構築も担うと考えられる。当グループでは、H-NS 様タンパク質である Pmr をコードするプラスミド pCAR1 が *Pseudomonas putida* KT2440 株に接合した場合、Pmr の参入が宿主染色体由来の同タンパク質群 (TurA, TurB) の転写制御ネットワークにどのような影響を与えるのかについて研究を行ってきた。本研究では特に、各 H-NS 様タンパク質の有無に伴って転写制御ネットワークがどのように変化するかに着目している。
【方法】pCAR1 非保持株 [KT2440 株、KT2440Δ*turA* 株、KT2440Δ*turB* 株] と pCAR1 保持株 [KT2440(pCAR1) 株、KT2440Δ*turA*(pCAR1) 株、KT2440Δ*turB*(pCAR1) 株、KT2440(pCARΔ*pmr*) 株] の計 7 株の対数期・定常期におけるサンプルをそれぞれ RNA-Seq 解析に供した。
【結果】*turA* 破壊により転写変動した染色体上遺伝子数を、pCAR1 保持時[KT2440(pCAR1) vs KT2440Δ*turA*(pCAR1)] と非保持時 [KT2440 vs KT2440Δ*turA*] とで比較すると、生育段階に関わらず pCAR1 保持時の方が多かった。同様の傾向は *turB* 破壊時にも確認された。この原因として、pCAR1 保持に伴う相対的な H-NS 様タンパク質の不足の影響は非常に大きく、各タンパク質の欠失の影響を Pmr のバックアップ機能だけでは十分に補えなかったと考えられる。興味深いことに、生育段階によらず TurA および TurB により転写制御される遺伝子群の種類も pCAR1 保持／非保持時で大きく異なっていた。H-NS 様タンパク質による核様体形成様式の変化から考察すると、非保持株に pCAR1 が参入することで、保持株では TurA と TurB に加え Pmr も多く発現し、本来 TurA と TurB が結合していた領域に Pmr がいわば割り込むような形で結合するために、非保持株と保持株における TurA と TurB の結合箇所に変化が生じ、TurA と TurB のレギュロンもまた大きく変化したと考えられる。

H-NS family proteins, Pseudomonas, plasmid

講演番号：3A09p15
講演日時：3 月 27 日 16:43～ センター2 号館 A09 会場

染色体由来の転写制御因子がプラスミド pCAR1 上の分解遺伝子群の発現を一細胞レベルで変化させる

A transcription factor encoded on the chromosome of *Pseudomonas resinovorans* CA10 caused the heterogeneity in expression of the carbazole-degradative genes on the plasmid pCAR1.

○武田 祐太郎[1]、山本 夏実[1]、高比良 早紀[1]、水口 千穂[1,2]、岡田 憲典[1]、野尻 秀昭[1,2] ([1]東大・生物工学セ、[2]東大・微生物連携機構)
○Yutaro TAKEDA[1], Natsumi YAMAMOTO[1], Saki TAKAHIRA[1], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1,2], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1,2] ([1]BRC, UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

【背景・目的】プラスミドは難分解性物質分解能等の新規形質を宿主に付与するが、最近の研究からは、新規に獲得した遺伝子の発現はクローン集団中であっても一細胞ごとに異なり、また細胞ごとの発現の揺らぎが集団としての分解力を決定付けている可能性が考えられる。我々は *Pseudomonas* 属細菌を宿主として、プラスミド pCAR1 上のカルバゾール分解遺伝子群の発現を一細胞レベルで解析している。pCAR1 上のカルバゾール分解遺伝子群は、同じく pCAR1 上にコードされる転写制御因子 AntR により P_{ant} プロモーターからの発現が誘導される。先行研究にて、pCAR1 本来の宿主である *Pseudomonas resinovorans* CA10 株では P_{ant} からの発現が細胞集団中で均一であるのに対し、*Pseudomonas putida* KT2440(pCAR1) 株においては集団中に一部 P_{ant} からの発現が弱い細胞が出現することが示された。CA10 株は AntR ホモログをコードする遺伝子 (PCA10_14990) を染色体上に有しているのに対し、KT2440 株は有していない。PCA10_14990 と AntR の相同性はアミノ酸レベルで 67.7%であり、また PCA10_14990 産物も P_{ant} からの転写を制御できることが過去の研究により示唆されていた [Urata et al., 2004, *J. Bacteriol.*, 186: 6815-23]。本研究では、PCA10_14990 が pCAR1 上のカルバゾール分解遺伝子群の発現のばらつきに及ぼす影響を評価することを目的とした。

【方法】染色体上の PCA10_14990 を相同組換えにより破壊し、P_{ant} プロモーター下流に *gfp* が結合した遺伝子カセットを mini-Tn*7*を用いて染色体上に挿入した株 (CA10Δ14990 株) を作製した。CA10Δ14990 株をコハク酸とアントラニル酸を含む培地で培養し、培養開始から 3 時間後の緑色蛍光強度をフローサイトメーターを用いて解析した。

【結果・考察】CA10Δ14990 株においては CA10 株と比べて P_{ant} からの発現のばらつきが大きくなり、P_{ant} からの発現の弱い細胞が集団中に出現した（図)。これは PCA10_14990 の破壊によって染色体上から AntR 様の因子が供給されなくなり、細胞内の転写制御因子量が足りない細胞が集団中に出現したためと考えられる。この結果より、染色体由来の転写制御因子が pCAR1 上の遺伝子発現の不均一性に直接的に関与していることが示された。

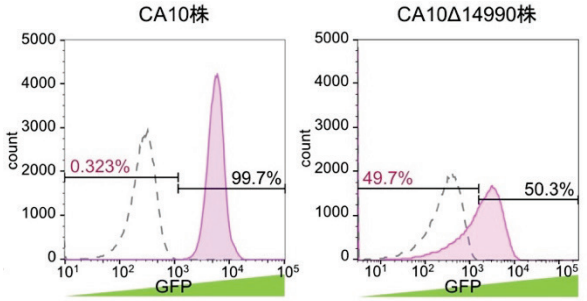


図. 各株の結果をピンク色のヒストグラムで表した。コントロール（灰色の点線）が示す緑色蛍光強度の最大値を基準に二分したゲートを黒色の線で、各ゲートに含まれるイベントの割合を数値で示した。

Pseudomonas, single-cell, plasmid

発表責任者：野尻秀昭（anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3A09p16
講演日時：3 月 27 日 16:54～ センター2 号館 A09 会場

放線菌 *Streptomyces avermitilis* のカルコフォア生産制御機構の解析
Analysis of regulatory mechanism of chalkophore production in *Streptomyces avermitilis*
○萩谷 祥[1]、Salvatore Cosentino[2]、按田 瑞恵[2]、後藤 恭宏[3]、中村 佳司[3]、林 哲也[3]、岩崎 渉[2]、上田 賢志[1]、髙野 英晃[1] ([1]日大・生資科・生命研、[2]東大・院理・生物科学、[3]九大院・医学研究院)
○Sho HAGIYA[1], Cosentino Salvatore[2], Mizue ANDA[2], Yasuhiro GOTOU[3], Keiji NAKAMURA[3], Tetsuya hayashi[3], Wataru IWASAKI[2], Kenji UEDA[1], Hideaki TAKANO[1] ([1]Nihon Univ., [2]The Univ. of Tokyo, [3]Kyushu Univ.)

［目的］*Streptomyces* 属細菌の形態分化や二次代謝産物生産は微量の銅イオンの存在によって促進されていることが知られている。カルコフォアは *Methylosinus trichosporium* OB30 において発見され、銅イオンを特異的にキレートする二次代謝産物として働くことが知られている。放線菌においてもカルコフォアとして *S. thioluteus* DSM40027 が生産する Diisonitrile 化合物 SF2768 が見出され[1]、その合成遺伝子は同定されたが、それの発現制御の詳しいメカニズムは解明されていない。本研究では SF2768 合成遺伝子をもつ *S. avermitilis* におけるカルコフォア合成遺伝子群の転写制御メカニズムの解明を目的とした。
［結果・考察］ 銅応答性遺伝子の同定を目的としたトランスクリプトーム解析を行った結果、100 μM 硫酸銅を含む培地において転写レベルが顕著に抑制される遺伝子を複数同定した。銅存在時に 1,000 倍に転写レベルが低下する遺伝子にカルコフォア合成遺伝子群（*SAV612*～*SAV600*）、シグマ因子をコードする *SAV614*、*SAV614* とオペロンを形成する *SAV615* が含まれていた。また、*SAV614* と *SAV615* のホモログとして考えられる *SAV898* と *SAV899* も含まれていた。このことから、細胞外に豊富な銅イオンが存在するとカルコフォア合成遺伝子はオフとなり、その生産が抑制されることが示唆された。

カルコフォア遺伝子の発現制御機構を明らかにすることを目的として、*SAV614* と *SAV615* 遺伝子の破壊株を作製した。相同組み替えを利用して標的遺伝子を薬剤耐性遺伝子と置換した後、Cre リコンビナーゼで薬剤マーカーを除去した。セミ定量 RT-PCR によりカルコフォア合成遺伝子群などの転写レベルを解析した。その結果、*SAV614* 破壊株と *SAV615* 破壊株のいずれにおいても、カルコフォア合成遺伝子の転写レベルが低下していた。この結果より、σ因子 *SAV614* がカルコフォア合成遺伝子のプロモーター認識に関わり、*SAV615* は *SAV614* の活性を正に制御している可能性が示唆された。

[文献]
1. *ACS Chem. Biol.* 2017, 12, 3067-3075.

Streptomyces, Chalkophore, Copper

発表責任者：高野英晃（takano.hideaki@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3A09p17
講演日時：3 月 27 日 17:05～ センター2 号館 A09 会場

Streptomyces griseus における GPCR 様制御系 Cvn1 と c-di-GMP シグナル伝達系の関係性
Correlation between G protein-coupled receptor-like regulatory system Cvn1 and c-di-GMP signal transduction system in *Streptomyces griseus*

○向山 絵理香、天野 泰介、上田 賢志、髙野 英晃（日大・生資科・生命研）
○Erika MUKOYAMA, Taisuke AMANO, Kenji UEDA, Hideaki TAKANO (College of Bioresource Sci., Nihon Univ.)

［目的］放線菌ゲノムに特異的に分布する conservon (*cvn*)は、真核生物に分布する G タンパク質共役型受容体に類似した蛋白質複合体をコードしている。これまでに我々は、*S. griseus* における *cvn1* の破壊が栄養菌糸に異常な分断を引き起こし、胞子様細胞を形成させることを明らかにした。この栄養菌糸の分断現象は、栄養増殖期における隔壁形成遺伝子群の早期発現が一因であることが明らかになっている。また、*S. griseus* において分化の中心的な転写抑制因子 *bldD* の破壊が *cvn1* 破壊と極めて似た表現型を付与することを確認している。BldD の活性はシグナル伝達物質 c-di-GMP によって調節されることが他の放線菌群において報告されていることから[1]、本研究では Cvn1 と c-di-GMP による BldD の制御的関係性を明らかにし、Cvn1 制御系を介した細胞分化メカニズムを解明することを目的とした。
［方法］*S. griseus* に存在する c-di-GMP の分解・合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子計 6 種類の破壊株を、標的遺伝子が薬剤耐性遺伝子に置換された改変コスミドを用いた相同組換えによって作製した。得られた破壊株を固体培地と液体培地において 3 日間培養し、*S. griseus* 野生株、*cvn1* 破壊株、*bldD* 破壊株と表現型を比較した。
［結果・考察］*SGR_4717*、*SGR_2020*、*SGR_2001*、*SGR_709* は、c-di-GMP 合成を担うジグアニルシクラーゼ (DGC)とその分解を担うホスホジエステラーゼ (PDE)の 2 ドメインを有する。一方、*SGR_2612* と *SGR_4052* は DGC ドメインのみを有する。これまでに全 6 種の c-di-GMP 関連遺伝子群のうち 5 種類の破壊株を取得した。*SGR_2612*、*SGR_709* 破壊株は固体・液体培地において野生株と類似した形態を示した。*SGR_4717* 破壊株は固体培地において *cvn1* 破壊株や *bldD* 破壊株と類似していないが気中菌糸形成能を部分的に欠損している形態を示した。*SGR_2001*、*SGR_4052* 破壊株は固体培地において気中菌糸形成能を欠損し、液体培地においては早期の隔壁形成が確認され、*cvn1* 破壊株と *bldD* 破壊株に極めて類似な表現型を示した。以上の遺伝子破壊株における表現型の高い類似性より、*SGR_2001*、*SGR_4052* と Cvn1 の高い関連性が考えられ、GPCR 様制御系 Cvn1 がシグナル伝達物質 c-di-GMP を介した細胞分化制御系に関与することが示唆された。

［文献］
[1] Tschowri N. *et al*. Cell 158:1136-1147 (2014)

Streptomyces, c-di-GMP, development

発表責任者：高野英晃（takano.hideaki@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3A09p18
講演日時：3 月 27 日 17:16～ センター2 号館 A09 会場

新生ポリペプチド鎖依存的な膜局在化による mRNA 分解促進

Promotion of mRNA degradation by the nascent polypeptide chain-dependent membrane localization in bacteria

○石井 英治[1,2]、秋山 芳展[1]、森 博幸[1]（[1]京大ウイ・再生研、[2]日本学術振興会特別研究員ＰＤ）
○Eiji ISHII[1,2], Yoshinori AKIYAMA[1], Hiroyuki MORI[1]（[1]Kyoto Univ., [2]JSPS Research Fellow）

VemP(**V**ibrio protein **e**xport **m**onitoring **p**olypeptide)は、*vemP-secDF2* オペロンにコードされる海洋性ビブリオ菌の分泌タンパク質である。VemP の分泌（膜透過）が損なわれた場合、VemP の翻訳途上鎖とリボソームトンネル内壁との特異的相互作用により、VemP の翻訳伸長は C 末端付近で安定に停止(翻訳アレスト)する。それにより *secD2* の SD 配列を含む領域に形成される mRNA のステム構造が不安定化されることで、膜透過促進因子である SecDF2 の翻訳が誘導される。一方、膜透過が正常な時には、翻訳アレスト状態にある VemP は SRP 経路に乗って膜透過装置まで運ばれ、膜透過に伴う引っ張り力によって翻訳アレストが解消される(Ishii *et al.*, 2015)。最近、我々は *vemP-secDF2* の mRNA 量が VemP の膜への標的化に応じて変動することを見出した。本研究では、*vemP-secDF2* mRNA の量的制御について着目し、その詳細な分子機構について明らかにすることを目的とした。

細胞のタンパク質膜透過能と *vemP-secDF2* mRNA の量との関係を調べるため、大腸菌中で *vemP-secDF2* を発現し、mRNA 量を RT-qPCR により解析した。まず、VemP の膜透過能と mRNA 量の関係を直接的に明らかにするため、膜透過装置への標的化に必要な VemP のシグナル配列の欠損体を作成し、その mRNA 量を野生型の VemP の mRNA と比較した。その結果、欠損体では野生型より mRNA 量が増大していた。また、タンパク質膜透過の阻害剤で菌を処理した時も mRNA 量の増大がみられた。このことから、*vemP-secDF2* mRNA は VemP の膜透過不全や標的化不全に伴って増大していることが明らかとなった。また、Rifampicin chase 実験により、膜透過不全による mRNA 量の増大は、mRNA の安定化により起きることが明らかとなった。これらの結果は、膜透過や標的化が正常な状態において、*vemP-secDF2* mRNA が積極的に分解されていることを示唆している。また、翻訳アレストが不全となる変異と組み合わせた場合では、膜透過阻害に伴った mRNA 量の増大はみられなかったが、標的化不全による mRNA 量の増大は観察された。これらのことから、*vemP-secDF2* mRNA の分解は、主に膜上で生じているものの、翻訳アレストしたリボソームが RNase による分解から保護し、mRNA の安定化に寄与していることが示唆された。

nascent-chainpoly peptide, RNA decay, translation arrest

発表責任者：石井英治（eishii@infront.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3A10a01
講演日時：3 月 27 日 09:30～ センター2 号館 A10 会場

pH に依存した *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J の捕食
pH-dependent Predation by *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J
○守屋 多恵[1]、吉村 純一[1]、星子 裕貴[1]、Garcia-Contreras Rodolfo[2]、前田 憲成[1] ([1]九工大院・生体工、[2]メキシコ国立自治大・医)
○Tae MORIYA[1], Jumichi YOSHIMURA[1], Yuki HOSHIKO[1], Rodolfo Garcia-Contreras[2], Toshinari MAEDA[1] ([1]Kyutech., [2]UNAM.)

【目的】近年、薬剤耐性(anti-microbial resistance, AMR)が世界中で大きな問題となっており、このまま対策をしなければ 2050 年には人類の死因第 1 位になることが予想されている。しかし、近年認可される新たな抗生物質は年々減少傾向にある一方で、新たな薬剤耐性菌は続々と登場しており、早急な対策が求められている。このような状況の中で、細菌を捕食することで増殖する性質を持つグラム陰性菌の *Bdellovibrio bacteriovorus* (以下、*B. bacteriovorus* と表記)は、ESKAPE に代表される薬剤耐性菌及び臨床病原菌株など様々な種類の細菌を捕食できることから、今までの抗菌薬に代わる新しい「生きた抗菌薬」として注目を浴びている。*B. bacteriovorus* のライフサイクルはこれまでの研究から広く知られているが、捕食メカニズムについては未だ不明な点が多く、特に pH が *B. bacteriovorus* の捕食活動にどのような影響を及ぼすかについての詳しい研究はほとんど行われていない。*B. bacteriovorus* 109J 株を用いて本研究室の先行研究から弱酸性条件下で捕食阻害が起こることが分かった。そこで本研究では、*B. bacteriovorus* 109J の弱酸性条件下での捕食阻害が、*B. bacteriovorus* 109J 自身の活性低下によるものではないかと仮定し、弱酸性条件での生菌数測定などの実験を行った。

【方法及び結果】最初に、*B. bacteriovorus* 109J が捕食活性を示す pH の閾値を知るために、pH を 0.1 刻みで pH 6.6 から pH 7.6 に調整した HEPES 緩衝液に懸濁させた大腸菌（初期濁度を OD_{600}=2 に設定）を用いて、*B. bacteriovorus* 109J の菌液を 166 µl を加え、37℃, 120 rpm の条件で 10 日間培養し、分光光度計を用いて濁度を計測し、捕食の有無を調べた。次の実験として、HEPES 緩衝液を pH 7.6, 7.3, 7.0, 6.8, 6.6 に調整し、pH 7.6 の条件下で前培養を行った *B. bacteriovorus* 109J を各条件の HEPES 緩衝液で 100 倍希釈を行って、元の条件の pH の影響を減らした上で、37℃, 120 rpm の非栄養条件下で、5 日間の単独培養を行った。0, 2, 5 日目にサンプリングを行い、二層平板法を用いて生菌数の変化を調査した。もう一つの実験として、WST-8 キットを用いて、各 pH 条件下における *B. bacteriovorus* 109J と *E. coli* BW25113 の代謝活性を測定した。以上の実験から、結果として *B. bacteriovorus* 109J は pH 6.7 までにおいて濁度の低下が観察されるが、pH 6.6 では濁度の低下が見られなかった。生菌数は、pH が低くなる程、減少が急激になる、かつ少なくなることが分かった。代謝活性に関しても低 pH では中性から塩基性付近の pH と比較すると活性が低くほとんど変化がないことが分かり、弱酸性条件が *B. bacteriovorus* 109J にとって生存に不利な環境である可能性が示唆された。

Bdellovibrio bacteriovorus, Predatory bacteria, anti-microbial resistance

発表責任者：前田憲成（toshi.maeda@life.kyutech.ac.jp）

講演番号：3A10a02
講演日時：3 月 27 日 09:41～ センター2 号館 A10 会場

好塩性古細菌 *Halorubrum* 属 sp. 176-9 株，590-2 株と既知株との紫外線曝露比較による抵抗性解析
Comparative analysis of UV resistance halophilic archaea *Halorubrum* sp. 176-9, sp. 590-2 and other strains.

○小宮山 寿紗[1]、嶋根 康弘[2]、峯岸 宏明[1,2] ([1]東洋大学、[2]海洋研究開発機構)
○Kazusa KOMIYAMA[1], Yasuhiro SHIMANE[2], Hiroaki MINEGISHI[1,2] ([1]Toyo Univ., [2]JAMSTEC)

＜背景・目的＞

Archaea/Euryarchaeota/Halobacteria に属する高度好塩菌は，そのほとんどが古細菌で占められることから好塩性古細菌とも呼ばれており，至適増殖 NaCl 濃度 15%以上で塩湖や塩田などの高塩濃度環境を好んで生育する古細菌の主要グループの一つである．これらの分離源は，淡水環境よりも乾燥や紫外線曝露量が多く，好塩性古細菌にはそれらに抵抗するメカニズムが備わっているのではと考えられている．そこで本研究では，国内外の市販塩サンプルから紫外線抵抗性を有する好塩性古細菌の分離を目指した．分離された *Halorubrum* 属 sp. 176-9 株，590-2 株は他候補株よりも紫外線曝露後生存率が高く，現在報告されている放射線・紫外線抵抗性を有する *Halobacterium* sp. NRC-1 に匹敵する紫外線抵抗性を有することが示唆された．そこで，これら 2 株と既知の *Halorubrum* 属株，NRC-1 株，感受性株として *E. coli* の紫外線抵抗性比較試験を実施し，当該株が抵抗性を獲得する要因を解析することを本研究の目的とした．

＜方法＞

市販塩サンプル 810 種類から NaCl 濃度 20%の培地でスクリーニングを行った．スクリーニングによる紫外線曝露は 2 回行い，どちらも UV-C を 1 分間照射するものとした．2 回のスクリーニングにより紫外線抵抗性を示す菌株を選定した．さらに相互に紫外線抵抗性比較試験を行い，CFU による生存率，コロニー発現までの時間等の要因から強い抵抗性を示す菌株 6 株に絞った．この 6 株と NRC-1 株を Log phase で紫外線曝露させ，また UV-C，B の波長のパターン，明暗培養の培養パターンで NRC-1 株に匹敵する菌株として 2 株に厳選した．この 2 株に対して 16S rRNA 遺伝子，*rpoB'* 遺伝子解析を行い近縁種の推定を行った．また増殖至適条件（NaCl，pH，温度），要求 Mg 濃度，抗生物質試験，嫌気培養他菌体の諸性質を解析した．

＜結果＞

強抵抗性を示した 2 株のうちの 176-9 株は，UV-C，B ともに NRC-1 株に並ぶかそれ以上の生存率を示した．また 590-2 株は他試験株が培養 10 日目でコロニー発現していた中唯一 7 日目でコロニー発現を見せ早い曝露後回復を示した．そのうえ UV-B において NRC-1 株と同等の生存率を示した．この 2 株の菌株はどちらも *Halorubrum* 属に属する菌株と分かり，内 590-2 株は遺伝子塩基配列解析の結果 *Halorubrum* 属の新種であることが分かった．

Halophilic archaea, UV resistance, Archaea

発表責任者：小宮山寿紗（kzs.kk1@gmail.com）

講演番号：3A10a03
講演日時：3 月 27 日 09:52～ センター2 号館 A10 会場

Lactobacillus fructivorans および近縁菌種由来グリセロ糖脂質の化学的性状
Chemical characterization of glyceroglycolipids from *Lactobacillus fructivorans* and related species
○川原 一芳、駒井 美紗、飯田 博一（関東学院大）
○Kazuyoshi KAWAHARA, Misa KOMAI, Hirokazu IIDA (Kanto Gakuin Univ.)

【目的】*Lactobacillus fructivorans* はヘテロ火落ち菌として知られていた乳酸菌の菌種であるが、これまでホモ火落ち菌（*L. homohiochii*）の基準株とされていた NBRC 15887 株についても、近年の遺伝子レベルの研究により *L. fructivorans* に再分類されるべきであることが報告された [1)]。*Lactobacillus* 属菌種を含む乳酸菌は二糖型のグリセロ糖脂質（GGL）を細胞膜の主要な脂質成分として含むことが知られているので、上記菌種、および近縁菌種である *L. acetotolerans* の菌株について、GGL の化学的性状を比較し、菌株ごとの違いの有無を検討した。
【実験方法】*L. homohiochii*（*L. fructivorans*）NBRC 15887 および *L. fructivorans* と *L. acetotolerans* の複数の菌株を、MRS 培地を用いて、30°C で静置培養し、凍結乾燥菌体を調製した後、クロロホルム/メタノール（2:1, v/v）で菌体脂質を抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、あるいは薄層クロマトグラフィー（TLC）により精製した。TLC の展開溶媒にはクロロホルム/メタノール/水（20:9:1, v/v/v）を使用した。脂質の質量分析は MALDI-TOF マススペクトロメトリー（MS）により行った（ポジティブモードで使用）。脂肪酸のメチルエステル化は MIDI 法で行い、GC および GC-MS で分析した。GGL を加水分解した後、糖成分をアセチルアルジトール誘導体として GC および GC-MS で分析した。糖鎖構造の分析には ^{1}H-NMR を使用した。
【結果および考察】調べた全ての菌株に共通して、TLC で約 5.5 の Rf 値を示す中性の GGL を有していることが確認できた。これらの GGL は糖成分としてガラクトースとグルコースを 1 分子ずつ含んでいたため、*Lactobacillus* 属菌種に共通の糖鎖構造とジアシルグリセロール部分を有する脂質であると推定された。しかしその分子量には菌株ごとの違いが見られた。NBRC 15887 株の GGL は *L. fructivorans* の基準株である NBRC 13954 株と同一の分子量分布を示し、このうち高分子量の GGL は C_{19} シクロプロパン酸（ラクトバシル酸）とアラキジン酸（$C_{20:0}$）を含むことがわかった。しかし、*L. acetotolerans* の 2 株と *L. fructivorans* の 1 株は主要な GGL が比較的低分子で、ジアシルグリセロール部分には $C_{16:0}$ と $C_{18:1}$、あるいはラクトバシル酸を含んでいるが、$C_{20:0}$ は含まなかった。NBRC 15887 株については菌体脂肪酸の分析を行った。その結果、*Lactobacillus* 属菌種が持つ通常の脂肪酸に加えて、$C_{20:0}$ と $C_{20:1}$ を検出することができた。これらの脂肪酸も GGL の構成脂肪酸となるため、GGL がより複雑な分子量分布パターンを示すものと推定された。
1) Zhao W. and Gu C. T., Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 69, 1720-1723 (2019)

glyceroglycolipid, lactic acid bacteria, *Lactobacillus fructivorans*

発表責任者：川原一芳（kawahara@kanto-gakuin.ac.jp）

講演番号：3A10a04
講演日時：3 月 27 日 10:03～ センター2 号館 A10 会場

Lipomycetaceae 科酵母の国内種分布及び新種並びに *Babjevia* 属の再分類・修正（emendation）について

Species distribution and novel species of Lipomycetaceous yeasts in Japan, and reclassification and emendation of the genus *Babjevia*.

○山崎 敦史 (製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター)
○Atsushi YAMAZAKI (NBRC, NITE)

Lipomycetaceae 科酵母は、Saccharomycetales 目に属する子嚢菌酵母であり、油脂酵母 *Lipomyces* 属、*Myxozyma* 属及び *Dipodascopsis* 属の 3 属を含む。*Lipomyces* 属が大量に生産する油脂は、パーム油等の植物性油脂に類似しておりバイオ燃料や食用油脂等の原料に利用できるとして期待されている。主な生息域は土壌であるが、生態や種分布について不明な点が多い。
本研究では、国内各地の土壌から Lipomycetaceae 科酵母の分離を行い、得られた各酵母種の種分布について考察した。また、この取り組みにより本科に属する新種が合計 14 種得られたため報告する。得られた新種のうち、東京大学北海道演習林（北海道富良野市）の土壌由来の *Dipodascopsis anomala*（旧：*Babjevia anomala*）に近縁な *Dipodascopsis* 属の 2 種については、偽菌糸体内に子嚢胞子を形成するというユニークな特徴が認められたが、これと同様の記載が *D. anomala*（当時 *Lipomyces anomalus*）の原著論文中にも存在していた。そのため、本研究で得られた 2 新種と *D. anomala* を属レベルでまとめる分類群として *Babjevia* 属への再分類と、本属記載文の修正（emendation）を合わせて提唱した（2019 年 11 月受理「International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, IJSEM」）。

Lipomycetaceae, Species distribution, *Babjevia*

発表責任者：山崎敦史（yamazaki-atsushi@nite.go.jp）

講演番号：3A10a05
講演日時：3 月 27 日 10:14～ センター2 号館 A10 会場

Characterization of Anaerobic Thermophilic Chitin-Degrading Bacterium UU3 Isolated from Compost

Umbhorn Ungkulpasvich[1], ○Akihiko Kosugi[1,2] ([1]Tsukuba Univ., [2]JIRCAS)

An anaerobic, chitinolytic bacterium, designated strain UU3, was isolated from a chitin-degrading bacterial community inhabiting biocompost on Ishigaki Island, Japan by enrichment culture using chitin powder as sole carbon source. The isolated strain UU3 was a gram-positive bacterium with rod shape and non-endospore forming. Based on 16s rRNA gene sequences, Strain UU3 was showed 90.4% and 87.8% homology with that of mesophilic bacterium *Hydrogenispora ethanolica* strain LX-B (=DSM25471^T) and *Desulfotomaculum thermobenzoicum* strain TSB (=DSM6193), respectively. The optimum growth temperature and pH were observed at 60 °C and pH 7.0, which indicated distinct phenotypic properties from that of *H. ethanolica* and *D. thermobenzoicum*. Strain UU3 can utilize not only chitin and colloidal chitin as carbon source but also widely carbon sources including D-arabinose, arabinan, arabinogalactan, cellobiose, D-galactose, galactan, D-fructose, D-sucrose, N-acetyl-D-glucosamine, D-glucose, D-xylose, β-glucan and maltose, and is mainly produced acetate as end-products. Strain UU3 will be as a novel thermophilic-anaerobic chitinolytic bacterium.

Chitin degradation, Thermophilic, Anaerobe

講演番号：3A10a06
講演日時：3 月 27 日 10:35～ センター2 号館 A10 会場

チアミンを代謝する土壌微生物の単離
Screening of thiamin-metabolizing microorganism
○熊野 匠人[1,2]、室本 亮介[1]、橋本 義輝[1,2]、小林 達彦[1,2] ([1]筑波大院・生命環境、[2]筑波大・MiCS)
○ Takuto Kumano[1,2], Ryosuke Muromoto[1], Yoshiteru Hashimoto[1,2], Michihiko Kobayashi[1,2] ([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]MiCS, Univ. Tsukuba)

【目的】
チアミンは鈴木梅太郎博士によって糠からオリザニンとして発見された生理活性物質で、生体内ではチアミン 2 リン酸として解糖系酵素の補酵素として働く。不足すると脚気になることが知られており、ヒトにとって必須の栄養素であるビタミンの一つである。チアミンはチアミナーゼ（チアミナーゼ II）によって 4-メチル-5-β-ヒドロキシエチルチアゾール (HET)と 4-アミノ-5-ヒドロキシメチル-2-メチルピリミジン (HMP)に分解されることが知られている。しかし、HET や HMP がどのように分解されるかについて、1968 年に土壌微生物による推定代謝経路の報告があるものの、未だ酵素・遺伝子レベルでは不明である。一方、2007 年には土とチアミンを混ぜるとチアミンが分解され、ホルミルアミノピリミジンが生成すること、それが枯草菌の一種によって HMP に変換され、チアミンへ再合成されることが報告された。また、チアミナーゼ II はチアミン欠乏時に誘導されることなどから生理的役割は HMP 前駆体から HMP を供給することにあるという考え方もあり、1968 年の報告以来、純粋にチアミンを分解するような代謝経路はこれまで報告されておらず、代謝酵素・遺伝子の報告もない。そこで我々は、チアミンを資化する微生物を土壌からスクリーニングし、その経路を明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】
本研究ではまず、チアミンを単一炭素源とする液体培地を用い、各地から採取した土壌を加えて２８℃で１週間程度培養した。微生物の生育が見られたものについて、新しい培地に植継ぐことを数回繰り返し、最終的に１０^{4}倍程度に希釈して同組成の寒天培地上にまいた。培地上で生育が見られたコロニーを単離し、チアミン資化能をもつ複数の菌の単離に成功した。それらをチアミン単一炭素源液体培地で培養後、代謝産物を LC/MS で分析し、分子量を同定することができた。初期反応はチアミナーゼ II と同様の加水分解反応であり、生じた HMP がさらに代謝されたと考えられる代謝産物も検出された。本研究によりブラックボックスであった土壌中でのチアミン分解経路について初期反応を明らかにすることができた。

Vitamin, Screening, Microorganism

講演番号：3A10a07
講演日時：3 月 27 日 10:46～ センター2 号館 A10 会場

エマルション培養法を用いたペプチダーゼ生産微生物のスクリーニング
Screening of peptidase-producing microorganisms using emulsion culture
○橋口 太一[1]、本間 宣行[1]、鈴木 義之[3]、志田 洋介[1]、小笠原 渉[2] ([1]長岡技科大院・生物、[2]長岡技科大院・技学イノベーション、[3]長岡高専・専攻科)
○Taichi HASHIGUCHI[1], Nobuyuki HONMA[1], Yoshiyuki SUZUKI[3], Yosuke SHIDA[1], Wataru OGASAWARA[2] ([1]Dept. Bioengir. Nagaoka univ. of tech., [2]Dept. of Science of tech. Nagaoka univ. of tech., [3]NITNC)

微生物が生産する酵素は食品、工業、医薬品製造等の様々な分野に応用されている。中でもペプチダーゼはその性質によって産業価値が高いため、ペプチダーゼ活性の高い微生物がスクリーニングにより獲得されている。近年、寒天平板培地などを用いた古典的スクリーニング法とは異なるスクリーニング法としてエマルション培養法が注目されている。エマルションとは油中に微小水滴(ドロップレット)が分散した系であり、ピコリットルスケールの水滴で培養が可能である。さらに蛍光基質を用いた酵素活性に基づくハイスループットなスクリーニングが可能である。

また本研究室では、環境中からの有用微生物の単離を目的に研究を行っている。これまでに高ペプチド分解菌である *Pseudoxanthomonas mexicana* WO24 株と *Escherichia coli* のエマルション培養とペプチダーゼ活性の強弱に基づくスクリーニングに成功した。そこで、構築したスクリーニング系を用いて、本研究では環境中からの高ペプチダーゼ生産微生物の単離を目指した。

最初に土壌サンプル中の微生物を 30 ℃で 3 日間、1 ドロップレットに 1 細胞以下となるようエマルション培養した。エンドペプチダーゼに対する蛍光基質とセルソーターを組み合わせた検出系により、6 時間で 100 万ドロップレットの分泌ペプチダーゼ活性を解析した。同時に、ペプチダーゼ活性が高い上位 1 %の約 1 万ドロップレットをセルソーターで回収し、寒天平板培地に単離した。さらなるペプチダーゼ活性に基づく選抜のために、形態と生育に基づいて選出したコロニーを 96 ウェルプレートで培養し、分泌ペプチダーゼ活性を解析した。その時、*P. mexicana* WO24 株と比較して高活性だった 8 つの候補株を 16S rRNA シーケンス解析により同定した。その結果、既知のペプチダーゼ生産菌である *Stenotrophomonas maltophilia*、*Lysobacter enzymogenes*、ペプチダーゼに関する報告が少ない *Dyella koreensis* 、*Lysobacter soli* の全 4 種の微生物種の同定に成功した。

得られた微生物種が分泌するペプチダーゼの基質特異性解析を行うため、P1 位におけるアミノ酸が異なるペプチドベースの蛍光基質を用いて、各アミノ酸に対する特異性を調査した。単離された 4 種のうち、*L. enzymogenes* は基質特異性がほぼ全アミノ酸に渡って広く、*S. maltophilia* 、*D. koreensis* は疎水性アミノ酸に対して高い相対活性を有した。一方、*L. soli* はアスパラギン酸に対してのみ高い活性を持ったため、基質特異性の高い単一のペプチダーゼを分泌している可能性が考えられる。このペプチダーゼは研究価値が高い可能性があるため、今後 *L. soli* 由来アスパラギン酸特異的ペプチダーゼの精製および解析を行い、*L. soli* の分泌ペプチダーゼに関する知見を獲得していく。

peptidase, emulsion, screening

発表責任者：橋口 太一（s173316@stn.nagaokaut.ac.jp）

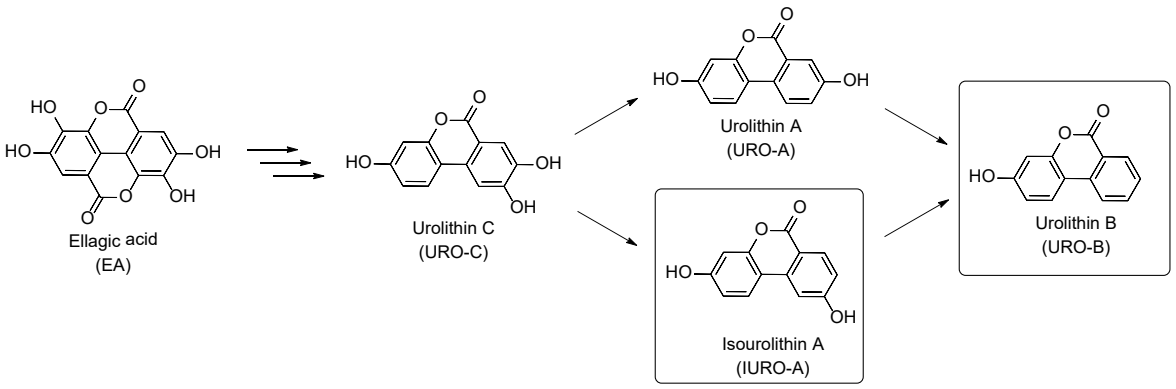
講演番号：3A10a08
講演日時：3 月 27 日 10:57～ センター2 号館 A10 会場

複合微生物系によるウロリチンの生産に関する研究(5) ～新規ヒト腸内由来ウロリチン B 生産菌の発見と利用～

A study for metabolic pathway of urolithins in gut microbiota (5) -Discovery and application of novel urolithin B-producing bacterium from human feces-

○沢田 翔一、中島 賢則、山本 浩明（ダイセル・コーポレート研）
○Shoichi SAWADA, Takanori NAKAJIMA, Hiroaki YAMAMOTO (Daicel Corp., Corporate Research Center)

【目的】ウロリチンは、スーパーフルーツと言われるザクロやベリー類に含まれるエラジタンニンやその加水分解物であるエラグ酸が、生体内、特に腸内細菌によって代謝され生成する物質であり、様々なヒト健康効果を示すことが報告されているポリフェノールの一種である。我々は先に、前述のエラグ酸を原料として、マイトファジー促進効果などを有するウロリチン A を生産する腸内細菌の分離およびその利用について報告した。ウロリチンは水酸基の数および位置の違いによる類縁体が存在し、その一つであるウロリチン B もまた、抗炎症作用、動脈硬化の予防効果などが報告されている。今回、エラグ酸からウロリチン B を生産しうる腸内細菌の探索を試みた。
【方法】ザクロ抽出物を含むサプリメントを摂取後の尿中からウロリチンが検出されたヒト（ウロリチン生産者）の糞便を採取した。この糞便サンプルをもとに、集積培養、単菌分離を行った。得られたコロニーをウロリチン C 含有培地に接種し、培養後にウロリチン誘導体を分析することにより、生産菌の分離を試みた。培養実験は ABB 培地 (oxoid) を用いて、気相を $N_2/H_2/CO_2$ (80/10/10) で置換した嫌気条件下、37℃の培養を実施し、培養液中に生成したウロリチン類を HPLC により定量分析した。
【結果】ウロリチン生産者の糞便をもとに分離したコロニーを評価した結果、ウロリチン C をイソウロリチン A に変換する新規微生物を見出すことができた。16S rRNA 遺伝子を用いた同定の結果、本生産菌は *Slackia* 属に属する微生物であった。本生産菌はウロリチン骨格の 8 位水酸基を特異的に脱離する活性を有することがわかった。我々が先に報告したウロリチン C 生産菌、ウロリチン A 生産菌と本発表の微生物を共培養することによって、エラグ酸を出発物質としてウロリチン B を生産することができた。
また、菌の組み合わせによってイソウロリチン A を生産することができたため、併せて報告する。



urolithin B, dehydroxylation, Slackia

講演番号：3A10a09
講演日時：3 月 27 日 11:08～ センター2 号館 A10 会場

Evidence for the correlation between heterokaryon incompatibility and strain phylogeny in the industrial filamentous fungus *Aspergillus oryzae*

○Chan LU[1], Noriko MORI[1], Takuya KATAYAMA[1,2], Ryota SAITO[3], Kazuhiro IWASHITA[3], Jun-ichi MARUYAMA[1,2] ([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]NRIB)

[Background] In filamentous fungi, cell fusion occurs between genetically different strains, and then heterokaryon can be formed, in which genetically different nuclei co-exist in the common cytoplasm. However, a phenomenon termed heterokaryon incompatibility (HI) occurs between genetically incompatible strains, in which growth inhibition or cell death are generally induced. Previously, we established BiFC (bi-molecular fluorescence complementation) technology to visualize the fused cell in *Aspergillus oryzae*, the filamentous fungus used in Japanese food fermentation (*e.g.* sake, soy sauce and *miso*)[1)]. Moreover, using this method, we showed for the first time HI and the presence of compatible groups (CGs) in *A. oryzae*[1)], indicating that eliminating HI is important for genetic crossing of *A. oryzae* strains belonging to different CGs. Although numerous *A. oryzae* strains are industrially used, there is still poor knowledge about HI mechanism. In this study, we aim to provide a more comprehensive evidence for CGs and to give insight into HI mechanism in *A. oryzae*.

[Result] To classify *A. oryzae* strains into CGs, we selected 34 strains that comprehensively belong to the phylogenetic clades, and successfully constructed two kinds of auxotrophic mutants (*pyrF* for orotate phosphoribosyltransferase and *pyrG*: for orotidine-5'-phosphate decarboxylase) by CRISPR/Cas9 system[2)]. Strains lacking *pyrF/pyrG* genes grew only on minimal media supplemented with uridine/uracil. We performed the protoplast fusion with Δ*pyrF* and Δ*pyrG* pairing, and then tested via the formation of auxotrophically complemented heterokaryon. If heterokaryon formation is observed, the strains are considered to belong to the same CG, otherwise classified into different CGs. As compared with phylogenetic tree, strains with close phylogenetic relationship were classified into the same CG, while strains with distinct phylogenetic clades were mutually incompatible. Therefore, the phylogenetic distance between the strains would be an important aspect to determine HI, which would guide us to identify HI-related genes based on comparative genomics.

1) Okabe *et al.*, *Sci Rep.* (2018) 8, 2922
2) Katayama *et al.*, *Appl Environ Microbiol.* (2019) 85, e01896-18
3) Tsukasaki *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (2014) 78, 1254-1262

Aspergillus oryzae, incompatibility, heterokaryon

発表責任者：丸山潤一（amarujun@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3A10a10
講演日時：3 月 27 日 11:19～ センター2 号館 A10 会場

プラスミドの受容菌認識における外膜タンパク質 OprH の機能解析
Outer membrane protein H1 (OprH) affects the conjugative host range of plasmid
○作田 郁子[1]、水口 千穂[1,2]、岡田 憲典[1]、野尻 秀昭[1,2] ([1]東大・生物工学セ、[2]東大・微生物連携機構)
○Ayako SAKUDA[1], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1,2], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1,2] ([1]BRC, UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

【背景・目的】プラスミドの接合伝達は、受容菌に新規形質を付与するという意義を持ち、その利用や制御の場としての実環境中のプラスミドの接合伝達様式を知ることは重要である。我々はこれまでに種々の細菌が混在する実環境中での接合伝達を想定し、供与菌 1 種に対し受容菌が 2 種同時に存在する接合 (1:2 接合) を行い、プラスミド NAH7 について *Pseudomonas putida* および *Pseudomonas resinovorans* を宿主とした 1:2 接合時に、同種への接合伝達が優先される現象を明らかにした [Sakuda *et al*., mSphere, 2018]。本現象に関与する受容菌由来の因子探索の結果、プラスミドの接合伝達時のカチオン要求性への関与が明らかになっている外膜タンパク質 outer membrane protein H1 (OprH) が候補作用領域上に見出された [作田ら、2018 年度本大会]。本研究では、プラスミドの接合伝達における受容菌選択の原理理解を目指し、外膜タンパク質 OprH の受容菌認識への寄与を検証した。
【方法・結果】本研究で使用した *P. putida* および *P. resinvorans* の OprH はアミノ酸レベルで 58.2%の相同性を有している。それぞれの *oprH* 破壊株を受容菌として用い、供与菌として *P. putida* の NAH7 保持株を用いた 1:1 接合および 1:2 接合条件下における NAH7 の挙動を比較した。30°C で 3 時間の液体中での接合実験を行い、接合伝達頻度 (Transfer frequency: TF) は接合伝達体数を供与菌数で割ることで算出した。異種受容菌への伝達頻度について、1:1 接合時の割合で 1:2 接合時の割合を割った値を kin index (KI) として算出し、受容菌選択性の指標とした。すなわち、KI が小さいと同種への伝達頻度が高いことになる。結果を図に示す。*P. putida* の *oprH* を破壊した場合には、1:1 接合時の *P. putida* への TF が減少し、また 1:2 接合条件下で *P. resinovorans* へ伝達する割合が増加することで KI の上昇が見られた。また、*P. resinovorans* の *oprH* を破壊した場合には、1:1 接合時の *P. resinovorans* への TF が減少し、KI が大きくなった。さらに、2 種の受容菌の *oprH* を破壊すると KI はさらに大きくなる傾向が見られた。以上の結果から、受容菌外膜上の OprH はプラスミドの接合伝達 (あるいは受容菌のプラスミド受容能) に正に寄与し、さらにプラスミドによる受容菌選択に関与していることが示唆された。本報告により、従来のプラスミドの接合伝達観において見落とされてきた、受容菌認識に寄与する新規因子の存在が明らかになった。

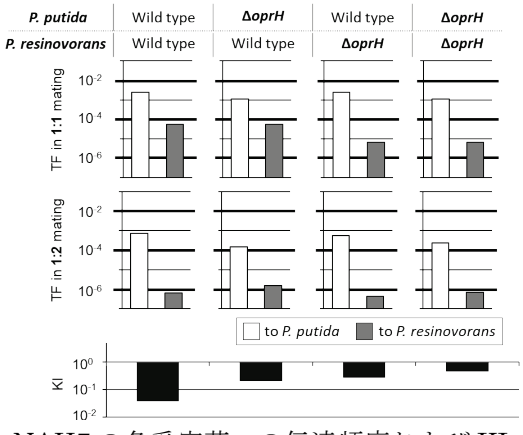


図. NAH7 の各受容菌への伝達頻度および KI

horizontal gene transfer, plasmid, outer membrane protein

発表責任者：野尻秀昭（anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3A10a11
講演日時：3 月 27 日 11:40～ センター2 号館 A10 会場

ATAD プロセスにおける難培養主要好熱細菌の直接 FISH 観察と分離

Direct observation by FISH method and isolation of uncultured predominant thermophilic bacteria in ATAD process

○恒吉 研志、新井 智博、田代 幸寛、酒井 謙二（九大院・生資環）
○ Kenshi TSUNEYOSHI, Tomohiro ARAI, Yukihiro TASHIRO, Kenzi SAKAI (Grad. Sch. Bioresour. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ)

【背景・目的】

福岡県築上町では、自家熱型高温好気消化（Autothermal Thermophilic Aerobic Digestion、ATAD）により、し尿を液体肥料へ変換している。先行研究では、実機における ATAD の理化学特性・細菌群集構造解析より、本プロセスはユニークな 3 段階で進行することを初めて報告した（Tashiro et al., AEM, 2018）。本プロセスの更なる効率化を目指すには、微生物の機能解明が必要である。特に、第 3 段階の主要細菌は、既知の分離細菌との相同性が約 85%と低く、難培養の未知の細菌であると考えられている。そこで本研究では、第 3 段階に存在する主要細菌の分離を行うため、その形態を FISH(Fluorescent In Situ Hybridization)法により明らかにするとともに、顕微蛍光マニピュレータによる液体試料からの直接分離を目的とした。

【実験方法】

本研究では、Gemmatimonadetes 門 *Longimicrobium terrae* と 85%の相同性を示す OTU9470 を標的細菌とした。FISH 法に使用するプローブは OTU9470 の 16S rRNA に特異的にハイブリダイズするように二種類設計し、FITC 化により蛍光標識した。二種類のプローブで共通に蛍光が観察された菌を標的細菌と判断した。さらに、ATAD 試料から顕微蛍光を用いて細菌を直接採取し、チャンバー内の ATAD 培地（ドロップレット）に分離し、50ºC で 2 日間インキュベートを行った。その後、試験管でスケールアップして、50ºC で 3 日間振とう培養を行った。

【結果・考察】

FISH 法による蛍光顕微鏡観察により、ATAD 試料中のフロックと一部の細菌から強い蛍光が観察された。第 3 段階の別の主要細菌（Firmicutes 門 *Heliorestis baculata* と 85%の相同性）を FISH 法で観察した先行研究でもフロックを形成していることが報告されていることから、第 3 段階の主要細菌群はフロックを形成していることが示唆された。

FISH 観察で予測された形態のフロックをターゲットとして顕微蛍光マニュピュレーターで、分離・培養したところ、複数の単離菌は、ドロプレット中での増殖を確認でき、スケールアップ後の培養後、フロックの形成を一部確認した。今後、単離菌の 16S rRNA 遺伝子シーケンス解析による同定を行い、実際に標的細菌であるか確認する予定である。以上の結果、FISH 法と顕微蛍光マニュピュレーターを組み合わせることで、難培養の未知の細菌の分離が可能であることが示唆された。

Nonculturable microorganisms, Fish, Manipulator

講演番号：3A10a12
講演日時：3 月 27 日 11:51～ センター2 号館 A10 会場

火山灰に由来する難培養高度好熱菌の集積と分離の検討

Enrichment and isolation of uncultured extreme thermophiles from volcanic ash

○沖村 麻衣子[1]、ヒダヤ ファンディー[1,2]、ビエネス カトリーナ[1]、奥川 友紀[1]、田代 幸寛[1]、酒井謙二[1] ([1]九大院・生資環、[2]IOPRI)
○ Maiko OKIMURA[1], Fandi Hidayat[1,2], Kathrina Bienes[1], YUKI OKUGAWA[1], YUKIHIRO TASHIRO[1], KENJI SAKAI[1] ([1]Grad. Sch. Bioresour. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ., [2]IOPRI, Indonesia)

＜背景・目的＞
我々は既に、種々の火山灰中には高度好熱菌が存在していることを特異的 MPN-PCR で明らかにしている。また，鹿児島市下水汚泥とその超高温コンポストからは複数の高度好熱菌を分離しているが，火山灰からの分離は成功していない。これらは難培養高度好熱菌であると考えられている。そこで本研究では、集積分離条件の再検討に加えて，低温感受性を加味した平板塗沫培養法により高度好熱菌の分離を試みた。
＜実験方法＞
標準株 *Calditerricola satsumensis* YMO81^T を用い，75° C における集積培養条件（液量及び振とう）を検討し、濁度測定により、最適条件を決定した。桜島や Sinabung 山（インドネシア）等で採取した火山灰および高度好熱菌 *Calditerricola satsumensis* YMO81^T 種を接種し、。確立した条件で培養した集積培養液より DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子を PCR 増幅したのち、ダイレクトシーケンス解析により、主要細菌を帰属した。顕微蛍光マニピュレーターを用いた液系分離の他、主要細菌の近縁種の低温感受性をフィードバックした条件下でゲラン固体培地を用いてコロニー分離を行った。
＜結果・考察＞
集積培養条件を再検討した結果、200 mL/500mL 肩付きフラスコで回転振とう(150rpm)した場合に高い濁度を示し，通気が増殖に大きく影響を与えることが推察された．さらに、本集積培養液のダイレクトシーケンス解析結果、SVA、MVA の集積液中の増幅 16S rDNA 遺伝子配列はいずれも *Calditerricola* spp.（相同性 99%以上）に帰属され、高純度で本菌が集積されたことが示唆された。しかしながら，顕微蛍光マニピュレーターを用いた液系分離法では生菌を分離することができなかった．次に、低温感受性を考慮したフィードバック培養条件下では、いずれの火山灰集積液からもゲランガム固体培地でコロニーを形成したことから、従来難培養と考えられていた高度好熱菌の分離が可能となった。形成したコロニーの 16S rRNA 遺伝子シーケンス解析の結果、いずれの分離源からの株も *Calditerricola satsumensis* と高い相同性を示し，鹿児島市下水汚泥，超高温コンポストに加えて，桜島を含む火山灰中に系統学的肉別の困難な高度好熱菌が棲息していることが明らかになった。

uncultured bacteria, extremely thermophiles, cold tolerant

講演番号：3A10a13
講演日時：3 月 27 日 12:02～ センター2 号館 A10 会場

深部地下圏環境におけるメトキシ芳香族化合物（MACs）分解メタン生成共生系の発見
Discovery of a novel subsurface syntrophic niche:methoxylated aromatic compounds(MACs) degradation

○坂本 幸子[1]、延 優 小西[2]、眞弓 大介[3]、玉澤 聡[4]、五十嵐 雅之[5]、若山 樹[5]、前田 治男[5]、坂田 将[3]、鎌形 洋一[2]、玉木 秀幸[2] ([1]筑波大院・生命、[2]産総研・生物プロセス、[3]産総研・地圏資源、[4]幌延地圏環境研究所、[5]国際石油開発帝石株式会社)
○Sachiko SAKAMOTO[1], Masaru Konishi NOBU[2], Daisuke MAYUMI[3], Satoshi TAMAZAWA[4], Masayuki IKARASHI[5], Tatsuki WAKAYAMA[5], Haruo MAEDA[5], Susumu SAKATA[3], Yoichi KAMAGATA[2], Hideyuki TAMAKI[2] ([1]Tsukuba Univ., [2]AIST,BPRI, [3]AIST,GRE,GSJ, [4]H-RISE, [5]INPEX)

近年、メタン生成アーキアが石炭中のメトキシ芳香族化合物（MAC）を基質としてメタンを生成する新たな生物機能が発見された。MAC は、リグニン由来の物質であり、石炭層のみならず、ケロジェンとよばれる地球上で最も多く存在する有機物中に含まれることから、上述のメタン生成菌が様々な地下の天然ガス資源の成因に関与している可能性がある。また、上述のメタン生成菌以外の微生物も MAC を炭素源として利用し、最終的に MAC はメタンに転換されている可能性がある。一方で、深部地下圏で MAC 分解メタン生成に関与する微生物の実態は不明な点が多い。実際に、MAC 利用性のメタン生成アーキアは１種のみでしか知られておらず、また無酸素環境下で MAC を利用可能な細菌に関する知見もホモ酢酸生成細菌等に限られている。そこで、本研究では深部地下圏において MAC 分解を担う未知微生物を探索し、その生理生態機能の解明を行った。

深部地下油ガス田環境から得た MAC 分解メタン生成集積培養系を対象に分離培養を行った結果、新規嫌気性細菌の純粋分離に成功した。16S rRNA 遺伝子に基づいた系統解析の結果、本株は *Firmicutes* 門に属するが、近縁種との相同性が 87.5%以下と低く、系統的新規性が高かった。本株の MAC 分解能を調べたところ、単離後の培養実験では、単独では MAC を分解しないという想定外の結果が得られた。そこで、ゲノム解析により本株が MAC 分解に関与するか検討した。既知の嫌気性 MAC 分解細菌は、Wood-Ljungdahl（WL）経路と呼ばれる二酸化炭素固定経路を利用し、MAC から酢酸を生成する。一方で、本株のゲノム上には WL 経路の一部しか存在せず、またゲノム情報から酢酸ではなく、ギ酸と水素を生成する可能性が示唆された。そこで、熱力学的計算を行い、ギ酸、水素濃度と代謝反応から獲得できる自由エネルギーの関係性を評価した結果、ギ酸、水素の蓄積に伴い反応が不利になることが示唆された。このことから、本株はギ酸・水素資化性メタン生成菌との共生下で MAC を分解しているのではないか、と考え、同メタン生成菌との共培養実験を行ったところ、予想通り、共培養時のみ本株とメタン生成菌の顕著な増殖とメタン生成及び MAC の分解が確認された。このことから、本株はメタン生成菌との共生系において MAC を分解する新規嫌気共生細菌であることが明らかとなった。無酸素環境下において MAC を分解する細菌は、何れも単独で MAC を単一基質として利用可能であり、メタン生成菌との共生系で MAC を分解する共生微生物はこれまでに報告されていない。この MAC 分解を担う新規メタン生成共生系は、深部地下圏環境において新たな嫌気共生系として存在しうる可能性があり、今後、本共生機構及び生理生態機能を詳細に解明する予定である。

aromatic compound degradation, syntrophy, subsurface

発表責任者：玉木秀幸（tamaki-hideyuki@aist.go.jp）

講演番号：3A10a14
講演日時：3 月 27 日 12:13～ センター2 号館 A10 会場

耐／好塩性プロテアーゼ生産菌の探索とその系統解析

Screening of the halotolerance / halophilic protease producing archaea enzyme

○土方 友理[1]、近藤 悠介[1]、嶋根 康弘[2]、峯岸 宏明[1,2] ([1]東洋大学、[2]海洋研究開発機構)
○Yuri HIJIKATA[1], Yusuke KONDO[1], Yasuhiro SHIMANE[2], Hiroaki MINEGISHI[1,2] ([1]Toyo Univ., [2]JAMSTEC)

＜目的＞

プロテアーゼとは、タンパク質のペプチド結合を加水分解するタンパク質分解酵素であり、産業用酵素として様々な産業分野で使用されている。中でも、好塩性プロテアーゼは高塩濃度の食品に応用することで生産の効率性及び、品質の向上を期待することができる。また、発酵食品の製造によるタンパク質廃棄物は高塩濃度を有する為、食品廃棄物処理施設を劣化させる。そこに耐／好塩性プロテアーゼを使用することで処理施設の劣化防止や環境改善を期待することができる。そこで本研究では耐／好塩性プロテアーゼ生産菌の探索と諸性質解析を目的とした。

＜実験方法＞

810 種類の市販塩を分離源とし、基質としてスキムミルクとゼラチンをそれぞれ加えて調製した 2 種類の JCM 298 寒天培地を用いて、耐／好塩性プロテアーゼの探索を行った。インキュベーター内で 37 ℃、3 週間培養し、ハローの有無を確認した。ハローの確認方法は、スキムミルク培地ではスキムミルクの分解班を確認し、ゼラチン培地ではトリクロロ酢酸を塗布し、コロニーのまわりが白変したかどうかで確認した。ゼラチン培地でハローが確認できた塩サンプルは再度、寒天培地に培養した。ハローの確認ができたものを耐／好塩性プロテアーゼ生産菌の候補株とした。

候補株のスクリーニングを行い、単離できたものから 16S rRNA 遺伝子塩基配列の決定を行い、既知種との相同性の確認を行った。

＜結果・考察＞

スクリーニングの結果、スキムミルク培地では 26 種類の塩サンプルから 51 株、ゼラチン培地では 1 種類の塩サンプルから 1 株の耐／好塩性プロテアーゼ生産菌の候補株を得ることができた。単離できた候補株の 16S rRNA 遺伝子塩基配列を決定し、その相同性を確認した。スキムミルク培地から単離できた候補株の 16S rRNA 遺伝子塩基配列の相同性解析の結果、これらは *Haloarchaeobius* 属、*Haloarcula* 属、*Halostella* 属、*Haloterrigena* 属および *Halobacterium* 属と近縁であった。現在、残りの候補株についても 16S rRNA 遺伝子塩基配列の解析中である。

haloarchaea, 16S rRNA gene, protease

講演番号：3A10p01
講演日時：3 月 27 日 13:50～ センター2 号館 A10 会場

Difference of Gut Microbial Community in Indonesian Obese, Type 2 Diabetic, and Healthy Groups

○Phatthanaphong THERDTATHA[1], Masaru TANAKA[1], Mariyatun MARIYATUN[2], Miisaroh ALMUNIFAH[2], Nancy Eka Putri MANURUNG[2], Siska INDRIARSIH[2], Yuan-kun Lee[3], Endang Sutriswati RAHAYU[2], Jiro NAKAYAMA[1] ([1]Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Kyushu University, [2]Faculty of Agricultural Technology, Universitas Gadjah Mada, [3]Department of Microbiology and Immunology, National University of Singapore)

INTRODUCTION: Obesity and type 2 diabetes (T2D) mellitus have become frequently communicable diseases worldwide. Many scientific studies state that their developments are associated with disorder in gut microbial community. Indonesia is one of the countries, facing rapid increase of obese and T2D patients, where the cause and effect of its gut microbiome in these metabolic diseases are not yet to be disclosed. To this end, the 74 Indonesian volunteers were classified into two major groups of T2D (n = 25) and non-T2D (n = 49) and three minor groups of normal weight (n = 34), overweight (n = 19), and obese (n = 21), respectively.

METHODS: Their gut microbiota were analyzed by using the 16S rRNA gene amplicon sequencing with the universal primers targeting V3-V4 regions. Alpha diversity analysis was accomplished by using the observed OTUs, Shannon-Wiener, and PD whole tree indices.

RESULTS: Obese group showed significantly lower species richness than overweight and normal weight groups, while there was no significant difference between T2D and non-T2D. Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) showed that obese group had significantly higher relative abundance of *Clostridiaceae* and *Romboutsia timonensis*, while normal weight group had more *Ruminococcaceae*, *Bacteroidaceae*, and the butyrate-producing *Clostridiales*. Moreover, overweight group showed high abundance of *Prevotellaceae* and *Paraprevotellaceae.* Comparison between T2D and non-T2D was also elucidated. As the result, a limited group of bacteria, for example, unclassified *Lachnospiraceae* was significantly more abundance in the T2D group, while a succinate producing bacteria – *Succinivibrio* and *Prevotella* was decreased, compared to the non-T2D. The gut microbiota of T2D subjects who administered by anti-diabetic drugs were significantly higher abundance in butyrate producing bacteria and low abundance in *Clostridiaceae* and *Romboutsia timonensis*. These all mentioned results suggest the different mode of interaction of gut microbiota to obesity and T2D mellitus in Indonesian.

Obesity, Diabetes, Gut microtiota

発表責任者：Jiro NAKAYAMA（nakayama@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3A10p02
講演日時：3 月 27 日 14:01～ センター2 号館 A10 会場

Difference of Gut Microbial Metabolism among Indonesian Obese, Type 2 Diabetic, and Healthy Groups

○ Yayi Song[1], Phatthanaphong THERDTATHA[1], Mariyatun MARIYATUN[2], Miisaroh ALMUNIFAH[2], Nancy Eka Putri MANURUNG[2], Siska INDRIARSIH[2], Yuan-Kun LEE[3], Endang Sutriswati RAHAYU[2], Jiro NAKAYAMA[1] ([1]Department of Bioscience & Biotechnology ,Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University, [2]Faculty of Agricultural Technology, University Gadjah Mada, [3]Department of Microbiology and Immunology, National University of Singapore)

INTRODUCTION: Type 2 diabetes (T2D) is a kind of chronic metabolic disease, which ranks 5th in the world and the 6th leading cause of death in Indonesia. Obesity is also increasing all over the world in association with elevated risks of non-communicable diseases, notably T2D. Many studies have revealed many pathophysiological aspects of intestinal microbiota. Notably, metabolism of gut microbial community are involved in metabolism and homeostasis that may link with obesity and diabetes, while short chain fatty acids (SCFAs) and bile acids (BAs) are gut major substances with hormonal functions. In this study, we aim to address the alteration of gut microbiota metabolism in association with obesity and T2D in Indonesian population.

METHODS: In this study, we collected 72 fecal samples from Indonesian, and were classified into non-diabetes (HbA1c < 6.5, n=48) and T2D (HbA1c > 6.5, n=24), including normal weight (18<BMI<25, n=34) overweight (25<BMI<30, n=18), obesity (BMI>30, n=20). For metabolome analysis, fecal samples were stored in MeOH. After evaporating MeOH by speed-vac concentrator, samples were dissolved in PBS in deuterium water containing 4mM of trimethylsilylpropionate-d4 and subjected to quantitative NMR analysis. After the qNMR measurement, the samples were lyophilized and then dissolved in EtOH. After the clean up by an HLB cartridge (Waters), the samples were subjected to an LC-MS to quantify major BA molecules including 10 conjugated BA, 2 primary BAs, and 3 secondary BAs. Concentration of each BA molecule was non-parametrically compared between groups by Wilcoxon rank-sum test and also statistically correlated with BMI or HbA1c by Spearman's rank analysis.

RESULTS & DISCUSSION: T2D group has statistically lower concentration of total and each BA except for 7α-dehydroxylated secondary BAs, namely DCA and LCA. Primary BA concentration positively correlated with BMI while secondary BA concentration negatively correlated with BMI. Total BA concentration did not differ among different BMI group, while primary BA concentration was statistically higher in obese group than in normal BMI group. Primary BA concentration was negatively correlated with HbA1c. These results suggest that BA metabolism of gut microbiota alters in association with obesity and diabetes.

obesity, diabetes, metabolome

発表責任者：Nakayama Jiro（nakayama@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3A10p03
講演日時：3 月 27 日 14:12～ センター2 号館 A10 会場

モンゴル人の腸内フローラと生活習慣病との関係

The association between Mongolian gut microbiota and lifestyle diseases

○篠田 あかり[1]、デンベレル シルチン[2]、三島 梨子[1]、田中 優[1]、堀野 美里[1]、ジャムヤン ドゴースレン[2]、ラハクバジャウ ツォクトバートル[2]、中山 二郎[1] ([1]九州大農、[2]モンゴル生命科学大学)
○ Akari SHINODA[1], Shirchin DEMBEREL[2], Riko MISHIMA[1], Masaru TANAKA[1], Misato HORINO[1], Dugersuren JAMYAN[2], Tsogtbaatar LKHAGVAJAV[2], Jiro NAKAYAMA[1] ([1]Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Kyushu Univ., [2]Mongolian University of life Sciences)

【背景】食の西洋化に伴い、代謝性疾患である肥満や糖尿病は、アジア諸国で深刻な問題となっている。モンゴルはアジアの中でも特徴的な食文化が根付いている。寒冷乾燥なモンゴル高原は農耕に適した地域が限られており、数千年にわたり草をはむ家畜を介して土地からエネルギーを摂取する営みを行ってきた。夏はビタミンの摂取を兼ねて乳製品、冬は肉や皮のついた穀物などを中心とした食生活を送っている。この特徴的な食習慣がモンゴル人の高 BMI 値を引き起こしていること考えられる。また、近年モンゴルの糖尿病患者数は増加している。しかしながら、モンゴルの食生活と肥満・糖尿病と腸内細菌叢の関係性については未だ明らかにされていない。そこで本研究では、伝統的な移動型の牧畜生活を営む健康な遊牧民、糖尿病、肥満、糖尿病かつ肥満の 4 つの群から糞便試料を採取し、代謝性疾患が腸内環境に及ぼす影響を調査した。
【方法】本研究では、二つのデータセットを用いた。一つはモンゴル国の遊牧民、糖尿病患者、肥満患者を対象とした調査データで、もう一つは、アジアの国際共同プロジェクト”Asian Microbiome Project（AMP）”第二期調査で得られた 5 か国の健康なアジア人のデータセットを用いた。それぞれ、糞便試料から抽出した DNA を鋳型に 16S rRNA の V3-V4 領域を増幅させ、Illmina 社 MiSeq によるペアエンドシーケンスを行った。得られた配列データから Qiime /Usearch を用いて OTU を作成し、系統解析を行うことで各被験者の腸内細菌叢を決定した。このデータをもとに統計解析を行い、モンゴル人の健常者、肥満者、糖尿病患者の腸内細菌叢の特徴を調査した。
【結果と考察】6 か国の全データを用いて、weighted UniFrac distance/ PCoA 解析したところ、それぞれ *Prevotella* と *Bacteroides* を優先菌とする 2 つのクラスターが見られた。モンゴル人の多くは *Prevotella* 型のクラスターに属した。*Prevotella* 型タイプは菜食主義者に多いことが知られている。肉食中心のモンゴル人に *Prevotella* 型が多いことは一見矛盾するようだが、皮付き穀類を多く摂取する食習慣との関係が疑われる。また、モンゴル人は *Lactobacillus* が豊富であることが示された。これは、馬乳酒やヨーグルトなどの発酵乳製品を多量に摂取する食習慣との関連が疑われる。*Prevotella* や *Lactobacillus* が豊富なモンゴル人の細菌叢の特徴は、糖尿病群においては弱くなっており、食習慣の現代化と腸内細菌叢の変化と生活習慣病との関連が示唆される。

gut microbiota, Mongolia, lifestyle diseases

発表責任者：中山二郎（nakayama@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3A10p04
講演日時：3 月 27 日 14:23～ センター2 号館 A10 会場

歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* の自己凝集と溶血がタイプ 2 クオラムセンシングによって調節される
Type 2 quorum sensing regulates autoagglutination and hemolysis in periodontopathogenic bacterium, *Eikenella corrodens*
○谷口 彰吾、飯田 亮平、阿座上 弘行（山口大農）
○Syogo TANIGUCHI, Ryohei IIDA, Hiroyuki AZAKAMI (Yamaguchi Univ.)

【目的】歯周病原性細菌の一つである *Eikenella corrodens* 1073 株はオートインデュサーとして AI-2 を用いてクオラムセンシング（QS）を行う。本菌では，AI-2 濃度は対数増殖期に上昇するが，定常期に入ると AI-2 濃度の急激な低下が観察される。その後の解析により、定常期において AI-2 の不活化が起こっていることが明らかになった。これまでに AI-2 を介した QS（タイプ 2QS）によって、バイオフィルム形成など本菌の病原性が調節されることが示されている。本研究では、タイプ 2QS が本菌の自己凝集能や溶血活性に及ぼす影響を調べた。

【方法・結果】AI-2 を合成できない変異株（*ΔluxS* 株）を用いて，自己凝集能や溶血活性を調べ，野生株と比較した。*ΔluxS* 株では、野生株に比べ自己凝集能の低下が確認された。さらに、*ΔluxS* 株では野生株に比べて溶血活性の上昇が観察された。これらの結果から、タイプ 2QS が *E. coorodens* の病原性を調節することが示唆された。これまでの研究より、本菌のバイオフィルム形成や自己凝集能、溶血活性には *N*-アセチルガラクトサミン（GalNAc）特異的レクチンが関わることが明らかになっている。そこで、タイプ 2QS によるこれらの制御が GalNAc 特異的レクチンによるものかどうかを調べるために、野生株と *ΔluxS* 株のレクチン活性を比較したが両株に差は見られなかった。そこで、両株の菌体表面疎水性を調べたところ、*ΔluxS* 株では表面疎水性の低下が見られた。このことから、*ΔluxS* 株では菌体表層の構造が大きく変化していることが示唆された。さらに、*ΔluxS* 株では、リポポリサッカライド（LPS）や細胞外 DNA（eDNA）量の減少が観察された。したがって、タイプ 2QS によって LPS や eDNA 量が制御されることによって菌体表層の構造や表面疎水性が変化し、これによってバイオフィルム形成や自己凝集能、溶血活性が調節されることが示唆された。

quorum sensing, autoagglutination, hemolysis

発表責任者：阿座上　弘行（azakami@yamaguchi-u.ac.jp）

講演番号：3A10p05
講演日時：3 月 27 日 14:34～ センター2 号館 A10 会場

難培養性微生物とは何か？ 休眠・覚醒・自己増殖阻害
What are uncultivables? "Dormancy, Resuscitation, Self-growth inhibition"
○青井 議輝[1]、田村 淳[1]、寺地 裕康[2]、村上 千穂[3]、加藤 節[1]、中島田 豊[1]、金田一 智規[2]、大橋 晶良[2] ([1]広島大院統合生命、[2]広島大院工、[3]安田女子大薬)
○Yoshiteru Aoi[1], Atsushi Tamura[1], Hiroyasu Teracgu[2], Murakami Chiho[3], Setsu Kato[1], Yutaka Nakashimada[1], Tomonori Kindaichi[2], Akiyoshi Ohashi[2] ([1]Hiroshima Univ. Integrated Sciences for Life, [2]Hiroshima Univ. Engineering, [3]Yasuda Women's Univ.)

なぜ多くの微生物はなぜ培養できないのか？そもそも普遍的な要因が存在するかどうかも定かではない。つまり、常識的には、多くの微生物が培養できない理由は「培地組成など培養条件が適合しない」こと（だけ）が原因ではないかと考えられる傾向にある。しかし我々は、このような「培養条件の不適合性」以外に、まだ十分に検討されていない普遍的な要因があり得ると仮定して、そのメカニズムに迫ることを目指している。もし多くの微生物が培養困難である普遍的な理由（メカニズム）が明らかになれば、新しい分離培養手法を開発する上で重要な指針となり得る。また環境中で微生物が増殖を制御している未知メカニズムの発見につながると考えられる。そこで本研究では、難培養性微生物である亜硝酸酸化細菌 *Nitrospira* の純菌株をモデルとし、「なぜ多くの研究者がこれまでに本種の分離株の獲得にいたらなかったのか」、すなわち難培養性についての本質的な原因を解明することを目的とした。結果、本菌株は以下に上げる二つの性質を同時に併せ持つことから従来の分離培養法では極めて分離困難であることが判明した。
性質１）休眠と覚醒：飢餓状態など好ましくない条件下では容易に非増殖状態（休眠状態）に移行する。環境状況が好転しても休眠状態からは容易に脱却せず、そこから脱却するためには、シグナル様物質（覚醒因子）が必要である。そしてそれは増殖状態の細胞から分泌される。
性質２）自己増殖阻害：そもそも *Nitrospira* は固体培地でコロニーを形成しないため、従来法では分離困難である。またコロニーを作らない理由として、自身が産出する代謝物（代謝副産物）に対する感受性が高く、局所的に菌体密度が高まると増殖を停止（阻害）するためであることが示唆された。
今回モデルとして用いた *Nitrspira* のみならず、他の多くの環境微生物も同様のメカニズムによって従来法では分離培養困難であることが推察される。また、上記に挙げた１）および２）の性質を両方併せ持つような微生物は従来法では極めて分離培養が困難であると言える。

Uncultivable microorgasnism, Nitrite oxidizing bacteria, Colony formation

発表責任者：青井議輝（yoshiteruaoi@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：3A10p06
講演日時：3 月 27 日 14:45～ センター2 号館 A10 会場

難培養性微生物とは何か? コロニーを形成しない微生物の選択的獲得
What are uncultivables? "Screening and characterization of microbes unable to form colonies"
○馬場 啓彰、JUNG Dawoon、加藤 節、中島田 豊、青井 議輝（広島大統合生命科学）
○ Hiroaki BABA, Dawoon JUNG, Setsu KATO, Yutaka NAKASHIMADA, Yoshiteru AOI (Hiroshima Univ.)

【背景と目的】
環境中に存在する微生物のほとんどは未培養であり、多くの微生物は従来法では培養困難（できない）ことが広く知られている。これら未知微生物にアクセスすることは有用微生物資源の利用や環境微生物の理解の上で必要不可欠であるが、これまでに従来法に替わる新規な分離培養手法の開発には大きな発展がない。一方で、環境中から微生物を分離培養する際には、寒天など固体培地上でコロニーを形成させて分離する方法が一般的である。したがって、固体培地上でコロニーを形成できない微生物の多くは未だ分離されたことのない未培養微生物である可能性が高い。そこで本研究では、固体培地上でコロニーを形成しない微生物を選択的に分離培養可能な手法を確立すること、未培養微生物の獲得という観点において同アプローチの有効性を明らかにすることを目的とした。
【方法】
コロニーを形成しない微生物の選択的獲得法は、液体培地で増殖した菌株のうち寒天平板培地上で増殖しない微生物のみ選択するというスクリーニングを鍵とする手法である。本研究では新規手法の効果を検討するために新規手法と従来法(寒天平板法)の二つの系で培養を行い、得られた分離株の多様性および新規性について比較評価した。また各手法で得られた分離株の増殖特性を比較評価した。
【結果と考察】
新規手法により、実際にコロニーを形成しない微生物を選択的に獲得することが可能であることが示された。また、本手法を通じて獲得した分離株の多くは新規性の高い未培養微生物であり、従来法（寒天平板法）に比べて新規性の高い分離株の獲得効率が顕著に高かった。コロニーを形成しない微生物について増殖特性を評価した結果、寒天平板法で得られた微生物に比べて増殖速度が遅く、最終到達菌体密度が低いというデータが得られた。このデータから微生物の増殖において自身の代謝(副)産物による阻害がかかっている可能性が考えられた。

uncultured bacteria, microbial cultivation, liquid medium

発表責任者：青井議輝（yoshiteruaoi@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：3A10p07
講演日時：3 月 27 日 15:06～ センター2 号館 A10 会場

難培養微生物とは何か？環境中における未知増殖制御ネットワークを解き明かす

What are uncultivables? "Illuminating microbial growth controlling network in nature"

○鈴木 陸太[1]、杉山 周[3]、SEO Eunyoung[3]、加藤 節[2]、中島田 豊[2]、青井 議輝[2] ([1]広島大学工、[2]広島大学統合生命科学、[3]広島大学先端研)
○Rikuta SUZUKI[1], Shu SUGIYAMA[3], Eunyoung SEO[3], Setsu KATO[2], Yutaka NAKASHIMADA[2], Yoshiteru AOI[2] ([1]Hiroshima Univ. Engineering, [2]Hiroshima Univ. Integrated Sciences for Life, [3]Hiroshima Univ. Advanced Sciences of Matter)

地球上に存在する膨大な種類の微生物のほとんどは培養できない、もしくは非常に困難であることが知られている。また、それらの難培養微生物はそもそも「なぜ培養できないのか」という理由も解明されていない。もし、難培養である原因の一端を明らかにして、培養可能な微生物種を大幅に拡大することができれば、学術的及び産業的な波及効果は極めて大きい。しかし、従来法で容易に分離される微生物を解析してもその答えにはたどり着けない。また現在、従来法に代る画期的な分離培養手法の開発にはほとんど進展がないといっても過言ではない。そこで本研究では、微生物間の相互作用が休眠状態の微生物を覚醒させる可能性に着目し、培養開始初期から超高菌体密度を実現する新規培養手法を開発した。また、本手法の開発を通じて、難培養微生物の未知なる増殖制御機構を明らかにし、環境中で実際におきている微生物間の相互作用を解明することを目的とした。
本研究では､Gel Microdrop(GMD)を用いた超高菌体植菌密度を実現する新規分離培養手法を開発した。この手法は直径 10-30μm のゲルに細胞を 1 つずつ封入し、それを油相中で凝集させてそのまま培養する。これにより、「各々のクローンは培養期間中分離状態を保つ条件で、従来法の 1 万倍以上の初期植菌密度」を実現する。この新規培養手法を用いることにより、従来法と比較して十倍以上ものコロニー生成を確認することができた。また、本研究では土壌より上記培養手法によって獲得した分離株を用いて増殖特性の評価を行なった。その結果、特定の異種間または同種間における相互作用により、それらの増殖の開始が誘導されるという現象が確認された。以上の結果から、自然環境中では、複雑な微生物間相互作用により、各々の微生物の増殖が制御されている「増殖制御ネットワーク」が形成されている可能性が示唆された。

uncultured bacteria, microbial interaction, growth trigger

発表責任者：青井議輝（yoshiteruaoi@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：3A10p08
講演日時：3 月 27 日 15:17～ センター2 号館 A10 会場

The microbial community in a multiple parallel mineralization system suppresses *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* on *Lactuca sativa*

○JAMJAN MEEBOON[1], Makoto Shinohara[1], Kazuki Fujiwara[1], Kenji Miyamoto[2], Yasuo Kato[3], Akinori Ando[4,5], Jun Ogawa[4,5] ([1]NARO, [2]Dept. Biosci. Inform., Keio Univ., [3]Biotech. Res. Cent., Toyama Pref. Univ., [4]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [5]Res. Unit Physiol. Chem. Kyoto Univ.)

Multiple parallel mineralization (MPM) is a form of hydroponics in which microbial activity, and the presence of organic nutrients, lead to the development of a plant–microbe ecosystem within the hydroponic solution. The microbiota that develops in the MPM system has been found to increase nutrient production efficiency and decrease root related diseases. In this study, we evaluated if (1) MPM could decrease symptoms of a common root rotting pathogen and (2) if the type of fertilizer (inorganic or organic) added into the hydroponic solution impacted the effectiveness of the MPM system. We focused on the fungal root pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* is the causal agent for root rot disease on lettuce and is detrimental for the commercial lettuce industry in Japan. We conducted growth experiments with butterhead lettuce ‘‘Saradana’’ (*Lactuca sativa* var. *capitata*) growing in conventional hydroponic systems and MPM systems supplemented with either inorganic or organic fertilizers (fish-based soluble fertilizer). The lettuce seedlings were grown on the vermiculite media for 2 weeks and then transplanted into the planting panel of the MPM system. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* was inoculated into the solution 7 days after planting. The seedlings growing in the MPM systems adequately supported plant growth and significantly decreased disease symptoms compared to those grown in conventional hydroponic systems. In addition, the lettuce growing in MPM systems that included organic fertilizers exhibited minimal disease symptoms whereas the seedlings grown in MPM systems, that did not include organic fertilizers, were wilted and had severely damaged roots. The results of this study indicate that organic hydroponic MPM systems are sufficient to support plant growth and suppress Fusarium wilt disease under greenhouse conditions.

disease control, inorganic fertilizers, organic hydroponics

講演番号：3A10p09
講演日時：3 月 27 日 15:28～ センター2 号館 A10 会場

有機質肥料活用型養液栽培による生産物の品質及び棚もち評価
Evaluating quality and shelf life of products by organic hydroponics
○篠原 信[1]、安藤 聡[1]、宮本 憲二[2]、加藤 康夫[3]、安藤 晃規[4]、小川 順[5]([1]農研機構、[2]慶大理工、[3]富山県大・生医工研セ、[4]京大院農、[5]京大・生理化学研究ユニット)
○Makoto SHINOHARA[1], Akira Ando[1], Kenji Miyamoto[2], Yasuo Kato[3], Akinori Ando[4], Jun Ogawa[5] ([1]NARO, [2]Dept. Biosci. Inform., Keio Univ., [3]Biotech. Res. Cent., Toyama Pref. Univ., [4]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [5]Res. Unit Physiol. Chem. Kyoto Univ.)

[目的・方法]
有機質肥料活用型養液栽培は、従来不可能とされていた、水耕栽培（養液栽培）での有機質肥料の利用を可能にした栽培技術である。化成肥料による従来の無機養液栽培と比べ、生産物に含まれる硝酸態窒素の濃度が低いなど、品質面で有利であることが示されてきたが、栄養価などの品質面での評価はこれまで十分に検討されてこなかった。また、本栽培技術を導入した生産者からは、店もち（商品として陳列されてからの鮮度保持）が良好であるとの感想が得られていたが、これを客観的に評価する試験はこれまで行われていなかった。そこで本研究では、サニーレタスを対象に、品質面及び店もちの面で従来の無機養液栽培の生産物と比較する試験を行った。サニーレタス苗 166 株を各栽培区に定植、化学肥料区には OAT ハウス 1 号、2 号を大塚 A 処方に従って施肥した。有機肥料区は鰹煮汁、天然有機カリ水溶液、発酵石灰液を加え、化学肥料区と同等の窒素量となるように施肥した。収穫後、生産物をランダムに選抜、成分分析を行った。店もちの評価のため、腐敗実験を行った。プラスチック容器に 5cm 角に切断した生産物断片を詰め密閉、26℃で静置した。毎日 1 分間フタを開放し、再び密閉静置し、経過観察した。
[結果・考察]
生産物に含まれる糖はフルクトース、グルコース、スクロースともに有機肥料区が高く、呈味アミノ酸はアスパラギン酸、グルタミン酸は同程度であったが、グルタミンが有機質肥料区の方が 10 倍以上と高かった。葉中硝酸イオンは化学肥料区で 3,000ppm 前後、有機質肥料区は 1,000ppm 以下であった。クエン酸、リンゴ酸は化学肥料区の方が高かった。カチオンについては、カリウム、カルシウムが化学肥料区において倍以上高く、ナトリウムは有機質肥料区が高かった。マグネシウムは同程度であった。サニーレタスの特徴であるアントシアニン含量は、有機質肥料区が倍以上と高い値を示した。化学肥料区は乾物重の湿重に対する比が 4.95%であったのに対し、有機肥料区は 8.33%と高かった。腐敗実験では、実験開始 10 日後に化学肥料区のレタス組織が融解したのに対し、有機質肥料区はやや萎凋した状態で、組織は融解しなかった。そこで、サニーレタス断片を次亜塩素酸で表面殺菌し、再度腐敗実験を行ったが、組織融解については同様の結果となった。これらの結果から、有機質肥料区の生産物は、腐敗実験の条件下では組織融解が起こりにくく、その原因は表在微生物による可能性は低いと考えられた。

organic hyroponics, nitrate, shelf life

発表責任者：篠原信（shsh@affrc.go.jp）

講演番号：3A10p10
講演日時：3 月 27 日 15:39～ センター2 号館 A10 会場

消化汚泥からバイオガスを生産できる微生物菌叢の生態解明

Enrichment of biogas-producing microbial consortium with sludge-degrading activity

○近 綾香、油井 信弘、藤井 克彦（工学院大先進工）
○Ayaka KON, Nobuhiro ABURAI, Katsuhiko FUJII (Kogakuin Univ.)

【目的】

下水処理で発生する余剰汚泥の減容手段として嫌気消化（メタン発酵）が普及しているが、それでも減容率は 30%程度であり、残りは難生分解残渣（消化汚泥）として残存する。演者らは以前の研究で、消化汚泥を分解して水素を生産する嫌気菌叢を堆肥や牛糞から見出した。そこで本研究では、菌叢を探索する範囲を市街地の土壌や他種動物の糞まで拡大し、「消化汚泥を基質としてメタンや水素を生産する菌叢」生態系について知見を得ることを試みた。

【方法】

消化汚泥は近隣下水処理施設より譲渡を受けた。これを水道水で水洗し、60℃で乾燥した後に 1 ㎜径まで粉砕した。他方、山林、公園、河川敷等の土壌 8 種類と動物園の草食動物の新鮮糞 7 種類を採集し、滅菌水に懸濁したものを微生物源とした。消化汚泥乾燥粉末 100 mg と滅菌水 10 mL が入ったバイアル瓶に、前述の微生物懸濁液を 100 µL 加え、30、40 および 50℃の 3 種類の温度で嫌気培養を行った。培養 2 週間目と 4 週間目にバイアル瓶中の気相成分を GC-TCD で分析し、水素およびメタンの発生有無を検討した。さらに、菌液中の酵素活性を測定するとともに、DGGE 法による菌叢解析も行った。

【結果】

集積培養の結果、土壌由来の菌叢 20 個と動物糞由来の菌叢 15 個で水素やメタンの発生が見られた。また、菌叢 25 個（土壌由来 16 個、動物糞由来 9 個）では、継代培養を繰り返しても継続的に水素やメタンの発生が見られた。微生物源はいずれも常温の環境試料に由来するが、30℃と 40℃のみならず、常温の範囲から外れた 50℃で水素を発生する菌叢もあった。16S リボソーム RNA 遺伝子に基づく DGGE 解析を行った結果、菌叢を構成する属種は多様であり、既知の嫌気菌属種に加えて、水素発酵やメタン発酵への関与が報告されていない細菌の存在も示唆された。

消化汚泥は、余剰汚泥の可溶性成分が嫌気消化で分解された後の残渣であり、微生物細胞壁が主である。そこで、微生物細胞壁の成分に対する分解酵素活性を試験した。実験の結果、セルラーゼ、キチナーゼ、プロテアーゼ活性が検出された。菌叢は、細胞壁構成多糖やタンパク質を分解して低分子化し、これをもとに水素やメタンを生産していると考えられる。

Biogas, Sludge, Microbial consortiun

発表責任者：藤井　克彦（st13631@ns.kogakuin.ac.jp）

講演番号：3A10p11
講演日時：3 月 27 日 15:50～ センター2 号館 A10 会場

高リグニン分解活性を示す白色腐朽菌-細菌複合微生物系の作出

Construction of a co-cultivation system with a white-rot fungus and bacteria exhibiting high delignification activity

○寺島 大貴[1]、松村 真輝[1]、森 智夫[1]、河岸 洋和[1,2,3]、平井 浩文[1,2] ([1]静大農、[2]静大グリーン研、[3]静大創造院)
○ Taiki TERASHIMA[1], Masaki MATSUMURA[1], Toshio MORI[1], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,3], Hirofumi HIRAI[1,2] ([1]Faculty of Agriculture, Shizuoka Univ., [2]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka Univ., [3]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka Univ.)

【背景・目的】

白色腐朽菌は木材の主成分であり難分解性芳香族高分子であるリグニンを高度に分解することができる唯一の微生物であり、自然界においては様々な細菌と相互に作用しながら、木材腐朽を行っていると考えられている。しかしながら、自然界の木材腐朽に関わる白色腐朽菌－細菌間相互作用に関連した研究例は少なく、相互作用機構に関する知見も乏しい。この原因として、自然界の腐朽木材中細菌叢の高い多様性・不安定性・難培養性に加えて、木材が多糖成分やリグニンなどの高分子からなる不均一かつ複合的な材料であるため、相互作用結果として現れる表現系を再現良く得ることが非常に難しい事が原因であると思われる。当研究グループでは、白色腐朽菌菌床に自然界由来の細菌叢を混入させることにより、単独培養時と比較して変化した表現型が安定して再現可能な、白色腐朽菌−細菌複合微生物系の開発を試みてきた。その結果、高いリグニン分解性・分解選択性を維持したまま継代が可能な複合微生物系の開発に成功したので、この複合微生物系の特性について報告する。

【方法・結果】

白色腐朽菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 株菌糸をブナ木粉に蔓延させ、菌床を作成した。菌床を静岡大学敷地内の土壌に埋設し、数週間放置することで菌床に細菌を混入させた。菌床外縁部を除去し菌床中心部を得て、これをブナ木粉培地に接種した。ブナ木粉培地は 30 日間静置培養し、リグニン分解率を測定するとともに、新たな木粉培地への継代を繰り返した。継代 4 回目までの複合微生物系は、*P. sordida* 単独培養よりも高いリグニン分解率を示したものの、それ以降は継代の度にリグニン分解活性は低下しており、木粉への継代では表現系は安定化できなかった。

そこで、他の継代法を探索したところ、寒天培地で継代した場合において優れた木材腐朽特性を維持したまま継代が行えること、本複合微生物系は *P. sordida* がリグニン分解酵素を発現しない条件下でリグニン分解酵素を発現することが明らかとなった。本複合微生物系には、白色腐朽菌のリグニン分解活性を向上させ、多糖分解活性を低下させる難培養性の菌糸付着性細菌叢が含まれており、結果として白色腐朽菌のリグニン分解選択性の向上につながっていると思われる。

delignification, fungal-bacterial interaction, white-rot fungi

講演番号：3A10p12
講演日時：3 月 27 日 16:01～ センター2 号館 A10 会場

ニホンミツバチ由来乳酸菌の単離と諸性状解析
Isolation and characterization of lactic acid bacteria from *Apis cerana japonica*
○櫻間 晴子[1]、坂本 文夫[1,2]、萩下 大郎[1] ([1]京都先端大バイオ環境、[2]京都ニホンミツバチ研究所)
○Haruko Sakurama[1], Fumio Sakamoto[1,2], Tairo Hagishita[1] ([1]Kyoto Univ. of Adv. Sci., [2]Kyoto apis cerana japonica Lab.)

【目的】
フルクトースを生育基質として好むユニークな乳酸菌が，ミツバチの腸内環境のようにフルクトースが豊富な環境から単離されており，フルクトフィリック乳酸菌と呼ばれている．在来種であるニホンミツバチ（*Apis cerana japonica*）は，外来種のセイヨウミツバチと違い，日本の湿潤な気候帯に適応し独自の生態特性を有するが，腸内細菌に注目するニホンミツバチの調査はほとんど行われていない．そこで，本研究では，ニホンミツバチ由来の乳酸菌に着目し，その機能解析を行うことで，ニホンミツバチ由来の乳酸菌の特徴とその役割を推定することで，宿主と腸内細菌との共生関係の一端を解明することを目的とする．
【方法】
単離源として，ニホンミツバチの腸と蜂蜜，蜜蝋を使用した．これらサンプルを嫌気条件下で炭酸カルシウム含有 MRS 培地にて培養することで乳酸菌を単離した．MRS 培地で培養した単離菌から NucleoSpin Tissue（MN 社）でゲノムを取得し，16S rDNA 配列解析により菌種を推定した．さらに，これら単離菌に対して，アピ 50CH（ビオメリュー社）を使用し資化性実験を行った．さらに，ニホンミツバチなどの腸から，直接，NucleoSpin Tissue でゲノムを取得した．取得したゲノムを使って，MiSeq にて V3-V4 領域を標的とした 16S メタゲノム解析を実施することで菌叢解析を行った．
【結果】
炭酸カルシウム含有 MRS 培地で培養した結果，使用した単離源全てでハローを有する細菌が見られた．そこで，各単離源からハローを有する単離菌を 1 種類ずつ選択し菌種を推定した結果，ニホンミツバチの腸由来の単離菌は *Lactobacillus Apis*，蜂蜜や蜜蝋由来の単離菌は *L. kunkeei* と類似していることが示された．ここで，*L. Apis* や *L. kunkeei* はセイヨウミツバチ（*Apis mellifera*）で取得されている乳酸菌として，特に，*L. kunkeei* はフルクトフィリック乳酸菌として報告されている．さらに，菌叢解析の結果，ニホンミツバチの腸は *Lactobacillus* 属が 30.5%，*Bifidobacterium* 属が 4.7%存在していることが示され，ニホンミツバチにおいても *Lactobacillus* 属が最優占属であった．以上のことから，取得した単離菌はニホンミツバチで重要な役割を担っていることが期待される．現在，これら細菌の糖資化性や分解活性について検討しているところである．

lactic acid bacteria, Japanese honey bee

発表責任者：櫻間晴子（sakurama.haruko@kuas.ac.jp）

講演番号：3A10p13
講演日時：3 月 27 日 16:21～ センター2 号館 A10 会場

ヒト腸内芽胞形成細菌の各種胆汁酸による発芽誘導と分離培養

Germination and cultural isolation of spore forming bacteria in human feces by various bile acids

○鬼塚 咲良、田中 優、中山 二郎 (九大院・農)
○Sakura ONIZUKA, Masaru TANAKA, Jiro NAKAYAMA (Kyusyu Univ. Agr.)

【目的】ヒト消化液に含まれる胆汁酸は腸内フローラの形成やバランスに密接に関連し、その 1 つであるタウロコール酸(TCA)が腸内細菌由来の芽胞形成体に対して発芽誘導することが知られている [1)]。一方、ヒトの腸管内では様々な胆汁酸が存在し、分子種ごとに発芽誘導活性が異なることが予想される。そこで本研究では、①様々な胆汁酸分子種の腸内芽胞菌の発芽誘導活性を調査し、②さらにその活性を用いて、ヒト腸内に多岐に存在する未培養・難培養細菌の分離培養を試みた。
【方法】糞便中の芽胞菌を回収するために被験者 7 人の糞便サンプルをエタノール処理し、栄養細胞を死滅させた。そこに TCA を含むヒト腸管内に存在する 15 種(タウリン抱合型、グリシン抱合型、遊離型)の胆汁酸をそれぞれ添加し、GAM 寒天培地で 72 時間、嫌気培養を行った。胆汁酸分子種ごとの発芽誘導活性を検証するために、寒天培地上に生育した細菌を回収し 16S rRNA アンプリコンによる群集解析を行った。同時に、生育したコロニーをランダムに釣菌し、GAM 培地を用いて液体培養したものに対して、16S rRNA 遺伝子全長配列による菌種同定を行った。
【結果】各種胆汁酸に共通して *Lachnospiraceae* 科や *Ruminococcaceae* 科、*Clostridiaceae* 科の発芽が誘導されていた。先行研究 [1)] で発芽誘導活性が報告されている TCA に比べて、グリシン抱合型胆汁酸において有意に多くのコロニーが観察された。また、発芽誘導に胆汁酸を必要としない菌、幅広い胆汁酸に反応する菌、特定の胆汁酸のみに反応する菌の存在が確認された。これら 642 株を系統解析した結果 100 の OTU が得られ、16S rRNA 配列データベースに対して相同性検索を行った結果、*Lachnospiraceae* 科 39 種(新規候補種 9 種)、*Oscillospiraceae* 科 9 種、*Clostridiaceae* 科 8 種(新規候補種 2 種)を確認した。
【結論】腸内細菌の芽胞形成能及び胆汁酸の発芽誘導活性を用いることで、未分離・難培養菌種を含む腸内細菌を広く分離培養できることが判明した。この新奇な分離培養法により、ヒト腸内フローラ中で質・量ともに重要な働きを有するにも関わらず、培養が困難で研究が遅れていた有胞子桿菌 *Clostridia* 綱細菌群の研究が加速すると期待される。

【参考文献】
1) Browne HP et al., Culturing of unculturable human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation, *Nature* (2016)

Gut microbiota, Bile acid, Spore

発表責任者：中山二郎（nakayama@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3A11a01
講演日時：3 月 27 日 09:30～ センター2 号館 A11 会場

原形・扁平白米と球形白米により醸成した清酒のメタボライト比較解析

Comparative analysis of sake metabolite focused on shape of polished rice

○平吉 明日香[1]、平田 章悟[1,2]、福本 浩史[1,3]、小松 夕子[1]、小林 拓嗣[1]、矢澤 彌[1]、室井 佑介[4]、川上 晃司[4]、岩下 和裕[1,2,3] ([1]酒総研、[2]広島大院・統合生命、[3]広島大・工、[4]株式会社サタケ)
○ Asuka HIRAYOSHI[1], Shogo HIRATA[1,2], Kouji FUKUMOTO[1,3], Yuko KOMATHU[1], Takuji KOBAYASHI[1], Hisashi YAZAWA[1], Yusuke MUROI[4], Koji KAWAKAMI[4], Kazuhiro IWASHITA[1,2,3] ([1]NRIB, [2]Grad.Sch.Integr.Sci.Life.Hirashima, [3]Univ.Engineering.Hiroshima., [4]SATAKE CORPORATION)

【目的】清酒製造において、精米は清酒の風味に大きな影響を与える重要な工程であると考えられている。さらに、精米を行った白米の形状も原料米中の粗タンパク量等に大きな影響を及ぼすと考えられている。そこで、我々のグループでは、20－70%精米条件で球形精米、40－70%条件で原形、扁平の形状に調整した白米を作成し、同一条件で製麹、小仕込みを行って、白米中の粗タンパク質量や米麹の酵素力価、発酵経過及び清酒の一般成分等の比較を行ってきた。その結果、原形・扁平精米は同一精米歩合の球形に比べてより精米の効果が大きい傾向が見られ、例えば原形・扁平の 60%精米の米麹の酵素力価や製成酒の一般成分は球形の 40%精米に匹敵する数値を示した。一方で、原形・扁平の 70%精米は大きく異なる傾向を示した。そこで、我々はこれらの清酒のメタボローム分析を実施して、各精米歩合および白米形状の清酒メタボライトへの影響について検討を行った。
【方法および結果】20－70%の球形白米、40－70%の原形・扁平白米を用いて同一条件で各 2 点ずつの製麹および小仕込みを行い、得られた清酒について醸造酒メタボライト分析法により n=3 の分析を行った。得られたピークリストについて、再現性の良いピーク（変動係数 13%未満）の抽出を行い、以下の解析に供した。まず、得られたピークリストを用いて、主成分分析を行った。その結果、70%の原形・扁平、60%の扁平白米により得られた清酒は他の清酒から大きく外れる傾向を示した。その他の清酒は比較的近い位置に位置するとともに、精米歩合により整列している傾向が見られた。また、60%の原形白米は 40%の球形白米の近く、50%の原形・扁平白米は、30%の球形白米の近くにプロットされていた。

そこで、40%-70%の球形白米のメタボロームデータを説明変数、精米歩合を目的変数として orthogonal projections to latent structures (OPLS)による予測式の作成を行った。なお、分析回ごとに 3 つに分け、各分析回数間で交差検証を行った。その結果、R^2=0.99、RMSEP=1.1 の非常に精度の高い回帰式を作成することが出来た。このことは清酒の成分から球形精米の精米歩合が予測できることを示す。そこで、20%－30%の球形白米、40－70%の原形・扁平白米により得られた清酒のメタボロームからの精米歩合の予測を行った。その結果、20－30%球形白米の清酒はほぼ回帰式上にプロットされ、原形・扁平白米の清酒はより低い精米歩合の位置にプロットされた。原形・扁平の 40%, 50% 60%白米は、それぞれおおおよそ 20, 35, 50%球形白米の位置にプロットされた。つまり、原形・扁平の 50%白米の清酒は球形の 35%白米の清酒に匹敵することが示唆された。

sake, metabolome, rice polishing

発表責任者：岩下　和裕（iwashitact@nrib.go.jp）

講演番号：3A11a02
講演日時：3 月 27 日 09:41～ センター2 号館 A11 会場

ワイン発酵助成剤が清酒醸造に及ぼす影響

Effect of　fermentation management for wine on　sake brewing

○飯塚（古川）　幸子、神田 涼子、藤田 晃子、山田 修（酒総研）
○Sachiko IIZUKA(FURUKAWA), Ryoko KANDA, Akiko Fujita, Osamu Yamada (NRIB)

【背景と目的】酵母発酵助成剤は、製造の健全を期するため海外のワイン醸造では広く用いられており、日本でも酒税法及び酒類行政関係法令等解釈通達で、酒類の原料として取り扱わない物品として、その使用が認可されている。しかしながら、これまでのところ、酒類の原料として取り扱わない物品を用いた清酒醸造については、チアミン添加の影響を調べた上東らの報告[1,2)]があるのみで、酵母発酵助成剤の添加による清酒醸造への影響に関する報告は見当たらない。そこで、本研究では、ワイン醸造で用いられている酵母発酵助成剤添加が清酒醸造に及ぼす影響を調べるとともに、新たな特徴ある製品開発の可能性について検討した。
【方法】LALLEMAND 社製の酵母発酵助成剤である Stimula Sauvignon Blanc と Optimum White を添加した小規模清酒醸造試験を行った。ワイン醸造では、Stimula Sauvignon Blanc は酵母による香気代謝の最適化を目的として、また Optimum White はアロマの強化と持続性の向上を目的として用いられている。小規模清酒醸造試験は 2 回行い、1 回目は清酒酵母 5 種類とワイン酵母 1 種類を用い、麹歩合を 15%と 20%とし、上記の酵母発酵助成剤を仕込時にワインの推奨使用量添加した総米 80g の一段仕込試験とした。2 回目は清酒酵母 3 種類とワイン酵母 1 種類を用い、麹歩合を 20%とし、上記の酵母発酵助成剤を仕込時と上槽時にワインの推奨使用量を添加した総米 300g の三段仕込試験とした。いずれも当所職員をパネルとし、製成酒の官能評価を実施した。
【結果と考察】用いた酵母の種類に関わらず、酵母発酵助成剤の添加により発酵が促進され、原料利用率が向上した。特に Stimula Sauvignon Blanc の添加により、ワイン酵母で清酒酵母と同程度のアルコール度となるまで発酵が進んだ。また、製成酒の香気成分は、Stimula Sauvignon Blanc の添加により、用いた酵母の種類に関わらず酢酸イソアミルやカプロン酸エチルなどのエステル含量が高くなった。ワイン醸造では、Stimula Sauvignon Blanc は、4-mercapto-4-methylpentane-2-one (4MMP) 及び 3-mercaptohexan-1-ol (3MH)の前駆体取り込みと変換を促進するために使用されるが、今回の結果から、清酒ではエステル生成にも寄与することが示唆された。また、製成酒の官能評価の結果、対照と同程度の良い評価が得られたことから、新たな特徴ある製品開発に有効な手段となる可能性があると考えられた。

1)上東ら, J. Brew. Soc. Japan 2014, 109, 310-317.
2)上東ら, J. Brew. Soc. Japan 2015, 110, 865-873.

sake brewing, fermentation management for wine, fermentation property

講演番号：3A11a03
講演日時：3 月 27 日 09:52～ センター2 号館 A11 会場

新たな泡盛製造法「3 回蒸溜法」と育種酵母 T25 株を併用した泡盛の開発

Application and Analysis of a High Leucine-Accumulating Yeast Mutant for Three Times Distilled Awamori

○塚原 正俊[1]、阿部 峻之[1]、渡久地 洋平[2]、豊川 洋一[3]、渡辺 大輔[4]、高木 博史[3] ([1](株)バイオジェット、[2](有)神村酒造、[3]奈良先端大、[4]京大農)
○Masatoshi TSUKAHARA[1], Takayuki ABE[1], Yohei TOGUCHI[2], Yoichi TOYOKAWA[3], Daisuke WATANABE[4], Hiroshi TAKAGI[3] ([1]Biojet, [2]Kamimura-Shuzo, [3]NAIST, [4]Kyoto Univ.)

1. 背景・目的

沖縄県の伝統的酒類である泡盛は日本で最古の蒸留酒である。これまでの泡盛の歴史の中で、各酒造所は酒質の向上や特徴付けを目的として様々な醸造技術の検討を行ってきた。最近、泡盛の風味多様化を目指した新たな取り組みとして 3 回蒸留法を用いた商品が複数の酒造所より発売された。これら 3 回蒸留法の泡盛開発では、基本技術については酒造所間で共有し「華やか」「マイルド」な商品設計という方向性を保ちつつ、それぞれの酒造所の創意工夫により酒質の差別化が試みられている。今回、これらの 3 回蒸留法を用いた泡盛群の特性を評価すると共に、本法に適した泡盛酵母の検討について報告する。

2. 方法

複数銘柄の 3 回蒸留泡盛、およびこれらの酒造所に対応する一般酒（1 回蒸溜酒）、さらに異なる蒸留方法である減圧蒸留泡盛を試料とした。泡盛の試作品作製は神村酒造における製造スケールにて実施した。泡盛香気成分の網羅的分析は、フラッシュ GC ノーズ HERACLES II（Alpha Mos）によって行った。

3. 結果・考察

それぞれの泡盛を試料として網羅的な香気成分分析を行った。その結果、GC における各香気成分由来ピークの主成分分析により、3 回蒸留酒、一般酒（1 回蒸溜酒）、減圧蒸留酒がグループごとに明確に区別されることが分かった。また、一般酒（1 回蒸溜酒）と比較して 3 回蒸留酒では酒造所による香気成分の違いが大きいことを示唆するプロットが得られた。一方、泡盛特徴香に着目した分析により、3 回蒸留酒は isoamyl acetate および ethyl butyrate の濃度が一般酒に比べて高く、2-Phenetyl alcohol および isoamyl alcohol の濃度が低いことがわかった。以上の結果から、3 回蒸留泡盛は共通する特徴香気成分を持ちつつ、各酒造所ごとの風味のバラエティーが比較的大きい泡盛であることが示唆された。

我々は、これまでにハイビスカス花より単離した酵母の育種を行い、ロイシン高含蓄酵母 T25 株を取得している。この酵母で醸造する泡盛では 3 回蒸留泡盛の特徴香でもある isoamyl acetate が親株に比べて高い濃度で含まれる*。今回、3 回蒸留泡盛の醸造に T25 株を用いて、香気成分分析を行った。その結果、isoamyl acetate 濃度は、同様に醸造した泡盛 101 号酵母と比較して 3 倍程度高いことがわかった。また、T25 株を用いた泡盛は、他の 3 回蒸留泡盛銘柄と比較しても isoamyl acetate 濃度が高いことがわかった。以上の結果から、T25 株は 3 回蒸留法の特徴を高められることから、3 回蒸留法の泡盛醸造に適した酵母であると考えられた。

*Abe, Toyokawa et al. 2019 Front. Genet.

Awamori, Three times distilled liqour, Flavors

発表責任者：塚原正俊（tsuka@biojet.jp）

講演番号：3A11a04
講演日時：3 月 27 日 10:03～ センター2 号館 A11 会場

本格焼酎・泡盛の品質を特徴付ける香気成分の閾値調査及び分類
Characterisation and threshold measurements of aroma compounds contributing to the quality of Honkaku shochu and Awamori
○長船 行雄、利田 賢次、韓 錦順、磯谷 敦子、向井 伸彦（酒類総合研究所）
○ Yukio OSAFUNE, Kenji TOSHIDA, Jinshun HAN, Atsuko ISOGAI, Nobuhiko MUKAI (National Research Institute of Brewing)

【背景・目的】
官能評価の体系を確立するためには、評価用語と対応する成分の解明が重要な課題となる。本格焼酎・泡盛の成分と官能評価に関する研究は大麦焼酎について報告がなされているものの、焼酎全般を対象とした体系的な研究は少ないのが現状である。これまでに当所においても本格焼酎・泡盛に含まれる香気成分について閾値等の検討を行ってきたが、これに加え、本研究では 16 成分について、統一した手法で検知閾値及び認知閾値、そして対応する官能評価用語の決定を行うことにより、本格焼酎・泡盛の品質を特徴付ける成分を解明することを目的とした。また、これまでに閾値が決定された成分を含めた 32 成分を用いて香気分類を実施することにより、フレーバーホイール作成の基礎となる情報の収集を実施した。
【方法】
過去の報告を参考に、ASTM E679-04(2011)、「強制選択による上昇系列の閾値測定法」により検知閾値及び認知閾値を調査した。各調査には、事前に嗅覚の確認試験に一定の基準で合格した当所職員 16 名以上が参加した。調査対象成分は 16 成分とし、溶媒には 25%エタノール水溶液を使用した。官能評価用語の決定には、各香気成分を香りが認知可能な濃度で添加した溶液をパネリストに供し、特性の把握により用語の抽出を実施した。また、香気分類の試験においても同様に、25%エタノール水溶液に各成分を添加したものを使用し、香りの質の相違あるいは類似によって複数のグループに分類することで試験を実施した。
【結果・考察】
本格焼酎・泡盛に含まれる 16 成分について、検知閾値及び認知閾値の決定を行った。得られた検知閾値を用いて、過去の本格焼酎・泡盛鑑評会出品酒の各成分の含有量を基に香気寄与度の指標である Odour Activity Value（＝各成分の含有量／検知閾値）を算出した。その結果、14 成分については Odour Activity Value の最大値が 1 以上となったことから、本格焼酎・泡盛の品質に寄与していると推定された。なお、調査を実施した 16 成分について特性の把握を実施することにより、対応する官能評価用語を抽出した。また、これまでに閾値調査を実施した成分を含めた 32 成分を用いて香気分類を実施することにより、フレーバーホイール作成の基礎となる結果を得た。

aroma compound, threshold, Honkaku shochu

発表責任者：長船行雄（y.osafune@nrib.go.jp）

講演番号：3A11a05
講演日時：3 月 27 日 10:14～ センター2 号館 A11 会場

製麹における酵素発現様式が麹構造に及ぼす影響
The effect of enyme expression pattern on physical structure during *koji* making
○田川 結希[1]、吉崎 由美子[2]、花城 勲[2]、奥津 果優[2]、二神 泰基[2]、玉置 尚徳[2]、髙峯 和則[2]([1]鹿大院・農、[2]鹿大・農)
○Yuki Tagawa[1], Yumiko Yoshizaki[2], Isao Hanashiro[2], Kayu Okutsu[2], Taiki Futagami[2], Hisanori Tamaki[2], Kazunori Takamine[2] ([1]Grad. Sch. Agri. Kagoshima Univ., [2]Fac. Agri. Kagoshima Univ.)

【目的】麹は、蒸煮米に麹菌を生育させたものであり、酒類などの発酵食品製造に用いられる重要な原料である。麹は、麹菌が生育時に生成したデンプンやタンパク質分解酵素類を多量に含むことから、主に発酵時の酵素剤としての役割が強い。しかしながら、酵母のアルコール発酵時に麹の代替として蒸米とこれら分解酵素を加えても、麹を用いた場合と比べて発酵速度は遅い。この理由の一つとして、麹作製（製麹）時に米のデンプン構造が、ある程度分解されていることに起因すると考えた。緩慢なアルコール発酵は、雑菌汚染の可能性を増加させ、安定した酒造りに支障をきたす恐れがある。そこで本研究では、製麹段階における酵素発現と麹のデンプンを主とする粒構造との関係性を調べ、さらに発酵に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。
【方法】焼酎用麹菌である白麹菌（AK345 株）を用いて製麹を行い、経時的（0、19、23、27、42 時間）にサンプリングし、酵素活性測定、電子顕微鏡観察および化学分析に用いた。さらに蒸米および麹の酵素消化性試験は、100℃にて 1 時間加熱処理することで麹および蒸米由来酵素を失活させた後、α-amylase およびプロテアーゼ酵素溶液を添加し、30℃で 24 時間静置後、上清に含まれる還元糖を測定した。また発酵試験では、泡盛製造方法を適応し、酵素消化性試験同様に両サンプルともに加熱処理後、酵素消化性試験と同様の酵素溶液に加えて、鹿児島 5 号酵母にて 30℃で 7 日間発酵させた。
【結果】製麹時において経時的にサンプリングし、酵素活性および糖組成等の経時変化を調べた。glucose および還元糖量は、製麹 27 時間まで増加を続け、その後ほぼ一定の値を示した。酸不耐性 α-amylase 活性は、製麹 23 時間まで増加し続け、その後低下した。一方、酸耐性 α-amylase 活性は、製麹段階の進行に伴った増加が認められた。麹酸度も製麹時間に依存して増加した。glucoamylase は、製麹 27 時間後から著しい増加が確認された。電子顕微鏡観察においても製麹 27 時間後にデンプン粒の顕著な分解が認められたことから、耐酸性 α-amylase と glucoamylase がデンプン構造に影響を与えることが示唆された。また酵素消化性試験によって、酵素分解の受けやすさを評価した結果、麹は蒸米に比べ、高い酵素消化性が認められた。さらに発酵試験においても発酵初日から、麹は蒸米に比べ発酵速度が速かった。このことから麹と蒸米のデンプンを主とする粒構造の違いが酵素消化性および発酵速度に影響することが確認された。今後、GC-MS 分析を行い、香りに及ぼす影響について調べる予定である。

koji, enzyme, structure

発表責任者：吉崎由美子（k7814020@kadai.jp）

講演番号：3A11a06
講演日時：3 月 27 日 10:35～ センター2 号館 A11 会場

黒麹菌低酸生成変異株の造成とその特徴付け

Breeding and characterization of a low acid producing mutant of Aspergillus luchuensis

○久貝 樹幹、穂坂 賢、進藤 斉、徳岡 昌文（東農大院農）
○Tatsumoto KUGAI, Masaru HOSAKA, Hitoshi SHINDO, Masafumi TOKUOKA (Grad. Sch. Agric., Tokyo Univ. of Agric.)

【目的】焼酎・泡盛製造に使われる黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* は多量のクエン酸を生成する特徴をもつ。最近の研究から、高いクエン酸生産性は、細胞膜上の輸送体が鍵であることが明らかとなったが、クエン酸生産に伴う生理的な変化についてはまだ不明な点が多い。本研究では、この課題に対する 1 つのアプローチとして、黒麹菌の低酸生成変異株の取得と、取得したクエン酸生成が抑制された株における代謝と酵素生産性の変化の解析に取り組んだ。

【方法】*A. luchuensis* var. *saitoi* の分生子に対し生存率 1%で UV を照射し、カゼイン培地での酸沈殿によるコロニー周縁の白濁を指標として、低酸生成変異株をスクリーニングした。液体培地（10%Glucose、0.4%Hipolypepton、0.01%KH_2PO_4、0.01%$MgSO_4・7H_2O$）で 6 日間振とう培養し培地酸度を調べた。菌体内代謝物は、培養菌体からクロロホルム・メタノール・水混合溶媒により抽出した。米麹はα化米 15 g を用いシャーレで製麹した。酸度測定及び酵素活性は所定分析法に基づき分析した。細胞内代謝物は LC-TOF/MS により分析し、代謝物の定量には HPLC を用いた。

【結果】スクリーニングの結果、液体培養において酸生成が親株の半分以下に低下する 4 株が得られた。細胞内代謝物について LC-TOF/MS のデータを主成分分析したところ、第一主成分は酸生成と関連しており、酸生成が低い株において多い特徴的なピークが見出された。化合物の同定を試みた結果、*m/z* 値が 565、606 の 2 つのピークは、標準品の MS/MS フラグメントとの比較から、UDP-Glucose、UDP-GlcNAc であったことから、低酸生成株においてこれらの化合物の細胞内量が多いことが示された。UDP-Glucose と UDP-GlcNAc は細胞壁成分の前駆体であることから、酸生成と細胞壁合成が関連していることが示唆された。また、最も酸生成能が低い K1Y 株は、米麹においても酸生成量が親株の 30%程度である一方で、α-Amylase、Glucoamylase、α-Glucosidase の活性は、それぞれ親株の 3.3 倍、1.9 倍、3.9 倍に増加していた。他の低酸生成変異株では酵素生産性の向上は確認できなかったことから、この特徴は K1Y 株に特有の変異によると考えられた。

Aspergillus luchuensis, Citric acid, Metabolome

発表責任者：徳岡昌文（m3tokuok@nodai.ac.jp）

講演番号：3A11a07
講演日時：3 月 27 日 10:46～ センター2 号館 A11 会場

泡盛醸造における *Aspergillus luchuensis* 由来フェノール酸脱炭酸酵素の 4-VG 生成への寄与
Contribution of *Aspergillus luchuensis* phenolic acid decarboxylase to the 4-VG production in awamori brewing

○眞榮田 麻友美[1,2]、本底 麻綸[2]、渡嘉敷 建孝[3]、後藤 正利[1,4]、水谷 治[1,2]、上地 敬子[2]、平良 東紀[1,2] ([1]鹿大院連農、[2]琉球大農、[3]石川種麹店、[4]佐賀大農)
○Mayumi MAEDA[1,2], Marin MOTOSOKO[2], Tatsunori TOKASHIKI[3], Masatoshi GOTO[1,4], Osamu MIZUTANI[1,2], Keiko UECHI[2], Toki TAIRA[1,2] ([1]Kagoshima Univ., [2]Univ. Ryukyus, [3]Ishikawatanekojiten, [4]Saga Univ.)

【目的】泡盛古酒の特徴香であるバニリンは，原料米中のフェルラ酸（FA）が醸造中に 4-ビニルグアヤコール（4-VG）へ変換され，貯蔵中に非酵素的酸化によって生成される。これまでに，醸造中の FA から 4-VG への変換は酵母や乳酸菌の代謝もしくは，蒸留時の酸と熱によるものと考えられてきた。*Saccharomyces cerevisiae* では phenylacrylic acid decarboxylase（PAD1）と ferulic acid decarboxylase（FDC1）が共同して FA から 4-VG を生成することが報告されている。一方で，*Aspergillus luchuensis* のゲノム上には，*S. cerevisiae* の *pad1* および *fdc1* と相同性を有する遺伝子と，それらとは全く相同性の無い細菌類および *Candida* 属の phenolic acid decarboxylase（PAD：フェノール酸脱炭酸酵素）と相同性を有する *pad* 遺伝子が存在する。我々は，これまでに実用菌株 *A. luchuensis* var. *awamori* ISH1 株（以下，ISH1 株）由来 PAD（AlPAD）が FA から 4-VG への変換反応を触媒すること，AlPAD が製麹中に発現・機能していることを明らかにしている。本研究では，泡盛醸造中の AlPAD の 4-VG 生成への寄与を明確にするために *alpad* 破壊株を作製し，醸造中の 4-VG 生成量を野生株と比較した。また，泡盛醸造中の蒸留時の熱による 4-VG 生成への影響を調べた。

【方法】*alpad* 破壊株の作製は ISH1 株を親株としてアグロバクテリウム法を用いて行った。醸造試験は以下のように行った。インディカ精白米を用いて野生株または *alpad* 破壊株で，30，42，54 または 66 時間製麹を行った。次に，得られた麹で仕込んだモロミを 2 週間発酵させた後，簡易蒸留器を用いて蒸留し，アルコール濃度 10%（w/w）まで採取した。RP-HPLC にて定量したモロミおよび蒸留液中の 4-VG 量を野生株と *alpad* 破壊株で比較することによって，AlPAD の 4-VG 生成への寄与率を算出した。蒸留時の熱による 4-VG 生成への影響を調べるために，*alpad* 破壊株で仕込んだモロミに FA を一定量添加した後，蒸留を行いモロミ中および蒸留液中の 4-VG 量を定量した。

【結果】醸造試験において，野生株で仕込んだモロミおよび蒸留液中の 4-VG 量は製麹時間 42 時間以降 66 時間まで著しく上昇したのに対し，*alpad* 破壊株の 4-VG 量は著しく低く，ほとんど変化しなかった。製麹時間 42 時間以降の麹を用いた泡盛醸造において，4-VG 生成における AlPAD の寄与率は 88-94%と算出された。また，蒸留時の熱による 4-VG 生成への影響を調べた結果，モロミ中の FA 量を 100%とした際，約 12%が 4-VG に変換され，その内 1/6 程度が蒸留液に移行することが分かった。本条件での蒸留時の熱による 4-VG 生成への寄与率は約 3-7%と算出された。これらの結果から，実用菌株 ISH1 を用いた泡盛醸造中の 4-VG 生成の主要因は AlPAD であることが明らかとなった。

Aspergillus luchuensis, phenolic acid decarboxylase, awamori

発表責任者：平良東紀（tokey@agr.u-ryukyu.ac.jp）

講演番号：3A11a08
講演日時：3 月 27 日 10:57～ センター2 号館 A11 会場

ミントビールの発酵による香気成分の変化について
Behavior of flavor compounds derived from mint during beer brewing.
○大沢 千晶、谷川 篤史、蛸井 潔、神前 陽一、石田 文人 (サッポロビール株式会社)
○ Chiaki OSAWA, Atsushi TANIGAWA, Kiyoshi TAKOI, Yoichi KOZAKI, Fumito ISHIDA (Sapporo Breweries Limited)

【背景・目的】
近年のクラフトビールブームにより、様々なタイプのビールテイスト飲料が醸造されている。その中には、ハーブやスパイスを用いることで素材由来の特徴的な香りや味がアクセントとなっている製品もある。ハーブの一種であるミントは、モヒートなどのカクテルやジンなどの浸漬酒といった酒類に広く用いられている。しかし、ビールをはじめとする醸造酒で用いられている例は少なく、発酵による香気成分の変化に関する知見は乏しい。本報告では、ミントを用いたビールテイスト飲料を醸造し、発酵による香気成分の変化とそれらが香味に与える影響を調査した。

【方法】
スペアミントおよびペパーミントをそれぞれ用いたビールテイスト飲料を醸造し、麦汁および製品に含まれるミントの主要な香気成分（リモネン、メントン、メントール、酢酸メンチル、カルボン）を SPME-GC/MS を用いて定量した。また、得られた分析値を元に、市販されているビールに対してメントン、メントール、酢酸メンチル、カルボンを添加し、官能評価を行った。

【結果・考察】
発酵前後でのミントの主要な香気成分を定量したところ、成分量に差はあるものの、スペアミントとペパーミント共通でメントールが減少し、酢酸メンチルが増加することが確認された。このことより、発酵によってメントールのエステル化が起きていることが示唆された。
また、市販品ビールに酢酸メンチルを添加して官能評価を行ったところ、「甘い香り」「フルーティーな香り」が有意に上昇した。さらに、メントンおよびメントール、カルボンを含むビールに酢酸メンチルを添加したところ、「清涼感」が有意に上昇した。このことより、発酵によって生成する酢酸メンチルは、①単体で「甘い香り」や「フルーティーな香り」を付与する効果、②メントン、メントール、カルボンとの共存により「清涼感」をエンハンスする効果を有すると考えられた。以上の結果、ミントを原料とするビールテイスト飲料は、酵母による発酵を介することで単にミントを溶解・浸漬した酒類とは異なった香味特徴を有することが示唆された。

beer, mint, menthyl acetate

講演番号：3A11a09
講演日時：3 月 27 日 11:08～ センター2 号館 A11 会場

味噌・醤油酵母 Zygosaccharomyces 酵母の接合及び、接合関連遺伝子発現制御

Gene regulation of mating type related genes of Zygosaccharomyces yeast

○黒木 克明、尾形 智夫（前橋工科大学大学院）
○Katsuaki KUROKI, Tomoo OGATA (Maebashi Institute of Technology)

【目的】*Zygosaccharomyces* 酵母は、味噌醤油製造に使用される酵母である。この酵母の接合は、古くから報告されているが[1)]、接合培地に醤油麹エキスの利用等が必要とされ、一般的な実験に使用するには難点があった。そこで、今回、*Zygosaccharomyces* 酵母の接合条件を再検討するとともに、接合性によって制御されると予想される遺伝子群の発現制御機構について調べた。
【方法】*Zygosaccharomyces* 酵母の接合は、薬剤耐性及び栄養要求性の相補を利用して、測定した。接合性 **a** で発現されると予想される *STE6* 遺伝子発現は、*Zygosaccharomyces* sp. NBRC1876 から、プロモーター領域をクローニングし、*lacZ* 遺伝子に接続させたレポーターアッセイによって測定した。
【結果】*Zygosaccharomyces* 酵母の接合は、接合培地を窒素飢餓培地にすることで確認された。接合性 a で、遺伝子発現がおこると予想された *STE6* 遺伝子プロモーターに接続させた lacZ 活性は、*Zygosaccharomyces* sp. NBRC1877 *ura*3Δ 株(*MAT***a**)を、窒素飢餓培地で培養することで、発現がみられた。*Zygosaccharomyces* sp. NBRC1876 *ura*3Δ 株(*MAT*alpha)では、窒素飢餓培地での培養でも、その発現は小さかった。接合性 alpha で、遺伝子発現誘導がおこると予想された *MF*alpha1 遺伝子は、*Zygosaccharomyces* sp. NBRC1876 *ura*3Δ 株(*MAT*alpha)を、窒素飢餓培地で培養することで、発現がみられ、*Zygosaccharomyces* sp. NBRC1877 *ura*3Δ 株(*MAT***a**)では、窒素飢餓培地での培養でも、その発現は小さかった。*Z. rouxii* の *STE6* 遺伝子プロモーターには、*Candida albicans* の *MAT***a2** 結合配列と類似するシス配列が見られた。*Z. rouxii* の *MF*alpha1 遺伝子プロモーターには、*S. cerevisiae* の MATalpha1 と DNA 結合タンパク質 Mcm1 の結合配列と類似するシス配列が見られた。現在、これらのシス配列が、遺伝子発現に関与しているかを検討している。なお、*Zygosaccharomyces* 酵母の接合遺伝子座 *MAT* には、*S. cerevisiae* とは異なり、HMG-box を有する MATa2 が存在する。接合性 **a** で、遺伝子発現誘導がおこると予想される遺伝子群は、そのプロモーター上のシス配列に、MATa2 が結合することで、遺伝子発現が誘導されると推察している。また、*Zygosaccharomyces rouxii* の基準株(type strain)の一つである *Z. rouxii* CBS732 由来の *Z. rouxii* DL2 株(*MAT* **a**)では、*STE12* 遺伝子にフレームシフト変異があり、野生型 *STE12* 遺伝子の導入により、接合能が回復し、かつ、*STE6* 遺伝子プロモーターに接続させた lacZ 活性が上昇した。

1) Mori, H. and Onishi, H. Appl. Microbiol. Vol.15, p928-934 (1967)

Zygosaccharomyces, mating, mating related genes

発表責任者：尾形　智夫（tomoo.ogata@maebashi-it.ac.jp）

講演番号：3A11a10
講演日時：3 月 27 日 11:19～ センター2 号館 A11 会場

黒酢発酵液由来乳酸菌の D-アミノ酸生成能評価と酵素学的解析
D-amino acids productivity and enzymatic analysis of lactic acid bacteria isolated from fermentation broth of rice black vinegar
○星 南穂子[1]、藤井 暁[2]、橋口 和典[2]、長野 正信[2]、亀谷 将史[1,3]、新井 博之[1,3]、石井 正治[1,3] ([1]東大院 農生科 応生工、[2]坂元醸造、[3]東大微生物連携機構)
○Naoko HOSHI[1], Akira FUJII[2], Kazunori HASHIGUCHI[2], Masanobu NAGANO[2], Masafumi KAMEYA[1,3], Hiroyuki ARAI[1,3], Masaharu ISHII[1,3] ([1]Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo, [2]Sakamoto Kurozu, Inc, [3]CRIIM, Univ. Tokyo)

壺造り純米黒酢醸造において、発酵過程初期から継続的に乳酸菌が検出される。乳酸は発酵液の pH を低下させ酢酸発酵に不要な細菌の繁殖を防ぎ、乳酸菌が生産するその他の物質は黒酢の呈味性などに関与している。本発表では、乳酸菌が生産する物質の中で、D-アミノ酸に着目した。黒酢は食酢の中でも D-アミノ酸を多く含むことが知られている。D-アミノ酸は呈味性に関与するだけでなく、人体内で重要な生理機能を担っていることも報告されている。一般に、生物体内で D-アミノ酸は L-アミノ酸からのラセミ化により合成されると考えられている。D-アミノ酸は細菌のペプチドグリカンの構成成分であることより、ほとんどの細菌がその生合成能を持っており、特にアラニンラセマーゼとグルタミン酸ラセマーゼは広く知られている。

過去に我々は D-アミノ酸高含有の熟成期黒酢発酵液について菌叢解析を行い、*Lactobacillus* 属の乳酸菌が優占化していたことを示している。そこで、熟成期発酵液から乳酸菌を単離し、そのうちの 7 株について D-アミノ酸の菌体外蓄積量を測定したところ、既知の高生産株と比べて D-Ala を多量に蓄積することを発見した。D-Ala は菌の生育に伴い蓄積し、培地に L-アミノ酸を添加すると D-Ala の蓄積量はさらに増加した(第 71 回日本生物工学会大会要旨集, 186)。

そこで、L-アミノ酸添加天然培地や黒酢発酵液を模した培地で黒酢由来乳酸菌株を培養し、菌体外への D-Ala 蓄積量を評価した。また、各培養で得られた株のラセマーゼ活性を測定・比較した。

本発表では、培地成分、培養条件と D-Ala 蓄積量、ラセマーゼ活性との関係について報告する。

black vinegar, lactic acid bacteria, D-amino acid

発表責任者：石井正治（amihii@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3A11a11
講演日時：3 月 27 日 11:40～ センター2 号館 A11 会場

豆乳凝固能を持つ酵母の分離とその性質

Isolation of soymilk curdling yeast and its characteristics

○山本 希、庄子 真樹、佐々木 瞳、金内 誠（宮城大食産）
○Nozomi YAMAMOTO, Masaki SHOJI, Hitomi SASAKI, Makoto KANAUCHI (Miyagi Univ.)

【目的】わが国では、大豆は味噌や醤油、豆腐、豆乳などの伝統的加工食品として食されてきた。大豆に含まれるタンパクは、アミノ酸スコアーは 100 と高く、栄養的にも優れている。近年では、大豆のタンパク質が持つ機能性が着目され、中性脂肪低下や、冠状動脈心疾患のリスク軽減作用などがあると報告されている。しかし大豆は、①独特な香気をもち、②このタンパク質はカルシウムやマグネシウムなどの金属イオンで凝固しており、③これら凝固物は硬く、崩れやすい性質を持つ。このため乳タンパク（カゼイン）凝固物のチーズのような食感を持たず、食品のバリエーションに乏しい。これらの問題点を解決する手段として微生物が生産する酵素に着目した。微生物による発酵過程で香味の改善や食感の改良も期待できると考えられる。そこで、天然界より、豆乳凝固酵素を生産する酵母の分離を目的とした。これにより乳から作られたチーズのような食感を有する食材を生産することを目指す。

本研究では、天然界より豆乳凝固能を有する酵母を分離し、その微生物学的同定を行うとともに、その酵母によって凝固した凝固物の物性をクリープメーターにて測定し、その特性や優位性を明らかにすることとした。

【方法】分離源として、土壌や果実など 182 サンプルを用いた。これを 5%エタノール含有 GYP 培地（1% グルコース、0.5% 酵母エキス、0.5% ポリペプトン、100ppm クロラムフェニコール、100ppm アンピシリン）にて 30℃、48 時間集積培養した。培養物は同組成の GYP 寒天平板培地（1.5%寒天）で画線培養を行い、単一コロニーを分離した。菌体は、検鏡により形態とスライドカルチャーによる偽菌糸形成について観察した。さらに、Fowell 培地（0.4%酢酸ナトリウム、2%寒天、pH6.7）にて胞子形成能を検討した。酵母培養により得られた凝固物の破断強度は、市販豆乳に酵母を接種後 30℃、48 時間培養して得られた凝固物を山電製 RE-3305 クリープメーターを用い測定した。

【結果】土壌 182 種のサンプルから、偽菌糸非形成であり、胞子形成能を持つなどの形態学的特性より食品用酵母である *Sccharomyces* 属に類似した 27 種の菌株を分離した。これらを豆乳で培養した結果、BB36 株が高い凝固性と良好な香気を示し、最終選抜株とした。この株の凝固特性を検討するために破断強度の測定を行った。一般的な充填豆腐の凝固剤であるグルコン酸で凝固させた豆乳凝固物とは相違が見られ、明確な破断点が見られず、物性の改良が示唆された。また、酵母の菌体内酵素を抽出し、得られた粗酵素でも凝固したことより、新規な豆乳凝固酵素の存在が示唆された。

yeast, curdling, soymilk

講演番号：3A11a12
講演日時：3 月 27 日 11:51～ センター2 号館 A11 会場

ドライエイジングにおける使用菌種の相異が熟成肉の品質に与える影響
Effects of fungal strains on the quality of dry aged beef
○秋葉 奏汰[1]、跡部 美樹雄[2]、村上 周一郎[1,2]([1]明治大農、[2]（株）ミートエポック)
○Sota AKIBA[1], Mikio ATOBE[2], Shuichiro MURAKAMI[1,2] ([1]Meiji Univ., [2]Meat epoch, Ltd.)

【背景・目的】
ドライエイジングによる熟成肉の製造では、ある種のカビが増殖することで品質が向上することが知られている。その際、日本では主にケカビと呼ばれる *Mucor* 属や *Helicostylum* 属の接合菌が増殖し、アメリカでは *Thamnidium* 属の接合菌が使われている。しかし使用菌種の相違が、熟成肉の品質にどのような影響を与えているのかは明らかにされていない。これまでに当研究室では、熟成肉表面に優占的に生育している微生物として *Helicostylum* sp. JW-1 株を分離・同定し、ドライエイジングを簡便に行えるツールとして、本菌の胞子を布に付着させた「エイジングシート」を開発してきた[1)]。本研究では、この JW-1 株とアメリカで使用されている *Thamnidium elegans* を用いて牛肉を熟成させ、その品質に与える影響を明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】
まず試験に用いる *T. elegans* を選抜した。製品評価技術基盤機構から購入した *T. elegans* 4 株について、平板培地およびオーストラリア産牛肉 （OG ビーフ） を用いた増殖試験から、最も生育の良かった 5429 株を、以後の実験に用いることにした。次に JW-1 株と 5429 株から回収した胞子を用いて製造したエイジングシートで OG ビーフを包み、恒温恒湿冷蔵庫（4℃、湿度 80～90%）で 30 日間熟成させた。熟成させていない肉（0 日目）と各カビで 10 日、20 日、および 30 日間熟成させた肉について、それぞれテクスチャーと遊離アンモニウムイオン（NH_4^+）濃度を分析した。テクスチャーをクリープメーターを用いて測定したところ、破断点における歪み率はすべてのサンプル間において有意な差は見られなかった。また破断点における荷重は各試料間のばらつきが大きく、用いた菌株での傾向を確認することはできなかった。遊離 NH_4^+濃度は、上記の試料に加え、肉を真空パックして保存したもの（ウェットエイジング)、牛肉を滅菌した布で巻いて保存したもの（コントロール）も調製し、陽イオンクロマトグラフで分析した。各試料から調製した肉抽出液に含まれる NH_4^+濃度を陽イオンクロマトグラフで定量した。その結果、熟成が進むにつれ両カビで熟成させた試料では、遊離する NH_4^+濃度が増加し、特に JW-1 株においてその増加は顕著であった。しかし、最終的に 30 日目には両菌株で同程度になることが明らかになった。また、ウェットエイジングでは遊離 NH_4^+濃度の増加は確認できず、コントロールでは、カビで熟成させたものと比較して少なかった。
1) 日本畜産学会第 122 回大会講演要旨, p. 185 (2017)

Thamnidium elegans, *Helicostylum sp.* , Aged beef

発表責任者：村上周一郎（smura@meiji.ac.jp）

講演番号：3A11a13
講演日時：3 月 27 日 12:02～ センター2 号館 A11 会場

ラッカーゼ処理によるショウガ粉末乳酸菌発酵物調製時の生育阻害の予防
Laccase treatment prevent lactic acid bacteria from growth inhibition of ginger powder
○桐生 高明[1]、木曽 太郎[1]、西村 政晃[2]、増田 隆史[3]、村上 洋[1]([1]大阪産業技術研究所、[2]Japan Ginger(株)、[3]LIKE TODO JAPAN 製薬（株））
○ Takaaki KIRYU[1], Taro KISO[1], Masaaki NISHIMURA[2], Takashi MASUDA[3], Hiromi MURAKAMI[1] ([1]Osaka Research Institute of Industrial Science and Technology, [2]Japan Ginger, [3]LIKE TODO JAPAN)

（目的）ショウガには指先などの末梢の体温を維持する機能が、乳酸菌は整腸作用などが報告されており、機能性表示食品などに利用されている。ショウガ粉末を乳酸菌で発酵させれば、その両方の機能性をもつ食品の製造が期待できる。さらに、発酵プロセスを導入することで、ただ単にショウガ粉末と乳酸菌粉末を混合しただけでは得られない効果が期待できる。しかし、ショウガ粉末に乳酸菌を接種したところ、ショウガの成分により乳酸菌の増殖が阻害され、発酵が進行しないことがわかった。我々は、ショウガ粉末による乳酸菌の増殖阻害を回避し、ショウガ粉末乳酸菌発酵物を生産する方法について検討を行った。
（方法）5%ショウガ粉末懸濁液または脱イオン水に 1、2.5、5%のβサイクロデキストリン（β-CD）を加え、4 時間静置した。1/10 量の 10×MRS 培地および炭酸カルシウム（50 mg/mL）を加え滅菌した。これに乳酸菌 *Lactococcus lactis* L57 株を植菌し、30℃、120 振幅/min で 24 時間培養し、生菌数を測定した。さらに、5%ショウガ粉末液または脱イオン水にラッカーゼダイワ Y120（天野エンザイム）を添加し、47℃、 120 振幅/min で 4 時間処理した。1/10 量の 10×MRS 培地および炭酸カルシウム（50 mg/mL）を加え pH を 6.2 に調整した。オートクレーブ滅菌の後、*L. lactis* L57 株を植菌し、30℃、120 振幅/min で 24 時間培養し、生菌数を測定した。
（結果）5%ショウガ粉末件濁液にβ-CD を加えなかった試料と 1%β-CD を加えた試料では、乳酸菌が生育しなかったのに対し、2.5%および 5%のβ-CD を加えることで、MRS 培地と同程度の乳酸菌の生育が確認された。同様に、ショウガ粉末をラッカーゼ処理すると、乳酸菌が生育するようになることが確認できた。これらの結果は、β-CD 処理及びラッカーゼ処理が、ショウガの抗菌成分を弱毒化することを示唆しており、これらの処理によりショウガ粉末を用いた乳酸菌発酵が可能になる。また、*L. lactis* 以外の乳酸菌でもラッカーゼ処理によりショウガによる生育阻害が回避できることがわかった。

ginger, lactic acid bacteria, laccase

発表責任者：桐生　高明（kiryu@omtri.or.jp）

講演番号：3A11p01
講演日時：3 月 27 日 13:50～ センター2 号館 A11 会場

阿波晩茶の発酵に関与する乳酸菌の地域特性

Regional characteristics of lactic acid bacteria involved in fermentation of Awa-bancha

○西岡 浩貴[1,2,3]、大野 智生[4]、丹羽 諒[5]、岩橋 均[2,4,5]、堀江 祐範[2,3] ([1]徳島県工技セ、[2]岐阜大院・連合農学、[3]産総研・健康工学、[4]岐阜大院・自然科技、[5]岐阜大・応用生物)
○Hiroki NISHIOKA[1,2,3], Tomoki ONO[4], Ryo NIWA[5], Hitoshi IWAHASHI[2,4,5], Masanori HORIE[2,3] ([1]Tokushima Prefectural Industrial Technology Center, [2]United Graduate School of Agricultural Science, Gifu Univ., [3]Health Research Institute, AIST, [4]Graduate School of National Science and Technology, Gifu Univ., [5]Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu Univ.)

１．目的

阿波晩茶は微生物の発酵によりつくられる後発酵茶である。徳島県の上勝町及び那賀町が主な産地であるが、距離が離れた三好市等他の地域でも生産されている。阿波晩茶は茹でて揉んだ茶葉を樽に詰め、2～4週間程度発酵させた後、天日乾燥させて製品となる。樽での発酵は乳酸菌を主とした嫌気発酵で、阿波晩茶の風味を形成する重要な工程である。発酵に関与する乳酸菌と茶葉の成分変化との関係が明らかになれば、阿波晩茶の品質安定化等に貢献できる。これまでの研究で、2018年に上勝町と那賀町から採取した試料を分析した結果、発酵時の菌叢は*Lactobacullus pentosus*が優占していることがわかった。本研究では、2019年に上勝町、那賀町、三好市から採取した試料について、乳酸菌の遺伝子解析や性質の評価を行った。また、茶葉の成分を分析し、発酵時の乳酸菌との関係を検討した。

２．方法

上勝町、那賀町、三好市の阿波晩茶生産者から、発酵が終了した直後の茶葉を採取し、試料とした。各試料についてMRS寒天平板を用いて乳酸菌を分離し、16S rRNAの配列比較により菌種を同定した。さらに、*Lactobacillus plantarum*グループに同定された菌株に対しては、*recA*遺伝子を標的としたmultiplex PCRにより近縁種の分離を行った。分離した乳酸菌について、API50CHを用いて糖の資化性を評価した。また、茶葉について、有機酸、アミノ酸、カテキン類の分析を行った。

３．結果と考察

分離された乳酸菌について16S rRNAの配列比較及び*recA*遺伝子を標的としたmultiplex PCRにより同定したところ、上勝町と那賀町から採取した試料は2018年と同様に、2019年の試料でも*L.pentosus*が優占していたが、三好市から採取した試料では*L.plantarum*が優占していた。分離された乳酸菌について糖の資化性を評価したところ、*L.pentosus* NBRC 106467^{T}と阿波晩茶から分離された*L.pentosus*では利用できる糖のパターンがやや異なる傾向にあった。また、茶葉の成分分析では、発酵により乳酸や酢酸が増加し、アミノ酸は減少傾向にあり、カテキン類は組成が変化した。これらの結果から、阿波晩茶の発酵時、地域に生息している*L.pentosus*や*L.plantarum*を優占種とした菌叢により、風味が形成されることが示唆された。

Awa-bancha, Post-fermented tea, Lactic acid bacteria

発表責任者：西岡浩貴（nishioka@itc.pref.tokushima.jp）

講演番号：3A11p02
講演日時：3 月 27 日 14:01～ センター2 号館 A11 会場

石鎚黒茶の乳酸菌ゲノムを探求する

Genome sequence of lactic acid bacteria in Ishizuchi-kurocha

○丹羽 諒[1]、西岡 浩貴[2,3,4]、岩橋 均[1,3]、堀江 祐範[3,4] ([1]岐阜大応用生物科学部、[2]徳島県工技セ、[3]岐阜大院・連合農学、[4]産総研・健康工学)
○Ryo NIWA[1], Hiroki NISHIOKA[2,3,4], Hitoshi IWAHASHI[1,3], Masanori HORIE[3,4] ([1]Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu Univ., [2]Tokushima Prefectural Industrial Technology Center, [3]The United Graduate School of Agricultural Science, Gifu Univ., [4]Health Research Institute, AIST)

１．目的

石鎚黒茶は無形民俗文化財に登録された愛媛県特産の後発酵茶であり、好気・嫌気2段階発酵を行うことで知られている。このうち、嫌気発酵の過程にて乳酸菌が優占種になることが16S rRNAアンプリコンシーケンスにより確認している。乳酸菌が発酵食品の製造過程において優占種として生育できる理由の一つに抗菌ペプチドのバクテリオシンを挙げることができ、それぞれの発酵食品に適した菌株により存在するバクテリオシンの種類や配列が異なることが報告されている。我々は石鎚黒茶の生産過程でバクテリオシン遺伝 子が蓄積されることを確認している。そこで、本研究では石鎚黒茶から単離された*Lactobacillus plantarum* IY01511のゲノムをシーケンスし、それぞれの遺伝的特性を確認した。また、アノテーション結果より*Lactobacillus plantarum* IY01511の*pln*遺伝子クラスター構造を決定した。

２．方法と結果

単離した乳酸菌からExtrap Soil DNA Kit Plus Ver.2を用いてDNAを抽出した。これをillumina社MiSeqによりシーケンスした。ここで得られたデータはTrimmomatic v0.39によりクオリティーフィルタリングし、Unicycler v0.4.8によりアセンブルした。ドラフトゲノムはDFAST (https://dfast.nig.ac.jp/) によりアノテーションし、*pln*遺伝子群の構造を確認した。

De novo アセンブリの結果より、44本のコンティグを得ることができ、ゲノムサイズは約3.23Mbpであった。このドラフトゲノムのうち*pln*遺伝子として*plnA, plnB, plnC, plnD, plnEF, plnH, plnJ, plnL, plnM, plnP, plnU, plnV, plnW*の13種類の*pln*関連遺伝子が確認された。また、16S rRNAの完全配列をBLASTにより相同性検索したところ*Lactobacillus plantarum* IY01511は過去に報告されている*Lactobacillus plantarum* CIP 103151に近い性質を持つと示唆された。現在は発酵食品から分離した*Lactobacillus*属細菌のゲノム解析を行っており、本講演において併せて報告する。

Lactobacillus plantarum, Genome Sequencing, Bacteriocin

発表責任者：丹羽諒（v8024064@edu.gifu-u.ac.jp）

講演番号：3A11p03
講演日時：3 月 27 日 14:12～ センター2 号館 A11 会場

紀州なれずし発酵時の細菌叢に関する研究

Studies on microbiota during Kishu-Narezushi fermentation

○大野 智生[1]、久保 実希[2]、シャプトリ ヨラニ[3]、岩橋 均[1,2,3] ([1]岐阜大院自科技、[2]岐阜大応生、[3]岐阜大院連農)
○Tomoki OHNO[1], Miki KUBO[2], Yolani Syaputri[3], Hitoshi IWAHASHI[1,2,3] ([1]Graduate School of National Science and Technology, Gifu Univ., [2]Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu Univ., [3]Graduate School of Agricultural Science, Gifu Univ.)

1. 目的

紀州なれずしは, 微生物発酵を利用して作られるなれずしの一種であり, 和歌山県の伝統食品として知られている. 塩蔵した鯖を米飯に乗せ, ダンチクの葉で包んで一週間ほど熟成させることで作られ, 発酵によって生まれる酸味と独特の風味を特徴としている. これまでの研究で, 紀州なれずしの発酵形態を調べるために次世代シーケンサーを使用した細菌叢解析を既に行っており, 発酵後試料(2018年度製造)において*Lactobacillus*属細菌の豊富な存在が示唆されている. 本研究では, ダンチク試料, 発酵前後のなれずし試料に対して細菌叢解析を行い, 紀州なれずしの発酵の動態について検討した. また, 2019年度製造のものと2018年度製造のもので細菌叢を比較し, 紀州なれずしにおける製造年度による細菌叢のばらつきについての検討を行った.

2. 方法

発酵前, 発酵後の紀州なれずし(2019年度製造, 和歌山県和歌山市, 弥助寿司), 及びなれずし製造工程で使用されるダンチクの葉(漬け込み前)を試料とした. 各試料について, DNA抽出の後, 16SrRNA遺伝子v3-v4領域のPCR増幅を行い, 次世代シーケンサー (illumina MiSeq) による16S rRNA遺伝子アンプリコン解析を行った. なれずし試料については米部分, 魚部分を分けて解析に用いた.

3. 結果

配列決定, 分類推定の結果, 発酵前試料と比較し, 発酵後試料で*Lactobacillus*属細菌由来と推定される配列の相対存在比が大きく上昇していることが確かめられた. ダンチク葉試料については,ごく低い割合で*Lactobacillus*属細菌由来配列の存在が確認された. 発酵後試料の製造年度による比較では, 2018年度試料と2019年度試料で*Lactobacillus*属細菌の高い相対存在比は共通していたが, 2019年度試料においてのみ*Klebsiella*属, *Leuconostoc*属細菌の高相対存在比が確認されるなど, 細菌叢に違いが見られた. 現在, 多様性指標の計算など, より詳細な試料間での細菌叢比較を検討している.

Narezushi, Microbiota, Fermentation

発表責任者：大野 智生（ohnotomoki2018@gmail.com）

講演番号：3A11p04
講演日時：3 月 27 日 14:23～ センター2 号館 A11 会場

伝統的無塩発酵漬物「すんき」の乳酸菌叢と成分組成の解析
Bacterial community structure and chemical composition of *sunki*, a traditional unsalted pickle of fermented turnip leaves

○冨田 理[1]、渡辺 純[1]、中村 敏英[1]、遠藤 明仁[2]、岡田 早苗[3,4]([1]農研機構 食品研究部門、[2]東京農業大学、[3]木曽町、[4]高崎健康福祉大学)
○ Satoru TOMITA[1], Jun WATANABE[1], Toshihide NAKAMURA[1], Akihito ENDO[2], Sanae OKADA[3,4] ([1]Food Res. Inst., NARO, [2]Tokyo Univ. Agric., [3]Kiso Town, [4]Takasaki Univ. Health Welfare)

【背景・目的】すんきは長野県木曽地方に伝わる地域伝統発酵食品の一つである。蕪（カブ）の葉を乳酸発酵させることにより無塩でありながらも保存性を高めた漬物であり、冬季の貴重な保存食として生産されてきた。すんきは地域固有の食文化として、また健康的な食品として貴重な資源である一方で、乳酸菌叢や成分組成に関する学術的知見には乏しい。過去の研究例では、数点の試料について解析が行われた報告がみられる。しかし、すんきは発酵スターターを使用せずに自然発酵で生産されるため、菌叢は製品ごとに異なって多様化していると予想される。実際に、我々の先行研究において 28 点のすんきのメタボローム解析を行った結果、菌叢の違いを示唆すると考えられる成分組成の多様性を確認した [1)]。そこで本研究では、多検体のすんきに対して次世代シークエンサーによる包括的解析を行い、乳酸菌叢の多様性を明らかにすることを目的とした。
【方法と結果】木曽町において各家庭で生産された 31 点の自家製すんきを収集した。それらの漬け汁から総 DNA を抽出し、Illumina のプロトコールに従って 16S rRNA 遺伝子の V3–V4 領域のアンプリコン解析を行った。シークエンスデータからの amplicon sequence variant (ASV)の生成等には QIIME2 を用いた。解析の結果、ほぼすべての試料が *Lactobacillus* 属単独で 90%の占有率を示した。しかし、各試料の ASV の組成を比較したところ、菌種レベルでの相違があることが示唆された。そこで、UniFrac-主座標分析および階層的クラスター解析を用いて各試料の ASV 組成の類似性を解析したところ、各試料の菌叢は大きく 3 つのタイプ（A、B、および C）へと分類された。タイプ A には *L. fermentum* が優勢菌種として存在し、*L. delbrueckii*、*L. reuteri*、*L. crispatus*、*L. intestinalis*、*L. gasseri* などと共に菌叢を構成していた。タイプ B と C は *L. fermentum* の占有率が小さく、その代わりに、タイプ B では *L. delbrueckii* が単独で約 90%の占有率を示し、タイプ C では *L. plantarum* 系統群と *L. buchneri* 系統群の乳酸菌種が菌叢を構成していた。これらの結果により、すんきの菌叢の多様性と菌種構成の傾向が明らかとなった [2)]。また、同じ試料を用いてメタボローム解析を行った結果、3 つのタイプ間に有機酸やアミノ酸信号強度の有意差が示されたほか、*L. fermentum* の占有率と pH との間に相関性が認められた（$R = 0.643$）。こうした包括的解析法は菌叢と成分との関連性解明に有効であり、本研究の知見は天然の菌叢をモデルとした複合系発酵スターターに活用できると期待される。

参考文献： 1) Tomita et al., *Food Chem.*, 258, 25-34, 2018
2) Tomita et al., *J. Biosci. Bioeng.* (in press)

fermented food, lactic acid bacteria, metagenomic analysis

発表責任者：冨田 理（s.tomita@affrc.go.jp）

講演番号：3A11p05
講演日時：3 月 27 日 14:34～ センター2 号館 A11 会場

発酵千枚漬と甘酢千枚漬の乳酸菌叢の比較

Comparative analysis of lactic acid bacteria in fermented-type and vinegar-type senmaizuke pickels

○井口 博之（京都先端大・バイオ環境）
○Hiroyuki IGUCHI (Kyoto Univ. Adv. Sci.)

【背景】京都の代表的な漬物である千枚漬は、蕪の下漬けと本漬けを経て作られる。下漬けでは蕪に塩を加えて漬け、本漬けでは調味液を加えて漬ける。本漬けに酢を加える「甘酢千枚漬」が現在は主流となっている。酢を加えず乳酸発酵を進める「発酵千枚漬」が元来の製法であるが、発酵タイプは今ではごく一部の店舗が製造するのみである。本研究は伝統の発酵製法の微生物学的特徴を明らかにするため、亀岡市の漬物店（K 店）が製造する「発酵千枚漬」「甘酢千枚漬」の発酵過程を解析した。比較のため、あわせて各社の千枚漬の解析も行った。
【結果】各社の千枚漬け製品を通常に冷蔵保存すると、甘酢千枚漬は pH がほぼ変化しなかったのに対し、発酵千枚漬は経時的な pH の低下が認められた。乳酸菌数を調べると、発酵千枚漬は経時的に菌数が増加していたことから、発酵千枚漬は発酵が続いていることが明らかになった。次に、次世代シークエンサーを用い、K 店の発酵千枚漬の菌叢解析を行った。下漬け中には多様な細菌が存在していたが、本漬け・冷蔵保存の過程でそれらは菌叢を変えながら存在割合を減らし、一方で乳酸菌が増加していた。乳酸菌は、本漬中には *Leuconostoc* 属が最優勢であったが、保存中に *Lactobacillus* 属が優勢となり全細菌の半分程を占めた。他社の甘酢千枚漬では、乳酸菌以外の細菌種は少なく、*Lactobacillus* 属または *Leuconostoc* 属が最優勢であり、乳酸菌が全細菌の 9 割以上を占めていた。発酵／甘酢の比較により、発酵千枚漬に特有の菌種も見出した。続いて、千枚漬より分離した乳酸菌の生育特性を調べた。発酵後期に相当する低 pH では、*Lactobacillus* 属は増殖できたが、*Leuconostoc* 属は増殖できなかった。このことから、発酵千枚漬の発酵後期に *Lactobacillus* 属が増加したのは、耐酸性の能力が一因と考えられた。発酵千枚漬と甘酢千枚漬の由来によっては、乳酸菌の生育 pH の特徴の違いは見られなかった。

senmaizuke pickle, lactic acid bacteria

発表責任者：井口　博之（iguchi.hiroyuki@kuas.ac.jp）

講演番号：3A11p06
講演日時：3 月 27 日 14:45～ センター2 号館 A11 会場

商業的に生産されるぬか漬け漬物製造中の菌叢が与える成分への影響

The effect of microbiome on chemical components of pickles during the commercial production with rice-bran bed

○澤田 和典[1]、小谷野 仁[2]、山本 希[2]、山田 拓司[2] ([1](株)ぐるなび、[2]東工大生命理工学院)
○Kazunori SAWADA[1], Hitoshi KOYANO[2], Nozomi YAMAMOTO[2], Takuji YAMADA[2] ([1]Gurunavi, Inc., [2]Tokyo Institute of Technology)

【背景と目的】糠漬けに使われる糠床は乳酸菌をはじめとするグラム陽性菌だけでなく、酵母やグラム陰性菌がバランスよく存在することで独特の味や香りを有するようになると考えられている。しかしながら、商業的な糠漬けの生産にあたってはこうした複雑な菌叢によって起こる発酵の制御が難しいとされ、品質管理の観点からもより詳細な知見が求められている。そこで、実際に商業的に生産された糠漬けがどのような菌叢変化を経て生産されているかについて知見を得ることを目的とした。
【方法】本研究では商業的に製造されている糠漬けのたくあんのうち、原料となる大根が収穫され、漬け込まれる冬に寒冷な地域と温暖な地域それぞれ 3 社にご協力いただき、製造工程中のサンプルを入手した。糠漬けのたくあんは、大根の収穫、大根の乾燥、糠への漬け込み、漬け上がり後の取り上げの 4 工程からなるが、それぞれの工程でサンプルの提供を受けた。サンプル中の菌叢を解析するとともに、漬物の有機酸・アミノ酸の定量を行い比較した。
【結果と考察】漬け込み工程における製造環境の違いによって菌叢に差異が生じ、漬物の成分に差異を与えていると考えられた。その中でも非乳酸菌が漬物の成分に影響を与える可能性が示された。寒冷な環境でつけた糠漬けたくあんでは乳酸菌以外のグラム陽性菌やグラム陰性菌を含む複雑な菌叢がグルタミン酸濃度を低下させた一方、温暖な環境でつけた糠漬けたくあんでは、グラム陰性菌である好塩細菌が漬物中のグルタミン酸濃度を上昇させた可能性が示唆された。グラム陰性菌は腐敗の原因菌として扱われることが多いが、漬物の味にも関与しうることが示され、漬物の品質管理の観点からも重要な視点となることが期待される。

Pickle, Rice-bran bed, Microbiome

発表責任者：澤田 和典（sawada-ka@gnavi.co.jp）

講演番号：3A11p07
講演日時：3 月 27 日 15:06～ センター2 号館 A11 会場

複合微生物系を用いたメタ発酵の制御因子の解明による選択的 L-乳酸生産

Elucidation of control factors for selective production of L-lactic acid by meta-fermentation with complex microbial system

○関谷 和真[1]、石田 勇貴[1]、木村 知弘[1]、宮本 浩邦[2]、田代 幸寛[1]、酒井 謙二[1]([1]九大院・生資環、[2]理研・生命医科学)
○Kazuma SEKIYA[1], Yuki ISHIDA[1], Tomohiro KIMURA[1], Hirokuni MIYAMOTO[2], Yukihiro TASHIRO[1], Kenji SAKAI[1] ([1]Grad. Sch. Bioresour. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ., [2]IMS,RIKEN)

背景：本研究室では、複合微生物系を制御することで有用な有機酸やアルコールを生産する過程をメタ発酵と定義している。メタ発酵は、従来の単一微生物の発酵とは対照的な特徴を有しており、滅菌が不要、コストが安価、複合基質が利用可能といった利点がある。しかし、発酵制御が困難であるため、メタ発酵に影響を及ぼす制御因子の特定を行っているが、知見は圧倒的に少ない。先行研究ではメタ発酵の制御因子として種菌と温度が発酵産物に及ぼす影響を調査した。その結果、常温域では発酵産物が複雑化していたが、高温域ではどの種菌を使用しても、主な発酵産物は生分解性プラスチックの原料となる光学活性な L-乳酸に単一化された。しかし、単一化の原因は解明されておらずメタ発酵の制御因子の特定に至っていない。そこで本研究では、発酵因子として種菌、温度、さらに培地にも着目し、発酵産物、菌叢、栄養源の相関関係を明らかにすることでメタ発酵の制御を試みた。
実験方法・結果：メタ発酵の制御因子として、まず温度（30,37,40,45,50,55,60,65℃）と種菌（消化液肥、堆肥 A、堆肥 B、堆肥 C）をそれぞれ変化させて、未滅菌の糖化処理した生ごみ培地を用い pH 振動制御下で回分発酵を行い、生産物の定量と同時に，16S rRNA アンプリコン解析により菌叢の遷移を追跡した。その結果、30～40℃では種菌によって生産物と菌叢が異なった。生産物は酪酸、D-乳酸、L-乳酸、酢酸と多様であり，主に常温性の乳酸菌が主要菌として菌叢を形成した。一方、45℃では著量の光学活性な L-乳酸が蓄積し、この場合 *Bacillus coagulans* が最優先菌であった。また，50℃ではいずれの種菌を用いても L-乳酸がさらに高い選択性で蓄積しており、*B. coagulan*s がほぼ 100%の占有率を示し、菌叢と生産物が単一化される結果となった。さらに 55℃では 50℃と同様の生産物であったが、発酵前半から菌叢の変化が見られ、特に堆肥 B で菌叢変化が顕著であった。また、60℃と 65℃では糖消費、生産物の蓄積がほとんど見られなかった。

次に，メタ発酵に及ぼす培地の影響を検討するために生ごみ培地に代えて、グルコースを炭素源とする半合成培地（Lidan 培地および MRS 培地）を用いて 50℃で回分発酵を行い、同様に発酵産物と菌叢解析を行った。結果、半合成培地を用いても生産物に違いは見られず最優先菌は同一であったが，発酵後半には乳酸が減少し、酪酸や酢酸などが生ごみ培地の場合よりも多く蓄積し、*Clostridium* 属細菌が増加した。これは、グルコースの枯渇により、乳酸が消費されていることが考えられた。このように、培地中に存在する炭素源の種類により菌叢が変化した。よって、炭素源の種類が新たなメタ発酵の制御因子として示唆された。現在、グルコースではなく、他の炭素源の使用を検討している。

complex microbial system, lactic acid production, 16S rRNA amplicon sequencing

発表責任者：関谷和真（sekiya.kazuma.085@s.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3A11p08
講演日時：3 月 27 日 15:17～ センター2 号館 A11 会場

酪酸産生菌のオリゴ糖代謝と糖加水分解酵素の解析
Oligosaccharide metabolism and glycosyl family proteins in butyrate producing gut microbes
○丹野 広貴[1]、藤井 匡[2]、前野 慎太朗[1]、平野 勝紹[2]、栃尾 巧[2]、遠藤 明仁[1] ([1]東農大生物産業、[2]物産フードサイエンス株式会社)
○Hiroki TANNO[1], Tadashi FUJII[2], Shintaro MAENO[1], Katsuaki HIRANO[2], Takumi TOCHIO[2], Akihito ENDO[1] ([1]Tokyo Univ. of Agric., [2]B Food Science Co., Ltd.)

【背景と目的】
酪酸産生菌は近年有用性が注目されている腸内細菌であり、それらにより産生される酪酸はヒト結腸上皮細胞で他の短鎖脂肪酸よりも優先的に利用され、大腸炎やアレルギーの抑制に関与するなどの報告がある。しかし、培養が困難であるため栄養源となるオリゴ糖代謝の詳細は明らかになっていない。我々の先の研究ではヒト腸内で最も主要な酪酸産生菌である *Faecalibacterium prausnitzii* や *Anaerostipes* はフルクトオリゴ糖(FOS)で顕著に生育し、ラフィノース(Raf)やキシロオリゴ糖(XOS) は代謝しないという特徴をもつ一方で、*Agathobacter rectalis* や *Roseburia* には FOS を代謝せず Raf や XOS を代謝する菌種や用いたオリゴ糖全てを代謝した菌種も存在し、菌種間でオリゴ糖代謝能には大きな差異がみられた。また各オリゴ糖による生育度と酪酸産生量には大きな相関があった。本研究では、ゲノム情報に基づき酪酸産生菌の潜在的なオリゴ糖代謝能を比較することで、オリゴ糖摂取による酪酸産生菌の生育促進メカニズムの一端を明らかにすることを目的とした。
【実験方法、結果及び考察】
先の研究で糖代謝試験を行ったヒト腸内で主要な酪酸産生菌 14 菌種のうち、公開されていた 10 菌種のゲノムデータをデータベースより取得した。またゲノムデータが公開されていなかった 4 菌種については新たにドラフトゲノムを決定し、解析を行った。ゲノムサイズ及び遺伝子数は系統群ごとに異なる特徴を示した。COG による遺伝子の機能分類では、我々が先の研究で用いたオリゴ糖全てを代謝しなかった菌種は、糖の輸送と代謝に関わる遺伝子が少ないという結果になった。続いて CAZy を用いて糖加水分解酵素(GH)の抽出を行った。その結果、先の研究で FOS のみを代謝した菌種は FOS 代謝に関わると考えられる GH32 を有していたが、XOS 代謝に関わると考えられる GH43 などは有していなかった。一方で FOS を代謝せず Raf もしくは XOS を代謝した菌種の多くはそれらを両方とも有していた。用いたオリゴ糖全てを代謝した菌種はそれらを含め他にも様々な GH を有しており、いずれのオリゴ糖も代謝しなかった菌種は GH の総数が非常に少なかった。また各 GH の有無と総数を階層クラスタリングにより数値分類すると、実際の糖代謝試験の結果と相関がみられた。これらの結果より、酪酸産生菌は多様なオリゴ糖代謝能を持ち、異なるオリゴ糖の摂取は異なる酪酸産生菌の生育を促進させる可能性が示唆された。

butyrate producer, oligosaccharide, glycosyl hydrolase

発表責任者：遠藤　明仁（a3endou@nodai.ac.jp）

講演番号：3A11p09
講演日時：3 月 27 日 15:28～ センター2 号館 A11 会場

蒟蒻芋麹による蒟蒻マンナンの加水分解と多様な用途開発

Taro koji of Amorphophalus konjac and hydrolysis of konjac polysaccharides for various products of biotechnological interest

○足立 収生[1]、有馬 秀幸[2]、種場 理絵[2]、田中 淳也[2]、片岡 尚也[1]、赤壁 善彦[1]、松下 一信[1]、薬師 寿治[1] ([1]山口大農、[2]山口県産技セ)
○ Osao ADACHI[1], Hideyuki ARIMA[2], Rie TANEBA[2], Junya TANAKA[2], Naoya KATAOKA[1], Yoshihiko AKAKABE[1], Kazunobu MATSUSHITA[1], Toshiharu YAKUSHI[1] ([1]Yamaguchi Univ., [2]Ind. Technol. Inst. Yamaguchi Pref.)

【背景・目的】蒟蒻（コンニャク）芋(*Amorphophallus konjac*)の多糖類、蒟蒻マンナンはマンノースとグルコースを主成分に β-(1→4) 結合による主鎖を、部分的に β-(1→3) 結合や β-(1→6) 結合による分枝鎖を構成する。 α-(1→4) 結合や α-(1→6) 結合からなるデンプンはヒト、動植物や微生物の消化酵素で消化されるが、蒟蒻芋は殆んど消化されない。それ故、蒟蒻芋の用途は食材コンニャク製造に限定されてきた。本研究の目的は、加水分解酵素の攻撃に難攻不落な蒟蒻マンナンを蒟蒻芋麹で消化し、その生成物の多様な用途開発を行うことにある。 β
【方法・結果】蒟蒻芋を水洗・薄切りし、長期保存できるように風乾した。蒟蒻芋切片を殺菌したのち、数十株の糸状菌を接種して生育を観察した。蒟蒻芋切片上で生育できないものや胞子をすぐに着生するものに比べ、菌糸を全面に伸長して生育できる菌株を探索し、最終的に *Aspergillus luchuensis* AKU 3302 を選択した。殺菌した蒟蒻芋切片に種菌を接種して、麹蓋に広げて 30˚C で培養した。約 3 日間の培養によって、胞子の着生が見られず菌糸がよく生育した蒟蒻芋麹が得られた。麹を水に浸漬して、55˚C で加水分解して得られる上澄みの糖濃度を検糖計で、糖組成を HPLC によって調べた。糖濃度の増加が見られなくなった時点を加水分解の終点とした。*A. luchuensis* で作った蒟蒻芋麹の加水分解液が最も高い糖濃度を示し、米麹に広く使われる *A. oryzae* などの菌株は蒟蒻芋多糖類をよく加水分解できなかった。加水分解液中の糖類はマンノースとグルコースが主成分で、酵母の添加でアルコール発酵した。酢酸耐性酵母 *Saccharomycodes ludwigii* AKU 4400 と酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* SKU 1108 とによって加水分解液を並行複発酵[1)] すると食酢が製造できた。加水分解液からマンノースを単離し、酢酸菌で酸化発酵するとマンノン酸や 5-ケトマンノン酸など、これまで産業的に製造・利用されていない酸化生成物が得られた。
【考察】糖質科学の主役はグルコースであり、マンノースが注目されることはなかった。マンノースの接触水添で得られるマニトールには、輸液、甘味料、保湿剤としての用途が期待される。さらに、マニトールを酸化発酵すると高収率で果糖が得られる。これは五炭糖異性化酵素による現行のグルコースの異性化よりもはるかに高効率・高収率な果糖製造法となる。蒟蒻芋麹の使用によって蒟蒻芋に期待できる多様な用途開発を提案する。

[1)]佐伯明比古、*日食工誌*、**37**, 722-725 (1990).

Amorphophallus konjac, Aspergillus luchuensis, konjac mannan

発表責任者：足立収生（osao@yamaguchi-u.ac.jp）

講演番号：3A11p10
講演日時：3 月 27 日 15:39～ センター2 号館 A11 会場

清酒製造の上槽工程で使用された濾布に残留している香気成分のクラスター解析

Cluster analysis of flavor components absorbed to filter cloth used in operation in filtration of finished main mash in sake brewery

○伊藤 一成、谷野 有佳、花房 裕子、三宅 剛史（岡山県工技セ）
○Kazunari ITO, Yuka TANINO, Hiroko HANAFUSA, Tsuyoshi MIYAKE (Industrial Technology Center of Okayama Prefecture)

【目的】 清酒の香りは品質を決定づける要因の 1 つであり、オフフレーバーが感じられると、その評価が著しく低下する。清酒のオフフレーバーの原因の 1 つとして、もろみから清酒と酒粕に分離する上槽工程で使用される濾布からの移り香がある。濾布は使用後、酒粕を剥がし丹念に洗浄して再度利用されるが、繰り返し使用するうちに洗浄しきれなかった成分が織目や布繊維に残留・蓄積してしまうことがある。このような濾布を次の上槽で使用したとき、一部の成分が清酒に溶出しオフフレーバーの原因となることが指摘されている。濾布由来のオフフレーバーは、清酒や酒粕に由来する様々な残留物の酸化成分であると認識されているが、詳細な解析はあまり行われていない。そこで我々は、具体的にどの様な成分が濾布からの移り香となり得るのかを調べていくために、先ず始めに本研究において、実際の製造現場で使用されている濾布に残留している香気成分の分析を行い、素材ごとの比較を行った。
【方法】 岡山県内の清酒製造会社で洗浄後保管されていた使用済みの濾布 18 試料（綿とさらし、PVC 繊維、PET 繊維（ポリエステル繊維）の濾布 4 種類）について分析を行った。濾布からの香気成分の抽出は、加熱により吸着成分を脱着後パージガスによるヘッドスペース相の捕集管への濃縮を行う DHS（ダイナミックヘッドスペース）法で行い、捕集濃縮された全成分を加熱脱着後 GCMS により分離検出した。得られたデータから階層的クラスター解析を行い、NIST ライブラリーと香気成分データベースによる成分の同定を行った。
【結果】 濾布を直接用いた DHS-GCMS により多数の成分が検出でき、今回分析した 18 試料のどれか 1 つでも検出された成分は 400 を超えた。このうち、検出強度が高く明らかに濾布に由来すると思われた 71 成分から、素材ごとで有意差が見られた 60 成分を抽出した。この 60 成分について階層的クラスター解析を行ったところ、PVC や PET 繊維の濾布は綿やさらしの濾布と比べ残留している香気成分が全体的に多く、4 種の素材ごとで異なるクラスターを形成した。これらの各成分について、NIST ライブラリーと香気成分データベースでサーチしたところ 40 成分同定できた。同定成分について、それぞれの素材ごとで内部標準に対する相対強度で定量比較を行い、濾布の素材別で残留している香気成分の特徴に関して考察した。

filter cloth, DHS-GCMS, cluster analysis

発表責任者：伊藤一成（kazunari_itou@pref.okayama.lg.jp）

講演番号：3A11p11
講演日時：3 月 27 日 15:50～ センター2 号館 A11 会場

清酒製造の上槽工程における脂肪酸とそのエチルエステルの変化
Changes of free fatty acids and fatty acid ethyl esters after filtration of finished main mash in sake brewery
○谷野 有佳、伊藤 一成、花房 裕子、三宅 剛史（岡山県工技セ）
○Yuka TANINO, Kazunari ITO, Hiroko HANAFUSA, Tsuyoshi MIYAKE (Industrial Technology Center of Okayama Prefecture)

【目的】清酒の香気は酒質を決定づける重要な因子であり、清酒製造過程で香気のバランスが崩れるとオフフレーバーが目立つ要因になるといわれている。発酵終了後に醪を搾り清酒と酒粕に分ける上槽工程において、種々の香気成分、特にエステル類が減少することは広く認識されており、その原因は気相への揮散、器材や酒粕への吸着などであることが、主要な香気成分の挙動から示されている。一方で、清酒中で主要なエチルエステルの前駆体となる中鎖脂肪酸は、油臭、紙臭などのオフフレーバーや苦味の原因となることが知られている。また近年では、中鎖脂肪酸と、官能特性やエチルエステル生成との関連性についての報告もある。清酒には、脂肪酸とそのエチルエステルの存在が確認されているが、長鎖脂肪酸とそのエチルエステルは少量で個体差が大きいことから、生成や挙動についての理解はあまり進んでいない。脂肪酸エチルエステル生成についての報告の中で、上槽前後の中長鎖脂肪酸量の変化がほとんどないことが報告されているが、その試料では長鎖脂肪酸は検出されておらず、その具体的挙動の理解にまでは至っていない。そこで本研究では、短鎖から長鎖の脂肪酸とそのエチルエステルを一斉分析し、上槽前後におけるそれぞれの変化を調べることにした。
【方法】岡山県内の清酒製造会社において自動圧搾機を使用した上槽前後の酒を試料として用いた。上槽前は醪を遠心分離したもの、上槽後は荒走り以後の初期に採取したものを分析試料とした。香気成分の分析は、少量の水系試料を全て気化させる Full Evaporation DHS (FEDHS) 法と特性の異なる捕集管 2 本を組み合わせた方法で、エタノールを除き、親水性、極性成分を含めた低沸点から高沸点までの全成分を捕集濃縮し加熱脱着後、GC/MS で分離検出した。内部標準物質にはカプロン酸メチルを用いた。
【結果】上記の方法により、清酒に含まれる炭素数 2 から 18 までの沸点と極性の異なる脂肪酸とそのエチルエステルを一斉検出することができた。少量だった長鎖脂肪酸とそのエチルエステルは、得られたトータルイオンクロマトグラムから、それぞれに特徴的な m/z 60 と m/z 88 のイオンクロマトグラムを抽出することで面積値を得ることができた。各成分のターゲットイオン強度比から対内部標準の相対強度で半定量化し、比較を行ったところ、いずれの試料でも上槽後では、特に長鎖脂肪酸エチルエステルが大きく減少していた。一方で、脂肪酸ではエチルエステルと比較して大きな変化はみられなかった。

FEDHS-GC/MS, free fatty acid, ethyl ester

講演番号：3A11p13
講演日時：3 月 27 日 16:21～ センター2 号館 A11 会場

清酒醸造過程における peptidylprolyl *cis-trans* isomerase （PPIase）の挙動に関する研究

The behavior of peptidylprolyl *cis-trans* isomerase (PPIase) from yeast during the Japanese sake brewing process

○山田 宏樹[1]、藤原 久志[2]、若井 芳則[2]、渡部 邦彦[1] ([1]京都大院　生命環境、[2]黄桜（株））
○Hiroki YAMADA[1], Hisashi HUJIWARA[2], Yoshinori WAKAI[2], Kunihiko WATANABE[1] ([1]Kyoto Pref. Univ., [2]Kizakura Co., Ltd.)

【背景・目的】　異なる酒米を用いた清酒醸造において、醸造の最終産物である酒粕中のタンパク質解析を行ったところ、醸造に用いる酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 由来の５つの酵素タンパク質が発見された。そのうち４つは解糖系に関連する酵素であったが、唯一代謝とは無関係のシャペロンである peptidylprolyl *cis-trans* isomerase（PPIase）Cpr1p が同定された。そこで清酒醸造の異なる段階において、酒粕だけでなく清酒および醪を含む異なるサンプルに対し、PPIase の存在・挙動を調査した。本研究は、酵母 PPIase の醸造過程における役割を明らかにすることを目的としている。
【方法・結果】　まず醸造過程での酵母 PPIase を検出するための酵母 PPIase 抗体を作製した。実験室酵母 S288C 株由来の PPIase 遺伝子（*CPR 1*）に対して作製したプライマーを用い、PCR 増幅により遺伝子断片を得た。それを制限酵素消化後ベクタープラスミド pET11a に組み込み、大腸菌 BL21 (DE3) 株で組換え Cpr1p (rCpr1p) を大量発現させた。その後、陰イオン交換 (DEAE-cellulose) クロマトグラフィーとゲル濾過クロマトグラフィー (Sephadex G-100）による精製を行い、rCpr1p を抗原として用いてウサギ抗 PPIase 抗体を作製した。次に、この抗体を用いて Western blotting 法と ELISA 法で PPIase を検出した。醸造サンプルは、醪サンプル（5、10、15、25 日目）と、最終産物として清酒サンプルおよび酒粕サンプルをそれぞれ採取、調製した。

最初に酒粕サンプル中の PPIase の局在を Western blotting 法で調べたところ、確実に酒粕中に確認されたが、共存する酵母菌体における局在性を明らかにすることはできなかった。一方で、清酒中には Western blotting 法と ELISA 法では PPIase が検出されず、酵母菌体を含む酒粕サンプルにのみ存在することが判った。また、醪サンプルについて、遠心後の上清を醪の清酒サンプルとして Western blotting 法に供した結果、5、10 日目に PPIase が主要タンパク質として存在していた。しかし、醪発酵が進むにつれて、醪の上清に含まれる総タンパク質量および PPIase が減少することが示された。このことから PPIase は、5、10 日目において醪の上清部分では顕著に存在するが、醸造後期には消失し、醪の沈殿部分に酒米や菌体と共に存在し続けることが、最終産物である酒粕に存在することから示唆された。今後は酵母菌体内および外の PPIase の検出を酵母細胞の分取・分画と共に確立し、異なる条件で醸造された醪中に含まれる PPIase の量的比較を行う予定である。さらに醸造過程における PPIase 誘導の調査と役割について検討する計画である。

Saccharomyces cerevisiae, Japanese sake, peptidylprolyl *cis-trans* isomerase

発表責任者：山田　宏樹（s819631032@kpu.ac.jp）

講演番号：3A11p14
講演日時：3 月 27 日 16:32～ センター2 号館 A11 会場

Ideonella sakaiensis における PcaG 遺伝子破壊株の性状解析
Characterization of PcaG gene disrupted strain of *Ideonella sakaiensis*
○西井 太郎[1]、蜂須賀 真一[2]、吉田 昭介[1,2] ([1]奈良先端大バイオ、[2]奈良先端大研究推進機構)
○Tarou NISHII[1], Shinichi HACHISUKA[2], Shosuke YOSHIDA[1,2] ([1]NAIST. of Biol. Sci., [2]NAIST. of IRI.)

【背景と目的】Poly(ethylene terephthalate) (PET) は, ペットボトルなどの材料として大量生産されているプラスチックの一種である。PET は石油資源を消費して製造されるため, その資源循環が課題となっている。最近, PET を主な栄養源に増殖できる細菌 *Ideonella sakaiensis* が単離された (Yoshida *et al*., *Science*, **351**, 1196-1199 (2016))。*I. sakaiensis* はまず, PET 加水分解酵素 (PETase) により PET を mono(2-hydroxyethyl) terephthalate (MHET) に分解する。次に MHETase により MHET を ethylene glycol (EG) および terephthalic acid (TPA) に加水分解する。本菌はこれら PET の加水分解によって得られた EG および TPA をエネルギー源または炭素源として利用している。我々はゲノム解析, およびトランスクリプトーム解析から, 本菌は TPA を protocatechuic acid (PCA) を経て代謝すると予測した。PCA は医薬品の原料等となる有用な化合物である。本研究では, *I. sakaiensis* の推定 TPA 代謝経路における PCA 芳香環開裂を担う PCA 3,4-dioxygenase 遺伝子 (*pcaHG*) に着目し, その遺伝子破壊による PET を発酵原料とした PCA 生産株の獲得を目指した。
【方法と結果】広域宿主ベクターpT18*mobsacB* の SmaI部位に *pcaG* 相同領域を組み込んだ *pcaG* 破壊ベクターを作製し, *E. coli* S17-1 株を介した接合伝達により *I. sakaiensis* に導入した。ゲノムの目的の部位への破壊ベクターの導入を確認するため, *I. sakaiensis* ゲノムおよび破壊ベクターにアニールするプライマーを用いたコロニーダイレクト PCR を行った。野生株と本破壊株をそれぞれ, 最少培地に TPA, EG, TPA と EG の混合 (TPA+EG), 非晶性 PET を炭素源としてそれぞれ加え, 培養を行った。その結果, *pcaG* 破壊株は TPA 培地においては増殖せず, EG 培地における増殖は野生株と同等であった。以上のことから, *pcaG* 破壊株は EG 代謝能を維持しつつ, TPA 代謝能を喪失したと考えられた。また, *pcaG* 破壊株の増殖は PET, TPA+EG の両培地において野生株よりも抑制された。破壊株の PET 培地における培養では, その培養上清の吸収スペクトルに野生株には認められない紫外部の吸収ピークが出現した。現在, LC-MS 等により, 破壊株が生産する化合物の同定を進めている。

Poly(ethylene terephthalate), Plastic fermentation, Genetically modification

発表責任者：西井　太郎（nishii.taro.nn0@bs.naist.jp）

講演番号：3A11p15
講演日時：3 月 27 日 16:43～ センター2 号館 A11 会場

コリネ型細菌によるパルミトレイン酸の生産（第一報）

Engineering of *Corynebacterium glutamicum* for palmitoleic acid production (1st)

○北村 嘉子[1]、大竹 辰徳[1]、林 幹朗[2]、竹野 誠記[1]、池田 正人[1] ([1]信州大農、[2]協和発酵バイオ)
○Kako KITAMURA[1], Tatsunori OTAKE[1], Mikiro HAYASHI[2], Seiki TAKENO[1], Masato IKEDA[1]
([1]Shinshu Univ., [2]Kyowa Hakko Bio)

【背景と目的】 C16:1Δ9 の長鎖不飽和脂肪酸であるパルミトレイン酸（Pol）は、抗炎症効果や 2 型糖尿病の抑制効果、LDL コレステロール低減効果等が報告されるにつれ、需要が高まりつつある機能性脂質の一つである。しかし、その供給源は一部の植物に限られている。近年、Pol を脂質に含有する微細藻類や酵母を用いて Pol の生産が試みられているが、生産性が低く、実用レベルには至っていない。一方、我々は、これまでに、コリネ菌に長鎖脂肪酸生産の高いポテンシャルを見いだし報告してきた。しかし、Pol については、同菌種は元来、その生合成能を有していないため、生産させることができない。本研究では、外来の機能を導入し、コリネ菌固有の脂肪酸代謝特性と組み合わせた選抜方法を考案することで、Pol 合成能を獲得した目的株の選抜を試みた。その戦略と結果を報告する。

【方法と結果】 コリネ菌は細菌としては例外的に、真核型の I 型 FAS（脂肪酸合成酵素）を 2 種有する（FasA & FasB）。FasA は主にオレオイル（Ole）-CoA（C18:1Δ9）の、一方、FasB はパルミトイル（Pal）-CoA（C16:0）の合成を担う。当初、FasA による Ole-CoA 生合成の中間体として Pol-CoA を引き抜く戦略を立てたが、鎖長伸長過程における Ole-CoA の前駆体は C16:1Δ7 であり、目的とする Pol-CoA（C16:1Δ9）とは二重結合の位置が異なるため、この戦略は成り立たなかった。別策として、FasB の合成する Pal-CoA の不飽和化により Pol-CoA を合成する戦略を立てた。この戦略では、宿主として *fasA* 破壊株を用いる。本破壊株は生育に Ole など不飽和脂肪酸（UFA）を必要とするが、もし FasB で合成される飽和の Pal-CoA を不飽和の Pol-CoA に変換する狙い通りの代謝が成立すれば、目的株を UFA 非要求株としてポジティブに選択することができる。目的に沿う活性（acyl-CoA Δ9-desaturase）を一部の *Pseudomonas* 属細菌が有するとの知見を見いだしたので、同遺伝子（*desB*）をプラスミド上にクローン化して、コリネ菌 *fasA* 破壊株に導入した。この形質転換株では残念ながら UFA 要求性は解除されなかったが、その中から低頻度で UFA 非要求株が出現することを見いだした。その出現はプラスミド依存的であった。その代表株を POL-1 株と命名した。POL-1 株から同プラスミドをキュアすると、再び UFA 要求性を示し、さらにこのキュア株に同プラスミドを導入すると、UFA 要求性が解除された。従って、何らかの変異が関わっているものの、狙い通りの代謝変換（Pal-CoA→Pol-CoA）が成立していると判断した。

Corynebacterium glutamicum, type I fatty acid synthase, acyl-CoA Δ9-desaturase

発表責任者：池田正人（m_ikeda@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3A11p16
講演日時：3 月 27 日 16:54～ センター2 号館 A11 会場

コリネ型細菌によるパルミトレイン酸の生産（第二報）

Engineering of *Corynebacterium glutamicum* for palmitoleic acid production (2nd)

北村 嘉子[1]、大竹 辰徳[1]、林 幹朗[2]、○竹野 誠記[1]、池田 正人[1] ([1]信州大農、[2]協和発酵バイオ)
Kako KITAMURA[1], Tatsunori OTAKE[1], Mikiro HAYASHI[2], ○Seiki TAKENO[1], Masato IKEDA[1]
([1]Shinshu Univ., [2]Kyowa Hakko Bio)

【背景と目的】 コリネ菌は 2 種の脂肪酸合成酵素（FasA & FasB）を有する。そのうちの *fasA* をオレイン酸（Ole）生産菌で破壊すると、Ole 主体の発酵がパルミチン酸（Pal）発酵に転換することを見いだし、昨年度の本大会にて報告した。この Pal 生産菌は *fasA* が破壊されているため、Ole など不飽和脂肪酸（UFA）の要求性を示す。従って、この Pal 生産菌を出発菌株とした場合でも、原理的には、前演者が報告した通りの育種と選抜のスキームが当てはまるはずである。もしそうであれば、Pal からパルミトレイン酸（Pol）への代謝変換によって、発酵産物として Pol の蓄積を検出できる可能性がある。本研究ではその検証と、Pol 生産に関わる未知変異の特定を試みたので報告する。

【方法と結果】 前演者が出発菌株として用いた野生株由来 *fasA* 破壊株に代えて、Pal 生産菌 PCC-6 Δ*fasA* 株から同様な育種を試みた。まず、前演者が構築した *desB* プラスミドを導入したところ、やはり、UFA 要求性は解除されなかったが、この宿主においても形質転換株の中から低頻度で UFA 非要求性を示すサプレッサー株が出現した。代表株 M-1 を親株の PCC-6 Δ*fasA* 株とともにグルコース培地で培養し、生成した遊離脂肪酸をガスクロにて分析した。その結果、M-1 株では Pal のピークに加えて、親株には存在しないピークの出現を認めた。このピークは、標準品の Pol と完全に重なったことから、生成物が Pol であると結論した。この結果は、Pal 生産菌内で FasB 酵素によって過剰合成された Pal-CoA の一部が DesB 酵素によって Pol-CoA に変換されて膜脂質に取り込まれるとともに、余剰分が脱 CoA 化を受けて遊離の Pol として細胞外に排出されたと考えることができる。M-1 株を全ゲノム解析に供した結果、グローバルレギュレーターの1つである DtxR の遺伝子に原因変異を見いだした。その変異が外来の DesB の機能発現をうながしていると考えられ、その仕組みについても考察する。

Corynebacterium glutamicum, palmitoleic acid production, suppressor mutation

発表責任者：池田正人（m_ikeda@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3A11p17
講演日時：3 月 27 日 17:05～ センター2 号館 A11 会場

有機合成反応を利用したビニル化合物生産菌の選択的分離法

Screening of microbes producing vinyl compounds using organic synthesis reactions

○麻生 祐司[1]、佐野 芽生[1]、小原 仁実[1]、松本 圭司[2]、和田 一仁[2]([1]京都工繊大院・工芸科学、[2]株式会社カネカ・R&B 本部)
○Yuji ASO[1], Mei SANO[1], Hitomi OHARA[1], Keiji MATSUMOTO[2], Kazuhito WADA[2] ([1]Kyoto Inst. Tech., [2]Kaneka Corp.)

【目的】イタコン酸（IA）などの微生物生産ビニル化合物は抗菌性や抗炎症性などの生理活性を示すことから創薬シード化合物として有用である。しかし、自然界からビニル化合物生産菌を選択的に分離する手法はない。そこで本研究では、ビニル化合物の末端二重結合への選択的付加反応である Thiol-ene（TE）反応と Mizoroki-Heck（MH）反応を利用したビニル化合物生産菌の選択的分離法 DISCOVER（direct screening method based on coupling reactions for vinyl compound producers）を開発した(1, 2)。具体的には、抗菌剤チオグリセロール（TG）とラジカル開始剤 VA-044（VA）を含む寒天培地に分離源である土壌を塗布培養し、TE 反応にてビニル化合物生産菌のコロニーを優先的に形成させる。次に、MH 反応にて分離株の培養液中のビニル化合物をヨードベンゼンでラベル化する。このとき、反応の進行をヨウ素染色により確認する。LC-MS によりラベル化物を解析し、ビニル化合物を同定する。
【方法】TG、VA、モデルビニル化合物として IA を混合し、30℃で水中にて TE 反応を行った。Ellman 試薬と LC-MS を用いて経時的に TE 反応を解析し反応条件を最適化した。次に、IA 生産菌 *Aspergillus terreus* NBRC 6123 の胞子を含む土壌を TG, VA 含有ポテトデキストロース（PD）寒天培地およびグルコース無機塩（GM1）寒天培地に塗布培養後、IA 生産菌のコロニー数をカウントすることで土壌からの NBRC 6123 の再分離率を算出した。次に、土壌 98 種を TG, VA 含有 PD 寒天培地に塗布培養してコロニーを得た後、分離株をグリセロール無機塩培地で培養した。培養液上清を MH 反応に供し、ヨウ素染色で呈色を示した反応液について LC-MS にてラベル化物を解析しビニル化合物を同定した。
【結果と考察】TE 反応は嫌気下の培地中でも進行すること、TE 反応により TG は抗菌活性を消失すること、TG と VA の至適濃度はそれぞれ 50 mM、0.5 mM であることがわかった。また、TG, VA 含有 PD 寒天培地および GM1 寒天培地を用いた場合、土壌からの NBRC 6123 の再分離率はそれぞれ 96%、100%であった。一方、TG, VA 非含有寒天培地を用いた場合の再分離率はそれぞれ 33%、60%であったことから、TE 反応がビニル化合物生産菌の分離に有効であることが示された。次に、98 種の土壌を TG, VA 含有 PD 寒天培地に塗布培養した結果、85 株のコロニーを得た。分離株の培養液を MH 反応に供した結果、45 株がヨウ素染色で呈色を示しビニル化合物生産菌であることが示唆された。このうち、S13-1 株の生産するビニル化合物を LC-MS にて解析した結果、IA であることがわかった。以上の結果より、DISCOVER はビニル化合物生産菌の選択的分離に有効であることが示された。
(1) Y. Aso *et al.*, Scientific Reports, 9:16007 (2019); (2) M. Sano *et al.*, Heliyon, 5(7):e02048 (2019)

Mizoroki-Heck reaction, Thiol-ene reaction, Vinyl compounds

発表責任者：麻生祐司（aso@kit.ac.jp）

講演番号：3A11p18
講演日時：3 月 27 日 17:16～ センター2 号館 A11 会場

Aspergillus niger S17-5 の生産するヒドロキシヘキシルイタコン酸の生理活性評価
Bioactive characterization of hydroxyhexylitaconic acids produced by *Aspergillus niger* S17-5
○佐野 芽生[1]、小原 仁実[1]、松本 圭司[2]、和田 一仁[2]、麻生 祐司[1]([1]京都工繊大院、[2]株式会社カネカ・Ｒ＆Ｂ本部)
○Mei SANO[1], Hitomi OHARA[1], Keiji MATSUMOTO[2], Kazuhito WADA[2], Yuji ASO[1] ([1]Kyoto Inst. Tech., [2]Kaneka Corp.)

【目的】ある種の微生物はイタコン酸（IA）などのビニル化合物を生産する。これらは抗菌性、抗炎症性、抗腫瘍活性などの生理活性を示すことから創薬シード化合物として注目されている。これまでに、発表者らはハロゲン化アリール/アルケニルのアルケンへの選択的付加反応である Mizoroki-Heck 反応を用いたビニル化合物生産菌の選択的分離法を開発した(1)。本研究では土壌より新たなビニル化合物生産菌を分離するとともに、生産するビニル化合物の構造解析と生理活性を評価した。
【方法】日本国内 86 カ所より採取した土壌をクロラムフェニコールおよび Triton X-100 添加ポテトデキストロース寒天培地に塗布培養し、430 株の糸状菌を分離した。分離株をグリセロール無機塩培地で培養後、培養液上清に酢酸パラジウム、炭酸カリウム、ヨードベンゼンを混合し反応させた。反応後、亜硝酸ナトリウム、デンプン、塩酸からなる呈色液を添加し、ヨウ素染色を行った。呈色を示した反応液について HPLC 解析し、ビニル化合物生産の有無を調べた。分離株のうち S17-5 株の培養液上清を分取 HPLC に供し、本株の生産する 2 種類のビニル化合物を精製した。LC-MS と ^{1}H, ^{13}C, 2 次元 NMR により、それぞれ両化合物の分子式と分子量、構造を解析した。次に、大腸菌、緑膿菌、黄色ブドウ球菌、サルモネラ、腸炎ビブリオ、肺炎桿菌に対する両化合物の最小生育阻止濃度（MIC）を求めた。また、両化合物と LPS を RAW264 細胞培養液に添加し培養後、サイトカイン IL-1β、IL-6 生産抑制効果すなわち抗炎症性を ELISA で確認した。さらに、両化合物を MRC-5 および HeLa 細胞培養液に添加し培養後、生細胞数をテトラゾリウム塩 WST-8 を用いて測定した。
【結果と考察】土壌より分離した 430 株をヨウ素染色によりスクリーニングした結果、ビニル化合物を生産していると考えられる 72 株を得た。このうち、*Aspergillus niger* S17-5 は IA と異なる 2 種類のビニル化合物を生産していた。LC-MS 解析の結果、両化合物の分子式はともに $C_{11}H_{18}O_5$、分子量は 230.11 であった。NMR 解析の結果、両化合物は 8-ヒドロキシヘキシルイタコン酸（8-HIA）および 9-HIA と同定された。両化合物の MIC はいずれの検定菌に対しても 2.5 mM 以上であり、抗菌活性は確認できなかった。また、両化合物は IL-1β、IL-6 生産抑制を示さず、抗炎症性は確認できなかった。一方、IA は IL-1β に対して抗炎症性を示した。さらに、細胞毒性を評価した結果、8-HIA は MRC-5 および HeLa 細胞に対して、9-HIA は HeLa 細胞に対して細胞毒性を示した。一方、IA はいずれの細胞に対しても細胞毒性を示さなかった。以上の結果より、8-HIA および 9-HIA の非抗炎症性と細胞毒性はヒドロキシヘキシル基に起因することが示唆された。

(1) Sano *et al.*, Heliyon, 5(7):e02048 (2019)

Hydroxyhexylitaconic acid, Mizoroki-Heck reaction, Screening

講演番号：3A12a01
講演日時：3 月 27 日 09:30～ センター2 号館 A12 会場

有機塩素系殺虫剤分解能を持つスフィンゴモナッド細菌株の membrane vesicle 形成
Membrane vesicle formation of Sphingomonads capable of degrading organochlorine pesticide
○鈴木 達也[1]、相馬 隆光[2]、加藤 広海[1]、豊福 雅典[3,4]、野村 暢彦[3,4]、永田 裕二[1] ([1]東北大学大学院・生命科学研究科、[2]筑波大学大学院・生命環境科学研究科、[3]筑波大学・生命環境系、[4]筑波大学・微生物サステイナビリティ研究センター)
○Tatsuya SUZUKI[1], Takamitsu SOMA[2], Hiromi KATO[1], Masanori TOYOFUKU[3,4], Nobuhiko NOMURA[3,4], Yuji NAGATA[1] ([1]Tohoku Univ. Graduate School of Life Sciences, [2]Tsukuba Univ. Graduate School of Life and Environmental Sciences, [3]Tsukuba Univ. Faculty of Life and Environmental Sciences, [4]Tsukuba Univ. MiCS)

【背景・目的】有機塩素系殺虫剤 γ-hexachlorocyclohexane（γ-HCH）は人体に有害であり、環境中での残留性が高いことから環境汚染物質として問題となり、世界各地で γ-HCH を分解する細菌の単離および分解代謝経路の研究が進められてきた。これまでに単離され、遺伝子・酵素・ゲノムレベルで解析されている γ-HCH 分解細菌株は、全て *Alphaproteobacteria* に属するスフィンゴモナッド細菌株であり、本細菌群の物質代謝に対する多能性と遺伝的可塑性が示唆されている。しかし、特殊な分解酵素遺伝子の起源や獲得機構については未知である。一方、細菌は様々な方法で新規遺伝子を獲得するが、近年、membrane vesicle（MV）と呼ばれる膜小胞が介在するケースが報告されている。すなわち、MV がこれまで見過ごされてきた遺伝情報のリザーバーや遺伝子水平伝播装置として機能している可能性が考えられる。そこで本研究では、代表的な γ-HCH 分解資化細菌である *Sphingobium japonicum* UT26 株の MV 産生能について検討した。
【方法】UT26 株、および本株の γ-HCH の資化に必須な ABC トランスポーターシステム LinKLMN をコードする遺伝子を完全欠失させた Δ*linKLMN* 株を通常の栄養培地で培養し、培養上清から、他細菌株での MV 調製法に準じて、超遠心および密度勾配遠心により MV 画分を調製した。当該画分中の脂質の定量、粒子状物質の粒径分布、ならびに透過型電子顕微鏡（TEM）を用いて、本画分に MV が含まれているか検討した。
【結果・考察】調製した MV 画分の脂質定量、粒径分布、および TEM による観察結果から、UT26 株は、粒径 100~200 nm 程度の MV を産出することを確認した。一方、これまでの研究で、膜成分の培地中への漏出が示唆されていた Δ*linKLMN* 株では、野生型株より多量の MV を生産することが明らかになった。LinKLMN は外膜成分を輸送することで生体膜の integrity に関与することが示唆されており、他細菌株で同様の機能を持つ ABC トランスポーターの欠損で MV 生産が増加する知見とも一致する。以上の結果より、(i) グラム陰性細菌の中でも特殊な外膜を持ち、多彩な物質代謝能を有するスフィンゴモナッド細菌株が MV を産出すること、および、(ii) 外膜の integrity に関与する ABC トランスポーターの破壊により MV を高産出すること、を示した。今後、MV の遺伝情報のリザーバーや遺伝子水平伝播装置として機能の検証や、スフィンゴモナッド細菌群特有の成分を有する MV の応用への展開が期待される。現在、本株が産出する MV の特性、および野生型株と Δ*linKLMN* 株が産生する MV の質的違い等について検討している。

Membrane Vesicle, Sphingomonads, Organochlorine pesticide

発表責任者：鈴木達也（t.suzuki@ige.tohoku.ac.jp）

講演番号：3A12a02
講演日時：3 月 27 日 09:41～ センター2 号館 A12 会場

菌体外膜小胞へのタンパク質輸送における細胞表層構造制御タンパク質の機能
Functions of a protein regulating cell surface structure in the protein transport to extracellular membrane vesicles
○釜阪 紘平、陳 晨、川本 純、小川 拓哉、栗原 達夫（京都大学化学研究所）
○Kouhei KAMASAKA, Chen CHEN, Jun KAWAMOTO, Takuya OGAWA, Tatsuo KURIHARA (Institute for Chemical Research, Kyoto Univ)

グラム陰性細菌が分泌する菌体外膜小胞　(Extracellular membrane vesicle, EMV) には核酸や毒性タンパク質などが選択的に内包されており、これらが分泌、輸送されることで細胞間コミュニケーションや遺伝子の水平伝播、病原性の発現など様々な細胞間相互作用が引き起こされることが知られている。EMV を介した生体分子の輸送機構を応用することで、膜タンパク質のような疎水性タンパク質の分泌生産系構築や、多段階反応を触媒する酵素群を集積したナノリアクターの開発が期待される。しかし、従来研究されてきた細菌の多くは、EMV 生産量が低く、内包するタンパク質の純度が低いことなどの問題点がある。アジ腸管より単離された *Shewanella vesiculosa* HM13 は、機能未知タンパク質 P49 を高純度で内包した EMV を高生産することから、EMV 生産機構の解明や応用に適した細菌種といえる。本研究は、*S. vesiculosa* HM13 の EMV 分泌を介した P49 の選択的輸送機構の解明を目的とした。本菌の全ゲノム解析の結果、P49 遺伝子は、グラム陰性細菌に高度に保存される II 型タンパク質分泌装置 (T2SS) サブユニットのホモログをコードする遺伝子群、および細菌の表層糖脂質合成に関与する機能が推定される遺伝子群から成る遺伝子クラスター内に存在した。これら P49 遺伝子の周辺遺伝子について、それぞれ遺伝子破壊株を作製し、各遺伝子の欠損が P49 の EMV 局在性に及ぼす影響を解析した結果、P49 は T2SS 様分泌装置により輸送され、糖脂質合成関連遺伝子により合成された表層糖脂質との相互作用によって、EMV へと輸送される P49 分泌モデルが推定された。本モデルにおける P49 による EMV の表層認識を検証するため、精製した P49 と P49 欠損株由来の細胞および EMV の *in vitro* 結合実験を行なった。その結果、P49 は 細胞および EMV 表層との結合能を有することが確認された。さらに、P49 遺伝子の周辺遺伝子破壊株より調製した EMV と P49 の結合能を解析した結果、糖脂質生合成への関与が推定される Wzx ホモログの欠損株が生産した EMV は P49 との結合能が著しく低下していることを見出した。Wzx は細胞表層糖脂質の糖鎖前駆体を細胞質からペリプラズムへと輸送するフリッパーゼであることが知られている。一方で、T2SS 様分泌装置のサブユニットをコードする遺伝子の破壊株より調製した EMV は、P49 との結合能を有していた。以上の結果から、P49 は Wzx ホモログが関与する糖脂質生合成系によって制御される表層構造を認識している可能性が示された。今後は、Wzx ホモログおよび P49 遺伝子を破壊した二重変異株を新たに作製し、P49 との結合能の評価および表層糖脂質構造の比較解析から、P49 による表層糖脂質の認識機構の詳細を解析する予定である。

membrane vesicle, protein secretion, Wzx flippase

発表責任者：釜阪　紘平（kmsk.k121@mbc.kuicr.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3A12a03
講演日時：3 月 27 日 09:52～ センター2 号館 A12 会場

細菌のセンサータンパク質によるベシクル生産とバイオフィルム分散の誘導
Induction of vesicle production and biofilm dispersion through a bacterial sensor protein
○横山 文秋[1,2]、今井 友也[3]、川本 純[1]、小川 拓哉[1]、栗原 達夫[1] ([1]京都大学・化学研究所、[2]日本学術振興会・特別研究員、[3]京都大学・生存圏研究所)
○ Fumiaki YOKOYAMA[1,2], Tomoya IMAI[3], Jun KAWAMOTO[1], Takuya OGAWA[1], Tatsuo KURIHARA[1] ([1]ICR, Kyoto Univ., [2]JSPS Research Fellow, [3]RISH, Kyoto Univ.)

【背景】
現在までに解析されているすべての細菌において細胞外ベシクルの分泌が認められている。ベシクルは脂質膜で構成されるナノ粒子で、種々のタンパク質や核酸を含み、グラム陰性細菌では膜上にリポ多糖を有している。その生産性、構成成分、機能は細菌種や生育環境によって様々であり、代表的なものとして他の細菌や宿主との細胞間コミュニケーションやバイオフィルムを構成するマトリックスとしての役割が挙げられる。我々は、大腸菌と比較して 10 倍程度の高いベシクル生産性をもつ細菌 *Shewanella vesiculosa* HM13 を用いてベシクル生産機構の解明を目指している。
【方法・結果】
細菌の生育環境がベシクルの生産性や構成成分の組成に影響することから、ベシクル中より同定されたセンサータンパク質 HM1275 に着目した。本センサータンパク質に作用するシグナルを同定するために貧栄養培地に種々のアミノ酸を添加した条件で野生株と HM1275 欠損株を培養し、多検体を一度に解析できるマルチドットブロッティングによりベシクル生産性を比較した。リシン添加時のベシクル生産性の差に着目し、異なるリシン濃度下におけるベシクル生産性を評価した。野生株ではリシン濃度依存的にベシクル生産性が向上したのに対し、欠損株では同等の向上は見られなかった。また、HM1275 はバイオフィルム分散関連タンパク質である BdlA と配列相同性を有していたことからバイオフィルム形成量を定量したところ、野生株でのみ経時的な減少が見られた。リシン添加条件下では野生株のバイオフィルム形成量が減少したのに対し、欠損株ではむしろ経時的な増加傾向が見られた。生/死細胞染色したバイオフィルムを共焦点レーザー顕微鏡により観察した結果、野生株のバイオフィルム中では生細胞が約 80% であったのに対し、欠損株では約 53% であった。
【考察】
これらの結果から、本菌は細胞外のリシン濃度をセンサータンパク質 HM1275 によって感知することでベシクル生産およびバイオフィルム分散を誘導していると考えられる。また、生育環境に応じてバイオフィルム分散することで、バイオフィルム中での細胞死を回避していることが示唆された。HM1275 がベシクル上に存在することから、ベシクルを介した HM1275 の他細胞への輸送により集団的にバイオフィルム分散を誘導している可能性がある。

Vesicle, Biofilm, Shewanella

発表責任者：横山 文秋（yokoyama@mbc.kuicr.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3A12a04
講演日時：3 月 27 日 10:03～ センター2 号館 A12 会場

腸内細菌叢が産生するメンブレンベシクルの解析

Characterization of membrane vesicles derived from gut microbiota

○菊地 薫[1]、尾花 望[2,3]、野村 暢彦[3,4] ([1]筑波大・生命環境、[2]筑波大・医学医療系・TMRC、[3]筑波大・MiCS、[4]筑波大・生命環境系)
○ Kaoru Kikuchi[1], Nozomu Obana[2,3], Nobuhiko Nomura[3,4] ([1]Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Fac. TMRC, Medicine, Univ. Tsukuba, [3]MiCS, Univ. Tsukuba, [4]Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

ヒトの腸管には約 40 兆の細菌が生息しており、宿主と相互作用し、宿主の消化・生理・病理・免疫系などに様々な影響を与える。例えば、腸内細菌による短鎖脂肪酸の産生や代謝機能による宿主へのエネルギー源の供給、腸管上皮細胞や免疫細胞の分化や成熟化、病原菌に対する感染防御など腸内細菌叢が宿主に与える影響が次々と解明されている。また、腸内細菌叢解析技術の進展によって、腸内細菌叢の組成の変化と多様性の減少が、宿主の健康や疾患に深い関連があることが明らかとなってきている。しかし、腸内細菌叢の機能や宿主との相互作用機構についてはいまだ不明な点が多い。

多くの細菌はメンブレンベシクル(MV)と呼ばれる直径 20 ~ 400 nm の球状膜構造体を細胞外に放出することが明らかとなっている。MV はタンパク質、核酸、シグナル物質、免疫調節因子、病原性因子など多様な菌体成分の輸送媒体として機能する。当研究室の先行研究では、腸内細菌の一種である *Clostridium perfringens* が MV を能動的に産生しており、*C. perfringens* の MV は宿主細胞の自然免疫を誘導することが明らかとなった(Obana *et al.* 2017)。また、様々な腸内細菌単離株を培養したところ、多くの腸内細菌が MV 産生能を有していたことから、腸管内においても腸内細菌叢由来の MV が存在し、腸内細菌叢-宿主間相互作用に寄与すると考えられる。しかし、実際の腸内環境下における MV 生産性の腸内細菌種や、腸内細菌が産生する MV と宿主の関係性は解明されていない。そこで、本研究では、宿主腸内中で産生される腸内細菌叢由来の MV を単離し、その機能を明らかにすることを目的とした。

まず、マウスを用いて糞便から MV を回収する方法を検討した。MV は細菌の細胞膜から構成されるため、脂質特異的な蛍光色素を用いて脂質量を定量することにより MV 量を評価することとした。様々な MV 単離手法を比較したところ、糞便懸濁液を密度勾配遠心と超遠心法を組み合わせた手法で分画することによって MV 画分が精製可能であった。また、得られた MV 画分を透過型電子顕微鏡によって観察したところ、MV 様構造である脂質二重膜の球状構造が認められた。さらに、同 MV 画分を鋳型とし、16S rRNA 遺伝子を標的とするユニバーサルプライマーを用いた PCR の結果、MV 画分より細菌由来 DNA が検出された。以上のことから、マウスの糞便から細菌由来 MV が単離可能であること、また、実際の腸内環境下において腸内細菌叢が MV を産生していることが示唆された。今後は MV 画分に含まれる 16S rRNA のシーケンシングによって MV 産生している腸内細菌の同定を進めるとともに、腸内細菌叢由来の MV の機能解析を進める予定である。

membrane vesicle, gut microbiota, bacterial-host interaction

講演番号：3A12a05
講演日時：3 月 27 日 10:14～ センター2 号館 A12 会場

枯草菌における Spo0A を介したメンブレンベシクル生産
Spo0A-mediated regulation of membrane vesicle production in *Bacillus subtilis*
○安部 公博[1]、尾花 望[2,3]、豊福 雅典[1,3]、野村 暢彦[1,3] ([1]筑波大生命環境、[2]筑波大 TMRC、[3]筑波大 MiCS)
○Kimihiro ABE[1], Nozomu Obana[2,3], Masanori Toyofuku[1,3], Nobuhiko Nomura[1,3] ([1]Univ. Tsukuba, [2]TMRC, Univ. Tsukuba, [3]MiCS, Univ. Tsukuba)

多くの細菌は、環境中に Membrane vesicle (MV)と呼ばれる球状の膜小胞を放出する。MV は、核酸、タンパク質、栄養素やシグナル物質の細胞間輸送に寄与し、細菌集団の発展や維持に大きく貢献することが知られている。グラム陰性細菌では、細胞外膜の剥離による MV の形成がよく知られているが、近年、グラム陽性細菌においても、MV が生産されることが明らかとなってきた。しかしながら、グラム陽性細菌は、外膜構造を持たず、細胞膜も厚い細胞壁に覆われているため、グラム陽性細菌における MV 生産のメカニズムについては、いまだ不明な点が多い。これまでに当研究室では、枯草菌において、PBSX プロファージに由来する細胞壁溶解酵素が MV 生産に寄与し、枯草菌を mitomycin C で処理すると本酵素の発現が誘導され、MV が菌体外に放出されることを明らかにしてきた (Toyofuku *et al*., 2017)。一方、枯草菌を BHI (Brain Heart Infusion)培地で培養すると、PBSX 由来の細胞壁溶解酵素に依存的せずに MV が生産されることが報告されている。本研究は、枯草菌における BHI 培地中での MV 生産のメカニズムの解明を目的とした。

グラム陽性腸内細菌であるウェルシュ菌において、Spo0A 依存的に MV 生産が制御されていることが、当研究室の先行研究から明らかとなっている(Obana *et al*., 2017)。Spo0A は、バイオフィルムや胞子形成のマスターレギュレーターとして、枯草菌を含む多くのグラム陽性有胞子細菌に保存されている。そこで、まず、Spo0A が枯草菌においても MV 生産に関与するかを検証した。その結果、*spo0A* 欠損株では、MV 生産量が野生型の 20%程度にまで減少した。また、Spo0A によって負に制御される転写因子 AbrB をコードする *abrB* と *spo0A* の 2 重欠損株においては、MV 生産が回復した。このことから、枯草菌において、MV 生産は AbrB によって負に制御されており、Spo0A が AbrB の脱抑制を行うことで、MV 生産を正に制御することが明らかとなった。さらに、Spo0A/AbrB によって制御される遺伝子群のうち、枯草菌が産生する抗菌ペプチドの 1 種であるサブランシン生合成遺伝子オペロンを欠損させると MV 生産が *spo0A* 欠損株と同程度に低下することが明らかとなった。以上の結果から、サブランシンが枯草菌における BHI 培地中での MV 生産に関与することが示唆された。

Bacillus subtilis, membrane vesicle, antimicrobial peptide

発表責任者：野村暢彦（nomura.nobuhiko.ge@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3A12a06
講演日時：3 月 27 日 10:35～ センター2 号館 A12 会場

degP 遺伝子破壊による *Meiothermus ruber* H328 株の膜小胞産生能強化に関する研究
Improvement of membrane vesicle (MV) production by a *Meiothermus ruber* H328 mutant disrupting *degP*

○淺野 優希[1]、大西 愛航[1]、川崎 一則[2]、渡部 邦彦[1] ([1]京府大院・生命環境、[2]産総研・関西センター)
○Yuki ASANO[1], Manato ONISHI[1], Kazunori KAWASAKI[2], Kunihiko WATANABE[1] ([1]Kyoto Pref. Univ., [2]AIST)

【目的】　難分解性のトリ羽毛を強力に分解する好熱性のグラム陰性細菌 *Meiothermus ruber* H328 株は、細胞外に細胞とは異なる脂質二重膜構造を有する膜小胞（membrane vesicle）を産生する。細菌に産生される膜小胞は、生理活性物質や酵素タンパク質を運ぶ新しい天然キャリヤや膜小胞表面への抗原タンパク質の提示によるワクチン産生への応用が期待されている[1)]。これら膜小胞の応用のためには、膜小胞の量的コントロールが必須となる。一方、*Escherichia coli* において、ペリプラズム局在のシャペロン/プロテアーゼ *degP* 遺伝子を欠損させた株では、野生株（WT）と比較し、熱ストレス条件下で膜小胞産生量が増加することが報告されている[2)]。そこで本菌株における膜小胞産生量増加を目的に、*degP* をゲノム情報から同定後、遺伝子破壊株を作成し、膜小胞産生能および産生される膜小胞について研究を行った。また、他の遺伝子変異による膜小胞産生量増加を図るためにさらなる遺伝子探索を行った。

【方法・結果】　本菌株のゲノム情報から *degP* を検索・同定し、相同組換えにより遺伝子破壊株（*ΔdegP* 株）を作成した。培養は YS 培地（0.5% yeast extract, 0.5% sucrose, pH 8.0）、55ºC あるいは 60ºC で 2-6 日間行い、その培養上清をサンプルとした。WT 株が培養温度 55-60ºC で至適生育を示すのに対し、*ΔdegP* 株は 60ºC 培養で、顕著な熱感受性を示した。膜小胞の調製は、多段階の（超）遠心と濾過を組合せ、定量的に行った。膜小胞の定量は、膜脂質染色用蛍光色素の増加する蛍光強度を測定することで行った。WT 株では培養温度変化に対し蛍光強度の変化はほとんど見られなかったが、熱ストレス条件である 60°C で培養した *ΔdegP* 株は、6 日目で WT 株の約 3-4 倍の蛍光強度が得られた。膜小胞サンプルの TEM 観察では、WT 株は 100 nm 以上、*ΔdegP* 株は 100 nm 以下の膜小胞が多く観察された。次いで、膜小胞サンプルの SDS-PAGE、MALDI-TOF-MS 解析により、*ΔdegP* 株で増加するタンパク質は膜小胞に存在する S-layer protein（*mrh_2961*）であると示され、膜小胞量の増加を裏付けることができた。これらの結果より、本菌株においても *degP* 遺伝子欠損による膜小胞産生能の強化を示した。さらに、膜小胞画分に対するトリプシンを用いたプロテアーゼ感受性試験を行うことで、両株の膜小胞における S-layer protein の局在調査を現在進めている。別途、グラム陰性細菌において、*degP* と同様の効果をもたらすと知られる遺伝子（*tolRA*, *nlpI* など）を本菌株のゲノム情報より検索した。しかし候補遺伝子は同定されておらず、本菌株はこれらの遺伝子を持たないことが判った。

1）Watanabe, K. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 9837–9843 (2016)　2）Kuehn, M. *J. Bacteriol.* **195**, 4161-4173 (2013)

membrane vesicle, *degP*, S-layer protein

発表責任者：淺野優希（s819631002@kpu.ac.jp）

講演番号：3A12a07
講演日時：3 月 27 日 10:46～ センター2 号館 A12 会場

産業利用糸状菌における細胞外膜小胞の発見

Discovery of extracellular membrane vesicles in industrial filamentous fungus

○岩橋 由佳[1]、浦山 俊一[1,2]、桝尾 俊介[1,2]、兼松 周作[1]、高谷 直樹[1,2]、野村 暢彦[1,2]、竹下 典男[1,2]、豊福 雅典[1,2]、萩原 大祐[1,2]（[1]筑波大・生命環境、[2]筑波大・MiCS）
○Yuka IWAHASHI[1], Syunichi URAYAMA[1,2], Syunsuke MASUO[1,2], Syusaku KANEMATSU[1], Naoki TAKAYA[1,2], Nobuhiko NOMURA[1,2], Norio TAKESHITA[1,2], Masanori TOYOFUKU[1,2], Daisuke HAGIWARA[1,2] ([1]Life Enviro Sci, Univ. of Tskuba, [2]MiCS, Univ. of Tsukuba）

細胞外膜小胞（eMV: extracellular membrane vesicle）は、細胞外に放出された膜小胞の総称であり、細胞外への新たな物質輸送機構として動物細胞や細菌で研究が進んでおり、健康や食品、環境に関連する新たな産業の創出に繋がると注目が集まっている。細菌由来の eMV には毒素やクオラムセンシングシグナルなどが内包され、様々な細胞間相互作用に関与している。一方、環境に遍在し産業にも広く利用されている糸状菌においては、多様な相互作用現象が知られているものの、それを担う物質の輸送機構が解明されている事例は少ない。糸状菌における eMV の理解は、生物間相互作用の根幹ともいえる物質輸送機構に新たな観点を与え、ヒトや植物に対する重大な病原性糸状菌の感染機構の理解や、産業利用菌の新たな利用法の確立に繋がると期待される。我々のグループではイネいもち病菌由来の eMV を見出しており、本研究では糸状菌における eMV 産生の普遍性を明らかにすることを目指し、*Aspergillus* 属菌をはじめとする産業利用菌における eMV 産生能とその性質を解析した。

培養液中の脂質量を指標とした eMV 産生条件の探索により、*Aspergillus oryzae*・*Aspergillus luchuensis*・*Asprgillus kawachii*（YPD 培地）、*Trichoderma ressei*（PDB 培地）などの産業利用菌が他の試験菌に比べて eMV を多く産生していることが示唆された。このことから、糸状菌による eMV 産生はイネいもち病菌だけではなく、様々な菌種で認められる現象であると考えられた。また、YPD 培地において eMV 産生が示唆された菌種においても、他の培地では eMV 産生が認められない場合もあったことから、多量の eMV 産生には一定の条件が必要であることも明らかとなった。我々は *A. oryzae* を用いて糸状菌が産生する eMV について詳細な検討を行い、菌体対数増殖初期および定常期、溶菌時に eMV が産生されていることを確認した。また、培養液の浸透圧変化や細胞壁一部欠損変異株による eMV 産生量の変化や、共焦点蛍光顕微鏡を用いた観察から eMV 産生メカニズムを推定した。現在は eMV のプロテオーム解析を行い、どのようなタンパク質が内包されているのかを調査中であり、その結果についても議論する。

extracellular membrane vesicles, *Aspergillus oryzae*, amylase

発表責任者：萩原大祐（hagiwara.daisuke.gb@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3A12a08
講演日時：3 月 27 日 10:57～ センター2 号館 A12 会場

細菌由来メンブレンベシクルの 1 粒子表面化学解析
Surface chemical analysis of single bacterial membrane vesicles
○髙橋 花奈子[1]、安田 まり奈[2]、豊福 雅典[2]、重藤 真介[1] ([1]関西学院大院理工、[2]筑波大院生命環境)
○Kanako TAKAHASHI[1], Marina YASUDA[2], Masanori TOYOFUKU[2], Shinsuke SHIGETO[1] ([1]Kwansei Gakuin Univ., [2]Univ. of Tsukuba)

【背景・目的】細菌が集団社会を形成し互いに相互作用する際，メンブレンベシクル（MV）と呼ばれる球状の膜小胞（直径 20～400 nm）を放出する。MV は脂質二重膜から構成されており，内部には核酸やタンパク質，シグナル因子等が含まれている。MV の形成機構などが明らかにされつつある一方で，MV の化学分析を 1 粒子レベルで行った例は皆無である。そこで我々は生体試料の非破壊分析が可能なラマン分光法に着目した。ラマン分光法では，物質に光を照射し，入射光とは異なる波長を持つ散乱光（ラマン散乱）を検出・解析することにより，物質を壊すことなく詳細な化学情報を得ることができる。とくに，金属ナノ探針先端にレーザー光を集光することで誘起される近接場効果を利用したチップ増強ラマン分光法（TERS）は光の回折限界を超えた空間分解能（~10 nm）で測定を行うことができる。本研究では TERS を用いた MV1 粒子の表面化学分析法の開発を目的とした。
【実験・解析】脱窒細菌 *Paracoccus denitrificans* を 24 時間培養し，その培養液から MV ペレットを回収した。MV ペレットの洗浄・回収を 2 回繰り返し，MV 濃縮液を得た。次に，この MV 濃縮液 20 μL を金蒸着基板に滴下し，風乾した。風乾した試料に対して，原子間力顕微鏡（AFM）とラマン顕微鏡の複合装置（XploRa Nano, HORIBA）を用いて AFM および TERS 測定を行った。得られた TERS スペクトルデータを階層クラスター分析（HCA）を用いて解析し，TERS スペクトルの類似性に基づいた MV 表面の化学的不均一性の評価を行った。
【結果・考察】AFM 像から，MV と推測されるナノ構造体を多数確認した。その中から，高さ~30 nm，幅~210 nm の構造体を選択し，TERS 測定を行った。得られた TERS スペクトルは MV の主要構成成分であるリン脂質に由来するピークを示した。この結果と前述した構造体の大きさを考慮すると，AFM 像のナノ構造体は実際に単一の MV であると言える。MV の TERS スペクトルはリン脂質のピーク以外にも多くのピークを持つ多様なパターンを示した。この多様なスペクトルパターンは MV 表面に存在する異なった配向を持つ様々な生体分子種を反映していると考えられる。さらに，HCA の結果からは，MV の TERS マッピング像におけるクラスター分布の高い局在性が確認された。このような局在したクラスター分布は人工脂質二重膜のリポソームに対する TERS 測定結果では見られず，細菌が産生した MV 固有の性質であることを強く示唆する。以上のように，我々は TERS を用いた MV 1 粒子表面の可視化に初めて成功し，MV 表面にドメイン構造が存在する可能性を示唆する興味深い結果を得ることができた。

Membrane vesicles, *Paracoccus denitrificans*, Tip-enhanced Raman spectroscopy

発表責任者：重藤真介（shigeto@kwansei.ac.jp）

講演番号：3A12a09
講演日時：3 月 27 日 11:08～ センター2 号館 A12 会場

膜小胞過剰分泌性 *Buttiauxella* 属細菌における小胞分泌機構の解析
Analysis of the mechanism on membrane vesicle secretion in a hyper-vesiculating bacteria *Buttiauxella* spp.
○中道 菜緒[1]、二又 裕之[2,3]、田代 陽介[2,4]([1]静大工、[2]静大院総合科技、[3]静大グリーン研、[4]JST さきがけ)
○Nao NAKAMICHI[1], Hiroyuki FUTAMATA[2,3], Yosuke TASHIRO[2,4] ([1]Fac. Eng., Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. Integr. Sci. Technol., Shizuoka Univ., [3]Res. Inst. Green. Sci. Technol., Shizuoka Univ., [4]JST PRESTO)

【背景・目的】
多くの細菌は細胞外に膜小胞(membrane vesicles)を放出する。膜小胞は細胞膜のリン脂質二重層により構成された直径 20-400 nm のリポソーム様球状構造体であり、内部には DNA などの遺伝物質、タンパク質、病原因子などが含まれる。膜小胞は、細菌由来の物質を内包して他の細胞に輸送をすることから新たな遺伝子導入技術やドラッグデリバリーシステム、さらにはワクチンへの応用が期待されている。しかし得られる膜小胞の収量の向上などの課題があり、その課題解決には膜小胞形成機構の理解が重要である。これまで膜小胞の機能や分泌機構について様々な解析がなされてきたが、細菌種により機構は統一されておらず、その全貌はいまだ明らかとなっていない。近年我々は、様々な微生物における膜小胞生産量を解析し、その中で *Buttiauxella agrestis* DSM 4586 が膜小胞を過剰形成することを見出した。そこで本研究では、細菌における膜小胞の生産制御を目標として、膜小胞を過剰形成する *Buttiauxella* 属細菌における小胞分泌機構を解析した。
【方法・結果】
はじめに、*Buttiauxella* 属細菌 8 株における膜小胞生産量比較を行った。LB 培地で培養を行い、培養上清より膜小胞を抽出し、リン脂質標識蛍光試薬 FM4-64 を用いて生産量を比較した。多くの *Buttiauxella* 属細菌の膜小胞生産量が高かったものの、DSM 4586 に系統学的に最も近い *B. agrestis* DSM 9389 は他の 7 株と比較して顕著に生産量が低く、DSM 4586 と比較して 100 分の 1 程度しか膜小胞を形成していなかった。
次に、膜小胞過剰生産株 *B. agrestis* DSM 4586 の膜小胞形成機構を突きとめるため、ランダム遺伝子欠損株ライブラリーを用いて膜小胞形成関連因子を探索した。DSM 4586 のゲノム DNA 上の遺伝子をトランスポゾンによりランダムに破壊し、それら変異株における膜小胞生産量を測定した。野生株と比較して、生産量が 5 倍以上増加、あるいは 5 分の 1 以下に減少する変異株をそれぞれ取得しており、現在変異部分の特定とその遺伝子の膜小胞生産への関与を解析している。

membrane vesicles, outer membrane vesicles, transposon

発表責任者：田代陽介（tashiro.yosuke@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3A12a10
講演日時：3 月 27 日 11:19～ センター2 号館 A12 会場

緑膿菌膜小胞形成部位に局在するカルジオリピンの合成機構及び生理機能
Synthetic mechanism and physiology of cardiolipin localized at membrane vesicle-forming site in *Pseudomonas aeruginosa*

○上野 想[1]、塩田 拓也[1]、三浦 わかな[2]、二又 裕之[1,3]、田代 陽介[1,4]（[1]静大院総合科技、[2]静大工、[3]静大グリーン研、[4]JST さきがけ）
○So UENO[1], Takuya Shiota[1], Wakana Miura[2], Hiroyuki Futamata[1,3], Yosuke Tashiro[1,4] ([1]Grad. Sch. Integr. Sci Technol., Shizuoka. Univ., [2]Fac. Eng., Shizuoka. Univ., [3]Res. Inst. Green. Sci. Technol., Shizuoka. Univ., [4]JST PRESTO)

【緒言】
多くの細菌は、自身の膜表層から膜小胞(Membrane Vesicles: MVs)と呼ばれるリン脂質二重層の球体を細胞外へ分泌する。先行研究から、日和見感染菌である緑膿菌ではバイオフィルム(BF)状態において膜小胞分泌部位にカルジオリピン(CL)と呼ばれるリン脂質が局在することが明らかになっている。CL は二つのリン酸基と四つの脂肪酸からなるユニークな構造を有しており、大腸菌以外ではその合成経路及び生理機能についての詳細は明らかになっていない。膜小胞分泌は細菌の感染に関与しているとされ、緑膿菌における CL の合成機構及び機能の解明は緑膿菌感染症治療への応用へと期待できる。さらに、CL は多くの細菌に普遍的に存在する為、膜小胞形成と CL の関係の全貌を明らかにすることは多くの細菌の膜小胞分泌機構の解明に繋がる可能性を秘めている。そのため、その機構解明は膜小胞を用いたワクチン開発など生物工学的利用の発展にも貢献する。本研究では膜小胞研究におけるモデル微生物である *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 を用いて、緑膿菌における CL の合成経路及び生理機能を解明することを目的とした。
【方法・結果】
菌体または抽出した MVs の脂肪酸解析を行ったところ、BF 条件では浮遊条件と比較して不飽和脂肪酸の割合が増加していることが示された。また、BF 条件において、CL 中の不飽和脂肪酸の割合が増加していることも示された。この結果及び先行研究の結果から、BF 条件における CL の増加さらには不飽和脂肪酸割合の増加によって膜湾曲部位に局在するモデルが示された。CL と膜小胞形成との関連をさらに調べる為に、遺伝子欠損株を用いて緑膿菌 CL 合成関連遺伝子の探索を行った。その結果、大腸菌で報告されている遺伝子以外に機能未知であった遺伝子 *clsD* が CL の合成に関与していることが初めて明らかとなった。

membrane vesicles, cardiolipin, *Pseudomonas aeruginosa*

発表責任者：田代陽介（tashiro.yosuke@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3A12a11
講演日時：3 月 27 日 11:40～ センター2 号館 A12 会場

細菌由来メンブレンベシクルへの物質封入技術の構築
Encapsulation of compounds into bacterial membrane vesicle
○臼倉 雄紀[1]、野村 暢彦[1,2]、豊福 雅典[1,2] ([1]筑波大生命環境、[2]筑波大学微生物サステイナビリティ研究センター)
○Yuki USUKURA[1], Nobuhiko NOMURA[1,2], Masanori TOYOFUKU[1,2] ([1]Tsukuba Univ., [2]Tsukuba MiCS)

細菌はメンブレンベシクル（MV）と呼ばれる直径数十～数百 nm の球状構造体を形成し、核酸やタンパク質などを内包することで細胞質成分を細胞間で運搬、伝達していることが明らかとなった。MV は細菌の細胞膜によって形成され、他の細菌に対する遺伝子の水平伝播や宿主への病原性の付与などの働きを有することが報告されている。そのため、MV によるワクチンや薬剤輸送システムとしての利用といった臨床面での応用も注目されている。一方で、細菌により産生される MV は一般的に細菌の膜がたわむことで形成されるため、外部から特定の物質を内包させることは難しいとされてきた。そこで従来までは、生体膜成分からなるリポソームを MV に模し、任意の物質を内包させることで菌体へと伝達させていた。しかし、菌体の MV 認識には MV 表面の膜タンパク質や膜組成などが関与していると考えられているため、菌体由来の MV を用いることが MV の応用や MV に対する菌体の応答を真に理解するうえで、不可欠である。そこで、本研究では細菌が産生する MV に外部から任意の物質を内包させる技術の構築を目的とした。

本技術を構築するにあたり、Explosive Cell Lysis（ECL）と呼ばれる、グラム陰性細菌の MV 形成メカニズムに着目した（Toyofuku, *et al*, 2016, *Nature Commun.*）。ECL では細菌が破裂し、細胞質成分が一度外部に放出されてから MV に内包される。このことから、ECL を介した MV 形成過程において細胞外部の物質を MV に内包できると考えた。本実験では、MV に内包させる物質として水溶性緑色蛍光色素のカルセインを使用した。カルセインを *Pseudomonas aeruginosa* 培養液に添加し、ECL を誘導し、密度勾配遠心によりフラクションに分画した。各フラクションの MV 量と添加したカルセインの蛍光値を測定したところ、カルセインが元々は検出されないはずである MV フラクションにその蛍光が見出された。このことから、ECL を利用することで MV に対して任意の物質を外部から内包できると示唆された。

本技術を用いることで、MV を介して任意の物質を細菌特異的に運搬、伝達できると考えられる。また、MV に内包させる物質を変えることで MV のイメージングや MV を介した集団制御など、目的に応じた MV の利用が可能となる。

membrane vesicle, cell-cell communication, drug delivery system

発表責任者：臼倉雄紀（yuki.u.univ.tsukuba@gmail.com）

講演番号：3A12a12
講演日時：3 月 27 日 11:51～ センター2 号館 A12 会場

放線菌に由来する膜小胞の解析

Analysis of Actinomycetes-derived membrane vesicles

○永久保 利紀[1]、野村 暢彦[1,2]、豊福 雅典[1,2]([1]筑波大院・生命環境系、[2]筑波大・微生物サステイナビリティ研究センター)
○Toshiki NAGAKUBO[1], Nobuhiko NOMURA[1,2], Masanori TOYOFUKU[1,2] ([1]Grad. School of Life and Environ. Sci., Univ. of Tsukuba, [2]MiCS, Univ. of Tsukuba)

近年、様々な微生物が、生体膜に由来する微小な膜小胞（membrane vesicle, MV)を産生することが分かっている。さらに、MV には多種多様な生物学的機能が存在することが明らかになりつつあり、それらを医学や生物工学などの分野に応用することを目指す研究が世界中で盛んに進められている。このように、MV は多岐にわたる潜在的な応用可能性を秘めているが、それらの応用展開を進めていく上では、MV の組成やそれを決定づける産生メカニズムに関する基礎的な知見が必要不可欠である。そのような状況の中、我々はグラム陰性菌とグラム陽性菌の両菌群において普遍的な MV 産生メカニズムを解明してきた。いずれのメカニズムも、ファージ由来溶菌酵素による細胞壁分解に伴う細胞死が MV 形成の引き金であるという特徴を有する。一方で、グラム陽性菌に属し、真核生物的な特徴を有するユニークな微生物群である放線菌においては、MV に関する知見が非常に乏しい。放線菌は、抗生物質をはじめとする様々な有用化合物の生産者として用いられているため、放線菌における MV の組成や産生メカニズムを明らかにすることで、放線菌の MV に関する基礎的な知見を広げるとともに、MV を物質生産に応用する新たな展開へとつながる可能性がある。

以上の背景を踏まえ、本研究では放線菌が産生する MV を単離・精製し、種々のイメージング技術と生化学的手法を用いた解析を行った。これらの解析により、上記の放線菌由来 MV の構造や組成に関する知見が得られた。また、種々の培養条件における MV の産生量や組成の変化を解析し、それらの培養条件が放線菌の MV 産生に与える影響を調べた。本研究の成果は、未だ謎の多い放線菌由来 MV の生化学的性質や産生メカニズムへの理解を深めるものである。

Membrane vesicles, Actinomycetes, Metabolites

講演番号：3A12a13
講演日時：3 月 27 日 12:02～ センター2 号館 A12 会場

鉄還元細菌由来メンブレンベシクルを介した緑膿菌の細胞外電子移動
Extracellular electron transfer of Pseudomonas aeruginosa mediated by membrane vesicles from Shewanella oneidensis

○徳納 吉秀[1,2,3]、野村 暢彦[1,4]、豊福 雅典[1,4]([1]筑波大学生命環境系、[2]物質材料研究機構国際ナノアーキテクトニクス研究拠点、[3]日本学術振興会特別研究員 PD、[4]筑波大学微生物サステイナビリティ研究センター)
○Yoshihide TOKUNOU[1,2,3], Nobuhiko NOMURA[1,4], Masanori TOYOFUKU[1,4] ([1]Faculty of Life and Environment, University of Tsukuba, [2]International Center for Materials Nanoarchitectonics, National Institute for Materials Science (MANA), [3]JSPS Research Fellow PD, [4]Microbiology Research Center for Sustainability (MiCS))

現在、微生物そのものを電極触媒として利用する環境エネルギー技術が注目を集めている。一般に、活性汚泥から得られる細菌叢が電極触媒として用いられ、中でも鉄還元細菌が触媒機能の鍵となる微生物だと考えられている。鉄還元細菌は、細胞外膜に電子伝達タンパク質である外膜シトクロムを分布させることで電極に電子を伝達するため、微生物電極触媒の活性に直接的に作用する。そのため、外膜シトクロムを介した電子移動機構(細胞外電子移動, Extracellular electron transfer, EET)が盛んに研究されてきた。一方で、細菌叢内の異種菌体間相互作用に関する知見は乏しく、特に、相互作用による EET への影響は明らかになっていない。ここで、モデル鉄還元細菌である *Shewanella oneidensis* MR-1 は、電極上で直径約百 nm の膜小胞(メンブレンベシクル, MV)を放出する。一般に MV は様々な生体分子を内包しており、情報伝達や物質の輸送など、微生物間相互作用を媒介するキャリアとして働くことが明らかになってきた。そこで本研究では *S. oneidensis* MR-1 により放出される MV と電極上異種微生物との相互作用の解明を目的として、電極上細菌叢にしばしば含まれる緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa* PAO1)を電気化学手法により解析した。

まず、*S. oneidensis* MR-1 由来の MV が *P. aeruginosa* PAO1 に付着するかどうかを検討するため、ITO 電極を作用極とした三電極電気化学リアクターに MV を含む電解液を入れ、サイクリックボルタンメトリー法により MV 由来の酸化還元シグナルを取得した。すると、*P. aeruginosa* PAO1 が ITO 電極に吸着しているときには、吸着していない場合と比べて MV の酸化還元シグナルが約 5 倍に増加した。これは、電極上の *P. aeruginosa* PAO1 により MV が電極表面に局在化したことを示しており、MV が *P. aeruginosa* PAO1 に付着することが示唆された。さらに、*P. aeruginosa* PAO1 が吸着した ITO 電極に+0.4 V (vs 標準水素電極電位)を印加し、*S. oneidensis* MR-1 により産生された MV を添加したところ、*P. aeruginosa* PAO1 による電流値が約 3 倍に増加した。外膜シトクロムの欠損株により産生された MV を添加した際には電流値の増加は確認されなかったことから、MV に含まれる外膜シトクロムが電子の通り道となって *P. aeruginosa* PAO1 の EET を媒介することが示唆された。すなわち、*S. oneidensis* MR-1 は、外膜シトクロムの局在する MV を異種微生物へと付着させることで EET を促進し、細菌叢の電極触媒能を向上させる作用があることが示唆された。

Cytochrome, Redox, Microbial fuel cells

発表責任者：徳納吉秀（tokunou.yoshihide.ga@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3A12p01
講演日時：3 月 27 日 13:50～ センター2 号館 A12 会場

L 型大腸菌が栄養型に復帰するときの形態形成因子の局在

Localization of morphogenetic components in regeneration of L-form *Escherichia coli*.

○藤田 智也（茨城県立医療大・医セ）
○Tomoya FUJITA (Ibaraki Pref. Univ.)

細菌の細胞壁が欠損した球形の L 型菌は、様々な感染症の患者から単離され、その細胞特性から感染性や病原性に関与しているのではないかと疑われている。一方で、細菌の祖先である細胞壁がない原始細胞は、不規則な細胞分裂を行い、細胞融合による遺伝情報の水平伝播を起こしていたと考えられているため、細胞挙動が似た L 型菌をモデルにした生物進化を意識した研究も行われている。このように、L 型菌は広く認知されているが、それを構成する分子機構についての知見は少なく、基礎生物学の観点からみると十分に理解されていない。

これまでに演者は、薬剤処理で誘導した L 型大腸菌の一部が、ユニークな細胞形態を経ながら細胞壁を再合成して栄養型に復帰することを確認した。そこで本研究では、形態形成機構の主要な因子である FtsZ、MreB、および RodZ の局在を細胞形態の変化に沿って経時観察し、L 型菌におけるそれらの役割を明らかにすることを目的とした。詳細については検討中である。

L-form bacteria, morphogenesis, cytoskeleton

発表責任者：藤田　智也（fujitat@ipu.ac.jp）

講演番号：3A12p02
講演日時：3 月 27 日 14:01～ センター2 号館 A12 会場

Corynebacterium glutamicum における DegQ 様プロテアーゼの役割
Role of DegQ-like proteases in Corynebacterium glutamicum
○渡辺 真央、テレジア ナタリア　マリア、岩井 伯隆、和地 正明（東京工業大学）
○Mao WATANABE, Natalia Maria Theresia, Noritaka IWAI, Masaaki WACHI (Tokyo Institute of Technology)

コリネ型細菌 *Corynebacterium glutamicum* はグルタミン酸生産菌として土壌から分離され、グルタミン酸をはじめとする多様なアミノ酸の発酵生産に工業的に利用されているグラム陽性菌である。近年ではアミノ酸だけでなく、異種タンパク質の分泌生産宿主として注目されている。本菌は培地中にタンパク質をほとんど分泌せず、内毒素も持たないため、容易に純度の高い安全な目的産物を生産させることができる。しかし、本菌は一般的なグラム陽性菌とは異なり、特異的な細胞表層構造を有している。ペプチドグリカン層の外側に長鎖脂肪酸であるミコール酸を主成分にする層と、CspB タンパク質で構成される S-layer が存在し、これらの細胞表層がタンパク質分泌の際に透過障壁となっている。先行研究の過程で溶菌酵素リゾチームへの感受性が細胞表層の透過性の指標として利用できることがわかった。また、Ca^{2+}キレーターEGTA にコリネ型細菌のリゾチーム感受性を上げる効果が見出された。この結果から EGTA が細胞表層に何らかの影響を及ぼす可能性が示唆されたため、EGTA 処理した細胞の表層タンパク質および分泌タンパク質を SDS-PAGE により分析した。その結果、EGTA 処理により CspB タンパク質の培地中への遊離と断片化が認められた。CspB タンパク質の断片化を引き起こす因子を探るため、プロテアーゼ欠損株を用いたスクリーニングを行った。それにより EGTA 処理によって引き起こされる CspB タンパク質の断片化は DegQ 様プロテアーゼの 1 つによるものであることが示された。この DegQ 様プロテアーゼ遺伝子は分泌シグナル配列を持つため、CspB タンパク質は細胞表層上もしくは培養液中に分泌された後、DegQ 様プロテアーゼによって断片化されたと考えられる。

以上の背景から、DegQ 様プロテアーゼによる CspB タンパク質の断片化のメカニズムとその生理的意義を明らかにすることを目的とし、DegQ 様プロテアーゼの欠損株過剰発現系の構築とタンパク質の精製を試みた。DegQ 様プロテアーゼの欠損株は親株に比べてリゾチーム感受性が上昇した。このことから、正常な細胞表層の形成に何らかの役割を果たしていることが示唆された。コリネ型細菌内で構成的に発現するプロモーターの下流にヒスチジンタグを融合した DegQ 様プロテアーゼの過剰発現株を構築した。分泌タンパク質を解析した結果、DegQ 様プロテアーゼの過剰発現が確認された。また、過剰発現株では EGTA 処理を行わなくても CspB タンパク質の断片化が誘導されることも明らかになった。現在、in vitro でのプロテアーゼ活性の確認を行うため、ヒスチジンタグを用いたアフィニティークロマトグラフィによる DegQ 様プロテアーゼの精製を進めている。

Corynebacterium glutamicum, DegQ, Cell surface

発表責任者：渡辺真央（fujimoto.m.ad@m.titech.ac.jp）

講演番号：3A12p03
講演日時：3 月 27 日 14:12～ センター2 号館 A12 会場

Enterococcus faecium 由来酸性グリセロ糖脂質の化学的性状
Chemical characterization of acidic glyceroglycolipid from *Enterococcus faecium*
○亀井 桃香、有路 沙織、飯田 博一、川原 一芳（関東学院大理工生命）
○Momoka KAMEI, Saori ARIJI, Hirokazu IIDA, Kazuyoshi KAWAHARA (Kanto Gakuin Univ.)

【目的】多くのグラム陽性細菌の細胞質膜の主成分の一つは、グリセロ糖脂質（GGL）であることが知られており、古くから研究が行われてきたが、2011 年に肺炎球菌の GGL が Natural Killer T 細胞を活性化することが報告され[1)]、再び注目されるようになった。また、肺炎球菌と分類学的に近縁である乳酸菌は、肺炎球菌と類似の GGL を有しており、これらの GGL にも同様の免疫活性がある可能性が考えられている。そこで我々は、乳酸菌の一種である *Enterococcus faecium* の GGL について調べ、これまでの研究により、本菌は 2 種類の GGL を有していることを見出した。そのうち中性の GGL については、グルコース二糖をもつ構造であることを確認した。本研究では、これとは別の酸性 GGL について、精製法を検討し、精製 GGL について化学構造を解析した。
【実験方法】*E. faecium* NBRC 100485 株を MRS 培地で培養し、得られた乾燥菌体からクロロホルム/メタノール（2:1, v/v）で菌体脂質を抽出した。この菌体脂質から、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーおよびシリカゲルカラムクロマトグラフィーで酸性 GGL を精製した。構造分析には、MALDI-TOF マススペクトロメトリー（MS）、^{1}H-NMR、ガスクロマトグラフィー（GC）およびガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリー（GC-MS）を使用した。
【結果】酸性 GGL を DEAE-セルロースに吸着した後に溶出し、さらにシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離し、精製画分を得ることができた。MALDI-TOF マススペクトロメトリー分析の結果、精製 GGL の主要な分子量は 1580~1630 程度であると推定された。この GGL の TMS ジアゾメタン処理により、分子量が 14 の倍数で増加したので、酸性基がメチルエステル化されたことが確認できた。また、この GGL を 1 M アンモニア水、100°C、2 h の条件で加水分解して脂肪酸を除去し、水層に得られた糖鎖画分について MALDI-TOF マススペクトロメトリーで分析したところ、複数のピークが検出されたが、各ピークの差が約 338 mu であったことから、酸性 GGL の糖鎖部分は、ヘキソースとヘキスロン酸からなる二糖の繰り返し構造を含んでいることが示唆された。中性糖の分析から、このヘキソースはグルコースであることが確認できたので、今後はメチル化分析等により、ウロン酸の同定を試みる予定である。
1）Kinjo, Y., et al, Nat. Immunol., 12(10), 966－974, (2011).

lactic acid bacteria, glyceroglycolipid, *Enterococcus faecium*

発表責任者：川原一芳（kawahara@kanto-gakuin.ac.jp）

講演番号：3A12p04
講演日時：3 月 27 日 14:23～ センター2 号館 A12 会場

Actinoplanes missouriensis の胞子嚢膜を構成する脂質のリピドーム解析
Lipidome analysis of the sporangium membrane of *Actinoplanes missouriensis*

○前田 聡史[1]、手塚 武揚[1,2]、和泉 自泰[3]、高橋 政友[3]、馬場 健史[3]、大西 康夫[1,2] ([1]東大院・農生科、[2]東大・微生物イノベ連携機構、[3]九大・生医研)
○Satoshi MAEDA[1], Takeaki TEZUKA[1,2], Yoshihiro IZUMI[3], Masatomo TAKAHASHI[3], Takeshi BAMBA[3], Yasuo OHNISHI[1,2] ([1]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, Univ. of Tokyo, [3]Med. Inst. of Bioregulation, Kyushu Univ.)

［目的］希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* は栄養豊富な環境では基底菌糸を伸長して増殖するが、栄養飢餓状態になると基底菌糸から短い胞子嚢柄を介して胞子嚢を形成し休眠する。胞子嚢は水などのシグナルを感知すると開裂し、遊走子を放出する。胞子嚢は多数の胞子を内包する多細胞状態の構造体であり、原核生物において極めて特異な存在である。これまでに我々は、胞子嚢の最外層である胞子嚢膜が脂質とタンパク質からなること、胞子嚢膜のリン脂質は菌糸細胞膜のリン脂質と同じく、主にカルジオリピン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトールから構成されること、粗精製した胞子嚢膜画分から SmpA、SmpB、SmpC、SmpD と名付けた 4 つのタンパク質を同定し、このうち SmpA と SmpB は胞子嚢形成に必須であることなどを明らかにしてきた。本研究では胞子嚢膜に含まれる脂質について、さらに詳細な解析を行い、胞子嚢膜の分子実体の解明を目指した。
［方法・結果］胞子嚢と栄養菌糸をそれぞれ破砕して、スクロースの密度勾配を用いた超遠心によって分画することで、胞子嚢膜と菌糸細胞膜を精製した。精製した胞子嚢膜および菌糸細胞膜の溶媒抽出物を、脂質成分を網羅的かつ定量的に分析するリピドーム解析に供した結果、胞子嚢膜に含まれる脂質のうち約 70%がトリアシルグリセロールであり、リン脂質の割合は 10%にも満たないことが明らかになった。そこで、トリアシルグリセロールを分解するリパーゼ H で胞子嚢を処理したところ、胞子嚢膜が分解されている様子が観察された。以上の結果から、胞子嚢膜の構成要素としてトリアシルグリセロールが存在することが強く示唆された。一方、胞子嚢膜のリン脂質の組成は菌糸細胞膜と同様、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトールなどであり TLC 解析の結果と概ね一致した。また、胞子嚢膜を構成する脂質中の主要な脂肪酸はペンタデカン酸 (15:0)、ヘキサデカン酸 (16:0)、ヘプタデカン酸 (17:0)、 オレイン酸 (18:1) であり、こちらも菌糸細胞膜に含まれる脂肪酸と大きな違いはなかった。
A. missouriensis の胞子嚢は、*Streptomyces* 属放線菌が形成する気中菌糸やそれが分化してできる胞子鎖と同様に、空気中に形成され表面は疎水的である。*Streptomyces* 属の気中菌糸や胞子鎖は疎水性の表層タンパク質に覆われているが、*A. missourisensis* はこれらの表層タンパク質のホモログを持たない。このことから *A. missouriensis* ではトリアシルグリセロールが胞子嚢表面の疎水性に関与している可能性が考えられる。現在、リパーゼ H での処理により、胞子嚢膜にどのような構造変化が生じるかを透過型電子顕微鏡で観察する実験を行なっており、その結果も合わせて発表する。

rare actinomycetes, sporangium, lipid

発表責任者：大西 康夫（ayasuo@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3A12p05
講演日時：3 月 27 日 14:34～ センター2 号館 A12 会場

Saccharomyces cerevisiae の細胞膜における生体膜構成リン脂質の分布と機能の解析
Distribution and role of membrane phospholipid in plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*
林 透真[1]、○古尾谷 南沙[1]、水池 彩[1]、堀内 裕之[1,2]、福田 良一[1,2]([1]東大院・農生科、[2]東大・微生物連携)
Toma HAYASHI[1], ○Nazuna FURUOYA[1], Aya MIZUIKE[1], Hiroyuki HORIUCHI[1,2], Ryouichi FUKUDA[1,2] ([1]Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, Univ. of Tokyo)

真核細胞において、生体膜の主要構成成分であるリン脂質は偏って分布しており、オルガネラ膜ごとにリン脂質組成が異なるだけでなく、脂質二重層の内層・外層間においても不均一に分布していることが知られている。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を含む様々な生物種の細胞膜において、リン脂質ホスファチジルエタノールアミン（PE）は内層側に偏って分布することが示唆されているが、細胞膜内層への PE の局在機構や細胞膜における PE の非対称分布の生理的意義には未解明な点が多い。

本研究では、*S. cerevisiae* の細胞膜内層への PE の供給機構と非対称分布の意義を明らかにすることを目的として、細胞膜内層の PE を人為的にメチル化することによりホスファチジルコリン（PC）に変換し、その影響を解析することにした。酢酸菌由来の PE メチル化酵素 Pmt にヒトの Ras GTPase である Rit1 の細胞膜移行シグナル、蛍光タンパク質 EGFP、3×HA を連結した融合タンパク質（PM-Pmt）を *GAL1* プロモーター下で発現させるためのプラスミド YCpGAL-RITC-pmt を構築した。このプラスミドを導入した酵母をガラクトース培地で培養して PM-Pmt の発現を誘導し、蛍光顕微鏡で観察したところ、EGFP の蛍光が細胞外縁部に確認され、PM-Pmt が細胞膜に局在することが示唆された。また、PM-Pmt を PC 合成欠損株で発現させたところ、ガラクトースを炭素源とした場合に生育が支持されたことから、PM-Pmt が PE メチル化酵素として機能していることが示唆された。PM-Pmt を発現させた場合の細胞膜リン脂質組成や生育への影響についても合わせて報告する。

yeast, phospholipid, plasma membrane

発表責任者：福田良一（afukuda@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3A12p06
講演日時：3 月 27 日 14:45～ センター2 号館 A12 会場

酵母生育定常期におけるステロール合成鍵酵素 Erg1 の細胞内分子動態
Intracellular dynamics of yeast key sterol-synthesis enzyme Erg1 in stationary phase

○柴田 裕平[1]、奥 公秀[1]、阪井 康能[1,2] ([1]京都大農、[2]京都大学際融合)
○Yuhei SHIBATA[1], Masahide OKU[1], Yasuyoshi SAKAI[1,2] ([1]kyoto Univ., [2]C-PIER)

目的

Erg1 はステロール合成経路を構成する酵素の 1 つであり、酵母においてエルゴステロールが多段階の反応を経て合成される中で、スクアレンからラノステロールへの変換に働くエポキシダーゼである。本酵素の発現量や活性の制御は細胞内ステロール量調節の鍵と考えられているが、その制御の一翼をになう分解機構については、これまでに小胞体関連分解(ERAD)が報告されているものの、他の機構については不明であった。本研究では小胞体および脂肪滴に局在する Erg1 の細胞内動態に着目し、その動態制御に機能する因子群の同定と、同定した Erg1 動態制御因子の欠損がステロール合成に与える影響を明らかにすることを目的とした。

方法・結果

我々は出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の生育状態に応じた Erg1 の細胞内動態を、Erg1 の C 末端側に GFP を融合した Erg1-GFP を発現させて解析した。解析の手法としては、GFP 蛍光の顕微鏡観察のほか、抗 GFP 抗体による Erg1-GFP のイミュノブロット解析を用いた。

酵母の対数増殖期からダイオーキシックシフトを経て定常期に至るまで、Erg1-GFP の局在は小胞体および脂肪滴の両方に見られた。一方でイミュノブロット解析の結果、生育定常期の酵母からの抽出サンプルのみで、Erg1-GFP の全長ポリペプチドに加えて、GFP 単体とほぼ同じ分子量を持った断片が検出された。このような断片は、オートファジーで分解される GFP 融合タンパク質の解析でよく検知される。そこでオートファジーに機能する Atg タンパク質欠損株で同様の解析を行った結果、全長ポリペプチドのみが検出されたことから、Erg1-GFP は、定常期の酵母においてオートファジーにより分解されることが分かった。

さらに脂肪滴に特異的に局在するタンパク質 Osw5 の欠損株でも Erg1-GFP のオートファジー分解が抑制されること、本欠損株では定常期にラノステロールが蓄積することを見出した。これらの結果から Erg1 のオートファジー分解を介したステロール量の調節機構の存在が示唆された。

sterol synthesis, autophagy, ER

発表責任者：阪井康能（ysakai@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3A12p07
講演日時：3 月 27 日 15:06～ センター2 号館 A12 会場

メタノール資化性酵母 *Candida boidinii* における小胞体内酸化還元状態の解析
Analysis of ER redox dynamics in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*
○若林 万紗也[1]、由里本 博也[1]、寶関 淳[1,2]、阪井 康能[1] ([1]京大院農、[2]京都先端大・バイオ環境)
○Masaya WAKABAYASHI[1], Hiroya YURIMOTO[1], Jun HOSEKI[1,2], Yasuyoshi SAKAI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]KUAS)

【背景・目的】

メタノール資化性酵母は、強力なメタノール誘導性プロモーターを利用した異種遺伝子発現の宿主として広く用いられている。本酵母において異種タンパク質を分泌生産する際に、小胞体 (ER) 内シャペロンタンパク質を過剰発現させることで生産効率が向上することが報告されており、ER 内の酸化還元状態がタンパク質のフォールディングや分泌効率に影響を及ぼすと考えられている。我々はこれまでに、哺乳類細胞の ER 内酸化還元状態を可視化できる蛍光分子プローブ ERroGFP S4 の開発に成功した[1)]。ERroGFP S4 の 405 nm と 488 nm で励起した蛍光強度の比を計測することで、ER 内の酸化還元状態を *in vivo* で解析することができる。本研究では、メタノール資化性酵母の異種タンパク質分泌生産や ER シャペロン過剰発現時に ER 内酸化還元状態がどのように変化するかを解析するため、ERroGFP S4 をメタノール資化性酵母 *Candida boidinii* で発現させ、ER 内酸化還元状態の可視化解析を試みた。

【方法・結果】

ERroGFP S4 をコードする遺伝子配列を *C. boidinii* の使用コドンに最適化し、*C. boidinii* Kar2 タンパク質の分泌シグナル配列と ER リテンションシグナル配列を N 末端および C 末端にそれぞれ付加し、*C. boidinii* において *ACT1* プロモーター支配下に発現した。グルコース培養した細胞の蛍光顕微鏡観察により、ERroGFP S4 が ER 内に発現していることを確認した。また、この細胞を酸化剤として H_2O_2 および還元剤として DTT で処理すると、405 nm と 488 nm で励起した蛍光強度比から H_2O_2 処理では酸化的に、DTT 処理では還元的に有意に変化することがわかった。これらの結果から、*C. boidinii* において ERroGFP S4 を用いて ER 内酸化還元状態を可視化解析できることが明らかとなった。現在、異種タンパク質分泌生産時、および ER シャペロン過剰発現時に ER 内酸化還元状態がどのように変化するのかを解析している。

1) Hoseki, *et al.*, *Biosci. Rep.* **36**: e00316 (2016).

ER redox dynamics, methylotrophic yeast, heterologous protein production

講演番号：3A12p08
講演日時：3 月 27 日 15:17～ センター2 号館 A12 会場

分裂酵母の胞子細胞膜形成開始におけるスピンドル極体タンパク質 Spo7 のはたらき

Role of the spindle pole body protein Spo7 in the initiation of spore plasma membrane formation in fission yeast

○鈴木 未菜、中村 太郎（大阪市大・院理）
○Mina SUZUKI, Taro NAKAMURA (Osaka City Univ.)

背景と目的

分裂酵母は、窒素源が枯渇すると胞子を形成する。胞子の細胞膜前駆体である前胞子膜の形成は、胞子形成過程におけるダイナミックな現象である。前胞子膜は、動物細胞における中心体に相当するスピンドル極体（SPB）を起点に形成される。私たちは、前胞子膜形成開始に必須な SPB タンパク質を取得してきた。このうち、膜形成に直接はたらく可能性が高い Spo7 というタンパク質に注目した。Spo7 は、Sec7 ファミリータンパク質であり、コイルドコイルドメインと PH ドメインを有している。さらに、PH ドメインを介してリン脂質結合能をもつことがわかっているが（Nakamura-Kubo *et al.*, 2011）、その詳しいはたらきは解明されていない。本研究では、*spo7*$^{+}$の周辺ではたらく遺伝子の取得と解析を通して、Spo7 のさらなる機能を明らかにし、前胞子膜形成開始の分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。

方法と結果

Spo7 と相互作用するタンパク質を取得するために、酵母ツーハイブリッド法を行ったところ、コイルドコイルドメインとケルチリピートドメインをもつ Tea3 が取得された。Tea3 は、栄養増殖時に極性成長に関わることが知られているが（Arellano *et al.*, 2002）、胞子形成時にどのようなはたらきをしているのかについては明らかになっていない。
今回は、*tea3* 破壊株の胞子形成時の形質、Tea3 の胞子形成時の局在及び Spo7 とどのように関わるのかについて報告する。

spore, membrane, centrosome

講演番号：3A12p09
講演日時：3 月 27 日 15:28～ センター2 号館 A12 会場

分裂酵母細胞膜にみられる陥入構造の形成に関わる 2 つの BAR ドメインタンパク質の解析
Characterization of the two fission yeast BAR domain proteins involved in invagination structure formation of the plasma membrane

○箕面 凪砂[1]、田原 悠平[1,2]、宮田 真人[1,2]、中村 太郎[1] ([1]大阪市大・院理、[2]大阪市大・複合先端)
○Nagisa MINOMO[1], Yuhei TAHARA[1,2], Makoto MIYATA[1,2], TARO NAKAMURA[1] ([1]Osaka City Univ., [2]OCARINA, Osaka City Univ.)

背景と目的

分裂酵母の胞子は、様々な環境ストレスに対して耐性をもつ休眠細胞であり、その表面は、金平糖のような凸凹とした構造をしている。我々は、急速凍結レプリカ電子顕微鏡法により、分裂酵母の胞子細胞膜に深い溝状の特徴的な陥入構造が多数存在していることを発見し、この構造が BAR ドメインタンパク質 Pil2 によって形成されることを明らかにした。また、栄養細胞にも陥入構造が存在し、こちらは別の BAR ドメインタンパク質 Pil1 が形成に関わっていることを報告した（2018 年度大会）。

本研究は、胞子にみられる陥入構造がどのような役割を果たしているのか、また、分裂酵母がなぜ、陥入構造の形成に２つの BAR ドメインタンパク質を使い分けるのかを、Pil1, Pil2 の解析を通して明らかにすることを目的とする。

方法と結果

陥入構造の役割を明らかにするため、胞子に熱またはエタノール処理を行い、生存率を測定したところ、*pil2*Δの胞子の生存率が大きく下がった。これらの結果により、胞子細胞膜の陥入構造は胞子のストレス耐性に関わっていることが示唆された。胞子のストレス耐性には胞子壁表層タンパク質 Isp3 が関わっていることが知られている（Fukunishi *et al.,* 2014）。*pil2*Δの胞子では、Isp3 は胞子表層に局在していたが、量が減少していた。以上の結果により、陥入構造がないと Isp3 が不安定な状態になり、それがストレス耐性の低下につながっていると考えられる。

続いて、２つの BAR ドメインタンパク質を使い分ける意義を明らかにするため、胞子特異的に発現する *pil2*$^{+}$を栄養細胞で過剰発現させたところ、細胞膜表面にフィラメント状の局在を示した。この局在は、Pil1 の局在と非常に似ていた。しかしながら、Pil1-GFP を胞子で過剰発現させても、胞子細胞膜表面に Pil2 のような直線状の局在はみられなかった。これらのことから、Pil1 の機能は Pil2 でも代替できる可能性が高い。

現在、Pil1、Pil2 の各領域を入れ替えた株を作製し、栄養細胞と胞子の陥入構造形成に必要な領域の決定を進めている。

yeast, stress, eisosome

講演番号：3A12p10
講演日時：3 月 27 日 15:39～ センター2 号館 A12 会場

出芽酵母の胞子形成における Vps13 の解析
Analysis of Vps13 during sporulation in budding yeast
○藤枝 祐二[1]、棟重 賢治[1]、中村 毅[1]、須田 恭之[2]、舘川 宏之[1,3]（[1]東京大農生科、[2]筑波大医、[3]微生物科学イノベーション連携研究機構）
○YUJI FUJIEDA[1], KENJI MUNESHIGE[1], TSUYOSHI NAKAMURA[1], YASUYUKI SUDA[2], HIROYUKI TACHIKAWA[1,3] ([1]Tokyo Univ., [2]Tsukuba Univ., [3]Collaborative Research Institute for Innovative Microbiology)

【目的】
二倍体の出芽酵母は、窒素源が枯渇し非発酵性炭素源のみが存在する飢餓条件において、第一・第二減数分裂を経て４つの一倍体胞子を形成する。この過程において、胞子の細胞膜の前駆体である前胞子膜が細胞内に形成される。当研究室ではこの前胞子膜形成において異常をきたす破壊株のスクリーニングが行われ、*spo71* 破壊株、*spo73* 破壊株、*vps13* 破壊株が得られた。Spo71，Spo73，Vps13 の３タンパク質はこれまでの相互作用の解析から SSV 複合体を形成して前胞子膜形成において働くと考えられている。Vps13 は栄養増殖時には様々なオルガネラコンタクトサイトに局在する脂質輸送タンパク質であることが報告されており、本研究ではこの Vps13 の解析を中心に SSV 複合体の前胞子膜形成における役割の解明を目的とした。

【結果・考察】
SSV 複合体の３タンパク質について内在性の発現量における局在を観察したところ、すべて前胞子膜上に均一に局在が観察された。さらなる観察において、Vps13 の前胞子膜局在は *spo71* 破壊株においては観察されないことから、Vps13 は Spo71 依存的に前胞子膜に局在をしていることが確認された。そこで Vps13 と結合すると報告されている Spo71 の PxP モチーフを含むドメインと前胞子膜マーカーのキメラタンパク質である、PxP-K20 を過剰発現したところ、Vps13 の局在は前胞子膜上に観察された。このことから、Vps13 は Spo71 との結合を介して前胞子膜上に局在することが明らかとなった。しかしながら、PxP-K20 タンパク質が *spo71* 破壊株の胞子形成能を回復しないことから、Spo71 は Vps13 のリクルートの他に前胞子膜形成に必要な機能を有していることが考えられる。Vps13 の前胞子膜局在が Spo71 依存的である一方で、Vps13 の N 末端の局在を栄養増殖時に観察したところ、小胞体への局在が観察された。このことから、Vps13 は前胞子膜形成時において、前胞子膜－小胞体のコンタクトサイトを形成して前胞子膜形成において働くことが示唆された。現在、前胞子膜－小胞体コンタクトサイトについてさらなる解析を行っている。

Budding yeast, sporulation, membrane contact site

発表責任者：藤枝　祐二（yuji.f.1103@gmail.com）

講演番号：3A12p11
講演日時：3 月 27 日 15:50～ センター2 号館 A12 会場

出芽酵母 YBR056w にコードされるβ-1,6-グルカナーゼ活性を持つ蛋白質の解析
Saccharomyces cerevisiae YBR056w encodes a ß-1,6-glucanase
北澤 陽一郎[1]、永田 晋治[3]、平山 弘人[4]、鈴木 匡[4]、足立 博之[1,2]、○野田 陽一[1,2]([1]東大院・農生化、[2]東大微生物連携研究機構、[3]東大院・新領域、[4]理研・CPR)
Yoichiro KITAZAWA[1], Shinji NAGATA[3], Hiroto HIRAYAMA[4], Tadashi SUZUKI[4], Hiroyuki ADACHI[1,2], ○Yoichi NODA[1,2] ([1]Univ. of Tokyo, Dept. of Biotech., [2]CRIIM, [3]Univ. of Tokyo, [4]Riken, CPR)

（目的）出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の細胞壁は，マンナン蛋白質，キチン，β-1,3-グルカン，β-1,6-グルカンにより構成されている．β-1,6-グルカンは前三者を繋ぎ止める機能を持ち，細胞の生育に必須な構成成分であるが，その生合成機構に関しては不明な点が多く残されている．我々は，その生合成機構を明らかにするために，β-1,6-グルカンの生合成に関与する Kre ファミリー蛋白質群の機能を解析している．そのうちの 1 つ Kre6 は GH 16 ファミリーの糖加水分解酵素と相同性を示す領域を持ち，細胞壁合成が盛んに行われる出芽部位に強く局在する．我々は，Kre6 の存在する膜画分中にβ-1,6-グルカンに対する transglycosylation 活性，伸張活性が存在する可能性を考え，探索を行った．その過程において，細胞抽出液中に Kre6 には依存しないβ-1,6-グルカンの切断活性を複数見出した．本研究では，この切断活性を担う酵素を同定・解析し，β-1,6-グルカンの生合成との関係を調べることを目的とした．

（方法と結果）酵母の細胞抽出液に見出した活性は，細胞質画分に存在するものと膜画分に存在するものの少なくとも二種類が存在することがわかった。また，膜画分に比べ細胞質画分の活性が比較的容易に精製できたため，質量分析により同定を試みたところβ-glucanase の一つである Exg1 であることがわかった．Exg1 がβ-1,6-グルカン切断活性を持つことは既知であったため，先行研究の調査を再度詳細に行ない，切断酵素をコードする可能性が高い 2 つの候補遺伝子 *EXG2, EGH1* に着目し，*EXG1* との三重破壊株(BY4741 Δ*exg1*Δ*exg2*Δ*egh1*)を作製した．この株についてβ-1,6-グルカン切断活性を測定したが，野生型の出芽酵母で認められた活性が大きく変化せず残存していた．そこでこの三重遺伝子破壊株から活性を持つ蛋白質の精製を試みたが，同定には至らなかった．一方，分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* にはβ-1,6-グルカンを切断する活性を持ち，GH5 ファミリーに属する Exg3 が存在することから，*S. cerevisiae* の Exg3 ホモログ, YBR056w に着目した．上記の三重欠損株, Δ*exg1*Δ*exg2*Δ*egh1* にさらに YBR056w の遺伝子欠損を導入して，そのライセート中のβ-1,6-グルカン分解活性を測定したところ，三重変異株と比較して大きく減少していた．また GST 融合蛋白質として大腸菌で発現・精製した YBR056w は，顕著なβ-1,6-グルカン分解活性を示した．最後に，四重遺伝子破壊株(Δ*exg1* Δ*exg2* Δ*egh1* Δ*ybr056w*)に低コピーベクターで YBR056w を導入し，そのライセート中のβ-1,6-グルカン分解活性を測定したところ，活性の回復が見られた．これらのことから，YBR056w にコードされる蛋白質は，出芽酵母のライセート中で検出されるβ-1,6-グルカン分解活性の主要な構成成分の一つであることが強く示唆された．現在，本活性とβ-1,6-グルカン生合成との関連についてさらに解析を行なっている．

glucanase, yeast, cell wall

発表責任者：野田陽一（anoday@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3A12p12
講演日時：3 月 27 日 16:01～ センター2 号館 A12 会場

分裂酵母の新規 RNA 結合タンパク質 Nrp1 の機能解析
Functional analysis of the RNA-binding protein Nrp1 in fission yeast
○湯川 格史[1,2]、大石 充輝[1]、登田 隆[1,2]（[1]広島大・院統合生命、[2]広島大・健康長寿研究拠点）
○Masashi YUKAWA[1,2], Mitsuki OHISHI[1], Takashi TODA[1,2] ([1]Grad. Sch. of Integ. Sci. for Life, Hiroshima Univ., [2]HiHA, Hiroshima Univ.)

染色体均等分配には紡錘体微小管が必須であり、その破綻はゲノム不安定性を引き起こし、流産や癌を含む種々のヒト疾患の原因となる。紡錘体微小管の双極構造は、モータータンパク質 5 型キネシンが生み出す中心体を押し離す力によって形成されると考えられている。そのため、5 型キネシン欠損細胞は中心体不分離を引き起こし、致死となる。しかし、我々は分裂酵母 5 型キネシン Cut7 欠損株が示す致死性が、14 型キネシン Pkl1 欠損によって抑圧されることを見出した。すなわち、Cut7 に依存しない紡錘体形成経路の存在が判明した(1,2)。そこで、Cut7 と拮抗的に機能する機能経路の全容解明を目的として、*cut7* 温度感受性変異を抑圧するサプレッサー変異の取得を試みた(3)。その結果、原因遺伝子として取得の予想された *pkl1* 遺伝子に加えて、RNA 認識モチーフを有する機能未知の *nrp1* 遺伝子が同定された。実際、*nrp1* 遺伝子破壊や RNA 認識モチーフ内の変異によっても *cut7* 変異株の温度感受性を抑圧できたことから、Nrp1 は標的 RNA との結合を介して紡錘体形成に関与する可能性が考えられた。さらに興味深いことに、Nrp1 は進化上高度に保存されており、種々のストレス条件下で細胞質内にストレス顆粒様凝集体を形成すること、*nrp1* 欠損株は酸化ストレスに感受性を示すことも判明した。従って、Nrp1 は細胞周期 M 期のみならず、ストレス応答にも重要な役割を担うと考えられる。本発表では、Nrp1 が紡錘体形成にどのように関与しているか、また、ストレス応答経路と分子レベルでどのようなクロストーク系を構成するかについて議論する。

1. Yukawa et al., Mol. Biol. Cell, 28: 3647-3659. (2017)
2. Yukawa et al., J. Cell Sci., 131: 1-11. (2018)
3. Yukawa et al., G3: Genes Genomes Genetics, 9:269-280. (2019)

RNA binding protein, bipolar spindle formation, microtubule

講演番号：3A12p13
講演日時：3 月 27 日 16:21～ センター2 号館 A12 会場

1 細胞自家蛍光解析で可視化する微生物の細胞死過程の多様性

Spectrum of cell death: traces of fatal stresses in single-cell innate fluorescence signature

○下段 千尋[1]、高部 響介[2]、野村 暢彦[2,3]、八幡 穣[2,3]（[1]筑波大・生命環境学群、[2]筑波大・生命環境系、[3]筑波大・MiCS）
○Chihiro SHIMODAN[1], Kyosuke TAKABE[2], Nobuhiko NOMURA[2,3], Yutaka YAWATA[2,3] ([1]Sch. of Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Fac. of Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [3]Microbiology Research Center for Sustainability Univ. Tsukuba）

【背景】食品製造や医療の現場で微生物の生死を判定することは、衛生や安全の面で重要である。現在、これを調べるには、培養か染色を行っている。培養では、対象とするサンプルを寒天培地に撒き、コロニーを形成させるまでに 1 日から数日という長い時間がかかる。染色では、サンプルの再利用ができないため、検査に供したものは再び使うことができなくなる。培養や染色を必要としない判定法を作ることができれば、迅速に、かつサンプルを損なうことなく検査を行うことができる。
【目的】そこで本研究では、微生物の生死を迅速に、かつ非侵襲で判定する方法を開発することを目的とした。その方法として、微生物の自家蛍光を用いた。自家蛍光は、生体分子にレーザーを照射した際に発する微弱な蛍光で、生体分子の集合体である微生物の 1 細胞全体から取得できる自家蛍光は、細胞の状態を反映する。本研究グループでは、共焦点レーザー顕微鏡による自家蛍光取得と画像解析、機械学習による分類を組み合わせた、CRIF（Confocal reflection microscopy-assisted single-cell innate fluorescence analysis）をこれまでに開発している。この手法で取得する 1 細胞ずつの自家蛍光の情報を自家蛍光シグネチャーと呼び、当研究グループではこれまでに微生物の種類や増殖段階によって自家蛍光シグネチャーが異なることを示してきた。しかし、生死によって違いが表れるかは不明だった。そのため、微生物の生死によって自家蛍光シグネチャーが異なるかどうかを調べた。
【方法】大腸菌 K12 株を対数増殖期まで培養したのち、エタノール・紫外線・加熱の 3 つの方法で殺菌し、各種殺菌を行ったものと行わなかったものを CRIF で比較した。
【結果と考察】主成分分析により、死菌の自家蛍光シグネチャーは生菌のものと異なる特徴を示すことが明らかとなった。さらに、自家蛍光シグネチャーは殺菌の方法によっても異なることが示された。この結果から、自家蛍光シグネチャーを用いて微生物の生死を判別することができ、さらに、細胞の“死因”を推測できる可能性が示された。
【展望】より多くの殺菌方法や様々な種類の細菌で同様の実験を行い、汎用性のある判別モデルを作ることで、殺菌等を行った際に細胞が目的の方法で死んでいるかを確かめることができると考えられる。

innate fluorescence, single-cell analysis, cell death

発表責任者：八幡穣（yawata@me.com）

講演番号：3A12p14
講演日時：3 月 27 日 16:32～ センター2 号館 A12 会場

糸状菌オルガネラと細胞壁・隔壁のラベルフリーラマンイメージング解析
Label-free Raman imaging analysis of organelles and cell walls/septa in a filamentous fungus
○安田 充[1]、竹下 典男[2]、重藤 真介[1] ([1]関西学院大理工、[2]筑波大生命環境)
○Mitsuru YASUDA[1], Norio TAKESHITA[2], Shinsuke SHIGETO[1] ([1]Kwansei Gakuin Univ., [2]Univ. of Tsukuba)

【背景・目的】糸状の細長い菌糸からなる糸状菌は菌糸の先端を伸長させながら分岐し，生長する。この糸状菌の生態を分子レベルで調べるため，本研究では入射レーザーとは異なる波長の散乱光 (ラマン散乱光) を検出するラマン分光法を利用する。ラマン分光法は非破壊・非染色・細胞が生きたままの状態で様々な細胞内分子の分子情報に加え，それらの空間分布情報をもたらす。このラマン分光法を糸状菌に適用すれば，糸状菌生態における分子レベルでの理解が加速すると期待される。そこで，本研究は糸状菌オルガネラと細胞壁・隔壁のラベルフリーラマンイメージング解析を目的とした。

【実験】糸状菌 *Aspergillus nidulans* を 1–2 日間，液体培地で培養した。菌糸のラマンイメージングを共焦点顕微ラマン分光イメージングシステムで行った。得られたラマンハイパースペクトルデータを，多変量解析の一種である，多変量波形分解-交互最小二乗法 (Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares：MCR-ALS) を用いて解析した。MCR-ALS はラマンハイパースペクトルデータを主要な細胞内成分の固有スペクトルとそれら成分の空間分布に分解する数学的手法である。

【結果・考察】多様な細胞内分子のラマン散乱光が重なり合ったラマンスペクトルから，どのような分子が含まれるかを同定することは困難を極める。しかし，我々は MCR-ALS を用いることで，1,000 以上のラマンスペクトルからなる菌糸のラマンハイパースペクトルデータが，主にシトクロムなどのタンパク質，核酸，多糖類，脂質の成分で構成されることを明らかにした。各成分のラマンスペクトルを詳細に解析したところ，シトクロム成分に関しては還元型シトクロム *b,c* が支配的であることを突き止め，シトクロム種の同定と酸化還元状態の識別に成功した。また，多糖類成分は真菌の細胞壁や隔壁の構成成分であるキチンに特徴的なスペクトルパターンを示し，脂質成分については細胞膜の構成成分であるエルゴステロールが含まれることがわかった。特に多糖類と脂質成分の情報はラマン分光法がキチンやエルゴステロールを標的とした抗真菌薬の新たな評価法になりうる可能性を示唆する。さらに，各成分の空間分布を解析した結果，ミトコンドリア，細胞核 (多核)，脂肪滴といったオルガネラ，ならびに細胞壁や隔壁などの菌糸細胞の境界を同時かつラベルフリーで可視化することに成功した。以上より，ラマン分光法が糸状菌の生態を分子レベルで理解するための強力なツールとなりうることを実証した。

filamentous fungus, Raman imaging, multivariate analysis

発表責任者：重藤 真介（shigeto@kwansei.ac.jp）

講演番号：3A12p15
講演日時：3 月 27 日 16:43～ センター2 号館 A12 会場

Identification of novel proteins regulating fungal cell-to-cell communication by localization screening of multicellularity-specific uncharacterized proteins

○Md. Abdulla Al MAMUN[1], Takuya KATAYAMA[1,2], Wei CAO[3], Shugo NAKAMURA[3], Jun-ichi MARUYAMA[1,2] ([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]INIAD, Toyo Univ.)

[Background]

Multicellular organisms have the feature of intercellular molecular exchange for cooperation among the cells or tissues. Fungi consist of unicellular (yeast) and multicellular (filamentous fungi) species, and the latter one possesses a primitive morphological structure, the septal pore for cell-to-cell communication. A specifically evolved fungal organelle Woronin body plugs the septal pore upon wounding, thereby protecting the flanking cell. However, comparative genomic approach between multicellular and unicellular fungal species has not yet been employed to investigate additional components/mechanisms in the regulation of cell-to-cell communication. As Ascomycota, one of fungal divisions, possesses a number of genetically well-analyzed species, we performed a genomic comparison between multicellular and unicellular ascomycetes and subsequent localization screening to find novel proteins regulating the cell-to-cell communication via septal pore.

[Results]

In this study, we used *Aspergillus oryzae* due to having a unique experiment system of quantitatively analyzing the ability to protect the flanking cell upon hypotonic shock-induced hyphal wounding[1)]. Here, 776 genes were selected as multicellularity-specific uncharacterized by using BLAST-based genomic comparison between multicellular ascomycetes (*A. oryzae*, *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus nidulans*) and unicellular ascomycetes (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Candida albicans*) along with gene ontology term “no biological data available”. Proteins encoded by the genes were expressed as EGFP fusion in *A. oryzae*, and 8% of the proteins were found to localize to the septum/septal pore. Approximately 40% of deletion strains lacking the septum-localizing proteins exhibited lower abilities to protect the flanking cell upon wounding. In conclusion, the present genomic comparison along with localization screening allowed us to successfully find many novel proteins having a role in fungal cell-to-cell communication.

1) Maruyama and Kitamoto (2019) The Mycota VIII, pp. 3-14

septum, cell-to-cell communication, *Aspergillus oryzae*

発表責任者：Jun-ichi Maruyama（amarujun@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3A12p16
講演日時：3 月 27 日 16:54～ センター2 号館 A12 会場

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* における AoCdc48 の機能及び有用物質分泌生産能に関する解析

Analysis on AoCdc48 function and its involvement in valuable material productivity in *Aspergillus oryzae*.

○守田 湧貴、菊松 風大、竹川 薫、樋口 裕次郎 (九大院 生資環 生命機能)
○Yuuki Morita, Futa Kikumatsu, Kaoru Takegawa, Yujiro Higuchi (Dept. of Biosci. Biotechol., Kyushu Univ.)

【研究背景】出芽酵母における Cdc48 は、一分子中に二つの AAA ATPase ドメインを有し、タンパク質の品質管理において機能している。主な機能としては小胞体関連分解(endoplasmic reticulum associated degradation, ERAD)、核内膜関連分解(inner nuclear membrane-associated degradation, INMAD)、ミトコンドリア関連分解(mitochondria-associated degradation, MAD)、エンドソーム-ゴルジ体関連分解(endosome and Golgi-associated degradation, EGAD)においてユビキチン化された異常タンパクや不要タンパクのプロテアソーム分解に寄与していることが報告されている。また正常な生育に必須なタンパク質であり、機能不全を引き起こすと ER ストレス等を生じて生育が著しく抑制されることも報告されている。人などの哺乳動物や出芽酵母においては非常に研究が進んでいるタンパク質であるが、糸状菌においては Cdc48 の機能及び有用物質生産性への関与は未だ明らかになっていない。そこで本研究では、黄麹菌 *Aspergillus oryzae* における Cdc48 のオルソログである AoCdc48 の機能及び有用物質生産性への関与に関して解析を行った。

【結果・考察】我々は *Aocdc48* の条件発現株、過剰発現株及び AAA ATPase ドメインのアミノ酸点変異株を構築し、AoCdc48 の機能及び有用物質生産性への関与の解析を行った。*Aocdc48* 条件発現株においては *Aocdc48* 発現抑制時に菌糸形態の異常を引き起こすことを見出した。そこで、*Aocdc48* 発現抑制時における菌糸の分泌小胞、小胞体、液胞を GFP を用いたマーカータンパク質によって蛍光顕微鏡観察を行った。その結果、分泌小胞は先端への局在を失っていることが観察され、小胞体や液胞は異常な局在が観察された。また *Aocdc48* の発現を抑制すると生育が著しく抑制されて解析が困難なため、出芽酵母において生育可能であり、ATPase 活性が著しく低下することが報告されているアミノ酸点変異部位に同様に変異を加えた株の構築を行った。その結果、AoCdc48 の機能が不活性且つ生育が可能である株の選抜を行い、生育可能な株の取得に成功した。次に *Aocdc48* 過剰発現株において表現型の解析及びアミラーゼ分泌生産性、コウジ酸分泌生産性に関して解析を行った。その結果、表現型の解析では 30℃培養におけるコロニー形態の異常及びストレス負荷によるコロニー形態の異常の抑圧が確認された。またアミラーゼ分泌生産性、コウジ酸分泌生産性の解析では対象株と *Aocdc48* 過剰発現株間の分泌量は同程度であることが確認された。

現在、異常タンパク質発現株を構築し、ERAD や EGAD などにおける異常タンパク質分解能の解析及び異種タンパク質生産株を構築し、異種タンパク質分泌生産性の解析を行っている。

Aspergillus oryzae, Cdc48, ERAD

講演番号：3A12p17
講演日時：3 月 27 日 17:05～ センター2 号館 A12 会場

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* における AAA ATPase AipA と AoAbp1 のエンドサイトーシスにおける機能解析

Functional analysis of AAA ATPase AipA and AoAbp1 related to endocytosis in *Aspergillus oryzae*.

○日浅 怜子、柿本 健一、竹川 薫、樋口 裕次郎（九大院 生資環 生命機能）
○Reiko HIASA, Kenichi KAKIMOTO, Kaoru TAKEGAWA, Yujiro HIGUCHI (Dept of Biosci. Biotechnol., Kyusyu Univ.)

【背景および目的】

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は古来から醸造食品の製造に利用されてきたことから、高い安全性が認められ、酵素などの有用タンパク質を分泌高生産する。こうした特徴から、近年ではバイオ医薬品の主成分である糖タンパク質などの異種タンパク質を産生させる宿主としての利用が期待されている。黄麹菌の細胞内小胞輸送経路には分泌経路と物質取り込みのエンドサイトーシス経路が存在するが、黄麹菌を含めた糸状菌において、エンドサイトーシスの詳細な分子機構は未だ解明されていない。我々はこれまでに黄麹菌において、エンドサイトーシス関連因子であり、アクチンの重合化に関わる AoAbp1 と相互作用するタンパク質として AAA ATPase である AipA を同定している。AipA はエンドサイトーシスが活発に行われている菌糸先端に主に局在することが明らかとなっているが、AipA ホモログを含めて詳細な分子機能はほとんどわかっていない。本研究では、エンドサイトーシスにおける AAA ATPase AipA を中心とした分子機構を黄麹菌において明らかにすることを目的とした。

【方法および結果】

AipA と相互作用する AoAbp1 との関係性を調べるため、Δ*Aoabp1* および Δ*aipA* において AipA と AoAbp1 の局在を解析した。その結果、AipA の局在は AoAbp1 に依存することが明らかになった。次に、AipA のエンドサイトーシスにおける重要性を調べるために、エンドサイトーシスマーカーとして細胞膜タンパク質である AoUapC および AoCan1 と緑色蛍光タンパク質 EGFP の融合タンパク質を黄麹菌細胞内でそれぞれ発現させ、共焦点顕微鏡を用いてエンドサイトーシスを継時的に解析した。AoUapC-EGFP、AoCan1-EGFP を用いた解析により、Δ*aipA* においてエンドサイトーシスの促進が確認された。また、AoCan1-EGFP を用いた解析により *aipA* 過剰発現株においてエンドサイトーシスの抑制が確認された。これにより AipA は黄麹菌細胞内においてエンドサイトーシスを負に制御していることが示唆された。また、AoCan1-EGFP を用いた解析により、AAA ATPase 活性の無い $aipA^{K542A}$ 過剰発現株において野生株と同様のエンドサイトーシスが確認されたことから、AipA の機能において AAA ATPase 活性が重要であることが示唆された。さらに、*aipA* 過剰発現条件下において AipA が正常に機能しているかどうかを調べるために EGFP-AipA の局在観察を行ったところ、通常条件下と異なり AipA は菌糸中にドット状の局在を示したことから、余剰な AipA は菌糸基部でのエンドサイトーシスに関与することで、エンドサイトーシスを抑制している可能性が示唆された。

Aspergillus oryzae, AipA, endocytosis

講演番号：3A12p18
講演日時：3 月 27 日 17:16～ センター2 号館 A12 会場

黄麹菌におけるα-アミラーゼ mRNA の可視化解析

Visualisation analysis of α-amylase mRNA in *Aspergillus oryzae*

○樋口 裕次郎、竹川 薫（九大院農）
○Yujiro HIGUCHI, Kaoru TAKEGAWA (Dept. of Biosci. Biotechnol., Kyushu Univ.)

細胞において、mRNA が転写され、タンパク質に翻訳される過程は生命活動における根本を成すものであり、この転写・翻訳過程の細胞内における時空間的かつ量的な制御機構は極めて重要なものである。また、個々の細胞間における mRNA 生成・分解からタンパク質の合成までの過程は、ヘテロであることが明らかになってきている。さらに、細胞内のどの部位で mRNA やタンパク質が機能するかといった詳細な情報は、細胞生物学的解析でしか得ることはできない。こうしたことから近年、個々の mRNA やタンパク質分子を解析するために、一分子可視化の研究が一層展開してきている。

本研究において対象とする黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は、日本の発酵・醸造産業において必須の微生物であり、有用酵素の分泌生産能力が非常に高い。特に、デンプン分解酵素である α-アミラーゼは 1 リットルの培養あたり数十グラムのオーダーで生産し、主に菌糸の先端から分泌されると考えられている。また、α-アミラーゼは mRNA としても極めて多量に転写されることが知られている。しかし、多細胞多核である黄麹菌において、細胞のどの部位の核で mRNA が作られ、そして翻訳が行われているのかといった研究報告は未だ無い。そこで本研究では、黄麹菌において多量に作られる α-アミラーゼ mRNA の細胞内局在を解析することを目的とし、多細胞多核である黄麹菌における遺伝子発現機構に関する時空間的知見を得ることを目的とした。

今回、α-アミラーゼ mRNA の局在解析を fluorescence in situ hybridization (FISH) 法により固定した細胞において行った。mRNA にハイブリダイズするプローブには FAM 蛍光色素を用い、α-アミラーゼをコードする *amyB* のコーディング領域全長に渡り平均 20 nt ずつ 47 か所に設計することで、single molecule FISH (smFISH) を可能とした。菌株には野生株である RIB40 株を用い、まず最少培地である CD 培地ベースで一晩培養し、smFISH により α-アミラーゼ mRNA の細胞内局在を観察した。その結果、CDglc 培地では蛍光がほぼ見られなかったのに対し、CDmal 培地では菌糸先端から少し基部側に蛍光が見られた。また、CDglc 培地で一晩培養した後、CDmal 培地にシフトしたところ、30 分後以降で微弱な、60 分後以降で強い蛍光が確認された。次に、栄養源の豊富な GPY および MPY（それぞれ炭素源にグルコースとマルトースを含む）培地で培養した細胞において α-アミラーゼ mRNA を観察したところ、GPY では細胞内に蛍光がほぼ見られなかったのに対し、MPY では菌糸先端からやや基部側で蛍光が観察された。以上の結果から本研究により、α-アミラーゼの mRNA が培養条件、特に炭素源条件によって発現量や局在パターンを変化させていることを細胞生物学的に明らかにした。

Aspergillus oryzae, α-amylase, mRNA

発表責任者：樋口裕次郎（y.higuchi@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3A15a01
講演日時：3 月 27 日 09:30～ センター2 号館 A15 会場

難分解性土壌有機化合物フミン酸の分解酵素の精製

Screening of the enzyme degrading humic acid

○伊藤 空良、西山 辰也、上田 賢志（日大生資科）
○ Sora ITO, Tatsuya NISHIYAMA, Kenji UEDA (College of Bioresource Sciences, Nihon University)

【背景･目的】 フミン酸とは、土壌に含まれる有機化合物のアルカリ抽出物(腐植質)の中で、酸に不溶な成分のことを指す。土壌中の生体由来有機化合物が様々な分解、重合を経て生成されたフミン酸は土壌に多量に存在するが、巨大で、芳香環や多数の共役二重結合を持つ化学構造のために高い難分解性を示す。しかし、本化合物がもつ豊富な芳香環は有用物質を合成するための初発原料として利用できることから低分子化が期待される。先行研究より、土壌を主な生息地として生育する放線菌の中から、フミン酸を添加した固体寒天培地上でフミン酸の分解活性を示す菌株が発見された。しかし、本活性はフミン酸の高い難分解性のために in vitro で直接測定することが困難であった。そこで本研究では、土壌中から高いフミン酸分解活性を示す菌を探索し、その菌が持つフミン酸分解のメカニズムを解明することを目的とする。

【方法 結果】 市販のフミン酸にはカルシウムやリン、鉄、などの不燃性の無機物である灰分や、芳香環から伸びる側鎖が多く含まれる。フミン酸分解菌を探索する中で、基本骨格ではなく側鎖を分解、資化する菌が含まれる可能性が考えられたことから灰分及び側鎖を除去する目的で灰分処理を行った。その結果、フミン酸に含まれている灰分が 8.14%から 1.23%に減少した。さらに、灰分処理を行ったフミン酸を用いて NMR で構造解析を行った結果、糖やカルボニル基が減少し、相対的に芳香環が増加していたことから、芳香環を多く含んだフミン酸の炭素骨格には変化がなくそれ以外の炭素が取り除かれたと考えられた。次に、フミン酸代謝酵素を生産する菌を土壌中から取得するために、灰分処理したフミン酸を単一炭素源とする最少培地や、フミン酸を含む栄養培地で集積培養し、約 3200 個のコロニーを得、フミン酸を含む栄養寒天培地上で茶褐色を呈するフミン酸の脱色斑が見られるか試験した。その結果、脱色活性を示す菌を 11 株取得した。これらの菌株に対して 16S rRNA 遺伝子配列に基づく種同定を行った結果、8 株が *Streptmyces* 属であり、3 株は *Rhodococcus*、*Pseudomonas*、*Microbacterium* 属であった。取得した菌株を Bennet's maltose 液体培地で培養し、その培養上清を硫酸アンモニウムによって濃縮した濃縮液とフミン酸溶液とを混合したところ、2 株においてフミン酸由来の吸光度の減少が確認された。

humic acid, streptomyces, soil organic matter

発表責任者：西山　辰也（nishiyama.tatuya@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3A15a02
講演日時：3 月 27 日 09:41～ センター2 号館 A15 会場

放線菌が分泌する二種のヌクレオチダーゼの諸性質解明
Characterization of two nucleotidases secreted by *Streptomyces*
○星野 理央、西山 辰也、上田 賢志（日大生資科）
○Rio HOSHINO, Tatsuya NISHIYAMA, Kenji UEDA (College of Bioresource Sciences, Nihon University)

［目的］ リン酸は、細胞内に於ける様々な物質のリン酸化反応に必要であると同時に、核酸をはじめとする主要な生体成分の構成要素として必須の役割を果たしている。一方で、環境中におけるリンの存在量には限りがあることから、バクテリアには細胞内におけるリン酸量の恒常性を維持するための制御機構が存在し、細胞外からリン酸を回収するためのメカニズムに連携している。

自然環境中に存在するリン酸源としては、無機イオン態として存在するリン酸の他に、環境 DNA（環境中に存在する生物由来の DNA の総称）があげられる。近年、バクテリアは環境 DNA を分解して栄養源として利用する機構を有することが明らかになりつつある。ここでは、放線菌における環境 DNA の利用の実態を解明することを目的として、本菌によって細胞外に分泌されるヌクレオチダーゼ（ヌクレオチドをヌクレオシドとリン酸に分解する加水分解酵素）の探索とその特性解析を行った。

［方法・結果］研究室保有の保存菌株計 488 株の培養上清を対象にイノシンモノヌクレオチド（IMP）を基質とするヌクレオチダーゼ活性を持つ菌株を探索したところ、複数の高活性株を発見した。そのうち、NE5-10 株および Y2F8-2 株について 16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統解析を行ったところ、NE5-10 株は *Streptomyces rubiginosohelvolus* や *Streptomyces venezuelae* と、Y2F8-2 株は *Streptomyces somaliensis* とそれぞれ 99%以上の相同性を示した。次に、これらの株が生産する酵素を各種カラムクロマトグラフィーを用いて SDS-PAGE 上で単一のバンドを示すまで精製し、得られた精製酵素を用いて諸性質を調査した。NE5-10 株が生産する酵素は、至適温度 50℃、至適 pH 7.5 であり、Mg^{2+}または Mn^{2+}の添加により顕著な活性上昇を示した。本酵素は、IMP に対して 8.0 U/mg と最も高い活性を示す一方で GMP(2.8 U/mg)、UMP(0.7)、AMP(1.9)、CMP (1.1)に対する活性は低かった。IMP に特異的な 5’-ヌクレオチダーゼはわずかしか報告されていないことから、本酵素が有する酵素学的特性に興味が持たれる。本酵素の基質特異性が厳密であることは、それが環境からのリン酸の獲得とは異なる生理的役割をもつ可能性も想起させる。Y2-F8-2 株の酵素は、至適温度 60℃、至適 ph 6.0 であり、Ca^{2+}の添加により活性が著しく増加した。基質特異性試験では IMP を基質にすると 34.7 U/mg と最も高く、他の核酸に対する活性もそれぞれ GMP(16.3)、UMP(14.7)、AMP(24.8)、CMP (5.7)となり、広く基質となることが判明した。このことから、NE5-10 株の 5’-ヌクレオチダーゼとは異なる機能と役割をもつことが推測された。

nucleotidase, secreted protein, Streptomyces

発表責任者：西山　辰也（nishiyama.tatsuya@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3A15a03
講演日時：3 月 27 日 09:52～ センター2 号館 A15 会場

Gordonibacter urolithinfaciens DSM27213 における新規酵素エラグ酸ラクトナーゼの同定および機能解析

Identification and analysis of novel enzyme, ellagic acid lactonase, in *Gordonibacter urolithinfaciens* DSM27213

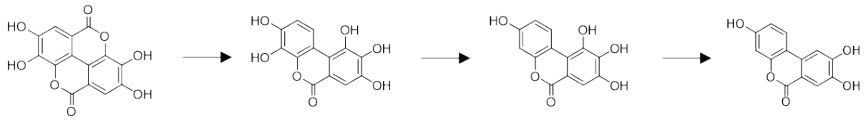
岸野 重信[1]、渡邊 寛子[1]、○熊澤 加奈子[1]、工藤 眞丈[2]、林 素子[2]、山本 浩明[2]、小川 順[1]([1]京都院農、[2]ダイセル・コーポレート研)

Shigenobu KISHINO[1], Hiroko WATANABE[1], ○Kanako KUMAZAWA[1], Masatake KUDOH[2], Motoko HAYASHI[2], Hiroaki YAMAMOTO[2], Jun OGAWA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Daicel Corp. Corporate Reseaech Center)

【背景・目的】

ポリフェノール化合物の一種である urolithin は、ザクロやラズベリーなどのベリー類、クコやクルミなどのナッツ類に含まれているエラジタンニンの腸内代謝物であり、腸内細菌がエラジタンニンからエラグ酸、urolithin を産生することが報告されている。urolithin 類の中には抗酸化・抗炎症作用といった生理活性を示すものがあることから健康増進への寄与が期待されている。腸内での urolithin 産生はエラグ酸の分子内ラクトンの加水分解を初発反応としており、加水分解により生じる urolithin M5 を起点として様々な urolithin が産生される。

ヒト糞便由来腸内細菌 *Gordonibacter urolithinfaciens* DSM 27213 はエラグ酸を urolithin M5 へと変換し、さらに urolithin M5 を urolithin M6、urolithin M6 を urolithin C へと変換することが報告されているが、変換に関する酵素や反応機構などの詳細な分子メカニズムは未解明のままである。そこで本研究では、*G. urorithinfaciens* DSM 27213 を対象に、エラグ酸の urolithin M5 への変換反応を触媒する酵素を特定するとともに、その機能解析を行った。



【方法・結果】

本菌を、エラグ酸を含む培地と含まない培地にて培養し、それぞれの条件でのエラグ酸変換活性を比較した結果、エラグ酸添加培地で培養した菌体のみにエラグ酸変換活性を見いだした。このことから、本菌のエラグ酸変換活性はエラグ酸を含む培地で培養することにより誘導されることが明らかとなった。そこで、エラグ酸変換活性の初発反応に関与する酵素を特定するために、誘導菌体と非誘導菌体で発現しているタンパク質を比較したところ、誘導菌体に高発現している加水分解酵素と予想されるタンパク質（UroH）を見いだした。続いて、大腸菌（*Escherichia coli* Rosetta2 (DE3)）を宿主とする UroH の異種タンパク質発現系を構築し機能評価を行うことで、UroH がエラグ酸から urolithin M5 への変換反応を触媒する新規酵素であることを明らかにした。次に、形質転換株より精製した UroH の諸性質の解析を行った。その結果、本酵素が pH 7.0～9.0, 50 ℃にて高い活性を示すこと、Ca^{2+}の添加により本酵素の活性が向上することを明らかにした。

Urolithin, gut bacteria, ellagic acid lactonase

発表責任者：岸野重信（kishino@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3A15a04
講演日時：3 月 27 日 10:03～ センター2 号館 A15 会場

Gordonibacter urolithinfaciens DSM 27213 における urolithin 脱水酸化反応に関与する因子の解析
Analysis of factors involved in urolithin dehydroxylation in *Gordonibacter urolithinfaciens* DSM 27213

○渡邊 寛子[1]、岸野 重信[1]、工藤 眞丈[2]、林 素子[2]、山本 浩明[2]、小川 順[1] ([1]京大院農、[2]ダイセル・コーポレート研)
○Hiroko WATANABE[1], Shigenobu KISHINO[1], Masatake KUDOH[2], Motoko HAYASHI[2], Hiroaki YAMAMOTO[2], Jun OGAWA[1] ([1]Graduate School of Agriculture, Kyoto Univ., [2]Daicel Corp. Corporate Research Center)

【背景・目的】　野菜やフルーツ、木の実などに含まれるポリフェノール化合物は、健康増進効果が期待できる食事成分として注目されている。また、その生理機能の発現には、腸内細菌代謝が関与するとされている。例えば、腸内細菌によるフェノール性水酸基の脱水酸化は、ポリフェノール化合物の化学的特性に変化を与え、腸管吸収等に影響する。しかし、腸内細菌によるポリフェノールの脱水酸化の詳細はほとんど解明されていない。ヒト糞便由来腸内細菌 *Gordonibacter urolithinfaciens* DSM 27213 は、ザクロなどに含まれるエラジタンニンに由来するポリフェノール、エラグ酸を urolithin M5、urolithin M6 および urolithin C へと変換することが報告されているが、関連する酵素や反応機構は明らかになっていない[1]。本研究では、この代謝経路のうち urolithin M5 から urolithin M6、urolithin M6 から urolithin C への脱水酸化反応に関わる酵素系の解明を目的とし、反応に関わる因子の解析を試みた。

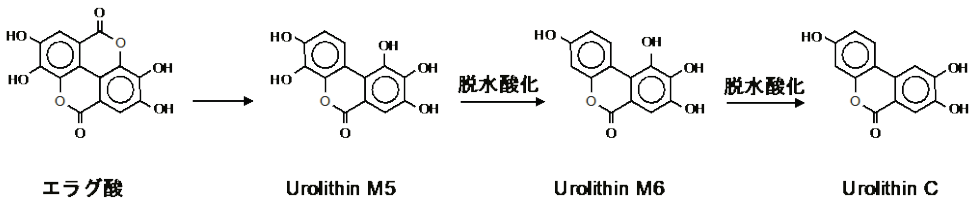


図 *G. urolithinfaciens* DSM 27213 におけるエラグ酸変換経路

【方法・結果】　*G. urolithinfaciens* DSM 27213 を、エラグ酸、urolithin M5、urolithin M6、urolithin C をそれぞれ含む培地ならびに無添加の培地にて培養し、得られた洗浄菌体におけるエラグ酸関連化合物変換活性を評価した。その結果、本菌の urolithin 脱水酸化活性は、エラグ酸あるいは urolithin M5 により誘導されることが見いだされた。次に、エラグ酸添加培地にて培養して得られた洗浄菌体ならびにその無細胞抽出液を用いて同様の評価を試みたところ、洗浄菌体では urolithin M5 および urolithin M6 の脱水酸化活性が確認されたが、無細胞抽出液では活性が観察されなかった。そこで、無細胞抽出液を用い、*in vitro* での urolithin 脱水酸化反応を顕在化する諸条件の検討を行った。補酵素やビタミン類、金属イオン、種々の電子伝達関連物質などの添加効果を検討した結果、methylviologen の添加が無細胞抽出液の urolithin 脱水酸化活性を顕在化することを見いだした。加えて、H_2、NAD(P)H および FAD が本脱水酸化酵素系の電子伝達に関与することを見いたした。

1) Selma, et al., *Food Funct.*, **5**, 1779–1784 (2014)

Urolithin, Gut bacteria, Dehydroxylation

発表責任者：岸野重信（kishino@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3A15a05
講演日時：3 月 27 日 10:14～ センター2 号館 A15 会場

水酸化脂肪酸 10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid からオキソ脂肪酸 10-oxo-*cis*-12-octadecenoic acid への変換反応に有用な微生物の探索

Screening of microorganisms useful for 10-oxo-*cis*-12-octadecenoic acid production from 10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid

○江原 優作、岸野 重信、中辻 亮太、小川 順（京大院農・応用生命）
○Yusaku Ehara, Shigenobu Kishino, Ryota Nakatsuji, Jun Ogawa (Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【背景・目的】

当研究室では、乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* AKU 1009a におけるリノール酸（LA）飽和化代謝の中間体として、共役リノール酸（CLA）や水酸化脂肪酸 10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid (HYA)、オキソ脂肪酸 10-oxo-*cis*-12-octadecenoic acid (KetoA) などを見いだしている。また、これらの脂肪酸が、抗がん作用や腸管上皮バリアの損傷回復機能、脂質代謝異常症改善や脂肪肝改善など多彩な生理機能を有していることを明らかにしてきた。現在、これらの脂肪酸の医薬品や食品としての応用に向け、その生産プロセスの確立が求められている。HYA は、微生物機能を利用して工業レベルの生産が検討されているが、生理機能が期待される KetoA を効率良く生産する微生物の取得には至っていない。そこで、本研究では、KetoA の生産方法の確立を目指して、高い生産能を有する微生物の探索を行った。

【方法・結果】

研究室保存菌のなかで、食品用途で利用されている 571 株の風乾菌体と MRS 培地にて培養した食品由来乳酸菌 162 株の洗浄菌体を対象に HYA を KetoA に変換する菌株の探索を行った。14 mM HYA、5 mM NAD^+、5 mM $NADP^+$を含む反応液に風乾菌体や洗浄菌体を懸濁し、好気条件下、28 ˚C にて 24 時間振とう反応を行った。反応後、薄層クロマトグラフィー（TLC）、ガスクロマトグラフィー(GC) を用いる分析に供することにより、KetoA 生産能を評価した。その結果、風乾菌体について 6 株、洗浄菌体について 23 株の乳酸菌に HYA を KetoA に変換する活性を見いだした。さらに、KetoA の生産能、生育速度、再現性の観点から 6 株を選抜し、選抜した菌株に対して、補酵素要求性について調べた。その結果、補酵素 $NAD(P)^+$添加区で KetoA の生産量が増加したことから、本反応には $NAD(P)^+$が必須であることを明らかにした。NAD^+、$NADP^+$の要求性については、菌株により傾向が異なることが観察された。また、選抜した 6 株は全て乳酸菌であったことから、ピルビン酸から乳酸を生成する際に $NAD(P)^+$を併産する反応と、HYA から KetoA への変換反応とをカップリングすることによる、KetoA 生産の効率化を試みた。その結果、ピルビン酸濃度の増加に伴い、KetoA 生産量の増加が確認できた。各乳酸菌の乳酸脱水素酵素が効率的に $NAD(P)^+$再生に寄与したと考えられる。以上より、食品添加物として利用されているピルビン酸による補酵素再生により KetoA の生産性が向上する食品由来乳酸菌の取得に成功した。

10-oxo-*cis*-12-octadecenoic acid, lactic acid bacteria, functional fatty acid

発表責任者：岸野重信（kishino@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3A15a06
講演日時：3 月 27 日 10:35～ センター2 号館 A15 会場

ピリミジンの酸化的代謝に関わる uracil-thymine dehydrogenase の特性解析

Characterization of uracil-thymine dehydrogenase in pyrimidine oxidative metabolism

宋 子良[1]、○定免 宏幸[1]、竹内 道樹[2]、堀之内 伸行[1]、斯 大勇[1]、日比 慎[2,3]、清水 昌[1]、小川 順[1] ([1]京大院農・応用生命、[2]京大院農・産業微生物、[3]富山県大工・生工研センター)

Chee-Leong SOONG[1], ○Hiruyuki JOMEN[1], Michiki TAKEUCHI[2], Nobuyuki HORINOUCHI[1], Dayong SI[1], Makoto HIBI[2,3], Sakayu SHIMIZU[1], Jun OGAWA[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Ind. Microbiol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [3]Biotechnol. Res., Center, Frac. Eng., Toyama Pref. Univ.)

【背景・目的】

顕著な pyrimidine 分解活性を示す放線菌 *Rhodococcus erythropolis* JCM 3132 は、uracil を酸化的に代謝し、urea 及び malonic acid を生成する（図 1)。先行研究において、本代謝経路に関わる酵素である barbiturase を精製し、その遺伝子を同定した(1)。本研究では、本代謝経路の初発反応を触媒する uracil-thymine dehydrogenase（UTDH）の精製と遺伝子の同定を試みた。また、精製 UTDH を用いて、その特性解析を行った。

【結果】

5 段階のカラムクロマトグラフィーを経て、*R. erythropolis* JCM 3132 より UTDH を精製した。精製した UTDH について詳細な解析を行った結果、本酵素が、それぞれ FAD 結合部位、Fe-S クラスター、Mo 結合部位を有する 3 つのサブユニットから構成されることを見いだした。さらに、これらの遺伝子を *R. erythropolis* L88 において発現したところ、UTDH を活性型として発現することに成功した。また、様々な電子受容体を検討したところ、Methylene blue、phenazine methosulfate、benzoquinone が電子受容体として機能したが、NAD^+、$NADP^+$、FAD、FMN は電子受容体として機能しなかった。また、本酵素は、uracil や thymine だけでなく、uracil の 5 位置換体や hydroxypyrimidine の酸化反応を触媒したが、purine や dihydropyrimidine を基質とすることは出来なかった。

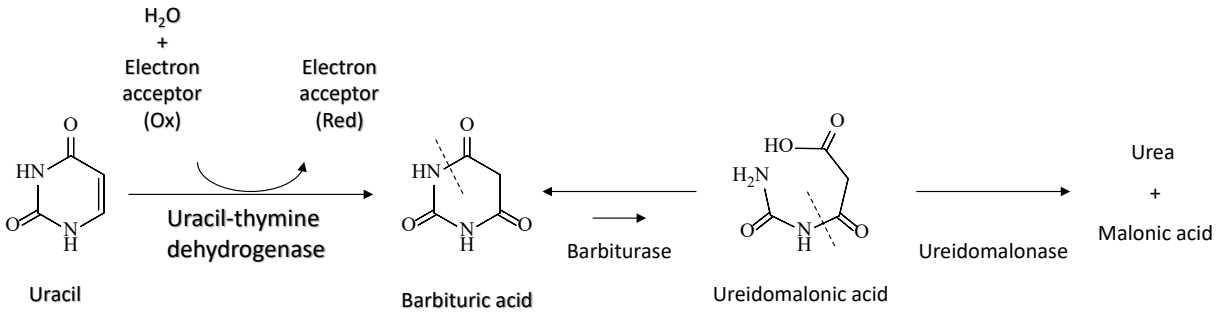


図 1 *Rhodococcus erythropolis* JCM 3132 の uracil 代謝

1) C.L. Soong, J.Ogawa, and S.Shimizu, *Biochem.Biophys. Res. Commun.,* **286**, 222-226 (2001)

pyrimidine, dehydrogenase, *Rhodococcus erythropolis*

発表責任者：小川順（ogawa@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3A15a07
講演日時：3 月 27 日 10:46～ センター2 号館 A15 会場

Pichia farinosa NBRC0462 株が産生するフルオロケトン還元酵素の触媒機能解析および光学純度の向上に向けた変異導入
Catalytic analysis and improvement of fluoro ketone reductase
○釜井 彩花[1]、七田 沙耶香[1,2]、三木 慎介[3]、礒部 公安[1,2]、日比 慎[1]、中林 誠[1]、浅野 泰久[1,2] ([1]富山県大・生工研セ、[2]JST, ERATO、[3]セントラル硝子（株））
○Sayaka KAMAI[1], Sayaka SHICHIDA[1,2], Shinsuke MIKI[3], Kimiyasu ISOBE[1,2], Makoto HIBI[1], Makoto NAKABAYASHI[1], Yasuhisa ASANO[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ, [2]JST, ERATO, [3]Central Glass Co., Ltd)

［背景］フッ素原子の導入された医薬品は脂溶性が高まり体内へ吸収されやすくなる事や、毒性が軽減され薬効が増大する事が知られている。このような背景から本研究では特に、医薬品や農薬の中間体として有用な光学活性ハロゲン化アルコールである（*R*)-1,1,1-Trifluoro-2-propanol (TFIPL) の酵素を用いた簡便な合成法の開発を目的としている。これまでに、1,1,1-Trifluoroacetone (TFA) から TFIPL を高い光学純度で産生し、さらにフッ素が置換したケトン体 1,1-Difluoroacetone (DFA), 3-Chloro-1,1-difluoroacetone (MCDFA), 3-Chloro-1,1,1-Trifluoroacetone (MCTFA) に対して高活性を示す *Pichia farinosa* NBRC 0462 由来酵素 Fluoro ketone reductase (FKR) を見出してきた。FKR の触媒機能解析の結果、FKR の安定性の低さや、DFA, MCDFA, MCTFA に対しての選択性の低さが問題点として挙げられた。そこで本研究では FKR と各基質との複合体の共結晶化を行うことで、安定性と立体選択性の向上に向けた変異体 FKR の取得、およびそのメカニズムの解明を目指した。
［方法］触媒機能解析および結晶化は *E. coli* BL21 (DE3)に遺伝子発現させた FKR を用いた。酵素活性はハロケトンを基質とし 340 nm における NADH の吸光度の減少を測定した。結晶化は約 8 mg/mL の精製酵素を用い、CRYSTAL GRYPHON にて結晶化スクリーニングを行い、高エネルギー加速器研究機構にて X 線回折強度測定を行った。得られた結晶構造を基に MOE プログラムを用いた変異点の選抜を行い、効率的に変異体の作成を行った。
［結果］FKR の精製過程における不安定さや熱への耐性が低いといった安定性に関する問題は Co^{2+}、Ni^{2+}、Mn^{2+}の添加により著しく改善した（40°C, 30 分の熱処理に対して約 37 倍の安定性の向上)。結晶解析の結果、Co^{2+}は FKR の C 末端に結合しており、二量体形成に関与することで安定性が向上するのではないかと示唆された。金属塩との結合に重要とされた C 末端に対し飽和変異をかけることで結合に関与するアミノ酸を検討した。さらに、FKR と各基質 (DFA, TFA, MCDFA, MCTFA)複合体の結晶は 1.6 Å, 1.3Å, 1.9Å, 1.7 Å でそれぞれ得られ、MOE を用いた変異点の選抜を行った結果、すべての基質に対して高い光学純度を算出する変異体の取得に成功した。

Chiral fluoro alcohol, Carbonyl reductase, Protein engineering

講演番号：3A15a08
講演日時：3 月 27 日 10:57～ センター2 号館 A15 会場

Biocatalytic Asymmetric Ring-opening of Dihydroisoxazoles: A New Route to Complementary Enantiomers of ß-Hydroxy nitriles from Olefins

○Daijun ZHENG, Yasuhisa Asano (Toyama Prefectural University)

Introduction Aldoxime dehydratase (Oxd) is a family of Heme-containing enzyme discovered about 20 years ago in our laboratory [1]. The enzyme is involved in the "aldoxime-nitrile pathway" in nature [2], in which the Oxds catalyze the dehydration of aldoximes to their corresponding nitriles. Using the dehydration function of Oxds, a cyanide-free platform for the synthesis of nitriles has been established utilizing aldoxime precursors [3]. Recently, we have demonstrated that the enzyme catalyzes the Kemp elimination reaction *via* a -Fe-N- complex catalytic pathway [4], which is different from the classic acid-base mechanism. We here firstly report a new application of aldoxime dehydratases on chiral β-hydroxy nitriles synthesis by Kemp elimination reaction.

Materials and Methods To synthesize chiral β-hydroxy nitriles using Oxds as catalysts, we designed the substrates of 5-sub-4,5-dihydroisoxazoles, being able to synthesized from simple alkenes and nitromethane [5]. The Oxds derived from *Pseudomonas chlororaphis* B23 (Oxd A), *Bacillus* sp.*OxB-1* (Oxd B), *Rhodococcus* sp. N-771 (Oxd RE) had been used to test the activity on the asymmetric ring-opening of 5-substituted-4,5-dihydroisoxazoles.

Results The Oxds showed activity on broad substrate scope with excellent enantioselectivity (up to 99% ee), and good turnover number (up to 11 s^{-1}). Upon simple isolation and treatment with an alkaline reagent, the remaining chiral 5-sub-4,5-dihydroisoxazoles can be easily transformed into their corresponding *β*-hydroxy nitriles. Using site-directed mutagenesis, a ferrous Heme-containing active site was confirmed and two possible deprotonation pathways were proposed.

References

[1] Y. Asano, Y. Kato, *FEMS Microbiol. Lett.* **1998**, *158*, 185-190;

[2] Y. Asano, S. Okazaki, Future directions in biocatalysis, ver 2, pp173-187 (2017);

[3] S.-X. Xie, Y. Kato, Y. Asano, *Biosci. Biotech. Biochem*., **2001**, *65*, 2666-2672; T. Betke, P. Rommelmann, K. Oike, Y. Asano, H. Gröger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 12361-12366;

[4] Y. Miao, R. Metzner, Y. Asano, *ChemBioChem* **2017**, *18*, 451-454;

[5] F. J. F. Castro, M. M. Vila, P. R. Jenkins, M. L. Sharma, G. Tustin, J. Fawcett, D. R. Russell, *Synlett* **1999**, 798-800.

Aldoxime dehydratase, Biocatalysis, Kemp elimination

発表責任者：Yasuhisa Asano（asano@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：3A15a09
講演日時：3 月 27 日 11:08～ センター2 号館 A15 会場

腸内細菌による難消化性澱粉分解メカニズムの解明

Elucidation of resistant starch degradation mechanism by intestinal bacteria

岸野 重信、森川 拓磨、○山本 ティミラ明李、小川 順（京大院農・応用生 命）
Shigenobu KISINO, Takuma MORIKAWA, ○ThimiraAkari YAMAMOTO, Jun OGAWA (Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ)

【背景・目的】
難消化性澱粉（Resistant starch; RS）は小腸で消化、吸収されない澱粉及び、澱粉分解物の総称である。近年では、ラットなどの動物を使った実験により、腸内有用菌の増殖を助けるプレバイオティクス効果や、これらが腸内細菌による発酵を受けて生成する有機酸における脂質代謝改善効果などが報告されている。しかし、RS が腸内細菌によって資化される詳細なメカニズムは明らかになっていない。そこで、ヒト腸内細菌を主とする研究室保存株を用いて RS を資化する微生物をスクリーニングし、RS を分解する酵素を特定することで RS が腸内でどのように代謝されているのかを明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】
ヒト腸内細菌を主とする研究室保存株 96 株を用いて RS 分解能を評価し、RS 分解菌を選抜した。RS はアミロファイバーSH（株式会社 J-オイルミルズ）を使用した。腸内細菌による RS の分解過程を、①不溶性の多糖である RS の可溶化、②多糖の分解（多糖→オリゴ糖→単糖）、③単糖からの有機酸発酵、の 3 段階と捉え、以下の 3 通りの方法でスクリーニングを行った。
①1 %の RS を基質として含む GAM 寒天培地にて微生物を嫌気条件下 24 時間培養し、コロニー周辺部に現れるクリアゾーンを評価した。結果、2 株でクリアゾーンの形成を確認できた。
②1 %の RS を添加した GAM 液体培地にて微生物を嫌気条件下 24 時間培養した。培養後の培地上清中に含まれる有機酸量を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて測定した。RS を含まない GAM 液体培地に 24 時間、嫌気条件下で培養した場合との有機酸量の差を測定すると、5 株で有機酸量の顕著な増加が確認できた。
③GAM 液体培地にて微生物を嫌気条件下 24 時間培養し、培養した培地の上清を回収した。上清を 1 %の RS と 24 時間反応させ、反応液中に含まれる単糖、二糖、三糖を薄層クロマトグラフィー（TLC）によって測定した。その結果、6 株で糖の増加が確認された。

Resistant starch, intestinal bacteria, prebiotics

講演番号：3A15a10
講演日時：3 月 27 日 11:19～ センター2 号館 A15 会場

新規可逆的脱炭酸酵素 4-hydroxyisophthalic acid decarboxylase の諸性質解明
Biochemical analysis of a novel reversible decarboxylase towards 4-hydroxyisophthalic acid
吉原 朋矢、○青野 陸、木野 邦器（早大・先進理工・応化）
Tomoya YOSHIHARA, ○Riku AONO, Kuniki KINO (Waseda Univ.)

【背景・目的】現在の我々の豊かな生活は化石資源に大きく依存しており、様々な機能性化成品の多くは、化石資源を原料とする化学プロセスにより製造されている。しかし近年炭素循環型社会の実現が望まれる中、環境調和型のバイオプロセスによる化成品製造が注目されている。これまでのバイオマス利用技術はセルロースやヘミセルロースからの糖化が主流で、アルコールや有機酸などの基幹物質生産に適用されているが、高機能性ポリマーの創出には芳香環を有する化合物を原料とし、低炭素化に貢献する環境適応型バイオプロセスの開発が期待される。PET に代表される汎用ポリエステルの原料であるテレフタル酸などの芳香族ジカルボン酸は、触媒空気酸化法によって製造されている。一方、微生物由来の脱炭酸酵素の中には、逆反応である炭酸固定によって芳香族カルボン酸を合成する可逆的脱炭酸酵素が存在する。しかしながら、既知の可逆的脱炭酸酵素の多くは芳香族モノカルボン酸の合成反応を触媒するのに対し、芳香族ジカルボン酸の報告例はほとんどない。そこで我々は、バイオプロセスによる芳香族ジカルボン酸合成を目指して、それを可能とする新規可逆的脱炭酸酵素の取得を検討している。

【方法・結果】これまでに我々は芳香族ジカルボン酸 4-hydroxyisophthalic acid (4HIPA) に対して可逆的脱炭酸活性を示す *Cystobasidium slooffiae* HTK3 株を取得している [1)]。さらにその細胞抽出液より目的活性を有するタンパク質を取得し、4HIPA に対する可逆的脱炭酸酵素 (4HIDC) の取得と同定に成功している [2)]。本タンパク質は既知の可逆的脱炭酸酵素とは一次構造が大きく異なっていたので、当該可逆的脱炭酸酵素 4HIDC の生化学的諸性質について詳細な解析を行った。組換え型 4HIDC を調製し、脱炭酸反応における至適反応条件の検討を行ったところ、pH 6.5-8.0, 30-40°C において高い活性を示した。炭酸固定反応における $KHCO_3$ 濃度を検討したところ、既知の可逆的脱炭酸酵素の多くは濃度依存的に活性が上昇するのに対し、本酵素は 0.6 M 程度で最大活性を示したが高濃度の $KHCO_3$ 存在下において活性が低下することを明らかにした。また 4HIPA 以外の芳香族カルボン酸を合成できる可能性を検討するため、基質特異性の検討を行った。その結果、4HIDC はバニリン酸も基質として芳香族ジカルボン酸である 5-carboxyvanillic acid の合成反応を触媒することもわかった。

1) 西田ら，日本農芸化学会 2019 年度大会, 3E2p04, 2) 吉原ら，日本農芸化学会 2019 年度大会, 3E2p05

reversible decarboxylase, 4-hydroxyisophthalic acid

発表責任者：木野邦器（kkino@waseda.jp）

講演番号：3A15a11
講演日時：3 月 27 日 11:40～ センター2 号館 A15 会場

海洋由来酵母による褐藻類主要成分マンニトールからの油脂生産
Lipid production from mannitol, a major component of brown macroalgae, by marine-derived yeast

○中田 翔太[1]、日尾 守[2]、髙瀬 隆一[1,2]、河井 重幸[3]、渡辺 大輔[1,2]、橋本 渉[1,2]（[1]京大院農、[2]京大農、[3]石川県大）
○ Shota NAKATA[1], Mamoru HIO[2], Ryuichi TAKASE[1,2], Shigeyuki KAWAI[3], Daisuke WATANABE[1,2], Wataru HASHIMOTO[1,2] ([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Fac. Agric., Kyoto Univ., [3]Ishikawa Pref. Univ.)

【背景と目的】近年、化石燃料の枯渇や地球温暖化の進行といった背景から、再生可能資源を原料とする有用物質の生産に注目が集まっている。例えば、植物油などに含まれる油脂はバイオディーゼル燃料の原料として利用されている。日本は広大な排他的経済水域をもつため、藻類などの海洋バイオマスが原料として期待されている。その内、褐藻類は主要な成分として単糖マンニトール（乾燥藻体重量の約 10～20%）や多糖アルギン酸（同約 30～40%）を豊富に含有している。当研究室では、合成生物学的手法を用いることにより、マンニトール及びアルギン酸単糖の資化能を付与した酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の育種に成功しており、褐藻類を原料とするホワイトバイオテクノロジーへの応用を目指している [1)]。一方、原料の褐藻類が高濃度の塩を含む点や、海水の産業利用のニーズが高まっている点を考慮すると、耐塩性の微生物を活用することがより望ましい。そこで本研究では、褐藻類の主要成分を資化可能な海洋由来微生物を探索し、褐藻類からのホワイトバイオテクノロジーへ利用することを目指した。
【方法と結果】海水を微生物分離源として用い、褐藻類の主要成分を資化可能な微生物を探索した結果、酵母 *Rhodosporidiobolus fluvialis* がマンニトール資化能を有することが明らかになった。*R. fluvialis* は細胞内に多量の油脂を蓄積することが報告されているため、本酵母によるマンニトールからの油脂生産を解析した。*R. fluvialis* をマンニトールを単一炭素源とする培地で培養し、培養菌体を疎水性色素ナイルレッドにより染色した結果、細胞内に脂肪滴が形成されていることが観察された。続いて、グルコースまたはマンニトールを炭素源とした場合の *R. fluvialis* による油脂生産を比較した。その結果、グルコースを炭素源とする場合には培養 72 時間後に乾燥菌体重量当たり最大 20.0%の油脂を蓄積する一方で、マンニトールを炭素源とする場合には培養 48 時間後に最大 55.1%の油脂を蓄積することが示された。さらに、海水と同程度の 3% (w/v) 塩化ナトリウムを含む培地における *R. fluvialis* によるマンニトールからの油脂生産を調べた結果、培養 48 時間後に最大 39.1%の油脂を生産可能であることが明らかになった。また、*R. fluvialis* がマンニトールから生産した油脂にはオレイン酸やリノール酸が多く含まれており、バイオディーゼル燃料の原料に適していた。
【考察】本研究により、海洋由来酵母 *R. fluvialis* が褐藻類の主要成分であるマンニトールからバイオディーゼル燃料の原料となる油脂を生産できることを明らかにした。さらに、*R. fluvialis* は海水と同程度の塩化ナトリウムを含む培地においても著量の油脂を生産できることを見出した。そのため、海水を利用した褐藻類からの油脂生産により、水不足やエネルギー不足といった社会問題の解決に繋がることが期待される。
【参考文献】 1) S. Nakata *et al*. (2019). *Sci. Rep*. **9**, 17147, DOI:10.1038/s41598-019-53597-1.

mannitol, lipid, marine-derived yeast

発表責任者：橋本渉（whasimot@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3A15a12
講演日時：3 月 27 日 11:51～ センター2 号館 A15 会場

大腸菌と酵母の共培養による Tropinone の生産

Production of Tropinone by co-incubation of engineered *E.coli* and yeast

○室田 健来、長谷部 文人、大石 和敬、鮒 信学（静岡県立大院食）
○KATSUKI MURODA, FUMIHITO HASEBE, KAZUHIRO OHISHI, NOBUTAKA FUNA (Univ. of Shizuoka)

【目的】

トロパンアルカロイドは、ナス科やコカノキ科に分布する天然有機化合物群である。Scopolamine は、ベラドンナやヒヨスなどが生産するトロパンアルカロイドであり、副交感神経系の抑制効果があるため、胃腸鎮痛鎮痙薬や酔い止めなどとして市販されている。しかしながら、Scopolamine の前駆体 Tropinone の生合成が長らく不明であったため、異種生産系が確立されておらず、現在でも植物や植物培養細胞からの抽出に頼っている。そのためコストが高く、潜在的な用途が多種あるのにも関わらず利用が限られている。Tropinone は、前駆体 1-Methyl-Δ^1-pyrrolinium cation (**1**)と C3 ユニットの縮合が鍵反応となり生合成される。最近、C3 ユニットの生合成に関与する酵素 PYKS (CHSB)および Cytochrome P450 (CYP82M3)が報告され[1]、トロパンアルカロイドの微生物生産が可能となった。

1 は PMT と MPO により Putrescine から生合成される。最近、PMT、MPO、PYKS 、CYP82M3 などを酵母で共発現させることで、6 mg/L の Tropinone の微生物生産が報告された[2]。この時、中間体である **1** の生産量は 40 mg/L であった[2]。一方、我々は、MPO の代替酵素として aminotransferase である YgjG を見出し、これと PMT を代謝経路の増強及び改変を行った大腸菌で共発現させることで、約 250 mg/L の **1** の生産を大腸菌で達成している。**1** の生産量が既知の報告よりも多いことから、本生産系を利用することで Tropinone のさらなる増産が達成出来ると考えられる。そこで、本研究では我々が構築した **1** を生産する大腸菌を利用した Tropinone 生産を目指した。

【方法・結果】

大腸菌を宿主として、コドン最適化を行った *Solanum lycopersicum* 由来 PYKS ホモログ(*Sl*CHSB)と *Atropa belladonna* 由来 CYP82M3(*Ab*CYP82M3)の発現条件検討を行った。その結果 *Sl*CHSB は可溶性タンパク質として取得でき、その活性も確認できた。一方、*Ab*CYP82M3 は不溶性であり、活性型で取得することは困難であったことから、*Ab*CYP82M3 は酵母を宿主として発現させることにした。現在、*Sl*CHSB を共発現させた **1** 生産大腸菌と *Ab*CYP82M3 を発現させた酵母とを共培養することで Tropinone 生産を試みている。本大会ではその生産の可否および生産量についての知見を報告する予定である。

【参考文献】1. M. A. Bedewitz *et al*., *Nature Communications*, **9**, 5218 (2018)
2. P. Srinivasan & C. D. Smolke., *Nature Communications*, **10**, 3634 (2019)

Alkaroido, Tropinone, P450

講演番号：3A15a13
講演日時：3 月 27 日 12:02～ センター2 号館 A15 会場

プレバイオティクスオリゴ糖 1-ケストース の構造を基盤とした新規オリゴ糖の酵素合成利用

Enzymatic synthesis of novel prebiotic oligosaccharides based on the structure of 1-kestose

○白井 沙也加、保坂 浩貴、平野 貴子、袴田 航、西尾 俊幸（日大院生資科）
○Sayaka SHIRAI, Hiroki HOSAKA, Takako HIRANO, Wataru HAKAMATA, Toshiyuki NISHIO
(Graduate School of Bioresource Sciences,Nihon Univ.)

【背景・目的】

現在使用されている機能性オリゴ糖のほとんどはグルコース、ガラクトース、フルクトースの 3 種の単糖の組み合わせから構成されている。一方、自然界には上記以外の単糖を構成糖として有する様々な糖質が存在し、生物において様々な役割を担っている。その中でもグルコサミンやグルクロン酸といったアセチルアミノ単糖や酸性単糖とそれらの誘導体は肝臓解毒作用、肌老化抑制効果などの有用生理機能を有しており、現在では医薬品やサプリメントとして利用されているため、大量かつ安価に生産されている。このことから当研究室では、酵素反応を用いることでアセチルアミノ単糖や酸性糖を含む新規なフラクトオリゴ糖誘導体を合成し、それらの生理機能を評価する研究を行なっている。現在までに、スクロースのグルコース残基が *N*-アセチルグルコサミンやグルクロン酸に置き換わった構造を有する *N*-アセチルスクロサミン(SucNAc)、スクロン酸の合成に成功している。さらに SucNAc を原料とし、グリコシダーゼの糖転移作用を利用して、1-ケストース（1-Kes 図 1.A 参照）類似構造を有する *N*-アセチルケストサミン(KesNAc 図1.B参照)の合成にも成功している。本発表では、これらの 1-Kes 誘導体の合成および諸性質について現在まで得られた結果を報告する。

【方法・結果】

出発原料として当研究室で合成法を確立したスクロン酸メチルエステル(SucAM)の高濃度溶液に麹菌の糖転移型 β-フルクトフラノシダーゼを作用させることで、TLC 上で糖転移反応物と思われるスポットが確認できた。この反応物を活性炭クロマトグラフィーおよびジオールカラムクロマトグラフィーにより精製を試みたが、1-Kes 誘導体とニストース誘導体と思われる 2 つの生成物の分離が困難であった。そこで我々はスクロースから 1-Kes を特異的に合成できる β-フルクトフラノシダーゼに着目し、1-Kes 誘導体を効率的に合成することを試みた。その結果、TLC 上で 1-Kes 誘導体であるケスツロン酸メチルエステル(SucAM)を優先的に生成することに成功し、活性炭クロマトグラフィーにより KesAM の精製に成功した。KesAM はメチル基を加水分解するために陰イオン交換樹脂に吸着させ、1N NaOH により生成物をナトリウム塩にすることで脱着を行なった。得られた生成物の構造を確認した結果 1-Kes のグルコース残基がグルクロン酸に置き換わったケスツロン酸(SucA 図 1.C 参照)であることが確認できた。今後は図 1 に示した 3 つの糖について腸内有用菌を用いた資化性試験を行う予定である。

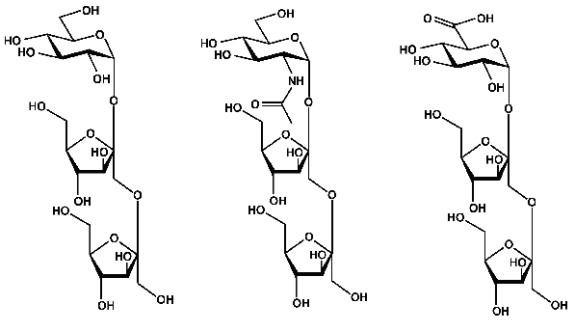


図1 1-ケストースとその誘導体

β-fructfranosidase, Enzymatic synthesis, Oligosaccharide

講演番号：3A17a01
講演日時：3 月 27 日 09:30～ センター2 号館 A17 会場

リパーゼ・スーパーインデューサーにより誘導されるリパーゼと関連物質の機能解析
Functional analysis of lipase and related materials induced by lipase super-inducers
○石塚 盛雄[1]、多勢 真大[1]、関谷 麻美[1]、千濱 良太[1]、赤沼 元気[2]、牛尾 一利[3] ([1]中央大理工、[2]立教大理、[3]新居浜高専物生)
○ Morio ISHIZUKA[1], MASAHIRO TASE[1], MAMI SEKIYA[1], RYOTA CHIHAMA[1], GENKI AKANUMA[2], KAZUTOSHI USHIO[3] ([1]Chuo Univ., [2]Rikyo Univ., [3]Niihema coll.)

安定で高立体選択性のリパーゼ及びエステラーゼは生理的意義の解明や工業的利用の観点から注目されている。私たちは stearyl alcohol (StOH) などの高級アルコールと polyoxyethylene 20 oleyl ether (POE20) などのポリオキシエチレン(n)アルキルエーテルが最も効果的なリパーゼ・スーパーインデューサーとして作用することが見出した。いくつかの *Pseudomonas* 様細菌による熱安定性および立体選択的リパーゼ産生の誘導のための超誘導物質としての StOH の添加は、添加物を含まない場合と比較して、リパーゼ活性の数百倍以上の増大をもたらす。これは、オリーブ油で生育した場合と比較して数十倍のリパーゼ活性の増強を意味する。また、その中の *Ralstonia* sp. NT80 は、リパーゼとともに、14kD タンパク質の EliA（リパーゼ誘導のエフェクタータンパク質）が強く誘導され、大量に細胞外に分泌される。 EliA は、以下の事実から表面活性剤であることが確認された。精製された EliA は水の表面張力を低下させ、n-アルカン乳化活性を有していた。 EliA 遺伝子欠失突然変異株におけるリパーゼ活性およびリパーゼ遺伝子転写物の両方が野生型株と比較して著しく減少し、EliA 遺伝子の相補実験によりリパーゼ活性が著しく増大したため、EliA は高級アルコールによるリパーゼ超誘導に強く関与していると推定される。EliA 遺伝子は、5'-上流領域解析の結果、リパーゼ遺伝子とは異なる転写調節下にあると推定される。また、StOH により誘導されたリパーゼ発現が、プルダウンアッセイにより二成分系（センサーキナーゼと応答レギュレーター）の制御下にあると示唆された。*Ralstonia* sp. NT80 では、StOH の添加により、リパーゼ分泌量の著しい増大のみならず、大量の polyhydroxyalkanoate (PHA、ポリヒドロキシアルカノエート）の細胞内蓄積と細胞の変形が観察された。この現象は、通常の基質・誘導物質であるオリーブ油を StOH などの高級アルコールに置き変えることによって、細胞に大きなストレスを生じさせ、細胞が過剰応答をしたと考えることも可能である。*In vitro* では、EliA 単独での StOH の直接乳化がほとんど認められず、界面活性糖脂質のラムノリピッド（rhamnolipid）添加により StOH の資化促進は観察されたが、rhamnolipid 単独によるリパーゼの超誘導現象は確認できなかった。更に、リパーゼ超誘導時には細胞脂肪酸組成が変化した。リパーゼの超生産システムのモデルを以下のように提案する。少量のリパーゼ・スーパーインデューサーの取り込み、EliA タンパク質の誘導と分泌、EliA 等による StOH の乳化、リパーゼの超誘導と大量分泌、大量のリパーゼ・スーパーインデューサーの取り込みと資化、及び PHA の細胞内大量蓄積現象の実現。この現象の詳細な分子機構解明により応用の範囲が広がると期待できる。

lipase super-inducer, stearyl alcohol, polyhydroxyalkanoate

発表責任者：石塚 盛雄（ishizuka@chem.chuo-u.ac.jp）

講演番号：3A17a02
講演日時：3 月 27 日 09:41～ センター2 号館 A17 会場

ADP 結合型センサーヒスチジンキナーゼ VicK の細胞質内領域の X 線結晶構造
X-ray crystal structure of cytosolic region of sensor histidine kinase, VicK, complexed with ADP
○孫 定国[1]、江口 陽子[2]、内海 龍太郎[2]、岡島 俊英[1] ([1]大阪大学　産業科学研究所　生体分子反応科学研究分野、[2]近畿大学　生物理工学部　　食品安全工学科)
○TEIKOKU SON[1], Yoko Eguchi[2], Ryutaro Utsumi[2], Toshihide Okajima[1] ([1]Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University, [2]Department of Science and Technology on Food Safety, Faculty of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University)

二成分情報伝達系（TCS）は、膜結合型センサータンパク質（ヒスチジンキナーゼ：HK）とそれに対応する細胞質の転写因子から構成される、細菌の主要な環境応答機構である。細菌の内膜上に存在する HK のセンサードメインが外界からの環境シグナルにより活性化されると、HK の構造変化を通じて細胞内キナーゼドメインが自己リン酸化される。次いでリン酸基転移反応によって転写因子がリン酸化され、その結果、環境変化に対応した遺伝子発現を可能にしている。各種病原菌において、TCS は病原性、薬剤耐性などを制御するうえ、生存に必須な系も存在するため、新たな抗菌薬の標的として、注目されている。本研究では、う蝕菌（*Streptococcus mutans*）のバイオフィルム形成に制御に関与する VicK（アミノ酸残基数: 450）に着目した。VicK の細胞質内領域(aa. 33-450)は、他の HK とも相同性を示すことが判明している。したがって、細胞質内で VicK の自己リン酸化を阻害する化合物は、う蝕を防ぐばかりでなく、抗菌性を示す可能性がある。VicK の細胞質領域の全長構造はすでに報告があるが、その分解能は 3.3Å と低く、フレキシブルなループ構造も欠けていた。阻害剤の開発やその機能を理解するためには、より高分解能の構造情報が必要である。そこで、VicK の細胞質内領域の X 線結晶構造解析を行った。自己リン酸化に必要な機能領域として、まず、VicK の細胞質内領域として、自己リン酸化される His 残基を含む DHp 領域から、ATP を結合し、His 残基のリン酸化を触媒する CA ドメインを含む C 末端までの領域（$VicK_{199\text{-}437}$; aa.199-450 に相当）を大腸菌発現系を用いて調製した。さらに、C 末端を欠損させた $VicK_{199\text{-}437}$ (aa. 199-437)も調製した。両コンストラクトの自己リン酸化能を調べたところ、同等な自己リン酸化能を示した。そこで $VicK_{199\text{-}437}$ について、結晶化スクリーニングを行った結果、良質な結晶が得られた。Se-Met を用いた異常分散法によって位相を決定し、構造精密化を行った結果、2.48Å分解能でループ構造を含む aa199-437 領域を構造決定することができた。VicK は DHp 領域が 4-ヘリックスバンドル構造を形成し、全体として二量体を形成していた。さらに、MgATP 存在下においても結晶化した結果、$VicK_{199\text{-}437}$ のヌクレオチド結合型の構造決定にも 2.14Å分解能で成功した。結合部位には MgADP が結合しており、ADP のアデニン環は疎水的な結合ポケットに位置し、Asp368 と Asn338 が水素結合していた。Mg イオンを配位したリン酸領域は、Arg 残基などの塩基性残基側鎖と相互作用していることがわかった。さらに、自己リン酸化 His217 がリン酸化されていることがわかった。このリン酸基転移が、溶液状態のときに起きて結晶化されたのか、あるいは結晶内で起きたのか今後検討したい。

two-component system, histidine kinase, X-ray crystallography

講演番号：3A17a03
講演日時：3 月 27 日 09:52～ センター2 号館 A17 会場

麹菌のアレスチン様因子 CreD のユビキチン化はマルトース輸送体 MalP のグルコース不活性化制御に必要である
CreD ubiquitination required for glucose-induced inactivation of maltose transporter MalP in *Aspergillus oryzae*.
○藤田 翔貴[1]、多田 日菜子[1]、田中 瑞己[2]、新谷 尚弘[1]、五味 勝也[1]([1]東北大学院農、[2]静岡県大食栄)
○SHOKI FUJITA[1], HINAKO TADA[1], MIZUKI TANAKA[2], TAKAHIRO SHINTANI[1], KATSUYA GOMI[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Univ. of Shizuoka)

麹菌のデンプン分解酵素生産において，誘導基質であるマルトースの菌体内取り込み系が重要である。その一方で、それらデンプン分解酵素の遺伝子発現は、環境中へのグルコースの流入が起因となるカーボンカタボライト抑制によって抑制される。麹菌の主要なマルトース輸送体 MalP は、グルコース存在下で転写抑制を受けるだけでなく、エンドサイトーシスによって速やかに細胞膜上から除去され、液胞にて分解される。この MalP の細胞膜上からの除去には，アレスチン様タンパク質 CreD を介した HECT 型ユビキチンリガーゼ HulA による MalP のユビキチン化（Ub 化）が必要である。また、アダプターとして機能する CreD も HulA によって Ub 化されていることが明らかになってきた。しかし、これら MalP や CreD のグルコース存在下におけるユビキチンを介した制御機構には未だ不明な点が多く残る。本研究では、アダプターCreD のユビキチン修飾状態が標的認識に及ぼす影響を解析することとした。さらに、CreD-HulA 複合体による MalP のユビキチン付加領域の探索を試みた。

まず、CreD の被ユビキチン残基の同定を行い、CreD のユビキチン修飾状態が MalP 分解へ及ぼす影響を解析することで、CreD の Ub 化が MalP の分解に必要であるのか検証した。CreD の C 末端へ FLAG タグを付加させた CreD-3FLAG を免疫沈降し、Ub 抗体を用いて CreD のユビキチン修飾状態を解析したところ、CreD はグルコースの有無に関わらず Ub 化されていることが明らかになった。一方で、麹菌近縁種の CreD において、よく保存された 4 つのリシン残基をアルギニンに置換した CreD 変異体では、Ub 化が著しく抑制された。さらに、この CreD 変異体発現株では、MalP のグルコース依存的な Ub 化および細胞内への取り込みが抑制された。以上の結果より、MalP のグルコース依存的な分解には，MalP だけでなく、その Ub 化を仲介するアダプターCreD も HulA によって Ub 化される必要があることが明らかになった。さらに、MalP の N および C 末端領域が細胞質に露出していることに着目し、これら領域中に存在しているリシン残基をアルギニン置換した変異体を作製した。これら変異体のグルコース依存的な分解を顕微鏡観察およびウェスタンブロット法で経時的に解析したところ、N 末端領域中に存在した３つのリシン残基の置換変異体はグルコース存在下でも原形質膜上に安定して局在していることが明らかになった。以上の結果より、MalP はグルコース依存的に N 末端領域が Ub 化され、細胞内へ取り込まれることが示唆された。

Aspergillus oryzae, endocytosis, Catabolite repression

講演番号：3A17a04
講演日時：3 月 27 日 10:03～ センター2 号館 A17 会場

麹菌のカーボンカタボライト抑制制御に関わるアレスチン様タンパク質 CreD の発現量制御機構
Regulation mechanism of expression of CreD, an arrestin-like protein involved in the control of carbon catabolite repression in Aspergillus oryzae
○田中 瑞己[1]、藤田 翔貴[2]、多田 日菜子[2]、新谷 尚弘[2]、河原崎 泰昌[1]、五味 勝也[2]([1]静県大食栄、[2]東北大農)
○ Mizuki TANAKA[1], Shoki FUJITA[2], Hinako TADA[2], Takahiro SHINTANI[2], Yasuaki KAWARASAKI[1], Katsuya GOMI[2] ([1]Univ. Shizuoka, [2]Tohoku Univ.)

麹菌のアミラーゼ遺伝子発現は、グルコースが存在すると転写因子 CreA によって制御されるカーボンカタボライト抑制によって抑制される。糸状菌における CreA 以外のカーボンカタボライト抑制制御因子として、脱ユビキチン化酵素複合体を形成する CreB と CreC、ユビキチンリガーゼとその標的タンパク質のアダプターとして機能するアレスチン様タンパク質 CreD が同定されている。麹菌においては、*creB* を破壊することで CreA の存在量が減少することが明らかになっているが(1)、CreB によって脱ユビキチン化される標的タンパク質は明らかとなっていない。また、グルコースが存在するとアミラーゼの発現誘導基質であるマルトースを取り込むトランスポーター(MalP)がエンドサイトーシス依存的に細胞膜から液胞に輸送され、CreD とユビキチンリガーゼ HulA による MalP のユビキチン化がエンドサイトーシスに必要であることが明らかになっている(2)。さらに、CreD 自身もユビキチン化され、アレスチン様ドメイン内に存在する 4 個のリジンをアルギニンに置換することでユビキチン化を受けなくことが示されている。本研究では、CreD のタンパク質レベルでの発現量に CreB や CreD のユビキチン化が与える影響について解析した。

野生株と *creB* 破壊株において FLAG タグ融合 CreD を発現させ、グリセロールを炭素源とした培地で培養後、グルコース培地に移した場合の CreD 量をウェスタンブロット法により調べた。その結果、野生株においてはグルコース培地に移してから 60 分後に CreD 量が著しく増加した。一方、*creB* 破壊株においてはグルコース培地で培養後も CreD 量の増加は見られなかった。次に、*creB* 破壊株において非ユビキチン化変異導入 CreD を発現させた結果、グルコース培地で培養後に CreD 量の増加が観察された。このことから、グルコース存在下では CreD が CreB によって脱ユビキチン化されることで安定化される可能性が示された。また、麹菌においてはグルコキナーゼ *glkA* を破壊することでカーボンカタボライト抑制が解除されるが、*glkA* 破壊株においてもグルコース培地で培養後の CreD 量の増加が抑制された。今後、CreD の転写レベルでの発現量に炭素源や *creB* および *glkA* の破壊が与える影響について調べる予定である。

(1) Tanaka et al., *Mol. Microbiol.*, 110, 176–190, 2018.
(2) Tanaka et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 83, e00592-17,2017.

Aspergillus oryzae, Carbon catabolite repression, Ubiquitin

発表責任者：田中瑞己（mizuki.tanaka@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：3A17a05
講演日時：3 月 27 日 10:14～ センター2 号館 A17 会場

シグナルを封入した人工メンブレンベシクルによる細菌制御
Bacteria control by signal loaded artificial membrane vesicles
○中嶋 勇人[1]、豊福 雅典[2,3]、野村 暢彦[2,3]、Utada Andrew. S.[2,3] ([1]筑波大・生命環境、[2]筑波大・MiCS、[3]筑波大・生命環境系)
○Yuto Nakajima[1], Masanori Toyohuku[2,3], Nobuhiko Nomura[2,3], Andrew. S. Utada[2,3] ([1]Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]MiCS, Univ. Tsukuba, [3]Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

多くの細菌はメンブレンベシクル（MV）と呼ばれる自身の細胞膜で構成された直径 20～400 nm の球状の構造物にシグナル分子や核酸などを封入し、細胞外へ放出する。MV には細胞特異性が備わっているものもあり、複数の細菌が競合する環境の中でも特定の菌にのみ物質を伝達することができる。これまでの細菌制御は、温度や pH の変化、抗生物質を細菌集団に添加するなど系全体に対して行われてきた。MV の細胞特異的な伝達性は、特定の菌の活性の飛躍的な上昇や抑制が可能であり、集団の中で特定の細胞を選択的に制御することができると考えられる。 しかし、細菌が生産しない物質の封入や不純物を除いた目的物質のみの封入などは困難であった。そこで我々は、人工的に MV を作製することで目的物質を封入し、細菌への伝達を行った。

人工 MV はグラム陰性菌の生物膜を模倣し大腸菌の生物膜から抽出したホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルグリセロール、カルジオリピンを用いた。褐色瓶中で脂質溶液と封入する物質を混合し完全に乾燥させ、瓶の壁面に脂質層を形成させた。その脂質層を脂質のゲル－液晶転移温度以上で攪拌し、水和することで、乾燥した脂質層が膨張し分離した。分離した二重脂質層は末端部分の炭化水素が水との相互作用を防ぐため、閉じて小胞を形成する。その後、超音波処理もしくは押し出し法を用いてサイズを縮小した均一な小胞を作製した。作製した小胞を透過型電子顕微鏡（TEM）で観察した結果、二重脂質膜小胞様の構造体が見られた。ナノトラッキング法を用いて粒径を計測したところ、およそ 156±8 nm であった。

続いて、人工 MV にクォーラムセンシング（QS）シグナルを封入して細菌への伝達を確認した。QS とはシグナル物質を介した菌体密度依存的な遺伝子発現機構である。ここでは、QS シグナルとして知られる *N*-Acyl homoserine lactone （AHL）の一つである C_{16}-HSL を人工 MV に封入した。これを *Chromobacterium violaceum* VIR24 を用いたシグナルレポーター株に添加し、C_{16}-HSL の伝達を評価した。この株は C_{16}-HSL を感知するとその量に応じて GFP を発現する。C_{16}-HSL を封入した人工 MV を添加すると GFP の発現が確認された。一方で、C_{16}-HSL 非添加では反応しなかった。 この結果から、人工 MV を介して C_{16}-HSL が *C. violaceum* に伝達されたことが考えられる。今後は人工 MV に封入されたシグナルの安定性や細菌への局所的な伝達を検証するために一細胞レベルで人工 MV の伝達を解析する。加えて、細胞特異性を備えた人工 MV の作製及び様々な物質の封入と伝達を検証することで新たな細菌制御の技術を構築していく。

Membrane vesicles, Quorum sensing, Bacterial interaction

講演番号：3A17a06
講演日時：3 月 27 日 10:35～ センター2 号館 A17 会場

過酷な環境から単離された微細藻類の新規な光酸化ストレス防御機構のオミクス解析
Omics analysis of photooxidative stress protection in green microalgae isolated from severe growth environments.
○豊島 拓樹[1]、吉田 梨沙子[1]、佐保 好亮[1]、高市 真一[2]、川崎 信治[1,2] ([1]東農大バイオサイエンス、[2]東農大分子微生物)
○ Hiroki TOYOSHIMA[1], Risako YOSHIDA[1], Yoshiaki SAHO[1], Shinichi TKAICHI[2], Shinji KAWASAKI[1,2] ([1]TUA Bioscience, [2]TUA microbiol.)

【目的】一般の光合成生物は、強光を伴う高塩濃度や乾燥、低温などの環境ストレス下において、光酸化ストレスが発生し生育が困難になる。当研究チームでは過酷な環境に生息する光合成生物に新規な生命応答の存在を推定し、優れたストレス耐性能を有する微細藻類の単離を行ってきた。単離株の中で真夏のアスファルト表面から単離された真核微細藻類 Ki-4 株は、形態、分子系統学的特徴からイカダモ科に属する新種と判明し、*Coelastrella astaxanthina* と命名した[1)]。本藻類は光酸化ストレス環境下で、藻体を赤色化し長期間生存する高い耐性能を示した。この赤色化に着目して研究を進めた結果、真核光合成生物から初めて水溶性カロテノイド結合タンパク質が精製され、アスタキサンチンを結合することから AstaP と命名した[2)]。本タンパク質は原核生物のシアノバクテリアに分布するチラコイド膜表在性の水溶性カロテノイド結合タンパク質(OCP)とは異なり細胞表層移行シグナルを有し、光酸化ストレス下で大量に発現・蓄積することから、光合成生物では報告例のない強光防御機構への関与が推定された。一方、Ki-4 株は AstaP のみならず、ストレス耐性時に未同定タンパク質の発現や代謝産物の組成変化が観察された[3)]。そこで本学会では Ki-4 株が光酸化ストレス耐性を獲得する未知のストレス防御機構の解明を目的とした研究結果を報告する。
【方法・結果】光酸化ストレス条件下での生理解析を行った結果、Ki-4 株はストレス付与直後に低下する光合成活性を速やかに回復し、一週間にわたり光合成活性を維持しながら肥大化し、最終的には休眠細胞を形成する様子が観察された。トランスクリプトーム解析の結果、*astaP* 遺伝子は発現遺伝子の中で最も発現が高誘導される遺伝子の１つと同定されたが、他の高発現する遺伝子の約８０％は機能未知遺伝子と推定された。タンパク質発現と代謝産物変動についてプロテオミクス解析を行った結果、機能未知遺伝子がコードするいくつかのタンパク質の発現確認に成功し、LCMS を主とするメタボロミクス解析によりストレス代謝の同定と代謝経路の推定を行った。

1) Kawasaki et al. Phycological Research (2019)
2) Kawasaki et al. Plant Cell Physiology,54(7) 1027-1040(2013).
3) 豊島ら、2019 年度　日本農芸化学会

Photooxidative stress, AstaP, astaxanthin

講演番号：3A17a07
講演日時：3 月 27 日 10:46～ センター2 号館 A17 会場

好熱菌に分布する機能未知の AstaP ホモログタンパク質の機能解析

Functional analysis of an AstaP homolog protein found in a thermophilic bacterium

○本間 薫[1]、大島 一輝[1]、加藤 聖子[1]、石毛 太一郎[3]、久保田 恵理[3]、高市 真一[1,2]、川崎 信治[1,2]
([1]東農大バイオ、[2]東農大微生物、[3]東農大ゲノム解析セ)
○Kaoru HOMMA[1], Kazuki Oshima[1], Shoko Kato[1], Taichiro Ishige[3], Eri Kubota[3], Shinichi Takaichi[1,2], Shinji Kawasaki[1,2] ([1]TUA Bio., [2]TUA microbiol., [3]TUA Genome.)

【目的】光合成生物は、強光が付随する環境ストレス下において光酸化ストレスを発生し、生育が困難となる。我々は光合成生物の生育が困難と思われる真夏のアスファルトから、高い環境ストレス耐性能を有する真核微細藻類（*Coelastrella astaxanthina* Ki-4）を単離した。Ki-4 株は強光が付随する環境ストレス付与時に、脂溶性のアスタキサンチンを結合し水溶性化する AstaP を大量に生産し強光ストレス耐性を獲得する。本タンパク質の一次構造は、N 末端部分に細胞外輸送シグナルを有し、かつ Fasciclin ドメインを保持していた。データベース解析の結果、AstaP に高い相同性を持つホモログは全て機能未知タンパク質に分類され、興味深いことに原核微生物の好熱菌やシアノバクテリアを中心に幅広く分布していた。ゲノム上に AstaP ホモログを保持する原核生物は全てカロテノイド合成能を保持することが観察されたことから、AstaP ホモログはカロテノイド代謝に関与することが強く推定された。昨年度の学会では、好熱菌に分布する AstaP ホモログの欠損株の作製と光応答性について報告した[1)]。本学会ではその機能同定を目的として解析を行ったので報告する。

【方法・結果】AstaP ホモログの分布が観察された好熱菌 *Meiothermus ruber* やシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 では、AstaP ホモログをコードする遺伝子の顕著な光応答性が観察された。RNAseq 解析の結果、好熱菌の AstaP ホモログをコードする遺伝子は全転写産物の中でも特に強く強光下で発現誘導される光応答遺伝子であることが判明した。AstaP ホモログが関与する強光条件下での生理代謝について知見を得ることを目的として、野生株と欠損株を用いたカロテノイド組成解析とプロテオーム解析を行ったので報告する。

1) 大島ら　農芸化学会 3C2P08(2019).

light response, carotenoid, gene expression

講演番号：3A17a08
講演日時：3 月 27 日 10:57～ センター2 号館 A17 会場

出芽酵母の複合スフィンゴ脂質構造多様性破綻ライブラリーの作製とストレス耐性能評価
Construction of complex sphingolipid structural diversity disruption library of budding yeast and evaluation of the stress tolerance
○古賀 綾乃、高山 千廣、谷 元洋（九州大理）
○Ayano KOGA, Chihiro TAKAYAMA, Motohiro TANI (Kyushu Univ.)

複合スフィンゴ脂質は生体膜の基本骨格である脂質二重層の主要成分の一つであり、真核細胞の生育において必須な脂質である。複合スフィンゴ脂質には多彩な構造バリエーションがあり、この構造多様性は複合スフィンゴ脂質が多彩な生理機能を発揮するための重要な分子基盤であると考えられているが、詳細は殆ど明らかになっていない。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では、複合スフィンゴ脂質は 15 種類のサブタイプに分類される。即ち、疎水性部のセラミドは A, B, B’, C および D タイプの 5 種類が存在し、親水性頭部構造の違いでイノシトールリン酸が結合した IPC、これにマンノースが結合した MIPC、さらにイノシトールリン酸が結合した $M(IP)_2C$ の 3 種類に分類される。酵母においてこのような複合スフィンゴ脂質の多様性を規定する代謝酵素は、Sur2, Scs7, Csg1, Csh1, Ipt1 である。これまでに我々は、これらの複合スフィンゴ脂質代謝酵素の欠損株を用いて、MIPC が特定の小胞輸送経路の制御、細胞壁機能維持に関与することを明らかにしている。本研究では、複合スフィンゴ脂質の構造多様性と生理機能の連関性を総合的に理解することを目的として、複合スフィンゴ脂質構造多様性破綻ライブラリー（*SUR2*, *SCS7*, *CSG1*, *CSH1*, *IPT1* の欠損を組み合わせることで、様々な複合スフィンゴ脂質サブタイプが抜け落ちた計 11 種類の変異株ライブラリー）を作製し、それらのストレス耐性能の評価を行った。その結果、MIPC, $M(IP)_2C$ が生合成できず複合スフィンゴ脂質が IPC のみとなった変異株（*csg1Δ csh1Δ*）は、高温、高浸透圧、細胞壁およびアルカリストレスに対して高感受性を示し、この高感受性は IPC の A タイプしか存在しない変異株（*csg1Δ csh1Δ sur2Δ scs7Δ*）でさらに促進されることが明らかになった。また、*csg1Δ csh1Δ sur2Δ scs7Δ* 株の高浸透圧ストレス高感受性は、高浸透圧ストレス応答経路 HOG 経路の MAPK である *HOG1* 欠損下でも観察されたことから、この高感受性はストレス応答経路の損傷で起きているものではないことが示唆された。以上の結果より、複合スフィンゴ脂質の構造多様性は、様々な環境ストレスに対する耐性能の獲得に重要であることが示唆された。

Sphingolipid, Saccharomyces cerevisiae, Stress resistance

発表責任者：谷　元洋（tani@chem.kyushu-univ.jp）

講演番号：3A17a09
講演日時：3 月 27 日 11:08～ センター2 号館 A17 会場

Lactobacillus agilis BKN88 における走化性の解析
Characterization of chemotactic responses in *Lactobacillus agilis* BKN88
○鈴木 駿也[1]、近藤 和穂[1]、横田 健治[2]、五十君 静信[2]、梶川 揚申[2]([1]東農大院・農化、[2]東農大・農化)
○ Shunnya SUZUKI[1], Kazuho KONDO[1], Kenji YOKOTA[2], Shizunobu IGIMI[2], Akinobu KAJIKAWA[2] ([1]Grad. Sch. Agr. Chem, Tokyo Univ. Agr., [2]Sch. Agr. Chem, Tokyo Univ. Agr)

【背景・目的】運動性細菌は好ましい物質に向かって遊走する一方、好ましくない物質からは忌避する行動応答（走化性）を示し、運動性細菌の生態において運動性・走化性は重要な役割を果たす。実際に我々は、ニワトリ腸管由来の運動性 *Lactobacillus* 属細菌である *Lactobacillus agilis* BKN88 (以下, BKN88)において、マウス腸管への定着に運動性が関与することを報告した。しかし、運動性 *Lactobacillus* 属細菌の走化性に関する具体的な知見はほとんどなく、腸管定着における走化性の役割も不明である。そこで、本研究では BKN88 の走化性に関わる腸管由来物質の探索と対応する受容体の同定を目的とした。
【方法】走化性に関与する物質を探索するため、Capillary 法による走化性試験を行った。BKN88 のゲノム上には走化性受容体と推定される遺伝子が 5 つ(*mcp1*～*mcp5*)存在した。そこで、各遺伝子の発現を RT-PCR により確認した。発現が確認された遺伝子を、温度感受性プラスミド pG$^+$host5 を用いた二重相同組換えによりそれぞれ欠失させた。構築した MCP 欠損株の走化性試験を行い、走化性物質に対する受容体の同定を試みた。
【結果・考察】走化性試験の結果、BKN88 は胆汁酸、乳酸、酢酸、酪酸から忌避し、ムチンに誘引された。BKN88 と腸管由来非運動性 *Lactobacillus* 属細菌の胆汁酸・酸耐性を比較したところ、BKN88 の胆汁酸・酸耐性は比較的低かった。以上の結果から、BKN88 は胆汁酸や有機酸から逃れる能力を持つため胆汁酸・酸耐性を獲得する必要がなかったと推察される。また、BKN88 は腸内細菌が産生する有機酸や細胞毒性を示す胆汁酸から忌避し、腸管内での生存性を向上させていると考えられた。BKN88 のムチンに対する走化性はムチンの糖鎖に誘引されていることが考えられた。そこで、ムチン構成糖を対象に走化性試験を行ったところ、BKN88 は *N*-アセチルノイラミン酸（Neu5Ac）に誘引された。以上の結果より、BKN88 は粘液の主成分であるムチンの Neu5Ac に遊走することで、腸管内での定着性を向上させていると推察された。RT-PCR では *mcp1*～*mcp5* 全ての発現を確認した。各 MCP 欠損株の走化性物質に対する走化性を確認したところ、MCP2 欠損株ではムチンに対する走化性を、MCP5 欠損株では胆汁酸に対する走化性をそれぞれ欠失していた。乳酸、酢酸、酪酸に対する走化性は、いずれの MCP 欠損株においても保持されていた。以上より、ムチン・胆汁酸に対する走化性には MCP2・MCP5 がそれぞれ関与し、有機酸に対する走化性には複数の MCP もしくは未知の受容体が関与することが示唆された。

motile lactobacilli, chemotaxis, *Lactobacillus agilis*

講演番号：3A17a10
講演日時：3 月 27 日 11:19～ センター2 号館 A17 会場

ヒト表皮由来細胞を用いたヒト毛髪主要細菌による発育・老化関連遺伝子 SIRT1 の発現促進/抑制活性調査

Stimulation/repression of SIRT1 gene in human keratinocytes by bacteria found on human scalp hair

○山田 あずさ、渡辺 康太、西 悠里、田代 幸寛、酒井 謙二、片倉 喜範 (九大院・ 生資環)
○Azusa YAMADA, Kota Wamatabe, Yuri Nishi, Yukihiro Tashiro, Kenji Sakai, Yoshinori Katakura (Grad. Sch. Bioresour. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ)

［研究背景］

人体には腸内や口腔内、皮膚上など様々な部位に固有の細菌群が棲息している。特に、表皮には表皮常在細菌が棲息し、細菌の生産する有機酸などは、外来性の病原性微生物の侵入を防ぐなど宿主に対し有益性をもたらす一方、常在細菌群集構造の乱れにより疾患が引き起こされる場合もあることが知られている。我々は、ヒト毛髪および毛根に一定菌数の特徴的な細菌群集が存在することを既に明らかにしている(Watanabe et al. Microbes Environ., 2019)。本研究では、ヒト毛髪細菌とヒト頭皮の相互作用を検討するために、ヒト表皮由来細胞株を用いた発育・老化関連遺伝子の発現促進/抑制アッセイ系に及ぼす影響を調査した。

［研究方法］

16S アンプリコン解析より主要なヒト毛髪細菌候補と考えられた 7 種細菌の標準株に加え、毛髪育毛促進活性が報告されている *Pantoea agglomerans* (Wakame et al. Anticancer Res., 2016) を分譲取得し実験に供した。ヒト細胞の作用対象遺伝子はサーチュイン遺伝子の一種で、皮膚細胞においては、紫外線などにより引き起こされる DNA 損傷の修復に関与することが知られている SIRT1 とした。ヒト皮膚表皮由来細胞株 HaCaT(SIRT1p-EGFP)を、10% FBS 含有 DMEM 培地を用いて 37 ℃、5 %CO_2 条件下で培養し、96 ウェルプレートに一定濃度で播種した。上記細菌をそれぞれ適した培地と条件で培養して得られた細胞より、死菌体およびその抽出液を作製し、HaCaT に添加し培養した。EGFP 蛍光をイメージングサイトメーター (IN Cell Analyzer 2000) で測定し、ヒト SIRT1 プロモーターの活性化を評価した。各アッセイ系は少なくとも 3 回実施し、$P < 0.05$ の変化を与えた系に対して統計的有意とした。

［研究結果・考察］

試験に供した死菌体或いは無細胞抽出液のいくつかにおいて SIRT1 の発現を刺激する活性が存在することが明らかとなった。また、ある細菌では SIRT1 活性の発現が抑制された。従って、毛髪細菌が毛髪或いは毛根付傍に常在・生育することで頭皮細胞に影響を与えている可能性が示唆された。また、頭皮環境の改善などにおいては、毛髪棲息細菌を考慮する必要性が浮かび上がった。現在は、HaCaT に内在する SIRT1 活性化調査の細菌数を増やすとともに、バルジ幹細胞を用いたテロメラーゼ活性化に対する影響についても検討を進めている。

SIRT1, Bacteria, Human scalp hair

講演番号：3A17a11
講演日時：3 月 27 日 11:40～ センター2 号館 A17 会場

出芽酵母のリン酸飢餓誘導性オートファジーと選択的オートファジーにおいて重要な Slt2 と Hrr25 による Atg29 のリン酸化制御
Regulation of Atg29 phosphorylation by Slt2 and Hrr25 is important for phosphate starvation-induced autophagy and selective autophagy　in *Saccharomyces cerevisiae*
○奥村 俊、横田 浩人、菊池 あゆみ、五味 勝也、新谷 尚弘（東北大・院農）
○Shun OKUMURA, Hiroto YOKOTA, Ayumi KIKUCHI, Katsuya GOMI, Takahiro SHINTANI (Tohoku Univ.)

オートファジーは、栄養飢餓に応答して細胞質成分を二重膜構造体オートファゴソームで包み込み、液胞（動物細胞ではリソソーム）へ輸送し分解する経路である。出芽酵母では、栄養飢餓に伴う Atg13 の脱リン酸化が引き金となり、Atg13、Atg1 キナーゼ、Atg17/31/29 複合体からなる集合体（Atg1 複合体）を形成する。この集合体の形成は Atg1 の自己リン酸化に必要であり、オートファジーの開始に必須のプロセスである。リン酸飢餓下では Atg13 の脱リン酸化が緩慢であることで、Atg1 複合体の形成および Atg1 の自己リン酸化の効率が低い。そのため、窒素飢餓誘導性オートファジー（NSiA）と比較しリン酸飢餓誘導性オートファジー（PSiA）の活性は著しく低い。さらに、PSiA における Atg1 の自己リン酸化には Atg11 が必要（NSiA では不要）であることを明らかにしている。Atg11 は選択的オートファジーの基質に結合しオートファゴソームに取り込むためのアダプタータンパク質である。本会昨年度大会では、PSiA において Atg11 がアダプターとしての機能のほかに Atg29 との相互作用を介して Atg1 複合体への Atg1 と Atg9 のリクルートを促進することを報告した。本研究では、Atg11-Atg29 間の相互作用に必要となる Atg29 のリン酸化の制御機構を明らかにすることを目的とした。

先にリン酸飢餓下で細胞壁が厚くなることを見出しており、cell wall integrity（CWI）経路が活性化されていると推測した。そこで、CWI 経路の MAP キナーゼである Slt2 の活性化状態を解析したところ、リン酸飢餓下において Slt2 は強く且つ持続して活性化されていることがわかった。次に、*slt2*Δ株における Atg29 のリン酸化状態を解析したところ、そのリン酸化が親株と比較し顕著に遅延していた。カゼインキナーゼ 1δである Hrr25 が Atg11 と物理的に相互作用することが報告されていたため、*hrr25*Δ株においても同様の解析を行い、Atg29 リン酸化の遅延を認めた。両キナーゼの二重欠損株では、Atg29 リン酸化はほぼ完全に失われていた。また、恒常活性型の Atg29ΔC の発現は *slt2*Δ株、*hrr25*Δ株における PSiA 欠損を部分的に抑圧したことから、両キナーゼが独立して Atg29 のリン酸化を制御することが PSiA に重要であることが示唆された。さらに、共免疫沈降解析により *slt2*Δ株、*hrr25*Δ株における Atg11-Atg29 間相互作用の低下が示されたことから、両キナーゼが Atg29 のリン酸化を通じて Atg11-Atg29 間相互作用を制御することが示唆された。最後に、Atg29ΔC の発現は *slt2*Δ株における窒素飢餓下のマイトファジーとペキソファジーの欠損をほぼ完全に抑圧した。以上の結果から、PSiA では Slt2 と Hrr25 による、窒素飢餓下の選択的オートファジーでは Slt2 による Atg11-Atg29 間相互作用の制御が、Atg1 と Atg9、または選択的基質を Atg1 複合体へリクルートする上で重要であると結論づけた。

Saccharomyces cerevisiae, autophagy, phosphate starvation

発表責任者：新谷　尚弘（takahiro.shintani.d7@tohoku.ac.jp）

講演番号：3A17a12
講演日時：3 月 27 日 11:51～ センター2 号館 A17 会場

分裂酵母の胞子形成の制御に関わる DDK 複合体 Spo4-Spo6 と、SIN 経路因子の相互作用解析

Analysis of interaction between the DDK complex Spo4-Spo6 and SIN pathway during sporulation in fission yeast

○伊藤 碧美[1]、中村 太郎[2]、今田 一姫[1,2]([1]鈴鹿高専、[2]大阪市大・院理)
○Tamami ITO[1], Taro NAKAMURA[2], Kazuki IMADA[1,2] ([1]NIT, Suzuka College, [2]Osaka City Univ.)

Dbf4-dependent kinase（DDK）複合体は真核生物に広く保存されているプロテインキナーゼで、DNA 複製の制御に関わる。分裂酵母は 2 つの DDK 複合体をもっており、Hsk1-Him1 は他の真核生物の DDK 複合体と同様、DNA 複製の制御を行うが、Spo4-Spo6 は DNA 複製ではなく第二減数分裂の進行と胞子形成を制御することが知られている。これまでの研究から、Spo4-Spo6 の kinase 活性は減数分裂には必要なく、将来の胞子の細胞膜である前胞子膜の形成開始に必要であることが分かっている。しかし、Spo4-Spo6 による減数分裂・胞子形成の制御機構は未だ不明である。本研究は、Spo4-Spo6 がどのようにして胞子形成を制御しているのかを明らかにすることを目的とする。

まずはじめに、Spo6 の局在観察を行った。その結果、第二減数分裂時に、核とスピンドル極体（SPB；中心体にあたる構造）に局在すること、SPB 局在には N 末端側が必要であることが分かった。そこで、*spo4* 変異株において、胞子形成時に SPB に局在し胞子形成に関与する各因子の局在を調べたところ、SIN 経路因子の SPB 局在に Spo4 の kinase 活性が必要であることが示された。SIN 経路は、栄養増殖時の細胞質分裂の開始を制御しているリン酸化ネットワークで、胞子形成に必要であることが分かっている。それでは、Spo4-Spo6 は SIN 経路因子を直接リン酸化することで制御しているのだろうか？私たちはこれを検証するため、Spo4-Spo6 の調節サブユニットである Spo6 と SIN 経路因子の相互作用を調べている。

yeast, DDK, sporulation

講演番号：3A17a13
講演日時：3 月 27 日 12:02～ センター2 号館 A17 会場

TORC1 経路における細胞内グルタミン検知機構
The glutamine-sensing mechanism in the yeast TORC1 pathway
○谷川 美頼[1]、山本 勝良[2]、前田 達哉[1] ([1]浜松医科大、[2]東大定量研)
○Mirai TANIGAWA[1], Katsuyoshi YAMAMOTO[2], Tatsuya MAEDA[1] ([1]Hamamatsu Univ. Sch. of Med., [2]Tokyo Univ.)

TOR 複合体 1 （TORC1）は、アミノ酸をはじめとした栄養源によって活性化され、細胞の成長を促進する栄養応答の枢要をなす分子である。アミノ酸による TORC1 の活性化は、独立した複数の経路を介して引き起こされている。これまで我々は、グルタミンが酵母において、Gtr 複合体（哺乳類 Rag 複合体オルソログ）非依存的に TORC1 を活性化すること、この活性化が液胞膜タンパク質 Pib2 を介すること、Pib2 が *in vitro* で直接 TORC1 を活性化することを明らかにしてきた。Pib2 による TORC1 の活性化が細胞内グルタミンに依存して引き起こされていることは、細胞内にグルタミンセンサーが存在することを示唆しているが、その正体は不明である。

今回我々はグルタミンセンサーの候補分子を同定し、精製タンパク質のみを用いた *in vitro* の系において、グルタミンによる TORC1 活性化の完全再構成に成功した。得られた結果より、グルタミンがどのように検知され、Pib2 を介した TORC1 の活性化を引き起こすのか、そのメカニズムについて考察する。

TORC1, rapamycin, amino acid

発表責任者：谷川美頼（tanigawa@hama-med.ac.jp）

講演番号：3A17p01
講演日時：3 月 27 日 13:50～ センター2 号館 A17 会場

超高温堆肥及び原料汚泥から分離された *Calditerricola* 属細菌の低温耐性機構の解明
Mechanism of distinguishable cold-tolerance of *Calditerricola* spp. isolated from hyperthermal compost and its material sludge

○尾島 舞世、前田 一至、田代 幸寛、酒井 謙二（九大院・生資環）
○Maise OJIMA, Kazushi MAEDA, Yukihiro TASHIRO, Kenji SAKAI (Grad. Sch. Bioresour. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ.)

【背景・目的】
現在、鹿児島市では都市下水を活性汚泥処理し、その余剰汚泥を超高温で堆肥化している。これまでに、超高温コンポストから *Calditerricola* 属細菌 *Calditerricola satsumensis* YMO81^{T}および *C. yamamurae* YMO722^{T}（以下、コンポスト分離株）が、さらに当研究室において消化汚泥（20˚C）から *C. satsumensis* DD2 および D3（汚泥分離株）が分離されている。先行研究によりこれらの分離株は異なる低温応答を示すことが明らかになり、これが各株の生態学的適所生存に寄与していることが示唆されている。本研究では、長期低温下における各株の生存率を調査するとともに、ドラフトゲノム解析から違いとして浮かび上がった脂肪酸組成を低温と高温で比較した。

【方法】
CYS 液体培地を用いて 75℃で前培養した各株を 20℃で静置し、CFU の変化をモニターして生存率を決定した。脂肪酸分析は、本培養に続いて 75℃及び 20℃で後培養した各株をけん化、メチル化、抽出、クリーンアップの順で調製後、GC を用いて分析した。

【結果・考察】
20℃での生存率を測定した結果、コンポスト分離株は 1h で生存率が 20%まで低下し、1 日以内に死滅した。一方、汚泥分離株は 20℃で 3 日程度で生存率が急激に低下した後、DD2 は 189 日、D3 は現在 241 日目まで増殖能を維持している。したがって汚泥分離株のみが低温耐性を示すことが確認された。膜脂肪酸分析の結果、75℃で培養した直後は 4 株は極めて類似した脂肪酸組成を示した。コンポスト分離株は低温下において不飽和脂肪酸は見られなかったことから、低温耐性を有していない株として予測通りの結果となった。一方、汚泥分離株では低温における培養後で組成が変化することを確認した。DD2 及び D3 で主要な飽和脂肪酸が減少し、新たなピークの脂肪酸が増加したことから、これらの主要な脂肪酸が不飽和化し、変化していると推測した。このことはドラフトゲノム解析から汚泥分離株特有の機能遺伝子として同定された Two-component sensor histidine kinase による発現制御系の関連が示唆され、以上の結果から、低温で応答する遺伝子調節機構によって細胞膜の脂肪酸組成を変化させることで、低温耐性をもたらしている可能性が示唆された。

Extreme thermophile, cold tolerance, compost

講演番号：3A17p02
講演日時：3 月 27 日 14:01～ センター2 号館 A17 会場

普遍的リボヌクレアーゼによる大腸菌バイオフィルム形成制御機構の解析
Studies on the mechanism of biofilm formation regulated by the conserved ribonuclease, RNase T2, in *Escherichia coli*

○南 篤[1]、日高 真誠[1,2]、葛山 智久[1,2]、小川 哲弘[1,2] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]東大・微生物連携機構)
○ Atsushi MINAMI[1], Makoto HIDAKA[1,2], Tomohisa KUZUYAMA[1,2], Tetsuhiro OGAWA[1,2] ([1]UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

【背景・目的】
微生物は、環境変化に応答してバイオフィルムと呼ばれる集合体を形成する。バイオフィルムは、配管の詰まりや医療機器の汚染等、様々な問題を引き起こす。そこで、バイオフィルムの予防・排除を目的とし、この分子機構の解明が試みられている。
最近、大腸菌のバイオフィルム形成が、普遍的リボヌクレアーゼである RNase T2（大腸菌では RNase I と呼ばれる）により制御されることが報告された。ここでは、RNase I による宿主 RNA の分解産物が、バイオフィルム形成を抑制する新規セカンドメッセンジャーとして機能することが示された。バイオフィルム形成を促進するためには、RNase I の活性が阻害される必要があると考えられるが、その分子機構は明らかにされていない。
RNase I の活性は、宿主リボソームにより阻害されることが以前から知られていた。我々は、リボソームの動態変化が RNase I の活性を調節すると仮定し、これの実証を試みた。

【方法・結果】
大腸菌は、アミノ酸飢餓等によりバイオフィルム形成が誘導されるが、同時にリボソームが構造変化を伴い不活性化する。この不活性化リボソームが RNase I の活性を阻害することを考えた。そこで、不活性化リボソームを細胞内に蓄積する複数の変異株を作製し、アミノ酸飢餓条件下で培養することで、バイオフィルム形成を誘導した。その結果、全ての破壊株で、野生株と比較してバイオフィルム形成能が有意に上昇した。このことから、この構造変化した不活性化リボソームが、RNase I の阻害因子として機能することが示唆された。
また、RNase I の不活性化により、バイオフィルム形成にかかわるカーリー線毛の合成が亢進することが示唆されていた。そこで、RNase I 欠損株（Δ*rna* 株）において、カーリー線毛合成遺伝子（*csgA*）を破壊し、この株（Δ*rna*Δ*csgA* 株）におけるバイオフィルム形成能を調べた。その結果、Δ*rna* 株よりもバイオフィルム形成能が低下したが、Δ*csgA* 株よりは高かった。このことから、RNase I を介したバイオフィルム形成にはカーリー線毛が関与することが分かったが、同時に、他にも介在する経路が存在することが示唆された。

biofilm, ribonuclease, ribosome

発表責任者：小川　哲弘（atetsu@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3A17p03
講演日時：3 月 27 日 14:12～ センター2 号館 A17 会場

種横断的な活性パースルフィド産生経路とその生理的意義の解明

Biosynthesis and physiological functions of reactive cysteine persulfides

○西村 明[1]、赤池 孝章[2]、高木 博史[1] ([1]奈良先端・バイオ、[2]東北大・医)
○Akira NISHIMURA[1], Takaaki Akaike[2], Hiroshi Takagi[1] ([1]Grad. Sch. Sci. Tech., NAIST, [2]Tohoku Univ. Sch. Med.)

【背景と目的】
我々はシステインパースルフィド（CysSSH）をはじめとした「活性パースルフィド」が生体内で多量に存在し、強力な抗酸化活性や親電子シグナル制御機能を発揮していることを報告してきた。最近、ポリスルフィド化タンパク質の合成機構を解析する過程で、翻訳関連酵素の 1 つである cysteinyl-tRNA synthetase（CARS）がシステインからピリドキサールリン酸（PLP）依存的に CysSSH を合成し（cysteine persulfide synthase: CPERS）、その合成経路は種横断的に保存されていることを見出した。しかしながら、活性パースルフィドの生理機能については未だ不明な点が多い。本研究では、真核生物のモデルとして酵母 *Saccharomyces cerevisiae*（*S. cerevisiae*）を用いて CysSSH の生理機能について解析を行った。
【方法と結果】
まず、酵母の CARS ホモログである Crs1 の組換えタンパク質を調製し、解析を行った結果、哺乳類のものと同程度の CPERS 活性が確認できた。続いて、CRISPR/Cas9 システムを用いて、*S. cerevisiae* の Crs1 にアミノ酸置換（PLP 結合部位のリジンをアラニンに置換）を導入し、細胞内の CysSSH 含量が低下した変異株を作製した。この株の表現型を解析したところ、小胞体ストレス応答の異常とともに、経時寿命が顕著に減少していることが示された。また、低下した経時寿命は活性パースルフィドドナーの添加によりほぼ完全に回復することも明らかになった。さらに、*S. cerevisiae* の野生株に活性パースルフィドドナーを添加することで、経時寿命の延長が認められた。これらの結果から、CARS によって産生される CysSSH は内因性の寿命制御因子である可能性が考えられた。今後、CysSSH による経時寿命の制御機構を解明することで、ヒトの抗老化戦略の構築に資するだけでなく、エネルギー代謝異常が関わる各種疾患（ミトコンドリア病、生活習慣病、がん等）の発症機構に対する理解と予防・治療法の開発に大きく寄与することが期待される。

ER stress, reactive persulfide, aging

発表責任者：西村　明（nishimura@bs.naist.jp）

講演番号：3A17p04
講演日時：3 月 27 日 14:23～ センター2 号館 A17 会場

Aspergillus fumigatus のファルネソール応答機構における一酸化窒素の機能解析
Functional analysis of nitric oxide on the cellular response to farnesol in *Aspergillus fumigatus*
○老木 紗予子[1]、二宮 章洋[1]、浦山 俊一[1,2]、萩原 大祐[1,2]（[1]筑波大・生命環境、[2]筑波大・MiCS）
○Sayoko OIKI[1], Akihiro NINOMIYA[1], Syun-ichi URAYAMA[1,2], Daisuke HAGIWARA[1,2] ([1]Fuc. of Life and Env., Univ. of Tsukuba, [2]MiCS, Univ. of Tsukuba）

【背景と目的】一酸化窒素（NO）は哺乳類、植物、細菌など多様な生物の生体内で生成され、シグナル分子として機能する。酵母では、NO が細胞のストレス耐性と細胞死という相反する作用を誘導すること（機能二面性）が明らかになっているが、糸状菌における NO の生理機能はほとんど分かっていない。最近、植物の精油成分であるチモール（Thymol）が *Aspergillus flavus* の胞子において NO 産生と細胞死を引き起こすことが報告された。また、我々は酵母と同様に高温や過酸化水素などの酸化ストレスによって *Aspergillus fumigatus* が NO を産生することをすでに見出している。そこで本研究では、*A. fumigatus* の NO 産生を誘導する抗菌物質を探索し、その応答分子機構ならびに NO の生理機能を明らかにすることを目的とした。中でも、植物精油成分の一つであり、植物だけでなく一部の細菌や真菌によっても分泌されるファルネソール（Farnesol）に着目して解析を進めた。
【方法と結果】NO を検出する蛍光プローブ（DAF-FM DA）を用いて、様々な抗菌物質存在下で *A. fumigatus* 菌糸の細胞内 NO 産生を定量的に測定した結果、抗真菌薬（ボリコナゾールやアムホテリシン B など）は NO 産生を誘導しなかったが、精油成分（チモール、ファルネソール、シトラール、およびネロール）はいずれも NO 産生を誘導した。ファルネソールは糸状菌のアポトーシス様の応答を誘導することが知られており、0.12 mM の濃度で *A. fumigatus* の生育を阻害した。そこで、アポトーシスを誘導するとされる活性酸素種（ROS）と NO の関係を調べるため、ファルネソール存在下で NO および ROS 産生レベルを定量した。その結果、生育阻害濃度のファルネソールによって NO および ROS 産生レベルが上昇した。一方、NO 消去剤の添加により ROS 産生が、ROS 消去剤の添加により NO 産生が抑制されたため、ファルネソールによって誘導される NO と ROS の産生には相関があることが示された。また、ファルネソールおよび NO 消去剤存在下で *A. fumigatus* の発芽率を測定した結果、ファルネソールによって引き起こされた発芽遅延が NO 消去剤によって回復したことから、発芽遅延には NO が関与することが示唆された。さらに、ファルネソールを添加した *A. fumigatus* 培養上清抽出物を HPLC に供した結果、特異的なピークが検出されたため、ファルネソールは NO 産生を介して *A. fumigatus* の二次代謝を誘導することが示唆された。
【考察】*A. fumigatus* において、他生物が分泌するファルネソールによって誘導された NO 産生が ROS 産生と発芽遅延を引き起こす一方、二次代謝産物の生産にも関わることが示唆され、NO が *A. fumigatus* の細胞死や生物間相互作用に機能する可能性が考えられる。

Aspergillus, farnesol, nitric oxide

発表責任者：萩原大祐（hagiwara.daisuke.gb@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3A17p05
講演日時：3 月 27 日 14:34～ センター2 号館 A17 会場

好気性光合成細菌 *Rseobacter denitrificans* において LOV-HK はストレス耐性に寄与する
LOV-HK contributes to stress tolerance in *Roseobacter denitrificans*
○山本 麻衣子、亀谷 将史、石井 正治、新井 博之（東大院農生科・応生工）
○Maiko YAMAMOTO, Masafumi KAMEYA, Masaharu ISHII, Hiroyuki ARAI (Tokyo Univ.)

【背景・目的】*Roseobacter denitrificans* OCh114 株は紅色非硫黄細菌の一種で、好気条件で酸素非発生型光合成を行う。好気性光合成細菌は場所によっては海洋表層微生物の最優占種であることが明らかとなり、地球規模の物質循環において重要な微生物群であることが示唆されている。好気条件での光合成装置の発現は活性酸素種の発生の可能性があり、好気性光合成細菌の酸化ストレス耐性は環境中での優占化に重要であると考えられる。青色光応答性の Light, Oxygen, Voltage (LOV)ドメインをもつヒスチジンキナーゼである LOV-HK はいくつかのアルファプロテオバクテリアの菌で general stress response の制御に関わり、*LOV-HK* を破壊すると酸化ストレス耐性や浸透圧耐性が変化すると報告がある [1,2]。OCh114 株のゲノムには 1 つの *LOV-HK* 遺伝子が存在し、異種発現した LOV-HK は典型的な LOV タンパク質と同様の光応答性を示し、光合成関連遺伝子の制御に関わることを報告したが [3]、ストレス耐性との関わりについては不明であった。そこで、本菌において LOV-HK がストレス耐性と関わりがあるのかを明らかにするために、野生株と *ΔLOV-HK* 株において H_2O_2 添加及び高エネルギーの青色光の照射が生育に与える影響を調べた。
【方法】野生株および Δ*LOV-HK* 株を暗条件で OD600 が 2～2.5（対数増殖期）になるまで培養した後、培養液を 10^{-6} まで段階的に希釈し、寒天培地に 5 µl ずつ植菌した。コントロールでは何も添加していない寒天培地を暗条件で培養した。H_2O_2 添加条件では、H_2O_2 を寒天培地に 250 µM 添加し、暗条件で培養した。青色光条件では、青色光を常に照射しながら培養した。また、青色光以外の光として近赤外光照射条件でも培養した。全て 7 日培養した後、プレートを観察した。
【結果】H_2O_2 の影響：野生株ではコントロールと H_2O_2 添加条件で生育にほとんど差がみられなかったのに対して、Δ*LOV-HK* 株ではコントロールと比べ H_2O_2 添加条件で生存率の低下がみられた。
青色光の影響：コントロールと近赤外光条件では野生株とΔ*LOV-HK* 株で生育に違いは見られなかったが、青色光条件においてΔ*LOV-HK* 株の生存率は野生株より低く、LOV-HK があることで青色光照射下での生育が有利になることが示唆された。以上の結果より、本菌の LOV-HK は酸化ストレス耐性や青色光ストレス耐性に寄与していることが推測された。
1. Foreman, R. et al., J. Bacteriol., 194, 3038-3049 (2012)
2. Kim, H. S. et al., Mol. Microbiol., 94, 913-925 (2014)
3. 山本麻衣子ら 日本農芸化学 2018 年度大会 2A06p11

aerobic phototrophic bacteria, LOV, oxidative stress

講演番号：3A17p06
講演日時：3 月 27 日 14:45～ センター2 号館 A17 会場

分裂酵母の接合過程を亢進させる優性変異

A dominant mutation that enhances mating process in fission yeast

章 佳君、河野 真歩、深町 拓紀、松尾 安浩、○川向 誠（島根大生資）
Jiajun Zhang, Maho Kono, Takuki Fukamachi, Yasuhiro Matsuo, ○ Makoto Kawamukai (Shimane Univ. Life & Env. Sci)

分裂酵母は通常は一倍体細胞で安定であり、栄養豊富な条件下では体細胞分裂により増殖する。しかし、細胞外ストレスや栄養源（特に窒素源）の枯渇、接合フェロモンなどの細胞外因子に応答すると、接合・減数分裂・胞子形成からなる有性生殖過程へ移行する。

当研究室で解析している *sam* 変異体は栄養豊富な条件下でも接合・胞子形成を行う変異体である。*sam1,2,5,6,7,8* 変異は *pka1* の変異体であり(1)、*sam4* 変異は *rad24* の変異体であることを報告している(2)。これまでに *sam3* 変異株の原因遺伝子が不明であったことから、マッピングを行い、第 1 染色体上の変異であることを見出した。次いで、全ゲノム配列を決定し、*sam*3 変異株では *rad24* に *E185K* のミスセンス変異が生じていることを見出した。*rad24-E185K* 株を構築すると *sam3* 変異株と同様に接合過程への亢進がみられ、カルシウム感受性を示すなど同一の表現型を示した。*rad24-E185K* 変異体は、野生型あるいは *ras1* を欠損させた 2 倍体株において、胞子形成を誘導し、優性不能型の表現型を示した。

rad24 は 14-3-3 タンパク質をコードしているが、14-3-3 タンパク質は全ての真核生物で高度に保存されたタンパク質で、多くのリン酸化タンパク質と相互作用し、様々な機能分子を制御する。分裂酵母には 2 種類の 14-3-3 タンパク質である Rad24 と Rad25 がホモあるいはヘテロダイマーを形成し、有性生殖の制御に関与する(3)。Rad24 は、Mei2（RNA 結合タンパク質・減数分裂のマスター因子）、Ste11（有性生殖移行の制御に関与する転写活性化因子）、Byr2（フェロモン-MAPK 経路を構成する因子）、Chk1（DNA 損傷時に細胞周期を停止させるプロテインキナーゼ）などと相互作用することが知られている。*sam3* 変異がコードする Rad24(E185K)は、相互作用に重要な疎水性残基を含む溝の 185 番目のグルタミン酸がリジンに置換したことから標的タンパク質と結合できなくなり、その結果として有性生殖が亢進すると推定される。そこで、Rad24(E185K)と Chk1 の相互作用を免疫沈降法で検証したところ、野生型 Rad24 と同様の相互作用を有する結果となった。一方、Rad24(E185K)と Ste11 との相互作用では、野生型 Rad24 との結合に差が見られた。Rad24(E185K)と標的タンパク質の相互作用の差をさらに検証している。

(1) Dipali et al. Biosci. Biotechnol., Biochem. 2011
(2) Oowatari et al., Biosci. Biotechnol., Biochem. 2009
(3) Ozoe et al., Mol. Cell Biol. 2002

fission yeast, S. pombe, mating

発表責任者：川向　誠（kawamuka@life.shimane-u.ac.jp）

講演番号：3A17p07
講演日時：3 月 27 日 15:06～ センター2 号館 A17 会場

酵母のプロテオスタシスにおける高濃度エタノールへの適応応答

Induction of adaptive responses to severe ethanol stress in yeast proteostasis

○吉田 雅偲、加藤 沙枝、井澤 真吾（京工繊大・応生）
○Masashi Yoshida, Sae Kato, Shingo Izawa (Kyoto Inst. Technol.)

【目的】出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* が産生するエタノールは、高濃度になると酵母自身にとってもストレスとなり生育や代謝にダメージを与える。これまでに我々は、高濃度のエタノールストレス(10% v/v)が翻訳の抑制 [1]、異常なセプチンリングの形成 [2]、変性タンパク質の蓄積 [3]を誘導することを報告している。本研究では、高濃度エタノールストレスによる変性タンパク質の蓄積およびその処理について、酵母の適応応答能について検討を行った。

【方法】変性タンパク質の細胞内拡散を防ぎ deposition site 形成を促す aggregase として機能する Btn2 や Hsp42、変性タンパク質の脱凝集酵素(disaggregase)である Hsp104、変性タンパク質の分解酵素 Mca1、オートファジー関連因子などの単独および二重欠損株を実験に用いた。変性タンパク質として不溶性タンパク質およびユビキチン化されたタンパク質のレベルを SDS-PAGE と Western blotting で解析した。また、蛍光顕微鏡解析で deposition site の形成・消失を観察した。

【結果と考察】10%エタノールストレス処理によって酵母細胞内の不溶性タンパク質やユビキチン化されたタンパク質のレベルが増加したが、エタノールの除去によって変性タンパク質は速やかに減少した。一方、MG132 によってユビキチン–プロテアソーム系を阻害した細胞や *hsp104*Δ株や *btn2*Δ株では、エタノール除去後の変性タンパク質の減少に遅れが観察された。また、6%エタノールで 3 時間細胞を前処理することによって、10%エタノールによる変性タンパク質の蓄積が顕著に抑制されることを新たに見出した。このようなプロテオスタシスにおける適応応答は、比較的弱いエタノールストレスでの前処理によって酵母の変性タンパク質処理能力が向上し、続く高濃度エタノールストレス下で生じる変性タンパク質を効率的に処理できるようになったため起きたと考えられた。実際に、翻訳伸長阻害剤であるシクロヘキシミド存在下で前処理を行った場合や *hsp104*Δ 株では、十分な適応応答が誘導されなかった。現在、醸造過程のように徐々にエタノール濃度が上昇する場合でも同様の適応応答が誘導されるのかどうか検討している。

【参考文献】

(1) Yamauchi and Izawa (2016) *Front. Microbiol.*, **7**, 1319. (2) Homoto and Izawa (2018) *J. Cell Sci.*, **131**, jcs217091. (3) Kato *et al.* (2109) *FEMS Yeast Res.*, in press.

adaptation, proteostasis, ethanol stress

発表責任者：井澤　真吾（thioredoxin@kit.ac.jp）

講演番号：3A17p08
講演日時：3 月 27 日 15:17～ センター2 号館 A17 会場

絶対嫌気性菌 *Clostridium* 属細菌の O_2 適応機構に関する研究
Mechanisms of growth cessation of *Clostridium* strains in the presence of O_2.
○永塚 健司[1]、宇津 智晴[1]、菅谷 雄史[1]、平澤 克明[1]、佐藤 拓海[2]、新村 洋一[1,2]、川崎 信治[1,2] ([1]東農大バイオ、[2]東農大微生物)
○ Kenji NAGATSUKA[1], Tomoharu UTU[1], Yuusi SUGAYA[1], Katuaki HIRASAWA[1], Takumi SATOH[2], Youichi NIIMURA[1,2], Shinji KAWASAKI[1,2] ([1]TUA bio, [2]TUA microbiol)

【 目的 】

絶対嫌気性菌は発酵産業やプロバイオティクス等の健康分野で注目されている。しかしながら O_2 存在下で生育が阻害されるため大気環境での取り扱いが難しく、基礎研究や産業分野での応用の妨げとなっている。そこで当研究チームでは絶対嫌気性菌が O_2 存在下で生育が阻害される原因の解明を目的として研究を行っている。代表的な絶対嫌気性菌である *Clostridium. acetobutylicum* は、低濃度の気相 O_2 濃度下では全ての O_2 を消費した後に嫌気条件下とほぼ同様の生育を開始した。その後の諸酵素学的研究により *C. acetobutylicum* において O_2 存在下において発現誘導される複合酵素系が同定され、O_2 や活性酸素種を水へと還元無毒化することが明らかとなった。以上のことから同菌は① O_2 存在下において生存性を有し、②O_2 や活性酸素種による直接の毒性とは異なる要因によって生育停止することが示唆された。昨年度の農芸化学大会では O_2 存在下において生育を停止中の菌体に生存性が示唆されること、特異的に発現変化するタンパク質が生育停止中に観察されることなどを報告した。本学会では *Clostridium* 属細菌の O_2 や活性酸素種による生育停止機構の解明を目的として、*C. acetobutylicum* の近縁種を用いて O_2 下での生理挙動に関する比較解析を行ったので報告する。

【 方法・結果 】

C. acetobutylicum の近縁種でありアセトンブタノール発酵を行う *C. beijerinckii*、プロバイオティクスとして注目されている *C. butyricum* を比較解析を行う供試菌として選定した。O_2 及び O_2 の代謝産物である H_2O_2 に対する生育挙動を観察した結果、*C. acetobutylicum* と同様な生育停止と回復の挙動が観察された。生育停止中の分子応答について、*C. acetobutylicum* で O_2 及び H_2O_2 処理時に特異的に発現変化する２つのタンパク質に着目し免疫学的手法を用いた挙動観察を行った。その結果、類似する現象が観察されたことから、*Clostridium* 属の O_2 に対する生理応答の共通性が示唆された。

１）鈴木ら　2019 年度　農芸化学大会

Clostridium, oxidative stress, anaerobe

講演番号：3A17p09
講演日時：3 月 27 日 15:28～ センター2 号館 A17 会場

イネいもち病菌における推定カルシウムチャネル及びその構成因子の機能解析

Functional analysis of putative Ca^{2+} channel related factors in the rice blast fungus

○山内 優季、平岡 輪子、林 平、内田 百岳、荒添 貴之、鎌倉 高志（東理大理工）
○Yuki Yamauchi, Wako Hiraoka, Taira Hayashi, Momotaka Uchida, Takayuki Arazoe, Takashi Kamakura (Tokyo Univ. Sci.)

細胞内カルシウムシグナリングは Ca^{2+}をセカンドメッセンジャーとした一連のシグナル伝達機構であり、真核生物における様々な遺伝子発現や細胞応答を制御している。通常 100 nM 以下に保たれている細胞内 Ca^{2+}濃度が、環境変化や細胞外からの刺激に応じて劇的に上昇することが知られており、この Ca^{2+}のダイナミクスは小胞体やミトコンドリアなどの細胞内 Ca^{2}貯蔵小器官からの Ca^{2+}流入や、細胞外からの Ca^{2+}の取りこみにより制御される。イネに重要病害を引き起こすイネいもち病菌においても無性胞子である分生子形成や感染特異的器官である付着器の形成、イネへの病原性にカルシウムシグナリングが関与していることが示されているが（Rho et al., 2009)、細胞内 Ca^{2+}ダイナミクスの制御機構については明らかになっていない。本研究では、細胞外からの Ca^{2+}の取り込みへの関与が示唆される Ehs1 (Echinocandin hypersensitive 1) および Fig1 (Factor induced gene 1) に着目し、イネいもち病菌における機能解析を試みた。Ehs1 は出芽酵母の伸展活性化 Ca^{2+}チャネル構成因子 Mid1 のホモログであり、様々な条件下で細胞外 Ca^{2+}の取り込みに関与する HACS（high-affinity calcium uptake system）の主要因子であると考えられている。Fig1 は高カルシウム条件下でのみ細胞外 Ca^{2+}の取り込みに関与する LACS（low-affinity calcium uptake system）の主要因子であると考えられている。

まず、CRISPR/Cas9 system を用いてイネいもち病菌における *EHS1* と *FIG1* の単独破壊株および二重破壊株を作出し、様々な培地上での各菌株の生育検定を行った。その結果、Δ*ehs1* 株および Δ*ehs1*Δ*fig1* 株で生育が遅延する傾向がみられ、酢酸を単一炭素源とした最小培地においては全ての破壊株で有意な生育遅延が認められた。カルシウムキレート剤である EGTA を添加すると、Δ*ehs1* 株、Δ*ehs1*Δ*fig1* 株においてより顕著な生育遅延がみられ、糸先端部が蛇行した形態や厚膜胞子様構造が観察された。そこで、Ehs1 の細胞壁合成への関与を調べるために Congo Red を添加した培地上での生育検定を行った。その結果、Δ*ehs1* 株、Δ*ehs1*Δ*fig1* 株において有意な生育遅延が確認された。Δ*ehs1* 株においてはパラコートによる活性酸素ストレス処理においても同様の生育遅延が観察された。一方、Δ*ehs1* 株における付着器形成率の低下は認められなかった。ネオマイシンによる小胞体からの Ca^{2+}放出阻害を行ったところ、野生株および Δ*ehs1* 株の両株で顕著な付着器形成率の低下がみられたが、Δ*ehs1* 株においては $CaCl_2$ の添加による付着器形成率の回復はみられなかった。このような $CaCl_2$ 添加による付着器形成率の回復の欠如は活性酸素ストレス処理時においても同様に観察された。現在、各破壊株のより詳細な表現型を解析行っている。

Rice blast fungus, Calcium ion channel

講演番号：3A17p10
講演日時：3 月 27 日 15:39～ センター2 号館 A17 会場

酵母ユビキチンリガーゼ Rsp5 の C2 ドメインを介したエンドサイトーシス調節機構
Regulatory mechanism of endocytosis via the C2 domain of the yeast ubiquitin ligase Rsp5

○棚橋 亮弥[1]、ティラ シティ ヌル アフィア[1]、渡辺 大輔[2]、高木 博史[1] ([1]奈良先端大・バイオ、[2]京大院・農)
○Ryoya TANAHASHI[1], Tira Siti Nur Afiah[1], Daisuke WATANABE[2], Hiroshi TAKAGI[1] ([1]NAIST Biol., [2]Grad. Agr., Kyoto Univ.)

真核生物において、不要なまたは異常な細胞膜タンパク質はユビキチン化修飾を介したエンドサイトーシスによって分解・除去される。エンドサイトーシスは、細胞膜の陥入を制御する Rvs167 などの約 60 種ものエンドサイトーシス関連タンパク質によって厳密に制御された機構であるが、その詳細なメカニズムについては不明な点が多い。当研究室では、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて細胞外の窒素源に応答した細胞膜上のアミノ酸パーミアーゼ Gap1 のユビキチン化修飾とエンドサイトーシスについて研究を進めており、これまでに酵母の HECT 型ユビキチンリガーゼ Rsp5 が Gap1 のユビキチン化修飾に関わることを報告してきた。Gap1 のユビキチン化修飾を引き金としたエンドサイトーシスに Rsp5 分子内の各ドメインが協調的に機能することが重要であると考えられているものの、細胞膜との相互作用に関わる C2 ドメインのエンドサイトーシスにおける役割は未だ明らかになっていない。そこで本研究では、Gap1 のエンドサイトーシス制御における C2 ドメインの機能解析を行った。

まず、C2 ドメインの機能を解析するために、Rsp5 の C2 ドメイン欠失株を作製した結果、興味深いことに、Gap1 のユビキチン化修飾は引き起こされるにも関わらず、エンドサイトーシスは著しい欠損を示した。また、C2 ドメインにおいて細胞膜との結合に必要な Lys 残基を Gln に置換したところ、Gap1 のエンドサイトーシスに C2 ドメイン欠失と同程度の欠損が見られた。さらに、Rsp5 が C2 ドメインの機能を介してエンドサイトーシス関連タンパク質の制御に関与する可能性を検討した。その結果、C2 ドメインの欠失により Rvs167 との相互作用、および Rvs167 のユビキチン化レベルが低下した。以上の結果から、Rsp5 の C2 ドメインは、細胞膜との直接的な相互作用を介して、エンドサイトーシス関連タンパク質の一つである Rvs167 をユビキチン化修飾し、エンドサイトーシスを制御することが明らかになった。現在、Rvs167 のユビキチン化修飾がエンドサイトーシスに及ぼす影響について解析を進めている。また、C2 ドメイン欠失株の表現型解析を通して、C2 ドメインが酵母のエタノールストレス応答に関与することを示唆する結果も得られたので、併せて報告する。

Ubiquitin ligase, Ubiquitin, Endocytosis

講演番号：3A17p11
講演日時：3 月 27 日 15:50～ センター2 号館 A17 会場

栄養飢餓に誘導される出芽酵母リボソーム分解機構の解析
Studies on the mechanism of ribosome degradation during nutrient starvation in *Saccharomyces cerevisiae*

○西 晃平[1]、山田 陸翠[1]、赤川 博文[1]、陣内 凱[1]、島 日佳理[1]、日髙 真誠[1,2]、葛山 智久[1,2]、小川 哲弘[1,2] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]東大　微生物連携機構)
○Kohei NISHI[1], Rikusui YAMADA[1], Hirohumi AKAGAWA[1], Gai ZINNAI[1], Hikari SHIMA[1], Makoto HIDAKA[1,2], Tomohisa KUZUYAMA[1,2], Tetsuhiro OGAWA[1,2] ([1]Tokyo Univ., [2]CRIIM, UTokyo)

【背景・目的】
細胞は膨大な量のタンパク質で構成されるが、この合成には多大なエネルギーが消費される。そのため、増殖中の細胞ではタンパク合成が活性化するが、飢餓条件では逆に抑制され、エネルギーの浪費が防がれる。このように、細胞は環境に応じてタンパク合成能を調節する。真核細胞では、TOR 複合体が環境の栄養状態を感知する。栄養が枯渇すると、TOR 複合体を介して翻訳の開始段階および新規リボソーム合成が阻害される。また、リボソームがオートファジー依存的に分解されることが、近年の出芽酵母を用いた研究で示された。このうち、rRNA は普遍的リボヌクレアーゼ RNase T2 により分解される。RNase T2 は、ほぼ全ての生物に存在し、重要かつ多様な生命現象にかかわる。また、RNase T2 による rRNA 分解は、宿主酵母細胞の環境適応に必要であった。しかし、このリボソーム分解・環境適応の分子機構には不明な点が多い。そこで、本研究では、RNase T2 の機能に注目して解析することで、出芽酵母におけるリボソーム分解機構の全容解明を目指した。

【方法・結果】
真核生物では、RNase T2 はリソソーム/液胞に局在すると考えられている。また、シロイヌナズナでは、RNase T2 の C 末端領域が液胞局在にかかわること、RNase T2 の欠損が恒常的にオートファジーを活性化することが示された。そこで、まず出芽酵母 RNase T2（Rny1p）の rRNA 分解が、オートファジーの活性そのものに影響するかを調べた。リボソームタンパクと GFP との融合体（Rpl25p-GFP）を用いた GFP cleavage assay や ALP assay により、栄養飢餓条件における Rny1p 欠損株（*rny1*Δ 株）のオートファジー活性を測定した。その結果、いずれのアッセイにおいても、*rny1*Δ 株で野生株よりオートファジー活性が低下することが示された。次に、Rny1p の C 末端領域の機能について調べた。C 末端領域欠失型 Rny1p を発現する変異株は、ストレスへの適応能を失っていた。これが、Rny1p の局在性変化に由来するかを検討するために、現在、C 末端領域欠失型 Rny1p の局在性について解析を行っている。

ribosome, ribonuclease, stress response

発表責任者：小川哲弘（atetsu@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3A17p12
講演日時：3 月 27 日 16:01～ センター2 号館 A17 会場

プロファージ遺伝子よる微生物間コミュニケーションの活性化
Prophage gene stimulates cell-to-cell communication
○安田 まり奈[1]、森永 花菜[2]、尾花 望[3,5]、野村 暢彦[4,5]、豊福 雅典[4,5] ([1]筑波大院・生命環境科科学、[2]産総研・生物プロセス研究部門、[3]筑波大・医学医療系トランスボーダー医学研究センター、[4]筑波大・生命環境系、[5]筑波大・微生物サステイナビリティ研究センター)
○Marina YASUDA[1], Kana MORINAGA[2], Nozomu OBANA[3,5], Nobuhiko NOMURA[4,5], Masanori TOYOFUKU[4,5] ([1]Grad. Sch. of Life and Environ. Sci., Tsukuba Univ., [2]Bioproduction Research, AIST, [3]TRMC, Tsukuba Univ., [4]Fac. of Life and Environ. Sci., Tsukuba Univ., [5]MiCS, Tsukuba Univ)

細菌は細胞外に放出されたシグナル物質を認識することで、周囲の環境に応じた集団的な遺伝子発現制御を行う微生物間コミュニケーション機構を有する。多くのグラム陰性細菌はシグナル物質として *N*-acyl-homoserine lactone（AHL）を利用するが、その疎水性はアシル基の炭素鎖長により大きく異なる。近年我々は、グラム陰性細菌である *Paracoccus denitrificans* が、疎水性の高い AHL の一つである C_{16}-HSL を膜小胞 (MV) に内包させて細胞外に放出していることを報告した (Toyofuku *et al.*, 2017, *ISME journal*)。水中で拡散しづらい C_{16}-HSL は、MV に内包されることでその分散性が向上する。さらに、*P. denitrificans* の MV は本菌に優先的に付着するという興味深い性質を有する。つまり、C_{16}-HSL 伝達の鍵を握るのは MV 産生であり、その産生機構の解明は微生物間コミュニケーションの理解に繋がると考えられる。そこで、*P. denitrificans* の MV 産生機構を解明することを本研究の目的とした。

我々は先行研究において、*Bacillus subtilis* や *Pseudomonas aeruginosa* において集団中の一部で誘導される新奇 MV 産生機構を発見した（Toyofuku *et al.*, 2017, *Nat Commun.*, Turnbull *et al.*. 2016, *Nat Commun.*）。この機構は DNA ストレスによって誘導され、プロファージ領域に存在する溶菌遺伝子を必要とする。多くの細菌はそのゲノム上にプロファージ領域を有することから、溶菌遺伝子を介した MV 産生は細菌に広く共通した機構であることが考えられた。

そこで、*P. denitrificans* に DNA ストレスを与えたところ、MV 産生が大きく誘導され、培養上清中に MV とともに C_{16}-HSL が多量に放出されることが明らかとなった。ライブセルイメージングによって、集団中の一部の細胞が溶菌を介して MV を産生する様子が観察できた。さらに、DNA ストレス条件下で産生された MV に含有される DNA の全ゲノムシークエンスを行ったところ、MV にはプロファージ領域に由来する遺伝子が濃縮されており、その中には溶菌遺伝子が存在することが明らかとなった。その溶菌遺伝子の欠損株は、野生型で見られるような DNA ストレスに応じた MV 産生誘導能、上清中への多量の C_{16}-HSL 放出能を失った。以上より、本菌において溶菌遺伝子を介した MV 産生および C_{16}-HSL 放出機構が存在することが明らかとなった。

プロファージは細菌ゲノム上に存在する溶原ファージであり、環境変化に応じて発現し細胞溶菌を引き起こす。本研究により、溶原ファージが MV 産生を介して C_{16}-HSL 放出・伝達を制御する新たな微生物間コミュニケーションの様式が示唆された。

prophage, cell-to-cell coomunication, membrane vesicle

講演番号：3A17p13
講演日時：3 月 27 日 16:21～ センター2 号館 A17 会場

分裂酵母のアクチンと微小管の制御に関わる分子経路の解析
Analysis of actin- and microtubule- organization regulated by a molecular pathway in fission yeast

○辻 拓也[1]、久米 一規[2]、水沼 正樹[2] ([1]広島大工、[2]広島大院統合生命)
○Takuya TSUJI[1], Kazunori Kume[2], Masaki Mizunuma[2] ([1]Hiroshima Univ., [2]Hiroshima Graduate School of Integrated Life Sciences)

細胞固有の形を決定する重要な因子である細胞極性は、細胞形態のみならず、細胞の分裂、運動など細胞に方向性を与え、細胞の機能に重要な役割を担っている。私たちはこれまでに、分裂酵母の細胞極性異常変異体の解析から、細胞極性に重要な分子経路としてＭＯＲ経路（細胞形態形成ネットワーク/Ｍｏｒｐｈｏｇｅｎｓｉｓ Ｏｒｂ６ ｎｅｔｗｏｒｋ）を同定した。ＭＯＲ経路は進化上高度に保存され、出芽酵母でも細胞極性制御に、高等生物の線虫やハエでは神経突起形成に、ヒトでは腸上皮細胞の極性制御や分裂期のスピンドル形成に重要であることが報告されている。

分裂酵母のＭＯＲ経路は二つのキナーゼ（ＭＯＲ経路構成因子）を中心としたシグナル伝達経路であり、アクチンの細胞端への局在を制御し、細胞端の極性成長を促進する。ＭＯＲ経路変異体は全て生育に必須で、その変異体は高温感受性となり、アクチンが細胞全体に分散した球形の細胞形態異常を示す。さらに、ＭＯＲ経路変異体は微小管構造にも異常を示し、微小管重合阻害剤に感受性になることがわかってきた。つまり、ＭＯＲ経路はアクチンのみならず微小管とも機能関連することが示唆された。また最近のＭＯＲ経路の解析から、ＭＯＲ経路構成因子・Ｏｒｂ６キナーゼによる微小管形成因子のリン酸化が、細胞質微小管の本数制御に関わることが分かってきた。そこで本研究では、ＭＯＲ経路による微小管制御機構の全体像を明らかにするため、当該制御機構に関わる因子を探索した。具体的には、微小管形成因子のリン酸化に注目し、Ｏｒｂ６キナーゼの機能と逆の役割をもつホスファターゼを探索することにした。

探索方法としては、分裂酵母の非必須遺伝子破壊株ライブラリーに存在するホスファターゼ遺伝子破壊株（５８株）を用いて、ＭＯＲ経路変異体との二重変異体を構築し、ＭＯＲ経路変異体が示す微小管重合阻害剤の感受性に影響を与える株のスクリーニングを行った。その結果、ＭＯＲ経路変異体の微小管重合阻害剤の感受性を抑圧する二重変異体を複数選抜した。現在、選抜した二重変異体の微小管構造について観察を行っている。

Fission yeast, Microtubules, Phosphatase

講演番号：3A17p14
講演日時：3 月 27 日 16:32～ センター2 号館 A17 会場

酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* と *Komagataeibacter medellinensis* における共通の耐熱化機構の解析

Analysis of general thermotolerant mechanism among *Acetobacter pasteurianus* and *Komagataeibacter medellinensis*

○松本 奈実[1]、水町 優希[1]、松谷 峰之介[1,2]、片岡 尚也[1,3,4]、藥師 寿治[1,3,4]、松下 一信[1,3,4] ([1]山口大院創成科学、[2]東農大ゲノム解析セ、[3]山口大農、[4]山口大中高温微セ)
○Nami MATSUMOTO[1], Yuki MIZUMACHI[1], Minenosuke MATSUTANI[1,2], Naoya KATAOKA[1,3,4], Toshiharu YAKUSHI[1,3,4], Kazunobu MATSUSHITA[1,3,4] ([1]Grad. Sch. Yamaguchi Univ., [2]Tokyo Univ. Agric, [3]Fac. Agr. Yamaguchi Univ., [4]RCTMR Yamaguchi Univ.)

【背景・目的】耐熱性微生物を用いた高温発酵技術は、低コストで安定な発酵技術として期待され、耐熱化微生物の取得および耐熱化機構の解明が望まれている。私たちは、酢酸菌を用いた実験室進化育種による耐熱化株の取得とともに、その耐熱化機構の解明に取り組んでいる[1]。*Komagataeibacter medellinensis* NBRC 3288 の耐熱化株 ITO－１では、変異遺伝子のひとつ *spoT* の C 末端側にある機能制御領域の 424-bp が欠失しており、親株の *spoT* 遺伝子の C 末端全領域を欠失させると耐熱性が向上したため、*spoT* 遺伝子変異が耐熱性に寄与していることが明らかとなった[2]。SpoT はセカンドメッセンジャーpp(p)Gpp の合成と分解に関与しており、その変異は細胞分裂やアミノ酸生合成などに変化をもたらすと考えられる。この *spoT* 変異株では、ITO－１株と同様に高温下で特徴的に観察される細胞伸長が親株に比べて顕著に抑えられる[2]。一方、*Acetobacter pasteurianus* SKU1108 から取得された耐熱化株 TH-3 には 11 ヶ所の変異が見出され[3]、アミノ酸輸送体、ジカルボン酸輸送体とウリジリル転移酵素遺伝子の変異が耐熱性に寄与することが明らかとなっている[4]。これらの酵素はアミノ酸代謝に関与していることから、細胞内アミノ酸含量を測定した結果、TH-3 株では特定のアミノ酸濃度が上昇しおり、アミノ酸代謝と耐熱性との関連が示唆された[5]。このように、TH-3, ITO-1 両株の耐熱化は異なる遺伝子変異に基づくことが示されている。そこで、本研究では、酢酸菌の耐熱化機構を解明するため、ITO-1 株の *spoT* 遺伝子変異と同様の変異を *A. pasteurianus* SKU1108 株に導入した株を構築し、その耐熱性試験および生理学的解析を行った。
【方法・結果】*A. pasteurianus* SKU1108 株の *spoT* 遺伝子を ITO-1 株の変異に相当する C 末端領域を欠失した変異株を構築した。フラスコ培養にて酢酸発酵能を比較した結果、*spoT* 変異株は 30˚C での発酵能は親株と同様であるが、高温での発酵能が向上していることが明らかとなった。また、非発酵条件(0.5% YPGD 培地)と発酵条件(0.5% YPGD + 4% エタノール)の寒天培地による比較培養では、非発酵条件下でも耐熱性の向上が確認された。これらの結果から、*spoT* 遺伝子の制御領域の変異は酢酸菌に共通して耐熱化を誘起することが示唆された。現在、細胞長の測定・アミノ酸含量等の解析を進めており、これらの解析と合わせて、酢酸菌に共通の耐熱化機構について考察する。

本研究は JST-ALCA 事業（JPMJAL1106）の一環として行われた。
[1] Matsushita K et al., Biosci Biotechnol Biochem, 80, 655 (2016), [2] 水町ら、第 71 回生物工学会(岡山大, 2019), [3] Matsutani M et al., J Biotechnol, 165, 109 (2013), [4] 谷本ら、農化 2015 年度大会(2A21p13), [5] 上利ら、農化 2019 年度大会(3C1p15)

acetic acid bacteria, adaptation, thermotolerance

講演番号：3A17p15
講演日時：3 月 27 日 16:43～ センター2 号館 A17 会場

Saccharomyces cerevisiae の膜結合型ムチン Hkr1p の C 末端領域は HM-1 キラートキシン耐性獲得と出芽方向性を制御する
The C-terminal domain of the signaling mucin Hkr1p controls resistance to HM-1 killer toxin and budding patterns in *Saccharomyces cerevisiae*.
○今藤 俊宏、鈴木 宇香、笠原 紳（宮城大学食産業学部）
○Toshihiro KONDO, Ukyo SUZUKI, Shin KASAHARA (Miyagi Univ.)

【背景・目的】*Saccharomyces cerevisiae* の膜結合型ムチン Hkr1p は 1,802 アミノ酸から成る巨大な糖タンパク質で，その遺伝子である *HKR1* を多コピープラスミドに導入して過剰発現させることで *Hansenula mrakii*（*Lindnera mrakii*）が産生する HM-1 キラートキシンに対して抵抗性を示すようになる。また，Hkr1p は高浸透圧環境への適応時に機能する HOG MAP キナーゼ経路の最上流に位置するセンサータンパク質であることも知られている。Hkr1p は，同じく *S. cerevisiae* の膜結合型ムチンである Msb2p と構造的に酷似しており，特に Msb2p の C 末端領域がプロテアーゼによる切断で膜から遊離して細胞内で特定の機能を発揮するとされることから，Hkr1p も同様の挙動を示すことが考えられる。本研究では，Hkr1p の C 末端領域の部分発現が HM-1 耐性や細胞形態，出芽方向性に及ぼす影響について調べ，またその領域が担う細胞生理学的な役割を明らかにすることを目的とした。

【実験】本研究では，まず *HKR1* の 3'末端側（Hkr1p の C 末端領域）の部分配列を *GAL1* プロモーター下で誘導的に部分発現させて HM-1 抵抗性を評価した。異なる長さの領域を発現させるため，*MSB2* とのホモロジー領域（HMH 領域）とその 3'末端側を含むΔ1，HMH 領域以降を段階的に欠損させたΔ2，Δ3，Δ4 を作製し，またΔ1 とΔ4 の逆ストランドを発現させるためにΔ1^{Rv}，Δ4^{Rv} を作製して，各々について HM-1 耐性や細胞形態への影響を評価した。さらに，各々を生育限界濃度の HM-1 存在下で液体培養し，細胞壁上の出芽痕を Calcofluor white で染色して出芽方向を観察した。

【結果・考察】*HKR1* の 3'末端側部分配列を発現させた形質転換体は，Δ1 のみが強い HM-1 耐性を示した。*HKR1* 欠損株（Δ*hkr1* 株）と今回用いた各形質転換体は，いずれも出芽パターンが顕著な影響を受けていた。さらに，対照株（野生株）に HM-1 を作用させても出芽パターンが乱れることが観察された。これらから，Hkr1p の C 末端領域は出芽方向性の制御において重要な役割を担っていること，また HM-1 が出芽方向性の制御を撹乱していることが示された。Hkr1p の C 末端領域には EF ハンドやロイシンジッパーのモチーフが認められることから，Msb2p や高等動物の膜結合型ムチン MUC1 などと同様に，C 末端領域がプロセッシングを受けて細胞質や核に移行して，上記事象に関連する遺伝子の発現を制御していることが考えられた。

yeast, killer toxin, signaling mucin

発表責任者：笠原紳（kasahara@myu.ac.jp）

講演番号：3A17p16
講演日時：3 月 27 日 16:54～ センター2 号館 A17 会場

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* LB600 の EPS 合成遺伝子群の機能解析
Functional analysis for eps cluster of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB600
○工藤 大夢、鈴木 駿吾、関口 里奈、佐々木 泰子 (明治大・農)
○Hiromu KUDO, Syungo SUZUKI, Rina SEKIGUCHI, Yasuko SASAKI (Meiji Univ,)

＜背景と目的＞

ヨーグルトは 2 種の乳酸菌 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*（以下 *L. bulgaricus*）と *Streptococcus thermophilus*（以下 *S. thermophilus*）の共生によって生産され、両菌が産生する細胞外多糖（Exopolysaccharide; EPS）はヨーグルトの風味や物性にとって重要な因子である。また乳酸菌の産生する EPS は生体に取り込まれると、宿主に様々な生理活性作用(プロバイオティクス効果)をもたらすことも報告されている。しかし乳酸菌体にとって EPS がどのような役割を持っているのか、その詳細は明らかになっていない部分も多い。

L. bulgaricus は世界中で発酵乳の生産に用いられている一方で、遺伝子操作が困難なことから、乳酸菌の中でも基礎的な研究があまり進んでいない。当研究室では、接合伝達プラスミドを用いた接合を利用した染色体遺伝子操作によって、*L. bulgaricus* の遺伝子欠損株を作製し、様々な遺伝子の機能解析を進めている。本研究では上記の遺伝子操作法を用いることで、十数種の遺伝子から構成される EPS 合成クラスターの機能解明を試みた。

＜結果および考察＞

当研究室が保有する中で最も EPS の生産が見られた“LB600 株（以下 WT)” を対象に、本菌株が持つ EPS 合成クラスター内の“EPS 合成制御に関わる酵素；EpsC”と“糖転移酵素；EpsF”について欠損株を作製、それぞれ“Δ*epsC*”、“Δ*epsF*”とした。WT、Δ*epsC*、Δ*epsF*をスキムミルク培地で培養し生育検討を行ったところ、Δ*epsF*は WT と同様に約 5 時間で発酵終点に到達した一方で、Δ*epsC* では約 5 時間 45 分を要して、生育遅延が観察された。また培地中の EPS を抽出し HPLC で測定した結果、Δ*epsF*では WT の約 1/5 量、Δ*epsC*株では検出限界以下であった。これらの結果をもとに、培地中の EPS 濃度や EPS の生産の有無が菌体に与える影響を明らかにするために“凍結融解”、“低温生残性”へのストレス試験を行ったところ、Δ*epsF* は WT と同程度のストレス耐性を示したのに対し、EPS 非生産株であるΔ*epsC*は WT と比較して凍結融解への耐性が約 10 倍、低温生残性は最大で約 100 倍に向上していた。

EpsC は他菌種において EPS の生産のほか、菌体の分裂などの細胞活動にも関わることが報告されている。したがってΔ*epsC*のストレス耐性向上は EPS の欠損による影響ではなく、細胞分裂速度が遅延したことによるものと推測した。これを裏付けるための今後の検討が必要と考えられた。

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus*, exopolysaccharide, deficient mutant

発表責任者：工藤 大夢（knoelh1225@gmail.com）

講演番号：3A17p17
講演日時：3 月 27 日 17:05～ センター2 号館 A17 会場

Study on a novel protein FipA as a possible scaffold for Fus3 MAPK cascade in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*

○ Yue CHEN[1], Takuya KATAYAMA[1,2], Ozgur BAYRAM[3], Gerhard H. BRAUS[4], Katsuhiko KITAMOTO[5], Jun-ichi MARUYAMA[1,2] ([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Dept. of Biol., Maynooth Univ., [4]Dept. of Mol. Microbiol. Genet., Georg-August-University Goettingen, [5]Nihon Pharmaceutical Univ.)

[Background]

Scaffold protein facilitates phosphorylation in mitogen activated protein kinase (MAPK) cascade. In yeast, Ste5 functions as a scaffold protein for the Fus3 MAPK cascade regulating pheromone response. In filamentous fungi, Fus3 orthologs are required for cell fusion, asexual formation of sclerotia and sexual development, and HAM-5 is regarded as the scaffold protein instead of Ste5. In our previous comparative functional analysis of HAM-5 ortholog (AoHam5) and Fus3 MAPK cascade components (AoSte11, AoSte7 and AoFus3) in *Aspergillus oryzae*, abilities of sclerotia formation and cell fusion were retained in *Aoham5* deletion strain but completely lost in those of *Aoste11*, *Aoste7* and *Aofus3,* raising the possible existence of another scaffold protein[1)]. As we previously identified FipA as an AoFus3-interacting protein by tandem affinity purification[2)], FipA is possibly another scaffold candidate. In this study, we aim to investigate the function of FipA as the scaffold for the Fus3 MAPK cascade.

[Results]

We constructed the deletion strain of *fipA* and performed phenotypic analysis of sclerotia formation. We also quantitatively measured its cell fusion efficiency by utilizing auxotrophic complementation[3)]. As a result, the *fipA* deletion strain completely lost abilities of sclerotia formation and cell fusion. These phenotypic defects are similar to those of *Aoste11*, *Aoste7* and *Aofus3* deletion strains, which supports the possibility that FipA functions as the scaffold protein.

For further investigation of FipA function as a scaffold protein, we developed a method to detect the AoFus3 phosphorylation level by western blotting analysis. Expectedly, in both *Aoste11* and *Aoste7* deletion strains, AoFus3 phosphorylation was hardly detected. We are analyzing the AoFus3 phosphorylation levels in *Aoham5* and *fipA* deletion strains. Moreover, we will investigate the direct interactions of FipA with the AoFus3 MAPK cascade components by conducting co-immunoprecipitation.

1) Chen *et al.*, Annual meeting of JSBBA (2019) 1C2a03
2) Katayama *et al.*, Annual meeting of JSBBA (2016) 2F049
3) Tsukasaki *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (2014) 78, 1254-1262

Aspergillus oryzae, development, MAPK cascade

発表責任者：丸山 潤一（amarujun@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3A17p18
講演日時：3 月 27 日 17:16～ センター2 号館 A17 会場

超好熱菌細胞内における大型ポリアミンの転写・翻訳への関与
Genes regulated by branched-chain polyamine in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*

○福田 青郎[1]、尾崎 守[1]、福田 萌子[1]、濱川 匡史[1]、家森 優佳[1]、秀瀬 涼太[2]、兼崎 友[3]、加藤 知[1]、藤原 伸介[1] ([1]関西学院大理工、[2]神戸大院科学技術イノベ、[3]静岡大グリーン研)
○ Wakao FUKUDA[1], Mamoru OSAKI[1], Moeko FUKUDA[1], Masafumi HAMAKAWA[1], Yuka YAMORI[1], Ryota HIDESE[2], Yu KANESAKI[3], Satoru KATO[1], Shinsuke FUJIWARA[1] ([1]Kwansei-Gakuin Univ., [2]Kobe Univ., [3]Shizuoka Univ.)

【目的】ポリアミンはアミノ基を複数含む脂肪族炭化水素であり、あらゆる生物が有する生理活性物質である。特に超好熱菌は、長鎖型または分岐鎖型の、常温の生物が有するポリアミンよりも大型ポリアミンを生産する。この大型ポリアミンは強く正に帯電しているため、核酸の構造変化を引き起こし、特定の遺伝子・タンパク質の発現制御にも関わりうると予想されている。そこで本研究では、分岐鎖ポリアミン[3(3)(3)4]を生産する超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* を対象として、大型ポリアミンの超好熱菌細胞内における転写・翻訳への寄与を明らかにすることを目的とし研究を行った。
【実験】分岐鎖ポリアミンを合成可能な *T. kodakarensis* KU216 株と分岐鎖ポリアミンを合成できない DBP1 株の生育を比較すると、DBP1 株は 93 ℃では生育できず、90 ℃で生育遅延を起こす。KU216 株の至適生育温度である 85 ℃では、DBP1 株は若干の生育遅延を示すものの、KU216 株との生育の差は小さくなる。そこでまず栄養培地にて培養した KU216 株と DBP1 株細胞を得た。これらの無細胞抽出液に含まれるタンパク質や RNA について、トランスクリプトーム解析やプロテオーム解析を行った。いくつかの遺伝子に関しては、RT-qPCR やウエスタンブロット解析等により、得られた結果の妥当性を確認した。
【結果】90 ℃で培養した菌体を解析した結果、DBP1 株細胞内では、400 種以上の遺伝子転写産物量が 2 倍以上に増加していた。また KU216 株または DBP1 株からのみ検出されたタンパク質は合計で 150 種類を超えた。検出された転写産物量やタンパク質の種類には多くの差異が見られたことから、その発現が分岐鎖ポリアミンの有無に影響を受けることがわかった。特に興味深いことに転写産物量の増減とタンパク質の検出は一致しないものが多く、様々な段階でポリアミンの影響を受けることが明らかになった。
一方 DBP1 株細胞内では各種 tRNA 量の減少が確認された。分岐鎖ポリアミンが高温環境における tRNA の安定化に関与するためだと考えられる。またコドン使用頻度の高い tRNA ほど減少が顕著であり、分岐鎖ポリアミンの欠損が DBP1 株自体のタンパク質生産能力の低下を引き起こすと予想された。
以上のように分岐鎖ポリアミンは、超好熱菌の様々な転写・翻訳両方に関わることがわかった。

Polyamine, Hyperthermophile, Transcriptome

発表責任者：福田青郎（wfukuda@kwansei.ac.jp）

講演番号：3A18a01
講演日時：3 月 27 日 09:30～ センター2 号館 A18 会場

THE EFFECT OF CARBON SOURCE ON THE OXIDATIVE STRESS INDUCED IN HEATED *ESCHERICHIA COLI* CELLS

○Khanh Vo[1], Akihiro Wada[1], Ryoko Asada[1,2], Jin Sakamoto[2], Tetsuaki Tsuchido[2], Masakazu Furuta[1,2] ([1]Dept. Quantum and Radiation, Grad. Engineering, Osaka Prefecture Univ., [2]Research Center of Microorganism Control, Organization of Research Promotion, Osaka Prefecture Univ.)

Background. Microbial contamination posed severe threats in many aspects, especially in the food industry, it is necessary to know the efficiency of food preservation treatments under various conditions. In our previous studies, the utilization of different media resulted in a change in heat sensitivity in *E. coli*. Along with this phenomenon, we proposed the involvement of oxidative stress (secondary stress) causing lethal action as a result of the impact of heat treatment (primary stress) [1, 2]. Using strains expressing fluorescence proteins for detecting reactive oxygen species (ROS), we observed the difference in the accumulation of hydrogen peroxide (H_2O_2) and changes in intracellular oxidation potential with two different media, L-broth and EM9 [2]. We assumed that the level of cell metabolism, especially in the catabolic pathway, possibly is involved in the difference. So, in this study, we examined the effect of several carbon sources in *E. coli* cells with thermal treatment by predicting the effects on the formation of ROS and oxidation-reduction potential (ORP). This approach may contribute to the understanding of the thermal injury in bacterial cells and for the conditioning of the pasteurization process in the food manufacturing and agricultural industry.

Materials and methods. *Escherichia coli* OW6 were grown in L-broth or EM9-glycerol medium. The *E. coli* strains having ROS and oxidation sensing fluorescent protein genes, such as Hyper [3] and Odd-dye [4], were induced with L-arabinose and grown with different glucose concentrations. The cells were heated at 50^0C in potassium phosphate buffer (KPB) or phosphate buffer saline (PBS), and those heat sensitivities were evaluated by fluorescence intensity (FI) measurement of the above oxidative probes.

Results. The carbon source seemed to act as an important factor in the heat sensitivity of *E. coli* cells, especially in minimal medium. We found that the heat resistance was reduced sharply when shifted from glucose to glycerol in EM9 medium and increased marginally in LB-glucose compared with LB alone. We compared the FI behaviors of the oxidation and ROS indicator proteins in heated cells with different concentrations of glucose in L-broth and EM9 medium. As a result, *E. coli* cells in EM9 medium have greater resistance to heat but the intracellular environment shows more oxidized than those grown in LB. Cultivation with glucose made cells less oxidized than in EM9 with glycerol, but no such effect was observed in LB medium. These results suggest that the carbon source in growth medium affects the heat sensitivity of *E. coli* cells by changing the intracellular oxidation-reduction environment.

References. 1) Wada, A. *et al. Abstr. Ann. Meet. of Jpn. Soc. Food Microbiol* (2018). **2)** Khanh, C. V., *et al. Abstr. Ann. Meet. of Soc. Antibacterial and Antifungal Agents, Jpn*. (2019). **3)** Belousov, V. V., *et al. Nat methods, 3*(4), 281 (2006). **4)** Sakamoto, J., *et al. Abstr. Ann. Meet. of Jpn. Soc. Biotech* (2017).

oxidative stress, thermal treatment, *Escherichia coli*

講演番号：3A18a02
講演日時：3 月 27 日 09:41～ センター2 号館 A18 会場

加熱処理芽胞の発育動態解析に基づく包括損傷評価

Comprehensive evaluation of overall injury based on growth dynamics analysis of heat-treated Bacillus subtilis spores

○朝田 良子[1,2]、傳 大輝[1]、坂元 仁[2]、土戸 哲明[2]、古田 雅一[1,2]([1]大阪府大・院・工、[2]大阪府大・研究推進機構・微制研セ)
○Ryoko ASADA[1,2], Hiroki DEN[1], Jin SAKAMOTO[2], Tetsuaki TSUTIDO[2], Masakazu FURUTA[1,2]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Pref. Univ., [2]RCMC, Osaka Pref. Univ.)

〔背景および目的〕食品や医薬、工場ラインなど様々な場で適用される加熱殺菌処理において抵抗性の細菌芽胞が生残する可能性があり、問題視される。その細菌芽胞の耐性化要因の 1 つとして、コア内の DNA がタンパク質により保護されており、さらに加熱処理後の発芽後成長・再増殖時に働くシステムとして、DNA 修復タンパク質が複数存在する。加熱処理により生残した細菌芽胞は損傷し亜致死状態として存在しながら、保存・流通などの非ストレス下で時間とともに回復する。このような損傷菌（芽胞）の実態は未解明である。また、通常、細菌芽胞の殺滅指標には寒天平板を用いたコロニーカウント法（CFU 法）が用いられるが、細菌が受けた損傷には、生死以外にも増殖開始の遅延などの要因も含まれることから、健常菌および回復状態の菌と区別ができずに正確な損傷菌数が把握できていない可能性がある。本研究では加熱処理芽胞について、平板法による CFU の生存率と生育遅延解析法からの換算生存率との差分値[1)]を用いて、芽胞の発芽・発芽後成長・栄養増殖の各過程を包括した総体的損傷としての芽胞損傷を評価した。さらに DNA 保護作用を持つ低分子酸可溶性タンパク質構造遺伝子（*sspAsspB*）変異株と野生株との間で発生損傷菌数を比較することで、加熱処理での標的部位として従来からの胞子膜損傷に加えて DNA 損傷の可能性を検討した。
〔方法〕*Bacillus subtilis* 168 野生株（WT）およびその低分子酸可溶性タンパク質構造遺伝子を欠損させた変異株（*⊿sspA sspB*）をそれぞれ Schaeffer‘s sporulation medium 寒天培地で芽胞を調製した（-80℃保存）。未加熱、95℃の各処理時間で加熱処理した芽胞の 0.1%Tween 80 含有 50 mM リン酸カリウム緩衝液（ pH7.0 ）を用いた 10 倍希釈系列を調製し、マイクロプレートリーダーに植菌し、L 培地中 37℃培養での増殖（OD_{650}）計測からの生育遅延解析法とスポット法および CFU 法で生存性を評価した。〔結果と考察〕スポット法と生育遅延解析法により、枯草菌芽胞 WT と*⊿sspA sspB* 欠損株を用いて加熱処理での死滅の程度を比較した。95℃ 10 分、20 分処理において枯草菌芽胞 WT は 1 桁も死滅しなかったが、*⊿sspA sspB* 株では 10 分処理では 3 桁、20 分処理では 4 桁の死滅が確認できた。両株とも CFU 法と比較して、生育遅延解析法では低い換算生存率を示した。発芽および発芽後成長に関与する機能が傷害を受けたため、増殖開始の遅延時間が長くなったためと考えられる。通常の L 培地では発芽損傷を受けた芽胞の中には発芽不能となって死菌とみなされる危険性が示唆された。また、加熱処理芽胞において損傷菌の発生は WT 株の方が多く、WT では本来損傷に留まる芽胞が変異株では *sspA, ssp*B 欠損のために死菌に進行すると考えられる。このことにより損傷菌の発生における DNA 損傷の関与が明らかとなり、DNA の安定性が強く影響する可能性が示唆された。
引用文献　1)　Tsuchido T.　Biocontrol Sci. 22:131-135(2017)

spore, injury, heat sterilization

発表責任者：朝田良子（asada@riast.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：3A18a03
講演日時：3 月 27 日 09:52～ センター2 号館 A18 会場

ガンマ線照射芽胞の差分後培養法による包括損傷評価
Comprehensive evaluation of overall injury of irradiated *Bacillus subtilis* spores by the double subculture method

○傳 大輝[1]、朝田 良子[1,2]、坂元 仁[2]、土戸 哲明[2]、古田 雅一[1,2]([1]大阪府大院・工、[2]大阪府大・研究推進機構・微制研セ)
○ Hiroki DEN[1], Ryoko ASADA[1,2], Jin SAKAMOTO[2], Tetsuaki TSUCHIDO[2], Masakazu FURUTA[1,2] ([1]Grad. Osaka Prefe Univ., [2]RCMC, Osaka Prefe Univ.)

〔目的〕枯草菌に代表される *Bacillus* 属の細菌は生存環境や栄養状態が悪化すると芽胞と呼ばれる耐久型細胞に分化し、休眠状態となる。この芽胞は硬い層状の構造を持ち、ジピコリン酸(DPA)がコアに集積して脱水を起こす。DNA は酸可溶性低分子タンパク質で保護されていることが紫外線をはじめ物理的・化学的ストレスに抵抗性である要因と考えられており、食品や医療用具における殺滅菌処理において芽胞不活化が最重要課題である。わが国では医療用具等に放射線滅菌が実用化されているが、放射線による芽胞の致死標的とされる DNA の損傷や修復過程を調べることは滅菌機構の解明や他の滅菌方法との複合化など、殺滅菌法の高度化のための基盤的課題である。これまでの本研究室での検討結果から、芽胞のγ線の主な作用過程は発芽後の発育であることが示唆されていることから、DNA の保護因子と修復能の関与を調べることを目的に、それらの欠損株を用いて検討した。
〔方法〕*Bacillus.subtilis* 168 野生 (WT) 株及び Small acid-soluble spore protein (SASP)欠損株を用いた。芽胞のγ線照射は 0、1、2、3、4 kGy の吸収線量で行い、50 mM KPB で希釈して LB 寒天培地で 1 日培養後、生成コロニーを計数し、生残曲線を作成した。一方、発育遅延解析法では、96 穴ウェルプレートに LB 液体培地+0.1% Tween 80 を 180 µL 加えておき、それに芽胞試料液を 20 µL 加え、その後の 24 時間の OD_{650} の経時変化を自動計測した。これら平板法による CFU（コロニー生存率）値と発育遅延解析法による IV（換算生存率）値を基にした固液培地生存率差分法(DiVSaL 法)[1)に]によって損傷芽胞数を算出した。
〔結果・考察〕コロニーカウントによる生残率評価では WT 株と比較して *sspAsspB* 欠損株ではより感受性となる事が確認できた。次にマイクロプレートリーダーによる発育遅延解析でも WT 株に比べ *sspAsspB* 欠損株の発育遅延時間の延長が見られた。この遅延が芽胞の死滅によってのみもたらされたものかどうかを DiVSaL 法によって解析した所、WT 株に比べ *sspAsspB* 欠損株では生存菌の内の損傷菌の割合が増加した。このことから芽胞 DNA に結合し、DNA 骨格を保護する SASP はγ線耐性にも関与しているものと推察した。
現在、相同組換え欠損である *recA* 欠損株と、非相同末端結合欠損株である *ykoUV* 欠損株でも同様にγ線照射による損傷芽胞の発生動向を検討中であり、その結果も併せて報告する。
引用文献 1) Tsuchido, T., Biocontrol Sci., 22:131-135 (2017)

spore, injury, double subculture method

講演番号：3A18a04
講演日時：3 月 27 日 10:03～ センター2 号館 A18 会場

枯草菌胞子の加熱殺菌に発芽レセプターの損傷は関与するのか
Is damage of germination receptors involved in the thermal killing of *Bacillus subtilis* spores?
○坂元 仁[1]、朝田 良子[1,2,3]、古田 雅一[1,2,3]、土戸 哲明[1]（[1]大阪府立大微制研セ、[2]大阪府立大院工量子、[3]大阪府立大放研セ）
○Jin Sakamoto[1], Ryoko Asada[1,2,3], Masakazu Furuta[1,2,3], Tetsuaki Tsuchido[1]（[1]Microorganisms Control CRes. Osaka Pref. Univ., [2]Dept. Quantum, Grad. Sch. Eng., Osaka Pref. Univ., [3]Rad. CRes. Osaka Pref. Univ.）

【背景】枯草菌は飢餓条件下で胞子を形成して耐性化する。胞子の発芽の初期には L-Ala 発芽の GerA 系と、AGFK（L-Asn、グルコース、フルクトース、KCl）発芽の GerB 系と GerK 系の 2 タイプの発芽レセプターが関与し、最終段階では 2 種類の主要コルテックス分解酵素 CwlJ と SleB の作用により胞子特有の細胞壁であるコルテックスを分解して発芽後生長を経て栄養細胞となる。CwlJ および SleB、だけでなく SleL ホモログである YdhD および YaaH の 4 重欠損胞子を基盤とした発芽レセプターの組合せ欠損株の解析から、下流の分解反応に依存しない一定レベルの光学密度の低下やジピコリン酸の細胞外漏洩を検出し、これより発芽レセプターがこれらの機能を担っている可能性が示唆された[1)]。本発芽レセプターの機能評価システムで 4 時間までの発芽処理時の光学密度の低下を計測したところ、天然培地である L 培地中での発芽には L-Ala 発芽系と同様に GerA が関与していること、AGFK 系発芽では GerB 系と GerK 系の両ユニットが同時に存在する必要があった。その一方で、親株の胞子の加熱損傷時の生菌数計測において L 寒天培地よりも AGFK 含有 L 寒天培地で生存率が向上することから、発芽システムの損傷が示唆された[2)]。そこで発芽レセプター欠損株を用いてこの仮説の検証を試みた。〔方法と結果〕供試菌として枯草菌 168 株を親株と発芽レセプター遺伝子の *gerA* および *gerB gerK* 欠損株を用いた。胞子の調製は、Schaeffer 胞子形成培地にて 37℃で 1 週間培養後、集菌洗浄し、リゾチーム処理により栄養細胞を除去した調整胞子を用いた。未加熱条件下では *gerA* 欠損株および *gerB gerK* 欠損株とも AGFK 含有 L 培地において、親株と同レベルのコロニー形成数を示したが、*gerA* 欠損株のみ L 培地ではコロニー形成数が 1/5 ほど低下し、85℃での非致死的な加熱処理で、L 培地においても AGFK 含有培地と同レベルのコロニー形成数を示した。これは GerB GerK 構造体の加熱損傷による脱制御が、L 寒天培地での発芽を促したと考えられた。さらに、95℃での致死的な加熱処理においても *gerA* および *gerB gerK* 欠損株とも AGFK 含有培地での生存率の向上が観察された。これは溶液中での発芽処理での光学密度の低下現象とは相関しなかったが、厳密な発芽レセプター抑制機構の破壊による脱制御の可能性、または機能維持した発芽レセプターによる機能補完、さらにエネルギー代謝回路による蘇生向上の可能性が示唆されたのでここに報告する。

1）坂元ら 日本防菌防黴学会年次大会要旨集 98 頁（2017）
2）坂元ら 日本防菌防黴学会年次大会要旨集 98 頁（2018）

spore, *Bacillus subtilis*, germination

発表責任者：坂元 仁（sakamoto.jin@cs.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：3A18a05
講演日時：3 月 27 日 10:14～ センター2 号館 A18 会場

好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* の芽胞内で発現しているアラニン脱水素酵素の同定
Identification of alanine dehydrogenase expressed in spores of thermophile *Geobacillus kaustophilus*

○大森 勇門[1,2]、亀井 咲也香[1]、安達 泰志[2]、大島 敏久[1,2] ([1]大阪工大・工・生命工学、[2]大阪工大・院工・生命工学)
○Taketo Ohmori[1,2], Sayaka Kamei[1], Taishi Adachi[2], Toshihisa Ohshima[1,2] ([1]Dept. Biomed. Eng., Osaka Inst. Tech., [2]Grad. Sch. Appl. Chem. Environ. & Biomed. Eng., Osaka Inst. Tech.)

[目的] *Bacillus* 属細菌においてアラニン脱水素酵素(AlaDH)は芽胞形成時に重要な役割を示し、本酵素の欠損により芽胞が正常に形成できなくなることが報告されている。好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* は *Bacillus* 属細菌と同様に芽胞形成能を有する。我々はこれまでにゲノム情報より *G. kaustophilus* が二種類の AlaDH 推定遺伝子 *GK2752* と *GK3448* を持つことを見出し、両遺伝子を組換え大腸菌にて発現させたところ、どちらも AlaDH 活性を示すことを本学会で報告している。しかしながら、これら二種類の AlaDH が *G. kaustophilus* の生体内でどのように使い分けられているのか、その詳細は明らかになっていない。AlaDH の機能分担を明らかにすることは *Geobacillus* 属細菌の芽胞形成メカニズム、あるいは特有の生理機能の解明につながる。これまでに栄養増殖中の *G. kaustophilus* の菌体内では *GK3448* 由来の AlaDH のみが発現していることを見出している。本研究では芽胞を調製し、芽胞内で発現する AlaDH の同定を目的とした。
[方法]*G. kaustophilus* の芽胞は Difco 社の Nutrient Broth を基本とした芽胞形成用培地に植菌して培養することで調製した。集菌した芽胞をビーズショッカーで破砕して粗酵素液を調製し、硫安塩析、色素リガンドクロマトグラフィー(Reactive Red 120 Sepharose-CL6B)、調製用電気泳動を行うことで AlaDH を精製した。精製した AlaDH は大腸菌で発現させた組換え GK2752 および GK3448 酵素とともに SDS-PAGE あるいは Native-PAGE による活性染色を行いその泳動パターンを比較した。また芽胞由来精製 AlaDH の N 末端アミノ酸配列をプロテインシーケンサーにて解析した。
[結果]芽胞の破砕液より 60%飽和硫酸アンモニウムによる塩析、色素リガンドクロマトグラフィー、調製用電気泳動を行うことで高純度に AlaDH を精製した。GK2752 と GK3448 酵素の分子量は GK2752 が 39,369、GK3448 は 39,721 と近似しているが、SDS-PAGE や Native-PAGE での 2 種の酵素の泳動距離が明確に異なることを、我々は大腸菌で発現させた組換え酵素を用いた実験で既に見出している。そこで芽胞から精製した AlaDH と 2 種類の組換え AlaDH を SDS-PAGE と Native-PAGE で共泳動して分析した結果、芽胞内では GK2752 酵素のみが発現していることが明らかになった。これらの結果から、*G. kaustophilus* のゲノムに存在する 2 種類の AlaDH 遺伝子が栄養増殖と芽胞という異なる生育段階で役割分担していることが示唆された。二種の AlaDH 遺伝子のクラスター構造は大きく異なっており、今後は両酵素遺伝子や関連遺伝子の破壊株を調製し、栄養増殖、芽胞形成と発芽におけるそれぞれの機能及び発現調節機構などの解析を行うことで両酵素の詳細な生理機能を解明していきたい。

Geobacillus kaustophilus, spore, alanine dehydrogenase

発表責任者：大森勇門（taketo.omori@oit.ac.jp）

講演番号：3A18a06
講演日時：3 月 27 日 10:35～ センター2 号館 A18 会場

生大豆が納豆菌に応答して抗菌物質を生産・分泌する
Alive soybeans produce and secrete antimicrobials in response to *Bacillus subtilis* (natto)
○長瀬 鮎美、杉浦 春香、渡辺 大輔、橋本 渉（京大院農）
○Ayumi NAGASE, Haruka SUGIURA, Daisuke WATANABE, Wataru HASHIMOTO (Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【背景と目的】納豆は、納豆菌（*Bacillus subtilis* (natto)）の大豆への腐生作用により作られる日本の伝統的発酵食品である。納豆製造には、納豆菌が蒸し大豆上で良好な生育を示し、粘性物質である γ-ポリグルタミン酸を多量に生産する性質が利用されている。当研究室において、発芽能を有する生大豆上では蒸し大豆上に比べて納豆菌の生育が抑制されることを見出している。この生育抑制は、培養開始直後ではなく、菌が一定のレベルまで増殖した後に起こる現象であることから、生大豆が納豆菌の生育をモニターして抗菌物質を生産・分泌する可能性が考えられた。そこで本研究では、このような生大豆の納豆菌への応答機構を明らかにすることを目指して、抗菌物質の抽出と性状解析を行った。
【方法と結果】生大豆上と蒸し大豆上にそれぞれ納豆菌懸濁液を添加して納豆菌を培養し、大豆表面を水で洗浄した懸濁液の pH を経時的に測定した。その結果、蒸し大豆では納豆菌の増殖とともに pH が上昇したのに対し、生大豆では納豆菌が生育しても pH が弱酸性に保たれた。また、初期 pH を弱酸性に調整した LB 固体培地と、弱酸性の緩衝剤を含む同様の培地にそれぞれ納豆菌を植菌すると、前者では納豆菌が生育したのに対し、後者では生育が抑制された。したがって、酸性条件の維持が生育抑制に必須であることが示された。次に、生大豆から抗菌物質の抽出を試みた。生大豆上で納豆菌を培養することで生育抑制を誘導した後、メタノール抽出及び、トルエンと酢酸エチルを用いた分液抽出により分画した。阻止円形成試験の結果、酢酸エチル抽出画分が納豆菌に対する生育抑制活性を有していた。生大豆に納豆菌を植菌しないネガティブコントロールの実験でも酢酸エチル抽出画分でわずかに阻止円が形成されたことから、抗菌物質は、一定レベルで構成的に生産されているが、納豆菌の生育に応答して生成が顕著に誘導される可能性が示唆された。さらに、酢酸エチル抽出画分を用いて、枯草菌（*Bacillus subtilis*）、大腸菌（*Escherichia coli*）、及び乳酸菌（*Lactobacillus rhamnosus*）の阻止円形成試験を行ったところ、大腸菌と乳酸菌に対する生育抑制活性は検出されなかった。
【考察】本研究により、生大豆が納豆菌に応答して抗菌物質を生産・分泌していることが明らかになった。その抗菌物質は、酢酸エチルによって抽出される酸性物質であること、また、納豆菌を含む枯草菌に対する作用を有することが示された。大豆は、自然環境中における枯草菌との相互作用の歴史の中で選択性の高い抗菌メカニズムを獲得したのかもしれない。納豆製造において大豆を蒸すことは、納豆菌による大豆成分の利用を促進するだけでなく、納豆菌の生育に応答した大豆による抗菌物質の生産を防止する意義を有することが見出された。

soybean, *Bacillus subtilis*, antimicrobial

発表責任者：橋本渉（whasimot@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3A18a07
講演日時：3 月 27 日 10:46～ センター2 号館 A18 会場

枯草菌の加熱処理およびガンマ線照射芽胞に対するチモールの発育抑制作用の解析

Inhibitory activity of thymol on the development of heated and irradiated *Bacillus* subtilis> spores

○岡田 太地[1]、阪井 俊夫[1]、朝田 良子[1,2,3]、坂元 仁[3]、土戸 哲明[1,2,3]、古田 雅一[1,2,3] ([1]大阪府大院・工・量子、[2]大阪府大院・放研セ、[3]大阪府大院・微制研)
○Daichi OKADA[1], Toshio SAKAI[1], Ryoko ASADA[1,2,3], Jin SAKAMOTO[3], Tetsuaki TSUCHIDO[1,2,3], Masakazu FURUTA[1,2,3] ([1]QRE, Osaka-Prefe-univ, [2]RRC, Osaka-Prefe-univ, [3]RCMC, Osaka-Prefe-univ)

〔目的〕細菌芽胞は種々の殺菌処理に抵抗性であり、加熱殺菌においても処理後に生残して食品を汚染することが懸念される。また、芽胞は熱処理後、実際には生存していても発芽能を喪失したために死滅したとみなされ、殺菌効果が過大評価される場合がある。芽胞の発育には発芽，発芽後成長から栄養型細胞に至る連続的なプロセスがあり、より有効な殺滅菌を行うには、個々の殺菌処理が枯草菌芽胞の発育のどの段階でどのような作用を及ぼすのかを把握することが重要である。当研究室での既往研究において、精油成分の carvacrol と thymol が芽胞の発芽過程を抑制すること [1)]、また熱および放射線による殺菌処理芽胞の発育遅延をもたらすこと [2)] が分かっている。本研究では、thymol による加熱処理芽胞と放射線照射による損傷芽胞の発芽および発芽後成長に対する抑制作用とその特性を比較・検討した。〔方法と結果〕枯草菌（*Bacillus subtilis*）168 株を用い、Schaeffer 培地上, 37℃で芽胞を形成させた。発芽培地にはリン酸カリウム緩衝液（KPB, pH7.0）に発芽誘発剤として L-alanine と AGFK（L-asparagine, D-glucose, D-fructose, KCl）を添加したものを用いた。まず、加熱とガンマ線照射による発芽率と発芽速度の面から発芽速度活性化条件を調べた。結果、加熱処理芽胞では 70℃-20 分において発芽速度が活性化し、75,80℃-20 分加熱すると不活性化が生じた。一方で、1～8kGy のガンマ線照射芽胞では発芽速度の活性化・不活性化は生じなかった。また既報 [1)]に準じて KPB 中で芽胞を加熱損傷させた後、thymol の存否による TSB 中での発育遅延の程度を評価した。その結果 thymol 濃度の増加によって発育遅延が生じ、加熱損傷と thymol の添加は相乗的な発育遅延効果を生じさせることが分かった。さらに thymol を添加した KPB 中で加熱損傷させてから thymol 添加 TSB 培地で発育させることで更なる発育遅延が生じることが分かった。一方でガンマ線照射してから thymol を含む TSB 中で発育させると発育遅延は生じなかった。thymol に暴露すると細胞膜損傷やタンパク質変性効果が増幅されて発育が遅延することが知られており、加熱によって生じた膜損傷やタンパク質変性が thymol によって促進された結果、相乗的な発育遅延が生じたと考えられる。一方で、ガンマ線は膜やタンパク質にはあまり作用せず、DNA に対して損傷を与えるため、thymol との併用による相乗効果は得られなかったと推察した。

1) 阪井ら, 農芸化学会大会要旨集 2C19p05 (2017).
2) 阪井ら, 損傷菌セミナー要旨集 p17 (2018).

Bacillus subtilis, spore, thymol

講演番号：3A18a08
講演日時：3 月 27 日 10:57～ センター2 号館 A18 会場

D-アミノ酸の抗菌能評価と作用特性
Antibacterial activities of D-amino acid and their properties
○内田 脩斗[1]、松村 吉信[1,2] ([1]関西大・生命生物工、[2]関西大・ORDIST)
○Shuto UCHIDA[1], Yoshinobu MATSUMURA[1,2] ([1]Dept. Life science and biotechnology, Kansai Univ., [2]ORDIST, Kansai Univ.)

【目的】タンパク質の構成成分である１９種類の L-アミノ酸やグリシンの重要性は広く認められている一方で、L-アミノ酸の光学異性体である D-アミノ酸は、バクテリア細胞の細胞壁に含まれる D-アラニンや一部の抗生物質で利用されているものの、その重要性は注目されていなかった。しかし近年、動物において D-アスパラギン酸のメラトニン分泌抑制作用などの生理活性が確認されると、その他の D-アミノ酸の生理活性にも着目されるようになった。特に、微生物制御分野においては、ペニシリン G などの細胞壁合成阻害剤の一部が D-アミノ酸の構造と類似している点やグラミシジン S などの一部抗生物質で D-アミノ酸を含むことが知られているが、近年、腸内細菌で産生された D-アミノ酸が腸管上皮細胞で分泌される D-アミノ酸酸化酵素で分解され、副産物として過酸化水素が生じること、さらに、発生した過酸化水素によってビブリオ属細菌が殺滅されることが報告され、D-アミノ酸が殺菌料や保存料としての食品への利用が期待される。本研究では、D-アミノ酸単体でのバクテリア細胞への生理的機能を探索した。
【方法】試供菌として、*Escherichia coli* OW6、*Staphylococcus aureus* Mu50、*Pseudomonas aeruginosa* PA01、*Klebsiella pneumoniae* IAM12351 を用いた。D-アミノ酸には試薬として購入可能なものを使用し、一部の L-アミノ酸も対照として使用した。抗菌力評価は最小発育阻止濃度(MIC)測定法、バクテリア細胞の増殖は A_{660} で測定した。培地には BSM 改変無機塩培地に各種 D-アミノ酸（<20mM）を添加したものを使用した。培養条件は 37℃で 120 rpm、24 時間とした。
【結果】D-システイン(D-Cys)を添加した培地での培養において、*K. pneumoniae* で明らかな増殖能の低下が観察され、5 mM で増殖が半減し、20 mM で停止した。このことから 20mM を MIC 値と判断した。また、L-Cys や D-Cys 以外の D アミノ酸では顕著な増殖抑制は観察されなかった。この D-Cys の増速抑制は D-Cys による L-アミノ酸代謝系阻害に起因する可能性が予想されることから、L-アミノ酸と D-Cys 併用時における D-cys の効果を検証した結果、5 mM L-グルタミン添加によって D-Cys の増殖阻害能が一部解除されていることが確認されたが、比増殖速度に大きな影響はなく、D-Cys がアミノ酸代謝系に大きな影響を及ぼしているとは考えにくい。また、これまでに *E. coli* や *S. aureus* においても D-Cys の増殖抑制効果を検証し、両株でも顕著な増殖抑制能が確認されたが、*P. aeruginosa* では D-Cys の増殖抑制効果は確認されなかった。今後、D-Cys 処理したバクテリア細胞における活性酸素発生やストレス状態を検証し、D-Cys の作用機構を調べる予定である。

D-amino acid, microbial control, pathogen

発表責任者：松村 吉信（ymatsu@kansai-u.ac.jp）

講演番号：3A18a09
講演日時：3 月 27 日 11:08～ センター2 号館 A18 会場

ボイセンベリーの抗菌性の評価
Evaluation of antibacterial activity of boysenberry
○橋本 奈々美[1]、水木 徹[4]、三浦 健[1,2,3] ([1]東洋大院・生命科学、[2]東洋大学・生命科学、[3]東洋大学・ライフイノベーション研究所、[4]東洋大学・バイオナノエレクトロニクス研究センター)
○Nanami HASHIMOTO[1], Toru MIZUKI[4], Takeshi MIURA[1,2,3] ([1]1Graduate School of Life Sciences, Toyo University, [2]2Faculty of Life Sciences, Toyo University, [3]Institute of Life Innovation Studies, Toyo University, [4]Bio-Nano Electronics Research Centre, Toyo University)

【背景・目的】
ボイセンベリーはカリフォルニア北部を原産地とするバラ科キイチゴ属の果実であり、ブラックベリー、ラズベリー、ローガンベリーの交雑種であるとされている。日本国内でも一部地域で栽培されており、本大学近隣の群馬県館林市でも生産が行われている。また、ボイセンベリーには特有のアントシアニンやエラグ酸、葉酸など美容や健康に良いとされる化合物が多く含有されており、機能性食品として注目を浴びている。
我々の研究室では、ボイセンベリーの新たな有効性を発見するため、微生物の生育に対する影響の検証を行っている。そこで、本発表では、館林産のボイセンベリー果実の成分分析と抗菌性試験について報告する。
【結果・考察】
館林市産ボイセンベリー（2016 年度収穫）の成分分析を日本食品分析センターに受託した結果、ブルーベリー（文献値）と比較して、アントシアニンが 1.5 倍、エラグ酸が 2 倍、葉酸が 5 倍、亜鉛が 2 倍であった。さらに、DPPH ラジカル消去活性法による抗酸化活性を測定したところ、明らかにブルーベリーと比較し高い値を示した。
本実験で抗菌性試験を行うために、指標菌である *Esherichia coli* NBRC3972、*Bacillus subtilis* NBRC3134、*Staphylococcus aureus* NBRC12732、*Pseudomonas aeruginosa* NBRC 12689、*Candida albicans* NBRC1594 の分譲菌株を用いた。まず、ディスク拡散法を行った。各菌株の培養液を塗布した寒天培地上にボイセンベリー果汁を浸透させたペーパーディスクを置き培養したところ、*C. albicans* NBRC1594 以外の他の菌株において生育阻止円が見出された。さらに、また標準平板希釈法による生存率の測定を行った。各菌株の培養液にボイセンベリー果汁を添加して培養したところ、*C. albicans* NBRC1594 の生存率は、ボイセンベリー果汁無添加の場合と比較して 1.5 倍増加した。その一方で、それ以外の菌株においては生存率 50%以下であった。本研究の結果より、ボイセンベリー含有化合物が抗菌活性を有していることが示唆された。

berry, antioxidant activity, antibacterial activity

発表責任者：橋本奈々美（s39101900160@toyo.jp）

講演番号：3A18a10
講演日時：3 月 27 日 11:19～ センター2 号館 A18 会場

空気によるマイクロバブルの微生物への殺菌効果

Bactericidal effect of air microbubble to microbes

○赤尾 紅羽、西本 真琴（和歌山高専）
○Kureha AKAO, Makoto NISHIMOTO (NIT.W.C)

【背景・目的】近年、ファインバブル(FB)という普通の気泡と異なる微細気泡が注目されている。FB には、直径が 1−100 μm のマイクロバブル(MB)と直径が 1 μm 以下のウルトラファインバブル(UFB)がある。これらの FB は、通常の気泡とは明らかに異なる特徴や特性を示す。例えば、気泡表面が負に帯電していること、気泡内部に自己加圧効果が生じること、またそれにより圧力が増加し、気泡内の気体が溶解すること、さらに圧力崩壊した際に酸化力の高いラジカルが発生することなどが挙げられ、様々な産業分野への応用が考えられている。これらのうち、MB の収縮による内部圧の上昇で溶解する際に発生するジェットや静電的分極による電気的特性は、殺菌効果が期待されている。MB が微生物に及ぼす影響に関するこれまでの報告は､食品保存の改善として FB の微生物の増殖抑制効果や MB によるノロウイルスの不活化を示すものであるが、前者は二酸化炭素、後者はオゾンが用いられており、空気を用いた MB の直接的な殺菌効果を示した報告は実用例でもほとんどない。

そこで本研究では、空気による MB の微生物に対する殺菌効果を検討することを目的とした。

【方法】蒸留水をポンプにより循環させ、その循環流路中に案内翼を組み込むことにより旋回流から生じるせん断場を作る｡そこに気体を導入することによる気−液せん断方式を用いて MB を発生させ、所定の時間バブリングした MB 処理水を作製した。

微生物には、グラム陰性菌の桿菌で通性嫌気性に属する大腸菌(*Escherichia coli* DH5α 株)を用いた。菌を培養する培地には、酵母エキス 0.5 %、トリプトン 1.0 %および塩化ナトリウム 1.0 %を用いた LB 液体培地を使用した。そこに寒天 1.5 %を添加し、LB 寒天培地として使用した。液体培地をオートクレーブ(121 °C、15 min)で滅菌後、菌を液体培地に 1 白金耳接種し、その後、37 °C で一晩振とう培養を行った。振とう培養後の菌体を蒸留水および MB 水に添加し、蒸留水に添加したものをコントロールとした。30 °C で 90 分間静置した後、寒天培地に 50 μL 接種し、37 °C で一晩培養した。培養後、生じたコロニー数を生菌数としてカウントした。

【結果】コントロールおよび MB 処理水のコロニー数を比較すると、120 分間 MB 処理した水を添加することで約 40 %まで菌数が減少した。この結果から、空気による MB が微生物に対して殺菌効果あるいは微生物増殖抑制効果を示すことが明らかになった。

microbubble, E.coli, air

講演番号：3A18p01
講演日時：3 月 27 日 13:50～ センター2 号館 A18 会場

Aspergillus niger の培養方法による形態変化への影響
Effects of culture methods on morphological change in *Aspergillus niger*
○正木 佑弥[1]、村上 周一郎[2] ([1]明治大院農、[2]明治大農)
○Yuya MASAKI[1], Syuichirou MURAKAMI[2] ([1]Meiji Graduate School, [2]Meiji Univ.)

【背景・目的】
糸状菌 *Aspergillus niger* は、酵素産業において糖質分解酵素等の生産に用いられている微生物である。酵素生産のために菌体を液体培地にて培養する際、菌体の塊（＝ペレット）が形成され、その形態は培養条件により多様に変化することが知られている。ペレットの大きさは酵素の生産量に影響を与えるため、ペレット形成およびその形態変化のメカニズムの解明が求められる。本研究では、液体培地中の溶存酸素量に着目し、培養方法とバイオマス量、および形態変化の関連性について検討した。
【方法・結果】
まず唯一 C 源として sucrose を用いた液体培地に、当研究室で分離した *A. niger* E-1 株の分生子を 1.0×10^5 spore/mL になるように植菌し、30℃、80 rpm で 4 日間振盪培養した。この時、振盪培養は同一方向へのロータリー方式による培養と、溶存酸素量に変化をつけるために一定時間ごとに回転方向を変化させる「反転方式」による培養を同条件で行った。その結果、ペレットサイズはロータリー方式で直径 0.6±0.2 mm、反転方式で 0.1±0.03 mm となり、通気方法の違いによりペレットサイズが変化することが明らかになった。一方、培養 4 日目における培養液の溶存酸素量を測定したところ、反転方式がロータリー方式の半分程度であった。また、培養 24 h のペレット表面を実体顕微鏡で観察したところ、ロータリー方式が円滑な形状あったのに対し、反転方式では菌糸が分岐し毛のように広がっていた。培養後の菌体を回収・凍結乾燥し、菌体の乾燥重量を測定したところ、反転方式において 5 倍程度の菌体重量の増加がみられた。
次にロータリー方式の培養において、バッフル付きの三角フラスコを用いて溶存酸素量を増加させて培養を行った。その結果、反転方式培養の場合と同様にペレット表面で菌糸の分岐が増加し、ペレットサイズも反転方式で培養したものと同等のサイズに縮小した。また、反転方式の回転数を 60 rpm に落とし通気量を低下させて培養を行うと、菌糸の分岐が低下する一方でペレットサイズが増大し、培養液内の溶存酸素量がペレットサイズに及ぼす影響が大きいことが示唆された。
これらの現象が、通気量に応じたバイオマス量（＝菌密度）に依存し遺伝子発現を調節することで起こる現象であるとしたら、本菌にも細菌類で報告されているクオラムセンシング様の機構が存在している可能性が考えられた。

Aspergillus niger, pellet formation, dissolved oxygen

講演番号：3A18p02
講演日時：3 月 27 日 14:01～ センター2 号館 A18 会場

Arenibacter sp. C-21 株におけるヨウ素の局在性とヨウ素結合タンパク
Localization of iodine and iodine-binding protein in *Arenibacter* sp. C-21
○中澤 遥、天知 誠吾（千葉大院園芸）
○Haruka NAKAZAWA, Seigo AMACHI (Chiba Univ.)

ヨウ素は人間を含む脊椎動物にとって必須の微量元素であり、甲状腺ホルモンの構成成分として知られる。さらに、近年はサンゴやマガキガイ、ホヤなどの無脊椎動物においてもヨウ素の蓄積が確認されている。しかし、それらの蓄積機構や局在性、生理機能に関しては不明な点が多い。

Arenibacter sp. C-21 は相模湾の海底土より単離された海洋性細菌で、^{125}I を用いたトレーサ実験により、培地中の 4,000 倍の濃度のヨウ素を蓄積することが明らかになっている。しかし、これまでにヨウ素を蓄積するバクテリアに関する知見はほとんど得られておらず、C-21 株における蓄積ヨウ素の機能も不明である。そこで本研究では、C-21 株におけるヨウ素の蓄積メカニズムと蓄積ヨウ素の機能を解明することを目的として、トレーサ実験、ヨウ素の局在性解析、LC-MS/MS 解析を行った。C-21 株をヨウ素を含む培地で培養すると、グルコース依存的にヨウ素を蓄積した。また、菌体はグルコースの存在下で過酸化水素を生成することが明らかになった。これにより、C-21 株は自らが生成する過酸化水素を利用してヨウ素を取り込むことが示唆された。ヨウ素蓄積菌体をリゾチーム処理・超音波破砕・超遠心処理により、ペリプラズム画分、スフェロプラスト画分及び細胞膜画分に分画し、各画分に含まれるヨウ素の割合を求めた結果、93.8%が細胞膜画分に局在した。さらに、細胞膜画分をタンパク質画分とその他の画分に分け、放射活性を測定した結果、タンパク質画分に多く局在した。また、細胞膜画分を SDS-PAGE により分離し、検出された各バンドの放射活性を測定した。高い活性を示したバンドを LC-MS/MS 解析に供したところ、菌体内のヨウ素はハロパーオキシダーゼの一種と予想されるタンパク質（PAP2）のチロシン残基に結合することが明らかになった。現在、このタンパク質及び結合したヨウ素の機能を解明するため、PAP2 の遺伝子発現解析を試みている。

Iodine, Haloperoxidase, Accumulation

講演番号：3A18p03
講演日時：3 月 27 日 14:12～ センター2 号館 A18 会場

細菌のヨウ素酸呼吸には新規鉄硫黄モリブデンタンパク Idr が関与する

A novel dimethylsulfoxide reductase family of molybdenum enzyme, Idr, is involved in iodate respiration by *Pseudomonas* sp. SCT

○柏 澄江[1]、山﨑 千尋[1]、笠原 康裕[2]、天知 誠吾[1] ([1]千葉大園、[2]北大低温研)
○Sumie KASHIWA[1], Chihiro YAMAZAKI[1], Yasuhiro KASAHARA[2], Seigo AMACHI[1] ([1]Chiba Univ., [2]Hokkaido Univ.)

当研究室が相模湾の海洋堆積物から単離に成功した *Pseudomonas* sp. SCT は、ヨウ素酸(IO_3^-)を唯一の電子受容体として利用できるヨウ素酸呼吸細菌である。SCT 株のペリプラズムにはヨウ素酸存在下で誘導されるヨウ素酸還元酵素(Idr)が存在する。Idr を Native-PAGE ゲル上で活性染色後、活性バンドを切り出し、これを SDS-PAGE で泳動したところ 3 本のバンドが現れた。これらを LC-MS/MS 解析に供したところ、亜ヒ酸酸化酵素のラージサブユニット(AioA)、スモールサブユニット(AioB)、および 2 種類のシトクロム *c* ペルオキシダーゼ (CCP)とアノテーションされた合計 4 種類のタンパクが検出された。これらタンパクをコードする遺伝子はゲノム上でオペロン構造を形成し、近傍には Mo 補因子の生合成遺伝子が複数存在した。系統解析により AioA に近縁なタンパクは DMSO(dimethyl sulfoxide) reductase ファミリーの中で新規のクレードを形成することがわかった。このため、これらタンパクを IdrA、IdrB、$IdrP_1$、$IdrP_2$ と名付けた。IdrA には Mo 補因子結合サイトと[3Fe-4S]結合サイトがあり、IdrB には TAT シグナル配列と[2Fe-2S]結合サイトが存在した。一方、$IdrP_1$ と $IdrP_2$ は既知の CCP とは系統的に異なるタンパクであった。転写解析の結果、*idr* 遺伝子はヨウ素酸呼吸条件で最も発現量が高く、脱窒や好気条件では発現量が低いことがわかった。また比較プロテオーム解析の結果、ヨウ素酸呼吸時には Idr タンパクのみならず、過酸化水素(H_2O_2)スカベンジャー(Ahp、Cat)、H_2O_2 誘導性転写因子 OxyR、SOD、酸素(O_2)高親和性の末端オキシダーゼ(Cyd、Cco)などの発現も上昇していた。以上のことから、ヨウ素酸呼吸に伴って、H_2O_2 と O_2 が発生することが示唆された。ヨウ素酸呼吸時のエネルギー代謝を考察すると、ヨウ素酸のヨウ化物(I^-)への還元に必要な 6 電子のうち、2 電子はヨウ素酸に、2 電子は H_2O_2 に、残る 2 電子は O_2 に渡される 3 分岐型電子伝達鎖モデルが予想された。このモデルを証明するため培養上清中の H_2O_2 を定量したところ、実際にヨウ素酸依存的な H_2O_2 の生成が確認された。現在、CCP の活性測定や *idrA* 欠損株の作成を行っている。

Pseudomonas, cytochrome *c* peroxidase, iodate respiration

講演番号：3A18p04
講演日時：3 月 27 日 14:23～ センター2 号館 A18 会場

セレン耐性菌 *Cellulomonas* sp. D3a 株における亜セレン酸還元機構の解析
Analysis of selenite reduction mechanism in selenium-resistant bacterium *Cellulomonas* sp. D3a
○戸部 隆太[1]、牧村 康平[1]、坂本 暁紀[1]、Tejo N. Prakash[2]、三原 久明[1]（[1]立命大生命、[2]Thapar Inst. Eng. & Tech.）
○ Ryuta TOBE[1], Kohei MAKIMURA[1], Akinori SAKAMOTO[1], Prakash TEJO N.[2], Hisaaki MIHARA[1] ([1]Ritsumeikan Univ., [2]Thapar Inst. Eng. & Tech.)

【背景・目的】
インドの北西部に広がる高濃度セレン蓄積地帯の土壌から単離されたグラム陽性 *Cellulomonas* sp. D3a 株は、有毒なカルコゲンオキシアニオンである亜セレン酸に対する還元能・耐性能を有する。他の *Cellulomonas* 属細菌は、亜セレン酸の還元能をほとんど示さないことから、本菌は他の *Cellulomonas* 属細菌とは異なる亜セレン代謝系を有することが示唆されている。本研究では、*Cellulomonas* sp. D3a 株の亜セレン還元機構の解明を目指し、本菌の亜セレン酸還元特性を解析した。

【結果・考察】
好気・嫌気両条件下にて、グルコースを炭素源とする富栄養培地および最少培地における本菌の亜セレン酸耐性能と還元能を調べた。その結果、好気下では、富栄養培地および最少培地のいずれにおいても、本菌の生育は亜セレン酸の添加により著しく阻害された。しかし、嫌気下では、富栄養培地においては高い亜セレン酸耐性能および還元能を示し、最少培地では亜セレン酸の添加濃度依存的な生育が認められた。一方で、亜セレン酸と化学的に類似するオキシアニオン（セレン酸、硫酸、亜硫酸、硝酸、亜硝酸）を最少培地にそれぞれ添加した場合では、本菌の生育は認められなかった。このことより、本菌はグルコースを基質、亜セレン酸を最終電子受容体とする亜セレン酸呼吸システムを有することが示唆された。また、本菌の亜セレン酸還元能は亜硫酸の添加により阻害されることを見出した。*Cellulomonas* sp. D3a 株の菌体を破砕し、細胞破砕液に亜セレン酸と同時に亜硫酸を添加したところ、菌体反応と同様に亜セレン酸還元活性の著しい阻害が認められた。さらに、本菌の破砕液を細胞質画分と膜画分に分画し、それぞれの画分における亜セレン酸還元活性を調べたところ、膜画分でのみ活性が認められた。以上のことより、本菌の亜セレン酸呼吸システムにおけるセレン酸還元酵素は、亜硫酸により活性阻害を受ける膜タンパク質または膜結合タンパク質であることが示唆された。

Selenite reduction, Bacteria, Respiration

発表責任者：三原久明（mihara@fc.ritsumei.ac.jp）

講演番号：3A18p05
講演日時：3 月 27 日 14:34～ センター2 号館 A18 会場

超低栄養性細菌 *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株の *mnoA* の機能解析
Functional analysis of *mnoA* of a super oligotroph, *Rhodococcus erythropolis* N9T-4
○岸本 真奈[1]、池ヶ谷 凌士[2]、新谷 政己[2]、金原 和秀[2]、吉田 信行[2]([1]静大・工、[2]静大院・総合科技)
○Mana KISHIMOTO[1], Ryoji IKEGAYA[2], Masaki SHINTANI[2], Kazuhide KIMBARA[2], Nobuyuki YOSHIDA[2] ([1]Fac. Eng., Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. Integr. Sch. Tech., Shizuoka Univ.)

【目的】超低栄養性細菌 *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株は，炭素・窒素・硫黄源およびエネルギー源無添加の無機塩培地で良好に生育し，大気中の CO_2 を利用して生育するというユニークな特性を示す．本菌の炭素代謝については不明な点が多いが，栄養が乏しい条件下で生育するための独特なシステムを持っていると予想している．トランスクリプトーム解析などにより，低栄養条件で際立って発現する遺伝子として NDMA 依存性のメタノールデヒドロゲナーゼ（NDMA-MDH）をコードする *mnoA* と，NAD 依存性のアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする *aldA* が同定されている．*aldA* は本菌の低栄養生育に必須でありかつ高発現する遺伝子であることから，最重要遺伝子として研究を進めてきたが，低栄養条件で最も高発現する *mnoA* についての詳細は不明である．そこで本研究では，低栄養条件における *mnoA* の機能を明らかにすることを目的とした．
【方法および結果】これまでの研究で，*mnoA* 欠損株(Δ*mnoA* 株）は低栄養培地(BM 培地）に生育することが分かっていたが，今回改めてΔ*mnoA* 株のゲノム DNA を鋳型として PCR を行った結果，*mnoA* の断片が増幅された．そこで，*sacB* を用いた相同組換えにより *mnoA* の欠損株を再度取得した．今回取得したΔ*mnoA* 株は富栄養条件（LB 培地）においては親株と同様の生育を示すが，BM 培地では親株と比較して生育が著しく低下した．さらに *mnoA* とその上流領域(200 bp）を含むプラスミドをΔ*mnoA* 株に導入すると，BM 培地での生育が回復したことから，*mnoA* は本菌の低栄養生育に必須な遺伝子であることが今回初めて明らかとなった．
mnoA の機能解析を行うため，His タグを導入して N9T-4 株内で発現させることには成功したが，精製 MnoA の酵素活性は検出できなかった．最近，グラム陽性菌である *Mycobacterium* 属の NDMA-MDH の電子受容体がマイコファクトシン(MFT)であることが示唆されている．MFT はグラム陰性菌の PQQ に相当する役割があると予想されており，その生合成系も PQQ に非常に類似していることが分かっているが，酵素の電子受容体となっているという直接的な証明は成されていない．N9T-4 株のゲノムにおいて，MFT の生合成系遺伝子は *aldA* と *mnoA* の 2 つの遺伝子間にすべて存在しており，低栄養条件で高発現していることから，MFT も本菌の低栄養生育に重要な役割を持つと予想した．MFT の前駆体ペプチドをコードする *mftA* についても同様に欠損株を作製し，その生育を検討したところ，やはり BM 培地での生育が著しく低下した．従って，MFT も本菌の低栄養生育に必須であることが明らかとなり，NDMA-MDH の電子受容体となっていること可能性が示された．

oligotroph, *Rhodococcus erythropolis*, methanol dehydrogenase

発表責任者：吉田 信行（yoshida.nobuyuki@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3A18p06
講演日時：3 月 27 日 14:45～ センター2 号館 A18 会場

培養条件検討から *adhX* 遺伝子依存的貧栄養環境生育機構に迫る

Approach toward mechanism of *adhX*-dependent oligotrophic growth by examining culture conditions

○酒井 洋範、加藤 広海、大坪 嘉行、津田 雅孝、永田 裕二（東北大院生命科）
○Hironori SAKAI, Hiromi KATO, Yoshiyuki OTSUBO, Masataka TSUDA, Yuji NAGATA (Tohoku Univ.)

【背景・目的】従属栄養細菌にとって自然環境の多くは栄養枯渇状態であり、貧栄養環境への適応は環境中での生存に重要である。貧栄養環境への適応機構として、胞子形成や休眠状態への移行など、増殖を制限して「耐え忍ぶ」機構の存在が広く知られている。しかし、当該環境での適応進化には、積極的な増殖も必要である。実際、栄養源が極めて限られた環境下でも増殖する従属栄養細菌の存在が知られている。我々は、好気性従属栄養細菌で *Alphaproteobacteria* に属する *Sphingobium japonicum* UT26 株が、Zn-dependent alcohol dehydrogenase (ADH) 遺伝子 (*adhX*) の高発現により、有機炭素源非添加の無機固体培地上で CO_2 固定を伴いコロニー形成する現象（oligotrophic growth (OG) 表現型）を見出した。UT26 株のゲノム上には既知の CO_2 固定の鍵酵素と有意な相同性を持つタンパク質をコードする遺伝子は見出されず、新規の CO_2 固定経路が関与している可能性が考えられる。更に、*adhX* ホモログが細菌ゲノムに比較的広く存在することや、*adhX* 高発現で OG 表現型を示す他株が存在することから、本現象はある程度普遍的な現象であることが示唆されている。本研究では、培養条件を検討し、OG 表現型の機構解明に繋がる知見を得ることを目的とした。
【方法・結果および考察】OG 表現型には CO_2 固定が伴うが、炭素源として培地含有物質や細胞内の蓄積物質を利用している可能性は否定できていない。特に、これまでの OG 表現型の観察は、主に固体培地を利用していたため、寒天やゲランガムなどのゲル化剤を炭素源として利用している可能性も考えられた。そこで、液体培養でも OG 表現型が観察できるか検討した。これまでの研究では、液体培地では十分な濁度の上昇が観察できなかったが、今回、cfu を測定したところ、OG 表現型株では非 OG 表現型株と比べて顕著な cfu の上昇が観察された。すなわち、ゲル化剤非添加でも OG 表現型が観察された。次に、OG 表現型株が、栄養培地で培養した際に細胞内に蓄積した物質を利用している可能性について検討した。細胞内蓄積物質は、継代培養を繰り返すことで枯渇すると考えられるが、有機炭素源非添加液体培地で継代培養を繰り返しても、OG 表現型株は同様の cfu の上昇を示し、細胞内の蓄積物質を利用している可能性は低いと考えられる。一方、OG 表現型株を CO_2 制限環境下で培養すると生育しないが、今回、通常の CO_2 濃度に戻すと生育することを確認した。すなわち、CO_2 制限環境は細胞を殺すのではなく、生育を抑制していることが明らかになった。これらの結果は、OG 表現型株は、主に大気中の CO_2 を炭素源として利用する可能性を強く支持する。現在、CO_2 の添加効果や、振とう・静置の培養方法の違いによる効果などについて検討をしている。

oligotroph, carbon fixation, alcohol dehydrogenase

発表責任者：酒井洋範（h.sakai@ige.tohoku.ac.jp）

講演番号：3A18p07
講演日時：3 月 27 日 15:06～ センター2 号館 A18 会場

深海好圧性細菌 *Shewanella violacea* が有する 4 つのペプチド輸送体の特性解析
Functional analysis of four peptide transporters from a deep-sea piezophile *Shewanella violacea*
○根來 将吾[1]、翠川 雄斗[1]、加藤 千明[2]、阿部 文快[1] ([1]青山学院大学、[2]海洋研究開発機構)
○Shogo NEGORO[1], Yuto MIDORIKAWA[1], Chiaki KATO[2], Fumiyoshi ABE[1] ([1]Aoyama Gakuin Univ., [2]JAMSTEC)

【目的】深海を特徴づける高水圧・低温といった環境要因は、一般に大気圧下に棲む生物の栄養源の取り込みを抑制し、増殖を制限する。こうした極限環境下で栄養源を獲得するため、深海微生物は膜輸送体の機能を特殊化している可能性が考えられる。そこで私たちは、窒素源を獲得する手段の一つとしてペプチド輸送体に着目した。深海好圧性細菌 *Shewanella violacea* のゲノム上で、常圧菌 *Shewanella oneidensis* のペプチド輸送体 $PepT_{So}$ のホモログを検索したところ、4 種のペプチド輸送体が見いだされ、それらを $PepT_{Sv1}$、$PepT_{Sv2}$、$PepT_{Sv3}$ および $PepT_{Sv4}$ と名付けた。興味深いことに、$PepT_{Sv1}$ と $PepT_{Sv4}$ の細胞外領域には、常圧菌のホモログには見られない長い膜外ループの存在が予測された。そこで本研究では、各ペプチド輸送体を大腸菌内で発現させ、大気圧下および高圧下におけるペプチド輸送活性を調べた。また、深海性細菌のペプチド輸送体で高度に保存された膜外ループの役割を知るため、特に $PepT_{Sv1}$ に着目し解析を行った。

【方法】 *S. violacea* DSS12 株のゲノム DNA を鋳型として各ペプチド輸送体遺伝子を PCR で増幅し、その断片を pCold TF ベクターに導入し発現プラスミドを構築した。得られたプラスミドを大腸菌 C43 株に導入し、15°C で IPTG による発現誘導を 2 時間行った後、放射性ラベル基質 ($[^3H]$-Ala-Ala) を用いた取り込みアッセイを行い、ペプチド輸送体の輸送機能を評価した。

【結果】まず、$[^3H]$-Ala-Ala を基質として大気圧下で輸送活性を測定したところ、$PepT_{Sv2}$ を除く 3 つのペプチド輸送体で活性が確認された。よって、大腸菌の細胞膜上でも *S. violacea* のこれらのペプチド輸送体が機能的であることが示唆された。次に、高圧下（30 MPa、60 MPa）における各ペプチド輸送体の輸送能を調べたところ、$PepT_{Sv1}$ および $PepT_{Sv3}$ は 30 MPa でも活性を有することがわかった。また、$PepT_{Sv3}$ は 60 MPa で輸送能が消失したのに対し、$PepT_{Sv1}$ は同じ圧力下で輸送能を維持していた。従って、4 種のペプチド輸送体は異なる圧力下でペプチド輸送を担う可能性が示唆された。次に固有の膜外ループ構造を有する $PepT_{Sv1}$ の機能をより詳細に調べるために、ループ構造の欠失体および荷電アミノ酸残基のアラニン置換体を作製し同様のアッセイを行った。その結果、いずれの変異体においても輸送活性が著しく低下することがわかった。このことから、$PepT_{Sv1}$ のループ構造は基質認識や構造安定性といったペプチド輸送に関わる重要な機能を担う可能性が示唆された。

Shewanella violacea, Peptide transporter, High pressure

発表責任者：阿部文快（abef@chem.aoyama.ac.jp）

講演番号：3A18p08
講演日時：3 月 27 日 15:17～ センター2 号館 A18 会場

O_2耐性菌 *Amphibacillus xylanus* の“嫌気ストレス”に関する研究[第２報]
“Anaerobic stress” in *Amphibacillus xylanus* which lacks a respiratory chain

大野 由依[1]、木俣 真弥[1]、○齋藤 迅成[1]、松本 滉平[1]、尾崎 和帆[1]、川越 樹[1]、田中 啓介[2]、酒井陽一[3]、高山 努[3]、中本 忠宏[4]、武田 晃治[5]、吉村 悦郎[6]、阿部 晃[7]、川崎 信治[1]、新村 洋一[1]([1]東農大バイオ、[2]東農大ゲノム解析セ、[3]大同大、[4]東レリサーチセ、[5]東農大教職課程、[6]放送大教養、[7]東農大分子微生物)
Yui OHNO[1], Shinya KIMATA[1], ○Jinsei SAITO[1], Kohei MATSUMOTO[1], Kazuho OZAKI[1], Tatsuki KAWAGOE[1], Keisuke TANAKA[2], Yoichi SAKAI[3], Tsutomu TAKAYAMA[3], Tadahiro NAKAMOTO[4], Kouji TAKEDA[5], Etsuro YOSHIMURA[6], Akira ABE[7], Shinji KAWASAKI[1], Youichi NIIMURA[1] ([1]Tokyo University of Agriculture Biosience, [2]Tokyo University of Agriculture Nodai Genome Research Center, [3]Daido Univesity, [4]Toray Research Center, [5]Tokyo University of Agriculture Education course, [6]The Open University of Japan, [7]Tokyo University of Agriculture Molecular Science of Bacteria)

〈背景・目的〉
酸化ストレスは、活性酸素が細胞障害の直接原因となっている。一方、酸素の供給が止まって発生するストレス “嫌気ストレス”も微生物のみならず、動・植物界で報告されている。このストレスは、急激な嫌気化で生成する還元力（e^-）の過剰に起因すると推定されるが、細胞への障害要因は不明である。本研究の供試菌 *Amphibacillus xylanus* EP01 株(*A. xylanus*)[1] は好気・嫌気の２代謝系[2] を有し、両条件で同等の良好生育する酸素耐性嫌気性菌である。両代謝系で酸化還元バランスが維持されるため、好気から嫌気への切り替え培養時に還元力の過剰は起きにくいと推定された[3]。しかし、嫌気条件へ切り替え時に Fe^{2+}の増加と生菌数の減少が観察され、Fe^{2+}減少で生育回復が観察された(2018 年度本大会)。本報告は、“嫌気ストレス”細胞障害原因の代謝的解明を目的とする。
〈方法・結果・考察〉
1．*A. xylanus* の好気から嫌気への切り替え培養における代謝解析： 前報同様、*A. xylanus* を対数増殖期中期(O.D.660=1.0)まで好気培養後、嫌気培養に切り替えた(100 % N_2吹き込み)。O_2濃度は、切り替え直後から 0 μM であり、30 分後に生育停滞が確認された。切り替え前後の菌体を RNA-Seq 解析に供したところ、好気、嫌気培養時と異なるヒートマップが観察された。
2．*A. xylanus* 鉄動態解析：メスバウアー分光法にて、各培養時未破砕菌体の鉄動態を観察した。嫌気培養への切り替え後に Fe^{2+}存在比は 26 %から 100 %に増加し、前報(2018 年度本大会)の蛍光顕微鏡結果(FeRhoNox™-1)が支持された。増加したFe^{2+}比率は低スピン66 %と高スピン34 %で構成された。
3．過酸化脂質モデル化合物による DNA 損傷：Fe^{2+}の細胞毒性は、H_2O_2との反応で生成する OH・関与と報告されていたが、本培養系（完全嫌気下）で、H_2O_2 が生成しないため、過酸化脂質類の関与が推定された。過酸化脂質モデル化合物（過酸化キュメン）を用いて、遊離 Fe^{2+}存在下での DNA 損傷を検討したところ、H_2O_2同様に過酸化キュメンでも、Fe^{2+} による DNA の損傷が確認された。
4.過酸化脂質定量(TBARS 法)： 酸化ストレスマーカーとして TBARS (Uchiyama)法を用いて、*A. xylanus* の嫌気培養への切り替え時の TBARS 値測定を行った。その結果、切り替え後 240 分で大幅な TBARS 値の増加が観察された。
以上の結果に基づき“嫌気ストレス”障害と過酸化脂質マーカー増加の関係を考察する。
[1] Niimura,Y.et al.1990,Int.J.Syst.Bacteriol.40,297 [2] Mochizuki, D. et al., 2014, Microbiology **160**, 340 [3] Kimata,S.et al.2018,FEBS Open Bio **8**,947.

Fe^{2+}, lipid hydroperoxide, TBARS

発表責任者：新村洋一（niimura@nodai.ac.jp）

講演番号：3A18p09
講演日時：3 月 27 日 15:28～ センター2 号館 A18 会場

酢酸、酪酸存在下で見られる *Hydrogenophilus thermoluteolus* TH-1 株の生育阻害

Growth inhibition of *Hydrogenophilus thermoluteolus* strain TH-1 in the presence of acetate and butyrate

○岩本 啓志[1]、亀谷 将史[1,2]、新井 博之[1,2]、石井 正治[1,2] ([1]東大 農生科、[2]東大微生物連携機構)
○Keishi IWAMOTO[1], Masahumi KAMEYA[1,2], Hiroyuki ARAI[1,2], Masaharu ISHII[1,2] ([1]Univ. Tokyo, [2]CRIIM)

【背景・目的】

Hydrogenophilus thermoluteolus TH-1 株は伊豆の峯温泉から単離された、至適生育温度 55℃、至適生育 pH7.0 の通性化学独立栄養性の高温性水素細菌である。TH-1 株は独立栄養性細菌の中で最も高い生育能を示し、その高い増殖速度から工業的な利用が期待されている。

TH-1 株は独立栄養条件と従属栄養条件の他に、水素と二酸化炭素と有機酸いずれも加えた混合栄養条件においても生育可能であるが、acetyl-CoA を経てグリオキシル酸回路で同化される有機酸である酢酸または酪酸を用いた混合栄養条件では生育開始前にラグが発生する。しかし生育ラグ発生メカニズムは未解明であり、気相の水素と二酸化炭素の両方が生育ラグ発生に関わっているのか、あるいは一方のみが関わっているのかも明らかになっていない。また TH-1 株はカルビンベンソンサイクルを用いて炭酸固定を行うことが知られており、そのうち炭酸固定を行う鍵酵素 RubisCO が生育ラグ発生へ関与している可能性も考えられた。

本研究では(1)培養時の気相組成および(2)RubisCO の生育ラグへの関与について明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

(1)酪酸または酢酸を唯一の炭素源として加えた無機培地に水素または二酸化炭素いずれか一方を加えた条件で、TH-1 株の培養を行った。その結果、水素のみを加えた条件では生育ラグは見られず、二酸化炭素のみを加えた条件で生育ラグが見られた。このことから、酪酸または酢酸と二酸化炭素が共存する場合に生育ラグが発生すること、水素の有無は生育ラグには関与しないことが分かった。

(2)RubisCO をコードする遺伝子 *cbbL* について、生育ラグが起きる条件と起きない条件それぞれにおいて転写解析を行った。また RubisCO 抗体を用いてウエスタンブロットを行い、上記条件における RubisCO 発現量解析を行った。生育ラグが起きる条件における *cbbL* 転写量及び RubisCO 発現量は生育ラグが起きない条件と比べて低く、RubisCO は生育ラグに関与しない可能性が示唆された。

RubisCO, glyoxylate cycle, TCA cycle

講演番号：3A18p10
講演日時：3 月 27 日 15:39～ センター2 号館 A18 会場

ビフィズス菌の生理状態に影響を及ぼす環境要因に関する研究
Environmental factors affecting the physiological states of Bifidobacterium
○佐野 寿広[1]、渡部 拓也[1]、佐藤 拓海[2]、川崎 信治[1,2] ([1]東農大バイオ、[2]東農大微生物)
○Toshihiro SANO[1], Takuya Watabe[1], Takumi SATOH[2], Shinji Kawasaki[1,2] ([1]TUA Bio, [2]TUA Microbiol)

【背景・目的】
ビフィズス菌は宿主に対し有益な効果を持ち、健康に寄与するプロバイオティクスとして知られている。 ビフィズス菌は嫌気性細菌であるが、CO_2の存在によりO_2耐性を示し[1)]、生育促進を引き起こす事が報告されている[2)]。また pH や温度、栄養状態といった生育環境の違いがビフィズス菌の形態に影響を及ぼす事が報告されている[3)]。このように生育環境の違いがビフィズス菌に様々な変化をもたらす事は多く報告されているが、その生理活性や機能に及ぼす影響に関しては未解明な部分が多く残されている。そこで本研究では、生育環境の変化がビフィズス菌の生理活性や機能にどのような影響を及ぼすかについて知見を得る事を目的とする。
【方法】
CO_2と O_2がビフィズス菌に与える影響について調査するため、単離源の棲息環境や O_2感受性の異なる 7 菌種を供試菌とした。MRS 培地と半合成培地（MRS 培地に比べ貧栄養条件）を用い、N_2飽和気相条件に 10% CO_2、各種濃度 O_2を添加した条件で培養を行い、経時的に生育を観察した。
【結果・考察】
MRS 培地ではCO_2添加による O_2耐性の向上は観察されなかったが、一部の菌において CO_2存在下で生育促進が観察された。さらに半合成培地ではCO_2添加による O_2耐性の向上や O_2による生育促進が観察された。さらに CO_2存在下の生育促進が MRS 培地に比べ顕著であった。貧栄養条件下でより顕著な生育促進が観察された事から、貧栄養条件において CO_2は代謝に利用される、あるいは代謝の補助を行う可能性が考えられる。

1)Bergey’s manual of systematic bacteriology 第 8 版
2)Kawasaki *et al. Appl Environ Microbiol.* 2007
3)Dhanashree *et al. Front Microbiol.* 2017

Bifidobacterium, CO2, growth

講演番号：3A18p11
講演日時：3 月 27 日 15:50～ センター2 号館 A18 会場

乳酸酸性環境における共存酵母による乳酸菌の生存性向上効果の検討
Enhanced lactic acid bacteria viability with yeast co-incubation under acidic conditions
○平井 智美、相澤 美穂、小笹 佳菜、清田 彩美、川澄 俊之（日女大食）
○Satomi HIRAI, Miho AIZAWA, Kaza OZASA, Ayami SEITA, Toshiyuki KAWASUMI (Japan Women's Univ.)

〈背景・目的〉乳酸酸性下における乳酸菌と酵母の共存は自然界や発酵食品中に広くみられるが、その共存による相互作用については未知な部分が多い。当研究室では、漬物由来の乳酸菌（*Lactobacillus pentosus* N1, *L. paracasei* N9）の生存性が酵母（*Meyerozyma guilliermondii* K25 株）との共存により有意に向上することを見出した。また、漬物由来ではない *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Cyberlindnera saturnus* の各基準株との共存においても *L. pentosus* N1、*L. paracasei* N9 の生存性が有意に向上すること（$p<0.05$）、生存性向上の要因として考えられた酵母代謝産物の供給、酵母による乳酸量の減少は関連がない事を報告してきた。今回新たに、酵母細胞との接触、ならびに過酸化水素（H_2O_2）と乳酸菌生存性との関連性について検討した。〈方法〉乳酸菌（5×10^8/mL）と酵母（5×10^7/mL）を 0.5%乳酸緩衝液中（pH3）で混合後 10℃にて静置し、乳酸菌の生菌数を経時測定した。酵母の細胞接触の影響は、乳酸緩衝液中で乳酸菌と酵母をセルロース膜で隔離し、乳酸菌生存性が接触時と同様に向上されるのかを検討した。H_2O_2 の関連については、Ferrous Oxidation-Xylenol Orange Assay（FOX 法）による乳酸緩衝液中の H_2O_2 測定、および無機触媒である MnO_2 添加による H_2O_2 消去が乳酸菌生存性へ与える影響を検討した。〈結果・考察〉初発菌数 LOG 8.5 CFU/mL 前後であった乳酸菌は単独時、15 日後に、*L. pentosus* N1 はほぼ全て死滅、*L. paracasei* N9 は約 LOG 3 CFU/mL まで減少した。細胞接触の影響について、酵母共存で接触無しの場合、15 日後に *L. pentosus* N1 は約 LOG 6 CFU/mL、*L. paracasei* N9 は約 LOG 7 CFU/mL を維持し、接触有りと同様に乳酸菌の生存性は有意に向上した（$p<0.05$）。接触有りと無しとの結果間に有意差はなく、酵母細胞の接触は乳酸菌の生存性向上に関連がないと考えられた。H_2O_2 の影響について、いずれの乳酸菌も単独時に H_2O_2 を生産した。乳酸緩衝液中の H_2O_2 濃度は乳酸菌単独時、15 日後に、*L. pentosus* N1 は約 400μM、*L. paracasei* N9 は約 100μM を蓄積したが、*S. cerevisiae*、または *M. guilliermondii* K25 の共存により、H_2O_2 濃度は大幅に減少し有意に低値（1～35μM）を示した（$p<0.05$）。同様に、いずれの乳酸菌も MnO_2 添加によって乳酸緩衝液中の H_2O_2 濃度は有意に低値（1～6μM）を示し、また、生菌数も有意に向上し（$p<0.05$）、15 日後に *L. pentosus* N1 は約 LOG 6 CFU/mL、*L. paracasei* N9 は約 LOG 5 CFU/mL を維持したことから、H_2O_2 濃度の大幅な減少によって乳酸菌の生存性が向上したことが示唆された。これらの結果より、酵母共培養系においては、酵母の持つカタラーゼ活性による H_2O_2 消去が乳酸菌の生存性向上に影響を与えている可能性が推察された。

lactic acid bacteria, yeast, viability

講演番号：3A18p12
講演日時：3 月 27 日 16:01～ センター2 号館 A18 会場

花と訪花昆虫に生息する嫌気性細菌の生理的意義に関する研究

Ecological　research of anaerobes living in flower and flower-visiting insects.

○鈴木 大貴[1]、森 達則[1]、山本 安里沙[1]、石毛 太一郎[3]、佐藤 拓海[2]、川崎 信治[1,2] ([1]東農大バイオ、[2]東農大微生物、[3]東農大ゲノム解析セ)
○Daiki SUZUKI[1], Tatsunori MORI[1], Arisa YAMAMOTO[1], Taichiro ISHIGE[3], Takumi SATOH[2], Shinji KAWASAKI[1,2] ([1]TUA Bio., [2]TUA Microbiol., [3]TUA Genome.)

【目的】

酸素に弱い細菌であるビフィズス菌の多くは動物腸管内に生息するが、例外としてミツバチの腸管から O_2 耐性能の高いビフィズス菌が単離された報告がある。そこで我々はミツバチの腸内細菌が花由来であると推定した。糖源として蜜が豊富な花には特有の微生物叢の存在が推定されることから、2006 年から花に生息する嫌気性細菌の探索を行っている。その結果、全国各地の花から乳酸など酸を生成する嫌気性細菌のコロニーが多く検出され、花に特有の嫌気微生物叢の存在が強く推定された。その過程で動物からは単離報告例のない新種の嫌気性乳酸菌が花から単離され、*Lactobacillus floricola*、*Lactobacillus ozensis* と命名した。両菌は主に花蜜に豊富なグルコース、フルクトースのみを資化する非常に狭い糖資化能を有している。本学会では、これまでに当研究室で実施した両菌の宿主調査を主とするメタ 16S rRNA 遺伝子解析の結果と、花と訪花昆虫に生息する生理・生態学的な特性について得られた知見を報告する。

【方法】

試料は 2006 年から 2019 年にかけて、湿地帯や草原を中心に環境省などの許可を得て北海道から沖縄までの各地で花や訪花昆虫、さらには蕾、葉、茎、土なども併せて採取した。採取した試料は、個体あるいは部位ごとに解剖後、16S rRNA 遺伝子解析を行った。また次世代シーケンサーと Qiime2 による微生物叢解析を行った。

【結果】

国立公園など自然豊かな地域で採取した花からは *Lactobacillus* 属の両新種を始めとして、*Lactococcus* 属、*Leuconostoc* 属などの乳酸菌が主に単離され、多いもので花 1 輪あたり 104～108 のコロニーが得られた。メタ 16S rRNA 遺伝子解析の結果、花の微生物叢としてグラム陰性細菌や、乳酸菌以外のグラム陽性細菌、好気性細菌なども検出されたが、培養法にて単離された嫌気性乳酸菌の検出頻度は他の菌属種に比べて高く、培養法との相関性が得られた。また、ハチやハナアブなど訪花昆虫の細菌叢解析を行った結果、花の細菌叢と類似する結果が得られた。特に、全国のハナアブ類とキク科の花から共通して *L. floricola* と *L. ozensis* が検出された。現在、Qiime2 を用いた微生物叢解析を実施している。

flower microbiome, insect microbiome, lacticacid bacteria

講演番号：3A18p13
講演日時：3 月 27 日 16:21～ センター2 号館 A18 会場

ウイスキー由来乳酸菌 *Lactobacillus helveticus* の環境適応と進化
Niche-specific adaptation of *Lactobacillus helveticus* found in fermenting mashes of whisky
○城戸 良彦[1]、前野 慎太朗[1]、久保田 恵理[2]、志波 優[2,3]、遠藤 明仁[1] ([1]農大食香粧化学科、[2]農大ゲノム解析センター、[3]農大分子微生物学科)
○Yoshihiko Kido[1], Shintaro Maeno[1], Eri Kubota[2], Yu Siwa[2,3], Akihito Endo[1] ([1]Dept. of Food, Aroma and Cosmetic Chemistry, Tokyo Univ. of Agric, [2]Genome Research Center, Tokyo Univ. of Agric, [3]Dept. of Molecular Microbiology, Tokyo Univ. of Agric)

【背景と目的】
古くから乳酸菌は、日本酒の腐敗防止やワインの酸味低減に重要なマロラクティック発酵などの役割を持ち、酒類の製造と深い関りがあることが知られている。しかし、ウイスキー製造に関与する乳酸菌の研究は限られている。その限られた研究の中で 2002 年に *Lactobacillus helveticus* がウイスキーもろみから分離された。それまで *L. helveticus* は発酵乳のみから分離される乳酸菌として知られていた。大麦麦芽を原料とするウイスキーもろみと牛乳を原料とする発酵乳では、微生物が生育するにあたり、異なる栄養獲得能力とストレス耐性が必要となる。乳酸菌はゲノムレベルで生息環境に適応することが知られている。そこで本研究では、表現性状解析およびゲノム解析の両面から、異なる 2 つの環境に生息する *L. helveticus* の進化の様式を明らかにすることを目的とした。
【結果と考察】
表現性状解析には 5 株のウイスキー由来 *L. helveticus* と 6 株の発酵乳由来 *L. helveticus* を用いた。まず、3 つのストレス耐性試験 (アルコール、酸、NaCl) を行ったところ、ウイスキー由来株が発酵乳由来株に比べ、7.5%アルコールに対し有意に耐性を示し($p = 0.045$) 、pH4.5 の酸性条件下および 2 % NaCl に対し耐性を持つ傾向を示した (酸; $p = 0.068$, NaCl; $p = 0.082$)。また、2 群間の糖代謝能の違いを 22 種類の糖を用いて試験すると、ウイスキー由来株はマルトースやセロビオースなど植物に含有する糖を特異的に代謝し、発酵乳由来株は牛乳由来の糖であるラクトースやその構成糖であるガラクトースを特異的に代謝した。次に、牛乳およびスキムミルク発酵能を試験したところ、発酵乳由来株はいずれも発酵し、ウイスキー由来株はグルコースを添加させても発酵しなかった。比較ゲノム解析では、表現性状解析に用いた菌株に加え、公開されているゲノムデータの中から 8 株の発酵乳由来株のデータを収集し解析に用いた。発酵乳由来株に比べ、ウイスキー由来株は有意にゲノムサイズが小さく ($p = 0.008$)、CDS 数も少なくなっていた ($p = 0.003$)。続いて、2 群間で糖代謝能に違いが見られたマルトースとガラクトースの糖代謝関連遺伝子群の有無を確認した。マルトース代謝関連遺伝子群をウイスキー由来株は 5 株全てが有したのに対し、発酵乳由来株は 14 株中 6 株が有した。この結果は表現性状の結果を完全に支持した。一方でガラクトース代謝関連遺伝子群を発酵乳由来株は 14 株全てが有したのに対し、ウイスキー由来株は 5 株中 2 株が有した。この結果は表現性状解析の結果をおおむね支持した。これらのことより、*L. helveticus* はゲノムレベルで環境に適応していることが示唆された。

Lactobacillus, Whisky fermentation, Evolution

発表責任者：遠藤明仁（a3endou@nodai.ac.jp）

講演番号：3A18p14
講演日時：3 月 27 日 16:32～ センター2 号館 A18 会場

カフェイン耐性乳酸菌の人工胃腸液における生存性

Survival of caffeine resistant lactic acid bacteria in simulated gastrointestinal condition

○齊藤 可剛[1]、関 文巳[2]、水木 徹[3]、三浦 健[1,4]（[1]東洋大院・生命科学、[2]東洋大学・生命科学、[3]東洋大学・バイオナノエレクトロニクス研究センター、[4]東洋大学・ ライフイノベーション研究所）
○Yoritaka SAITO[1], Ayami SEKI[2], Toru MIZUKI[3], Takeshi MIURA[1,4] ([1]Graduate School of Life Sciences, Toyo University, [2]Faculty of Life Sciences, Toyo University, [3]Bio-Nano Electronics Research Centre, Toyo University, [4]Institute of Life Innovation Studies, Toyo University)

【背景・目的】

カフェインは様々な植物に存在し、それを原材料とするコーヒーや茶、チョコレートのような食品などに含まれる。過去の知見において、このカフェインには、大腸菌やその他病原菌に対して抗菌活性があることが示されている。一方で、乳酸菌などのヒトにとって有用な微生物に対しても、抗菌活性を有し、カフェインが含まれる食品を摂取することで、腸内細菌叢のバランスが崩れる恐れが考えられる。これまでに、我々は、カフェイン耐性を有する乳酸菌の単離を試みたところ、多くの乳酸菌がカフェイン１％で生育不可能であるのと比較して、2%存在下でも生育可能な YKP4 株の単離に成功した（2019 年度年会）。その YKP4 株は MALDI-TOF MS により Lactobacillus paracasei と同定された。そこで、本研究では、YKP4 株におけるプロバイオティクス特性の検討を行うことを目的とした。

【結果・考察】

コーヒー抽出液（ドリップコーヒー）および一般的なコーヒーにおける含有量である 0.03%カフェイン耐性試験を行った結果、L. paracasei NBRC 15889 と比較して、YKP4 株の生存率は高かった。
37℃で、人工胃腸液処理を行ったところ、胃液処理（3 時間）では、L. paracasei NBRC 15889 の生存率が 90%であったが、連続して行った腸液（3 時間）処理を行うと 10%まで劇的に減少した。一方、YKP4 株においは、胃液処理では 55%、連続して行った腸液処理 20%の生存率が見出された。
さらに、コーヒー抽出液および 0.03%カフェイン存在下では、L. paracasei NBRC 15889 は無添加と比較して、胃液処理では 60-70%、連続して行った腸液（3 時間）処理を行うと生存率が数%まで低下した。一方、興味深いことに、YKP4 株においは、コーヒー抽出液およびカフェイン存在下で、カフェイン無添加の場合と比較して、胃液処理では 1.5 倍の 80%以上の生存率、連続して行った腸液処理では、カフェイン無添加の場合と比較して同等の生存率 20%が見出された。この結果、YKP4 株はカフェインが存在すると胃酸耐性が向上し、腸まで届く可能性が示唆された。現在、腸上皮細胞を用いた接着率の測定を行っている。

lactic acid bacteria, probiotics, caffeine

発表責任者：齊藤 可剛（drosophila.melanogaster3413@gmail.com）

講演番号：3A18p15
講演日時：3 月 27 日 16:43～ センター2 号館 A18 会場

微生物によるメイラード反応生成物の分解および褐変抑制の最適条件の検討とその作用機序の解明

Effects of microorganisms on the degradation and formation of Maillard reaction products

○黒川 香緒里[1]、油井 拓哉[1]、島村 裕子[1]、小林 文男[2]、増田 修一[1] ([1]静岡県大院・薬食生命、[2]有限会社ラヴィアンサンテ)
○ Kaori KUROKAWA[1], Takuya YUI[1], Yuko SHIMAMURA[1], Fumio KOBAYASHI[2], Syuichi MASUDA[1] ([1]University of Shizuoka, [2]Laviansante Co., Ltd.)

【目的】食品の加工や貯蔵過程で起こるメイラード反応から生じる生成物は、食品の着色や劣化、香気成分の生成等に広く関与していることが知られている。食品の場合、流通、保存期間中に褐変化が進行すると商品価値が低下する場合があり、褐変を効果的に抑制する方法が求められている。また、食品中のメイラード反応生成物の一部は、腸内細菌により分解されて抗酸化性等の生理活性を発現すると考えられているが、それら生理活性の生体内における発現機構は明らかになっていない。そこで、本研究では、メイラード反応生成物 (メラノイジン) の分解および褐変抑制活性を有する微生物を用いて、メラノイジンの分解および褐変抑制の最適条件について検討した。
【方法】沖縄県の宮古島および食品等から分離したメラノイジン分解微生物 (5 菌株) および褐変抑制微生物 (1 菌株) を用いた。メイラード反応生成物として、グルコースとグリシンを 95°C で 1 時間加熱したモデル系メラノイジンの非透析画分を調製した。メラノイジン分解微生物を用いて、培地 (GYP、BHI および MRS 液体培地) および培養条件 (好気静置、嫌気静置および好気振盪) を変え、メラノイジン分解 (脱色) の最適条件を検討した。また、微生物分解後のメラノイジンの部分構造を明らかにするために、DAD-HPLC および FT-IR 分析を行った。さらに、褐変抑制微生物を用いて、キシロースまたはリボースとグリシンまたはヒスチジンによる褐変に対する抑制効果と各種糖の資化能について検討した。
【結果・考察】メラノイジン分解微生物を用いてメラノイジン分解の最適条件を検討したところ、全ての条件下において、GYP および BHI 液体培地の脱色率が高かったが、MRS 液体培地においては、嫌気条件において高い脱色率を示した。DAD-HPLC を用いて分解後のメラノイジンを分析した結果、280 および 400 nm のクロマトグラムにおいて、高分子側 (分子量 10,000 以上) のピーク面積が減少し、低分子側に新たなピークが検出された。また、分解後のメラノイジンの FT-IR スペクトルにおいては、1,000 cm^{-1} 付近のピークの減少が認められた。褐変抑制微生物は、糖濃度 8 および 16%では、キシロースとグリシンの組み合わせで最も高い脱色能を示した。また、本菌株は、16%のグルコース、スクロースおよびマルトースにおいても増殖可能であった。現在、褐変抑制微生物を高い糖濃度環境下で増殖させた際の糖アルコールの生成と褐変抑制効果の関連性について検討している。

Maillard reaction, browning, Microbiological degradation

講演番号：3A18p16
講演日時：3 月 27 日 16:54～ センター2 号館 A18 会場

黄色ブドウ球菌由来膜小胞形成と毒素ファージ誘導の関連性の解明

Relationship between *Staphylococcus aureus*-derived membrane vesicle production and toxin phage induction

○山梨 佑花、安藤 彩加、島村 裕子、大橋 典男、増田 修一（静岡県大・食品栄養）
○Yuka YAMANASHI, Ayaka ANDO, Yuko SHIMAMURA, Norio OHASHI, Syuichi MASUDA (University of Shizuoka)

【目的】黄色ブドウ球菌が放出する菌体由来分子を包み込んだ膜小胞 (メンブレンベシクル; MVs) は、宿主細胞に炎症反応を引き起こし、アトピー性様皮膚炎 (AD) を誘導することが報告されている。また、バクテリオファージを介した DNA の伝達により伝播する staphylococcal enterotoxin A (SEA) は、全身的な炎症反応の誘導や AD の悪化に関与しているが、SEA 遺伝子の伝播機構は明らかになっていない。さらに、MVs の構造は、ファージと似ていることから、バクテリオファージ関連遺伝子と密接な関係があることが示唆されているが、その詳細についても不明である。そこで、本研究では、SEA 遺伝子の伝播機構の解明を目的に、SEA 遺伝子を受容する SEA 非産生株 (recipient) の性状および黄色ブドウ球菌由来 MVs 形成と SEA 保有ファージによる溶菌機構の関係について明らかにすることを目的とした。
【方法】SEA 遺伝子アクセプター株 (recipient) として AD 発症者および健常者の皮膚から分離した黄色ブドウ球菌分離株 (SEA 非産生株) 6 菌株を、また、SEA 遺伝子ドナー株として SEA 産生株 (No.29 株) を用いた。SEA 非産生株と No.29 株を透析共培養することにより、分離株の由来と SEA 遺伝子伝播の関係について検討した。また、SEA 非産生株と No.29 株の保有するファージタイプと SEA 遺伝子伝播の関連性を調べた。さらに、No.29 株由来 MVs 中の SEA タンパク質および SEA 保有ファージ内包の有無について、Western blot 法および PCR 法を用いて調べた。
【結果・考察】AD 発症者の皮膚から分離した SEA 非産生株は、No.29 株を溶菌させ、さらに、一部の SEA 非産生株に SEA 遺伝子が伝播した。No.29 株の SEA 遺伝子を受容した SEA 非産生株の保有ファージ (SEA^-) のタイピングを行ったところ、No.29 株が保有するファージテイル (ϕMu3A; SEA^+) と同様のタイプであったことから、同様のファージテイルを保有する菌株間で SEA 遺伝子が伝播する可能性が示唆された。No.29 株由来 MVs 中には、SEA タンパク質だけでなく、SEA 遺伝子と同ファージ上にコードされているスタフィロキナーゼ遺伝子およびファージテイル (ϕMu3A) 遺伝子が内包されていた。これらの結果より、黄色ブドウ球菌の MVs 形成と毒素ファージの誘導能には、関連性がある可能性が示唆された。現在、溶菌を誘導させた No.29 株から MVs を分離し、MVs 中に存在する SEA 保有ファージが SEA 非産生株に感染する条件について検討している。

Staphylococcus aureus, Membrane vesicles, gene transfer

講演番号：3B01a01
講演日時：3 月 27 日 09:30～ 総合学習プラザ B01 会場

ヤマカガシ (Rhabdophis tigrinus) が有する頸腺毒成分の地域的特徴

Regional characteristics of toxic components in nuchal glands of Rhabdophis tigrinus

○井上 貴斗[1]、中田 隆[1]、吉永 直子[1]、Alan H. Savitzky[2]、森 哲[3]、森 直樹[1] ([1]京大院農、[2]ユタ州立大生物、[3]京大院理)
○Takato Inoue[1], Ryu Nakata[1], Naoko Yoshinaga[1], Alan H. Savitzky[2], Akira Mori[3], Naoki Mori[1] ([1]Grad. Sch. Agri., Kyoto Univ., [2]Dept. Biol., Utah State Univ., [3]Grad. Sch. Sci., Kyoto Univ.)

【背景と目的】

日本に生息するユウダ科のヘビ, ヤマカガシ (*Rhabdophis tigrinus*) は捕食用のタンパク毒以外にも, 頸腺と呼ばれる頸部の袋状器官に, 強心性ステロイド化合物, bufadienolide 類 (BDs) を防御物質として蓄える. ヤマカガシは BDs を自ら合成せず, 餌とするヒキガエル類から摂取し, その一部を構造変換した上で蓄積している. その組成は多様で, 現時点でおよそ 20 種の BDs がヤマカガシから同定されている. 動物が生合成および蓄積する成分に生じる差の一つとして, 地域差がある. これまでの分析で, 日本のヒキガエルが蓄積する BDs には地域差が有ると明らかにした (2019 年度本大会). そこで本研究では, ヒキガエルを毒源とするヤマカガシが蓄積する BDs の地域差を検証した. 全国各地のヤマカガシ頸腺液を LC/MS 分析し, 分析結果を種々の統計処理で解析した. また HPLC を用いて, ヤマカガシから種々の BDs を単離し, NMR 分析によって構造決定した.

【方法と結果】

日本各地で採取したヤマカガシの頸腺蓄積液を MeOH で抽出し, LC/MS で分析した. 波長 300 nm の UV 吸収と *m/z* から, BDs を検出した. 採集ポイントと個体数に応じてサンプルを計 11 地域に分け, 地域ごとに各 BDs の検出割合を算出した. これら地域の異なり度合いをクラスター分析, および, シルエット値の算出によって評価した. その結果, 11 地域を BDs 組成で分類すると, ヤマカガシの BDs 組成は東西で 2 つのクラスターに分かれた. その分類精度を評価する重判別分析を行ったところ, 分類精度は高かった.

以上から, ヤマカガシが蓄積する BDs にも地域差はあると結論した. その地域差を生ずる要因として, 地域差への関与が大きい成分と小さい成分がある. 前者は地域性が高く, 後者は地域性が低い成分である. 今回は, 地域性が高い 4 成分と地域性が低い 5 成分をHPLC で単離し, 各種 NMR 分析によって構造決定した. これらの内, 新規化合物である 6α-hydroxybufalin と gamabufotalin は, 日本のヒキガエルにおいて地域共通性が高い主要成分だった.

bufadienolide, Rhabdophis tigrinus, toad

発表責任者：井上貴斗（chem-riku.it@outlook.jp）

講演番号：3B01a02
講演日時：3 月 27 日 09:41～ 総合学習プラザ B01 会場

ヤエヤマサソリ毒液に含まれる抗ウイルス活性成分の単離・同定
Identification of an anti-viral component in the venom of the scorpion *Liocheles australasiae*
○宮下 正弘[1]、三谷 直也[1]、北中 淳史[1]、焼尾 真緒[1]、陳 明[2]、西本 幸子[3]、堀田 博[2,3]、中川 好秋[1]、宮川 恒[1] ([1]京大院農、[2]神戸大医、[3]甲南女子大医療栄養)
○Masahiro MIYASHITA[1], Naoya MITANI[1], Atsushi KITANAKA[1], Mao YAKIO[1], Ming CHEN[2], Sachiko NISHIMOTO[3], Hak HOTTA[2,3], Yoshiaki NAKAGAWA[1], Hisashi MIYAGAWA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kobe Univ., [3]Konan Women's Univ.)

【目的】サソリ毒液の主成分は殺虫性ペプチドなどの生理活性ペプチドであるが、抗菌活性や抗ウイルス活性を示す成分も含まれている。当研究グループではこれまで、日本生息種であるヤエヤマサソリ（*Liocheles australasiae*）の毒液成分について研究を進めてきたが、抗ウイルス活性成分の存在は不明であった。そこで、本研究では、ヤエヤマサソリ毒液に含まれる抗ウイルス活性成分を探索し、その構造決定を行った。

【方法および結果】まず、ヤエヤマサソリ毒液の C 型肝炎ウイルス（HCV）に対する中和活性を調べた結果、顕著な活性を示したことから、毒液に抗 HCV 活性成分が含まれることが明らかとなった。そこで、抗 HCV 活性を指標にして逆相 HPLC による毒液成分の分離・精製を繰り返した結果、分子質量 13,080 Da の活性成分を単離することができた。得られた成分を還元・アルキル化反応に供し、LC/MS による分析を行った結果、12524.7 Da と 1144.5 Da の質量をもつ二つの成分に分離した。このことから、この活性成分は二つのサブユニットがジスルフィド結合によって架橋されたヘテロダイマー構造をもつことが判明した。スモールサブユニットについてはさらに MS/MS 分析をおこない、そのアミノ酸配列を決定した。この配列を、これまでに得られているヤエヤマサソリ毒腺のトランスクリプトーム配列情報から探索したところ、この分子がホスホリパーゼ A2（PLA2）であることが判明し、これを LaPLA2 と命名した。続いて、ラージサブユニットを Lys-C および Glu-C を用いて酵素消化し、得られた断片ペプチドについて LC/MS 分析を行った。検出された断片ペプチドの質量を、LaPLA2 の全長配列から計算によって得られた値と照合することで、成熟型 LaPLA2 の構造を推定した。その結果、N 末端および C 末端配列を含む断片ペプチドを特定することができた。さらに、配列から予想されるよりも大きな質量をもつ断片ペプチドが検出され、その質量差から N-結合型糖鎖による修飾を受けていることが示唆された。そこで、この糖鎖構造を含む断片ペプチドの MS/MS 分析をおこなったところ、LaPLA2 の N-結合型糖鎖は 2 分子の N-アセチルヘキソースと 2 分子のデオキシヘキソースで構成されていることが分かった。さらに、節足動物における糖鎖構造のこれまでの知見から、この糖鎖がアスパラギン残基に結合した N-アセチルグルコサミンに対して、2 分子のフコースが α(1-3) および α(1-6) 結合し、1 分子の N-アセチルグルコサミンが β(1-4) 結合した構造であると推定できた。

scorpion, virus, phospholipase

発表責任者：宮下正弘（miyamasa@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3B01a03
講演日時：3 月 27 日 09:52～ 総合学習プラザ B01 会場

食虫動物トガリネズミ由来の麻痺性神経毒ペプチドの構造と生物活性

Structures and bioactivities of the paralytic peptides from *Blarina brevicauda*

○森田 真布[1]、武仲 敏子[2]、別所 学[2]、Maturana D. Andres[2]、木越 英夫[3]、大舘 智志[4]、上村 大輔[5]、北 将樹[2] ([1]名大物質国際研、[2]名大院生命農、[3]筑波大院数理物質、[4]北大低温研、[5]神奈川大理)
○Maho MORITA[1], Toshiko TAKENAKA[2], Manabu BESSHO[2], Andres D. MATURANA[2], Hideo KIGOSHI[3], Satoshi OHDACHI[4], Daisuke UEMURA[5], Masaki KITA[2] ([1]Nagoya Univ. RCMS, [2]Nagoya Univ., [3]Tsukuba Univ., [4]Hokkaido Univ., [5]Kanagawa Univ.)

【目的】

トガリネズミは唾液に毒を持ち，獲物を麻痺させて捕獲する珍しい哺乳類である．北米に棲息するブラリナトガリネズミ *Blarina brevicauda* が持つ毒は特に強力であり，虫だけでなくカエルやネズミなど脊椎動物も捕獲することが知られている．演者らはこれまでに，*B. brevicauda* の顎下腺から脊椎動物に対して麻痺と痙攣を引き起こす致死性プロテアーゼ毒，ブラリナトキシンを発見した．一方で，このブラリナトキシンを獲物に注入してから毒性を示すまで数時間以上かかること，およびトガリネズミが主な餌とするミミズや昆虫など無脊椎動物にはこの毒は効かないことから，*B. brevicauda* の唾液成分にはブラリナトキシンとは異なる麻痺物質が含まれると予想し，捕食に有効に働く麻痺性神経毒の同定を目指すこととした．

【方法・結果】

ブラリナトガリネズミの顎下腺を生理食塩水で抽出し，ミールワームに対する麻痺作用を指標に分離精製した結果，低分子の画分に活性が見られた．この主成分を精製して分子量約 5 kDa の新規ペプチド 2 種を単離し，Blarina Paralytic Peptides (BPP) 1, 2 と命名した．酵素消化と MALDI-TOF MS/MS 解析により，BPP1, 2 のアミノ酸一次配列を決定した．BPP 類はいずれも 3 つのジスルフィド結合をもつ一本鎖のペプチドであり，BLAST 相同性検索により，ヒトのオピオイドペプチド前駆体に相当するシンエンケファリンの部分構造に類似していることが明らかになった．また，Ca チャネルを発現誘導したヒト神経芽腫細胞を用いてパッチクランプ実験を行った結果、BPP2 に Ca チャネル開口活性が見られた．構造と機能についてさらなる解析を行うため，演者らはブレビバチルス発現系を用いてリコンビナントペプチドを合成した．本講演で詳細について報告する．

peptide, calcium channel, Blarina brevicauda

発表責任者：北将樹（mkita@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3B01a04
講演日時：3 月 27 日 10:03～ 総合学習プラザ B01 会場

雑草ホオズキ類に含まれる昆虫摂食阻害物質

Insect antifeedants in *Physalis angulata*

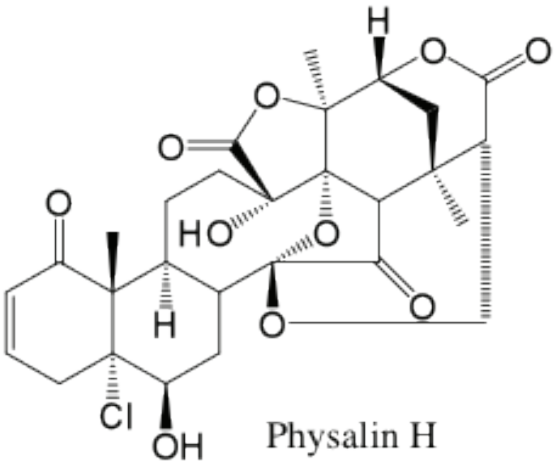
○森本 正則、綱木 海成、栗山 美鈴、松田 一彦（近畿大農）
○Masanori MORIMOTO, Kaisei TSUNAKI, Misuzu KURIYAMA, Kazuhiko MATSUDA (Kindai Univ.)

〔目的〕

近年、雑草ホオズキ類として熱帯アメリカ原産のナス科ホオズキ属ヒロハフウリンホオズキ（*Physalis angulata var. angueata*）と北アメリカ原産で非常に近縁な種であるホソバフウリンホオズキ（*P. angulata var. lanceifolia*）が国内分布を拡大している。これら雑草ホウズキ類は、野外での昆虫による食害が少ない。本研究では、これら雑草ホオズキ類の昆虫摂食阻害活性物質を単離し、その構造を解明することを目的とした。

〔方法と結果〕

京都府亀岡市のアズキ圃場で採集したホソバフウリンホオズキ地上部をメタノールで抽出し、これを減圧濃縮して濃緑色油状物を得た。この油状物をエタノールに溶解し、そこにヘキサンを滴下することで、不溶性画分と可溶性画分に分画した。ヒロハフウリンホオズキについても同様に分画した。この様にして調製した不溶性画分と可溶性画分のハスモンヨトウ 3 齢幼虫に対する昆虫摂食阻害活性を評価したところ、いずれのホオズキ類から得た抽出物についてもヘキサン不溶性画分が可溶性画分より高い摂食阻害活性を示した。そこで、ヘキサン不溶性画分をヘキサンと酢酸エチルを溶媒として用いてシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィーで分画・精製し、トリテルペンラクトンである Physalin B、Physalin H およびその類縁体を単離した。ハスモンヨトウ幼虫に対する Physalin H の半数摂食阻害活性は 18.2 μg/cm^2 (32.3 nmol/cm^2)であった。Physalin 類の昆虫摂食阻害活性は、インドセンダン（*Azadirachta indica* A. Juss.）の Azadirachtin A の昆虫摂食阻害活性よりも劣るものの、ヒロハフウリンホオズキとホソバフウリンホオズキの昆虫に対する防御機構の一部として機能していると推察した。



Physalin H

Insect antifeedants, *Physalis angulata*, Triterpene

発表責任者：森本正則（masanori@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：3B01a05
講演日時：3 月 27 日 10:14～ 総合学習プラザ B01 会場

ヤーコン葉部腺毛由来セスキテルペンラクトン類の昆虫摂食阻害発現に必要な化学構造因子（第 2 報）

Insect antifeedant activity of sesquiterpene lactones and their congeners from yacon leaves (Part 2)

○綱木 海成、森本 正則、河野 大祐、松田 一彦（近畿大農）
○Kaisei TSUNAKI, Masanori MORIMOTO, Daisuke KAWANO, Kazuhiko MATSUDA (Kindai Univ.)

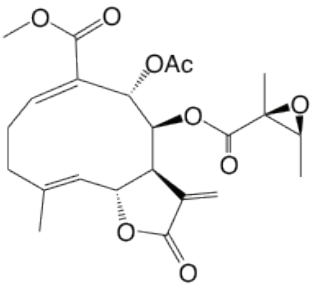
〔目的〕

アンデス地方原産のキク科植物ヤーコン（*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Rob）は、その肥大根茎を食用とするマイナー作物である。一方、江戸時代末期に日本に侵入したキク科植物イヌキクイモ（*Helianthus strumosus* L.）は、近縁種のキクイモ（*H. tuberosus* L.）とともに日本各地に雑草として帰化している。これまでに、ヤーコンとイヌキクイモの葉表面の腺毛から分泌されるセスキテルペンラクトン（SL）類が植食性昆虫に対する防御物質として機能していることを明らかにしてきた。本研究では、これらの腺毛由来 SL 類の類縁体の単離同定するとともに誘導体を合成し、それらのハスモンヨトウ（*Spodoptera litura* F.）3 齢幼虫に対する摂食阻害活性について構造活性相関を明らかにすることを目的とした。

〔方法と結果〕

新鮮なヤーコン葉部をジクロロメタンで数秒洗浄することにより葉部腺毛成分を抽出液し、これを減圧濃縮することによって葉部滲出物を黄色油状物として得た。イヌキクイモについても同様な手法で滲出物を得た。これらから、ヘキサンと酢酸エチルを展開溶媒とするシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィーを用いて SL 類を精製した。

ヤーコン葉部滲出物からは SL 類の Uvedalin、Enhydrin および Uvedalin aldehyde を単離した。このうち Uvedalin と Enhydrin は、パラジウム炭素で水素を添加し、部分的に還元した。イヌキクイモ葉部滲出物からは、SL 類の Erioflorin とその類縁体を単離した。Erioflorin は、無水酢酸でアセチル化した。これらにナツシロギク（*Tanacetum parthenium*）の SL である Parthenolide を加えて、ハスモンヨトウ幼虫に対する摂食阻害活性試験を実施した。その結果、Uvedalin、Enhydrin はインドセンダン（*Azadirachta indica* A. Juss.）由来の Azadirachtin A と比較して弱いもののハスモンヨトウ 3 齢幼虫に対して顕著な摂食阻害活性を示した。一方、Erioflorin、Acetylerioflorin および Parthenolide は、ヤーコンの SL 類よりも低い昆虫摂食阻害活性を示した。また、Uvedalin、Enhydrin の部分還元体も還元前の化合物に比べて低い摂食阻害活性を示すことから γ-ラクトンに結合する二重結合が高活性発現に重要な置換基であると推察された。



Uvedalin

insect antifeedant, sesquiterpene lactone, yacon

発表責任者：綱木 海成（1833670014v@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：3B01a06
講演日時：3 月 27 日 10:35～ 総合学習プラザ B01 会場

黒穂菌由来の植物成長調節物質に関する化学的研究

Chemical study on plant growth regulators from *Ustilago esculenta*

○森本 悠介[1]、呉 静[4]、崔 宰熏[1,2,3,4]、徳山 真治[3]、平井 浩文[1,2,3,4]、河岸 洋和[1,2,3,4] ([1]静岡大院総合農、[2]静大院創造、[3]静大応生化、[4]静大グリーン研)
○ Yusuke MORIMOTO[1], Jing WU[4], jae-Hoon CHOI[1,2,3,4], Shinji TOKUYAMA[3], Hirohumi HIRAI[1,2,3,4], Hirokazu KAWAGISI[1,2,3,4] ([1]Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka Univ., [2]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka Univ., [3]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka Univ., [4]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka Univ)

【目的】

マコモタケとはイネ科マコモ属であるマコモ（*Zizania latifolia*）に黒穂菌（*Ustilago esculenta*）が感染することによって肥大化したものであり、我が国においても美味な食材として知られるようになってきた。その肥大化の原因として黒穂菌の感染によってオーキシンが盛んに分泌され，茎での細胞分裂が活性化するという説がある。しかし我々は黒穂菌がオーキシン以外の肥大化の誘導物質を産生していると仮定し，その化合物の単離・精製，構造決定及び共生のメカニズムの解明を試みている。現在までに当研究室ではマコモタケから破骨前駆細胞分化抑制物質 makomotine 類および腫瘍細胞増殖抑制物質 makomotindoline 類を発見し[1-3]，黒穂菌培養ろ液から 5 種の化合物を新規物質として単離したが、植物に対する活性は見いだしていない[4,5,6]。本研究では、黒穂菌から植物成長調節物質の探索を目的とした。

【方法・結果】

黒穂菌を 1 週間前培養したものを、ポテトデキストロースブロス培地を用いてジャーファメンターで培養・濾過を行い 10.5 L の培養ろ液を得た。その後、減圧濃縮した粗抽出物を、*n*-ヘキサン、酢酸エチルおよび *n*-ブタノールで順次液-液分配、乾固した後エタノールで固-液分配し、減圧濃縮後、各可溶部を得た。得られた酢酸エチル可溶部 2.68 g をフラッシュカラムクロマトグラフィー、HPLC を用いて分画し、化合物の単離および精製を試みた。現在，単離した化合物は NMR, IR, MS を用いて構造決定を行っている。さらに、植物成長調節活性試験を行い、マコモの肥大化の誘導物質かどうかを検討する。

1) H. Kawagishi, *et al*., *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **70**, 2800-2802 (2006)
2) T. Suzuki, H. Kawagishi, *et al*., *Bioorga. Med. Chem. Lett*. **22**, 4246-4248 (2012)
3) J.-H. Choi, H. Kawagishi, *et al*., *Tetrahedron Lett*. **55**, 3596-3599 (2014)
4) 西山 祐貴ら、平成 28 年度日本農芸化学大会講演要旨集 p.123
5)森 拓未ら、平成 29 年度日本農芸化学大会講演要旨集 p.619
6)森本 悠介、平成 30 年度日本農芸化学大会講演要旨集 p.1186

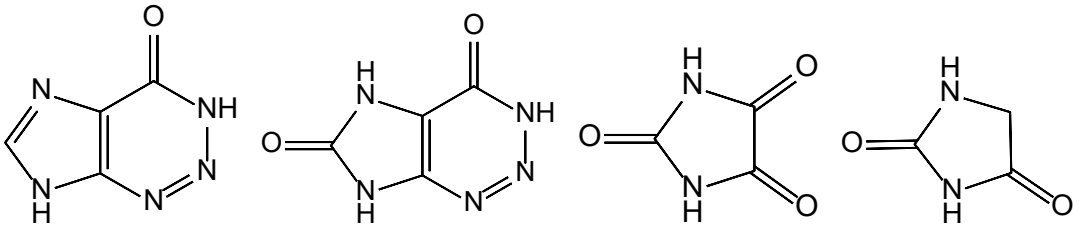
Zizania latifolia , *Ustilago esculenta*, structure determination

講演番号：3B01a07
講演日時：3 月 27 日 10:46～ 総合学習プラザ B01 会場

フェアリー化合物の安定性と分解産物に関する化学的研究
Chemical studies on stability and degradation products of fairy chemicals

○渥美 有矢[1]、竹村 太秀[1]、呉 静[2]、崔 宰熏[1,2,5]、平井 浩文[1,2,5]、近藤 満[2,5,6]、浅川 倫宏[3]、稲井 誠[4]、菅 敏幸[4]、河岸 洋和[1,2,5] ([1]静岡大院・総合農、[2]静岡大・グリーン研、[3]東海大・海洋、[4]静岡県大・薬、[5]静岡大院・創造、[6]静岡大院・総合理)
○Yuya Atsumi[1], Hirohide Takemura[1], Jing Wu[2], Jae-Hoon Choi[1,2,5], Hirofumi Hirai[1,2,5], Misturu Kondo[2,5,6], Tomohiro Asakawa[3], Makoto Inai[4], Toshiyuki Kan[4], Hirokazu Kawagishi[1,2,5] ([1]Graduate School of Integrated Science and Technology, Department of Agriculture, Shizuoka University, [2]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, [3]Marine Science and Technology, Tokai University, [4]School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, [5]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, [6]Graduate School of Integrated Science and Technology, Department of Science, Shizuoka University)

【目的】
我々はフェアリーリング惹起物質としてコムラサキシメジ培養濾液から植物成長調節活性を有する 2-azahypoxanthine (AHX) (**1**)を単離し、AHX が植物内で内生されていることを報告した[1,2]。また、AHX をイネ科等の植物に投与すると 2-aza-8-oxohypoxanthine (AOH) (**2**)に代謝され、この AOH もまた植物成長調節活性を有することが確認されている[2]。これらの化合物の安定性を確かめるために UV 照射や熱処理による試験を行った。これらの試験より分解産物が生じている可能性が考えられたので、分解産物の単離・同定も試みた。



1 **2** **3** **4**

【方法・結果】
AHX, AOH に UV を照射し、発生したガスをガスクロマトグラフィーで分析したところ、窒素が発生していることを明らかにした。また、AHX からは分解産物としてパラバン酸(**3**)を生じることが明らかとなった。一方、AHX, AOH を水に溶かし乾燥機を利用して 120 °C で加熱し、HPLC を用いて分析と単離を行った。AHX と AOH の熱分解産物として、それぞれ 2 つの化合物の単離に成功し、NMR と MS を用いて構造決定を行っている。そのうちの AOH 熱分解産物の一つは、X 線単結晶構造解析によってヒダントイン(**4**)であることを明らかにした。

1) J.-H. Choi, H. Kawagishi et al., *ChemBioChem*, 11, 1373-1377 (2010)
2) J.-H. Choi, H. Kawagishi et al., *Angew. Chem. Int. Ed.,* 53, 1553-1555 (2014)
3) J.-H. Choi, H. Kawagishi et al., *Org. Lett.*, 20, 312-314 (2018)
4) H. Kawagishi, *Biosci. Biotecnol. Biochem.* 82, 752-758 (2018)
5) H. Kawagishi, *Proc. Jpn. Acady., Ser. B.,* 95, 29-38 (2019)

fairy rings, degradation products

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3B01a08
講演日時：3 月 27 日 10:57～ 総合学習プラザ B01 会場

コムラサキシメジ菌糸体培養濾液由来の植物成長調節物質の探索
Search for plant growth regulation compounds from culture broth of *Lepista sordida*
○住田 真晟[1]、呉 静[2]、崔 宰熏[1,2,3]、平井 浩文[1,2,3]、河岸 洋和[1,2,3] ([1]静大農・応生科、[2]静大・グリーン研、[3]静大院・創造)
○ Masaaki SUMIDA[1], Jing WU[2], Jae-Hoon CHOI[1,2,3], Hirofumi HIRAI[1,2,3], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,3] ([1]Dept. of Appl. Life Sci., Fac. of Agric., Shizuoka Univ, [2]RIGST, Shizuoka Univ, [3]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ)

【目的】

コムラサキシメジ (*Lepista sordida*)は、キシメジ科ムラサキシメジ属の可食性のキノコである。コムラサキシメジは、芝生がリング状に繁茂あるいは枯死した後にキノコが発生するフェアリーリングという現象を起こす菌として知られており、過去に当研究室ではコムラサキシメジ菌糸体培養濾液から、様々な植物体に対して成長調節物質としての活性を示す 2-azahypoxanthine (AHX)および imidazole-4-carboxamide (ICA)を単離している。[1-3)]本研究ではコムラサキシメジ菌糸体培養濾液からのさらなる植物成長調節物質の単離、精製および構造決定を試みた。

【方法・結果】

コムラサキシメジを２週間、YG 培地によって液体培養した。得られた培養液を濾過し、菌体および培養濾液に分けた。培養濾液を *n*−ヘキサン、酢酸エチル、*n*−ブタノールで順次液−液分配、減圧濃縮後エタノールで固−液分配し、各可溶部を得た。得られた酢酸エチル可溶部をフラッシュクロマトグラフィー、HPLC 等を用いて分画し、化合物の単離・精製を試みた。結果として酢酸エチル可溶部から新規化合物を含む数種の化合物の単離に成功した。これらの化合物の構造は MS、IR および各種 NMR スペクトルデータの解析により決定した。これらの単離した化合物を用いて各種活性試験を行い生理活性を調査する予定である。

1) Choi. J-H, H. Kawagishi et al., ChemBioChem 11, 1373-1377 (2010)
2) Choi. J-H, H. Kawagishi et al., J.Agric.Food Chem. 58, 9956-9959 (2010)
3) A. Ito, H. Kawagishi et al., Mycoscience 58, 387-390 (2017)

Lepista sordida, mushroom, structural determination

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3B01a09
講演日時：3 月 27 日 11:08～ 総合学習プラザ B01 会場

サンゴハリタケ（*Hericium coralloides*）由来の生体機能性物質の探索
Search for biofunctional compounds from *Hericium coralloides*
○清宗 大[1]、呉 静[3]、崔 宰熏[1,2,3,4]、平井 浩文[1,2,3,4]、河岸 洋和[1,2,3,4]（[1]静大院・総合農、[2]静大農・応用生物化学科、[3]静大・グリーン研、[4]静大院・創造）
○ Dai KIYOMUNE[1], Jing WU[3], Jae-Hoon CHOI[1,2,3,4], Hirohumi HIRAI[1,2,3,4], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,3,4] ([1]Grad.of Inte.Sci.,Shizuoka Univ., [2]Fac.of Agric.,Shizuoka Univ., [3]RIGST,Shizuoka Univ., [4]Grad.Sch.of Sci.and Tech.,Shizuoka Univ.)

【背景・目的】当研究室では、過去にサンゴハリタケ属であるヤマブシタケ（*Hericium erinaceus*）子実体および菌糸体から認知症の予防や治療への有効性が指摘されている神経成長因子の合成を促す物質として、hericenone 類および erinacine 類を発見し[1-6]、菌糸体培養濾液から HeLa 細胞に対して増殖阻害活性を示す物質として erinapyrone 類および植物成長調節物質として erinaceolactone 類を発見した[7-9]。ヤマブシタケ廃菌床から，小胞体ストレス誘導神経細胞死抑制物質を単離している[10]。そのため，我々は同じサンゴハリタケ属であるサンゴハリタケ（*H. coralloides*）に着目した。

サンゴハリタケは、サンゴハリタケ科サンゴハリタケ属の可食性のキノコである[11]。サンゴハリタケは傘をつくらずサンゴ状に分岐する枝を横ざまにのばし、枝の下面から無数の針を垂らす。全体的に白く、直径の大きさは 10 cm から 20 cm 程度で針の長さは 1 mm から 6 mm であり、日本やヨーロッパ、北アメリカなどでみられる[12]。サンゴハリタケに関する二次代謝産物の研究は少ないため，本研究ではサンゴハリタケ子実体および培養濾液からの機能性物質の単離・精製を目的とした。

【方法・結果】栽培したサンゴハリタケ子実体を凍結乾燥し、乾燥させた子実体（45.9 g）をミキサーで粉砕し，ヘキサン、酢酸エチル、エタノール、水で各 2 回ずつ抽出した。その後、ヘキサン可溶部 (1.5 g) をフラッシュカラムクロマトグラフィー、MPLC、HPLC で分画を進め、化合物の単離・精製を試みた。また、菌糸体を液体培地で振とう培養し、濾過して菌糸体、培養濾液に分け、培養濾液（6 L）をヘキサン、酢酸エチルで液-液分配し、水層を乾固しエタノールで抽出した。培養濾液の酢酸エチル可溶部 (4.83 g) をフラッシュカラムクロマトグラフィーに供し分画を進め、化合物の単離・精製を試みた。その結果、数種の化合物の単離に成功した。これらの化合物の構造は MS、IR および各種 NMR スペクトルにより決定した。今後、これらの化合物の活性試験を行う予定である。

【参考文献】
1) Kawagishi, H. et al., Tetrahedron Lett., 32, 4561–4564 (1991)
2) Kawagishi, H. et al., Phytochem., 32, 175–178 (1993)
3) Kawagishi, H. et al., Tetrahedron Lett., 35, 1569–1572 (1994)
4) Kawagishi, H. et al., Heterocycl. Commun., 2, 51–54 (1996)
5) Kawagishi, H. et al., Tetrahedron Lett., 37, 7399–7402 (1996)
6) Lee, E. W. et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 64, 2402–2405 (2000)
7) Kawagishi, H. et al., Chem. Lett., 21, 2475–2476 (1992)
8) Okamoto, K. et al., Phytochem., 34, 1445–1446 (1993)
9) Wu, J. et al., J. Nat. Prod., 78, 155–158 (2015)
10) Ueda, K. et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 73, 1908‐1920 (2009)
11) Zou, Y. J. et al., J. Microbiol., 50, 72-78 (2012)
12) 今関　六也ら、日本のきのこ、山と渓谷社、432 (1999)

Hericium coralloides, structure determination, mushroom

講演番号：3B01a10
講演日時：3 月 27 日 11:19～ 総合学習プラザ B01 会場

キナメツムタケ子実体由来の生体機能性物質の探索

Search for biofunctional compounds from *Pholiota spumosa*

○横堀 沙英[1]、呉 静[2]、崔 宰熏[1,2,3]、平井 浩文[1,2,3]、河岸 洋和[1,2,3]（[1]静大・農、[2]静大・グリーン研、[3]静大院・創造）
○Sae Yokobori[1], Jing Wu[2], Jae-Hoon Choi[1,2,3], Hirofumi Hirai[1,2,3], Hirokazu Kawagishi[1,2,3] ([1]Fac. of Agric., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ., [3]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ.)

【背景・目的】

キノコの形態や機能は多種多様であり、古くから食用のみならず、生薬あるいは漢方薬として重宝されてきた。そのためキノコから様々な生理作用を示す化合物が数多く単離されている。

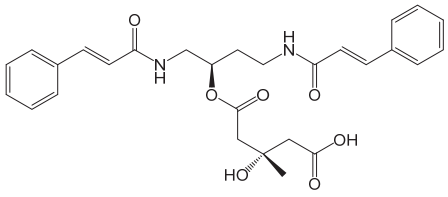
キナメツムタケ（*Pholiota spumosa*）はモエギタケ科スギタケ属に属するキノコで、秋から晩秋にかけて倒木上やその周辺の地上に発生する食用キノコである。子実体から単離された pholiotic acid（**1**）は、前立腺がん細胞の細胞増殖を阻害するという報告があるが、このキノコに関する研究例は非常に少ない[1)]。

本研究では、キナメツムタケの子実体由来の新規機能性物質の探索を目的とした。

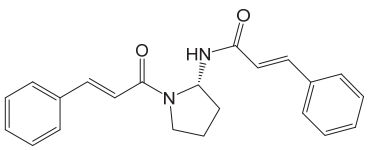
【方法・結果】

キナメツムタケ子実体 17.0 kg を 80%エタノール、アセトンで順次 2 回ずつ抽出、抽出液を減圧濃縮し、粗抽出物を得た。その後、ヘキサンおよび酢酸エチルで順次液-液分配、エタノールで固-液分配し、減圧濃縮後、各可溶部を得た。得られた酢酸エチル可溶部 11.5 g をフラッシュカラムクロマトグラフィー、MPLC、HPLC を用いて分画し、化合物の単離および精製を試みた。

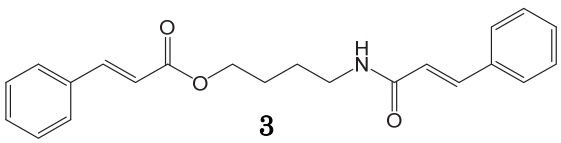
前回大会では酢酸エチル可溶部から 2 種の新規化合物および 2 種の既知化合物（化合物 **2**、**3**）の単離を報告した。今回、酢酸エチル可溶部からさらに数種の化合物の単離に成功した。単離された化合物の構造は MS、IR および各種 NMR スペクトルデータの解析によって決定した。現在、これらの化合物を各種活性試験に供している一方で、更なる化合物の単離を試みている。



1



2



3

1) Marco C, *et al*., *Eur. J. Org. Chem.*, 33, 5551-5559 (2007)

Pholiota spumosa, mushroom, structural determination

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3B01a11
講演日時：3 月 27 日 11:40～ 総合学習プラザ B01 会場

白きょう病菌（*Beauveria bassiana*）由来の生物活性物質

Search for bioactive compounds from *Beauveria bassiana*

○日比 琢斗[1]、呉 静[2]、崔 宰熏[1,2,3]、道羅 英夫[2]、平井 浩文[1,2,3]、河岸 洋和[1,2,3]（[1]静大院・総合農、[2]静大・グリーン研、[3]静大院・創造）
○Takuto HIBI[1], Jing WU[2], Jae-Hoon CHOI[1,2,3], Hideo DOHRA[2], Hirofumi HIRAI[1,2,3], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,3] ([1]Grad. Sch. of Inte. Sci and Tech., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ., [3]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ.)

[目的]

冬虫夏草として知られている白きょう病菌（*Beauveria bassiana*）はバッカクキン科 *Beauveria* 属の昆虫病原性真菌で、世界中の土壌で自然に生育し、カイコ（*Bombyx mori*）などの様々な節足動物種に寄生する。シロアリやアブラムシなどの害虫を防除するための生物学的殺虫剤として使用されている [1)]。またトマトやトウモロコシなどの植物体で、自然状態もしくは人工接種試験においてエンドファイトとして作用することも明らかとなった [2)]。カイコに分生子を注入した実験では、*B. bassiana* の NBRC 103747 株は子実体を形成せず、我々が分離した No.1 株はカイコから子実体を形成した。両菌の分生子を同量注入した場合は子実体を形成しなかった。このことより、*B. bassiana* が産生する生物活性物質が子実体形成に影響を与えた可能性が示唆された。また、*B. bassiana* 子実体から二次代謝物質についての研究報告はこれまでされていない。そこで本研究では、カイコから栽培した *B. bassiana* No.1 株子実体からの子実体形成に関与する物質、あるいは新規生物活性物質の探索を目的とした。

[方法・結果]

我々の研究グループでは No.1 株を単離・同定した。No.1 株の菌糸体を 2 週間 Potato Dextrose Agar (PDA) 培地で前培養し、前培養後の PDA 培地に界面活性剤の一種である Tween20 を加え遠心分離を行い、分生子のみを分離した。分生子を 1.0×10^5 (cells/mL) の濃度に調整し、調整した分生子 25 μL をカイコへ直接接種した。その後カイコを 11 週間栽培し、子実体を凍結乾燥した。乾燥子実体をミキサーで粉砕し、ヘキサン、酢酸エチル、アセトン、エタノールおよび水で順次抽出した。各画分を減圧濃縮後、23.3 g の酢酸エチル可溶部を得た。酢酸エチル可溶部をフラッシュカラムクロマトグラフィー、MPLC、HPLC を用いて分画し、新規化合物を含む数種の化合物を単離した。これらの化合物の構造は MS、IR および各種 NMR スペクトルにより決定した。今後、各種活性試験を行う予定である。

参考文献

1) Samish, M.; Ginsberg, H.; Glazer, I. *Parasitology*, 129, S389-403 (2004)

2) 蚕糸・昆虫バイオテック 小池正徳・相内大吾 82（3）、169－173（2013）

bioactive compounds, *Beauveria bassiana*, structure determination

講演番号：3B01a12
講演日時：3 月 27 日 11:51～ 総合学習プラザ B01 会場

Pestalotiopsis microspora が生産する新規神経保護物質の単離と構造解析
Novel neuroprotective hydroquinones with a vinyl alkyne from the fungus, *Pestalotiopsis microspora*

○菅野 和紀[1]、鶴川 幸音[1]、柴崎 久宜[1]、井口 恵太[1]、村上 裕信[1]、内山 淳平[1]、倉持 浩司[2]、紙透 伸治[1] ([1]麻布大獣医、[2]東理大理工)
○Kazuki KANNO[1], Yukine TSURUKAWA[1], Hisanobu SHIBASAKI[1], Keita IGUCHI[1], Hironobu MURAKAMI[1], Jumpei UCHIYAMA[1], Kouji KURAMOCHI[2], Shinji KAMISUKI[1] ([1]Azabu Univ., [2]Tokyo University of Science)

真菌の二次代謝産物は様々な生理活性を有しており、医薬品や農薬などの開発を目的に研究されている。我々は真菌の二次代謝産物から天然有機化合物ライブラリーを作製し、様々な生理活性試験を行うことで新規生理活性物質を探索している。今回、Pestalotiopsis microspora の培養液中から神経細胞保護活性を有する新規キノールを単離、構造決定したので報告する。

日本各地の海洋や土壌で動植物を採取し、付着している真菌を単離し、液体培地で約 3 週間培養した。培養液をジクロロメタンで抽出し、粗抽出物をシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィーにより分画した。得られたフラクションをライブラリー化し、様々な活性試験を行った。その結果、神奈川県で採取した葉より分離した P. microspora が生産する化合物がラット副腎褐色細胞腫 PC12 に対して保護活性を持つことが示唆された。そこで、活性を示すフラクションを精製し、1D/2D NMR、MS、IR などにより解析した。その結果、ビニルアルキンとハイドロキノン構造を有することが明らかになった（図１）。この化合物はこれまでに報告のない新規の構造であったため、pestalotioquinol A, B と名付けた。また、絶対配置を決定するためにハイドロキノン部位をメチル化後、10’位のヒドロキシ基を MTPA エステル化し、10’位の絶対配置を R と決定した。

Pestalotioquinol の生理活性試験は神経様細胞に分化させた PC12 を用いた。PC12 を pestalotioquinol 存在下で 24 時間培養後、ペルオキシナイトライト供与体である 3-morpholinosydnonimine（SIN-1）を用いて細胞障害を誘導した。その後、乳酸テヒドロゲナーゼ（LDH）アッセイにより細胞傷害性を確認し、神経細胞を保護するか検討した。その結果、pestalotioquinol A, B は SIN-1 によって誘導される細胞傷害を有意に抑制した[1]。

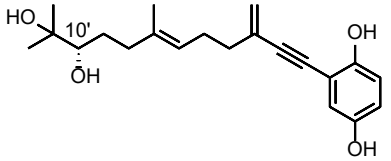


図１　pestalotioquiino A の構造

[1] Kanno K, Tsurukawa Y, Kamisuki S, Shibasaki H, Iguchi K, Murakami H, Uchiyama J, Kuramochi K. Novel neuroprotective hydroquinones with a vinyl alkyne from the fungus, Pestalotiopsis microspora. J. Antibiot.72:793-799. 2019

fungal metabolite, hydroquinone derivative, neuroprotective agent

発表責任者：紙透伸治（kamisuki@azabu-u.ac.jp）

講演番号：3B01a13
講演日時：3 月 27 日 12:02～ 総合学習プラザ B01 会場

ヘム重合阻害を指標とした微生物代謝産物からの抗マラリア活性物質の探索

Search for antimalarial active substances from microbial metabolites using heme polymerization inhibition

○清水 優希[1]、石山 亜紀[1,2]、小池 李茉[3]、渡邊 善洋[2]、穂苅 玲[2]、岩月 正人[1,2]、大村 智[2]([1]北里大学感染制御科学府、[2]北里生命化学研究所、[3]北里大学理学部化学科)
○Yuki SHIMIZU[1], Aki Ishiyama[1,2], Rima Koike[3], Yoshihiro Watanabe[2], Rei Hokari[2], Masato Iwatsuki[1,2], Satoshi Omura[2] ([1]Graduate School of infection Sciences, Kitasato Univ., [2]Kitasato institute for Life Sciences, Kitasato Univ., [3]Department of Chemistry, Kitasato Univ.)

【背景・目的】

マラリアはハマダラカの吸血により媒介される原虫感染症である。マラリア原虫は赤血球内に侵入しヘモグロビンを食胞で分解することでアミノ酸の供給源として利用している。ヘモグロビンの分解により遊離するヘムは単量体では原虫に毒性を示すため、ヘムの重合体であるヘモゾインを形成し食胞内に蓄積することで無毒化している。既存薬の chloroquine や amodiaquine の抗マラリア作用標的の一つはヘムの重合阻害であると考えられているが、これらの既存薬に薬剤耐性を獲得した熱帯熱マラリア原虫の蔓延が問題となっている。本研究では、大村天然化合物ライブラリーを用い、ヘム重合阻害活性を指標とした抗マラリア活性物質の探索を行った。また所属機関内で供給された微生物培養液からは新規骨格を有するヘム重合阻害物質の探索を行った。

【方法および結果】

ヘム重合阻害活性は図 1 に示した評価方法で行った。ヘム重合阻害活性を示した化合物は熱帯熱マラリア原虫の薬剤耐性 K1 株、感受性の FCR3 株に対する抗マラリア活性、およびヒト正常線維芽細胞（MRC-5）に対する細胞毒性を評価した。大村天然化合物ライブラリー634 検体中 83 化合物にヘム重合阻害活性が確認された。そのうち 38 化合物が抗マラリア活性を示した。ヘム重合阻害活性を示した化合物の多くは平面性の高い特徴的な部分構造（キサントン、ナフトキノン、アンスラキノン骨格など）を共通に持っていることが明らかになった。

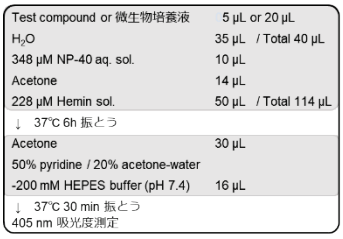


図 1 ヘム重合阻害活性評価

微生物培養液の探索からは、糸状菌 *Sepedonium chrysospermum* FKI-9083 株が選択された。本株の培養液を用いて ODS カラムクロマトグラフィー、および HPLC 精製により活性物質として FKI-9083-a (13 mg)、FKI-9083-b (15 mg) 取得した（図 2)。各種 NMR、ESI-MS を用いて解析した結果、両物質を新規化合物であると推定した。

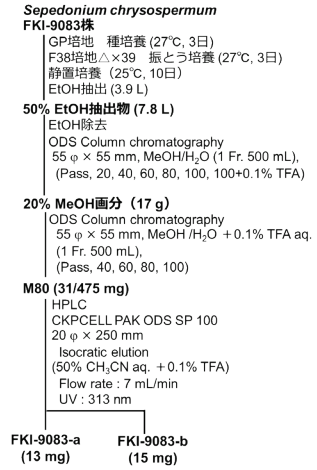


図 2 FKI-9083 物質の発酵及び精製

Microbial metabolites, Malaria, Fungal

発表責任者：岩月正人（iwatuki@lisci.kitasato-u.ac.jp）

講演番号：3B01p01
講演日時：3 月 27 日 13:50～ 総合学習プラザ B01 会場

担子菌類 *Aleurodiscus grantii* が生産する植物幼苗根伸長阻害物質の同定
Identification of root growth inhibitors in *Aleurodiscus grantii*
山口 諒[1]、石原 亨[2]、○上野 琴巳[2] ([1]鳥取大院農、[2]鳥取大農)
Makoto YAMAGUCHI[1], Atsushi ISHIHARA[2], ○Kotomi UENO[2] ([1]Grad. Sch. Sust. Sci., Tottori Univ., [2]Fac. Agric., Tottori Univ.)

大型の子実体を形成する担子菌類「きのこ」から、これまでに様々な生理活性物質が単離されてきた。しかし探索対象となったきのこは全体のごく一部であり、更に多くのきのこを対象とすれば、新奇の生理活性物質を得られる可能性がある。そこで、鳥取大学農学部付属菌類きのこ遺伝資源研究センターのきのこ抽出物ライブラリーを用いて、植物の生育に影響を及ぼす物質の探索を行った。

ホワイトクローバー、シバ、およびネナシカズラ種子を用い、発芽および根の伸長阻害活性を指標に 76 種類のきのこ培養ろ液抽出物をスクリーニングしたところ、*Aleurodiscus grantii* が選抜された。*A. grantii* をモルト液体培地（5 L）で約 3 ヶ月間静置培養したのち、菌体と培地をろ別して培地を酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル抽出物を順相と逆相のカラムクロマトグラフィーで分画し、活性成分をホワイトクローバー幼苗根伸長阻害試験で追跡した。活性成分を分取 HPLC で精製し、幼苗根伸長阻害物質 **1**（8.7 mg）および **2**（0.4 mg）を単離した。

NMR 分析および有機合成から、化合物 **1** と **2** はそれぞれ、アミノ酸のプロリンを含む環状ジペプチドの cyclo(L-Pro-L-Tyr)（maculosin）、cyclo(L-Pro-L-Trp)（brevianamide F）と同定した。化合物 **1** と **2** は、ホワイトクローバーだけでなくニンジン、レタス、キャベツ、イネ、シコクビエの根の伸長を濃度依存的に阻害した。阻害活性は化合物 **2** の方が高く、ホワイトクローバーに対する化合物 **2** の IC_{50} は 3.2 μM であったのに対し、化合物 **1** は 2.9 mM であった。化合物 **1** は、オーキシン様活性を示すという報告（Castro et al., 2011）があったことから、カイワレダイコンを用いて胚軸伸長促進活性試験を行ったが、化合物 **1** と **2** はともに胚軸伸長に影響を及ぼさなかった。このことから、化合物 **1** と **2** は、オーキシンとは異なった作用機構で根の伸長を阻害している可能性が示唆された。

mushroom, diketopiperazine, root growth inhibitor

発表責任者：上野　琴巳（kotoueno@tottori-u.ac.jp）

講演番号：3B01p02
講演日時：3 月 27 日 14:01～ 総合学習プラザ B01 会場

放線菌異種発現による verticilactam 新規類縁体の生産と単離・構造決定

Structures of new verticilactam derivatives by heterologous expression

○野川 俊彦[1]、寺井 淳高[1]、新家 一男[2]、池田 治生[3]、高橋 俊二[4]、長田 裕之[1]（[1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー、[2]産総研、[3]北里大・生命研、[4]理研 CSRS・天然物生合成）
○ Toshihiko NOGAWA[1], Atsutaka TERAI[1], Kazuo SHIN-YA[2], Haruo IKEDA[3], Shunji TAKAHASHI[4], Hiroyuki OSADA[1] ([1]RIKEN CSRS Chem. Biol., [2]JBIC, [3]Kitasato Univ., [4]RIKEN CSRS Nat. Prod. Biosynth.)

【背景と目的】微生物の二次代謝産物は、その多様な構造と活性から医薬品や農薬またはそのリード化合物として重要である。ケミカルバイオロジー研究におけるバイオプローブとして利用されている化合物も多い。微生物が作り出す様々な新規骨格は、生合成や化学合成研究において新たな発見のヒントになることが多い。我々の研究室では、微生物から様々な活性や構造を有する二次代謝産物を単離・構造決定している。特に、構造に着目したスクリーニングにより特徴的な新規骨格を有する化合物を単離している。放線菌 *Streptomyces spiroverticillatus* JC-8444 より単離した verticilactam は、16 員環マクロラクタム中にβ-keto-amide 構造を有し、デカリン、テトラヒドロフランが縮合した特徴的骨格を有する（*Org. Lett.* **12**, 4564, 2010）。しかし、その生産量は少なく十分な生物活性を評価することが困難であった。また、化合物探索中に類縁体と思われる化合物を見出していたが、生産量の問題から単離には至らなかった。一方、我々の研究室では異種発現による微量代謝産物の生産を検討している。その中で、verticilactam およびその類縁体の生産を確認することができた。本発表ではそれら類縁体の単離、構造確認および生物活性評価を行った。

【方法と結果】*S. spiroverticillatus* JC-8444 のゲノム解読を行い、PKS モジュールやドメイン構成から verticilactam 生合成遺伝子クラスターを推定した。次に、生合成遺伝子クラスター全長を有する BAC ベクターを構築し、二次代謝産物生産能に優れる *Streptomyces avermitilis* SUKA17 株（*Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 2646, 2010）を形質転換した。さらに、verticilactam 生合成遺伝子クラスターに存在する LAL ファミリー転写制御因子遺伝子（*SSP_1550*）を導入することによって生産向上を検討した。得られた形質転換体を verticilactam 生産培地により 28°C で 5 日間培養を行なった。培養液の酢酸エチル抽出物を各種クロマトグラフィーを繰り返し行うことにより verticilactam を単離した。さらに、LC/MS 分析において類似の UV およびマスナンバーを有する新規類縁体と思われるピークを verticilactam 近傍に２種検出した。これらについてもそれぞれ単離・精製を行なった。これらは高分解能質量分析の結果より、どちらも verticilactam と同様の分子式 $C_{25}H_{33}NO_5$（found 428.2428 $[M+H]^+$, both compounds showed identical mass number, calculated for $C_{25}H_{34}NO_5$, 428.2437）を有することが示された。これらの構造について NMR を用いて詳細に確認した。その結果、これらの構造を verticilactam と同様の平面構造を有し、マクロラクタム中の二重結合の立体が異なる新規立体異性体であると決定した。得られた新規異性体とともに verticilactam も含めて各種生物活性を検討した。

microbial metabolite, structure elucidation, heterologous expression

講演番号：3B01p03
講演日時：3 月 27 日 14:12～ 総合学習プラザ B01 会場

インドネシア産樹木内生菌が生産する新規二次代謝産物の探索

Search for new secondary metabolites produced by endophytic fungi from Indonesia

○末広 航、小関 卓也、塩野 義人 (山形大学農)
○Wataru SUEHIRO, Takuya KOSEKI, Yoshihito SHIONO (Yamagata Univ.)

［背景・目的］

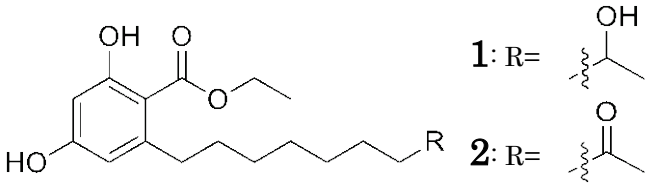
我々のグループでは、これまでに微生物の生産する新しい生理活性物質について、幅広くスクリーニングしてきました。その過程で得られた植物内生菌 GC16022 株が、他の菌より、比較的多くの二次謝産物を生産していたので、本研究では、本菌の生産する二次代謝産物を明らかにすることにした。

［方法］

分離糸状菌 GC16022 株を玄米培地で培養後、その MeOH 抽出物を EtOAc で分画した。その後、得られた抽出物を TLC 上のスポットを指標に各種クロマトグラフィーを用いて精製し、化合物 1～7 を単離した。

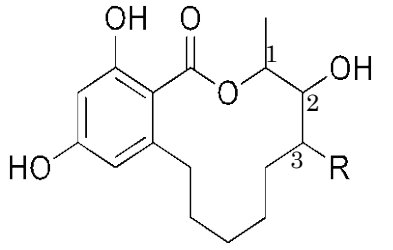
［結果］

化合物 **1** は NMR スペクトルデータ解析の結果、2,4-ジヒドロキシ安息香酸エステルとヒドロキシ基を持つ炭素数 9 の側鎖を部分構造にもつ既知化合物であった。化合物 **2**, **3**, **6** についても、同様に構造を解析した結果、2,4-ジヒドロキシ安息香酸を基本骨格とした既知物質であった。また、化合物 **4** と **5** については、デプシドン骨格を有する既知物質であった。一方、化合物 **7** は、NMR スペクトルデータを解析した結果、**6** の 3 位にヒドロキシ基を有する新しい類縁体であった。相対立体配置については、**7** のアセトナイド誘導体を用いた 差 NOE 実験により明らかにした。

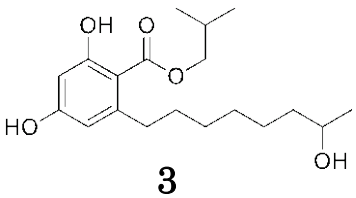


1: R=

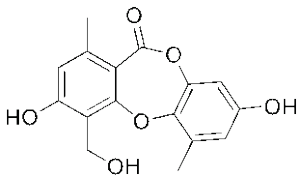
2: R=



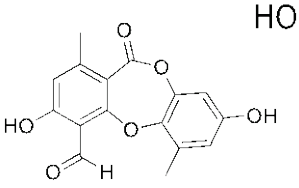
6: R=H **7**: R=OH



3



4



5

Natural product chemistry, Organic chemistry, Microbiology

講演番号：3B01p04
講演日時：3 月 27 日 14:23～ 総合学習プラザ B01 会場

インドネシア産樹木より分離した糸状菌 GI-1005 株が生産する代謝産物について
Metabolites produced by the fungus GI-1005 isolated from Indonesian trees.

○佐藤 志帆、小関 卓也、塩野 義人 (山形大農)
○Shiho SATO, Takuya KOSEKI, Yoshihito SHIONO (Yamagata Univ.)

【背景・目的】

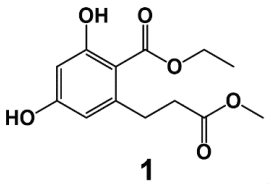
これまでに植物内生菌を由来とする抗菌活性や細胞毒性を示す有用物質が数多く発見されてきた。我々のグループでは熱帯地域に生息する植物内生菌の二次代謝産物に着目し、それらから新しい構造を持つ化合物の探索を行っている。本研究では、インドネシア産樹木より分離した糸状菌 GI-1005 株が生産する新しい構造を持つ化合物について報告する。

【方法】

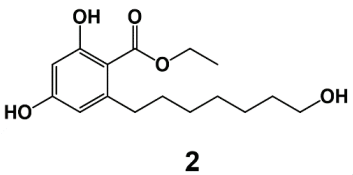
玄米培地を用いて 25℃で、30 日間培養した GI-1005 株の培養物を MeOH で抽出した。得られた MeOH 画分を EtOAc で分配した後、有機層を TLC 上での発色を指標に各種カラムクロマトグラフィーにより精製した結果、化合物 **1** ～ **3** を単離することができた。続いて、それぞれの NMR スペクトルデータを用いて、各化合物の構造解析を行った。

【結果】

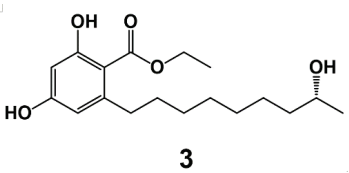
化合物 **1** の ^{13}C-NMR と DEPT スペクトルデータより、2 個のメチル、3 個のメチレン、2 個のメチン、4 個の四級炭素、2 個のエステルに帰属されるスペクトルが観測された。また、^{1}H-NMR と二次元 NMR の解析により、**1** は分子内にベンゼン環、エチルエステル、プロピオン酸メチルを部分構造に有することが分かった。さらに、HMBC 実験より得られた相関をもとに、これらを連結させ、**1** の構造を決定した。化合物 **2** は **1** と同様に、^{13}C-NMR、DEPT スペクトルデータにより 1 個のメチル、8 個のメチレン、2 個のメチン、4 個の四級炭素、1 個のエステルに帰属されるスペクトルが観測された。さらに、^{1}H-NMR と二次元 NMR の解析により、**1** の部分構造であるエチル-3,5-ジヒドロキシベンゾエートと 1-ヘプタノールを有することが分かり、次に、HMBC 相関により、それらを連結させ、**2** の構造を決定した。化合物 **3** は、既知物質のエチル-3,5-ジヒドロキシ-7-(8-ヒドロキシナノイル)ベンゾエートであった。



1



2



3

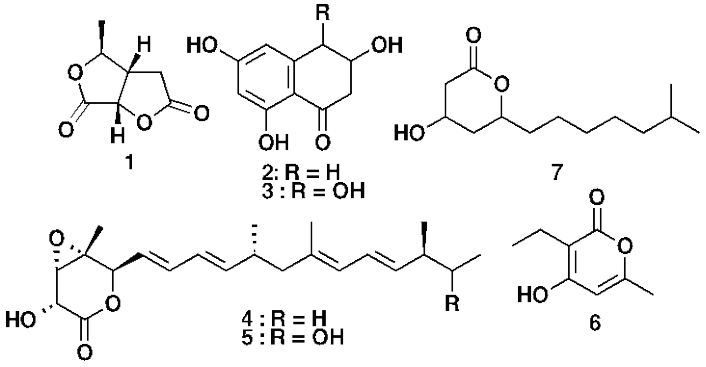
natural product, endophyte, structure analysis

講演番号：3B01p05
講演日時：3 月 27 日 14:34～ 総合学習プラザ B01 会場

ナラ菌 Raffaelea quercivora が生産する二次代謝産物について
New secondary metabolites from Raffaelea quercivora
○塩野 義人、中村 智紀、小関 卓也 (山形大農)
○Yoshihito SHIONO, Tomoki Nakamura, Takuya Koseki (Yamagata Univ.)

目的】「ナラ枯れ」とは、ブナ属を除く日本のブナ科樹木であるコナラやミズナラ、シイ、カシなどに発生する伝染病である。ナラ枯れの病原菌（ナラ菌: *Raffaelea quercivora*）は、幹に穴を開け入り込むカシノナガキクイムシにより、持ち込まれ、樹木内で広がり、やがて導管を塞ぎ、水分吸収が阻害される。そのため、葉が急激に萎れて変色し、枯死する。全国のナラ枯れ被害量は、年々、減少しているが、一部地域では被害が増加している。一方、防除法に関しては、カシノナガキクイムシの侵入を防ぐ、粘着剤等の塗布またはビニールシートの被覆の実施や殺菌剤の樹幹への注入方法がとられているが、ナラ枯れ病の詳細な発病メカニズムは不明な点が多く、完全に除去する方法はない。

我々のグループでは、ナラ菌に対する生育阻害物質を植物内生菌類に求めて探索し、数種の菌類がナラ菌に対して生育抑制作用を有することを明らかにしてきた。また、その過程において、ナラ菌が生産する生理活性物質についても、数種の培養培地の抽出物を対象に探索してきた。本研究では、ナラ菌の培養培地に「ナラの木屑」を添加することにより顕著に生産誘導される二次代謝産物に着目し、それらを明らかにすることにした。



【方法と結果】玄米培地（60 g x 6） にナラの木屑（各 5 g）を添加して、25℃で、30 日間培養した。培養物抽出物を各種カラムクロマトグラフィーにより精製し、化合物 **1～6** を得た。NMR スペクトルデータから、**1** は 二環式の γ-ラクトンを基本骨格とした新規化合物であった。化合物 **2** と **3** は既知のシタロン類であった。化合物 **4** と **5** は δ-ラクトン環にエポキシ環を有したナフレディンとその新類縁体であった。化合物 **6** は、既知の 2-ピロンの誘導体であり、**7** は、δ-ラクトン誘導物質であった。今回得られた物質については、ナラの幼苗に対する萎凋作用を示さなかったが、レタスの根に対して弱い伸長阻害作用を示した。

Raffaelea quercivora, Nafuredin, Plant disease

発表責任者：塩野義人（yshiono@tds1.tr.yamagata-u.ac.jp）

講演番号：3B01p06
講演日時：3 月 27 日 14:45～ 総合学習プラザ B01 会場

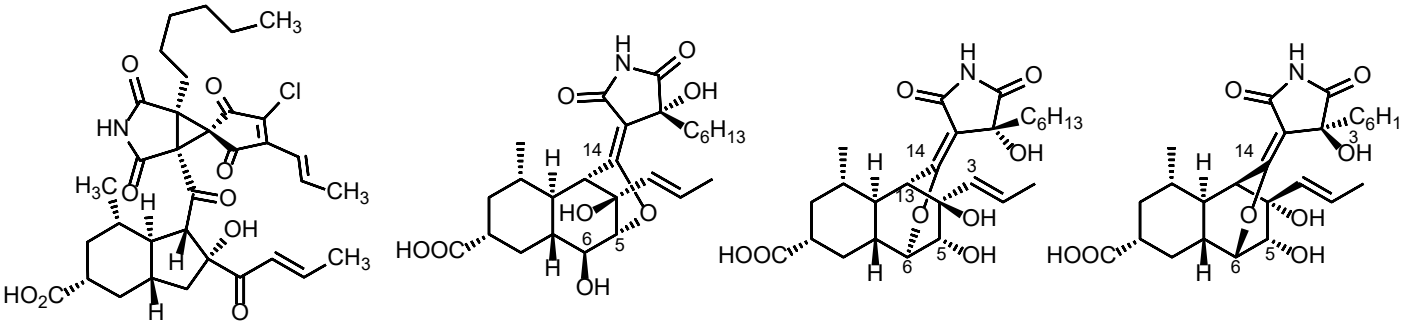
Cyclohelminthol CP3 の構造
Staructure of Cyclohelminthol CP3

○橋本 勝、猪瀬 航太、田中 静也、殿内 暁夫（弘前大農生）
○Masaru HASHIMOTO, KOTA INOSE, SHIZUYA TANAKA, AKIO TONOUCHI (Hirosaki Univ.)

我々は、これまでに真菌 *Helminthosporium velutinum* yone96 培養液から、cyclohelminthol X (1), cyclohelminthol CP2 (**2**)など、構造的に興味深い抗真菌化合物を単離報告してきた[1,2]。培養液をさらに探索したところ、新たに cyclohelminthol CP3 (**3**)と命名した新たな関連物質を単離した。

3 は ESIMS スペクトルにおいて明瞭な分子イオンシグナルを与えなかったが、二量体イオン(*m/z* 964.5165)や脱水体イオン(*m/z* 474.2498)などから、分子式を **2** と同じ $C_{26}H_{37}NO_8$ と決定した。^{13}C NMR スペクトルで 23 本のシグナルを観測しこれを確認した。^{1}H NMR スペクトルは **2** のそれとは類似点も見られたが、$^{2}J_{H\text{-}5/H\text{-}6}$ について **2** と **3** では 0 Hz, 3.0 Hz と顕著な違いも見られた。二次元 NMR スペクトルを詳細に解析したところ、14 位エノール酸素が 6 位で結合したテトラヒドロピラン誘導体であることが判明した。しかし、通常のスペクトル解析ではジアステレオマー**3'**の可能性も否定できなかった。

そこで **3** の ^{13}C 化学シフトを、9 位カルボキシル基などを省略したモデルを用いて DFT 法による計算値との差異の二乗平均平方根を比較したところ、**3** は 2.24 ppm、**3'**は 3.94 ppm となり、前者を支持した。また、H-13 と C-3 との間に中程度の強度で HMBC 相関を観測したが、**3** のモデルでは $^{3}J_{H\text{-}13/C\text{-}3}$ が 3.0 Hz と矛盾しないが、**3'**のモデルでは 1.3 Hz と小さく HMBC 相関を期待できない。以上のことから **3'**の可能性を除外した。絶対配置については ECD スペクトルを DFT 計算で再現することにより決定した。発表ではこれの推定生合成経路などについても言及する。



1) Hashimoto M. et al., *J. Org. Chem.* **2017**;*82*, 5574.
2) 田中静也ら、2019 年日本農芸化学会大会要旨集 1D5p09

cyclohelminthol, DFT calculation, C-H spin coupling calculations

発表責任者：橋本勝（hmasaru@hirosaki-u.ac.jp）

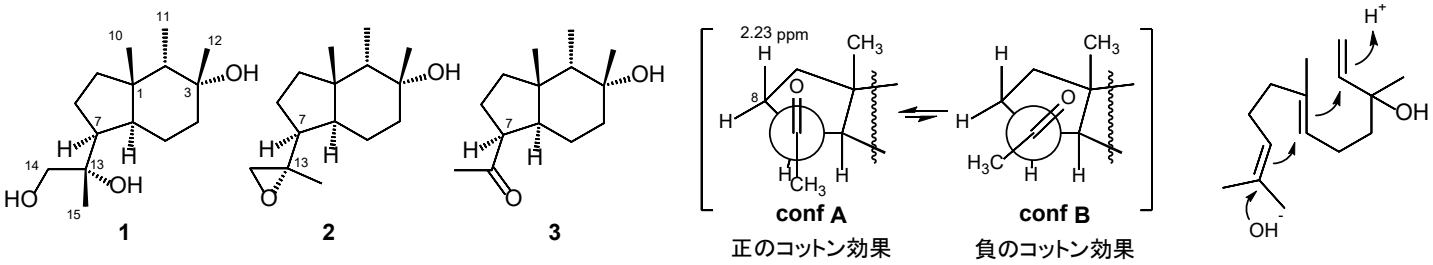
講演番号：3B01p07
講演日時：3 月 27 日 15:06～ 総合学習プラザ B01 会場

Seiridium sp. から単離した新規セスキテルペン

A new sesquiterpene isolated from *Seiridium* sp.

○西山 真未、田中 和明、橋本 勝 (弘前大学)
○Mami Nishiyama, Kazuaki Tanaka, Masaru Hashimoto (Hirosaki Univ.)

我々は、「興味深い生態を持つ微生物は特異的な二次代謝物を活用している」との仮説の下、微生物研究者が研究対象とする微生物の成分検索を行ってきた。今回、ミズキ科山茱萸から見出された真菌 *Seiridiumu* sp. KT3957 の培養液より新規セスキテルペン **1** を単離、絶対構造を含めて決定した。



1 の Na 付加体を *m/z* 279.1912 に観測し、また ^{13}C NMR スペクトル 15 本のシグナルを観測、分子式 $C_{15}H_{28}O_3$ を決定した。二次元 NMR スペクトルを詳細に解析したところ、bicyclo[4.3.0]nonane 骨格を有するこれまでにないセスキテルペンであることが判明した。環状構造の相対立体化学は結合定数及び NOE から推定した。^{13}C 化学シフトを DFT 計算値と比較したところ、(7*S**,13*S**)-体では RMS が 0.88 ppm で、 (7*S**,13*R**)-異性体は 1.16 ppm であり、どちらかというと前者を支持した。側鎖配座自由度を制限したエポキシド **2** に変換して、同様に比較したところ、その RMS 値は(7*S**,13*S**)-体は 0.81 ppm、(7*S**,13*R**)-異性体は 1.23 ppm と矛盾しない。また、**2** は H-7/C-13 間に強い HMBC 相関シグナルを与えたが、その理論 $^2J_{\text{H-7/C-13}}$ 値は、(7*S**,13*S**)-体の場合-5.4 Hz と相関を十分に説明するが、(7*S**,13*R**)-異性体では-1.7 Hz とこれを説明することができないことから、上記の帰属を補足した。

1 は絶対配置決定に適切な官能基、発色団を持たないことから、過ヨウ素酸酸化により、メチルエステル **3** に変換した。

得られた **3** は 280 nm 付近に正のコットン効果を与えた。計算では、カルボニル基の位置がこのコットン効果を左右し、配座 A が正のコットン効果を与え安定であることが判明した。また Hβ-8 のプロトンが顕著に非遮蔽されたことより、NMR スペクトルからもこの配座を支持する。以上のことから 7*S*-enantiomer であると決定した。

1 はこれまでに体炭素骨格を持つがネロリドールの環化でその生合成を説明できる。

Seiridium sp., Sesquiterpene, bicyclo[4.3.0]nonane framework

講演番号：3B01p08
講演日時：3 月 27 日 15:17～ 総合学習プラザ B01 会場

Stenotrophomonas maltophilia KMM 349 株が産生するシデロフォア解析
Analysis of siderophore produced by *Stenotrophomonas maltophilia* KMM 349
○久富 敦[1]、志波 優[2]、藤田 信之[2]、越野 広雪[3]、田中 尚人[1,2]([1]東農大院環境共生、[2]東農大生命、[3]理研 MSCU)
○ Atsushi HISATOMI[1], Yuh SHIWA[2], Nobuyuki FUJITA[2], Hiroyuki KOSHINO[3], Naoto TANAKA[1,2] ([1]Ariculture Univ. Environmental symbiosis, [2]Ariculture Univ. Fermentation, [3]Riken Center For Sustainable Resource Science)

<目的> *Stenotrophomonas maltophilia* は海中や土壌中、植物などの自然環境に広く生育し、日和見感染菌としても知られている。菌血症、肺炎、尿路感染症など様々な感染症の原因菌として知られており、死亡例もいくつか報告されている。人体に感染した際に遊離した鉄を獲得する事が困難なため、本種は鉄キレート物質であるシデロフォアを産生することが報告されているが詳細は明らかにされていない。シデロフォアとは、三価の鉄に対し高親和性を示すキレート物質であり、様々な植物や微生物が鉄欠乏時に産生し、鉄の獲得を行う。その構造はキレート部位の特徴により catecholate、phenolate、carboxylate、hydroxamate の 4 つのタイプに分類される。2019 年 *S. maltophilia* KMM 349 株が catecholate type のシデロフォアを産生する事が報告された[1)]が未だにその構造は明らかではない。*S. maltophilia* 株が産生するシデロフォアの構造を明らかにする事で、*S. maltophilia* に感染した際の有効な抗菌薬などの開発につながる可能性がある。
そこで本研究では *S. maltophilia* KMM 349 株が産生するシデロフォアの同定を目的とする。
<実験方法>*S. maltophilia* KMM 349 株のゲノム配列を決定するため MiSeq および MinION によりシークエンシングした。その後 Unicycler v.0.4.7 によりアセンブルしゲノム全長の配列を決定した。また KEGG を用いてシデロフォア合成遺伝子を探索した。また *S. maltophilia* KMM 349 株が産生するシデロフォアをイオン交換クロマトグラフィー、逆相 HPLC により単離、精製し LC/MS による分子量、分子式推定をした。その後 NMR により産生されるシデロフォアの構造を決定した。
<結果>シデロフォア合成遺伝子を探索した結果、*S. maltophilia* KMM 349 株はエンテロバクチン産生株である *Escherichia coli* K-12 株と同じ遺伝子群を有していたが、*entD* のみが欠失している事が明らかとなった。また KEGG に登録されている *S. maltophilia* 9 株も *entD* が欠失していた。*entD* は最終的にエンテロバクチン前駆体を環化する *entB*, *entF* を活性化する役割が報告されているため *S. maltophilia* はエンテロバクチン前駆体の環化ができない事が推測された。*S. maltophilia* KMM 349 株が産生するシデロフォアのは LC/MS 分析の結果 *m/z* =240 の化合物であった。NMR によりその構造は 2,3-dihydroxybenzoylserine である事が明らかとなった。ゲノムの情報を合わせることで *S. maltophilia* の 2,3-dihydroxybenzoylserine は *entD* の欠失によって産生される事が考えられた。1) 久富ら 2019 年度日本農芸化学会年次大会 2C20p15

Siderophore, Stenotrophomonas maltophilia, Genome analysis

発表責任者：久富敦（isuta444@gmail.com）

講演番号：3B01p09
講演日時：3 月 27 日 15:28～ 総合学習プラザ B01 会場

アゾール環含有ペプチド coryneazolicin の異宿主生産と生理活性

heterologous production of azole rings-contained peptide coryneazolicin and its biological activity

○小谷 真也[1,2]、田熊 桃子[1]、長野 裕樹[1]、KAWEEWAN Issara[2]、逸見 光[3]、大吉 崇文[1,2]（[1]静大院・総合、[2]静大院・創造、[3]農研機構・食品部門）
○ Shinya KODANI[1,2], Momoko TAKUMA[1], Yuki NAGANO[1], Issara KAWEEWAN[2], Hikaru HEMMI[3], Takanori OYOSHI[1,2] ([1]Grad. Sch. Int. Sci. Tech., Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Tech., Shizuoka Univ., [3]Food Research Institute, NARO)

［目的］本研究の目的は、放線菌 *Corynebacterium urealyticum* のゲノムに存在する coryneazolicin(CZN)の生合成遺伝子クラスターを大腸菌に導入し異宿主生産を行うことである。発現生産を試みた物質 coryneazolicin は、plantazolicin (PZN) の類縁体であり、RiPPs のサブクラスの 1 つである Linea Azole contaning Peptides: LAPs に分類される。coryneazolicin に関して in vitro での酵素を用いた合成は報告されているが [1]、生理活性の報告はない。そこで、coryneazolicin の生理活性を明らかにすることを目的として異宿主生産を行った。
［方法］ まず、coryneazolicin 生合成遺伝子クラスター（約 6000bp）を PCR 法で増幅後、発現ベクターpET28a に組み込んだ。最終的に、大腸菌 *Eshcherichia coli* BL21 (DE3)に形質転換を行い、改変 Basal 寒天培地を用い、23℃で 5 日間培養を行った後に、スパーテルで菌体を回収し、約 2 倍量の MeOH で抽出を行った。抽出液を遠心分離し、HPLC および ESI-MS により分析を行った。
［結果］抽出液を分析したところ、プロテアーゼによって切断が不完全な中間体およびデメチル体の生産が確認された。これは、遺伝子クラスター内のメチル化酵素およびプロテアーゼが完全に作用していないことが考えられた。そこで、PZN 生合成遺伝子のメチル化酵素およびプロテアーゼの遺伝子を pACYC-Duet ベクターに組み込み、遺伝子クラスターを組み込んだ pET28a と共に大腸菌に形質転換し、共発現を試みたところ、完全な CZN の生産に成功した [1]。化学構造を ESI-MS および NMR で確認し、CZN の構造が報告されたものと同じであることを確認した。活性試験の結果、抗菌活性および細胞毒性が見られた。また、CZN は、HCT116 および HOS ガン細胞に対してアポトーシスを引き起こすことが明らかとなった [2]。
［文献］
1. Deane CD *et al. ACS Chem. Biol*. ;11(8):2232-43 (2016).
2. Takuma *et al. J. Antibiot.* 72(11):800-806 (2019).

heterologous production, peptide, cytotoxicity

発表責任者：小谷真也（kodani.shinya@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3B01p10
講演日時：3 月 27 日 15:39～ 総合学習プラザ B01 会場

植物根圏における土壌細菌の増殖を刺激する物質の探索
Searching for growth-stimulation factor of soil bacteria in plant rhizosphere
○井田 和輝、近藤 竜彦、小鹿 一（名大農）
○Kazuki IDA, Tatuhiko KONDOU, Makoto OJIKA (Nagoya Univ.)

【背景・目的】
世界規模での持続的な食糧供給を考える上で、環境負荷の小さい農業生産技術の開発は非常に重要である。近年、この観点から微生物を利用した生物農薬や土壌改良が注目されており、中でも*Bacillus*属細菌を用いた生産性向上技術について活発な研究が行われている。
我々は植物根圏における細菌叢の研究を進める過程で、アルファルファの根から調製した浸出液を土壌に添加すると、土壌中の菌叢が短時間で劇的に変化し、複数の細菌群、中でも*Bacillus*属細菌の割合が顕著に増加するという興味深い現象を見出した。この現象は、アルファルファが何らかの生理活性物質を根圏へと分泌し、植物の生育に有益な*Bacillus*属細菌の根圏への定着を促していることを示唆している。本研究では、根から分泌され、*Bacillus*属細菌の増殖を促すこの生理活性物質の化学的本体を同定することを目的とした。この物質とその作用機序が明らかになれば、植物成長促進や植物保護などの形質を持つ細菌や、遺伝子組み換え等によって抗生物質生産などの有用形質を付加した細菌を根圏へ定着させ、低コストかつ高効率でその効果を発現させる技術の開発につながることが期待される。

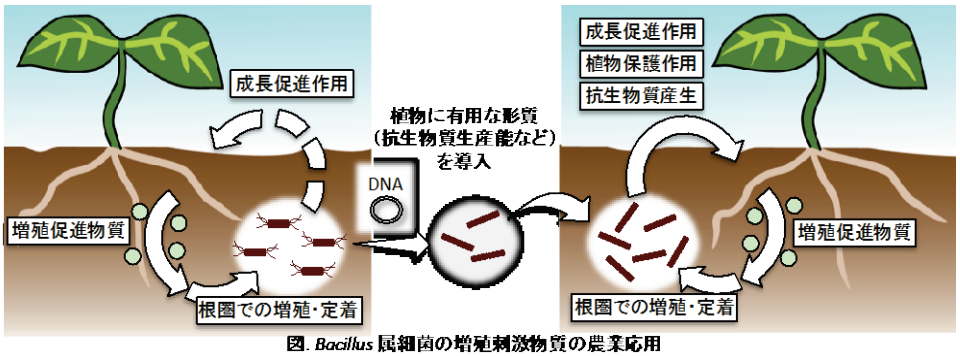


図. *Bacillus* 属細菌の増殖刺激物質の農業応用

【方法・結果】
アルファルファの芽生えから無菌状態で調製した浸出液（Seeding Exudate, SE）を土壌へ添加し、土壌中の菌叢の変化をメタゲノム解析によって観察した。その結果、SE の濃度依存的に *Bacillus* 属細菌の割合の増加が見られた。そこで、SE を精製出発原料として *Bacillus* 属細菌に対して増殖活性を示す物質の探索を行なうこととした。精製画分の活性検定法として、より簡便なリアルタイムPCRを用いて *Bacillus* 属細菌の増殖活性を観察する方法を採用した。現在、HPLC を含む三段階の精製によって高度に精製された活性画分を得ており、本大会では精製した活性画分の詳細な分析結果についても合わせて報告したいと考えている。

soil bacteria, identification, growth stimulating activity

発表責任者：井田和輝（ida.kazuki@a.mbox.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3B01p11
講演日時：3 月 27 日 15:50～ 総合学習プラザ B01 会場

微生物が生産する糸状菌の二次代謝産物能の制限を解除するアンロッカーの探索

Search for“unlocker”compounds from microbial secondary metabolites which release the ability of secondary metabolites production in fungi

○酒井 一成[1]、名児耶 睦[2]、荒川 絵美[3]、渡邊 善洋[1]、岩月 正人[1,3]、野中 健一[1,3]、大村 智[1]([1]北里大生命研、[2]北里大理、[3]北里大院感染制御)

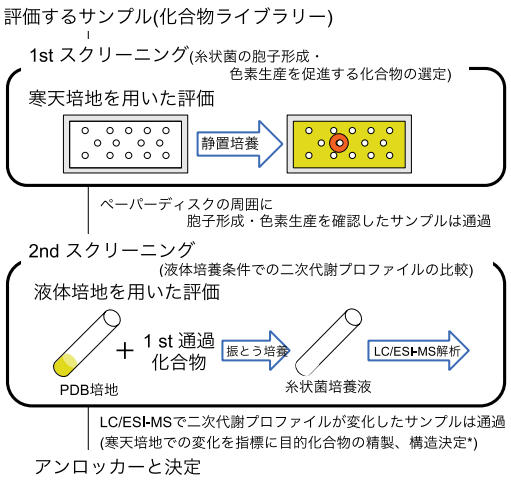
○Kazunari SAKAI[1], Mutsumi Nagoya[2], Emi Arakawa[3], Yoshihiro Watanabe[1], Masato Iwatsuki[1,3], Kenichi Nonaka[1,3], Satoshi Omura[1] ([1]Kitasato Univ. Life Sci., [2]Kitasato Univ. Sci., [3]Kitasato Univ. Infect. Cont.)

【背景と目的】

糸状菌は 10 万種を超える大分類群であり、今までに 15,000 個を超える二次代謝産物の報告がある(*J. Antibiot.*, **65**, 385 (2012))。さらに、近年のゲノム解析技術の進歩により糸状菌のゲノム上には制限を受け、利用できていない生合成遺伝子群の存在が明らかとなり、利用できている遺伝子群は全体の 1 割から 2 割程度であることが明らかとなった(*生物工学*, **89**, 313 (2011))。未利用遺伝子を利用するために、遺伝子工学的手法による生合成遺伝子の強制発現などが行われているが、1 つの化合物の生合成遺伝子の特定に膨大な時間を要する欠点がある。そこで簡便で低コストな方法としてエピジェネティック制御に関するヒストン脱アセチル化酵素などの酵素に対する阻害剤を生産培地に添加する方法が注目された。だがこれらの酵素阻害剤を使用した化合物生産能の解除は現段階で全試験菌の 1 割程度と汎用性に難がある。そこでユニークな構造を有する大村化合物ライブラリーを利用し、糸状菌の分生子形成と色素生産および LC/ESI-MS データを指標に糸状菌の化合物生産能を解除する天然有機化合物(アンロッカー)の探索を開始した。

【方法、結果】

試験菌は二次代謝プロファイルが明確である *Talaromyces siamensis* FKA-61 株を用いた(*J. Antibiot.*, **69**, 573 (2015))。1st スクリーニングでは、分生子形成を抑制する寒天培地に前培養した試験菌 1.5%を植菌し検定プレートを作製した。ペーパーディスク法を用いて色素円の有無を評価した (右図)。794 化合物を評価した結果、133 化合物が通過した。2nd スクリーニングでは 1st スクリーニングを通過した 133 化合物から保有量の多い 12 化合物を評価した。化合物を生産培地に添加し 6 日間培養後、EtOH で抽出した培養抽出物を LC/UV で二次代謝プロファイルの変化を評価した。またこの際に添加量を変化させることで濃度依存的に変化させるサンプルをアンロッカーとした。2nd スクリーニングの結果、プロファイルを変化させた 1 化合物は濃度依存的に新たな化合物を産生させることに成功した。



アンロッカーのスクリーニング方法

Secondary metabolites, Fungi, Dormancy gene

発表責任者：酒井 一成（mi13010@st.kitasato-u.ac.jp）

講演番号：3B01p12
講演日時：3 月 27 日 16:01～ 総合学習プラザ B01 会場

ポリカチオン化修飾による微生物由来生理活性中分子ペプチドの新しい探索技術の開発

New approach for bacterial medium-sized peptide discovery by polycationic modification

○永嶋 世蓮、武内 大和、丸山 千登勢、濱野 吉十（福井県大院・生物資源）
○ Seren NAGASHIMA, Yamato TAKEUCHI, Chitose MARUYAMA, Yoshimitsu HAMANO (Fukui Pref. Univ.)

【目的】近年の創薬研究では、標的分子（タンパク質）に対して作用する医薬品を、これまでに解明された生体メカニズムを基に合理的に設計する「分子標的治療薬の創製」が試みられている。主には有機低分子化合物の開発が進められてきたが、製造コストが比較的安価である反面、標的タンパク質との結合表面積が小さく、特異性を出すのが困難などの問題があり、近年はペプチドや抗体などの中分子ペプチド創薬への期待がますます高まっている。しかしながら、高い水溶性を持つ中分子ペプチドは生体膜を透過することが困難であり、細胞内在のタンパク質を標的とした生理活性ペプチドの開発における一つの課題となっている。これまでに我々は、放線菌 *Streptomyces albulus* が生産するポリカチオン性ペプチド epsilon-poly-L-lysine（e-PL）が、高い水溶性を有しながら、高い生体膜透過性を有することを見出し、これまでの研究で、e-PL によるポリカチオン化修飾（e-PL 修飾）によって、低分子、高分子を問わず、細胞内に送達できることを明らかにしている。そこで本研究では、e-PL を活用した新たな生理活性中分子ペプチドの探索法の確立を試みた。
【方法と結果】最初に、e-PL 修飾が、中分子ペプチドの生体膜透過性を向上できるか検証した。そのモデル中分子として、1,000～4,000 Da の生理活性ペプチドの中で、原核生物特異的な抗菌活性を有し、細胞毒性を持たない化合物を用いた。これら化合物構造内の amino 基に、dibenzocyclooctyne(DBCO)-NHS ester を用いて DBCO 基を付与し、azide 基を有する e-PL(e-PL-PEG-N_3)とのクリック反応にて e-PL 修飾した後、動物細胞に対する毒性を評価した。その結果、3 種類の中分子ペプチドは、e-PL 修飾特異的に、動物細胞に顕著な毒性を示した。このことから、e-PL 修飾が、中分子ペプチドの生体膜透過性向上にも有効である事を明らかにした。現在、これら中分子ペプチドの細胞内標的は不明のままであるが、e-PL 修飾によって、中分子ペプチドの新しい生理活性を見いだすことが可能であると考えられる。そこで次に、新たな中分子ペプチドの探索を行うために、まず、各種放線菌の培養液をイオン交換カラムおよびゲルろ過カラムにて処理し、1,000～4,000 Da の中分子化合物を選択的に簡易精製した。得られた中分子化合物を含む画分に DBCO 付加反応を行い、続いて e-PL-PEG-N_3 とのクリック反応後、培養細胞への生育抑制活性を指標に、生理活性ペプチドの探索を行った。本発表では、本法によるスクリーニング結果について紹介する。

medium-sized peptide, cell penetrating peptide

発表責任者：濱野　吉十（hamano@fpu.ac.jp）

講演番号：3B01p13
講演日時：3 月 27 日 16:21～ 総合学習プラザ B01 会場

ツキヨタケ（*Omphalotus japonicus*）菌糸培養物に含まれる新規 polyisoprene polyol について
New Polyisoprene Polyol from the Mycelium of *Omphalotus japonicus*

○青木 聡樹[1]、網干 貴子[1,2]、新井 大輔[3]、飯塚 禎明[3]、村山 哲也[1,2] ([1]岩手大院連農、[2]山形大農、[3]山形大農フィールド科学センター)
○Satoki AOKI[1], Takako ABOSHI[1,2], Daisuke ARAI[3], Yoshiaki IIZUKA[3], Tetsuya MURAYAMA[1,2] ([1]Iware Univ., [2]Yamagata Univ., [3]FSC)

【背景・目的】

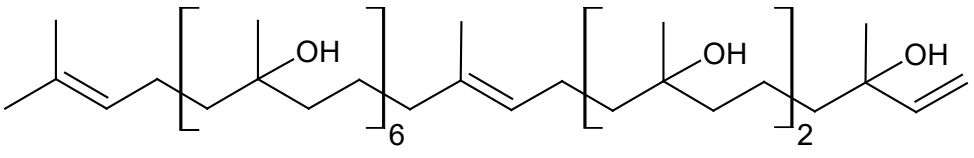
ツキヨタケ（*Omphalotus japonicus*）はツキヨタケ科（ホウライタケ科）ツキヨタケ属の毒キノコである[1]。先行研究では illudin S が毒成分として報告されている[1]。演者らはこれまでに子実体より 6 種の新規セスキテルペン類を単離し報告してきた。本発表ではこれまで詳細な研究が行われて来なかった菌糸培養物について成分の探索を行い、既知化合物の illudin S（RE-1）や ergosterol（RE-2）に加え、新規な polyisoprene polyol (RE-3)を単離し構造を決定したので報告する。

【方法】

山形大学上名川演習林産のツキヨタケ子実体から分離した菌糸を玄米培地に接菌し、25℃で 40 日間培養した。培養物は MeOH で抽出し減圧濃縮後、蒸留水で懸濁して hexane, EtOAc, BuOH の順で分液し、各画分を得た。このうち EtOAc 画分よりシリカゲルクロマトグラフィー並びに RP-HPLC により化合物 RE-1～3 を単離した。

【結果・考察】

化合物 RE-3 の ^{1}H NMR スペクトルより 1.5～2.2 ppm にかけて飽和炭化水素由来の重複したピークが観測されたほか 5.0～6.0 ppm 付近に 2 個の 3 置換二重結合由来のピークと 1 個の末端二重結合由来のピークが観測された。質量分析の結果、*m/z* 911.7917 にプロトン付加イオンが観測され分子式を $C_{55}H_{106}O_9$ と決定した。そこで MS/MS 測定をしたところ観測されたフラグメントイオンが先行研究でブナシメジより報告された hypsiziprenol 類のものと類似していたことから、本化合物は polyisoprene polyol であると推測し[2]、各フラグメントピークの帰属により構造決定に至った。我々の知る限り、天然からの polyisoprene polyol 類の報告はブナシメジ及びオオワライタケ子実体からの 2 例のみであることから[2,3]、本発表は 3 例目の報告となる。



Compound RE-3

1) M. Tada, *et al., Chem. Pharm. Bull.*, 12 1964. 2) A. Sawabe, *et al.*, *J. Mass Spectrom.*, 31, 921-925, 1996. 3) S. Nozoe. *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 24, 1731-1734, 1983.

mushroom, polyisoprene polyol, MS/MS

発表責任者：村山 哲也（mtetsuya@tds1.tr.yamagata-u.ac.jp）

講演番号：3B01p14
講演日時：3 月 27 日 16:32～ 総合学習プラザ B01 会場

ハスモンヨトウ抵抗性ダイズ品種ペキンが持つ特徴的成分の同定

Identification of characteristic compounds of Peking, a resistant soybean variety against *Spodoptera litura*

○矢野 まりこ[1]、中田 隆[2]、寺石 政義[1]、吉永 直子[1]、奥本 裕[1]、森 直樹[1] ([1]京大院農、[2]農研機構)

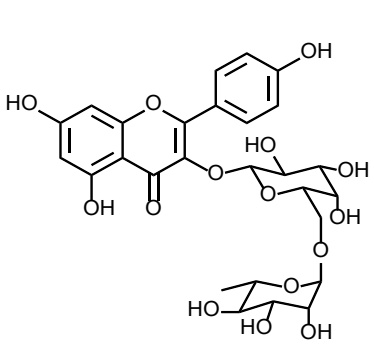
○ Mariko YANO[1], Ryu NAKATA[2], Masayoshi TERAISHI[1], Naoko YOSHINAGA[1], Yutaka OKUMOTO[1], Naoki MORI[1] ([1]Graduate School of Agriculture, Kyoto Univ., [2]NARO)

【背景・目的】

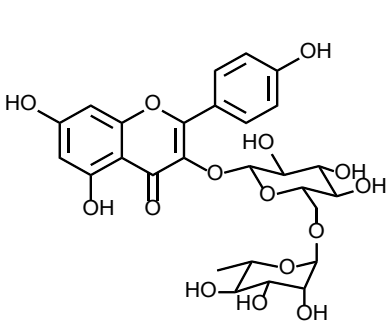
ヤガ科昆虫ハスモンヨトウ（*Spodoptera litura*）の幼虫はダイズ（*Glycine max*）の重要害虫の一つである．これまでの研究から，ダイズ品種ペキンがハスモンヨトウ抵抗性を示すことを明らかにした．本研究では，感受性品種エンレイの成分との比較から，抵抗性品種ペキンに特徴的な成分を単離・精製し，同定した．

【方法・結果】

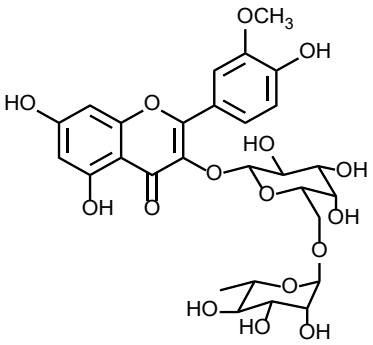
ハスモンヨトウ抵抗性品種ペキンと感受性品種エンレイの葉を抽出し，LC/MS で分析した．分析結果は主成分分析で解析し，ペキンに特徴的な二次代謝物を探索した．その結果，分子量 610 (3 種), 594 (2 種), 624 (2 種) の成分を見出した．ペキン葉を 80% MeOH で抽出し，ODS で分画後，HPLC で単離した．それぞれの構造を NMR, LC/MS/MS, GC/MS で解析し， kaempferol 3-*O*-robinobioside, kaempferol 3-*O*-rutinoside, isorhamnetin-3-*O*-robinobioside 等を同定した．



Kaempferol 3-*O*-robinobioside



Kaempferol 3-*O*-rutinoside



Isorhamnetin 3-*O*-robinobioside

Glycine max, *Spodoptera litura*, resistance

発表責任者：矢野まりこ（yano.mariko.55w@st.kyoto-u.ac.jp）

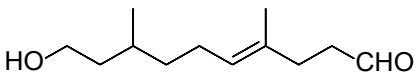
講演番号：3B01p15
講演日時：3 月 27 日 16:43～ 総合学習プラザ B01 会場

スズランの花より見出だしたスズラン様香気成分の同定
Identification of muguet odorants in lily-of-the-valley flowers
○大橋 輝久、坂巻 憲佐、赤尾 寛子、石崎 享（長谷川香料（株））
○Teruhisa OHASHI, Kensuke SAKAMAKI, Hiroko AKAO, Susumu ISHIZAKI (T.HASEGAWA CO., LTD.)

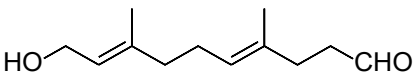
【目的】
スズランは、バラ、ジャスミンと並び三大花香と呼ばれ、フレグランスにおける重要な香調となっている。しかしながら、スズランを含めて天然物からはスズラン様香気を有する化合物はほとんど見つかっていない。また、バラやジャスミンとは異なり、良質な精油を工業的に生産することは困難であるため、天然のスズラン精油は流通していない。そこで、スズランの特徴香気成分を解明することを目的として、スズランの花の香気分析を行った。

【方法】
スズランの品種の中でも、香りが強いドイツスズラン（*Convallaria majalis*）を試料とし、花のヘッドスペース香気分析を行った。吸着剤に捕集した花の香気成分を有機溶媒で脱着後、濃縮して香気濃縮物を得た。得られた香気濃縮物について GC-MS/O 分析を行い、特徴香気成分を探索した。GC-MS/O 分析でスズラン様香気として検出された 2 つの微量な不明成分については、1D/2D 切替 GC-MS/O で詳細に分析し、得られたマススペクトルから構造推定を行った。推定した構造を有する化合物を合成し、分析データを比較することで両不明成分を同定した。

【結果】
スズラン様香気を有する化合物として検出された成分は、(4*E*)-10-Hydroxy-4,8-dimethyldec-4-enal（**1**）および(4*E*,8*E*)-10-Hydroxy-4,8-dimethyldeca-4,8-dienal（**2**）であると同定した。どちらも、これまでにスズランの花から同定された例は無く、天然物の香気成分としての報告も今回が初めてとなる。



1



2

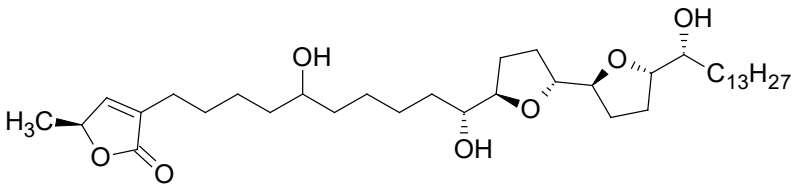
lily of the valley, flower, aroma

発表責任者：大橋輝久（teruhisa_ohashi@t-hasegawa.co.jp）

講演番号：3B01p16
講演日時：3 月 27 日 16:54～ 総合学習プラザ B01 会場

バンレイシ科植物アテモヤの種子からの squamocin-IV の単離・生物活性評価
Isolation and biological evaluation of squamocin-IV from seeds of *Annona atemoya*
○吉田 優香、増田 裕一（三重大生物資源）
○Yuka YOSHIDA, Yuichi MASUDA (Mie Univ.)

【目的】
バンレイシ科植物は、熱帯・亜熱帯に生息する果樹で、食用および薬用に利用されている。特に種子には多種多様な生物活性化合物が含まれており、テルペノイド、アルカロイド、アセトゲニン、環状ペプチドなどが単離されている。バンレイシ科植物のアテモヤは、バンレイシとチェリモヤを掛け合わせた植物である。本研究では、アテモヤの品種の中で三重県が生産に力を入れているピンクスマンモスに着目し、その種子から生物活性物質を単離することを目的とした。
【方法・結果】
アテモヤ (品種: ピンクスマンモス) の種子をミキサーで粉砕し、ヘキサンによる脱脂を行った後、メタノールで含有成分を抽出した。生物活性成分の分画は、KB(ヒト口腔類表皮がん) 細胞に対する細胞毒性を指標として行い、細胞毒性の評価には MTT アッセイを用いた。得られた抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒：メタノール/クロロホルム) によって大まかに分画し、最も強い細胞毒性を示したメタノール 2.5%溶出画分を、ODS カラムを用いた逆相 HPLC で分取することにより、1 つの生物活性物質を単離した。
本化合物の分子式は、高分解能 ESI-MS により得られた精密質量と、NMR により得られた炭素数、水素数、ヘテロ原子数から、$C_{37}H_{66}O_7$ と決定した。また、単離した化合物の NMR 化学シフトおよび *J* 値は、既知化合物 squamocin-IV (**1**) [1)]のものとよい一致を示した。以上より、我々が単離した活性化合物の構造は **1** であると結論付けた。現在、**1** の生物活性の詳しい分析を進めている。



squamocin-IV (**1**) の構造

1) Miao, Y.; Shi, Y.; Xu, X.; Chen, Y.; Chen, J.; Li, X., *Phytochem. Lett.*, **2016**, *16*, 92–96.

isolation, biological evaluation, acetogenin

発表責任者：増田 裕一（masuda@bio.mie-u.ac.jp）

講演番号：3B01p17
講演日時：3 月 27 日 17:05～ 総合学習プラザ B01 会場

エゾエンゴサクの青色花弁に含まれる鉄錯体アントシアニンの化学研究

Chemical studies on ferric complexed anthocyanin found in blue petals of *Corydalis ambigua*

○吉田 久美[1]、鬼塚 丈矢[1]、尾山 公一[2]、近藤 忠雄[1] ([1]名古屋大院情報、[2]名古屋大物国セ)
○Kumi YOSHIDA[1], Takeya Oniduka[1], Kin-ichi Oyama[2], Tadao Kondo[1] ([1]Grad. Sc. Informatics, Nagoya Univ., [2]RCMS, Nagoya Univ.)

[目的] エゾエンゴサク（*Corydalis ambigua*）は北海道から本州中部以北に分布するキケマン属の多年草で、春に青色から青紫色の花を咲かせる。花弁のアントシアニン成分に関してはすでに報告があるが[1]、青色の発色機構は不明であった。我々はこれまで、種々の青色の花色発色機構の研究を行い、そのほとんどがアントシアニンの金属錯体によることを報告した[2]。今回、エゾエンゴサクの発色機構の解明を目指し、花弁成分の単離、花弁に含まれる金属の分析、ならびに構成成分を用いた青色の再現を行った。

[方法と結果] エゾエンゴサク花弁は、2019 年 4 月に北海道広尾郡で採取した。生花弁の可視吸収スペクトルと円二色性を測定したところ、607 nm に吸収極大を持ち、その吸収帯に励起子型の正のコットン効果を示した。凍結した花弁を我々の常法に従って酸性のアセトニトリル水溶液で抽出して 3D-HPLC で分析したところ、アントシアニンは主として 2 種類、それ以外にフラボノールを含む数種の紫外吸収成分のピークが認められた。そこで、これら成分の単離精製を行った。凍結花弁 600 g を 3% トリフルオロ酢酸を含むメタノール溶液で抽出し、アンバーライト XAD-7 カラムクロマトグラフィー及び分取 HPLC を用いて精製した。5-*O*-*p*-coumaroylquinic acid (**1**)、cyanidin 3-*O*-sambubioside (**2**)、kaempferol 3-*O*-sambubioside (**3**)をそれぞれ 49 mg、94 mg、181 mg 単離した。さらに、花弁を湿式灰化して ICP 発光分析により金属分析を行ったところ、錯体形成の可能性のある元素として Mg、Al、Fe、Zn を検出した。

次に、これらの成分を混合して花弁のスペクトルの再現を試みた。Al^{3+}を用いた溶液は、いかなる条件でも紫色を呈し花弁のスペクトルは再現されなかった。アントシアニン(**2**)に Fe^{2+}だけを加えた場合も、λmax は 580 nm を示し、しかも円二色性では負の励起子型コットンを示した。pH 6.5 の条件下で 1 mM のアントシアニン(**2**)にフラボノール(**3**)を 2 当量、Fe^{2+}を 1/3 当量加えると、花弁と同じスペクトルが再現された。キナ酸エステル(**1**)は、青色発色に全く寄与しなかった。以上から、花弁の青色はシアニジン発色団に鉄イオンが錯体形成し、さらにフラボノールが何らかの発色と安定化に関与した超分子構造を取ることが明らかになった。

[1] F. Tatsuzawa, et al., *Biochem. Syst. Ecol.*, ***33***, 789-798 (2005).
[2] K. Yoshida, M. Mori, T. Kondo, *Nat. Prod. Rep.*, ***26***, 884-915 (2009).

blue flower coloration, *Corydalis ambigua*, ferric ion complex

発表責任者：吉田久美（yoshidak@i.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3B02a01
講演日時：3 月 27 日 09:30～ 総合学習プラザ B02 会場

エチレンレセプター変異体イネにおける初期生長の促進

Enhanced seedling growth of a rice mutant of an ethylene receptor OsERS1

○森田 重人[1,2]、谷 柚希[1]、増村 威宏[1,2]（[1]京都府大生命環境、[2]京都農技セ生資セ）
○Shigeto MORITA[1,2], Yuzuki TANI[1], Takehiro MASUMURA[1,2] ([1]Kyoto Pref. Univ., [2]Biotech. Res. Dept., Kyoto Pref. Agr. Forest. Fish. Technol. Center)

【目的】 種子の形成過程では休眠が誘導されるため、完熟直後の種子は発芽が抑制されている。穀類種子の休眠誘導が弱いと、穂発芽が起こり、収量や品質の著しい低下が引き起こされる。また発芽は芽生えの生長と直結しており、発芽と初期生長の遅れは、栽培期間全体にわたり生育に悪影響を与える。このように種子の休眠・発芽は、農業上重要な問題である。

植物の種子休眠と発芽は植物ホルモンにより調節されている。エチレンは多くの植物種で休眠解除と発芽促進に機能しているが、イネの発芽におけるエチレンの役割については未解明である。またエチレンは、イネ芽生えにおいてシュートの伸長促進に働いている。そこで本研究では、イネ種子の休眠・発芽調節におけるエチレンの役割を明らかにすることを目的として、エチレンレセプター*OsERS1*の発芽・初期生長における機能について解析した。

【方法・結果】 これまでに我々は、CRISPR/Cas9システムを用いたゲノム編集により、*OsERS1*の変異体系統を作出している。そのホモ変異体 (T_1個体) を育成し、得られたT_2種子を用いて、休眠・発芽や初期生長に影響が見られるかどうかを調査した。

変異体系統とコントロール（非変異体）系統から、開花後42日目の休眠種子を採取して発芽試験を行い、休眠性を調査した。その結果、3つの変異体系統のうちの1つ (N41系統) で休眠性の上昇が見られた。そこで、N41系統の後代 (T_2個体) を育成し休眠性を調査すると表現型が分離したことから、休眠性の上昇は*OsERS1*の変異とは直接関係しないことが示唆された。N41系統については現在、新規休眠性変異体の候補としてさらに遺伝解析を継続している。

また完熟種子を用いて発芽試験を行った結果、コントロール系統と変異体系統で発芽率に差は見られなかったことから、*OsERS1*を変異させても発芽に影響しないと考えられた。一方、初期生長を調べると、変異体系統はコントロール系統と比べてシュートの生長が促進されており、エチレン応答性遺伝子の発現が上昇していた。エチレンレセプターはエチレン応答の負の調節因子であることから、*OsERS1*の変異によりエチレン応答が上昇したことで、シュートの伸長が促進されていると示唆された。

ethylene response, elongation, rice

発表責任者：森田 重人（s_morita@kpu.ac.jp）

講演番号：3B02a02
講演日時：3 月 27 日 09:41～ 総合学習プラザ B02 会場

陸棲藍藻 *Nostoc* sp. HK-01 における植物生長調節物質の生産と休眠細胞の発芽調節

Production of plant growth substances and regulation of germination in a terrestrial cyanobacterium, *Nostoc* sp. HK-01

○木村 駿太[1,2]、中嶋 正敏[1]、湯本 絵美[3]、宮本 皓司[4]、オン 碧[5]、横谷 香織[5]、浅見 忠男[1]（[1]東大院・農生科、[2]学振 PD、[3]帝京大・先端機器セ、[4]帝京大・理工、[5]筑波大・生命環境）

○Shunta KIMURA[1,2], Masatoshi NAKAJIMA[1], Emi YUMOTO[3], Koji MIYAMOTO[4], Midori ONG[5], Kaori YOKOTANI[5], Tadao ASAMI[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. of Tokyo, [2]JSPS Research Fellow, [3]Adv. Instrum. Anal. Center, Teikyo Univ., [4]Fac. Sci. Eng., Teikyo Univ., [5]Fac. Life & Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

【背景・目的】

藍藻（Cyanobacteria）は葉緑体の起源と考えられている生物で、世界中の水中、陸地に生息しており、生態系における重要な一次生産者である[1, 2]。陸棲の藍藻の一種 *Nostoc* sp. HK-01 は、栄養細胞、異型細胞、連鎖体および休眠細胞に分化する[3]。我々は、これら 4 形態のうち休眠細胞のみ優れた乾燥耐性を備えていることを明らかにしてきた[4]。休眠細胞への分化は生存に必須であるがゆえに厳密な制御機構が存在すると予想されるが、その分化・発芽に関した環境条件の報告において、栄養細胞の糸状体の全てではなく、その中のいくつかの細胞のみが休眠細胞に分化する。このため、環境要因以外にもトリガーがあると推測されるが、分化を直接制御する物質等は明らかにされていない[5]。他方、藍藻類においてはいくつかの制御物質（植物ホルモン）生産の報告例があるが[6]、その生理機能はほとんど解明されておらず、既知あるいは未知の物質が藍藻の休眠を制御している可能性がある。本研究では、当該藍藻の休眠制御に関わる物質の同定とその機能解明を最終的な目的に据えて、まずは既知植物ホルモンの生産能の有無と、その藍藻への生物活性を検証した。

【方法・結果および考察】

液体培養で得た藻体を、常套法で抽出・精製し、内部標準を用いて LC-MS/MS 分析に供した。その結果、複数の既知生長調節物質が MS レベルで検出された。加えて、休眠細胞からの発芽過程を細胞単位で追跡する実験系の構築を図った。その上で、確立した実験系を用いての既知植物ホルモン類投与効果を検証した。これらの結果は、植物ホルモンが藍藻の休眠打破あるいは発芽を制御している可能性を示したので、併せて報告したい。

【参考文献】

1) Potts, In The ecology of cyanobacteria. Kluwer academic publishers, 2000.
2) Middelburg, In Marine Carbon Biogeochemistry, Springer, 2019.
3) Kimura *et al.*, *Biol. Sci. Space*, 2017.
4) Kimura *et al.*, *Biol. Sci. Space*, 2015.
5) Sukenic *et al.*, Academic Press, 2019.
6) Lu and Xu, *Trends Plant Sci.*, 2015.

dormancy, terrestrial cyanobacteria, phytohormone

発表責任者：中嶋正敏（anakajm@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3B02a03
講演日時：3 月 27 日 09:52～ 総合学習プラザ B02 会場

ストリゴラクトン受容体 D14 過剰発現の引き起こす病害抵抗性とその誘導機構

Inducution of plant disease resistance by strigolacton signalling

○伊藤 瑛子[1]、山野 博之[1]、前田 哲[2]、神田 恭和[2]、草島 美幸[1]、藤田 萌香[3]、仲下 英雄[3]、森 昌樹[2]、中村 英光[1]、浅見 忠男[1] ([1]東京大農生科、[2]農研機構、[3]福井県大)
○Akiko Ito[1], Hiroyuki Yamano[1], Satoru Maeda[2], Yasukazu Kanda[2], Miyuki Kusajima[1], Moeka Fujita[3], Hideo Nakashita[3], Masaki Mori[2], Hidemitsu Nakamura[1], Tadao Asami[1] ([1]Tokyo Univ., [2]NARO, [3]Fukui Univ.)

【背景・目的】

ストリゴラクトン（SL）は植物ホルモンの一種であり、枝分かれ抑制作用をはじめ、根の発達や環境ストレス応答など様々な作用を示すことが知られている。また、植物は病原菌に感染されると、活性酸素種を発生させたり抗菌性の二次代謝産物であるファイトアレキシンを産生させたりして病害から身を守る応答をする。この病害応答は複数の植物ホルモン信号伝達のネットワークにより精密に制御されている。我々は、イネの SL 受容体 D14 の過剰発現体(*D14*ox)が葉身に疑似病斑を形成することや、いもち病菌への抵抗性を向上させていることをこれまでに見出しており、また、*d14* 欠損変異体はいもち病菌に対し高い感受性を示すことも見出している。さらに、我々は、*D14ox* では野生型に比べ、活性酸素種の生産量や防御関連遺伝子発現量、塩化銅処理時のファイトアレキシン生産量が増加しているという結果も得ており、*D14* 過剰発現がイネにおいて病害応答シグナルを活性化し、病害抵抗性を獲得していることを示している。そこで、本研究では、植物に病害抵抗性を付与する新たな方法を確立する目的で、この *D14* 過剰発現による病害抵抗性の誘導メカニズムの詳細を明らかにすることにした。

【方法・結果】

D14ox がいもち病抵抗性を示すのは､SL シグナルが病害応答シグナルを活性化しているからなのか、過剰に存在する D14 が SL とは無関係に病害応答シグナルを活性化しているからなのか疑問であった。そこで、野生型のイネに SL 生合成阻害剤を投与したところ、いもち病菌への抵抗性が低下した。我々は前回大会で SL アナログである GR24 処理がイネのいもち病菌への抵抗性を向上させる傾向を示したという報告をしたが、今回はそれを裏付ける結果となった。また、*D14ox* における SL 応答遺伝子の発現パターンからも SL シグナルが増強されていることが示唆された。

さらに、我々は、*D14ox* における遺伝子発現パターンやファイトアレキシン生産量を調べ、D14 が病害抵抗性に関わる複数のホルモンのシグナルを制御している可能性を示唆する結果を得た。現在、SL シグナルがなぜこのような病害抵抗応答を引き起こすことができるのかを明らかにするためにさらなる解析を行っている。

strigolactone, disease resistance, rice

講演番号：3B02a04
講演日時：3 月 27 日 10:03～ 総合学習プラザ B02 会場

典型的ストリゴラクトンの生合成経路の解明

Elucidation of biosynthetic pathway of canonical strigolactone

○若林 孝俊[1,2]、濱名 実咲[1]、森 采美[1]、北野 友里恵[1]、支田 香澄[1]、秋山 遼太[1]、刑部 敬史[3]、刑部 祐里子[3]、水谷 正治[1]、杉本 幸裕[1,2]（[1]神戸大院・農、[2]JST/JICA SATREPS、[3]徳大・生物資源）

○Takatoshi WAKABAYASHI[1,2], Misaki HAMANA[1], Ayami MORI[1], Yurie KITANO[1], Kasumi SHIDA[1], Ryota AKIYAMA[1], Keishi OSAKABE[3], Yuriko OSAKABE[3], Masaharu MIZUTANI[1], Yukihiro SUGIMOTO[1,2] ([1]Kobe Univ., [2]JST/JICA SATREPS, [3]Tokushima Univ.)

ストリゴラクトン(SL)は、植物地上部の枝分かれを制御する植物ホルモンであり、根圏では根寄生雑草の種子発芽やアーバスキュラー菌根菌の菌糸分岐を誘導する根圏情報物質として働く。SL はその構造から、ABC 環を有する典型的 SL と、ABC 環の三環性母核を持たない非典型的 SL とに分類される。典型的 SL はさらに C 環の立体配置によって、strigol-type SL と orobanchol-type SL の 2 つのグループに分類される。SL の生合成では、まず最初に β-カロテンから生合成中間体であるカーラクトンが生成され､その後シトクローム P450 (CYP)である CYP711A/MAX1 によってカーラクトン酸(CLA)に変換される。代表的な典型的 SL である orobanchol は、イネにおいて、CYP711A ホモログの働きにより、CLA から 4-deoxyorobanchol (4DO)を経て生合成されることが報告されている。しかし、イネ以外の多くの植物の CYP711A ホモログが CLA から典型的 SL への変換を触媒しないことや、ササゲ等の orobanchol を生産するいくつかの植物では､SL 投与実験において CLA が 4DO を経由せず orobanchol へ変換されることが明らかとなっている。このため、典型的 SL の生合成に CYP711A 以外の酵素が関与していることが推定された。そこで本研究では、新規な典型的 SL 生合成経路を解明することを目的とした。

ササゲ(*Vigna unguiculata*)を実験材料とし、SL 投与実験を行った結果、CLA から orobanchol への変換が CYP 阻害により顕著に抑制され、orobanchol 生合成への CYP の関与が示唆された。そこで、ササゲ根の遺伝子解析を行い、既知の SL 生合成遺伝子と共発現する CYP 遺伝子を選抜し、その組み換え酵素の機能を解析した。その結果、ササゲの VuCYP722C が CLA を orobanchol へ変換することを見出した。一方、VuCYP722C は 4DO から orobanchol への変換は触媒せず、投与実験の知見と一致していた。さらに、orobanchol 生産植物であるトマト(*Solanum lycopersicum*)のゲノム中に見出されるホモログを解析した結果、SlCYP722C 組み換え酵素は上記と同様の活性を示した。そこで、CRISPR/Cas9 法により当該遺伝子をゲノム編集したノックアウトトマト植物体(*Slcyp722c*-KO)を構築した。*Slcyp722c*-KO 植物体の根浸出液中には orobanchol が検出されず、代わって野生株には認められない CLA が検出された。このことから、SlCYP722C が CLA から orobanchol への直接的な変換を触媒することが明らかとなった。さらに、CLA から strigol-type SL である 5-deoxystrigol への変換をワタ(*Gossypium arboreum*)の GaCYP722C 組み換え酵素が触媒することを見出した。以上のことから、CYP722C は典型的 SL 生合成の鍵酵素として機能していると考えられる。

strigolactone, orobanchol, biosynthesis

講演番号：3B02a05
講演日時：3 月 27 日 10:14～ 総合学習プラザ B02 会場

基質アナログ型ストリゴラクトン生合成阻害剤の探索

Research of carlactone derivatives as strigolactone biosynthesis inhibitors

○川田 紘次郎[1]、内田 裕也[1]、小野田 聡志[1]、佐々木 康幸[1]、野村 崇人[2]、矢嶋 俊介[1]、伊藤 晋作[1] ([1]東京農大・バイオ、[2]宇都宮大・バイオ)
○Kojiro KAWADA[1], Yuya UCHIDA[1], Satoshi ONODA[1], Yasuyuki SASAKI[1], Takahito NOMURA[2], Shunsuke YAJIMA[1], Shinsaku ITO[1] ([1]Tkyo Univ of Agriculture., [2]Utsunomiya Univ.)

植物ホルモンであるストリゴラクトン (SL) は植物の枝分かれ抑制作用を示す。一方で植物と共生するアーバスキュラー菌根菌の菌糸誘導やストライガやオロバンキのような根寄生性植物の発芽刺激物質としても作用することが知られている。このような作用の多様性から SL 生合成に関する研究が盛んに行われてきた。

我々は以前より SL 生合成阻害剤の開発に着手し、トリアゾール基を持つ TIS108 や KK5 を見出してきた。これらの化合物をイネに添加すると 30 nM でイネにおいて主要な SL である 4-デオキシオロバンコール (4DO) の生合成量を有意に減少させる。一方 3~10 μM をイネまたはシロイヌナズナに添加しても SL 生合成変異体に見られるような枝分かれの増加はほとんど観察されなかった。上記阻害剤と SL 生合成酵素である CYP711A の酵素試験を行ったところ、複数存在する CYP711A ホモログのうち一部の CYP711A にのみに阻害活性を示すことが明らかとなった。この結果から全ての CYP711A を阻害していない為、枝分かれ数が増加しなかったと考えられる。

今回、枝分かれ過剰形態を誘発させる阻害剤の開発を目的とし、全ての CYP711A を阻害する新規 SL 生合成阻害剤の開発に着手した。

これまで見つかっている CYP711A はカーラクトン (CL) を基質としカーラクトン酸 (CLA) に変換する酵素活性を有している。その為 CL の構造を一部変換した化合物は基質として認識され全ての CYP711A に対し競合阻害剤として作用する可能性がある。そこで我々はカーラクトンの骨格に着目し基質アナログ型 SL 生合成阻害剤の探索を行った。

今回 CL の合成法を参考に CL アナログの合成を行った。得られた CL アナログを CYP711A の酵素活性を指標とし阻害活性を評価したところ CYP711A の反応産物である CLA が CL アナログ無添加に比べ減少した。更に一部の CL アナログをイネに処理したところ、水耕液中の 4DO を減少させることが明らかとなった。

これらの結果から CL アナログが SL 生合成阻害剤になり得ることを見出し、更に今回得られた CL アナログの構造活性相関から CYP711A に対する阻害活性に重要な部位をある程度絞りこむことができた。

strigolactone, bioorganic chemistry, inhibitor

講演番号：3B02a06
講演日時：3 月 27 日 10:35～ 総合学習プラザ B02 会場

多機能性物質カリキンの受容体阻害剤の創製

Design and synthesis of karrikin receptor inhibitor

酒井 寿彦、喜久里 貢、高橋 郁夫、中村 英光、○浅見 忠男（東大院農生科）
Toshihiko Sakai, Ko Kikuzato, Ikuo Takahashi, Hidemitsu Nakamura, ○Tadao Asami (U Tokyo)

【背景・目的】

Karrikin（KARs）は山火事などにより植物が燃焼すると生じる煙中の成分である。KAI2 は KARs 受容体であり、KRRs を受容することで種子の発芽を促進する情報伝達因子であり、焼け野原となった大地に再び植物を繁茂させるといった、重要な役割を果たすと考えられている。また、KAI2 は胚軸伸長の抑制という光形態形成や病害抵抗生発現に関わる未知物質の受容にも関わっていることが知られている。しかし、植物内在性の KAI2 タンパク質のリガンド（KL）は未だ明らかになっていない。KL が明らかになっていないにも関わらず、KARs の発見により KAI2 タンパク質の機能の追究が可能になったという事実はアゴニストの発見がタンパク質の機能解明に有効であることを示している。同様に KAI2 受容体阻害剤の創製と応用により、多様な植物における未解明な KAI2 機能とその作用機序の追究が可能になると期待できる。本発表では KAI2 阻害剤候補化合物 2 種類の同定と、生化学的な解析によるこれらの化合物の KAI2 阻害剤としての特性の評価について報告する。

【方法・結果】

KAI2 はストリゴラクトン（SL）受容体である D14 と同様にα/β加水分解酵素ファミリーに属し、リガンドの受容機構やシグナル伝達機構に多くの共通点を有していることから、D14 のアンタゴニストとして働く化合物から KAI2 アンタゴニスト活性を有する化合物の発見を試みた。当研究室で開発された SL 共有結合型アンタゴニスト探索のために構築された化合物ライブラリーを対象として、シロイヌナズナの胚軸伸長を指標とした KAI2 アンタゴニストのスクリーニングを行った結果、KAI2 阻害剤候補化合物として 2 種類の化合物を選抜した。これらの候補化合物は KAI2 タンパク質と共有結合することが予想されるため、KAI2 タンパク質に候補化合物を投与した後にトリプシン処理を行い、LC-MS/MS を用いた分析を行うことにより候補化合物の KAI2 タンパク質への結合箇所の特定を試みた。その結果、候補化合物が Ser 残基へ結合していることが確認された。現在、KAR 処理によって発現誘導される D14-LIKE2（DLK2）などの発現状況を qRT-PCR を用いて解析しているほか、発芽実験を行いさらなる作用機序の解明を行った結果について報告する。

α,β-hydrolase, receptor, karrikin

発表責任者：浅見忠男（asami@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3B02a07
講演日時：3 月 27 日 10:46～ 総合学習プラザ B02 会場

酢酸コリン処理によって認められるシロイヌナズナ生長促進の分子機構解析

Molecular mechanism of growth promotion by choline acetate in *Arabidopsis thaliana*

○池田 直樹[1]、神村 麻友[1]、小林 毅[2]、蔡 晃植[1,3]([1]長浜バイオ大・バイオ、[2]アグロカネショウ(株)、[3]長浜バイオ大・ゲノム編集研究所)
○ Naoki Ikeda[1], Mayu Kmaimura[1], Takeshi Kobayashi[2], Fang-Sik Che[1,3] ([1]Bio-science, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology, [2]AGRO-KANESHO CO., LTD., [3]Genome Editing Research Institute, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology)

酢酸コリンを処理した多くの植物では生育の促進が認められる。しかし、この酢酸コリンによる植物生長促進機構については光合成の促進が関与するという報告があるだけで、その分子機構についての知見はほとんど得られていない。そこで、酢酸コリンによる生長促進の分子機構を明らかにするために、分子レベルでの解析が容易なシロイヌナズナを用いて研究をおこなった。まず、シロイヌナズナに酢酸コリンを処理した場合、生育促進が認められるかどうかを調べるため、1/2MS 培地に酢酸コリンを 0.3～600 μM となるように加え、この培地で生育させたシロイヌナズナの乾重量を測定した。その結果、播種 2 週間後のシロイヌナズナにおいて酢酸コリン濃度 0.6～60 μM の培地で約 10%程度の乾重量の増加が認められた。さらに、酢酸コリン処理により主根が約 4%伸長していること、側根数も約 60%増加すること、葉面積も 26%増加することが明らかになった。次に、同様に酢酸コリン処理したシロイヌナズナにおける光合成活性について調べたところ、酢酸コリン処理により CO_2 取り込み速度が 1.14 倍高いことも示された。そこで次に、酢酸コリンによる光合成促進の分子機構を調べるために、酢酸コリン処理時における遺伝子発現変動を 44 k-オリゴマイクロアレイを用いて調べた。その結果、カルビン - ベンソン回路の酵素の中で律速酵素の一つとして知られている Fructose-bisphosphate aldolase（FBA）が発現上昇していることが示された。シロイヌナズナには FBA のアイソフォームが 8 つ存在しているので、次に、各 FBA アイソフォームをコードする遺伝子の酢酸コリン処理時における発現変動を qRT-PCR を用いて解析した。その結果、*AtFBA6* と *AtFBA8* の発現が酢酸コリン処理によって増加することが示された。そこで *AtFBA8* の発現上昇が酢酸コリンによる光合成促進と生長促進に関与するかどうかを調べるために、*AtFBA8* の欠損体を取得した。この *AtFBA8* 欠損株に酢酸コリンを処理したところ、野生株に処理した時に認められた、乾重量の増加と主根の伸長促進が認められないことが示された。以上のことから、酢酸コリンによる光合成促進と生長促進に *AtFBA8* が関与する可能性が示唆された。

choline acetate, growth promotion

講演番号：3B02a08
講演日時：3 月 27 日 10:57～ 総合学習プラザ B02 会場

フェアリー化合物の生合成に関連した新規プリン代謝の解明

Elucidation of novel purine metabolism related to biosynthesis of fairy chemicals

○竹村 太秀[1]、崔 宰熏[1,2]、大西 利幸[1,2]、平井 浩文[1,2]、稲井 誠[3]、大内 仁志[3]、浅川 倫宏[4]、菅 敏幸[3]、河岸 洋和[1,2] ([1]静大院・創造、[2]静大・グリーン研、[3]静県大・薬、[4]東海大・海洋)
○Hirohide TAKEMURA[1], Jae-Hoon CHOI[1,2], Toshiaki OHNISHI[1,2], Hirofumi HIRAI[1,2], Makoto INAI[3], Hitoshi OUCHI[3], Tomohiro ASAKAWA[4], Toshiyuki KAN[3], Hirokazu KAWAGISHI[1,2] ([1]Grad. Sch. of Sci. and Technol., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ., [3]Sch. of Pharm. Sci., Univ. of Shizuoka, [4]Sch. of Mar. Sci. and Technol., Tokai Univ.)

【背景・目的】

芝草がリング状に繁茂あるいは枯死した後にキノコが発生する現象はフェアリーリングと呼ばれている。当研究室ではこの原因物質として 2-azahypoxanthine (AHX)、imidazole-4-carboxamide (ICA)、及び 2-aza-8-oxohypoxanthine (AOH) を発見し、これらの 3 つの化合物をフェアリー化合物 (Fairy Chemicals: FCs) と総称している。また、FCs は植物に対する成長調節活性や普遍的内生が確認されており、新規植物ホルモンの可能性が示唆されている[1-6]。

当研究室では FCs の生合成経路として図 1 に示すような新規プリン代謝を推定し、一昨年度本大会において hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT) が AHX 及び AOH に活性を示すことを報告した。また、昨年度本大会ではイネに存在する 4 種の adenine phosphoribosyltransferase (APRT) のうち 2 種が ICA 及び AICA に活性を示すことを報告したため、残りの 2 種の APRT について機能同定を試みた。

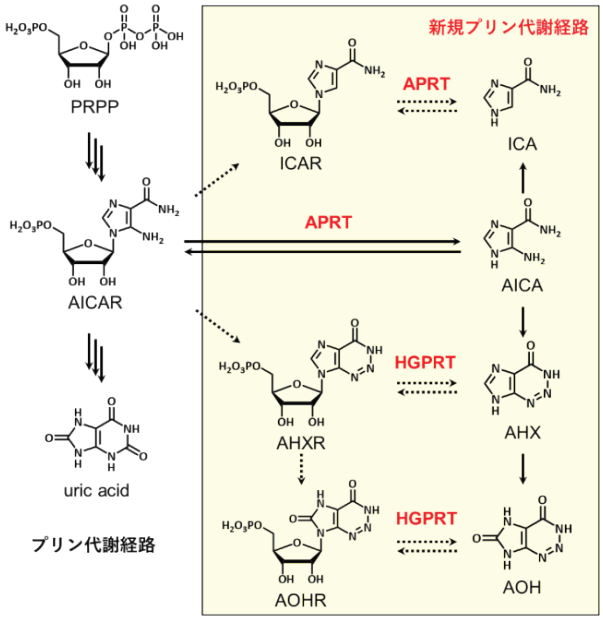


図 1　植物における FCs の生合成経路

実線: 植物で確認された経路, 破線: 推定生合成経路
AHXR: AHX ribonucleotide, AICA: 5-aminoimidazole-4-carboxmide, AICAR: AICA ribonucleotide, AOHR: AOH ribonucleotide, ICAR: ICA ribonucleotide, PRPP: phosphoribosyl pyrophosphate

【方法・結果】

イネの cDNA から 2 種の APRT (APRT_2g 及び APRT_12g) のクローニングを行い、大腸菌を宿主とした異種発現および FCs に対するホスホリボシル化活性・脱ホスホリボシル化活性を検討した。その結果、これらの APRT は ICA と ICAR 及び AICA と AICAR の変換を可逆的に触媒し、FCs の生合成に関与していることが示された。したがって、図 1 に示した新規プリン代謝が APRT 及び HGPRT によって調節されることが明らかとなった。現在、FCs を処理したイネを用いた遺伝子発現差解析及び定量分析から、植物体内における FCs の生合成・代謝と APRT 及び HGPRT の関連性を検討している。

1) J.-H. Choi, H. Kawagishi et al., *ChemBioChem* **11**, 1373–1377 (2010)
2) J.-H. Choi, H. Kawagishi et al., *J. Agric. Food Chem.* **58**, 9956–9959 (2010)
3) J.-H. Choi, H. Kawagishi et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 1553–1555 (2014)
4) H. Kawagishi, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **82**, 752–758 (2018)
5) H. Kawagishi, *Proc. Jpn. Acad. Ser. B.* **95**, 29–38 (2019)
6) H. Takemura, H. Kawagishi et al., *Sci. Rep.*, **9**:9899 (2019)

biosynthesis, plant hormones, purine metabolism

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3B02a09
講演日時：3 月 27 日 11:08～ 総合学習プラザ B02 会場

コムラサキシメジにおける 2-azahypoxanthine のトリアジン基形成機構に関する研究
Studies on the triazine group formation machinery of 2-azahypoxanthine in *Lepista sordida*

○伊藤 彰将[1,2]、古田島 美颯[3]、崔 宰熏[1,3,4]、平井 浩文[1,3,4]、浅川 倫宏[5]、大内 仁志[6]、稲井 誠[6]、菅 敏幸[6]、河岸 洋和[1,3,4]（[1]静大院・創造、[2]JSPS、[3]静大院・総合農、[4]静大・グリーン研、[5]東海大・海洋、[6]静県大・薬）
○ Akinobu ITO[1,2], Mihaya KOTAJIMA[3], Jae-Hoon CHOI[1,3,4], Hirofumi HIRAI[1,3,4], Tomohiro ASAKAWA[5], Hitoshi OUCHI[6], Makoto INAI[6], Toshiyuki KAN[6], Hirokazu KAWAGISHI[1,3,4] ([1]Grad. Sch. of Sci. and Technol., Shizuoka Univ., [2]Res. Fellow of Jpn. Soc. for the Prom. of Sci., [3]Grad. Sch. of Inte. Sci. and Technol., Shizuoka Univ., [4]RIGST, Shizuoka Univ., [5]Marine Sci. and Technol., Tokai Univ., [6]Dept. of Pharm. Sci., Univ. of Shizuoka)

【目的】

コムラサキシメジ (*Lepista sordida*) の菌糸体培養濾液からフェアリーリング惹起物質として、2-azahypoxanthine (AHX) 及びimidazole-4-carboxamide (ICA) が発見された[1,2]。更に、AHXは植物体内で2-aza-8-oxohypoxanthine (AOH) へ代謝されることが判明し、我々はこれらの化合物をfairy chemicals (FCs) と呼称している[3]。FCsは植物の成長を制御し、植物に様々なストレス耐性を付与することが判明した[1-5]。また、我々はFCsが植物及びキノコにおいて普遍的に存在していることを確認した[1-5]。このようにFCsの生物活性及び生合成は非常に興味深いが、その生合成経路は一部しか明らかになっていない。前回大会に引き続き、本研究では、コムラサキシメジにおけるAHXの生合成研究に着手した。

【方法・結果】

AHXの生合成前駆体は5-aminoimidazole-4-carboxamide (AICA) であることが判明している[6]。AICAからAHXの変換反応には窒素源が必要であり、更にコムラサキシメジにおけるAHX産生量はL-Arg処理によって有意に増加することを踏まえ、L-ArgからNO synthase (NOS) によって生成するNOが窒素源として関与していると仮説を立てた。*In vitro*において、AICAとNO発生剤である1-hydroxy-2-oxo-3-(3-aminopropyl)-3-isopropyl-1-triazene (NOC5) を反応させ、反応液をHPLCで分析した結果、AHXの生成が確認できた。そこで、NOSがAHXの生合成における鍵酵素であると予想し、L-Arg処理及び未処理のコムラサキシメジ菌糸体からcDNAライブラリーを調製し、qRT-PCRによるNOS遺伝子の発現解析を検討した。更に、[guanidino-$^{15}N_2$] L-Argを培地に添加してコムラサキシメジ菌糸体を培養し、培養濾液から各種クロマトグラフィーを駆使してAHXを単離・精製後、^{15}Nでラベルされ たAHXがNMR及びLC-MS/MSで検出されるかを検討した。現在、詳細に研究を行っている。

【参考文献】

1) Choi. J.-H., Kawagishi. H. *et al*., *ChemBioChem* **11**, 1373－1377 (2010).
2) Choi. J.-H., Kawagishi. H. *et al*., *J. Agric. Food Chem.* **58**, 9956－9959 (2010).
3) Choi. J.-H., Kawagishi. H. *et al*., *Angew. Chem. Int. Ed*. **53**, 1552－1555 (2014).
4) Kawagishi. H. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **82**, 752－758 (2018).
5) Kawagishi. H. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* **95**, 29－38 (2019).
6) 伊藤 彰将, 河岸 洋和ら, 日本農芸化学会大会講演要旨集, p1090 (2019).

fairy rings, nitric oxide synthase, *Lepista sordida*

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3B02a10
講演日時：3 月 27 日 11:19～ 総合学習プラザ B02 会場

Conversion of 2-Azahypoxanthine (AHX) to 2-Aza-8-oxohypoxanthine (AOH) by resting cells of *Buttiauxella* sp. A111

○Apirati Sukprasitchai, Ayaka Kikuchi, Jae-Hoon Choi, Hirokazu Kawagishi, Shinji Tokuyama (Grad.Sch.Inte.Sci.Tech., Shizuoka Univ.)

[Background and Purpose]

Fairy chemicals (FCs), 2-azahypoxanthine (AHX) and 2-aza-8-oxohypoxanthine (AOH), are compounds responsible for the natural phenomenon "fairy rings", zone of stimulated grass growth due to interaction between fungus and plant, and also can regulate plant growth. AOH showed plant growth promoting activity and was endogenous in various plant at similar level to those of plant hormones. These results indicated that FCs might be a new family of plant hormones (1,2). At this time, the only way to synthesis AOH is enzymatic conversion of AHX by xanthine oxidase (XOD). Since commercial available XOD is very expensive and conversion activity was inhibited by AOH (product inhibition). We have reported that *Burkholderia contaminans* CH-1 converted AHX to AOH but AOH conversion activity of this strain was not high (3). In this study, we focused on screening for bacteria showing high AOH conversion activity and improvement of AOH conversion activity.

[Method and Results]

Among strains isolated from soil, strain A111 showed the highest AOH conversion activity and its activity is 11 times higher than *Burkholderia contaminans* CH-1 at 2 mg/ml of AHX. Strain A111 is very close to *Buttiauxella gaviniae* DSM 9393 based on 16S rRNA sequence analysis. To improve conversion activity of strain A111, cultural conditions and resting cell reaction of AOH conversion were investigated. Glucose suppressed the activity in liquid medium but peptone promoted it. The strain cultured in modified LB broth for 16 hours at 30°C in Erlenmeyer flask showed the highest activity. Resting cells of the strain converted AHX to AOH in 50 mM phosphate buffer (pH 6.0) at 40°C and 5 mg/ml for 16 hours efficiently. Aeration was needed in the reaction. To investigate H_2O_2 productivity in the conversion reaction, the cells were incubated with AHX and Nitro blue Tetrazolium (NBT). After the incubation, the cells were showed purple color in the test tube. These results suggested that AOH conversion enzyme might be xanthine oxidase, not xanthine dehydrogenase. Finally, AOH conversion activity of strain A111 was improved around 81 times higher than the initial activity at 70 µg/ml of AHX and showed 82 times higher than *Burkholderia contaminans* CH-1 at 5 mg/ml of AHX.

1) Kawagishi, H., Proc. Jpn. Acad., Ser. B. 95, 29-38 (2019).
2) Kawagishi, H., Biosci. Biotechnol. Biochem., 82, 752-758 (2018).
3) Choi, J.H. et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 80, 2045-2050 (2016).

Bioconversion, Fairy chemicals, *Buttiauxella* sp.

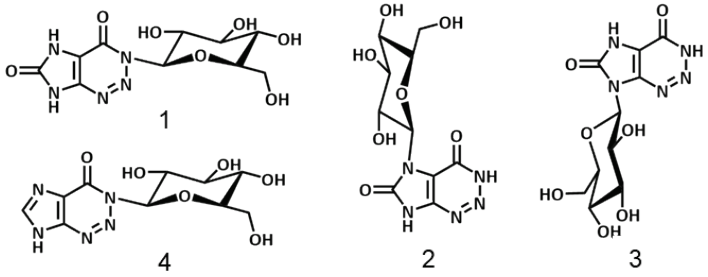
講演番号：3B02a11
講演日時：3 月 27 日 11:40～ 総合学習プラザ B02 会場

イネにおけるフェアリー化合物の代謝に関する化学的研究
Chemical studies on metabolism of fairy chemicals in rice

○崔 宰熏[1,2,3]、與五澤 薫[1]、平井 浩文[1,2,3]、松浦 英幸[4]、堀越 秀[4]、佐分利 亘[4]、森 春英[4]、河岸 洋和[1,2,3] ([1]静大院・総合農、[2]静大・グリーン研、[3]静大院・創造、[4]北大・農)
○Jae-Hoon CHOI[1,2,3], Kaoru YOGOSAWA[1], Hirofumi HIRAI[1,2,3], Hideyuki MATSUURA[4], Shu HORIKOSHI[4], Wataru SABURI[4], Haruhide MORI[4], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,3] ([1]Grad. Sch. of Inte. Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ., [3]Grad. Sch. of Sci. and Technol., Shizuoka Univ., [4]Res. Fac. of Agric., Hokkaido Univ.)

【目的】

我々は以前、フェアリーリング惹起物質としてコムラサキシメジの培養濾液から植物成長調節活性を有する 2-azahypoxanthine(AHX) を発見した [1)]。AHX は植物に処理することにより 2-aza-8-oxohypoxanthine(AOH) に代謝され [1,2,4)]、AOH もまた植物成長調節活性を有している [1,2,5)]。また、AHX あるいは AOH を処理したイネの抽出物から AOH の *N*-グルコシド 3 種(**1-3**) 及び *O*-グルコシド 1 種、AHX の *N*-グルコシド 1 種(**4**) 及び *O*-グルコシド 1 種が見い出されている [5,6)]。本研究では、AHX と AOH の植物体内におけるさらなる代謝産物の単離を目的とした。また、化合物 **1**, **4** はイネに処理すると AHX と AOH に分解されることが確認されているため、これを触媒する酵素を探索したところ、ジャポニカ種のイネが有するβ-glucosidase 8 がそれら配糖体の加水分解反応に関与することが明らかとなった。そこで、大腸菌を用いた異種発現による機能解析を目的とした。



【方法・結果】

2 週間 AHX 溶液中で培養したイネを地上部と根部に切り分け、エタノールとアセトンで順次抽出し、得られた可溶部を減圧濃縮した。この抽出物を各種クロマトグラフィーに供し、代謝産物の探索を行っている。また、化合物 **1**, **4** の加水分解反応に関与するβ-glucosidase 8 を大腸菌を宿主として異種発現し、その基質特異性や逆反応を触媒する活性の有無などを調査している。現在、この発現酵素と、同様にイネに存在するβ-glucosidase 7 の基質特異性や逆反応を触媒する活性の有無などを検討中である。

1) J.-H. Choi, H. Kawagishi et al., *ChemBioChem*, 11, 1373 (2010), 2) H. Kawagishi, Proc. Jpn. Acad., Ser. B, 95, 29 (2019), 3) H. Kawagishi, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 82,753 (2018), 4) J.-H. Choi, H. Kawagishi et al., *Angew.Chem.Int.Ed.*, 53, 1553 (2014), 5) J.-H. Choi, H. Kawagishi et al., *Org. Lett.*, 20, 312 (2018), 6) 與五澤・河岸ら、日本農芸化学会大会講演要旨集, p.1207 (2019)

fairy chemicals, metabolite, rice

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3B02a12
講演日時：3 月 27 日 11:51～ 総合学習プラザ B02 会場

植物成長調節活性物質である ICA における代謝と生理機能の解明
Elucidation of metabolism and bioactivity of ICA, a plant growth regulator

○古田島 美颯[1]、松崎 信生[2]、崔 宰熏[1,2,3]、呉 静[3]、平井 浩文[1,2,3]、浅川 倫宏[4]、大内 仁志[5]、稲井 誠[5]、菅 敏幸[5]、河岸 洋和[1,2,3]（[1]静大院・総合農、[2]静大院・創造、[3]静大・グリーン研、[4]東海大・海洋、[5]静県大・薬）
○Mihaya KOTAJIMA[1], Nobuo MATSUZAKI[2], Jae-Hoon CHOI[1,2,3], Jing Wu[3], Hirofumi HIRAI[1,2,3], Tomohiro ASAKAWA[4], Hitoshi OUCHI[5], Makoto INAI[5], Toshiyuki KAN[5], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,3] ([1]Grad. Sch. of Inte. Sci. and Technol., Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. of Sci. and Technol., Shizuoka Univ., [3]RIGST, Shizuoka Univ., [4]Mar. Sci. and Technol., Tokai Univ., [5]Sci. Pharm. Sci., Univ. of Shizuoka)

【目的】

フェアリーリングとは、芝草が輪状に繁茂あるいは枯死した後にキノコが発生する現象のことである。当研究室では、フェアリーリング惹起物質として、植物成長調節活性を有する2-azahypoxanthine (AHX) 及びimidazole-4-carboxamide (ICA) を単離した[1-4]。また、植物の成長を抑制するICAをイネに処理したところ、3つの代謝産物を単離し、そのうちICA-riboside (ICAr, **1**) とICAr-glucoside (**2**) の構造と**1**のイネにおける内生を明らかにした[5]。本研究では、化合物**3**の構造、生理活性、生合成経路の解明を目的とした。

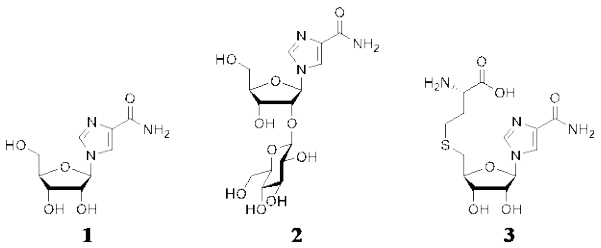


Fig. 化合物**1-3**の構造

【方法・結果】

化合物**3**は分子中にホモシステインを含んでおり、その絶対配置を明らかにするため、全合成を行った。その結果、キラルカラムを用いたクロマトグラフィーによってL体であると決定した。また、化合物**1-3**を用いてイネにおける成長調節活性を試験したところ、いずれの化合物も地上部においてはICAより弱い成長抑制活性、根部においてはICAとは対照的に弱い成長促進活性を示した。現在、化合物**3**の生理活性及び生合成経路を解明するため、取り込み試験や生合成に関わると考えられる酵素の大腸菌による異種発現を行っている。

1) Choi, J.-H., Kawagishi, H. *et al*. *ChemBioChem* **11**, 1373–1377 (2010).
2) Choi, J.-H., Kawagishi, H. *et al. J. Agric. Food Chem.* **58**, 9956–9959 (2010).
3) Kawagishi, H. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **82**, 752–758 (2018).
4) Kawagishi, H. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B.* **95**, 29–38 (2019).
5) Choi, J.-H., Kawagishi, H. *et al. Org. Lett.* **21**, 7841–7845 (2019).

fairy ring, *Oriza Sativa*, metabolism

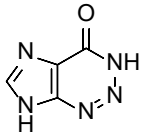
発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

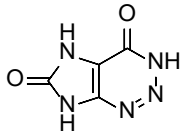
講演番号：3B02a13
講演日時：3 月 27 日 12:02～ 総合学習プラザ B02 会場

植物におけるフェアリー化合物 2-azahypoxanthine の代謝酵素に関する生化学的研究
Biochemical study on metabolic enzymes of one of fairy chemicals, 2-azahypoxanthine in plant
○稲木 僚[1]、竹村 太秀[1]、崔 宰熏[1,2,3]、堤 祐司[4]、平井 浩文[1,2,3]、河岸 洋和[1,2,3] ([1]静大院・総合農、[2]静大・グリーン研、[3]静大院・創造、[4]九大農・環境農学)
○ Ryo Inaki[1], Hirohide Takemura[1], Jae-Hoon Choi[1,2,3], Yuji Tsutsumi[4], Hirofumi Hirai[1,2,3], Hirokazu Kawagishi[1,2,3] ([1]Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka University, [2]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, [3]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, [4]Department of Agro-environmental Sciences, Faculty of Agriculture, Kyushu University)

【目的】我々は、コムラサキシメジの培養濾液からフェアリー化合物2-azahypoxanthine (AHX) を見出し、さらにAHXは植物内でも内生されていることを明らかにしてきた[1-4]。さらに、AHXを植物に投与すると、2-aza-8-oxohypoxanthine (AOH) に代謝され、AHXおよびAOHは植物成長調節作用を有することが確認されている[2]。AOHは化学合成が極めて困難であるが、以前にAHX結合性タンパク質としてイネからペルオキシダーゼが検出され、AHXからAOHへの変換に関与している可能性が考えられた[5]。また、RNAiによりペルオキシダーゼ(CWPO-C)をノックダウンしたポプラの表現型において、主茎の伸長および直系の増大、根の伸長促進がみられた。これはAOHを処理した時の表現型に類似しており、CWPO-Cがフェアリー化合物の代謝に関与している可能性も考えられる[6]。本研究ではこれらの酵素の機能を解明し、AOH合成酵素を同定することを目的とした。


AICA


AHX


AOH

【方法・結果】AHX結合タンパク質として検出されたペルオキシーゼをOsPO1と命名し、大腸菌による異種発現を行った。また、BLAST検索を行いイネにおいてCWPO-Cと最も相同性の高いものをOsPO3とし、大腸菌による異種発現を試みた。フェアリー化合物を基質としてOsPO1、OsPO3およびCWPO-Cの酵素活性を調べ、CWPO-CにおけるAOH変換活性を確認した。すべてにおいて、AHXの前駆体である5-aminoimidazole-4-carboxamide (AICA) に対する変換活性も確認した。現在イネの培養細胞を用いてクロマトグラフィーによる分画を行い、AHXからAOHへの変換酵素の探索を行っている

1) J.-H. Choi, H. Kawagishi et al., *ChemBioChem*, 11, 1373-1377 (2010)
2) J.-H. Choi, H. Kawagishi et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 53, 1553-1555 (2014)
3) H. Kawagishi, *Biosci. Biotechno.l Biochem.*, 82, 752-758 (2018)
4) H. Kawagishi, *Proc. Jpn. Acad. Ser. B.*, 95, 29-38 (2019)
5) 杉浦　輝, 日本農芸化学会 2016 年度大会, (2016)
6) D. Yoshikay, Y. Tsutsumi et al., 5th Symposium of Biotechnology Applied to Lignocelluloses, (2018)

fairy rings, peroxidase

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3B02p01
講演日時：3 月 27 日 13:50～ 総合学習プラザ B02 会場

ブラシノステロイド情報伝達経路上の新規 bHLH 型転写因子の植物成長における機能解析
Arabidopsis transcription factors in BR signaling by CRES-T method

○田中 雄一朗[1,3]、長谷川 玲花[4]、山上 あゆみ[1,2]、池田 美穂[4]、光田 展隆[5]、久城 哲夫[3]、篠崎 一雄[2]、浅見 忠男[6]、高木 優[4]、中野 雄司[1,2]([1]京大院・生命、[2]理研・CSRS、[3]明治大院・農、[4]埼大院・理工、[5]産総研、[6]東大院・農)
○Yuichiro Tanaka[1,3], Reika Hasegawa[4], Ayumi Yamagami[1,2], Miho Ikeda[4], Nobutaka Mitsuda[5], Tetsuo Kushiro[3], Kazuo Shinozaki[2], Tadao Asami[6], Masaru Takagi[4], Takeshi Nakano[1,2] ([1]Dept. Biostudies., Kyoto Univ, [2]RIKEN・CSRS, [3]Dept. Agric. Chem., Meiji Univ., [4]Grad. Sch. Science. Technol., Saitama Univ., [5]AIST., [6]Dept. Appl. Biol. Chem. Univ. of Tokyo)

【目的および背景】

ブラシノステロイド(BR)は植物の成長、光形態形成、葉緑体制御などに関わる重要な植物ホルモンである。我々は、BR 生合成阻害剤 Brz 存在下での胚軸形態を基に突然変異体の選抜を行い、BR シグナル伝達に関わる因子の探索を行ってきた。現在までに BR シグナル伝達に関わる転写因子としては BIL1/BZR1、BES1 を始めとして数種類が同定されているが、これらの既知の転写因子のみでは BR による生理機構の全てを説明し得るのは難しいと考え、未同定の転写因子が存在すると考察している。本研究では、このような BR に関わる新たな転写因子の単離を目的とし、CRES-T 法(Chimeric repressor silencing technology)を用いて作成された変異体群から、Brz を用いたスクリーニングを試みている。

【方法および結果】

野生型アラビドプシスは暗所発芽時に、徒長し子葉が閉じたもやし様の形態を示すが、BR 欠損下の暗所発芽時には、胚軸が短化し子葉が開花した暗所光形態形成を示す。この条件下において、Brz 耐性の徒長胚軸形態、もしくは Brz 高感受性の短化胚軸形態示す変異体を探索し、これを BR シグナル伝達の原因遺伝子として考え、新規な BR シグナル因子の単離を行ってきた。

産総研/埼玉大において開発された CRES-T 法は、アラビドプシスの全転写因子約 2000 種について、SRDX ドメインを付加したベクターを形質転換することによって、全転写因子の機能抑制型変異形態を発現させる変異体作出法である。そこで、この CRES-T 変異体群と、Brz に基づくケミカルバイオロジーの融合によって BR シグナル伝達経路上の新規な転写因子のスクリーニングを試みた。これらの中で特に、bHLH ファミリーに属する遺伝子を変異原因とする Brz 感受性異常 bHLH 変異体 *bhh1,2,3,4,5,6*（*Brz-sensitivity-altered bHLH1,2,3,4,5,6* ）を単離した。現在は、相互にアミノ酸配列約 63%という高い相同性をもつホモログである *BHH1* と *BHH2* を中心に解析を進めている。

bhh1, bhh2 変異体は、Brz 培地上の暗所発芽 7 日目において、野生型と比較して Brz 高感受性の胚軸短化形態を示し、成熟期には矮性形態を示した。さらに、*BHH1, BHH2* 過剰発現体は共に、CRES-T ラインとは逆に、Brz 耐性の徒長胚軸形態を示し、成熟期においては草丈が高く、種子サイズが増大するなどの形態を示した。また、細胞内解析においては、Yeast-two hybrid 法による解析によって、BIL1/BZR1 核移行因子である BIL7 や、BR シグナル抑制型キナーゼである BIN2 との相互作用が認められ、GFP との融合タンパク質を用いた解析により、核に局在していることも明らかとなった。さらに、*BHH2* 過剰発現体は、BR シグナル応答におけるマーカー遺伝子である *TCH4* の転写を促進させることも明らかとなった。このことから、このファミリー遺伝子は、BR シグナル伝達において促進的に働き、植物の成長を促す機能を持つことが予測される。現在は、引き続き qRT-PCR による発現解析や、*BHH1* と *BHH2* の二重変異体の解析などを進めている。本研究は農研機構生研支援センター「イノベーション創出強化研究推進事業」の支援を受けて行った。

phytohormone, brassinosteroid, transcription factor

講演番号：3B02p02
講演日時：3 月 27 日 14:01～ 総合学習プラザ B02 会場

高活性型ブラシノステロイドを生産する CYP85A3 の構造決定に向けた大量発現及び精製
Overexpression and purification of CYP85A, which produces bioactive brassinosteroids

○藤山 敬介[1]、髙見 祐貴[2]、日野 智也[1]、大西 利幸[3]、轟 泰司[3,4]、水谷 正治[5]、永野 真吾[1] ([1]鳥取大院工、[2]鳥取大工、[3]静岡大農、[4]静岡大グリーン研、[5]神戸大院農)
○ Keisuke FUJIYAMA[1], Yuki TAKAMI[2], Tomoya HINO[1], Toshiyuki OHNISHI[3], Yasushi TODOROKI[3,4], Masaharu MIZUTANI[5], Shingo NAGANO[1] ([1]Grad. Sch. of Eng., Tottori Univ., [2]Fac. of Eng., Tottori Univ., [3]Fac. of Agr., Shizuoka Univ., [4]RIGST, Shizuoka Univ., [5]Grad. Sch. of Agr. Sci., Kobe Univ.)

ブラシノステロイド（BR）は主に伸長成長を促進する植物ホルモンであり、生合成の過程で多くのシトクロムP450 (P450, CYP) が関与することが知られている。それらの中でもBR生合成の初発を担うCYP90B1と生合成終盤の反応を担うCYP85Aファミリーは、それぞれBR生合成の律速段階とBRの活性化段階を担う重要な酵素である。我々は既に基質及び阻害剤結合型CYP90B1の結晶構造を決定し、CYP90B1による立体選択的な水酸化メカニズムと既存のBR生合成阻害剤の詳細な結合様式を明らかにした（Fujiyama *et al, Nat. Plants* 2019)。一方、BR生合成経路終盤の反応は植物生理学的に重要であるにも関わらず、CYP85Aファミリーが触媒するBaeyer-Villiger酸化（Fig. 1）の詳細は明らかになっていない。そこで我々はCYP85Aファミリーによる活性型BRの生産メカニズムの解明や、CYP85Aファミリーに特異的な新規BR生合成阻害剤の開発に必要な構造情報の提供、及びBRを生合成する各種酵素反応を分子レベルで理解することを目的とし、基質結合型のCYP85Aファミリーの構造決定を目指した。

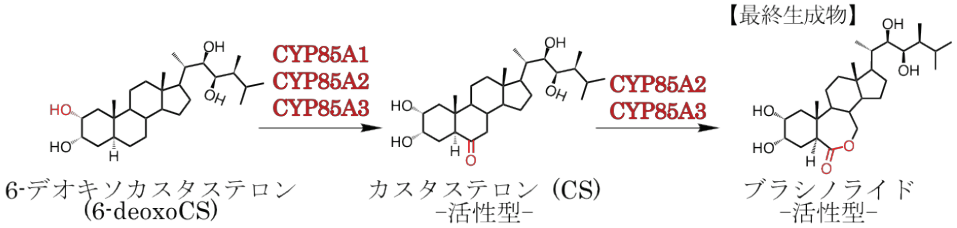


Fig.1 CYP85A ファミリーが触媒する BR 生合成経路終盤の反応

本研究では初めに、CYP85Aファミリーの中でも酵素の異種発現及びブラシノライドの生産活性が確認されているシロイヌナズナ由来CYP85A2とトマト由来CYP85A3に注目した。大腸菌での発現を試みるため、各種酵素の膜アンカードメインを欠損させ、C末端側にHisタグを付加した変異体を作製した。その結果、結晶化に必要な発現量が確認されたトマト由来CYP85A3を研究対象とすることにした。CYP85A3を大量発現した菌体を超音波破砕し、超遠心分離によって可溶性画分を回収した。その後、得られた可溶性画分からNi-NTAアガロース担体と陽イオン交換担体を用いてCYP85A3を高純度に精製した。精製したCYP85A3は、6-deoxoCSやCSを基質として認識する他、CSからブラシノライドを生産する活性を持つことが確認されたため、現在はこの酵素試料を用いて結晶化スクリーニングを行なっている。本発表では上記の内容に加え、6-deoxoCSやCSの結合に伴う吸収スペクトルの変化、及びそれらに対する親和性についても報告する。

brassinosteroid, P450, heme

発表責任者：藤山敬介（d18t3003c@edu.tottori-u.ac.jp）

講演番号：3B02p03
講演日時：3 月 27 日 14:12～ 総合学習プラザ B02 会場

ブラシノステロイド情報伝達における新規 MYB 型転写因子 BMYs の単離と機能解析
Arabidopsis transcription factors in BRs signaling by Yeast-two hybrid method

○藤田 健司郎[1,3]、長谷川 玲花[4]、山上 あゆみ[1,2]、池田 美穂[4]、光田 展隆[5]、久城 哲夫[3]、篠崎 一雄[2]、高木 優[4,5]、浅見 忠男[6]、中野 雄司[1,2]（[1]京大院・生命、[2]理研・CSRS、[3]明治大院・農、[4]埼大院・理工、[5]産総研、[6]東大院・農）
○Kenjiro Fujita[1,3], Reika Hasegawa[4], Ayumi Yamagami[1,2], Miho Ikeda[4], Nobutaka Mitsuda[5], Tetsuo Kushiro[3], Kazuo Shinozaki[2], Masaru Takagi[4,5], Tadao Asami[6], Takeshi Nakano[1,2] ([1]Grad. Biostudies., Kyoto Univ., [2]CSRS, RIKEN, [3]Grad. Agric., Meiji Univ., [4]Grad. Sch. Sci. Eng., Saitama Univ., [5]AIST, [6]Dept. Apple. Biol. Chem., Univ. of Tokyo)

【背景および目的】ブラシノステロイド（BR）は植物成長、光形態形成、葉緑体制御などに関わる重要な植物ホルモンである。我々は BR 生合成阻害剤 Brz 存在下での胚軸形態観察から突然変異体の選抜を行い、BR シグナル伝達に関わる因子の探索を行ってきた結果、BR シグナル伝達に関わる転写因子 BIL1/BZR1 などを同定してきている。さらに、BIL1/BZR1 の核移行制御因子として、促進因子 BIL7 と抑制因子 BSS1 を単離したが、BIL7,BSS1 の高発現株形質は BIL1/BZR1 の活性型変異、抑制型変異の形態よりも著しく強いことが明らかとなった。これらの結果は、BIL7 および BSS1 が BIL1/BZR1 以外にも BR シグナル伝達経路上の転写因子を制御している可能性を示している。そこで、本研究では、これらの新しい BR シグナル転写因子の単離を目的として、探索を開始した。

【方法および結果】我々は、これまでに BR 生合成阻害剤 Brz 存在下暗所発芽時において、野生型アラビドプシスの胚軸と比較して、胚軸徒長形態を示すものを BR シグナル活性変異体、胚軸短化形態を示すものを BR シグナル抑制変異体として単離するケミカルバイオロジー研究を進めてきた。BIL7 および BSS1 と相互作用する転写因子を探索するため、産総研で開発されたアラビドプシス約 2000 種の転写因子を網羅した Y2H ライブラリーを用いて選抜を行ない、得られた転写因子について、産総研/埼玉大で作成された CRES-T（*Chimeric repressor silencing technology*）形質転換体種子の Brz 感受性解析を行う融合研究を試みた。

その結果、MYB ファミリーに属する転写因子に由来する Brz 感受性異常 MYB 変異体 *bmy1,2*（*Brz-sensitivty-altered myb 1,2*）が選抜された。Y2H 法により BMY1,2 は少なくとも BIL7 と相互作用を示し、この *bmy1-SRDX* 形質転換体は、Brz 条件下の暗所発芽時において野生型に比べて、Brz 高感受性の胚軸短化形態を示した。また、成熟期には茎丈が短いなどの BR 欠損様形態が観察された。さらに、GFP-BMY1 過剰発現体の解析により、BMY1 は核と細胞質に存在することが明らかとなった。*bmy2-SRDX* の Brz 条件下の暗所発芽時は Brz 高感受性の胚軸短化形態を示し、成熟期には、長日条件下で花茎形成期までのロゼッタ葉数が約 50 枚となる著しい花成遅延形態が観察された。BMY2 過剰発現体では、Brz 条件下の暗所発芽で胚軸徒長を示したことから、少なくとも BMY2 に関しては BR シグナル応答を正に制御する転写因子であると考察された。現在、さらなる解析を進めている。

本研究は農研機構生研支援センター「イノベーション創出強化研究推進事業」の支援を受けて行った。

Brassinosteroid signaling, Yeast-two hybrid, Transcription factors

講演番号：3B02p04
講演日時：3 月 27 日 14:23～ 総合学習プラザ B02 会場

新規 GH3 阻害剤を用いたオーキシン代謝経路の解析
The analysis of auxin catabolic pathway with a chemical inhibitor for GH3 amide synthetase
○新井 一司[1]、福井 康祐[1]、笠原 博幸[2,3]、林 謙一郎[1] ([1]岡山理大、[2]理研・CSRS、[3]東京農工大・GIR)
○Kazushi ARAI[1], Kosuke FUKUI[1], Hiroyuki KASAHARA[2,3], Ken-ichiro HAYASHI[1] ([1]Okayama Univ. Sci, [2]CSRS, RIKEN, [3]GIR, Tokyo Univ. Agr. Tech)

＜背景・目的＞
植物ホルモン・オーキシンは、植物全体の成長・発達・環境応答などあらゆる形態形成に関与している。オーキシンは、細胞内・組織内での濃度の違いにより様々な生理作用を示すため、生合成・輸送・不活性化がオーキシン濃度を精緻に制御していると考えられている。これまで、主要なオーキシンであるインドール-3-酢酸（IAA）の生合成酵素や輸送体が同定され、生合成の主経路や、環境応答における極性輸送の重要性が示されてきた。しかしながら、IAA の不活性化については複数経路が提唱され、主経路も判然としていないのが現状である。これまでの報告により、主要なオーキシンの代謝経路として２オキソグルタル酸要求性酸化酵素である DAO が担う酸化経路と、オーキシン早期応答性遺伝子 *GH3* がコードするアミノ酸複合体合成酵素が担う経路が想定されている。しかしながら、シロイヌナズナの *dao1-1* 変異体や、*35S::DAO1* 組換え体でも顕著な形態の変化は認められず、DAO によるオーキシン代謝活性には疑問が残る。一方で、*GH3* 遺伝子は機能重複する多重遺伝子ファミリーを形成しているため、オーキシン代謝調節における GH3 経路の寄与は未解明な部分が多い。そこで、本研究ではオーキシン代謝に関わる GH3 酵素の阻害剤を新規に創製し、GH3 経路がオーキシン代謝に担う役割を明らかにすることを目的として研究を行なった。
＜方法・結果＞
GH3 酵素機能の阻害活性を指標としたケミカルスクリーニングを行い、得られた化合物をリード化合物として構造最適化を行った。その結果、GH3 酵素機能を強く阻害する代表化合物を得た。本化合物を植物に処理すると、オーキシン過剰な表現型を示した。さらに、様々なオーキシン関連の変異体や組換え体植物を用いた解析を行なった結果、本化合物はオーキシン代謝を担う GH3 酵素を特異的に阻害し、内生 IAA を蓄積させることが示された。また、大腸菌を用いて組換えタンパク質を合成し、GH3 酵素反応に対する阻害剤の阻害定数および阻害様式の同定を行なった。その結果、本化合物がオーキシンと拮抗して酵素反応を阻害することが明らかとなった。以上から、GH3 経路はオーキシンの代謝の大部分を担っていることが示唆された。

auxin, GH3, inhibitor

講演番号：3B02p05
講演日時：3 月 27 日 14:34～ 総合学習プラザ B02 会場

レイシの花の発達に伴うオーキシン関連化合物の変化

Changes of Auxin-related compounds　depending on the development of lychee flowers

○金 倫熙、宮川 恒、宮下 正弘、大迫 祐太朗、山根 久代、田尾 龍太郎（京大院農）
○Ryunhee KIM, Hisashi MIYAGAWA, Masahiro MIYASHITA, Yutaro OSAKO, Hisayo YAMANE, Ryutaro TAO (Grad. Sch. Agr., Kyoto Univ.)

【目的】レイシ(*Litchi chinensis* Sonn.)は甘さと酸味のバランスに特徴のある果物で、世界のさまざまな国で食されている。しかし、栽培には雌花の形成比率が低く、落花率が高いという困難がある。レイシにおいては植物の全般的な発達に関与している研究はまだ十分に行われていない。
そこで、本研究はレイシ果実収量の向上をめざし、性決定と果実の発達におけるオーキシンの関与を検討した。検討にあたっては、インドール-3-酢酸（IAA）に加えて各種代謝物を分析対象とし、その総和による組織中のオーキシン合成活性の評価を試みた。
【方法】2019 年の春（４月～５月）に、生殖器官の発達程度によって、品種’Yu her Pau’の花を 4 段階(bud stage 1[BS1], bud stage 2[BS2], immature flower[IF], mature flower[MF])に区分し、収穫した。その後、-70℃に保管し、80%アセトン水溶液で抽出した。抽出液を濃縮し、C18 固相カートリッジを用いて精製を行った後、再度濃縮し、LC-ESI-MS/MS (Shimadzu LCMS-8030)を用いて IAA とその酸化代謝物ならびにアミノ酸抱合体を検出、定量した。組織内濃度は抽出の際に所定量加えたそれぞれの代謝物の同位体標識体との比に基づいて計算した。
【結果】BS1 から IF の段階では、遊離 IAA が雄花より雌花に高い濃度で含まれているが、花が成熟すると、雌花の IAA 濃度が低くなることが分かった。各発達段階にしたがって、雌花の子房の IAA 濃度変化が、雌花全体の IAA 濃度変化と一致した。
IAA 代謝物としては、酸化代謝物である OxIAA ,DioxIAA が雄花、雌花、いずれにおいても高い濃度で含まれており、その変化は IAA 濃度変化のパターンと類似した。また雄花は発達の過程で雄花における IAA アミノ酸抱合体の濃度はほとんど変化しなかったのに対して、雌花では BS2 から MF の段階で IAA-Asp, OxIAA-Asp, DioxIAA-Asp, IAA-Glu,DioxIAA-Glu などのアミノ酸抱合体の濃度が増加した。
花に対して合成オーキシン NAA（*1-Naphthaleneacetic acid*）を処理したところ、雄花では花糸が伸張し、雌花では子房が肥大した。
以上の結果から、雌花の初期成長には雄花に比べて高濃度の IAA が必要となるが、成熟過程では酸化代謝やアミノ酸抱合により、IAA の濃度が低下することが明らかになり、オーキシンがレイシの生殖器官の発達に関与することが示唆された。

Litchi chinenesis, Auxin, IAA(Indole-3-acetic acid)

発表責任者：KIM Ryunhee（kim.hee.67a@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3B02p06
講演日時：3 月 27 日 14:45～ 総合学習プラザ B02 会場

ジベレリン生合成を阻害するジベレリン誘導体
Gibberellin derivatives as biosynthetic inhibitors of gibberellin
○磯野 満理奈[1]、竹内 純[2]、瀬尾 光範[4]、轟 泰司[2,3]([1]静大院・総科技・農、[2]静大・農、[3]静大・グリーン研、[4]理研・CSRS)
○Marina ISONO[1], Jun TAKEUCHI[2], Mitunori SEO[4], Yasushi TODOROKI[2,3] ([1]Dept. Agric., Shizuoka Univ., [2]Fac. Agric., Shizuoka Univ., [3]RIGST, Shizuoka Univ., [4]RIKEN CSRS)

【背景・目的】植物ホルモンのジベレリン（GA）は発芽促進，茎部伸長作用，花芽誘導などの生理作用を示す。これまでに 130 種以上の GA が同定されているが，高等植物の活性型 GA は GA 生合成最終産物である GA_4 と GA_1 だけである。本研究は GA 生合成最終段階を触媒する GA 3β-oxidase（GA3ox）の選択的阻害剤創出を目的としている。2-オキソグルタル酸（2-OD）/Fe(II)依存性二原子酸素添加酵素（2ODG）である GA3ox は，2-オキソグルタル酸と非ヘム鉄により酸素分子を活性化することで GA_9 と GA_{20} の A 環 3 位を水酸化し，活性型 GA である GA_4 と GA_1 を生成する。植物には 100 を越える 2ODG 遺伝子が存在しており，GA3ox 同様に GA 生合成・代謝に関わる GA20ox と GA2ox，エチレン生合成の最終段階を触媒する ACC oxidase の他にも，オーキシンやジャスモン酸の代謝，DNA の修復やヒストンのデメチル化，さらにはフラボノイドなど 2 次代謝物の生合成も担っている。既報の GA3ox 阻害剤としては，2-OD のアナログとして 2ODG への 2-OD の結合を阻害するプロヘキサジオン（PHX）が知られているが，その阻害機構が示すように原理的にはすべての 2ODG を阻害してしまうため，GA3ox 選択的な阻害剤は現状未出である。
【方法・結果】酵素選択性を付与するために内生基質である GA_9/GA_{20} に類似した構造を基本骨格として採用し，酵素親和性を強化する目的で，金属元素に強く配位する性質をもちながらも，導入による構造変化を最小限に留められるイソシアニド（NC）基を酸化部位（3β）に配置した化合物を，GA3ox 選択的阻害剤候補として設計した。入手性と 3 位の反応性を考慮して GA_3 を原料とし，GA_3 型ならびに GA_{20} 型阻害剤の合成を進めたところ，合成過程で副反応が起きて *iso*-GA_3 型の化合物 Me 3β-NC-*iso*-GA_3（NC-*iso*）が得られた。そこで，この化合物の植物体に対する活性を先に調べたところ，NC-*iso* はシロイヌナズナ（Col-0）種子発芽には何の効果も示さなかったが，イネ（Nipponbare）実生に対しては処理濃度依存的に節間伸長を抑制することがわかった。この効果は GA_3 共処理で打ち消されたため，NC-*iso* が GA 生合成に影響を与えているかどうかを調査した結果，NC-*iso* 処理したイネ実生において GA3ox の前駆体である GA_9 と GA_{20} の内生量が大きく減少していることがわかった。さらに NC-*iso* による節間伸長阻害活性は，*ent*-カウレン酸と同様に GA に代謝される steviol を共処理することで打ち消されたため，NC-*iso* は GA3ox ではなく *ent*-カウレン酸化酵素 CYP701A を阻害標的としている可能性が示唆された。現在，当初の目的である GA_3/GA_{20} 型阻害剤の合成を進めている。

gibberellin, inhibitor, plant hormone

発表責任者：轟　泰司（todoroki.yasushi@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3B02p07
講演日時：3 月 27 日 15:06～ 総合学習プラザ B02 会場

ジャスモン酸誘導体プロヒドロジャスモンはレッドリーフレタスにおけるフェノール性化合物の蓄積を促進する

The jasmonic acid derivative, prohydrojasmon (PDJ), promotes the accumulation of phenolic compounds in red-leaf lettuce

○波岡 由[1]、高橋 真哉[1,2]、青野 光子[1,3]、佐野 友春[4]、腰山 雅巳[5]、藤澤 浩[5]、礒田 博子[1,2] ([1]筑波大・T-LSI、[2]筑波大・生命環境、[3]国環研・生物 C、[4]国環研・計測 C、[5]日本ゼオン)
○Yui Namioka[1], Shinya Takahashi[1,2], Mitsuko Aono[1,3], Tomoharu Sano[4], Masami Koshiyama[5], Hiroshi Fujisawa[5], Hiroko Isoda[1,2] ([1]T-LSI, Univ. Tsukuba, [2]FLES, Univ. Tsukuba, [3]CEBES, NIES, [4]CEMA, NIES, [5]Zeon Corp.)

近年、植物由来の様々な生理活性物質（ファイトケミカル）による健康増進効果が注目されている。作物については、ファイトケミカルを多く含む新しい品種の開発なども盛んに行われている。植物ホルモンの一種であるジャスモン酸とその誘導体は、植物体への作用として、成長調節、生物的・非生物的ストレス耐性の付与だけでなく、二次代謝産物蓄積の促進などが報告されている。

合成ジャスモン酸誘導体であるプロヒドロジャスモン（PDJ）は、植物成長調整剤として、果実の着色促進や品質保持にも用いられる。しかしながら、葉物作物の品質向上に用いた例は知られていない。そこで本研究では、葉物作物の一種であるレッドリーフレタスに対して PDJ 処理を行い、フェノール性化合物の含有量を指標として機能性成分産生を促進させる方法の検討と、PDJ の作用メカニズムの解明を試みた。

植物材料にはレッドリーフレタス（*Lactuca sativa* L.）を用いた。レッドリーフレタスは水耕栽培をおこない、PDJ は水耕液に混合することにより幼植物体に処理した。PDJ 処理後にレッドリーフレタスの地上部をメタノール-塩酸混合液に浸漬することにより、抽出物を得た。得られた抽出物は、2 つの波長（305 nm と 540 nm）で吸光度を測定することにより、簡易的な定量を試みた。さらに、抽出物に含まれる化合物を明らかにするために、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による分析を行った。HPLC 分析には、抽出物を濃縮しトリフルオロ酢酸含有バッファーに再溶解したものを用いて分析をおこなった。さらに、液体クロマトグラフィー-質量分析法（LC-MS）による分析もおこなった。

レッドリーフレタスへの PDJ 処理により、処理後 1-3 日で第 1 本葉と第 2 本葉のアントシアニン含有量蓄積の促進がみられた。また、処理後 1-2 日で、第 1 葉と第 2 葉のフェノール化合物蓄積の促進が見られた。HPLC 分析により、これらの一部はシアニジン-3-グルコシドであることが確認された。このことから、葉物作物への PDJ 処理によるファイトケミカル産生促進の可能性が示唆された。さらに、その他のアントシアニン類やフェノール性化合物についても現在同定を行っているので、合わせて報告する予定である。

Prohydrojasmon, Phenolic compounds, Red leaf lettuce

講演番号：3B02p08
講演日時：3 月 27 日 15:17～ 総合学習プラザ B02 会場

Foliar application of prohydrojasmon on growth, total phenolic content, anthocyanin accumulation and antioxidant activity of komatsuna and lettuce

○Haidar Rafid Azis[1], Selma Etteieb[1,2], Shinya Takahashi[1,3], Masami Koshiyama[4], Hiroshi Fujisawa[5], Hiroko Isoda[1,3] ([1]ARENA, Univ. Tsukuba, Japan, [2](LSTE), INAT, Tunis, Tunisia, [3]FLES, Univ. Tsukuba, Tsukuba, Japan, [4]Specialty Chem. Div., Zeon Corp., Tokyo, Japan, [5]Headquarters, Zeon Corp., Tokyo, Japan)

Prohydrojasmon has been reported to improve the quality of crops. This improvement including the accumulation of polyphenols which beneficial to promote health. The majority of studies reported its application towards fruit. We noticed it still limited to vegetable crops. Here, we evaluated foliar spray application of prohydrojasmon on growth and total phenolic content, anthocyanin content, and antioxidant activity in two leafy vegetables, komatsuna and lettuce.

Our findings indicated prohydrojasmon did not show any significant inhibitory effect on growth. In general, Prohydrojasmon significantly improved total phenolic content, anthocyanin content and antioxidant activity. In komatsuna, prohydrojasmon at a concentration of 0.5 μM, improved total phenolic and anthocyanin content. At a concentration of 1 μM, it induced antioxidant activity. In lettuce, prohydrojasmon at a concentration of 400 μM, improved total phenolic and anthocyanin content. At a concentration of 0.5 μM, induced the antioxidant activity. These results suggest prohydrojasmon potentially applicable to vegetable crops. It significantly improved phenolic and anthocyanin content, as well as induced antioxidant activity. It also did not affect the growth of plant adversely.

Prohydrojasmon, Vegetative crops, Phenolic

発表責任者：Shinya Takahashi（takahashi.shinya.fp@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3B02p09
講演日時：3 月 27 日 15:28～ 総合学習プラザ B02 会場

ソバα-アミラーゼ阻害ペプチド遺伝子の植物体内での発現

Expression of buckwheat α-amylase inhibitory peptide gene in plants

○新町 文絵、菊地 舞、平野 佳奈、熊谷 日登美、水野 真二、渡辺 慶一（日大生物資源）
○ Fumie shinmachi, Mai Kikuchi, Keina Hirano, Hitomi Kumagai, Shinji Mizuno, Keiichi Watanabe (Nihon Univ.)

2015 年から機能性表示食品制度が施行され、これまでに農林水産物の生鮮食品でも 30 品目以上が届出・受理されているが、全体に占めるその割合は少ない。しかし農作物の中にはまだ明らかにされていない機能性成分を含有するものがあると思われる。

現在、日本での糖尿病患者は予備軍も含めて増加傾向にあり、その対策が必要とされている。そこで機能性農作物を利用して、食餌の過程で血糖値の上昇を防ぐことができれば、血糖値抑制の有用な方法の一つとなるのではないかと考えた。α-アミラーゼは、デンプンから糖の生成に関与することから、その活性を阻害できれば糖の生成量が減り、体内への糖吸収も減少して血糖値上昇を抑制する効果が期待される。これまでにソバの実から抽出したタンパク質画分にα-アミラーゼ阻害活性を持つものがあり、アミノ酸の部分配列を決定している。そこでこのペプチドの遺伝子配列をもとに、植物体内での発現部位や時期を検討することで、植物に存在する新たなα-アミラーゼ活性阻害物質の探索や機能解析に寄与することを目的として実験を行った。

供試植物は、ソバ(品種:信州大ソバ)を用い、深型シャーレに入れたバーミキュライトに播種した。子葉が完全に展開したら 450ml 容ガラス瓶に移植し、生育に合わせて強度を変えた Hoagland’s 水耕液で栽培した。栽培は、25℃明暗 12 時間の培養棚で行い、生育時期の異なる三時期(花が咲き始めた頃、全体に開花した頃、子実がついた状態)に部位別に採取し、液体窒素で凍結後、分析まで-80℃で保存した。まず、α-アミラーゼ阻害活性を持つペプチド断片のアミノ酸配列をもとにホモロジー検索を行い、ソバおよびダッタンソバの EST 配列から、α-アミラーゼ阻害活性を持つペプチドのアミノ酸部分配列を含む領域でプライマーを設計した。このプライマーを用いてソバの葉から DNA を抽出して PCR を行ったところ目的サイズの増幅が確認できたため、この増幅断片を回収・精製し、DNA シーケンス解析を行った。その結果、目的配列を含む断片であることを確認した。

次に生育時期の異なる三時期の各部位から RNA を抽出し RT-PCR により cDNA を合成した後、設計したプライマーで PCR を行い、部位・時期別の遺伝子発現を検討した。その結果、α-アミラーゼ阻害活性を持つペプチド断片の遺伝子は、成熟した子実が付いた状態の時に子実で強く発現していることが分かった。その他の時期や部位でも弱い発現が見られたが、葉での発現は全体的に低い傾向にあった。これより、このペプチドは子実の成熟期に蓄積される同化産物の分解抑制に関与しているのではないかと推察した。今後、この全長を明らかにし、さらに詳細な解析を行う予定である。

Buckwheat, α-amylase inhibitor

発表責任者：新町文絵（shinmachi.fumie@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3B02p10
講演日時：3 月 27 日 15:39～ 総合学習プラザ B02 会場

サリチル酸の気孔閉鎖誘導におけるシグナル伝達物質としての硫化水素
Hydrogen sulfide as a signaling substance in the induction of stomatal closure by salicylic acid
○山田 直隆[1]、新北 大樹[1]、岩井 純夫[2] ([1]九州大農、[2]鹿児島大農)
○Naotaka Yamada[1], Daiki Shinboku[1], Sumio Iwai[2] ([1]Kyusyu Univ., [2]Kagoshima Univ.)

【目的】
硫化水素（H_2S）や一酸化窒素（NO）などのガス状分子や過酸化水素（H_2O_2）などの活性酸素は、植物細胞のシグナル伝達物質として注目されている。サリチル酸（SA）処理した気孔では、発生誘導される NO と H_2O_2 が気孔閉鎖のシグナルとして機能していることが報告されているが，H_2S が関与しているかについては未解明な点が多い．本研究では、SA による気孔閉鎖誘導において H_2S 、NO および H_2O_2 の機能と関係性を明らかとすることを目的とした。
【方法】
23℃で 3 週間以上育てたソラマメ葉から剥離した表皮を、KCl（50 mM）、$CaCl_2$（0.1 mM）を含む 10 mM MES-KOH (pH 6.15) 緩衝液に、23℃明期条件で 3 時間浮遊させ気孔を開口させた後、SA 処理を行い開口度の変化を顕微鏡観察にて測定した。孔辺細胞の H_2S，NO および H_2O_2 量は、蛍光プローブ Hsip-1 DA，DAF-2 DA および H_2-DCFDA を用いて、顕微鏡下で蛍光観察を行い測定した。
【結果】
SA (10 μM)の気孔閉鎖誘導は、H_2S の吸収剤（ヒポタウリン）や生合成阻害剤（アミノオキシ酢酸）、NO の消去剤（cPTIO）や合成酵素阻害剤（L-NAME）、およびカタラーゼや Superoxide 消去剤（Tiron）を同時施用することにより打ち消され、H_2S，NO および H_2O_2 はいずれも SA の気孔閉鎖誘導における重要なシグナル物質であることが確認された。
SA 処理した場合のソラマメ孔辺細胞内の H_2S、NO および H_2O_2 の含量は、それぞれ処理前の 1.7 倍、2.1 倍および 2.3 倍に増加したおり、SA はいずれの化合物の発生を引き起こしていた。これら各物質の増加は、H_2O_2 では SA 処理 5 分後、H_2S と NO では 1 時間後だけで観察され、H_2O_2 がいち早く SA により誘導されていた。また、発生する器官も H_2O_2 は孔辺細胞全体であるの対し、H_2S と NO 共にクロロプラストであった。以上のことから、H_2S と NO は密接に関係していることが予想された。また、SA 処理による H_2S の発生量に対して、cPTIO および L-NAME はほとんど影響しなかったことから、SA の気孔閉鎖誘導において，H_2S は NO の上流のシグナル物質として機能していると考えられた。

guard cell, salicylic acid, hydrogen sulfide

発表責任者：山田直隆（n-yamada@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3B02p13
講演日時：3 月 27 日 16:21～ 総合学習プラザ B02 会場

Studies on Sustainable Plant Production System Using Plant Growth Promoting Bacteria and Co-compost from Palm Plantation

○Alsayeda Zahra Salman[1], Clament Chin[2], Norhayati Ramli[3], Mohd Zainudin[4], Yukihiro Tashiro[1], Kenji Sakai[1] ([1]Grad. Sch. Bioresour. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ., [2]Facul. Of Sustai. Agri. Univ. Malaysia Sabah, [3]Facul. of Biotech. and Biomolec. Sci. Univ. Putra Malaysia, [4]Instit. of Trop. Agri. and Food Secur. Univ. Putra Malaysia)

【Introduction】In contribution to establish a zero-emission palm oil industry; co-compost was produced with shredded empty fruit bunch and anaerobic sludge from palm oil mill effluent. A hundred strains were isolated from the produced co-compost, screened and grouped into three groups according to their functions: plant growth promoting (PGP) traits, bio-controlling, and composting. In this study, four PGPB strains, *Citrobacter sedlakii* CESi7, *Citrobacter sedlakii* CE9, *Enterobacter cloacae* subsp. dissolvens B3 were selected. The strains were investigated for their efficiency as PGPB inoculants in screening and cultivation tests with a type culture strain, *Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens* LMG 2683(T).

【Methods and Results】The selected strains were screened in a plate assay for their abilities in nitrogen fixation, and solubilization of phosphate, potassium and silicate. The production of Indole-3-acetic acid (IAA) was quantified using the spectrophotometric assay. The plant growth promotion of the strains as inoculants was evaluated with *Brassica rapa* (Komatsuna) in a cultivation test with (positive) or without N, P, and K (negative). As a result, CESi7 and CE9 had remarkably high potassium solubilizing ability, and moderate phosphate solubilizing ability. CESi7 had the highest IAA production among the other strains. In the cultivation test, all inoculated plants had a germination rate between 93%-100%. In addition, novel strains *Citrobacter sedlakii* CESi7, *Citrobacter sedlakii* CE9 and *Entrobacter cloacao* subsp. dissolvens B3 showed evident plant growth abilities in comparison with the control. In particular, CESi7 had noticeably high plant growth promoting abilities especially towards the negative control in comparison with other treatments.

Plant Growth Promoting Bacteria,PGPB, Co-compost, *Citrobacter sedlakii,Enterobacter cloacae*

講演番号：3B02p14
講演日時：3 月 27 日 16:32～ 総合学習プラザ B02 会場

青枯病様発生土壌でのトマト発育におけるウルトラファインバブル水の効果

Effects of ultra fine bubble water on the growth of tomato cultured in wilt disease infested soil

○横山 峰幸[1]、海田 るみ[1]、山下 貴敏[2]、田中 和広[2]、藤井 義晴[1]([1]農工大院農、[2]田中金属製作所)
○ Mineyuki YOKOYAMA[1], Rumi KAIDA[1], Takatoshi YAMASHITA[2], Kazuhiro TANAKA[2], Yoshiharu FUJII[1] ([1]Tokyo Univ of Agr and Technol, [2]Tanakakinzoku Co.)

ウルトラファインバブル（UFB）水とは、ナノメートルレベルの微細な気泡を含有する水で、洗浄効果や長期間の気体封入効果、また生理活性効果を生かして環境・食品・水産・美容など様々な分野で利用が図られている。2030 年までに 12 兆円以上の市場を形成するとの予測もある。農作物の成長促進にも効果があるとの指摘もあるがその分子機構は不明の点が多い。発表者の一部は 2018 年の本学会で UFB が連作障害を改善する可能性があること、そしてその作用は植物に直接作用するのではなく土壌の改善を通じて作用していることを示した。本発表においては青枯病様の被害が出た実際の土壌を用いて、UFB 水がトマトの発育を回復するかどうかを実験室レベルで調査した。

【実験方法】UFB はμ-jet タイプ（田中金属製作所）を更に加圧・循環し作成した。空気を導入した UFB（TNPA）以外に酸素導入（TNPO）とオゾン導入（TNPOz）の UFB 水も作成した。土壌は、熊本県トマト栽培農家で青枯病様の劇症被害が発生している病害土壌を使用した。対照として同じ農家での無被害のトマト栽培土壌を用いた。UFB 水中でのヒドロキシラジカル(HR)は ESR（JES-FA200、日本電子）で、DMPO を用いて測定した。溶存酸素（DO）は蛍光式溶存酸素計（HI98198、HANNA）を用いて測定した。(実験 1) 2 日間発芽させたトマト種子を 24 穴プレートに播き、潅水を RO 水、または UFB 水（TNPA または TNPO）で行い、4 日間 25℃で栽培した後、根と地上部の生重量を測定した。（実験 2）病害土壌を RO 水または TNPA で一度洗浄後使用した。2 週間発育させたトマトの根を一部切断後に 6 穴プレートに植え、1 週間、30℃で栽培した。潅水は肥料添加 RO 水で毎日おこなった。

【結果】（実験 1）TNPA 及び TNPO で病害土壌に潅水すると根の生育が有意に回復し、UFB 水の効果が認められた。健全土壌では RO 水、TNPA、TNPO の生育に差はなかった。（実験 2）土壌を RO 水または TNPA で洗浄する方法においても TNPA 区は根の生育が有意に勝っていた。

UFB の生理活性はヒドロキシラジカル（HR）の発生に因るという考えがある。そこで UFB 水の HR 発生 ESR で測定できるか検討した。その結果、そのままでは測定は困難であったが硫酸を加えると明確に HR のシグナルが得られることが分かった。RO 水ではシグナルは測定できなかった。TNPA、TNPO、TNPOz で HR の発生に差はなかった。一方、溶存酸素（DO）は RO 水ではほぼ飽和しており、TNPA は RO 水と差がなく、TNPO では直後はより高かったが（18ppm）が 2,3 日で TNPA レベルに低下した。TNPOz も TNPA と差はなかった。従って作用性に相関があるのは HR であり、DO は今回の試験では寄与していないと考えられる。病害土壌中の菌叢の変化は現在、解析中である。

ultra fine bubble, nano bubble, Ralstonia solanacearum

発表責任者：横山峰幸（qqpn9upd@spice.ocn.ne.jp）

講演番号：3B02p15
講演日時：3 月 27 日 16:43～ 総合学習プラザ B02 会場

ノリ養殖の不作原因特定のための現場水質分析

Water quality analysis for specifying the cause of crop failures in *nori* cultivation

○吉村 航[1]、小杉 知佳[1]、島田 裕至[2]、吉満 友野[2]([1]日本製鉄（株）、[2]千水総研セ)
○KO YOSHIMURA[1], CHIKA KOSUGI[1], YUSHI SHIMADA[2], TOMOYA YOSHIMITSU[2] ([1]Nippon Steel Corp., [2]Chiba Prefectural Fisheries Research Center)

【背景】海苔は日本の水産業において重要な品目のひとつであり、そのほとんどが養殖により生産されている。千葉県富津市は東京湾の海苔養殖における主要な産地のひとつであるが、近年は原因不明の深刻な不作に悩まされている。不作は主に短縮化と呼ばれる現象によると考えられているが、その原因は明らかではない。海苔の生育に最も影響を与える因子のひとつとして海水の水質、特に栄養塩の濃度が挙げられる。そこで、不作原因の特定を目指し、海苔養殖場の経時的な水質分析を実施した。
【概要】2018 年 10 月から 2019 年 4 月まで、富津岬の南側に位置する海苔養殖場の 5 地点において週 1 回、経時的に現場表層水を採取した。海水はその日のうちに、前処理を行い、栄養塩濃度（三態窒素、リン酸態リン、ケイ素)、および pH、電気伝導度（EC)、クロロフィル濃度などの各種項目を分析した。その結果、以下のことが明らかになった。年明けを境に窒素・リンの濃度は大きく低下し、漁期後半は特にリンの枯渇が顕著であった。これは東京湾ではリンが不足傾向にあるというこれまでの知見と一致した。また、年末から年明けにかけて EC が上昇し、漁期前半にくらべ後半は EC が高い水準で推移した。このことから、漁期後半にかけて塩分濃度の高い外洋水が漁場に流入したことが示唆された。また、漁期後半ではリン酸態リン・ケイ素の濃度が周期的な変動を示したが、海水中のクロロフィル濃度はこれとは逆の動きを示しており、珪藻の消長が海水中の栄養塩の濃度に大きく影響していることを示唆された。海水採取地点ごとの分析値に着目すると、富津岬の突端に近い採取地点で、漁期を通じて最も栄養塩濃度が高いことが明らかになった。一方、地点ごとの栄養塩濃度と海苔の収穫状況との間に明確な相関はみられなかったことから、今回の水質分析の結果のみから、近年の不作傾向を説明することは難しいと考える。
　水質と不作の関係性をより明確化するため、2019 年度漁期にも同様の水質分析を行っており、その結果も合わせて報告する。また、水質分析以外の手法から不作原因を解明するため、スサビノリ（*Pyropia yezoensis*）の培養系を用いた実験にも取り組んでおり、その内容についても紹介する。

algae, Rhodophyta, *Pyropia yezoensis*

発表責任者：吉村　航（yoshimura.sb9.koh@jp.nipponsteel.com）

講演番号：3B03a01
講演日時：3 月 27 日 09:30～ 総合学習プラザ B03 会場

TEAD-YAP 相互作用を標的とした化合物の探索
Chemical screening for regulating the TEAD-YAP interaction

○高瀬 翔平[1]、林瀬 瑠奈[1]、則次 恒太[1]、市川 保恵[2]、小川 健司[2,3]、吉田 稔[2,4,5]、伊藤 昭博[1,4]([1]東京薬科大・生命科学、[2]理研 CSRS・創薬シード、[3]日大・生物資源科学、[4]理研 CSRS・ケミカルゲノミクス、[5]東大院農・応生工、微生物連携機構)
○Shohei Takase[1], Runa Hayase[1], Kota Noritsugu[1], Yasue Ichikawa[2], Kenji Ogawa[2,3], Minoru Yoshida[2,4,5], Akihiro Ito[1,4] ([1]Sch. of Life Sci., Tokyo Univ. of Pharm. and Life Sci., [2]Seed Cpds Explor. Unit Drug Discov., RIKEN CSRS, [3]Col. of Biores. Sci., Nihon Univ., [4]Chem. Genomics Res. Gr., RIKEN CSRS, [5]Dept. Biotechnol. and CRIIM, Univ. Tokyo)

Hippo 経路はがん抑制経路であり、その制御下にある TEAD はショウジョウバエからヒトまで高度に保存されている。TEAD は器官サイズの調節、細胞の増殖、生存、分化に関わる遺伝子の発現を制御する転写因子である。TEAD の転写活性は転写共役因子である YAP との結合に依存し、YAP のリン酸化によって制御されている。また、前立腺がん・大腸がん・胃がん・乳がん・腎がん等の様々ながん種において TEAD は高発現し、TEAD の発現レベルと予後には相関があることが明らかとなっている。さらに、YAP の過剰発現は肝肥大を誘導し、TEAD の抑制がその効果を抑止することが報告されている。したがって、この相互作用を阻害する化合物は TEAD の生理的機能を探索するためのケミカルプローブとして有用なだけでなく、抗がん剤としても期待できる。現在までに TEAD と YAP の相互作用を阻害する低分子化合物として、ポルフィリン骨格を有する Verteporfin やトリテルペン化合物 Celastrol が同定されている。これら阻害剤は抗腫瘍抑制活性を有することが明らかとなっている一方で、特異性等の問題がある。我々は分割ルシフェラーゼ法の一つである NanoBiT（NanoLuc Binary Technology）を用いることによって生細胞内における YAP、TEAD 間相互作用を検出できるアッセイ系を構築した。本アッセイ系を用いてハイスループットスクリーニングを行ったところ、理化学研究所および東京大学が保有する合計約 3 万種類の化合物から、YAP と TEAD 間相互作用を阻害する候補化合物を 12 個同定した。これら候補化合物が YAP 依存的な TEAD の転写活性を阻害するかどうか調べるために、ルシフェラーゼレポーターアッセイ系を用いて評価した。その結果、濃度依存的に TEAD の転写活性を阻害する複数の化合物を得た。これらのヒット化合物は、非小細胞肺がん H1299 細胞の増殖を濃度依存的に阻害した。以上の結果より、我々は TEAD-YAP 相互作用を阻害することにより TEAD の転写活性を抑制し、がん細胞増殖抑制作用を示す低分子化合物を複数同定することに成功した。我々が見出したこれら阻害剤は Hippo 経路のさらなる生理的機能の解明や YAP と TEAD 間相互作用を標的としたがん治療薬開発に大きく貢献すると期待される。

TEAD-YAP interaction, High throughput screening, Inhibitor

講演番号：3B03a02
講演日時：3 月 27 日 09:41～ 総合学習プラザ B03 会場

FD-891－F-actin 複合体構造と PPI 阻害機構の解析
Studies on the complex structure of FD-891 in F-actin, and analyses of PPI inhibition by FD-891
吉田 香里[1]、山田 有里佳[2]、藤井 高志[2]、工藤 史貴[3]、片岡 孝夫[4]、江口 正[3]、難波 啓一[2,5]、○臼井 健郎[1]（[1]筑波大生命環境、[2]阪大院生命機能、[3]東工大理学院、[4]京都工繊大工芸科学、[5]理研 BDR）
Kaori YOSHIDA[1], Yurika YAMADA[2], Takashi FUJII[2], Fumitaka KUDO[3], Takao KATAOKA[4], Tadashi EGUCHI[3], Keiichi NAMBA[2,5], ○Takeo USUI[1] ([1]Univ. Tsukuba, [2]Osaka Univ., [3]Tokyo Inst. Tech., [4]Kyoto Inst. Tech., [5]RIKEN BDR)

【目的】FD-891 は、放線菌 *Streptomyces graminofaciens* A-8890 より単離・構造決定された 16 員環マクロライドである[1,2]。我々は本物質の標的分子及び作用機構に興味を持ち、解析を進めてきた。その結果、FD-891 が動物細胞の細胞周期を G2/M 期で停止させて細胞増殖を阻害活性すること、また caspase-8 依存的アポトーシスを誘導すること[3]、細胞内に一つの大きなアクチン凝集体を形成させることを報告した。さらにアクチン重合を促進して F-アクチンを安定化させる一方、他のアクチン重合安定化剤とは異なり F-アクチンと F-アクチン結合タンパク質とのタンパク質－タンパク質間相互作用（PPI）を阻害することなどを明らかにしてきた[4]。しかしながら FD-891 のアクチン結合部位や PPI 阻害機構は不明であった。最近、安定性に優れる FD-891 類縁体と F-アクチンとの複合体構造が明らかとなった。そこで得られた複合体構造を元に変異アクチンを用いた解析を行い、FD-891 による PPI 阻害機構の解明を試みた。
【方法及び結果】FD-891 類縁体と F-アクチンとの複合体構造から、FD-891 は主としてアクチンのサブドメイン 1 と 3 が形成するポケットに結合するとともに、隣り合ったアクチンの D-loop とも相互作用している可能性が示された。そこで、結合領域周辺のアミノ酸残基をアラニンに置換した変異アクチンタンパク質のみを発現する多剤超感受性酵母株[5,6]を作成し、Halo アッセイによって薬剤感受性を検討した。その結果、サブドメイン 1 と 3 の変異株のいくつかは FD-891 に対し耐性または感受性を示したことから、結合部位としての可能性が支持された。さらに D-loop の変異株は FD-891 耐性を示したことから、D-loop と FD-891 との相互作用が PPI 阻害に重要であることが強く示唆された。現在、FD-891 に対し耐性、または感受性を示した変異アクチンの精製を行っており、FD-891 と F-アクチンとの相互作用や PPI 阻害に関する in vitro アッセイ結果も合わせて報告する予定である。

1) *J. Antibiot.*, **47**, 1226-1233 (1994)
2) *J. Antibiot.*, **57**, 156-157 (2004)
3) *J. Antibiot.*, **62**, 507-512 (2009)
4) 日本農芸化学会 2011 年大会
5) 日本農芸化学会 2011 年大会トピックス賞
6) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 1588-1593 (2011)

F-actin, Protein-Protein Interaction, Bioprobes

発表責任者：臼井健郎（usui.takeo.kb@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3B03a03
講演日時：3 月 27 日 09:52～ 総合学習プラザ B03 会場

Tight Junction 開口剤 MA026 の Claudin に対する標的特異性

Studies on the claudin specificity of MA026, a Tight Junction opener

○向山 海凪[1]、内山 千尋[2]、福田 茜[2]、中澤 圭輝[2]、倉持 由佳[2]、谷口 敦彦[2]、南雲 陽子[1]、林 良雄[2]、臼井 健郎[1] ([1]筑波大生命環境、[2]東京薬科大薬)
○Minagi MUKAIYAMA[1], Chihiro UCHIYAMA[2], Akane FUKUDA[2], Yoshiki NAKAZAWA[2], Yuka KURAMOCHI[2], Atsuhiko TANIGUCHI[2], Yoko NAGUMO[1], Yoshio HAYASHI[2], Takeo USUI[1] ([1]Univ. Tsukuba, [2]Tokyo Univ. Pharm. Life Sci.)

【背景・目的】

上皮細胞に存在する細胞接着構造である Tight Junction (TJ) は、外界からの異物の侵入や水分をはじめとする生体内物質の漏出を防ぐなど、上皮を介した分子の移動を制限することで生体の恒常性を維持している。しかしながらバイオ医薬品などの親水性高分子薬剤の吸収も阻害されるため、これらの薬剤投与は注射等の侵襲的な手法が余儀なくされている。我々は TJ を短時間・可逆的に開口させることで異物の侵入を抑えつつ、上皮を介したバイオ医薬品等の非侵襲的投与が可能になると考え、TJ 可逆的開口剤の探索・作用機構解析を実施している。

MA026 は、抗ウイルス活性を指標にグラム陰性細菌 *Pseudomonas* sp. RtIB026 株から単離された環状デプシペプチドであり [1]、C 型肝炎ウイルスの侵入受容体で、かつ TJ 構成タンパク質でもある Claudin-1 に結合することが報告されている [2]。我々は MA026 がイヌ腎臓上皮細胞 MDCK II 単層の TJ を開口させることを見出し [3]、本物質が非侵襲的薬剤投与に有用である可能性を明らかにした。一方、Claudin はヒトでは 27 種類のファミリーが確認されており、その発現組織特異性からドラッグデリバリーの標的としても興味が持たれている。そこで本研究では MA026 類縁体の Claudin 特異性を明らかにすることを目的に研究を行った。

【方法・結果】

MA026 類縁体の Claudin 特異性を明らかにするため、MDCK II 細胞単層に対する TJ 開口活性を指標に結合領域ペプチド断片を用いた競合実験を行った。その結果、Claudin-1 由来のペプチド断片により TJ 開口が阻害されたことから、MA026 は Claudin-1 との相互作用を介して TJ を開口させていることが強く示唆された。現在、他の Claudin ファミリーに対する MA026、及び種々の MA026 合成類縁体との相互作用解析などを進めており、合わせて報告する予定である。

1) *PCT WO* 02/062831 (2002)
2) *J. Am. Chem. Soc.,* **135**, 18949-18956 (2013)
3) *J. Antibiot.,* **70**, 691-694 (2017)

tight junction, claudin, specificity

発表責任者：臼井健郎（usui.takeo.kb@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3B03a04
講演日時：3 月 27 日 10:03～ 総合学習プラザ B03 会場

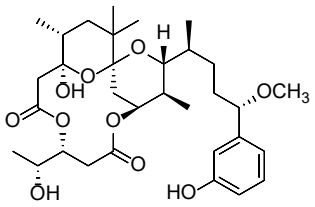
Debromoaplysiatoxin 単純化アナログ・10-Me-Aplog-1 の側鎖長の最適化

Optimization of the side chain length of 10-Me-Aplog-1, a simplified analog of debromoaplysiatoxin

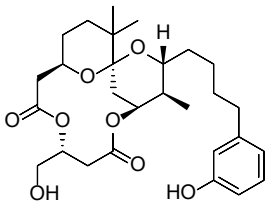
○権田 敦子、高田 晃児、入江 一浩（京大院農）
○Atsuko GONDA, Kouji TAKADA, Kazuhiro IRIE (Kyoto Univ.)

【背景・目的】Protein kinase C (PKC) は細胞内情報伝達を担うタンパク質リン酸化酵素である。多くの PKC 機能欠損型の突然変異が発がんを促進させることから [1]、がん治療における PKC の活性化が有望視されている。Debromoaplysiatoxin (DAT) は高い PKC 活性化能を示すとともに、がん細胞増殖抑制活性、発がん促進活性、炎症性を併せもつ。所属研究グループは DAT の構造単純化による副作用の選択的除去を目指し、新規抗がん剤シーズ 10-Me-Aplog-1 (**1**) の合成に成功している [2]。化合物 **1** と PKC との結合において、疎水性側鎖が PKC のループ部分と水素結合あるいは CH/π 相互作用していることが明らかになっている [3]。この相互作用における最適な側鎖長を明らかにするため、**1** の側鎖長を 2 炭素増減させた **2** および **6**、**2** の疎水性低下を補った臭素化体 (**3**) が合成された（未発表）。化合物 **2** は、**1** と比べて PKCδ-C1B に対する結合能ならびにがん細胞増殖抑制活性が 1 オーダー低下したのに対して、**3** は **1** と同等の活性を示した。一方で、**3** は炎症性および発がん促進活性を若干有していたことから、疎水性度を高める方法として臭素原子の導入は適していないことが判明した。本研究は、**1** の側鎖長を 1 炭素増減させた **4** および **5** を合成し、各種活性を評価することを目的としている。最終的に、これまで合成された誘導体 (**1**–**6**) の活性との比較により、最適な側鎖長を明らかにする。

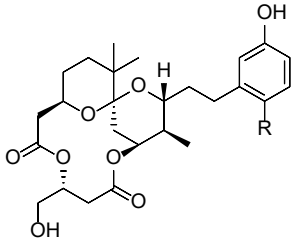
【結果・考察】*m*-Hydroxyphenylacetate を出発物質とし、**1** の合成経路に準じた経路 [2]（最長直線工程数 22 段階）で **4** を合成した（収率 1.6%）。化合物 **4** の PKCδ-C1B ドメインに対する結合能は、**3** と比べて約 2 倍強かったが、弱い炎症活性が認められた。現在、**3** のがん細胞増殖抑制活性を検討中である。さらに、**5** の合成を鋭意進めており、その結果についても併せて報告する予定である。



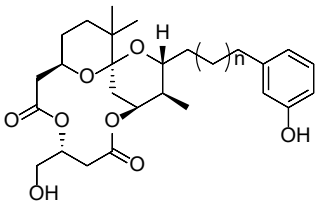
Debromoaplysiatoxin



10-Me-Aplog-1 (**1**)



R=H : **2**, R=Br : **3**



n=1 : **4**, n=3 : **5**, n=4 : **6**

1) C. E. Antal *et al., Cell* **2015**, *160*, 489; 2) Kikumori, M. *et al*., *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 5614;
3) Hanaki, Y. *et al., Molecules* **2017**, *22*, 631.

protein kinase C, tumor promoter, aplysiatoxin

発表責任者：入江一浩（irie@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3B03a05
講演日時：3 月 27 日 10:14～ 総合学習プラザ B03 会場

CH/π相互作用に着目した aplysiatoxin 単純化アナログの合成と生物活性

Synthesis and biological activities of the simplified aplysiatoxin analogues focused on CH/π interaction

○小林 巧実、入江 一浩（京大院農）
○Takumi KOBAYASHI, Kazuhiro IRIE (Kyoto Univ.)

【背景・目的】

Protein kinase C (PKC) は細胞内情報伝達において中心的な役割を担っている。最近の研究においてがん細胞における PKC の変異の大部分が機能喪失型であり、PKC が腫瘍の増殖を抑制している可能性が示唆されたことから (C. E. Antal. *et al*., *Cell*. **2015**, *160*, 489) 、PKC の活性化はがん治療において有効な戦略の一つである。海洋生物由来の PKC 活性化剤である debromoaplysiatoxin (DAT) の骨格を用いて、所属研究室で開発された 10-Me-aplog-1 は DAT よりも高いがん細胞増殖抑制活性を有し、発がん促進活性ならびに炎症作用などの副作用をほとんど示さなかった (Kikumori, M. *et al*., *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 5614.) 。10-Me-aplog-1 は現時点で最も有望な抗がん剤シーズの 1 つである。

当研究室において、10-Me-aplog-1 の側鎖のフェノール性水酸基を除いた化合物 **1**、およびその芳香環を還元した化合物 **2** の PKCδ-C1B に対する結合試験を行ったところ、10-Me-aplog-1 と比べて **1** は約 2 倍、**2** は約 8 倍結合能が低下した。これらと δ-C1B の結合様式をドッキングシミュレーションによって予測したところ、側鎖のフェノール性残基が δ-C1B の Met-239 および Pro-241 との間で水素結合あるいは CH/π 相互作用を形成しうることが示唆された (Hanaki, Y. *et al*., *Molecules* **2017**, *22*, 631) 。そこで本研究では、10-Me-aplog-1 の側鎖のベンゼン環を、CH/π 相互作用の増大という観点からナフタレン環に置換した化合物 **3** の合成を目的とした。

【結果・考察】

目的化合物 **3** は、10-Me-aplog-1 の合成経路を参考にし、6-hydroxy-1-naphthoic acid を出発物質として直線工程数 26 段階で収束的に合成した (収率 0.18%)。化合物 **3** とその OBn 体 (**4**) の PKCδ-C1B ドメインに対する結合能 (K_i = 1.0, 0.75 nM) は、**1** の結合能 (K_i = 0.87 nM) と同程度であった。これよりナフタレン環の置換による PKCδ-C1B 結合能の増大は認められなかった。なお、**3** および **4** のマウス耳における炎症作用ならびにがん細胞増殖抑制活性については、現在検討中である。

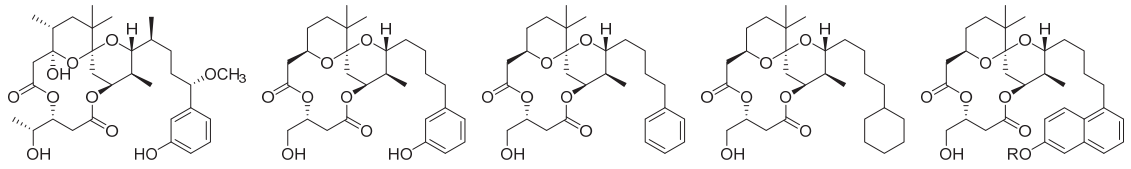


図　各種 DAT アナログの構造と PKCδ-C1B ドメインに対する結合能 (K_i)。

protein kinase C, aplysiatoxin, CH/π interaction

発表責任者：入江一浩（irie@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3B03a06
講演日時：3 月 27 日 10:35～ 総合学習プラザ B03 会場

分裂酵母を用いた抗癌活性を有する新規キネシン阻害剤の探索
Exploring specific inhibitors against human kinesin motors using fission yeast

○登田 隆[1,2]、湯川 格史[1,2]、栗澤 尚瑛[3]、小野寺 拓夢[4]、木村 賢一[3,4] ([1]広島大学・院統合生命、[2]広島健康長寿拠点、[3]岩手大・院総合科学、[4]岩手大農)
○Takashi TODA[1,2], Masashi YUKAWA[1,2], Naoaki KURISAWA[3], Takumu ONODERA[4], Ken-ichi KIMURA[3,4] ([1]Grad. Sch. of Integ. Sci. for Life, Hiroshima Univ., [2]HiHA, Hiroshima Univ., [3]Grad. Sch. of Arts Sci., Iwate Univ, [4]Dept. of Biol. Chem. & Food Sci., Iwate Univ.)

抗癌剤として微小管阻害剤が広く利用されているが、正常細胞に対する副作用が強いことから、癌細胞だけを狙い撃ちできる新たな分子標的薬剤の開発が熱望されている。そこで、我々は微小管モーター・キネシンに着目した。キネシンは微小管を介した蛋白質・オルガネラなどの積荷を運ぶモーター分子で、紡錘体微小管形成や細胞極性制御等に関与する。特に、14 型キネシンは、中心体制御に異常をきたした癌細胞において過剰産生された中心体を一つの疑似中心体にクラスター化させる役割がある。そのため、本来致死となるはずの多極紡錘体形成を抑えることにより、乳癌をはじめとする多くの癌細胞の増殖を促進することが明らかにされている。従って、このようなキネシンの働きを特異的に阻害できれば、癌細胞を選択的に除去できると考えられる。しかし、これまでに開発された阻害剤は特異性が低く、未だ抗癌剤として実用化に至っていない。そこで、本研究では、キネシンを分子標的とした細胞毒性の少ない抗癌剤シーズ創生を目指すことにした。このため、ヒト疾患研究の優れたモデル系である分裂酵母細胞内でヒト由来キネシンを強制発現させて致死化を誘導し、その細胞に多彩な天然物抽出液を添加することによって細胞増殖を回復させる。本発表では、ヒト 14 型キネシン過剰発現酵母を用いた特異的阻害剤の探索例について紹介したい。

1. Kurisawa et al., Bioorg. Med. Chem., DOI:10.1016/j.bmc.2019.115154.(2019)
2. Yukawa et al., Fung. Genet. Biol., 116: 33-41. (2018)

anti-cancer drug, spindle formation, kinesin motor

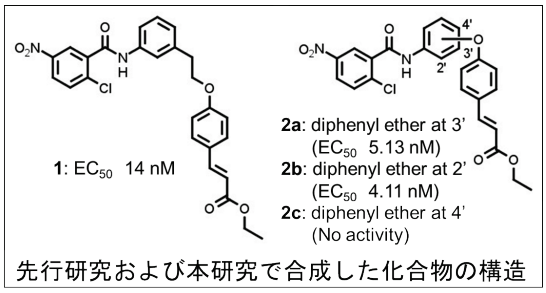
発表責任者：登田　隆（takashi-toda@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：3B03a07
講演日時：3 月 27 日 10:46～ 総合学習プラザ B03 会場

フラグメントユニットの近接性と配向性が異なる共有結合型 PPARγリガンドの合成と活性評価
Importance of the Proximity and Orientation of Ligand-Linkage to the Design of Cinnamate-GW9662 Hybrid Compounds as Covalent PPARγ Agonists

○宇津木 優樹[1]、小渕 裕菜[2]、河村 幸雄[2]、永尾 雅哉[3]、礒田 博子[1,4]、宮前 友策[1,3,4]（[1]筑波大院グローバル教育院、[2]京都女子食物、[3]京大院生命、[4]筑波大生命環境）
○Yuki UTSUGI[1], Hirona KOBUCHI[2], Yukio KAWAMURA[2], Masaya NAGAO[3], Hiroko ISODA[1,4], Yusaku MIYAMAE[1,3,4] ([1]SIGMA, Univ. Tsukuba, [2]Kyoto Women's Univ., [3]Kyoto Univ., [4]FLES, Univ. Tsukuba)

【目的】核内受容体 Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARγ)は、低分子リガンドにより活性化される転写因子であり、糖や脂質代謝の主要制御因子である。PPARγのリガンド結合ドメイン (LBD)の Cys285 残基に共有結合を形成するリガンドは、PPARγの転写活性を選択的に調節することで、副作用を示さずに血糖値降下作用を示すことから、新たな糖尿病治療薬の候補として期待されているが、内在性酸化型不飽和脂肪酸およびその代謝物以外にはほとんど知られていない。演者らは、以前、PPARγのリガンド結合ポケットの特徴を利用した新規リガンド開発のための方法論を考案し、不可逆的アンタゴニスト GW9662 及び植物由来けい皮酸誘導体の両者を融合させた構造を有する新規共有結合型 PPARγアゴニスト (**1**)を創出した [1,2]。本研究では、２つのフラグメントユニットの近接性及び配向性が異なる類縁化合物を合成し、生物活性の評価を行った [3]。



先行研究および本研究で合成した化合物の構造

【結果および考察】3-nitrophenol もしくは 4-hydroxybenzaldehyde を出発原料として、４工程の反応により、けい皮酸のフラグメントユニットが GW9662 のアニリン環の 3'、2'、4'位のそれぞれに、リンカー基を介さずに結合した化合物 **2a**、**2b**、**2c** を合成した。合成した化合物はいずれも 2-chloro-5-nitrobenzoyl 基を有するため、Cys 残基のチオール基と求核置換反応を示すと考えられる。実際、FT-LC-MS 解析及び recombinant PPARγ LBD を用いたローダミンマレイミドアッセイを用いて検証した結果、合成した化合物はいずれも PPARγの Cys285 残基と共有結合を形成することが示された。次にルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイにより転写活性化能を評価した結果、**2a** および **2b** は、EC_{50} 値 5.13 および 4.11 nM の親和性でアゴニスト活性を示した。リンカー基で連結した化合物 **1** の EC_{50} 値が 14 nM であることから、２つのフラグメントユニットを近接させることで、PPARγに対する結合親和性が向上することが示唆された。一方、**2c** は転写活性化能を一切示さなかったことから、けい皮酸ユニットの結合部位の重要性が明らかになった。ドッキングシミュレーションにより、合成化合物の推定結合様式を比較したところ、けい皮酸のフラグメントユニットが PPARγ LBD のヘリックス３、β シート、及び Ω ループ領域と相互作用することが転写活性化能に重要であり、またそれらの推定結合様式は、内在性リガンドである酸化型不飽和脂肪酸の結合様式と類似することが示唆された。さらに、PPARγ LBD の Cys285 残基を Ala に置換した変異体を用いたレポーター遺伝子アッセイにより、**2a** および **2b** の転写活性化能が Cys285 残基との共有結合形成に依存すること、またリガンドを培地から取り除いた後も、PPARγに対する不可逆的な結合により、持続的に転写活性を引き起こすことが明らかになった。

【参考文献】[1)]Ohtera, *et al*., *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 2794-2804; [2)]宮前ら，日本農芸化学会 2015 年度大会; [3)]Utsugi, *et al*., *Molecules* **2019**, *24*, 2019.

pparγ, covalent ligand, fragment-based drug discovery

発表責任者：宮前友策（miyamae.yusaku.fw@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3B03a08
講演日時：3 月 27 日 10:57～ 総合学習プラザ B03 会場

統合表現型プロファイリングとケミカルプロテオミクスの手法による 3 量体 G_i タンパク質調節化合物の発見

Discovery of Small-Molecule Modulator of Heterotrimeric G_i-Protein by Integrated Phenotypic Profiling and Chemical Proteomics

○河村 達郎[1,2]、二村 友史[3]、SHANG Erchang[2]、室井 誠[1,3]、JANNING Petra[2]、上野 雅佳[4]、WILKE Julian[2]、武田 茂樹[4]、近藤 恭光[3]、ZIEGLER Slava[2]、渡辺 信元[1]、WALDMANN Herbert[2]、長田 裕之[1,3] ([1]理研 CSRS・理研-マックスプランク連携、[2]マックスプランク分子生理学研究所、[3]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー、[4]群馬大・理工)

○Tatsuro KAWAMURA[1,2], Yushi FUTAMURA[3], Erchang SHANG[2], Makoto MUROI[1,3], Petra JANNING[2], Masayoshi UENO[4], Julian WILKE[2], Shigeki TAKEDA[4], Yasumitsu KONDOH[3], Slava ZIEGLER[2], Nobumoto WATANABE[1], Herbert WALDMANN[2], Hiroyuki OSADA[1,3] ([1]RIKEN-Max Planck Joint, RIKEN CSRS, [2]Max-Planck-Inst. Mol. Physiol., [3]Chem. Biol., RIKEN CSRS, [4]Sci. Tech., Gunma Univ.)

【背景・目的】作用のユニークな生理活性物質の発見とその標的分子の同定は、細胞機能の理解や創薬につながる重要なプロセスである。我々は、化合物が誘導する細胞形態変化およびプロテオーム変動を指標にした統合表現型プロファイリングシステムを用いることにより、作用機序既知のレファレンス化合物とは異なるユニークな作用を示す化合物 RKN9055 を見出したことを、昨年度の大会にて報告した。その後、RKN9055 の作用機構の解明を目的とし、さらなる検証を行った。

【結果・考察】RKN9055 の標的分子を同定するため、ケミカルプロテオミクスの手法による結合タンパク質の解析を行った。ビオチンタグを付加したプルダウンプローブおよび光親和型反応を用いて作製したアフィニティービーズのそれぞれを用いてプルダウンアッセイを行ったところ、3 量体 G タンパク質の一種である G_i のサブユニット $G\alpha_{i2}$ (GNAI2)および $G\beta_2$ (GNB2)が RKN9055 の結合タンパク質として共通に見出された。次に、Cellular Thermal Shift Assay (CETSA)による検証を行ったところ、RKN9055 は $G\alpha_{i2}$ の熱安定性を低下させたことから、本実験でも RKN9055 と $G\alpha_{i2}$ との結合が示唆された。G タンパク質共役受容体(GPCR)は様々な細胞機能を司る分子であり、G_i は共役する GPCR にアゴニストが結合した際のシグナル伝達を担う主要な分子である。分子レベルでは、GPCR にアゴニストが結合すると G_i は活性化され、αサブユニット($G\alpha_i$)に結合した GDP から GTP への交換反応、$G\alpha_i$ とβγサブユニット($G\beta\gamma$)の解離を介して、下流の様々なエフェクター分子の機能を調節する。我々は、ヒトの GPCR と $G\alpha_{i2}$ の融合タンパク質を発現させたカイコの膜画分を用いた *in vitro* のアッセイにより、GPCR アゴニストにより誘導される $G\alpha_{i2}$ 上の GDP と GTP の交換反応を RKN9055 が阻害することを見出した。一方、同様の *in vitro* 実験系において、RKN9055 は別の G タンパク質ファミリーに属する $G\alpha_s$ 上の GDP/GTP 交換反応には影響を与えなかったことから、RKN9055 の $G\alpha_{i2}$ に対する選択的な作用が示唆された。G_i が活性化された際に $G\alpha_i$ から解離した $G\beta\gamma$依存的に誘導される細胞内イベントとして、小胞体から細胞質への Ca^{2+}の流出、ERK/MAPK の活性化が知られている。我々は、RKN9055 が HeLa 細胞に対して細胞内 Ca^{2+}濃度の上昇と ERK/MAPK のリン酸化を速やかに誘導することを見出した。以上の結果より、RKN9055 が $G\alpha_i$ に作用し、$G\alpha_i$ と $G\beta\gamma$の解離を引き起こすことにより $G\beta\gamma$依存的なシグナル伝達を活性化させる可能性が示唆された。本研究で見出した RKN9055 が G_i の機能を解析するためのツール化合物となること、さらに統合表現型プロファイリングが作用のユニークな生理活性物質を取得するための手法として活用されることが期待される。

target identification, chemical proteomics, heterotrimeric G-protein

講演番号：3B03a09
講演日時：3 月 27 日 11:08～ 総合学習プラザ B03 会場

2DE-CETSA を用いた PKM2 制御シグナルに作用する化合物 NPD10084 の同定

Identification of a small compound targeting PKM2-regulated signaling using 2DE-CETSA

○室井 誠[1]、永澤 生久子[1]、小川 直子[1]、川谷 誠[1]、大石 智一[2]、大庭 俊一[2]、川田 学[2]、長田 裕之[1]([1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー、[2]微化研)
○Makoto Muroi[1], Ikuko Nagasawa[1], Naoko Ogawa[1], Makoto Kawatani[1], Tomokazu Ohishi[2], Shun-ichi Ohba[2], Manabu Kawada[2], Hiroyuki Osada[1] ([1]Chem. Biol., RIKEN CSRS, [2]Institute of Microbial Chemistry)

【背景・目的】ケミカルバイオロジー研究において、化合物の標的を同定することは重要であるが、時間と手のかかる難しい過程でもある。標的同定にかかる時間を短縮のために、我々は、化合物によって誘導されるプロテオームの変化について、２次元電気泳動を用いたプロテオーム解析を行うことによってプロファイルし、化合物の標的を推測する薬剤標的解析システム ChemProteoBase を構築してきた。さらに、昨年度の大会で、ChemProteoBase のスポット同定情報と Cellular Thermal Shift Assay（CETSA）と組み合わせ、化合物と相互作用するスポットを解析することによって、化合物の標的を推測するシステム２DE-CETSA 法を構築したことを発表した。大腸がん株化細胞の増殖阻害を指標としたスクリーニングで、得られた理研天然化合物バンク（NPDepo）の化合物 NPD10084 について、２DE-CETSA を用いて解析をしたところ、熱安定性の変化するスポットとして PKM2 が同定された。NPD10084 の作用解明を目的として解析を進めた。
【結果･考察】NPD10084 は NPDepo 化合物ライブラリー約 18000 化合物からスクリーニングで得られ、その細胞増殖阻害活性の IC50 はおよそ１μM であった。HCT116 細胞のライゼートを用いて、２DE-CETSA を行ったところ 55℃において、5 つのスポットの熱安定性が減少した。HeLa 細胞を用いて作成したスポットマップと照合したところ、PKM２のスポットと一致し、HCT116 細胞の実際のスポットを LC―MS/MS で同定したところ PKM２であった。リコンビナントの PKM２を用いてピルビン酸キナーゼ活性を検討したところ、阻害活性は認められなかった。しかし、PKM２は解糖系における機能の他に、β-catenin や、STAT３に結合することによって、転写を制御している事が知られており、PKM2 とβ-catenin あるいは STAT３との結合について共沈実験を行うことによって解析したところ、NPD10084 はそれぞれの結合を阻害することが明らかになった。また、そのシグナルの下流にある c-Myc, Cyclin D1 の発現や STAT3 のリン酸化も阻害された。さらに、HCT116 を用いた ゼノグラフトモデルにより NPD10084 の抗腫瘍活性について検討したところ、顕著な体重の減少を伴わずに、コントロール群に対してがんの増殖を遅延させ、腫瘍組織における c-Myc の発現を抑制していることが明らかとなった。すなわち、NPD10084 が個体レベルでも PKM2 の下流のシグナルを抑制しうることが示唆された。NPD10084 の作用解析は新たな抗がん剤の開発に役立つ他、２DE-CETSA は化合物の標的解析において有効なシステムの１つになると考えられる。

Proteomic analysis, CETSA, PKM2

講演番号：3B03a10
講演日時：3 月 27 日 11:19～ 総合学習プラザ B03 会場

Squalene oxidation products and their effect on the human keratinocyte cell line HaCaT

○Saoussane Khalifa[1], Naoki Shimizu[1], Shunji Kato[1,2], Junya Ito[1], Takahiro Eitsuka[1], Kiyotaka Nakagawa[1] ([1]Food and Biodynamic Chemistry Lab., Grad.School of Agric.Sci., Tohoku Univ., Japan, [2]Division of Host Defense Mechanism, Tokai Univ., School of Medicine)

Introduction: Squalene (SQ), an intermediate in the biosynthesis of sterols and an abundant component of skin lipids, is known for its multiple health benefits. However, it is easily oxidized to form 6 SQ monohydroperoxide (SQ-OOH) isomers as the primary oxidation products. Although SQ-OOH isomers as a whole have been suspected to cause various skin impairments, the effect of individual SQ-OOH isomers on the skin is still unknown. Furthermore, the secondary oxidation products of SQ haven't been thoroughly studied structurally nor in the sense of their effect on the skin.

Methods: Individual SQ-OOH isomers were synthesized through photooxidation of SQ, purified using semi-preparative HPLC, reacted with 2-methoxypropene for further purification then subjected to semi-preparative HPLC again. Secondary oxidation products of SQ were synthesized by subjecting SQ to a first oxidation reaction to generate SQ-OOH isomers, then to a second oxidation with different conditions to generate the secondary oxidation products. The secondary oxidation products were collected using an open column chromatography then purified using semi-preparative HPLC. The structures of the secondary oxidation products were studied using ^{1}H NMR and HPLC-MS/MS.

The human keratinocyte cell line HaCaT, being a reliable in vitro model for skin studies, was used to demonstrate the effect of the purified SQ-OOH isomers and SQ secondary oxidation products (5-100 μM) on the cells.

Results and discussion: The study of the structure of the main secondary oxidation product showed SQ molecule bearing 4 oxygen atoms, interpreted by the presence of an endoperoxide aside from the hydroperoxide group based on the ^{1}H NMR and HPLC-MS/MS results. Surprisingly, the cytotoxicity effect on HaCaT cells differed between individual SQ-OOH isomers, and between SQ-OOH isomers and the secondary oxidation products as well. These results shed light on the importance of SQ secondary oxidation products and SQ-OOH isomers in relation to skin disease. The understanding of the formation of these products and their different effects towards HaCaT cells might be a key point to the understanding of skin disorders related to SQ oxidation.

Squalene, Oxidation, HaCaT

発表責任者：Saoussane Khalifa（khalifa.saoussane.q3@dc.tohoku.ac.jp）

講演番号：3B03a11
講演日時：3 月 27 日 11:40～ 総合学習プラザ B03 会場

細胞内局在観察を志向したテトランドリン蛍光標識化合物の合成とオートファジー阻害活性評価

Synthesis and biological evaluation of a fluorescent labeled compound for the identification of intracellular localization of tetrandrine that blocks autophagic flux

○高橋 知暉[1]、東海 芙美子[1]、礒田 博子[2,3]、繁森 英幸[2]、宮前 友策[2] ([1]筑波大学　生命環境科学研究科、[2]筑波大学　生命環境系、[3]筑波大学　地中海・北アフリカ研究センター)
○Tomoki Takahashi[1], Fumiko Tokai[1], Hiroko Isoda[2,3], Hideyuki Shigemori[2], Yusaku Miyamae[2] ([1]Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, [2]Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, [3]Alliance for Research on the Mediterranean and North Africa, University of Tsukuba)

【目的】オートファジーは、真核生物が有する自己分解システムであり細胞の品質管理機構を担う。細胞が、栄養飢餓やホルモン刺激に応答すると、細胞内の不要なタンパク質やオルガネラがオートファゴソームと呼ばれる二重膜構造により内包され、リソソームの酵素により分解された後、再利用される。オートファジーは、がんや神経変性疾患など様々な疾病に関与することが指摘されており、新たな創薬標的として注目されている。演者らは、ツツラフジ科植物に含まれるビスベンジルイソキノリンアルカロイドであるテトランドリン (Tet) がオートファジー経路を阻害することを見出し、過去の本大会にて報告した[1,2]。 生化学的な解析により、本化合物がオートファゴソームとリソソームの融合に関わる因子を標的とする可能性が示唆されたが[3]、詳細な作用機序の解明に至っていない。本研究では、Tet の細胞内局在を明らかにすることを目的として、蛍光標識体の合成および生物活性評価を行った。

【結果と考察】市販の pyrrole-2-carbaldehyde を出発原料として、計４工程の反応[4]により合成した BODIPY を、DMF 溶媒中、EDC および HOBt 存在下で 11-azido-3,6,9- trixaundecan-1-amine と混合し、室温で 6 時間攪拌した結果、67% の収率でアジド基を付加した BODIPY 化合物を得た。一方、Lan らの方法[5]により 14 位ベンゼン炭素を選択的にアミノ化した Tet を、CH_2Cl_2 溶媒中、EDC および DMAP 存在下で 5-hexynoic acid と混合後、室温で 24 時間攪拌し、43% の収率でアルキノイル化した Tet を得た。得られた Tet アルキノイル体と、アジド基を付加した BODIPY を、MeOH と H_2O の混合溶媒 (10:1) 中、$CuSO_4$、sodium ascorbate および TBTA 存在下、室温で 24 時間攪拌した結果、 43% の収率で目的の Tet 蛍光標識体を得た。次に、Tet 蛍光標識体のオートファジー阻害活性を確認するため、抗 LC3 抗体を用いたウエスタンブロットを行った。Tet 蛍光標識体を 24 時間処理したラット肝星細胞株 HSC-T6 において、ポジティブコントロールの Tet および bafilomycin A_1 と同様、オートファゴソームのマーカータンパク質である LC3-II が蓄積したことから、蛍光標識体の活性保持が確認された。次に、フローサイトメトリーにより、細胞への Tet 蛍光標識体の取り込みを調べた結果、蛍光標識体を１時間処理後、BODIPY に由来する強い蛍光強度を示す細胞集団が検出された。また、蛍光標識体を３０分あるいは１時間処理後、細胞を洗浄し化合物を含まない培地でさらに１時間処理した場合においても明瞭な蛍光が検出された。一方、Tet の構造を含まないアジド修飾 BODIPY 化合物では、蛍光強度の強い細胞集団が観察されなかった。以上の結果から、蛍光標識体のリガンド部位となる Tet の化学構造が細胞内の任意の生体分子に結合することで、蛍光標識体の代謝を受けずに細胞内に保持されることが示唆された。現在、蛍光標識体を用いた顕微鏡観察を検討中である。

【参考文献】 [1]西藤ら, 日本農芸化学会 2014 年大会, [2]宮前ら, 日本農芸化学会 2018 年大会, [3]Miyamae, *et al. Biophys. Biochem. Res. Commun*. **2016**, *477*, 40-46, [4]Kerstin, *et al. Eur. J. Org. Chem*. **2010**, 3611-3620, [5]Lan, *et al. Eur. J. Med. Chem*. **2018**, *14*, 1968-1980

autophagy, tetrandrine, BODIPY

発表責任者：宮前友策（miyamae.yusaku.fw@u.tsukuba.ac.jp）

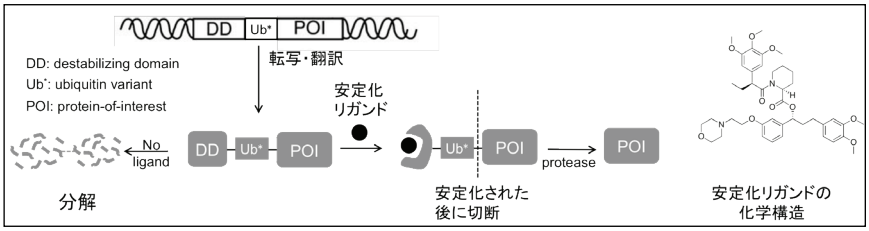
講演番号：3B03a12
講演日時：3 月 27 日 11:51～ 総合学習プラザ B03 会場

脱ユビキチン化酵素の切断活性を利用した細胞内標的タンパク質発現制御法の構築

A method for conditional regulation of protein stability in native or near-native form

○宮前 友策[1,2,3]、宇津木 優樹[2]、礒田 博子[1,2,4]、Ling-Chun Chen[3]、Thomas J. Wandless[3] ([1]筑波大生命環境、[2]筑波大グローバル教育院、[3]CSB Stanford Univ.、[4]筑波大地中海・北アフリカ)
○ YUSAKU MIYAMAE[1,2,3], YUKI UTSUGI[2], HIROKO ISODA[1,2,4], LING-CHUN CHEN[3], THOMAS J. WANDLESS[3] ([1]FLES Univ. Tsukuba, [2]SIGMA Univ. Tsukuba, [3]CSB Stanford Univ., [4]ARENA Univ. Tsukuba)

【目的】細胞内の標的タンパク質の発現量を、外来的な遺伝子導入によりコンディショナルに制御する手法は生命科学分野において重要な研究ツールである。共同発表者の Wandless らが開発した destabilized domain (DD)[1]は、不安定化された分解ドメインであり、細胞内に発現させると速やかに分解されるが、DD に結合する小分子リガンドを添加することにより、安定化される特徴を持つ。この不安定性は、DD に融合させた任意のタンパク質に伝播するため、目的タンパク質の発現量を小分子リガンドの添加により翻訳後レベルで制御することができる。しかし、標的タンパク質を恒久的に DD タグに融合させる必要があり、標的タンパク質が本来有する分子機能を損なってしまう場合がある。この問題を解決するため、本研究では、ユビキチンの C 末端が脱ユビキチン化酵素（DUB）により認識、切断される機構を利用して、小分子リガンドの添加依存的に、標的タンパク質の発現量をタグなどが付加していない未修飾、もしくは未修飾に極めて近い状態で制御することのできる手法の開発を行った[2]。



【結果および考察】FK506 binding protein (FKBP)のアミノ酸配列に不安定化変異を導入した DD の C 末端と、標的タンパク質の N 末端の間に Ub を挿入したキメラタンパク質を発現するベクターを構築した。ポリユビキチン化を防ぐため、リシン残基をアルギニン置換したユビキチンバリアント (Ub*)を用いた。本ベクターをマウス由来線維芽細胞 NIH/3T3 に導入し、ウェスタンブロットにより発現量を調べた結果、標的タンパク質として用いた super-folder GFP (sfGFP)が、安定化リガンド非添加時にも検出された。DUB が細胞内に豊富に発現することから、Ub*の野生型 C 末端配列が極めて親和性高く認識され、DD による分解が生じる前、すなわち翻訳とほぼ同時に切断が生じることにより、安定性制御を失ったと考えられた。そこで、DUB による認識に重要な Gly75 残基に変異を導入し、DUB による基質認識能を低下させることにより、切断速度を調節することとした。Gly75 を他の 19 種類のアミノ酸残基に置換したコンストラクトを発現するベクターを構築し、遺伝子導入後、ウェスタンブロットにより発現量ならびに切断活性を評価した。その結果、Ser もしくは Cys に置換した場合にのみ、望む切断速度を示すことが明らかになった。すなわち、安定化リガンド非添加時には全長が速やかに分解される一方、リガンド添加時には DD が安定化されることにより全長タンパク質が安定化され、次いで DUB により標的タンパク質が Ub*の C 末端から解放されるような切断様式を示した。本法は、特に N 末端領域がその機能発現に重要な役割を果たすタンパク質の発現および機能制御に有効である。【参考文献】[1]Banaszynski *et al., Cell* **2006**, *126*, 995-1004; [2]Miyamae *et al.,* submitted.

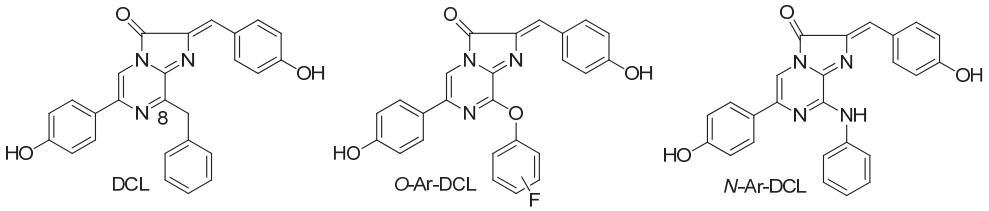
destablized domain, protein degradation, ubiquitin

発表責任者：宮前友策（miyamae.yusaku.fw@u.tsukuba.ac.jp）

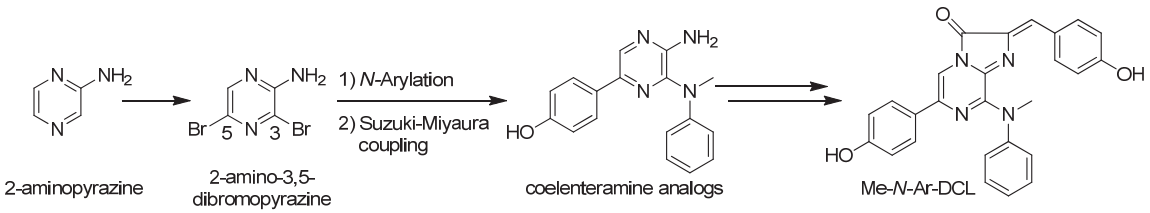
講演番号：3B03a13
講演日時：3 月 27 日 12:02～ 総合学習プラザ B03 会場

N-Ar-DCL 誘導体の合成と発光活性
Synthesis and luminescent activity of *N*-Ar-DCL analogs
○森口 舞子[1]、姜 法雄[1]、滝川 浩郷[2]、久世 雅樹[1] ([1]神戸大院農、[2]東大院農生科)
○Maiko MORIGUCHI[1], Bubwoong KANG[1], Hirosato TAKIKAWA[2], Masaki KUSE[1] ([1]Kobe Univ., [2]Tokyo Univ.)

【目的】発光タンパク質（フォラシン）はデヒドロセレンテラジン（DCL）を基質として利用し、活性部位のシステイン残基がDCLと結合したクロモフォア（発光を司る化学構造）を形成し、活性酸素種（ROS）の刺激で発光する。フォラシンを実際の生細胞中でROSイメージング手段として利用するためにはより明るく光らせる必要があり、DCLの構造を改変して実現することにした。DCLの8位がクロモフォア酸化物の発光効率に関与しており、本研究ではDCLの8位にヘテロ原子を導入しその電子的効果により発光効率を高めたDCL誘導体を合成することを目的とした。



【方法】これまでに DCL の 8 位に酸素原子または窒素原子を導入した DCL 誘導体の化学合成を行ってきた。また *O*-Ar-DCL の 8 位酸素原子に隣接するベンゼン環上にフッ素原子を導入した DCL 誘導体の化学合成も行った。合成した様々な DCL 誘導体を用いてフォラシンの発光測定を行ったところ、*O*-Ar-DCL が最も発光活性が高く、*N*-Ar-DCL は発光活性が低くなるといった結果が得られた。その理由として最終段階での脱水縮合の際に、望みのピラジン環上の窒素原子とではなく 8 位に導入した窒素原子と縮合したために *N*-DCL 誘導体が得られていない可能性が考えられる。そこで、8 位に導入する窒素原子上にメチル基を導入した Me-*N*-Ar-DCL を化学合成した。



dehydrocoelenterazine, pholasin, luminescent activity

講演番号：3B03p01
講演日時：3 月 27 日 13:50～ 総合学習プラザ B03 会場

マルチタグ交換可能なノシル型ジアジリン光ラベル試薬の創製

Synthesis of multi-tag exchageable nosyl-type diazirine in photoaffinity labeling

○村井 勇太[1]、スハイリー サェーディン アイミ[2]、石川 卓弥[2]、門出 健次[1] ([1]北大院先端生命、[2]北大院生命科学)
○Yuta MURAI[1], Aimi Suhaily Saadin[2], Takuya Ishikawa[2], Kenji Monde[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Hokkaido University)

【目的】

生命現象の分子レベルでの理解や医薬品開発に向けた基礎研究では、標的タンパクの同定やそのリガンド-タンパク結合モデル解析が重要な課題となる。薬物受容体等の膜タンパク構造解析ではその発現に成功しても安定性や結晶化に問題があり、NMR や X 線解析が適用できない場合がある。その補完法として不安定タンパク質を含めあらゆる相互作用系で実施できる光アフィニティーラベル法はこれまで数多くの実績が報告されている。しかし、これまでの光アフィニティーラベル法はプローブ自体の嵩高さによる標的分子との親和性の低下、釣り上げ後の煩雑な解析過程などから標的分子のロスが度々見受けられ解析困難に直面することもしばしばである。

そこで、上記の問題点を解決すべく、二級アミン合成時に汎用されるアミンの保護基であるノシル基を基本骨格としたノシル型ジアジリン（光アフィニティープローブ）の開発を目指した。本開発プローブの特徴は 1)ノシル型ジアジリン、リガンドのバイファンクショナルのみで達成でき、標的分子との親和性低下を極力抑えることが可能。2)ノシル環上のニトロ基効果によりジアジリン基の光分解能を向上させ、標的分子へのラベル化効率を上げることが期待される点。3)弱塩基下、チオアニオンによる芳香族求核置換反応（夾雑系中のシステイン残基による反応は起こりづらい）により、光ラベル化後に解析目的に適したタグを導入可能。4)タグ導入時にリガンドを除去できるため質量分析によるタンパク解析の複雑さを避けることが期待できる点があげられる。

【実験・結果】

4-クロロベンズアルデヒドを原料とし、ニトロ基の導入、塩素のベンジルメルカプタン置換を行なった。続いてアルデヒド基にトリフルオロメチル基を導入後、酸化させトリフルオロアセチル基に変換後、既存法に従い、ジアジリン基を合成した。最後にベンジルメルカプタンを $CH_3CN/AcOH/H_2O$ 溶媒下、1,3-ジクロロ-5,5-ジメチルヒダントインで処理することで、スルホニルクロリドへと誘導した。このスルホニルクロリドは不安定なため、系中でエタノールアミンと反応させモデル化合物であるスルホンアミドを合成した。このモデル化合物を用いてジアジリンの光分解実験を行なったところ、半減期が2.5分と示された。また芳香族求核置換反応により、ノシル型ジアジリンにクマリンやbodipy、高イオン化タグの導入にも成功した。また、この光プローブの実用性を確認するため、モデルタンパク質を用いて、その有用性を確認した。

nosyl, photoaffinity labeling, SNAr

講演番号：3B03p02
講演日時：3 月 27 日 14:01～ 総合学習プラザ B03 会場

抗ウイルス活性を有するカルボリン誘導体の作用標的の同定：光親和性プローブの設計・合成・評価
Identification of target protein of carboline derivatives with antiviral activity: Design, synthesis and evaluation of photoaffinity probes

○竹本 佑平、袴田 航、平野 貴子、西尾 俊幸（日大院生資科）
○Yuhei TAKEMOTO, Wataru HAKAMATA, TAKAKO HIRANO, Toshiyuki NISHIO (Graduate school of Bioresource Sciences, Nihon Univ.)

【目的】ウイルスの増殖過程において、ウイルス糖外皮タンパク質の *N*-結合型糖鎖修飾を阻害すると抗ウイルス活性を示すことが古くから知られている（*Nature,* **330**, 74-77, 1987）。これまでに我々は、本糖鎖修飾に関与する小胞体グルコシダーゼ II（GII）を標的酵素とし阻害剤探索を行った結果、カルボリンを母核とする GII 阻害剤として、AR407 を見出した。AR407 は、高い GII 阻害率を有し、細胞内で GII を阻害していることを明らかにした。さらに、抗ウイルス活性を評価した結果、高い抗ウイルス活性を示すことを明らかにした（日本農芸化学会関東支部 2018 年度大会, O-7, 恩田ら）。そこで我々は、AR407 の GII 阻害活性および抗ウイルス活性の向上を目指し、AR407 の GII 作用ユニットの同定を行うこととした。GII は活性部位を含む α サブユニットと糖鎖認識部位を含む β サブユニットのヘテロダイマー構造をとる。しかしながら、AR407 がどちらのサブユニットに結合するのか明らかになっていない。そこで、AR407 を酵素へのリガンドとし光親和性標識プローブを設計・合成し、そのプローブをヒト培養細胞に作用させ、得られた光標識タンパク質をウェスタンブロッティング法により解析し、AR407 の結合サブユニットを明らかにすることを本研究の目的とした。
【方法・結果】AR407 を基にした光親和性プローブを分子設計するため、AR407 とヒト GII との相同と考えられるマウス GII のドッキングモデルを構築した。本モデルでは、AR407 のカルボリンおよびインドール部分が GII の活性部位および周辺の空隙に結合し、AR407 の 4-メトキシフェニル部分は、活性部位の外側に位置していた。そこで、光親和性プローブに必要な光反応性基をそのメトキシ基部分からリンカーを介して導入することとした。光反応性基には、酵素との反応効率・特異性が高いとされているベンゾフェノンを選択した。設計したプローブの合成は、L-トリプトファンメチルエステルと 4-ニトロベンズアルデヒドのピクテスペングラー反応によりカルボリン骨格を構築し、得られた化合物のメチルエステル部分にトリプタミンを導入し AR407 パートを合成した。得られた化合物のニトロ基を還元し、リンカーとベンゾフェノンを導入することにより、9 段階・総収率 4.86%で目的とするプローブを合成した。さらに、本プローブの構造を機器分析により確認した。
　現在、本プローブを HeLa 細胞に投与し UV 光にてタンパク質標識を行っている。得られた光標識タンパク質は クリック反応によりビオチン化した後、アビジンビーズを用いて光標識タンパク質を精製し、ウェスタンブロッティング法により AR407 がどちらのサブユニットに結合しているか明らかにする予定である。

ER glucosidase II, N-linked oligosaccharide, Photoaffinity labeling

発表責任者：袴田　航（hakamata.wataru@nihon-u.ac.jp）

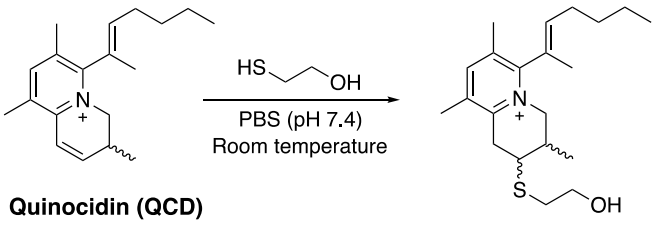
講演番号：3B03p03
講演日時：3 月 27 日 14:12～ 総合学習プラザ B03 会場

3,4-Dihydroquinolizinium 化合物のチオールに対する反応性評価

Evaluation of reactivity of 3,4-dihydroquinolizinium compounds toward thiols

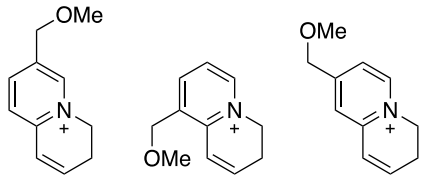
○川合 計太朗、小鹿 一、中川 優（名大院・生命農）
○Keitaro KAWAI, Makoto OJIKA, Yu NAKAGAWA (Nagoya Univ.)

【目的】 放線菌由来の Quinocidin (QCD) は，天然では極めて稀な 3,4-dihydroquinolizinium 骨格を有し，HeLa-S3 細胞に対して顕著な毒性を示す (IC_{50} = 0.63 μM)[1]。我々は，QCD が中性水溶液中，室温でチオールと付加反応を起こすことを見出した。3,4-Dihydroquinolizinium 環に対するチオールの Michael 付加型反応はこれまで知られておらず，本ヘテロ環は不可逆的阻害剤の開発における新たな求電子ユニットとして利用できる可能性がある。そこで本研究では，3,4-dihydroquinolizinium 環を利用した求電子ユニットのモデル化合物として三種の化合物 (**1**, **2**, **3**) を合成し，置換基の位置が反応性に与える影響について調べることを目的とした。

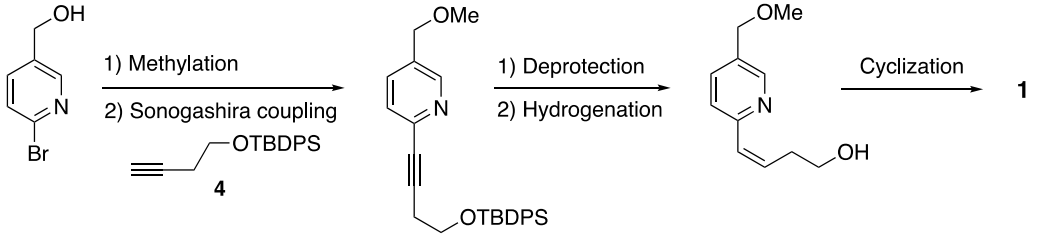


Quinocidin (QCD)

【方法および結果】 化合物 **1** は，6-bromo-3-pyridinemethanol を出発原料として，ヒドロキシ基のメチル化，アルキンユニット **4** との薗頭反応，TBDPS 基の脱保護，Lindlar 触媒を用いた接触水素化，mesylate を介した環化反応の 5 段階で合成した。化合物 **2** も 2-chloro-3-pyridinemethanol を出発物質として同様の 5 段階で合成することができた。合成した **1** および **2** の 2-mercaptoethanol に対する反応性を評価したところ，**2** の方が **1** よりもわずかに高い反応性を示すことが確認された。現在，**3** の合成も進めており，その反応性の比較についても併せて報告する。



1 **2** **3**



1) Nakagawa, Y. *et al. Chem. Eur. J.* **2017**, 23, 17894.

heterocycle, Michael addition, Quinocidin

講演番号：3B03p04
講演日時：3 月 27 日 14:23～ 総合学習プラザ B03 会場

フッ素化フラバン-3-オール誘導体の構造-活性相関研究

Structure-activity relationship studies of fluorinated flavan-3-ol derivatives

○道下 僚[1]、西野 祐樹[1]、石丸 拓実[2]、澤野 翔哉[2]、齊藤 安貴子[1,2]（[1]大阪電通大院工、[2]大阪電通大工）

○Ryo DOGE[1], Yuki NISHINO[1], Takumi ISHIMARU[2], Shoya SAWANO[2], Akiko SAITO[1,2]
([1]Graduate School of Engineering, OECU, [2]Faculty of Engineering, OECU)

【目的】

緑茶カテキンの一種として知られる(–)-epicatechin (**1**)やそのガロイル誘導体 (**2**)の構造を Fig. 1 に示した。この 2 つの化合物は flavan-3-ol 構造を基本骨格としているが、一般的に(–)-epicatechin (**1**)よりもガロイル誘導体 (**2**)の方が高い生物活性を示す。我々は、flavan-3-ol 誘導体の構造-活性相関に興味を持ち、有機合成による誘導体合成と活性評価を行ってきた。その結果、3 位に加え、5 位にもガロイル基を導入することで更に活性が向上することを確認した。また、2,3 位の立体が *trans* 型より *cis* 型の方が高い活性を示した。昨年度の本大会では、エステル部分の安定性、および、ガロイル基の水酸基をフッ素に置換した誘導体 **5**、**8** の合成と生物活性について報告した。本大会では、ヒト子宮頸ガン細胞 HeLa S3、ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞 A549、ヒト胎児肺由来線維芽細胞 WI-38 に対するフッ素化誘導体 **5**、**8** の影響の詳細な検討の他、新たなフッ素化誘導体の構造-活性相関研究について報告する。

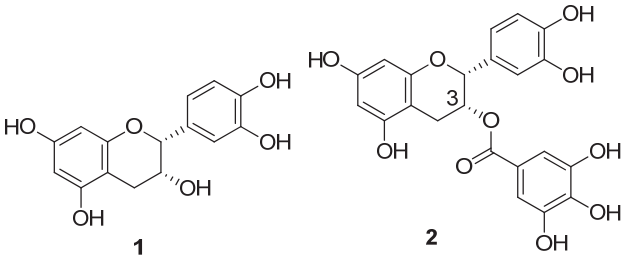
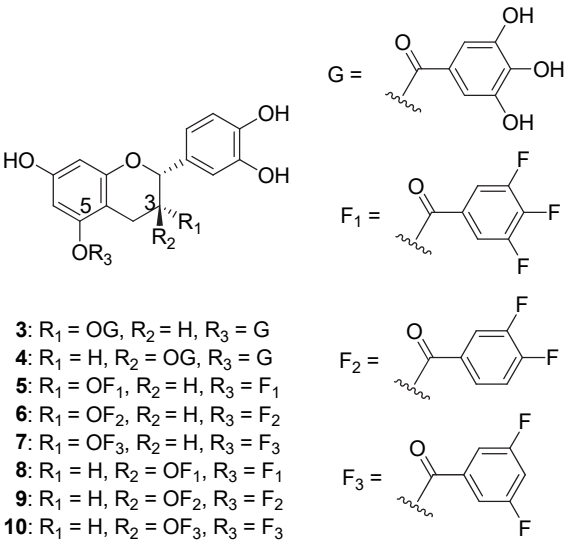


Figure 1. (–)-Epicatechin (**1**)とガロイル誘導体 (**2**)

【方法と結果】

フッ素化誘導体を含む化合物 **3**～**10** を HeLa S3, A549, WI-38 に添加し、それぞれの細胞の挙動を観察した。その結果、フッ素を導入した化合物 **5** と **8** で極めて短時間の暴露でアポトーシスを誘導することを確認した。また、化合物 **5** では、終濃度 40 μM 以上でミトコンドリアが凝集していることが示唆された。本発表ではフッ素の導入数・位置による活性の変化について詳細を報告する。



3: R_1 = OG, R_2 = H, R_3 = G
4: R_1 = H, R_2 = OG, R_3 = G
5: R_1 = OF_1, R_2 = H, R_3 = F_1
6: R_1 = OF_2, R_2 = H, R_3 = F_2
7: R_1 = OF_3, R_2 = H, R_3 = F_3
8: R_1 = H, R_2 = OF_1, R_3 = F_1
9: R_1 = H, R_2 = OF_2, R_3 = F_2
10: R_1 = H, R_2 = OF_3, R_3 = F_3

Figure 2. 使用した化合物群

flavan-3-ol derivatives, structure-activity relationship study, apoptosis

発表責任者：齊藤　安貴子（a-saito@osakac.ac.jp）

講演番号：3B03p05
講演日時：3 月 27 日 14:34～ 総合学習プラザ B03 会場

Formycin A による去勢抵抗性前立腺がん細胞選択的細胞死誘導

Formycin A induces selective cell death of castrate resistant prostate cancer

○武井 智暉[1]、濱村 祐輝[1]、本郷 周[2]、小坂 威雄[2]、大家 基嗣[2]、井本 正哉[1] ([1]慶大・院・理工、[2]慶大・医)

○Tomoki TAKEI[1], Yuki HAMAMURA[1], Hiroshi HONGO[2], Takeo KOSAKA[2], Mototsugu OYA[2], Masaya IMOTO[1] ([1]Graduate school of Science and Technology, Keio University, [2]Keio University school of Medicine)

進行性転移性前立腺がん（mPC）は精巣や副腎から供給される男性ホルモンに依存して増殖することから，外科的な精巣摘除や内分泌療法によって男性ホルモンの供給を断つ去勢療法が mPC に対する標準治療とされている．しかし，時間が経つにつれて，ほぼすべての男性患者が転移性去勢抵抗性前立腺がん（mCRPC）と呼ばれる病期へと進行する．この CRPC については，その去勢抵抗性獲得メカニズムは未だに不明な部分が多く，根本的な治療法も存在しない．そこで本研究では，天然物スクリーニングにより CRPC 細胞に細胞死を誘導する化合物を取得することで，悪性化メカニズムの解明及び新規 CRPC 治療薬シード化合物の創出を試みた．スクリーニングには慶應義塾大学医学部で樹立された CRPC モデル細胞を用い，これら CRPC 細胞に対して選択的に細胞死を誘導する化合物を探索した．その結果，微生物化学研究所から供与された放線菌の一培養液の 1-BuOH 抽出物に目的の活性を見出したため，本放線菌の生産する活性物質の単離精製・構造解析を行った．その結果，活性物質は Formycin A[1] と同定した．

Formycin A の CRPC への選択性を他のがん細胞株への増殖阻害活性と比較することで評価した． Formycin A は親株である mPC の LNCaP 細胞に対する増殖の IC_{50} 値は 0.17 μg/mL であるのに対し，最も悪性度の高い CRPC である C24 細胞に対する IC_{50} 値は 0.02 μg/mL を示した．さらに，肺がん，大腸がん，食道がん，皮膚がん細胞に対する IC_{50} 値も C24 細胞に対する IC_{50} 値より 10 倍以上弱かった．したがって，Formycin A は他のがん細胞種と比較しても，選択的に CRPC 細胞に活性を示すことが分かった．さらに Formycin A が *in vivo* においても CRPC 腫瘍に抗腫瘍効果を示すか評価を行った．CRPC の病態を再現するために去勢手術を施したマウスに CRPC である C24 細胞を皮下移植し，Formycin A を経口投与することで評価した結果，Formycin A はマウスの体重減少を伴うことなく濃度依存的に腫瘍の増殖を阻害した．

次に， Formycin A の作用機序解析を行った．Formycin A は caspase-8 及び caspase-3 の切断を誘導した．そこで，Formycin A による細胞死にその上流である Death Receptor (DR) が関与するか検討したところ， Formycin A 処理により CRPC 細胞選択的に FasL の細胞表面発現量を上昇させた．さらに FasL の中和抗体により，Formycin A の誘導する caspase-8 及び caspase-3 の活性化が阻害されたことから，Formycin A は Fas-FasL システムを介して CRPC 選択的にアポトーシスを誘導することが示唆された．

引用文献

１．ISHIZUKA M, TAKEUCHI T, NITTA K, KOYAMA G, HORI M, UMEZAWA H. J. Antibiot. 17:124-126 (1964)

Castrate resistant prostate cancer, Natural product screening, Formycin A

発表責任者：武井智暉（tomotomo2814@keio.jp）

講演番号：3B03p06
講演日時：3 月 27 日 14:45～ 総合学習プラザ B03 会場

変異 β-catenin 依存的にアポトーシスを誘導する化合物の作用機序解析

Mechanistic analysis of compound which induces mutant ß-catenin-dependent apoptosis

○池田 拓慧[1]、室井 誠[2]、石川 俊平[3]、長田 裕之[2]、井本 正哉[2] ([1]慶應大・理工、[2]理研 CSRS, ケミカルバイオロジー、[3]東大・医)
○Hiroaki Ikeda[1], Makoto Muroi[2], Shumpei Ishikawa[3], Hiroyuki Osada[2], Masaya Imoto[2] ([1]Keio Univ., [2]RIKEN CSRS, [3]The Univ. of Tokyo)

【背景・目的】
Wnt シグナル伝達経路の構成因子として知られるβ-catenin は、細胞増殖を厳密に制御している。しかしβ-catenin (*CTNNB1*)に活性型の変異が生じると、β-catenin は常に安定化し核内に蓄積、増殖シグナルが異常に亢進する。β-catenin の変異は大腸がんの約 10%、肝細胞がんの約 20%など様々ながん種で認められるが、このようながんに対して有効な治療薬は未だ開発されていない。そこで本研究では変異β-catenin 依存的に細胞死を誘導する化合物を取得し、その作用機構を解析することを目的とした。
【結果】
β-catenin 変異がん細胞選択的に細胞死を誘導する化合物を約 25,000 化合物より探索し、第一三共株式会社より供与された DS37262926 (miclxin)に目的の活性を見出した。Miclxin はβ-catenin ヘテロ変異 HCT116 細胞とβ-catenin 野生型アレルを欠損した HCT116 *CTNNB1* Δ45/-細胞にアポトーシスを誘導したが、β-catenin 変異型アレルを欠損した HCT116 *CTNNB1* +/-細胞にはアポトーシスを誘導しなかった。Miclxin の標的タンパク質取得を目的として、miclxin アフィニティビーズを用いて HCT116 細胞ミトコンドリア抽出液から miclxin 結合タンパク質を探索した。その結果、ミトコンドリア内膜タンパク質複合体(MICOS)構成因子である MIC60 が miclxin 結合タンパク質として同定された。HCT116 細胞に miclxin を処理するとミトコンドリア膜電位の低下が認められ、その後 eIF2α-ATF4-CHOP 経路の活性化を伴うミトコンドリア・ストレスが誘発された。このストレス応答として Bcl-2 の発現低下、AIF の核内移行によるアポトーシスが誘導されることを明らかにした。さらに MIC60 をノックダウンすることにより、同様のミトコンドリア・ストレス応答が誘導されたことから、miclxin は MIC60 を阻害する新規な化合物であることが分かった。一方、HCT116 細胞のβ-catenin をノックダウンすると miclxin によるミトコンドリア･ストレスの誘発が阻害され、アポトーシスが抑制された。このことから MIC60 の機能不全によるミトコンドリア・ストレスにβ-catenin が関与していることが明らかになり、MIC60 を標的とすることが変異β-catenin 依存的にミトコンドリア損傷を誘発する新たながん化学療法の戦略であることを示唆した。

β-catenin, apoptosis, mitochondrial stress

講演番号：3B03p07
講演日時：3 月 27 日 15:06～ 総合学習プラザ B03 会場

細胞内ビリルビン代謝を標的とする新規パーキンソン病治療薬シード BRUP-1 の同定と作用機序解析

BRUP-1, a novel drug seed for Parkinson's disease targeting intracellular bilirubin metabolism

○片浦 哲志[1]、斉木 臣二[2]、石川 景一[2]、赤松 和土[2]、笹澤 有紀子[1,2]、服部 信孝[2]、井本 正哉[1]([1]慶大院理工、[2]順天堂大医)
○ Tetsushi KATAURA[1], Shinji SAIKI[2], Kei-ichi ISHIKAWA[2], Wado AKAMATSU[2], Yukiko SASAZAWA[1,2], Nobutaka HATTORI[2], Masaya IMOTO[1] ([1]Keio Univ., [2]Juntendo Univ.)

[背景・目的]パーキンソン病(PD)はアルツハイマー病に次いで患者数第 2 位の神経変性疾患であり，中脳黒質ドパミン神経細胞の変性によって引き起こされる運動障害を主症状とする．高齢者の約 1%が発症する高頻度な疾患であるが，未だ有効なバイオマーカーの確立や根治薬の開発には至っていない．ここで近年，PD 患者では血漿中ビリルビン値が有意に低下していることがメタボローム解析により明らかになった．ビリルビンは強力な抗酸化物質として知られ，脳内でもスーパーオキシドの除去に寄与することなどが報告されている．したがって，ビリルビンの減少は単なるバイオマーカーとしてだけでなく，有効な PD の治療標的になることが期待された．そこで本研究では，ビリルビンの簡便な測定系の構築・ビリルビン量を回復させる薬剤のスクリーニング・PD モデル細胞を用いた薬効評価を実施し，ビリルビン代謝を標的とする新規 PD 治療薬シードを創出することを目的とした．
[方法と結果]ビリルビンと結合して緑色蛍光を発するタンパク質 UnaG と，内部標準として mCherry を HepG2 細胞に発現させることで，UnaG/mCherry 蛍光比から簡便にビリルビン量の変化を評価できる細胞系を作製した．この細胞に対し，PD モデル細胞・動物系で広く使用されているロテノンを処理したところ，細胞内ビリルビン量が有意に減少することが分かった．そこで，ロテノンによるビリルビン減少を阻害する薬剤を化合物ライブラリー（約 10,000 化合物）から探索し，低分子化合物 BRUP-1 をヒット化合物として取得した．さらに BRUP-1 は酸化ストレス応答のマスターレギュレーターである Nrf2 の活性化を介して，ビリルビン生合成の律速酵素ヘムオキシゲナーゼ 1 （HO-1）の発現上昇を誘導し，細胞内ビリルビン量を増加させることを見出した．そこで次に，神経様に分化させた PC12D 細胞に対しドパミン細胞選択的神経毒である MPP^+を添加する PD モデル細胞系を用いて，BRUP-1 の神経保護活性を評価した．その結果，BRUP-1 は MPP^+が誘導する活性酸素種（ROS）産生を阻害し，神経細胞死を顕著に抑制することができた．この活性は HO-1 依存的であることから，BRUP-1 は Nrf2/HO-1/ビリルビン経路を活性化させることで神経保護活性を示すことが示唆された．さらに，BRUP-1 はヒト健常者由来 iPS 細胞より分化誘導したニューロンに対しても有意な細胞保護効果を示したことから，BRUP-1 は PD の有用な新規治療薬シードとなることが期待される．

Parkinson's disease, Bilirubin, Drug screening

発表責任者：井本正哉（imoto@bio.keio.ac.jp）

講演番号：3B03p08
講演日時：3 月 27 日 15:17～ 総合学習プラザ B03 会場

疫病菌交配ホルモン受容体遺伝子の探索

Study on mating hormone receptor gene of *Phytophthora*

○笠原 功輝、田中 愛子、竹本 大吾、小鹿 一 (名大農)
○Kouki KASAHARA, Aiko TANAKA, Daigo TAKEMOTO, Makoto OJIKA (Nagoya Univ.)

[背景・目的]

Phytophthora 属卵菌の総称である疫病菌の多くは植物病原性を示すことで作物に対して甚大な被害をもたらし、さらにはその防除に用いられる大量の農薬を原因とした環境汚染が懸念されている。疫病菌は有性生殖を行うことで耐久性の卵胞子を形成し、拡散性の向上と交配による悪性化を伴う遺伝的多様性を獲得する。疫病菌の有性生殖は二つの交配型（A1 型、A2 型）の接触によって生じるが、この時それぞれの交配型が分泌する交配ホルモン α1、α2 がもう一方の交配型で受容されることで有性生殖が誘起される。これらの交配ホルモンは既に単離・同定されており、生合成経路の一部と構造活性相関は明らかになっているものの、その作用機作は未だ明らかとなっていない。疫病菌における有性生殖メカニズムの解明は疫病菌防除への応用の期待から長く望まれてきた課題であるが、我々はその中でも交配ホルモンの受容機構に着目し研究を行っている。本研究では疫病菌の有性生殖の鍵を握る交配ホルモン受容体を同定し、さらにはその下流の情報伝達系を解析することで、有性生殖メカニズムの全容を分子レベルで解明し、得られた知見を疫病菌防除に応用することを目的としている。

[方法・結果]

交配ホルモン受容体の同定の為、複数のアプローチで実験を行っている。すなわち、(1) トランスクリプトーム解析による交配型間の遺伝子発現差解析、(2) 交雑種における遺伝子型の遺伝学的解析である。(1) においては、当研究室で保有する疫病菌の内 A1 型、A2 型それぞれ 3 株について RNA-Seq による解析を行い、それぞれのコンティグの発現レベル等の性質から受容体としての可能性が高いと考えられるものを絞り込んだ。(2) においては、A1 型と A2 型の交配によって得られた F1 世代を自家受精させることによって、意図的に遺伝的な多様性を生じさせた F2 世代を取得する。これらの F2 世代の内、同一の交配型を示す個体群についてゲノムシーケンスを行い保存された遺伝子座を明らかにすることで受容体候補遺伝子を絞り込んでいる。(1)、(2) 共に交配ホルモン受容体候補遺伝子を絞り込んだ後、当研究室で保有する複数の A1 型、A2 型の疫病菌から抽出した RNA を用いてリアルタイム PCR などによる確認を行っていく予定である。

Phytophthora, mating hormone, hormone receptor

講演番号：3B03p09
講演日時：3 月 27 日 15:28～ 総合学習プラザ B03 会場

疫病菌交配ホルモン生合成遺伝子の探索

Studies on biosynthesis genes for the *Phytophthora* mating hormones

○有吉 俊[1]、田中 愛子[1]、竹本 大吾[1]、大栗 隆二[2]、矢島 新[2]、小鹿 一[1] ([1]名大院・生命農、[2]東農大院・農)
○Suguru ARIYOSHI[1], Aiko TANAKA[1], Daigo TAKEMOTO[1], Ryuji OGURI[2], Arata YAJIMA[2], Makoto OJIKA[1] ([1]Nagoya University, [2]Tokyo University of Agriculture)

【背景・目的】

疫病菌（*Phytophthora* 属植物病原糸状菌）は有性生殖の際に 2 種類の交配ホルモン α1, α2 を利用する。これまでに交配ホルモンの化学構造、生合成経路、構造活性相関が明らかにされてきた[1, 2]が、生合成酵素の同定や受容体探索などのケミカルバイオロジー的課題は未解決のままである。このうち生合成酵素に関しては、生合成経路（図 1）より cytochrome P450 をはじめとする酸化酵素が疑われる。そこで本研究では、トランスクリプトーム解析を実施し、交配ホルモン生合成遺伝子の探索を試みた。

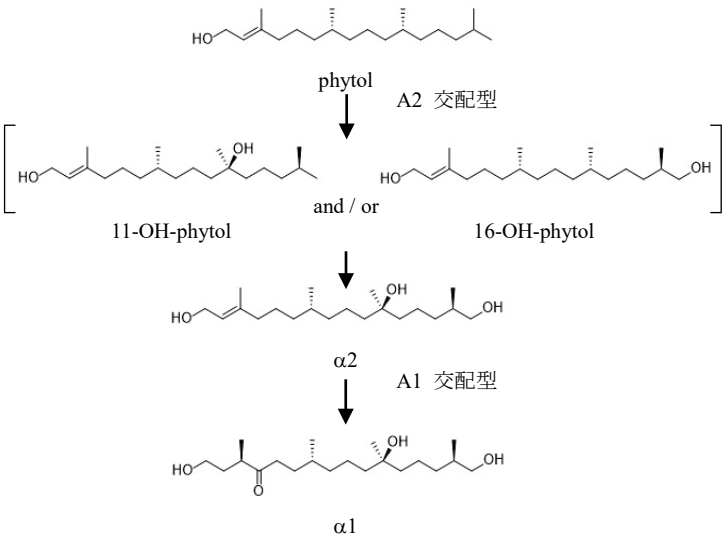


図 1. 疫病菌交配ホルモンの生合成経路

【方法・結果】

6 株の *P. nicotianae*（A1 交配型 3 株、A2 交配型 3 株）を 10% V8 野菜ジュース寒天培地で培養し、各菌株の菌糸を回収した。回収した菌糸から total RNA を抽出後 RNA-seq 解析を行い、A1, A2 交配型間の発現差解析を行った。RNA-seq 解析で A1 または A2 交配型選択的に発現が見られた遺伝子について、qPCR で両交配型間の発現比を確認した結果、A2 交配型で優先的に発現する酸化酵素遺伝子を発見した。この α2 生合成酵素遺伝子は cytochrome P450 をコードしていた。これをアグロバクテリウムに導入し、タバコ葉（*N. benthamiana*）に感染させ、感染部位に phytol を投与した後、得られたタバコ葉抽出液を LC/MS で確認したが、α2 および hydroxy phytol 中間体（OH-phytol）は検出できなかった。そこで内生菌（エピクロエ属エンドファイト）に候補遺伝子を導入・発現させ、phytol や OH-phytol を投与し培養した。現在これらサンプルについて LC/MS で α2 が含まれるか確認中である。また α1 生合成遺伝子に関しても qPCR によりさらなる解析を進める予定である。

1) J. Qi, *et al.*, *Science* 2005, 309, 1828
2) M. Ojika, *et al.*, *Nat. Chem. Biol.* 2011, 7, 591-593

Phytophthora, hormone biosynthesis, transcriptome

講演番号：3B03p10
講演日時：3 月 27 日 15:39～ 総合学習プラザ B03 会場

ε-poly-L-lysine 修飾による抗体の細胞内送達法の確立
Intracellular delivery of antibody modified with ε-poly-L-lysine
○武内 大和[1]、牛丸 和乗[1]、加藤 康夫[2]、丸山 千登勢[1]、濱野 吉十[1]([1]福井県大院・生物資源、[2]富山県大・生医工研セ)
○ Yamato TAKEUCHI[1], Kazunori USHIMARU[1], Yasuo KATO[2], Chitose MARUYAMA[1], Yoshimitsu HAMANO[1] ([1]Fukui Pref. Univ., [2]Toyama Pref. Univ.)

【目的】近年、抗体医薬を含むバイオ医薬が標的分子に特異性が高く、副作用が小さいため注目度が高まっている。しかし、高分子のバイオ医薬は細胞膜を透過できないため、細胞外あるいは細胞表層の分子を標的にしたものに限られる。したがって、バイオ医薬などの機能性高分子を細胞内へ送達する技術を開発できれば、細胞内分子を標的とした新たなバイオ医薬の創製につながる。細胞内送達技術の 1 つとして、化合物の塩基性ペプチド修飾が挙げられる。塩基性ペプチドの多くはその化学的特性から生体膜透過性を有することが報告されており、我々は、放線菌 *Streptomyces albulus* によって生産される ε-poly-L-lysine（ε-PL）に着目した。ε-PL は 25-35 残基の L-lysine が直鎖状につながった天然の塩基性ペプチドである。我々はその生合成メカニズム（*Nat. Chem. Biol.*, 4, 766, 2008）を応用し、分子間の結合に有効なクリックケミストリーの官能基（azide 基、alkyne 基、thiol 基など）を ε-PL の carboxy 基末端に導入する微生物変換法を確立した。そこで、得られた ε-PL-PEG_4-azide を用いて、低分子の蛍光色素および高分子の蛍光タンパク質（27 kDa）に ε-PL を導入し、動物細胞を処理したところ、低分子、高分子を問わず、生体膜透過性を付与できることを確認した。さらに、酵素である Cre recombinase（38 kDa）に ε-PL を導入したところ、高分子であるにもかかわらず、細胞内へ送達され酵素活性も維持していることが確認された。そこで本研究では、分子量 150 kDa を超える抗体にも生体膜透過性を付与できるかを検証した。

【方法と結果】抗α-tubulin の IgG に対し、4 当量の dibenzocyclooctyne (DBCO)-PEG-NHS ester、FAM-NHS ester を加え、IgG に DBCO 基と蛍光色素を導入した。さらに ε-PL-PEG_4-azide を加え、azide/DBCO のクリックケミストリーを介して抗体を ε-PL で化学修飾した。得られた ε-PL 修飾抗体の生体膜透過性を HeLa 細胞で確認したところ、ε-PL 未修飾の抗体と比較して、顕著な生体膜透過性が確認された。また、ε-PL 修飾抗体を細胞に長時間処理することで、細胞の変形や培養プレートから剥がれる現象が観察された。これらの現象から、ε-PL 修飾した抗体が、細胞内へ到達後、α- tubulin に結合し、その働きを阻害することで細胞毒性が引き起こされていると示唆された。これまで、抗体の塩基性ペプチド修飾により細胞内へ送達後、細胞毒性を誘導するという報告例はなく、細胞内標的を狙った全く新しい抗体医薬の創製が期待できる。そこで、抗体の ε-PL 修飾により細胞死が誘導されるかを検証し、その結果についても報告する。

cell penetrating peptide, click chemistry, antibody

発表責任者：濱野吉十（hamano@fpu.ac.jp）

講演番号：3B03p11
講演日時：3 月 27 日 15:50～ 総合学習プラザ B03 会場

ゴルジ体マンノシダーゼ阻害剤の構造修飾による活性の分離　～細胞毒性の軽減とマンノシダーゼ阻害に基づくスフェロイド形成阻害～

Separation of cytotoxicity and inhibitory activity of spheroid formation by structural modification of Golgi mannosidase inhibitor.

○加納 結衣[1]、小山 亮祐[1]、水谷 文香[2]、袴田 航[1,2]、平野 貴子[1,2]、西尾 俊幸[1,2] ([1]日大院・生資科、[2]日大・生資科・生化)
○ Yui KANO[1], Ryosuke KOYAMA[1], Ayaka MIZUTANI[2], Wataru HAKAMATA[1,2], Takako HIRANO[1,2], Toshiyuki NISHIO[1,2] ([1]Graduate school of Bioresource Sciences, Nihon Univ., [2]Chem. and Life Sci., College of Bioresource Sciences. Nihon Univ.)

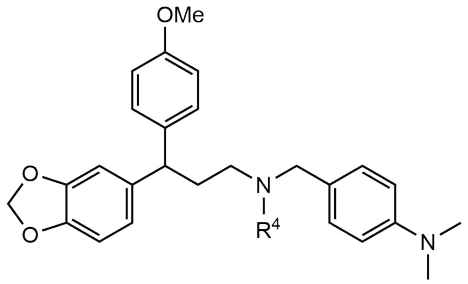
【目的】がん腫瘍の治療における課題の 1 つは、抗がん剤が腫瘍の深部まで作用しにくいことである。そこで、我々はがん腫瘍を形成している細胞間のコミュニケーション（CCC）を阻害し、腫瘍を崩壊させる抗がん戦略を立案し、その標的酵素として *N*-結合型糖鎖プロセシング酵素であるゴルジ体マンノシダーゼ（GM）を選択した。GM の阻害は、阻害により生じたハイマンノース型糖鎖（HM）が細胞表層まで輸送されることが報告（*FEBS Letters*, **580**, 6123-6131, 2006）されており、それによりがん細胞の CCC が阻害され、がん腫瘍が崩壊させることができると考えた。

これまでに我々は、非糖構造を有する GM 阻害剤として AR524（下図）を見出し、単層培養 HeLa 細胞を用いて生物活性評価を行った。しかしながら、AR524 は GM 阻害活性を示す濃度と細胞毒性を示す濃度が近接していた。そこで、これまで構造活性相関を検討していなかった AR524 の 2 級アミンを標的とし、その修飾を行うことにより、2 つの活性の分離することを本研究の目的とした。

【方法と結果】AR524 の 2 級アミンの修飾は、置換基の大きさを揃えつつアミド化（アセチル化・ベンゾイル化）による塩基性の低減とアルキル化（エチル化・ベンジル化）による求核性の低下を目指し、それらの合成を行った。はじめに、AR524 と合成したこれら誘導体の細胞毒性を HeLa 細胞において評価した結果、一部の誘導体は AR524 に比べて大幅に細胞毒性が軽減することが明らかとなった。これらの化合物の GM 阻害活性は、単層培養 HeLa 細胞における化合物投与時の HM 型糖鎖の蓄積を蛍光標識レクチンの結合量により評価した。その結果、非常に低濃度で細胞内に HM 型糖鎖が観察され、AR524 誘導体が細胞内で AR524 と同程度の GM 阻害活性を示すことを確認した。

次に、誘導体が HeLa 細胞を三次元に培養したスフェロイド（SPH）において CCC を阻害し SPH を崩壊させるか、SPH 形成阻害活性を評価した。その結果、比較的低濃度において誘導体に SPH 形成阻害活性が認められた。このことから、アミンを修飾することにより、細胞毒性と GM 阻害活性をある程度分離できることを確認した。

今後、これら AR524 誘導体がよりがん腫瘍の実態に近い SPH の「崩壊」活性を示すか、検討を行う予定である。



AR524: R^4 = H
AR524Et: R^4 = Ethyl
AR524Ac: R^4 = Acetyl
AR524Bn: R^4 = Benzyl
AR524Bz: R^4 = Benzoyl

Structure of AR524 and its derivatives

Golgi mannosidase inhibitor, N-linked oligosaccharide, spheroid formation

発表責任者：袴田　航（hakamata.wataru@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3B03p12
講演日時：3 月 27 日 16:01～ 総合学習プラザ B03 会場

既報小腸グルコシダーゼ阻害剤をライブラリとして用いる小胞体グルコシダーゼ II 阻害剤の探索手法の開発

Development of screening method for endoplasmic reticulum glucosidase II inhibitors using reported small intestine glucosidase inhibitors as a library.

○中村 啓喜[1]、井上 拓哉[1]、恩田 桃子[2]、袴田 航[1,2]、平野 貴子[1,2]、西尾 俊幸[1,2] ([1]日大生資科・生命化、[2]日大院・生資科)

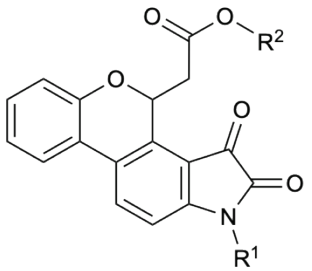
○ Hiroki NAKAMURA[1], Takuya INOUE[1], Momoko ONDA[2], Wataru HAKAMATA[1,2], Takako HIRANO[1,2], Toshiyuki NISHIO[1,2] ([1]Chem. and Life Sci., College of Bioresource Sciences, Nihon Univ., [2]Graduate school of bioresource Sciences, Nihon Univ.)

【目的】ウイルスの感染・増殖には、ウイルス外被タンパク質の *N*-結合型糖鎖が重要な役割を果たしている。そこで、この *N*-結合型糖鎖修飾に関与し、抗ウイルス剤の標的酵素として報告例が多い小胞体グルコシダーゼ II (GII) を抗ウイルス薬の標的酵素とした。標的酵素の阻害剤探索は、化合物ライブラリからの阻害剤探索または仮想リガンド探索からの阻害剤探索を行うことが一般的であるが、阻害剤のヒット率の低さが問題となっている。そこで我々は、阻害剤探索におけるヒット率の向上のため、既報の類似酵素阻害剤をライブラリとした阻害剤探索を行い、ヒット率の改善を目指している。本研究では、標的酵素である GII と同じ Glycoside Hydrolase family 31 属し、糖尿病治療薬の標的酵素である小腸グルコシダーゼの既報の阻害剤をライブラリとして GII 阻害剤を探索することとした。小腸グルコシダーゼ阻害剤の報告は非常に多いため、2017 年以降に報告された阻害剤の中から、ドラックライクな構造を有し、最も阻害活性の高い阻害剤（*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **25**, 1471, 2015）を選択・合成・評価を行うことによって本手法の有効性を例示することを目的とした。

【方法・結果】はじめに、選択した論文中で最も阻害活性が高かった化合物 **2** を基準阻害剤として選択し、化合物 **2** とマウス由来 GII 触媒サブユニット（PDB ID: 5IEE）とドッキングモデルを構築することにより、化合物 **2** の酵素活性部位の予測を行った。その結果、置換基 R^1 が活性部位に結合するモデルが得られた。置換基 R^1 が阻害活性に大きな影響を与えると予測されたため、化合物 **2** の置換基と置換基の大きさが同等の化合物 **3** および大幅に小さい化合物 **4** について、同様にドッキングモデル構築した結果、化合物 **4** は活性部位にほとんど結合せず GII 阻害活性が低いことが予測された。そこで、化合物 **1- 4** を論文に従い合成した。

次に、当研究室で確立した細胞レベル GII 阻害活性測定系を用いて、化合物 **1・2** の GII 阻害を測定した結果、100 μM において、82.8 %・67.1 %の比較的高い阻害活性を示し、同系における化合物 **1・2** の EC_{50} 値は、24.1 μM・38.4 μM であった。さらに、化合物 **1** の GII 阻害活性が細胞毒性（100 μM・24 時間暴露）による偽陽性でないことを確認した結果、細胞毒性 EC_{50} > 100 μM であったため疑陽性の懸念は排除された。これらの結果は、一例ではあるが小腸グルコシダーゼ阻害剤を GII 阻害剤に転用することの成功を示している。

今後、すべての化合物の生理活性を測定するとともに、本方法論の有用性を実証するため、他の小腸グルコシダーゼ阻害剤についても GII 阻害剤への転用を試みる予定である。



1: R^1=4-trifluoromethylphenyl, R^2=CH_3
2: R^1=4-trifluoromethylphenyl, R^2=H
3: R^1=4-methoxyphenyl, R^2=CH_3
4: R^1=methyl, R^2=CH_3

Structure of GII inhibitor candidates

antivirus agent, glucosidase inhibitor, Endoplasmic reticulum glucosidase II

発表責任者：袴田　航（hakamata.wataru@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3B03p13
講演日時：3 月 27 日 16:21～ 総合学習プラザ B03 会場

イオンモビリティ MS による植物ホルモンの超高感度分析

High-sensitivity analysis of plant hormones by LC-ESI-MS/MS with differential mobility separation

○謝 肖男[1]、竹原 千恵[1]、朝比奈 雅志[2]、米山 香織[3]、野村 崇人[1]、米山 弘一[3]([1]宇都宮大学・バイオセンター、[2]帝京大・理工・バイオ、[3]愛媛大・農)
○Xiaonan XIE[1], Chie Takehara[1], Masashi Asahina[2], Kaori Yoneyama[3], Takahito Nomura[1], Koichi Yoneyama[3] ([1]Ctr. for Biosci. Res. & Educ., Utsunomiya Univ., [2]Dept. Biosci., Teikyo Univ., [3]Drad. School od Agric., Ehime Univ.)

植物の生活環は、種子発芽から、茎、葉、根の分化と生長、花成、受精および種子の成熟などの過程から構成されている。これら過程の発現は外的環境要因および内生生理活性物質によって巧妙に調節されている。その主要な内生生理活性物質は植物ホルモンである。植物の生活環を調節する分子機構の解明には、各過程における植物ホルモンの同定および定量が不可欠である。また、個々の植物ホルモンは単独で機能するのではなく、複雑な相互作用をしながら生長や分化を制御している。そのため、同一試料から複数のホルモンを同時に分析、あるいは特定の組織から高感度かつ高精度で分析する必要がある。

近年、LC-ESI-MS/MS による植物ホルモンの高感度かつ多検体・一斉分析が可能になり、植物の生育に関わる生理活性物質の作用発現機構、生合成や代謝経路などの研究が飛躍的に進展した。しかし、LC では完全に分離できず、全てのホルモンを同時に識別することは難しい。また、植物の抽出物には目的物以外に大量の不純物が含まれているため、イオンサプレッションの影響を無視できず、サンプルを精製せずに高感度かつ高精度で分析することは不可能である。

イオンモビリティスペクトロメトリー質量分析(IMS-MS)は、イオンにおける衝突断面積の差によって、混合物中の化合物を特異的に分離する技術である。異性体や構造類縁体などの LC だけで分離できない化合物を、立体構造に基づいた高精度な分析が可能であり、近年、新しい質量分析法として注目されている。われわれの研究グループでは、植物ホルモンをより簡便に高感度かつ高精度に分析するため、分析対象とする植物ホルモンをイオンモビリティにより特異的に識別してから、MS に導入し分析する方法を検討してきた。LC-ESI-IMS-MS/MS/MS で分析した結果、多数の植物ホルモンは 10 fg で検出され、わずか 0.01 mg の植物の抽出物から IAA と ABA を分析することが可能であった。また、IMS-MS を用いて、数種類の天然 SL および ABA の立体異性体を簡易に識別することも成功した。本発表では、種子発芽における各組織の ABA 含有量の変化、重力、光屈性にかかわる IAA の含有量など、IMS-MS を用いたシロイヌナズナやトマトなどからの植物ホルモンの分析について報告する。

Plant hormone, Ion mobility, Mass spectrometry

講演番号：3B03p14
講演日時：3 月 27 日 16:32～ 総合学習プラザ B03 会場

アミロイドβタンパク質の凝集の蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)による検出

Detection of aggregation of amyloid beta-protein using Förster Resonance Energy Transfer

○杉山 恵里、増田 裕一（三重大院生物資源）
○Eri SUGIYAMA, Yuichi MASUDA (Mie Univ.)

【目的】アルツハイマー病因ペプチドである 42 残基のアミロイドβタンパク質(Aβ42)は、分子間βシートを形成して凝集し、神経細胞毒性を示す。Aβ42 の凝集阻害剤のスクリーニングには、分子間βシートへの結合により蛍光強度が増大するチオフラビン T(ThT)が一般に用いられているが、その結合部位が凝集阻害剤と競合すると、凝集量を正確に評価できなかった。本研究では、凝集阻害剤の影響を回避する目的で、Aβ42 自体に蛍光基を導入し、凝集による分子間距離の接近を蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)として検出する方法を検討した。

【方法・結果】Aβ42 凝集体の N 末端はランダム構造であることから [1]、Aβ42 の性質および凝集阻害剤の影響が少ないと考えられる。そこで、N 末端に蛍光性アミノ酸(アクリルドニルアラニン [2]、ベンゾアクリルドニルアラニン [3])を導入した 2 種類の Aβ42 の設計・合成した(図 A)。Bradford 法によるタンパク質定量および SH-SY5Y 細胞を用いた MTT アッセイにより、これらの Aβ42 の凝集能および神経細胞毒性が野生型と同等であることを確認した。2 種類の Aβ42 の等量混合物を凝集させると、アクリルドニルアラニンからベンゾアクリルドニルアラニンへの分子間 FRET が観測された(図 B)。しかしながら、凝集によりそれぞれの蛍光基の蛍光強度が減衰することが判明した。

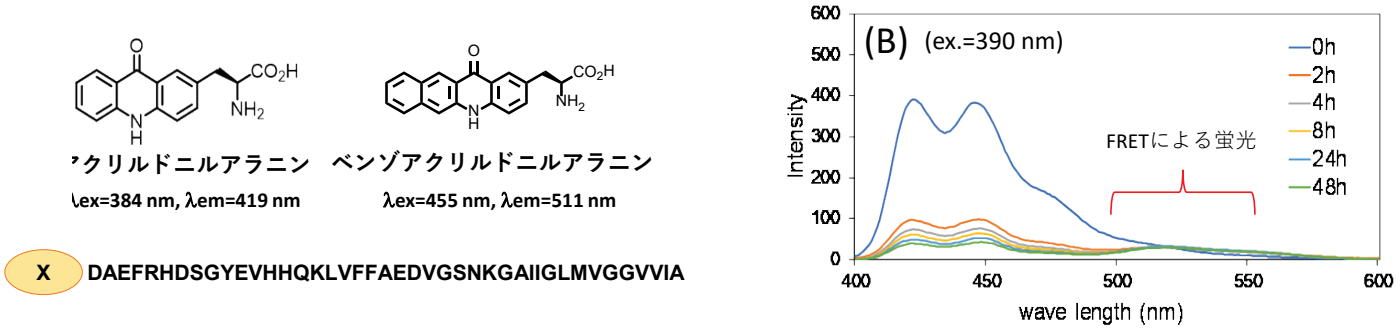


図 (A) 蛍光標識した Aβ42。(B) 2 種類の Aβ42 等量混合物の蛍光スペクトルの経時変化

【参考文献】1) Morimoto, A. *et al., J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, 52782. 2) Szymańska, A. *et al.*, *Helv. Chim. Acta,* **2003**, *86*, 3326. 3) Taki, M. *et al.*, *Chem. Lett.*, **2010**, *39*, 818.

Alzheimer's disease, Amyloid ß, FRET

発表責任者：増田　裕一（masuda@bio.mie-u.ac.jp）

講演番号：3B03p15
講演日時：3 月 27 日 16:43～ 総合学習プラザ B03 会場

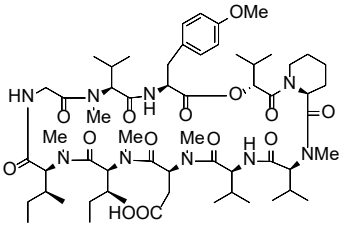
clavariopsin A の誘導化と PC12 細胞に対する神経突起伸長作用

Derivatization and Neuritogenic activity of clavariopsin A

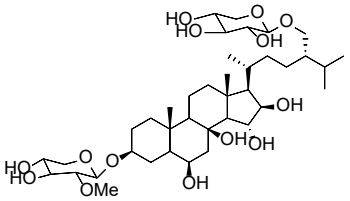
○森川 綾音、長島 志栞、小鹿 一（名大院・生命農）
○Ayane MORIKAWA, Shiori NAGASHIMA, Makoto OJIKA (Nagoya Univ.)

【背景・目的】

当研究室では神経モデルである PC12 細胞を用い、神経成長因子（NGF）増強活性物質の探索を行っている。当研究室の保有する化合物ライブラリのうち、水生不完全菌 *Clavariopsis apuatica* から得られた抗真菌性環状デプシペプチド clavariopsin 類およびオニヒトデから得られたステロイド配糖体 acanthasteroside B3 が増強活性を持つことがすでに判明している。本研究ではより活性の強い物質を得るため、clavariopsin 類の中でも強い活性を持つ clavariopsin A の誘導体の合成および構造活性相関の解明を目的とした。また、clavariopsin A や acanthasteroside B3 の作用機序の解明を目指した。



clavariopsin A



acanthasteroside B3

【方法・結果】

活性評価は次の方法で行った。わずかに突起伸長を示す程度の濃度の NGF （0.5 ng/mL、約 10～20%の伸長率）およびサンプルを PC12 細胞に投与し、4 日間培養した後に細胞の長径よりも長い神経様突起を持つ細胞の割合を数えることで増強活性の指標とした。clavariopsin A の誘導体化は次のように行った。まず、clavariopsin A と TMS ジアゾメタンを反応させることでメチルエステル誘導体を得た。次に、clavariopsin A と各種アミン（炭酸水素アンモニウム、ヘキシルアミン、デシルアミン、ピロリジン）を HATU 存在下で反応させることでアスパラギン酸残基をアミド化しアミド誘導体を 4 つ得た。得られた誘導体を用いて NGF 増強活性試験を行った結果、いずれの誘導体においても低濃度で突起伸長活性を示し、ヘキシルアミド誘導体においては 0.63 μM という低濃度で増強活性を示すことが分かった。このことから、疎水性がより高い化合物ほど高い活性を持つことが示唆された。現在、clavariopsin A および acanthasteroside B3 を作用させた PC12 細胞から RNA 抽出を行い、トランスクリプトーム解析による突起伸長の作用機序の検討を進めている。

NGF-enhancing activity, PC12, clavariopsin

講演番号：3B03p16
講演日時：3 月 27 日 16:54～ 総合学習プラザ B03 会場

新規神経細胞保護物質 pestalotioquinol A の作用機構解析
The mechanism of action of a novel neuroprotective compound, pestalotioquinol A
○鶴川 幸音[1]、菅野 和紀[1]、鈴木 優華[1]、村上 裕信[1]、竹田 志郎[1]、永根 大幹[1]、坂上 元栄[1]、篠田 陽[2]、紙透 伸治[1] ([1]麻布大・獣医、[2]東京薬科大・薬)
○ Yukine TSURUKAWA[1], Kazuki KANNO[1], Yuka SUZUKI[1], Hironobu MURAKAMI[1], Shiro TAKEDA[1], Masaki NAGANE[1], Motoharu SAKAUE[1], Yo SHINODA[2], Shinji KAMISUKI[1] ([1]Azabu Univ., [2]Tokyo University of Pharmacy)

活性窒素種（RNS）は細胞に酸化ストレスを与え、細胞傷害を引き起こす。また、RNS による細胞傷害はアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患や炎症との関連が示唆されている。そこで本研究では、RNS である peroxynitrite（$ONOO^-$）供与体；3-morpholinosydnonimine（SIN-1）による細胞傷害から神経細胞を保護する化合物の探索を行った。その結果、*Pestarotiopsis microspora* の二次代謝産物から神経細胞保護活性を示す新規化合物 pestalotioquinol A（pesA）を得た（図 1）。pesA は神経様細胞に分化したラット副腎褐色細胞腫由来細胞株（PC12）に前処理を行うことで、pesA 非存在下でも SIN-1 によって誘導される細胞傷害を有意に抑制した（図 2）[1]。本研究では、さらに pesA の作用機構について解析を行った。まず、細胞傷害を誘導する活性種に対して選択性を示すか検討した。RNS である NO 供与体；NOR-3、活性酸素種（ROS）産生を誘導する 2-methyl-1,4-naphthoquinone（menadione）、rotenone および過酸化水素によって誘導される細胞傷害に対する神経細胞保護活性試験を行った。その結果、NOR-3 による細胞傷害に対しては神経細胞保護活性が示されたが、ROS による細胞傷害に対しては示されなかった。この結果より、pesA の神経細胞保護活性は SIN-1 や NOR-3 などの RNS による細胞傷害特異的であることが示唆された。

次に、pesAによる細胞内の抗酸化機構に関わるグルタチオンへの影響について検討した。PC12にpesAを処理後、細胞内のグルタチオン濃度を測定した。その結果、pesA処理により還元型グルタチオンの濃度が有意に増加した。この結果より、pesAは活性種を消去する作用をもつ還元型グルタチオンの濃度を増加させることで神経細胞保護活性を示す可能性が示唆された。

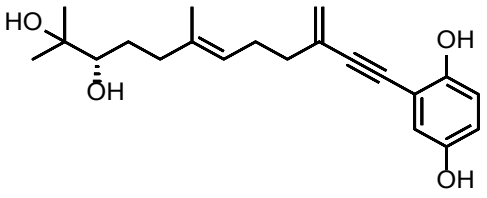


図 1. pestalotioquinol A

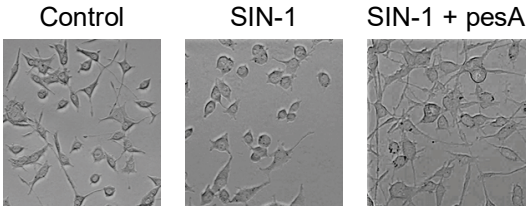


図 2. pesA が SIN-1 による細胞傷害に与える影響

[1] Kanno K, Tsurukawa Y, Kamisuki S, Shibasaki H, Iguchi K, Murakami H, Uchiyama J, Kuramochi K. Novel neuroprotective hydroquinones with a vinyl alkyne from the fungus, *Pestalotiopsis microspora*. *J. Antibiot.*72:793-799. 2019

reactive nitrogen species (RNS), Mechanism of action, neuroprotection

発表責任者：紙透　伸治（kamisuki@azabu-u.ac.jp）

講演番号：3B03p17
講演日時：3 月 27 日 17:05～ 総合学習プラザ B03 会場

梨幼果抽出成分による出芽酵母の寿命延長効果と老化関連遺伝子の発現

Extension of chronological lifespan and expression of aging-related genes by immature pear extract against Saccharomyces cerevisiae

○村田 和加惠[1,2]、長谷川 真梨菜[1]、藤田 憲一[2]、山口 良弘[2]、田中 俊雄[2,3]、荻田 亮[2,3]（[1]米子高専、[2]阪市大院・理、[3]阪市大・健康研セ）
○Wakae MURATA[1,2], Marina HASEGAWA[1], Ken-ichi FUJITA[2], Yoshihiro TAMAGUCHI[2], Toshio TANAKA[2,3], Aikira OGITA[2,3] ([1]Yonago Natl. Coll. Technol., [2]Grad. Sch. Sci., Osaka City Univ., [3]Res. Center Urban Health & Sports, Osaka City Univ.)

近年、日本社会の高齢化や健康ブームなどと相まって、健康寿命の延伸に向けた関心が高まっている。健康を阻害するひとつの要因には、免疫機能の低下や、活性酸素種の影響による DNA の損傷など、細胞老化に起因する細胞機能の低下、すなわち加齢関連疾患が挙げられる。細胞寿命の延伸や、細胞機能の維持など、細胞老化に関連する研究は多岐にわたり進められており、寿命延伸効果を付与する成分の探索および、その応用が期待されている。本研究では、ヒト寿命の決定機構と共通性を有することから、ヒトの寿命・老化研究のモデル細胞として扱われている出芽酵母を用いて、梨の抽出成分による細胞寿命の延長効果を検討した。

梨の成熟果および幼果をそれぞれ破砕し、蒸留水あるいは 70% エタノールに懸濁した後、それぞれのサンプルを抽出した。細胞寿命の評価は、出芽による細胞増殖を停止した細胞が生存し得る期間、すなわち経時寿命を測定することにより行った。定常期に至った後、継続して液体培地中にて培養した酵母から、コロニー形成が可能な生存細胞の割合をコロニーカウント法により求め、経時寿命における細胞生存率とした。また、Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 試験によって出芽酵母の mRNA の発現量を分析し、梨抽出成分による遺伝子レベルでの影響を評価した。

実験の結果、梨幼果の水抽出成分、およびエタノール抽出成分のいずれを付与した場合においても、コントロールと比べて経時寿命を著しく延長させる効果が認められた。さらに、RT-PCR によって mRNA の転写量について調べたところ、梨幼果の水抽出成分を付与したものでは、ヒト長寿遺伝子 (SIRT1) の相同遺伝子とされている *SIR2*、および *SIR4* の発現量に増加傾向が認められたが、エタノール抽出成分を加えたものでは、それら遺伝子の発現量に差は認められなかった。さらに、寿命延長に関与すると報告がある抗酸化に関わる SOD 遺伝子、およびグルコース応答系である Sch9、Tor1 経路に関わる遺伝子の RT-PCR 試験を行ったところ、水、エタノールのいずれの抽出成分においても mRNA の転写量において有意な差がみられなかった。以上の結果から、梨の幼果成分における、水抽出成分およびエタノール抽出成分では、極性が異なる成分が、それぞれに異なる機序によって出芽酵母の寿命延長に関与している可能性が示唆された。

Saccharomyces cerevisiae , Chronological lifespan, sirtuin gene

講演番号：3B03p18
講演日時：3 月 27 日 17:16～ 総合学習プラザ B03 会場

スサビノリ由来硫酸化多糖体ポルフィランの抗炎症作用
Anti-inflammatory effect of sulfated polysaccharide porphyrin isolated from Pyropia yezoensis
柳戸 彩奈、山口 健一、○小田 達也（長大水）
Ayana YANAGIDO, Kenichi YAMAGUCHI, ○Tatsuya ODA (Nagasaki Univ)

【背景と目的】スサビノリ *(Pyropia yezoensis)*は海苔の原料であるが，ノリ養殖現場では栄養塩の低下などにより生育状態が悪化し、商品価値の無い色落ちノリ問題がしばしば発生している。色落ちノリの有効利用を見出すとの観点から、色落ちノリに含まれる硫酸化多糖体ポルフィランに着目し、その生理活性について検討した。これまでの研究により、色落ちノリ由来ポルフィランは LPS 刺激マウスマクロファージ RAW264.7 細胞からの一酸化窒素(NO)産生を抑制する事を見出している。さらに興味あることに、その効果は正常ノリ由来ポルフィランに比べ強いことが見出されている。本研究では，ポルフィランのラジカル分解による低分子化とその分解物の *in vitro* 及び *in vivo* における生理作用について検討した。
【方法】熱水抽出したポルフィランはイオン交換クロマトにより精製した。*in vivo* の効果はマウス(ddY, 5 w)に対する LPS 致死作用抑制効果で検討した。一酸化窒素(NO)は Griess assay により、tumor necrosis factor (TNF)-αは ELISA により測定した。マウスマクロファージ株化細胞 RAW264.7 細胞の破骨細胞への誘導は receptor activator of nuclear factor κB ligand (RANKL)を用いた。ラジカル分解はアスコルビン酸と過酸化水素により行った。
【結果と考察】LPS 刺激 RAW264.7 細胞からの NO 産生を色落ち由来ポルフィランは濃度依存的に阻害し、その効果は正常ノリ由来ポルフィランに比べ強い事が確認された。さらに、生育状態が異なる４種色落ちノリから得られたポルフィランの分子量分布及び NO 産生阻害効果は異なり、より低分子ポルフィランがより強い活性を示す傾向であった。４種色落ちノリ由来ポルフィランをラジカル分解に供した後、ゲル濾過分析した結果、いずれも低分子化が確認され、それに伴い LPS 刺激 RAW264.7 細胞に対する NO 産生阻害効果の増強が観察された。*In vivo* 実験において、 LPS と共にポルフィラン尾静脈投与したマウスの生残率は LPS 単独投与に比べ顕著に上昇し、ポルフィラン投与群の血漿 TNF-αも低下した。以上の結果はポルフィランがエンドトキシンショックなどの *in vivo* においても抗炎症作用を発揮し得ることを示唆する。一方、receptor activator of nuclear factor κB ligand (RANKL)刺激により RAW264.7 細胞は破骨細胞へと誘導されることが知られている。マクロファージから誘導された破骨細胞は骨粗鬆症やリューマチなどの骨に関わる病態に関与することが知られている。RANKL 刺激 RAW264.7 細胞からの破骨細胞への誘導に対するポルフィランの影響を調べた結果、色落ちノリ由来低分子化ポルフィランに強い阻害効果が見出された。以上の結果から、ポルフィランがより強い抗炎症作用を発揮するには低分子化が有効であると推定された。

Porphyran, sulfated polysaccharide, Inflammation

発表責任者：小田達也（t-oda@nagasaki-u.ac.jp）

講演番号：3B04a01
講演日時：3 月 27 日 09:30～ 総合学習プラザ B04 会場

膜脂質－微生物型ロドプシン相互作用の網羅的解析

Systematic analysis of the interaction of microbial rhodopsins with membrane lipids.

○関 貴洋[1]、斉藤 遥平[1]、須藤 雄気[2]、村田 武士[3]、河合（野間）繁子[1]、梅野 太輔[1]（[1]千葉大工、[2]岡山大薬、[3]千葉大理）
○Takahiro SEKI[1], Yohei SAITO[1], Yuki SUDO[2], Takeshi MURATA[3], Shigeko KAWAI-NOMA[1], Daisuke UMENO[1]（[1]Grad. Sch. Eng., Chiba Univ., [2]Grad. Sch. Med. Dent. Pharm. Sci., Okayama Univ., [3]Grad. Sch. Sci., Chiba Univ.）

膜貫通 α-ヘリックス型膜タンパク質は全遺伝子の約 30 %を占めると言われている。これらの中にはそれらの構造や機能維持に，特定の脂質分子との相互作用を必要とするものが多数知られている。しかし脂質分子は数万種存在していると言われており，ある膜タンパク質の機能や安定性に，どの脂質成分がどれほど寄与するのかを知ることは困難である。実際に，膜タンパク質に結合することが知られる脂質分子にも，類似した構造を持つ他の脂質分子も多く存在している。これら構造類似脂質によって膜タンパク質が安定化するかどうかを調べることで，膜タンパク質の脂質分子認識の様式を理解できると期待される。

ロドプシンは，アポタンパク質・オプシンとアポカロテノイドの 1 つであるレチナール発色団からなる光受容タンパク質であり，レチナールの結合によりオプシンの安定化がおこる。またロドプシンの中には，その側面に特定のカロテノイドが結合するものが存在し，レチナールへのエネルギー移動やオプシンのさらなる安定化を通じて，ロドプシンの機能拡張が実現されている。自然界には多くのカロテノイドやアポカロテノイドが存在しているが， これらのうちどの分子がロドプシンと相互作用するかは未解明である。そこで本研究では，カロテノイド・アポカロテノイドを持たない大腸菌を宿主として様々なロドプシンを発現させ，天然・非天然カロテノイド・アポカロテノイドを細胞内で供給する系を開発した。複数種のロドプシンと複数の脂質分子を一つの宿主の中で「総当たり戦」的に共存させ， ロドプシンと脂質の相互作用ルールの抽出を試みた。

本報告では，以下の実験の結果について報告し，ロドプシンと脂質分子との相互作用の様式とその可塑性について議論したい。

(1) レチナール添加培地でのロドプシンの発現量解析
(2) 各種アポカロテノイド合成大腸菌株におけるロドプシンの発現量解析
(3) 各種カロテノイド合成大腸菌におけるロドプシンの発現量解析
(4) 脂質分子不在でも安定発現するロドプシンの進化工学的取得の試み

Lipids-protein interaction, Rhodopsin, Carotenoid

発表責任者：関 貴洋（sktkhr@chiba-u.jp）

講演番号：3B04a02
講演日時：3 月 27 日 09:41～ 総合学習プラザ B04 会場

トリプシン加水分解で生じる単鎖ペプチドのコレステロールミセル崩壊活性

Bile acid micelle disruption activity of short chain peptides from tryptic hydrolyzed protein

○伊藤 雅子[1,2]、清水 一憲[1]、本多 裕之[1] ([1]名大院工・生命分子工学、[2]愛知産技セ)
○Masako ITO[1,2], Kazunori SHIMIZU[1], Hiroyuki HONDA[1] ([1]Biomolecular Eng., Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., [2]Ind. Res. Cen., ACIST)

高コレステロール血症は、血液中のコレステロール値が高くなる生活習慣病の一つである。6 残基の大豆タンパク質ペプチド（ソイスタチン）は、胆汁酸と結合し、コレステロールの吸収を抑える作用があることが知られている[1)]。このような、腸管内で機能するペプチドを、64,000,000 通り存在する 6 残基ペプチドの中から抽出することは難しく、効率的に探索する方法の開発が必要である。そこで当研究室では、アミノ酸の物理的特徴量を用いた主成分分析を用いて、短鎖ペプチドライブラリーから胆汁酸と高結合する長鎖ペプチドの効率的な探索方法を開発した[2)]。この方法で、ランダムライブラリーから抽出した 6 残基のペプチドは、*in vitro* の試験で、高い、胆汁酸ミセル崩壊活性と胆汁酸ミセル形成阻害活性を示した。これらのペプチドは腸管内でのコレステロール吸収を阻害する可能性が示唆された。

本発表では、さらに、ランダムライブラリーから抽出した４残基及び 6 残基の、胆汁酸結合活性の高いペプチドの特徴について検討したところ、リジン、アルギニンを含むペプチドは、他のアミノ酸を含むペプチドより有意に胆汁酸結合活性が高いことが想定された。この点について確認するため、食品タンパク質（乳及び米グルテリン）の配列から、トリプシン（リジン、アルギニンの C 末端で特異的に切断するプロテアーゼ）分解により生成が想定されるペプチド（４～６残基）を合成し、胆汁酸ミセル崩壊活性を確認した。その結果、確認したペプチドのほとんどに活性を見出すことができ、特に４残基、５残基のペプチドは、6 残基より活性が高かった。つまり、リジン、アルギニンを含むと、有意に胆汁酸との結合活性が高く、コレステロールの吸収阻害活性が高いことを新たに発見できた。

引用文献
1) S.Nagaoka *et al.*, *Biosci.Biotechnol.Biochem.*, 74,1738-1741 (2010)
2) M.Ito *et al.*, *J.Biosci.Bioeng.*, 127,366-371 (2019)

functional peptide, cholesterol, tryptic hydrolysis

発表責任者：本多裕之（honda@chembio.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3B04a03
講演日時：3 月 27 日 09:52～ 総合学習プラザ B04 会場

アコヤガイ貝殻内の ACC 結合タンパク質の構造・機能解析
Structural and functional analyses of ACC binding protein in the shell of *Pinctada fucata*
○岩橋 晴香[1]、荒城 綾香[1]、根岸 瑠美[2]、降旗 一夫[1]、永田 宏次[1]、鈴木 道生[1] ([1]東大院農、[2]東大定量研)
○Haruka IWAHASHI[1], Ayaka ARAKI[1], Lumi NEGISHI[2], Kazuo FURIHATA[1], Koji NAGATA[1], Michio SUZUKI[1] ([1]Tokyo Univ., [2]IQB)

炭酸カルシウムは貝類や甲殻類が身を守るための殻や外骨格として利用しており、無脊椎動物における代表的な生体鉱物（バイオミネラル）の主成分である。バイオミネラルは単なる無機的な石灰化と異なり、有機物と相互作用した炭酸カルシウムが沈着することで緻密な微細構造を形成する。この微細構造を形成するためには炭酸カルシウムの結晶形成の初期の段階で、不定形の炭酸カルシウム（ACC: Amorphous Calcium Carbonate）と何らかの有機基質が相互作用することが重要であると考えられている。そこで、本研究では、アコヤガイ（*Pinctada fucata*）を用いて、ACC に特異的に相互作用する有機基質を探索し、その構造と機能を明らかにすることを目的とした。

アコヤガイの貝殻内側を酢酸で脱灰し酸可溶性成分を得た。一方で不溶性の成分は SDS/DTT で成分を抽出した後、変性剤可溶性画分として集めた。両者の成分を、ACC ナノクラスター溶液もしくは炭酸カルシウム結晶と混合することで、ACC ナノクラスターに特異的に結合するタンパク質の探索を LC-MS/MS を用いた定量解析により行った。その結果、酸不溶性画分から ACC に結合したタンパク質として、パラミオシンなどの筋肉タンパク質が同定され、それらのタンパク質にはグルタミン酸が多く含まれていることが分かった。特に EEAE というモチーフの数が多いほど、ACC により強く結合することが示唆された。そこで、EEAE のモチーフ配列についてペプチド合成を行い、NMR により ACC と結合する前後のペプチドの構造を解析した結果、ペプチドは 3 つのグルタミン酸の側鎖のカルボキシ基の向きを揃えて ACC に結合することが分かった。またペプチド存在下では ACC が安定化され、炭酸カルシウムの結晶形成が遅れることが走査型電子顕微鏡（SEM）により観察された。E の側鎖の長さが炭酸カルシウムの結合に影響を与えるか調べるため、DDAD というモチーフ配列についても同様に実験を進めている。

筋肉タンパク質が存在する貝柱が貝殻に接着する部位は光輝層と呼ばれる特殊な柱状の炭酸カルシウム結晶から構成される。光輝層からタンパク質を抽出したところ、分解した筋肉タンパク質が多数含まれる可能性が示唆された。そのため EEAE という配列を有する筋肉タンパク質が光輝層の炭酸カルシウム結晶の形成に関与する可能性が考えられた。免疫電顕によるパラミオシンの光輝層における局在解析や *in vitro* における炭酸カルシウム結晶形成実験によりパラミオシンが石灰化に与える影響を明らかにすることで、光輝層における特殊な炭酸カルシウム結晶の形成にパラミオシンが関与するか解析を進めている。

biomineralization, ACC, peptide

講演番号：3B04a04
講演日時：3 月 27 日 10:03～ 総合学習プラザ B04 会場

TNF-α結合活性を持つフィブロネクチン変異体の創出
Development of TNF-α-binding fibronectin mutant
○牧野 祥嗣、伊藤 伸哉（富県大工）
○Yoshihide MAKINO, Nobuya ITOH (Toyama Pref. Univ.)

【目的】抗体医薬はがんや免疫疾患等に高い薬効を発揮するが薬価が高く、患者および医療財政への負担となっている。そこで、抗体ではない蛋白質でその機能を代替する試みが進められている。微生物等により代替タンパク質を安価に生産すれば、薬価を低く抑えることができる。レミケードなどの抗体医薬は、腫瘍壊死因子-α（TNF-α）に対する中和抗体であり、関節リウマチ等に高い治療効果を発揮する。我々は、大腸菌を発現系として生産可能な、TNF-αへの結合活性を代替する非抗体タンパク質の創出を目指して研究を進めている。ここでは、フィブロネクチンを骨格として利用した、TNF-α親和性タンパク質の創出について報告する。
【方法】フィブロネクチン（10FnIII）を骨格として、構造中の２つのループ領域をランダマイズするような遺伝子を合成した。リボソームディスプレー法を用いて TNF-α親和性クローンをスクリーニングした。得られた遺伝子プールから大腸菌発現ライブラリを構築した。TNF-α親和性および特異性についてのモノクローナルアッセイを、ELISA 等により行った。
【結果】親和性選択を 5 回行った後に、得られた遺伝子プールを発現ライブラリにサブクローニングした。55 クローンをランダムに選び、発現タンパク質を抽出してモノクローナルアッセイを行った。その結果、13 クローンに、親和性と、ある程度の特異性が認められた。TNFR1 および TNFR2 に対する TNF-α結合の競合 ELISA を行ったところ、うち 2 クローンに TNF-α結合を阻害する傾向が認められた。この時点では親和性および特異性が十分ではないと考えらえたため、ループシャッフリング等の改良に着手した。これらも含めた親和性および特異性創出の結果の詳細について報告する。

Fibronectin, Scaffold protein, Affinity molecule

発表責任者：牧野祥嗣（makino@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：3B04a05
講演日時：3 月 27 日 10:14～ 総合学習プラザ B04 会場

デルタロドプシンの変異体解析
Analysis of deltarhodopsin mutant
○佐藤 良樹[1]、弘埜 陽子[1]、石井 純[2]、柘植 謙爾[2]、松田 史生[3]、戸谷 吉博[3]、原 清敬[1]([1]静岡県立大食栄環、[2]神戸大先端バイオ工、[3]阪大院情報)
○YOSHIKI SATO[1], Yoko Hirono[1], Jun Ishii[2], Kenji Tsuge[2], Fumio Matsuda[3], Yoshihiro Toya[3], KIYOTAKA HARA[1] ([1]Univ. Shizuoka, [2]Kobe Univ., [3]Osaka Univ.)

現在盛んに行われている、微生物を利用した有用物質生産や、遺伝子組換え技術を用いてそれらの生産性を向上させる研究では、細胞内エネルギー物質である ATP の不足による、生産性の頭打ちや、微生物の増殖の低下が問題となることがある。これまでに我々は、高度好塩菌 *Haloterrigena turkmenica* がもつ光駆動型プロトンポンプの一種であるデルタロドプシンを微生物細胞に導入し、ATP 再生活性を向上させることで有用物質の生産性を向上させる研究をおこなってきた。そこで、本研究では、このデルタロドプシンンに変異を加えることで、光駆動プロトン輸送活性を高めることを目的とした。

具体的には、デルタロドプシン遺伝子を含むプラスミドを用いて大腸菌 MG1655(DE3)株を形質転換し、デルタロドプシン発現株を構築した。変異デルタロドプシンは、エラープローン PCR によるランダム変異の導入により取得した。培養途中で IPTG を添加してデルタロドプシンまたは変異デルタロドプシンを発現誘導し、光受容分子である all-trans－retinal を添加してさらに培養を継続した。培養後のデルタロドプシン発現株または変異デルタロドプシン発現株を回収し洗浄後、光を照射しながら細胞外の pH の変化を測定することで変異デルタロドプシンの光駆動プロトン輸送活性を評価した。

本発表においては、取得した変異デルタロドプシンの光駆動プロトン輸送活性の測定結果を通して得られた知見について報告する。

rhodopsin, error prone PCR, mutant

発表責任者：原　清敬（k-hara@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：3B04a06
講演日時：3 月 27 日 10:35～ 総合学習プラザ B04 会場

ゼブラフィッシュ胚から分泌される希少糖含有糖ペプチドの構造研究

Structural analysis of glycopeptides containing a rare sugar secreted from zebrafish embryos

○長束 俊治、沢 空樹、飯塚 紀公（新潟大院自然科学）
○Shunji NATSUKA, Takaki SAWA, Norihiro IIZUKA (Grad. Scl. Sci., Niigata Univ.)

我々は、ゼブラフィッシュ胚の網羅的な糖鎖解析（グライコーム解析）を行う中で、希少糖を含む新規な糖ペプチドを発見し、2017 年度の本大会において報告した。今回はその後の進展、特にキャリアタンパク質の探索について報告する。

当該糖ペプチドの糖鎖部分は *O*-結合型と *N*-結合型の両タイプがあり、非還元末端に希少糖である 6-デオキシアルトロース(6dAlt)を持っていた。末端の共通構造は 6dAlt(β)1-3GalNAcα1-3HexNAcβ1-で、*N*-結合型の場合はバイアンテナ型、*O*-結合型の場合はムチン型タイプ 2 コアの伸長構造として存在していた。受精後の時間を追って存在量を分析したところ、受精時の胚からは検出されず、発生の進行と共に検出量が増加した。魚卵由来の糖ペプチドとして受精時に表層胞から多受精阻止のために分泌されるもの(hyosophorin)が知られているが、存在時期が異なることから、我々が発見した糖ペプチドは別の機能を持つと考えられる。また胚培養上清から検出されたことから、胚体外へ分泌されていることが推定された。

次にキャリアタンパク質を探索する目的で受精後 24 h 胚から有機溶媒変性によってタンパク質を抽出し、グライコプロテオーム解析を行った。タンパク質混合物をトリプシン消化で断片化後、Amide-Spin カラムで糖ペプチドを濃縮、さらに ConA 添加限外ろ過によりコンプレックス型糖ペプチドを素通り画分として濃縮した後に、LC-MS^n で分析した。MS^2 で糖鎖の開裂パターンから 6dAlt 含有と推定されるものを選別し、ペプチド+HexNAc のフラグメントを MS^3 および MS^4 で開裂させることによりアミノ酸配列を解析した。その結果をゼブラフィッシュのプロテイン・データベース検索にかけたところ、CEACAM5 のホモローグがヒットした。CEACAM5 は、癌胎児生抗原のファミリーとしてヒトで発見された GPI アンカー型の膜タンパク質で、多くの *N*-結合型糖鎖を持つことが知られており、胎児の消化管上皮においてその糖鎖への吸着によって微生物を除去する機能を有すると考えられている。

今回検出した CEACAM5 ホモローグが分泌糖ペプチドの前駆体であるかはまだ不明だが、これらの結果から、当該の希少糖含有糖鎖が微生物との相互作用において役割を持つ可能性が示唆された。

glycoproteomics, CEACAM5, 6-deoxyaltrose

発表責任者：長束俊治（natsuka@bio.sc.niigata-u.ac.jp）

講演番号：3B04a07
講演日時：3 月 27 日 10:46～ 総合学習プラザ B04 会場

カイコ中部絹糸腺の糖鎖構造解析
N-Glycans analysis in the middle silk gland of silkworm *Bombyx mori*.
○梶浦 裕之[1]、内野 恵郎[2]、立松 謙一郎[2]、瀬筒 秀樹[2]、藤山 和仁[1] ([1]阪大 ICBiotech、[2]農研機構・生物研)
○Hiroyuki KAJIURA[1], Keiro UCHINO[2], Ken-ichiro TATEMATSU[2], Hideki SEZUTSU[2], Kazuhito FUJIYAMA[1] ([1]ICBiotech, Osaka Univ., [2]Division of Biotechnology, NARO)

【 目的 】カイコは組換えタンパク質発現宿主として高いタンパク質生産能を有し、次世代の新規宿主細胞として利用が望まれる。カイコでの組換えタンパク質生産時に思索しなければいけない要素の 1 つが糖鎖修飾である。生体内で機能するタンパク質の多くは糖鎖を含む糖タンパク質として合成されるが、その構造は種特異的である。そのため、カイコで生産した糖タンパク質には動物が持つ糖鎖構造とは異なる昆虫特異的な糖鎖が付加され、組換えタンパク質が生体内で本来の機能を発揮しないことがあり得る。そこでカイコの糖鎖構造を動物型に改変する試みが重要になってくるが、カイコの糖鎖修飾と構造、その時間空間的な変化に関する知見は乏しい。そこで本研究ではカイコ内のモデル器官として中部絹糸腺に注目し、中部絹糸腺における糖鎖構造の経時的な変化を解析することとした。
【 方法 】カイコ 4 齢、5 齢、蛹の中部絹糸腺を抽出し、全糖タンパク質を抽出した。ヒドラジン分解により糖鎖を切り出し、2-アミノピリジンによる標識後、HPLC、LC-MS/MS 解析によりその糖鎖構造を推定した。
【 結果 】中部絹糸腺の糖鎖構造解析の結果、27 種類の糖鎖構造が存在することが分かった。中でも 4 齢の中部絹糸腺では ^{GN}M3、$_{GN}$M3、M3、および GN2M3 が主要な糖鎖構造であった。^{GN}M3 と $_{GN}$M3 の両方の存在比が減少すると GN2M3 が徐々に蓄積し、最終的に 5 齢の中部絹糸腺では GN2M3 の存在比が最も高くなった。興味深いことに、中部絹糸腺にはごくわずかではあるが ^{GN}M3、$_{GN}$M3、M3、あるいは GN2M3 とも異なる GN 型糖鎖が確認できた。各種酵素消化産物の HPLC 解析、及び MS/MS 解析の結果、この構造は GN2M2 であることが明らかとなった。即ちこの時間空間的な糖鎖構造解析と GN2M2 の存在により、カイコには時期特異的に発現する未同定の *N*-アセチルグルコサミン転移酵素が存在することが示唆された。

Bombyx mori, *N*-Glycan analysis, Middle silk gland

発表責任者：梶浦 裕之（kajiura@icb.osaka-u.ac.jp）

講演番号：3B04a08
講演日時：3 月 27 日 10:57～ 総合学習プラザ B04 会場

プラディミシン誘導体を利用した糖タンパク質の染色
Glycoprotein staining with Pradimicin derivative

○垣原 眞太朗[1]、都築 麗江[1]、小鹿 一[1]、五十嵐 康弘[2]、伊藤 幸成[3]、中川 優[1,3]([1]名大院生命農、[2]富山県大生工、[3]理研)
○Shintaro KAKIHARA[1], Kazue TSUZUKI[1], Makoto OJIKA[1], Yasuhiro IGARASHI[2], Yukishige ITO[3], Yu NAKAGAWA[1,3] ([1]Nagoya Univ., [2]Toyama Prefectural Univ., [3]RIKEN)

【目的】プラディミシン A (PRM-A, **Fig. 1**) は, Ca^{2+} 存在下で D-マンノース (Man) に特異的に結合する天然色素であり, 糖鎖研究への利用が期待されている. しかしながら, PRM-A は凝集性が高いため, 研究用ツールとしての利用には制限がある. 我々は近年, アミド結合を介して PRM-A にアジドユニットを導入した誘導体 (PRM-Azide, **Fig. 1**)[1] が Man 認識能を保持する一方で, 凝集性をほとんど示さないことを見出した. そこで本研究では「カルボキシ基のアミド化」を分子設計の基盤として, 凝集性を示さず, かつ糖タンパク質の検出に利用できる PRM-A 誘導体を開発することを目的とした.
【方法・結果】2-Aminoethanol を縮合した新規アミド誘導体 PRM-EA (**Fig. 1**) を PRM-A から二段階で合成した. その Man 結合活性を等温滴定カロリメトリーによって評価したところ, 結合活性は PRM-A よりも 5 倍程度低いものの, PRM-EA は Man 結合能を保持していることが確認された. さらに, PRM-EA の凝集性を沈殿試験によって評価したところ, PRM-A は水溶液中で容易に凝集するのに対して, PRM-EA は Man の有無に関わらず, ほとんど凝集しないことが明らかになった (**Fig. 2**;左). そこで, PRM-EA を用いてドットブロット法における糖タンパク質の検出を試みた. 5 種の糖タンパク質 (OVA, Tg, Fet, TRF, IgG) と糖鎖をもたない BSA をポリフッ化ビニリデン膜にブロットし, Fish Gelatin によるブロッキングを行った後, 100 μM PRM-EA 水溶液で染色を行った. その結果, 糖鎖の末端に Man をもつ Tg, OVA および Fet が PRM-EA に由来する赤色に染色されることが確認された (**Fig. 2**;右). これらの結果は PRM-EA が Man を有する糖タンパク質の検出薬として利用できる可能性を示唆している.

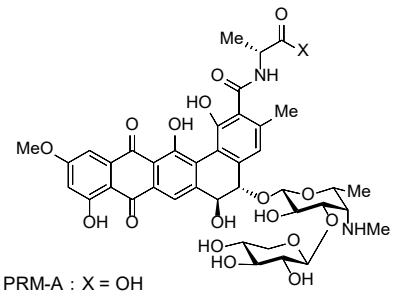


Fig. 1 PRM 類の構造

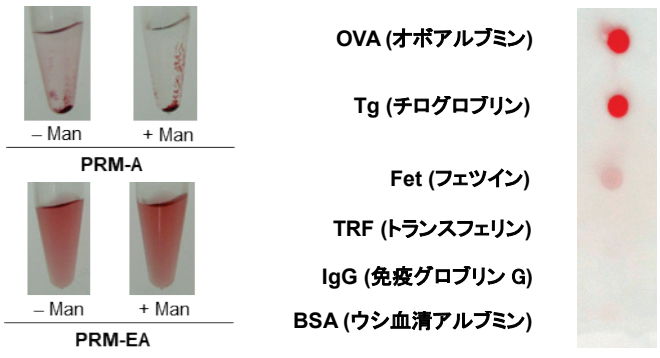


Fig. 2 沈殿試験 (左) および染色試験 (右)

1) Y. Nakagawa *et al. Cell Chem. Biol.* **2019**, 26, 950-959

aggregation, glycoprotein staining, Pradimicin

発表責任者：中川　優（yu@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3B04a09
講演日時：3 月 27 日 11:08～ 総合学習プラザ B04 会場

野生イノシシに含まれるグリコサミノグリカンの分析

Analytical study of glycosaminoglycan in wild boar

○武田-奥田 尚子、延 水晶、田村 純一（鳥取大農）
○Naoko TAKEDA-OKUDA, Su-Jung YEON, Jun-ichi TAMURA (Fac. Agric., Tottori Univ.)

［目的］

近年、日本全国でニホンジカやイノシシなどの害獣による山林や農耕地における被害が深刻化している。鳥取県でも、害獣による被害が拡大しており、侵入防止策の設置や捕獲を積極的に行っている。捕獲された害獣の皮や食用部位は有効活用されているが、その他の部位の多くは破棄されており、これらの未利用部位の有効活用が課題となっている。そこで我々のグループでは、捕獲した野生ホンシュウジカと野生エゾシカの軟骨部位と内臓に含まれるコンドロイチン硫酸(CS)やデルマタン硫酸(DS)、ヒアルロナン(HA)の組成分析を行ってきた。その結果、軟骨部位には非常に高濃度で CS と DS が含まれていることを明らかにした。また、軟骨組織は CS/DS 比が高かったのに対し、消化管でのそれは低く、CS/DS の組成では A 型の割合が高いことも明らかにした。本研究ではシカとは種の異なる野生イノシシの軟骨部位と消化管に含まれる CS や DS、HA の含有濃度の測定と組成分析を行った。また、成獣と生後数か月の幼獣を比較することで、年齢による違いも明らかにすることとした。

［方法・結果］

野生イノシシ(*Sus scrofa*)を各部位ごとに細断し、エタノールを用いて脱脂した後、減圧乾燥して脱脂乾燥物を得た。得られた脱脂乾燥物をプロテアーゼで処理後、透析を行い、エタノールを用いて糖鎖を沈殿させ、精製糖鎖を得た。得られた精製糖鎖は、コンドロイチナーゼ ABC またはコンドロイチナーゼ ACI を用いて糖鎖を二糖単位まで分解し、HPLC を用いて分析を行った。その結果、ニホンジカと同様に軟骨組織では CS/DS 比が高く、消化管では低いことが明らかとなった。また、成獣と幼獣における CS/DS の組成と硫酸化パターンに大きな差はみられなかった。

Glycosaminoglycan, Boar, Chondroitin sulfate

講演番号：3B04a10
講演日時：3 月 27 日 11:19～ 総合学習プラザ B04 会場

Schizosaccharomyces 属における細胞表層糖鎖の構造解析
Structural characterization of galactomannans in fission yeasts
○福永 嵩大[1]、田中 直孝[2]、中北 愼一[3]、樋口 裕次郎[1]、前川 裕美[1]、竹川 薫[1]([1]九州大農、[2]香川大農、[3]香川大総合生命)
○Takamasa FUKUNAGA[1], Naotaka TANAKA[2], Shinichi NAKAKITA[3], Yujiro HIGUCHI[1], Hiromi MAEKAWA[1], Kaoru TAKEGAWA[1] ([1]Kyusyu Univ.Faculty of Agriculture, [2]Kagawa Univ.Faculty of Agriculture, [3]Kagawa Univ.Life Science Research Center)

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の細胞表層糖鎖に存在するガラクトースは、*S. pombe* の細胞間認識機構に重要な役割を果たしている。*S. pombe* 糖鎖のガラクトース残基には、酸性基としてピルビン酸(Pv)が付加しており、糖鎖中の Pv がガラクトースを介した非性的凝集を抑制することで、細胞間の認識に重要な役割を果たす(1)ことを当研究室にて明らかにしている。

Pv 含有糖鎖は原核生物に普遍的に見られるが、真核生物においてはほとんど報告がなく、唯一、海洋性海綿動物 (***Microciona prolifera***) の Pv 化ガラクトース残基が、同種細胞間の凝集過程に重要であるという報告がなされているのみである。そこで本研究では、真核生物界における Pv 含有糖鎖の分布、および生合成機構の解明、さらに本酸性糖鎖の生理的意義の解明を目指している。

分裂酵母 *S. pombe* において、細胞表層に Pv が付加されない変異株が取得され、4 つの *pvg*$^{-}$遺伝子が同定された(2)。その中で、Pvg1 はゴルジ体においてホスホエノールピルビン酸を基質とする Pv 転移酵素であることを当研究室で明らかにした(3)。また、Pvg2, 3, 5 は Pv 転移反応に必要な、β1.3 結合でのガラクトース付加に関与することが構造解析から報告されているが、詳しい生合成機構については明らかになっていない。Pvg2 と Pvg5 に関しては、既知のタンパク質との高い相同性は見られなかったものの、*S. pombe* 以外の 3 つの *Schizosaccharomyces* 属酵母ゲノムにもホモログ遺伝子が存在することがわかった。そこで、これら 4 つの遺伝子の発現を RT-PCR により確認したところ、いずれの種においても構成的な発現が確認された。この結果から *Schizosaccharomyces* 属内で Pv 含有糖鎖の生合成機構が保存されていることが予想されたため、*N*-結合型糖鎖を抽出し、構造解析を行った。NMR 解析他の結果から、*Schizosaccharomyces* 属 4 種の細胞表層糖鎖には全てピルビン酸が付加されていることが明らかになった。さらに、*S. pombe* 以外の *Schizosaccharomyces* 属酵母が持つ Pvg1 ホモログを *S. pombeΔpvg1* で発現させた結果、Pv 化レベルが回復した。そのため、*S. pombe* 以外の *Schizosaccharomyces* 属酵母についても、Pvg1 ホモログは糖鎖末端のガラクトース残基への Pv 付加反応に関与することがわかった。

(1) Matsuzawa, T., Yoritsune, K. I. & Takegawa, K. (2012). *Eukaryot. Cell.* 11, 151-158
(2) Andreishcheva, E. N., et al. (2004). *J. Biol. Chem.* 279, 35644-35655
(3) Yoritsune, K. I., Matsuzawa, T., Ohashi, T., & Takegawa, K. (2013). *FEBS Lett.* 587, 917-921

Pyruvylated galactose, Fission yeast, Galactomannan

発表責任者：竹川薫（takegawa@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3B04a11
講演日時：3 月 27 日 11:40～ 総合学習プラザ B04 会場

シアル酸結合レクチン(Siglec7)の新規シアル酸結合領域の存在

The presence of a new sialic acid binding region in Siglec7

○佐藤 ちひろ、山川 奈緒、吉村 淳、北島 健 (名古屋大学)
○Chihiro SATO, Nao YAMAKAWA, Atsushi YOSHIMURA, KEN KITAJIMA (Nagoya Univ.)

Siglec（Sialic acid binding Immunoglobulin-like lectin）は、主に脊椎動物の免疫細胞上に発現する内在性シアル酸認識レクチン分子群である。Siglec-7 は、NK 細胞や単球上に発現しており、細胞外領域の N 末端側に位置する V-set ドメインがシアル酸認識に関与している。リガンドとしては、α2,8-ジシアル酸構造および分岐α2,6-シアル酸構造をもつものに対して高い結合特異性を示すことが知られている。Siglec7 はこれまで 6 種類の X 線結晶構造解析が取られていたが、その複雑なリガンド結合性を明らかにする研究はなされていなかった。そこで本研究は Siglec の持つ複雑なリガンド特異性の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。モデルとして Siglec7 を用いて in silico docking simulation 解析を行った。Siglec7 は apo 体およびリガンド結合体の X 線結晶構造の情報を用いた。リガンドは Siglec7 のリガンドとして考えられている GD3 の糖鎖構造の一部である Neu5Acα2→8Neu5Ac 構造を用いて解析を行った。その結果、apo 体へは、従来報告されている R124 を含む領域とドッキングが起こったが、リガンド結合体を用いた解析では、R67 を含む新規な領域との結合性が見られた。即ち、新規シアル酸結合領域の存在の可能性が示された。そこで、新規シアル酸認識領域の存在証明を行うため、まず Siglec-7 の細胞外領域の C 末端にヒト IgG の Fc 領域を結合させた融合タンパク質 Siglec-7Ec-Fc（wt）と変異体を作製した。変異体は R124 を含む領域の解析のために、R124A 変異体を、R67 領域の解析のために、R67A および、R94A 変異体を調製した。ガングリオシドとネオオリゴシアロ糖脂質をリガンドに用いて ELISA 法による結合実験を行ったところ、wt では GD3 に対する結合性が極めて高く、ジシアル酸以上の重合度 3-5 のオリゴシアル酸にも結合性が高いことが明らかになった。また変異体においては wt と比較して、既知のシアル酸結合領域変異体である R124A では結合性が減少したが、同時に新規シアル酸結合領域である R67A においても同様の結果が得られた。また、TLC immunostaining 法によっても wt はオリゴシアル酸に対して結合性を示した。また透析平衡法を用いた解析により、Siglec7 一分子に対して、2 個程度のリガンド結合サイトの存在が示された。以上の結果より、Siglec7 には既知のシアル酸結合領域だけでなく、新規のシアル酸結合領域が存在し、その二つが複雑なリガンド特異性を提示することに関わることが示唆された。

lectin, sialic acid, Siglec

発表責任者：佐藤ちひろ（chi@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3B04a12
講演日時：3 月 27 日 11:51～ 総合学習プラザ B04 会場

ハイマンノース型糖鎖ポリマーによる核/細胞質レクチンの同定
Identification of nuclear cytoplasmic lectins by glycopolymers carrying high-mannose type N-glycans
○前田 恵[1,2]、田中 創平[2]、高瀬 美穂[2]、Van Damme Els JM[3]、木村 吉伸[1,2] ([1]岡山大院・環境生命、[2]岡山大農、[3]ベルギーゲント大学)
○Megumi MAEDA[1,2], Sohei TANAKA[2], Miho TAKASE[2], Els JM Van Damme[3], Yoshinobu KIMURA[1,2] ([1]Graduate School of Environmental and Life Science, Okayama Univ., [2]Okayama Univ., [3]Ghent Univ.)

【目的】植物細胞には，複数の核/細胞質局在レクチンが存在しており，それらのいくつかは種々の生物的・非生物的ストレスに応答して発現誘導することが知られているが，詳細な生理機能は未解明なままである[1]。核/細胞質局在レクチンの内在性リガンドのひとつとして，分化・生長中の植物細胞に遍在している遊離 *N*-グリカンが候補に挙げられる。ハイマンノース型の遊離 *N*-グリカン（HMT-FNGs）は，新生糖タンパク質の品質管理系において，細胞質でミスフォールド糖タンパク質から脱糖鎖酵素（PNGase および EGNase）の作用により生成し，胚軸の伸長や果実の熟成を促進するホルモン様活性を有する可能性が推定されている[2]。本研究では，細胞質に存在する HMT-FNGs が核/細胞質局在レクチンと相互作用し，核へ移行後，転写因子と複合体を形成し，植物の分化・生長に関わる遺伝子の発現を制御する，という作業仮説を立て，その研究の一環として，ハイマンノース型 *N*-グリカンを多価に結合させた糖鎖ポリマーを合成し，核/細胞質レクチンの同定を試みた。
【方法・結果】ローヤルゼリー糖タンパク質から，ペプシン消化，アクチナーゼ消化，ゲルろ過，逆相及び親水性クロマトを組み合わせることにより短鎖糖ペプチドである Asn-糖鎖（Man5-9GlcNAc2-Asn）を調製した。その構造はアミノ酸分析と糖鎖構造解析（RP-, SF-HPLC, ESI-MS 分析）により確認した。合成糖鎖ポリマーは Asn-糖鎖のアミノ基をポリ-γ-L-グルタミン酸（γ-PGA）のカルボキシル基に縮合させて作製した。Asn-糖鎖の結合はアミノ酸分析と糖鎖構造解析により確認した。次いで糖鎖ポリマーの糖鎖結合タンパク質との結合性を以下のように確認した。まず，糖鎖ポリマーはタチナタマメ粗抽出物と混合すると，ハイマンノース型糖鎖結合レクチン（ConA）と複合体を形成し沈殿することを確認した。更に，糖鎖ポリマーが細胞質に局在するハイマンノース型糖鎖結合レクチン（Morniga M）と相互作用することをゲルろ過により確認した。最後に糖鎖ポリマーによる核/細胞質レクチンの同定を試みるため，ダイズ胚軸由来可溶性タンパク質と複合体を形成させた。SDS-PAGE 分析により，複数のマンノース結合タンパク質の存在を確認した。以上の結果から，本糖鎖ポリマーにより，ダイズ胚軸におけるマンノース結合タンパク質の存在を明らかにすることができた。
[1] N. Lannoo, E.J.M. Van Damme, *Biochimica et Biophysica Acta.,* **1800**, 190-201(2010); [2] Maeda M, Kimura Y. *Front Plant Sci.*, **5**, 1-9(2014)

free N-glycans, γPGA, sugar binding protein

発表責任者：前田恵（mmaeda@okayama-u.ac.jp）

講演番号：3B04a13
講演日時：3 月 27 日 12:02～ 総合学習プラザ B04 会場

酵母におけるアミロイドベータ配列とそれを含む下流配列の凝集および局在解析

Aggregation and localization analysis of amyloid beta sequence and its downstream sequences in yeast

○久保 友雅[1]、村橋 璃香[1]、浦野 大樹[2]、赤田 倫治[2,3,4]、星田 尚司[2,3,4] ([1]山口大工、[2]山口大院創成科学・化学、[3]山口大中高温微生物セ、[4]山口大生命医工学セ)
○Yuga KUBO[1], Rika MURAHASI[1], Daiki URANO[2], Rinji AKADA[2,3,4], Hisasi HOSHIDA[2,3,4] ([1]Yamaguchi Univ.,Dept.Appl.Chem., [2]Yamaguchi Univ.,Dev.Appl.Chem., [3]Yamaguchi Univ.,RC-TMR, [4]Yamaguchi Univ.,YUBEC)

アルツハイマー型認知症は、認知症全体の約 60%を占め、アミロイドベータ(以後 A-beta とする)前駆体タンパク質（APP: Amyloid-beta precursor protein）から切り出されてできる A-beta ペプチドが脳内で凝集し A-beta 斑（老人斑）として沈着し神経変性を引き起こすことが原因であると言われている。このように A-beta がアルツハイマー型認知症の原因であることがわかってきたが、その前駆体である APP についてはその機能さえ全く分かっていない。APP の機能を解明することが、アルツハイマー病の発症メカニズムの解明つながる可能性がある。しかし、APP の機能をヒトの脳内で解析することは難しい。そこで、酵母で解析することにした。

APP は 770 アミノ酸(アイソフォーム a)からなるタンパク質で、その 672-713 の領域が切り出されたのが A-beta42 であり、凝集性がある。まず A-beta42 の N 末側から 27 アミノ酸削除したところ、C 末側のアミノ酸配列でも凝集した。一方、C 末側から 10 アミノ酸削除しただけで凝集が無くなり、細胞質に局在を示した。したがって C 末に、凝集に必要な配列があった。C 末をさらに細かく削除した結果、6 アミノ酸を削除しても凝集したが、8 アミノ酸を削除すると凝集が無くなり、細胞質に局在した。C 末の 8 アミノ酸は疎水性アミノ酸で構成されている。凝集に対する疎水性アミノ酸の効果を見るために、凝集しない A-beta (1-34)に単一の疎水性アミノ酸を 6 つ連続させて付け、凝集の有無を調べた結果、6M, 6V, 6L を付加したもので凝集が見られ、6G を付加したものでは凝集がみられなかった。これらの結果から A-beta42 の C 末側の M,V,L などの疎水性アミノ酸が凝集に寄与していることが示された。ここでアルツハイマー病と関係する家族性変異を調べてみると、A-beta 領域外の下流部に多くの変異が存在していた。そこでこの領域を含む 726 番目までを発現させてみると驚いたことに、液胞膜に局在を示した。この領域を A-beta (1-55)と呼ぶ。液胞膜局在に必要な配列は A-beta (1-55)の C 末側なので、その配列をモデル化することにした。ここには疎水性アミノ酸の V と I が多く含まれていた。そこで A-beta42 の下流に V や I の連続配列を融合してみると液胞膜に局在した。この結果から、A-beta (1-55)は V や I を多く含む配列を介して液胞膜へターゲティングしていることが予想できた。これらのことから、A-beta (1-55)は神経細胞内でも特別な膜局在を示す配列ではないかと予想した。現在、APP 全長の局在性を調べている。

amyloid-beta, APP, downstream sequences

講演番号：3B04p01
講演日時：3 月 27 日 13:50～ 総合学習プラザ B04 会場

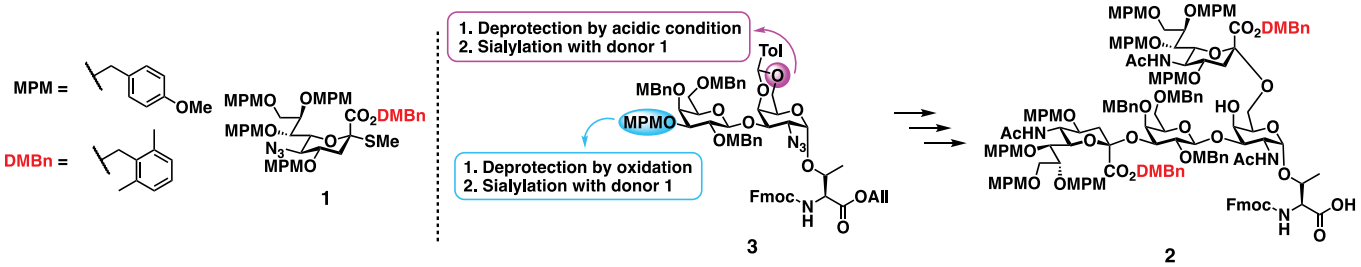
シアル酸を有する *O*-結合型糖アミノ酸の合成研究

Synthetic study of *O*-linked glycoamino acids bearing sialic acid

○伊藤 駿、朝比奈 雄也、北條 裕信（大阪大学蛋白質研究所）
○Shun ITO, Yuya ASAHINA, Hironobu HOJO (Institute for Protein Research, Osaka University)

糖タンパク質の構造活性相関の解析には、均一な糖鎖構造を有するサンプルが必要である。一般に糖タンパク質の非還元末端にはシアル酸が存在するため、シアリル化糖タンパク質を如何に調製するかは一つの大きな課題である。以前我々は、シアル酸水酸基に 4-methoxybenzyl (MPM)基を利用する保護基戦略を展開した。MPM 保護したシアリル糖アミノ酸をペプチド固相合成に応用し、一工程の脱保護過程でシアリル糖ペプチドの合成を達成した。しかし、シアリル化の際、シアル酸カルボキシ基に利用した MPM 基が反応系中の酸性度に耐えられず脱落する副反応が生じ、総収率が低下する問題があった。前年度の本大会にて、我々は 2,6-dimethylbenzyl (DMBn)基を、シアル酸カルボキシ基に利用した新たな保護基戦略を報告した。シアリルドナー**1** とグリコシルアクセプターを用いたシアリル化は、極低温条件下において高立体選択的かつ高収率でα2,6 およびα2,3 シアリル結合を有する二糖を与えた。加えて、この保護基はシアリル化条件下で十分な安定性を有し、続く糖アミノ酸への誘導化も効率良く行えた。得られた糖アミノ酸をペプチド固相合成に応用し TFA 処理したところ、以前の MPM 保護法と同様、DMBn 基の残存なく完全脱保護体のシアリル糖ペプチドを合成することに成功した。そこで本研究では、最適化されたこの保護基戦略を利用して、より複雑な糖鎖であるジシアリル T 抗原糖アミノ酸 **2** を合成することを目的とした。

糖アミノ酸 **2** の合成戦略を下図に示す。糖アミノ酸 **3** の MPM 基を選択的に脱保護し、シアリル化を行うことでシアリル T 抗原糖鎖を構築した後、4-methylbenzylidene の酸加水分解に続くシアリル化で糖アミノ酸 2 を得る計画とした。まず、糖アミノ酸 **3** を調製し MPM 基の選択的脱保護の検討に着手した。結果、MPM 基は CAN を利用した一電子酸化により 98%の高収率で脱保護できた。その後、ドナー**1** によりシアリル化することで、シアリル T 抗原糖アミノ酸誘導体を高収率で得ることができた。これを、TsOH を利用した酸加水分解により 4-methylbenzylidene を選択的に脱保護し、再びシアリル化を行うことでジシアリル T 抗原糖アミノ酸誘導体を得ることを検討した。



Sialic acid, Sialylation, Glycoprotein

発表責任者：伊藤　駿（ff_shun_0704@outlook.com）

講演番号：3B04p02
講演日時：3 月 27 日 14:01～ 総合学習プラザ B04 会場

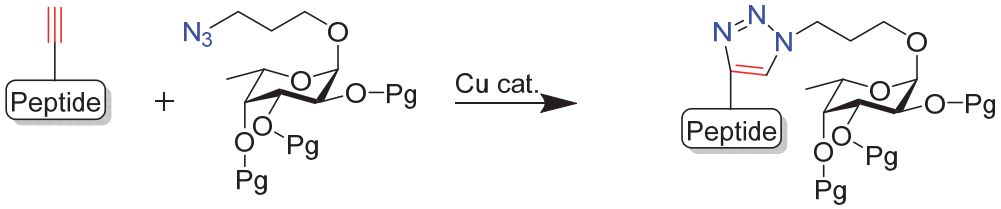
ペプチド上のα-フコシル結合の安定性の検討

Study for stability of α-fucosyl bonding on peptide

○安藤 達也、朝比奈 雄也、北條 裕信（阪大蛋白研）
○Tatsuya ANDO, Yuya ASAHINA, Hironobu HOJO (Inst. Protein. Res., Osaka Univ.)

L-フコース（Fuc）は、生体内に存在するデオキシ糖の一種であり、哺乳細胞では、N-結合型糖鎖やルイス抗原糖鎖中に、α-結合で付加している。L-フコースは、L-ガラクトース 6 位の水酸基がデオキシ化された構造を持っており、この僅かな構造的差異が、双方の化学的性質の違いを生じる原因となっている。特に、酸に対する安定性は、ガラクトースに比べると極めて低く、容易にフコシド結合の分解が起きる。この性質は、最終脱保護でトリフルオロ酢酸（TFA）による強酸処理を行う必要のあるペプチド固相合成法と相容れない。これらの理由から、フコースを含有する糖ペプチド合成は難しく、数件しか報告例が存在しない。その中で、Kunz らは、フコース水酸基の保護様式が、フコシド結合の酸安定性に影響を与えることを報告した[1]。彼らの報告によると、ベンジル保護フコースは、TFA 処理にて完全に加水分解を受ける一方、アセチル保護フコースでは、フコシル結合の開裂なく、目的の脱保護体を得ている。しかし、フコースの酸安定性についての詳しい報告は多くはなく、どのような保護基体系で、どの程度の酸安定性が得られるかどうかについては明らかにされていない。そこで、本研究では、フコースの保護基様式が、どの様にフコシド結合の酸安定性に影響を及ぼすか系統的に検討し、フコース含有糖ペプチド合成における最適な保護法を模索することにした。

モデル実験として、3 つのフコース水酸基を様々な様式で保護したアジドプロピルフコシドを調製した。次に、別途調製したアルキンを持つペプチドと、Cu 触媒を利用した Huisgen 環化反応により連結し、数種類の保護基様式を持つ糖ペプチドを調製した。得られた糖ペプチドを最終脱保護処理条件である TFA カクテルに処し、フコシド結合の安定性を検証した。



[1] Kunz, H.; Unverzagt, C.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*. **1988**, *27*, 1697-1699.

Fucose, Hydroxyl protecting group, Chemical synthesis of Glycopeptide

講演番号：3B04p03
講演日時：3 月 27 日 14:12～ 総合学習プラザ B04 会場

マトリグリカン繰返しオリゴ糖の合成

Synthesis of repeating oligosaccharide of matriglycan

○田村 純一[1,2]、大村 優華[2]、田村 敬裕[1] ([1]鳥取大院連農、[2]鳥取大院農)
○Jun-ichi TAMURA[1,2], Yuka OMURA[2], Takahiro TAMURA[1] ([1]United Grad. School Agric. Sci., Tottori Univ., [2]Dep. Agric., Grad. School Sust. Sci., Tottori Univ.)

マトリグリカンは，*O*-マンノシルグリカンの非還元側の大部分を占め，Xyl（xylose）と GlcA（glucuronic acid）を二糖繰返し単位とする多糖（XG リピート）である．マトリグリカンは細胞外マトリックスであるラミニンと強く相互作用し，*O*-マンノシルグリカンを介して，基底膜と細胞骨格とを結合させ，筋繊維を安定化させている．

筋ジストロフィー症は筋繊維の壊死や変性を主病変とする遺伝性の疾患である．近年，*O*-マンノシルグリカンの欠損が筋ジストロフィーの発症原因の一つであることが明らかになってきた．*O*-マンノシルグリカンの形成は還元側から逐次相当する糖転移酵素により行われ，XG リピートがラミニンと結合するため，糖鎖のどの部分が欠損しても筋ジストロフィーが発症する．それに対して，ラミニンと強く相互作用する糖鎖部分を別途化学的に合成し，ジストログリカンと結合させることで，ラミニンと細胞骨格とを架橋することができると考えた．その最初の段階として，マトリグリカンの精密化学合成により，”Xylα1-3GlcAβ1-3Xylα1-3GlcAβ”を得ることとした．

既知の GlcA 誘導体(**1**)を 3 工程で 3 位水酸基遊離の **2** とした．続いて，2 位に p-メトキシフェニルエーテルまたは 2-ナフチルメチルエーテルを持つ D-キシロースのチオグリコシド(**3**)と **2** を，DDQ を用いて混合アセタールとしたのち，分子内で縮合することで，相当する Xyl-GlcA 二糖(**4**)をα選択的に合成することができた．続いて，**4** の Xyl 残基の保護基を除去し，得られたトリオール(**5**)の 2,4 位水酸基を選択的にアシル保護して 3 位水酸基遊離の二糖受容体(**6**)を合成した．他方，**6** の水酸基を他の保護基で保護することで二糖供与体(**7**)へ誘導した．これら **6** と **7** を互いに縮合し，β結合した四糖保護体を得た．最後に全ての保護基を除去して，標的化合物”Xylα1-3GlcAβ1-3Xylα1-3GlcAβ”を位置選択的かつ立体選択的に合成することに成功した．

Oligosaccharide, Matriglycan, Glycosylation

発表責任者：田村純一（jtamura@tottori-u.ac.jp）

講演番号：3B04p04
講演日時：3 月 27 日 14:23～ 総合学習プラザ B04 会場

O-マンノシルグリカン部分構造，Xyl α 1-3GlcA β 1-3Xyl β 1-4Rbo の合成

Synthesis of partial structure of *O*-mannosylglycan, Xylα1-3GlcAß1-3Xylß1-4Rbo

○田村 敬裕[1]、大村 優華[2]、田村 純一[1,2] ([1]鳥取大連農、[2]鳥取大院農)
○Takahiro TAMURA[1], Yuka OMURA[2], Jun-ichi TAMURA[1,2] ([1]United Grad. School Agric. Sci., Tottori Univ., [2]Dep. Agric., Grad. School Sust. Sci., Tottori Univ.)

O-マンノシルグリカンは骨格筋から発見されたジストログリカンを修飾する糖鎖である．*O*-マンノシルグリカンは細胞外マトリックスであるラミニンと細胞骨格とを架橋することにより，筋細胞膜を安定化させる役割を担っており，その非還元側に位置する Xyl（xylose）と GlcA（glucuronic acid）からなる繰返し多糖がラミニンと直接相互作用を持つ．

筋ジストロフィー症は細胞外マトリックスであるラミニンと細胞骨格との連携が破綻することにより発症する疾患である．*O*-マンノシルグリカンの欠損は，筋ジストロフィー症の発症原因の一つである．*O*-マンノシルグリカンの形成は還元側から逐次相当する糖転移酵素により行われるため，どの部分が欠損しても，筋ジストロフィーが発症する．それに対して，ラミニンと強く相互作用する糖鎖部分を別途，酵素的に合成しジストログリカンと結合させることで，ラミニンと細胞骨格とを架橋することができると考えた．そのため，非還元末端側を形成する糖転移酵素である LARGE や B4GAT1 の糖鎖伸長のプライマー構造を決定することが求められ，今回は酵素的に合成の困難な Xyl-Rbo(ribitol)構造を含む，”Xylα1-3GlcAβ1-4Xylβ1-4Rbo”を標的化合物とした．

既知の GlcA 誘導体(**1**)を 3 工程で 3 位水酸基遊離の(**2**)とした．また，既知である Xyl 誘導体(**3**)から 2 工程で単糖供与体(**4**)を合成した．これらを DDQ を用いて混合アセタールとしたのちに，分子内縮合することで Xyl-GlcA 二糖(**5**)をα選択的に合成することができた．得られた二糖を酸性条件下で加水分解し，遊離となった水酸基を保護して二糖(**6**)を得た．こののち，2 工程で相当するイミデートへと誘導し，二糖供与体(**7**)を得た．他方，以前我々が合成した Xyl-Rbo 二糖(**8**)*から 2 工程で 4 位水酸基遊離の **9** へと誘導し，これを **7** と縮合することで，四糖(**10**)を合成することができた．最後に全ての保護基を除去し，標的化合物” Xylα1-3GlcAβ1-4Xylβ1-4Rbo”を得ることができた．

*T. Tamura and J. Tamura, *Tetrahedron Lett*., **60**, *2019*, 465-468.

Oligosaccharide, Mannosyl glycan, Glycosylation

発表責任者：田村純一（jtamura@tottori-u.ac.jp）

講演番号：3B04p05
講演日時：3 月 27 日 14:34～ 総合学習プラザ B04 会場

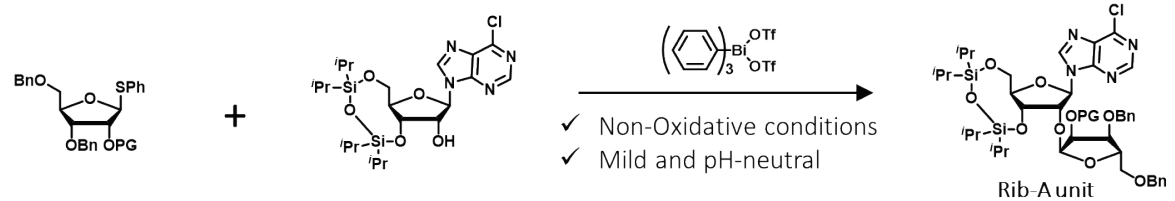
ポリ ADP リボース合成に向けた実用的リボシルアデノシンユニット構築法の開発

Development of a practical method for the preparation of the ribosyl adenosine unit toward poly ADP ribose synthesis

○萩野 瑠衣[1]、茂崎 恵太[1]、石田 秀治[1,2]、安藤 弘宗[2]、田中 秀則[2]（[1]岐阜大・応用生物、[2]岐阜大・G-CHAIN）
○Rui HAGINO[1], Keita MOZAKI[1], Hideharu ISHIDA[1,2], Hiromune ANDO[2], Hidenori TANAKA[2] ([1]Gifu Univ., [2]G-CHAIN)

【背景・目的】ポリ ADP リボース（PAR）付加はタンパク質の翻訳後修飾（PTM）の一つであり、DNA 修復、アポトーシスや転写など、様々な生命現象への関与が報告されている。PAR は PAR ポリメラーゼにより合成される生体高分子であり、モノマーである ADP リボース（ADPr）のアデノシン 2'位水酸基と末端リボフラノースとの *O*-1,2-*cis*-グリコシド結合形成により ADPr 鎖が伸長される。PAR 付加の重要性が細胞レベルで近年明らかになってきたが、均一な PAR 分子の入手が困難であるため、本 PTM の分子レベル機能解明は立ち遅れている。そのため、化学合成による構造明確な PAR 分子の供給が望まれている。最近、Filippov らが PAR 合成研究を精力的に行っており（Filippov *et al.* ACIE **2015**）、リボシルアデノシン（Rib-A）ユニットを鍵合成中間体として採用している。しかしながら、既知の Rib-A ユニット合成法は収率及び合成効率に改善の余地があった。そこで、本研究では Rib-A ユニットの効率合成法の確立を目的とした。Rib-A ユニット合成における課題は、①立体選択的 *O*-1,2-*cis*-グリコシド結合形成、②グリコシル化反応でのプリン塩基の求核攻撃による *N*-グリコシド体の副生、③糖供与体活性化で用いる求電子剤のプリン塩基への付加、④酸性条件によるプリン塩基の脱離が挙げられる。上述の課題を克服するために、我々はアデノシン 6 位アミノ基を塩素原子に置換した受容体と中性かつ非酸化的なチオグリコシド活性化法を利用した。加えて、リボフラノース供与体 2 位水酸基の適切な保護基を検討したので報告する。

【方法・結果】リボフラノース供与体として容易に調製可能なチオグリコシド体を採用した。チオグリコシド活性化の常法である NIS-TfOH 法では受容体のプリン塩基で *N*-ヨウ素化が進行する可能性があったため、本研究では $Ph_3Bi(OTf)_2$ 活性化剤を利用した（Pohl *et al.* ACIE **2013**）。 中性かつ非酸化的にチオグリコシドを活性化できる本試薬を用いてグリコシル化反応を行ったところ、予想通りプリン塩基での副反応は起こらず、目的とする *O*-グリコシド体が得られた。リボフラノース供与体 2 位水酸基の保護基としてアリル基、ベンジル基、2-ナフチルメチル基を検討した結果、2 位の保護基がグリコシル化反応の収率及び立体選択性に影響することが明らかとなった。



O-Ribosylation, Ribosyl adenosine unit, Poly ADP ribose

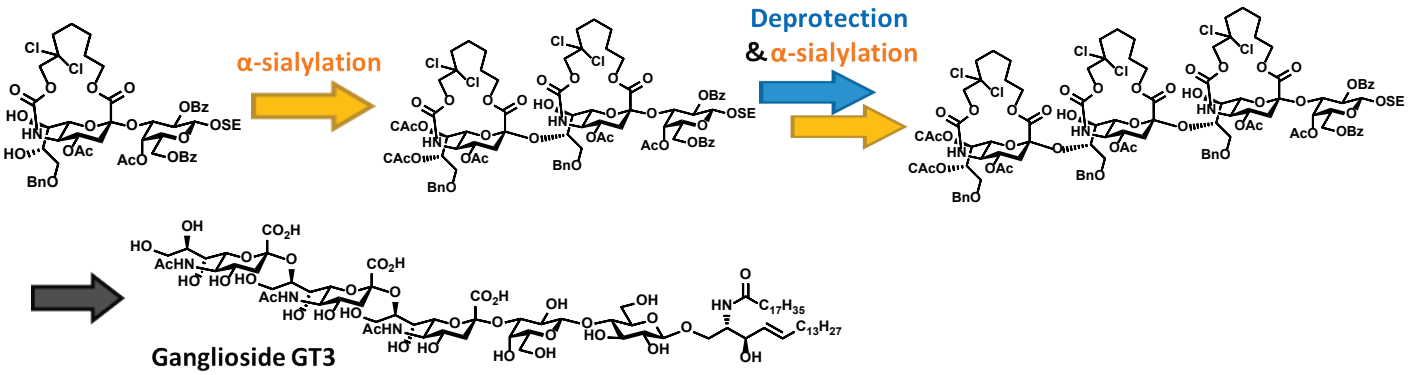
講演番号：3B04p06
講演日時：3 月 27 日 14:45～ 総合学習プラザ B04 会場

二環性シアル酸を用いた c 系列ガングリオシドの合成

Synthesis of c-series ganglioside by using bicyclic sialic acids

○武馬 弘幸[1]、河村 奈緒子[2]、田中 秀則[2]、今村 彰宏[1]、石田 秀治[1,2]、安藤 弘宗[2]([1]岐阜大・応用生物、[2]岐阜大・G-CHAIN)
○Hiroyuki BUMA[1], Naoko KOMURA[2], Hidenori TANAKA[2], Akihiro IMAMURA[1], Hideharu ISHIDA[1,2], Hiromune ANDO[2] ([1]Gifu Univ., [2]G-CHAIN)

【目的】c 系列ガングリオシドは、ヒトにおいては古くより胎児の脳組織に一過性の発現が確認されており、神経細胞の分化・増殖にも関与していることから、特に神経系における機能が注目されている。c 系列ガングリオシドの詳しい機能解明には純度の高い標品が求められるが、生体微量成分であり化学合成による安定的な供給が必要とされる。しかし、α(2,8)結合のシアル酸三量体の構築が困難であるため、非常に難しい合成標的とされてきた。そこで本研究では、グリコシド化反応において完全な立体選択性示す二環性シアル酸[1]を用いた新たな合成法を考案し、ガングリオシド GT3 の全合成を目指すこととした。
【方法及び結果】α(2,8)結合の合成が困難な理由は、シアル酸 8 位水酸基の低反応性による。この課題に対して、これまでに 1,5-ラクタム型受容体[2]が開発され、5 位アミド基との水素結合の解消により 8 位水酸基の求核性が向上することが報告されている。同様に本研究で用いる二環性シアル酸の 8 位水酸基も反応性が高いことが示されている。そこで本研究では 7,8 位水酸基をクロロアセチル基で保護した二環性供与体を用いる戦略を立案した。まず、この供与体とガラクトース受容体のグリコシド化を行い、収率 80%にてシアリルガラクトースを得た。その後、受容体への変換とα-シアロシド化を繰り返すことで三量体の合成を試みた。その結果、二量体構築のグリコシド化反応では収率 71%にて、三量体構築のグリコシド化反応では収率 48%にて目的化合物を得ることが出来、二環性シアル酸の 8 位水酸基が良好な反応性であることが示された。続いて、トリシアリルガラクトースを供与体へと導いた後、Glc-Cer の導入を行い、ガングリオシド GT3 への誘導を試みた。



[1] N. Komura *et al. Science* **2019**, *364*, 677-680.
[2] H. Ando *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6759-6763.

sialic acid, α-sialylation, c-series ganglioside

発表責任者：安藤弘宗（hando@gifu-u.ac.jp）

講演番号：3B04p07
講演日時：3 月 27 日 15:06～ 総合学習プラザ B04 会場

脂質ラフトの動態解明に向けたラクト系スフィンゴ糖脂質プローブの合成

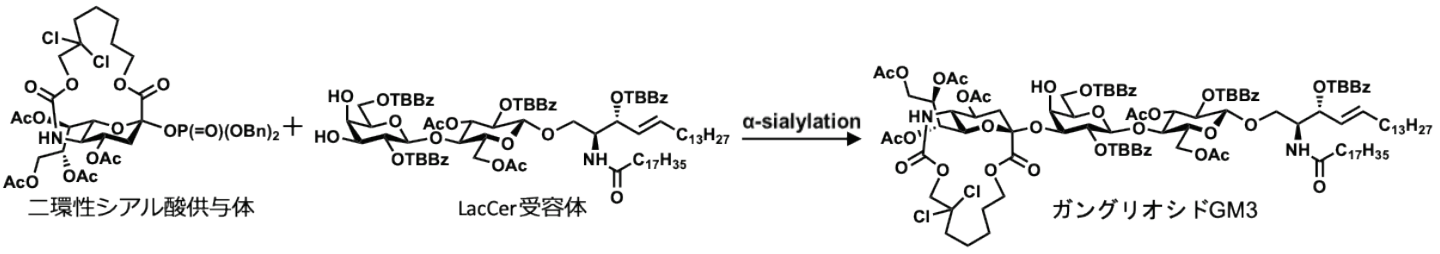
Synthesis of lacto-series glycosphingolipid probes for the elucidation of lipid raft dynamics

○高橋 舞菜[1]、白崎 淳哉[2]、河村 奈緒子[2]、田中 秀則[2]、今村 彰宏[1]、石田 秀治[1,2]、安藤 弘宗[2]（[1]岐阜大・応用生物、[2]岐阜大・G-CHAIN）
○Maina TAKAHASHI[1], Junya SHIRASAKI[2], Naoko KOMURA[2], Hienori TANAKA[2], Akihiro IMAMURA[1], Hideharu ISHIDA[1,2], Hiromune ANDO[2] ([1]Dept. of Applied Bioorganic Chemistry, Gifu Univ., [2]G-CHAIN）

【背景・目的】細胞膜表面に存在する脂質ラフトは、シグナル伝達などの様々な生命現象への関与が知られているが、詳細な形成機構や機能は未解明である。そのため、主要なラフト構成分子であるスフィンゴ糖脂質を 1 分子観察し、動態解明する必要がある。先行研究より、ガングリオ系やグロボ系スフィンゴ糖脂質において、糖鎖構造の違いがラフト関連蛋白質や糖脂質同士の相互作用に影響を与えることが示唆された[1]。そこで本研究では、ラフトでの動態が未解明であるラクト系スフィンゴ糖脂質を新たな標的とした。すなわち、ラクト系スフィンゴ糖脂質の観察用蛍光プローブの開発と、膜分子間相互作用の解明を目的とする。さらに、シアル酸含有スフィンゴ糖脂質(ガングリオシド)の合成においては、効率化を狙い新規合成アプローチを試みることとした。

【方法・結果】ラクト系スフィンゴ糖脂質のラクトテトラオシルセラミド(Lc$_4$Cer)とシアリルラクトテトラオシルセラミド(NeuAcLc$_4$Cer)の蛍光プローブを標的化合物とした。先行研究より、蛍光色素導入位置は、糖脂質本来の性質を損なわないよう糖鎖末端とした。そして、蛍光色素は化学的に不安定であるため、合成の最終段階でアミド化により導入する合成経路を立案した。まずは、蛍光 Lc$_4$Cer の合成に向け、Gal3 位水酸基に末端が TFA アミド基のリンカーを結合させた供与体を合成した。この Gal 供与体と二糖受容体をグリコシド化に供し、良好な収率で三糖骨格を得た。その後、三糖を供与体へと誘導し、Glc-Cer カセットアプローチを用い、高収率にて糖脂質骨格を構築した。最後に、保護基の除去、蛍光色素(ATTO594)導入を行い、蛍光 Lc$_4$Cer の合成を達成した。

続いて、NeuAcLc$_4$Cer 合成に向けたガングリオシド新規合成法を試みた。従来の合成法では、シアリル化の立体制御が課題であった。そこで、近年我々が開発した完全な立体選択的シアリル化反応[2]を取り入れ、糖脂質受容体を直接シアリル化する効率的合成法の確立を目指した。まずは、二環性シアル酸供与体と LacCer 受容体を用い、ガングリオシド GM3 の合成検討を行ったので、報告する。



[1] N. Komura *et al*., *Nat. Chem. Biol.* **2016**, *12*, 402–410. [2] N. Komura *et al*., *Science* **2019**, *364*, 677–680.

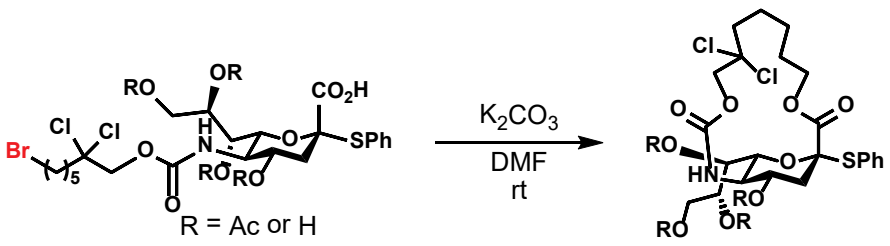
lacto-series glycosphingolipid, lipid raft, sialic acid

発表責任者：安藤弘宗（hando@gifu-u.ac.jp）

講演番号：3B04p08
講演日時：3 月 27 日 15:17～ 総合学習プラザ B04 会場

二環性シアル酸供与体の効率的合成法の検討
Investigation of an efficient synthesis of bicyclic sialyl donors
○吉田 裕香子[1]、田中 秀則[2]、今村 彰宏[1]、石田 秀治[1,2]、河村 奈緒子[2]、安藤 弘宗[2]([1]岐阜大・応用生物、[2]岐阜大・G-CHAIN)
○Yukako YOSHIDA[1], Hidenori TANAKA[2], Akihiro IMAMURA[1], Hideharu ISHIDA[1,2], Naoko KOMURA[2], Hiromune ANDO[2] ([1]Gifu Univ, [2]G-CHAIN)

【目的】シアロ糖鎖は細胞接着、細胞分化等の生命現象だけでなく、感染・疾患にも関与する重要な生体分子である。これらの機能を明らかにするためには、シアロ糖鎖の化学合成が必要であるが、シアル酸をα結合によりグリコシド化する手法の開発が長年の課題であった。ごく最近、我々は、大環状二環性シアル酸供与体を用いた新たなグリコシド化法を考案し、本手法により、α-シアロシドのみを高収率にて構築可能であることを証明した[1]。本手法にはシアル酸の C1 位と C5 位をアルキル鎖で架橋した、二環性供与体が必要であるが、その合成は多段階（9 段階）を要し、総収率も低い（31%）ことから、改善の余地を残していた。そこで、本研究では、二環性シアル酸供与体の合成効率向上を目的に、新たな合成アプローチを検討した。
【方法・結果】二環性シアル酸供与体の合成において鍵となる反応は、マクロラクトン化反応である。既存の合成法では、架橋部末端の水酸基と C1 位カルボキシル基を光延反応に供することによって、良好な収率で環化体を得た。しかしながら、過剰量の試薬を要するため、特に大量合成においては残存した試薬との単離が困難である点が課題であった。加えて、既存の環化法は、反応点以外の水酸基を予め保護する必要があるため、この制約の解消も望まれる。従って、二環性シアル酸供与体の合成効率向上のためには、工程数削減と、最適なマクロラクトン化法の確立が必要である。まずは、既存のテトラアセテート供与体を標的に、新たな合成法を試みた。α-SPh 誘導体を原料とし、アセトアミド及び全てのエステルをアルカリ加水分解した。その後、末端の水酸基を TBS 基で保護した架橋部を C5 位アミノ基へカーバメート結合により導入し、シアル酸の水酸基をアセチル化した。これにより、環化前駆体を 1 段階削減した経路にて合成した。続いて、1 位カルボキシル基を混合酸無水物の生成により活性化し、マクロラクトン化を試みた。しかしながら、種々の検討の結果、環化体は得られなかった。これらの結果を受け、次にカルボキシラートアニオンを求核種とした環化のアプローチを試みた。即ち、架橋部末端に臭素を導入したシアル酸テトラアセテート体を別途調製し、K_2CO_3 存在下、DMF 溶媒中でマクロラクトン化反応を試みた。その結果、非常に高収率にて環化体を得ることに成功し、過剰の試薬を必要としない、極めて単純なマクロラクトン化法を確立した。本手法は遊離の水酸基を有する基質においても適用可能と考えられる。そこで、合成の幅を更に拡張するため、全ての水酸基が遊離のシアル酸を用いて環化反応を検討した。



[1] N. Komura *et al*. *Science*, **2019**, *364*, 677-680.

sialic acid, α-sialylation, glycosylation

発表責任者：河村奈緒子（komura@gifu-u.ac.jp）

講演番号：3B04p09
講演日時：3 月 27 日 15:28～ 総合学習プラザ B04 会場

完全なα選択的 Kdo グリコシド化法の開発研究

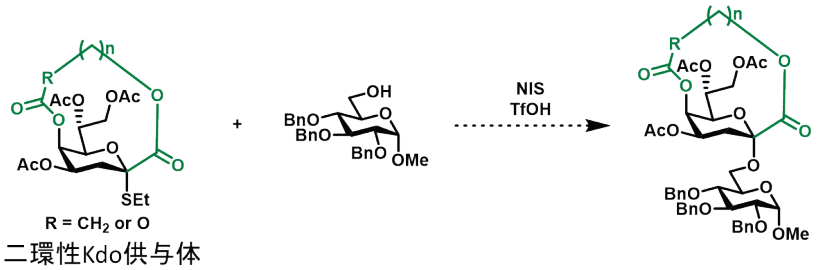
Study on a method for fully α-selective glycosidation of Kdo

○浜島 将伍[1]、河村 奈緒子[2]、田中 秀則[2]、今村 彰宏[1]、石田 秀治[1,2]、一柳 剛[3]、安藤 弘宗[2]([1]岐阜大・応用生物、[2]岐阜大・G-CHAIN、[3]鳥取大農)
○Shogo HAMAJIMA[1], Naoko KOMURA[2], Hidenori TANAKA[2], Akihiro IMAMURA[1], Hideharu ISHIDA[1,2], Tsuyoshi ICHIYANAGI[3], Hiromune ANDO[2] ([1]Gifu-Univ., [2]G-CHAIN, [3]Tottori Univ.)

【目的】3-Deoxy-D-*mannno*-oct-2-ulosonic acid (Kdo) は、グラム陰性菌、植物、藻類などの哺乳類以外の生物が有するケトアルドン酸の一種である。この糖は、グラム陰性菌が有するリポ多糖の内部コア領域に存在し、この領域の糖鎖がもつ免疫学的な作用の観点などから近年注目されている。これらのKdo含有糖鎖の生理学的な機能の解明には、化学的合成による研究試料の安定的供給が肝要である。

天然に存在するKdoグリコシドはそのほとんどがα-グリコシドであるため、これまでに様々なα選択的Kdoグリコシド化法の開発が行われてきた。しかし、従来法には基質や反応条件により立体選択性にばらつきがあるという共通の課題が残されている。そこで本研究では、完全なα選択的Kdoグリコシド化法の開発を目的とした。

【方法・結果】Kdo とシアル酸の構造的な類似点から、本研究では当研究室で近年確立した完全なα選択的シアロシド化法である「二環性シアル酸供与体」を用いる方法[1]を Kdo に応用した「二環性 Kdo 供与体」の構造が縮合反応に与える影響を検証することとした。まず初めに、大員環の員数が目的物の収率に大きく影響することが想定されたため、大員環部分として 14-17 員環を有する二環性 Kdo 供与体を合成し、グリコシド化の比較検討を行った。その結果、C5 位がエステル架橋された二環性 Kdo 供与体を用いた場合、いずれの員数の二環性 Kdo 供与体を用いた反応においても、得られたグリコシドは目的とするα-グリコシドのみであった。また、大員環の員数が大きいほど供与体の活性化が起こりやすく、より低温下においても反応が進行し、収率良く目的物が得られるという傾向が概ねみられた。次に、C5 位の架橋構造を二環性シアル酸供与体に倣い、エステル構造からカーボネート構造へと変更した二環性 Kdo 供与体の合成を行い、グリコシド化の検討を行った。その結果も併せて報告する。



[1] Komura, N. *et al. Science* **2019**, *364*, 677-680.

Kdo, α-glycosidation, bridgehead cation

発表責任者：安藤弘宗（hando@gifu-u.ac.jp）

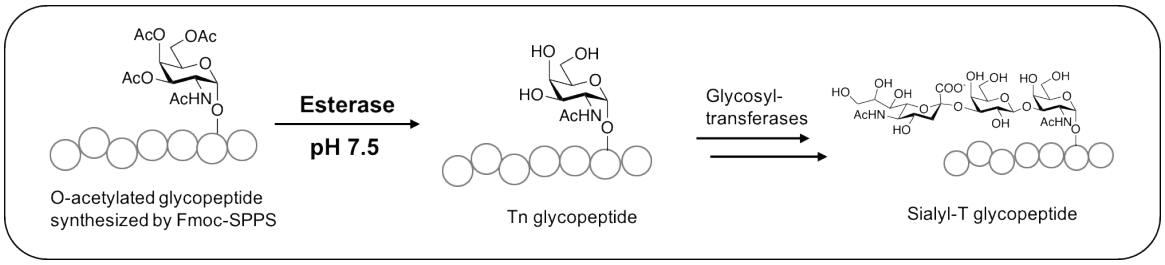
講演番号：3B04p10
講演日時：3 月 27 日 15:39～ 総合学習プラザ B04 会場

糖ペプチド合成を志向したエステラーゼによる脱アセチル化反応
Deacetylation with Esterase for Glycopeptide Synthesis

○吉村 弥生[1,2]、長島 生[3]、横江 貴之[3]、清水 弘樹[3]、岸本 利光[1]、千葉 靖典[2] ([1](一財) バイオインダストリー協会、[2]産総研・創薬基盤、[3]産総研・生物プロセス)
○ Yayoi YOSHIMURA[1,2], Izuru NAGASHIMA[3], Takayuki YOKOE[3], Hiroki SHIMIZU[3], Toshimitsu KISHIMOTO[1], Yasunori CHIBA[2] ([1]JBA, [2]BRD, AIST, [3]BRI, AIST)

タンパク質を修飾する糖鎖の生物学的機能を分子レベルで解明するべく、糖ペプチドは糖タンパク質の部分構造として活用されてきたとともに、糖ペプチドの合成法は化学法、酵素法両手法で開発されてきた。さらに、化学法により合成した糖ペプチドに対して糖転移酵素や糖加水分解酵素を作用させ糖鎖構造を変換する化学-酵素法は、シアル酸修飾された糖ペプチドの合成には特に有効な合成手法として発展してきた。糖ペプチドの化学合成は主に Fmoc 法がとられており、*O*-結合型糖ペプチドを合成する際には糖残基上の水酸基が Ac 基で保護された Fmoc 糖アミノ酸 （例： Fmoc-Ser[GalNAc(Ac)$_3$-α]-OH)が用いられている。糖水酸基の Ac 基による保護は、強酸処理による合成用樹脂からの糖ペプチド鎖切り出しやアミノ酸側鎖保護基の除去において、糖残基がペプチド鎖から脱離するのを防ぐ効果がある。一方で、Ac 基の除去には樹脂から切り出された糖ペプチドを塩基処理する必要があり、糖のβ脱離やペプチド鎖のエピメリ化といった副反応を引き起こす可能性がある。本研究では、糖ペプチド合成での Ac 基除去反応における副反応を防ぐ手法として中性条件下で反応が可能なエステラーゼの応用を検討した。

エステラーゼは市販品数種を入手し、Fmoc-Ser[GalNAc(Ac)$_3$-α]-OH をモデル基質としてAc基の除去をpH 7.5の中性Buffer中で検討した結果、細菌由来のエステラーゼ（BsE）が高い反応性を示した。市販のBsEをAc基で保護されたGalNAc糖ペプチドを基質として脱Ac化反応に供したところ、混入しているペプチダーゼによりペプチド鎖の分解が生じたため、純度の高いBsEを得るべく、BsEの大腸菌による生産系を構築した。新たに調製したBsEを糖ペプチドに対する反応に利用したところ、ペプチド鎖の分解は確認されず脱Ac化反応が完結した。さらに同じ系内に糖転移酵素、糖ヌクレオチドを添加することで、精製なしに連続的に脱Ac化反応と糖鎖伸張反応が可能であることを見出した。本発表ではその反応例としてSialyl-Tで修飾されたMUC1糖ペプチドの合成を報告する。



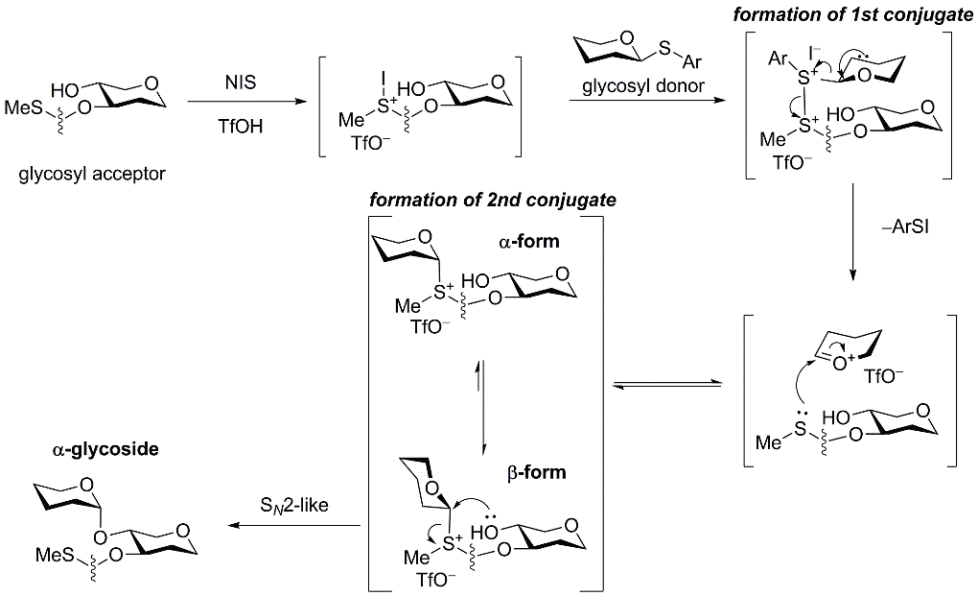
glycopeptide, chemoenzymatic synthesis, esterase

発表責任者：吉村弥生（yoshimura.yayoi@aist.go.jp）

講演番号：3B04p11
講演日時：3 月 27 日 15:50～ 総合学習プラザ B04 会場

チオエーテル基を用いた立体選択的グリコシル化の反応機構に関する研究
Mechanistic study of thioether-promoted stereoselective glycosylation
須田 栞[1]、前川 丈武[1]、杉橋 葵[1]、西田 芳弘[1,2]、○土肥 博史[1,2] ([1]千葉大園芸、[2]千葉大分子キラリティー研究センター)
Shiori Suda[1], Hiromu Maegawa[1], Aoi Sugihashi[1], Yoshihiro Nishida[1,2], ○Hirofumi Dohi[1,2] ([1]Chiba Univ., [2]MCRC, Chiba Univ.)

我々は以前に糖受容体の反応点近傍にチオエーテルをもつ保護基を導入することにより、グリコシル化における 1,2-*cis* 選択性が大幅に向上することを報告した。しかし、その選択性が発現する詳細なメカニズムは未だ不明である。本研究では、チオエーテル基による 1,2-*cis* 選択的グリコシル化の反応メカニズムの解明を目的として、メチルチオエーテル型保護基を反応点近傍に導入した様々な構造を持つ糖受容体を用いてグリコシル化における立体選択性を評価した。単純な構造を持つエチレングリコールの一つのアルコールにベンゾイル基、*o,m* もしくは *p* 位にメチルチオ基を持つベンゾイル基を導入したものを糖受容体をとして、*per-O*-ベンジルフェニルチオグリコシドとグリコシル化反応を行った。その結果、チオエーテル基を有するすべての糖受容体は高い 1,2-*cis* 選択性が発現し、特に *o*-（メチルチオ）ベンゾイル基を導入した場合に最も高い 1,2-*cis* 選択性を示した。また、その選択性は環状アルコールを糖受容体として用いた場合に比べて低かったことから、環構造内にチオエーテル基とアルコールが配置されることで立体選択性が向上することが示唆された。続いて、活性化剤と糖受容体をあらかじめ混合した後に糖供与体を加えたところ、1,2-*cis* 選択性が大幅に向上した。さらに、α および β 型の糖供与体をそれぞれ反応に供したところ、全く同じ立体選択性を示したことから、糖供与体の絶対配置は選択性に関与しないことがわかった。以上の結果から、ヨードカチオンによって糖受容体に生じたスルホニウムイオンが糖供与体を活性化し、生じたオキソカルベニウムイオン中間体に糖受容体の硫黄原子が付加することで形成される β 型複合体に対してアルコールが S_N2 様に反応すると予想した。また、本法を *Shigella flexneri1a* の細胞表層由来 O 抗原型多糖の 5 糖ユニットの化学合成に応用した。



Glycosylation, Oligosaccharides, Reaction mechanism

発表責任者：土肥　博史（hdohi@faculty.chiba-u.jp）

講演番号：3B04p12
講演日時：3 月 27 日 16:01～ 総合学習プラザ B04 会場

アラビナン分解酵素の機能解析に向けた D-アラビノフラノシド含有プローブの合成研究

Synthetic study on D-arabinofuranosylated probes for the functional analysis of mycobacterial arabinan-degradating enzymes

○石渡 明弘、伊藤 幸成（理研）
○Akihiro ISHIWATA, Yukishige ITO (RIKEN)

結核菌などの抗酸菌類に含まれる D-アラビノフラノースからなるアラビナンは、ミコリルアラビノガラクタン-ペプチドグリカン複合体や、リポアラビノマンナンなどの細胞壁成分に含まれる多糖である。α-1,3 分岐構造及び非還元末端と β-1,2 キャッピング構造された構造を有し、α-1,5 結合を主鎖に持つ多糖のアラビナンは、質量分析にて 31 糖まで確認されている。結核菌は多剤耐性菌が大きな問題で、細胞壁糖鎖生合成は新規抗菌剤のターゲットとして重要視されている。一方、結核菌のアラビナンを分解するエンド型加水分解酵素 [1] が見いだされているが、すでに当研究室ではその基質認識や切断部位の解析のための天然構造を有する合成基質の供給をすすめている。今回、結核菌アラビナン分解酵素解析のための、D-アラビノフラノシド構造を有する各種チオグリコシドプローブを合成したので報告する。

エンド型加水分解酵素によって、主鎖 α-1,5 結合の内部が切断され、また、エキソ型加水分解酵素によって、主鎖 α-1,5 結合の非還元末端側から順次切断されていくが、いずれの酵素によっても切断されないプローブとしてα-チオアラビノフラノシドを調製する計画とした。オリゴ糖合成で用いた糖供与体合成 [2–5] を参考に、D-アラビノフラノシド構造を有するチオグリコシドを調整した。
阻害活性についても検討中であり、合わせて報告したい。

参考文献： [1] Xin, Y. st al., *et al*., *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1473*, 267. [2] Ishiwata, A, et al. *Bioorg. Med. Chem*. **2006**, *14*, 3049. [3] Ishiwata, A, et al. *Org. Lett.* **2006**, *46*, 3521. [4] Ishiwata, A, et al., *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 4250. [5] Ishiwata, A, Ito, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 2275.

arabinan, mycobacteria, synthesis

講演番号：3B04p13
講演日時：3 月 27 日 16:21～ 総合学習プラザ B04 会場

位置選択的グリコシル化と水酸基の立体反転を基軸としたアスパラギン結合型糖鎖の合成

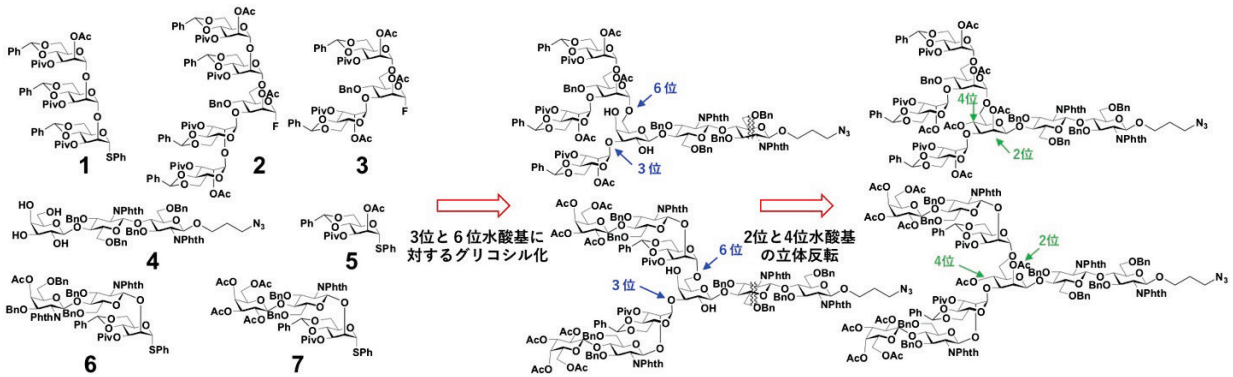
Synthesis of N-Glycans using regioselective glycosylation and simultaneous inversion reaction of stereochemistry of hydroxyl groups

○松尾 一郎、佐野 加苗、永田 光穂、高垣 智迪（群馬大院理工）
○Ichiro Matsuo, Kanae Sano, Mitsuo Nagata, Tomomichi Takagaki (Gunma Univ)

【背景】我々は、アスパラギン結合（*N*-）型糖鎖を効率的かつ系統的に合成するために、4 ヶ所遊離の水酸基を有するガラクトース残基の 3, 6 位に対する位置および立体選択的グリコシル化反応と、結果として得られる糖鎖の分岐部分に相当するガラクトース残基上の 2, 4 位水酸基の立体をガラクト配置からマンノ配置へと反転、天然型の糖鎖へと導く糖鎖合成法を実践している。本発表では、我々の糖鎖合成法によって高マンノース型糖鎖 11 糖、 7 糖および複合型糖鎖 9 糖の合成を行った結果について報告する。

【結果】高マンノース型糖鎖の合成は、非還元末端部分を構成するオリゴ糖ブロック（α1-2 結合したマンノース繰り返し構造を有する直鎖型３糖（1)、分岐構造を有する５糖ブロック(2)および３糖ブロック(3)）を調製した。そして、ガラクトース残基を有するキトビオース誘導体３糖（４）の３位水酸基に対する直鎖型３糖をグリコシル化、続く６位水酸基に対して選択的に分岐型５糖をカップリングすることで 11 糖骨格を構築した。一方、単糖誘導体のガラクトース残基３位へのカップリング、続く分岐型３糖の導入により７糖を合成した。得られた 11 糖および７糖のガラクトース残基上の水酸基を Tf 化、テトラブチルアンモニウムアセテートを反応させることで天然型の立体配置を有する高マンノース型糖鎖 11 糖および７糖へと導いた。

一方、複合型糖鎖の合成は、LacdiNAc 構造を有する３糖ブロックやラクトサミン構造を有する３糖ブロックを合成、ガラクトース残基上の 3, 6 位水酸基に対する２箇所同時のグリコシル化反応による９糖骨格の１段階構築や、３位水酸基への選択的グリコシル化、続く６位水酸基に対するグリコシル化により、非還元末端部分に異なる糖鎖構造を有する複合型糖鎖骨格が構築できることを確認した。



N-Glycan, Glycosylation, Inversion reaction

発表責任者：松尾一郎（matsuo@gunma-u.ac.jp）

講演番号：3B04p14
講演日時：3 月 27 日 16:32～ 総合学習プラザ B04 会場

ポリラクトサミンの化学的構築に向けた合成研究

Study on chemical synthesis of polylactosamine

○細川 基樹[1]、今村 彰宏[1]、石田 秀治[1,2] ([1]岐阜大院・自然科技、[2]岐阜大・G-CHAIN)
○Motoki HOSOKAWA[1], Akihiro IMAMURA[1], Hideharu ISHIDA[1,2] ([1]Gifu Univ. Graduate School of Natural Science and Technology, [2]Gifu Univ. G-CHAIN)

【目的】多糖は単糖が多数重合した糖鎖のことを指す。中でも、複数の単糖で構成されるヘテロ多糖は生体内に広く見られ、様々な生命現象に深く関与していることが知られている。しかし、その詳細な作用機序は未解明である。ヘテロ多糖の生理機能を分子レベルで解明するためには、構造が明確かつ十分な鎖長を持つ糖鎖の入手が不可欠であるが、これを天然から抽出することは極めて困難である。そのため、化学合成による創出が重要となる。

我々は、ヘテロ多糖の中でも、ガラクトース (Gal) と *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) からなる多糖ポリラクトサミンに注目した。ポリラクトサミンは、多彩な生理活性を有する糖脂質や糖タンパク質上に広く見られる重要な多糖であるが、その構造活性相関研究は進んでいない。これは、構造均一なポリラクトサミンの化学合成が極めて困難であることが一因である。そこで本研究では、化学合成による長大なポリラクトサミン骨格の構築を目指し、研究を行うこととした。

【方法・結果】長大な糖鎖を構築する上で課題となるのは、1) グリコシル化反応の効率、2) 多糖の有機溶媒に対する溶解性の低下、3) 均一な糖鎖の単離・精製、である。本研究では、1)および 2)の課題に対し、保護基として、嵩高く脂溶性の高い DTBS (di-*tert*-butylsilylene) 基および *t*-BuBn (*tert*-butylbenzyl) 基を用いることとした。そして、これらを導入した糖鎖ブロックを設計し、グリコシル化反応を試みることとした。また、3)の課題に対しては、ブロック合成による分子量差を利用したサイズ排除カラムの利用およびフルオラスケミストリーによる分離 (FSPE 法)を検討することとした。

設計した糖鎖ブロックの合成は、市販の Gal と GlcN 塩酸塩から行い、Gal の 4, 6 位に DTBS 基を、GlcNAc の 6 位に *t*-BuBn 基を導入したラクトサミン二糖を調製した。次に、これを二糖供与体、受容体へと誘導し、グリコシル化させることで四糖ブロックを合成した。さらに、これを六糖まで伸長した。本研究ではこれを鍵化合物として、多糖骨格構築のブロック合成に利用した。また、アグリコンとしてフルオラスタグを導入することで還元末端となる四糖の合成を行った。本発表では、上述した糖鎖ブロックを用いたグリコシル化反応の検討およびポリラクトサミンの骨格形成の結果について報告する。

Polylactosamine, Polysaccharide, Glycosylation

講演番号：3B04p15
講演日時：3 月 27 日 16:43～ 総合学習プラザ B04 会場

圧力変化に対する DPPC 二分子膜流動性へ及ぼす一価不飽和脂肪酸の影響

Effects of monounsaturated fatty acid on the biomembrane fluidity in pressure change

○上野 弘人、西本 真琴（和歌山高専）
○Hiroto UENO, Makoto Nishimoto (NITWC)

【背景・目的】生体膜を構成しているリン脂質は、一般に多種類の飽和リン脂質や不飽和リン脂質からなることが知られている。生物は生息する環境条件に合わせた生体膜組成を持つことで、膜流動性を保ち、生命を維持している。例えば、低温や高圧のかかる海底などは、生物にとって極めて過酷な環境である。そのような環境では、膜流動性は低下し、生命維持が難しくなる。しかし、そこで生息する生物は、生体膜中のリン脂質から遊離した不飽和脂肪酸により、膜流動性を上昇させ、その環境に適応していると考えられている。これまで温度変化に対して、不飽和アシル鎖を持つリン脂質の構造が膜流動性に与える影響は調査されている。しかし、圧力変化に対しての研究は少なく、リン脂質の不飽和結合が生体膜に及ぼす影響については十分に理解されていない。

そこで本研究では、人工モデル膜である 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC)を用い、圧力変化に対して、不飽和アシル鎖を 2 本有する 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC)が膜流動性に与える影響を時間分解蛍光異方性測定により明らかにする。

【実験方法】DPPC 水溶液 1.0 mmol kg^{-1} に、DOPC を所定の濃度(0─300 μmol kg^{-1})となるように混合し、Bangham 法によりリポソーム溶液を調製した。蛍光プローブには、リン脂質の極性基付近に局在する 1-[4-(trimethylamine)phenyl]-6-phenyl-1,3,5-hexatriene (TMA-DPH)とリン脂質の疎水基付近に局在する 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH)を用いた。

時間分解蛍光異方性測定は、測定で得られた異方性値からオーダーパラメーター*S* や回転拡散係数 D_w といった、脂質分子間の距離及び運動性を示す因子を決定することで膜流動性を評価することができる。測定条件として、温度 50 ºC 一定下、圧力範囲 0.1─150 MPa、λ_c=370 nm、λ_{em}=430 nm で行った。

【結果・考察】DPPC 二分子膜は 50 ºC において、圧力上昇に伴い流動性が高い液晶相から流動性の低いゲル相に変化する。この相変化が起こる圧力を主転移圧力といい、DPPC 純粋系では、約 37 MPa で見られた。さらに、DOPC の濃度が上昇すると、主転移圧力は高圧側へシフトした。これは、不飽和脂肪酸を含む DOPC がゲル相よりも液晶相を安定化させることを示している。また、測定した異方性値の結果から *S* 値及び D_w 値を算出した。DOPC 存在下では、DPPC 純粋系に比べ、*S* 値は減少し、脂質分子の間隔を広げることが分かった。また D_w 値は増加し、脂質分子の運動性を上昇させることが分かった。これらは、DOPC の折れ曲がった構造に起因していると考えられる。従って、DOPC が DPPC 二分子膜に分配することで、脂質分子間隔が広がり、膜流動性を維持していることが分かった。

biomembrane, pressure change, monounsaturated fatty acid

講演番号：3B04p16
講演日時：3 月 27 日 16:54～ 総合学習プラザ B04 会場

α-L-ガラクトシル化を基盤とするフコイダンの化学合成研究

Chemical synthesis of fucoidan via α-L-galactosylation as a key step

○富田 紘隆[1]、今村 彰宏[1]、石田 秀治[1,2] ([1]岐阜大院・自然科技、[2]岐阜大・G-CHAIN)
○Hirotaka TOMIDA[1], Akihiro IMAMURA[1], Hideharu ISHIDA[1,2] ([1]Gifu Univ., [2]Gifu Univ. G-CHAIN)

【研究背景】フコイダンは主にガゴメコンブなどの褐藻類に含まれる硫酸化多糖体である。その生理活性として、がん細胞の抗血管新生による抗腫瘍活性などが報告されており[1]、新たな化学療法剤への創薬展開が期待されている。フコイダンは、水酸基が硫酸化された L-フコースが α 結合で連なった糖鎖を主軸とする構造をもつが、種類によって糖組成や分岐構造、硫酸基の結合部位や含有率が異なる。このような構造不均一性は、研究試料としてのフコイダンの入手を非常に困難なものとしている。そのため、構造活性相関研究は遅々として進んでいない。また、化学的手法によるフコイダンの合成例は限定的であり、多糖レベルの合成報告はほとんどない。そこで我々は、独自の技術により、構造均一かつ長鎖のフコイダンの化学合成法の開発を行うこととした。
【方法】フコイダンの化学合成において鍵となるのは、α-L-フコシド結合の構築である。特に、より長鎖のフコイダンを合成するためには、グリコシル化反応における α 選択性が重要となる。しかし、L-フコースの α 結合は 1,2-*cis* 配置であるため化学的構築が難しい。そこで我々は、この課題を解決するため、原料として L-フコースではなく L-ガラクトースを用いることとした。これは、当研究室で開発された「DTBS 効果による α 選択的 D-ガラクトシル化」[2, 3]は、L-糖にも適用可能であると考えたためである。本手法であれば、糖鎖が伸張した場合でもグリコシル化反応における高い α 選択性が保持できると期待した。また、より効率的に多糖骨格を構築するため、二糖単位でのブロック合成を行う戦略を立てた。そして本研究では、L-ガラクトースから L-フコースへの変換効率も重視し、ガラクトース 6 位デオキシ化の反応条件を種々検討することとした。本発表では、フコイダンの化学合成に向けたこれまでの結果をまとめる。

[1] Q. Cong, H. Chen, W. Liao, F. Xiao, P. Wang, Y. Qin, Q. Dong, K. Ding, *Carbohydr. Polym.* **2016**, *136*, 899–907.
[2] A. Imamura, H. Ando, S. Korogi, G. Tanabe, O. Muraoka, H. Ishida, M. Kiso, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 6725–6728.
[3] A. Imamura, N. Matsuzawa, S. Sakai, T. Udagawa, S. Nakashima, H. Ando, H. Ishida, M. Kiso, *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 9086–9104.

Fucoidan, α-L-Galactosylation, Di-tert-butylsilylene

講演番号：3B04p17
講演日時：3 月 27 日 17:05～ 総合学習プラザ B04 会場

細菌由来コレステリル-α-グルコシド（CPG)およびその類縁体の合成

Syntheses of a bacterial cholesteryl-α-glucoside (CPG) and its analogue

○髙登 公一[1]、今村 彰宏[1]、石田 秀治[1,2] ([1]岐阜大院・自然科技、[2]岐阜大・G-CHAIN)
○ Koichi TAKATO[1], Akihiro IMAMURA[1], Hideharu ISHIDA[1,2] ([1]Gifu Univ., [2]Gifu Univ., G-CHAIN)

【研究背景】*Helicobacter pylori* は全世界の人口の 50%以上の人が感染している病原菌である。健常者に感染した場合では、腹痛といった軽度な症状のみ現れ、数日で症状が改善する。一方、乳児や高齢者、疾患患者に感染した場合では、胃がんや十二指腸潰瘍といった重篤な症状が現れ、治療が困難になる場合が多い。上述の主な発症原因化合物として、Cholesteryl-6'-*O*-acyl-α-D-glucopyranoside (CAG)と Cholesteryl-6'-*O*-phosphatidyl-α-D-glucopyranoside (CPG) が知られている。近年、特に CPG に着目した研究が進められ、CPG (14:0/19c:0) が *H. pylori* 感染者から高頻度で検出されることが明らかとなった [1]。しかし、病原性の発現に重要な CPG のファーマコフォアは未だ明らかになっていない。そこで本研究では、CPG のファーマコフォアの解明、ひいては *H.pylori* 感染に対する新たな治療法の開発を指向し、有機化学的手法による CPG（リン酸エステル結合を有する天然化合物）の全合成、ならびにリン酸エステル結合をアミド結合に置換した類縁体の合成を行うこととした。
【方法・結果】本研究で鍵となるのは、各目的化合物に存在する α グルコシド結合の立体選択的な構築と稀有な脂肪酸の合成である。まず、コレステリル α-グルコシド構造の構築を検討した。本研究では、*in situ* anomerization 法 [2]と DTBS 基保護を特徴とする α 選択的グルコシル化反応 [3]を比較検討することで、効率的な α-グルコシドの構築を目指した。結果として、コレステロールのグリコシル化には *in situ* anomerization 法が適していることがわかった。続いて、両目的化合物の合成に向けて、グルコース 6 位を遊離の水酸基および一級アミンへと誘導した。次に、稀有なシクロプロパン構造を有する脂肪酸を市販のカルボン酸から調製し、これをグリセロールに導入することでジアシルグリセロール誘導体とした。最後に、天然物の CPG においては、コレステリルグルコシドとジアシルグリセロール部位をリン酸エステルで結合させ、類縁体ではアミドとした。両カップリング反応は良好な収率で達成され、最後にすべての保護基を除去することで各目的化合物の合成に成功した。

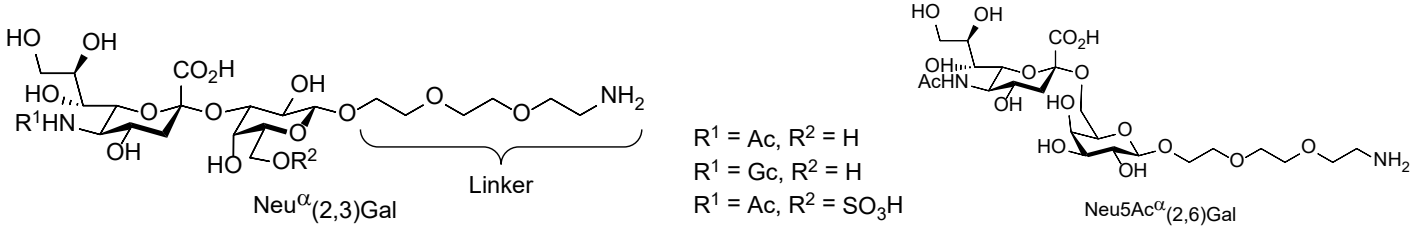
【参考文献】
[1] H. M. Jan, Y. C. Chen, Y. Y. Shin, Y. C. Huang, Z. Tu, A. B. Ingle, S. W. Liu, M. S. Wu, J. G. Hague, K. T. Mong, Y. R. Chen, C. H. Lin, *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 6208–6216.
[2] H. Q. Nguyen, R. A. Davis, J. G. Hague, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 13400–13403.
[3] M. Heuckendorff, H. H. Jensen, *Eur. J. Org. Chem.* **2016**, 5136–5145.

H. pylori, Cholesteryl glucoside, Stereoselective glycosylation

講演番号：3B04p18
講演日時：3 月 27 日 17:16～ 総合学習プラザ B04 会場

トキソプラズマの感染機構解明に向けたシアロ糖鎖の合成と評価
Syntheses and evaluations of sialo-glycans for the elucidation of Toxoplasma infection mechanism
小川 明日香[2]、河村 奈緒子[1]、田中 秀則[1]、今村 彰宏[2]、石田 秀治[1,2]、○安藤 弘宗[1]([1]岐阜大・G-CHAIN、[2]岐阜大・応用生物)
Asuka OGAWA[2], Naoko KOMURA[1], Hidenori TANAKA[1], Akihiro IMAMURA[2], Hideharu ISHIDA[1,2], ○Hiromune ANDO[1] ([1]G-CHAIN, [2]Gifu Univ)

【目的】トキソプラズマは、ほぼすべての恒温動物に感染可能な人獣共通感染寄生虫である。免疫の低下した感染者には重篤な症状を引き起こし、特に妊婦への感染は胎児に悪影響を及ぼす。しかし現在まで、有効な治療法は開発されていない。その一つの要因は、糖鎖が関与するとされる感染機構の詳細が未解明なことである。これまでの研究により、トキソプラズマの MIC（microneme proteins）が宿主細胞表面の特定のシアロ糖鎖に結合することで感染が起きる[1]と考えられている。この仮説をもとにシアロ糖鎖の結合特異性や感染への関与が検証されているが、用いる糖鎖試料や試験方法によって異なる評価結果を与えているのが現状である。そこで、本研究では、構造均一な糖鎖分子を用いたトキソプラズマの糖鎖結合性の評価を目的とし、MIC との結合性が高いと考えられている Neuα(2,3)Gal 類縁体を有機化学的に合成することとした。
【方法・結果】合成標的として、シアル酸 C5 位の修飾が異なる二種類の Neuα(2,3) Gal（*N*-Ac 型並びに *N*-Gc 型）と Neuα(2,3) 6-sulfo-Gal を設定した。そこで、当研究室で開発した二環性シアル酸供与体[2]を利用した合成法を立案し、昨年度大会では Neuα(2,3) Gal（*N*-Ac 型）の合成を報告した[3]。この合成法により、今年度は、Neuα(2,3) Gal（*N*-Gc 型）の合成を達成した。さらに、硫酸化体合成の為、6 位水酸基を Bn 基で保護したガラクトース受容体を新たに設計し、これと二環性シアル酸供与体のグリコシド化反応を行うことで、二糖を高収率にて合成した。二糖構築後、供与体への変換、リンカーの導入、架橋部の Zn/AcOH による開裂及び *N*-Ac 化を行った。現在、Bn 基の除去、硫酸基の導入、全脱保護による標的構造への誘導を検討中である。一方、先行して合成した三種のシアロ糖鎖に加え、シアル酸の結合位置の影響を調べるため、Neuα(2,6)Gal も合成した。これら合成分子を用いたトキソプラズマとの結合評価を試みたので、その結果を併せて報告する。



[1] a) J. A. Garnett *et al*. *Protein Sci*. **2009**, *18*, 1935; b) J. Marchant, *et al*. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 16720.
[2] N. Komura *et al. Science* **2019**, *364*, 677. [3]日本農芸化学会 2019 年度大会 1E4p08.

Toxoplasma gondii, sialic acid, α-sialylation

発表責任者：安藤弘宗（hando@gifu-u.ac.jp）

講演番号：3B05a01
講演日時：3 月 27 日 09:30～ 総合学習プラザ B05 会場

大腸菌による Ergothioneine 発酵生産の効率化

Enhanced production of ergothioneine by recombinant *Escherichia coli*

○田草川 隼[1]、上出 倫敬[1]、佐藤 康治[2]、小笠原 泰志[2]、大津 厳生[3]、大利 徹[2]([1]北大院総合化学、[2]北大院工、[3]筑波大生命環境)
○Shun TAKUSAGAWA[1], Tomoyuki KAMIDE[1], Yasuharu SATOH[2], Yasushi OGASAWARA[2], Iwao OHTSU[3], Tohru DAIRI[2] ([1]Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., [3]Univ. Tsukuba)

［背景・目的］

Ergothioneine（ERG）は、ヒトをはじめ多くの生物に存在する含硫アミノ酸で、高い抗酸化活性を有する。ヒトは ERG 合成能を持たないが、特異的トランスポーターである OCTN1 を利用した取り込み機構を持つことから、生命維持に重要な役割を担う化合物と考えられている。現在、キノコ抽出物が化粧品や健康補助食品に利用されているが、含有量は低く高価であることから、安価な新規供給法の開発が望まれている。最近、我々は *Mycobacterium smegmatis* が持つ ERG 生合成遺伝子（*egtABCDE*）を大腸菌で高発現させることにより 24 mg/L の ERG 生産を達成した（*J. Agric. Food Chem.* **66**, 1191, 2018）。また、生産性は低いが麹菌を用いた発酵生産も報告した（*Biosci. Biotechnol. Biochem.* **83**, 181, 2019）。前者の生産系では、初発中間体である hercynine が著量蓄積しており、これを基質に用いる EgtB が律速反応と考えられた。そこで本研究では、その改善による ERG 生産性の向上を目的とした。

［方法・結果及び考察］

ゲノムデータベースを精査すると、ある種の細菌では ERG 生合成に特徴的な遺伝子 *egtB* と *D* のみがクラスターを形成していた。本 *egtB* を上述の大腸菌を用いた ERG 生産系に導入したところ生産性が 81 mg/L に向上したが、培養液には EgtB の反応産物である Hercynyl-γ-glutamylcysteine sulfoxide（Her-γGC）が全く検出されなかった。糸状菌 *Neurospora crassa* では、Cys を ERG 合成の硫黄源として用い、Her-γGC を中間体としない生合成経路が報告されている。そこで、今回見出した EgtB も Cys を基質とするか検討した。組換え酵素を用いた *in vitro* 解析の結果、予想通り本酵素は Cys のみを基質とすることがわかった。そこで、より高活性な $EgtB_{Cys}$ オルソログを探索した結果、最終的に生産性を 224 mg/L に向上させることができた。

ergothioneine, bioproduction

発表責任者：大利徹（dairi@eng.hokudai.ac.jp）

講演番号：3B05a02
講演日時：3 月 27 日 09:41～ 総合学習プラザ B05 会場

多価不飽和脂肪酸合成酵素の生産物リリース機構の解明

Off-loading mechanism of products in polyunsaturated fatty-acid synthases

○林 祥平[1]、小笠原 泰志[2]、佐藤 康治[2]、丸山 千登勢[3]、濱野 吉十[3]、大利 徹[2]([1]北大院総合化学、[2]北大院工学、[3]福井県大院生物資源)

○ Shohei HAYASHI[1], Yasushi OGASAWARA[2], Yasuharu SATOH[2], Chitose MARUYAMA[3], Yoshimitsu HAMANO[3], Tohru DAIRI[2] ([1]Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., [3]Fukui Pref. Univ.)

ある種の海洋性微細藻類や細菌はポリケチド合成酵素（PKS）様のマルチドメインから構成される酵素複合体「多価不飽和脂肪酸生合成酵素（PUFA 合成酵素)」によりドコサヘキサエン酸（DHA）やエイコサペンタエン酸（EPA）を生合成することが知られている。その生合成機構は脂肪酸合成酵素や PKS と同様に、PUFA 合成酵素のアシルキャリアプロテイン（ACP）上で反応が進行し、最終生成物として DHA や EPA が生合成される。一般的に ACP とチオエステル結合した生成物はチオエステラーゼ(TE）によって ACP から切り離される。しかし、興味深いことに、PUFA 合成酵素には TE と相同性を示すドメインが存在せず、生成物のリリース機構は明らかとなっていない。そこで、本研究ではその機構を明らかにすることを目的とした。

PUFA 合成酵素を構成する 2 つのアシルトランスフェラーゼ（AT）ドメインのうち、1 つが伸長基質であるマロニル-CoA のロードに関与するが、もう一方の AT ドメインはマロニル-CoA やアセチル-CoA のローディング活性をほとんど示さず、機能が明らかとなっていない。そこで、アミノ酸配列情報を基に、機能未知の AT ドメインの活性残基 Ser を Ala に置換することで AT ドメインを不活性化し、大腸菌を異種宿主とした異種宿主生産系を用いて不活性化の影響を評価した。その結果、野生型と比較して、PUFA の生産性が約 90%減少したことから、AT ドメインは PUFA 生産に重要であることがわかった。この結果から、我々はこの機能未知の AT ドメインが生成物のリリースに関与すると予想し、*in vitro* 機能解析を行った。基質として DHA-ACP と EPA-ACP をそれぞれ酵素合成後、DHA と EPA 合成酵素由来 AT ドメインの組換え酵素を用いて *in vitro* 反応を行ったところ、酵素依存的に *holo*-ACP の生成が認められた。アミノ酸置換により AT を不活性化した組換え酵素を用いた場合では反応は進行しなかったことから、AT ドメインが生成物の加水分解に関与することが示された。さらに、炭素鎖長の異なる種々のアシル-ACP 基質を用いて AT ドメインの基質特異性を解析した結果、AT ドメインは長鎖（C18 から C22）で *cis* 二重結合を持つ脂肪鎖-ACP を基質として認識することが示唆された。

polyunsaturated fatty acids, biosynthesis, thioesterase

発表責任者：大利徹（dairi@eng.hokudai.ac.jp）

講演番号：3B05a03
講演日時：3 月 27 日 09:52～ 総合学習プラザ B05 会場

Investigation of a novel epimerase in the biosynthesis of D-tryptophan containing lasso peptide, MS-271

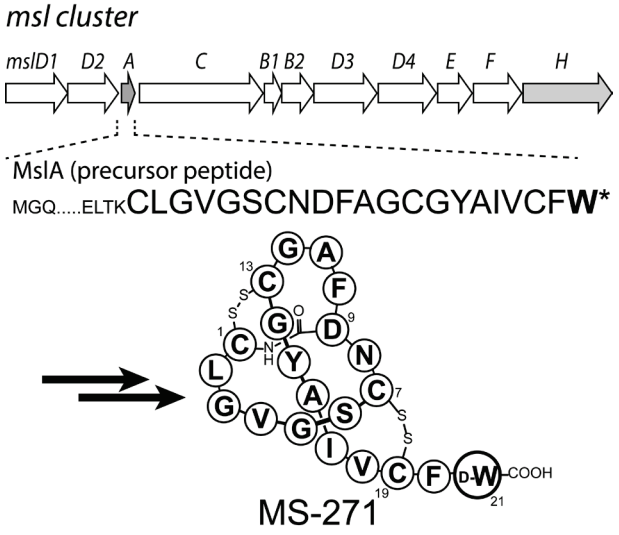
○Zhi FENG[1], Yasushi OGASAWARA[2], Tohru DAIRI[2] ([1]Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

[Introduction]

MS-271, produced by *Streptomyces* sp. M-271, is a lasso peptide natural product comprising 21 amino acid residues with a D-tryptophan (D-Trp) at its C-terminus.[1] Because lasso peptides are member of ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides (RiPPs), the biosynthesis of MS-271, especially the mechanism to introduce the D-Trp residue, is of great interest. We previously identified the biosynthetic gene cluster (*msl*) of MS-271 and showed that the D-Trp is introduced by epimerization of the C-terminal Trp residue in the precursor peptide (MslA). Furthermore, heterologous expression of the *msl* cluster in *Streptomyces lividans* revealed that it contains all the necessary genes for MS-271 biosynthesis.[2] However, the cluster lacked obvious candidate genes for epimerization and an enzyme responsible for the epimerization thus remains unknown. In this study, we investigated the details of D-Trp introduction.

[Results & Discussion]

Among the enzymes required for the biosynthesis of MS-271, MslH is the only enzyme of unknown function. We thus speculated that MslH is responsible for the epimerization of the C-terminal Trp. To test this hypothesis, we expressed *mslA* together with *mslH* in *E. coli*. After the purification of MslA, we hydrolyzed it and the stereochemistry of Trp was analyzed by Marfey's method. However, only L isomer was observed. These results suggested that modifications of MslA such as cyclization and disulfide bond formations occur prior to the epimerization reaction. We currently examine co-expression of other genes with *mslA* and *mslH* to identify the minimum set of genes that introduce D-Trp in MslA.



[References]

[1] Yano, K. *et al. Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 115.

[2] Feng, Z. *et al. ChemBioChem* **2018**, *19*, 2045.

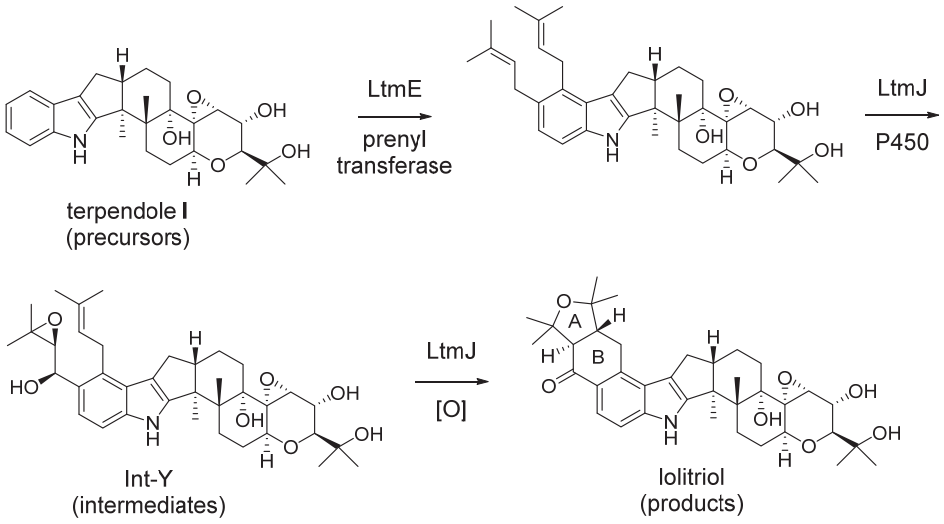
lasso peptide, biosynthesis, epimerase

発表責任者：大利徹（dairi@eng.hokudai.ac.jp）

講演番号：3B05a04
講演日時：3 月 27 日 10:03～ 総合学習プラザ B05 会場

Biosynthesis Study of Indole Diterpene Lolitrems and its Structural Diversification
○Yulu JIANG[1], Taro OZAKI[1], Chengwei LIU[1], Jun-ichi MARUYAMA[2], Atsushi MINAMI[1], Hideaki OIKAWA[1] ([1]Dept. of chem., Fac. Sci., Hokkaido Univ., [2]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo)

(Introduction) Indole-diterpenes (IDTs) are one of important class of fungal secondary metabolites with various biological activities. Among IDTs, lolitrem B is a potent tremorgenic mycotoxin[1] that contains a highly complex polycyclic skeleton including a unique 5/6 bicyclic system (AB rings). Frequent occurrence of the common AB rings in the lolitrem core indicates the broad substrate specificity of putative biosynthetic enzymes, LtmE and LtmJ[2]. Here we report the reconstitution of late modification steps for lolitrems, employing a combination of *Aspergillus oryzae* expression system and CRISPR/Cas9-mediated genome editing techniques[3].
(Results) The prenyltransferase gene *ltmE* and the cytochrome P450 gene *ltmJ* were efficiently introduced into *A. oryzae* NSPlD1 by genome editing techniques. Biotransformation of terpendole I by the transformant AO-*ltmEJ* yielded lolitriol and its reaction intermediate Int-Y. Structural analysis of Int-Y revealed that one of the two prenyl moieties was oxidized to an epoxy alcohol, allowing us to propose the reaction mechanism. Substrate specificity of LtmEJ with several substrate analogs will also be discussed in the presentation.



References
(1) Gallagher, R. T. *et al.*, *Experientia.*, **1986**, 42, 823; (2) Saikia, S. *et al.*, *FEBS Lett.*, **2012**, 586, 2563; (3) Liu. C. W. *et al., J. Am. Chem. Soc.,* **2019**, 141, 15519.

Indole diterpene, Cytochrome P450, Genome editing

発表責任者：及川 英秋（hoik@sci.hokudai.ac.jp）

講演番号：3B05a05
講演日時：3 月 27 日 10:14～ 総合学習プラザ B05 会場

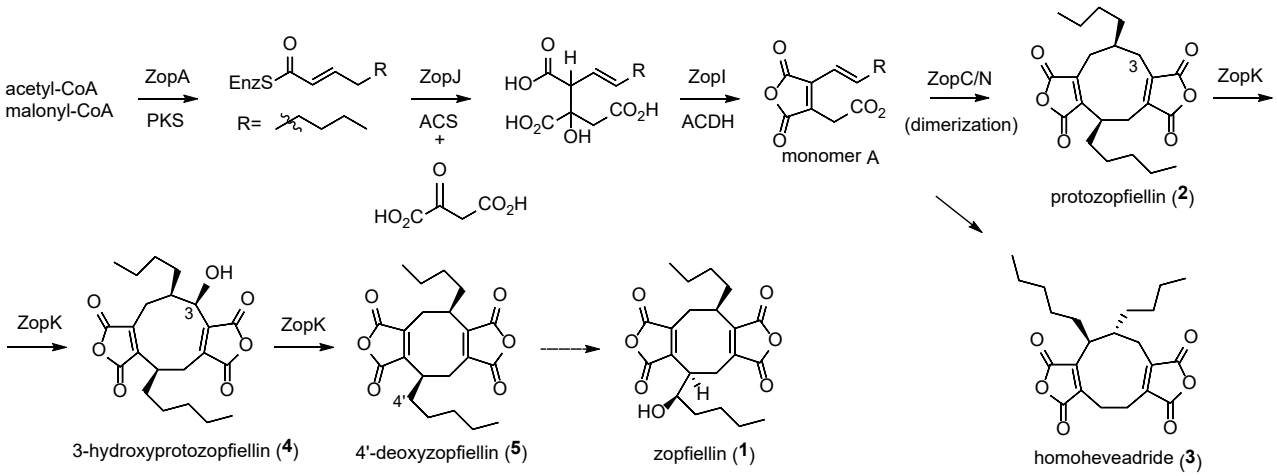
酸無水物型二量体ゾフィエリンの特異な八員環形成機構

Enzymatic Construction of Eight-membered ring in the zopfiellin biosynthesis

○椎名 哲也、松 優佑、長嶺 翔太、尾﨑 太郎、劉 成偉、南 篤志、及川 英秋（北大院理）
○Tetsuya SHIINA, Yusuke MATSU, Shota NAGAMINE, Taro OZAKI, Chengwei LIU, Atsushi MINAMI, Hideaki OIKAWA (Fac.Sci.,Hokkaido Univ)

【目的・背景】糸状菌の代謝物には、無水マレイン酸を部分構造として持ち、それらが多量化した天然物が存在する。多量化の様式や酸化度が異なる構造多様な類縁体が知られる天然物群であり、顕著な抗真菌活性を示す zopfiellin (**1**) もその一つである。**1** は他の酸無水物二量体には見られない八員環骨格を有しており、その生合成機構に着目して本研究を開始した。これまでに我々は、ポリケチド合成酵素 ZopA、アルキルクエン酸合成酵素 ZopJ、アルキルクエン酸脱水酵素 ZopI によりモノマーA が合成されることを明らかにした。また、麹菌異種発現系によって構築したモノマー生産株 AO-*zopAIJ* を宿主として二量化酵素 ZopC・ZopN および加水分解酵素 ZopM を異種発現し protozopfiellin (**2**) および homoheveadride (**3**) が生産されることを明らかにした [1)]。本研究では **1** が有する特徴的な八員環の骨格構築に関与する酵素の機能解析を行ったので報告する。

【方法・結果】麹菌異種発現によって構築した二量化体生産株 AO-*zopAIJCNM* に酸化酵素遺伝子 *zopK* を追加導入した。得られた形質転換体の代謝産物を分析し、形質転換体が 3-hydrxyprotozopfiellin (**4**) および 4'-deoxyzopfiellin (**5**) を生産することを明らかにした。また、組み換え酵素を用いた *in vitro* の反応により ZopK が **2** を酸化し **4** を中間体として **5** へ変換することを明らかにした。さらに、^{13}C 標識前駆体を用いた **1** への取り込み実験を行った結果をもとに ZopK の反応機構を推定したので、詳細を議論する。



1) 日本農芸化学会 2019 年度大会 3D2p06

anhydride, biosynthesis, fungi

発表責任者：及川英秋（hoik@sci.hokudai.ac.jp）

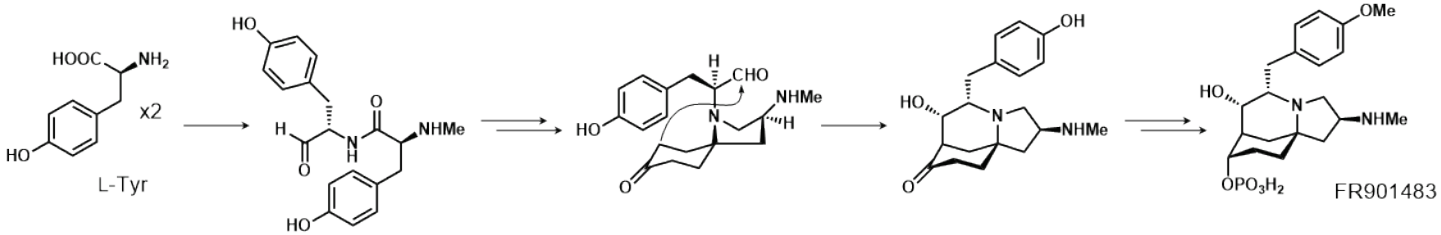
講演番号：3B05a06
講演日時：3 月 27 日 10:35～ 総合学習プラザ B05 会場

FR901483 の生合成研究

Biosynthetic study on FR901483

○田村 優依[1]、佐藤 道大[1]、谷口 昌要[2]、笹村 智司[2]、永井 浩二[2]、渡辺 賢二[1]([1]静岡県大薬、[2]大鵬薬品工業)
○Yui TAMURA[1], Michio Satou[1], Masatoshi Taniguti[2], Satoshi Sasamura[2], Kouzi Nagai[2], Kenji Watanabe[1] ([1]University of Shizuoka, [2]TAIHO Phamaceutical Co., Ltd.)

【目的】糸状菌が生産する化合物は構造および生物活性多様性に富み、創薬研究に活かされてきた。糸状菌 *Cladobotryum* sp.から単離された FR901483 は IL-2 産生阻害に基づかない新規メカニズムの免疫抑制活性を示すことから、新たな免疫抑制剤開発の足掛けとなることが期待される化合物である。また本化合物は含窒素三環性骨格および多彩な官能基を有していることから、有機合成化学的にも注目され、これまでに数多くの全合成研究が報告されている。一方で生合成経路に関しては、2 つのチロシンから生合成されると予想されているものの、現在までに詳細な経路に関する報告例はない。そこで本研究では FR901483 の生合成経路の全容解明および本化合物の類縁体を得ることを目的として研究に着手した。
【方法】はじめに、*Cladobotryum* sp.の全ゲノム配列の解読から本化合物の推定生合成遺伝子クラスターを探索し *clf* クラスターと命名した。本化合物の生産条件において、*clf* クラスターが発現しているかを RT-PCR により確認した後、RNA-seq 解析からクラスター中の各遺伝子の ORF を特定した。続いて、*clf1*, clf*4* および *clf9* については組換えタンパク質として獲得し、*in vitro* 実験に供した。さらに本化合物の生合成再構築を目的として、各遺伝子の cDNA をもとに異種発現用プラスミドを作製した。このプラスミド異種発現宿主である *Aspergillus nidulans* へ形質転換し、生合成経路の再構築を試みた。
【結果と考察】*clf* クラスターにコードされているタンパク質を大腸菌発現系を用いて組換えタンパク質として獲得し、*in vitro* 反応に供したところ、Clf4 はチロシン 2 量体環化反応を誘導し、Clf9 は FR901483 脱リン酸体を基質としてリン酸化反応を誘導した。これらのことから、*clf* クラスターが FR901483 生合成遺伝子クラスターであることが示された。また、*A. nidulans* に *clf*1/2/11 を除くすべての遺伝子を導入した株を培養したところ、FR901483 脱リン酸体と同じ質量電荷比を示す化合物の生産が確認された。現在生産された化合物の精製および構造決定を行っている。



FR901483 推定生合成経路

Biosynthesis, *Cladobotryum* sp, Immunosuppression

発表責任者：渡辺賢二（kenji55@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：3B05a07
講演日時：3 月 27 日 10:46～ 総合学習プラザ B05 会場

シトクロム P450 による二量化ジケトピペラジンの創製

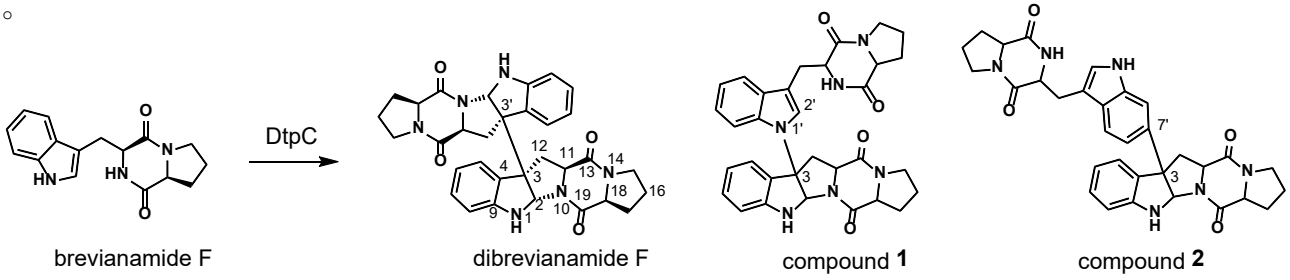
P450 engineering as a tool for diketopiperazine dimerization

○小谷 拓也、猿渡 隆佳、佐藤 道大、渡辺 賢二 (静岡県大薬)
○ Takuya KODANI, Takayoshi SARUWATARI, Michio SATO, Kenji WATANABE (Univ. of Shizuoka)

【背景】これまでに我々は、diketopiperazine (L-Trp-L-Phe) の二量体 (ditryptophenaline) 形成を触媒する P450 酵素、DtpC を糸状菌 ***Aspergillus flavus*** より見出している [1)]。本酵素は本来の基質である L-Trp-L-Phe だけではなく、brevianamide F (L-Trp-L-Pro) も基質として認識し、dibrevianamide F を生成することも明らかとなっている [1)]。DtpC はトリプトファンのインドール環の一電子酸化を触媒し、二量体化はベンジルラジカルを介したラジカルカップリング反応によるものと予想される。DtpC は本来の基質以外の diketopiperazine を受容することが可能な汎用性の高い酵素である。我々は、DtpC の活性部位を分子進化的手法を用いて改変し、網羅的な diketopiperazine 類二量体化合物の生合成を目指した。

【方法】アミラーゼ誘導型プロモーターの下流に brevianamide F 生合成遺伝子 ***ftmA*** および ***dtpC*** を配置したプラスミドを作製し、***A. nidulans*** に導入した。得られた形質転換体を培養し、培養液上清を酢酸エチルにて抽出し、LC-MS での解析を行った。

【結果・考察】LC-MS の解析から dibrevianamide F の生成だけでなく、dibrevianamide F と同じ質量電荷比を与える化合物の存在が確認された。これら化合物を精製し、構造解析を行ったところ、化合物 **1** および **2** であることが明らかとなった。DtpC 本来の生成物である ditryptophenaline や dibrevianamide F は C3-C3′位での結合であるのに対し、これら化合物はそれぞれ C3-N1′および C3-C7′位での結合によるものであった。化合物 **1** および **2** は、DtpC の活性部位と基質の親和性が弱まりゆらぐことで、インドール環で発生したラジカルが N1 位、C7 位に転位した結果、形成すると考えられる。現在 DtpC に変異を導入し、化合物 **1** および **2** の生産が増大する変異体のスクリーニングを行うと同時に、基質許容性の高い変異体を用いた網羅的 diketopiperazine 類二量体化合物の解析を行っている。



brevianamide F　　dibrevianamide F　　compound **1**　　compound **2**

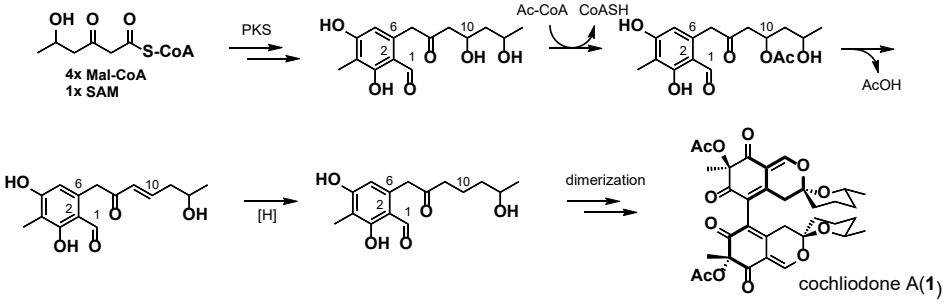
Saruwatari T. *et al*. *ChemBioChem* **2014**, *15*, 656-659.

P450, diketopiperazine, dimerization

講演番号：3B05a08
講演日時：3 月 27 日 10:57～ 総合学習プラザ B05 会場

糸状菌由来 azaphilone 系天然物 cochliodone A の生合成研究
Biosynthetic study on fungal metabolite, cochliodone A
○赤岡 史人[1]、高西 潤[1]、佐藤 道大[1]、三野 孝[2]、渡辺 賢二[1] ([1]静岡県大薬、[2]千葉大院工)
○Fumito AKAOKA[1], Jun TAKANISHI[1], Michio SATO[1], Takashi MINO[2], Kenji WATANABE[1] ([1]Univ. of Shizuoka, [2]Chiba Univ.)

【目的】Cochliodone A (**1**) は糸状菌 *Chaetomium globosum* より単離されたポリケタイド化合物であり、スピロアセタール環を有する単量体化合物が二量体化した azaphilone 系天然物である。Azaphilone 類は糸状菌の代謝産物として広く見られる pyrano-quinone 骨格を有する二環性の主炭素骨格を持つ化合物群である。この pyrano-quinone 骨格は、ポリケタイド合成酵素 (PKS) から切り離された benzaldehyde 中間体が酸化されることで形成される [1]。しかしながら本化合物のアセタール形成および二量体化の生合成機構は不明のままである。そこで今回これらの形成メカニズムを含む、本化合物の全生合成経路を解明することを目的として研究を行った。
【方法】**1** の生合成遺伝子クラスター同定については、先行研究における PKS 遺伝子破壊実験から明らかとなっている。今回、遺伝子クラスター内の全ての遺伝子に対し遺伝子破壊株を作製し、得られた破壊株の代謝産物に対して LC-MS 分析を行った。遺伝子破壊株にのみ観測された化合物に対して、単離・構造決定を行った。続いて各遺伝子の機能解明を目指し、大腸菌もしくは出芽酵母から組換タンパク質を獲得し、*in vitro* 反応に供した。
【結果】各遺伝子破壊株から得られた抽出物の LC-MS 解析の結果を野生株と比較し、新たに生産された化合物をそれぞれの遺伝子破壊株の培養液から精製し構造決定を行った。興味深いことに、遺伝子破壊実験から得られた化合物および *in vitro* 反応の結果から、10 位のメチレン基は水酸基のアセチル化・脱アセテート・還元の一連の反応により形成されることが明らかとなった。現在、本化合物の全生合成経路の解明に向けて予想中間体とその生合成に関わる精製酵素を用いた *in vitro* 反応を行っており、アセタールおよび二量体化反応について解析中である。



1)Sato, M., *et al. Org. Lett.,* **2016,** *18,* 1446.

Cochliodne A, biosynthesis, azaphilone

講演番号：3B05a09
講演日時：3 月 27 日 11:08～ 総合学習プラザ B05 会場

担子菌由来テルペン系天然物の異種生産

Heterologous production of natural terpenoids derived from mushroom

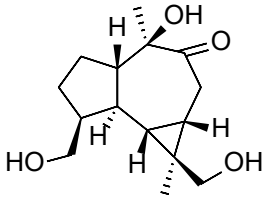
○西下 純平[1]、長嶺 翔太[1]、尾崎 太郎[1]、劉 成偉[1]、丸山 潤一[2]、南 篤志[1]、及川 英秋[1]([1]北大院理、[2]東大院農)

○ Jumpei NISHISHITA[1], Shota NAGAMINE[1], Taro OZAKI[1], Chengwei LIU[1], Jun-Ichi MARUYAMA[2], Atsushi MINAMI[1], Hideaki OIKAWA[1] ([1]Fac. Sci., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo)

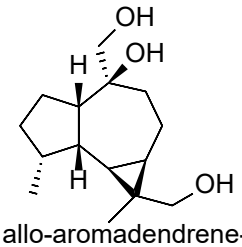
【目的】担子菌は生物活性テルペンを探索する上での重要な資源の一つであり、その染色体上には 10 種以上のテルペン生合成遺伝子クラスターが存在する。しかし、実験室の培養条件ではその半分以上が転写されていないことや [1]、転写されている遺伝子でも生産菌がミススプライシングを行ってしまう場合があり、正しい cDNA 配列の調製には手間がかかる。我々は、担子菌由来遺伝子の gDNA 配列を麹菌へと導入すると、ほぼ正しくスプライシングが行われることを明らかにした。また、この手法を用いることで、担子菌 *Clitopilus pseudo-pinsitus* の持つテルペン環化酵素遺伝子の網羅的機能解析に成功している [2]。今回我々は、テルペン環化酵素遺伝子に隣接して存在する修飾酵素遺伝子の gDNA 配列を用いた解析などを行い、担子菌由来テルペン系天然物の異種生産と生合成経路の解明を試みた。

【方法・結果】*Clitopilus pseudo-pinsitus* が保持する環化酵素遺伝子のうち、viridiflorol を与える *cpsts9* に隣接する修飾酵素遺伝子の gDNA 配列をクローニングし、我々が特定した高発現領域に導入した [2,3]。構築した形質転換体から cDNA を調製してその配列を確認すると、麹菌は担子菌由来遺伝子を完全にスプライシングできる場合と、イントロンを 1～2 個ほど「スキップ」してしまう場合があることがわかった。このイントロンを PCR により除去し、修正した配列を導入すると、viridiflorol の酸化生成物を得ることに成功した。講演では、他クラスターの解析結果と合わせて報告する。

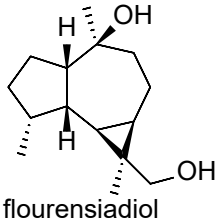
【関連化合物】



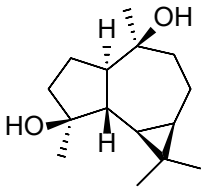
inonotin G



allo-aromadendrene-10β,14-diol

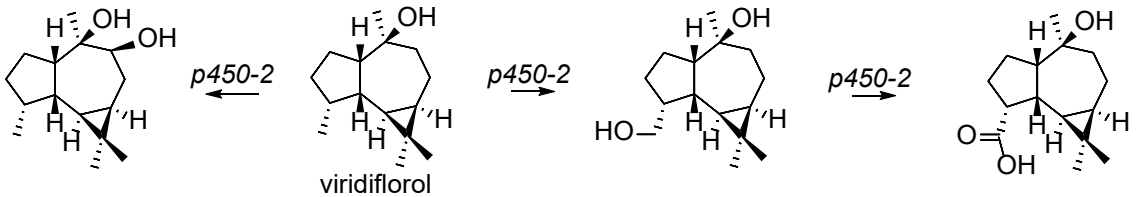


flourensiadiol



allo-aromadendrene-4,10-diol

【獲得した酸化生成物】



viridiflorol

[1]*ChemBioChem* **2013**, *14*, 2480-2491. ；[2]*Appl. Environ. Microbiol.,* DOI: 10.1128/AEM.00409-19. ；[3]*J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 39, 15519-15523

Basidiomycetes fungi, Sesquiterpene, *Aspergillus oryzae*

講演番号：3B05a10
講演日時：3 月 27 日 11:19～ 総合学習プラザ B05 会場

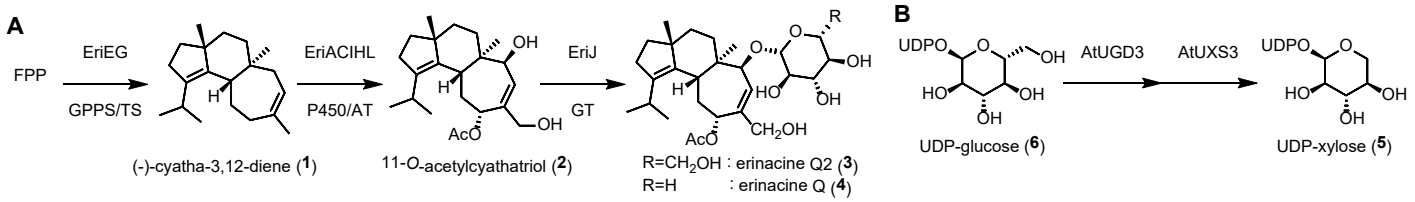
担子菌由来ジテルペン erinacine 生合成経路の解明と効率的再構築

Efficient Reconstitution of the Biosynthetic Pathway of Basidiomycota Diterpene Erinacines

○小谷 明里[1]、劉 成偉[1]、尾﨑 太郎[1]、呉 静[2]、河岸 洋和[2]、丸山 潤一[3]、南 篤志[1]、及川 英秋[1]
([1]北大院理、[2]静岡大・農、[3]東大院・農生科・応生工)
○ Akari Kotani[1], Chengwei Liu[1], Taro Ozaki[1], Jing Wu[2], Hirokazu Kawagishi[2], Jyunichi Maruyama[3], Atushi Minami[1], Hideaki Oikawa[1] ([1]Fac. Sci., Hokkaido Univ., [2]Fac. of Agric., Shizuoka Univ., [3]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo.)

【目的・背景】担子菌は我々の生活に関わる重要な食用・薬用資源であり、新たな生物活性物質の供給源としても期待されている。一方、子実体形成の有無や培養条件の違いで異なる代謝物を与えるため、その代謝物を安定して供給することは必ずしも容易ではない。この問題を解決するためには、異種宿主を用いた物質生産は有効な手段である。今回我々は、麹菌異種発現系とゲノム編集技術の一つである CRISPR/Cas9 を利用することで、担子菌 *Hericium erinaceus* が生産するジテルペン・エリナシンの生合成経路を再構築し、天然物の全生合成に成功したので詳細を報告する。

【方法・結果】既報のエリナシン生合成遺伝子クラスター (H. Liu *et al*., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 4749) に加え、生産菌のゲノム情報をもとにアセチル基転移酵素 Ple2 との相同性から EriL を新たに見出し、研究対象とした。昨年度の本大会で報告したように (曽ケ端ら、日本農芸化学会大会 2019 年度一般講演 3D2a14) 、過去に高収量を与えた形質転換体における外来遺伝子導入部位に生合成遺伝子を導入することで、以下に示す各形質転換体を作製した。初めに GGPP 合成酵素 EriE 及びテルペン合成酵素 EriG の異種発現により、cyatha-3,12-diene (**1**) の生産を確認した。続いて、種々の組み合わせで異種発現を行うことで、3 種の P450 (EriACI) 、P450 の補助酵素 EriH、 及び EriL によって、**1** が 11-*O*-acetylcyathatriol (**2**) へと変換されることを明らかにした (図 A) 。
次に糖転移酵素 EriJ を異種発現した。*eriJ* 導入株では、望む xylose ではなく glucose の配糖体 erinacine Q2 (**3**) を生産した。これは UDP-xylose (**5**) の供給量が十分でなく、その上流に位置する UDP-glucose (**6**) が反応したためと考えた (図 B) 。そこで、シロイヌナズナ由来の 2 種の生合成遺伝子を共発現することで、**3** を 4.7 mg L^{-1} の収量で得た (C. Liu *et al. J. Am. Chem. Soc.*, **2019**, *141*, 15519) 。最近、*H. erinaceus* 由来の **5** の供給に関与する 2 遺伝子の共発現によって **3** の生産量が大幅に改善することを見出し、この高生産株を宿主として、さらに修飾が進んだ類縁体への変換も試みている。



Terpene, Basidiomycota, genome editing

発表責任者：及川英秋（hoik@sci.hokudai.ac.jp）

講演番号：3B05a11
講演日時：3 月 27 日 11:40～ 総合学習プラザ B05 会場

コリバクチン生産制御に基づく大腸発がん化学予防剤の開発

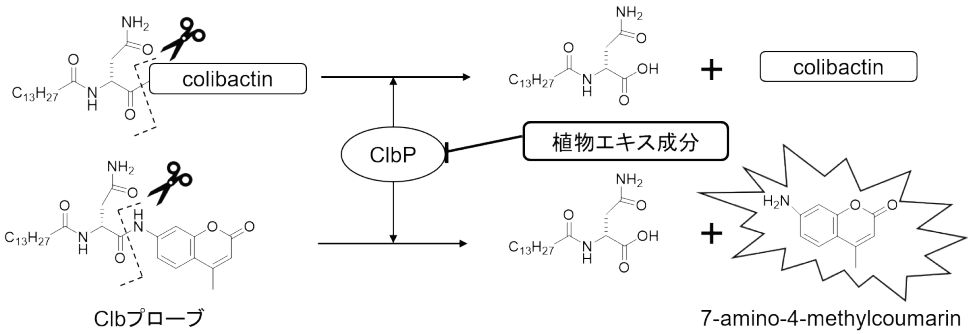
Identification of chemical elicitors for preventing colorectal cancer through a suppression of colibactin-producing E.coli in the microbiota

○尾形 勇二、石野 皓哉、佐藤 道大、恒松 雄太、渡辺 賢二 (静岡県大薬)
○Yuji Ogata, Teruya Ishino, Michio Sato, Yuta Tunematu, Kenji Watanabe (Dept. Pharm. Sci., Univ. Shizuoka)

【背景・目的】 コリバクチンは一部の大腸菌が産生する強力な遺伝毒性物質で、大腸発がんのリスク因子の一つと考えられている。実際に様々な国での疫学研究の結果、大腸がん患者の約 7 割でコリバクチン産生菌が検出されている。我々の先行研究では、コリバクチン生合成の最終段階を担う加水分解酵素(ClbP)に着目し、その酵素活性を検出する化学プローブ(Clb プローブ)を開発することに成功した。Clb プローブを用いることで、糞便から安易かつ容易にコリバクチン産生菌の有無を判定することができる。この検査はコリバクチンを介した大腸発がんの予防に寄与し得る。一方でコリバクチン産生菌の除菌法や、コリバクチン産生阻害法はこれまでに確立されていない。本研究ではコリバクチン産生菌のみを選択的に除菌できる化合物や、コリバクチン産生阻害活性を有する化合物を、処方箋無しに日常的に摂取可能な生薬・漢方成分を含む植物エキスから見出すことを目的とした。
【方法・結果】 植物エキスライブラリーを用いたスクリーニング方法を以下のように検討した。

1. OD_{600} によるコリバクチン産生菌の生育阻害能評価
   大腸がん患者のがん組織より単離したコリバクチン高産生菌を用いて、植物エキスライブラリーを対象にスクリーニングを実施した。大腸菌の増殖率を OD_{600} で用いて算出し活性を評価したが、植物エキス由来の不溶性成分が一定の割合で存在していたことから吸光度による方法では正確に判定が行えていないと考えられた。
2. Clb プローブ法
   ① Clb プローブ存在下にてコリバクチン産生菌を蛍光検出できることを利用し、コリバクチン産生菌の生育阻害活性と ClbP 酵素阻害活性を区別することなく評価した。約 10,000 種の植物エキスに対して本法にてスクリーニングを実施し、再現性良く蛍光強度を減弱させるエキスを同定した。
   ② ClbP 過剰発現株より得られた ClbP 酵素を用いることにより、①で阻害活性が強かった植物エキスに対し ClbP の阻害能の評価を行った。本取組みにより、「ClbP 阻害剤」と「細胞死誘導剤」の区別化を行った。

これらのスクリーニングの結果より、活性の高いと考えられる植物エキスを選抜した。今後 LC-MS/MS 解析を行い、その有効成分を特定する予定である。

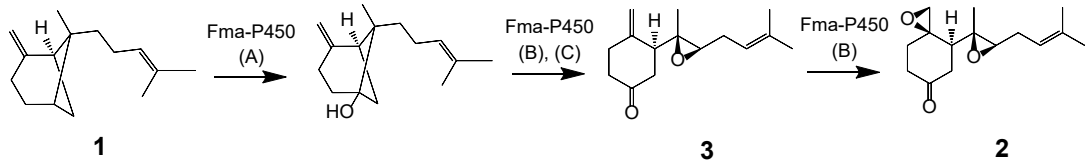


colibactin, cancer prevention, herbal medicine

講演番号：3B05a12
講演日時：3 月 27 日 11:51～ 総合学習プラザ B05 会場

Fumagillin 生合成酵素 Fma-P450 の触媒する多段階酸化反応
Fma-P450 catalyzing multistep oxidations in fumagillin biosynthesis
○蜂矢 志保実、岸本 真治、渡辺 賢二（静岡県大薬）
○Shihomi HACHIYA, Shinji KISHIMOTO, Kenji WATANABE (Univ. of Shizuoka)

【背景】シトクロム P450 (P450) は活性部位にヘムを持つ酸化酵素であり、微生物を始め、植物や哺乳類の代謝において重要な役割を担っている。これらの酵素は、下図における C-H 結合の活性化によるヒドロキシ化(A) やエポキシ化 (B)、ラジカル種による C-C 結合の切断 (C) 等の反応を触媒するといったように、複雑な構造変換を引き起こすものも存在する。そのような酵素の一つである Fma-P450 は糸状菌 *Aspergillus fumigatus* の fumagillin 生合成に関与する酵素であり、*β-trans*-bergamotene (**1**) を基質として、多段階の酸化反応を経てジエポキシケトン体である化合物 **2** に変換することが報告されている[1]。しかし、この報告では *fma*-P450 遺伝子を発現させた酵母の代謝物から触媒反応を推測しており、酵母の内在酵素が関与している可能性は否定できない。そこで我々は、Fma-P450 の精製酵素を取得し、その触媒する反応を確認するとともに、Fma-P450 がどのようにして多段階の選択的な反応を触媒しているかを解明すべく研究を開始した。



1 **3** **2**

【方法・結果・考察】大腸菌に膜貫通ドメインを有する P450 遺伝子を異種発現させる場合、膜貫通ドメインを既知の配列に置換することで遺伝子発現や膜からの可溶化が可能になることが知られている。そこで、N 末端の膜貫通ドメインを別の配列に置換し、C 末端に精製用の 6xHis タグを付加した組換え型 *fma*-P450 の発現ベクターを設計した。これで大腸菌 Nico (DE3) 株を形質転換し、IPTG で発現誘導後、20 ℃で 24 時間培養した。その後菌体を回収し、フレンチプレスを用いて破砕後、超遠心分離により膜画分を取得した。続いて膜画分に界面活性剤 CHAPS を加えて Fma-P450 を可溶化し、Ni-NTA 金属アフィニティクロマトグラフィーにより精製した。得られた粗精製 Fma-P450 に対して基質 **1**、*A. fumigatus* 由来 P450 還元酵素、NADPH を加え 30 ℃で 15 時間反応させ、LC-MS で分析を行った。この結果、化合物 **2** 及び **3** が生成されていることが確認され、Fma-P450 が実際に多段階反応を触媒して化合物 **1** を **2** へと変換することが明らかとなった。現在、Fma-P450 がどのようにして異なる位置を選択的に酸化しているのかを解明するべく、X線構造解析のための結晶化に取り組んでいる。

【参考文献】1. Lin H.-C. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 4426−4436.

Cytochrome P450, Oxidation enzyme, Filamentous fungus

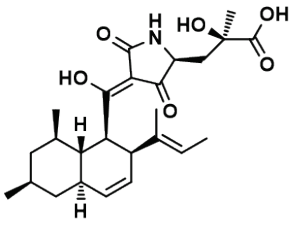
発表責任者：蜂矢志保実（gp2002@u-shizuoka-ken.ac.jp）

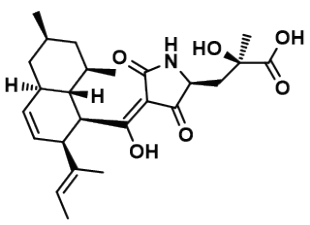
講演番号：3B05a13
講演日時：3 月 27 日 12:02～ 総合学習プラザ B05 会場

Diels-Alderase CghA の全容解明
Mechanism of CghA, Diels-Alderase from *Chaetomium globosum*

○岸本 真治[1]、佐藤 道大[1]、Jamieson Cooper[2]、横山 葵[1]、成田 一仁[1]、前田 直哉[1]、恒松 雄太[1]、原 幸大[1]、橋本 博[1]、Houk Kendall. N.[2]、渡辺 賢二[1] ([1]静岡県大薬、[2]UCLA)
○ Shinji KISHIMOTO[1], Michio SATO[1], Cooper Jamieson[2], Mamoru YOKOYAMA[1], Kazuto NARITA[1], Naoya MAEDA[1], Yuta TSUNEMATSU[1], Kodai HARA[1], Hiroshi HASHIMOTO[1], Kendall. N. Houk[2], Kenji WATANABE[1] ([1]University of Shizuoka, [2]UCLA)

【背景・目的】糸状菌 *Chaetomium globosum* 由来の二次代謝物 Sch210972 (Sch) のオクタリン骨格は Diels-Alderase である CghA によって立体選択的に合成されている[1]。これまでに我々は CghA の触媒メカニズムに関する研究を展開しており、前年度大会にて CghA の結晶構造と合成基質を活用した CghA の立体選択性制御機構の解明を報告した[2]。CghA の触媒メカニズムにおいて残る未解明点は生成物阻害の回避機構である。Diels-Alder 反応では反応の遷移状態と生成物の構造が非常によく似ているため、何らかの制御がなければ生成物が反応を阻害してしまうと考えられている。実際に Diels-Alder 反応の遷移状態をハプテンとした抗体触媒は、Diels-Alder 反応を触媒するものの生成物が抗体内に留まるため反応速度が著しく小さい[3]。一方、CghA は抗体触媒よりも反応速度が明らかに大きく、生成物阻害を回避するメカニズムがあると考えられたため、これを明らかにするべく研究を行った。
【方法・結果】CghA と Sch の共結晶構造を精査することで CghA 中の Sch の立体配置を調べた。すると、Sch 単独の結晶ではテトラミン酸が *Z* 体の enol (**1**)として存在しているのに対して、CghA 中で Sch のテトラミン酸は *E* 体の enol (**2**)として存在していた。そこでこの二つの立体配置での基質のエネルギー差を計算したところ、*E* 体は *Z* 体よりも 2.8 kcal/mol エネルギーが高いことが明らかとなった。このことから CghA は酵素的に基質を *E* 体に異性化させていることが示唆されたため、テトラミン酸周辺のアミノ酸残基に変異を導入して酵素活性の変化を調べた。ケトンのカルボニル酸素に配位している Asn364 の変異で野生型の 10%程度まで活性が低下し、アミドのカルボニル酸素に配位している Ser65 の変異と Ser65 に水二分子を介して水素結合している Asn82 の変異ではそれぞれ野生型の 0.5%、2.5%とさらに顕著に活性が低下していた。
【考察】エネルギー計算の結果と変異体酵素の活性の変化から、CghA は Asn82 と Ser65 を介して基質を *E* 体へと誘導していることが示唆された。この結果と反応遷移状態のエネルギー計算から導き出した CghA の生成物阻害回避機構を含む触媒メカニズムの全容については本発表にて紹介する。


(*Z*)-enol (**1**)


(*E*)-enol (**2**)

【参考文献】

1. Sato M. et al. *ChemBioChem* **2015**, *16*, 2294.
2. 岸本ら. 日本農芸化学会 2019 年度大会（東京） **2019**, 3D2p09.
3. Heine, A. et al. *Science* **1998**, *279,* 1934.

Diels-Alder reaction, reaction mechanism, tautomer

講演番号：3B05p01
講演日時：3 月 27 日 13:50～ 総合学習プラザ B05 会場

トリコスタチン生合成マシナリーの *in vitro* 再構成
In vitro reconstruction of the trichostatin biosynthetic machinery
○青山 美和子[1]、湯澤 賢[1]、松田 悠太郎[2]、大澤 宏祐[3]、吉田 将人[3]、土井 隆行[3]、新家 一男[4]、西山 真[5,6]、葛山 智久[1,6] ([1]東大院・農生科、[2]東大・農、[3]東北大院・薬、[4]産総研、[5]東大・生物工学セ、[6]東大・微生物イノベ連携機構)
○Miwako AOYAMA[1], Satoshi YUZAWA[1], Yutaro MATSUDA[2], Kosuke OHSAWA[3], Masahito YOSHIDA[3], Takayuki DOI[3], Kazuo SHIN-YA[4], Makoto NISHIYAMA[5,6], Tomohisa KUZUYAMA[1,6] ([1]GSALS, UTokyo, [2]Fac. Agri., UTokyo, [3]Grad. Sch. Pharm. Sci., Tohoku Univ., [4]AIST, [5]BRC, UTokyo, [6]CRIIM, UTokyo)

【目的】Trichostatin A (TSA)[1]は放線菌が生産する天然化合物の一つであり、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC)の強力な阻害剤である[2]。HDAC は真核細胞の遺伝子発現調節に関わることから、TSA は抗がん剤としても期待されていた。実際に TSA を模倣して開発された SAHA (Vorinostat) は T 細胞性リンパ腫治療薬として承認されている。しかしながら、TSA は創薬における忌避構造であるアニリン構造を有することから、医薬品としての開発は断念されている。一方で TSA には様々な天然の類縁体が存在しており、それぞれ HDAC への阻害活性の強さが異なること、特定の HDAC を選択的に阻害することが示唆されている。そのため、TSA 類縁体についての研究は、適切に作用する抗がん剤の開発にとって重要な意味を持つ。放線菌 *Streptomyces* sp. RM72[3]において TSA は、ポリケタイド合成酵素 (polyketide synthase, PKS)である TsnB1, TsnB2, TsnB3 によって生成された Trichostatic acid (TS acid) が TsnB9 (アミド基転移酵素)により変換されて生合成される[4]。本研究では、TSA の母核である TS acid の生合成を *in vitro* で再構成することにより PKS に関する新たな知見を得ること、また、本 PKS の酵素改変により新たな TSA 類縁体を創出することを目的としている。
【結果】大腸菌における発現条件を検討した結果、TsnB1 (151 kDa), TsnB2 (192 kDa), TsnB3 (212 kDa) の組換え酵素を可溶性酵素として精製することに成功した。これら PKS に開始反応に関わる TsnB8 (メチル基転移酵素)と TsnB12 (CoA リガーゼ)を加え、*p*-aminobenzoate (PABA), SAM, ATP, Malonyl-CoA, Methylmalonyl-CoA, NADPH の存在下で反応させたところ TS acid の生成が確認された。なお、TsnB3 単独の系に TsnB2 によって生成されるポリケチド中間体を与えた場合は TS acid が生成された一方、TsnB1–3 の系に TsnB1 によって生成されるポリケチド中間体の SNAC 体を添加した実験では TS acid の生成は確認できなかった。この結果は、3 つの PKS が複合体を形成することによって、基質の取り込みが変化したことを示唆している。現在は、新たな TS acid の類縁体を生産するために PKS のドメイン交換[5]やドメインの不活化も行っており、本発表ではその取り組みに関しても報告する。

[1] Tsuji N. *et al. J. Antibiot.* **29**, 1 (1976)
[2] Yoshida M. *et al. J. Biol. Chem.* **265**, 17174 (1990)
[3] Hosoya T *et al. J. Nat. Prod.* **75**, 285 (2012)
[4] Kudo K. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **139**, 6799 (2017)
[5] Yuzawa S. *et al. ACS Synth. Biol.* **6**, 139 (2017)

trichostatin, Streptomyces, biosynthesis

発表責任者：葛山智久（utkuz@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3B05p02
講演日時：3 月 27 日 14:01～ 総合学習プラザ B05 会場

放線菌における新奇芳香環生合成マシナリーの解明
Novel biosynthetic machinery for aromatic ring in *Streptomyces*

○張 倢[1]、トン ウェイリー[1]、湯澤 賢[1]、白石 太郎[1]、新家 一男[2]、西山 真[3,4]、葛山 智久[1,4]（[1]東大院・農生科、[2]産総研、[3]東大・生物工学セ、[4]東大・微生物イノベ連携機構）
○Jie ZHANG[1], WeiLi THONG[1], Satoshi YUZAWA[1], Taro SHIRAISHI[1], Kazuo SHIN-YA[2], Makoto NISHIYAMA[3,4], Tomohisa KUZUYAMA[1,4]（[1]GSALS., UTokyo, [2]AIST, [3]BRC, UTokyo, [4]CRIIM, UTokyo）

【目的】リファンピシン耐性を獲得した放線菌 *Streptomyces* sp. SANK 60404 TW-R50-13 株は、メチルベンゼン骨格を共通に有しポリエン鎖長の異なる新奇な２つの天然化合物（CBT-1 と CBT-2）を生産する[1]。これらの２つの化合物は、安定同位体標識した前駆体（酢酸ナトリウム）を用いたトレーサー実験から、ポリケタイド合成系によって生合成されることが証明されている[1]。しかしながら、CBT-1 と CBT-2 を合成するポリケタイド合成酵素（polyketide synthase, PKS）は、分子系統解析によって、その生合成機構は既知のポリケタイド合成酵素とは異なる新奇なポリケタイド合成システム[2]であることが明らかになってきた。また、メチルベンゼン骨格を有する天然化合物の報告例はほとんど見当たらず、当然ながらその生合成機構に関する知見はまったくない。そこで本研究では、この２つメチルベンゼン骨格含有天然化合物の生合成マシナリーを同定し、その反応機構を明らかにすることを目的としている。
【 結果】SANK 60404 株のゲノムシーケンスの *in silico* 解析と遺伝子破壊実験により、CBT-1とCBT-2 が、30 kb からなる *mbg* 遺伝子クラスターによって生合成されると推測した。この遺伝子クラスター内には、アシルキャリアータンパク質（acyl carrier protein, ACP）、ケトシンターゼ（ketosynthase, KS）とデヒドラターゼ（dehydratase, DH）が複数存在するため、ポリエン鎖長の異なる CBT-1 と CBT-2 をどのように作り分けられているかは推定できなかった。そこで、各種遺伝子破壊株を作製してそれらの蓄積する化合物を LC-MS で分析したところ、新奇 II 型 PKS による鎖長の異なるポリエンの形成の後、末端ポリエンの異性化と環化に続く酸化による芳香化の三段階の反応によって、メチルベンゼン骨格が形成されることが示唆された。また、ポリエン構造とメチルベンゼン骨格形成に関与すると推定した遺伝子の各種組換え酵素を精製し、*in vitro* 反応解析を行ったところ、メチルベンゼン骨格を有する未同定の中間体を検出することができた。さらに、この *in vitro* 反応解析によって、ポリエン骨格からメチルベンゼン骨格を形成するためには機能未知の２つの酵素が必要であることが判明した。放線菌における新奇ベンゼン環合成機構の解明は、生体内における芳香環合成について新たな知見をもたらすとともに、生体触媒を用いた新たな芳香族化合物生産システムの構築への道を拓くと考えている。

[1] WL Tong, *et al*., *J. Nat. Prod.* **79**, 857-864 (2016)
[2] D Du, *et al*., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **57**, 1954-1957 (2018)

methylbenzene, Streptomyces, biosynthesis

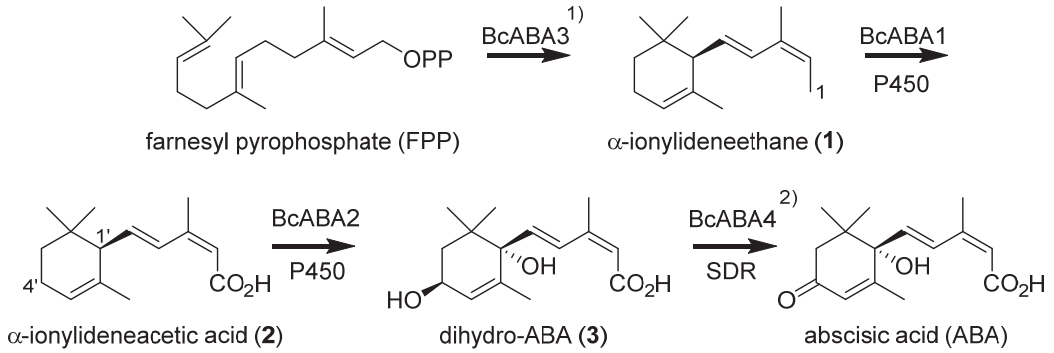
発表責任者：葛山智久（utkuz@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3B05p03
講演日時：3 月 27 日 14:12～ 総合学習プラザ B05 会場

麹菌異種発現系を用いた Abscisic Acid の生合成研究(4)
Biosynthetic study of Abscisic Acid utilizing *Aspergillus oryzae* heterologous expression system (4)
○瀧野 純矢、小崎 拓登、劉 成偉、尾崎 太郎、南 篤志、及川 英秋 (北大院理)
○Junya TAKINO, Takuto KOZAKI, Chengwei LIU, Taro OZAKI, Atsushi MINAMI, Hideaki OIKAWA (Fac. Sci., Hokkaido Univ.)

【目的・背景】植物ホルモンであるアブシジン酸 (ABA)は、植物の外的ストレスに応答するシグナル分子や植物の成長・休眠の調節因子として知られている。ABA は植物だけでなく、ある種の病原性糸状菌が生産し、宿主植物のホルモン作用を攪乱することで感染を容易にする機能が報告されている。糸状菌での ABA 生合成経路は、標識体の取り込み実験の結果より、ファルネシル二リン酸 (FPP)が環化して生成したα-ionylideneethane (1)を中間体とする経路が提唱されていたが、必要な酵素は同定されていなかった。昨年度の本会で、我々は遺伝子クラスター中の機能未知遺伝子 *bcABA3* が新規テルペン環化酵素として FPP から 1 への環化を触媒することを解明した[1)]。また、酸化還元酵素 BcABA4 は *in vitro* 実験を行い **3** の C4'位の水酸基を酸化して ABA を与えることを明らかにした[2)]。本研究では、糸状菌での ABA 生合成経路解明を目的とし、シトクロム P450: BcABA1, 2 の機能解析を行った。

【方法・結果】麹菌異種発現系によって構築した 3 種の形質転換体 (AO-*bcABA1*, AO-*bcABA2*, AO-*bcABA124*)に対して、酵素的に調製した **1** や **2** を基質とした微生物変換を行った。その結果、BcABA1 が 1 の側鎖末端メチル基 (C1)での酸化を触媒し **2** を与え、BcABA2 が **2** の 6 員環上（C1',C4'）での 2 段階の酸化反応を触媒することがわかった。これにより、糸状菌における ABA 生合成経路の全容解明に至った (下図)[2)]。また現在、特異な環化機構で **1** を与える新規テルペン環化酵素 BcABA3 の触媒機構を解明するために変異実験を行ったので、その結果も報告する予定である。



参考文献
1）*J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 12392−12395. 2) *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **2019**, *83*, 1642-1649.

Abscisic acid, Biosynthesis, Heterologous expression

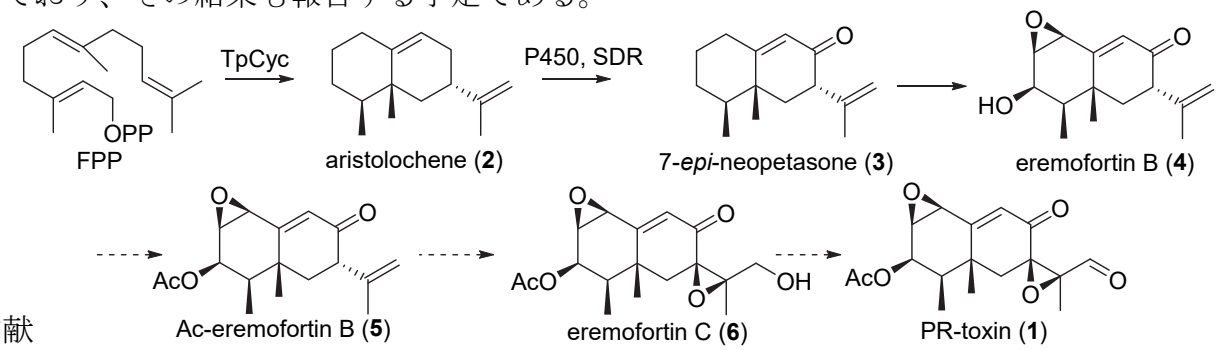
講演番号：3B05p04
講演日時：3 月 27 日 14:23～ 総合学習プラザ B05 会場

麹菌異種発現系を用いた PR-toxin の生合成研究
Biosynthetic study of PR-toxin by utilizing *Aspergillus oryzae* expression system

○佐藤 芳郎[1]、瀧野 純矢[1]、劉 成偉[1]、尾﨑 太郎[1]、丸山 潤一[2]、南 篤志[1]、及川 英秋[1]([1]北大院理、[2]東大院農)
○Yoshiro SATO[1], Junya TAKINO[1], Chengwei RYU[1], Taro OZAKI[1], Jun-ichi MARUYAMA[2], Atsushi MINAMI[1], Hideaki OIKAWA[1] ([1]Fac. Sci., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo)

【目的】PR-toxin (**1**)は、1973 年に青かび *Penicillium roqueforti* から単離された 6-6 員環構造を有するセスキテルペンであり、RNA 転写阻害やタンパク質合成阻害といった生物活性を示すマイコトキシンである。生産菌の PR-toxin 関連代謝産物や標識前駆体取り込み実験から、**1** の生合成経路が推定され[1]、さらには 2017 年に gene silencing に基づいた遺伝子クラスター (BGC)の候補の同定もなされていたが、その詳細は不明であった[2]。本研究では **1** の全生合成経路の解明を目的として、ゲノム編集を利用した麹菌異種発現系による酵素の機能解析を行った。

【方法・結果】我々は *Colletotrichum orbiculare* のゲノムマイニングにおいて、テルペン環化酵素を含む 3 種の遺伝子が **3** を与えることを報告した[3]。これらの遺伝子は **1** の BGC にも見いだされたため、生合成初期に作用することを確認すべく CRISPR/Cas9 のゲノム編集技術を用いて麹菌の高発現領域 HS801 へ導入した形質転換体を得た。その代謝産物を分析したところ、**3** の生産を確認した。BGC には 9 種の生合成遺伝子があり、うち 7 種は酸化酵素遺伝子であるため、その効率の良い機能解析が鍵となる。ゲノムデータベースから得られた相同な BGC を比較することにより、共通の遺伝子が生合成上流に作用すると仮定した。PR-toxin 関連代謝産物の中から、より酸化度の低い **4** を中間体と仮定すると、**3** から **4** への変換は単純な酸化反応と予想された。これらを基に **3** 生産株の HS201 領域に 3 及び 2 遺伝子を一組として分割導入すると、予想通り相同な BGC に共通して存在する酵素遺伝子により **4** への変換が見られた。現在、**4** までの生合成経路の解明とともに **4** 以降の反応の解析を進めており、その結果も報告する予定である。



参考文献
1)*Angew. Chem. Int. Ed.,* **2015**, *54,* 12167-12170. 2)*Appl Microbiol Biotechnol,* **2017**, *101* 2043-2056. 3)日本農芸化学会 2018 年度大会 2A17a13

Heterologous expression, *Aspergillus oryzae*, Crispr/cas9 genome editing

発表責任者：及川英秋（hoik@eis.hokudai.ac.jp）

講演番号：3B05p05
講演日時：3 月 27 日 14:34～ 総合学習プラザ B05 会場

カプサイシン生合成におけるバニリルアミン生成への推定アミノトランスフェラーゼの関与

Involvement of putative aminotransferase in the formation of vanillylamine in capsaicin biosynthesis

○中里 彩夏[1]、金島 一樹[1]、三澤 悠貴[1]、佐野 香織[1]、中谷 祥恵[1]、田中 義行[2]、古旗 賢二[1]([1]城西大学、[2]京都大学)
○Saika NAKASATO[1], Itsuki KANESIMA[1], Yuki MISAWA[1], Kaori SANO[1], Sachie NAKATANI[1], Yosiaki TANAKA[2], Kenji KOBATA[1] ([1]Josai Univ., [2]Kyoto Univ.)

【背景・目的】トウガラシには様々な辛味の強さを持つ品種が存在し、一般的によく知られている辛味品種にはハバネロやタカノツメがある。その辛味成分はカプサイシン（CAP）であることが知られている。CAP は体脂肪蓄積抑制効果のある成分として機能性食品への利用が期待されている。現在、トウガラシ果実の胎座における CAP 生合成経路は以下のように考えられている。推定アミノトランスフェラーゼ（putative aminotransferase, pAMT）がバニリン（V）をバニリルアミン（VNH_2）に変換し、さらに、カプサイシンシンターゼ（CS）が VNH_2と脂肪酸を脱水縮合して CAP へと変換する。しかし、トウガラシからこれらの酵素を精製して用いた研究報告はなく、これらの反応に pAMT や CS が関与していることは直接的に証明されていない。先行研究としてハバネロのリコンビナント pAMT（rpAMT）が作製されているが、この rpAMT では V から VNH_2への合成には至っていない。そこで、私たちは pAMT が CAP 生合成反応に関与しているかどうかを解明することを目的とし、大腸菌を用いて rpAMT を作製し、rpAMT に V から VNH_2を合成する活性があるかの検討を行った。
【方法・結果】ハバネロの胎座からクローニングした pAMT 遺伝子と His tag を共に組み込んだプラスミドを大腸菌 BL21（DE3）に形質転換した。IPTG を加えて遺伝子発現を誘導し、15℃で一晩タンパク質を合成させて集菌した。回収した大腸菌から rpAMT を Ni カラムで精製した結果、可溶性画分から SDS-PAGE における単一のバンドとして rpAMT を得ることができた。この rpAMT に基質として V、アミノ基供与体として γ-アミノ酪酸、補酵素としてピリドキサールリン酸を加え、30℃でインキュベートした。その結果、VNH_2の生成が HPLC-蛍光測定で認められた。以上のことから、V から VNH_2への合成には、pAMT が関与していることが強く示唆された。現在、ハバネロ胎座の p AMT 発現量と VNH_2合成活性の関連を調べており、実際にトウガラシ果実内で pAMT が CAP 合成に関与しているかを解析中である。

capsicum, putative aminotransferase (pAMT), recombinant protein

発表責任者：古旗　賢二（kobata@josai.ac.jp）

講演番号：3B05p06
講演日時：3 月 27 日 14:45～ 総合学習プラザ B05 会場

カプサイシン生合成における推定アミノトラスフェラーゼのアミノ酸置換の影響

Effect of amino acid substitution of putative aminotransferase in capsaicin biosynthesis

○金島 一樹[1]、中里 彩夏[1]、佐野 香織[2]、中谷 祥恵[1]、田中 義行[3]、古旗 賢二[1]([1]城西大院薬、[2]城西大理、[3]京都大)
○ Itsuki KANESHIMA[1], Saika NAKASATO[1], Kaori SANO[2], Sachie NAKATANI[1], Yoshiyuki TANAKA[3], Kenji KOBATA[1] ([1]Josai Univ ., [2]Josai Univ Faculty of Science., [3]Kyoto Univ.)

【背景・目的】

トウガラシはナス科トウガラシ属の植物で、辛味品種から無辛味品種まで幅広く存在している。トウガラシの辛味成分はカプサイシン (CAP) であることから、品種による辛さの違いは、この CAP の含有量に依存している。また、 CAP は体脂肪蓄積作用を有する事から、機能性食品としての利用が期待されている。トウガラシ生体内において CAP はバニリン (V) を原料として合成される。まず、推定アミノトランスフェラーゼ (putative aminotransferase, pAMT) が V をバニリルアミン (VNH_2) に変換し、更にカプサイシンシンターゼ (CS) が VNH_2 脂肪酸を脱水縮合させることで生成すると考えられている。このことから辛味品種と無辛味品種の CAP 含有量の違いの原因の 1 つとして、pAMT の活性の違いが考えられる。様々なトウガラシの品種から pAMT をクローン化すると、品種間でのアミノ酸配列は 98% 以上の相同性がある。このことから、この僅かなアミノ酸置換が pAMT の活性に影響を与え、トウガラシの辛味の違いに寄与しているのではないかと考えた。そこで、私たちは様々な品種のリコンビナント pAMT (rpAMT) を作製して、それらの VNH_2 合成活性を比較することでアミノ酸置換による影響を明らかにすることを目指した。

【方法・結果】

辛味品種としてハバネロ、チャラピタ、夢祭り、無辛味品種として CH-19 sweet の pAMT 遺伝子をクローニングした。4 品種の塩基配列情報から得られるアミノ酸配列を比較すると、品種間で数残基の違いが見られた。特に CH-19 sweet は C 末端の 29 残基が欠損していた。それぞれの pAMT を大腸菌発現用のベクターに組み込み、リコンビナントタンパク質の作製を試みた。その結果、ハバネロと夢祭りでのみ rpAMT を精製する事ができた。チャラピタ、 CH-19 sweet の rpAMT は可溶化効率が悪かった。ハバネロの rpAMT と夢祭りの rpAMT の VNH_2 合成活性を比較したところ、夢祭りの方が VNH_2 の合成活性は高かった。この 2 つの pAMT では 125 番目と 373 番目のアミノ酸が置換しており、これらの違いが VNH_2 の合成活性に影響を及ぼしている可能性がある。最終的な CAP 合成量は pAMT の活性に加え、pAMT の発現量にも依存すると考えられる。現在、残りの 2 品種の rpAMT について可溶化条件を検討しており、これらの精製とその活性測定を試みている。

Capsicum, putative aminotransferase(pAMT), iso form

発表責任者：古旗賢二（kobata@josai.ac.jp）

講演番号：3B05p07
講演日時：3 月 27 日 15:06～ 総合学習プラザ B05 会場

ラホヤマイシン生合成に関与する脂肪族ニトロ化酵素に関する研究

Study on the aliphatic nitration enzyme involved in lajollamycin biosynthesis

○冨田 宏矢[1]、勝山 陽平[1,2]、大西 康夫[1,2]（[1]東大院・農生科・応生工、[2]東大・微生物イノベ連携機構）
○Hiroya TOMITA[1], Yohei KATSUYAMA[1,2], Yasuo OHNISHI[1,2] ([1]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, Univ. of Tokyo)

【背景】放線菌は多種多様な二次代謝産物を生産することで知られるが、二次代謝産物の生合成には特異な反応を触媒する多くの酵素が関わることから、新規酵素の探索源としても非常に重要な研究対象である。以前、我々はニトロ基を持つ二次代謝産物に着目し、rufomycin 生合成においてチロシンの 3-ニトロ化を触媒するシトクロム P450 酵素 RufO を同定した [1)]。RufO は同一オペロン内にコードされる一酸化窒素合成酵素 (NOS) RufN から供給されると考えられる一酸化窒素を基質に用いる。このような直接的なニトロ化反応を触媒する酵素は、RufO およびトリプトファンのニトロ化を行う TxtE[2)] の 2 種類のみが知られる。本研究では、同様の反応機構を有する新たなニトロ化酵素の取得を目指し、P450 遺伝子と NOS 遺伝子が含まれる二次代謝産物生合成遺伝子クラスターの探索を進めた。
【結果】データベース検索により、いくつかの微生物ゲノムにおいて P450 遺伝子と NOS 遺伝子が二次代謝に関わると予想される遺伝子とクラスターを形成している例が見出された。これらのうち我々が今回着目した放線菌 *Streptomyces qinglanensis* では、ポリケタイド合成酵素 (PKS) 遺伝子および非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS) 遺伝子が混在したクラスター中に P450-NOS オペロンが存在した。このクラスターは oxazolomycin 生合成遺伝子クラスターと極めてよく似ており、このクラスに属するニトロ化合物 lajollamycin[3)]が生産物であると予想した。Lajollamycin は、その生合成機構が解明されていないものの、ポリエン構造の末端にニトロ基を持つことから、この P450 はこれまでに報告がない脂肪族化合物に対するニトロ化酵素であると期待される。まず *S. qinglanensis* の培養液抽出物を LC-MS で分析したところ、予想通り lajollamycin と思われる化合物の生産が確認された。続いて遺伝子クラスター内に存在する P450 の寄与を調べるため遺伝子破壊を試みたが、目的の遺伝子破壊株は得られなかった。そこで NOS 阻害剤を培地中に添加して培養を行ったところ、lajollamycin の生産が大幅に減少し、ニトロ基を持たない lajollamycin 類縁体が蓄積した。この結果から、lajollamycin のニトロ基の形成には一酸化窒素が使われることが強く示唆された。次に P450 によるニトロ化反応の基質を同定するため、ニトロ基のない lajollamycin 類縁体、生合成初期過程のキャリアタンパク質上のアシル鎖などを用いて *in vitro* 解析を進めた。しかしながら、いずれの場合においてもニトロ化反応は観察されなかった。現在、基質を同定しニトロ基の形成機構を明らかにすべく研究を行っている。

1) Tomita *et al.*, ***J. Biol. Chem.*** (2017)　2) Barry *et al.*, ***Nat. Chem. Biol.*** (2012)
3) Manam *et al.* ***J. Nat. Prod.*** (2005)

biosynthesis, cytochrome P450, nitration

講演番号：3B05p08
講演日時：3 月 27 日 15:17～ 総合学習プラザ B05 会場

2 つの II 型 PKS と FAS 間における ACP のクロストークに関する *in vitro* 解析

In vitro study on the cross-talk of ACPs among two type II PKSs and FAS

○堀内 真展[1]、杜 丹ヤオ[1]、勝山 陽平[1,2]、Burkart Michael D[3]、大西 康夫[1,2] ([1]東大院農生科・応生工、[2]東大・微生物イノベ連携機構、[3]UCSD, Dep. of Chem. and Biochem.)
○ Masanobu HORIUCHI[1], Danyao Du[1], Yohei Katsuyama[1,2], Michael D Burkart[3], Yasuo Ohnishi[1,2] ([1]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]UCSD, Dep. of Chem. and Biochem.)

【背景・目的】ポリケタイド合成酵素 (PKS) と脂肪酸合成酵素 (FAS) は、その触媒機構が類似しており、いずれにおいても反応中間体は acyl carrier protein (ACP) に結合した状態で各機能ユニットによる伸長・修飾反応を受ける。PKS、FAS には I 型と II 型のシステムがあり、I 型では各機能ユニットが連結して巨大なタンパク質を構成しているのに対して、II 型では各機能は別々のタンパク質が担っている。そのため、特に II 型システムにおいて、ACP と各機能タンパク質間の相互作用が触媒反応の制御に重要であると考えられる。Ishigamide は *Streptomyces* sp. MSC090213JE08 (JE08 株) から見出されたポリエン骨格を有するポリケタイドであり、このポリエン骨格は II 型 PKS である IgaPKS により生合成される。[1, 2] JE08 株は IgaPKS に加え、2 つの II 型システム (FAS および芳香族ポリケタイド okicenone の生合成を担う OkcPKS) を有する。一般に、これら II 型システムの ACP には、自身のシステム内のタンパク質とのみ相互作用する厳密な制御が存在すると考えられ、異なる II 型システム間でのクロストークは起こらないと言われているが、その詳細はわかっていない。そこで、II 型システム間で ACP のクロストークは起こり得るかを調べるとともに、ACP が目的のタンパク質と相互作用するメカニズムを解明することを目指した。
【方法・結果】PKS、FAS において最も重要な鎖伸長反応に着目し、ACP と ketosynthase (KS) 間の相互作用を調べた。初めに、IgaPKS の *in vitro* ポリエン骨格再構築系において、開始基質を hexanoyl-CoA から hexanoyl-ACP に置き換え、反応性を調べた。ACP には JE08 株が持つ FAS、IgaPKS、OkcPKS 由来の 3 種を用いた。その結果、FAS、OkcPKS 由来の ACP を用いた場合でもポリエンの生成が見られ、アシル基転移時は KS の ACP に対する特異性が低いことがわかった。次に 4'-ホスホパンテテインアナログの先端に alkene chloride が付加されたプローブを ACP にロードすることで、ACP と KS をクロスリンクさせる実験を行った。クロスリンク体は鎖伸長の際のクライゼン縮合時の中間体を模倣し、クロスリンク体の生成効率は ACP-KS 間の相互作用強度に依存すると考えられる。ACP には上記の 3 つ、KS には FAS と IgaPKS 由来のものを用いた。その結果、クロスリンク体は同じシステム由来の ACP と KS の間でのみ形成され、クライゼン縮合時には KS の ACP に対する特異性が高いことが示唆された。以上の結果より、KS-ACP 間の 2 つの相互作用 (アシル基転移、クライゼン縮合) では KS の ACP 認識メカニズムが異なることが示唆された。

[1] Du *et al*., **2016**, *Chembiochem*, 17, 15; [2] Du *et al*., **2018**, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*, 57, 7.

acyl carrier protein, polyketide synthase, protein-protein interaction

講演番号：3B05p09
講演日時：3 月 27 日 15:28～ 総合学習プラザ B05 会場

非リボソームペプチド cirratiomycin の生合成研究

Biosynthesis of the nonribosomal peptide cirratiomycin

○李 佳鳳[1]、曽根 薫[1]、新家 一男[2]、勝山 陽平[1,3]、大西 康夫[1,3]([1]東大院・農生科・応生工、[2]産総研、[3]東大・微生物イノベ連携機構)
○Jiafeng LI[1], Kaoru SONE[1], Kazuo SHIN-YA[2], Yohei KATSUYAMA[1,3], Yasuo OHNISHI[1,3] ([1]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., Univ. of Tokyo, [2]AIST, [3]CRIIM, Univ. of Tokyo)

【背景・目的】放線菌 *Streptomyces cirratus* No. 248 から単離された Cirratiomycin は、乳酸菌に対して抗菌活性を持つペプチド系抗生物質であり、[1)] ヒドロキシメチルセリン、(2*S*,3*S*)-ジアミノ酪酸 (DABA) などの非タンパク質性アミノ酸を含む。これらの非タンパク質性アミノ酸の生合成は未知であるため、その生合成機構を解明することを目的として、Cirratiomycin の生合成研究に取り組んだ。
【方法・結果】次世代 DNA シーケンサーによって *S. cirratus* No. 248 のゲノムを解析し、cirratiomycin 生合成に関わると考えられる遺伝子クラスターを見出した。本クラスターにはヒドロキシメチルセリンの生合成を担うと予想される FmoH ホモログ (Orf768) と非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS) がコードされている。FmoH は非リボソームペプチド JBIR-34, -35 の生合成において D-アラニンを α-メチル-L-セリンに変換する酵素であることから、[2)] 次に述べる 2 つのヒドロキシメチルセリン生合成経路が考えられた。(経路 A) Orf768 がアラニンをヒドロキシメチル化し、α-メチル-L-セリンを合成したのち、シトクローム P450 である Orf763 がこれを水酸化することによってヒドロキシメチルセリンを合成。(経路 B) Orf768 がアラニンではなくセリンをヒドロキシメチル化することによって直接ヒドロキシメチルセリンを合成。そこで、Orf768 の組換えタンパク質を用いて、いずれの経路が用いられているかを検証した。Orf768 を候補アミノ酸 (L-セリン、D-セリン、α-メチル-L-セリン、α-メチル-D-セリン、またはヒドロキシメチルセリン) およびヒドロキシメチル基のアクセプターであるテトラヒドロ葉酸 (THF) と反応させ、この酵素の逆反応触媒活性を調べた。その結果、Orf768 は、ヒドロキシメチル基を THF に移動することで、α-メチル-L-セリンから D-アラニンを、ヒドロキシメチルセリンからセリンを合成できることが示された。現在、より定量的な解析を行っている。次に、DABA を認識すると予想される NRPS である Orf764 の組換えタンパク質を調製し、DABA のアナログであるジアミノプロピオン酸を含む 7 種のアミノ酸を用いてアデニル化活性を調べたが、いずれのアミノ酸を用いた場合でも反応は見られなかった。現在、DABA を有機化学合成するとともに、DABA の生合成に関与すると予想される Orf799 と Orf803 について、組換えタンパク質による *in vitro* 解析を進めている。また、別の NRPS である Orf770 の組換えタンパク質を用いて解析した結果、この NRPS の A ドメインは L-アラニンを選択的に認識することが示され、ヘプタペプチドである cirratiomycin 中の L-アラニンは Orf770 によって取り込まれていることが強く示唆された。

1. Shiroza, *et al. Agric. Biol. Chem., 46,* 865, **1982**,; 2. Muliandi *et al., Chem. Biol., 21,* 923, **2014**

biosynthesis, nonribosomal peptide, cirratiomycin

講演番号：3B05p10
講演日時：3 月 27 日 15:39～ 総合学習プラザ B05 会場

JBIR-34,35 の生合成に関わる NRPS のクライオ電子顕微鏡による解析
Cryo-EM analysis of FmoA3, a NRPS involved in JBIR-34, -35 biosynthesis
○浦野 直樹[1]、勝山 陽平[1,2]、安達 成彦[3]、川崎 政人[3]、千田 俊哉[3]、大西 康夫[1,2]([1]東大院・農生科、[2]微生物連携機構、[3]高エネ機構・物構研)
○Naoki URANO[1], Yohei KATSUYAMA[1,2], Naruhiko ADACHI[3], Masato KAWASAKI[3], Toshiya SENDA[3], Yasuo OHNISHI[1,2] ([1]Grad. Sch.of Agric. and Life Sci., Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, [3]IMSS, KEK)

【背景・目的】非リボソームペプチド合成酵素（NRPS）は生産されるペプチドの一つ一つのアミノ酸の導入にそれぞれ対応するモジュールから構成されており、モジュールはペプチド結合形成に必要な個々の機能を有する複数のドメインからなる。NRPS 研究では、モジュールの組み合わせを変えることで本来の生産物とは異なる化合物を合成するように機能を改変する試みが盛んに行われているが、これを達成するためには、モジュール間相互作用やドメイン間相互作用の理解が必要である。FmoA3 は *Streptomyces* sp. Sp080513GE-23 が生産する非リボソームペプチド JBIR-34, -35 の生合成を担う NRPS の一つであり、1128 アミノ酸からなる単モジュール酵素である。すでに X 線結晶構造解析により、3 つの状態の FmoA3（apo 体、ATP アナログ結合体、α-methylserinyl-AMP 結合体）の構造を明らかにしているが、本研究では、クライオ電子顕微鏡（cryo-EM）解析により、FmoA3 の溶液中の構造を明らかにし、ドメイン間相互作用や構造変化を理解することを目指した。FmoA3 は分子量が大きく二量体を形成するため、cryo-EM による解析に適していると考えられる。なお、cryo-EM を用いて構造が解かれた NRPS はなく、The Electron Microscopy Data Bank（EMDB）には中解像度のネガティブ染色から得られた構造が一つ登録されているだけである。
【方法・結果】N 末端に His_6 tag、C 末端に Strep tag を融合した apo-FmoA3 を pColdI ベクターと大腸菌 BL21(DE3) を用いた系により調製し、Ni^{2+}, Strep-Tactin アフィニティークロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。得られた apo-FmoA3 を 20 mM HEPES 10%グリセロールのバッファー中で、-160℃以下に冷却した液化エタンを用いて急速凍結し、cryo-EM（Talos Arctica、Falcon3）で観察し Linear mode で 579 枚の画像を撮影した。RELION3 を用いて得られた画像から粒子を pick し二元分類を行い、二次元平均像を構築したところ、ダンベル状のモノマーが二量体を形成している様子が確認され、X 線結晶構造解析の結果と一致した。しかしながら、本解析では三次元マップの構築には至らなかった。バッファー中のグリセロールの影響で画像のコントラストが十分でないことが原因だと思われたため、凍結直前にグリセロールを含まないバッファーに置換するとともに、高い S/N 比を得るため Electron Counting mode で撮影したところ、FmoA3 の粒子がより明瞭に観察された。現在、550 枚の写真（0.88 Å/pixel）を用いて解析を進めている。将来的には、FmoA3 と相互作用する NRPS である FmoA2 との複合体の構造を cryo-EM で解析することや Fluorescence 共鳴エネルギー移動（FRET）を用いてドメイン間相互作用を解析することを計画している。

Nonribosomal peptide synthetase, cryo-EM, microorganism

発表責任者：浦野直樹（uprisingfollowme@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3B05p11
講演日時：3 月 27 日 15:50～ 総合学習プラザ B05 会場

放線菌が生産するジアゾ基含有トリペプチド alazopeptin の全生合成経路の解明

Elucidation of the whole pathway for the biosynthesis of alazopeptin, a diazo-containing tripeptide produced by actinomycetes

勝山 陽平[1,3]、○川合 誠司[2]、菅谷 優子[1]、冨田 宏矢[1]、大西 康夫[1,3] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]東大農・生命化学工学、[3]東大・微生物イノベ連携機構)
Yohei KATSUYAMA[1,3], ○Seiji KAWAI[2], Yuko SUGAYA[1], Hiroya TOMITA[1], Yasuo OHNISHI[1,3] ([1]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., The Univ. of Tokyo, [2]Fac. of Agric., The Univ. of Tokyo, [3]CRIIM, The Univ. of Tokyo)

【背景・目的】我々の研究室では以前、cremeomycin のジアゾ基形成に関与する CreE, CreD からなる亜硝酸生合成経路を発見したが、[1] この経路は他のジアゾ化合物の生合成にも関与すると予想される。Alazopeptin はジアゾ基を含む 6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DON) 2 分子と L-Ala が縮合したトリペプチドであり、*Streptomyces griseoplanus* および *Kitasatospora azatica* から単離されている。[2]昨年度の本大会では両菌株の alazopeptin 生合成遺伝子クラスターを示すとともに、その生合成経路の一部を発表し、ジアゾ基の形成には亜硝酸生合成経路が関与していることを示したが、[3]本研究では主に *S. griseoplanus* を用いて alazopeptin の全生合成経路の解明を目指した。

【結果・考察】安定同位体取り込み実験から DON の生合成は L-Lys が 5-hydroxylysine (LysOH) へと水酸化されることで開始されると考えられていたが、この反応を担う酵素はわかっていなかった。そこで、他とほとんど相同性を示さないタンパク質をコードする *azpK* および *azpL* の破壊株を作製し代謝解析したところ、いずれの破壊株でも alazopeptin や中間体が見られなかった。しかしながら、5-LysOH を *azpK* 破壊株の培養液に添加したところ濃度依存的に alazopeptin の生産が回復したことから AzpK が L-Lys の水酸化を担っていることが示唆された。一方、*azpL* 破壊株においては、DON の添加によって、alazopeptin の生産が回復した。AzpL は膜タンパク質と予想されたため *Streptomyces albus* で AzpL を異種発現させ、その膜画分を調製した。これを *in vitro* で亜硝酸、AzpL、5-LysOH、AzpJ (5-LysOH 脱水素酵素)、AzpI (DON アセチル化酵素) と反応させたところ、*N*-アセチル DON の形成が確認され、AzpL が DON のジアゾ基形成に関わることが強く示唆された。また、昨年度の大会で *N*-アセチル DON が carrier protein である AzpF にロードされ、さらに hydrolase AzpG によって脱アセチル化され DON-AzpF が生じることを *in vitro* 解析により示したが、それ以降の alazopeptin 生合成経路は不明であった。本研究では、hydrolase である AzpM が DON-AzpF から DON-DON への生合成を、ligase である AzpA が DON-DON に L-Ala を縮合する反応を担っていると予想し、これらの組換えタンパク質を調製し、*in vitro* 反応に供した。その結果、期待通り、DON-DON および alazopeptin の生成が認められ、*N*-アセチル DON から alazopeptin までの生合成経路がすべて明らかになった。

以上、DON の生合成を含めて、alazopeptin の全生合成経路が明らかになった。現在、*in vitro* 解析により、AzpK、AzpL および AzpM の触媒機構をより詳細に解明すべく研究を行っている。

[1] Sugai *et al.*, ***Nat. Chem. Biol.*** (2016). [2] Hata *et al.*, ***J. Antibiot.*** (1973). [3]講演番号: 1D2p03

biosynthesis, alazopeptin, actinomycetes

講演番号：3B05p12
講演日時：3 月 27 日 16:01～ 総合学習プラザ B05 会場

ビセニスタチン生合成におけるアシル基転移酵素 VinK とアシルキャリアタンパク質間の相互作用解析

Molecular interaction analysis between acyltransferase VinK and acyl carrier protein in Vicenistatin biosynthesis

○川田 浩一、千菅 太一、宮永 顕正、工藤 史貴、江口 正（東工大理）
○Koichi KAWADA, Taichi CHISUGA, Akimasa MIYANAGA, Fumitaka KUDO, Tadashi EGUCHI (Tokyo Tech. Sch. Sci.)

ビセニスタチンは放線菌 *Streptomyces halstedii* HC34 から単離されたβ-アミノ酸含有型マクロラクタム抗生物質であり、20 員環マクロラクタムにトリデオキシアミノ糖が結合した構造を有している。ビセニスタチン生合成経路の特徴の 1 つとして、アシル基転移酵素 VinK が単独で存在するアシルキャリアタンパク質（ACP）である VinL からポリケチド合成酵素（PKS）の開始モジュールに存在する VinP1LDACP にアシル基を受け渡す反応を触媒する点が挙げられる。我々は、VinK の 2 種類の ACP に対する認識機構に興味を持ち、これまで研究を進めてきた。このうち、VinL の認識機構については、ビスマレイミドエタンを用いたクロスリンク反応によって得られた VinK-VinL 複合体の X 線結晶構造解析によって既に明らかになっているが [1)]、VinP1LDACP の認識機構については不明であった。そこで、本研究では, VinK-VinP1LDACP 間の相互作用解析を行った。

はじめに、VinK の ACP 選択性を調査するため、VinP1LDACP や PKS の伸長モジュールに存在する他の ACP を用いて *in vitro* 反応を行い、HPLC で解析した。その結果、VinP1LDACP にのみ、アシル基が受け渡されたことから、VinK が VinP1LDACP を選択的に認識していることが明らかになった。次に、相互作用に重要なアミノ酸残基を特定するため、VinK-VinP1LDACP 複合体の X 線結晶構造解析を試みた。結晶化に適した安定な酵素複合体を得るためにブロモアセトアミド部位を有するパンテテイン型プローブを用いたクロスリンク反応を検討した。VinK の触媒残基であるセリンをシステインに変異させたところ、位置特異的に結合した酵素複合体が得られた。現在、精製した酵素複合体を用いて結晶化条件の検討を行っている。

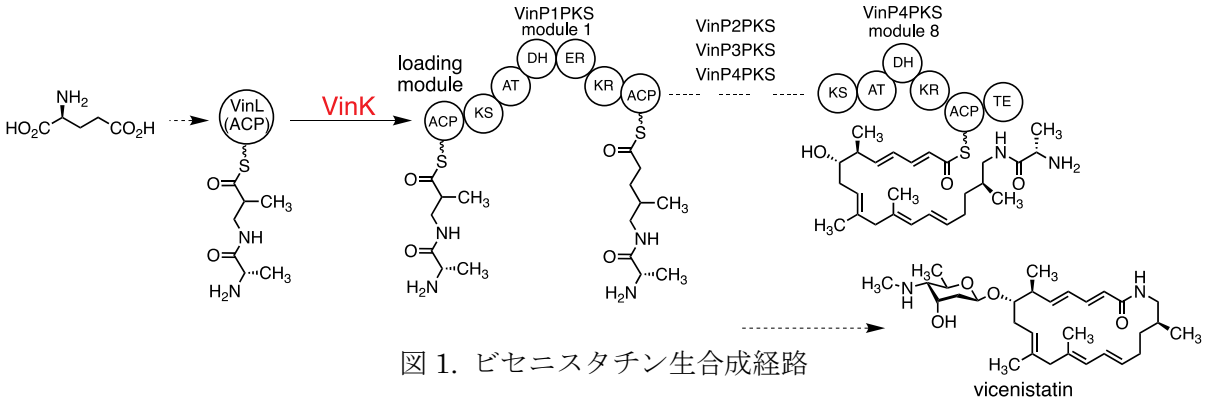


図 1. ビセニスタチン生合成経路

1）Miyanaga, A. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2016**, 113, 1802-1807.

polyketide, acyltransferase, protein-protein interaction

発表責任者：江口 正（eguchi@chem.titech.ac.jp）

講演番号：3B05p13
講演日時：3 月 27 日 16:21～ 総合学習プラザ B05 会場

コナダニ類に由来する脂肪族ギ酸エステルの生合成
Biosynthesis of aliphatic formate in astigmatid mites

○森山 太介、荒谷 剛史、清水 伸泰（京都先端科学大学)
○Daisuke MORIYAMA, Tsuyoshi ARAYA, Nobuhiro SHIMIZU (Kyoto University of Advanced Science)

【背景と目的】

ネダニモドキ属の一種 *Sancassania* sp. Sasagawa（ササガワダニ）は動物にとって必須脂肪酸である linoleic acid (LA) の生合成能を有する。先行研究において、同位体標識化合物を用いた取り込み実験が行われ、分泌成分の一つである (*Z*,*Z*)-8,11-heptadecadienyl formate (8,11-F17) は LA から誘導されることが証明された [1)]。さらに 8,11-F17 は生合成的に考えると、LA から誘導された linoleyl aldehyde (LAld) を直接の前駆体とした Baeyer-Villiger 酸化反応により生成されることが強く示唆された。Baeyer-Villiger 酸化酵素 (BVMO) は微生物や植物 [2)]、ヒトの肝臓 [3)]などから発見されており、主に環状ケトンをラクトンに、芳香族ケトンをエステルに変換する反応を触媒する。しかし、ダニ由来の BVMO は脂肪族アルデヒドをギ酸エステルに変換できることから、従来の BVMO とは反応形式が異なる。このような背景のもと我々は、8,11-F17 の生合成に関与する BVMO の同定および生成機構の解明を目指している。

【方法と結果】

日本農芸化学会 2018 年度大会では、ダニ粗酵素液に LAld を基質として加えると 8,11-F17 が生成することを報告した。今回は遠心分画法により粗酵素液を分画し、各画分による 8,11-F17 への変換条件を検討した。ダニに Tris-HCl buffer（スクロースを含む）を加えホモジネートした後、遠心分離で核画分、ミトコンドリア画分、ミクロソーム画分、細胞質画分にそれぞれ分画した。得られた画分に LAld を加えて 8,11-F17 への変換の有無を GC-MS で確認した。結果としてミクロソーム画分にのみ酵素活性が確認できた。さらにミクロソーム画分について、同位体標識 LAld を基質とした酵素反応を検討したので、それらの結果を併せて報告する。

1) N. Shimizu *et al*. *PNAS* 114, 2616-2621, 2017
2) H Leisch *et al. Chem. Rev.* 111, 4165-4222, 2011
3) W. George Lai *et al. Drug Metab. Dispos.* 39, 61-70, 2011

Baeyer-Villiger oxidation, Aliphatic formate, Mite

発表責任者：清水　伸泰（shimizu.nobuhiro@kuas.ac.jp）

講演番号：3B05p14
講演日時：3 月 27 日 16:32～ 総合学習プラザ B05 会場

ベンザスタチン生合成においてニトレン中間体を介した環化反応を触媒する P450 の X 線結晶構造解析

X-ray crystal structure analysis of a cytochrome P450 that catalyzes cyclization via a nitrene intermediate in benzastatin biosynthesis

○堤 隼馬[1]、浦野 直樹[1]、勝山 陽平[1,2]、大西 康夫[1,2] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]東大・微生物イノベ連携機構)
○Hayama Tsutsumi[1], Naoki Urano[1], Yohei Katsuyama[1,2], Yasuo Ohnishi[1,2] ([1]Grad. Sch. Agri. and Life Sci., Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, Univ. of Tokyo)

【背景・目的】ベンザスタチン（BS）類はゲラニル二リン酸（GPP）と *p*-アミノ安息香酸類から生合成される化合物群であり、インドリン骨格やテトラヒドロキノリン骨格という特徴的な二環性骨格を有する。[1] 我々は *Streptomyces* sp. RI18 株由来 BS 類生合成遺伝子クラスターの機能解析を行うことにより BS 類の生合成経路の全体像を明らかにしてきた。[2] この生合成経路においてシトクロム P450 である BezE は天然物生合成において前例のない環化反応を触媒する。BezE は最初に基質であるゲラニル化 *p*-acetoxyamino benzoic acid 類の酢酸を脱離させ、基質中の窒素と自身のヘム鉄との間で鉄-ナイトレノイドを形成する。次に生じたニトレンを基質中の二重結合に付加することでアジリジン環を含む三環性中間体を形成する。最後に水もしくは塩化物イオンの求核攻撃を介したアジリジン環開裂を触媒することにより二環性骨格を形成する。[2] この前例のない反応の詳細を解析するため、我々は BezE の X 線結晶構造解析を行い、その反応機構の解明を試みた。
【結果・考察】種々の条件検討を行ったが BezE の結晶を取得することはできなかったため、BezE ホモログである *Lentzea waywayadensis* 由来の BezE (LwBezE、相同性 89%) に着目した。条件検討の結果、LwBezE は基質アナログ (ゲラニル化-*p*-アミノ安息香酸) 存在下でのみ結晶化することがわかった。この結晶に X 線を照射した結果、最高分解能 2.5 Å の回折像が得られ、分子置換法を用いて基質アナログが結合した LwBezE の構造を決定することができた。LwBezE の全体構造は CYP161 ファミリーの P450 と類似していたが、C ヘリックスが短くなっていた。また、同ファミリーにおいて基質との複合体では安定化している B-C ループがディスオーダーしていた。LwBezE の基質ポケットに着目すると、I ヘリックス上の Arg と Asn の 2 つのアミノ酸が基質アナログのカルボン酸に近接していたが、部位特異的変異導入実験によって、両アミノ酸残基が活性に重要であることが示された。また、P450 に広く保存されており酸化活性に重要であると提唱されている I ヘリックス上の Thr-Glu が BezE においても保存されていたが、部位特異的変異導入実験によって、両者のうち Thr のみが活性に関与していることが明らかになった。この Thr は鉄-ナイトレノイドの形成反応に重要であると考えられる。一方、二環性骨格を形成するためのアジリジン環の開裂にはディスオーダーした B-C ループが関与することが構造から予想された。現在、求核的な塩化物イオンの付加反応機構を解明するため、この B-C ループに保存された極性アミノ酸に変異を導入した酵素の解析を行っている。

1) Motohashi, K, *et al. J. Antibiot* 64, 281 (2011); 2) Tsutsumi, H, *et al. J. Am. Chem. Soc*. 140, 6631 (2018)

Cytochrome P450, Nitrene transfer, Biosynthesis

講演番号：3B05p15
講演日時：3 月 27 日 16:43～ 総合学習プラザ B05 会場

cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD)がトウガラシのカプシエイト生合成のキー酵素である
cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) is the key enzyme for the biosynthesis pathway of capsiate in chili pepper

○鵜澤 雄也[1]、金島 一樹[2]、中里 彩夏[3]、佐野 香織[1]、橋本 雅司[1]、中谷 祥恵[2]、古旗 賢二[2]([1]城西大・理・化学、[2]城西大・院・薬科学、[3]城西大・薬・薬科学)
○Yuuya Uzawa[1], Ituki Kanesima[2], Saika Nakasato[3], Kaori Sano[1], Masasi Hasimoto[1], Satie Nakatani[2], Kenji Kobata[2] ([1]Faculty of Science, Josai Univ., [2]Graduate school of Pharmaceutical Sciences, Josai Univ., [3]Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Josai Univ.)

【背景・目的】トウガラシには辛味品種、無辛味品種、またはその中間の様々な辛みの品種が存在する。辛味成分としてカプサイシンが知られており、様々な辛みの強さはこのカプサイシンの含有量に依存している。一方、無辛味品種の中には、カプサイシをほとんど含まない代わりにカプシエイトを含むものがある。カプサイシンとカプシエイトはともに植物体が合成したバニリンを材料として合成される。カプサイシンの生合成経路は、推定アミノトランスフェラーゼ(putative aminotransferase, pAMT)によりバニリンがバニリルアミンとなり、カプサイシンシンターゼ(capsaicin synthase, CS)がこれをカプサイシンへと変換すると考えられている。一方、カプシエイト合成ではバニリンがバニリルアルコールに還元され、それが CS によってカプシエイトへと変換されると考えられているが、この経路でバニリルアルコールを合成する酵素はいまだ同定されていない。そこで我々は、バニリンをバニリルアルコールに還元する酵素の同定を試みた。
【実験・結果】バニリン還元酵素の候補として cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD)に着目した。CAD はリグニン合成に関与する酵素で、様々な植物において多様なアルデヒドを還元することが知られている。まず初めにカプシエイトを含むトウガラシ無辛味品種の 1 つである CH-19 sweet (*Capsicum annuum*)における CAD 遺伝子の発現を解析した。その結果 CAD 遺伝子がカプシエイト合成組織である胎座で十分に発現していることが明らかとなった。そこで、CH-19 sweet から CAD の cDNA をクローニングし、大腸菌を用いてリコンビナント CAD (rCAD)を作成した。rCAD とバニリンを反応させたところ、バニリルアルコールが合成され、バニリン還元活性を持っていることが明らかとなった。この反応系に CAD の特異的阻害剤として報告されている *N*-(*O*-aminophenyl) sulfinamoylter-tiobutyl acetate (OHPAS)を加えたところ、OHPAS の濃度依存的にバニリルアルコール生成が抑えられた。次に CH-19 sweet の胎座の懸濁液を作成して、これにバニリンを加えたところ、バニリルアルコールが合成された。この系に OHPAS を加えると、バニリルアルコール合成量は rCAD の時と同様に OHPAS の濃度依存的に減少した。以上のことから、トウガラシ植物体内においてバニリルアルコールの合成を担っている酵素は CAD であることが示唆された。

Capsicum, capsiate, cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD)

発表責任者：古旗賢二（kobata@josai.ac.jp）

講演番号：3B05p16
講演日時：3 月 27 日 16:54～ 総合学習プラザ B05 会場

辛味度の異なるトウガラシ品種におけるバニリルアミン合成能と推定アミノトランスフェラーゼ発現量の関連
Relationship between vanillylamine synthetic ability and putative aminotransferase expression in Capsicum cultivars with different pungency
○三澤 悠貴[1]、田中 義行[2]、中谷 祥惠[1]、古旗 賢二[1]([1]城西大院薬、[2]京都大院農)
○Yuki MISAWA[1], Yoshiyuki TANAKA[2], Sachie NAKATANI[1], Kenji KOBATA[1] ([1]Josai Univ., [2]Kyoto Univ.)

【目的】
カプサイシン（CAP）はナス科トウガラシ属（*Capsicum* 属）持有の辛味成分である。CAP の生合成にはバニリン（V）からバニリルアミン（VNH_2）への合成段階があり、この反応は推定アミノトランスフェラーゼ(putative aminotransferase：pAMT）が触媒していると推定されている。本研究では辛味度が異なる *C. chinense* 栽培品種を用いて、VNH_2合成における pAMT の関与を明らかにすることを目的とした。
【材料・方法】
C. chinense 栽培品種として、辛味の強い Red Habanero（RH）、中程度の辛味を示す Devil's Yellow (DY)、辛味の低い LP13 を用いた。緑熟果実の胎座をリン酸カリウム緩衝液(PKB)中でホモジナイズし、遠心後上清を得た。上清に基質として V、アミノ基供与体として γアミノ酪酸（GABA)、補酵素としてピリドキサールリン酸（PLP）を加え 30℃で 24 時間インキュベートし、生成する VNH_2量を HPLC-蛍光で測定した。一方、胎座における pAMT の mRNA 発現量をリアルタイム PCR にて測定した。さらに、各品種の果実中のカプサイシノイド（CAP+ジヒドロカプサイシン）含量を HPLC-UV で測定した。
【結果・考察】
胎座懸濁液上清の VNH_2合成活性は RH が最も高く 61.9 μg／g 胎座・24h で、DY、LP13 はそれぞれ 26.1 μg／g 胎座・24h、 7.5 μg／g 胎座・24h であった。胎座における pAMT の mRNA 発現量は、RH が最も高く、DY、LP13 はそれぞれ RH の 1/10、1/30 であった。果実のカプサイシノイド含量は RH が最も高く 14264.7 μg／g dry weight (DW)、次いで DY、LP13 であり、それぞれ 4084.4 μg／g DW、162.9 μg／g DW であった。以上のように、VNH_2合成活性、pAMT の mRNA 発現量およびカプサイシノイド含有量に正の相関がみられたことからトウガラシの CAP 生合成において、pAMT が V から VNH_2への合成を触媒していることが強く示唆された。今回用いた品種間の pAMT 発現レベルの相違は、イントロンにおけるトランスポゾン挿入位置の違いがスプラシング効率を変化させたことによるものであると考えられる。

Capsicum cultivars, putative aminotransferase, capsaicin

発表責任者：古旗賢二（kobata@josai.ac.jp）

講演番号：3B06a01
講演日時：3 月 27 日 09:30～ 総合学習プラザ B06 会場

卵巣摘出ラットにおける骨髄ステロール量の変動

Changes of sterols in bone marrow of ovariectomized rats

○江口 小百合[1]、宮﨑 優里花[1]、小野 雅博[1]、城内 文吾[2]、佐藤 匡央[2] ([1]九大院生資環、[2]九大院農)
○Sayuri EGUCHI[1], Yurika MIYAZAKI[1], Masahiro ONO[1], Bungo SHIROUCHI[2], Masao SATO[2] ([1]Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu Univ., [2]Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Graduate School, Kyushu Univ.)

【目的】骨粗鬆症とは低骨量と骨組織の微細構造の異常を特徴とする疾患であり、罹患すると骨の脆弱性が増大し、骨折の危険性が高まる。先の報告において骨髄脂肪の増加と骨量減少には相関があることが示されており、骨髄脂肪の増加が骨粗鬆症のリスクとなる可能性がある。しかし、骨粗鬆症における各種骨髄脂質成分の変動についての報告は少ない。そこで本研究では、骨粗鬆症モデルである卵巣摘出（OVX）ラットを用いて骨量減少が骨髄脂質成分の変動に与える影響を調査した。

【方法】11 週齢雌性 Sprague-Dawley 系ラットに卵巣摘出（OVX）手術または偽（Sham）手術を施し、1 週間の回復期間の後、各群に AIN-76 組成に準じた 0.5%コレステロール添加食を 4 週間 pair-feeding にて摂食させた。飼育終了後 9 時間絶食させ、イソフルラン麻酔下で大動脈採血により屠殺し、肝臓、大腿骨を摘出した。手術の確認として血漿コレステロール濃度を酵素法により測定した。摘出した大腿骨は実験動物用 X 線 CT 装置（Latheta LCT-100）を用いて骨密度および骨強度を測定した。また、血漿および骨髄中の各種ステロール量を GC-FID および GC-MS を用いて測定した。

【結果】終体重、体重増加量、摂食量、摂食効率に群間で有意な差は認められなかった。血漿コレステロール濃度は、Sham 群と比較して OVX 群で有意に高値を示したことから、エストロゲン枯渇状態の誘導が確認された。さらに、大腿骨の骨密度を測定したところ、皮質骨密度、海綿骨密度、全骨密度および骨梁密度は Sham 群と比較して OVX 群で有意に低値を示し、骨強度の指標である最小断面 2 次モーメントおよび断面 2 次極モーメントは低下傾向を示したことから、OVX 群においてエストロゲン枯渇による骨密度および骨強度の低下が示された。続いて、OVX 群の血漿カンペステロール濃度が上昇傾向を示したのに対し、骨髄中ではコレステロールおよびカンペステロール濃度は有意な低下を示した。植物ステロールであるカンペステロールは体内で合成されず食餌由来であるため、OVX 手術による骨粗鬆症モデルラットにおいて、骨髄へのステロールの取り込みが低下したあるいは排出が促進された可能性が示唆された。

osteoporosis, lipids in bone marrow, sterols

講演番号：3B06a02
講演日時：3 月 27 日 09:41～ 総合学習プラザ B06 会場

脂肪細胞機能調節におけるイソプレノイド合成経路の役割の検討

Study on the role of isoprenoid biosynthesis pathway in the regulation of adipocyte function

○後藤 剛[1,2]、Yeh Yu-Sheng[1]、Kwon Jungin[1]、Jheng Huei-Fen[1]、高橋 春弥[1]、野村 亘[1,2]、井上 和生[1]、河田 照雄[1,2] ([1]京都大院・農、[2]京都大・学際融合教育研究推進センター)
○Tsuyoshi Goto[1,2], Yu-Sheng Yeh[1], Jungin Kwon[1], Huei-Fen Jheng[1], Haruya Takahashi[1], Wataru Nomura[1,2], Kazuo Inoue[1], Teruo Kawada[1,2] ([1]Grad. Sch. of Agricul., Kyoto Univ., [2]C-PIER., Kyoto Univ.)

【目的】脂肪組織は生体最大のコレステロール貯蔵組織であり、コレステロール代謝恒常性維持において重要な役割を担っていると考えられる。コレステロールはイソプレノイド合成経路により生合成される。イソプレノイド合成経路はコレステロール以外にも種々の代謝物質の生産を担っているが、脂肪組織を主に構成する脂肪細胞におけるイソプレノイド酸合成経路の生理的意義については不明な点が多い。そこで、本研究ではメバロン酸合成経路の脂肪細胞における生理的役割について明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】Cre-loxP システムを用いてイソプレノイド合成経路の律速酵素である HMG-CoA 還元酵素（HMGCR）を脂肪細胞特異的に欠損させたマウス（aKO マウス）を作成・解析した。aKO マウスでは全身性の顕著な脂肪萎縮が認められ、高血糖、インスリン抵抗性、耐糖能異常、高中性脂肪血症、高コレステロール血症、脂肪肝をはじめとする各種代謝異常症を呈した。aKO マウスで認められたこれらの代謝異常症は、野生型マウス由来白色脂肪組織の皮下移植によってほぼ完全に回復したことから、aKO マウスの代謝異常は脂肪組織の機能不全に起因することが明らかになった。HMGCR flox マウスより単離した前駆脂肪細胞を分化誘導後、Cre 組換え酵素によって HMGCR を欠損させたところ、アポトーシスによる細胞死が誘導された。HMGCR 欠損による脂肪細胞のアポトーシスは、イソプレノイド化合物である geranylgeranyl pyorophosphate (GGPP) 添加により回復した。脂肪細胞において、GGPP 合成酵素をノックダウンするとアポトーシスの亢進が認められた。

【結論】イソプレノイド合成経路は脂肪細胞の GGPP 産生を介して脂肪細胞の生存に必須の役割を担うことが示された。

adipocyte, isoprenoid synthesis pathway, obesity

発表責任者：後藤剛（tgoto@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3B06a03
講演日時：3 月 27 日 09:52～ 総合学習プラザ B06 会場

CYP7B1 and its function on the progression of non-alcoholic steatohepatitis

○ Napatsorn DUMRONGKULCHART, Yuichi WATANABE, Makoto SHIMIZU, Yoshio YAMAUCHI, Ryuichiro SATO (Dept. of Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. of Agr. and Life Sci., Univ. of Tokyo)

The progression from simple steatosis to steatohepatitis (NASH) in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is multifactorial and accompanying with inflammation and lipotoxicity. However, the detailed mechanism remains unclear. In NAFLD patient plasma, 25-hydroxycholesterol (25-HC) and 27-hydroxycholesterol (27-HC), cholesterol derivatives known for regulating lipid metabolism and immune signaling, are reported to rise with NAFLD activity score relativity. Here, we focused on relationship of the oxysterols and progression of NASH in methionine choline deficient (MCD) diet-fed mice. Feeding with MCD diet for 4 and 8 weeks caused suppression of the gene encoding oxysterol-7α-hydroxylase, *Cyp7b1,* in liver. This change was accompanied with the elevation of hepatic oxysterols, specifically its substrate, 25-HC and 27-HC. Recovering *Cyp7b1* expression by adeno-associated virus (AVV) in MCD diet-fed mice lowered lipid accumulation and serum aspartate transaminase (AST) and alanine transaminase (ALT) level. Moreover, *Cyp7b1* reduced expression of inflammatory cytokine, tumor necrosis factor-α (*Tnf-α*), and attenuated hepatic expression of fibrogenesis markers including α-smooth muscle actin (*α-Sma*). These results suggest loss of *Cyp7b1* induces elevation of oxysterols which aggravates hepatic inflammation and fibrosis in MCD diet-induced NASH.

non-alcoholic fatty liver disease, oxysterol, inflammation

講演番号：3B06a04
講演日時：3 月 27 日 10:03～ 総合学習プラザ B06 会場

非アルコール性脂肪肝を制御する新たな転写因子の同定
Identification of a novel transcription factor which regulates nonalcoholic fatty liver disease
○清水 誠[1]、不野 歩美[1]、梅村 真理子[2]、高橋 勇二[2]、山内 祥生[1]、佐藤 隆一郎[1] ([1]東京大農、[2]東京薬大生命)
○ Makoto SHIMIZU[1], Ayumi FUNO[1], Mariko UMEMURA[2], Yuji TAKAHASHI[2], Yoshio YAMAUCHI[1], Ryuichiro SATO[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Tokyo Univ. of Pharma.)

脂肪肝は、肝細胞内に中性脂肪（トリグリセリド）が過剰に沈着する疾患である。飲酒歴を伴わない脂肪肝は非アルコール性脂肪肝（NAFLD）と呼ばれており、我が国の患者数は 2000 万とも推定されている。脂肪肝が進行すると、脂肪肝炎や肝硬変など重篤な疾患に繋がるため、その発生機序の解明や予防・軽減法の確立は喫緊の課題である。

これまで我々は、抗肥満ホルモン FGF21（Fibroblast growth factor 21）の発現制御因子の研究を行ってきた。その過程で、FGF21 が小胞体ストレス応答性転写因子 ATF4 の標的遺伝子であること、非アルコール性脂肪肝モデル（メチオニンコリン欠乏食）において ATF4-FGF21 経路がネガティブフィードバック機構を有することを見出しできた。また最近、肝臓に高発現し、ATF4 と構造が類似する転写因子 ATF5（activating transcription factor 5）も FGF21 の新たな発現調節因子であることを同定した。興味深いことに ATF5 の発現は様々な非アルコール性脂肪肝モデルで増加する。以上の背景から、脂肪肝における ATF5 の機能解明を目的として研究を行った。

野生型マウスと ATF5 欠損マウスに脂肪肝モデル食（低タンパク質食、4%カゼイン）を 3 週間与え、肝臓の様々なパラメーターを解析した。その結果、ATF5 欠損マウスでは肝臓のトリグリセリドの蓄積が有為に減少することを見出した。次に遺伝子発現解析により、ATF5 欠損マウスでの脂肪肝改善に関与する標的遺伝子の同定を試みた。その結果、抗肥満ホルモン FGF21 や脂肪酸分解に関与する酵素群の発現変動は認められなかった。低タンパク質食誘導性脂肪肝では、肝臓からのトリグリセリドの分泌が障害されることが知られている。LPL 阻害剤を用いた実験の結果、ATF5 欠損マウスでは肝臓からのトリグリセリド分泌が増加することが示された。一方、VLDL の形成・分泌に重要なタンパク質(MTP、apoB)やリン脂質の変動は認められなかった。リアルタイム PCR を用いて発現プロファイリングを行った結果、ATF5 はリポタンパク質代謝に関与する遺伝子を制御し得ることを見出した。この遺伝子は ATF5 欠損マウスで低下し、アデノウイルスで肝臓に強制発現させると肝トリグリセリドが増加する。

以上の結果より、ATF5 は低タンパク質食誘導性脂肪肝において発現が増加し、肝臓の脂質蓄積を正に制御することが示された。

ATF5, fatty liver, low protein

講演番号：3B06a05
講演日時：3 月 27 日 10:14～ 総合学習プラザ B06 会場

寒冷刺激に応答する転写因子 ATF5 の機能解析

Functional analysis of cold induced transcription factor, ATF5

○不野 歩美[1]、清水 誠[1]、梅村 真理子[2]、高橋 勇二[2]、佐藤 隆一郎[1] ([1]東京大 農生科 応生化、[2]東京薬大)
○Ayumi FUNO[1], Makoto SHIMIZU[1], Mariko UMEMURA[2], Yuji TAKAHASHI[2], Ryuichiro SATO[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. of Tokyo, [2]Tokyo Univ. Pharm and Life Sciences)

【背景・目的】肥満と高血圧、高血糖、脂質異常症のうち 2 つ以上を併発した状態はメタボリックシンドロームと呼ばれ、動脈硬化など重篤な疾病へのリスクファクターであることが知られている。そのため肥満の制御機構の解明は重要な課題の一つである。近年肥満改善のターゲットとして注目されているのが褐色脂肪組織(brown adipose tissue; BAT)である。BAT はミトコンドリアを豊富に含み、脂肪酸やグルコースの代謝で生じたエネルギーを熱エネルギーに変換するタンパク質である UCP1(uncoupling protein 1)が多く存在する。BAT の活性化により肥満が改善することが知られている。これらの背景から、BAT における脂質代謝のメカニズムの解明を目的とした。

これまでの研究で寒冷刺激により転写因子 ATF5(activating transcription factor 5)の発現が BAT で選択的に亢進すること、ATF5 欠損マウスでは寒冷下での呼吸交換比が変動することを見出している。本研究では、寒冷刺激による ATF5 の機能や発現制御の詳細な解析を行った。

【方法】野生型マウスと ATF5 欠損マウスに寒冷刺激を与え、BAT やエネルギー代謝に関与する各組織の遺伝子発現と血中成分の解析を行った。また、寒冷刺激を与えた BAT の RNA を用いてトランスクリプトーム解析を行った。さらに褐色脂肪様に分化する HB2 細胞において、ATF5 のプロモーター領域を挿入したレポータープラスミドを用いて発現制御機構を検証した。

【結果】野生型マウスと ATF5 欠損マウスで、寒冷時の BAT での UCP1 の発現、及び各脂肪組織における脂肪分解酵素や脂肪酸 β 酸化関連因子の発現に有意な差はみられなかった。肝臓では ATF5 欠損マウスで解糖系関連因子の発現が低下傾向であった。血中の脂肪酸・グルコース・ノルエピネフリン濃度に有意な差は見られなかった。トランスクリプトーム解析の結果、ATF5 欠損マウスの BAT で発現が低下するいくつかの遺伝子を同定した。また、レポーターアッセイでは寒冷刺激で誘導されるストレス応答性転写因子 ATF4(activating transcription factor 4)により ATF5 のプロモーター活性が亢進した。

【考察】ATF5 の欠損により寒冷時肝臓での糖代謝が低下し、脂質代謝に移行している可能性が示唆された。また、BAT において ATF5 は寒冷刺激で活性化される小胞体ストレスシグナルによる発現制御を受ける可能性が示された。ATF5 の BAT における機能については、同定した標的遺伝子を詳細に解析し、さらに HB2 細胞を用いて ATF5 の過剰発現、ノックダウン実験や、熱産生という組織の機能面から、体温変化に着目して追加実験を進めている。

brown adipose tissue, cold exposure, lipid metabolism

講演番号：3B06a06
講演日時：3 月 27 日 10:35～ 総合学習プラザ B06 会場

エストラジオールは白色脂肪組織の FGF21 および脱共役タンパク質 UCP-1 の遺伝子発現を抑制する

Estradiol negatively regulates the expression of FGF21 and thermogenic UCP-1 gene in white adipose tissue.

○加藤 拓、佐藤 遼太、守谷 浩子、横堀 友希、長谷川 由希子、井上 佳奈、竹中 麻子（明治大・農）
○Taku KATO, Ryota SATO, Hiroko MORIYA, Yuki YOKOBORI, Yukiko HASEGAWA, Kana INOUE, Asako TAKENAKA (Meiji Univ.)

【背景と目的】

抗肥満ホルモンとして知られる Fibroblast growth factor（FGF）21 は主に肝臓で高発現するが、脂肪組織などの末梢組織でも発現している。FGF21 は脂肪組織に作用し、“脂肪を燃やす働き”をする uncoupling protein（UCP）-1 遺伝子発現の増加といった抗肥満作用を示す。我々は、性成熟後の肝臓の FGF21 遺伝子発現量はメスよりもオスの方が高い可能性を見いだした。そこで本研究では、FGF21 遺伝子発現と白色脂肪組織における UCP-1 発現の性差を検討した。

【方法・結果】

実験 1 では、性成熟前後と性腺除去（卵巣除去あるいは精巣除去）した Wistar ラットを用いて、性ホルモンが FGF21 の合成を制御する可能性を検討した。性成熟後のラットにおいて、肝臓の FGF21 遺伝子発現量と血漿中の FGF21 濃度はメスよりもオスの方が高かった。卵巣除去群では偽手術群よりも肝臓の FGF21 遺伝子発現量と血漿中の FGF21 濃度が高かったが、精巣除去群では偽手術群との間に変化はなかった。以上の結果から、卵巣から分泌される女性ホルモンのエストラジオールが、肝臓の FGF21 遺伝子発現と FGF21 の血中濃度を低下させることが示された。

実験 2 では、雌雄の性成熟後の C57BL6/J マウスを用いて、肝臓及び脂肪組織（鼠径部の白色脂肪細胞：iWAT、腎臓周囲の白色脂肪細胞：pWAT、肩甲骨周辺の褐色脂肪細胞：BAT）の FGF21 と UCP-1 遺伝子発現量、脂肪組織重量を測定した。肝臓の FGF21 遺伝子発現量には性差はなかった。pWAT の FGF21 と UCP-1 遺伝子発現量はメスよりもオスの方が高い傾向であった。しかし、体重当たりの pWAT の重量には性差はなかった。以上の結果から、肝臓の FGF21 発現の性差には再現性がなかった一方、pWAT の FGF21 と UCP-1 遺伝子発現には性差が存在することが示された。

実験 3 では卵巣除去ラットの脂肪組織の FGF21 と UCP-1 遺伝子発現量を測定した。卵巣除去群では偽手術群よりも pWAT の FGF21 と UCP-1 遺伝子発現量が高かった。よって、pWAT の FGF21 と UCP-1 遺伝子発現の性差はエストラジオールによる発現抑制によって生じることが明らかになった。

【結論】

エストラジオールは白色脂肪組織の FGF21 遺伝子発現量を抑制することによって、オートクライン・パラクライン様式で、熱産生を誘発する UCP-1 の遺伝子発現を抑制する可能性を示した。

FGF21, UCP-1, Estradiol

発表責任者：竹中　麻子（takenaka@meiji.ac.jp）

講演番号：3B06a07
講演日時：3 月 27 日 10:46～ 総合学習プラザ B06 会場

膵臓β細胞機能調節作用を介した胎児期男性ホルモンの DOHaD への関与
Involvement of fetal androgen actions in DOHaD through the regulation of pancreatic beta-cell function

○原田 直樹[1]、四元 優佑[1]、甲木 孝弘[1]、與田 安紘[1]、乾 博[2]、山地 亮一[1] ([1]大阪府大生命環境、[2]大阪府大栄養)
○Naoki HARADA[1], Yusuke YOTSUMOTO[1], TAKAHIRO KATSUKI[1], Yasuhiro YODA[1], Hiroshi INUI[2], Ryoichi YAMAJI[1] ([1]Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Nutr, Osaka Pref. Univ.)

【背景・目的】 成人男性における男性ホルモン（テストステロン）レベルの低下は、メタボリックシンドロームや 2 型糖尿病のリスクとなり、寿命を縮める（*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 82, 1667-1682, 2018）。我々は、性成熟期の男性ホルモンが雄性ラットの膵β細胞量を増加させて耐糖能異常を防ぐことを見出した（*Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 314, E274-E286, 2018）。一方、男性ホルモンは性成熟期のみならず胎児期にも雄で一過的に増加して性分化を促す。近年、胎児期環境が健康に影響する生活習慣病胎児期発症起源仮説（Developmental Origins of Health and Disease; DOHaD）が注目され、性差も報告されているが、胎児期の男性ホルモンが DOHaD に及ぼす影響についてはよく分かっていない。そこで、本研究では胎児期の男性ホルモン作用を抗アンドロゲン剤（アンドロゲン受容体（AR）アンタゴニスト）によって阻害した雄仔ラットの膵β細胞の特徴や耐糖能について検討した。
【方法・結果】 胎児期 19.5 日目の膵臓において、AR の発現を調べた結果、膵臓β細胞（インスリン陽性細胞）の前駆細胞である NKX6.1 陽性細胞において AR が高レベルで発現することを見出した。そこで、胎児期のテストステロン作用を抑制することを目的に、母ラットに抗アンドロゲン剤であるフルタミド（50 mg/kg/day）を妊娠 16.5 日目から出産まで経口投与した。出生ラットの雌雄判別は、Y 染色体の有無の確認によって行い、雄における男性ホルモン作用の抑制を肛門尿道間距離により確認した。出生仔は全てコントロール群の母ラットに育てさせた。出生直後、膵β細胞量や膵臓中のインスリン発現量はコントロール群と比べて抗アンドロゲン剤投与群で雄特異的に減少した。離乳後、通常食を摂取させて飼育した際には 12 週齢時の膵β細胞量は抗アンドロゲン剤投与群でコントロール群の約 50%まで減少した。しかし、腹腔内糖負荷試験では、抗アンドロゲン剤投与群ではインスリン分泌量は維持されており、むしろ耐糖能が改善する傾向が観察された。一方、離乳後に高脂肪食を摂取させて飼育した際には、膵β細胞量は抗アンドロゲン剤投与群で回復が見られたが、抗アンドロゲン剤投与群では糖負荷時のインスリン分泌が低下して耐糖能が悪化することが判明した。インスリン感受性に関してはいずれも影響がなかった。以上の結果から、胎児期に雄で生じるテストステロンの一過的な増加により膵β細胞形成が促進する機構の存在が明らかとなった。これは、膵β細胞形成において性差が存在することを示すものとなった。さらに、胎児期における男性ホルモン作用の低下と生後高脂肪食の摂取により耐糖能不全を生じることから、男性ホルモンの DOHaD への関与が明らかになった（*Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 317, E731-E741, 2019）。

DOHaD, androgen, pancreatic beta-cells

発表責任者：原田直樹（harada@biochem.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：3B06a08
講演日時：3 月 27 日 10:57～ 総合学習プラザ B06 会場

細胞膜上性ステロイドホルモン受容体 mPR ε を介した代謝機能制御
The role of the novel sex steroid membrane receptor mPRε on metabolic homeostasis.
○渡辺 啓太、劉 瑩、大植 隆司、木村 郁夫（東京農工大学）
○Keita WATANABE, Ying LIU, Ryuji OHUE, Ikuo KIMURA (Tokyo university of agriculture and technology)

【背景・目的】
プロゲステロン(P4)は、卵巣によって合成・分泌される性ステロイドホルモンの一つであり、核内受容体(PR; progesterone receptor）と結合することで、遺伝子の転写調節作用を介した性成熟などの生理機能に関わることが知られている。しかしながら近年、性ステロイドホルモンは全身において性機能以外の様々な即時的な生理機能の維持および調節に関与することが明らかとなってきた。これらの作用には PR を介した genomic な反応だけでは説明がつかないものが多く、PR を介さない non-genomic で即時的な調節機構の存在が示唆されているが、その詳細なメカニズムは明らかにされていない。近年新たに細胞膜上 P4 受容体(mPR; membrane progesterone receptor)ファミリーの存在が報告され、P4 による種々の即時性応答に関与する可能性が示唆されているが、これらの受容体の詳細な分子構造、受容機構に関しては、統一的な見解が得られていない。本研究では、P4 による mPR を介した代謝機能制御メカニズムを解明することを目的とし、個体、細胞および分子レベルで解析を行った。
【方法】
まず、各組織における mPR の発現解析を実施した。次に、mPR の代謝機能に及ぼす影響を評価する一環として、C57BL/6N 野生型（WT）ならびに mPR 遺伝子欠損(mPRKO)マウスを対象に糖負荷試験を行い、耐糖能に対する P4 の影響を検討した。さらに、WT および mPRKO マウス胎児由来線維芽細胞を脂肪細胞に分化させた後、P4 による糖取り込み能への影響を評価した。加えて、卵巣摘出をした WT および mPRKO マウスに、P4 を皮下投与したモデルマウスを作出し、食餌誘導性肥満に対する P4 の影響を検討した。また、mPR 強制発現株を用いて、mPR による P4 の詳細な受容機構を検証した。
【結果・考察】
mPRε は mPR ファミリーの中で唯一雌雄どちらにおいても脂肪組織にて高い発現が認められた。また、P4 が mPRε を介して糖取り込みを制御する可能性が示唆された。また、mPRε は一般的な GPCR とは異なる経路で、下流シグナルを惹起する可能性が示唆された。以上より、P4 は代謝恒常性維持と密接に関与しているだけでなく、細胞膜上受容体を介して代謝機能を制御する新規のメカニズムの関与が示唆された。今後、mPRε による P4 の受容機構を明らかにすることで、細胞膜受容体を標的とした新規創薬、生活習慣病・肥満・糖尿病、特に妊娠糖尿病に対する新規の予防・改善戦略に貢献できると期待される。

Adipocyte, steroid hormone receptor, glucose

講演番号：3B06a09
講演日時：3 月 27 日 11:08～ 総合学習プラザ B06 会場

グルカゴンはグルコース代謝に重要でなくアミノ酸異化代謝の転写制御に重要である
Glucagon regulates gene expression of amino acid catabolism but not gluconeogenesis

○小田 裕昭[1]、半澤 史聡[2]、橋本 尚央子[1]、孫 淑敏[1]、池田 彩子[2]、林 敬[3] ([1]名古屋大生命農、[2]名古屋学芸大、[3]名古屋大環境医学研)
○Hiroaki ODA[1], Fumiaki HANZAWA[2], Naoko HASHIMOTO[1], Shumin SUN[1], Saiko IKEDA[2], Takashi HAYASHI[3] ([1]Nagoya Univ., [2]Nagoya Univ. Art Sci., [3]Nagoya Univ. Inst. Environ. Med.)

インスリンとグルカゴンは血糖値の制御に重要だということはよく知られており、生化学、栄養学の教科書には良く書かれている。インスリンが唯一の血糖値を下げるホルモンであるが、血糖値を増加させるホルモンは、グルカゴンの他にグルココルチコイドホルモン、甲状腺ホルモンなど複数存在している。その中でのグルカゴンが中心的な役割を演じると考えられている。グルカゴンは肝臓に特異的に発現する受容体に結合して、cAMP-PKA-CREB により血糖値を増加させる。しかし，グルカゴン遺伝子ノックアウトマウス（GcgKO）では、血糖値に変化が見られず糖新生系の遺伝子発現にはわずかな影響しか見られなかった。一方、グルカゴンは、アミノ酸異化代謝の主要な調節因子であることが分かった(1)。アミノ酸異化代謝は、日周リズムを示すことが知られているが、演者らは GcgKO マウスで大きく低下することを見出した。本研究では、肝臓のアミノ酸異化代謝と糖新生系酵素の遺伝子発現のグルカゴンによる転写制御が異なる原因を探索する目的で、それぞれの遺伝子の転写速度と遺伝子プロモーターの生物情報学的解析を行った。

13～17 週齢の雄性の GcgKO マウス（C57Bl/6J）と対照マウスを、12 時間の明暗交代下で水および通常飼料は自由摂食とし、4 時間毎に屠殺した。GcgKO マウスでは，血糖値に変化は見られず，糖新生系の遺伝子発現は低下していたものの，日周リズムは正常に保たれていた。GcgKO マウスの肝臓の概日時計遺伝子の発現は、対照マウスと比較して差はなかった。一方，アミノ酸異化代謝酵素系ならびに尿素回路の遺伝子発現は大きく低下し、日周リズムも大きく抑制されていた。それぞれの遺伝子の転写速度は，ほぼ mRNA の変動に近いものであった。これまで報告されている遺伝子上の転写調節領域に関する情報から両代謝の違いを検討した。GcgKO マウスにおいて転写速度が大きく低下していた遺伝子に cAMP 応答配列やグルココルチコイド応答配列などが見出されたが、それらがない場合もあった。アミノ酸異化代謝と糖新生代謝の明確に分ける差を見出すに至っていないが、さらなる解析を進めている。

1) Diabetes 61, 74 (2012)

glucagon, amino acid catabolism, gluconeogenesis

発表責任者：小田裕昭（hirooda@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3B06a10
講演日時：3 月 27 日 11:19～ 総合学習プラザ B06 会場

筋萎縮転写因子 FOXO1 はエネルギー代謝に重要な転写共役因子 PGC-１βの遺伝子発現を負に制御する

FOXO1 down-regulates PGC-1ß gene expression in skeletal muscle atrophy

○亀井 康富、中井 志帆、大藪 葵、畑澤 幸乃 (京都府立大学)
○Yasutomi KAMEI, Shiho NAKAI, Mamoru OHYABU, Yukino HATAZAWA (Kyoto Prefectural University)

【背景・目的】
転写因子 FOXO1 は、骨格筋において絶食や不活動などの筋萎縮時に増加する。骨格筋での FOXO1 の過剰発現は、Cathepsin L などの筋萎縮関連遺伝子の発現を増加させ、筋萎縮を引き起こす。
転写共役因子 PGC-１β(PPAR gamma coactivator-1β)は、骨格筋で核内受容体 ERR（エストロゲン受容体関連受容体）を介して、脂肪酸酸化の遺伝子を活性化するとともにミトコンドリア量を増加させる。PGC-１βを骨格筋で過剰に発現させたマウスでは、エネルギー消費が増加し、肥満が抑制された。そのため PGC-１βは抗肥満における有望な標的である。しかし、PGC-１β遺伝子の発現制御メカニズムに関しては未だ不明である。本研究では、様々な条件のマウス骨格筋サンプルまたは培養細胞を用いて PGC-１βの遺伝子発現解析を行い、FOXO1 による PGC-１βの発現制御の可能性を検討した。
【方法・結果】
網羅的遺伝子発現解析により、FOXO1 を骨格筋で過剰発現させたマウス（FOXO1-Tｇ）の骨格筋において PGC-１βの発現減少が観察された。RT-ｑPCR を用いて遺伝子発現解析を行ったところ FOXO1-Tg マウスで PGC-１βおよび PGC-１βの標的遺伝子である中鎖アシル CoA 脱水素酵素（MCAD）の発現も減少していた。FOXO1 と PGC-１βの発現の相関をさらに調べるために、FOXO1 の発現が変動する条件でのマウス骨格筋サンプルを用いて、遺伝子発現解析を行った。その結果、除神経、ギプス固定、および絶食によって FOXO1 およびその標的遺伝子 Cathepsin L の発現が増加した一方で、PGC-１βと MCAD の発現は減少した。また絶食後の再摂食によって FOXO1 の発現は減少したが、PGC-１βの発現は回復していた。すなわち、骨格筋において FOXO1 と PGC-１βの発現は逆相関していた。さらに培養細胞を用いた実験系を用いて FOXO1 と PGC-1βの発現の因果関係を検討した。タモキシフェン誘導性に、FOXO1 を核内移行させた条件下で遺伝子発現解析を行ったところ、FOXO1 の活性化により PGC-１βの発現が減少していた。これらの結果から、FOXO1 によって PGC-１βの発現が負に制御されることが明らかとなった。FOXO1 は筋萎縮時に発現増加するが、FOXO1 が PGC-1βの発現を抑制することで、筋萎縮時におけるエネルギー消費を抑制している可能性が示唆された。

skeletal muscle, atrophy, energy expenditure

発表責任者：亀井康富（kamei@kpu.ac.jp）

講演番号：3B06a11
講演日時：3 月 27 日 11:40～ 総合学習プラザ B06 会場

線虫 *C. elegans* の幼虫休眠を制御する短鎖神経ペプチド FLP-6 の機能解析
Functional analysis of FLP-6, one of the *C. elegans* neuropeptides, regulating larval diapause
○河野 強[1,2]、荒井 千佳子[1]、堀 結佳[2]、小野 真弘[2]、松永 洋平[3]、岩﨑 崇[1,2]([1]鳥取大・農、[2]鳥取大院・持続性社会、[3]HIROTSU バイオ)
○Tsuyoshi KAWANO[1,2], Chikako ARAI[1], Yuka HORI[2], Masahiro ONO[2], Yohei MATSUNAGA[3], Takashi IWASAKI[1,2] ([1]Tottori Univ., [2]Tottori Univ. Graduate School, [3]HIROTSU Bio)

【背景・目的】
モデル生物・線虫 *C. elegans* は生育環境の悪化（生育密度上昇・餌の枯渇・高温）に応答して一時的に生育を停止し、休眠幼虫となる。環境因子は頭部感覚神経で受容され、下流のインスリン様シグナル・TGF-β様シグナルに伝達されて通常生育/幼虫休眠が決定される。しかしながら、頭部感覚神経がどのように下流のホルモンシグナル（TGF-β様シグナル、インスリン様シグナル）を制御するのかは不明な点が多い。我々は、短鎖神経ペプチドが頭部で受容した環境情報をホルモンシグナルに伝えるとの作業仮説の下、短鎖神経ペプチド群 FLP（FMRFamide-like peptides）を探索し、FLP-6 欠損が幼虫休眠を促進させることを見出した。本大会では、FLP-6 の休眠制御機構等について発表する。本研究では、線虫 *C. elegans* の休眠制御機構の全容解明を最終目的とする。
【方法・結果】
まず、*flp-6* が生育/休眠制御遺伝子であることを確認した。レスキュー株ならびに過剰発現株を作出して休眠率測定を行ったところ、前者は野生株と同様の休眠率を示し、後者は著しい休眠率低下（欠損株とは逆の表現型）を示した。よって、*flp-6* は生育/休眠制御関連遺伝子と結論づけた。次いで、*flp-6p*::GFP 線虫（transcriptional fusion）ならびに *flp-6p*::FLP-6::mRFP 線虫（translational fusion）を用いて、休眠時/非休眠時の産生量ならびに分泌量それぞれの変動を比較した。産生量には変動が認められなかった一方、休眠時には分泌量の減少が認められた。このことから、休眠時には FLP-6 の分泌が低下することにより休眠率が上昇する、と推定した。さらに、FLP-6 の休眠制御機構を解析するために、TGF-β様シグナルのリガンドである DAF-7 ならびにインスリン様シグナルの主要なリガンドである DAF-28, INS-35 の分泌変動を解析した。*daf-7p*::DAF-7::mCherry 線虫、*daf-28p*::DAF-28::mCherry 線虫、*ins-35p*::INS-35::VENUS 線虫を用いて、*flp-6* 存在下/非存在下に於けるそれぞれのリガンドレポーターの分泌変動を解析した。その結果、*flp-6* 非存在下ではインスリン様分子 DAF-28, INS-35 の分泌が低下することが判明した。現在、FLP-6 過剰発現株に於ける分泌変動を解析中である。
【考察】
以上の結果から、生育環境の悪化が FLP-6 の分泌低下をもたらし、その結果、幼虫生育促進因子であるインスリン様分子 DAF-28, INS-35 の分泌量が減少し、最終的に幼虫休眠に至る、とのモデル（仮説）を提唱したい。

C. elegans, diapause, insulin

発表責任者：河野　強（kawano@tottori-u.ac.jp）

講演番号：3B06a12
講演日時：3 月 27 日 11:51～ 総合学習プラザ B06 会場

線虫 *C. elegans* の幼虫休眠を制御する短鎖神経ペプチド受容体 FRPR-4 の解析
Analysis of FRPR-4, one of the short peptide-receptors, regulating larval diapause of the nematode *Caenorhabditis elegans*
○小野 真弘[1]、松永 洋平[2]、美藤 友博[1]、岩﨑 崇[1]、河野 強[1]([1]鳥取大院、[2]HIROTSU バイオ)
○ Masahiro ONO[1], Yohei MATSUNAGA[2], Tomohiro BITO[1], Takashi IWASAKI[1], Tsuyoshi KAWANO[1] ([1]Tottori Univ., [2]HIOTSU Bio)

【目的】
ネコブセンチュウ類による農業被害は極めて甚大であり（年間被害 4 兆円以上)、このうち、宿主範囲が広いサツマイモネコブセンチュウ（*Meloidogyne incognita*）による被害が顕著である。効果的な防除法の開発が求められているのが現状である。*M. incognita* は一時的に生育を停止する点でモデル線虫 *Caenorhabditis elegans* と類似する。*M. incognita* は孵化後に生育を停止して感染性幼虫となり、宿主の根に感染する。同様に、*C. elegans* は劣悪な生育環境に応答して生育を停止し、休眠幼虫となる。そこで、モデル線虫 *C. elegans* の休眠制御機構に着目して、新たな防除ターゲットの探索を行うこととした。劣悪な生育環境下では、*C. elegans* の頭部感覚神経で受容された環境因子が、下流のホルモンシグナルを制御することで通常生育/休眠を制御することが知られている。当研究室では、短鎖神経ペプチド FLPs（FMRFamide-Like Peptides）が上記シグナルを制御することを明らかにしている。そこで本研究では、FLP 受容体である FRPR を標的として幼虫休眠制御に関わる分子を探索し、その制御機構を解析することとした。本研究で得られた知見を新たなネコブセンチュウ防除法の開発に資することを最終目的とする。
【方法・結果】
frpr 遺伝子破壊線虫をスクリーニングしたところ、*frpr-4* 破壊線虫ならびに *frpr-10* 破壊線虫が顕著な休眠率低下を示した。そこでまず、FRPR-4 の解析を進めることにした。*frpr-4* レスキュー株を作出し休眠率測定を行ったところ、野生株とほぼ同等の休眠率を示した。よって、*frpr-4* が休眠制御遺伝子であることが明らかとなった。*frpr-4p*::mRFP 発現線虫を作出し発現パターンを解析したところ、休眠時では ASI 神経細胞（主要な休眠制御細胞）に於ける発現が顕著であった。現在、休眠時、生育時での発現変動を qRT-PCR を用いて解析中である。また、エピスタシス解析により下流のホルモンシグナルの制御の可能性を検証したところ、FRPR-4 はインスリン様シグナル制御に関与していることが明らかとなった。現在、FRPR-4 が制御するインスリン様分子を探索している。

larval diapause, *C. elegans*, GPCR

発表責任者：小野真弘（n1pmasa@gmail.com）

講演番号：3B06a13
講演日時：3 月 27 日 12:02～ 総合学習プラザ B06 会場

線虫 *Caenorhabditis elegans* のビタミン C 生合成経路の同定
Identification of vitamin C biosynthetic pathway of *Caenorhabditis elegans*
○藪田 行哲[1]、青木 優果[1]、苅谷 あゆみ[1]、和田 滉佑[1]、柳本 綾子[1]、原 寛佳[1]、岡本 奈穂[1]、美藤 友博[1]、吉田 晋一[2]、石原 亨[1]、渡邊 文雄[1] ([1]鳥取大農、[2]鳥取県産技センター)
○Yukinori YABUTA[1], Yuka Aoki[1], Ayumi Kariya[1], Kousuke Wada[1], Ayako Yanagimoto[1], Hiroka Hara[1], Naho Okamoto[1], Tomohiro Bito[1], Shinichi Yoshida[2], Atsushi Ishihara[1], Fumio Watanabe[1] ([1]Tottori Univ., [2]Tottori Insti. Industri. Technol.)

【目的】ビタミンCはコラーゲンやホルモン合成に関わる酵素の補酵素、電子伝達や抗酸化物質として機能する。全ての植物と霊長類、モルモットや高等な鳥類を除く脊椎動物は体内でビタミンCを生合成することができ、既に生合成経路も明らかにされている。ところで、 線虫（*Caenorhabditis elegans*）はヒトの疾病発症の分子メカニズムの解明に用いられており、近年種々の栄養素の機能解明にも用いられてきている。無脊椎動物である線虫もビタミンCの生合成をすることが報告された（Patananan et al., 2015）が、その生合成経路は不明である。以上のことからビタミンCの機能解明に線虫を利用することができ、生合成経路を同定することでビタミンC欠乏線虫を作成できると考えた。そこで線虫のビタミンC生合成経路の同定を行った。
【方法】動植物共にD-glucoseを初発物質としてビタミンCを生合成されるが、動物ではD-glucoseの1位の炭素がビタミンCでは6位に炭素骨格の再構成が起こる。このことに着目して、1位の炭素を^{13}Cで標識したD-glucoseを線虫に投与し、^{13}CがビタミンCをのどの部分に取り込まれるのかをGC-MSを用いて解析した。次にラットおよびシロイヌナズナのビタミンC生合成に関わる酵素をコードする遺伝子と相同性の高い遺伝子を線虫ゲノムから探索し、それらの遺伝子の発現をノックアウト線虫およびfeeding RNAiによる発現抑制線虫を調製しビタミンCの測定を行った。また、動植物のビタミンC前駆体であるL-gulono-1,4-lantoneもしくはL-garactono-1,4-lactoneを添加して培養した線虫のビタミンC量を測定した。
【結果と考察】^{13}CはビタミンCの6位を含むフラグメントイオンから検出された事から、線虫のビタミンC生合成は炭素骨格の再構成を伴う事が明らかとなり、脊椎動物もしくはユーグレナと同様の経路を経て生合成されている事が示唆された。ラットのL-gulonate lactonaseおよびL-gulono-1,4-lantone oxidaseと相同性を示す遺伝子の発現抑制線虫と遺伝子破壊線虫を調製し、ビタミンCを測定したところ、コントロールと比較してそれぞれ、17.8%、16.3%の低下が認められた。現在、L-garactono-1,4-lactone dehydrogenaseと相同性を示す遺伝子の発現抑制線虫のビタミンCレベルの測定を行っている。またL-gulono-1,4-lantoneもしくはL-garactono-1,4-lactoneを添加した線虫のビタミンCレベルの測定についても現在行っている。

Caenorhabditis elegans, vitamin C, biosynthetic pathway

発表責任者：藪田行哲（yabuta@tottori-u.ac.jp）

講演番号：3B06p01
講演日時：3 月 27 日 13:50～ 総合学習プラザ B06 会場

新規肝線維化発症関連遺伝子としての 67-kDa laminin receptor の同定

Identifying 67-kDa laminin receptor as novel related gene of liver fibrosis

○西岡 成汰、竹下 菜津子、錦戸 里紗、山田 脩平、藤村 由紀、立花 宏文（九大院農院・生機科）
○Seita NISHIOKA, Natsuko TAKESHITA, Risa NISHIKIDO, Shuhei YAMADA, Yoshinori FUJIMURA, Hirofumi TACHIBANA (Kyushu.Univ.)

67-kDa laminin receptor（67LR）はラミニン結合タンパク質として発見された細胞膜タンパク質であり、*Ribosomal protein SA*（*Rpsa*）遺伝子にコードされる。当研究室ではこれまでに、67LR が緑茶カテキンの一種である（―)-epigallocatechin-3-*O*-gallate（EGCG）の受容体であること、さらに EGCG が 67LR を介して抗がん作用をはじめとした様々な生体調節作用を発揮することを明らかにした。しかし、67LR 自体の機能報告は少なく、さらなる検討が求められることから、67LR ノックアウトマウスによる表現型解析を試みた。全身での 67LR 欠損は胚性致死となるため、本研究では代謝の中心臓器である肝臓に着目し、肝臓特異的 67LR ノックアウトマウスの作製ならびに肝臓における 67LR 欠損がマウスに及ぼす影響の解析を行った。

Cre/loxP システムを用いた遺伝子組換えにより、肝臓特異的 67LR ノックアウトマウスの作製を行った。交配により、対照群となる flox マウス（$Rpsa^{Liver\ fl/fl}$; fl/fl）およびノックアウトマウス（$Rpsa^{Liver\ -/-}$; -/-）をそれぞれ獲得した。

-/-マウス生体の外見には遺伝子型による影響は認められなかったが、肝臓における所見として、fl/fl マウスと比較し、表面に凹凸が見られるものや、葉が委縮し硬く反っているものが約半数の個体で確認された。そこで、肝臓の状態を組織学的に評価するため、ヘマトキシリンエオジン（HE）染色および繊維化の診断に用いられるマッソントリクローム（MT）染色を行った。HE 染色では血管周囲にリンパ球の浸潤が見られ、炎症状態であることが確認された。また、MT 染色ではコラーゲンの蓄積が確認されたことから、-/-マウスの肝臓では繊維化が進行していることが明らかとなった。さらに、肝臓におけるコラーゲン遺伝子発現量およびタンパク質量を測定した結果、67LR 欠損により発現が上昇した。

続いて、肝臓の遺伝子発現に対する 67LR 欠損の影響をマイクロアレイにより解析した。その結果、67LR 欠損により 220 遺伝子が発現上昇し、192 遺伝子が発現低下した。さらに、変動した遺伝子のうち、肝線維化に関与する TGF-β シグナルを活性化する遺伝子である Itgbl1 や、線維化により発現上昇することが知られる Fn1、弾性繊維形成に関与する Fbln2 といった線維化関連遺伝子発現の上昇が確認された。

以上の結果より、肝臓における 67LR 欠損は繊維化関連遺伝子を含む多数の遺伝子発現を変動させることが明らかとなり、67LR は肝繊維化発症に関与することが示された。

67-kDa laminin receptor, liver, fibrosis

講演番号：3B06p02
講演日時：3 月 27 日 14:01～ 総合学習プラザ B06 会場

四塩化炭素誘導急性肝障害の再生過程におけるマクロファージ除去の影響

The effect of macrophage-depletion on the liver regeneration in chemically- induced liver injury model mouse.

○三浦 徳[1]、池田 志織[2]、増澤（尾﨑） 依[2]、細野 崇[2,3]、関 泰一郎[2,3] ([1]日大・生資科・総合研究所、[2]日大・生資科・生命化、[3]日大院・生資科・応生科)
○Atsushi Miura[1], Shiori Ikeda[2], Yori Ozaki-Masuzawa[2], Takashi Hosono[2,3], Taiichiro Seki[2,3] ([1]Nihon Univ. General Research Institute, [2]Nihon Univ., [3]Nihon Univ. Grad. School)

【背景と目的】
肝臓は、肝細胞の増殖や組織リモデリングなどを通じて他の臓器には見られない強力な組織再生能力を発揮する。マクロファージは炎症性サイトカインの産生や細胞外マトリクスの分解、壊死細胞の除去を介して肝再生を促進する。一方、マクロファージが肝機能の回復に関与するかは不明である。本研究では、四塩化炭素誘導急性肝障害の再生過程におけるマクロファージの選択的除去が、肝組織の修復や肝機能の回復に及ぼす影響を検討した。
【方法】
C57BL/6J マウス（8-12 週齢、オス）に四塩化炭素（1 mL/kg b.w.）を経口投与し、急性肝障害を惹起した。急性期応答がほぼ終息する四塩化炭素投与 48 時間後から、マクロファージの選択的除去剤であるクロドロン酸リポソーム（100 μL/mouse）を 2 日毎に腹腔内投与した（CLO 群）。対照群にはクロドロン酸を含まないリポソームを同様に投与した（vehicle 群）。四塩化炭素投与 144 時間後まで経時的に肝臓および血液を回収し、各種解析を実施した。
【結果】
肝臓におけるマクロファージ関連遺伝子の発現レベルは、CLO 群において著しく低値を示した。肝障害マーカーである血漿 ALT 活性は、肝障害惹起後 96, 144 時間において vehicle 群と比較して CLO 群で高値を示した。ヘマトキシリン・エオシン染色による組織学的解析から、CLO 群の肝臓では組織の修復が著しく遅延していることが明らかとなった。細胞増殖マーカーである Ki-67 の免疫組織化学的解析によって、細胞増殖が CLO 群で遅延していることが示された。Periodic Acid-Schiff 染色の結果から、肝臓におけるグリコーゲン貯蔵が CLO 群で低下していることが示された。また、ガスクロマトグラフ質量分析計を用いたメタボローム分析の結果、vehicle 群の解析によって見出された肝臓の再生を反映する代謝物群のうち、アミノ酸代謝などに関連する代謝物の回復が CLO 群で遅延することが明らかとなった。
【結語】
本研究では、急性肝障害の再生過程において、マクロファージが細胞増殖や組織リモデリングのみならず肝機能の回復にも重要であることを明らかにした。

Liver regeneration, Macrophage, Liver function

発表責任者：関泰一郎（seki.taiichirou@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3B06p03
講演日時：3 月 27 日 14:12～ 総合学習プラザ B06 会場

非アルコール性脂肪肝炎、急性肝障害モデルマウスにおける尿素回路関連酵素に関する研究

Studies on the urea cycle-relating enzymes in the mouse model of NASH and acute liver diseases

○LI WEITONG[1]、三浦 徳[2]、北田 祐也[1]、石倉 菜奈[2]、増澤（尾﨑） 依[2]、細野 崇[1,2]、関 泰一郎[1,2] ([1]日大院・生資科・応生科、[2]日大・生資科・生命化)
○WEITONG LI[1], Atsushi MIURA[2], Yuya KITADA[1], Nana ISHIKURA[2], Yori OZAKI-MASUZAWA[2], Takashi HOSONO[1,2], Taiichiro SEKI[1,2] ([1]Nihon Univ. Grad. School of Bioresouce Sci., [2]Nihon Univ. Coll. Bioresouce Sci.)

＜背景＞肝臓は、栄養素や生体外異物の代謝、血漿タンパク質の合成・分泌、血液量の調節など恒常性の維持に重要な役割を果たしている。近年、肥満や飲酒などの生活習慣、薬物などを原因とする肝障害が増加している。我々は、非アルコール性脂肪肝炎（NASH）の病態解析を行う過程で、コリン欠乏メチオニン減量高脂肪食（CDAHFD）給餌による NASH モデルマウスの肝臓において顕著に減少するタンパク質を見出し、同タンパク質をカルバモイルリン酸シンテターゼ I（CPS1）と同定した。CPS1 をはじめアンモニア代謝に関与する尿素回路関連酵素の肝障害における挙動や発現調節に関する報告は少ない。本研究では、肝障害における尿素回路関連酵素の発現とその調節機構を明らかにすることを目的として肝障害モデルマウスを用いて基礎的な研究を実施した。
＜方法＞実験 1. C57BL/6J マウスに CDAHFD を給餌して 1, 4, 8, 12 週間飼育し、血液および肝臓を回収した。血漿の肝障害関連マーカー、肝臓の組織学的解析ならびに尿素回路関連酵素の活性測定、タンパク質発現量を Western blotting により測定した。実験 2. C57BL/6J マウスに CCl_4（1.0 ml/kg b.w., *p.o.*）、アセトアミノフェン（APAP, 20 mg/kg b.w., *i.p.*），α-naphthyl isothiocyanate（ANIT, 60 mg/kg b.w., *p.o.*）を投与して肝障害を惹起し、0～216 時間後に肝臓、血液を回収し、実験 1 と同様に解析した。
＜結果＞実験 1） CDAHFD 給餌後 4, 8 週において血漿 AST, ALT 活性は上昇した。CDAHFD 給餌 4 週までは肝組織に多数の脂肪滴が観察され、肝細胞のバルーニング、さらに 8 から 12 週にかけて、コラーゲン繊維の沈着が観察された。NASH の進行とともにオルニチントランスカルバモイラーゼ（OTC）、アルギナーゼ（ARG）活性は減少もしくは減少する傾向を示したが、CPS1 活性は増加傾向を示した。一方これらの酵素タンパク質の発現量は減少もしくは減少する傾向を示した。実験 2）CCl_4 投与モデルでは、投与 24, 48 時間後に AST, ALT 活性は高値を示した。CPS1 活性は肝障害のピークと一致して増加する傾向を示したが、タンパク質発現量はほとんど変化しなかった。一方、OTC，ARG 活性は減少する傾向を示した。APAP モデル、ANIT モデルにおいても肝障害に伴って CPS1 活性は増加する傾向を示した。
＜結語＞ 脂肪肝炎、急性肝障害などにおいて、CPS1, OTC, ARG の発現動態が異なる可能性、CPS1 タンパク質が障害により減少しても活性は比較的安定して維持される可能性を明らかにした。現在、メタボロミクス解析により窒素関連代謝産物の動態についても検討中である。

Liver disease, Urea cycle, Carbamoyl phosphate synthetase 1

発表責任者：関 泰一郎（seki.taiichirou@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3B06p04
講演日時：3 月 27 日 14:23～ 総合学習プラザ B06 会場

肺線維症におけるタンパク質架橋化酵素の機能解析とその新規基質の同定
Analysis of protein crosslinking enzyme and identification of its novel substrates in lung fibrosis
○竹内 大修[1]、桑田 啓子[2]、辰川 英樹[1]、人見 清隆[1] ([1]名大院創薬、[2]名大・ITｂM)
○Taishu TAKEUCHI[1], Keiko KUWATA[2], Hideki TATSUKAWA[1], Kiyotaka HITOMI[1] ([1]Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ., [2]WPI-ITbM, Nagoya Univ.)

線維症とはコラーゲンなどの線維性タンパク質が過剰に蓄積することで柔軟な組織が硬化し恒常的な機能が失われる疾患である。肺において原因不明の線維化が起こる特発性肺線維症は重篤な病態を示す予後不良な疾患であるが、その病態発症に関わる詳細な分子メカニズムは解明されておらず、有効な治療法はない。肺を含む様々な組織における線維症の病態進行には、タンパク質架橋化酵素トランスグルタミナーゼ(TGase)の関与が知られている。TGase はタンパク質中のグルタミン残基とリジン残基との間に共有結合であるイソペプチド結合を形成する。哺乳類においては 8 つのアイソザイムからなる酵素ファミリーであり、生体内で皮膚形成や血液凝固などの多様な生理的機能を有する。同様に、TGase は線維性タンパク質の架橋修飾による安定化に寄与することで組織の硬化に関わることも古くから知られており、TGase による過剰な架橋反応が病態の増悪に寄与すると考えられている。しかしながら、肺線維症においてどのようなタンパク質がいつどこで TGase の基質として架橋され、病態の進行に関わるかという十分な解析はなされていない。本研究では TGase の制御を介した特発性肺線維症の新規治療法の開発を目的とし、線維化進行時における TGase の発現・活性分布の解析や架橋基質タンパク質の探索を行い、肺線維症における TGase を介した病態増悪に関わる分子メカニズムの解明を試みた。

実験はブレオマイシンを投与して作製した肺線維症モデルマウスを用いて行った。含有コラーゲン量や組織染色のデータから線維化の進行が認められた肺組織を用いて内在性 TGase の活性を評価したところ、線維化肺において TG1 及び TG2 の活性の上昇が確認された。また、TG2 遺伝子欠損マウスでは肺線維化誘導に伴う線維化領域の拡大が顕著に抑制された。さらに、*In vitro* 実験として、肺胞上皮細胞株に TGF-β を処理して上皮間葉転換を誘導した際にも同様に TGase の活性上昇が見られた。次に、線維化肺において活性上昇した TGase の基質となるタンパク質を探索するために、質量分析を用いて基質タンパク質の網羅的プロテオミクス解析を行った。肺組織切片上で標識した基質を内在性の TGase 活性により架橋させ、その組織抽出液を精製することにより、TGase の標的となる基質タンパク質を網羅的に同定する実験手法を確立した。同手法を用いて線維化肺で特異的な基質タンパク質を探索したところ、fibronectin や collagen のような既知の基質タンパク質が有意に同定される他、新規な候補基質タンパク質も多数同定された。今後はこれらの基質タンパク質の架橋修飾により肺線維化が誘導される分子メカニズムについてさらなる解析を行う予定である。

fibrosis, transglutaminase, EMT

発表責任者：竹内大修（prenda99skjhs@gmail.com）

講演番号：3B06p05
講演日時：3 月 27 日 14:34～ 総合学習プラザ B06 会場

Investigations of Biochemical Properties and Novel Function of Fibrinogen by Establishing Knockout Medaka (*Oryzias latipes*)

○ Qi Meng[1], Risa Suzuki[1], Yuko Watanabe[1], Rina Oguri[1], Hideki Tatsukawa[1], Hisashi Hashimoto[2], Kiyotaka Hitomi[1] ([1]Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ., [2]Grad. Sch. Sci., Nagoya Univ.)

Fibrinogen is the final factor during blood coagulation. Proteolytic cleavage of fibrinogen by thrombin results in processing to fibrin and their polymerization. Then, catalysis with FXIII form cross-linking of the fibrin for further stabilization. Fibrinogen is composed of two sets of three subunits of (alpha, beta, and gamma), among which gamma subunit is cross-linked by Factor XIII covalently. Fibrin(ogen) is not only involved in hemostasis, but also in thrombosis, fibrosis, cancer, bacterial infection, etc. Therefore, obtaining regulatory molecules of fibrinogen clot formation and clarifying other functions are significant. To achieve the objects, we used medaka (Oryzias latipes), a model fish, for biochemical studies and establishment of gene-deficient organism.

We obtained cDNA for each medaka fibrinogen subunit. Beta and gamma subunits showed high homology to each human fibrinogen subunit, and alpha subunit retains homology mainly around the N-terminal side. Based on the obtained cDNA gamma subunit, we successfully produced the recombinant protein in E. coli. Using the recombinant protein as antigen, specific antibody was prepared and used for immunochemical analysis of tissue distribution, which revealed higher expression in eyes, muscle, adipose tissue and liver. Since human fibrinogen is produced in liver, we further attempted to clarify the expressing tissue by the reverse transcription-PCR. According to the result, the fibrinogen gamma is mostly expressed in heart, liver and kidney for medaka.

We are establishing the knockout medaka for fibrinogen gamma subunit by CRISPR/Cas9 system. Currently, two mutants have been established, OlFggins4 and OlFggrepdel4. The common phenotypes are retarded blood clot formation and bent bone. The additional unique phenotypes for OlFggins4 and OlFggrepdel4 are the smaller body size, and the delayed hatching time, respectively. Furthermore, the survival rate of homozygous for both mutants is lower than that of wild type and heterozygous. Investigation of phenotype for both mutants is in progress.

Fibrin, Medaka, Blood Coagulation

発表責任者：Qi Meng（mengqi1024@gmail.com）

講演番号：3B06p06
講演日時：3 月 27 日 14:45～ 総合学習プラザ B06 会場

魚類におけるマイクロプラスチックの入出力代謝応答の評価

Evaluation for input to output metabolic response of microplastics in fish

○藤村 哲平[1]、坂田 研二[2]、菊地 淳[1,2,3]([1]横浜市立大学大学院 生命医科学研究科、[2]特定国立研究開発法人理化学研究所 環境資源科学研究センター、[3]名古屋大学大学院 生命農学研究科)
○Teppei Fujimura[1], Kenji Sakata[2], Jun Kikuchi[1,2,3] ([1]Graduate school of Medical Life Science, Yokohama City University, [2]RIKEN Center for Sustainable Resource Science, [3]Graduate school of Bioagricultural Sciences, Nagoya University)

【目的】我々の日々使用しているプラスチック製品は廃棄後に一部海洋へ流出し、紫外線照射や波などの物理的衝撃によりマイクロ化され、海域に生息する生物付着と物質吸着により比重が上がり、沿岸付近の魚類からだけではなく深海に生息する魚類からもマイクロプラスチックが検出されたことが報告されている[1-3]。しかし、マイクロプラスチックが魚類の体内に侵入することによって、生じる影響についての科学的知見は少ない。そこで本研究では魚類糞便を非侵襲的にサンプリングし、プラスチックが魚類の体内に侵入した際の影響を評価することを目的とした。
【方法】 魚類のプラスチック摂食時の影響を評価するために、カサゴに PET 粉末入りの人工飼料を摂食した際の糞便に加え、PET 摂食前後の人工飼料摂食時の糞便試料を得た。さらに活魚 7 種に対して 6 種の飼料を摂食実験し、得られた 480 の糞便試料、摂食した飼料をそれぞれ凍結乾燥した後、租粉砕し、KPi/D2O を用いて抽出した。溶液 NMR(700 MHz)の 2D-*J*res 計測により水溶性低分子群を計測して、得られた NMR スペクトルを数値化し、統計計算ソフト R により多変量解析を行い、魚類における飼料およびマイクロプラスチックの入出力応答を評価した。
【結果・考察】カサゴへのPET5%混在飼料系では、時系列サンプリングした糞便抽出物をNMR計測し、得られたスペクトルを用い、PCAを行った結果、PET摂食前に比べ、PET摂食時の糞便プロファイルは時系列で大きくばらつく傾向がみられた。また、PET摂食後に人工飼料に戻した糞便プロファイルのばらつきは、PET摂食の前と同様に小さい傾向がみられた。しかし、PET1%混在飼料系で同様の実験を行った結果、PET摂食時と摂食後では差は見られなかった。さらにカサゴに加え、魚種６種に対する各飼料の糞便抽出物をNMR計測し、得られたスペクトルを用いて、ランダムフォレスト解析を行った結果、特徴的な代謝プロファイルを示す魚種と飼料の関係性が明らかとなった。また、カサゴのPET混在飼料系の代謝プロファイルの70%以上が人工餌を給餌した際の代謝プロファイルに分類されたことから、PET混在飼料による代謝プロファイルへの影響は少ないことがわかった。以上のことから、糞便の水溶性プロファイルに関してはPET摂食の影響は少ない可能性が示唆された。本会ではこれらの結果に加えて、マイクロプラスチックに対しての化合物の吸着性・脱着性をNMRを用いて解析し、さらに、プラスチックにラベル物質を混ぜた飼料を魚類に与え、糞便へのプラスチックの動向を追跡した結果を報告したい。[1] Tanaka, K. & Takeda, H. *Scientific Reports* **6**,Article number: 34351 (2016) [2]Song Ye, Anthony L Andrady. *Marine Pollution Bulletin* **22**,12,608-613(1991) [3] Kubota, K.et al. *Front. Mar. Sc*i . **16**(2018) https://doi.org/10.3389/fmars.2018.[4] Asakura, T., Sakata, K., Yoshida, S., Date, Y. & Kikuchi, J. *PeerJ* **2,** e556 (2014).

metabolic profiles, non-invasively sampling, date science

講演番号：3B06p07
講演日時：3 月 27 日 15:06～ 総合学習プラザ B06 会場

離乳期マウスにおける腸内細菌叢形成に影響する消化管内タンパク質の発現解析

Expression analysis of the gut luminal proteins affecting weaning-coupled microflora formation in mice

○鬼頭 一平[1]、伊藤 大貴[1]、宮田 真路[2]、灘野 大太[1]、松田 幹[1]、大島 健司[1] ([1]名古屋大農、[2]東京農工大農)
○Ippei KITO[1], Hiroki ITOU[1], Shinji MIYATA[2], Daita NADANO[1], Tsukasa MATSUDA[1], Kenzi OSHIMA[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Tokyo Univ. Agri. Tech.)

＜背景＞腸内共生菌は宿主の全身的な生理に大きく影響することが知られており、特に離乳期での腸内細菌叢形成が生涯持続する免疫系や代謝系の性質を決定することが示唆されている。腸内細菌と腸管関連リンパ組織は相互に制御しあっており、腸内細菌によりムチン層の形成や抗菌タンパク質、分泌型 IgA の産生が誘導され、これらが腸管腔内での腸内細菌の定着と増殖を制御している。また食餌成分は腸内細菌の増殖に決定的な影響があり、乳児期では母乳摂取により乳児特異的腸内細菌叢が形成される。乳児期後期では母乳と通常食を同時に摂取し、その後通常食のみとなり完全離乳する。この期間では腸内細菌への栄養供給が量的にも質的にも大きく変化し、大人型細菌叢へと変化する。しかしながら、離乳期の細菌叢形成に影響すると考えられる腸管腔内タンパク質についてはあまり研究が進んでいない。本研究ではマウスをモデル系として、乳児腸上皮細胞が管腔へ分泌するタンパク質の発現と腸内細菌叢の変遷について解析した。
＜方法・結果＞ICR マウスを用い、乳児期初期から離乳後までのムチン層構成タンパク質、抗菌タンパク質および腸上皮細胞分化マーカーの発現変化をリアルタイム PCR により解析した。小腸で発現するムチン層構成タンパク質や抗菌タンパク質は、乳児期後期までに発現が上昇していた。その一方で結腸でのムチン層構成遺伝子や抗菌タンパク質の発現は乳児期後期でも誘導されず、完全離乳後に大きく上昇した。盲腸では出生直後からムチン層構成タンパク質の一つである IgGFc 結合タンパク質（Fcgbp）が高発現していた一方で、離乳前後で発現変動する遺伝子は見られなかった。乳児期中期マウスの腸内細菌量は僅かであり、小腸上部から結腸までほぼ均一であった。その後乳児期後期に回腸から結腸で急速に菌体量が増加した。種または分類群特異的 16S ribosomal RNA のリアルタイム PCR を行ったところ、*Lactobacillus* 属細菌は乳児消化管全体から検出され、全菌体における相対比率は離乳後に小腸以外では減少した。一方、腸内の主要構成菌である *Clostridiales* 目の未同定菌は生後直後から離乳後まで菌叢における相対比率は一定であった。
＜考察＞哺乳期間では消化管全体に少量の細菌が存在し、主に小腸で腸内細菌の定着に関連する遺伝子の発現が誘導されていた。乳児期後期から主に盲腸以降で腸内細菌量が増加していたが、結腸でのムチン層構成タンパク質は完全離乳後に発現が上昇した。また乳児期初期の盲腸では腸内細菌非依存的に Fcgbp が発現し、特殊な環境が形成されていると考えられた。以上から小腸、盲腸、結腸は、離乳前後の初期腸内細菌叢形成に対する役割がそれぞれ異なることが考えられる。

gut microbiota, intestinal epithelial cell, weaning

講演番号：3B06p08
講演日時：3 月 27 日 15:17～ 総合学習プラザ B06 会場

腸内共生細菌由来ポリアミンは腸管粘膜バリアと免疫を調整する
Commensal bacterial polyamines regulate gut mucosal barrier and immunity
○中村 篤央[1,2]、栗原 新[3]、松本 光晴[2]、長谷 耕二[3]([1]慶應大薬、[2]協同乳業、[3]近畿大生物理工)
○Atsuo Nakamura[1,2], Shin Kurihara[3], Mitsuharu Matsumoto[2], koji hase[3] ([1]Keio Univ., [2]Kyodo Milk Industry Co. Ltd., [3]Kindai Univ.)

【目的】腸内細菌叢由来の代謝産物は宿主の健康に多大な影響を与える。ポリアミン（プトレッシン、スペルミジン、スペルミン）は、この順で合成され、核酸保護作用、細胞の増殖や分化、オートファジー促進など細胞健全性の維持に必須である。スペルミジンは、真核生物における遺伝子翻訳の開始・伸長に重要なタンパクである eIF5A の「ハイプシン化」と呼ばれる翻訳後修飾の基質としての役割も知られている。腸内細菌叢は、プトレッシン、スペルミジンを産生し、外因性ポリアミンの主要な供給源であるが、その作用を直接的に証明した報告は無い。本研究では、腸内細菌叢由来ポリアミンの腸管粘膜バリア及び腸管マクロファージの分化における影響とその分子メカニズムを検証した。
【方法】 ポリアミン を生合成可能な *E. coli* 野生株（WT 株）および、プトレッシン合成酵素遺伝子を全て破壊した *E. coli*（KO 株）を単独定着させたノトバイオートマウスを用い、①大腸上皮細胞中のポリアミン濃度の測定、②大腸上皮中の細胞増殖マーカーKi67 発現細胞数の定量、③CX_3CR1 および Ly6C をマーカーとした腸管マクロファージのフローサイトメーターによる解析、及び④デキストラン硫酸 Na（DSS）誘導性腸炎に対する影響の検証を実施した。作用機序を解明するために、大腸オルガノイドを用い、⑤外因性のプトレッシンの生体への移行を安定同位体ラベル化解析にて検証し、⑥スペルミジン合成阻害剤及びハイプシン化阻害剤による細胞増殖への影響を検証した。
【結果】①大腸管腔及び上皮細胞中のポリアミン濃度は、WT 株定着群で KO 株定着群より有意に高かった。②大腸上皮細胞の増殖も WT 株定着群で KO 株定着群と比較し、亢進していた。③大腸粘膜固有層中の CX_3CR1^{high} $Ly6C^-$ 抗炎症性マクロファージの比率は、WT 株定着群で高く、KO 株定着群では CX_3CR1^{low} $Ly6C^+$ 炎症性マクロファージ/単球の比率が高かった。④WT 株定着群は、KO 株定着群より腸炎に対する高い抵抗性を示した。⑤大腸オルガノイド実験により、外因性のプトレッシンの細胞内への取り込みとスペルミジンへの変換が確認された。⑥スペルミジン合成阻害剤の処置は、オルガノイドの成長を抑制し、ハイプシン化 eIF5A レベルも低下させた。また、ノトバイオートの大腸上皮細胞中のハイプシン化 eIF5A レベルは、WT 株定着群において、KO 株定着群より高いことが確認された。
【結論】腸内細菌由来のプトレッシンは、大腸組織内に取り込まれスペルミジンに変換されることで宿主の腸管バリア機能を高めるとともに、粘膜免疫系を抗炎症側へシフトさせる。また、その作用機序の一端が eIF5A のハイプシン化の亢進に起因することが示唆された。腸内細菌由来のポリアミンは、宿主腸管の恒常性の維持に寄与する新たな腸内細菌由来の機能性因子と考えられる。

gut microbiota, intestinal epithelial cell, macrophage

発表責任者：中村篤央（a-nakamura@meito.co.jp）

講演番号：3B06p09
講演日時：3 月 27 日 15:28～ 総合学習プラザ B06 会場

転写抑制因子 Bach1 は大腸粘液分泌に関与する

Involvement of transcription repressor Bach1 in colonic mucus secretion in mice

○谷川 潤[1]、髙木 智久[2]、水島 かつら[2]、平井 泰子[2]、武藤 哲彦[3]、五十嵐 和彦[3]、内藤 裕二[2]、東村 泰希[1,2] ([1]石川県大・生資環、[2]京府医院・医、[3]東北大院・医)
○ Jun TANIKAWA[1], Tomohisa TAKAGI[2], Katsura MIZUSHIMA[2], Yasuko HIRAI[2], Akihiko MUTO[3], Kazuhiko IGARASHI[3], Yuji NAITO[2], Yasuki HIGASHIMURA[1,2] ([1]Ishikawa Pref. Univ., [2]Kyoto Pref. Univ. of Med., [3]Tohoku Univ.)

【目的】腸粘液層の脆弱化は大腸炎を自発的に引き起こす事から、粘液層を強固に保つことは大腸炎予防において重要である。BTB domain and CNC homolog 1（Bach1）はヘム結合性を有する転写抑制因子であり、heme oxygenase-1 などの酸化ストレス応答に関与する遺伝子の発現制御に関与している。本研究では Bach1 に着目し、大腸における粘液分泌機構について解析を行ったところ、Bach1 欠損マウス（Bach1KO）において粘液分泌が顕著に亢進する事を見出した。しかし、Bach1 欠損に伴う粘液分泌亢進における分子機序等の詳細に関しては未だ不明である。したがって本研究の目的は、Bach1 欠損に伴う粘液分泌亢進の分子機序の解析及び粘液分泌亢進が果たす病態生理学意義の解明を目的とした。
【方法】雄性 C57BL/6J マウス（WT）および Bach1KO より大腸を摘出し、過ヨウ素酸シッフ染色（PAS 染色）を用いて大腸粘液産生に関する評価を実施した。ゴブレット細胞マーカーである MUC2、細胞増殖マーカーである Ki-67 ならびに Bach1 の発現レベルを免疫組織染色法により評価した。また、同様のマウスより脾細胞を回収し、ゴブレット細胞への分化・増殖に関与するサイトカインである Interleukin-13（IL-13）の産生量を ELISA 法により定量した。1%デキストラン硫酸ナトリウム水溶液（DSS; 分子量 36,000～50,000）の自由飲水により実験大腸炎モデルを作製し、組織学的および生化学的手法により炎症レベルを評価した。
【結果】WT および Bach1KO の大腸を用いた組織学的解析の結果、Bach1 欠損に伴い陰窩長の顕著な伸長が確認され、Ki-67 陽性細胞および MUC2 陽性細胞が有意に増加した。また、大腸組織における Bach1 の発現局在を免疫組織染色により評価した結果、Bach1 は免疫細胞が多く存在する粘膜固有層に強く発現することが判明した。さらに、Bach1KO 由来の脾細胞では、WT と比較して、IL-13 産生量が有意に高値を示した。実験大腸炎モデルを用いた *in vivo* 解析の結果、DSS 投与により惹起された病態スコアの上昇や腸管長ならびに、炎症性サイトカインの発現亢進は、Bach1KO において有意に抑制された。現在、TUNEL 法を用いて DSS 投与に伴う大腸組織傷害の程度を評価している段階である。
【結論】Bach1 欠損に伴う大腸粘液分泌の亢進には免疫細胞からの IL-13 分泌が関与する可能性が示唆された。また、Bach1 の発現制御は大腸炎予防における新たな分子標的となることが期待される。

Goblet cell, Colitis, Mucin

発表責任者：谷川　潤（jun.mv0610@gmail.com）

講演番号：3B06p10
講演日時：3 月 27 日 15:39～ 総合学習プラザ B06 会場

社会的ストレス応答に与える週齢の影響
Effects of ages on social stress responses in mice
○榊原 啓之[1]、浦上 倫緒[1]、田中 航[1]、松山 弘希[1]、柴田 ひかり[2]、平野 平野明伽音[2]、下位 香代子[2] ([1]宮崎大学農学部、[2]静岡県立大学)
○ Hiroyuki SAKAKIBARA[1], Rio Uragami[1], Wataru Tanaka[1], Hiroyki Matsuyama[1], Hikari Shibata[2], Akane Hirano[2], Kayoko Shimoi[2] ([1]Univ. of Miyazaki, [2]Univ. of Shizuoka)

【目的】現代社会において，人間関係の複雑化に伴った心理的および社会的なストレス負荷が増大している。社会的ストレスの負荷は睡眠障害や慢性疲労の原因となるだけでなく，がんや肥満に繋がることから，社会的ストレスから身を守る手段を確立することは重要課題の一つである。我々は先行研究で，成長期のマウスに社会的ストレスを負荷すると，代表的なストレスマーカーであるコルチコステロンの血中への分泌量が増大するが，ポリフェノールを豊富に含むセントジョーンズワート含有食などを摂取していると，ストレス応答を防げることを報告している(Sakakibara et al., J. Trad. Med., 26, 86-92, 2009)。一方，超高齢社会を迎えている我が国では，家族との離別や社会からの孤立などにより高齢者への社会的ストレス負荷が特に懸念されて要る。しかしながら，ストレス応答や抗ストレス効果に対する加齢の影響を追求した報告はほとんどない。本研究では，対面ストレス負荷モデルを用い，成長期（若齢）と中高齢期におけるストレス応答について比較検討した。

【方法】7 週齢（若齢）あるいは 50 週超齢（中高齢）の雄性 BALB/c マウスに対し，われわれの先行研究（Miyashita et al., BBRC, 349, 705-780. 2006）に従って対面ストレスを負荷させた。7 日間のストレス負荷後に，未絶食下で概日リズムを刻むコルチコステロンの分泌量が高まる時間帯（明期の終盤）に解剖に処し，血液試料を得た。副腎や胸腺等の臓器重量，血中のコルチコステロン量，グルコースやトリグリセリドなどの血液生化学指標，IL-6 などの血中サイトカイン類量を比較測定した。

【結果】若齢期のマウスに対面ストレス負荷を負荷すると，副腎肥大が確認された。一方，体重，脾臓，胸腺重量には影響は見られなかった。血中因子については，コルチコステロン量が有意に上昇したが，グルコース等の生化学指標に影響は見られなかった。現在，中高齢期のマウスに対する影響について解析中である。

Social stress, Stress responce, mice

発表責任者：榊原啓之（hiroyuki@cc.miyazaki-u.ac.jp）

講演番号：3B06p11
講演日時：3 月 27 日 15:50～ 総合学習プラザ B06 会場

体幹への着圧が代謝・生理機能に及ぼす影響

The effect of physiological function by trunk compression

○嶋田 耕育[1]、野原 正勝[1,4]、亀井 飛鳥[1]、篠崎 文夏[1]、立田 みどり[2]、渡邉 隆之[2]、徳田 充孝[2]、阿部 啓子[1,3]（[1]KISTEC、[2]株式会社ダイアナ、[3]東大院農、[4]岡理大・獣医）
○Kousuke SHIMADA[1], Masakatsu NOHARA[1,4], Asuka KAMEI[1], Fumika SHINOZAKI[1], Midori TATSUDA[2], Takayuki WATANABE[2], Mitsutaka TOKUDA[2], Keiko ABE[1,3]（[1]KISTEC., [2]DIANA Co.,Ltd., [3]Univ of Tokyo., [4]Okayama Univ of Sci.）

（背景、目的）着圧の効果は局所的な圧力負荷によってポンプ機能をサポートし血液循環の停滞に働きかけることによってむくみなどの改善効果を有するものである。血液循環への効果は老廃物代謝等の亢進を伴って代謝機能全般にも影響すると考えられる。したがって、体幹に加わる刺激、いわゆる着衣による着圧効果はむくみなどの改善作用のみではなく、様々な代謝機能調節に影響しうることが期待される。しかしながら着圧によるむくみなどへの効果は多く検討されてはいる一方で、着圧による代謝機能への効果・機能、さらには作用メカニズムについては未だ十分に理解されていない。今回我々は実験動物であるマウスを用いて、マウスに最適化された着圧負荷可能な衣服を作成し、着用・着圧下での短期的な代謝機能への影響についての検討を試みた。

（結果・考察）実験動物であるマウスに対して容易に着脱することなく一般的な運動機能（ぶら下がり行動、グルーミング行動など）を阻害しない着衣を作成した。10 週齢 C57BL6/N 雄性マウスに対して今回作成した専用の着衣を着用させ、十分に着衣への馴化をした個体について着圧あり、なしの２群を作成した。着圧の開始時期はマウスにとっての不活動期である明期（AM１０時～１１時）に実施した。着圧あり群については腹囲に対して１０％減となるような着圧を負荷し、着圧なし群に対しては着衣のみの状態を維持した。着圧条件変更後の２４時間の代謝機能への影響について呼気ガス分析装置を用いた呼吸商測定及び体重変化、摂餌量の計測を実施した。呼気ガス分析の結果、着圧開始より活動期となる暗期に入るまでの期間において着圧あり群が着圧なし群よりも有意に脂質利用が高いことを見出した。また呼気ガス測定中の体重変化において、着圧なし群は一定量の増加が見られる一方で、着圧あり群は着圧開始時より体重変動は認めなかった。以上の結果より、着衣による着圧の有無はマウスの代謝機能に対して影響しうることを見出した。今後、着圧による代謝機能への作用メカニズムについては肝臓または脂肪組織などを対象にした遺伝子発現解析によって明らかにする。本研究から得られる結果は、着衣による着圧と食品の摂取とを組み合わせた代謝機能への影響など、衣と食とを関連付けた健康維持法の提案につながる新しい研究へと応用・展開することが期待される。

Compression garment, Metabolic function, Respiratory quotient

発表責任者：嶋田　耕育（fp-shimada@newkast.or.jp）

講演番号：3B06p12
講演日時：3 月 27 日 16:01～ 総合学習プラザ B06 会場

着圧がマウス肝臓遺伝子発現に及ぼす影響
Effect of compression on hepatic transcriptome in mice
○篠崎 文夏[1]、嶋田 耕育[1]、亀井 飛鳥[1]、野原 正勝[1,2]、立田 みどり[3]、渡邉 隆之[3]、徳田 充孝[3]、阿部 啓子[1,4] ([1]KISTEC、[2]岡山理科大学、[3]株式会社ダイアナ、[4]東大院農)
○Fumika SHINOZAKI[1], Kousuke SHIMADA[1], Asuka KAMEI[1], Masakatsu NOHARA[1,2], Midori TATSUDA[3], Takayuki WATANABE[3], Mitsutaka TOKUDA[3], Keiko ABE[1,4] ([1]KISTEC, [2]Okayama Univ of Sci, [3]DIANA Co.,Ltd, [4]Univ of Tokyo)

【目的】衣服を着用したときに体に加わる圧力は弾性ストッキングで血流を制御する際や、運動時に皮膚や皮下組織が揺れることを防ぐなどの目的で利用されている。これまでに着衣による生体への加圧の影響について、圧力の力学的効果、皮膚圧反射、脳波などの中枢神経系等が研究されている。過度な加圧は局所的に毛細管の血流を遮断しうっ血状態を招く。また、皮膚への圧迫が皮膚や皮下の圧受容器を刺激しその反射で皮膚の血管径が変化する場合がある。このような血流量の変化は皮膚温度、発汗量、心拍数、呼吸数などを変化させる。さらに、加圧時の脳波はα波の低下する傾向にあることから脳は覚醒レベルが高い状態であり、また加圧は交感神経活動レベルの上昇、副交感神経活動レベルの低下をもたらし自律神経活動に影響することから、代謝を変化させると推察された。しかし、加圧による代謝変化で遺伝子発現に着目した研究はない。本研究では加圧が生体に与える影響を明らかにするため、代謝の要である肝臓の遺伝子発現への影響を調べた。
【方法】ストッキング生地を加工した着衣を作製し、麻酔下でマウスに装着した。馴化した後、2 群に分け、一方を動ける程度に腹部を締付け加圧し(加圧群)、もう一方は加圧なしのまま（通常群）で 2 日間飼育をした。採材した肝臓から Total RNA を抽出し、DNA マイクロアレイを用いてトランスクリプトーム解析を実施した。
【結果】着衣を締め加圧した加圧群でも通常群と同様に摂食および飲水行動が可能な状態であった。加圧を開始した日の摂餌量は加圧群で減少したが、二日目には通常群と変わらない量となり、加圧状態に馴化したと推察された。飼育期間の体重変化に群間で差はなかった。肝臓の遺伝子発現データを階層的クラスター解析した結果、加圧群と通常群で明確に分離するクラスターを形成することはなかったことから、遺伝子発現の全体のパターンは両群で大きく違わないことがわかった。次に、二群間比較し FDR<0.01 で変動遺伝子を抽出し Gene Ontlogy (GO) TERM 分類することによって、どのような生物学的機能を有するかを調べた。その結果、脂質代謝や刺激応答に関する遺伝子が多く変動していることがわかった。以上の結果から、腹部への加圧は肝臓の遺伝子発現を変動させることが明らかとなり、生体の代謝に影響すると示唆された。

transcriptome, liver, compression

講演番号：3B06p13
講演日時：3 月 27 日 16:21～ 総合学習プラザ B06 会場

カイコのクワ認識に関与する成分と味覚受容体の探索

Key compounds and gustatory receptors involved in silkworm feeding behavior.

○小林 優理、鈴木 俊太、東原 和成（東京大学 大学院農学生命科学研究科 応用生命化学専攻）
○YURI KOBAYASHI, SHUNTA SUZUKI, KAZUSHIGE TOUHARA (Univ. of Tokyo)

【背景】

植食性昆虫は多くの植物の中から、自らの宿主植物を選び摂食している。植物の識別には味覚情報の寄与が大きく、植物中の化合物を味覚受容体によって感知し、摂食行動を決定していると考えられる。しかし、植食性昆虫の味覚受容体の機能解析はほとんど行われていないため、味情報の受容や処理メカニズムについては不明な点が多い。カイコは伝統的な植食性昆虫のモデル生物であり、クワのみを摂食する特徴的な摂食行動を示す。「なぜカイコはクワしか食べないのか」という問いに対して、古くからクワ中の化合物の同定が試みられ、いくつかの化合物が同定されてきた。しかし、どの化合物が主要な活性物質でありカイコのクワ認識に最も寄与しているのかは明らかになっていない。またカイコのクワ認識に関わる味覚受容体やクワ認識メカニズムについても解明されていない。

そこで我々は、カイコのクワ認識メカニズムを解明するために、クワ抽出液の分画と味覚受容体欠損カイコの行動アッセイを行い、クワを最も特徴付けるような物質とクワ認識に寄与する味覚受容体の同定を目指した。

【方法・結果】

カイコの摂食行動を評価するために、行動アッセイ系の確立を行ない、摂食促進活性を指標にクワ抽出物の分画を行なった。クワのメタノール抽出物の液液抽出によって得られた水層を、固相抽出および多段階の液体クロマトグラフィーによって分画し最終精製画分を得た。これを LC-MSMS を用いて分析したところ、あるひとつの化合物が同定された。この化合物はコントロールに比べカイコの摂食を促進する傾向が見られた。

カイコのクワ認識に関わる味覚受容体を同定するため、CRISPR/Cas9 システムを用いて味覚受容体欠損カイコを作製し、クワから単離した化合物への摂食アッセイを行なった。その結果、ある味覚受容体欠損系統では野生型カイコと比較してクワ抽出液への摂食時間は変わらないが、この化合物への摂食時間の減少傾向が見られた。この味覚受容体欠損系統については詳細な解析を進めていく。

以上の結果から、本研究ではクワ中の主要な摂食促進活性を持つ化合物同定することに成功した。また、これを受容する味覚受容体についても有力な知見が得られつつある。今後、クワ中の活性物質と味覚受容体の対応づけをさらに進めることで、カイコのクワ特異的な摂食行動の分子基盤が明らかになることが期待できる。

gustatory receptor, insect, silkworm

発表責任者：東原和成（ktouhara@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3B06p14
講演日時：3 月 27 日 16:32～ 総合学習プラザ B06 会場

オオカミカイロモン類似物質の気相中濃度の継時変化はマウスの忌避行動に影響を及ぼす

Changes in gaseous concentration of wolf kairomone analogues attect mouse avoidance behavior

○長田 和実[1]、宮園 貞治[2]、野口 智弘[2] ([1]日大生物資源科学、[2]旭川医大医)
○Kazumi Osada[1], Sadaharu Miyazono[2], Tomohiro Noguchi[2] ([1]Nihon Univ., [2]Asahikawa Medical Univ.)

Y-字型迷路はマウスの嗅覚行動実験に用いられる装置であり、これまでに主要組織適合性抗原複合体（MHC）のにおい型付与作用の発見や、乳がん発現ウイルス感染、アルツハイマー病の形質、肺がん、加齢変化に伴うマウスのにおいの変化など様々な化学シグナルの存在を証明した強力な実験手段である。しかしながら、Y-字型迷路中のにおい成分の濃度やその継時変化についての詳細な検討については行っていない。近年我々は GC-MS およびヘッドスペースー固相マイクロ抽出法（HS-SPME） を用いて大気中の揮発性物質を迅速に抽出する方法を開発し、9 種類のアルキルピラジン類について Y-字型迷路の各部位の濃度の経時的変化の測定を試みた。またこれらのアルキルピラジンのマウスに対する忌避作用の測定についても Y-字型迷路を用いて行った。その結果、以下のことが明らかになった。１）HS-SPME 抽出法を用いて Y-字型迷路気相中のアルキルピラジン類の経時的濃度変化を定量することに成功した。２）Y-字型迷路の左右両短腕から流れ込むにおい成分はマウスが立ち止まる交差点部分で左右の気相が混合することなく適切に分布し、匂いの選択実験に極めて有用であることを示した。３）アルキルピラジン類の気相中濃度は物質により様々であったが、気相中濃度の高さと忌避反応の間には正の相関は見られなかった。４）しかしながら、経時的にその濃度が上昇する物質ではマウスに対する忌避作用と正の相関がみられることが明らかになった。

Y-Maze, alkylpyrazine, avoidance behavior

発表責任者：長田和実（osada.kazumi@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3B06p15
講演日時：3 月 27 日 16:43～ 総合学習プラザ B06 会場

リクガメのエサ探索についての行動および分子生物学的解析

Behavioral and molelural biological analysis of food serach in tortoises

○海老原 充[1]、西岡 ゆきこ[2] ([1]関東学院大理工、[2]石川県立大学)
○Mitsuru Ebihara[1], Yukiko Nishioka[2] ([1]Kanto-gakuin Univ., [2]Ishikawa Prefectural Univ)

多くのリクガメは動きが遅い上に視線が低く遠くを見渡せないために、餌の探索・獲得において不利であると考えられてきた。それにもかかわらず、2 億年以上前に地球上に現れて以来絶えることなく繁栄してきた。その理由の 1 つとして、ライオンも歯が立たない甲羅により守られてきたことがあげられる。それとともに、餌の探索競争にも勝利する能力も必要となる。そこで、本研究では、ケヅメリクガメやヒョウモンガメなどの代表的なリクガメを用いて、彼らのエサ探索戦略を行動学および分子生物学的に明らかにし、リクガメが 2 億年以上絶滅せずに繁栄してきた秘密を明らかにすることを目的とした。

行動実験では、ケヅメリクガメを用いた。様々な香気成分に対する two preference test により嗅覚を、様々な味物質を用いた two preference test により味覚を解析した。その結果、カメが嗅覚や味覚を用いて餌を探索しているが、その能力には明確な個体差があることを明らかにした。嗅覚においては、解析した 8 個体のうち、4 個体が酸味臭に対して嗜好性を示したが、残りの 4 個体は全く嗜好性を示さなかった。一方で、酸味臭に嗜好性を示した 4 個体は、酸味そのものに対しては忌避行動を取った。

さらに、酸味受容体 *PKD2L1* 遺伝子の変異解析を行ったところ、酸味に対して忌避行動を取った 4 個体にはアミノ酸変異を伴う SNP が見つかった。しかし、*PKD2L1* 遺伝子と酸味忌避行動には統計的に有意な相関が見られなかった。これは、変異型 *PKD2L1* 遺伝子のホモの個体が見つからなかったことや、*PKD2L1* 遺伝子がホモ 4 量体を形成していると考えられており、変異型および野生型 *PKD2L1* 遺伝子のヘテロな個体での PKD2L1 産物の作用機作が解明されていないことなどによると考えられた。本研究では、さらに同様の SNP が存在するかどうかを、アルダブラゾウガメ、ヒョウモンガメ、ホルスフィールドリクガメを用いて解析した。

behavioral analysis, sour taste, tortoise

発表責任者：海老原　充（ebihara@kanto-gakuin.ac.jp）

講演番号：3B06p16
講演日時：3 月 27 日 16:54～ 総合学習プラザ B06 会場

Sterol Composition Analysis of the Two-Spotted Crickets, Gryllus bimaculatus
○Yin Shan Isa MACK, Shinji Nagata (The University of Tokyo)

Background: Cholesterol is a compulsory material for living organisms, yet there is not a universal way of obtaining cholesterol. Insects are unable to biosynthesise sterols for growth due to the lack of biosynthetic enzymes. In the past century, scientists discovered that plant feeding insects obtain cholesterol via phytosterol conversion but the mechanism is not fully understood, for example, the conversion site and the involving enzymes remain unknown until now. Additionally, it is not confirmed if omnivorous species, which feed on food of both plant and animal origin, share any similarities as the suggested mechanism in sterol conversion. Also, some of the intermediates are still yet to be confirmed by successful extraction.
Aim: We aim to investigate the mechanism and reveal the details of sterol metabolism in omnivorous insects by analysing the sterol composition of various tissues in the two-spotted crickets, *Gryllus bimaculatus*.
Methods: The crickets were given diets composed of different concentrations of sterols, mainly cholesterol and phytosterols. Sterol fractions extracted from their tissues were analysed by gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS).
Results: GC-MS analyses revealed that dietary sterols, such as cholesterol and phytosterols varied across tissues. When an excess of cholesterol was given to crickets, greater amount of cholesterol was detected while only a small proportion of dietary sterols seemed to have been taken up. Contrarily, when a low sterol diet was provided, almost all dietary sterols (cholesterol and phytosterols) were not found in the gut contents, which indicated that dietary sterols were ingested by the crickets. Additionally, lathosterol and cholestanol were detected in midgut and fat body, which indicated the presence of possible reactions relating to the conversion of these sterols. Furthermore, 7-dehydrocholesterol was found in midgut. Midgut is thus suspected to be the conversion site between cholesterol and 7-dehydrocholesterol. The resulting sterol distribution in crickets enabled us to further investigate the metabolic reactions in the midgut and identify the intermediates involved in the dietary sterol metabolisms.

Cholesterol, Phytosterol, Insect

講演番号：3B06p17
講演日時：3 月 27 日 17:05～ 総合学習プラザ B06 会場

ネムリユスリカにおける新規トレハローストランスポーターの探索と機能解析
Identification of new trehalose transporters in Polypedilum vanderplanki

○水谷 晃輔[1]、菊田 真吾[2]、コルネット リッシャー[3]、宮田 佑吾[3]、徳本 翔子[1]、黄川田 隆洋[1,3] ([1]東京大新領域、[2]茨城大学農、[3]農研機構)
○ Kosuke MIZUTANI[1], Shingo KIKUTA[2], Richard CORNETTE[3], Yugo MIYATA[3], Shoko TOKUMOTO[1], Takahiro KIKAWADA[1,3] ([1]Univ Tokyo, [2]Ibaraki Univ., [3]NARO)

ネムリユスリカ(*Polypedilum vanderplanki*)は、アフリカの半乾燥地帯に生息する水生昆虫である。幼虫期に乾燥耐性を発揮することで、8 ヶ月にも及ぶ乾季を生きながらえることが出来る。乾燥耐性メカニズムに寄与する因子の一つとして、糖の一種であるトレハロースが挙げられている。乾燥過程のネムリユスリカ幼虫ではトレハロースが大量に合成され、幼虫体内の隅々にまで送達される。このトレハロースがガラス化することで、生体分子を保護していると考えられている。

ネムリユスリカの乾燥過程においてトレハロースは脂肪体で合成され、PvTRET1 (Trehalose Transporter 1) を介して、末梢組織へ放出されることが示されている。しかしながら、PvTRET1 は主に脂肪体で発現しており、末梢組織の細胞でどの様にトレハロースが取り込まれているかは不明である。そこで末梢組織におけるトレハローストランスポーターの探索および機能解析を行った。

CAGE (Cap Analysis of Gene Expression)-seq により、*PvTret1* には、既報のものとは別にもう一つ転写開始点が存在する事が明らかになり、新規なアイソフォームをコードしている事がわかった。そのアイソフォームの ORF は既報のものよりも長かったため、PvTRET1-long と命名し、既報の PvTRET1 を PvTRET1-short として区別した。興味深いことに、PvTRET1-short とは異なり、PvTRET1-long は脳などの末梢組織で高い発現を示していた。

ネムリユスリカの遺伝子データベースから Na^+共輸送体ファミリーのモチーフを持ち、かつ乾燥過程で mRNA の発現が上昇する遺伝子を探索した。その結果、新規トレハローストランスポーター候補遺伝子として PvSTRT1(Sodium-coupled Trehalose Transporter 1)を見出した。PvSTRT1 は末梢組織、特に脳で高発現していた。次に PvSTRT1 がトレハロース輸送能を持つかを検討するため、アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた機能解析を行った。その結果、PvSTRT1 は Na^+濃度依存的にトレハロースを輸送することが明らかになった。一方で PvTRET1-short は Na^+濃度に依存しない促進拡散型の糖トランスポーターであり、PvTRET1-long も PvTRET1-short とトランスポーターモチーフを全て共有していることから同様の性質を持つことが予測される。

この様に、各トランスポーターは輸送方式が異なるため、それぞれが乾燥耐性に対して異なる役割を果たしている可能性が考えられた。そこで現在、ネムリユスリカの培養細胞株を用いて、各トランスポーターのノックアウト細胞の作成を行っている。この細胞株を用いて、それぞれのトランスポーターの生理学的機能を解析するとともに、乾燥耐性への寄与について検討している。

dessication tolerance, Trehalose, transporter

発表責任者：水谷　晃輔（9812295242@edu.k.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3B06p18
講演日時：3 月 27 日 17:16～ 総合学習プラザ B06 会場

イヌとウシの酸性キチナーゼの不活性化

Inactivation of dog and bovine acidic chitinases

○小山 文隆[1]、樫村 明徳[1]、脇田 悟誌[1]、坂口 政吉[1]、菅原 康里[1]、田畑 絵理[1,2]([1]工学院大・先進工、[2]日本学術振興会・特別研究員（DC1））
○Fumitaka OYAMA[1], Akinori Kashimura[1], Satoshi Wakita[1], Masayoshi Sakaguchi[1], Yasusato Sugahara[1], Eri Tabata[1,2] ([1]Kogakuin Univ., [2]Research Fellow of JSPS DC1)

キチナーゼはキチンを加水分解し、細菌、真菌、線虫、節足動物などの生物において、キチンの代謝に不可欠で重要な酵素である。マウスやヒトなどのほ乳類は、キチンを合成しないが、二つの活性型キチナーゼであるキトトリオシダーゼ（Chit1）と酸性キチナーゼ（Chia）の遺伝子をゲノム中に有している。Chia はマウスの胃組織で高く発現し、pH 2.0 で最も高い活性を有している。最近、我々は、Chia が、マウス、ニワトリ、ブタの消化器系条件下で、消化酵素として機能することを報告した。本研究では、伴侶動物で肉食性のイヌと食糧として重要で草食性動物のウシ Chia について遺伝子発現解析とその酵素機能解析を行った。イヌ Chia mRNA は小腸、肝臓、胃、脳で比較的高く発現していた。しかし、Chia mRNA レベルは、今回解析したすべてのイヌ組織で、どの組織でも高く発現するハウスキーピング遺伝子の GAPDH より低かった。ウシ Chia の mRNA の発現レベルは、ウシの組織においても GAPDH より低かった。以上のことから、Chia mRNA レベルは、イヌとウシの胃組織でとても低いことが分かった。最後に、イヌとウシ Chia を組換え体として発現し、キチナーゼ活性をマウス、ブタ、ニワトリ Chia と比較した。イヌ Chia が pH 2.0 に活性の至適を持ち、ウシ Chia タンパク質は最大活性を pH 4.0 に有していた。イヌとウシ Chia のキチナーゼ活性は、マウス、ニワトリ、ブタ Chia よりも低かった。以上の結果は、ウシとイヌ Chia のキチナーゼが不活性化していることを示す。

acidic chitinase, dog, bovine

講演番号：3B07a01
講演日時：3 月 27 日 09:30～ 総合学習プラザ B07 会場

AMPK は TSC2 を介して AP-1 活性を制御する
AMPK regulates AP-1 activity via TSC2
○山下 達也[1]、松本 雄宇[1,2]、鈴木 司[1,2]、井上 順[1,2]、山本 祐司[1,2] ([1]東農大院・農・農化、[2]東農大・応生・農化)
○ Tatsuya YAMASHITA[1], Yu MATSUMOTO[1,2], Tsukasa SUZUKI[1,2], Jun INOUE[1,2], Yuji YAMAMOTO[1,2] ([1]Tokyo Univ. Agric., Grad.Sch., [2]Tokyo Univ. Agric.)

【背景・目的】AMPK は真核生物で高度に保存されたセリン/スレオニンキナーゼであり、エネルギーレベルの低下によって活性化され、ACC や TSC2 など多くの因子をリン酸化することでその活性を制御する。インスリンシグナルの中間因子である TSC2 は mTORC1 の活性化を抑制することで、細胞の増殖・成長を制御している。我々はこれまでの研究から TSC2 が細胞増殖などに関与する転写調節因子 AP-1 を活性化することを見出した。一方でその経路の上流のシグナルは不明なままである。そこで本研究では TSC2 による AP-1 活性化の詳細なメカニズムに着目するとともに、TSC2 による AP-1 の活性化に AMPK が関与しているか着目した。

【実験方法】HEK293T 細胞に TSC2 と luciferase 遺伝子上流に AP-1 結合配列をもつベクターをトランスフェクションして AP-1 活性を測定し TSC2 が AP-1 制御に関与しているか調べた。同様に T SC2 を過剰発現させ、AP-1 の構成因子 c-jun の活性化経路である JNK シグナルに影響を与えるか western blotting を用いて調べた。また JNK シグナルの因子である JNK と MKK7 が TSC2 と結合しているか GST pull down assay を用いて調べた。次に TSC2 を過剰発現させ、さらに AMPK 阻害剤である Compound C と活性化剤である A769662 をそれぞれ添加し、TSC2 による AP-1 の活性化に AMPK が関与するか調べた。また同様に TSC2 を過剰発現させ、インスリンを添加し、TSC2 による AP-1 の活性化にインスリンシグナルが関与するか調べた。

【結果および考察】TSC2WT 過剰発現時には AP-1 活性が有意に上昇した。このことから TSC2 が AP-1 活性を上昇させることが示唆された。また TSC2 を過剰発現させると c-jun と JNK のリン酸化レベルの上昇が見られた。さらに GST-pulldown assay から TSC2 が JNK と MKK7 それぞれと結合していることが示された。ここから TSC2 は MKK7/JNK/c-jun の経路を介して AP-1 を活性化していることが示唆された。また Compound C を添加し、AMPK を阻害すると、mock 群と TSC2 過剰発現群両方で AP-1 活性の低下が見られた。さらに A769662 を添加し、AMPK を活性化させると、両群で AP-1 活性の上昇が見られた。ここから AMPK が TSC2 による AP-1 の活性化に影響を与えていることが示唆された。一方でインスリンを添加しても、AP-1 活性に有意な変化は見られなかったことから、TSC2 による AP-1 の活性化にインスリンシグナルは関与していないことが示唆された。

TSC2, AMPK, AP-1

発表責任者：山本　祐司（yujiya@nodai.ac.jp）

講演番号：3B07a02
講演日時：3 月 27 日 09:41～ 総合学習プラザ B07 会場

AMPK が SRSF1 を介して選択的スプライシングに及ぼす影響の解析

The effect of AMPK on alternative splicing via SRSF1

○鈴木 司[1,2]、松本 英里[1]、松本 雄宇[1,2]、井上 順[1,2]、山本 祐司[1,2] ([1]東農大院・農・農化、[2]東農大・応生・農化)
○ Tsukasa SUZUKI[1,2], Eri MATSUMOTO[1], YU MATSUMOTO[1,2], Jun INOUE[1,2], YUJI YAMAMOTO[1,2] ([1]Tokyo Univ. of Agric., Grad. Sch., [2]Tokyo Univ. of Agric.)

【目的】AMP-activated protein kinase(AMPK)は細胞内のエネルギーセンサーとして働き、AMP/ATP 比の上昇に応答して活性化される Ser/Thr キナーゼである。AMPK はこれまでに糖・脂質代謝、タンパク質合成などを制御することでエネルギー恒常性に寄与することが知られているが、この他にも DNA 修復や微小管制御などにも関与することが報告されており、AMPK の多彩な生理機能が示されている。当研究室も、AMPK の新たな生理機能を見出す目的で AMPK の新規基質を探索した結果、選択的スプライシングを制御する Serine/Arginine-rich splicing factor 1 (SRSF1) を見出し、報告してきた。本研究では、SRSF1 によって制御されるマクロファージ刺激タンパク質受容体である Ron pre-mRNA の選択的スプライシングが、AMPK によって変動するか解析することを目的とした。

【方法】SRSF1 は Ron pre-mRNA におけるエクソン 12 内の exonic splicing enhancer (ESE) と結合することでエクソン 11 のスキッピングを促進し、delta-Ron を生成することが報告されている (Claudia Ghigna, Mol. Cell, 2005)。そこで、SRSF1 依存的な Ron pre-mRNA のスプライシングが AMPK の活性化剤等で変化するか、MCF-7 細胞を用いた RT-PCR 法を用いて解析した。続いて、AMPK による SRSF1 のリン酸化が、SRSF1 と Ron pre-mRNA との結合性に変化をもたらすか解析を行った。

【結果】AMPK の活性化によって Ron pre-mRNA のエクソン 11 のスキッピングが抑制され、一方、AMPK の阻害剤を用いることによってエクソン 11 のスキッピングが上昇する結果が得られた。また、SRSF1 をノックダウンした細胞においては、AMPK 活性化によるエクソン 11 のスキッピングの抑制が認められなかった。よって AMPK は SRSF1 を介して Ron pre-mRNA の選択的スプライシングを制御することが示された。また、In vitro および細胞内にて SRSF1 と Ron pre-mRNA との結合性は、AMPK による SRSF1 のリン酸化によって減少したことから、AMPK は SRSF1 をリン酸化することにより標的 RNA との結合を抑制させ、SRSF1 依存的な選択的スプライシングを阻害することが示唆された。

AMPK, Alternative splicing, SRSF1

発表責任者：鈴木　司（ts200635@nodai.ac.jp）

講演番号：3B07a03
講演日時：3 月 27 日 09:52～ 総合学習プラザ B07 会場

プロスタグランジン A_2 硫酸抱合体のプロスタグランジン受容体を介した生理機能の解明
Elucidation of physiological function of prostaglandin A_2 sulfate conjugate via prostaglandin receptors
○児玉 直輝[1]、黒木 勝久[1]、Ming-Cheh Liu[2]、水光 正仁[1]、榊原 陽一[1] ([1]宮崎大学、[2]トレド大学)
○Naoki KODAMA[1], Kathuhisa Kurogi[1], Liu Ming-Cheh[2], Masahito Suiko[1], Yoichi Sakakibara[1] ([1]Univ of Miyazaki, [2]Univ of Toledo)

【背景】プロスタグランジン(PG)はアラキドン酸カスケードによって膜リン脂質から合成される生理活性脂質である。細胞内で合成された PG は細胞外へと放出され、近隣の細胞上の受容体に作用した後に速やかに代謝され不活化する。炎症反応や免疫調節に関与する PGE_2 はこのような不活化代謝の他に非酵素的代謝反応によって PGA_2 へと代謝される。さらにこの PGA_2 はグルタチオン S 転移酵素(GST)や細胞質硫酸転移酵素による抱合反応を受けることが明らかにされている。このような抱合反応を受けた化合物が生理活性に影響を及ぼすことがしばしば報告されているが、PGA_2 の抱合体の影響については未だ解明されていない。PGE_2 受容体の過剰な活性は癌や炎症性疾患にも関与していることから、この代謝物がこれらの疾患の新たな治療標的になることも期待される。そこで本研究では機能未解明の PGA_2 硫酸抱合体の生理機能を明らかにすることを目的としている。
【方法】PGA_2 硫酸抱合体の各種 PG 受容体(DP2, EP1, EP2, EP3, EP4, FP, IP)への作用を調べるため受容体発現遺伝子を細胞にトランスフェクションし PGA_2 硫酸抱合体による受容体の活性値を測定した。測定は cAMP の産生量を増加させる EP2、EP4、DP1、IP については cAMP-Glo™ Max Assay(プロメガ)および cAMP Select EIA Kit(フナコシ)を、それ以外の受容体(EP1、EP3、FP)については研究室で構築したルシフェラーゼレポーターアッセイ系を用いて行った。次に免疫細胞における PGA_2 硫酸抱合体の作用について評価するためにリアルタイム PCR 解析によって PGA_2 硫酸抱合体のサイトカイン産生遺伝子の発現量に与える影響を調べた。測定は PrimeTime® qPCR Assays(IDT)を用いたハイブリダイゼーション法によって行った。
【結果・考察】PGA_2 硫酸抱合体の各種 PG 受容体への作用を測定した結果、EP2 受容体にのみアンタゴニスト活性を示すことがわかった。また、EP4 受容体においてはインバースアゴニスト活性を示すことが明らかになった。PGA_2 の硫酸化を触媒する SULT7A1 は腸管免疫に関与していることが示唆されているため PGA_2 硫酸抱合体はこれらの受容体を介して腸管免疫や癌関連遺伝子の発現を調節していることが考えられた。免疫細胞のサイトカイン遺伝子発現量への影響を調べた結果では PGE_2 による刺激と比較して IL-1β などの遺伝子は逆の挙動を示したが IL-10、TNF-α などの遺伝子は同じ挙動を示すことが明らかになった。この結果から PGA_2 硫酸抱合体が EP2、EP4 以外の受容体に作用していることも考えられた。今後は大腸癌細胞などを用いて同様の実験を行うことで腸管における PGA_2 硫酸抱合体の機能の解明をさらに進めていく予定である。

prostaglandin, sulfate conjugate, cytokine

発表責任者：児玉直輝（gc14014@student.miyazaki-u.ac.jp）

講演番号：3B07a04
講演日時：3 月 27 日 10:03～ 総合学習プラザ B07 会場

小胞体の形態やストレス応答に対する五環性トリテルペノイド類の作用機序の解析

Mechanism of action of pentacyclic triterpenoids on the morphology and unfolded protein response of endoplasmic reticulum.

○馬場 康輔、佐々木 咲季、片岡 孝夫（京工繊大院・応用生物）
○Kosuke Baba, Saki Sasaki, Takao Kataoka (Kyoto Institute of Technology.)

【目的】

五環性トリテルペノイド類は、抗炎症活性や抗腫瘍活性などの生理活性を有する化合物であり、様々な植物に含まれている。我々は炎症性サイトカイン interleukin-1α(IL-1α)によって誘導される細胞接着因子の発現に対する五環性トリテルペノイド類の作用機序の解析を行い、これまでにアシアチン酸 （asiatic acid）やウルソール酸 (ursolic acid)が intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)の細胞内輸送、糖鎖修飾、タンパク質発現量に作用することを報告してきた [1,2,3]。本研究では、小胞体の形態や endoplasmic reticulum associated degradation （ERAD）などのタンパク質の品質管理機構に対するアシアチン酸、ウルソール酸、マスリン酸 （maslinic acid）、コロソール酸 (corosolic acid)、ベツリン酸 (betulinic acid)、オレアノール酸 (oleanolic acid)の影響を解析した。

【方法・結果】

EGFP タグを付加した小胞体シャペロンタンパク質 calnexin を安定発現するヒト肺がん細胞 A549 細胞株を構築し、小胞体の形態に対するアシアチン酸の影響を解析した。その結果、アシアチン酸が小胞体の形態を大きく変化させることが観察されたことから、アシアチン酸が小胞体ストレスを誘導することが示唆された。五環性トリテルペノイド類が小胞体ストレスセンサーIRE1 の標的である XBP-1 mRNA のスプライシングに対して与える影響を電気泳動と定量 PCR で解析したところ、いずれの五環性トリテルペノイド類も小胞体ストレスを誘導剤として知られる Thapsigargin と比べて弱いものの、小胞体ストレスを誘導することが明らかとなった。さらに、ウェスタンブロット法を用いてアシアチン酸が ERAD に与える影響を調べたところ、アシアチン酸が ERAD を阻害することが明らかとなった。以上の結果から、アシアチン酸、ウルソール酸、マスリン酸、コロソール酸、ベツリン酸は小胞体ストレスを誘導すること、並びにアシアチン酸は ERAD を阻害することが明らかとなった。

【参考文献】

[1] Mitsuda, S. *et al*., FEBS Open Bio, 4, 229-239 (2014)
[2] Hiramatsu, R. *et al*., Eur. J. Pharmacol., 767, 126-134 (2015)
[3] Baba, K. *et al*., Biol. Pharm. Bull. 41, 1757-1768 (2018)

Pentacyclic triterpenoids, ER stress, ER associated degradation

発表責任者：馬場 康輔（cutezaq0815@gmail.com）

講演番号：3B07a05
講演日時：3 月 27 日 10:14～ 総合学習プラザ B07 会場

COX と PPARγによるアレルギー応答抑制機構

Protective function of Cyclooxygenase and PPARγ on allergic response

○長田 和樹、笠倉 和巳、三浦 亮介、八代 拓也、西山 千春（東理大基礎工）
○Kazuki Nagata, Kazumi Kasakura, Ryosuke Miura, Takuya Yashiro, Chiharu Nishiyama (Dept. of Biol Sci and Tech., Tokyo Univ. of sci)

マスト細胞は IgE を介した I 型アレルギー反応のエフェクター細胞である。現行のアレルギー治療薬がマスト細胞活性化に伴う一連の反応のいずれかを抑制するものであることから、マスト細胞の機能制御がアレルギー疾患の治療や予防に有効であることが支持される。核内受容体スーパーファミリーに属する PPARγは脂肪細胞の分化やインスリン感受性に関わり、そのリガンドは 2 型糖尿病の治療薬である。近年、PPARγが免疫細胞機能にも影響を及ぼすことが見出されたが、マスト細胞における機能はほとんど不明であった。そこで、本研究ではマスト細胞依存性アレルギー反応において PPARγが果たす役割を明らかにすることを目指した。まず、マウス骨髄由来培養マスト細胞を調製し、IgE と抗原を用いて細胞の活性化反応を解析した。IgE/抗原刺激によりマスト細胞は脱顆粒反応を引き起こすが、PPARγ siRNA を導入したマスト細胞では脱顆粒が有意に増悪化した。さらに刺激によって誘導されるサイトカインの転写活性化が TNF-α、IL-6、IL-4、IL-13 いずれとも PPARγノックダウン（KD）細胞で劇的に増強され、産生されるタンパク質量も有意に増加した。これらの現象は、異なる配列の PPARγsiRNA でも認められたことから off target 効果の可能性は低いと考えられる。PPARγには 15-deoxy-$\Delta^{12,14}$-PGJ_2 など一部のエイコサノイドが内在性リガンドとして作用することが知られている。そこでマスト細胞が産生するエイコサノイドがオートクラインに PPARγの機能を調節する可能性を調べるため、COX 阻害薬であるアスピリンや COX siRNA を用いて解析した。するとアスピリン処理したマスト細胞では脱顆粒やサイトカイン発現誘導が増強され、COX-1、COX-2 いずれの KD でも脱顆粒やサイトカイン産生は増強傾向にあったが、特に COX-1 KD の影響が顕著であった。一方、PPARγKD による細胞活性化の増強はアスピリン処理や COX-1 KD 条件下でも観察され、PPARγと COX 両者を阻害することで相乗的に細胞の活性化が増幅した。以上のことから、主に COX-1 を介して合成されるエイコサノイドがマスト細胞の活性化を抑制するが、PPARγによる抑制は COX には依存せず、PPARγと COX とは独立した経路でマスト細胞の活性化抑制に寄与する可能性が示された。最後に、受動的アナフィラキシーマウスモデルを用いて IgE 依存性アレルギー反応を解析した結果、アナフィラキシーショックによる体温低下が PPARγアゴニストのピオグリタゾン経口投与によって有意に緩和され、COX 阻害薬インドメタシン投与によって増悪化した。以上、本研究により PPARγと COX-1 がそれぞれ独立した経路でマスト細胞の活性化抑制に関わることが明らかとなり、これらの分子制御がアレルギーの予防や緩和に繋がることが示唆された。

Mast cell, PPARγ, COX

講演番号：3B07a06
講演日時：3 月 27 日 10:35～ 総合学習プラザ B07 会場

ドラッグデザインに有用なニューロセルピン熱安定型変異体の創出
Construction of a thermostable mutant of neuroserpin useful for drug design
○陶山 莉菜乃[1]、原田 彰大[1]、三上 文三[2,3]、恩田 真紀[1] ([1]大阪府立大学・理・生物科学、[2]京都大学生存圏研究所、[3]京都大学エネルギー理工学研究所)
○Rinano SUYAMA[1], Akihiro HARADA[1], Bunzou MIKAMI[2,3], Maki ONDA[1] ([1]Dept. of Biol. Sci., Grad. Sch. of Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Inst. for Sustainable Humanosphere, Kyoto Univ., [3]Inst. of Adv. Energy, Kyoto Univ.)

【研究の背景と目的】ニューロセルピン(NS)は、主に大脳で発現するセルピン(serine protease inhibitor superfamily に属する蛋白質群)で、組織プラスミン前駆体活性化因子(tPA)を特異的に阻害する。tPA を特異的に阻害するセルピンとしては、血中を含め全身に存在する PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1)が古くから知られており、PAI-1 を阻害すればプラスミン(血栓を溶解する酵素)が増強することから、PAI-1 阻害化合物は血栓症治療薬として開発が盛んに行われている。更に最近、プラスミンがアミロイドプラークを分解することが明らかとなり、PAI-1 阻害剤がアルツハイマー病治療薬としても有望視されている。しかし、我々は、大脳に局在発現する NS を阻害の標的とした方が、より副作用が少なく高効率な薬剤が開発できると考えている。そこで、結晶構造に基づく薬剤設計に有用な NS 熱安定型変異体を創出することを本研究の目的とした。
【実験方法】セルピン族の蛋白質はポリマー化や不活性型への転移(Latent 化)が起こりやすく、薬物候補との複合体の結晶構造解析は極めて困難である。PAI-1 の場合、野生型に比べ寿命が 74 倍長い変異体 N150H/K154T/Q319L/M354I を阻害剤開発に利用するのが標準であるが、NS にはそのような安定型変異体は見出されていない。我々は、セルピン間で高度に保存されているが、NS では異なる一次配列になっている領域に着目し、NS 変異体 N161G/L162K/V163I (NS_{GKI})を調製して、その構造および緒性質を X 線結晶構造解析、示差走査熱量測定、分光学的手法や電気泳動法などで調べた。
【結果】NS_{GKI} は狙い通り、野生型 NS に比べ T_m 値が 7.8ºC も高く、野生型がポリマー化する条件でポリマー化が起こらなかった。また、分解能 2.39Å での結晶構造解析に成功し、同じ結晶系での野生型(分解能 1.95Å)と比較したころ、変異導入部位近傍のアミノ酸側鎖の向きを除き、構造がよく一致していた (RMSD: 0.40Å)。更に、野生型と同等の活性があり、我々が現在見出している阻害剤候補の Embelin (昨年の本学会大会で報告)との結合にも差はなかった。NS_{GKI} の変異導入部位近傍は、これまで見出されている多くのセルピン阻害剤の結合部位と離れた位置にあり、薬物候補との複合体の形成に影響を与えないと考えられる。
【結言】今回我々は、アルツハイマー病治療薬のシーズとなる NS 阻害剤開発に有用な変異体 NS_{GKI} を創出し、その X 線結晶構造解析にも成功した。

SBDD, plasmin, Alzheimer's disease

発表責任者：恩田真紀（onda@b.s.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：3B07a07
講演日時：3 月 27 日 10:46～ 総合学習プラザ B07 会場

病原性ニューロセルピン変異体 H338R の調整法の確立と諸性質の解析

Preparation and characterization of the pathogenic mutant of neuroserpin H338R.

○品田 紗智子、小林 誠、恩田 真紀 (大阪府立大学・理・生物科学)
○Sachiko SHINADA, Makoto KOBAYASHI, Maki ONDA (Dept. of Biol. Sci., Grad. Sch. of Sci., Osaka Pref. Univ.)

【研究の背景と目的】ニューロセルピン(NS)は、大脳に局在して発現し、神経軸索から分泌されるセルピン(serine protease inhibitor superfamily に属する蛋白質群)で、記憶や感情の抑制に関与している。セルピン族の蛋白質はポリマー化しやすく、NS ではポリマーが脳内に蓄積して認知症を引き起こす変異体が 6 種類確認されている。これらの病原性 NS 変異体のうち、発症年齢が 50 才前後と比較的遅い S49P 変異体については、当研究グループが X 線結晶構造解析に成功するなど、構造や生化学的な情報がある程度蓄積されている。しかし、10 代前半で発症する H338R 変異体(以下 H338R)については、極めて不安定であるために組換え型蛋白質の調製法すら確立されておらず、その緒性質はこれまで全く不明であった。本研究では、組換え型 H338R の調製、および緒性質の解析を目的とした。
【実験の方法と結果】H338R は凝集しやすく、宿主や培養条件を工夫しても可溶性画分から得ることは困難であった。そこで、大腸菌封入体として目的蛋白質を大量に取得し、Refolding による調製を試みた。まず、封入体を界面活性剤で洗浄した後にグアニジン塩酸塩で変性させ、変性条件下、Ni-アフィニティ・クロマトグラフィーにより精製した。得られた精製変性試料を大量の緩衝液中に滴下して希釈し、4ºC で 1 週間 Refolding させたところ、単量体 H338R が培地 1 L 当たり 7.8 mg の収率で得られた。更に、蛍光プローブの修飾やペプチドマッピング解析に利用できる Cys を導入した変異体 H338R/T296C/E343C についても、培地 1 L 当たり 8.1 mg の収率で単量体の調製に成功した。これらの蛋白質を用いて、H338R の緒性質について円偏光二色性や蛍光分析、電気泳動法により調べた。その結果、得られた H338R 単量体は、Native 型に比べてα-ヘリックス含量が僅かに少なく、分子コンパクトネスにおいてもやや広がっており、長時間安定に存在できる Folding 中間体様の特徴を持つことが明らかとなった。
【考察】今回解明した H338R の特徴は「セルピンのポリマーは、Native 型からではなく Folding 中間体から形成される」という山崎モデル(*Nature* 2008)を裏付ける実験的な証拠となる。セルピンの Folding 中間体はセルピン病(セルピンのポリマー化が原因で発症する疾患群：認知症や肝硬変など)治療薬の有望な標的分子の 1 つであり、今回、Folding 中間体と考えられる単量体、およびその Cys 導入変異体の大量調製に成功したことは、治療薬の開発に大きく貢献するものである。

folding, dementia, target molecule

講演番号：3B07a08
講演日時：3 月 27 日 10:57～ 総合学習プラザ B07 会場

セルピンの線維化と凝集体形成における C 末端領域の関わり
Involvement of the C-terminal region of serpins in the formation of aggregates and fibrils.
○米倉 百音、廣畠 早紀、西川 勇樹、恩田 真紀（大阪府立大・理・生物科学）
○Mone Yonekura, Saki Hirohata, Yuki Nishikawa, Maki Onda (Dept. of Biol. Sci., Grad. Sch. of Sci., Osaka Pref. Univ.)

【背景と目的】アミロイドーシスは、アミロイド線維を形成した蛋白質が全身の様々な臓器に沈着し、機能障害をおこす疾患の総称で、蛋白質が高濃度になると発症リスクが高まる。セルピン族(Serine Protease Inhibitor superfamily)の蛋白質は、血中に比較的高濃度に存在し、かつ重合しやすい性質がある。最近、セルピン族に属するオボアルブミン(OVA)が、アミロイド線維を形成することが報告された(Noji M., *et al*., 2018, *Biochemistry* **57**)。そこで、セルピンの中で最も血中濃度が高いα_1-アンチトリプシン(AT)と OVA を用い、セルピンの線維化と凝集性について調べた。

【実験の方法と結果】OVA を加熱するとアミロイド線維が形成されることから、AT についてもチオフラビン T 蛍光を指標に線維化を調べた。その結果、OVA と同様の蛍光強度変化が、加熱により観察された。セルピンはドメインスワップによりオリゴマー化する特徴があり、このオリゴマーが凝集して蓄積すると、認知症や肝硬変が発症する。そこで、オリゴマーからの線維形成について、先と同様の手法で調べたところ、OVA と AT どちらのオリゴマーからも、蛍光強度の増大が見られた。OVA と AT のオリゴマーは、単量体の C 末端領域がドメインスワップして伸長していくこと、Folding 中間体においてドメインスワップが起こることが既に明らかとなっている。また、凝集傾向予測計算を行った結果、両蛋白質とも、C 末端領域の凝集性が高いことが分かった。そこで、C 末端領域(OVA: Ser353-Pro385, AT: Ser359-Lys394)を除いた H 鎖(OVA: Gly1-Ala352, AT: Glu1-Met358)を調製し、Folding 中間体状態でのオリゴマー形成、およびオリゴマーからの線維化／凝集体形成について調べた。その結果、意外なことに、H 鎖だけでもオリゴマーを形成したが、全長蛋白質では起こったオリゴマーからの線維化や凝集体形成はほとんど見られなかった。しかし、Folding 中間体形成後に L 鎖(C 末端領域のペプチド)を添加すると、線維化／凝集化が起こった。化学修飾および蛍光共鳴エネルギー移動の測定の結果から、L 鎖は H 鎖の特定部位に結合し、凝集を引き起こしていることが分かった。セルピンの C 末端領域は、直鎖伸長(オリゴマー化)だけでなく、凝集(オリゴマー間の lateral な相互作用)や線維化に深く関与し、その機構について報告する。

ovalbumin, fibrillogenesis, aggregation

講演番号：3B07a09
講演日時：3 月 27 日 11:08～ 総合学習プラザ B07 会場

サリドマイド催奇性に関わる $CRL4^{CRBN}$ の新規基質の同定

Identification of a $CRL4^{CRBN}$ substrate associated with thalidomide teratogenicity

○朝妻 知子、伊藤 拓水、半田 宏（東医大医）
○Tomoko ASATSUMA-OKUMURA, Takumi ITO, Hiroshi HANDA (Tokyo Med. Univ.)

サリドマイド(Thalidomide)は 1957 年に鎮静剤として発売され、我が国を含む 40 を超える国で広く使用されたが、四肢形成や耳の異常など深刻な催奇形性を有したため 1960 年代前半には市場から撤退された。しかしながらハンセン病や多発性骨髄腫に対する優れた治療効果が判明し、近年になり厳格な統制の下、再び認可されている。また最近ではレナリドミドなど優れた抗がん活性を有するサリドマイド誘導体なども開発されている。サリドマイドや誘導体の標的因子は長年渡り不明だったが、我々の研究グループは 2010 年、サリドマイドの中核標的因子としてセレブロン(Cereblon, CRBN)を同定し、ゼブラフィッシュ胚やニワトリ胚を用いて CRBN がサリドマイドによる催奇形性を司ることを明らかにした。この際に CRBN は CUL4-DDB1 と複合体を構成し、E3 ユビキチンリガーゼ複合体 $CRL4^{CRBN}$ の基質受容体として機能することも示した(Science, 2010)。その後、サリドマイドやその誘導体依存的な $CRL4^{CRBN}$ の様々な基質(Ikaros など)が我々を含む複数の国内外の研究グループによって同定され、$CRL4^{CRBN}$ は結合した化合物に依存して新たな基質と結合し、分解することが明らかとなってきた（このような基質はネオ基質とも呼ばれる）。これら分解基質は抗多発性骨髄腫作用などサリドマイド(誘導体)の主作用に関わることが示された一方で、サリドマイドの副作用である催奇形成に関わる基質は未解明であった。

今回我々は、$CRL4^{CRBN}$ のサリドマイド依存的な新規ネオ基質として TP63 (p63)遺伝子産物 ΔNp63α および TAp63α を同定した。p63 タンパク質は p53 ファミリーに属するが、複数の発生過程にて重要な役割を有することでも知られる。ΔNp63α は四肢発生に必須であり、ヒトにおける遺伝疾患では四肢の形態異常を生じる。TAp63α は蝸牛菅の発生や聴覚に重要な転写因子 Atoh1 の発現を制御する。本研究ではモデル動物としてゼブラフィッシュを用い、サリドマイド処理により CRBN が ΔNp63α と TAp63α のそれぞれを分解することで、胸ビレと耳胞の発生異常を引き起こすことを示した(Asatsuma-Okumura et al. Nat. Chem. Biol., 2019)。本研究はサリドマイド催奇形性の分子基盤を生化学および発生学の２つのアプローチを用いることでネオ基質の実態も含めて明らかにしており、その成果は催奇形性を軽減させた新たな薬剤開発に貢献できるものと期待される。

thalidomide, cereblon, ubiquitin

発表責任者：朝妻知子（tokumura@tokyo-med.ac.jp）

講演番号：3B07a10
講演日時：3 月 27 日 11:19～ 総合学習プラザ B07 会場

ヒトとマウスキトトリオシダーゼの糖転移活性の評価

Evaluation of transglycosylation activity of human and mouse chitotriosidase

○木村 将大[1,2]、渡邊 尭[1]、関根 一考[1]、石塚 ひとみ[1]、池尻 碧[1]、小山 文隆[1]（[1]工学院大・先進工、[2]日本学術振興会・特別研究員 DC2）
○Masahiro Kimura[1,2], Takashi Watanabe[1], Kazutaka Sekine[1], Hitomi Ishizuka[1], Aoi Ikejiri[1], Fumitaka Oyama[1] ([1]Department of Chemistry and Life Science, Kogakuin University, Hachioji, Tokyo 192-0015, Japan, [2]Research Fellow of Japan Society for the Promotion of Science (DC2), Koujimachi, Chiyoda-ku, Tokyo 102-0083, Japan)

キチンは，N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) が β-1, 4 結合した重合体で，寄生虫のミクロフィラリアの鞘や真菌の細胞壁，昆虫や甲殻類の外骨格の主要な構成成分である。キチナーゼ (EC 3.2.1.14) は，キチンの β-1,4 グリコシド結合を加水分解する酵素である。キチナーゼは，糖質関連酵素データベース [The Carbohydrate Active enZYmes Database (CAZy), http://www.cazy.org/] で，グリコシド結合を加水分解する酵素 (Glycoside Hydrolase：GH) として分類されている。ほ乳類はキチンを合成しないにもかかわらず，キチナーゼを合成している。マウスとヒトでは，活性を持つキチナーゼとして chitotriosidase (Chit1) と acidic mammalian chitinase (AMCase) が同定されている。両酵素は細菌のキチナーゼに相同性を示し，GH18 ファミリーに分類される。Chit1 レベルは，常染色体劣性のリソソーム蓄積症であるゴーシェ病患者の血漿中で，約 1,000 倍上昇する。しかし，これらの疾患や病態における病態生理学的なほ乳類キチナーゼの役割は不明な点が多い。Chit1 はヒトやマウス組織で広く発現し，ヒトでは肺で，マウスでは胃で最も高く発現している。これまで，ヒト Chit1 (H.Chit1) とマウス Chit1 (M.Chit1) の遺伝子レベルでの研究は行われていたが，両酵素の機能を直接比較した研究はない。既にヒト Chit1 は糖転移活性を持つことが報告されている。本研究では H.Chit1 と M.Chit1 を同一条件でキチン基質に作用させ，その分解産物を比較することで，それぞれの糖転移活性を評価した。大腸菌で発現した組換え酵素は Protein A-H.Chit1-V5-His, Protein A-M.Chit1-V5-His からなる融合タンパク質である。大腸菌で発現したヒトとマウスの Chit1 を Ni セファロースカラム，HiTrap Q HP カラムを用いて精製を行った。両酵素の糖転移活性は 4-nitrophenyl N,N′-diacetyl-β-D-chitobioside [4NP-$(GlcNAc)_2$] と 4-methylumbelliferyl N-acetyl-β-D-glucosaminide [4-MU-GlcNAc] 用いた比色法と蛍光法を組み合わせて決定した。さらに，得られた分解産物を Fluorophore-Assisted Carbohydrate Electrophoresis (FACE) によって解析し，その分解産物を解析した。その結果，ヒトとマウス Chit1 の糖転移活性は異なっていた。このことは，ヒト Chit1 とマウス Chit1 は生体内でそれぞれ異なる機能を持つことが示唆された。

Chitotriosidase, Mammalian, Transglycosylation activity

発表責任者：木村　将大（bd17002@ns.kogakuin.ac.jp）

講演番号：3B07a11
講演日時：3 月 27 日 11:40～ 総合学習プラザ B07 会場

Caenorhabditis elegans を用いた低温暴露応答における CD36 の機能解析
Role of worm CD36 in response to low temperature exposure
○松本 晋也、小粥 みどり、原田 明穂、廣田 さやか、宮崎 愛子、一谷 美月、高桑 沙也加、平松 あい（京女大）
○Shinya MATSUMOTO, Midori Ogai, Akiho Harada, Sayaka Hirota, Aiko Miyazaki, Mitsuki Ichitani, Sayaka Takakuwa, Ai Hiramatsu (Kyoto Women's Univ)

CD36 は、血小板、単核食細胞、脂肪細胞、肝細胞、筋細胞などに発現する Class B スカベンジャー受容体であり、脂肪酸取り込み、酸化 LDL との結合、マラリア原虫感染赤血球の毛細血管への吸着などに関与することが報告されている。日本人には CD36 の欠損が比較的高頻度で見いだされている。しかし、CD36 を持たない個体は明確な身体機能の変調や障害を示さないことから、CD36 の機能には不明な点が多い。線虫（*Caenorhabditis elegans*）には CD36 遺伝子が存在する。そこで、CD36 の機能を明らかにするため、CD36 をノックダウンした線虫を解析したところ、低温暴露（4℃）で生存率が低下することが見いだされた（本学会 2018 年大会）。このことは、CD36 がこれまでに報告されている機能に加え、新たに温度（あるいは体温）に関連する機能に関与している可能性を示すものである。
CD36 の低温応答メカニズムを解明するために、低温暴露時における線虫体内の脂質組成の変化を GC-MS を用いて解析した。その結果、不飽和脂肪酸とシクロプロパン脂肪酸（9,10-methylenehexadecanoic acid, 11,12-methyleneoctadecanoic acid）の含量に変化が認められた。また、低温暴露後の線虫体内の脂肪量を比較したところ、CD36 ノックダウン線虫では低温暴露に対応した脂肪動員が障害を受けている可能性が示唆された。線虫における低温暴露と脂肪代謝の関連性については不明な点があるが、CD36 は低温応答における脂肪代謝の調節に関与している可能性が考えられた。また、生物がもつ低温応答の一つに不凍物質（トレハロースやグリセロール）の合成がある。そこで、これら不凍物質の関与を検討するため、不凍物質の代謝酵素の発現変動を調べたが、大きな変化は認められなかった。
低温応答における CD36 の関与をさらに解析すべく、現在脂肪酸代謝遺伝子を欠損した変異体線虫を用いて分子遺伝学的解析を進めている。

Caenorhabditis elegans, CD36, low temperature

発表責任者：Shinya Matsumoto（matumots@kyoto-wu.ac.jp）

講演番号：3B07a12
講演日時：3 月 27 日 11:51～ 総合学習プラザ B07 会場

脂質代謝制御因子 Insig-酸化ステロール結合の新規応答

The novel signaling of Insig-oxysterol interaction

○渡邉 雄一、三吉 翔子、清水 誠、山内 祥生、佐藤 隆一郎（東大院・農生科・応生化）
○Yuichi WATANABE, Shoko MIYOSHI, Makoto SHIMIZU, Yoshio YAMAUCHI, Ryuichiro SATO
(Dept. of Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., Univ. of Tokyo)

【背景･目的】Insig は小胞体膜上で酸化ステロールとの結合を介し、SREBP 活性制御や HMG-CoA 還元酵素の分解制御による脂質代謝調節を担う。Insig はこれら脂質代謝制御のほかにも、抗ウイルス機能を有するタンパク質の制御に関わるなど、その機能は多岐にわたる。近年、いくつかの酸化ステロールがストレス応答性の転写因子 ATF4 タンパク質を増加させることが報告され、我々はこの ATF4 発現に Insig が関与することを示唆する結果を得た。ATF4 はアミノ酸代謝関連遺伝子や糖脂質代謝関連遺伝子、アポトーシス関連遺伝子などの発現を調節することで生体内恒常性の維持を担っている。そこで、本研究では酸化ステロール–Insig による新機能の解明を目的として、Insig と酸化ステロールによる ATF4 発現調節機構及びその影響について解析を試みた。

【方法】CHO-7(Chinese hamster 卵巣由来)細胞並びに Insig 欠損 CHO-7 株 SRD-15 に、25-Hydroxycholesterol (25HC)をはじめとする 7 種の酸化ステロールを 5 μM, 24h 処理し、WB 及び RT-qPCR 法により各種タンパク質及び遺伝子発現解析を行った。また、Insig1、Insig2 (野生型及び酸化ステロール結合能欠損型)に関してレンチウイルスベクターを用いて SRD-15 に発現させ、ATF4 発現制御における Insig の分子機能について検証した。さらに、25HC 処理による CHO-7 及び SRD-15 の細胞生存率を MTT assay により評価した。

【結果・考察】処理した 7 種の酸化ステロールのうち 25HC を含む Insig 結合能の高い 3 種の酸化ステロールの添加により CHO-7 においては ATF4 タンパク質の発現が亢進した。一方で、Insig 欠損株 SRD-15 における ATF4 タンパク質の発現上昇はわずかであった。さらに、レンチウイルスベクターを用いた Insig の発現により、SRD-15 における 25HC による ATF4 の発現亢進が回復したのに対し、酸化ステロール結合能を欠損させた Insig の発現ではこの回復は見られなかった。これらの結果から、酸化ステロールによる ATF4 発現亢進は Insig との結合を介していることが示唆された。また、RT-qPCR の結果から、25HC による ATF4 発現上昇はその標的遺伝子のうちアポトーシス関連遺伝子の発現を顕著に亢進し、一方 SRD-15 においてはこれらアポトーシス関連遺伝子の発現亢進は見られなかった。その結果、25HC 処理下における細胞生存率は CHO-7 において顕著に低下したのに対し、SRD-15 においてはほとんど変化しなかった。本研究結果より、酸化ステロールは Insig との結合を介して ATF4 発現を上昇させ、細胞死を誘発することが示唆された。

oxysterol, stress response, cell death

講演番号：3B07a13
講演日時：3 月 27 日 12:02～ 総合学習プラザ B07 会場

ApoE 欠損マウスにおける自然抗体の機能解明

Function of natural antibody in Apolipoprotein E-deficient mouse

○林 世映、近澤 未歩、板倉 正典、佐々木 栄太、内田 浩二（東京大学）
○ SeiYoung LIM, Miho CHIKAZAWA, Masanori ITAKURA, Eita SASAKI, Koji UCHIDA (University of Tokyo)

【背景・目的】

動脈硬化における自然免疫の役割として、恒常的に産生される自然抗体（IgM）が酸化した脂質を中和・除去し、過剰な免疫反応を抑えるということが知られている。当研究室の先行研究により 1)自己免疫疾患のバイオマーカーである自己抗体（抗 dsDNA IgG）が動脈硬化でも増加すること(Hirose et al.,(2019)*J. Biol. Chem.*)、2)その自己抗体の交差性の確認から、酸化脂質由来アルデヒド修飾タンパク質の構造の一種であるピロール構造が DNA 様の特性を持つということが明らかとなった。(Miyashita et al.,(2014) *Sci. Rep.*）以上の結果から、動脈硬化において自己免疫疾患に類似した応答が起こりうること、またピロール構造が自己抗体産生の刺激になりうるということが予想される。しかしこれらの知見はいずれも獲得免疫に関するものであり、獲得免疫の発動前に活性化される自然免疫応答メカニズムについては不明な点が多い。本研究では動脈硬化モデルマウス（Apolipoprotein E 欠損マウス）を用いて自然免疫応答および、応答により産生された IgM の機能について解析することを目的とする。

【結果】

ELISA 法により、ApoE 欠損マウスの血中 IgM の特異性スクリーニングを行った。その結果ピロール化 BSA および dsDNA に対する IgM 抗体価が経時的に上昇し、野生型 BALB/c マウスに対し有意的な増加が認められた。またフローサイトメトリーにより ApoE 欠損マウスの抗体産生細胞の割合を評価したところ、IgM 産生を担う B1a 細胞の割合が有意的に増加した。これらの結果から、動脈硬化で自然免疫が活性化され、DNA または DNA 様構造を持つピロール化タンパク質に反応する IgM が増加するということが予想される。次に抗体の機能を解明するため、ApoE 欠損マウスの B 細胞から 3 種類のハイブリドーマを作成し、DNA に反応するモノクローナル抗体を精製した。ELISA 法により抗体の交差性を確認した結果、dsDNA に高い特異性を示すものと、ピロールタンパク質に対しても交差性を持つものが存在した。現在、自然免疫活性化の詳細を明らかにするため、単離したマウスの腹腔細胞（B1a 細胞に富む）に dsDNA およびピロール化 BSA を処置し、B1a 細胞の活性化および抗体産生を確認している。

IgM, Apolipoprotein E, Lysine pyrrolation

講演番号：3B07p01
講演日時：3 月 27 日 13:50～ 総合学習プラザ B07 会場

Lamin A isoform 4 に生ずる *N*-ミリストイル化の解析

Analysis of protein *N*-myristoylation occurring on Lamin A isoform 4

○七田 真由、岩田 春菜、守屋 康子、内海 俊彦（山口大院創成科）
○Mayu SHICHITA, Haruna IWATA, Koko MORIYA, Toshihiko UTSUMI (Yamaguchi Univ.)

［目的］ タンパク質 *N*-ミリストイル化は、一般に細胞質タンパク質に生じ膜局在化に機能することが知られている。我々はこれまでに、ヒト全タンパク質の N 末端配列から網羅的解析を行い、多数の新規 *N*-ミリストイル化タンパク質を見出したが、その中に核タンパク質として知られる Lamin A の isoform である Lamin A isoform 4 が存在していた。Lamin A は、その成熟化の過程で C 末端にファルネシル化が生じる事が知られているが、マウス Lamin A には *N*-ミリストイル化された isoform である Lamin A isoform C2 が存在する事が報告されている。本研究では、ヒト Lamin A isoform 4 に生ずる *N*-ミリストイル化と、その細胞内での挙動について検討し、マウス Lamin A isoform C2 や、ファルネシル化に異常があり核の形態変化を誘導することが知られている Lamin A 変異体である progerin と比較検討した。

［方法・結果］ Lamin A isoform A および progerin には N 末端に Flag-tag を、その他の Lamin A isoform には C 末端に Flag-tag を付加した cDNA を作成した。また、Lamin A isoform 4、マウス Lamin A isoform C2 については 2 位の Gly を Ala に置換し、*N*-ミリストイル化を阻害した G2A 変異体を作成した。これらの cDNA を COS-1 細胞へ遺伝子導入し、Click chemistry を用いて *N*-ミリストイル化及びファルネシル化を、免疫染色により細胞内局在および核の形態変化について検討を行った。その結果、Lamin A isoform 4 はファルネシル化されず、*N*-ミリストイル化され、この *N*-ミリストイル化に依存して COS-1 細胞の核および細胞の著しい形態変化を誘導することが示された。また、この核や細胞の形態変化は progerin の発現に伴う変化と類似していた。これに対して、マウス Lamin A isoform C2 では、このような核や細胞の著しい形態変化の誘導は生じなかった。これらの結果から、Lamin A isoform 4 に生ずる *N*-ミリストイル化は、マウス Lamin A isoform C2 とは異なり、progerin で生ずるような核や細胞の形態変化の誘導に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

protein *N*-myristoylation, Lamin A isoform 4, posttranslational modification

講演番号：3B07p02
講演日時：3 月 27 日 14:01～ 総合学習プラザ B07 会場

SCF ユビキチンリガーゼ調節因子 DCUN1D3 に生じる *N*-ミリストイル化及び特異的切断・分解の解析

Analysis of protein *N*-myristoylation and specific protein processing occurring on DCUN1D3

○西上 美里、細川 拓郎、守屋 康子、内海 俊彦（山口大院創成科）
○Misato NISHIUE, Takuro HOSOKAWA, Koko MORIYA, Toshihiko UTSUMI (Yamaguchi Univ.)

【目的】タンパク質分解の制御不全が癌をはじめとする様々な疾病に関与することから、E3 ユビキリンリガーゼである SCF 複合体を治療標的とした研究が進行している。我々はこれまでに、ヒト *N*-ミリストイル化タンパク質の網羅的探索の結果、ヒト細胞内に *N*-ミリストイル化されたユビキチン化関連タンパク質が多数存在することを見出した。

本研究では、*N*-ミリストイル化タンパク質 DCUN1D3 に注目した。DCUN1D3 の *N*-ミリストイル化が、SCF 複合体の足場タンパク質である CUL1 の Nedd 化を制御することで、SCF 複合体形成に関与することが知られている。その制御機構の更なる解析を目的とし、DCUN1D3 の *N*-ミリストイル化及び細胞内挙動について検討を行った。

【研究方法・結果】C 末端に Flag-tag を付加した DCUN1D3、及びその各種変異体を COS-1 細胞に遺伝子導入した。アルキルミリスチン酸を取り込ませた後、クリック反応により蛍光標識し、In-gel fluorescence によって *N*-ミリストイル化を、ウエスタンブロットによってタンパク質発現を検討した。また、細胞内局在は抗 Flag 抗体を用いた免疫染色により検討した。

その結果、DCUN1D3 は *N*-ミリストイル化されることで原形質膜に局在し、*N*-ミリストイル化を阻害した G2A 変異体は主に核に局在することが確認された。また、In-gel fluorescence による N 末端に生ずる *N*-ミリストイル化の検出、及びウエスタンブロットによる C 末端 Flag-tag の検出から、DCUN1D3 が一カ所で特異的に切断されることを見出した。各種変異体を用いてその切断部位を検討したところ、DCUN1D3 は、カスパーゼ認識配列 DXXD モチーフに依存し 160 位の Asp の C 末端側で特異的に切断されることが示された。実際、アポトーシス誘導剤である thapsigargin によりこの切断が生じ、カスパーゼ阻害剤である Z-VAD で切断が阻害されることが示された。DCUN1D3 の N 末端と C 末端のカスパーゼ切断断片のうち C 末端側断片は、COS-1 細胞への遺伝子導入に伴う明確な発現がみられなかったが、プロテアソーム阻害剤である MG132 により発現が確認されたことから、この C 末端側断片はプロテアソーム分解を受ける事が示された。

これらの結果から、DCUN1D3 の機能発現に N-ミリストイル化、及びアポトーシス過程におけるカスパーゼ切断とプロテアソーム分解が関与することが示唆された。

DCUN1D3, Ubiquitin ligase, protein *N*-myristoylation

講演番号：3B07p03
講演日時：3 月 27 日 14:12～ 総合学習プラザ B07 会場

N-ミリストイル化タンパク質結合因子 UNC119A と *N*-ミリストイル化タンパク質との相互作用の解析

Analysis of interaction of UNC119A with *N*-myristoylated proteins

○岩本 奈津子、大塚 葵、守屋 康子、内海 俊彦（山口大院創成科）
○Natsuko IWAMOTO, Aoi OTSUKA, Koko MORIYA, Toshihiko UTSUMI (Yamaguchi Univ.)

【目的】タンパク質 *N*-ミリストイル化は一般に細胞質タンパク質に生じ、膜局在化に機能することが知られている。最近の研究から、*N*-ミリストイル化タンパク質結合因子 UNC119 が、Src ファミリーチロシンキナーゼ（SFKs）や三量体型 G タンパク質αサブユニット等の *N*-ミリストイル化タンパク質のミリストイル基と結合することで、これらのタンパク質の細胞内局在に影響を及ぼすことが示された。しかし、*N*-ミリストイル化タンパク質のうち UNC119 と相互作用するタンパク質がどれだけ存在するかは明らかではない。本研究では、UNC119 と相互作用する *N*-ミリストイル化タンパク質の同定法を確立することを目的として、UNC119A と相互作用することが報告されている Src、FMNL3 と、まだ相互作用について解析がなされていない FMNL2 を *N*-ミリストイル化タンパク質のモデルタンパク質として用いて、*N*-ミリストイル化タンパク質と UNC119A との相互作用について検討を行った。

【方法・結果】Src、FMNL2、FMNL3、およびそれらの 2 位 Gly を Ala に置換し *N*-ミリストイル化を阻害した G2A 変異体の C 末端に GFP を、UNC119A の C 末端に Flag-tag を付加した融合タンパク質 cDNA を作成した。これらを COS-1 細胞に同時に遺伝子導入し共発現させ、GFP 蛍光観察および免疫染色により Src、FMNL2 及び FMNL3 の細胞内局在に対する UNC119A の影響を検討した。

その結果、原形質膜に局在する Src は、既報通り UNC119A と共発現すると細胞質へと局在が変化することが確認された。FMNL2 及び FMNL3 は、原形質膜に局在し顕著な細胞形態変化を誘導したが、 UNC119A と共発現させると、それぞれの G2A 変異体と同様、細胞質に局在し、細胞の形態変化の誘導は見られなかった。これらの結果から FMNL2 は Src、FMNL3 と同様、UNC119A と相互作用するタンパク質であることが明らかになった。以上、*N*-ミリストイル化タンパク質の GFP 融合タンパク質と UNC119A タンパク質を細胞で共発現させ、*N*-ミリストイル化タンパク質の GFP 蛍光を観察することにより、UNC119 と相互作用する *N*-ミリストイル化タンパク質の同定が可能であることが示された。

protein *N*-myristoylation, UNC119A, FMNL2

講演番号：3B07p04
講演日時：3 月 27 日 14:23～ 総合学習プラザ B07 会場

生体内におけるピロール化タンパク質の生成と機能
Generation and function of pyrrolated proteins in vivo
○近澤 未歩[1]、岩田 汐里[1]、林 世映[1]、板倉 正典[1]、佐々木 栄太[1]、吉武 淳[2]、柴田 貴広[2]、内田 浩二[1] ([1]東大農、[2]名大農)
○Miho CHIKAZAWA[1], Shiori IWATA[1], SeiYoung LIM[1], Masanori ITAKURA[1], Eita SASAKI[1], Jun YOSHITAKE[2], Takahiro SHIBATA[2], Koji UCHIDA[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Nagoya Univ.)

【背景・目的】脂質由来アルデヒドや糖により生成する酸化修飾タンパク質は、組織障害や疾病との関与が示唆されることに加え、生体分子との相互作用を介した多様な生体応答を引き起こす。これまでに当研究室では、リジンの修飾構造である“ピロール化”に着目し、検討を行なってきた。タンパク質のリジン残基は、γ-ケトアルデヒド構造を有する脂質由来アルデヒド類との反応によりピロール化を受ける。ピロール化タンパク質は抗 DNA 自己抗体や DNA 染色試薬に認識されることが確認され、ピロール化はタンパク質に DNA 様の特性を付与するユニークな翻訳後修飾であることが示唆された。ピロール化リジンはヒト・マウス血清からも検出され、生体内においてもピロール化タンパク質が生成して何らかの機能を担うことが予想される。しかし、生体内でピロール化がどのように起こるのかは明らかでないため、これを明らかにするため検討を行った。
【結果】様々な多価不飽和脂肪酸（PUFA）を銅-過酸化水素存在下で酸化させた後、ウシ血清アルブミン（BSA）とインキュベートし、ピロールリジンの定量を行なった。その結果、エイコサペンタエン酸（EPA）、ドコサヘキサエン酸（DHA）と BSA との反応によりピロールリジンが特に多く生成することを確認した。ピロール化に関わる因子を同定するべく、酸化 EPA, DHA を HPLC で分画し、各フラクションと BSA をインキュベートしたところ、複数のフラクションで DNA 染色試薬との反応性が確認され、ピロールリジンの生成が予想された。ピロール化には脂質由来のアルデヒド類が関与することが予想されるため、アルデヒド誘導体化試薬である 2,4-dinitrophenylhydrazine（DNPH）により誘導体化を行い、LC-MS により解析を行なった。新規ピークの質量電荷比は、分子量からグリコールアルデヒド(GA)の DNPH 誘導体であることが予想された。標品の GA と BSA のインキュベートによりピロールリジンが生成することが確認され、また PUFA の酸化によって GA が生成することが明らかになった。ピロール化タンパク質の生体内での機能を明らかにするため、免疫応答について解析を行った。GA 修飾タンパク質をマウスに免疫し、GA-BSA に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得た。いくつかのモノクローナル抗体は、GA-BSA に加え、高効率にピロール化リジンを生成する 1,4-butandial（BDA）修飾 BSA を認識することが確認された。このことから、ピロール構造は GA により生成する修飾構造の中でも抗原性が高い構造であること、GA により生成するピロールリジンを介した免疫応答が生体でも起こりうることが示唆された。

protein pyrrolation, glycolaldehyde, lipid peroxidation

講演番号：3B07p05
講演日時：3 月 27 日 14:34～ 総合学習プラザ B07 会場

タンパク質の安定性－胚発生過程におけるリゾチームの構造変化－

Stability of protein -Chages of egg white lysozme during embryonic development

○室井 由起子[1]、杉元 康志[2] ([1]鹿児島大農、[2]九州栄養福祉大)
○Yukiko Muroi[1], Yasushi Sugimoto[2] ([1]Kagoshima Univ., [2]Kyusyu Nutrition wlfare Univ.)

〔目的〕鶏卵の卵白タンパク質には抗菌活性やプロテアーゼ阻害機能を持つものが知られ、そのいくつかはタンパク化学的な研究が詳細に行われている。しかしながら、機能については不確定なものが多く、今後の研究の進展が期待されている。演者らは卵白タンパク質の構造と安定性、それに伴う機能について解析しており、特に、ニワトリ胚発生における卵白タンパク質の構造と機能の変化について研究を進めている。これまでの研究により、オボアルブミンは発生初期に構造の一部変化により熱安定性に転換されることを報告した。胚発生過程における卵白タンパク質の構造と機能に関する研究は少なく、今回はリゾチームの胚発生過程における構造変化と安定性について発表する。
〔方法〕ニワトリ受精卵を 38℃で発生させ、孵卵 0 日目、7 日目、11 日目、15 日目および 18 日目の卵により卵白を摂取し、それぞれよりリゾチームの精製を行った。リゾチームの精製は pH 分画、CM－カラムクロマトグラフィーおよび Mono-S クロマトグラフィーにより精製標品を得た。精製純度は SDS-PAGE および Native-PAGE で検定した。ムラミダーゼ活性は基質 *Micrococcus lysodeikticus* の細胞壁を用い、濁度の減少で評価した。リゾチームの構造の解析は DSC による変性温度、ANS による表面疎水性、トリプトファン蛍光強度およびアクリルアミドによるトリプトファン蛍光の消光度の測定により行った。
〔結果と考察〕リゾチームは分子内に 4 つのジスルフィド結合があり、安定な構造を取っている。発生が進むにつれてリゾチームの構造変化が見られた。すなわち、発生後 18 日目のリゾチームでは変性温度が 2℃ほど下がり、表面疎水性が増加し、トリプトファン蛍光が減少していた。また、トリプトファン蛍光の消光におけるアクリルアミド濃度の減少も観察され、大きな変化ではないが、構造変化を起こしていると思われた。しかし、ムラミダーゼ活性および *Staphylococcus* に対する抗菌性には殆ど変化が認められなかった。このことは活性中心や抗菌性に関わる領域には大きな変化がないことを示唆している。以上のようにリゾチームは発生過程において疎水性領域の表面への露出などの若干の構造変化は見られるものの、重要な役割であるムラミダーゼ活性や抗菌活性の機能は維持され、胚の成長に寄与していると考えられる。胚発生は 38°C で進行し、卵白タンパク質は 21 日間その状態で曝されており、機能の維持に構造の保持が重要である。その保持にはオボアルブミンをはじめとするタンパク質間の相互作用が関係していると考えられる。

lysozyme, strructure, embryonic development

発表責任者：室井　由起子（muroi1120@knwu.ac.jp）

講演番号：3B07p06
講演日時：3 月 27 日 14:45～ 総合学習プラザ B07 会場

UBE3B によるプロテアソーム制御機構の解析

Analysis of proteasomal regulation mechanism by UBE3B

○岡田 麻衣子[1,2]、岡本 一将[2]、根本 莉緒[1]、生村 瞳美[1]、矢野 和義[1,2]（[1]東京工科大・応用生物、[2]東京工科大院・バイオニクス）

○Maiko OKADA[1,2], Kazumasa OKAMOTO[2], RIO NEMOTO[1], Hitomi IKUMURA[1], Kazuyoshi YANO[1,2] ([1]Sch. of Biosci. and Biotech., Tokyo Univ. of Tech., [2]Grad. Sch. of Bionics, Tokyo Univ. of Tech.)

26S プロテアソームは 19S 制御ユニット（19S）と 20S 触媒ユニット（20S）から構成される巨大複合体であり、ユビキチン化タンパク質を選択的に分解するタンパク質分解装置である。19S ではユビキチン受容体による分解基質の認識や、ATPase による分解基質のアンフォールディングなどが行われる。このような 19S における過程を経て、酵素活性中心である 20S が活性型の構造へと変換され、分解タンパク質はペプチド断片へと消化される。

このようなプロテアソームによるタンパク質分解機構は、タンパク質の品質管理や細胞増殖など多様な細胞内機構の基盤となっており、生体内の恒常性維持の一旦を担っている。プロテアソームがどのような生理作用に関与するかについては分解基質の特性にも由来するため、これまでのタンパク質分解機構の研究においては、分解基質のユビキチン修飾制御の解明がめざましい進展を遂げている。一方で、プロテアソーム本体が多様な細胞内シグナルに応じていかに制御されるかについては、依然として不明な点が多い。そこで本研究ではプロテアソーム制御機構の解明を目的とし、プロテアソーム相互作用因子群（proteasome-interacting proteins：PIPs）の機能解析を行った。近年、ユビキチンリガーゼ活性を有する PIPs が、19S 構成因子のユビキチン修飾を担うことが示唆されている。しかしながら、PIPs のタンパク質分解機能に対する役割についてはコンセンサスが得られていない。

そこで本研究では、タンパク質分解レポーター細胞（Ub^{G76V}-GFP-U2OS）を用いて、プロテアソームに対する PIPs の機能を評価した。この細胞では、プロテアソームの機能低下により Ub^{G76V}-GFP が迅速に蓄積するため、蛍光強度を指標にプロテアソーム機能を評価することが可能である。その結果、Ubiquitin-protein ligase E3B（UBE3B）がプロテアソーム機能の促進因子であることが示唆された。UBE3B は N 末端に IQ motif、C 末端に HECT ドメインを有するユビキチンリガーゼであり、プロテオミクス解析によりプロテアソーム構成因子との相互作用が報告されている。その相互作用の意義は不明であったが、本研究結果を踏まえると、UEB3B がプロテアソームを直接制御する可能性が示唆された。

興味深いことに、UBE3B のノックダウン細胞では、プロテアソーム機能および細胞生存率が、プロテアソーム阻害剤であるボルテゾミブ存在下においても顕著に低下した。また、UEB3B と 19S 構成因子 Rpn13 は核内で共局在しており、ボルテゾミブによりこの共局在がさらに明瞭に観察された。ボルテゾミブの作用機序が 20S の酵素活性阻害であることを踏まえると、UBE3B は 19S に対する制御因子である可能性が示唆された。

以上、本研究では新規プロテアソーム制御因子として UBE3B を同定した。現在、UBE3B が 19S を制御する可能性を検討すると共に、他の PIPs との機能的関連性について検討している。また、UBE3B を標的としたがん治療への応用を検討している。

proteasome, ubiquitin ligase, UBE3B

講演番号：3B07p07
講演日時：3 月 27 日 15:06～ 総合学習プラザ B07 会場

TGF-βシグナル伝達系における主要転写因子 SMAD2/3 による補因子選択機構

Structural basis for cofactor binding mechanism by SMAD2/3 in TGF-ß signaling

○宮園 健一[1]、森脇 沙帆[1]、大野 陽介[1]、和田 ひかる[1]、伊藤 友子[1]、栗崎 晃[2,3]、浅島 誠[2]、田之倉 優[1]([1]東大農、[2]産総研、[3]奈良先端大バイオサイエンス)
○Kenichi MIYAZONO[1], Saho Moriwaki[1], Yosuke Ohno[1], Hikaru Wada[1], Tomoko Ito[1], Akira Kurisaki[2,3], Makoto Asashima[2], Masaru Tanokura[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]AIST, [3]NAIST)

トランスフォーミンググロースファクターβ（TGF-β）は、細胞の様々な機能を調節する多機能性サイトカインで、細胞の増殖・分化、アポトーシス、免疫応答、血管新生、細胞外マトリックス生産等の制御を担う。そのためその機能が乱れると、がんや線維症といった重篤な疾病へとつながる。細胞外の TGF-βシグナルは、細胞膜上において転写因子 SMAD2 および SMAD3（SMAD2/3）のリン酸化へと変換される。リン酸化によって活性型となった SMAD2/3 は、別の転写因子 SMAD4 とヘテロ 3 量体を形成した後核内へと移行し、TGF-βシグナル依存的に様々な遺伝子発現の制御を行う。

TGF-βの刺激依存的に作用する SMAD2/3 は、保存された結合モチーフを持たない非常に多くの他タンパク質（SMAD2/3 補因子）と特異的に相互作用できるという特徴を持つ。タンパク質間相互作用に関するデータベース BioGRID によると、ヒト由来 SMAD2 および SMAD3 は 264 種及び 347 種のタンパク質と特異的に相互作用することがすでに知られている。TGF-βシグナルの多機能性は、SMAD2/3 の補因子の多様性と大きく関係しているが、「なぜ共通のモチーフを持たない多くの補因子が SMAD2/3 に対し特異的に結合できるのか」という点は、これまでに明らかにされていなかった。SMAD2/3 は、N 末端側に存在する DNA 結合性の Mad homology 1 (MH1)ドメイン、および C 末端側に存在する多量体形成にかかわる MH2 ドメインからなるマルチドメインタンパク質である。本研究では、SMAD2/3 の MH2 ドメインに着目し、SMAD2/3 の MH2 ドメインが多様な SMAD2/3 補因子と結合できる構造基盤の解明を行った。

SMAD2/3 MH2 ドメインによる多様な補因子結合機構を明らかにするため、SMAD3 と転写因子 FOXH1 の複合体、SMAD2 と転写抑制因子 SKI の複合体、及び SMAD2 とシグナル抑制因子 MAN1 の複合体の構造を X 線結晶構造解析法により決定した。これらの SMAD2/3 補因子は、約 200 残基程度からなる SMAD2/3 MH2 ドメインに対し特異的に結合するが、共通する SMAD2/3 結合モチーフを持たない。各複合体の構造解析の結果、それぞれの SMAD2/3 補因子は、異なる構造基盤を用いて SMAD2/3 に対して結合することが明らかになった。得られた各複合体構造を精査すると、SMAD2/3 の MH2 ドメインには複数の疎水性パッチが存在しており、SMAD2/3 の補因子はそのパッチの 1 つないし複数をつなぐ形で SMAD2/3 に対し結合することが予想された。各補因子は、利用する疎水性パッチの組み合わせにより、ある時は競合し、またある時は共同的に SMAD2/3 に対し結合すると考えられる。本研究の結果、SMAD2/3 補因子の多様性を説明する新しいモデル（SMAD cofactor code）を明らかにすることができた。

TGF-ß, X-ray crystallography, Signaling

発表責任者：宮園健一（amiyaz@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3B07p08
講演日時：3 月 27 日 15:17～ 総合学習プラザ B07 会場

魚類刺棘由来毒素関連タンパク質の組換え体発現とその性質

Recombinant expression and properties of toxin-related proteins from fish stings

○佐藤 吏[1]、畠山 智充[1]、郷田 秀一郎[1]、海野 英昭[1]、城崎 紗也[2]、岸川 彰宏[1] ([1]長崎大工、[2]九州大工)
○ Tsukasa SATO[1], Tomomitsu HATAKEYAMA[1], Syuitiro GODA[1], Hideaki UNNO[1], Saya JYOZAKI[2], Akihiro KISHIGAWA[1] ([1]Nagasaki Univ., [2]Kyusyu Univ.)

海産動物には陸上動物に比べてはるかに多様な生物種が存在することから，これまでに知られていない興味ある構造と生物活性を有するタンパク質が多く存在することが予想される。我々はこれまでに，海産無脊椎動物（棘皮動物，軟体動物，刺胞動物等）から，陸上動物とは異なる興味ある特徴を有する生理活性タンパク質を見出し，その精製とその構造・機能解析を行ってきた。今回，海産脊椎動物である魚類の中でも，背鰭や胸鰭に毒腺を含む刺棘（しきょく）を有するオニオコゼ（*Inimicus japonicus*）の刺棘由来 RNA 配列を解析し，新規な毒素関連タンパク質の配列を見出し，大腸菌によるクローニング及び組換え体作製を行った。

オニオコゼの刺棘から得られたトータル RNA の配列を次世代シークエンサーによって解析した結果，C 型レクチン様タンパク質，フチガマアンコウ（*Thalassophryne nattereri*）由来毒素（ナッテリン）と類似したナッテリン様タンパク質（natterin-like protein; NLP）及びツノダルマオコゼ（*Synanceia horrida*）由来ストナストキシン（stonustoxin）様タンパク質（Ijtoxin），及びホスホリパーゼ A_2 など複数の毒素関連タンパク質をコードする RNA 配列が見出された。これらのうち，NLP と Ijtoxin はそのアミノ酸配列相同性から標的細胞膜内で自己会合することによって細胞膜にポアを形成する細胞膜孔形成タンパク質（pore-forming protein; PFT）であることが示唆された。また，PLA_2 については，ヘビ毒の β-ブンガロトキシンとも相同性が高く，標的細胞膜に障害を与える毒素として作用するものと推定された。PLA_2 については，プラスミド pET-19b を用いて大腸菌 BL21(DE3)pLysS により His-tag 付加タンパク質（His-PLA_2）として組換え体発現を試みた。その結果，His-PLA_2 はインクルージョンボディとして発現されたことから，これをグアニジン塩酸塩を用いて可溶化し，Ni-NTA カラムを用いて精製したところ，可溶性タンパク質として精製することができた。得られたタンパク質については発色基質（4-nitro-3-(octanoyloxy)benzoic acid; NOB）を用いて Ca^{2+}非依存的な PLA_2 活性を有することが確認された。さらに，ウサギ赤血球に対して比較的弱いながらも溶血活性を示し，細胞溶解性や神経伝達等に影響を及ぼすことによって毒性に寄与していることが示唆された。

PLA_2activity, hemolytic activity, toxin protein

講演番号：3B07p09
講演日時：3 月 27 日 15:28～ 総合学習プラザ B07 会場

コモンマーモセットにおける酸性キチナーゼの遺伝子発現解析とその酵素機能

Gene expression analysis and enzyme function of acidic chitinase in common marmoset

○田畑 絵理[1,2]、樫村 明徳[1]、上原 麻衣子[1]、脇田 悟誌[1]、菅原 康里[1]、坎本 晃海[3]、佐々木 えりか[3]、小山 文隆[1] ([1]工学院大先進工、[2]日本学術振興会・特別研究員（DC1）、[3]実験動物中央研究所)
○Eri TABATA[1,2], Akinori Kashimura[1], Maiko Uehara[1], Satoshi Wakita[1], Yasusato Sugahara[1], Terumi Yurimoto[3], Erika Sasaki[3], Fumitaka Oyama[1] ([1]Kogakuin Univ., [2]Research Fellow of Japan Society for the Promotion of Science (DC1), [3]Central Institute for Experimental Animals)

キチンは，*N*-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc) の重合体で，昆虫の主要な構成成分である。昆虫は普遍的な生物で，タンパク質に富み，飼料転換効率が高い。キチナーゼは，キチンの β-1, 4 結合を加水分解する糖質分解酵素であり，キチンを合成しない生物を含む，広範囲の生物種で発現している。その一つに酸性キチナーゼ (Acidic Chitinase, CHIA) がある。CHIA は，活性型キチナーゼとして，マウスの胃と肺で高いレベルで発現し，喘息，アレルギーに関わることから，食物消化や，キチン含有病原体に対する免疫応答に働くと考えられている。コモンマーモセット (*Callithrix jacchus*) は新世界ザルに属し，樹脂や果実，昆虫など，幅広い食性を持つ。多様な食性，動物種の CHIA を解析することは，生物の食への適応とその消化に関する理解を深めることが期待される。そこで，コモンマーモセット CHIA の発現レベルと酵素機能を検討した。コモンマーモセットの主要な 10 組織における，CHIA mRNA レベルを，定量 real-time PCR 法によって解析した。その mRNA レベルは，胃の主要な消化酵素である pepsinogen A には及ばなかったが，GAPDH の数倍高かった。したがって，CHIA mRNA は胃粘膜の主要な転写産物であることがわかった。さらに，その翻訳産物であるコモンマーモセット CHIA が，pH 2.0 に強いキチナーゼ活性をもち，消化器系条件下で，胃の消化酵素ペプシンと，腸の消化酵素トリプシン/キモトリプシンに優れた耐性をもっていた。さらに，CHIA は消化酵素存在下で，高分子キチン基質のみならず，キチン含有生物である，ミールワームの幼虫の殻に含まれるキチン質を分解し，$(GlcNAc)_2$ を生産した。これらの結果は，新世界ザルのマーモセットにおいて，CHIA が胃で多量に発現し，キチン分解酵素として機能していることを示した。

chitinase, chitin, common marmoset

講演番号：3B07p10
講演日時：3 月 27 日 15:39～ 総合学習プラザ B07 会場

脂肪酸合成律速酵素 ACC 複合体構成因子の探索

Identification of novel components of the ACC complex

○高橋 舜[1]、平口 遥香[2]、松本 雄宇[1,2]、鈴木 司[1,2]、山本 祐司[1,2]、井上 順[1,2]([1]東農大・応生・生応、[2]東農大・応生・農化)
○Shun TAKAHASHI[1], Haruka HIRAGUCHI[2], Yu MATSUMOTO[1,2], Tsukasa SUZUKI[1,2], Yuji YAMAMOTO[1,2], Jun INOUE[1,2] ([1]Tokyo Univ. Agric., [2]Tokyo Univ. Agric. Dept. Agric. Chem)

【背景・目的】

近年、食の欧米化により、肥満が原因となる脂質異常症やⅡ型糖尿病などの生活習慣病が問題となっている。肥満の原因である中性脂肪の蓄積には過剰な脂肪酸合成の亢進が関与していることが知られている。アセチル CoA カルボキシラーゼ（ACC）は脂肪酸合成の初発酵素であると共に律速酵素でもある。ACC は定常状態では二量体の形で存在しポリマー化することで活性化するが、その分子メカニズムはほとんど解明されていない。また ACC ポリマーの基本単位となる ACC 二量体についても不明な点が多い。我々はこれまでに、複合体構造を維持したまま泳動・検出できる BN-PAGE を用いて ACC 活性化制御機構の解析を行ってきた。その結果、ACC 二量体はその推定分子量より 160kDa ほど大きい約 720kDa であることを見出したことから、ACC 二量体は ACC 以外のタンパク質を含む複合体として存在する可能性が考えられた。そこで本研究では ACC 二量体およびポリマー複合体の構成因子の探索を目的とした。

【方法】

構成因子探索のために 2 つの実験手法を用いた。

① HEK293T 細胞へ ACC のポリマー化を促進させる MIG12 タンパク質の発現プラスミドを導入し、BN-PAGE に供した。MIG12 導入群と Mock 群の二量体部分とポリマー部分の 4 か所を切り出して質量分析に供した。

② ACC の C 末端側に TAP タグが連結した ACC-TAP タンパク質の発現プラスミドを作製した。HEK293T 細胞へこのプラスミドを導入し、二段階のプルダウンアッセイ（TAP 法）により ACC-TAP タンパク質を精製し、銀染色に供した。Mock 群と比較して ACC-TAP 群で特異的に検出されたバンドを切り出し質量分析に供す予定である。

【結果・考察】

①において、Mock 群の二量体部分には ACC をはじめ多くのタンパク質が同定されたが、MIG12 の導入によって複数のタンパク質の存在量が低下した。一方で、ポリマー部分では、MIG12 の導入により存在量が増加したタンパク質が複数同定された。それぞれで存在量が変動する共通の因子が ACC 複合体候補因子であると考えられる。また②によって ACC に結合するタンパク質を同定していく予定である。今後は①と②の結果から共通する因子を選出し、ACC 複合体構成因子の同定を目指す。

fatty acid synthesis, ACC

講演番号：3B07p11
講演日時：3 月 27 日 15:50～ 総合学習プラザ B07 会場

腸管上皮細胞由来抗菌性レクチン RegIV に抵抗性をもつ乳酸菌の細胞外多糖の特性

Properties of extracellular polysaccharides from *Lactobacillus* sp. resistant to RegIV, an antibacterial lectin secreted from intestinal epithelial cells

○池田 咲生子、西尾 英実、吉岡 ちなみ、渡辺 寛人（明治大農）
○Sakiko Ikeda, Hidemi Nishio, Chinami Yoshioka, Hirohito Watanabe (Meiji Univ.)

【目的】腸管上皮細胞から分泌される抗菌性レクチン RegIVは、マンナンなど多様な糖鎖に結合すること、大腸菌や枯草菌、真菌に対して抗菌活性を発揮するなど幅広い抗菌スペクトルを持つことが明らかになっている。一方、われわれはある種の乳酸菌が RegIVに対して抵抗性をもつことを明らかにしており、このことから RegIVが腸内フローラ制御に関与することが推定される。しかしながら、乳酸菌の RegIVに対する抵抗性発現のメカニズムは明らかになっていない。そこで本研究では、乳酸菌菌体表層に存在する細胞外多糖（EPS）に着目し、RegIVの抗菌活性に与える EPS の作用を明らかにすることを目的として解析を行った。

【方法および結果】大腸菌にてヒト組換え RegIV（rhRegIV）を発現、精製し、抗菌作用を解析した。その結果、*Lactobacillus plantarum* JCM1149 に対して RegIVは強い抗菌性を発揮したが、*Lactobacillus gasseri* JCM1131T は RegIV抵抗性を示した。

次に RegIV感受性の *L. plantarum* JCM1149、RegIV抵抗性の *L. gasseri* JCM1131T それぞれから EPS を分離し、これをトリクロロ酢酸および DNase、RNase、Proteinase K 処理して精製 EPS とした。EPS 共存下での RegIVの抗菌活性を解析したところ、感受性菌株 *L. plantarum* JCM1149 由来の EPS の共存によって RegIVの抗菌活性は有意に低下した。感受性菌株由来 EPS を DEAE Sephadex A-50 を用いたイオンクロマトグラフィーにより分画し、各画分の抗菌活性におよぼす影響を解析したところ、強酸性 EPS 画分に強い抗菌活性抑制作用が観察された。一方、このような抗菌活性の抑制は抵抗性菌株 *L. gasseri* JCM1131T 由来の EPS によっては観察されなかった。

これらのことから、乳酸菌株における抗菌性レクチン RegIVに対する感受性あるいは抵抗性の発現には、菌表層の EPS が関与する可能性が示唆された。

lectin, exopolysaccharide, intestinal flora

講演番号：3B07p12
講演日時：3 月 27 日 16:01～ 総合学習プラザ B07 会場

前頭前野における恐怖記憶再固定化と消去エングラムによる恐怖記憶制御機構

Mechanisms for regulation of fear memory by reconsolidation/extinction engram of medial prefrontal cortex

○石川 理絵、喜田 聡（東京大院・農・応用生命化学）
○Rie ISHIKAWA, Satoshi KIDA (Univ. of Tokyo)

恐怖記憶とは動物からヒトに至るまで保存されている恐怖条件づけ記憶であり、恐怖体験を受けた文脈（条件刺激）と恐怖情動（非条件刺激）との関連を記憶する。この恐怖記憶は危険回避のために環境に適応する本能行動の一つである。記憶は獲得直後には不安定であるが、遺伝子発現依存的な固定化のプロセスを経ることで、安定な長期記憶として貯蔵される。さらに、記憶は想起されると再び不安定な状態に戻り、再貯蔵のために再固定化のプロセスを必要とする。一方、恐怖記憶想起後に非条件刺激を受けない状態が続くと、恐怖記憶を消去するプロセスも誘導され、恐怖反応が減弱される。我々は、受動的回避反応課題を用いて、恐怖記憶再固定化と消去の制御回路の同定とその性状解析を進めてきた。これまでに、再固定化には前頭前野、扁桃体及び海馬、一方、消去には前頭前野と扁桃体における新規遺伝子発現がそれぞれ必要とされることを明らかにした。本発表では、恐怖記憶想起後の再固定化と消去制御機構の解明を目指して、これら脳領野において再固定化と消去を制御する恐怖記憶エングラム(記憶痕跡)集団を同定し、その機能的役割を解析した結果を報告する。まず、Arc と Homer 1a mRNA の核内出現を指標とした catFISH 法を用いて、再固定化と消去誘導時にそれぞれ活性化されたニューロンをラベルし、再固定化時と消去時に活性化されるニューロンの共通性と特異性を解析した。その結果、扁桃体では再固定化と消去がそれぞれ異なるニューロン集団（再固定化ニューロンと消去ニューロン）によって制御されるのに対して、興味深いことに、前頭前野では再固定化と消去が同一のニューロン集団（再固定化/消去ニューロン）によって制御されることが示唆された。この結果に基づき、c-fos-tag システムにより光活性化タンパク質チャネルロドプシンを前頭前野における再固定化/消去ニューロン（再固定化/消去エングラム）特異的に発現させて光活性化させた影響を解析した。その結果、再固定化誘導後の再固定化/消去エングラム光活性化は恐怖反応を誘導し、一方で、消去誘導後の再固定化/消去エングラム光活性化は消去を促進することが示唆された。以上から、前頭前野において恐怖反応と消去誘導の両方を制御するニューロンの存在が示唆され、前頭前野の再固定化/消去エングラムが恐怖記憶想起後のプロセスを制御することが示唆された。

PTSD, fear memory, medial prefrontal cortex

発表責任者：石川理絵（aishikawa@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3B07p13
講演日時：3 月 27 日 16:21～ 総合学習プラザ B07 会場

前頭前野-扁桃体回路は社会行動を制御し、前頭前野-視床室傍核回路は社会記憶形成を制御する
Functional neural circuits in mPFC regulating social behaviors and social recognition memory
○谷水 俊之[1]、櫻内 華恵[1]、石川 理絵[1,2]、喜田 聡[1,2]([1]東農大院・農・バイオ、[2]東大院・農・応用生命化学)
○Toshiyuki TANIMIZU[1], Kae SAKURAUCHI[1], Rie ISHIKAWA[1,2], Satoshi KIDA[1,2] ([1]Dep. of Bioscience, Tokyo Univ. of Agriculture, [2]Dept. of Applied Biological Chemistry, Univ. of Tokyo)

社会記憶（他者を覚える記憶）は社会生活を営む上で必要不可欠な記憶であり、社会行動を制御する基盤となる。社会行動異常は自閉症等の症状の一つにも数えられる。マウスの社会記憶を評価する社会的認知記憶課題では、記憶能力を評価する成体マウスに対して性的に未成熟な幼若マウスを 3 分間提示して、成体マウスが幼若マウスに接触した時間の長さ（探索時間）を測定し、初対面（トレーニング）の時よりも、二度目の対面（テスト）において探索時間が短くなれば幼若マウスを記憶していたと判断する。現在までに、我々はマウスの社会的認知記憶課題を用いた解析から、社会記憶形成に対する前頭前野、海馬、扁桃体、前帯状皮質の必要性を示した(Tanimizu et al., 2017)。さらに、初期応答遺伝子 c-fos 発現に基づいて領野間の機能的結合性を評価する in silico 解析から、前頭前野を中心とする神経回路が社会行動と社会記憶を制御することが予測された。本研究では、前頭前野による社会行動と社会記憶制御機構を解明することを目的として、前頭前野を中心として社会行動と社会記憶を制御する神経ネットワークの同定と光遺伝学的手法を用いたその機能解析を行った。まず、逆行性トレーサーによる回路標識と c-fos 発現細胞を検出する免疫組織染色を組み合わせて解析した結果、扁桃体から前頭前野への投射経路は社会行動発現に伴い活性化するのに対して、前帯状皮質、視床室傍核、腹側海馬から前頭前野への投射経路は社会記憶形成時に活性化することが示唆された。そこで、次に、光遺伝学的手法を用いて、扁桃体から前頭前野(AMY→mPFC)と視床室傍核から前頭前野(PVT→mPFC)回路の社会行動と社会記憶形成に対する役割を解析した。興奮性ニューロン特異的に光感受性タンパク質アーキロドプシン T (ArchT) を発現するアデノ随伴ウイルスベクター(AAV5-CaMKⅡ-ArchT-GFP)を成体マウスの扁桃体または視床室傍核に注入し、社会的認知記憶課題のトレーニング中もしくは直後に前頭前野に緑色光を照射し、それぞれの回路を不活性化した影響を解析した。その結果、AMY→mPFC 回路の不活性化は、社会行動の減少を誘導したが、社会記憶には影響を与えなかった。一方、PVT→mPFC 回路の不活性化は社会行動に影響を与えなかったが、社会記憶の形成を阻害した。以上の結果から、AMY→mPFC 回路は社会行動を制御するのに対して、PVT→mPFC 回路は社会記憶形成を制御することが初めて示唆された。以上より、前頭前野を中心とした神経ネットワークにより社会行動と社会記憶が制御される機構の存在が明らかとなった。

medial prefrontal cortex, social memory, social behavior

発表責任者：谷水俊之（tt203735@nodai.ac.jp）

講演番号：3B07p14
講演日時：3 月 27 日 16:32～ 総合学習プラザ B07 会場

恐怖記憶固定化に対する青斑核の役割の解析

Understanding roles of the locus coeruleus in contextual fear memory consolidation

○在原 悠[1]、喜田 聡[1,2] ([1]東農大院・農・バイオ、[2]東大院・農・応用生命化学)
○Yu ARIHARA[1], Satoshi KIDA[1,2] ([1]Dept. of Bioscience, Tokyo Univ. of Agriculture, [2]Dept. of Applied Biological Chemistry, Univ. of Tokyo)

恐怖記憶形成は危機回避のために必要な能力である。しかし、過度の恐怖記憶は心的外傷後ストレス障害（PTSD）の原因であり、PTSD の予防方法・治療方法開発を目的とした恐怖記憶制御プロセスの解明が急がれている。一方、記憶はその保持時間により、数分から数時間程度保持される不安定な短期記憶と、最長一生保持される安定な長期記憶に大別される。重要な点として、長期記憶として保持されるには、新規遺伝子発現を必要とする固定化のプロセスにより不安定な状態の記憶が安定化される必要がある。恐怖記憶固定化時には、海馬と扁桃体における新規遺伝子発現が必要とされることが組織学的解析から明らかにされている。青斑核は、脳幹にあるノルアドレナリン作動性の神経核であり、大脳、視床、海馬、扁桃体など広範な記憶制御脳領域に神経投射している。近年の報告において、青斑核から海馬へ投射するニューロンの活性が文脈記憶の獲得や日常記憶の維持に必要であることや恐怖記憶制御に関わることが示唆されている（Takeuchi et al., 2016; Wagatsuma et al., 2017、Uematsu et al., 2017)。しかし、恐怖記憶固定化及び想起をはじめとする制御プロセス群に対する青斑核の機能的役割とその制御機構は解明されていない。そこで本研究では、恐怖条件づけ文脈記憶制御に対する青斑核の役割を明らかにすることを目的として、脳内局所注入法を用いた行動学的解析を行なった。電気ショックチャンバーにマウスを入れ、この 148 秒後に電気ショック（0.4 mA）を 2 秒間与え、その 30 秒後にマウスを取り出した（トレーニング)。この直後にマウスの青斑核にタンパク質合成阻害剤アニソマイシンまたはその溶媒を微量注入した。トレーニングの 24 時間後に再び電気ショックチャンバーにマウスを 5 分間入れ、すくみ反応を示した時間の長さを測定した（テスト)。その結果、アニソマイシン注入群は溶媒注入群と比較してテストにおいて有意に低いすくみ反応を示した。以上の結果から、青斑核における遺伝子発現が恐怖記憶固定化に必要であることが示唆された。現在、他の記憶プロセスに対する青斑核の役割を解析しており、これらの結果をまとめて報告する。

Locus coeruleus, fear conditioning, memory consolidation

講演番号：3B07p15
講演日時：3 月 27 日 16:43～ 総合学習プラザ B07 会場

アデノシン A2a 受容体が海馬依存性記憶想起を制御する

Adenosine A2a receptor regulates hippocampus-dependent memory retrieval

○渡邊 亮介[1]、長谷川 俊介[1]、喜田 聡[1,2] ([1]東農大院・農・バイオ、[2]東大院・農・応用生命化学)
○Ryosuke WATANABE[1], Shunsuke HASEGAWA[1], Satoshi KIDA[1,2] ([1]Dept. of Bioscience, Tokyo Univ. of Agriculture, [2]Dept. of Applied Biological Chemistry, Univ. of Tokyo)

サーカディアンリズム産生を司る生物時計は学習・記憶能力を中心とする認知機能を制御すると考えられているが、認知機能との関連性は不明であった。我々は学習・記憶能力に対する生物時計の役割を明らかにするために、生物時計を構成する中心的な時計遺伝子である BMAL1 に着目し、前脳特異的にドミナントネガティブ型 BMAL1（dnBMAL1）を発現する遺伝子改変マウス（dnBMAL1 マウス）を作製し、この変異型マウスの学習・記憶能力の解析を進めてきた。その結果、この変異型マウスは、前脳領域の時計機能の障害ばかりではなく、時間帯依存的（明期開始後 10 時間；ZT10）に海馬依存性記憶の想起障害を示した。従って、海馬依存性記憶の想起が海馬生物時計によるサーカディアン制御を受けることが強く示唆された(Hasegawa et al., in press)。さらに、この変異型マウス海馬のトランスクリプトーム解析結果を Gene Set Enrichment 解析に供した結果、dnBMAL1 マウス海馬では、cAMP 情報伝達経路関連遺伝子群の発現の異常が示された。この結果に一致して、定量的 RT-PCR 解析から、dnBMAL1 マウス海馬ではアデニル酸シクラーゼ 1 と A-kinase anchor protein 5 などの mRNA 量が顕著に低下していること、さらに、海馬における cAMP 量も低下していることが示された。興味深いことに、dnBMAL1 マウスの記憶想起障害は薬理学的に cAMP 量を増加させることで解消されることも示され、cAMP 情報伝達経路が記憶想起を正に制御することが強く示唆されている。以上の背景から、記憶想起制御機構の解明を目的として、cAMP 情報伝達活性化を介して記憶想起を制御する神経伝達物質とその受容体の同定を進めている。一方、G タンパク質共役型受容体（GPCR）であるアデノシン A2a 受容体（A2aR）はアデニル酸シクラーゼを活性化することで cAMP 産生を促進する。本発表では、このアデノシン A2aR に着目し、海馬依存性記憶課題である社会的認知記憶課題を用いて、記憶想起に対するアデノシン A2aR の役割を解析した。ZT10 において、A2aR アンタゴニスト SCH442416 をマウスに腹腔内投与した場合、投与濃度依存的に社会的認知記憶想起の障害が示された。以上の結果から、アデノシン A2aR が海馬依存性記憶想起を制御することが示唆された。

A2aR, circadian rhythm, hippocampus

講演番号：3B07p16
講演日時：3 月 27 日 16:54～ 総合学習プラザ B07 会場

ニワトリ生殖細胞分化のおける PRDM14 の機能解析

Functional analysis of PRDM14 in chicken germ cell development

○金岡 英徳[1]、萩原 遥太[1]、奥嵜 雄也[1]、松林 和茉[1]、鈴木 孝幸[3]、飯島 信司[2]、西島 謙一[1]([1]名大院工、[2]愛工大、[3]名大院農)
○ Hidenori KANEOKA[1], Yota HAGIHARA[1], Yuya OKUZAKI[1], Kazuma MATSUBAYASHI[1], Takayuki SUZUKI[3], Shinji IIJIMA[2], Ken-ichi NISHIJIMA[1] ([1]Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., [2]Fuculty Eng., Aichi Inst. Tech., [3]Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ.)

【背景と目的】

鶏卵は人類にとって重要なタンパク源であり、その高い経済性からトランスジェニックニワトリをタンパク質性医薬品生産のため生きたバイオリアクターとして利用する技術の開発が進められつつある。ここ数年でトランスジェニックニワトリ作製技術は世界的に大きく進歩した。ニワトリ始原生殖細胞(PGC: Primordial Germ Cell)の培養技術が進歩し、CRISPR/Cas9 などのゲノム編集技術と組み合わせることで、遺伝子改変 PGC を移植することでトランスジェニックニワトリの作製が可能となった。しかし、移植 PGC が内在性 PGC と競合することによる定着率の低下など、未だに問題点も存在する。そこで哺乳類における PGC のマスターレギュレーターである Prdm14 に着目し、ニワトリ PRDM14 の機能解析を行うとともに、PRDM14 ノックアウトニワトリの作製を行なった。

【方法・結果】

ニワトリ PRDM14 は PGC で高発現しており、CVH や DAZL など生殖細胞マーカー遺伝子の発現を制御していることがわかった。また、ニワトリ初期胚で PRDM14 をノックダウンすると PGC の数が有意に減少したことから、PGC の分化・増殖に関わっている可能性が示唆された。次に培養 PGC の PRDM14 遺伝子座に CRISPR/Cas9 システムを用いて eGFP 遺伝子のノックインを行った。内在性 PRDM14 のプロモーター活性により、eGFP を安定的に強く発現するニワトリ PGC 細胞株の樹立に成功した。この樹立した細胞株をレシピエント胚に移植し、5.5 日胚で解析を行った結果、生殖線中 PGC のうち最大で 84%が移植した PGC 由来であった。そこで移植した胚を孵化させキメラニワトリの取得を行った。これらニワトリの精子を解析したところ、最大でゲノムあたり約 0.9 コピーの eGFP 遺伝子の挿入が確認された。そこでキメラニワトリの精子を人工受精させトランスジェニックニワトリの取得を試みた。その結果 84 羽中 18 羽(21%)という効率でトランスジェニックニワトリの取得に成功した。これらトランスジェニック個体の PGC の局在を eGFP 蛍光により追跡したところ、2.5 日胚での血中循環、6.5 日胚の生殖腺への局在など、内在性 PGC と変わらない挙動を示したことから、今回作製したトランスジェニックニワトリは生殖細胞分化に関する研究ツールとしても利用可能であると考えられる。

transgenic chicken, CRISPR/Cas9, primordial germ cell

発表責任者：金岡英徳（kaneoka@chembio.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3B07p17
講演日時：3 月 27 日 17:05～ 総合学習プラザ B07 会場

ヒストン脱アセチル化酵素による白色脂肪細胞の UCP1 発現制御機構の解析
Analysis on the regulatory mechanism of UCP1 expression in white adipocytes by histone deacetylase

○川原崎 聡子[1]、YULIANA Ana[1]、鄭 蕙芬[1]、野村 亘[1,2]、高橋 春弥[1]、荒 武[1]、井上 和生[1]、河田 照雄[1,2]、後藤 剛[1,2]（[1]京大院農・食品生物、[2]京大・生理化学研究ユニット）
○Satoko KAWARASAKI[1], Ana YULIANA[1], Huei-Fen JHENG[1], Wataru NOMURA[1,2], Haruya TAKAHASHI[1], Takeshi ARA[1], Kazuo INOUE[1], Teruo KAWADA[1,2], Tsuyoshi GOTO[1,2] ([1]Div. Food Sci., Biotechnol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Res. Unit Physiol. Chem., Kyoto Univ)

【目的】　脱共役タンパク質 1 (UCP1) は脂肪組織のミトコンドリアに存在し、熱産生を通じてエネルギー消費に寄与することが知られている。脂肪組織における UCP1 発現誘導は肥満解消への新たなアプローチとして注目されているが、その詳細なメカニズムには不明な点が多く残されている。そこで本研究では白色脂肪組織における UCP1 発現誘導に着目し、代表的な UCP1 発現誘導刺激であるβ-アドレナリン受容体の活性化を介した UCP1 発現誘導のメカニズムに関して、ヒストン修飾による転写調節に着目して検討を行った。
【方法・結果】　C57BL/6J マウスを 10℃で 24 時間飼育し、鼠径部白色脂肪組織（iWAT）の *Ucp1* 発現が誘導された条件下において、転写活性化のマーカーであるヒストン H3 リシン 27 (H3K27) のアセチル化が亢進していることが確認された。iWAT 由来細胞株においてβ-アドレナリン受容体アゴニストである isoproterenol（iso）刺激を行ったところ、*Ucp1* 発現が最大となった添加後 4 時間において H3K27 のアセチル化の亢進および UCP1 転写調節領域のアセチル化 H3K27 の増加が認められた。各ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）と *Ucp1* 発現量の相関を調べたところ、クラスⅠ HDAC と *Ucp1* 発現量の間に有意な逆相関が認められた。クラスⅠ HDAC の中でも特に強い相関を示した HDAC3 および HDAC8 に関して siRNA によるノックダウンが *Ucp1* 発現に及ぼす影響を検討した。その結果、HDAC8 のノックダウンは *Ucp1* 発現に影響を及ぼさなかったが、HDAC3 のノックダウンは iso 添加時の *Ucp1* 発現量を有意に増加させた。また、HDAC3 特異的阻害剤である RGFP966 の添加においても iso 添加時の *Ucp1* 発現量が有意に増加した。4 時間の iso 刺激により、HDAC3 タンパク質発現が減少し、HDAC3 と *Ucp1* エンハンサー領域の相互作用が有意に抑制された。
【結論】　クラスⅠ HDAC である HDAC3 が UCP1 転写調節領域のヒストン脱アセチル化に関与しており、特にβ-アドレナリン受容体活性化時には HDAC3 の発現低下により H3K27 のアセチル化が亢進することで UCP1 の転写が活性化されていることが示唆された。

uncoupling protein 1, β-adrenergic stimulation, histone deacetylase

講演番号：3B07p18
講演日時：3 月 27 日 17:16～ 総合学習プラザ B07 会場

腸管幹細胞の stemness に及ぼす IL-4 の影響

Effect of IL-4 on stemness of intestinal stem cells

○齋藤 由季、佐藤 美佳、岩槻 健、只石 幹、服部 一夫、清水 誠（東農大農）
○Yuki SAITO, Mika SATO, Ken IWATSUKI, Miki TADAISHI, Kazuo HATTORI, Makoto SHIMIZU (Tokyo Univ. of Agriculture)

【背景・目的】腸管オルガノイドは、幹細胞と分化した成熟上皮細胞（吸収上皮細胞、杯細胞、内分泌細胞、パネート細胞、タフト細胞など）で構成される腸管上皮細胞の集合体である。腸管幹細胞の自己複製や、成熟上皮細胞への分化は様々な生理活性物質によって制御されているが、その中で我々はインターロイキン 4（IL-4）に着目して研究を進めてきた。昨年度までに、腸管オルガノイドにおいて、IL-4 は幹細胞の増殖能を抑制することを見出した。今年度は、IL-4 が腸管幹細胞の stemness（自己複製能や多分化能といった未分化性の維持）に及ぼす影響を検討した。
【方法】C57BL/6J マウスあるいは Lgr5（幹細胞マーカー）を緑色蛍光タンパク質（GFP）で標識した遺伝子組換えマウス(Lgr5-EGFP)の空腸よりクリプトを単離し、オルガノイド培養に供した。IL-4 を添加する日を Day 0 とし、Day 0, 2 で IL-4（5,10,20 ng/mL）を添加した。Day 3 にて Total RNA を抽出し、cDNA に逆転写した後、qPCR を行い、幹細胞や各種分化細胞のマーカー遺伝子発現量を測定した。また、Day 3 において、細胞増殖能を評価するために EdU assay を、標的タンパク質の変化を調べるために蛍光免疫染色を行った。さらに、共焦点顕微鏡を用いて Lgr5-EGFP 空腸オルガノイド由来の蛍光を経時的（Day 0～Day 3）に測定し、幹細胞の動態をモニタリングした。
【結果・考察】IL-4 を 72 時間添加した群ではコントロール（Con）群に比して Lgr5 および Olfm4（幹細胞マーカー）の遺伝子発現量が有意に減少した。Lgr5-EGFP マウス由来の空腸オルガノイドを用いて 72 時間タイムラプス撮影を行った結果、Con 群に比して IL-4 添加群では EGFP シグナルが減弱した。また、EdU assay の結果、Con 群に比して IL-4 添加群では、EdU を取り込んだ増殖活性の高い細胞の割合が有意に減少した。以上より、IL-4 は幹細胞活性を減少させ、自己複製能を抑制することが示唆された。IL-4 添加により、幹細胞に変化が起きたことから、分化細胞にも何らかの変化が起きている可能性を考え、各腸管上皮細胞の分化細胞マーカー遺伝子発現量を測定した。その結果、パネート細胞マーカーである Lyz1 および Reg3γの遺伝子発現量が Con 群に比して有意に減少した。さらに Lysozyme（Lyz1 遺伝子のタンパク質）の蛍光免疫染色の結果、Con 群に比して Lysozyme 陽性細胞の蛍光強度が有意に減弱した。このことから、IL-4 添加によりパネート細胞の機能に何らかの変化が引き起こされることが示唆された。パネート細胞は幹細胞を維持するために重要な役割を有することから、IL-4 はパネート細胞の機能を変化させ、幹細胞の stemness を部分的に阻害する可能性が考えられた。

IL-4, organoid, stem cell

講演番号：3B08a01
講演日時：3 月 27 日 09:30～ 総合学習プラザ B08 会場

真核微細藻類 *Nannochloropsis* におけるプラチナ TALENs を利用した高効率外来遺伝子フリーゲノム編集ツールの開発

Development of highly active transgene-free genome editing tools using Platinum TALENs in eukaryotic microalga, *Nannochloropsis*

○栗田 朋和[1]、諸井 桂之[2]、岩井 雅子[3]、岡崎 久美子[1]、野村 誠治[4]、斎藤 史彦[4]、高見 明秀[4]、坂本 敦[1]、太田 啓之[3]、佐久間 哲史[1]、山本 卓[1] ([1]広島大・院統合生命、[2]広島大・院理学、[3]東京工業大・生命理工、[4]マツダ株式会社)

○Tomokazu Kurita[1], Keishi Moroi[2], Masako Iwai[3], Kumiko Okazaki[1], Seiji Nomura[4], Fumihiko Saito[4], Akihide Takami[4], Atsushi Sakamoto[1], Hiroyuki Ohta[3], Tetsushi Sakuma[1], Takashi Yamamoto[1] ([1]Hiroshima University, Graduate School of Integrated Sciences for Life, [2]Hiroshima University, Graduate School of Science, [3]Tokyo Institute of Technology, School of Life Science and Technology, [4]Mazda Motor Corporation)

光合成により光と二酸化炭素からバイオディーゼルの原料となる油脂を多量に合成できる微細藻類は、今後の再生可能エネルギー開発への応用が期待されている。一方で藻類バイオディーゼルは化石燃料に比べてコストが高く、生産性の改善が現在の最大の問題である。生産性の改善には、高効率な遺伝子改変法に加えて藻類の屋外培養が必須である。しかし現状では遺伝子組換え生物の屋外培養は認められないため、油脂高蓄積藻類の分子育種には最終産物からの外来遺伝子の除去が不可欠である。

そこで本研究では、細胞内に多量の油脂を蓄積する真核微細藻類 *Nannochloropsis* を材料として Platinum TALENs を利用した高効率ゲノム編集システムを開発し、さらに変異導入後に使用したゲノム編集ツールを除去するシステムを完成した。ゲノム編集は標的配列のデザインが可能な人工ヌクレアーゼを利用した遺伝子改変システムであり簡便かつ高効率な遺伝子改変が可能、さらに従来遺伝子改変が難しかった多くの生物で利用可能なため、盛んに利用されている。現在もっとも頻繁に使用されるゲノム編集ツールは CRISPR-Cas9 システムであるが、標的配列の制限やオフターゲット作用、特許問題などの面から現在産業利用しにくい状況となっている。我々は植物病原菌の転写因子由来で結合配列を任意にデザイン可能な DNA 結合タンパク質である TALEs と海産性細菌由来の FokI ヌクレアーゼを融合した TALENs(Transcription Activator-Like Effector Nucleases)を利用することにした。当研究室において開発された高活性型の TALENs である Platinum TALENs を *Nannochloropsis* のコドンに改変した Nanno-TALEN47 を *Nannochloropsis* において発現させた。その結果、内在性の硝酸還元酵素遺伝子 *NoNR* や脂質合成関連酵素遺伝子 *LPAT1* に対して非常に高い変異導入効率を示した。

さらに最近、出芽酵母のセントロメア/複製起点様配列(ARS)を持つ CRISPR-Cas9 プラスミドが変異導入後に細胞内から除去可能であることが報告された。そこで、我々は高い活性を持つ Platinum TALENs を発現するプラスミドに ARS を挿入したプラスミドを開発し *Nannochloropsis* に導入、*NoNR* に対する変異導入活性の検討とプラスミドの脱落を試みた。その結果、ARS を持つ Platinum TALEN プラスミドは非常に高い変異導入効率を維持し、かつ変異導入後の脱落にも成功した。本研究は今後の外来遺伝子フリーの高機能藻類の構築に必須の基盤技術を開発するものである。

Nannochloropsis, Transgene free, Genome editing

発表責任者：栗田朋和（kurita616@yahoo.co.jp）

講演番号：3B08a02
講演日時：3 月 27 日 09:41～ 総合学習プラザ B08 会場

ミドリムシ産業利用種における RNP 複合体を用いた高効率ゲノム編集法の開発

Development of highly efficient genome editing using Cas9 RNP complex in the industrial microalga *Euglena gracilis*.

○野村 俊尚[1,2]、井上 小槙[1]、上原 由紀子[1]、山田 康嗣[2,3]、岩田 修[2,3]、鈴木 健吾[2,3]、持田 恵一[1,2,4,5] ([1]理研 CSRS、[2]理研 BZP、[3]ユーグレナ、[4]横市大、[5]岡大)

○ Toshihisa NOMURA[1,2], Komaki INOUE[1], Yukiko UEHARA[1], Koji YMAMDA[2,3], Osamu IWATA[2,3], Kengo SUZUKI[2,3], Keiichi MOCHIDA[1,2,4,5] ([1]RIKEN CSRS, [2]RIKEN BZP, [3]euglena, [4]Yokohama City Univ., [5]Okayama Univ.)

バイオエコノミー社会の実現や持続可能な開発目標（SDGs）の達成に向けて、微細藻類由来のバイオ燃料やバイオプラスチックなどの生産が期待されている。なかでも、ミドリムシの産業利用種 *Euglena gracilis* は、屋内外での大量培養が実現化されており、機能性食品や飼餌料、バイオ燃料として利活用が可能な生物材料として注目されている。しかしながら、本種を対象とした基礎研究や有用株の育種を推進するための鍵技術となるゲノム編集法は、未だ確立できていない状況であった。

そこで我々は、産業利用も想定した Cas9 RNP 複合体の直接導入によるミドリムシのゲノム編集法の確立を試みた。まず、表現型の変化が見込める標的遺伝子としてパラミロン合成酵素遺伝子（*EgGSL2*）を対象としたガイド RNA を設計し、標的 DNA の切断活性を有する Cas9 RNP 複合体を作製した。次に、従属培養条件における細胞内のパラミロン粒の形態変化と T7E1 アッセイ法を指標として、エレクトロポレーションによる *E. gracilis* 細胞内への Cas9 RNP 複合体の最適な導入条件を検討した。その結果、本種における標的配列へのランダムな欠損および挿入変異の導入に世界に先駆けて成功した。殊に、確立した手法では、アンプリコンシークエンス解析による評価において、Cas9 RNP 複合体導入後 72 時間で約 80 %という非常に高い編集効率を達成した。従って、本手法を用いることで、選抜操作なしで省労力かつ短時間での *E. gracilis* ゲノム編集株の取得が可能である。さらに、Cas9 RNP 複合体と一緒に、ドナーDNA として標的配列の上下流と相同な配列を両端部に付加した一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド（ssODN）を導入することで、高効率かつ正確な標的箇所への DNA ノックインや塩基置換にも成功した。今後は、本ゲノム編集手法及びその派生技術を駆使することにより、ミドリムシにおける遺伝子機能の解析などの基礎研究の推進や産業利用のための有用株の分子育種を実現させることが可能となった。

Euglena gracilis, Genome editing, Cas9 ribonucleoproteins

講演番号：3B08a03
講演日時：3 月 27 日 09:52～ 総合学習プラザ B08 会場

スギ（*Cryptomeria japonica* D. Don）における効率的なゲノム編集技術の開発
Development of an efficient targeted mutagenesis system in sugi (*Cryptomeria japonica* D. Don)
○七里 吉彦[1]、上野 真義[2]、大宮 泰徳[2]、二村 典宏[2]、遠藤 真咲[3]、西口 満[2]、小長谷 賢一[1]、谷口 亨[4] ([1]森林総研森林バイオ、[2]森林総研、[3]農研機構・生物機能、[4]森林総研林木育種セ)
○ Yoshihiko NANASATO[1], Saneyoshi UENO[2], Yasunori OHMIYA[2], Norihiro FUTAMURA[2], Masaki ENDO[3], Mitsuru NISHIGUCHI[2], Ken-ichi Konagaya[1], Toru TANIGUCHI[4] ([1]Forest Bio-Research Center, FFPRI, [2]FFPRI, [3]Inst. Agrobiological Sciences, NARO, [4]Forest Tree Breeding Center, FFPRI)

スギ（*Cryptomeria japonica* D. Don）は我が国における主要樹種のひとつであり、建材をはじめ多くの生活用材として利用されている。一方で、近年国民病とも称されるスギ花粉症への対策の一環として、花粉の出ないスギの開発も求められている。本研究の目的は、CRISPR/Cas9 システム等のゲノム編集を利用した、無花粉スギなどの有用品種の開発である。

まず、CRISPR/Cas9 システムがスギで機能するかを検証するため、レポーター遺伝子として GFP を導入したスギ不定胚形成細胞（以下、スギ細胞）を用いて、GFP を標的としたゲノム編集を試みた。具体的には、アグロバクテリウムを介して、CRISPR/Cas9 発現ベクターを GFP 導入スギ細胞に導入し、GFP 蛍光の観察及びシーケンス解析を行った。作製した組換え細胞系統において、標的領域の改変により GFP 蛍光が見られなくなった系統が、標的領域の違いにより 25.9～47.1%という割合で得ることに成功した。

続いて、スギの内在性遺伝子を標的としたゲノム編集を試みた。標的遺伝子として、機能欠損によりアルビノの表現型を示すマグネシウムキラターゼ（*ChlI*）遺伝子を選定し、ゲノム編集による遺伝子破壊を試みた。その結果、*ChlI* 遺伝子の標的領域の欠損によりアルビノの個体が得られた。このことから、CRISPR/Cas9 システムはスギの内在性遺伝子の編集にも利用できることが明らかとなった。しかし、表現型が得られる効率は低く、スギにおける CRISPR/Cas9 システムの実用的な利用には、ゲノム DNA の切断効率の向上が必要と判断した。

ゲノム DNA の切断効率を向上させる目的で、人工ゲノム切断酵素 SpCas9 のコドン頻度をスギに最適化した cj_SpCas9 を作製し、スギのゲノム編集効率への影響を調査した。比較対象として、シロイヌナズナとイネにそれぞれコドン頻度を最適化した at_SpCas9、os_SpCas9 を用いた。内在性遺伝子としては、上と同じく *ChlI* 遺伝子を選定した。ヘテロ 2 本鎖移動度分析により、スギ細胞における *ChlI* 遺伝子の標的領域近傍における変異効率は、各 SpCas9 において 51.9～83.9%と比較的高効率であることが判明した。続いて、再生した個体の表現型を観察したところ、アルビノの系統が取得できる効率は at_SpCas9 では最大 42.9%、os_SpCas9 では 33.3%であったのに対し、cj_SpCas9 では最大 66.7%という結果が得られ、コドン最適化の有効性が示された。本大会では、現在進行中のゲノム編集によるスギの機能改変についても報告する。

Cryotomeria japonica, targeted mutagenesis, CRISPR/Cas9

発表責任者：七里吉彦（nanasato@affrc.go.jp）

講演番号：3B08a04
講演日時：3 月 27 日 10:03～ 総合学習プラザ B08 会場

Poly-His 法を利用したモデル・非モデル植物細胞へのタンパク質直接導入

Direct protein transport into model and non-model plant cells using Poly-His method

○大村 昂誠[1]、七里 吉彦[2]、遠藤 圭太[3]、河野 強[1]、岩崎 崇[1]([1]鳥取大院・農、[2]森林総研森林バイオ、[3]森林総研林木育種センター)
○Kousei OMURA[1], Yoshihiko NANASATO[2], Keita ENDOH[3], Tsuyoshi KAWANO[1], Takashi IWASAKI[1] ([1]Tottori Univ., [2]Forest-Bio Research Center, FFPRI, [3]Forest Tree Breeding Center, FFPRI)

植物の新しい品種改良技術としてゲノム編集技術の利用が注目されている。Cas9 タンパク質-RNA の複合体が内在性 DNA の部位特異的な変異を誘導するゲノム編集技術は、有用品種間の交配や遺伝子組換えとは根本的に異なる品種改良技術として期待されている。このゲノム編集技術は植物細胞に Cas9 タンパク質-RNA の複合体を直接導入する必要がある。しかし細胞壁を有している植物細胞内へタンパク質を直接導入する方法は限られており、困難とされている。そこで、本研究では植物細胞へのタンパク質直接導入法の開発を試みた。植物細胞へのタンパク質導入法を開発するにあたり、細胞膜透過ペプチド（Cell-penetrating peptides: CPP）に着目した。これまでに我々の研究室では、植物細胞に有効な CPP として、ポリヒスチジン（Poly-His）を開発している。Poly-His はヒスチジン残基のみが連続したシンプルなペプチドであり、タバコ BY-2 細胞に対して高い膜透過性を示すことが確認されている。この Poly-His をタンパク質導入キャリアーとして利用し、赤色蛍光タンパク質(RFP)や細胞内で機能する酵素であるアデニル酸シクラーゼ(CyaA)の植物細胞内への直接導入を検証した。この際、二種の植物細胞（モデル植物：タバコ BY-2 細胞、非モデル植物：スギ細胞）を対象として試験を実施した。

RFP に Poly-His（His 残基数：8, 12, 16, 20）を融合した RFP::Poly-His 融合タンパク質を、細胞壁を有した状態のタバコ BY-2 細胞、ならびにスギ細胞にそれぞれ添加した。蛍光顕微鏡観察と細胞内の赤色蛍光量を定量した結果、いずれの細胞に対しても RFP::His20 が最も高い細胞内導入量を示した。このことから His20 が植物細胞に対する有効なタンパク質導入配列であることが示唆された。

次いで、CyaA に RFP と His20 を融合した RFP::CyaA::His20 融合タンパク質をタバコ BY-2 細胞、スギ細胞にそれぞれ添加した。細胞内赤色蛍光量はいずれの細胞株においても、未処理の細胞と比較して有意に上昇した。また、CyaA は細胞質中の ATP を cAMP に変換する酵素である。導入したタンパク質が細胞内で酵素活性を保持しているかを評価するために、細胞内の cAMP 濃度を ELISA 法により定量した結果、いずれの細胞株においても細胞内の cAMP 濃度の増加が確認された。以上の結果より、His20 は機能性タンパク質を細胞質に輸送していることが明らかとなった。さらに、His20 はモデル／非モデル植物細胞に対する有効なタンパク質導入キャリアーであることが示唆された。今後は、Poly-His を利用したタンパク質導入をより多くの植物種において試験するとともに、CRISPR-Cas9 を植物細胞内へ直接導入することで簡便な植物ゲノム編集技術を確立していく予定である。

protein transport, plant cells, cell-penetrating peptide

発表責任者：岩崎　崇（itaka@tottori-u.ac.jp）

講演番号：3B08a05
講演日時：3 月 27 日 10:14～ 総合学習プラザ B08 会場

越淡麗 *Sdr4-k* 穂発芽耐性を持たせた酒米育種

Koshitanrei*Sdr4-k* Sakerice with pre-harvest sprouting tolerance

○岩野 舞衣子[1]、Rana Md Masud[1]、金澤 伸矢[2]、金古 堅太郎[1]、三ツ井 敏明[1,2] ([1]新潟大学院 自然研、[2]新潟大 農)

○MAIKO IWANO[1], Md Masud Rana[1], SHINYA KANAZAWA[2], KENTARO KANEKO[1], TOSHIAKI MITSUI[1,2] ([1]Grad. Sch. Sci & Tech, Niigata Univ., [2]Fac. of Agric.,Niigata Univ.)

「越淡麗」は原料から新潟オリジナルの大吟醸酒を醸造するために、「山田錦」と「五百万石」の交配によって新潟県が開発した酒造好適米である。線状心白を生じ、高度精米にも耐えられる大吟醸酒の醸造に適する特性を持つ。しかし酒造特性を重視した選抜の結果、「穂発芽」しやすいという問題を抱えている。穂発芽は降雨や倒伏による浸水の影響で収穫前に発芽してしまう現象で、デンプンの分解による品質低下の観点か形質評価の上でも重要視されている。この穂発芽は種子休眠性の低下によってもたらされる。「*Sdr4* 遺伝子」はイネの休眠関連遺伝子であり、*Sdr4-n*(日本晴型)と *Sdr4-k*(カサラス型)の対立遺伝子が存在する。日本稲の多くが *Sdr4-n* を持ち、*Sdr4-k* の導入によって休眠が深まり穂発芽を抑えることができることが報告されている (Sugimoto et al. 2010 Molecular cloning of Sdr4, a regulator involved in seed dormancy and domestication of rice. PNAS 5792-57972011)。本研究では、インド型品種カサラス由来の「*Sdr4-k*」をもつコシヒカリ NIL【*Sdr4-k*】を父系として、戻し交配育種によって *Sdr4-k* 遺伝子と穂発芽耐性を持つ「越淡麗 *Sdr4-k*」を生育した。

本来イネの生育には 6 カ月程度を要するため、交雑育種には長い年月が必要とされる。しかし、本研究では人工的な環境下で光周期と温度を管理する「バイオトロンブリーディングシステム」、未熟種子から胚を取りだして培養する「胚救済」を合わせて使用する世代促進法を利用し、イネの発芽から交配までの期間を 70 日程度に短縮することに成功した。また、SSR マーカーを用いたマーカー選抜で遺伝子型による選抜を行った。結果として、わずか 14 ヶ月で 3 回の戻し交配と 2 回の自家後代と、計 6 回の世代交代を行い、BC3F3 の越淡麗 *Sdr4-k* を得ることができた。

得られた越淡麗 *Sdr4-k* について表現型の分析を行った結果、稈長や穂長、種子の大きさに関して元の越淡麗と近い表現型を確認した。また、穂発芽の程度を確認したところ越淡麗よりも低い発芽率を示し、穂発芽が抑えられていた。発芽の際デンプンを分解する α-アミラーゼの酵素活性濃度についても越淡麗よりも低い傾向を確認できた。更に、*Sdr4-k* の下流に存在する遺伝子発現量の変化について定量分析で確認した。結果として、休眠関連遺伝子 *OsDOG1like-1* の発現量が有意に増加していた。また、発芽に関わる α-アミラーゼをコードする *Amy1A* の発現量は遺伝子型の変化に伴って減少していた。

rapid generation breeding, sake rice, pre-harvest sprouting

講演番号：3B08a06
講演日時：3 月 27 日 10:35～ 総合学習プラザ B08 会場

微細藻類ユーグレナのワックスエステル発酵制御因子 WSRK がピルビン酸：$NADP^+$ 酸化還元酵素のリン酸化および酵素活性におよぼす影響

Effect of WSRK, a regulatory factor of wax ester fermentation, on phosphorylation and enzyme activity of pyruvate:$NADP^+$ oxidoreductase in *Euglena gracilis*

○駒井 陽輔[1]、石井 侑樹[1]、小川 貴央[1]、丸田 隆典[1]、重岡 成[2]、中澤 昌美[3]、石川 孝博[1]([1]島根大院・自然科学、[2]近畿大・附属農場、[3]阪府大院・生命)
○Yosuke Komai[1], Yuuki Ishii[1], Takahisa Ogawa[1], Takanori Maruta[1], Shigeoka Sigeoka[2], Masami Nakazawa[3], Takahiro Ishikawa[1] ([1]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Shimane Univ., [2]Exp. Farm, Kindai Univ., [3]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)

【目的】ユーグレナは、好気条件においてパラミロンと呼ばれる貯蔵多糖(β-1,3-グルカン) を合成・蓄積するが、細胞が嫌気条件に曝されるとパラミロンをグルコース単位に分解後、ワックスエステル発酵経路によりミリスチルミリスチン酸 (C28) を主成分とするワックスエステルへと代謝変換する。この代謝経路に関連する酵素は既に遺伝子レベルで同定されているが、嫌気に応答したワックスエステル代謝調節機構については未解明である。我々はこれまでに、嫌気応答時のワックスエステル発酵制御にはリン酸化による翻訳後修飾が重要であること、その制御には WSRK (Wax ester Synthesis Regulation Kinase) と命名した新奇プロテインキナーゼが関与することを明らかにしている。さらに WSRK は、ワックスエステル発酵の鍵酵素であるピルビン酸：$NADP^+$ 酸化還元酵素 (PNO) のリン酸化状態に影響を及ぼしている可能性が示唆されている。そこで本研究では、WSRK 遺伝子サイレンシング (WSRK_KD) 細胞における PNO リン酸化状態および PNO 活性に及ぼす影響について検討した。

【結果】ユーグレナ細胞は、ワックスエステル発酵解析のモデル細胞である葉緑体欠損変異株 SM-ZK を使用した。この細胞にエレクトロポレーションを用いて WSRK 特異的二本鎖 RNA を導入し、WSRK_KD 細胞を調製した。従属栄養条件下で SM-ZK 株および WSRK_KD 細胞を定常期まで培養した後嫌気処理を行い、嫌気初期段階（3、6 時間後）における各細胞の PNO タンパク質およびリン酸化レベル、酵素活性について検討した。リン酸化の解析には、抗リン酸化 PNO ペプチド抗体を作製して用いた。その結果、コントロールの SM-ZK 株では嫌気処理に応答してリン酸化レベルの増加が確認された。一方、WSRK_KD 細胞では PNO タンパク質が減少し、かつリン酸化が認められなかった。嫌気処理 6 時間後の PNO 活性を測定した結果、SM-ZK 株と比較して WSRK_KD 細胞では約 50%に低下していた。

Euglena gracilis, Wax ester fermentaion, Hypoxia

発表責任者：駒井陽輔（n19m809@matsu.shimane-u.ac.jp）

講演番号：3B08a07
講演日時：3 月 27 日 10:46～ 総合学習プラザ B08 会場

天然ゴム生合成マシーナリーのインビトロ再構成系構築の試み
Trial for in vitro reconstitution of rubber synthesis machinery

○西野 輝[1]、黒岩 風[1]、モンドル 慶子[1]、山口 晴彦[2]、宮城 ゆき乃[2]、山下 哲[3]、高橋 誠司[4]、戸澤 譲[1] ([1]埼玉大院理工、[2]住友ゴム工業（株）、[3]金沢大理工、[4]東北大院工)
○Akira NISHINO[1], Fu KUROIWA[1], Yasuko MANDAL[1], Haruhiko YAMAGUCHI[2], Yukino MIYAGI[2], Satoshi YAMASHITA[3], Seiji TAKAHASHI[4], Yuzuru TOZAWA[1] ([1]Saitama Univ., [2]Sumitomo Rubber Industries, [3]Kanazawa Univ., [4]Tohoku Univ.)

【目的】パラゴムノキ（*Hevea brasiliensis*）において、天然ゴムはゴム粒子（rubber particle）の表面に局在する HRT1（Hevea Rubber Transferase 1）、HRBP (HRT1 REF Bridging Protein)、Rubber Elongation Factor (REF)などのタンパク質因子の関与により合成されゴム粒子内部に貯留されるということを、これまでに報告している（Yamashita *et al.* eLIFE, 2016）。この先行研究では、膜環境に *H. brasiliensis* から単離したゴム粒子を用いているため、内在する他のタンパク質の関与を完全に排除することはできず、生合成に必要な因子だけでゴム生合成系を再構成するには至っていない。そこで我々は、人工脂質 2 重膜であるリポソームおよびナノディスクを足場とする膜タンパク質合成系（Tozawa & Bernhard *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2013）に基づき、完全インビトロでのゴム生合成系の再構成を目指し、まず無細胞タンパク質合成条件の確立を進めた。

【方法】コムギ無細胞タンパク質合成系に、HRT1、HRBP、REF などのタンパク質合成鋳型となる mRNA を加え、膜環境として天然脂質で構成するリポソームもしくはナノディスクを加えて翻訳反応を行った。得られた反応液からリポソームもしくはナノディスクを粗精製し、SDS-PAGE により、結合しているタンパク質の確認を行った。ここで、リポソームについては遠心処理、ナノディスクについてはナノディスクを構成する MSP (Membrane Scaffold Protein) の His タグを利用した精製を行った。

【結果】膜環境としてリポソームまたはナノディスクどちらを用いた場合においても、SDS-PAGE による解析により、合成した HRT1 または HRBP と膜との複合体の形成を確認できた。引き続き、これらの材料を対象として、ポリイソプレン鎖の合成活性の検証を進めた。

【参考文献】
Yamashita *et al.* (2016) Identification and reconstitution of the rubber biosynthetic machinery on rubber particles from *Hevea brasiliensis*. *eLIFE* 5, e19022.
Bernhard F, Tozawa Y. (2013) Cell-Free Expression - Making a Mark. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 23, 374-380.

natural rubber, Hevea brasiliensis, in vitro translation

講演番号：3B08a08
講演日時：3 月 27 日 10:57～ 総合学習プラザ B08 会場

インビトロ再構成系した天然ゴム生合成酵素の活性解析

Functional analysis for reconstituted rubber synthesis enzyme

○黒岩 風[1]、西野 輝[1]、廣森 美樹[2]、モンドル 慶子[1]、山口 晴彦[3]、宮城 ゆき乃[3]、山下 哲[4]、高橋 征司[2]、戸澤 譲[1]([1]埼玉大院理工、[2]東北大院工、[3]住友ゴム工業（株）、[4]金沢大理工)
○ Fu KUROIWA[1], Akira NISHINO[1], Miki HIROMORI[2], Yasuko MANDAL[1], Haruhiko YAMAGUCHI[3], Yukino MIYAGI[3], Satoshi YAMASHITA[4], Seiji TAKAHASHI[2], Yuzuru TOZAWA[1]
([1]Saitama Univ., [2]Tohoku Univ., [3]Sumitomo Rubber Industries, [4]Kanazawa Univ.)

【目的】パラゴムノキ（*Hevea brasiliensis*）由来の天然ゴムは、リン脂質一重膜で囲まれた構造であるゴム粒子（rubber particle）の内部に貯蔵されており、Isopentenyl pyrophosphate（IPP）の重合によって生合成されるが、その詳細なメカニズムは未だ明らかになっていない。これまで、界面活性剤処理によって表面タンパク質を除去したゴム粒子上にタンパク質を合成することで、Hevea Rubber Transferase 1（HRT1）やHRT1-REF Bridging Protein（HRBP）、Rubber Elongation Factor（REF）などの複数のタンパク質が天然ゴム合成系を為していることが示唆されている。我々のグループでは、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系に人工的な脂質二分子膜構造体を添加することで、それらのタンパク質の翻訳と共役した脂質膜への導入と、その複合体の精製に成功した。ここでは、この完全インビトロ系を用いて、天然ゴム合成に関わると報告されてきたタンパク質の酵素活性の検出を試みた。

【方法】無細胞タンパク質合成系により、ナノディスクまたはリポソーム上に HRT1 や HRBP を合成し、この膜・タンパク質複合体を精製した。天然ゴム（ポリイソプレン鎖）の生合成酵素活性を直接的に確認するために、基質として前駆体となる Farnesyl pyrophosphate（FPP）と ^{14}C 標識 IPP を加えた溶液を 30°C で 20 時間インキュベートした。反応液を飽和食塩水飽和 BuOH によって処理し、ポリイソプレンを抽出した後、Toluene/Hexane（1:1）によってより長鎖の反応生成物を抽出した。BuOH 抽出層は、ポリイソプレン鎖を酸性ホスファターゼ処理した後に、逆相薄層クロマトグラフィー（TLC）によって展開し、イメージングプレートを用いて ^{14}C により放射標識された反応生成物を検出した。

【結果】HRT1 または HRBP を単独で合成したナノディスク・タンパク質複合体は、ポリイソプレン合成活性を示さなかった。一方、HRT1 と HRBP とを共合成したナノディスク・タンパク質複合体は、BuOH 抽出画分に反応生成物を含み、TLC からこれが IPP 重合によるポリイソプレンであることを確認した。これらの結果は、天然ゴム合成酵素系を構成するコア酵素タンパク質の再構成に新たな道を拓き、他の天然ゴム合成およびゴム粒子形成に関連するタンパク質群の寄与を明らかにする上で重要な知見となると考える。

natural rubber, Hevea brasiliensis, in vitro translation

講演番号：3B08a09
講演日時：3 月 27 日 11:08～ 総合学習プラザ B08 会場

Screening for defense-related genes in two latex-producing plants.

○ Hyrmeya Eric SAVADOGO[1], Yui SHIOMI[1], Yasuda JUNKO[1], Toshiharu AKINO[1], Kenji MIURA[2], Masamitsu YAMAGUCHI[1], Hideki YOSHIDA[1], Takanari UMEGAWACHI[1], Ryo TANAKA[1], Dang Ngoc Anh SUONG[1], Sakihito KITAJIMA[1] ([1]Department of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology, [2]Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba)

Laticifers cytoplasm is a sticky fluid called latex. Latex is rich in toxic compounds and proteins. Therefore, latex is supposed to play a defensive role against pests in latex-producing plants. However, its composition is poorly understood because there is no latex in model plants. A previous transcriptomic study of latex from *Ficus carica* and *Euphorbia tirucalli* latexes revealed the presence of many unigenes highly expressed with unknown function. Since they are highly expressed, they may be involved in the defense system. The purpose of this study is to identify genes encoding novel defense-related proteins in latex. We chose unigenes with unknown function highly expressed in *F. carica* or *E. tirucalli* latexes and transfected them into *Drosophila melanogaster* S2 cells. Expression of several unigenes including the *F. carica* PLAT (FcPLAT) and its homolog *E. tirucalli* ATS3 (EtATS3), which are characterized by having the PLAT domain, induced cell death. Furthermore, expression of FcPLAT or EtATS3 in *Drosophila* eye imaginal discs using the UAS-GMR/GAL4 system induced a rough eye phenotype, suggesting the proteins are cytotoxic. The rough eye phenotype was suppressed by coexpression of apoptosis inhibitor p35 or *Drosophila* Diap1 (Death-associated inhibitor of apoptosis 1) suggesting that these genes induced cells apoptosis. Tsukuba system, an improved agroinfiltration method, was used to express latex genes in *Nicotiana benthamiana*. When *Spodoptera litura* were fed with *N. benthamiana* expressing FcPLAT or EtATS3, larval development is retarded, indicating that FcPLAT and EtATS3 code toxic proteins. These genes can be used to improve crops resistance against pests.

The Japanese radish, which is a new and efficient host of Tsukuba system vector, is currently used to screen new defense-related genes from plants latex. Genes highly expressed in *F. carica* and *E. tirucalli* latexes that induced Drosophila S2 cells death are expressed in Japanese radish and their codyledons will be used to feed *S. litura.* Genes toxic to *S. litura* will be subjected to further study.

Laticifer, UAS-GMR-GAL4 sytem, Toxicity

講演番号：3B08a10
講演日時：3 月 27 日 11:19～ 総合学習プラザ B08 会場

かいわれスプラウトのアグロインフィルトレーションを用いる PLAT ドメイン含有タンパク質の抗昆虫活性の検討

Anti-insect activities of Arabidopsis PLAT domain-containing proteins using Kaiware sprouts as Agoinfiltration host

○安田 詢子[1]、秋野 順治[1]、三浦 謙治[2]、北島 佐紀人[1]([1]京都工芸繊維大・応用生物、[2]筑波大)
○Junko YASUDA[1], Toshiharu Akino[1], Kenji Miura[2], Sakihito Kitajima[1] ([1]Kyoto Institute of Technology, [2]Tsukuba Univ.)

［背景と目的］
植物の乳液の主要タンパク質は生体防御に関わるものであるが、機能未知タンパク質も多く蓄積している。そのうちイチジクとミドリサンゴの乳液から見出した２つの PLAT ドメイン含有タンパク質が、ハスモンヨトウ幼虫に対して生育抑制活性を有することを、昨年度大会で報告した。これらのタンパク質のホモログは乳液を産生しない植物にも存在するので、本研究ではアラビドプシスの５つのホモログを対象に、抗昆虫活性の有無を調べた。アグロインフィルトレーション法の宿主に広く使われるベンサミアナタバコは栽培期間が 5 週間と長いので、宿主の栽培期間を短縮し多数の遺伝子を簡便に同時解析するべく、かいわれ大根スプラウトを用いるアグロインフィルトレーション法を開発した。
［方法］
かいわれ大根の栽培日数は、種子の給水１日を含む 3～7 日間とし、そのうち 0～3 日間に光を照射した。アグロバクテリウム懸濁液はバキューム法で浸潤した。導入する発現プラスミドとして、筑波大学で開発された「つくばシステム」のベクターpBYR2HS-EGFP を用いた。アラビドプシス遺伝子を組み込んだつくばシステムベクターを発現させる場合には、マーカーとして EGFP を組み込んだ従来型バイナリーベクターをかいわれ大根に共感染した。感染後 3 日間の栽培の後、子葉を収穫して冷蔵保管した。これらの子葉を、孵化当日のハスモンヨトウ幼虫に与えた。2 日ごとに新しい子葉に交換し、6 日間の飼育後に体重を測定した。
［結果と考察］
pBYR2HS-EGFP の EGFP 蛍光を指標として最適なかいわれ大根の栽培条件を検討した結果、5 日間の栽培（1 日の給水と 2 日間の照明を含む）後にアグロインフィルトレーションを行い、その後 3 日間栽培すると、子葉面積の 80%以上で EGFP 蛍光を得た。EGFP タンパク質の量は RubisCO に匹敵した。この系を用いてアラビドプシスの 5 種の PLAT ドメイン含有タンパク質遺伝子をかいわれ大根で発現させた。ウェスタンブロッティングにて各タンパク質の蓄積を確認した。それらの子葉をハスモンヨトウ幼虫に食餌させると、高い死亡率を示す遺伝子があった。また致死ではなくても体重増加を抑制する遺伝子もあった。これらの結果は、乳液の PLAT ドメイン含有タンパク質だけでなく、アラビドプシスのホモログも抗昆虫活性を持つことを強く示唆する。乳液以外の PLAT タンパクで抗昆虫活性が見いだされたのは本研究が初めてである。

Latex, Agroinfiltration, Anti insecticidal protein

講演番号：3B08p01
講演日時：3 月 27 日 13:50～ 総合学習プラザ B08 会場

ブラシノステロイドのマスター転写因子 BIL1/BZR1 のプロモーター選択特異性の解明

Study on gene promoter-binding specificity by the brassinosteroid-dependent master transcription factor BIL1 / BZR1

○野崎 翔平[1]、宮川 拓也[1]、光田 展隆[2]、寺田 透[3]、山上 あゆみ[4]、中野 雄司[4]、田之倉 優[1]([1]東大院・農学生命科学、[2]産総研・生物プロセス研究部門、[3]東大院・情報学環、[4]京大院・生命科学)
○ Shohei NOSAKI[1], Takuya MIYAKAWA[1], Noubutaka MITSUDA[2], Tohru TERADA[3], Ayumi YAMAGAMI[4], Takeshi NAKANO[4], Masaru TANOKURA[1] ([1]Grad. Sch. Agr. Life Sci., Univ. Tokyo, [2]Bioprod. Res. Inst., AIST, [3]III, Univ. Tokyo, [4]Grad. Sch. Biostud., Kyoto Univ.)

ブラシノステロイド（BR）は植物の生長・発達および環境シグナル応答を制御する植物ホルモンである。BR の情報はマスター転写因子 BIL1/BZR1 に伝達され、活性化した BIL1/BZR1 は BR 応答遺伝子を直接正または負に制御する。BIL1/BZR1 は真核生物で広く保存される basic helix-loop-helix（bHLH）転写因子と類似した DNA 塩基認識モチーフを持ち、また共通の G-box 配列（5'-CACGTG-3'）を認識する。我々はこれまでに BIL1/BZR1 が標的 DNA を認識する立体構造を解き明かし、BIL1/BZR1 が bHLH 転写因子とは異なる二量体形成様式をとることで、G-box 配列への特異性を緩めていることを明らかにしてきた[1]。しかしながら、植物のゲノム上には無数の G-box 配列およびその類似配列（5'-NNCGTG-3'など）が点在しているにも関わらず、BIL1/BZR1 が BR 応答性遺伝子のプロモーターを特異的に認識する分子メカニズムは未だ明らかになっていない。

そこでまず我々は、既知の BR 応答性遺伝子プロモーターの DNA 断片と BIL1/BZR1 単独との相互作用解析を *in vitro* 系のゲルシフトアッセイ法で行った。各 DNA 断片は共通の G-box 配列およびその類似配列を含むにも関わらず、その周辺塩基配列の違いによって BIL1/BZR1 との結合親和性が大きく異なるという結果が得られた。また同時に、BIL1/BZR1 単独では抑制される遺伝子のプロモーターとの結合は強く、促進される遺伝子のプロモーターとの結合は弱い、という相関関係があることも示唆された。さらに、マイクロアレイによる BIL1/BZR1 特異的な遺伝子発現パターン解析、および DAP-seq 解析データベース（Plant Cistrome Database）から抽出したゲノム上の BIL1/BZR1 結合部位の結果を組み合わせて比較解析を行ったところ、ゲルシフトアッセイの結果と同様の相関関係があることが明らかになった。本発表においては上記の結果報告に併せて、BIL1/BZR1 の DNA 結合特異性を生み出す構造基盤、また BIL1/BZR1 が持つプロモーター認識特異性の生理的意義について考察する予定である。

brassinosteroid, transcription factor, protein structure

講演番号：3B08p02
講演日時：3 月 27 日 14:01～ 総合学習プラザ B08 会場

キチナーゼ様タンパク質は触媒残基を導入しても活性化しない

Chitinase-like proteins is not activated by introducing catalytic residues

○大川 一明、岸上 奈央、貴田 雄太、小山 文隆（工学院大・先進工）
○Kazuaki OKAWA, Nao KISHIGAMI, Yuuta KIDA, Fumitaka OYAMA (Kogakuin Univ)

キチンはエビ，カニ，昆虫の他に，真菌類や寄生虫などに含まれる。哺乳類はキチンを合成しないが，活性のあるキチナーゼとキチナーゼに構造が極めて類似しているが活性が証明されていないキチナーゼ様タンパク質を発現している。マウスやヒトで酵素活性が証明されているキチナーゼはキトトリオシダーゼ（Chitotriosidase，Chit1）と酸性哺乳類キチナーゼ（Acidic Chitinase，Chia）である。マウスで発現しているキチナーゼ様タンパク質は，Chi3l1（BRP-39），Ym1（Chi3l3）および Ym2（Chi3l4）などが同定され，ヒトでは CHI3L1（YKL-40）と CHI3L2 などが同定されている。哺乳類キチナーゼとキチナーゼ様タンパク質の生体内での機能は不明だが，喘息や悪性腫瘍などの炎症を伴う重篤な病気で過剰発現している。キチナーゼ様タンパク質は活性中心のアミノ酸が変異し，キチナーゼ活性を失った一群のタンパク質と考えられている。哺乳類キチナーゼとキチナーゼ様タンパク質は糖質加水分解酵素ファミリー 18 に属している。ファミリー 18 の触媒残基周辺はコンセンサスアミノ酸配列（DXXDXDXE）であり，触媒残基はグルタミン酸（E）である。一般的にキチナーゼ様タンパク質にキチナーゼ活性が検出されないのは活性中心のアミノ酸が置換しているからであると考えられている。本研究は，キチナーゼ様タンパク質の一種である Ym1，Chi3l1 に着目し、その活性化を目標とした。マウスの Chia と Ym1，Chit1 と Chi3l1 を比較すると，それぞれのキチナーゼ様タンパク質のコンセンサス配列に 2 残基の異なるアミノ酸が存在している。我々は PCR 法を利用して Ym1，Chi3l1 のコンセンサス配列にアミノ酸置換を導入し Ym1，Chi3l1 の活性化を試みたが、活性化しなかった。このことから，哺乳類のキチナーゼ様タンパク質が活性を示さないのは触媒残基を有さないだけでなく構造的な問題が存在すると考えられる。

chitinase-like protein, chitinase, mammalian

講演番号：3B08p03
講演日時：3 月 27 日 14:12～ 総合学習プラザ B08 会場

ダイズのイソフラボノイド生合成酵素の X 線結晶構造解析
X-ray crystallography of soybean isoflavone biosynthetic enzyme
○山下 哲[1]、今泉 璃城[1]、中多 舜[1]、竹下 浩平[2]、和氣 駿之[3]、山本 雅貴[2]、高橋 征司[3]、片岡 邦重[1]、中山 亨[3] ([1]金沢大 理工、[2]理研 RSC、[3]東北大院 工)
○Satoshi Yamashita[1], Riki Imaizumi[1], Shun Nakata[1], Kohei Takeshita[2], Toshiyuki Waki[3], Masaki Yamamoto[2], Seiji Takahashi[3], Kunishige Kataoka[1], Toru Nakayama[3] ([1]Kanazawa Univ., [2]RIKEN RSC., [3]Tohoku Univ.)

【目的】植物が生合成する多様なフラボノイドのうち，ダイズにおいてはイソフラボノイドであるゲニステインやダイゼインが蓄積することが知られており，抗酸化作用などの生理機能に加えて，根粒菌誘引物質としての重要な生理活性が注目されている．我々は，イソフラボノイド生合成に関与する酵素群について研究を展開しており，特に酵素間の相互作用に基づくメタボロンという酵素複合体の形成に強い関心を抱いている（Mameda *et al. Plant J*, 2018）．カルコン合成酵素(CHS)は，１分子の *p*-クマロイル CoA と３分子のマロニル CoA を基質として，フラボノイド生合成の初発物質であるカルコンを合成する酵素であり，ダイズにおけるイソフラボノイドメタボロン形成に関与することが見出されてきた．本研究では，ダイズの CHS の構造と機能に関する知見を深めることを目的として，X 線結晶構造解析を試みた．

【方法】ダイズ由来の CHS 遺伝子(GmCHS1)を pCold™ I プラスミドに連結し，大腸菌 BL21(DE3)株を形質転換したのち，大量発現を行った．組換え型酵素を発現した大腸菌を破砕し，超遠心分離することで可溶性画分を得，二段階のカラムクロマトグラフィーで精製した．精製された酵素タンパク質を用いて，結晶化条件のスクリーニングを行い，その後結晶化条件の最適化を行った．得られた結晶を用い，SPring-8 ビームライン BL32XU にて X 線回折データ収集を行った．

【結果】組換え型 GmCHS1 は大腸菌から可溶性タンパク質として精製され，ゲルろ過の溶出パターンからは一部量体構造をとることが示唆されたが，単量体と思われるピークを回収し，結晶化条件の探索を行った. その結果, 針状の微小結晶が得られ, 上述の微小ビームを用いたビームラインでのデータ収集により，必要なデータセットが得られたため，構造解析を行った結果について報告する．

【参考文献】
Mameda R., Waki T., Kawai Y., Takahashi S., Nakayama T. (2018) Involvement of chalcone reductase (CHR) in the soybean isoflavone metabolon: Identification of GmCHR5 that interacts with 2-hydroxyisoflavanone synthase. *The Plant Journal.* **96**, **pp56-74**.

metabolon, chalcone synthase, soybean isoflavone

発表責任者：山下哲（yamashita@se.kanazawa-u.ac.jp）

講演番号：3B08p04
講演日時：3 月 27 日 14:23～ 総合学習プラザ B08 会場

好熱性と常温性シアノバクテリア RuBisCO の構造活性相関研究
Structure-activity relationship between thermophilic and mesophilic cyanobacterial RuBisCOs
○河野 飛鳥[1]、磯野 香奈子[1]、合田 初奈[2]、林 美彩希[2]、蘆田 弘樹[1] ([1]神戸大院・人間発達環境、[2]神戸大・発達)
○Asuka KONO[1], Kanako ISONO[1], Hatsuna GODA[2], Misaki HAYASHI[2], Hiroki ASHIDA[1] ([1]Graduate School of Human Development and Environment, Kobe Univ., [2]Faculty of Human Development, Kobe Univ.)

リブロース 1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ（RuBisCO）はカルビンサイクルにおいて、リブロース 1,5-ビスリン酸に CO_2 を固定するカルボキシラーゼ反応を触媒する光合成鍵酵素であるが、リブロース 1,5-ビスリン酸に O_2 を固定するオキシゲナーゼ反応も触媒する。RuBisCO の CO_2 識別能力は CO_2/O_2 反応比特性係数（S_{rel}, relative specificity factor）で表され、S_{rel} は生物種によって大きく異なり、その多様性を生み出す構造は明らかにされていない。

我々の先行研究で、好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 の RuBisCO (Te^{WT})は、常温性シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942 の RuBisCO (Se^{WT})より S_{rel} が 1.7 倍高く、耐熱性も高いことを明らかにしてきた。また、常温性 Se^{WT} と好熱性 Te^{WT} は、ラージサブユニット（LS）とスモールサブユニット（SS）が 8 個ずつ会合した LS_8SS_8 構造で、Te^{WT} と Se^{WT} の SS を入れ替えたスワップ型の常温性 LS 好熱性 SS RuBisCO ($Se^{LS}Te^{SS}$)と好熱性 LS 常温性 SS RuBisCO ($Te^{LS}Se^{SS}$)の解析から、S_{rel} と耐熱性に SS が関与していることが予想された。しかしながら、これらスワップ型 RuBisCO の詳細な酵素特性は不明であった。

そこで本研究では、好熱性と常温性 WT、スワップ型 RuBisCO の酵素特性を解析した。両 WT とスワップ型 RuBisCO の S_{rel} を比較すると、$Se^{LS}Te^{SS}$ は Se^{WT} より 30 %高く、$Te^{LS}Se^{SS}$ は Te^{WT} より 19 %低かった。$K_m(CO_2)$に関して、$Se^{LS}Te^{SS}$ は Se^{WT} より 59 %低下し、$Te^{LS}Se^{SS}$ は Te^{WT} より 2 %低下した。またカルボキシラーゼ最大反応速度 $V_{max}(CO_2)$について、$Se^{LS}Te^{SS}$ は Se^{WT} より 72 %低下し、一方で、$Te^{LS}Se^{SS}$ は Te^{WT} より 8 %低くなった。これらの結果から、SS の会合が S_{rel}、$K_m(CO_2)$、$V_{max}(CO_2)$に関与していることが明らかになった。また、好熱性 SS は、常温性 RuBisCO の酵素特性を好熱性型に近づけることが分かった。これらのことから、好熱性 RuBisCO の酵素特性に SS が大きく関与していると考えられた。興味深いことに、Te^{WT}SS の C 末端に特徴的な挿入配列が存在することから、この挿入配列が好熱性 SS の機能に寄与していると予想された。そこで、Te^{WT} の SS から挿入配列を欠失させた RuBisCO ($Te^{\Delta insert}$)を作製し、解析した。その結果、$Te^{\Delta insert}$ の S_{rel} は Te^{WT} より 8 %低下し、$K_m(CO_2)$と $V_{max}(CO_2)$はそれぞれ 12 %、29 %高くなった。挿入配列欠失により常温性 RuBisCO の酵素パラメーターに近づいたため、好熱性 SS のこの構造は、好熱性 RuBisCO の酵素特性を発揮するために必要であることが明らかになった。以上のことから、シアノバクテリア RuBisCO において、S_{rel} を含む酵素特性の多様性に SS が大きく貢献していると考えられる。

Rubisco, cyanobacteria, thermophilic

講演番号：3B08p05
講演日時：3 月 27 日 14:34～ 総合学習プラザ B08 会場

オゴノリ科海藻の赤血球凝集活性に及ぼす培養水温の影響

Effects of culture temperature on the hemagglutination activity of the red algae family Gracilariaceae

○垣田 浩孝[1,2]、有本 清也[1]、音泉 良太[2]、三澤 彩香[2] ([1]日大院総合基、[2]日大文理)
○Hirotaka KAKITA[1,2], Seiya ARIMOTO[1], Ryouta OTOIZUMI[2], Ayaka MISAWA[2] ([1]Graduate School of Integrated Basic Sciences, Nihon Univ., [2]College of Humanities and Sciences, Nihon Univ.)

【緒言】ヘマグルチニンは免疫反応物質以外の特異的に糖鎖認識する部位を持つ物質の総称であり、自然界に普遍的に存在している。特に、タンパク質性のヘマグルチニンはレクチンと呼ばれている。１８８８年に陸上高等植物ヒママメ由来タンパク質リシンに赤血球凝集活性があることが報告されたのがレクチン研究の事実上の始まりとして一般的に認識されている。１９６６年に熱帯海藻２４種類中９種に弱い赤血球凝集活性を検出したことにより海藻にもレクチンが存在することが知られるようになった。近年、ある種の海藻では生育水温により生合成されるレクチン含量が変動することが報告された。そこで本研究では日本産オゴノリ科海藻培養株 5 種類について各種水温での培養実験を行い、成長速度、栄養塩吸収量およびレクチン活性を算出し、培養水温のレクチン活性への影響を明らかにするとともに、レクチン生産株として各オゴノリ科海藻株を評価することを目的とした。また天然生育海藻と培養藻体でのレクチン活性の比較も行い、レクチン生産株としての培養株の評価を行った。【材料・方法】オゴノリ科海藻培養株として、クビレオゴノリ配偶体株、クビレオゴノリ四分胞子体、徳島産オゴノリ株、函館産ツルシラモ株、熊本産ツルシラモ株を用いた。いずれも当研究室で単藻培養株として継続的に維持培養している株である。維持培養には藻類培養装置ＡＧＰ－１５０ＲＬおよび中温型三連式恒温槽（伊藤製作所製）を用いた。水温実験には温度、光強度を高精度に調節可能であり、1 台に培養室 2 室を有する海藻細胞生理特性評価装置ＮＳ－２１００（伊藤製作所製）を３台用いた。培養藻体から５ｍｍ長のアピカルフラグメントを調製し、フラスコに１２本を植え付け、光強度８０μｍｏｌ／ｍ２ｓ、１４時間明期／１０時間暗期の条件下で振とう（１００ｒｐｍ）培養を行った。水温は１０℃、１４℃、１８℃、２２℃、２６℃、３０℃で行った。各条件での実験点数は４とした。培養海水交換、海藻湿重量測定は１週間毎に行った。海藻培養後の海水はろ過後、２０倍希釈してオートアナライザーで栄養塩分析を行った。赤血球凝集活性はウサギ赤血球を用いて行った。タンパク質および糖含有量は比色分析で定量した。５種類の培養株により成長速度の至適水温が異なること、培養水温がレクチン活性に影響を及ぼしていることが明らかになった。例えば熊本産ツルシラモは、成長速度に関して最適温度範囲は１８℃～２６℃であった。本研究で得られた情報は、培養株を用いたレクチン生産を行う上で非常に有用であると考えられた。また天然海域生育海藻と培養藻体のレクチン活性を比較した結果、レクチン生産に培養株が使用できることが示唆された。

Seaweed, Temperature, Hemagglutinin

発表責任者：垣田浩孝（kakita.hirotaka@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3B08p06
講演日時：3 月 27 日 14:45～ 総合学習プラザ B08 会場

紅藻スサビノリ由来熱可溶性タンパク質 HES1,2,3 の比較
Comparative study of heat-soluble protein HES1, 2, 3 derived from Pyropia yezoensis
○岩本 博行[1]、神原 明梨[1]、井上 昌也[1]、三輪 泰彦[1]、山口 健一[2]([1]福山大生命工、[2]長崎大院水環)
○Hiroyuki IWAMOTO[1], Akari Kambara[1], Masaya Inoue[1], Yasuhiko Miwa[1], Kenichi Yamaguchi[2]
([1]Fukuyama Univ., [2]Nagasaki Univ.)

【目的】潮間帯に生息する紅藻アマノリ属のスサビノリ(*Pyropia yezoensis*)は、潮の干満によって生じる乾燥ストレスに対して強い耐性を示し、脱水状態でも生命維持に関わる酵素群を安定に保つ機構を持つと考えられるが、その詳細は不明である。一方、ワタ種子の胚発生後期に大量に蓄積するタンパク質として見出された LEA（Late Embryogenesis Abundant）タンパク質は、分子シャペロン機能を持ち、多くの生物において乾燥ストレスに対する保護タンパク質として働く、高親水性・熱可溶なタンパク質である。発表者の山口らはこれまで、スサビノリ葉状体に、熱水中でも沈殿しない一群のタンパク質が多量に存在することを見出し、HES（HEat-Soluble)タンパク質と命名した。これまで二次元電気泳動で 20 以上の HES タンパク質が分離されており、新規の LEA タンパク質と推定している。本研究ではそのうち HES1（60 kDa)、HES2（46kDa)、HES3（16kDa）の 3 つについて、主としてその構造を中心に比較した。

【方法と結果】HES1、HES2、HES3 の遺伝子は、それぞれ全長 401、451、144 残基のアミノ酸をコードしており、それぞれ 9 回、11 回、2 回のリピート配列が見出された。そのうち HES1 は 155 残基、HES2 は 414 残基、HES3 は 144 残基について、pCold-1 ベクターによるコールドショック発現系を用いて大腸菌で発現させ、Ni-NTA カラムとゲル濾過により精製した。ゲル濾過の溶出パタンで、HES1 と HES3 はそれぞれ 70kDa、57kDa の位置にシングルピークが現れたが、HES2 は 900kDa 付近を中心にブロードな溶出パタンを示し、会合が示唆された。精製した HES の円二色（CD）スペクトルを測定したところ、HES1,3 は α-ヘリックスを含まない、典型的な変性タンパク質のスペクトルを示したのに対して、HES2 は、20℃で α-ヘリックスを 20%程度含む非変性タンパク質の CD スペクトルを示した。次に昇温させて CD スペクトルを測定したところ、Tm（中間温度）=33℃で変性状態へと可逆的に遷移することがわかった。アミノ酸配列の二次構造予測では、いずれの HES タンパク質も高いヘリックス含量を示すと予想されたことから、ヘリックス促進剤である SDS、TFE(テトラフルオロエタノール)存在下で CD 測定をしたところ、HES1,3 ともに室温で α-ヘリックスを含む非変性の CD スペクトルに変化した。更に HES を乾燥させ、フィルム状態で CD を測定したところ、いずれも高いヘリックス含量を取る構造へと移行していた。以上のことから、HES1,2,3 タンパク質は天然変性タンパク質で、HES2 のみ HES1,3 とやや性質が異なる事が示唆された。

Pyropia yezoensis, LEA protein, intrinsically disordered protein

発表責任者：岩本博行（iwamoto@fukuyama-u.ac.jp）

講演番号：3B08p07
講演日時：3 月 27 日 15:06～ 総合学習プラザ B08 会場

ジベレリン及びオーキシンの恒常性を維持する共通の代謝システム
A same inactivation system that maintains gibberellin and auxin homeostasis.
○竹原 清日[1]、三上 文三[2]、桜庭 俊[3]、吉村 久子[1]、松岡 信[1]、上口（田中） 美弥子[1] ([1]名大・生物機能セ、[2]京大・生存圏、[3]量研)
○Sayaka TAKEHARA[1], Bunzo MIKAMI[2], Shun SAKURABA[3], Hisako YOSHIMURA[1], Makoto MATSUOKA[1], Miyako UEGUCHI-TANAKA[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Kyoto Univ., [3]QST)

【背景】
植物の生存において、「成長するか、しないか」を決定する事は非常に重要である。そのため植物は、植物ホルモンの一つであるジベレリン（GA）およびオーキシン（IAA）合成/不活性化関連遺伝子の発現をアロステリックに調節することにより、活性型 GA および IAA のレベルを厳密に調整している。植物ホルモンの恒常性をタンパク質レベルでも調節することは、植物の生存にとって重要であるが、これまでにその報告はない。そこで我々は、不活化酵素の翻訳後調節機構を解明するため、イネの GA 及び IAA 不活性化酵素である OsGA2ox3、OsDAO の X 線構造解析及び機能解析を行った。
【方法・結果】
両酵素の構造解析の結果、それぞれの基質である GA_4 および IAA が分子界面で架橋することにより、多量体を形成していることを明らかにした。さらに、この基質を介した多量体化は GA_4 および IAA 濃度の増加とともに徐々に進行し、酵素反応速度は単量体に比べはるかに速いことが分かった。また、これら不活化酵素の代謝メカニズムついて検討するため、分子動力学シミュレーションによる蛋白質のダイナミクスを解析したところ、多量体化した OsGA2ox3 の分子界面にある GA_4 は、低いエネルギー障壁で活性部位に入ることが明らかとなった。
以上の結果から、植物では基質レベルに基づいて単量体-多量体スイッチングが起こり、結果として生じる立体構造変化が代謝酵素の活性を高めて植物ホルモンの恒常性を維持する共通のシステムが存在することが示唆された。また、この同じアロステリック機構に基づいた GA および IAA レベルを維持するシステムは、進化においてそれぞれ独立して確立されたこと合わせて報告する。
本研究は、新学術領域研究により助成された。

gibberellin, planthormone, dioxygenase

講演番号：3B08p08
講演日時：3 月 27 日 15:17～ 総合学習プラザ B08 会場

2-オキソグルタル酸要求性酸化酵素に対するプロヘキサジオンの選択的阻害の解析

Analysis of selective inhibition of prohexadione on 2-oxoglutarate dependent dioxygenase

○尾原 寛之[1]、竹原 清日[1]、三上 文三[2]、松岡 信[1]、上口（田中） 美弥子[1] ([1]名大・生物機能セ、[2]京大・生存圏)
○Hiroyuki OBARA[1], Sayaka TAKEHARA[1], Bunzo MIKAMI[2], Makoto MATSUOKA[1], Miyako UEGUCHI(TANAKA)[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Kyoto Univ.)

【目的】

2-オキソグルタル酸要求性酸化酵素（2ODD）は、補基質として 2-オキソグルタル酸（2OG）、補因子として Fe(II)を要求する酸化酵素であり、P450 に匹敵する酵素ファミリーを形成する。これら 2ODD の植調剤としてプロヘキサジオンカルシウム塩（PHX-Ca）が知られており、植物の様々な二次代謝反応を調整する。

植物ホルモンのひとつであるジベレリン（GA）は、草丈の伸長促進や発芽促進など様々な生理作用を持つ。GA 生合成酵素の GA3-oxidase（GA3ox）と GA 不活化酵素の GA2-oxidase（GA2ox）は共に 2ODD であることが知られており、PHX-Ca によって阻害されるが、実際にイネに PHX-Ca を投与したときの現象としては活性型 GA の減少による草丈の伸長抑制が観察される。つまり PHX-Ca は GA3ox をより強く阻害すると考えられるが、その阻害選択性の原因は明らかになっていない。

そこで本研究では、活性本体であるプロヘキサジオン（PHX）を用いて、GA3ox-PHX 複合体、GA2ox-PHX 複合体の立体構造解析を行い、それらを比較することで PHX の阻害選択性の原因を解明し、発展的には他の多様な 2ODD を特異的に阻害する化合物を創製することを目的とする。

【方法・結果】

GA3ox としてイネの OsGA3ox2、GA2ox としてイネの OsGA2ox3 を選択し、大腸菌系で発現させ、精製を行った。精製した両酵素について、in vitro で PHX の阻害定数を測定したところ、in vivo の結果と一致して PHX は GA3ox をより強く阻害していることが明らかになった。

精製した GA3ox を GA_9、PHX と共結晶化させ、SPring-8 にて分解能 1.75 Åまでの X 線回析データを測定し、構造決定を行った。すると、活性中心で PHX は本来 2OG が結合するアミノ酸残基と結合しており、PHX が 2OG と拮抗的に働くことが示された。また GA2ox について、GA_4、PHX と共結晶化させ、SPring-8 にて分解能 3.26 Åまでの X 線回析データを測定した。現在、このデータを基に構造精密化を行っている。

構造精密化の途中ではあるが、GA3ox-PHX 複合体と GA2ox-PHX 複合体を比較すると、GA2ox では活性中心において疎水性アミノ酸残基と PHX が立体障害を生じている可能性が示唆された。

本研究の一部は、新学術領域研究により助成された。

phytohormone, gibberellin, dioxygenase

発表責任者：尾原寛之（obara.hiroyuki@c.mbox.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3B08p09
講演日時：3 月 27 日 15:28～ 総合学習プラザ B08 会場

植物ホルモン関連因子の構造生物学的解析に向けた試み
Structural biological attempts to analyze the crystal structure of phytohormone related factors
○杉原 諒彦[1]、竹原 清日[1]、三上 文三[2]、松岡 信[1]、上口(田中) 美弥子[1] ([1]名大・生物機能セ、[2]京大・生存圏研)
○Akihiko SUGIHARA[1], Sayaka TAKEHARA[1], Bunzo MIKAMI[2], Makoto MATSUOKA[1], Miyako UEGUCHI-TANAKA[1] ([1]Nagoya Univ, [2]Kyoto Univ)

【目的・背景】
ジベレリン（GA）は伸長や発芽、種子形成など多くの生理作用に関与している植物ホルモンである。GA のシグナル伝達において中心的に働く因子が DELLA タンパク質である。DELLA は GA 反応の抑制因子として知られ、C 末側に GRAS ドメインを、N 末側に DELLA および TVHYNP モチーフを持つ GRAS ファミリーに属するタンパク質である。細胞内で GA が受容体 GID1 と結合すると、GA-GID1 複合体は DELLA と結合できるようになり、DELLA の分解と GA 応答を引き起こす。一方、DELLA は、コアクティベーターとして、GA 合成酵素遺伝子等の転写を活性化して、それらのフィードバック制御にも関わることを最近我々は明らかにしている。この転写活性化には、C2H2 型 zinc finger をもつ IDD ファミリーが転写因子として関わり、IDD の C 末端領域が DELLA の GRAS ドメインと結合していた。近年、別の GRAS ファミリータンパク質である SHORT-ROOT(SHR)と IDD の共結晶が報告され、IDD の N 末側と SHR が結合することが明らかになった。しかしながら、DELLA タンパク質とは IDD の結合部位が異なるため結合様式や機能に違いがあると考えられた。そこで、本研究では X 線結晶構造解析により、イネの DELLA タンパク質である SLR1 と IDD との分子機構や結合様式を明らかにすることで、GA による転写調節機構をより理解することを目的とした。
【方法・結果】
SLR1 の GRAS ドメインと IDD の C 末端(C1 および C1+C2)領域をそれぞれ大腸菌系で発現させた。これまでに、イネにおいて複数の IDD が SLR1 と結合することが確認されているが、in vitro での結合力の違いは明らかにされていない。そこで、4 種類の IDD について C1 および C1+C2 領域を用いて SLR1 との結合力をプルダウンアッセイによって評価し、共結晶化に使用する IDD とその領域を決定した。その後、共結晶の作製を試みたところ、結晶を得ることができたが、構造解析に十分な反射が得られなかった。得られた結晶にはゲル化していたものもあったため、溶液中におけるタンパク質の安定性が乏しいと考えられた。そこで、現在はタンパク質の安定性に寄与する化合物のスクリーニングを行い、安定性の向上させる化合物を加えたうえで結晶化を試みている。
本研究は新学術領域研究の助成を受けた。

gibberellin, plant hormone, crystal structure

講演番号：3B08p10
講演日時：3 月 27 日 15:39～ 総合学習プラザ B08 会場

イネ除草剤抵抗性遺伝子 *HIS1* および *HSL1* の系譜解析

Genealogy analysis of rice herbicide resistance genes, *HIS1* and *HSL1*

○戸澤 譲[1]、吉田 均[2] ([1]埼玉大院理工、[2]農研機構)
○Yuzuru TOZAWA[1], Hitoshi YOSHIDA[2] ([1]Saitama Univ., [2]NARO)

【目的】日本型イネから発見された遺伝子 *HIS1* は、水稲用除草剤ベンゾビシクロン（BBC）に抵抗性を付与する。我々は、HIS1 タンパク質は、Fe(II)/2-オキソグルタル酸依存型ジオキシゲナーゼとして、酸化修飾により BBC の除草機能を不活性化すること、さらに HIS1 が BBC 以外の 4 種類の HPPD 阻害型除草剤に対する酸化修飾活性も有すること、*HIS1* の発現が植物に複数の除草剤に対する抵抗性を付与することを最近報告した（参考文献、*Science* 365, 2019)。HIS 1 類似タンパク質をコードする *HSL*（*HIS1 LIKE*)遺伝子は､イネ科作物に広く保存されることからも､主要作物間で HSL ファミリーが重要な機能を共有することが示唆されている。我々は、変異導入による *HSL* 遺伝子産物の機能改変、植物形質転換による機能解析などにより、HSL の生物学的機能の解明とともに有用遺伝子の開発を目指して研究を進めている。ここでは、イネの国内栽培品種に共通して存在し、87%という高い相同性を示す HIS1 と HSL1 のタンパク質をコードする遺伝子の由来について、ゲノム解析を中心に調査した結果を報告する。

【材料及び方法】ゲノム情報が開示されているイネの栽培品種について、アフリカ、東南アジア、オーストリア、南アメリカに由来する 9 種の AA ゲノム系統と 1 種類ずつのアフリカ固有の BB ゲノムおよび FF ゲノム系統に、イネ近縁のアシカキ（*Leersia perrieri*）も加え、目的とする遺伝子の塩基配列情報を抽出した。続いて抽出した塩基配列情報から得た *HIS1* および *HSL1* の翻訳産物のアミノ酸配列に基づき、系統樹解析を行った。並行して、イネ HSL1 およびイネ科作物 HSL1 について、三次元構造モデルに基づく変異導入解析を進め、除草剤を基質とする修飾活性の解析および形質転換による植物体での薬剤抵抗性試験を進めた。

【結果及び考察】日本晴では *HIS1* は第 2 染色体、HIS1 に 87%相同性なタンパク質をコードする *HSL1* は第 6 染色体にそれぞれ座乗し、さらに *HSL1* 近傍には複数の *HSL* が存在していることを確認した。様々なイネ系統のゲノム情報を比較解析したところ、AA ゲノムを有する各大陸固有のイネ系統にも *HIS1* および *HSL1* 遺伝子がそれぞれ同じ染色体位置に確認され、AA ゲノム型のイネの進化の初期には、既に *HSL1* から *HIS1* へ倍化と分岐が生じていることを示唆する結果を得た。Stein ら(*Nature Genetics* 50, 285, 2018)により AA と BB 系統の分岐が 650～700 万年前と推定されている点と、BB 系統の *Oryza punctata* に既に *HSL1* と *HIS1* の両遺伝子配列が確認できる点より、両遺伝子の分岐は、ホモ・サピエンスが誕生したと考えられている 20 万年前より遥か以前に生じていたものと推測される。転写についても両遺伝子間に顕著な組織特異性の差は無く、HSL1 と HIS1 の間には相同性の数値だけでは判別できない、基質特異性のような機能分化があることが示唆される。現在、変異導入解析により、それぞれの酵素の基質特異性解明に向けた生化学的解析を進めている。

【参考文献】Maeda *et al*. A rice gene that confers broad-spectrum resistance to β-triketone herbicides. *Science* 365: 393-396 (2019).

herbicide resistance gene, rice, Fe(II)/2OG dioxygenase

講演番号：3B08p11
講演日時：3 月 27 日 15:50～ 総合学習プラザ B08 会場

イネ除草剤不活性化酵素 HIS1 および HSL のタンパク質機能改変

Protein engineering of herbicide-inactivating enzymes, HIS1 and HSL

○佐久間 望、親松 紗璃依、高村 夏生、高荷 幸恵、戸澤 譲（埼玉大学院理工）
○Nozomi SAKUMA, Sarii OYAMATSU, Natsuki TAKAMURA, Yukie TAKANI, Yuzuru TOZAWA (Saitama Univ.)

【目的】水稲用除草剤ベンゾビシクロン（BBC）に抵抗性を付与する遺伝子として、日本型イネから発見された *HIS1* がコードするタンパク質は、Fe(II)/2-オキソグルタル酸依存型ジオキシゲナーゼとして、水酸化修飾により BBC の除草機能を不活性化する。さらに、HIS1 は BBC 以外の 4 種類のトリケトン骨格を有する HPPD 阻害型除草剤に対する不活性化修飾活性を有し、*HIS1* の発現がイネ以外の植物にも複数の除草剤抵抗性を付与する（*Science* 365, 2019）。HIS 1 に類似するタンパク質をコードする *HSL*（*HIS1 LIKE*)遺伝子は、イネ科主要作物に広く保存されていることが判明しており、作物間に共通する機能とその重要性が示唆されている。我々は、イネ科作物における *HSL* 遺伝子の配列比較解析、変異導入による遺伝子産物の機能改変、植物形質転換による機能解析などのアプローチにより、基質特異性を改変した新たな除草剤抵抗性遺伝子の開発を目指して研究を進めている。

【材料及び方法】先行研究で、HIS1 に 87%の相同性を示す HSL1 と HIS1 とのアミノ酸配列比較および三次元構造予測により、基質ポケットと推定した領域近傍のアミノ酸の中から、基質認識に重要とみられるアミノ酸 5 残基が予想され、HSL1 への HIS1 型アミノ酸置換変異導入により、重要な 3 残基が特定されている。今回は、引き続き HSL1 への変異導入による解析を進めるとともに、トウモロコシの HIS1 ホモログ ZmHSL1B のアミノ酸置換解析により機能改変を進めた。各変異体タンパク質のトリケトン系除草剤 5 種（BBC-OH、Sulcotrione、Mesotrione、Tefuryltrione、Tembotrione）に対する修飾活性については、Fe^{2+}および 2-オキソグルタル酸存在可で各基質と反応させ、反応生成物について高速液体クロマトグラフィーを利用した解析を行った。

【結果及び考察】HIS1 とともに構造モデルにおいて基質修飾部位と推測した HSL1 のアミノ酸残基を置換変異させた結果、140 位の残基一つの変異による Sulcotrione、Mesotrione、Tefuryltrione、Tembotrione の 4 剤に対する修飾活性の獲得を確認し、この変異タンパク質遺伝子のシロイヌナズナへの形質転換による発現が、植物体にこれら 4 種類の除草剤への抵抗性を付与することを確認した。一方、基質認識に重要であることが予想された 5 残基全てを HIS1 型に置換した HSL1 は、Sulcotrione、Mesotrione、Tefuryltrione、Tembotrione の 4 剤に対する修飾活性を獲得したものの、BBC への抵抗性は HIS1 ほどではないことを確認した。この結果は、基質ポケットと予測した領域のアミノ酸残基以外に BBC 認識に重要な残基が存在することを示し、現在、その残基の変異による探索を進めている。トウモロコシの HIS1 ホモログ ZmHSL1B は、変異を加えない状態でもある程度の BBC-OH に対する修飾活性が見られたが、イネの HIS1 および HSL1 型の複数のアミノ酸置換変異を加えることによって、BBC-OH に対するより高い修飾活性が付与できることを明らかにした。

rice, herbicide resistance, Fe(II)/2OG dioxygenase

講演番号：3B08p12
講演日時：3 月 27 日 16:01～ 総合学習プラザ B08 会場

イネ除草剤不活性化酵素 HIS1 の新たな基質の発見とその解析

Discovery of a novel substrate for herbicide-inactivationg enzyme HIS1

○親松 紗璃依[1]、高村 夏生[1]、山崎 明彦[2]、酒井 基成[2]、鈴木 悟[2]、関野 景介[2]、黒木 慎[3]、戸澤 譲[1] ([1]埼玉大学院理工、[2]エスディーエスバイオテック(株)、[3]農研機構)

○Sarii OYAMATSU[1], Natsuki TAKAMURA[1], Akihiko YAMAZAKI[2], Motonari SAKAI[2], Satoru SUZUKI[2], Keisuke SEKINO[2], Makoto KUROKI[3], Yuzuru TOZAWA[1] ([1]Saitama Univ., [2]SDS Biotech, [3]NARO)

【目的】イネ HIS1 タンパク質が Fe(II)/2-オキソグルタル酸依存型ジオキシゲナーゼ（2OGD）として、酸化修飾により複数のトリケトン系の除草剤を不活性化すること、*HIS1* 遺伝子が複数の除草剤に対する抵抗性遺伝子として利用可能なこと、イネには HIS1 に 87%の相同性を示す HSL1 をはじめ、HSL2、HSL4、HSL5 などの HIS1 相同タンパク質コード遺伝子が存在すること、HSL1 も単一のトリケトン系除草剤の酸化による不活性化機能を持つこと、などをこれまでに明らかにしてきた(*Science* 365, 2019)。今回、市販の 2OGD 阻害剤の HIS1 および HSL への阻害効果を調査している過程で、弱いながらも HIS1 の除草剤不活性化活性を抑制する化合物を見出すとともに、植物成長抑制剤として利用されている Trinexapac-ethyl が、HIS1 の基質となることを確認できた。HIS1 や HSL の基質特異性に関する知見を得ることを目的として、Trinexapac-ethyl 代謝物の構造解析を進めたので、今回はその結果を報告する。

【材料及び方法】2OGD 阻害剤の HIS1 や HSL の酵素活性に与える効果を調べるために、コムギ無細胞翻訳系で調製した酵素タンパク質、Fe^{2+}、2OG および基質となる除草剤の存在下で、各 2OGD の添加・非添加の各条件で酵素アッセイを行った。反応液を後処理後に HPLC 解析することにより、酵素活性阻害の有無を検証した。この過程で HIS1 の基質となることを確認した Trinexapac-ethyl については、HIS1 との酵素反応液からこれを精製し、LC/MS/MS 解析と NMR 解析によって構造を解析した。さらに、イネ日本晴野生株(*HIS1*)及び日本晴由来のレトロトランスポゾン *Tos-17* 挿入 *his1* 株を対象に、室温、自然光下にて TE 処理による茎葉伸長への影響を観察した。

【結果及び考察】2OGD 阻害剤の効果検証により、2OGD 阻害剤 Prohexadione が HIS1 による除草剤 BBC-OH を基質とする酵素活性を阻害すること、この薬剤が HSL1 による Tefuryltrione 修飾活性も阻害することを昨年度に報告した。しかしながらその阻害効果は、HIS1 や HSL1 阻害剤として有効利用するには不十分であった。同様な阻害効果を期待した Trinexapac-ethyl については、HIS1 の酵素反応基質となることが判明した。LC/MS/MS 解析と NMR 解析により Trinexapac-ethyl 反応生成物の構造を同定した結果、酸素原子 1 つが付加して特定部位が水酸化修飾を受けていることを明らかにした。10 種類の HIS1 類似タンパク質 HSL に対して Trinexapac-ethyl を反応させたところ、イネ HSL2、コムギ TaHSL、コムギ TaHSL2 の 3 種が明瞭な Trinexapac-ethyl 代謝活性を示した。一方で、HIS1 と 86%の相同性を持つイネ HSL1 は TE を代謝できなかった。植物体レベルで *HIS1* 株と *his1* 株について、Trinexapac-ethyl 効果を調査したところ、HIS1 酵素の有無による茎葉伸長阻害の程度に差異は見られなかった。実験に用いた各系統には Trinexapac-ethyl を代謝できる *HSL2* が存在していることが差異を生まない要因である可能性も考えられるため、現在、HIS1 と HSL2 を両方欠損する株について共同研究による Trinexapac-ethyl 効果の検証を進めている。

rice, herbicide resistance, Fe(II)/2OG dioxygenase

講演番号：3B08p13
講演日時：3 月 27 日 16:21～ 総合学習プラザ B08 会場

SLIM1 による *SDI1* の発現促進：硫黄欠乏下におけるグルコシノレート生合成の効率的な抑制機構
Promotion of *SDI1* expression by SLIM1: The effective repression mechanism of glucosinolate biosynthesis under sulfur deficiency

○川口 諒太[1]、丸山-仲下 明子[2] ([1]九大院生資環、[2]九大院農)
○ Ryota KAWAGUCHI[1], Akiko MARUYAMA-NAKASHITA[2] ([1]Kyushu Univ., Grad. Sch. Bio-Environ. Sci., [2]Kyushu Univ., Fac. Agr.)

硫黄は生物の必須元素であり、植物の成長や発達に重要な役割を担っている。植物は硫黄を硫酸イオンの形態で根から吸収し、複数の反応によりシステインへと同化する。動物の必須アミノ酸であるメチオニンはシステインを基に生合成される。アブラナ科植物に蓄積するグルコシノレート(GSL)は数種のアミノ酸から生合成される含硫二次代謝物質である。なかでも、メチオニン由来 GSL(mGSL)は病害虫に対する忌避効果や硫黄の貯蔵源としての機能を持ち、人に対する発がん予防効果を持つことも注目されている。植物が硫黄欠乏(-S)にさらされると、硫黄同化や GSL の分解が促進され、GSL 生合成が抑制される。この応答により硫黄を一次代謝系へと優先的に配分することで植物は-S 下でも生存を維持することができる。転写制御因子 Sulfur LIMitation 1(SLIM1)はこの-S 応答を包括的に担う。近年、-S 応答のマーカー遺伝子 *Sulfur Deficiency Induced 1*(*SDI1*)が、mGSL 生合成の抑制因子であることが報告された。SDI1 は mGSL 生合成遺伝子の発現を促進する転写因子 MYB28 と相互作用し、その転写活性化能を抑制することで、mGSL 生合成を抑制する。これらの知見は *SDI1* の発現誘導が-S に応じた mGSL 生合成抑制の鍵であることを示しているが、その分子機構は不明である。

本研究では、-S に応じた *SDI1* の発現上昇への SLIM1 の寄与を解析した。*SDI1* の 5’上流域 3kb の下流で GFP を発現するシロイヌナズナ Columbia-0 株(野生型株、Col)および SLIM1 欠損株(SKO)を硫黄十分(+S)、-S 条件下で育成し、GFP の定量および組織局在の観察を行った。SKO の GFP 量は+S では Col よりわずかに減少し、-S では顕著に減少した。この結果から、SLIM1 は *SDI1* の-S による発現誘導に働くこと、SLIM1 の他にも何かしらの促進因子が必要であることが示唆された。どちらの植物でも GFP は葉と根の維管束に沿って観察された。mGSL の主要な蓄積部位である葉では特に-S に応じて維管束特異的に *SDI1* の発現が誘導された。SLIM1 や MYB28, mGSL 生合成遺伝子も維管束で発現することから、SLIM1 依存的に維管束で *SDI1* の発現促進が起きることが mGSL 生合成の効率的な抑制に寄与すると考えられる。

Sulfur defficiency, Glucosinolate, Transcriptional regulation

講演番号：3B08p14
講演日時：3 月 27 日 16:32～ 総合学習プラザ B08 会場

新規転写因子 GRAB2 および Zn2 による OsPR7 遺伝子の転写制御機構
Transcriptional regulation of OsPR7 mediated by novel transcription factors, GRAB2 and Zn2 in rice

○中塚 達人[1]、西村 成史[1]、平井 洋行[2]、古川 岳人[2]、仲下 英雄[3]、蔡 晃植[1,2,4]([1]長浜バイオ大院・バイオ、[2]長浜バイオ大・バイオ、[3]福井県立大院・資源、[4]長浜バイオ大・ゲノム編集研究所)
○Tatsuto NAKATSUKA[1], Akifumi NISHIMURA[1], Hiroyuki HIRAI[2], Takehito FURUKAWA[2], Hideo NAKASHITA[3], Fang-Sik CHE[1,2,4] ([1]Grad. Sch. of Biosic., Nagahama Inst. of Biosic. and Tech., [2]Dept. of Biosic., Nagahama Inst. of Biosic and Tech., [3]Dept. Biosic., Fukui Pref. Univ, [4]Genome Editing Research Institute, Nagahama Inst. of Biosic and Tech.)

イネはイネ褐条病細菌*Ａｃｉｄｏｖｏｒａｘ　ａｖｅｎａｅ*の鞭毛タンパク質であるフラジェリンや翻訳伸長因子ＥＦ－Ｔｕ（Ｅｌｏｎｇａｔｉｏｎ　ｆａｃｔｏｒ　Ｔｕ）をＰＡＭＰ（Ｐａｔｈｏｇｅｎ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ　ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　ｐａｔｔｅｒｎ）として認識し、ＰＡＭＰ－Ｔｒｉｇｇｅｒｅｄ　Ｉｍｍｕｎｉｔｙ（ＰＴＩ）という免疫反応を誘導する。これまでに我々は、ＰＡＭＰをイネに処理すると、ＰＴＩとして活性酸素の発生やカロースの沈着、システインエンドペプチダーゼであるＯｓＰＲ７の細胞外蓄積等が認められることを明らかにした。さらに、*ＯｓＰＲ７*の過剰発現形質転換イネ（ＯｓＰＲ７－ｏｘ）にイネ白葉枯病菌*Ｘａｔｈｏｍｏｎａｓ　ｏｒｙｚａ*ｐｖ．*Ｏｒｙｚａｅ*（*Ｘｏｏ*）を接種したところ、ＯｓＰＲ７－ｏｘは*Ｘｏｏ*に対して病害抵抗性を示したことから、ＯｓＰＲ７はイネの*Ｘｏｏ*に対する病害抵抗性において中心的な役割を有することを示した。そこで本年度は、*ＯｓＰＲ７*の発現を制御する転写因子の同定とその制御機構について研究を行なった。まず、フラジェリンやＥＦ－Ｔｕを処理したイネにおいて発現が上昇する遺伝子を４４　Ｋオリゴマイクロアレイで解析したところ、５個の転写調節因子をコードする遺伝子がフラジェリンとＥＦ－Ｔｕ処理で共通に発現上昇することが示された。そこで、この５つの転写因子の中から*ＯｓＰＲ７*の発現を制御する転写調節因子を同定するため、それぞれの転写調節因子を発現するベクターと*ＰＲ７*遺伝子の上流２　ｋｂ領域をルシフェラーゼ遺伝子と連結したベクターをイネプロトプラストに同時導入し、導入１６時後におけるルシフェラーゼの発光量を測定した。その結果、ＧＲＡＢ２（Ｇｅｍｉｎｉｖｉｒｕｓ　ＲｅｐＡ　ｂｉｎｄｉｎｇ　２）と　Ｚｎ２（Ｚｉｎｃ－ｆｉｎｇｅｒ，　Ｃ２Ｈ２　ｔｙｐｅ　ｄｏｍａｉｎ　ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ　ｐｒｏｔｅｉｎ）が*ＯｓＰＲ７*の転写発現を促進することが明らかになった。次に、　ＧＲＡＢ２と　Ｚｎ２による*ＯｓＰＲ７*の転写誘導に必要なプロモーター領域を調べるため、*ＯｓＰＲ７*の上流１　ｋｂ，　０．５　ｋｂ，　０．２７　ｋｂ，　０．１　ｋｂをルシフェラーゼと連結したベクターをそれぞれ作製し、　ＧＲＡＢ２と　Ｚｎ２発現ベクターと同時にプロトプラストに導入した。その結果、ＧＲＡＢ２とＺｎ２は１　ｋｂ，　０．５　ｋｂ，　０．２７　ｋｂの領域でルシフェラーゼの発現を上昇させることが示された。以上のことから、　ＧＲＡＢ２と　Ｚｎ２が*ＯｓＰＲ７*の転写を制御するのに必要な部位は*ＯｓＰＲ７*の上流０．２７　ｋｂ～０．１　ｋｂの領域内に存在することが示された。

Transcriptional regulation, *Oryza sativa*, PR protein

発表責任者：中塚達人（b115122@m.nagahama-i-bio.ac.jp）

講演番号：3B08p15
講演日時：3 月 27 日 16:43～ 総合学習プラザ B08 会場

イネカルス形成制御遺伝子の探索と解析

The exploration and analysis of genes regulating callus formation in rice

○西尾 陸[1]、春名 沙紀[1]、沼本 穂[1]、森田 重人[1,2]、増村 威宏[1,2]([1]京都府立大学・生命環境、[2]京都府農技セ・生資セ)
○ Riku NISHIO[1], Saki HARUNA[1], Minori NUMAMOTO[1], Shigeto MORITA[1,2], Takehiro MASUMURA[1,2] ([1]Kyoto Pref. Univ. Life Env. Sci., [2]Kyoto Prefect. Agri. Forest. Fish. Technol.Cent., Biotechnol. Res. Dept.)

【研究背景と目的】

イネ（*Oryza Sativa*）は日本の主要作物であり，分子生物学的研究が盛んに行われている．近年では，CRISPR-Cas9 システムを用いたゲノム編集技術に関する研究がイネにおいても活発に進められている．植物では，エンドヌクレアーゼ，Cas9 と標的配列を認識するガイド RNA を細胞内で発現させるためにアグロバクテリウム（*Agrobacterium tumefaciens*）を用いた形質転換法が利用されている．アグロバクテリウムを感染させるためにイネでは胚盤由来のカルスを用いるが，カルス形成に関わる分子メカニズムは未だ十分に明らかにされていない．

一方，シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）のカルス形成に関する研究では，植物ホルモン応答，ストレス応答，細胞増殖，成長に関与する様々な転写因子がカルス形成に関わっていることが報告されている．そこで，本研究ではこれらのカルス形成に関わる遺伝子についてイネオーソログを探索し，カルス形成制御遺伝子を明らかにすることを目的とした．

【方法と結果】

シロイヌナズナでカルス形成への関与が報告されている転写因子のアミノ酸配列情報を元に，NCBI の BlastX を用いてイネオーソログを探索した．その結果，26 個の候補遺伝子が検出され，その多くがシロイヌナズナ遺伝子と同様の経路に関与する転写因子であると機能予測されていた．

これらイネオーソログ遺伝子がカルスにおいて実際に発現しているかを調べるために，イネ栽培品種日本晴の種子から N6D 寒天培地上でカルスを誘導し，培養 7 日目のカルス，14 日目のカルス，およびコントロールとしてホルモンフリーN6 培地で発芽させた 3 日目の芽生えから RNA を抽出し，RT-PCR を行った．その結果，23 個の遺伝子は，カルスで発現していることを確認した．これらの遺伝子の中からカルスに特異的に発現しているものを調べるために，リアルタイム RT-PCR によって発現強度を調べた．その結果，*ARF16* や *CRL* が，培養 7 日目のカルスにおいて強く発現していることがわかった．以上の結果より，これらの遺伝子は，イネカルス形成の初期段階において重要な役割を果たしている遺伝子であると推定し，更なる解析を進める予定である．

rice, callus, transcription factor

発表責任者：増村威宏（masumura@kpu.ac.jp）

講演番号：3B08p16
講演日時：3 月 27 日 16:54～ 総合学習プラザ B08 会場

amaterasu-oomikami:二倍体植物への進化の扉を開いた遺伝子
amaterasu-oomikami:a gatekeeper gene for gametophyte to sporophyte development in the fern *Ceratopteris richardii*
○山下 一郎（進化生物学研究庵 811）
○Ichiro Yamashita (Lab 811 of Evolution)

【背景・目的】陸上植物は約 5 億年前に緑藻類から分枝して、コケ類、シダ類を経て種子（被子・裸子）植物が進化したと考えられている。緑藻類とコケ類の植物体は一倍体細胞でできているが、種子植物は花粉（精子）と胚珠（卵）を除いて二倍体細胞から成る。遺伝子量が二倍になったことで代謝が増大し、環境適応力が高まることで、進化が促進されたことが推測できる。顕花植物は植物種の中で最も繁栄し、農作物や園芸植物として貴重である。シダ類は植物進化の中で初めて二倍体生活環を獲得して、コケ類と高等植物の中間の体制を維持している。即ち、胞子の発芽後しばらくは一倍体（前葉体：gametophyte）で増殖し、性分化・受精を経て二倍体となった細胞が増殖・成長して胞子を作る植物体（胞子体：sporophyte）を形成する。本研究では、シダ類のミズワラビ（*Ceratopteris richardii*）を用いて、前葉体から胞子体への体制転換に関与する遺伝子変異株の単離と解析を目的とした。
【方法】野生型胞子を 2.5%グルコースを含む Hyponex 培地に散布して前葉体を形成させる。受精を阻害するためにシャーレのふたを下にして培養すると、前葉体はしばらく増殖を続けるが、その後、生育が止まり死滅する。このとき、前葉体として成長を続ける変異個体を選別して培養土に植え替え、胞子体の成長後、胞子を採集した。この胞子を Hyponex 培地に散布して、前葉体の形成、性分化、受精、胞子体の成長などを観察し、胞子体の形成と成長が著しく低下した変異株を同定した。
【結果】単離した変異系統は、初期前葉体の形成能に関して野生型株と同じだった。性分化に関しては、明らかにオス型の数が雌雄同体に比べて多くなった。造精器・造卵器の形成、精子の数と運動能に変化はなく、受精に関しても野生株と同程度であった。変異株では前葉体の成長が持続する一方、受精後、多くはごく小さな胚（二倍体）のまま成長が停止した。このなかで若い胚から胞子体葉を形成するに至った変異個体を培養土に移し替え、その成長を観察したところ、野生株に比べて著しく成長速度が遅かった。
【考察】本研究で単離した変異株は、前葉体の成長が受精後も停止せず、受精によって形成された胚から胞子体への成長が著しく低下していたことから、前葉体から胞子体への体制変換に重要な役割を持つ遺伝子に変異を持つものと考えられる。この遺伝子は植物進化史のなかで、一倍体植物の世界から二倍体植物が誕生する一大進化の扉を開いた遺伝子と考えられ、我が国の天岩戸神話に準え、***amaterasu-oomikami*** と命名した。

gametophyte, sporophyte, C-fern

発表責任者：山下一郎（iyama@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：3B08p17
講演日時：3 月 27 日 17:05～ 総合学習プラザ B08 会場

雑種強勢形質を特徴付ける代謝物の探索とその制御機構の解析
Molecular insights into the hybrid vigor by metabolome analysis
○杉 直也[1]、椹澤 都月[1]、レ ティ ノ クイン[1]、光田 展隆[2]、藤原 すみれ[2]、鈴木 穣[3]、斎藤 和季[4,5]、草野 都[1,4]、柴 博史[1] ([1]筑波大院・生命環境、[2]産総研・生物プロセス、[3]東大・新領域、[4]理研・CSRS、[5]千葉大・薬)
○Naoya Sugi[1], Mizuki Gumizawa[1], Thi Ngoc Quynh Le[1], Nobutaka Mitsuda[2], Sumire Fujiwara[2], Yutaka Suziki[3], Kazuki Saito[4,5], Miyako Kusano[1,4], Hiroshi Shiba[1] ([1]Univ. of Tsukuba, [2]BPRI, AIST, [3]Univ. of Tokyo, [4]RIKEN CSRS, [5]Chiba Univ.)

【背景・目的】雑種強勢は、異なる種間あるいは種内系統間の交配で得られた F_1 雑種において、その両親と比較してバイオマスの増大、ストレス耐性向上等により旺盛な生育を示す現象である。当該現象は農業分野において生産性向上に大きく貢献している重要な現象であることから盛んに研究されているが、過去の育種学・遺伝学的アプローチではその全容を明らかにすることは出来ていない。また近年、雑種強勢への時計遺伝子や光合成関連遺伝子の関与が指摘されているものの、未だ不明である。そこで、表現型に直結する中心代謝物のメタボローム解析を行うことで、雑種強勢メカニズム解明に向けた新規知見を得ることを目的とした。
【方法・結果】雑種強勢で見られるバイオマスの増大は多数の因子が複合的に作用する量的形質であり、栽培時の様々な環境要因から多大な影響を受けると考えられる。そこで栽培環境要因のばらつきを極力排除し、均一化された新規バイオマス測定系を確立した。上記系を用いて生育させた F_1 雑種はその両親系統と比較して有意なバイオマス増加を示した。これらを材料としてメタボローム解析を行った結果、237 種類の代謝産物を検出した。過去の雑種強勢研究において、F_1 雑種におけるクロロフィル濃度の増加及び糖類の増加とバイオマス増加の関連が報告されたことから、これら形質について確認したところ、両親系統と比較して F_1 雑種においてクロロフィル濃度の増加は認められず、さらにメタボローム解析の結果において F_1 雑種特異的な糖類の蓄積も見られなかった。その一方で、F_1 雑種特異的な増減パターンを示した代謝物も存在した。それらの中には、生長に直接つながる炭素・窒素代謝のクロストークで重要な代謝物も含まれていた。当該代謝物が変化した原因を明らかにするため、この代謝反応に関連する酵素遺伝子群の発現量について定量解析すると共に、酵素活性の評価を進めている。これらの結果を元にシロイヌナズナ F_1 雑種における雑種強勢メカニズムについて考察したい。

Heterosis, metabolomics, biomass

講演番号：3B09a03
講演日時：3 月 27 日 09:52～ 総合学習プラザ B09 会場

アシタバ（*Angelica keiskei*)由来 *Tps* 遺伝子のクローニングと機能解析

cDNA cloning and functional analyses of TPSs in Ashitaba (*Angelica keiskei*)

○飯村 九林[1]、八反 順一郎[2]、三沢 典彦[2]、新藤 一敏[1] ([1]日女大・家政、[2]石川県大・生資研)
○ Kurin IIMURA[1], Jun-ichiro HATTAN[2], Norihiko MISAWA[2], Kazutoshi SHINDO[1] ([1]Japan Women's Univ., [2]Ishikawa Pref. Univ.)

【目的】セスキテルペンは植物がメバロン酸経路により生合成する C_{15} の基本骨格を持つイソプレノイドの総称であり、これまでに 7000 種類以上の化合物が報告されている。セスキテルペンの一部は香料として用いられる他、抗炎症作用、抗腫瘍作用、抗菌作用、駆虫作用などの多彩な生理活性を持ち、医薬品、食品材料、農薬等としても有用である。現在セスキテルペンの調製には植物からの抽出、化学合成といった手法が用いられているが、我々は新たなセスキテルペン合成酵素（TPS）の発見及びそれを組み込んだ組換え大腸菌による新たな調製手法の確立に取り組んでいる。

アシタバ（*Angelica keiskei*）は日本原産のセリ科シシウド属の多年草であり、古来より食用としてだけでなく生薬としても用いられている。そのため、その様々な生理活性が研究されており、これまでにアシタバが抗糖尿病活性、抗肥満活性、抗菌活性、抗腫瘍活性などを持つことが明らかとなっている。またその生理活性物質も同定されており、これまでにアシタバに様々なカルコン類やクマリン類が含まれることが確認されている。しかし、アシタバが生産するセスキテルペンについての研究報告は非常に限られており、ashitabaol が報告されているのみである。そこで試みにアシタバ葉抽出物を GC-MS で分析したところ、複数のセスキテルペン（β-caryophyllene, germacrene B, β-himachalene, germacrene D, が検出されることが判明した。そこで、本研究ではアシタバに存在するテルペン合成酵素（TPS）のクローニング、また組換え大腸菌での生産による化合物同定を試みた。

【方法および結果】アシタバの葉より RNA を抽出し、cDNA クローニングを行った。その結果、アシタバより 2 つの *Tps* 遺伝子を同定した（*AkTps1*、*AkTps2*）。その配列を解析したところ、AkTPS1 と AkTPS2 には、他生物の TPS と同様にアスパラギン酸リッチモチーフが認められ、AkTPS1 と AkTPS2 の相同性は 84.8%だった。また、Blast 解析の結果、これらはセリ科のゲルマクレン合成酵素と高い相同性を示し、特に AkTPS1 はセリ科のアジョワン（*Trachyspermum ammi*） の germacrene D 合成酵素と、AkTPS2 はセリ科の *Thapsia villosa* の germacrene D 合成酵素と最も高い相同性を示すことが明らかとなった。次に、AkTPS1 と AkTPS2 の機能を解析するために、これらの遺伝子を、メバロン産経路を含むプラスミドとともに大腸菌 BL21（DE3）に共発現させた。その結果、AkTps1 発現株からは germacrene D が、AkTps2 発現株からは germacrene B と germacrene D が同定され,それぞれの機能を明らかにすることができた。

Sesquiterpene, Ashitaba (Angelica keiskei), Terpene synthase

講演番号：3B09a04
講演日時：3 月 27 日 10:03～ 総合学習プラザ B09 会場

ジスルフィド結合導入による MMLV 逆転写酵素の耐熱化

Further increase in thermostability of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase by introducing disulfide bond

○神田橋 眞子[1]、李 瞳陽[2]、生川 雄太郎[2]、馬場 美聡[2]、兒島 憲二[1,2]、滝田 禎亮[1,2]、肥山 貴圭[3]、山崎 友実[3]、保川 清[1,2] ([1]京大農、[2]京大院農、[3]東洋紡)
○Mako KANDABASHI[1], Tongyang LI[2], Yutaro NARUKAWA[2], Misato BABA[2], Kenji KOJIMA[1,2], Teisuke TAKITA[1,2], Takayoshi HIYAMA[3], Tomomi YAMAZAKI[3], Kiyoshi YASUKAWA[1,2] ([1]Faculty of Agric., Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ., [3]Toyobo.)

【目的】

逆転写酵素（RT）は分子生物学的研究や臨床診断で必要不可欠な酵素であり、モロニーマウス白血病ウイルス(MMLV)RTはcDNA合成に広く使用されている。低温でのcDNA合成反応は、鋳型RNAの二次構造形成やプライマーの非特異的な結合が生じ、反応効率が低下する。そのため、反応温度を上げることが望まれる。(MMLV)RTにおける10分間の熱処理で活性が50%になる温度（T_{50}）は44℃であり、その熱安定性は不十分である。そこで我々は電荷の導入、疎水性コアの安定化およびRNase H活性の消失を指向した部位特異的変異導入を組み合わせ、耐熱型変異体MM3（E286R/E302K/L435R）、MM4（E286R/E302K/L435R/D524A）を作製した[1)]。しかし、これら変異体のT_{50}は54℃、56℃であり、さらなる耐熱化が求められる。本研究では、ジスルフィド結合導入によるMMLV RTの耐熱化を試みた。

【方法・結果】

1. 変異の設計：MMLV RTの立体構造のB因子の観点から、5個のドメイン中で熱安定性が最も低いと考えられるRNase Hドメインに着目した。シスチン形成が可能と思われるC_α原子間距離が9.2Å以内、C_β原子間距離が5.6Å以内に存在する2個のアミノ酸残基を5組選択し、二重変異体L514C/K577C、D518C/K576C、S527C/T556C、A551C/T662CあるいはA573C/L578Cを設計した。2. 変異体の調製：C末端に$(His)_6$を付加したMMLV RT（Thr24−Leu671）をコードする遺伝子がpET22b(+)に挿入された発現プラスミドに、5種類の二重変異をQuikChange法にて導入した。これを大腸菌BL21(DE3)に導入し、形質転換菌を培養し、菌体から酵素を精製した。3. 活性の耐熱性の評価：酵素を各温度で3分間熱処理後、モデルRNAを用いたRT-PCR（cDNA合成は45℃）を行った。cDNAが合成された熱処理の最高温度はWT、L514C/K577C、D518C/K576C、S527C/T556Cでは59℃であったのに対し、A551C/T662CおよびA573C/L578Cでは63℃と、WTより4℃高かった。4. 分子内ジスルフィド結合の解析：5,5’-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)（DTNB）を用いたエルマン法によるチオール基の定量およびリシルエンドペプチダーゼ分解産物の逆相HPLCパターンによる分子内ジスルフィド結合の同定を現在行っている。

【文献】

1. K. Yasukawa, M. Mizuno et al. (2010) *J. Biotechnol.* **150**, 299−306

thermostability, MMLV reverse transcriptase, Introduction of disulfide bond

発表責任者：神田橋　眞子（kandabashi.mako.54m@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3B09a05
講演日時：3 月 27 日 10:14～ 総合学習プラザ B09 会場

cre 発現ベクターの改良による *Thermus thermophilus* の Cre/*lox* 多重遺伝子破壊法の耐熱化

Development of a thermostable *cre* expression vector for a Cre/*lox*-based multiple gene disruption method of *Thermus thermophilus*

○平津 圭一郎[1]、西村 政隆[1]、布柴 達男[2] ([1]防衛大・応化、[2]国基大・教養)
○Keiichiro Hiratsu[1], Masataka Nishimura[1], Tatsuo Nunoshiba[2] ([1]Dep. of App. Chem., NDA, [2]Col. of lib. Arts, ICU)

目的 耐熱性の薬剤耐性選択マーカーが少ないために、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB27 株では多重遺伝子破壊株の作製や相補実験等の遺伝学的解析は困難だった。この問題を解決するために、我々の研究グループでは Cre/*lox* 部位特異的組換えを利用した遺伝子破壊法を開発した。 この方法では､耐熱性カナマイシン耐性遺伝子 *htk* を *lox* 配列で挟んだ遺伝子破壊用カセット(*lox66-htk-lox71*)を挿入して遺伝子を破壊し、その破壊株に *cre* 発現プラスミド pSH-Cre を導入して *lox* 間の組換え反応により *htk* を除去できるため、これを繰り返し遺伝子破壊に使用できる。しかし、Cre の変性温度は 54℃付近であることから､*htk* の除去操作では pSH-Cre 導入株を生育下限温度の 50℃で培養する必要がある。この培養条件では増殖速度が遅いため、遺伝子破壊株を得るためには 5 日間の培養×2 回＝10 日間を要する。本研究では、*htk* 除去に必要な培養時間を短縮するために、耐熱性 *cre* 発現プラスミドの開発を行った。

実験方法 pSH-Cre の *cre* 遺伝子領域に PCR によりランダム変異を導入した変異ライブラリー(pSH-Cre*)を作製し、これをカロテノイド生合成遺伝子群の転写抑制因子をコードする *litR* を破壊した株に導入して耐熱性 *cre* 発現プラスミドを分離した。*lox66-htk-lox71* カセットで *litR* を破壊したのちに Cre/*lox* 反応で *htk* を除去すると、親株（HB27）→ *ΔlitR*:: *lox66-htk-lox71* 株→ *ΔlitR*::*lox72* 株のコロニーの色は、カロテノイドの生産能を反映して黄色→白色→黄色に変化する。この特性を利用して、*ΔlitR*:: *lox66-htk-lox71*/pSH-Cre*を 60℃でプレート培養し、黄色のコロニーを選択することにより耐熱性の変異 pSH-Cre のスクリーニングを行った。

結果と考察 *ΔlitR*:: *lox66-htk-lox71*/pSH-Cre*を 60℃でプレート培養したところ、約 5%の形質転換コロニーが白色→黄色になった。得られた 14 クローンの黄色株からプラスミドを回収し、その塩基配列を決定すると、13 クローンに共通して *cre* 遺伝子の開始コドンの 4base 上流に C→T の塩基置換が起こっていた。この変異はプロモーター領域（*PslpA*）と *cre* 遺伝子の間の人工配列（66 base）に位置しており、Cre には変化がない事から、耐熱性獲得の要因は *cre* 遺伝子の発現量の増加と示唆された。本大会では、この耐熱性 *cre* 発現プラスミドの Cre/*lox* 遺伝子破壊法における有効性の検証結果も合わせて報告する。

Thermus thermophilus, Cre/*lox*, gene disruption

講演番号：3B09a06
講演日時：3 月 27 日 10:35～ 総合学習プラザ B09 会場

ヤスデ、*Oxidus gracilis* 由来のヒドロキシニトリルリアーゼのタンパク質工学による触媒効率およびエナンチオ選択性の向上

Protein engineering of hydroxynitrile lyase from cyanogenic millipede, *Oxidus gracilis* for enhancing catalytic efficiency and enantioselectivity

○浅野 泰久、チャイキュウ シリポーン、元島 史尋（富県大工）
○Yasuhisa ASANO, Siriporn CHAIKAEW, Fumihiro MOTOJIMA (Toyama Pref. Univ.)

［目的］ヒドロキシニトリルリアーゼ（HNL）は、シアノヒドリンの対応するカルボニル化合物とシアン化水素への開裂、および逆反応でのシアノヒドリンの合成を触媒する。我々は、シアンを生成するヤスデから高活性の HNL 類を発見し(1,2)、異種宿主における遺伝子発現について研究してきた(2,3)。ヤケヤスデ *Oxidus gracillis* 由来の HNL（OgraHNL）は、（*R*）-マンデロニトリル（（*R*）-Man）合成に対して高い比活性とエナンチオ選択性を示す。本研究の目的は、OgraHNL の触媒構造を解明し、さらに（*R*）-2-クロロマンデロニトリル（（*R*）-2-Cl-Man）に対して高い比活性とエナンチオ選択性を示すための遺伝子変異を行うことである。
[材料と方法]大腸菌 SHuffle T7 で OgraHNL 遺伝子を発現させた。最適な結晶化条件のスクリーニングは、シッティングドロップ蒸気拡散法を使用して 20°C で行った。
[結果] OgraHNL と硫酸塩、ベンズアルデヒド、（*R*）-Man、（*R*）-2-Cl-Man、およびアセトンシアノヒドリンとの複合体の結晶構造を、それぞれ 1.6、1.7、2.3、2.1、およびそれぞれ 2.0Å の解像度で明らかにした。結晶構造解析の結果から、本酵素の触媒機構を想定した。また、プログラムを用いて、（*R*）-Man および（*R*）-2-Cl-Man の両基質について、エナンチオ選択性を改善させる合理的な設計を行った。

1. M. Dadashipour, Y. Ishida, K. Yamamoto, Y. Asano, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2015**, 112, 10605-10610.
2. T. Yamaguchi, A. Nuylert, A. Ina, T. Tanabe, Y. Asano, *Sci. Rep*., **2018**, 8, 3051.
3. Z.-Y. Zhai, A. Nuylert, K. Isobe, Y. Asano, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*., **2019**, 46, 887-898.

Hydroxynitrile lyase, millipede, Oxidus gracilis

発表責任者：浅野泰久（asano@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：3B09a07
講演日時：3 月 27 日 10:46～ 総合学習プラザ B09 会場

Structural base to improve the enzyme activity and enantioselectivity of hydroxynitrile lyase from millipede, *Parafonteria laminate* for (*R*)-2-chloromandelonitrile synthesis

○Aem NUYLERT[1,2], Yasuhisa ASANO[1,2] ([1]Biotechnology Research Center, Toyama Prefectural Univ., [2]Asano Active Enzyme Molecule Project, ERATO, JST)

[Purpose] Hydroxynitrile lyases (HNLs) have been discovered in cyanogenic plant[1], bacteria[2] and recently in arthropods[3,4] by our laboratory. They play a role in decomposition of cyanogenic glycoside or cyanohydrin[5] into hydrogen cyanide and aldehyde. As reversible reaction, HNLs can utilize aldehyde or ketone to produce chiral cyanohydrin which are important building blocks for synthesis of fine chemical and pharmaceuticals. We discovered a new HNL from *Parafontaria laminate* (PlamHNL) which showed high enantioselectivity in the synthesis of various cyanohydrins. In this study, we focus on the synthesis of (*R*)-2-chloromandelonitrile which is a precursor of (*R*)-2-chloromandelic acid, a key intermediate in the synthesis of an antiplatelet agent, clopidogrel

[Materials and Methods] PlamHNL was engineered to improve the enantiomeric excess (*e.e.*) of (*R*)-2-chloromandelonitrile. A computer-aided substrate-docking simulation was carried out in the active site of a homology model of PlamHNL based on the known structure of another millipedes HNL. Since the PlamHNL shares 52% amino acid sequence homology with *Oxidus gracilis* HNL (OgraHNL), the modelling homology of PlamHNL structure was computed using OgraHNL structure complexed with (*R*)-2-chloromandelonitrile as a template.

[Results] The best mutant catalyzed the production of (*R*)-2-chloromandelonitrile with higher a conversion and % *e.e.* than the wild-type at pH 3.5 and 25˚C in 30 min reaction. These results showed that the enantioselectivity of PlamHNL for (*R*)-2-chloromandelonitrile synthesis was remarkably improved by the computer-aided mutation at the active site.

(1) Asano, Y.; Tamura, K. i.; Doi, N.; Ueatrongchit, T.; H-Kittikun, A.; Ohmiya, T. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2005,** *69* (12), 2349.
(2) Wiedner, R.; Gruber-Khadjawi, M.; Schwab, H.; Steiner, K. *Comput Struct Biotechnol J* **2014,** *10* (16), 58.
(3) Dadashipour, M.; Ishida, Y.; Yamamoto, K.; Asano, Y. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2015,** *112* (34), 10605.
(4) Yamaguchi, T.; Nuylert, A.; Ina, A.; Tanabe, T.; Asano, Y. *Sci Rep* **2018,** *8* (1), 3051.
(5) Yamaguchi, T.; Kuwahara, Y.; Asano, Y. *FEBS Open Bio* **2017,** *7* (3), 335.

hydroxynitrile lyase, Parafontaria laminate, computer-aided mutation

発表責任者：Prof. Yasuhisa Asano（asano@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：3B09a08
講演日時：3 月 27 日 10:57～ 総合学習プラザ B09 会場

酵素担持ペーパーデバイスにおいてベタイン誘導体が担持酵素の保存安定性に及ぼす影響

Influence of betaine derivatives on the stability of enzymes immobilized onto paper-based devices

○青木 拓真[1]、山本 真史[1,2]、北村 武大[2]、森田 祐子[2]、甲元 一也[1]([1]甲南大 FIRST、[2]第一工業製薬（株））
○Takuma AOKI[1], Masahumi Yamamoto[1,2], Takeo Kitamura[2], Yuko Morita[2], Kazuya Koumoto[1]
([1]Konan Univ., [2]DKS)

［研究背景］
唾液や尿などの体液を試料とする検査では、夾雑物の影響を低減できる酵素を担持した検査紙が使用される。しかし、検査紙に担持された酵素は、作製過程やその後の保存によって徐々に失活していき、検査紙の機能劣化を引き起こす。我々の研究室では、水溶液中で酵素安定化能を有するベタイン誘導体を開発し、その効果について報告してきた。本研究では、このベタイン誘導体のろ紙に担持した酵素に対する安定化効果について検討した結果を報告する。

［実験方法］
酵素として、西洋わさび由来のペルオキシダーゼ（HRP）を、ベタイン誘導体は研究室で合成したトリアルキルグリシネートを使用した。直径 1.2 cm のろ紙にベタイン誘導体を含んだ酵素溶液を滴下し、恒温乾燥機内で 40℃、50 分間恒温乾燥した。この恒温乾燥後のろ紙に基質（DAB）溶液を滴下し、室温で酵素反応を行った。酵素活性は 30 秒後の生成物由来の彩度を色彩計で測定し、評価した。

［研究結果］
トリアルキルグリシネートのアンモニウム基の炭素鎖が１～７つのベタイン誘導体（Ｂ１－Ｂ７）を含んだ酵素溶液で作成したろ紙で酵素反応を行った結果、構造依存的、濃度依存的な彩度の変化（上昇）が確認された。中でもアンモニウム基の炭素鎖をブチル基としたベタイン誘導体（Ｂ４）は、非添加時と比べて約３倍高い彩度を示し、ＨＲＰの安定性を最も向上していることが明らかとなった。安定化効果の見られたＢ４と既存の添加剤であるα－シクロデキストリン、トレハロースを用いて、２４時間後の恒温静置安定性を検討したところ、既存の添加剤では８時間後にはほぼＨＲＰが失活してしまっているのに対し、Ｂ４の添加では酵素反応の進行が確認されたことからＨＲＰの失活抑制効果があることが明らかとなった。ベタイン誘導体によるこのような安定化効果は二種類以上の酵素を共担持させた場合でも確認され、本研究成果は、診断で利用される酵素担持検査紙の保存安定性（長期保存）の向上に貢献できることが期待される。

betaine derivatives, paper-based device, immobilized enzyme

発表責任者：甲元 一也（koumoto@konan-u.ac.jp）

講演番号：3B09a09
講演日時：3 月 27 日 11:08～ 総合学習プラザ B09 会場

珪藻殻への有用タンパク質提示発現による機能性材料開発

Development of functional material by displaying useful proteins to frustules of a marine diatom.

○林 日佳里、大西 菜月、米田 広平、松田 祐介（関西学院大院）
○Hikari HAYASHI, Natsuki Onishi, Kohei Yoneda, Yusuke Matsuda (Kwansei Gakuin Univ.)

珪藻は二酸化ケイ素を主成分とする被殻（frustule）を持つユニークな光合成微生物である。珪藻が持つガラス質の被殻には Silica affinity protein（Silaffin）など複数のポリペプチドが含まれており、被殻の形成に関与していることが分かっている。人工的に Silaffin と任意のタンパク質との融合タンパク質を珪藻に発現させることで、目的タンパク質を珪藻被殻に提示発現させることが可能である。固定化酵素は再利用が可能な利点を持つが、酵素固定時に過激な条件を用いることがあり、酵素が失活する問題がある。一方、珪藻の被殻形成は、比較的穏和な条件下で進むため、有用酵素の被殻への提示発現を通して、効率的な固定化酵素作製への応用が期待できる。本研究では、海洋性珪藻 *Thalassiosira pseudonana* の被殻形成機構を利用し、フェノールオキシダーゼ（FO）及び金属結合タンパク質（MBP）を被殻に提示発現させ、固定化された酵素の物理化学的性質を調べることを目的とした。

提示発現のために、*FO* 遺伝子のコード領域を *T. pseudonana* 由来の Silaffin（*TpSil3*）直下に *flag* タグを介して連結した遺伝子（*TpSil3::flag::FO*）及び緑色蛍光タンパク質のコード配列（*egfp*）を *FO* 直下に連結した遺伝子（*TpSil3::FO::egfp*）を発現するベクターを作製し、野生株に導入した。また、*MBP* 遺伝子のコード領域を 3 つ連続的に連結した *poly-MBP* 遺伝子を *egfp* の直上及び直下に連結した遺伝子（*TpSil3::poly-MBP::egfp*；*TpSil3::egfp::poly-MBP*）を発現するベクターを作製し、野生株に導入した。EGFP 融合タンパク質発現候補株については、薬剤耐性による選抜の後、GFP 蛍光の有無で再選抜し、蛍光の細胞内局在をさらに詳細に解析した。

TpSil3:FO:EGFP 発現候補株は、いずれの株も被殻全体に GFP 蛍光が観察されたが、一部の候補株においては細胞質にも GFP 蛍光が観察された。また、TpSil3:poly-MBP:egfp 発現候補株では GFP 蛍光は観察されなかったが、TpSil3:egfp:poly MBP 発現候補株では有基突起と呼ばれる被殻上の突起状の部分にのみ GFP 蛍光が観察された。以上より FO は期待通り、被殻に提示発現できたと考えられる。また、poly-MBP は被殻の有基突起に提示発現していることが示唆され、被殻形成因子の下流に連結させるタンパク質によっては、被殻の一部に偏在して提示される可能性があることが示唆された。

diatom, silica, immobilization

講演番号：3B09a10
講演日時：3 月 27 日 11:19～ 総合学習プラザ B09 会場

R848 内封リポソームによる腫瘍随伴マクロファージ再教育及び抗体医薬 ADCP 効果増強

Improvement of ADCP response by re-education of tumor-associated macrophages with Resiquimod-encapsulated liposomes

○李 昊、曽宮 正晴、黒田 俊一 (阪大産研)
○Hao LI, Masaharu Somiya, Shun'ichi Kuroda (Osaka Univ. ISIR)

腫瘍随伴マクロファージ（Tumor-associated macrophage: TAM）は、がん組織に浸潤しているマクロファージであり、多くのがん組織の微小環境に存在する。TAM には M1 型と M2 型の二種類があり、M1 型が抗原提示作用や炎症促進作用を担いがん組織生長抑制的であるのに対し、M2 型は免疫抑制作用や組織再生作用を担いがん組織生長促進的である。がん細胞は TAM を M2 型へ分化させる因子を分泌し、がんの細胞増殖や転移に都合の良い M2 型に誘導することが示されている（Genard G ら, Frontiers in immunology, 8, 828, 2017)。したがって、腫瘍組織中の TAM を M2 型から M１型に誘導することが、免疫的がん治療の一つの標的になると考えられている。一方で、TAM は抗体医薬のエフェクター細胞として働くため、がん治療において有用である。抗体と結合したがん細胞は抗体依存性細胞貪食（ADCP）作用により、TAM 細胞に貪食される。本研究では、M2 型 TAM を M1 型 TAM に誘導することで TAM の ADCP 効果を増強し、抗体医薬の抗腫瘍効果を向上させられるかを検証した。
TAM の M１型への誘導には、Toll 様受容体 7/8 の低分子アゴニストである Resiquimod（R848）を使用した。R848 は TAM の M1 型再教育における有効性が示されているが、R848 の副作用を低減し生物利用率を高めるため、リポソーム製剤化による TAM 特異的デリバリーが必要と考えられた。そこで、R848 内封リポソーム（R848-LP）を用いて、TAM を M2 型から M1 型へ再教育することにより、抗体医薬の ADCP 作用を上昇させられると考えた。
三種類の抗体医薬（抗 CD20 抗体リツキシマブ、抗-EGFR 抗体クローン 528、および抗 HER2 抗体トラスツズマブ）を用いて ADCP 効果を in vitro で検討した結果、R848-LP で誘導した M1 型マクロファージが、M2 型マクロファージよりも高い ADCP 効果を持つことが判明した。ヒト大腸がん細胞株 WiDr（EGFR 高発現）を移植した担癌ヌードマウスにおいて、静脈内投与した R848-LP の体内分布を調べたところ、腫瘍内の TAM に多く取り込まれたことが確認された。さらに、R848-LP を投与した WiDr 移植モデルにおいて、抗 EGFR 抗体の ADCP 効果が増強され、腫瘍の増殖が強く抑制されることが示された。
以上の結果から、リポソームを使用した R848 の TAM への送達によって、TAM 再教育および抗体医薬の ADCP 効果増強が実現され、腫瘍治療効果が改善したと考えられた。

tumor-associated macrophage, antibody-dependent cellular phagocytosis, resiquimod

発表責任者：李昊（haoli44@sanken.osaka-u.ac.jp）

講演番号：3B09a11
講演日時：3 月 27 日 11:40～ 総合学習プラザ B09 会場

化粧品素材の生産における緑藻細胞の直接的な利用方法の構築

System construction directly using green algae cell on a production of cosmetic material

○小澤 七海[1]、崎濱 由梨[1]、中西 昭仁[1]、軽部 征夫[2] ([1]東京工科大・応生、[2]東京工科大・片柳研)
○Nanami OZAWA[1], Yuri SAKIHAMA[1], Akihito NAKANISHI[1], Isao KARUBE[2] ([1]Tokyo Univ. of Technol, [2]Tokyo Univ. of Technol, Katayanagi Ins)

【目的】

生物資源を由来とした成分の多くは、化粧品の有効成分として利用されている。特に、植物を由来とする成分は厳しい自然環境を生き抜くために生産された物質であり、その効能にあやかって、植物由来の油脂や抗酸化物質などは乾燥や紫外線から人体を保護するため、化粧品への利用が積極的になされている。また、物質生産分野では生産における脱石油を長らく掲げており、植物由来の有効成分の利用は循環型社会の構築に直接的にかかわり好ましい。ただ、これら有効成分を生産する植物の多くは陸生植物であり、植物を栽培するための広大な土地を必要とすることや、生育速度が低いこと、多細胞の組織を構成するため単細胞より代謝フローの制御が難しいことなどの問題点が挙げられる。そこで、我々は緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* を用いた化粧品有効成分の利用効率の向上を目指した。*C. reinhardtii* は植物を基盤とする代謝フローを有し油脂や抗酸化物質の生産が知られていること、水系での高密度培養が可能であること、一般的な陸生植物の 10 ~ 50 倍程度高い炭酸固定能を有し生育速度が高いこと、単細胞生物で代謝フローの制御が容易であることを利点としている。本研究では *C. reinhardtii* が生産する有効成分の効率的な利用を狙い、細胞そのものを直接的に利用することを想定しているが、そのためには細胞を死滅させる必要があり、その工程に手間と時間がかかる。そこで、*C. reinhardtii* をなるべく簡便に休止藻体状態とできれば、細胞をそのまま利用でき利用効率が上がると考えた。本研究では細胞に物理的処理を施して休止藻体状態とし、有効成分を油脂ととらえて、油脂を内包する死細胞をそのまま化粧品素材として利用できる系の開発を目的とした。

【方法】*C. reinhardtii* は光培養条件下（通気条件: 空気 0.1 vvm; 光条件: 50 μE; 培養温度: 室温（23℃）; 培地: MBBM）で培養された。培養細胞は各光条件下 (光条件 : 1000 μE; 照射時間 : 30 分・1 時間・2 時間・6 時間・30 時間; 細胞数: 1.0×10^5 cells/mL)で処理後、TAP 培地プレートに 200 cells となるように播種し、細胞の生死を判定した。また、細胞内の油脂を細胞破砕と油脂のメチルエステル化後、GC/FID で定性・定量した。

【結果・考察】各光条件下の処理後の細胞を TAP プレート培地に播種し細胞の生死判定を行った。*C. reinhardtii* の生存率は光照射前と比較し、光照射によって一定の割合で減少することが確認された。併せて、培養後の *C. reinhardtii* の細胞内油脂含有率を評価した結果、油脂含有率は 10%程度であった。今回の実験結果から、油脂を含有した細胞の新規な利用法を開拓する礎とできるのではないかと考えた。

Cosmetic materials, Green algae, Cellular stress response

講演番号：3B09a12
講演日時：3 月 27 日 11:51～ 総合学習プラザ B09 会場

微生物産生ブロック共重合体ポリマーの構造機能相関の解析

Analysis of structure-function relationship of biosynthesized block copolymer

○佐藤 圭悟[1]、影山 友基[2]、藤井 隆之輔[2]、松本 謙一郎[3]([1]北大工、[2]北大総合化学院、[3]北大院工)
○Keigo SATOH[1], Yuki KAGEYAMA[2], Ryunosuke FUJII[2], Kenichiro MATSUMOTO[3] ([1]Hokkaido Univ. eng, [2]Hokkaido Univ. Applied Chem, [3]Hokkaido Univ.)

【目的】ポリヒドロキシアルカン酸(PHA)は微生物が生産するプラスチックである。ポリマー材料の物性は、ポリマー分子量、モノマー構造に加えて、ポリマー中のモノマー配列によっても変化する。モノマー配列は、化学合成されるプラスチックでは比較的容易に制御できるが、モノマー合成と重合が細胞内で同時に進行する PHA においては、ランダム共重合体しか合成できず、モノマー配列による物性の制御は困難と考えられていた。これに対し我々は、２つのホモポリマーが共有結合したブロック PHA 共重合体[ポリ(2-ヒドロキシ酪酸(2HB)-block-3-ヒドロキシ酪酸(3HB)]]の合成に初めて成功した。2HB と 3HB のコポリマーの合成には、天然基質である 3HB-CoA に加えて非天然基質である 2HB-CoA に基質特異性を有する重合酵素が必要である。最初に見出された 2HB 重合酵素である $PhaC1_{Ps}STQK$ を用いると、ランダム共重合体が得られるのに対し、キメラ型重合酵素 $PhaC_{AR}$ を用いるとブロック共重合体が合成されることを見出した。軟質である P(2HB)セグメントと硬質である P(3HB)セグメントが接続された構造を持つ本ブロック共重合体は、既存の PHA とは異なる物性が期待できる。そこで本研究では、P(2HB-*b*-3HB)の物性の解析を行った。

【実験方法】重合酵素遺伝子およびモノマー供給のための CoA 転移酵素遺伝子を導入した組換え *E.coli* JM109 を、グルコース、2HB、3HB を含む LB 培地で 48 時間本培養を行った。得られた乾燥菌体からポリマーをクロロホルム抽出しフィルムを作製し、フィルムを伸ばした際に生じる応力を測定した。また、ポリマーの結晶化を促進するための熱処理条件の検討を行った。

【結果と考察】$PhaC1_{Ps}STQK$、$PhaC_{AR}$ をそれぞれ発現する大腸菌により、2HB/3HB を含む共重合体を合成した。NMR 分析により、ランダムおよびブロック共重合体がそれぞれ合成できたことを確認した。これらのフィルムは、2HB/3HB の比率は大きく違わないにも関わらず、ブロック共重合体のフィルムの方が、フィルムを伸ばすのに必要な応力が高い傾向が示された。また、熱処理を施した場合は伸長に必要な応力が高くなる性質が示され、期待通り結晶化を促進できた。これらの結果から、今回製作された P(2HB-*b*-3HB)は従来の PHA とは異なる物性を実現できることが示唆された。

polyhydroxyalkanoate, biodegradable plastic, biobased plastic

発表責任者：佐藤　圭悟（satoh1201@eis.hokudai.ac.jp）

講演番号：3B09a13
講演日時：3 月 27 日 12:02～ 総合学習プラザ B09 会場

新規配列制御型グリコール酸ポリマーの生合成と構造解析
Biosynthesis and structural analysis of glycolate-besed polymer
○梶川 彩香[1]、榊原 早也果[2]、荒井 修造[2]、大井 俊彦[3]、堀 千明[3]、松本 謙一郎[3]([1]北大工、[2]北大総合化学院、[3]北大院工)
○Ayaka KAJIKAWA[1], Sayaka SAKAKIBARA[2], Syuzo ARAI[2], Toshihiko OOI[3], Chiaki HORI[3], Kenichiro MATSUMOTO[3] ([1]Hokkaido Univ., [2]Applied Chem,Hokkaido Univ., [3]Eng,Hokkaido Univ.)

グリコール酸ベース・ポリヒドロキシアルカン酸（PHA）は生分解性および生体適合性が高く、環境低負荷材料および生体医療材料として期待される。当研究室の先行研究において、人工改変した重合酵素 PhaC1(STQK)を用いて非天然モノマーであるグリコリル(GL)CoA を重合できることを見出した。得られた GL と 3-ヒドロキシ酪酸（3HB）の共重合体は、PHA で一般的に見られるランダム共重合体であった。一方、最近我々は、キメラ型改変酵素 $PhaC_{AR}$ を用いることにより、2-ヒドロキシブタン酸（2HB）と 3HB のブロック共重合体を合成できることを見出した。構造が証明された PHA ブロック共重合体が生合成されたのは世界で初めてであった。そこで本研究では、$PhaC_{AR}$ を用いて GL-CoA を重合できるのか、得られたポリマーがどのような構造を持つのかを調べた。

$PhaC_{AR}$ と PhaC1(STQK)それぞれの重合酵素、および GL-CoA と 3HB-CoA 供給のための CoA 転移酵素を発現する組換え大腸菌を作成した。本菌を、グリコール酸と 3HB を含む培地で培養し、ポリマー合成を行った。両条件で同程度の GL を含むポリマーが生産されたことから、$PhaC_{AR}$ は GL 重合活性を有することがわかった。ポリマーの ^{1}H NMR 測定の結果，PhaC1(STQK)によって合成されたポリマーはランダム共重合体であったのに比べて、$PhaC_{AR}$ によって合成されたポリマーは、完全なランダム共重合体ではなく、3HB および GL が偏った領域が存在することが示唆された。このことを検証するために、示差走査熱量測定によってポリマーの融点を測定した。PhaC1(STQK)によって合成された GL ポリマーの場合は，GL 分率の上昇に伴って、ポリマー結晶成長の抑制に起因する P(3HB)由来の融点ピークの低温シフトが見られたことから、ランダム共重合体であることが確認できた。一方、$PhaC_{AR}$ によって合成された GL ポリマーの場合，GL 分率が上昇しても P(3HB)由来の融点ピークと類似したピークが観測されたことから、3HB に富む領域が存在することが支持された。以上より、$PhaC_{AR}$ は新たな GL 重合酵素であり、得られるポリマーの構造は PhaC1(STQK)を用いて得られるものとは異なっていることが示唆された。

polyhydroxy alkanoate, polyglycolic acid, biodegradable plastic

講演番号：3B09p01
講演日時：3 月 27 日 13:50～ 総合学習プラザ B09 会場

巨大植物二次代謝酵素の発見：チューリップ原種からのチューリッポシド B 変換酵素の精製および性状解析

Discovery of a giant enzyme for plant secondary metabolism: Purification and characterization of tuliposide B-converting enzyme in a wild tulip

○上田 真子[1]、野村 泰治[1,2]、北岡 直樹[1,2]、加藤 康夫[1,2]（[1]富山県大院・工、[2]富山県大・生医工研セ）
○Mako UEDA[1], Taiji NOMURA[1,2], Naoki KITAOKA[1,2], Yasuo KATO[1,2] ([1]Grad. Sch. Eng., Toyama Pref. Univ., [2]Biotechnol. Res. Cent., Toyama Pref. Univ.)

【目的】チューリップの栽培品種（*Tulipa gesneriana*）の組織中には、グルコースエステルであるチューリッポシド（Pos）類（6-PosA、6-PosB）が二次代謝産物として著量蓄積している。貯蔵物質である 6-PosA と 6-PosB は、組織中のカルボキシルエステラーゼファミリー酵素「PosA 変換酵素」および「PosB 変換酵素」によって、ヒドロキシ酸側鎖のラクトン化体である抗菌活性物質、チューリッパリン（Pa）A と PaB にそれぞれ変換される。一方、栽培品種とは同属異種である原種では、6-Pos 類に加えて栽培品種では通常みられない 1,6-ジアシル型 Pos 類（PosD、PosF）が比較的高濃度で存在していることから、原種の Pos 変換酵素は、基質特異性を含めた諸性質が栽培品種のものとは異なる可能性が想定された。そこで本研究では、原種から Pos 変換酵素を精製し、栽培品種由来の酵素との性状比較を行うことを目的とした。

【方法と結果】チューリップ原種「トルケスタニカ（*T. turkestanica*）」の葉の粗酵素における Pos 変換酵素活性を測定したところ、PosA 変換酵素活性と比べて 5 倍程度高い PosB 変換酵素活性が検出されたことから、PosB 変換酵素の精製を試みた。生育初期の葉（100 g FW）から粗酵素を抽出後、硫安分画を含む 5 段階の精製過程を経て、同酵素を均一に精製した。精製酵素の 6-PosB に対する比活性は、栽培品種由来酵素の比活性の 1/10 程度と大きく異なることが分かった。各種 Pos 類に対する反応速度論解析の結果、本酵素は 6-PosA よりも 6-PosB を良い基質とすることが確認された。一方、本酵素はモノアシル型 Pos 類である 6-Pos 類よりも 1,6-ジアシル型 Pos 類に対して高い活性を示し、その際、6-PosA と同じ 6 位アシル基をもつ PosD よりも、6-PosB と同じ 6 位アシル基をもつ PosF をより良い基質とした。さらに、本酵素は Pos 類の 6 位アシル基に特異的に作用した。以上の結果から、本酵素は基質 Pos 類の構造中、6 位アシル基の構造を識別し、作用していることが示された。

精製酵素の subunit 分子質量（52 kDa）は栽培品種由来の酵素よりも 7 kDa 程度大きかったが、栽培品種由来酵素と同様に、分子中には糖鎖は含まれていなかった。一方、ゲルろ過によって測定した本酵素の native 分子質量は 2,000 kDa 以上であった。このことから、原種の PosB 変換酵素は 40 量体以上の構造を有する巨大酵素であり、2 量体酵素である栽培品種由来の酵素（約 100 kDa）とは大きく異なることが明らかとなった。これは、植物二次代謝酵素としてはこれまでで最大のものである。

giant enzyme, secondary metabolism, tuliposide-converting enzyme

発表責任者：加藤康夫（ykato@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：3B09p02
講演日時：3 月 27 日 14:01～ 総合学習プラザ B09 会場

チューリップ原種からのチューリッポシド A 変換酵素の精製および性状解析
Purification and characterization of tuliposide A-converting enzyme in a wild tulip
○野村 泰治[1,2]、上田 真子[1]、北岡 直樹[1,2]、加藤 康夫[1,2] ([1]富山県大院・工、[2]富山県大・生医工研セ)
○Taiji NOMURA[1,2], Mako UEDA[1], Naoki KITAOKA[1,2], Yasuo KATO[1,2] ([1]Grad. Sch. Eng., Toyama Pref. Univ., [2]Biotechnol. Res. Cent., Toyama Pref. Univ.)

【目的】チューリップの栽培品種（*Tulipa gesneriana*）の組織中には、グルコースエステルであるチューリッポシド（Pos）類（6-PosA、6-PosB）が二次代謝産物として著量蓄積している。貯蔵物質である 6-PosA と 6-PosB は、組織中のカルボキシルエステラーゼファミリー酵素「PosA 変換酵素」および「PosB 変換酵素」によって、ヒドロキシ酸側鎖のラクトン化体である抗菌活性物質、チューリッパリン（Pa）A と PaB にそれぞれ変換される。一方、栽培品種とは同属異種である原種では、6-Pos 類に加えて栽培品種では通常みられない 1,6-ジアシル型 Pos 類（PosD、PosF）が比較的高濃度で存在していることから、原種の Pos 変換酵素は、基質特異性を含めた諸性質が栽培品種のものとは異なる可能性が想定された。原種「トルケスタニカ（*T. turkestanica*）」の葉では、PosA 変換酵素活性に比べて PosB 変換酵素活性が有意に高いことから、まず PosB 変換酵素を精製し性状解析を行ったところ、同酵素の比活性および分子質量は栽培品種由来の PosB 変換酵素とは大きく異なっており、特に native 分子質量は、栽培品種由来の酵素が 45 kDa の subunit からなる 2 量体酵素であるのに対して、原種由来の酵素は、52 kDa の subunit からなる 40 量体以上の巨大分子であることが判明した。このことから、PosA 変換酵素についても、原種由来の酵素は栽培品種由来の酵素とは異なる性状を有する可能性が示唆されたため、本研究では、原種からの PosA 変換酵素の精製と性状解析を行うことを目的とした。
【方法と結果】チューリップ原種「トルケスタニカ」の生育初期の葉（100 g FW）から粗酵素を抽出後、硫安分画を含む 6 段階の精製過程を経て、同酵素を均一に精製した。精製酵素の 6-PosA に対する比活性は、栽培品種由来酵素の比活性の 1/10～1/20 程度であり、これは原種および栽培品種由来の PosB 変換酵素間でみられた傾向と一致するものであった。また、反応速度論解析の結果、本酵素は 6-PosB よりも 6-PosA を良い基質とすることが確認されたが、6-PosA よりも PosD、6-PosB よりも PosF というように、原種由来の PosB 変換酵素と同じく、モノアシル型 Pos 類よりも 1,6-ジアシル型 Pos 類をより良い基質とし、なおかつ Pos 類の 6 位アシル基に特異的に作用することが示された。

精製酵素は 35 kDa の subunit からなる 2 量体酵素（82 kDa）であり、これは栽培品種由来の PosA 変換酵素と同様であった。したがって、原種由来の PosB 変換酵素が巨大分子であることは、同酵素特有の性質であることが判明した。今回精製した PosA 変換酵素ならびに先に精製した PosB 変換酵素の部分アミノ酸配列の結果、原種の Pos 変換酵素はいずれも栽培品種の酵素と同様に、カルボキシルエステラーゼファミリーに属する酵素であることが強く示唆された。

tulipalin, tuliposide, tuliposide-converting enzyme

発表責任者：野村泰治（tnomura@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：3B09p03
講演日時：3 月 27 日 14:12～ 総合学習プラザ B09 会場

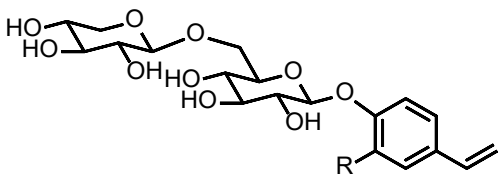
Bacillus amyloliquefaciens 由来 phenolic acid decarboxylase を発現したタケ培養細胞によるスチレン誘導体の生産

Production of styrene derivatives in the bamboo cells expressing phenolic acid decarboxylase from *Bacillus amyloliquefaciens*

○北岡 直樹[1,2]、早田 朋代[2]、野村 泰治[1,2]、荻田 信二郎[3]、加藤 康夫[1,2] ([1]富山県大・生医工研セ、[2]富山県大・生物工、[3]県立広島大・生命科学)
○Naoki Kitaoka[1,2], Tomoyo Hayata[2], Taiji Nomura[1,2], Shinjiro Ogita[3], Yasuo Kato[1,2] ([1]Biotechnol. Res. Cent., Toyama Pref. Univ., [2]Dep. Biotechnol., Toyama Pref. Univ., [3]Dep. Life Sci., Pref. Univ. Hiroshima)

【目的】当研究室では、活発な代謝経路上の化合物を基質とする外来の酵素遺伝子を植物培養細胞に導入することで代謝経路を改変する「合理的代謝フロースイッチング」[1)]を用い、植物培養細胞を宿主とした有用物質生産系の確立を進めている。これまで、当研究室で樹立したタケ・ササ類の培養細胞のうち、特にフェニルプロパノイド代謝系が活発なハチク（*Phyllostachys nigra*; Pn）培養細胞にオオムギ由来の *agmatine coumaroyltransferase* を導入することで、同酵素の反応生成物である *p*-coumaroylagmatine が高蓄積することを明らかにしている[1)]。また、*Pseudomomas putida* KT2440 由来の *hydroxycinnamoyl-CoA hydratase/lyase* を導入することで、同酵素の反応生成物である 4-hydroxybenzaldehyde と vanillin がそれぞれ酸化された 4-hydroxybenzoic acid および vanillic acid の glucose 結合体が高蓄積するという結果を得ている[2)]。本研究では、Pn 培養細胞を宿主とした合理的代謝フロースイッチングによる有用物質生産系のさらなる拡充を目指し、ポリマー原料としての利用が見込まれるスチレン誘導体の生産を試みた。

【方法と結果】フェニルプロパノイド化合物である *p*-coumaric acid および ferulic acid を基質とし、それぞれ 4-vinylphenol (4VP)と 4-vinylguaiacol (4VG)への変換を触媒する酵素遺伝子である *Bacillus amyloliquefaciens* 由来の *phenolic acid decarboxylase* (*BaPAD*)を導入した組換え Pn 培養細胞をパーティクルボンバードメント法により作出した。*BaPAD* 導入株における代謝物を解析した結果、野生株にはみられない 2 種類の化合物が確認された。*BaPAD* 導入株の懸濁培養細胞のメタノール抽出物を、ODS ならびにシリカゲルカラムクロマトグラフィー、次いで逆相系分取 HPLC に供し、両化合物を精製した。各種分光学的手法による構造解析から、それらの化学構造を 4VP primeveroside (別名 ptelatoside A[3)])と 4VG primeveroside と決定した。*BaPAD* 導入株を細胞増殖が活発な増殖条件とリグニン生合成が誘導される木化条件でそれぞれ懸濁培養したところ、4VP primeveroside および 4VG primeveroside の培地 1 L 当たりの生産量は増殖条件で高く、最大でそれぞれ 45 mg/L および 84 mg/L であった。以上の結果より、Pn 培養細胞を宿主とした合理的代謝フロースイッチングによるスチレン誘導体の生産が可能であることが明らかになった。



1) Nomura et al. (2018) *Sci. Rep.*, 8, 13203. 2) Kitaoka et al. (2019) submitted. 3) Ojika et al. (1984) *Chem. Lett.*, 13, 397.

bamboo cell, metabolic engineering, styrene derivatives

発表責任者：北岡　直樹（kitaoka@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：3B09p04
講演日時：3 月 27 日 14:23～ 総合学習プラザ B09 会場

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の投与による植物培養細胞の潜在的二次代謝能の発掘：タケ細胞における誘導性化合物の同定および生合成酵素の探索

Identification of a secondary metabolite induced by histone deacetylase inhibitor and detection of its biosynthetic enzyme activity in bamboo suspension cells

○米田 朱里[1]、野村 泰治[1,2]、北岡 直樹[1,2]、荻田 信二郎[3]、加藤 康夫[1,2]（[1]富山県大院・工、[2]富山県大・生医工研セ、[3]県立広島大・生命科学）

○Akari YONEDA[1], Taiji NOMURA[1,2], Naoki KITAOKA[1,2], Shinjiro OGITA[3], Yasuo KATO[1,2] ([1]Grad. Sch. Eng., Toyama Pref. Univ., [2]Biotechnol. Res. Cent., Toyama Pref. Univ., [3]Dep. Life Sci., Pref. Univ. Hiroshima)

【目的】「合理的代謝フロースイッチング」は、植物培養細胞において活発な二次代謝経路から派生する新たな生合成経路を遺伝子組換えにより導入することで、外来の有用物質の効率的な生産を行う手法である[1)]。当研究室では、独自に樹立したタケ・ササ類の培養細胞に同手法を適用し、様々な有用物質生産系の確立を進めている。このような背景に基づき、タケ・ササ類の培養細胞が潜在的にもつ二次代謝能を発掘することを目的として、転写調節剤の投与によって誘導生産される二次代謝産物の探索を進めた結果、ホウライチク (*Bambusa multiplex*; Bm) 懸濁培養細胞に、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤である suberoyl *bis*-hydroxamic acid (SBHA) を投与した際に、顕著に誘導生産される化合物 **1** および **2** を見いだした。本研究では、両化合物の高蓄積培養条件の確立、ならびに単離、構造決定を行った上で、当該化合物の生合成酵素の探索を行うことを目的とした。

【方法と結果】化合物 **1**、**2** の蓄積レベルに SBHA 投与濃度、培養開始時の細胞量、および培養期間が及ぼす影響を検討した。その結果、20 μM SBHA、3% sucrose を含む 1/2MS 培地に、沈降細胞量が 5%となるように細胞を移植後、30 日間振とう培養することで両化合物が高蓄積することを見いだした。同条件下で培養した Bm 懸濁細胞 (200 g FW) の MeOH 抽出物を、ODS カラムクロマトグラフィーおよび逆相系分取 HPLC に供し、SBHA 誘導性化合物 **1** を 54 mg、化合物 **2** を 157 mg 単離した。各種分光学的手法による構造解析から、化合物 **1** および **2** の構造を、それぞれ 3-*O*-*p*-coumaroylquinic acid および 3-*O*-feruloylquinic acid と決定した。このことから、Bm 細胞は、「合理的代謝フロースイッチング」による外来フェニルプロパノイド系化合物の生産宿主として有望であり、なおかつ SBHA の有無による生合成のオン/オフ調節を利用したユニークな物質生産系を構築できるものと期待される。

両ヒドロキシ桂皮酸キナ酸エステルの合成酵素の同定を目指し、feruloyl-CoA とキナ酸を基質として主要化合物である 3-*O*-feruloylquinic acid を生成する酵素活性の探索ならびに抽出・反応条件の最適化を行った。その結果、SBHA を投与した Bm 細胞の粗酵素中に有意レベルの当該酵素活性が検出された。その際、生成物の位置異性体である 4-および 5-*O*-feruloylquinic acid は生成しなかったことから、本酵素はキナ酸の 3 位ヒドロキシ基とヒドロキシ桂皮酸 CoA との縮合を特異的に触媒する酵素であることが示唆された。

1) Nomura et al. (2018) *Sci. Rep.*, 8, 13203

bamboo cell, histone deacetylase inhibitor, hydroxycinnamoylquinic acid

発表責任者：加藤康夫（ykato@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：3B09p05
講演日時：3 月 27 日 14:34～ 総合学習プラザ B09 会場

オオムギのフェニルアミドファイトアレキシン
Barley phenylamide phytoalexin

○宇部 尚樹[1]、藪田 行哲[2]、塔野岡 卓司[3]、上野 琴巳[2]、武田 真[4]、石原 亨[2]([1]鳥取連大・農、[2]鳥取大・農、[3]農研機構、[4]岡山大・植物研)
○ Naoki UBE[1], Yukinori Yabuta[2], Takuji Tohnooka[3], Kotomi Ueno[2], Shin Taketa[4], Atsushi Ishihara[2] ([1]UGSAS, Tottori univ., [2]Fac. Agric Sci., Tottori univ., [3]NARO, [4]IPSR, Okayama Univ.)

植物は病原菌に対して二次代謝産物を介した防御機構を発現する。このような防御機構の一つが誘導性抗菌性物質ファイトアレキシンの蓄積である。しかし、オオムギは重要穀物であるにもかかわらず、二次代謝産物を介した誘導性の防御機構はあまりわかっていない。本研究では、オオムギの根に病原菌を接種し誘導される二次代謝産物を調べ、ファイトアレキシンを同定することを目指した。

オオムギ幼苗の根に *Fusarium culmorum* を接種すると、化合物 **1**、**2** および **3** が増加した。LC-MS 分析の結果から、**1** および **2** は、コムギでファイトアレキシンとして知られる *N*-cinnamoyl-9-hydorxy-8-oxotryptmaine と *N*-cinnamoyl-8-oxotryptamine であることがわかった。化合物 **3** は未同定の化合物であったため、カラムクロマトグラフィーおよび分取 HPLC により精製した。各種機器分析を行い、**3** を新規の桂皮酸アミド *N*-cinnamoyl-3-(aminomethyl)indole と同定した。これらの物質は、コムギやオオムギなどコムギ連（Triticaeae）の種から見いだされたため triticamides A–C と名付けた。

化合物 **1**、**2** および **3** は、いずれも桂皮酸とトリプタミン類縁体からなる桂皮酸アミドであった。イネでは、tryptamine hydroxycinnamoyltransferase（THT）が tryptamine を構成要素とする桂皮酸アミドの合成酵素として報告されている。そこで、化合物 **1**、**2** および **3** の生合成遺伝子を特定するために、オオムギのゲノム配列情報を検索したところ、9 つの *THT* 相同遺伝子（*HvTHT1- HvTHT9*）がみつかった。その中で、病原菌を接種したオオムギの葉や根では、*HvTHT7* および *HvTHT8* 遺伝子の転写産物が増加することがわかった。

HvTHT 7 および 8 を大腸菌を用いて異種発現を行い性状を解析した。HvTHT7 と 8 はアシル供与体として cinnamoyl-CoA と feruloyl-CoA を、アシル受容体として tryptamine を好むことがわかった。8-Oxotryptamine および 3-(aminomethyl)indole も基質としたことから、HvTHT7 および HvTHT8 は化合物 **1**–**3** の生合成に関わることが強く示唆された。

1 および **2** は病原菌に対する抗菌活性を有する。そこで、**3** の抗菌活性を調べた。**3** も *F. culmorum*、*F. graminearum*、*Bipolaris sorokiniana* の胞子発芽や発芽管の伸長を阻害した。したがって、**1** と **2** に加え、**3** も誘導性の抗菌性物質であったことから、これらの物質がオオムギのファイトアレキシンであると結論した。

Barley, Phytoalexin, Phenylamides

講演番号：3B09p06
講演日時：3 月 27 日 14:45～ 総合学習プラザ B09 会場

輸送工学を利用した効率的なイソキノリンアルカロイド生産

Efficient production of isoquinoline alkaloid using transport engineering

○山田 泰之[1]、潤井 みや[1]、松井 治幸[1]、井上 開[1]、大木 秀浩[1]、南 博道[2]、佐藤 文彦[3,4]、士反 伸和[1] ([1]神戸薬大、[2]石川県大、[3]京大院生命、[4]阪府大院理)

○Yasuyuki Yamada[1], Miya Urui[1], Haruyuki Matsui[1], Kai Inoue[1], Hidehiro Oki[1], Hiromichi Minami[2], Fumihiko Sato[3,4], Nobukazu Shitan[1] ([1]Kobe Pharmaceutical Univ., [2]Ishikawa Prefecture Univ., [3]Kyoto Univ., [4]Osaka Prefecture Univ.)

【目的】

植物が生産する二次代謝産物の多くは医薬品原料として有用であり、その安定供給系の確立が急務の課題となってきている。近年、植物二次代謝産物の生合成経路を解明し、微生物においてそれらを再構築させる、生合成工学（合成生物学）が急速に発展してきており、すでに有用医薬品の原料となるいくつかの化合物について、大腸菌や酵母での生産が可能となっている。

一方で、生合成工学による有用物質生産の際、化合物の生物活性（毒性）により生産効率の低下が引き起こされる事例が報告されている。そこで我々は、生産物を液胞や細胞外へと隔離・排出する植物細胞の輸送機構に着目し、有用物質の生産が可能な微生物に輸送機能を付与し、より効率的な物質生産の可能性を検証した。本研究では、モルヒネやベルベリンなど多様な活性を有するイソキノリンアルカロイド（IQA）の重要中間体であるレチクリンやスチロピンを生産する大腸菌やメタノール資化性（ピキア）酵母に（Nakagawa et al., 2011; Hori et al., 2016; Matsumura et al., 2018)、アルカロイド輸送体を導入・発現させ、その生産効率の向上を検証した。

【方法・結果】

①大腸菌においてベルベリン等の IQA 輸送能が報告されている AtDTX1（シロイヌナズナ由来の生体異物排出輸送体）の発現ベクターを、レチクリン生産性大腸菌（AN2104 株）に導入し、その生産性を検証した。IPTG 添加による AtDTX1 の発現誘導の結果、レチクリンの菌体内蓄積量、および培地中への排出量がともに、コントロール株に比べて 3～5 倍程度上昇し、生産効率の向上を認めた。また、AtDTX1 が大腸菌において、実際にレチクリンの排出に関与することを輸送解析から明らかとし、現在、AtDTX1 や他の生合成酵素の発現解析などから生産効率向上の機構解明を進めている。

②IQA 輸送能が報告されている CjMATE1（オウレン由来のベルベリン輸送体）や NtJAT1（タバコ由来のニコチン輸送体）を、スチロピン生産性ピキア酵母（B52 株）に導入し、その生産性を検証した。NtJAT1 導入株について、メタノール投与により NtJAT1 タンパク質の発現が誘導されていることをウェスタンブロッティングにより確認した。さらに、基質であるレチクリンを培地中に添加し、スチロピン生産量を解析した結果、コントロール株と比べて NtJAT1 導入株におけるスチロピンの菌体内蓄積量、および培地中への排出量が有意に上昇していた。現在、輸送体導入によるスチロピン生産性の変化をより詳細に解析するために、培地組成や培養条件の検討を進めている。

microbial production, transport engineering, isoquinoline alkaloid

発表責任者：山田泰之（yyamada@kobepharma-u.ac.jp）

講演番号：3B09p07
講演日時：3 月 27 日 15:06～ 総合学習プラザ B09 会場

原種コーヒーから単離したカフェイン生合成系酵素遺伝子の機能解析と基質特異性決定部位の探索
Functional characterization of caffeine synthase genes from wild coffee, and search for residues determining enzymatic substrate specificity.
○國久 葉月[1]、岩根 利奈[1]、井田 美帆[1]、高木 駿[1]、倉田 陸朗[1]、Valerie Poncet[2]、Alexandre de Kochko[2]、水野 幸一[1]（[1]秋田県大生物資源、[2]IRD-Montpellier DIADE）
○Hazuki KUNIHISA[1], Rina IWANE[1], Miho IDA[1], Hayao TAKAGI[1], Rikuro KURATA[1], Poncet Valerie[2], de Kochko Alexandre[2], Kouichi MIZUNO[1] ([1]Akita Prefectural Univ., [2]IRD-Montpellier DIADE)

［背景・目的］主要３品種を含む *Coffea* 属原種はそれぞれカフェイン含量が異なる。それらのカフェイン生合成系酵素群を調べることで、*Coffea* 属の中でどのようにしてカフェイン合成能が獲得され発展してきたのか、その分子進化を探る。今回は、カフェイン含量が主要３品種と同程度である *C. humilis* のカフェイン生合成系酵素遺伝子を単離し機能解析を進めた。さらにカフェイン含量がきわめて低い *C. pseudozanguebariae* から単離した、これまでに知られているテオブロミンシンターゼとは分子系統の異なる新奇テオブロミンシンターゼ Cps-TS1 の基質特異性に関わる部位を探索したので報告する。
［方法］*C. humilis* の若葉より全 RNA を抽出し、その一部から cDNA を合成した。これを鋳型とし、*C. arabica* のカフェイン生合成関連酵素の配列情報と機能解析の結果をもとに設計したプライマーを用い、PCR にてそれら遺伝子の単離を試みた。単離した遺伝子の配列を *C. arabica* 由来の既知遺伝子と比較し分類した。一方、Cps-TS1 に部位特異的変異を導入するためのプライマーを設計し、野生型を鋳型として PCR を行い、変異型 Cps-TS1 を得た。これらについて大腸菌を用いた発現系を構築し、組換え型酵素を得た。これらに対して、カフェイン前駆体である種々のキサンチン誘導体またはニコチン酸を基質として反応させ、TLC にて生成物を検出し活性を調べた。
［結果・考察］*C. humilis* から単離した５種の遺伝子（*Chu-tmXRS1*、*Chu-tmXRS2*、*Chu-tmXRS3*、*Chu-tTgS1* および *Chu-tTgS2*）の組換え型酵素の生産を試み、活性を調べたところ、Chu-tmXRS3 は今回用いた基質で活性が見られなかったものの、その他は *C. arabica* の相当する酵素と同様の活性を有することを確認した。一方 Cps-TS1 は、7-methylxanthine (7mX) の 3*N* および Theobromine の 1*N* メチル化を担う CCS1 と非常に高いアミノ酸配列の相同性を示すものの、1*N* メチル化活性を持たないことから、より詳細な機能解析を行った。まず 7mX に対する至適条件を調べたところ、pH7.8、25℃が至適であった。つぎに Cps-TS1 と *C. racemosa* から単離した同系統のテオブロミンシンターゼ Cra-TS2、*C. arabica* のカフェイン・テオブロミンシンターゼ CCS1 および CTS1 とのアミノ酸配列の比較より、1*N* メチル化活性へ関与が疑われるアミノ酸残基を推定し、それらを置換した Cps-TS1 の変異型酵素３種（L328V、V332I および L328VV332I）を作製し活性試験を行った。その結果、野生型 Cps-TS1 と同様 1*N* メチル化活性は見られなかったものの、L328V および L328VV332I は Paraxanthine に対する 3*N* メチル化活性が著しく低下することを見いだした。以上より、Cps-TS1 の L328 は 3*N* メチル化活性の基質特異性に関与することが示唆された。現在、新たな変異型酵素の作製と機能解析を進めている。

coffee, caffeine, methyltransferase

発表責任者：水野幸一（koumno@akita-pu.ac.jp）

講演番号：3B09p08
講演日時：3 月 27 日 15:17～ 総合学習プラザ B09 会場

ゼニゴケの菌型テルペン合成酵素は油体細胞特異的に発現し油体へのセスキテルペン集積を担う
Fungal type terpene synthase in *Marchantia polymorpha* is involved in specific accumulation of sesquiterpenes in oil bodies

滝澤 遼典[1]、畑田 珠希[1]、森脇 祐太[1]、阿部 祥香[1]、山下 優子[1]、肥塚 崇男[1]、大和 勝幸[2]、西浜 竜一[3]、フェン チェン[4]、河内 孝之[3]、○松井 健二[1]([1]山口大農、[2]近畿大生物理工、[3]京都大生命科学、[4]テネシー大農)
Ryousuke Takizawa[1], Maki Hatada[1], Yuhta Moriwaki[1], Sachika Abe[1], Yuhko Yamashita[1], Takao Koeduka[1], Katsuyuki Yamato[2], Ryuichi Nishihama[3], Cheng Feng[4], Takayuki Kohchi[3], ○Kenji Matsui[1] ([1]Yamaguchi Univ., [2]Kindai Univ., [3]Kyoto Univ., [4]Univ. Tennessee)

【目的】苔類は進化の過程で最初に陸上化した植物に近縁の現生陸上植物群で、初期の陸上植物化学防御機構の名残を有していると考えられ、陸域生態系における適応機構の解明に適した研究対象である。ゼニゴケ亜綱に属する苔類の葉状体には油体と呼ばれる細胞小器官を有する油体細胞が散在する。この油体内には、抗菌活性、植食者忌避活性をもつセスキテルペン類やビスビベンジル類が局在している。こうした特定部位への防衛関連物質の集積は陸域生態系適応に寄与したと考えられるが、油体細胞の発生機構や油体細胞特異的化学防御物質集積機構はまだ解明されていない。そこで、本研究ではゼニゴケ（*Marchantia polymorpha*）油体へのセスキテルペン集積を担うテルペン合成酵素（TPS）の同定を進めた。
【方法・結果】ゼニゴケゲノムには少なくとも 36 個の TPS 遺伝子が存在し、そのうち 4 個は被子植物 TPS と相同性を有するジテルペン合成酵素で、残り 32 個は非維管束植物に特有の構造をもつ TPS で細菌や菌からの水平伝播によって獲得されたと考えられる[1)]。その中で 8 個は菌類 TPS 様構造をもち、そのうち少なくとも 2 個はセスキテルペン合成酵素をコードしていると考えられる。油体内部にセスキテルペンが特異的に集積している[2)]ので本研究ではこれら菌類 TPS 様遺伝子（FTPSL）に着目して検討を進めた。まず、ゼニゴケ FTPSL2 のプロモーターを蛍光タンパク質に結合してゼニゴケに導入すると蛍光タンパク質が油体細胞特異的に観察された。また、ゼニゴケ葉状体を寒天培地からバーミキュライトに移植すると油体が肥大し、セスキテルペン量が高くなるが、そうした変化と相関して FTPSL2 遺伝子の発現量が高まることが明らかとなった。更に干渉 RNA 法により FTPSL2 遺伝子の発現を抑制するとゼニゴケ葉状体のセスキテルペン量が低下することが明らかとなった。こうした結果からゼニゴケ FTPSL2 は油体細胞特異的に発現することで油体への特異的なセスキテルペン集積に寄与していることが明らかとなった。

1) Kumar et al. (2016) *Plant Cell*, **28**, 2632-2650.
2) Tanaka et al. (2016) *Phytochemistry*, **130**, 77-84.

Marchantia polymorpha, terpene synthase, oil body

発表責任者：松井健二（matsui@yamaguchi-u.ac.jp）

講演番号：3B09p09
講演日時：3 月 27 日 15:28～ 総合学習プラザ B09 会場

オーロンを経由するゼニゴケの新規赤色色素生合成経路

A novel biosynthesis pathway of red pigments via aurone in *Marchantia polymorpha*.

○押切 春佳[1]、松下 紋子[2]、渡辺 文太[3]、久保 浩義[1,2]、高梨 功次郎[1,2] ([1]信州大・総合理工、[2]信州大・理、[3]京大・化研)
○ Haruka Oshikiri[1], Ayako Matsushita[2], Bunta Watanabe[3], Hiroyoshi Kubo[1,2], Kojiro Takanashi[1,2] ([1]Grad. Sch. Sci. & Tech., Shinshu Univ., [2]Fac. Sci., Shinshu Univ., [3]ICR, Kyoto Univ.)

【目的】

オーロンはキンギョソウやコスモスにおいて生産される黄色を呈するフラボノイドである。オーロンの生産はゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*) においても報告されており、植物の陸上進出に当たり重要な役割を担うことが示唆されている。高等植物においては、Polyphenol oxidase (PPO) ファミリーに属する Aurone synthase (AUS) がカルコンの酸化的閉環反応を触媒することでオーロンを生合成するが、ゼニゴケにおける生合成経路は未だ解明されていない。さらに、ゼニゴケは Riccionidin A と呼ばれる四環構造の赤色色素を生産する。この構造はオーロンと類似しており、Riccionidin A 生産条件では複数の *PPO* が高発現することが報告されている。本研究では、ゼニゴケにおいて Riccionidin A はオーロンを経由して生合成されると推測し、ゼニゴケのオーロン生合成および Riccionidin A 生合成の全容解明を目的とした。

【結果】

先行研究において Riccionidin A を高蓄積する *MpMYB14* 過剰発現体が作出されている (Kubo et al., 2018)。*MpMYB14* 過剰発現体のフラボノイド含量を野生株と比較したところ、フラボンや Riccionidin A に加えて Aureusidin およびそれらの配糖体と推測される化合物が高蓄積していた。さらに、*MpMYB14* 過剰発現体を用いた粗酵素アッセイを行ったところ、2’,4,4’,6’-Tetrahydroxychalcone (THC) および 2’,3,4,4’,6’-Pentahydroxychalcone (PHC) を Aureusidin に変換する活性を検出した。THC および PHC から生合成された Aureusidin は反応時間に伴い減少し、それに合わせて新規に Riccionidin A が生成された。このことから Riccionidin A は THC および PHC、Aureusidin を介して生合成されることが推測された。現在、Aureusidin および Riccionidin A 生合成酵素の基質特異性などの諸特性について解析を進めており、これらの結果も併せて報告する。

Riccionidin A, *Marchantia polymorpha*, Aurone

発表責任者：高梨　功次郎（takanashi@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3B09p10
講演日時：3 月 27 日 15:39～ 総合学習プラザ B09 会場

蘚類ハイゴケの染色体上でクラスター化しているモミラクトン生合成遺伝子群の機能解析
Functional characterizations of the momilactone biosynthetic genes clustered in the chromosome of the moss *Hypnum plumaeforme*

○樋口 俊哉[1]、照屋 美優[1]、藤原 薫[1]、宮本 皓司[2]、山根 久和[2,3]、林 謙一郎[4]、川出 洋[5]、Longjiang Fan[6]、野尻 秀昭[1]、岡田 憲典[1] ([1]東大・生物工学セ、[2]帝京大・バイオ、[3]帝京大先端機器分析センター、[4]岡山理科大・理、[5]東京農工大学院・農、[6]中国・浙江大学)
○ Toshiya HIGUCHI[1], Miyu TERUYA[1], Kaoru FUJIWARA[1], Koji MIYAMOTO[2], Hisakazu YAMANE[2,3], Ken-ichiro HAYASHI[4], Hiroshi KAWAIDE[5], Fan Longjiang[6], Hideaki NOJIRI[1], Kazunori OKADA[1] ([1]Biotech. Res. Center, Univ. of Tokyo., [2]Dep. of Biosci., Teikyo Univ., [3]Advanced Instrumental Analysis Center of Teikyo Univ., [4]Dep. Biochem., Okayama Univ. Sci., [5]Grad. Agric., Tokyo Univ. Agric. Technol., [6]Zhejiang Univ.)

【背景】
イネ（*Oryza sativa*）のもみから単離されたモミラクトン A 及び B は抗菌活性や近傍の植物の生育を阻害するアレロパシー活性を有するジテルペン型の二次代謝産物である。イネに加え水田雑草イヌビエ、さらには下等植物である蘚類ハイゴケ（*Hypnum plumaeforme*）からもその産生が確認されている。イネやイヌビエにおいてモミラクトン生合成に関与する酵素遺伝子群は、染色体上の近接した位置にまとまって座乗し、クラスターの構造を成している。ハイゴケにおけるモミラクトン生合成酵素については、モミラクトン A 前駆体の酸化を触媒する HpMAS や、geranylgeranyl diphosphate（GGDP）の二段階環化反応を触媒する HpDTC1 を同定した。さらに、ゲノムシーケンス解析によって両酵素遺伝子と二つの P450 酵素遺伝子（*HpCYP1*, *HpCYP2*）が座乗する Scaffold が得られ、ハイゴケにも他のモミラクトン生産植物同様に生合成遺伝子クラスターが存在する可能性があるという興味深い結果が見出された。

【目的】
これまでに、ハイゴケ P450 酵素についてメタノール資化性酵母を用いて酸化活性を示してきた。本研究では、両酵素の連続した反応による中間代謝産物の同定およびモミラクトンの異種植物生産を目指し、複数の遺伝子を簡便に導入可能なベンサミアナタバコ（*Nicotiana benthamiana*）を用いた異種発現系の構築を進めた。

【方法および結果】
まず、HpDTC1 を Agroinfiltration することにより、ベンサミアナ内生の GGDP より P450 酵素の基質候補となる *syn*-pimaradiene の産生を GC-MS 分析により確認した。次に、*syn*-pimaradien-19-oic acid (PA) の合成活性を有することが報告されているイネ OsCYP99A3 を共導入し、PA の産生を確認した。また、ハイゴケ P450 酵素についても酸化物の解析を進めたところ、HpCYP2 については先行研究で示された *syn*-pimaradien-3-ol のマススペクトルと類似したピークを示す産物が得られた。現在、反応段階に伴うタンパク量や基質量の減少等を考慮し、より高収量の生成物を得るべく GGDP 生合成経路上流の律速酵素遺伝子の共導入や、異種シトクロム P450 レダクターゼの共導入による基質量の増産、反応の効率化を進めている。本大会ではそれらの進捗に加え HpCYP1 及び HpCYP2 の共導入による生成物の分析結果についても報告する。

Phytoalexin, Cluster, P450

発表責任者：樋口　俊哉（higuchi-toshiya@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3B09p11
講演日時：3 月 27 日 15:50～ 総合学習プラザ B09 会場

野生イネのストレス誘導性シトクロム P450 の機能解析
Functional characterization of stress inducible P450-like genes in the cluster region of *Oryza brachyantha*

○佐藤 遼平[1]、冨山 詩歩[1]、川出 洋[2]、豊増 知伸[3]、宮本 皓司[4]、野尻 秀昭[1]、岡田 憲典[1]([1]東京大学・生物生産工学研究センター、[2]東京農工大学・農学研究院、[3]山形大学・農学部、[4]帝京大学・理工学部)
○Ryohei Sato[1], Shiho Tomiyama[1], Hiroshi Kawaide[2], Tomonobu Toyomasu[3], Koji Miyamoto[4], Hideaki Nojiri[1], Kazunori Okada[1] ([1]Biotech. Res. Center, the Univ. of Tokyo, [2]Grad. Agric., Tokyo Univ. Agric. Technol., [3]Fac. Agric., Yamagata Univ., [4]Dept. of Biosci., Teikyo Univ.)

【背景と目的】 栽培イネ *Oryza sativa* は、病原菌感染等のストレスに応答して、抗菌性二次代謝産物であるファイトアレキシンを合成する。主要なジテルペン型ファイトアレキシンとしては、ファイトカサン類、モミラクトン類があり、それらの生合成遺伝子は染色体上で遺伝子クラスターを形成していることをこれまでに報告した[1)]。また、栽培イネの祖先種を含む野生イネにおいても、ジテルペン型ファイトアレキシンの誘導的な生産が認められるが、栽培イネから進化的に距離のある野生イネ *O. brachyantha* では、ファイトカサン類、モミラクトン類の生合成は見られない。*O. brachyantha* における栽培イネのクラスター領域を見てみると、その領域には栽培イネのファイトカサン類、モミラクトン類の生合成遺伝子のホモログと考えられるシトクロム P450 遺伝子が 2 番染色体上に 4 つ (*ObCYP76M6-a, ObCYP76M6-b, ObCYP76M6-c, ObCYP76M6-d*)、4 番染色体上に 2 つ (*ObCYP99A2/3-a, ObCYP99A2/3-b*) 存在しているが、栽培イネの遺伝子クラスターに含まれるジテルペン環化酵素や脱水素酵素の遺伝子は近傍には存在しない[2)]。また、栽培イネクラスター上の生合成遺伝子は、塩化銅処理などのストレスを与えると協調的に発現誘導を受けることが明らかとなっているが、興味深いことに、*O. brachyantha* の 6 つのシトクロム P450 遺伝子についても、塩化銅処理時に協調的に発現が誘導されることがわかった。そこで本研究では、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を宿主とした異種発現系を利用し、これらシトクロム P450 の酵素機能解析を行うことを目的とした。
【方法と結果】まず、機能解析の対象遺伝子として、*O. brachyantha* 各染色体より *ObCYP99A2/3-a*, *ObCYP76M6-c* を選択し、*P. pastoris* 染色体上に相同組換により組み込まれた形質転換酵母を作製した。酵素機能解析に用いる基質候補化合物としては、*O. brachyantha* においてストレス誘導的に合成される炭化水素である sandaracopimaradiene, isokaurene を基質候補と考えて、大腸菌異種発現系を用いて先行研究にならい合成した[3)]。また、基質合成のメバロン酸経路を増強するプラスミドを導入することにより、炭化水素合成量の増加も試みた。その結果、100 ml の培養菌体から 7 μg の基質炭化水素を得た。現在、構築した酵母異種発現系における目的シトクロム P450 遺伝子の発現を Western blotting で確認し、順次、酵素機能解析を進めている。

1) Shimura et al., 2007, The Journal of Biological Chemistry
2) Miyamoto et al., 2016, The Plant Journal
3) Toyomasu et al., 2018, Biochemical and Biophysical Research Communications

rice, phytoalexin, cytochrome P450

講演番号：3B09p12
講演日時：3 月 27 日 16:01～ 総合学習プラザ B09 会場

ムラサキのシコニン生合成に関与する Cytochrome P450 の機能解析
Characterization of cytochrome P450 involved in shikonin biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon*

○吉村 和貴[1]、中川 友喜美[2]、渡辺 文太[3]、矢崎 一史[2]、高梨 功次郎[4] ([1]信州大・総合理工、[2]京大・生存研、[3]京大・化研、[4]信州大・理)
○ Kazuki YOSHIMURA[1], Yukimi NAKAGAWA[2], Bunta WATANABE[3], Kazufumi YAZAKI[2], Kojirou TAKANASHI[4] ([1]Grad. Sch. of Sci. & Tech., Shinshu Univ., [2]RISH, Kyoto Univ., [3]ICR, Kyoto Univ., [4]Fac. of Sci., Shinshu Univ.)

薬用植物であるムラサキ（*Lithospermum erythrorhizon*）の根において産生されるナフトキノン系化合物であるシコニンは、抗菌作用や抗炎症作用を有するため、ムラサキの根を乾燥させた紫根は皮膚疾患に有効な生薬として古くから使用されている。そのため、ムラサキの培養細胞を用いたシコニン生合成経路の解明を目指した研究も行われ、シコニン生合成経路の前半部分の *p*-Hydroxybenzoic acid と Geranyl diphosphate がカップリングして *m*-Geranyl-*p*-hydoxybenzoic acid が生合成されるまでは明らかになったが、シコニン生合成経路の後半部分はほとんど解明されていない。その中で、ムラサキ培養細胞の粗酵素を用いた先行研究において Cytochrome P450 が Geranylhydroquinone (GHQ) のゲラニル基の 3’ 位への水酸基導入反応を行うことが推測された。そこで本研究では、ムラサキ培養細胞において Geraniol 10-hydroxylase との相同性が高く、シコニン生産時特異的に発現が上昇する Cytochrome P450 を 4 分子種（LeP450s）単離し、これらが GHQ の 3” 位への水酸基導入反応に関与していると推測して酵素機能解析を行った。LeP450s を出芽酵母に異種発現し、粗酵素による酵素活性を測定したところ 1 分子種が GHQ の 3” 位への水酸基導入活性を示した。本発表ではこの LeP450 の諸特性について議論する。

Shikonin, Cytochrome P450, *Lithospermum erythrorhizon*

発表責任者：高梨功次郎（takanashi@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3B09p13
講演日時：3 月 27 日 16:21～ 総合学習プラザ B09 会場

イチゴ中のフラバン-3-オール類の質量分析イメージングを用いた分布の解明

Distribution of flavan-3-ol species in strawberry fruit revealed by mass spectrometry imaging

○榎元 廣文[1]、八田 一[2] ([1]帝京大理工、[2]京都女子大家政)
○Hirofumi ENOMOTO[1], Hajime HATTA[2] ([1]Teikyo Univ., [2]Kyoto Woman Univ.)

【目的】フラバン-3-オール類は植物性食品中の主な渋味成分である。近年の研究から、フラバン-3-オール類は、抗菌および抗酸化活性を有し、いくつかの疾病に対する予防作用が示唆されている。フラバン-3-オール類はイチゴ中の主なポリフェノールの一種であり、イチゴの生物学的並びに食品科学的な機能において重要な成分である。イチゴ中の主なフラバン-3-オール類として、カテキン(Cat)とエピカテキン(ECat)のみから構成されるプロシアニジン(PCy)、および、その中にアフゼレキン(Afz)やエピアフゼレキン(EAfz)を 1 分子以上含むプロペラルゴニジン(PPe)、ならびにそのモノマーが報告されている。しかし、イチゴ中のフラバン-3-オール類の分布は十分に明らかになっていない。マトリックス支援レーザー脱離イオン化-質量分析イメージング(MALDI-MSI)は、植物組織中の低分子代謝物の可視化手法として有効な手法である。そこで本研究では、MALDI-MSI を用いて、イチゴ中のフラバン-3-オール類を可視化し、その分布を調べた。
【方法・結果】始めに、凍結ミクロトームを用いて、カルボキシメチルセルロースに凍結包埋したイチゴ‘とちおとめ’より凍結切片を作成後、酸化インジウムスズコート-スライドガラスに接着させた。次に、エアブラシを用いて 2,5-ジアミノナフタレンのメタノール溶液を塗布後、ultraflextreme(Bruker)を用い、ネガティブイオンモードで測定した。すると、イチゴ切片上より、Afz and/or EAfz、Cat and/or ECat((E)Cat)、PCy ダイマー、トリマー、テトラマーおよび PPe のダイマー、トリマーの$[M-H]^-$イオンに *m/z* 値が一致するピークが検出された。次に、これらのピークを同定するため、MALDI-タンデム質量分析(MS/MS)を行ったところ、(E)Cat、PCy ダイマー、トリマー、テトラマー、および PPe のダイマー、トリマーが同定された。なお、標準品の測定において、in source fragmentation が起こっていることが確認され、同定された全てのピークは、それ自身、およびより大きなオリゴマーのフラグメントイオンがミックスしたものであることが示唆された。最後に、同定されたフラバン-3-オール類のイオンイメージを作成したところ、すべてイチゴのヘタ、表皮、および維管束とその周辺に分布していた。また、表皮と維管束において、PCy と PPe の分布パターンが異なることが示唆された。これまで、イチゴの表皮にフラバン-3-オール類が局在し、病原菌に対する感染防御が報告されていた。本研究ではさらに、維管束およびその周辺にも分布していることが示された。感染した病原菌は維管束を介して拡散することから、フラバン-3-オール類は感染した病原菌の拡散を防ぐため、維管束およびその周辺にも分布していると推察された。

Stawberry, Flavan-3-ols, Mass spectrometry imaging

発表責任者：榎元 廣文（enomoto@nasu.bio.teikyo-u.ac.jp）

講演番号：3B09p14
講演日時：3 月 27 日 16:32～ 総合学習プラザ B09 会場

ダイズ特化代謝産物の根圏分泌及び生合成遺伝子発現の日周変動解析
Analysis of the diurnal regulation of genes and secreted specialized metabolites in soybean.
○松田 陽菜子[1]、中安 大[1]、山崎 真一[2]、青木 裕一[2]、永野 惇[3]、矢崎 一史[1]、杉山 暁史[1]([1]京都大・生存研、[2]東北大・東北メディカル・メガバンク機構、[3]龍谷大・農)
○ Hinako MATSUDA[1], Masaru NAKAYASU[1], Shinichi YAMAZAKI[2], Yuichi AOKI[2], Atsushi NAGANO[3], Kazufumi YAZAKI[1], Akifumi SUGIYAMA[1] ([1]RISH, Kyoto Univ., [2]Tohoku Medical Megabank Organization, Tohoku Univ., [3]Ryukoku Univ.)

根圏は植物の生育に極めて重要な根近傍の土壌領域である。植物根から分泌される特化代謝産物は根圏微生物に影響を与えるため、根圏形成の主要な因子と考えられている。ダイズ（*Glycine max*）の根圏に分泌される主要な特化代謝産物には、イソフラボンとソヤサポニンが挙げられる。イソフラボンは根粒形成や根圏微生物叢形成に重要であるが、ソヤサポニンのダイズ根圏での機能は未解明である。植物根の分泌物は、生育段階や栄養条件、ストレス等により変動する。また、シロイヌナズナにおいては、根圏微生物叢が日周変動を示すことが報告されており、根分泌物の日周変動の影響が示唆されている。イソフラボンとソヤサポニンの分泌量は、植物の生育段階により大きく変化し、特に生育初期に分泌量が大きいことが示されているが、これらの分泌が日周制御されているかについては未だ明らかにされていない。そこで本研究では、イソフラボンとソヤサポニンを中心に、ダイズ根圏に分泌される特化代謝産物に日周変動があるかを明らかにすることを目的とした。

ダイズを 12 時間の明暗周期で水耕栽培し、3 週齢の時点で 6 時間毎に計 8 回のサンプリングを行った（0:00, 6:00, 12:00, 18:00）。回収した水耕液から代謝産物を Sep-pak C18 で固相抽出し、LC-MS により解析した。また、葉と根から RNA を抽出し、トランスクリプトーム解析に供した。LC-MS 解析の結果、ダイゼイン、ゲニステインと、それらの配糖体（ダイジン、ゲニスチン）、マロニル配糖体（マロニルダイジン、マロニルゲニスチン）の分泌に日周変動は認められなかった。また、ソヤサポニンのうち、主要な分泌物であるソヤサポニン Ab、Bb 及びソヤサポゲノール A、B にも日周変動は認められなかった。以上の結果から、イソフラボンとソヤサポニンの根圏分泌は日周制御されていないことが示された。一方、260 nm の検出波長で得られたピークを解析したところ、日周変動を有する未同定の化合物のピークが 3 つ見出され、ダイズ根分泌物中に日周制御されているものがあることが明らかになった。トランスクリプトーム解析の結果、概日時計関連遺伝子の発現に周期性が認められた。現在、トランスクリプトーム解析の結果から、イソフラボンとソヤサポニンを含め特化代謝産物の生合成遺伝子、及び根圏分泌に関与すると予想される輸送体遺伝子の発現を中心に、日周変動を解析している。

rhizosphere, specialized metabolite, diurnal regulation

発表責任者：松田 陽菜子（aoki.hinako.77c@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3B09p15
講演日時：3 月 27 日 16:43～ 総合学習プラザ B09 会場

統合オミクスによるエダマメフラボノイド生合成の解明

Integrated omics reveals flavonoid biosynthesis of Edamame

○岡田 康平[1]、中村 李[1]、星野 友紀[1]、及川 彰[1,2] ([1]山形大農、[2]理研 CSRS)
○Kohei OKADA[1], Sumomo NAKAMURA[1], Tomoki HOSHINO[1], Akira OIKAWA[1,2] ([1]Yamagata Univ., [2]RIKEN CSRS)

【背景・目的】

エダマメとは、マメ科（*Leguminosae*）マメ亜科（*Fraboidesae*）ダイズ属（*Glycine*）のダイズ未熟種子を指す。山形県鶴岡市の特産エダマメである“ダダチャマメ”は、一般的なエダマメ品種よりも甘味・旨味・香りに長けたブランドエダマメとして知られている。エダマメには豊富なタンパク質やビタミンに加えて、イソフラボンなどの機能性成分を有し、健康食品としての人気も高まっている。ダイズと比較して未熟種子段階のエダマメの二次代謝物に関する研究例は少ない。そこで本研究では、エダマメのメタボローム解析とマイクロアレイによりフラボノイド生合成経路の解明を試みた。

【方法】

LC-MS を用いたメタボローム解析では、ダダチャマメ品種（‘甘露’、‘白山’、‘尾浦’）3 品種および一般的なエダマメ（‘湯上り娘’、‘サヤムスメ’、‘秘伝’）3 品種の代謝物含量および組成を調べた。また、マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析では、成熟段階のエダマメ 4 品種（‘おつな姫’、‘秘伝’、‘白山’、‘尾浦’）を対象に実験を行った。さらに、経時的にサンプリングを行ったエダマメ品種を用い、種皮および子葉を分画してカテキン類の生合成経路に関わる酵素遺伝子の発現量を qRT-PCR を用いて調べた。

【結果・考察】

ダダチャマメ品種はカテキンおよびエピカテキンを含む一方で、一般的なエダマメ品種はこれらを含まないことが明らかとなった。また、ダダチャマメ品種はイソフラボノイド類の含量が一般的なエダマメ品種と比較して少ない傾向にあった。マイクロアレイの結果から、ダダチャマメ品種と一般的なエダマメ品種間でいくつかの遺伝子で発現量の差異が認められた。qRT-PCR の結果から一般的なエダマメ品種と比較してダダチャマメ品種でカテキン、エピカテキンの生合成に直接関わるフラボノイド 3’-水酸化酵素(F3’H:flavonoid 3’-hydroxylase)をコードする遺伝子の発現量が高かった。しかし、フラボノイド関連遺伝子である、LAR、ANS、ANR、DFR ではダダチャマメ品種と比較して、一般的なエダマメ品種で発現量が高かった。以上のことから、ダダチャマメ品種におけるカテキン類の生合成では F3’H が重要であることが示唆された。

Edamame, flavonoid biosynthesis, Integrated omics

講演番号：3B09p16
講演日時：3 月 27 日 16:54～ 総合学習プラザ B09 会場

メタボローム解析による栽培土壌とエダマメ品質の相関解析
Metabolomics reveals the correlation between soil and edamame components
○増田 勘太郎[1]、佐々木 亮介[2]、斉藤 和季[2,3]、及川 彰[1,2] ([1]山形大院農、[2]理研 CSRS、[3]千葉大院薬)
○Kantaro MASUDA[1], Ryosuke SASAKI[2], Kazuki SAITO[2,3], Akira OIKAWA[1,2] ([1]Yamagata Univ., [2]Riken CSRS, [3]Chiba Univ.)

【背景・目的】エダマメとは、ダイズ（*Glycine max* （L.）*Merr*）の未熟種子であり、アミノ酸などの風味に関わる成分に加え、GABA やビタミン類などの機能性成分を豊富に含むことが知られている。山形県は国内でも有数のエダマメ生産地であり、特に鶴岡市の在来エダマメ品種であるダダチャマメはブランド野菜として注目を集めているが、一方で品質の不均一性が近年問題となっている。農産物の品質に影響を与える要因として栽培土壌の性質が挙げられる。作物に含まれる成分が、栽培土壌の保水性や通気性などの物理的性質や無機化合物含量から影響を受けることは知られているが、土壌中の有機物が与える影響についての報告は少ない。そこで、本研究では、従来の無機化合物分析に加え、土壌中の有機化合物が、エダマメ品質に与える影響についてメタボローム解析を用いて明らかにすることを試みた。

【方法】ダダチャマメの中でも生産量が最も多い品種である‘白山’をサンプルとして用いた。適期に収穫した‘白山’と栽培されていた周辺の土壌を同日にサンプリングした。これらに含まれる有機化合物を CE-MS（Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry ： キャピラリー電気泳動質量分析装置）および LC-MS（Liquid Chromatography Mass Spectrometry ： 液体クロマトグラフィー質量分析装置 ）を用いたメタボローム解析により網羅的に明らかにした。土壌サンプルに含まれる無機化合物は、IC（Ion Chromatography ： イオンクロマトグラフィー）によって定量した。

【結果・考察】昨年度の、CE-MS を用いた分析により、エダマメから約 200 種、土壌から約 50 種のイオン性化合物が検出された。LC-MS を用いた分析により、それぞれ、4 種の中性糖およびイノシトール、6 種の中性糖が検出された。また、IC を用いた分析により、土壌から 10 種の無機化合物が検出された。土壌性質が大きく異なる離れた圃場間ではエダマメ品質と土壌中の化合物に相関が認められた一方、同じ圃場内では土壌からの影響より収穫日の差異による影響が大きいことも明らかになった。そのため今年度は、年次変動や再現性の確認に加えて、気温や日照時間などの収穫時の環境条件をデータロガーにより連続的に計測した。さらに、栽培土壌がエダマメ品質に与える影響をより詳細に解析するために、圃場を追加し収穫日を揃えてサンプリングを行った。現在、これらのサンプルの分析を行いデータの統合解析を行っている。

Metabolomics, Edamame, Soil

講演番号：3B09p17
講演日時：3 月 27 日 17:05～ 総合学習プラザ B09 会場

Glucosinolate catabolism dependent on two atypical myrosinases is required for sustaining plant growth under sulfur deficiency

○Liu ZHANG[1], Ryota KAWAGUCHI[1], Tomomi MORIKAWA-ICHINOSE[1], Alaa ALLAHHAM[1], Sun-Ju KIM[3], Akiko MARUYAMA-NAKASHITA[2] ([1]Kyushu Univ., Grad. Sch. Bio-Environ. Sci., [2]Kyushu Univ., Fac. Agr., [3]Chungnam National Univ.)

Glucosinolates (GSLs) are major sulfur (S)-containing specialized metabolites exclusive to order *Brassicales*. For plants, hydrolysis of GSLs upon tissue disruption, so called “mustard oil bomb”, is an effective defense strategy against herbivory and pathogen attack. For humans, GSLs and their breakdown products show preventive effects for cancer and cardiovascular diseases.

GSLs found in *Arabidopsis* are mainly methionine-derived aliphatic GSLs (mGSL) and tryptophan-derived indolic GSLs (iGSL). S deficiency (−S) caused drastic reduction of both mGSL and iGSL in *Arabidopsis*, which implied their S storage function. Previous studies revealed that GSL biosynthesis was repressed, while its catabolism was stimulated upon −S. The repression of mGSL biosynthesis under −S is facilitated by *Sulfur Deficiency Induced1* (*SDI1*) and *SDI2*. Although the disruption of both *SDI1* and *SDI2* moderated the decrease in mGSL levels under −S, it did not result in the recovery of mGSL levels to those under S sufficiency. This finding indicated the role of GSL catabolism in reducing GSL accumulation under −S. GSLs are known to be hydrolyzed by a group of ß-glucosidases (BGLUs) termed as myrosinases. Two putative myrosinases, *BGLU28* and *BGLU30,* are presumed to be responsible for −S-induced GSL catabolism, since their transcript levels were up-regulated by −S.

To clarify the physiological function of BGLU28 and BGLU30 in −S-induced GSL catabolism, we analyzed the accumulation of GSLs and other S compounds in the single and double disruption lines of *BGLU28* and *BGLU30* (*bglu28*, *bglu30*, and *bglu28/30*), and compared with those in wild-type (WT) plants under different S conditions. In *bglu28/30*, GSL levels were highly increased, while the levels of sulfate, cysteine, glutathione, and protein were decreased under −S. Furthermore, transcript level of *Sulfate Transporter1;2*, the main contributor of sulfate uptake from the environment, was increased in *bglu28/30* under −S. With these metabolic and transcriptional changes, *bglu28/30* displayed obvious growth retardation under −S.

Overall, our results indicate that BGLU28 and BGLU30 are required for −S-induced GSL catabolism, which contribute to sustained plant growth under −S by recycling sulfate to primary S metabolism. These findings improve our understanding of plant adaptation to −S environment and can shed light on designing strategies to maintain crop yield under −S and boost production of health beneficial natural products in Brassica crops.

Glucosinolate catabolism, myrosinases, sulfur deficiency

発表責任者：ZHANG　Liu（zhangliu941202@gmail.com）

講演番号：3B09p18
講演日時：3 月 27 日 17:16～ 総合学習プラザ B09 会場

シロイヌナズナ成熟個体のグルコシノレート蓄積に及ぼす硫酸イオントランスポーターSULTR1;2 欠損の影響

Glucosinolate distribution in the aerial parts of *sel1-10*, a disruption mutant of the sulfate transporter SULTR1;2, in mature *Arabidopsis thaliana* plants

○一瀬 智美[1]、金 善州[2]、Alaa Allahham[1]、川口 諒太[1]、藤村 由紀[1]、丸山 明子[1]([1]九州大 院農、[2]忠南大学)
○Tomomi ICHINOSE[1], Sun-Ju Kim[2], Alaa Allahham[1], Ryota Kawaguchi[1], Yoshinori Fujimura[1], Akiko Maruyama-Nakashita[1] ([1]Fac.Agr.Kyushu Univ., [2]Chungnam National Univ.)

硫黄は生物の必須元素の一つである。シロイヌナズナの高親和型硫酸イオントランスポーター *SULTR1;2* は根からの硫酸イオン吸収に主要な役割を果たし、その遺伝子発現は硫黄欠乏条件(–S)下で上昇する。*SULTR1;2* 欠損株（*sel1-10*）は、発育遅延、硫酸イオンやグルタチオン量の減少、トランスクリプトームの変化など、–S 下におかれた植物様の表現型を示す。しかし、これまでの解析は幼植物体を用いて行われており、成熟個体の特性はよく分かっていない。本研究では *sel1-10* 成熟個体を用いて–S が硫黄代謝に及ぼす影響を解析した。

野生型株（Ws-0）および *sel1-10* を連続光条件下で 6 週間生育した。ロゼット葉、茎生葉、腋茎、鞘の乾燥重量、主茎長については両者間で差がなかったが、主茎の直径ならびに乾燥重量は *sel1-10* で減少した。続いてこれら成熟個体のロゼット葉、茎生葉、主茎、腋茎、鞘について凍結乾燥粉末を調製し、各部位における硫酸イオン、システイン、グルタチオン、グルコシノレート(GSL)量を測定した。*sel1-10* では野生型株と比べてロゼット葉における硫酸イオン量が増加し、鞘内の硫酸イオンおよびグルタチオン量が減少した。一方、GSL については、グルコイベリン、グルコラファニン、グルコブラシシンといった代表的な分子種の蓄積量が *sel1-10* のロゼット葉、茎生葉、主茎、腋茎において減少したものの、鞘では上記 GSL を含むほとんどの GSL が *sel1-10* においても野生型株と同程度に蓄積した。種子でも同様に GSL 量が維持されていた。これらの結果は、硫酸イオンの吸収が制限されても種子には GSL が優先的に蓄積されることを示しており、植物が次世代への硫黄貯蔵や外敵への防御に GSL を利用していることが示唆された。

Reference
Morikawa-Ichinose *et al. Plants*, 8, 95, (2019).
Maruyama-Nakashita *et al. Plant Physiol.*, 132, 597-605, (2003).

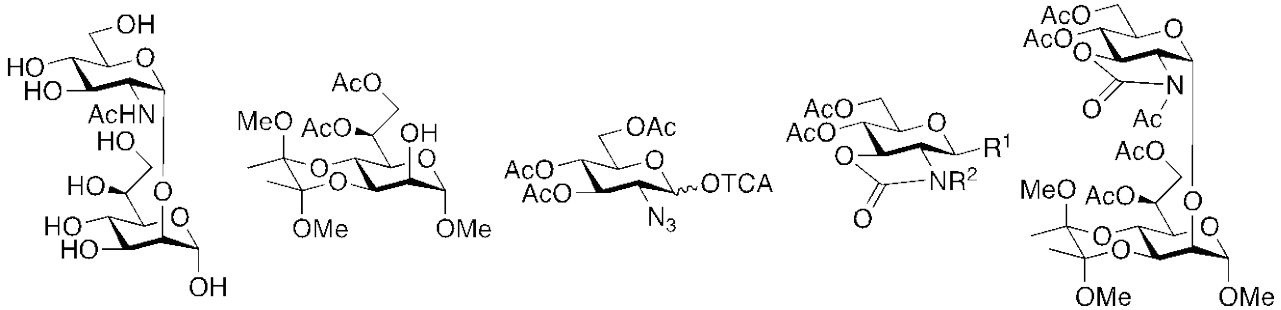
Glucosinolate, Sulfate transporter, *Arabidopsis*

講演番号：3B11a01
講演日時：3 月 27 日 09:30～ 総合学習プラザ B11 会場

様々なグルコサミン供与体によるヘプトース誘導体の 2 位水酸基への立体選択的グリコシル化
stereoselective 2-*O*-glycosylation of a heptose derivative by using glucosamine donors
○冨樫 佳祐[1]、大谷 直輝[2]、後久保 春花[1]、一柳 剛[1] ([1]鳥取大農、[2]鳥取大院持続性社会創生科学)
○Keisuke TOGASHI[1], Naoki OHTANI[2], Haruka SEDOKUBO[1], Tsuyosi ICHIYANAGI[1] ([1]Tottori Univ, [2]Grad. Sch. Tottori Univ)

ナイセリア属細菌が産生するリポオリゴ糖(LOS)のコア糖鎖は 3-デオキシ-D-マンノオクツロン酸(Kdo)，ヘプトース(Hep)および *N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)からなる。このうち GlcNAc が Hep の 2 位に α に結合した α-GlcNAc(1-2)Hep**1** 構造は，特異的な抗菌スペクトルを有するワクチン開発の観点から合成が行われている。しかし，この糖鎖構造の立体選択的な合成は報告されていなかった。本研究では，種々のグルコサミン誘導体を用いたヘプトース誘導体 **2** の 2 位水酸基へのグリコシル化反応を調査し，最適な合成方法について検討した。

はじめに 2 位にアジド基を有するグルコサミン誘導体 **3** を使用し, Boons らが報告している硫黄化合物を添加した立体選択的グリコシル化を試みたが，α/β=1.6:1 と立体選択性はほとんど見られなかった（収率 93%)。続いて眞鍋らが報告している *N*-ベンジル-2,3-*trans*-カーバメート基を有する供与体 **4** を使用したグリコシル化を試みたところ，わずかに α 選択性が向上した(29%, α/β=6.8:1)。また *N*-アセチル-2,3-*trans*-カーバメート保護した供与体 **5** によるグリコシル化では，標的とする α 結合した 2 糖 **6** のみを収率 64%で得ることができた。この反応では活性化剤に TMSOTf/NIS を用いた場合 β 体のみを，AgOTf /NIS を使用した場合に α 体のみが選択的に得られることが分かった。また β 体については BF_3·OEt_2 で処理することにより α 体への異性化できることを確認した。以上のことから, *N*-アセチルカーバメート誘導体の使用が目的 2 糖合成に最適であると結論づけた。現在，最適化した条件を使用してナイセリア属 LOS のコア 3 糖合成を試みており結果をあわせて報告する。



1　　2　　3　　4 R^1=STol, R^2=Bn　　6
5 R^1=SPh, R^2=Ac

glycosylation, Glcosamine, LPS

発表責任者：一柳剛（yanagi@tottori-u.ac.jp）

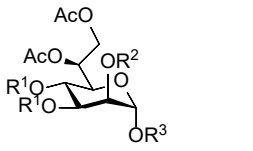
講演番号：3B11a02
講演日時：3 月 27 日 09:41～ 総合学習プラザ B11 会場

L-*glycero*-D-*manno*-heptose からなる LPS 内部コア 3 糖の合成研究
Synthetic study of L-*glycero*-D-*manno*-heptose trisaccharides produced by gram-negative bacteria.
○尾川 周平[1]、大谷 直輝[1]、織田 健成[2]、一柳 剛[2] ([1]鳥取大院持続性社会創生科学、[2]鳥取大農)
○Shuhei OGAWA[1], Naoki OHTANI[1], Kensei ODA[2], Tsuyoshi ICHIYANAGI[2] ([1]Grad. Sch. Tottori Univ., [2]Tottori Univ.)

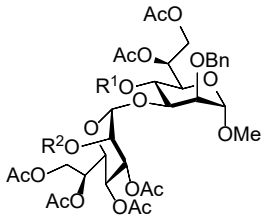
グラム陰性細菌は細胞外膜にリポ多糖(LPS)を産生する。LPS には属によって構造変異が少ないコア領域が存在し，主に中性 7 炭糖 L-*glycero*-D-*manno*-heptose (Hep)，および酸性 8 炭糖 3-deoxy-D-*manno*-oct-2-ulosonic acid (Kdo)で構成されている。我々は LPS コア糖鎖の効率的な合成法の確立と糖鎖ライブラリ構築に取り組んでおり，これまでにナイセリア属のコア 2~6 糖合成を達成している。今回我々は新たにナフチルメチル(NAP)基を有する Hep 誘導体を合成し，*trans*-3,4-ジオールおよび 7,8 ジオール受容体に対する位置選択的グリコシル化，およびヘモフィラス属およびエシェリケア属 LPS のコア糖鎖合成を試みたので報告する。

2 位に NAP 基を有する Hep 誘導体は，山﨑らが報告した Bn 基を有する Hep 誘導体と同様の経路により合成した。その結果，NAP 基は Bn 基に比べ酸安定性が低く，かさ高いため反応条件の最適化が必要であったが良好な立体選択性，収率で合成できた。続いてヘモフィラス属のコア 3 糖の合成を行った。2 位に NAP 基を持つ Hep のトリクロロアセトイミデート供与体 **1** を用いて，2 位に Bn 基を持つ Hep **2** の 3,4-diol に対してグリコシル化を行い，α1-3 グリコシド 2 糖 **3** を収率 82%で得た。また，α1-4 グリコシドも収率 13%で得られた。

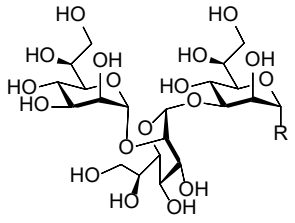
続いて NAP 基の選択的脱保護を行った。この際アセチル基の転移が起こることが確認された。異性体を分離後 2 位に Hep を導入することによりヘモフィラス属 LPS の中性コア 3 糖 **4** の合成を達成した。現在，グリコシル化における位置選択性および NAP 基の除去における反応条件の最適化およびエシェリケア属コア 3 糖 **5** 合成を行っており，結果とあわせて報告する。



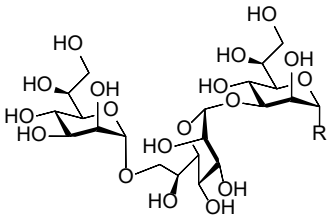
1: R^1=Ac, R^2=NAP, R^3=C(NH)CCl$_3$
2: R^1=H, R^2=Bn,R^3=Me



3: R^1=H, R^2=NAP



4



5

glycosylation, LPS, L-*glycero*-D-*manno*-heptose

発表責任者：一柳剛（yanagi@tottori-u.ac.jp）

講演番号：3B11a03
講演日時：3 月 27 日 09:52～ 総合学習プラザ B11 会場

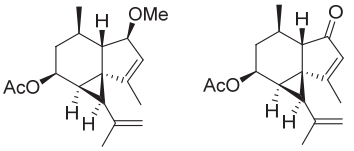
Shagene A, および B の不斉全合成研究

Studies towards asymmetric total synthesis of shagenes A and B

○八木田 凌太郎[1]、西林 和也[2]、MOHAMMED Tagwa[2]、平家 崇吉[2]、竹本 佳司[2]、入江 一浩[1]、塚野 千尋[1] ([1]京大院農、[2]京大院薬)

○Ryotaro YAGITA[1], Kazuya NISHIBAYASHI[2], Tagwa MOHAMMED[2], Takayoshi HEIKE[2], Yoshiji TAKEMOTO[2], Kazuhiro IRIE[1], Chihiro TSUKANO[1] ([1]Kyoto Univ. Grad. Sch. Agri., [2]Kyoto Univ. Grad. Sch. Pharm.)

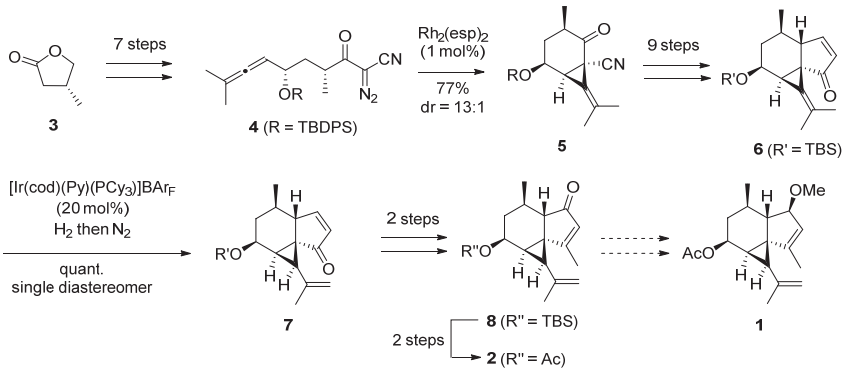
【研究背景・目的】



Shagene A (**1**) および B (**2**) は 2014 年に Baker らによって軟サンゴより単離されたセスキテルペンである (Jacqueline, L. S. *et al., Org. Lett.* **2014**, *16*, 2630). その構造および相対立体配置は各種スペクトル解析により決定されたが, 絶対立体配置は未決定である. 構造的特徴としては 3, 6, 5 員環が縮環した新奇三環性骨格と, シクロプロパン環の主鎖置換基が同一面に位置している全シス置換シクロプロパン構造が挙げられる. 生物活性としては, **1** にはリーシュマニア症の原虫 *Leishmania donovani* に対する殺虫作用 (IC_{50} = 5 μM) が報告されている. これは現在利用されている医薬品ミルテフォシン (IC_{50} = 3 μM) と同程度の活性である. 一方で, マウスマクロファージ様株化細胞 J774.A1 に対しては 345 μM でも毒性を示さず, その選択性の高さから新規シード化合物として期待される. これまで **1** および **2** の全合成は報告されておらず, 我々はその特異な構造と重要な生物活性に興味をもち, shagene 類の全合成研究に着手した.

【結果】

我々はこれまでにジアゾケトニトリルのジアステレオ選択的シクロプロパン化と続く Crabtree 型イリジウム触媒による二重結合の異性化を鍵反応として, shagene 類と同様の特異的な三員環構造を持つ avenaol の全合成を達成している (Yasui, M. *et al., Nat. Common.* **2017**, *8,* 674). この手法を shagene 類の骨格構築に応用した. (*R*)-4-Methyldihydrofuran-2(3*H*)-one (**3**) を出発物質とし, 7 工程でジアゾケトニトリル **4** を合成した後, ロジウム触媒で処理することでジアステレオ選択的にアルキリデンシクロプロパン **5** を得た. 閉環メタセシス反応を含む 9 工程で三環性骨格を構築した後, イリジウム触媒による異性化反応により **7** を合成し, 全シス置換シクロプロパン構造を構築した. その後 **8** を経て **2** の初の不斉全合成に成功した. 現在, CD スペクトル測定等による **2** の絶対立体配置の決定と, **1** の全合成を検討している.



total synthesis, sesquiterpene, leishmaniasis

発表責任者：塚野千尋（tsukano.chihiro.2w@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3B11a04
講演日時：3 月 27 日 10:03～ 総合学習プラザ B11 会場

超原子価ヨウ素による β - エナミノンのロダン化反応

Hypervalent iodine mediated C-H Thiocyanation of β-Enaminones

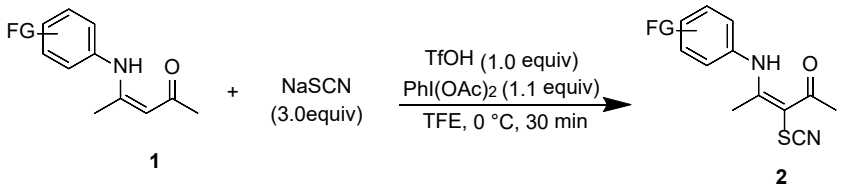
○松井 大樹、園田 素啓、谷森 紳治 (阪府大院生命環境)
○Daiki MATSUI, Motohiro SONODA, Shinji TANIMORI (Osaka Pref. Univ.)

［背景・目的］

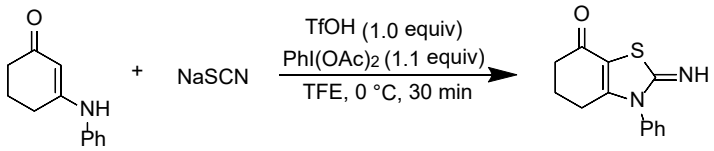
有機ロダン化合物はチオエーテル、スルホン等、含硫黄化合物に誘導できる重要な合成中間体の一つである。また、カイメンから単離された生理活性天然物にもみられる。このため、様々な合成法が報告されているが、β-ジケトン由来である β-エナミノンに対するロダン化の報告は少なく、その生理活性についても十分に研究されていない。本研究では環境に優しく、豊富な反応性を持つ超原子価ヨウ素反応剤を用いることで、新規に β-エナミノンのロダン化反応を見出したので報告する。

［方法・結果］

アニリンとアセチルアセトンより容易に得られる β-エナミノン **1a** とチオシアン酸カリウムをモデル基質に用い、超原子価ヨウ素反応剤である $PhI(OAc)_2$ の存在下、ロダン化反応を試みた。その結果、0 ℃、30 分間の反応で目的としたロダン化アルケン **2a** が 77%の収率で生成した。条件検討の結果、チオシアン酸塩としてチオシアン酸ナトリウムを用い、トリフルオロメタン酸を 1 当量添加したところ、97%の収率でロダン化アルケン **2a** が生成することを見出した。芳香環上に様々な置換基を有する β-エナミノン **1** に対し、上記反応を行ったところ、良好な収率で対応するロダン化アルケン **2** が生成した。さらに、β-シクロヘキサンジオンとアニリンから得られる β-エナミノン **3a** に対して上記反応を行うと、2-イミノチアゾール **4a** が得られることを見出した。



1 **2**



4a, 87%

Entry	FG	**2**	Yield (%)
1	H	**2a**	97
2	4-Me	**2b**	90
3	4-OMe	**2c**	98
4	4-F	**2d**	82
5	4-Cl	**2e**	76
6	4-Br	**2f**	83
7	4-I	**2g**	80
8	4-Bu-*t*	**2h**	91
9	4-NO_2	**2i**	77
10	2-Me	**2j**	91
11	3-Me	**2k**	85
12	2-Cl	**2l**	95
13	3-Cl	**2m**	94

Hypervalent iodine, Thiocyanation, Organic synthesis

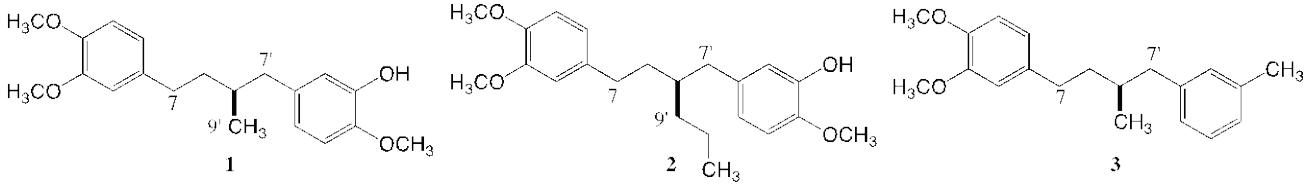
講演番号：3B11a05
講演日時：3 月 27 日 10:14～ 総合学習プラザ B11 会場

細胞毒性を有する鎖状 norlignan の biotin プローブの合成

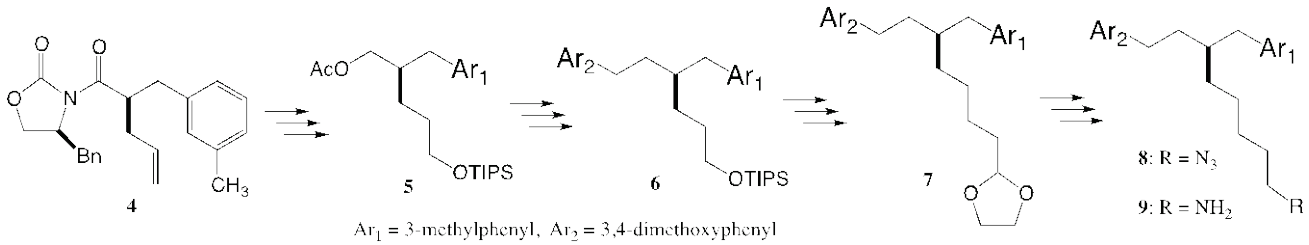
Synthesis of biotin probe of cytotoxic acyclic norlignan

○卯津羅 萌音、西脇 寿、山内 聡 (愛媛大院農)
○Mone Uzura, Hisashi Nishiwaki, Satoshi Yamauchi (Ehime Univ.)

目的）norlignan は、C6-C3 単位が 2 単位結合した lignan よりも炭素数が一つ少ない化合物群である。そのうち、lignan の 9 位の炭素が欠落した鎖状の骨格についてベンゼン環上の置換基と細胞毒性との関係について調べたところ、ベンゼン環上の置換基は活性に大きく影響を与えることが分かり、HeLa 細胞に対しては、7 位に 3,4-dimethoxyphenyl 基を 7'位に 3'-hydroxy-4'-methoxyphenyl 基を持つ誘導体 **1** が IC_{50} 値 0.9 μM を示した。また、9'位を増炭した誘導体 **2** は 2.7 μM の IC_{50} 値であり比較的高い活性を維持した。このことから、作用メカニズム解明のため、9'位にスペーサーを導入して biotin プローブを合成することにした。7'位上のベンゼン環上の 3'位に methyl 基を有する誘導体 **3** の IC_{50} 値は 4.7 μM であったことから、合成の簡便化のために 7'位に 3'-methylphenyl 基を有する化合物を合成することにした。さらに、立体構造は活性に大きく影響を与えない事もすでに確認している。



方法・結果）立体構造を構築するために、*S* 体の Evans の不斉補助基を用いたベンジル化により **4** を得た。次に、不斉補助基の還元的除去、生じた水酸基のアセチル基による保護、アルケンへの 9-BBN を用いた hydroboration、シリル保護を行い **5** とした。さらに、アセチル基の除去後、酸化、CH_3PPh_3Br との Wittig 反応を行った後、3,4-dimethoxystyrene との Grubbs 反応、水素添加によって **6** へ導いた。続いて、脱シリル化後のアルデヒドへの酸化、(1,3-dioxolan-2-yl)methyltriphenylphosphonium bromide との Wittig 反応、水素添加により **7** とした後、脱保護、水酸基への還元を行い、最後に azide **8** への変換を行った。この azide と種々の biotin alkyne との Click 反応を行い、biotin プローブを得ることを計画している。一方、azide を還元して amine **9** も得ている。



neolignan, cytotoxicity, biotin probe

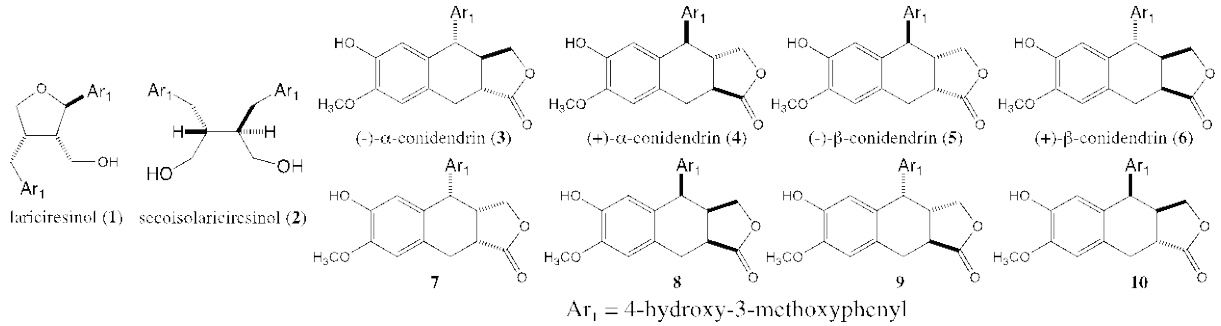
講演番号：3B11a06
講演日時：3 月 27 日 10:35～ 総合学習プラザ B11 会場

食品性植物に含まれる lariciresinol の体内代謝産物である conidendrin の全立体異性体の合成と抗アレルギー活性及び抗炎症作用

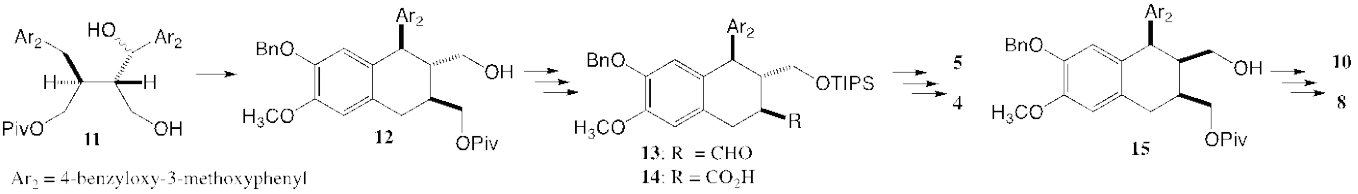
Syntheses of all stereoisomers of lariciresinol metabolite, conidendrin, antiallergic activity and anti-inflammatory effect

○白方 陽菜子、西脇 寿、石田 萌子、菅原 卓也、山内 聡（愛媛大院農）
○Hinako SHIRAKATA, Hisashi NISHIWAKI, Momoko ISHIDA, Takuya SUGAHARA, Satoshi YAMAUCHI (Ehime Univ.)

目的）lariciresinol (**1**)は、野菜類に含まれるリグナンの一つである。もう一つの野菜類に含まれるリグナン類である secoisolariciresinol (**2**)は、不飽和脂肪酸への抗酸化活性発現の結果 lariciresinol (**1**)に変換される事が示されている。また、lariciresinol (**1**)は、哺乳類に摂取されると体内で conidendrin に変換される事が報告されている。これまでの研究では、lariciresinol の人に対する生物活性は報告されていなかったが、今回は、その代謝物である conidendrin の人に対する生物活性を明らかにする事を目的とした。lariciresinol は植物により鏡像異性体の混合物として生合成されることから、その代謝物のすべての立体異性体 **3**–**10** を合成した後、生物活性を調べることにした。



方法・結果）*S* 体の Evans の不斉補助基を利用した *anti*-aldol 反応等を利用してベンジルアルコール **11** を得た後、分子内 Friedel-Crafts 反応を行い立体選択的に **12** とした。１級水酸基の保護、ピバロイル基の除去の後、生じた水酸基をアルデヒド **13** へ、さらにカルボン酸 **14** へ酸化した。**13** の脱シリル化の時に一部α位のエピ化が起こり、このエピ体から **5** へ導いた。**14** からは **4** が得られた。一方で、**12** に対して 1 級水酸基の脱離反応を行った後、立体選択的ハイドロボレーションによりエピ化を行い 1 級アルコール **15** とした。**15** から同様にして **10** と **8** を合成した。*R* 体の Evans の不斉補助基を用いて鏡像異性体 **3, 6, 7, 9** も合成し、光学純度は 99-100%ee であった。**3-6** の生物活性を調べたところ、(-)-β-conidendrin (**5**)の脱顆粒抑制活性、(+)-α-conidendrin (**4**)の TNF-α生成抑制活性が最も高かった。



lignan, conidendrin, antiallergic activity

講演番号：3B11a07
講演日時：3 月 27 日 10:46～ 総合学習プラザ B11 会場

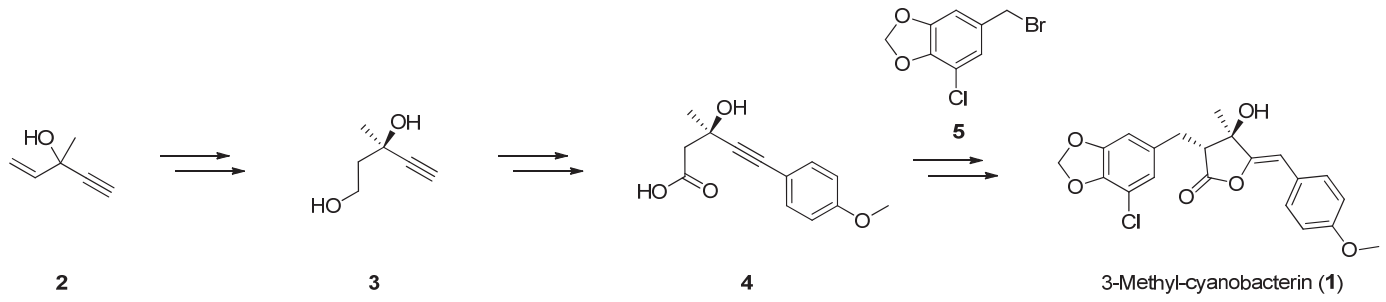
3-Methyl-cyanobacterin の新規不斉合成経路の確立

Establishment of new asymmetric synthesis route of 3-methyl-cyanobacterin

○松本 紘明、山内 聡、西脇 寿（愛媛大院農）
○Hiroaki MATSUMOTO, Satoshi YAMAUCHI, Hisashi NISHIWAKI (Ehime Univ.)

【目的】Cyanobacterin は淡水に生息するラン藻の一種である *Scytonema hofmanni* が産生する二次代謝産物である．Mason らによって初めて単離され，他の藻類に対して殺藻活性を示す[1)]ほか，陸上植物，特にトウモロコシやエンドウ，オオムギなどの高等植物に対して成長阻害活性を示すことが報告された[2)]．この化合物の不斉全合成に関しては，Haga らによる無塩素体の不斉合成[3)]，Ishibashi らによる不斉合成[4)]がこれまでに報告されている．しかし，構造活性相関解析の際に必要となる類縁体の合成展開がしにくいという問題点がある．そこで本研究では，cyanobacterin のアナログである 3-methyl-cyanobacterin（**1**）をモデル化合物として，cyanobacterin の新規不斉合成経路を確立することを目的とした．

【方法と結果】市販の **2** から 3 工程で合成した **3** と，4-iodoanisole をカップリングさせ，ジオールを得た．このジオールの末端の 1 級水酸基を Dess-Martin 酸化，Pinnick 酸化を経てカルボン酸 4 とした後，鍵中間体の合成に成功した．現在は，この鍵中間体と，vanillin から 5 工程で調製した置換ベンジルブロミド **5** を用いてアルキル化反応を検討し，さらに 2 工程を経て 3-methyl cyanobacterin（**1**）を合成している．



参考文献
1) Mason C., *et al.*, *Science*, **215**, 400-402 (1982), 2) Gleason F., *et al*., *Plant Physiol*., **80**, 834-837 (1986),
3) Haga Y., *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem*., **67**, 2183-2193 (2003), 4) Ishibashi F., *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem*., **69**, 391-396 (2005).

Cyanobacterin, Cyanobacterin analog, photosystem inhibitor

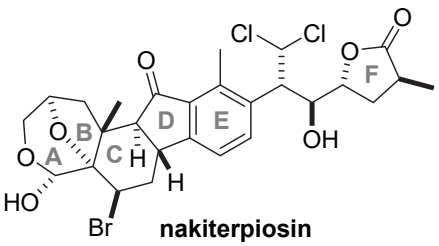
講演番号：3B11a08
講演日時：3 月 27 日 10:57～ 総合学習プラザ B11 会場

ナキテルピオシンの合成研究

Synthetic study of Nakiterpiosin

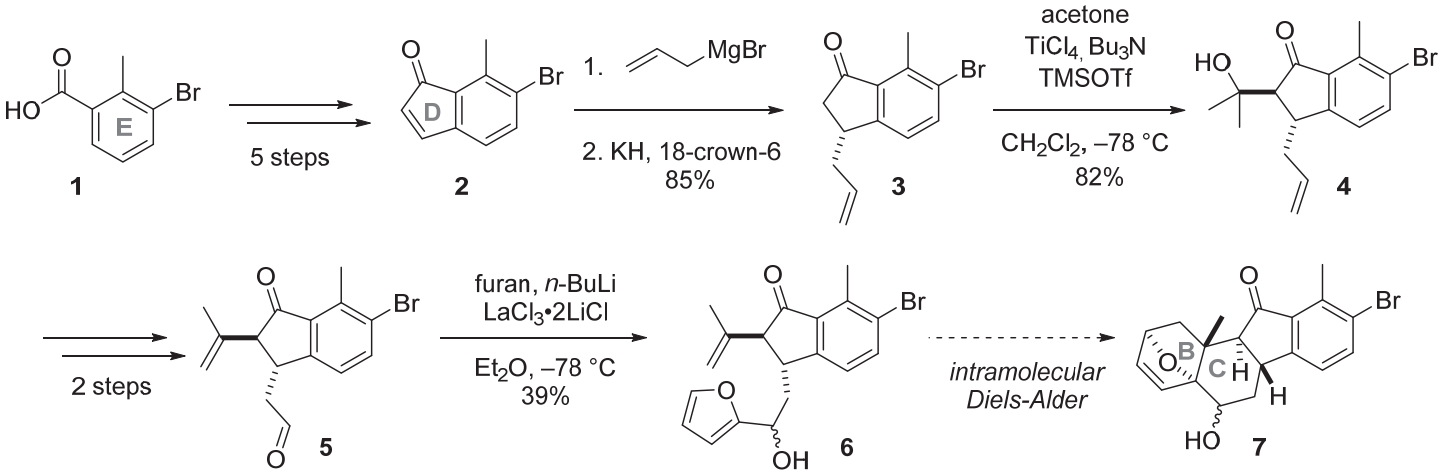
○松雪 洋恵[1]、深谷 圭介[1,2]、占部 大介[1,2] ([1]富山県大工、[2]富山県大・生医工研セ)
○Yoe MATSUYUKI[1], Keisuke FUKAYA[1,2], Daisuke URABE[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]Biotechnol. Res. Cent., Toyama Pref. Univ.)

ナキテルピオシンは海綿 *Terpious hoshinota* から単離された 6 環性化合物であり [1)]、マウス白血病細胞 P388 に強い細胞毒性を示すことが報告されている [2)]。構造上の特徴として、A 環が酸化開裂された C-nor-D homosteroid 骨格に加え、C 環部ブロモ基、側鎖部上のジクロロメチル基が挙げられる。本研究では、ナキテルピオシンの全合成を目指し、BCDE 環の構築を試みた。



nakiterpiosin

3-ブロモ-2-メチル安息香酸 **1** を出発原料とし、5 工程でインデノン **2** を合成した。次に **2** に対するアリル基の 1,4 付加を検討したが、望みの反応は一切進行せず、1,2 付加体のみが生じる結果となった。そこで **2** をアリル化した後に塩基性条件に付すことでオキシ Cope 転位を進行させ、望みのアリル化体 **3** を得た。**3** を $TiCl_4$ と Bu_3N 存在下、アセトンとのアルドール反応により増炭した。本反応は立体選択的に進行し、トランス二置換のインダノン **4** を単一の生成物として与えた。**4** をアルデヒド **5** へと誘導した後、塩化ランタン存在下、フリル基の付加を試みたところ、低収率ながらアルコール **6** を得ることに成功した。現在、**6** の分子内 Diels-Alder 反応による BC 環部の構築を検討している。



1) (a) Teruya, T.; Nakagawa, S.; Koyama, T.; Arimoto, H.; Kita, M.; Uemura, D. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 5171.
(b) Teruya, T.; Nakagawa, S.; Koyama, T.; Arimoto, H.; Kita, M.; Uemura, D. *Tetrahedron.* **2004**, *60*, 6989.
2) Gao, S.; Wang, Q.; Huang, L, J.-S.; Lum, L.; Chen, C. *J. Am. Chem. Soc*. **2010**, *132*, 371.

total synthesis, synthetic organic chemistry, natural product chemistry

発表責任者：占部大介（urabe@pu-toyama.ac.jp）

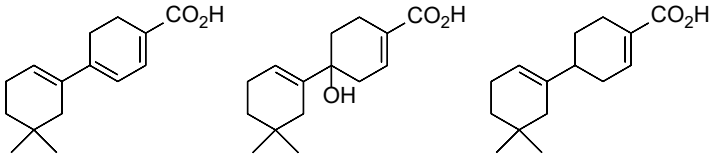
講演番号：3B11a09
講演日時：3 月 27 日 11:08～ 総合学習プラザ B11 会場

トウモロコシが産生するファイトアレキシン zealexin 類の合成研究

Synthetic studies of zealexins, maize sesquiterpenoid phytoalexins

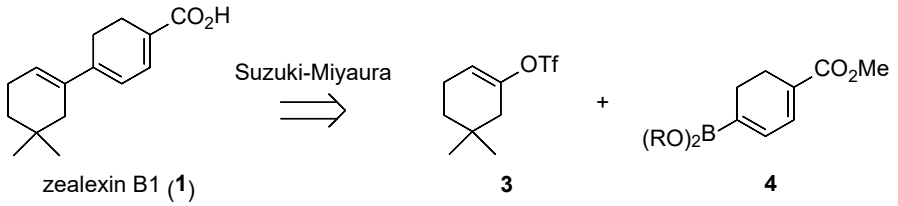
○石井 航平、松島 芳隆 (東京農業大学・農芸化学科)
○Kouhei ISHII, Yoshitaka MATSUSHIMA (Tokyo Univ of Agriculture, Dept of Agricultural Chemistry)

【背景と目的】トウモロコシから単離された zealexin 類は *Aspergillus flavus* や *Fusarium graminearum* などに対する抗菌活性を持つ新規のファイトアレキシンである [1)]。これらはトウモロコシから極微量しか得られず、その活性など詳細な研究のためには合成による物質供給が鍵となる。本研究では Zealexin 類の合成を目的とした。

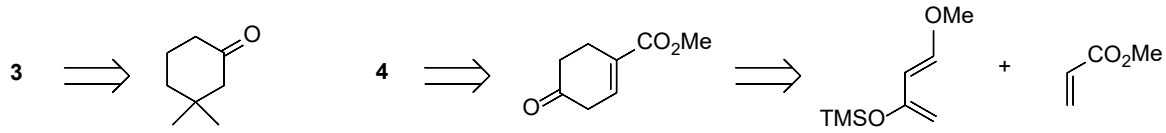


zealexin B1 (**1**)　zealexin A2 (**2**)　zealexin A1

【方法･結果】Zealexin 類の二つの環を結合する戦略により合成することを検討している。Zealexin B1 (**1**)の逆合成解析を図示した。**1** はエノールトリフラート **3** とボロン酸エステル **4** のカップリングにより得られると考えた。**3** は対応するケトン **5** から、また **4** は **7** と **8** の Diels-Alder 反応により得られるケトンエステル **6** から導くことができる。本計画に従って合成を行ったところ、低収率ながら zealexin B1 メチルエステル体の合成に成功した。現在は、収率向上とともに **3** と **6** を用いた zealexin A2 (**2**)の合成についても検討中である。



zealexin B1 (**1**)　**3**　**4**



5　**6**　**7**　**8**

1) A. Huffaker, F. Kaplan, M. M. Vaughan, N. J. Dafoe, X. Ni, J. R. Rocca, H. T. Alborn, P. E. A. Teal, E. A. Schmelz, *Plant Physiol*. **2011**, *156*, 2082-2097.

zealexins, phytoalexin, synthesis

発表責任者：松島　芳隆（ym205308@nodai.ac.jp）

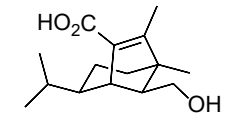
講演番号：3B11a10
講演日時：3 月 27 日 11:19～ 総合学習プラザ B11 会場

ジベレリン様活性を有する化合物 helminthosporic acid の合成研究

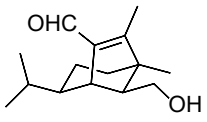
Synthetic study of helminthosporic acid, a gibberellin-like bioactive compound

○春原 大亮、松島 芳隆（東京農業大学・農芸化学科）
○ Daisuke HARUHARA, Yoshitaka MATSUSHIMA (Tokyo Univ of Agricukture, Dept of Agricultual Chemistry)

【背景・目的】Helminthosporic acid **1** はジベレリン様活性を有する生物活性物質として知られており、近年ジベレリン受容体のアゴニストとして働くことが分かった[1]。**1** は真菌 *Helminthosporium sativum* より単離された植物伸長作用を持つ helminthosporol から誘導できるが、helminthosporol やその類縁体の合成例は少なく、活性や作用機序のさらなる解明のため大量合成法が求められている。本研究では **1** の効率的な合成方法の確立を目的とする。

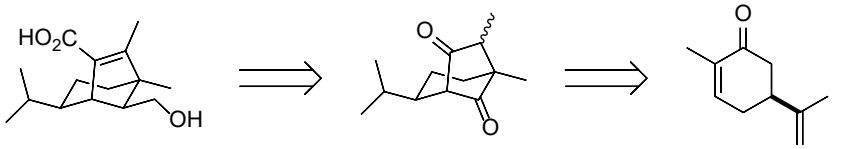


helminthosporic acid (**1**)



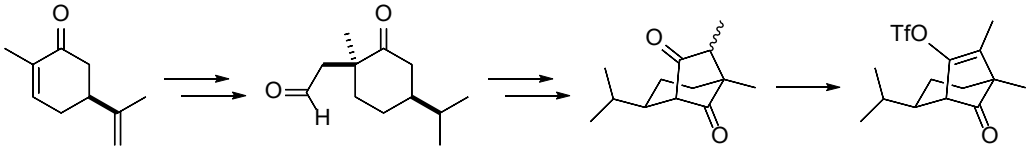
helminthosporol

【方法・結果】Helminthosporic acid **1** の逆合成解析を示した。**1** は化合物 **2** よりカルボキシ基の導入、Wittig 反応などによって得られると考えられる。また化合物 **2** は(*S*)-(+)-carvone から調製可能であると考えた。



1 **2** (*S*)-(+)-carvone

(*S*)-(+)-carvone を出発物質とし、水素添加、アリル化およびオゾン酸化によって化合物 **3** とした。**3** を分子内アルドール反応、酸化、メチル化することで中間体 **2** の合成に成功した。その後、カルボキシ基導入の足掛かりとして、**2** をトリフラート化して化合物 **4** を得た。より効率的に化合物 **2** を得るための方法として、分子内 Claisen 型縮合を用いた経路についても検討した。詳細について報告する。



(*S*)-(+)-carvone **3** **2** **4**

1) S. Miyazaki, K. Jiang, M. Kobayashi, T. Asami, M. Nakajima, *Biosci. Biotechnol. Biochem*., **2017**, *81*, 2152-2159.

Synthesis, Helminthosporic acid, Gibberellin-like bioactivity

発表責任者：松島　芳隆（ym205308@nodai.ac.jp）

講演番号：3B11a11
講演日時：3 月 27 日 11:40～ 総合学習プラザ B11 会場

Manginoid E の合成研究

Synthetic study of manginoid E

○山田 健士郎、山田 英俊、若森 晋之介（関西学院大理工）
○Kenshiro YAMADA, Hidetoshi YAMADA, Shinnosuke WAKAMORI (Kwansei Gakuin Univ.)

Manginoid 類（**1**~**4**, 図 1）は，2017 年に糸状菌の一種から単離され，11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1（11β-HSD1）に対する抑制活性をもつ[1]。そのため，肥満二型糖尿病に対する次世代の創薬標的として期待されている。その構造は，モノテルペンとシキミ酸を含み，これまでに単離されたメロテルペノイドには見られないものである。すなわち，**1**, **2** は 6-oxaspiro[bicyclo[3.2.1] ocatane-3,5'-indene]骨格を，**3**, **4** は 2,4-dioxatricyclo[3.3.1.$0^{3,7}$]nonane 骨格を有している。私たちは，その中でも最も複雑に縮環したアセタール骨格を持つ manginoid E に着目し，縮環構造の簡便な構築法を確立することとした。まずは，他の manginoid 類に共通する基本骨格とアセタール構造の構築法を開発するため，モデル化合物 **5**（図 1）の合成に着手した。

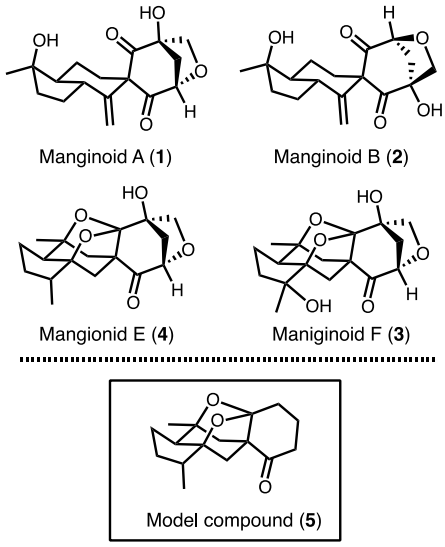


図 1

Manginoid 類の基本骨格である **10** を合成した（図 2）。採用した合成経路は，既知のアルデヒド **6**[2] と市販のジケトン **7** から，二つの炭素–炭素結合形成と酸化反応により，モデル化合物 **5** へと導く経路である。一つ目の炭素–炭素結合形成である Knoevenagel 縮合では，ワンポットで Hantzsch ester を用いた還元により二つのフラグメントを連結し，**8** へと導いた。二つ目の C–C 結合形成では，エポキシド **9** を形成したのちの分子内環化反応により，**10** のスピロ骨格を構築した。現在は，続く変換を検討している。

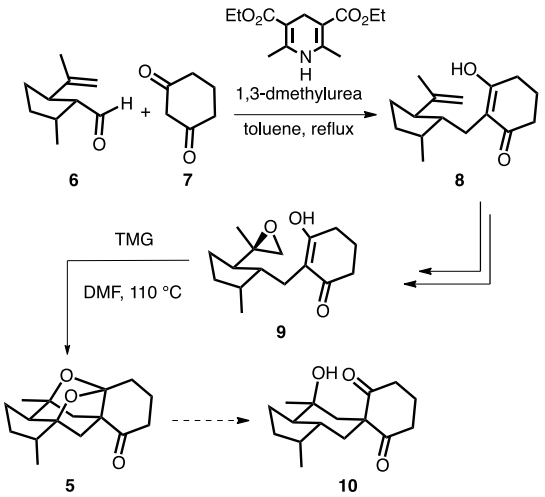


図 2

1) Chen, K.; Zhang, X.; Sun, W.; Liu, J.; Yang, J.; Chen, C.; Liu, X.; Gao, L.; Wang, J.; Li, H.; Luo, Z.; Xue, Y.; Zhu, H.; Zhang, Y. *Org. Lett.* **2017**, *19*, 5956.
2) Navickas, V.; Ushakov, D B.; Maier, M E.; Ströbele, M.; Meyer, H. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 3418.

organic synthesis, meroterpenoid, manginoid E

発表責任者：若森晋之介（shinnosuke1010@hotmail.co.jp）

講演番号：3B11a12
講演日時：3 月 27 日 11:51～ 総合学習プラザ B11 会場

フラボノイド配糖体糖鎖の酸加水分解に関する条件検討

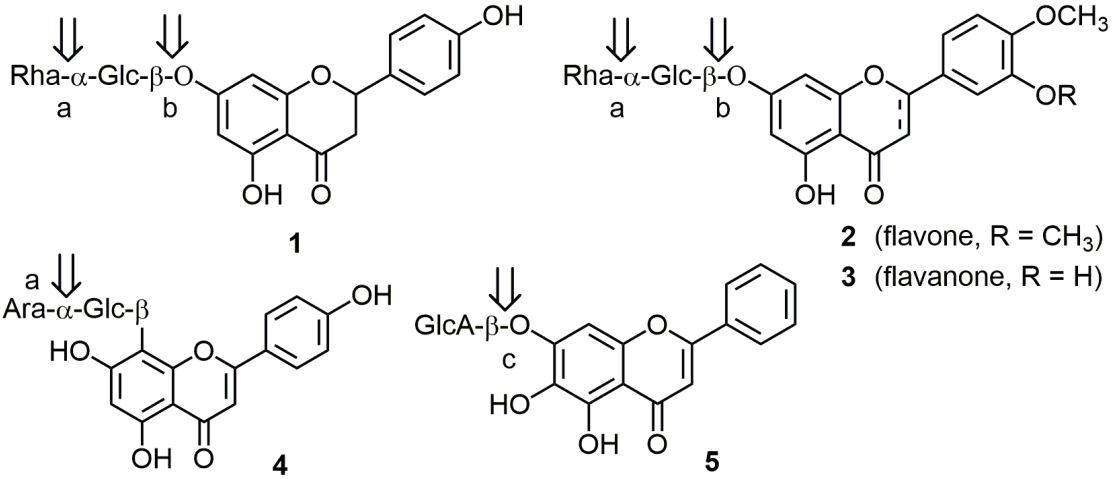
Examination on acid-catalyzed hydrolysis of flavonoid glycosides

○須貝 威、倉林 一樹、恒川 龍二、藤田 理愛、花屋 賢悟、東林 修平（慶應大薬）
○Takeshi SUGAI, Kazuki KURAHAYASHI, Ryujji TSUNEKAWA, Rie FUJITA, Kengo HANAYA, Shuhei HIGASHIBAYASHI (Keio Univ.)

生物活性フラボノイドの、効率・純度よい大量供給は重要である。演者らは、天然に豊富な植物資源、特に配糖体を出発原料とし、位置・化学選択的な反応を活用した合成研究をすすめてきた。高圧蒸気滅菌機や、酵素（リパーゼ）触媒など、通常の有機合成化学技術の中では、これまで頻用されてこなかった手法を鍵段階としている。

配糖体を出発物質とした場合、合成経路のいずれかの段階で、糖鎖を加水分解によって除去する必要がある。高圧蒸気滅菌器とは本来、微生物培養用の培地の滅菌に用いられる装置だが、不揮発性の硫酸を触媒に用いれば 100 ℃を超える温度で濃度・反応時間ともに正確に制御しつつ、酸加水分解が可能である。例えば 121 ℃において、硫酸の濃度および反応時間を変えることにより、下図に示す化合物(**1**～**3**)の結合 a を優先的に、または b までも加水分解しアグリコンを得る条件を設定可能である[1,2]。C-グリコシドから糖が伸長した天然物(**4**)では、結合 a が加水分解された生成物が得られた。さらに硫酸の濃度を高め、反応時間を長くすることにより、加水分解が困難な、グルクロン酸配糖体(**5**)の結合 c も効率よく加水分解できるようになった[3]。

本反応で得られた生成物は、生物活性物質の原料として活用した。



1) Kurahayashi, *et al*., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2018**, *82*, 1463.; 2) Tsunekawa, *et al ChemBioChem* **2019**, *20*, 210.; 3) Fujita, *et al*., *Heterocycles* **2018**, *97*, 1165.

flavonoid glycosides, acid-catalyzed hydrolysis, high pressure steam sterilizer

発表責任者：須貝 威（sugai-tk@pha.keio.ac.jp）

講演番号：3B11a13
講演日時：3 月 27 日 12:02～ 総合学習プラザ B11 会場

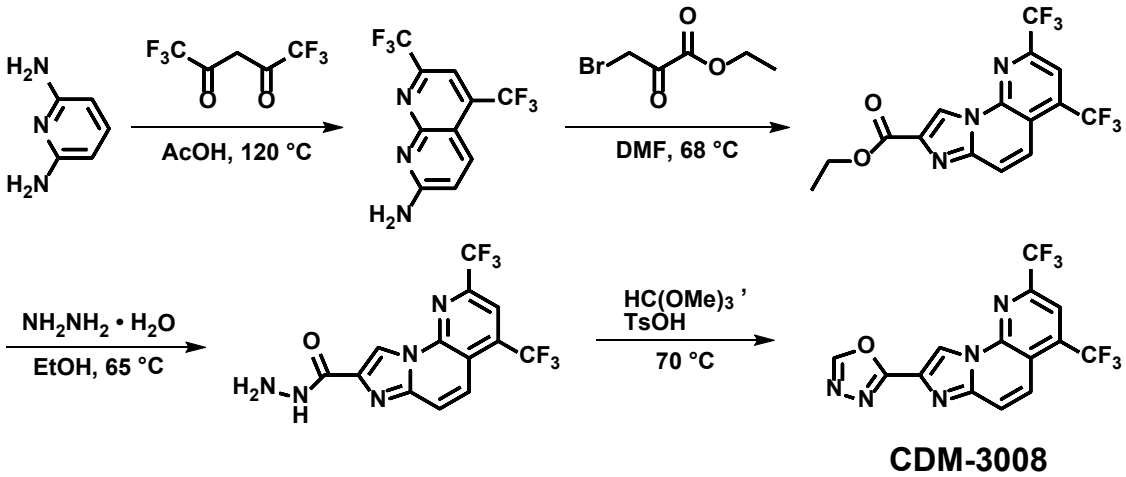
抗体 HBV 活性を有する CDM-3008 のマイクロ波利用合成研究

Study for microwave-supported synthesis of CDM-3008

横江 貴之、○清水 弘樹（産総研生物プロセス）
Takayuki YOKOE, ○Hiroki SHIMIZU (AIST)

CDM-3008 はイミダゾ[1,2-a][1,8]ナフチジン骨格を有する化合物であり、インターフェロン様活性を有し、C型肝炎ウイルス（HCV）抑制効果を有する。近年、京都大学の掛谷、理化学研究所の古谷、小嶋らによって、B型肝炎ウイルス（HBV）の cccDNA（covalently closed circular DNA 完全閉塞本鎖）抑制効果から抗 HBV 活性も有することが報告された。CDM-3008 は 2,6-ジアミノピリジンとヘキサフルオロアセチルアセトンから４工程で合成可能である。本研究ではこれら各段階におけるマイクロ波利用の有効性を検証した。

マイクロ波は主に通信に利用される電磁波帯であるが、電子レンジに利用されている様に、物質を迅速に加熱する作用も有する。1986 年から化学反応における迅速加熱手段としても利用され、反応の迅速化、高収率化などのメリットが得られることが多く報告されている。マイクロ波利用合成機は国内外のメーカーから市販されているが、定在波を利用した電場もしくは磁場の利用や進行波の利用など、マイクロ波の活用法や装置仕様は一様ではない。そのため、反応によっては装置間で効果の得られ方に相違が生じることも報告されている。我々は、マイクロ波利用により CDM-3008 合成における効率化を図ると共に、装置間差についても検証した。



HBV, cccDNA, microwave

発表責任者：清水弘樹（hiroki.shimizu@aist.go.jp）

講演番号：3B11p01
講演日時：3 月 27 日 13:50～ 総合学習プラザ B11 会場

キラル Ni 錯体に対するビニルトシラートの反応

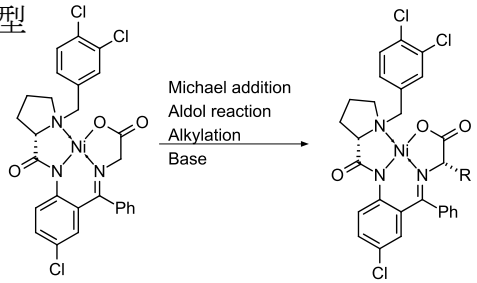
The reaction of vinyl tosylates to chiral Ni ligand

○茂野 優平[1]、今野 博行[1]、森脇 浩樹[2]、ソロショノク ヴァディム[3]([1]山形大院理工、[2]浜理薬品株、[3]バスク大)

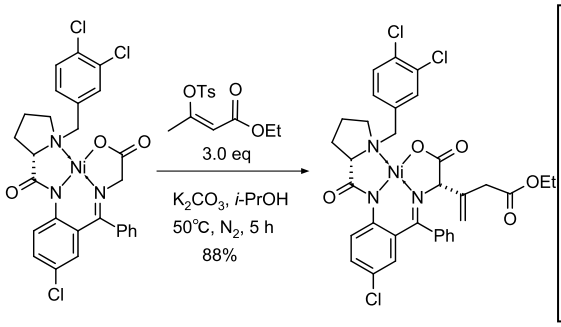
○ Yuhei SHIGENO[1], Hiroyuki KONNO[1], Hiroki MORIWAKI[2], Vadim A. SOLOSHONOK[3] ([1]Yamagata Univ., [2]Hamari Chemicals, Ltd., [3]Basque Univ.)

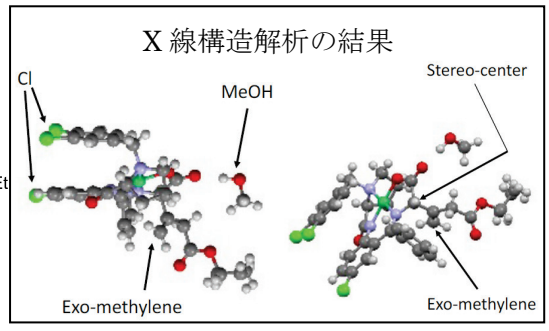
テーラーメードアミノ酸合成はペプチド医薬品の創製に不可欠であり、光学的に純粋で様々な構造を持つ α-アミノ酸の合成研究が活発に行われている。中でもグルタミンやピログルタミン骨格を有する異常アミノ酸が天然物から報告されており、それらの新規合成ルートの確立は構造活性相関研究などにおいて重要である。

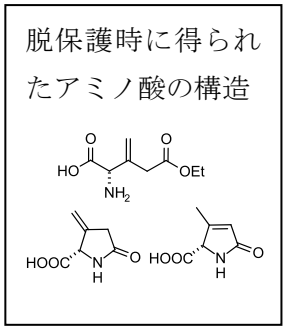
右に示したプロリンとグリシンから容易に調製可能な Schiff 塩基型キラル Ni 錯体は塩基性条件下でいくつかの C-C 結合形成反応が高立体選択的に進行する。その時、α 位の立体化学は錯体上のジクロロベンゼンとクロロベンゼンとの π-π 相互作用により高度に制御され、精製後、酸処理することで光学的に純粋なアミノ酸を得ることができる。



今回演者はキラルNi錯体とビニルトシラートの反応が高収率で進行することを見出した。詳細な解析の結果、この化合物は二重結合が異性化したエキソメチレンを構造に持つNi錯体であった。メタノールで良質な単結晶を得ることに成功したため、X線構造解析を用いて解析をしたところ、ジクロロベンゼンとクロロベンゼンとのπ-π相互作用がα位の立体化学を制御していることが示唆された。その後の酸処理により新規性の高い非天然型アミノ酸を得ることができた。現在、得られたアミノ酸の誘導体化を検討中である。







参考文献　Nian, Y.; Wang, J.; Moriwaki, H.; Soloshonok, V. A. Daton Trans. **2017**, 46, 4191-4198

Tailor-Made Amino Acids Synthesis, Asymmetric Functionalization, Soloshonok Ligand

発表責任者：今野博行（konno@yz.yamagata-u.ac.jp）

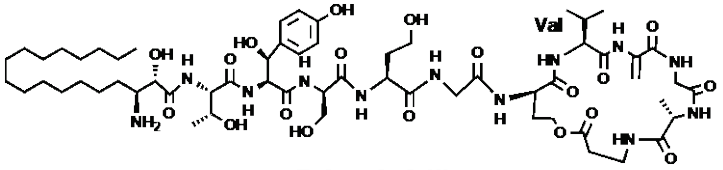
講演番号：3B11p02
講演日時：3 月 27 日 14:01～ 総合学習プラザ B11 会場

ラルストニン A ならびにラルストアミド A の合成研究

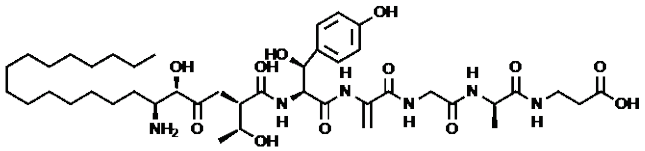
Synthetic study of ralstonin A and ralstoamide A

○今野 博行[1]、大山 貴恵[1]、森脇 浩樹[2]、ソノショノフ バディム[3] ([1]山形大院理工、[2]浜理薬品工業、[3]バスク大学)
○Hiroyuki KONNO[1], Kie OYAMA[1], Hiroki MORIWAKI[2], Vadim SOLOSHONOK[3] ([1]Yamagata Univ., [2]Hamari Chemical Ltd., [3]Univ. of the Basque Country)

[目的] Ralstonin A (1) は *Ralstonia solanacearum* より単離・構造決定されたウンデカペプチドであり、植物青枯病を引き起こす。Ralstonin A (1) は N-末端に Ahod と呼ばれる長鎖アルカンを持つアミノ酸残基や環状デプシ構造内にデヒドロアラニン残基を持つユニークな構造を有している。一方で最近Ralstonin A (1) の構造から4つのアミノ酸が脱落した直鎖ヘプタペプチド Ralstoamide A (2) も単離された。これらは構造的なユニークさを持つにも関わらずその合成研究は行われていない。そこで我々は決定された構造の確認と構造活性相関研究に向け全合成を開始した。



Ralstonin A (1)


Ralstoamide A (2)

[方法と結果] 構成するアミノ酸は Fmoc-固相合成法に適用可能な Fmoc-保護アミノ酸とし、C 末端から順次カップリングを行うことにした。デヒドロアラニン残基は Cys 残基の脱硫反応によって導くことにし、ホモセリン(Hse)はメチオニンから得られると考えた。β-ヒドロキシチロシン(β-OH-Tyr)は不斉ジヒドロキシル化反応を鍵反応に導くことにした。Ahod は Soloshonok リガンドを用いたテーラーメードアミノ酸合成法を活用し、得られた Ahod 誘導体は立体化学の決定に用いた。

β-OH-Tyr の合成：p-ヒドロキシベンズアルデヒドを出発原料に増炭後、不斉ジヒドロキシル化反応によって 2 つの水酸基を立体選択的に導入した。α位の水酸基は立体反転を伴いながらアミノ基に変換した。その後、保護基の架け替えを行うことで Fmoc-β-OH-Tyr(OBn)を得ることができた。

Ahod の合成:Soloshonok リガンドに Ni 存在下グリシンを連結させテンプレートを合成した。その後、$C_{15}H_{31}I$ を用いてジアステレオ選択的にアルキル化を行い、さらに HCl 処理とリガンド除去を行うことで(*S*)-2-aminoheptadecanoic acid を得た。次に、アミノ基を Boc で保護し、カルボン酸をαケト酸に変換した。最後にケトンを還元することで 2 種の Boc-Ahod 誘導体を得ることができた。次にこの 2 種のジアステレオマーを用いて NMR の結合定数から立体化学を決定した。

ペプチド伸長反応：Fmoc-固相合成法を用いて C 末端から順にアミノ酸をカップリングした。環状部分の構築では Hse 側鎖水酸基と C-末端カルボン酸の環状デプシ化を液相中で行うことで反応の進行を確認することができた。

cyclic depsipeptide, tailor-made amino acid synthesis, Fmoc-Solid phase peptide synthesis

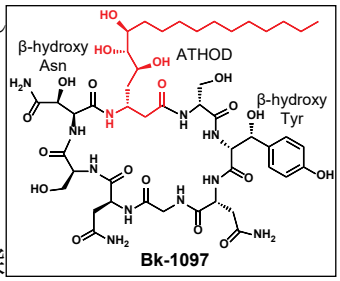
発表責任者：今野博行（konno@yz.yamagata-u.ac.jp）

講演番号：3B11p03
講演日時：3 月 27 日 14:12～ 総合学習プラザ B11 会場

Bk-1097 に含まれる ATHOD の合成とその立体化学の調査

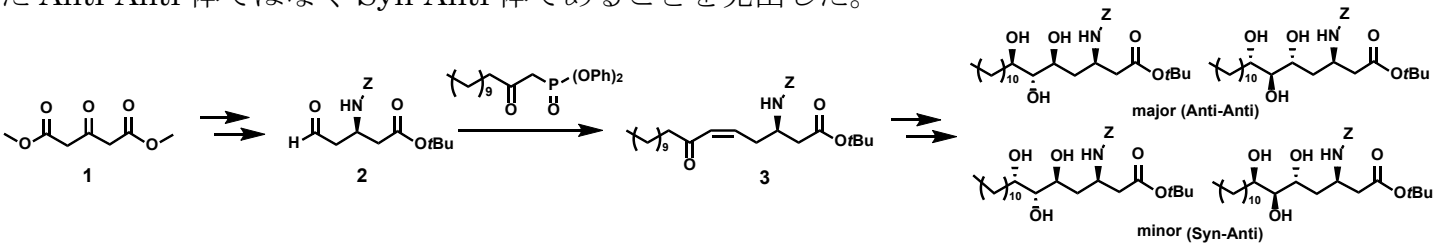
Synthesis of the ATHOD moiety in Bk-1097 and investigation of its absolute stereochemistry

○門脇 斗真、加藤 誠弥、矢野 成和、今野 博行（山形大院理工）
○Toma KADOWAKI, Seiya KATO, Shigekazu YANO, Hiroyuki KONNO (Yamagata Univ.)

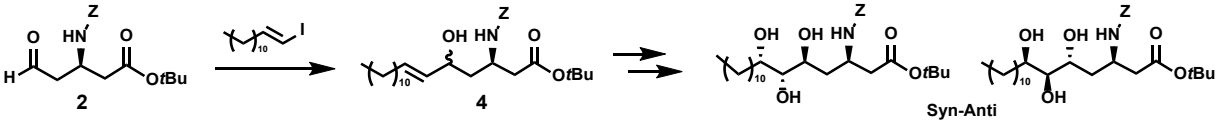


【目的】Burkholdine(Bk)-1097 は、2010 年に Schmidt らによって単離された環状リポペプチドで、異常アミノ酸を含む 8 つのアミノ酸から構成されている。生物活性としては、*S. cerevisiae*、*A. niger* に対して MIC=1.6 μg/mL の抗真菌活性を示し、既存の抗真菌薬 Amphotericin B の数値を上回る高い活性を有す。しかしながら、その作用機序は未解明であり、全合成も達成されていない。本研究室では、より高い抗真菌活性を持つ Bk-1097 類似体の探索、全合成を視野に入れた合成研究、および構造活性相関研究を展開してきた。今回、Bk-1097 の脂肪鎖部分である ATHOD 残基に着目し、その合成と立体化学に関する調査を行った。

【結果と考察】出発原料に Dimethyl 1,3-Acetonedicarboxylate **(1)**を用いて 8 工程で合成したアルデヒド**(2)**に対し、安藤試薬を用いた HWE 反応を行い、Z 体**(3)**を得た。次に OsO_4 触媒存在下ジヒドロキシル化、および $NaBH_4$ 還元を行うことで、保護 ATHOD へと導いた。トリオール部位の立体化学は、NMR データベースを参考にし、Anti：Anti/Anti：Syn = 3：1 であると結論づけた。^{1}H NMR からトリオール部位の立体化学の検証を行ったところ、天然物の ATHOD の立体化学は、予測されていた Anti-Anti 体ではなく Syn-Anti 体であることを見出した。



そこで、minor 成分であった Syn-Anti 型の ATHOD を選択的に合成するために、アルデヒド**(2)**に対して、Dodecanal から 3 工程で合成したヨードアルケンを NHK 反応によりカップリングさせることで、E 体のアルケン**(4)**に導き、その後 OsO_4 触媒存在下ジヒドロキシル化を行うことによって、Syn-Anti 型 ATHOD をジアステレオ選択的に合成することに成功した。現在、合成ルートの最適化および ATHOD の絶対配置の決定に向けて取り組んでいる。



antifungal, cycliclipopeptide, stereochemistry

発表責任者：今野博之（konno@yz.yamagata-u.ac.jp）

講演番号：3B11p04
講演日時：3 月 27 日 14:23～ 総合学習プラザ B11 会場

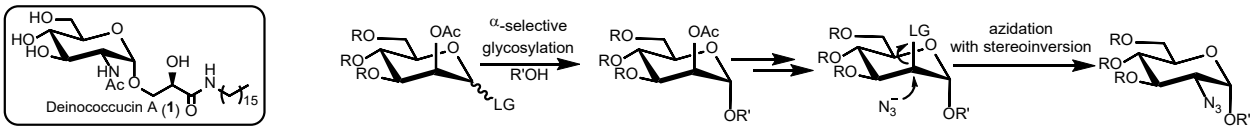
アミノ糖脂質である Deinococcucin A の合成研究

Synthetic study of Deinococcucin A, an aminoglycolipid

○嶋澤 悠希[1]、勝田 亮[2]、矢島 新[2]、額田 恭郎[2]、石神 健[2] ([1]東農大院・農、[2]東農大・生命)
○Yuki SHIMAZAWA[1], Ryo KATSUTA[2], Arata YAJIMA[2], Tomoo NUKADA[2], Ken ISHIGAMI[2] ([1]Graduate School of Agriculture, Tokyo Univ. of Agriculture, [2]Department of Chemistry for Life Sciences and Agriculture, Tokyo Univ. of Agriculture)

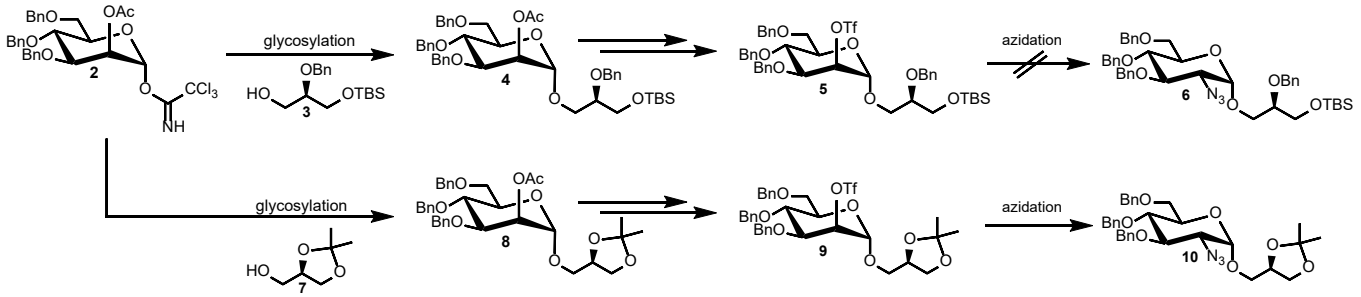
【目的】

Deinococcucin A (**1**)は *Camponots japonicus* の女王アリの腸に存在する *Deinococcus* sp.より単離されたアミノ糖脂質であり、*N*-アセチルグルコサミンに対し長鎖の 2,3-ジヒドロキシプロパン酸アミドが α 結合した構造を持つ。また、deinococcucin A は、キノンレダクターゼ誘導活性を有することから癌に対する新たな化学予防剤のリード化合物として期待されている。しかしながら、本化合物は比較的合成困難なαグリコシド結合を有する*N*-アセチルグルコサミン誘導体であること等から、未だ全合成報告はない。そこで筆者らは、α 選択的な合成経路を経由した deinococcucin A の初の全合成を目的とした。マンノース誘導体に対するα選択的グリコシル化の後に、立体反転を伴うアジドへの変換により、deinococcucin A を合成することとした。



【結果】

D-Mannose を出発原料として 2 位に Ac 基を有する糖供与体 **2** を、D-Mannitol を出発原料として糖受容体 **3** を合成した。糖供与体 **2** と糖受容体 **3** を用いて 2 位 Ac 基の隣接基関与を利用してグリコシル化を行ったところ高収率かつα選択的にマンノース誘導体 **4** を得ることに成功した。続いて立体反転を伴うアジドへの変換に関して反応条件を種々検討したが望むアジ化糖は得られなかった。これはグリセロール部位の保護基の嵩高さが原因であると考察し、糖受容体を単純なアルコール **7** へと変更した結果、アジ化糖 **10** の合成に成功した。アジ化糖 **10** のアセトアミドへの変換も成功しており、現在グリセロール部位の変換、および長鎖のアルキルアミンとの縮合を検討中である。



Deinococcucin A, Aminoglycolipid, Glycosylation

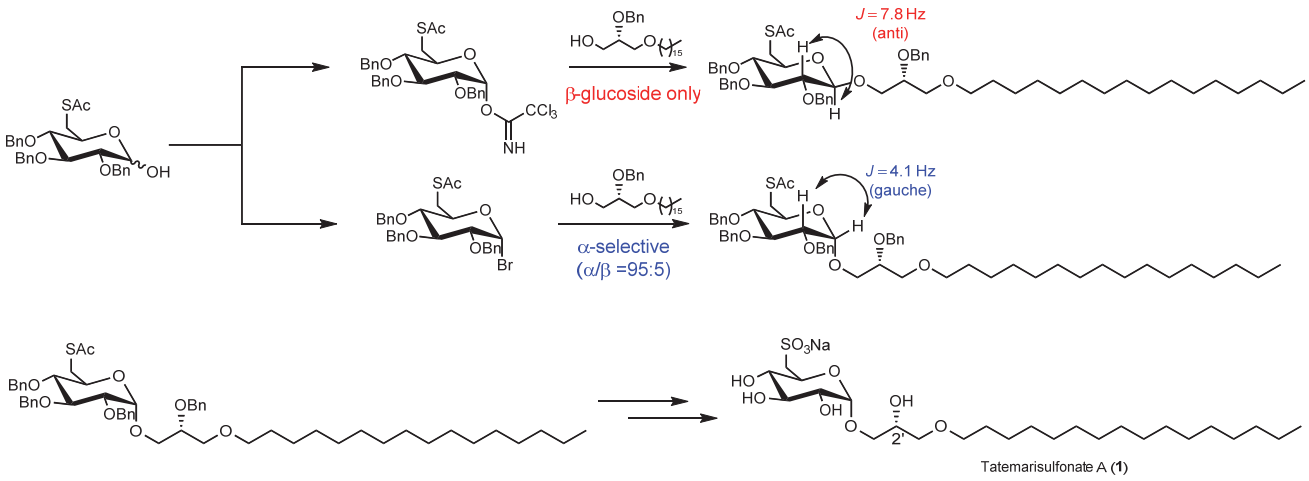
講演番号：3B11p05
講演日時：3 月 27 日 14:34～ 総合学習プラザ B11 会場

Tatemarisulfonate A および異性体の合成研究
Synthetic study of Tatemarisulfonate A and its isomers

○木村 健児[1]、勝田 亮[2]、矢島 新[2]、額田 恭郎[2]、石神 健[2] ([1]東農大院農、[2]東農大生命)
○ Kenji KIMURA[1], Ryo KATSUTA[2], Arata YAJIMA[2], Tomoo NUKADA[2], Ken ISHIGAMI[2] ([1]Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture, [2]Department of Chemistry for Life Sciences and Agriculture, Tokyo University of Agriculture)

【目的】Tatemarisulfonate A はタテヤママリモ(*Aegagropilopsis moravica*)より単離されたスルホキノボースを含有する新規エーテル脂質である。エーテル脂質は動物や微生物から多く単離されるが、植物からの報告例は少ない。またスルホキノボシル化されたグリセリルエーテルは前例が無いことやタテヤママリモは日本の固有種であることから、その起源や生理的意義に興味が持たれる。我々はこの興味深い構造を有するエーテル脂質の合成経路の開発、及び天然物の立体化学の確定を目的とし立体選択的なグリコシル化反応を鍵反応とした全合成研究を行った。

【結果】D-Glucose を出発原料として 6 位にチオアセチル基を有する含硫糖供与体を合成した。次に光学活性な糖受容体であるグリセリルエーテルを合成した。合成した糖供与体と糖受容体を用いて様々なグリコシル化の条件を検討した結果、α 体及び β 体の選択的な合成手法を確立することができた。続くスルホン酸への酸化および脱保護を経て D-Glucose より 11 段階にて tatemarisulfonate A の全合成を完了した。また、糖受容体のエナンチオマーも合成し、同様の変換を行うことで 2'-*epi*-tatemarisulfonate A を、続いて β-グリコシドより β-tatemarisulfonate A および 2'-*epi*-β-tatemarisulfonate A の合成も行った。天然物と各種合成品の NMR スペクトルを比較することにより天然物の立体化学を確定することができた。



Tatemarisulfonate A, Ether lipid, Glycosylation

発表責任者：石神健（ki206171@nodai.ac.jp）

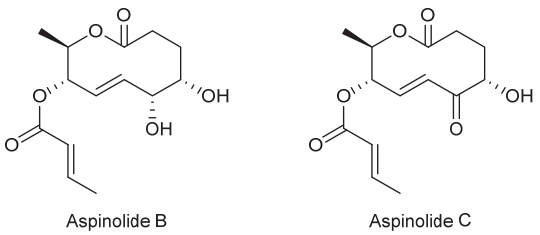
講演番号：3B11p06
講演日時：3 月 27 日 14:45～ 総合学習プラザ B11 会場

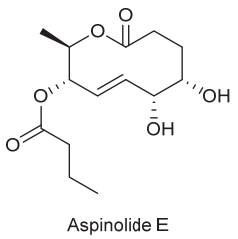
Aspinolide 類の合成研究

Synthetic study of aspinolides

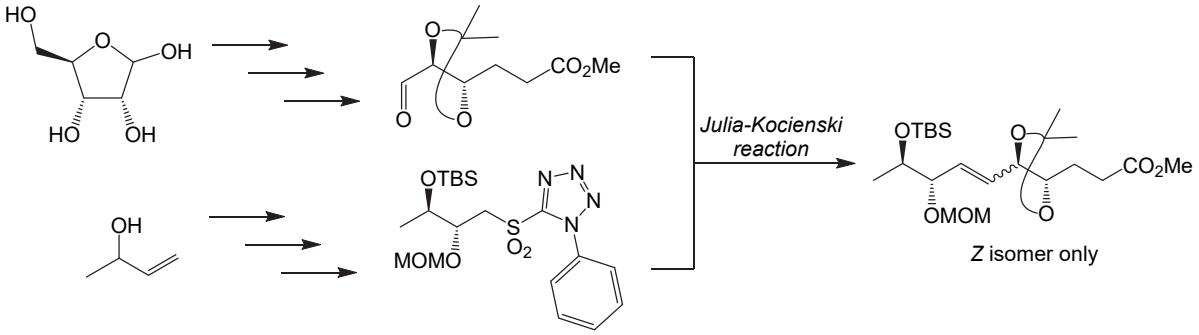
○武田 圭太[1]、勝田 亮[2]、矢島 新[2]、石神 健[2]、額田 恭郎[2] ([1]東農大院・農、[2]東農大・生命)
○ Keita TAKEDA[1], Ryo KATSUTA[2], Arata YAJIMA[2], Ken ISHIGAMI[2], Tomoo NUKADA[2] ([1]Graduate School of Agriculture, Tokyo Univ. of Agriculture, [2]Department of Chemistry for Life Sciences and Agriculture, Tokyo Univ. of Agriculture)

【目的】Aspinolide B は *Aspergillus ochraceus* から単離された高度に官能基化された十員環ラクトンである。十員環ラクトン類には興味深い生物活性を示す化合物が多いことから、本化合物も 1996 年に単離が報告されて以来、幾度となく研究の対象となってきた。全合成についてはこれまでに 4 例報告されているが、立体選択性、収率などに改善の余地がある。以上のことから今回、筆者は後年に報告された aspinolide 類化合物の合成を計画し、その嚆矢として Julia-Kocienski 反応を鍵とした aspinolide B の効率的な合成経路の確立を目的として研究を行った。





【結果】D-ribose から誘導したアルデヒド、アリルアルコールから誘導したスルホンを用いた Julia-kocienski 反応による環化前駆体の合成を検討した。この結果、目的の(*E*)体は得られず、(*Z*)体をもつ化合物のみを与えた。現在は Julia-Lythgoe 反応による(*E*)体の合成を検討している。



Aspinolide B, Total synthesis, Decanolide

講演番号：3B11p07
講演日時：3 月 27 日 15:06～ 総合学習プラザ B11 会場

バラの重要香気成分である DAMASCENOLIDE の類縁体合成と香気特性

Analog synthesis of DAMASCENOLIDE, an important aroma component of roses, and their aroma characteristics.

○宮澤 和[1,2]、大橋 輝久[1]、川口 賢二[1]、田中 尚子[1]、勝田 亮[2]、矢島 新[2]、額田 恭郎[2]、石神 健[2]（[1]長谷川香料（株）、[2]東農大・生命）
○Yamato MIYAZAWA[1,2], Teruhisa OHASHI[1], Kenji KAWAGUCHI[1], Naoko TANAKA[1], Ryo KATSUTA[2], Arata YAJIMA[2], Tomoo NUKADA[2], Ken ISHIGAMI[2] ([1]T. Hasegawa Co., Ltd., [2]Department of Chemistry for Life Sciences and Agriculture, Tokyo Univ. of Agriculture)

【目的】我々のグループはバラ（*Rosa damascena*）の重要香気成分としてシトラス様香気を有する 4-(4-methylpent-3-en-1-yl)-2(5*H*)-furanone（DAMASCENOLIDE®, **1**）を見出したことを報告している[1)]。化合物 **1** には「バラに天然感を付与する効果」や「紅茶の茶葉感を増強する効果」などが見出されており、非常に期待度の高い香料化合物である。我々はさらに優れた香料化合物の開発を目的とし、化合物 **1** の類縁体を種々合成し香気評価をすることにした。

【方法・結果】化合物 **1** の二重結合に着目し、二重結合に関する類縁体を種々合成することにした。標的化合物を Figure 1 に示す。化合物 **2**～**6** は化合物 **1** の側鎖部分の二重結合に関する異性体、化合物 **7**～**12** は化合物 **1**～**6** に対応する 2(3*H*)-フラノン異性体、化合物 **13**～**17** は化合物 **1** の酸化体および還元体である。これらを合成し香気評価を行った結果、二重結合の位置、有無によって香気が大きく変化することがわかったので、その詳細を報告する。

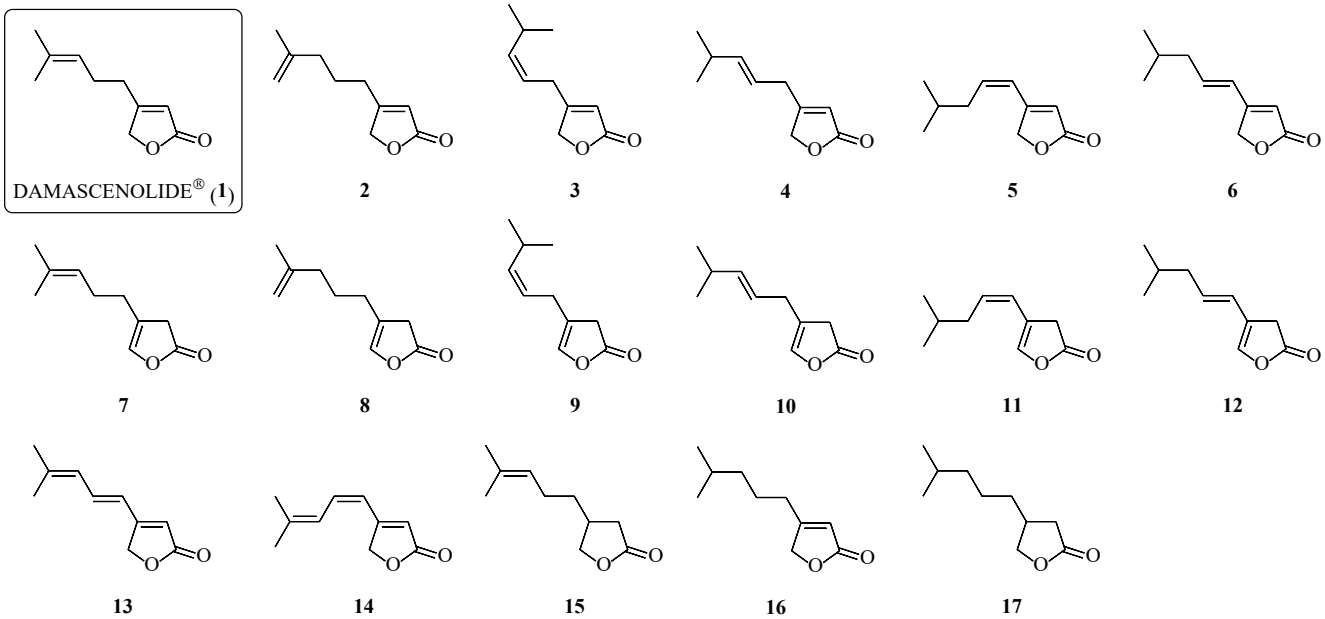


Figure 1. DAMASCENOLIDE®と標的化合物の構造

1) Ohashi, T.; Miyazawa, Y.; Ishizaki, S.; Kurobayashi, Y.; Saito, T. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 7410-7415.

DAMASCENOLIDE, Analog synthesis, Structure-odor relationship

発表責任者：宮澤　和（yamato_miyazawa@t-hasegawa.co.jp）

講演番号：3B11p08
講演日時：3 月 27 日 15:17～ 総合学習プラザ B11 会場

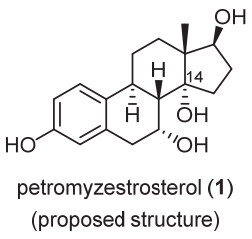
ウミヤツメのフェロモン様物質ペトロマイゼストロステロールの合成研究

Synthetic studies on petromyzestrosterol, a parapheromone isolated from sea lamprey

○河合 真穂、西川 俊夫、中崎 敦夫 (名大院生命農)
○Maho KAWAI, Toshio NISHIKAWA, Atsuo NAKAZAKI (Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University)

Petromyzestrosterol (**1**) は、オスのウミヤツメから単離された酸化型ステロイドであり、同種のメスの嗅上皮を刺激するフェロモン様物質である(Figure 1)[1]。その構造は各種NMR、MSの解析によって提唱されたが、14位ヒドロキシ基の相対立体配置に関しては、類似の構造を有するステロイドとの14位の^{13}C-NMRの化学シフトを比較することにより、α配向であるとする推定にとどまっている。そこで我々は、14位に関する両エピマー**1**及び*epi*-**1**を合成し、NMRスペクトルの比較によってpetromyzestrosterolの構造を決定することとした。

はじめに *epi*-**1** の合成を目指し、当研究室で開発した手法[2]を用いてその基本骨格を持つ **5** の合成に着手した(Scheme 1)。ソルビン酸エチルから 7 工程で合成したラセミ体の CD 環セグメント **2** とブロモフェノール **3** との Mizoroki-Heck 反応により **4** を単一の立体異性体として得た。**4** に対しラクトンの還元や Friedel-Crafts 型脱水環化を行い **5** へと変換した後、7 位への面選択的な酸素官能基の導入や脱メチル化により *epi*-**1** の合成に成功した。本大会では、合成した *epi*-**1** と天然物のスペクトルデータの比較も含めて報告する。



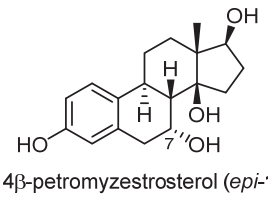
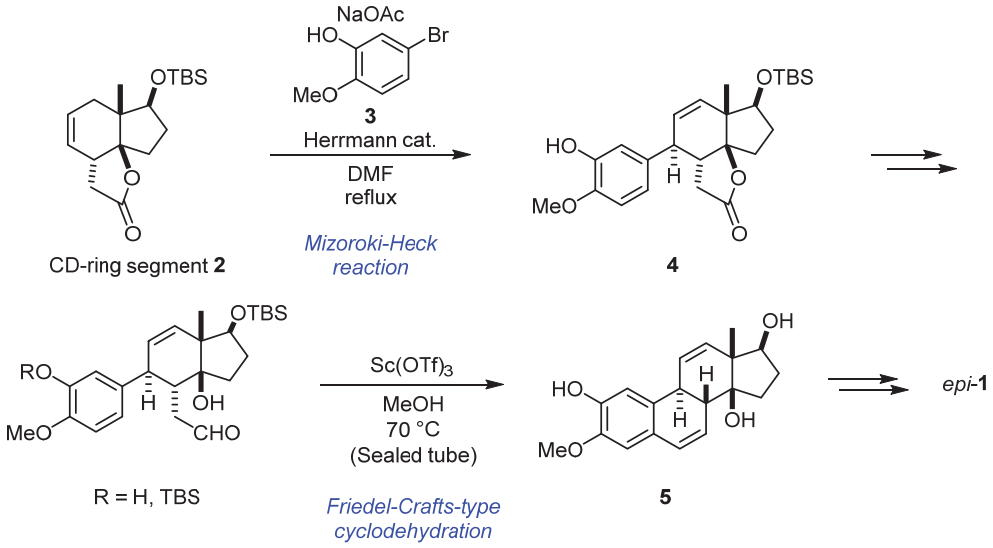


Figure 1



Scheme 1. Synthesis of *epi*-**1**

References

1. Li, K; Siefkes, J. M; Brant, O. C; Li, W. *Steroids* **2012**, *77*, 806.
2. Nakazaki, A.; Hashimoto, K.; Ikeda, A.; Shibata, T.; Nishikawa, T. *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 9097.

structural determination, oxygenated steroids, total synthesis

講演番号：3B11p09
講演日時：3 月 27 日 15:28～ 総合学習プラザ B11 会場

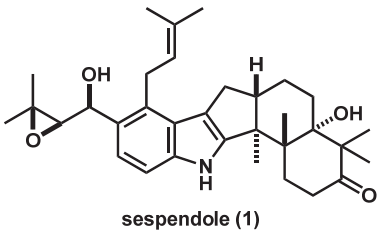
多環テルペンインドールの新合成法

A new synthetic route of polycyclic terpene indoles

○山口 将司、小野 義貴、樋口 恵子、杉野 公美、中崎 敦夫、西川 俊夫 (名大院生命農)
○Masashi YAMAGUCHI, Yoshiki ONO, Keiko HIGUCHI, Kumi SUGINO, Atsuo NAKAZAKI, Toshio NISHIKAWA (Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University)

【背景・目的】

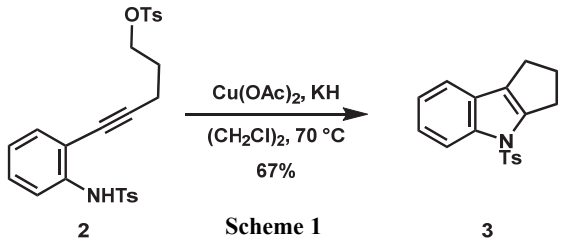
自然界には多くのテルペンインドールアルカロイド類が存在し、中でも、sespendole (**1**)などの多環インドール骨格を持った化合物は、そのユニークな構造的特徴と興味深い生物活性から注目を浴びている。しかし、これらの多環インドールアルカロイドの骨格合成法は極めて限られている。そこで、本研究では上記アルカロイド群の収束的合成を可能にする多環インドール骨格の新たな合成ルートの開発を目的とした。



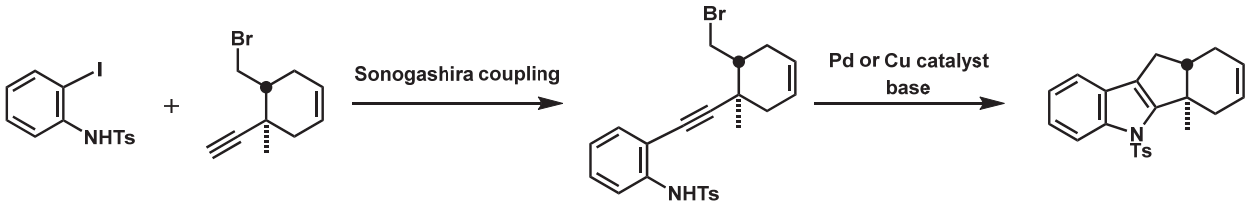
sespendole (1)

【方法・結果】

Hiroya らは、過剰量の強塩基存在下で銅触媒を作用させることで、*N*-Ts-アルキニルアニリド **2** から一段階で三環性のインドール化合物 **3** を合成できると報告した[1] (Scheme 1)。この反応を参考にして、シクロヘキサンを有した基質の環化によって四環性化合物の合成を目指した。まず、*N*-Ts-ヨードアニリド **4** とシクロヘキサン骨格上に脱離基を有するアセチレン **5** の Sonogashira Coupling により、環化前駆体 **6** を調製した。本化合物を用いて種々検討した結果、銅及びパラジウム触媒を用いると、望む連続環化反応が進行し、収率良く化合物 **7** を与えることを見出した(Scheme 2)。現在、反応条件の最適化と基質一般性を調べている。



2 Scheme 1 3



4 5 6 7

Scheme 2

1) Hiroya, K.; Itoh, S.; Sakamoto, T. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 1126-1136.

natural products, polycyclic terpene indoles, cascade reaction

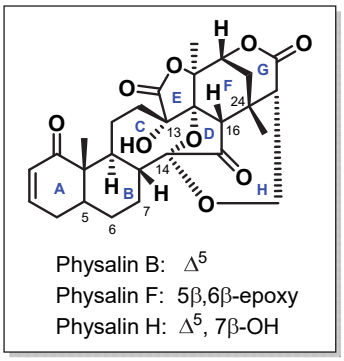
講演番号：3B11p10
講演日時：3 月 27 日 15:39～ 総合学習プラザ B11 会場

フィサリンの合成研究
Synthetic Studies on Physalins

○新木 悠介、西川 俊夫 (名大院生命農)
○Yusuke ARAKI, Toshio NISHIKAWA (Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University)

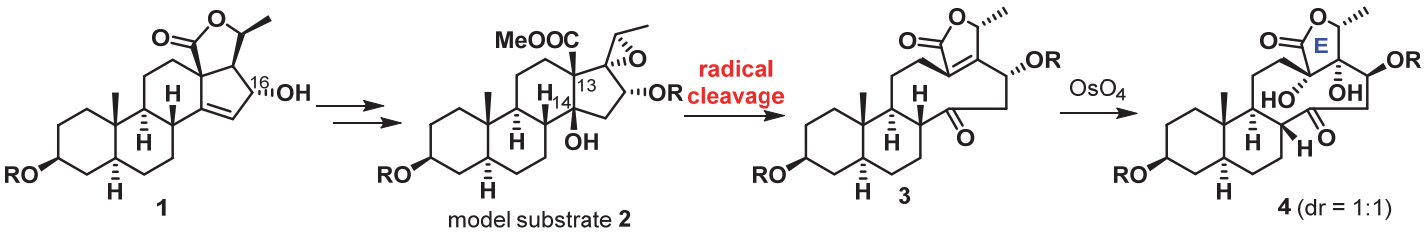
【背景と目的】

フィサリン（Physalin）はナス科植物・ホオズキより苦味成分として単離されたステロイド系天然物であり [1]、約 20 種類以上の類縁体が発見されている。その構造は、ステロイド骨格が高度に修飾された、他に類を見ない複雑なものである。その特徴として[1]ステロイド C13-14 結合が開裂してできる炭素九員環を有すること、[2]高度に酸化された CDE 環を持つこと、[3]ステロイド C16 と側鎖 C24 に新しい炭素炭素結合が形成されていること、などが挙げられる。この複雑な構造のため、構造決定から約 50 年が過ぎた今日でもフィサリンの全合成は報告されていない。そこで本研究では、フィサリンの世界初の全合成を目的とし、フィサリンの特異な CDE 環の構築法を確立することとした。



【方法と結果】

文献既知のステロイド **1**[2]を原料とし、10 工程でモデル基質 **2** を合成した。この **2** の 14 位水酸基からアルコキシラジカルを発生させると、目的の C13-C14 結合がラジカル的に開裂し、さらにエポシキドの開環、ラクトン形成が一挙に進行し **3** を与えた。続いて、OsO_4 を用いたジヒドロキシル化によりフィサリンの CDE 環に対応するジオール **4** (dr = 1:1)の合成に成功した。



Reference
1) T. Matsuura, M. Kawai, R. Nakashima, Y. Butsugan, *Tetrahedron Lett.* **14**, 1083 **(**1969).
2) J. Gui, D. Wang, W. Tian, *Angew. Chem. Int. Ed.* **50**, 7093 (2011).

Steroids, Natural product synthesis, Radical reaction

講演番号：3B11p11
講演日時：3 月 27 日 15:50～ 総合学習プラザ B11 会場

プルミスクレリン A の合成研究

Synthetic Studies on Plumisclerin A

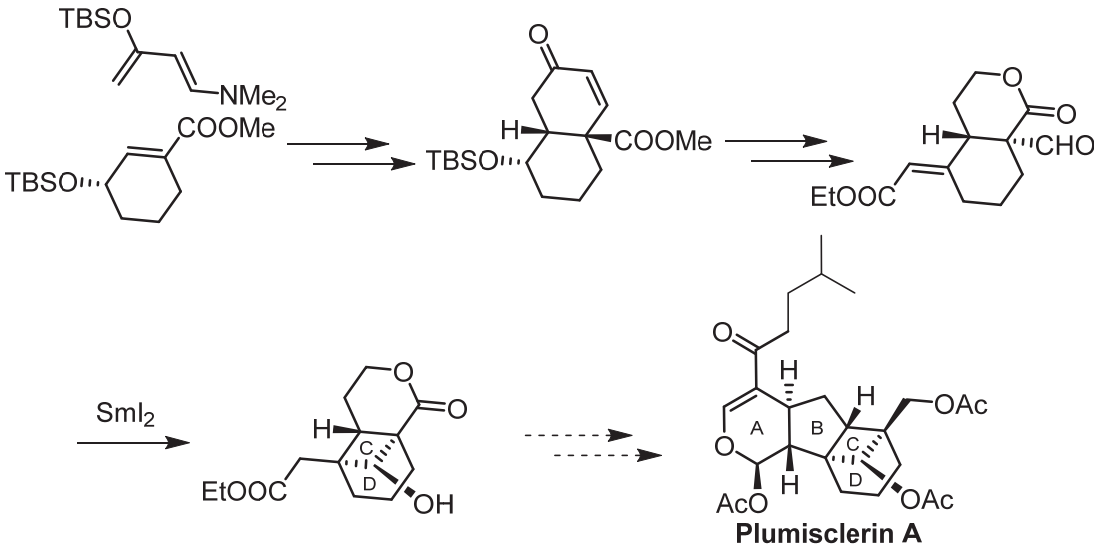
○柴田 将貴[1]、西川 俊夫[1]、安立 昌篤[1,2] ([1]名大院生命農、[2]東北大院薬)
○ Masataka SHIBATA[1], Toshio NISHIKAWA[1], Masaatsu ADACHI[1,2] ([1]Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, [2]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University)

【目的】

プルミスクレリン A[1)] は、軟体サンゴから単離されたジテルペンで、ヒト腫瘍細胞に対する細胞毒性がある。その構造は歪んだシクロブタンを含む BCD 環および、 トランス縮環したジヒドロピラン(A 環)とシクロペンタン(B 環)からなる非常に複雑なものである。我々は、ソラノエクレピン A の合成研究途上で歪んだシクロブタンを構築するために見出されたヨウ化サマリウム(SmI_2)を用いたラジカル環化反応[2)]で、プルミスクレリン A の歪んだ多環構造を構築することを目的とした。

【方法・結果】

シクロヘキセン **1** と Rawal ジエン **2** を原料とした Diels-Alder 反応と続く、数段階の変換によって、ラジカル環化反応前駆体のアルデヒド **4** を合成した。その後、ヨウ化サマリウムを用いた反応を検討し、目的のシクロブタン **5** を得た。本大会では、その詳細について報告する。



references

1) Reyes, F. *et al. Org. Lett.* **2010**, *12*, 912.
2) Komada, T. *et al. Chem. Lett.* **2012**, *41*, 287.

plumisclerin A, natural product, synthesis

講演番号：3B11p12
講演日時：3 月 27 日 16:01～ 総合学習プラザ B11 会場

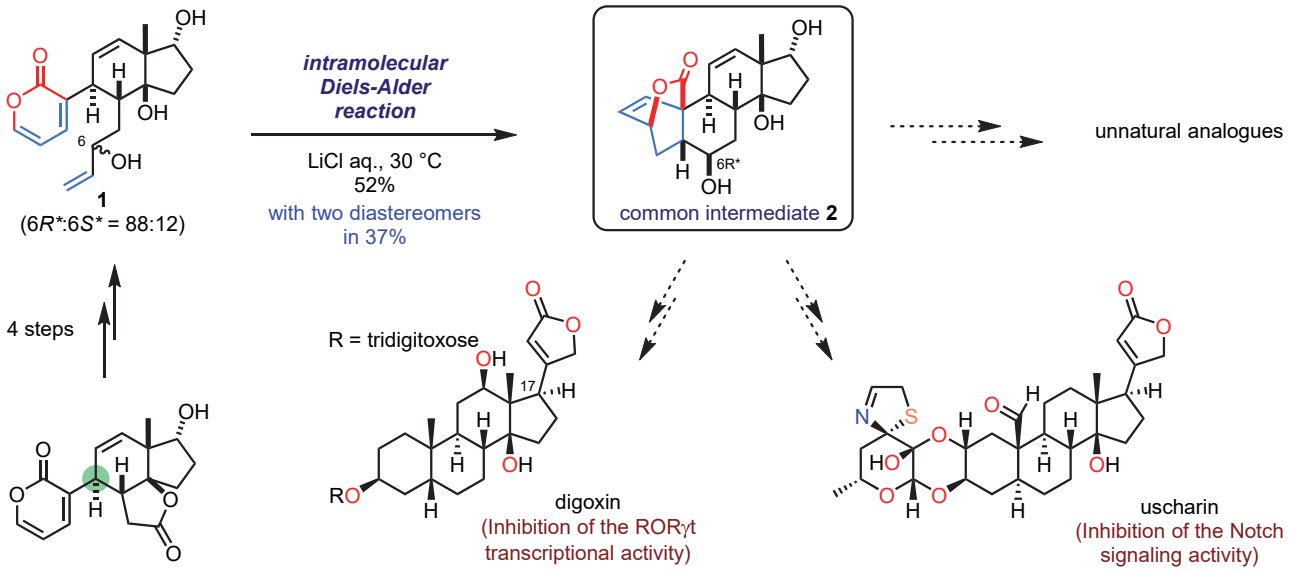
強心ステロイド類の新規な自在合成法の開発

A new divergent synthesis of cardiotonic steroids

○渡邉 正悟、西川 俊夫、中崎 敦夫 (名大院生命農)
○Shogo Watanabe, Toshio Nishikawa, Atsuo Nakazaki (Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University)

強心ステロイドは、Na^+/K^+-ATPase に対する強力な阻害剤である一方で、自己免疫疾患[1]や神経変性疾患[2]などの特定の疾患に対する医薬シーズとして注目されている。我々は、種々の天然型・非天然型の類縁体を化学合成により容易に供給できれば、創薬や生命科学分野での本化合物群を用いた基礎研究の推進、および、当該分野の発展に貢献できると考えた。そこで本研究では、強心ステロイド類の新規自在合成法の開発に着手した。

我々はこれまでに、水溶媒中での **1** の分子内 Diels-Alder 反応を鍵としてステロイド骨格の構築に成功している(Scheme 1)[3]。得られた化合物 **2** は、アルケンや水酸基などの官能基化の足掛かりを各環に有することから、汎用性の高い共通中間体として期待される。本発表では、共通中間体 **2** を起点とした様々な誘導体合成を検討したのでその結果を報告する。



Scheme 1

[1] Huh, J. R. *et al. Nature* **2011**, *472*, 486.

[2] Arai, A. M.; Ishibashi, M. *et al. J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 2453.

[3] a) Watanabe, S., Nishikawa, T., Nakazaki, A. *Org. Lett.* **2019**, *21*, 7410.

b) 渡邉正悟、西川俊夫、中崎敦夫 日本農芸化学会 2019 年度大会, 4D4a06.

cardiotonic steroid, total synthesis, divergent synthesis

講演番号：3B11p13
講演日時：3 月 27 日 16:21～ 総合学習プラザ B11 会場

強心ステロイドの不飽和ラクトン部位の新規構築法の開発

A new synthetic approach to construct unsaturated lactones of cardiotonic steroids

○松村 泰志、西川 俊夫、中崎 敦夫 (名大院生命農)
○ Taishi MATSUMURA, Toshio NISHIKAWA, Atsuo NAKAZAKI (Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University)

強心ステロイドは、植物や両生類などから単離された酸化型ステロイドである(Figure 1B)。その生物活性は、動物の膜タンパク質である Na^+/K^+-ATPase に対する強力な阻害活性に加えて、自己免疫疾患の改善作用などが報告されており、近年その重要性が見直されている。一方、ほ乳類の組織からも強心ステロイド群が見出されており、内因性ジギタリス様物質（Endogenous Digitalis-Like Factor, EDLF）と呼ばれている[1]。その多くは極微量しか得られないため、限られた構造情報から構造が推定されているのみである。強心ステロイドの効率的な合成法の開発は、強心ステロイドを利用した生命科学の基礎研究や EDLF の構造解明を推進する上で重要である[2]。そこで我々は、強心ステロイドの 17 位に置換した不飽和ラクトンの新規構築法の開発を目指した。

強心ステロイドは 17 位の不飽和ラクトンの違いにより二種類に大別される。2-ピロンを持つブファジエノリドおよびブテノリドを持つカルデノリドである。今回、これらの不飽和ラクトンをアルキン前駆体 **1** から合成する計画を立案した(Figure 1A)。本発表では、モデル基質を用いた検討の詳細について報告する。

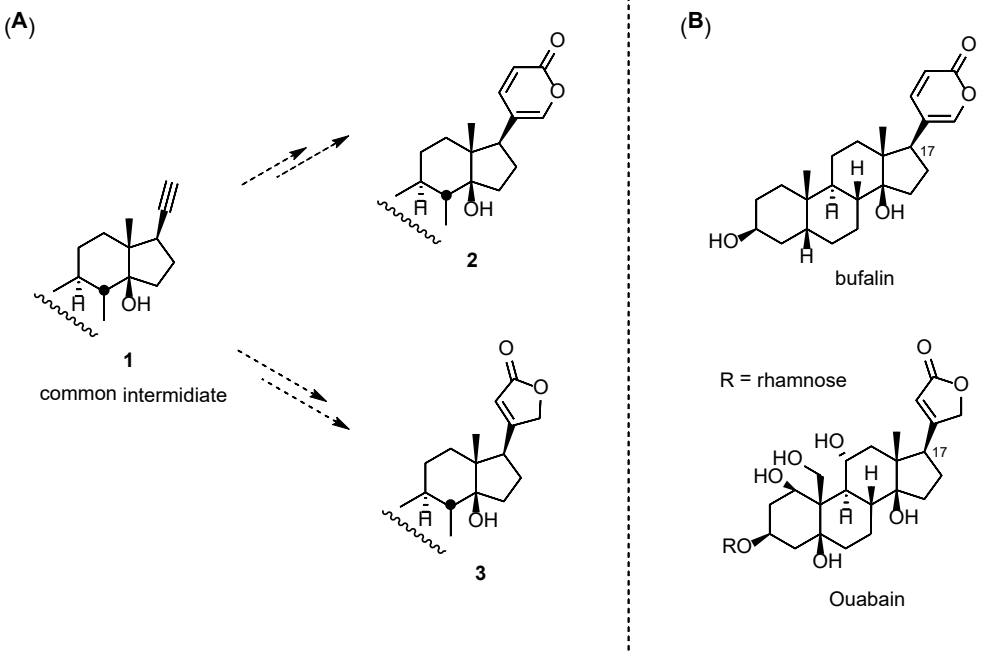


Figure 1. (**A**) General scheme. (**B**) Structures of bufadienolide and cardenolide.

References: [1] Lichtstein, D. *et al. Life Sci.* **2007**. *80*, 2093.
[2] (a) Watanabe, S.; Nishikawa, T.; Nakazaki, A. *Org. Lett*. **2019**. *21*, 7410. (b) Nakazaki, A.; Hashimoto, K.; Ikeda, A.; Shibata, T.; Nishikawa, T. *J. Org. Chem*. **2017**. *82*, 9097.
(c) 松村泰志、西川俊夫、中崎敦夫 日本農芸化学会 2019 年度大会, 4D4a07.

total synthesis, cardiotonic steroid, endogenous digitalis-like factor

発表責任者：松村泰志（matsumura.taishi@b.mbox.nagoya-u.ac.jp）

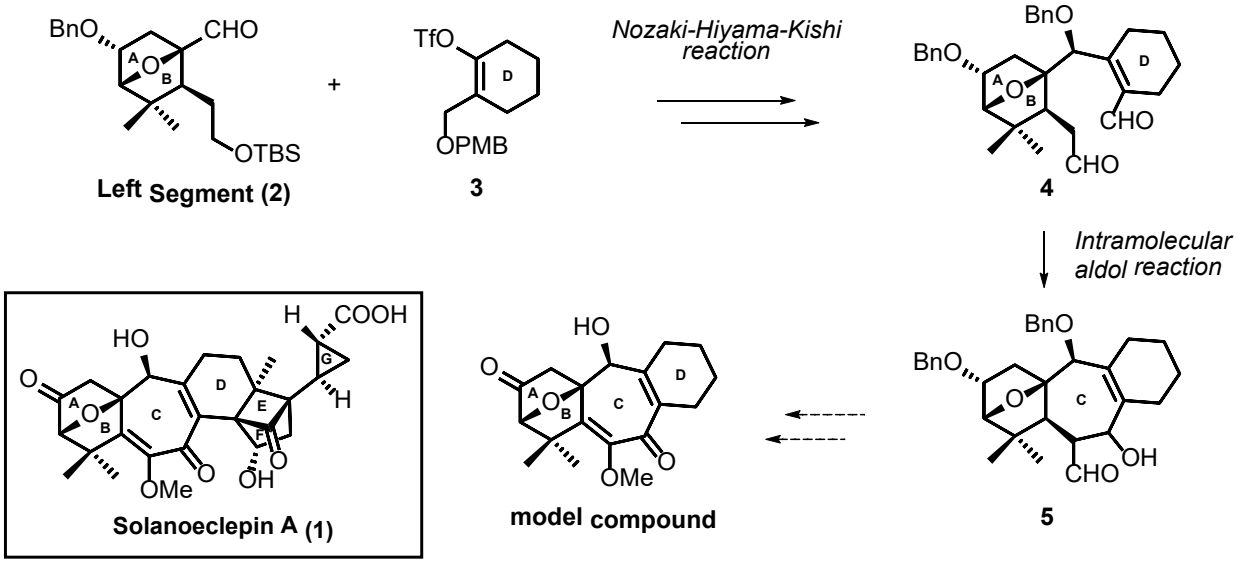
講演番号：3B11p14
講演日時：3 月 27 日 16:32～ 総合学習プラザ B11 会場

ジャガイモシスト線虫孵化促進物質ソラノエクレピンＡのＡＢＣＤ環部分の合成研究

Synthetic Studies on ABCD ring moiety of Solanoeclepin A, a Hatching Agent of Potato Cyst Nematode

○立松 怜史[1]、安立 昌篤[2]、西川 俊夫[1] ([1]名大院生命農、[2]東北大院薬)
○ Satoshi TATEMATSU[1], Masaatsu ADACHI[2], Toshio NISHIKAWA[1] ([1]Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, [2]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University)

【目的】ソラノエクレピン A(**1**)は、ジャガイモシスト線虫に対する孵化促進活性を持つ天然有機化合物であり、農薬の新規リード化合物として期待されている。しかし、天然から極微量しか得られないため、その生理活性の作用機構は未だ明らかとなっておらず、そのためにも化学合成による量的供給が必要とされている。我々は、収束的な合成法によって **1** を全合成するため、オキサビシクロ[2.2.1]ヘプタノン骨格を持つ左セグメントとトリシクロ[5.2.1.$0^{1,6}$]デカン骨格を持つ右セグメントを連結し、合成終盤で 7 員環(C 環)を構築する合成法を計画した。本大会では、モデル化合物を用いて行った左右のセグメントの連結法と 7 員環(C 環)の構築について発表する。
【方法・結果】前年度大会にて合成を報告した左セグメント **2**[1)]と D 環セグメント **3** を野崎-檜山-岸反応により連結し、さらに数工程の変換でジアルデヒド **4** を合成した。その後、分子内アルドール反応を行うことで 7 員環(C 環)を構築し化合物 **5** の合成に成功した。



1）立松怜史、安立昌篤、西川俊夫, 日本農芸化学会 2019 年度大会 1D4p04.

solanoeclepin A, natural product synthesis, intramolecular aldol reaction

発表責任者：立松怜史（tatematsu.satoshi@e.mbox.nagoya-u.ac.jp）

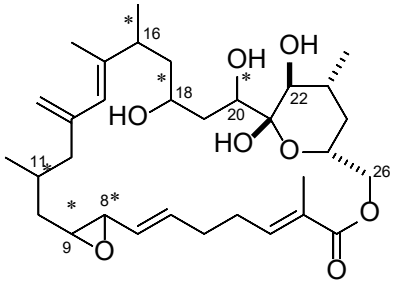
講演番号：3B11p15
講演日時：3 月 27 日 16:43～ 総合学習プラザ B11 会場

アンフィジノリド L の合成研究

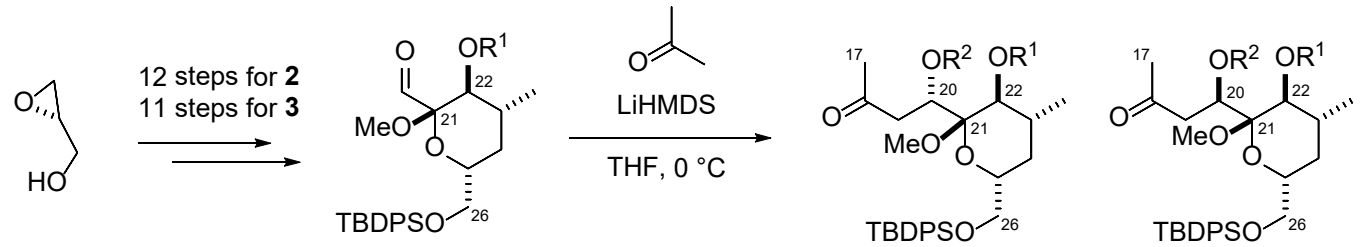
Synthetic study of Amphidinolide L

○小泉 潤[1]、深谷 圭介[1,2]、占部 大介[1,2] ([1]富山県大工、[2]富山県大・生医工研セ)
○Jun KOIZUMI[1], Keisuke FUKAYA[1,2], Daisuke URABE[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]Biotechnol. Res. Cent., Toyama Pref. Univ.)

アンフィジノリド L は、渦鞭毛藻 *Dinophysis acuminata* から単離された 27 員環マクロリドである[1]。強力ながん細胞増殖阻害活性を有することから、抗がん剤リードとして期待されるものの、天然からごく微量にしか得られず、一部の立体化学(C8, 9, 11, 16, 18, 20 位)が未決定である。そこで我々は、いずれの立体異性体も合成可能な立体制御全合成による完全構造決定を計画した。今回、立体化学が明らかなピラン環を含む C21-C26 フラグメントをまず合成し、その後、C22 位のヒドロキシ基を利用した C-C 結合形成により、C20 位の立体化学を構築する計画を立てた。



(−)-グリシドール(**1**)を出発原料として 12 工程で C21-C26 フラグメント **2** を合成した[2]。続いて、アセトンとのアルドール反応をモデルとして **2** からの増炭を検討した。その結果、THF 溶媒中アセトンと LiHMDS より生じたエノラートを **2** に対して作用させると、ジアステレオマー比 1.0:3.5 で C17-C26 フラグメント **4b** が主生成物として得られたことが分かった。一方で、別途合成した C21-C26 フラグメント **3** を基質に用いて、同一条件下でアルドール反応を試みたところ、ジアステレオマー比 1.7:1.0 で C17-C26 フラグメント **5a** を主生成物として与えた。以上の結果から、C22 位ヒドロキシ基の保護基の有無により、C20 位の立体化学が制御可能であることを示した。



1

2: R^1 = TES

3: R^1 = H

4a: R^1 = H, R^2 = TES

4b: R^1 = H, R^2 = TES

5a: R^1 = H, R^2 = H

5b: R^1 = H, R^2 = H

1) Kobayashi, J. *et al. J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 3734. 2) 日本農芸化学会 2019 年度大会, 3D4A04.

total synthesis, synthetic organic chemistry, natural product chemistry

発表責任者：占部大介（urabe@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：3B11p16
講演日時：3 月 27 日 16:54～ 総合学習プラザ B11 会場

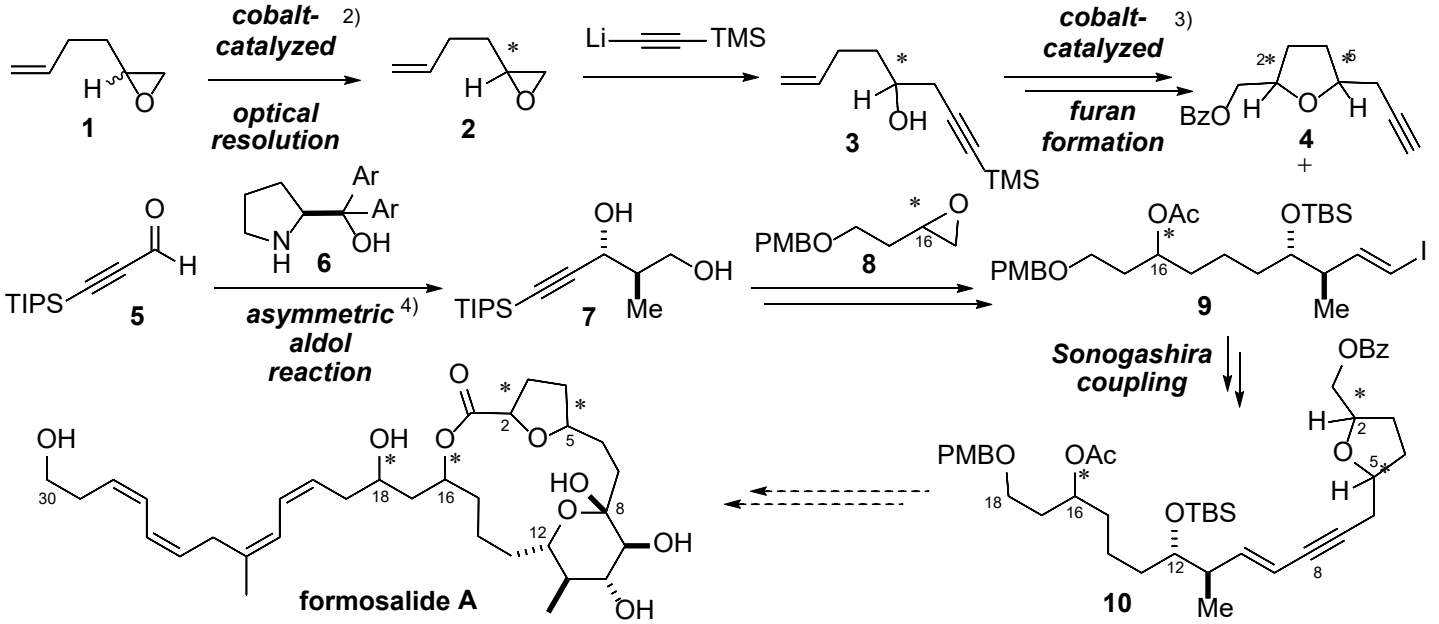
ホルモサリド A の合成研究

Synthetic study of Formosalide A

○茂住 梨紗[1]、深谷 圭介[1,2]、占部 大介[1,2] ([1]富山県大工、[2]富山県大・生医工研セ)
○Risa MOZUMI[1], Keisuke FUKAYA[1,2], Daisuke URABE[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]Biotechnol. Res. Cent., Toyama Pref. Univ.)

ホルモサリド A は、海洋性渦鞭毛藻 *Prorocentrum* sp.より単離された 17 員環マクロリドである[1)]。白血病細胞と結腸腺ガン細胞に対する細胞毒性を有する一方で、C2, 5, 16, 18 位の立体化学が未決定であり、全合成による完全な構造決定が望まれている。我々は既に DFT による高精度 NMR 計算を利用して不明な立体化学を推定している。本研究では立体制御反応により推定構造を合成することで構造を決定する計画を立てた。

まず、エポキシド **1** から Jacobsen らによる条件[2)]で光学活性エポキシド **2** を誘導した。末端アルキンと連結して得られた **3** からコバルト触媒を用いた酸化的環化[3)]により **4** を誘導した。また、林らの不斉アルドール反応[4)]を用いて、アルデヒド **5** からジオール **7** を合成した後、エポキシド **8** とカップリングし、ヨウ化ビニル **9** を得た。**9** をテトラヒドロフラン環 **4** と薗頭カップリングし、エンイン **10** を得ることに成功した。



1) Lu, C.-K.; Chen, Y.-M.; Wang, S.-H.; Wu, Y.-Y.; Cheng, Y.-M. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 1825. 2) Schaus, S. E.; Brandes, B. D.; Larrow, J. F.; Tokunaga, M.; Hansen, K. B.; Gould, A. E.; Furrow, M. E.; Jacobsen, E. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1307. 3) Palmer, C.; Morra, N. A.; Stevens, A. C.; Bajtos, B.; Machin, B. P.; Pagenkopf, B. L. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 5614. 4) Hayashi, Y.; Kojima. M.; Yasui, Y.; Kanda, Y.; Mukaiyama, T.; Shomura, H.; Nakamura, D.; Ritmaleni; Sato, I. *ChemCatChem* **2013**, *5*, 2887.

total synthesis, synthetic organic chemistry, natural product chemistry

発表責任者：占部大介（urabe@pu-toyama.ac.jp）

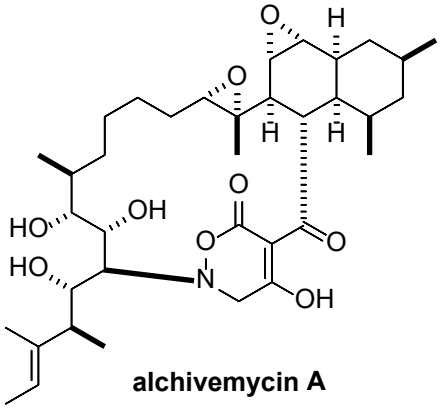
講演番号：3B11p17
講演日時：3 月 27 日 17:05～ 総合学習プラザ B11 会場

アルキベマイシン A の合成研究

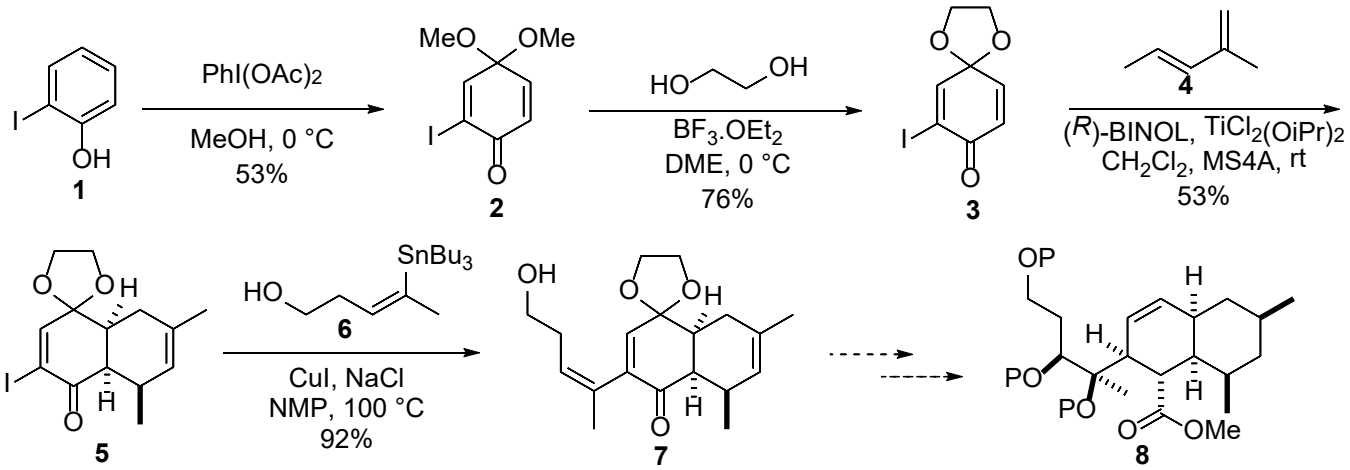
Synthetic study of Alchivemycin A

○印藤 寛二[1]、深谷 圭介[1,2]、占部 大介[1,2] ([1]富山県大工、[2]富山県大・生医工研セ)
○Kanji INDO[1], Kesuke HUKAYA[1,2], Daisuke URABE[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]Biotechnol. Res. Cent., Toyama Pref. Univ.)

アルキベマイシン A は植物由来の放線菌 *Streptmyces* 属から単離された多環式ポリケチドであり、一部のグラム陽性細菌に対する選択的な抗菌活性を示す[1)]。構造上の特徴として特異なテトラヒドロジオキソオキサジン構造に加え、高度に官能基化されたシスデカリン構造が挙げられる。本研究では、アルキベマイシン A の全合成を目指し、まずシスデカリンフラグメント **8** の構築を試みた。



2-ヨードフェノール(**1**)を出発原料として、酸化的脱芳香族化により **2** とした後、アセタール交換でキノンモノケタール **3** とした。得られた **3** に対して、ジエン **4** 存在下、三上らの不斉 Diels-Alder 反応の条件[2)]に付すことで、望みのシスデカリン **5** を収率 53%で得ることに成功した。その後、既知の方法[3)]で合成した **6** と Stille カップリングすることで、トリエン **7** を合成した。今後はオレフィンの位置選択的な官能基化によりシスデカリンフラグメント **8** を導く予定である。



1) Igarashi, Y.; Kim, Y.; In, Y.; Ishida, T.; Kan, Y.; Fujita, T.; Iwashita, T.; Tabata, H.; Onaka, H.; Furumai, T. *Org. Lett*. **2010**, *12*, 3402. 2) (a) Mikami, K.; Terada, M.; Motoyama, Y.; Nakai, T. *Tetrahedron: Asymmetry*, **1991**, *2*, 643. (b) Mikami, K.; Motoyama, Y.; Terada, M. *J. Am. Chem*. Soc. **1994**, *116*, 2812. 3) Lemos, E.; Porée, F, H.; Bourin, A.; Barbion, J.; Agouridas, E.; Lannou, M, I.; Commerçon, A.; Betzer, J, F.; Pancrazi, A.; Ardisson, J.; *Chem. Eur. J*. **2008**, *14*, 11092.

total synthesis, synthetic organic chemistry, natural product chemistry

講演番号：3C01a01
講演日時：3 月 27 日 09:30～ 理学部講義棟 C01 会場

塩生植物アッケシソウの根圏における必須微量元素 マンガンに対する生理応答特性
Characterization of Physiological response of Halophyte *Salicornia europaea* to Essential trace element manganese in Rhizosphere.
○扇 世史輝、吳 雨珊、仲山 英樹（長崎大院水環）
○Yoshiki OHGI, Yu-Shan Wu, Hideki Nakayama (Nagasaki Univ.)

緒言

マンガン（Mn）は、生命や産業において必要不可欠な元素である一方で、自然分解されないため、環境問題が懸念される。これまでの浄化技術では、高い運用コストや副生成物が生じるなどのデメリットがある。そこで、それらの代替手段の開発が期待される。本研究では、Mn に焦点を当て、塩分や銅などの重金属除去能力に優れているアッケシソウを用いた Mn のファイトレメディエーション技術の開発を目指し、Mn に対する生理応答の特性を解析した。

実験

本研究では、アッケシソウと比較するために、同じアカザ亜科に属するホウレンソウを用いて実験を行った。Mn に対する生理応答の特徴を探索するために、アッケシソウ及びホウレンソウを Mn の環境排水基準とほぼ同等の 0.2 mM の Mn(II)濃度に調製した水耕液と Mn(II)を加えていない水耕液で比較し、半水耕栽培で栽培した。Mn 酸化物を確認するために LBB 試薬を用いた試験を行った。また、実際に Mn 含有量を確かめるために、ICP 発光分光分析装置により分析を行った。

結果及び考察

アッケシソウ及びホウレンソウを比較栽培し、それぞれの根に LBB 試薬による Mn 酸化物の検出試験を行った結果、0.2 mM の Mn(II)濃度の水耕液で栽培したアッケシソウの根においてのみ、Mn 酸化物が生成されていた。また、ICP 発光分光分析装置による分析の結果、ホウレンソウよりもアッケシソウはより多く Mn を集積していることが分かった。陸上の中生植物と異なり、微量必須金属濃度が低い海水に曝される環境に適応して生長できる塩生植物のアッケシソウは、根圏の Mn 酸化物を必須微量金属元素の吸着材として活用することで生長促進していることが推察された。

今後の展開

アッケシソウの根圏に生成した Mn 酸化物がアッケシソウの生長に及ぼす影響を明らかにすることにより、根圏に形成された Mn 酸化物の生理な機能を解明したい。

Salicornia europaea, Manganese, Phytoremediation

発表責任者：仲山英樹（nakayamah@nagasaki-u.ac.jp）

講演番号：3C01a02
講演日時：3 月 27 日 09:41～ 理学部講義棟 C01 会場

微生物と線虫を用いた金属資源循環プロセスの評価

Evaluation of metal resource recycling process using microorganisms and nematodes

○濵野 樹[1]、倉橋 健介[2]、吉原 静恵[1]、齊藤 丈晴[1]、徳本 勇人[1]([1]大阪府立大学、[2]大阪府立大学工業高等専門学校)
○Itsuki HAMANO[1], KENSUKE KURAHASI[2], SHIZUE YOSHIHARA[1], TAKEHARU SAITO[1], HAYATO TAKEMOTO[1] ([1]Osaka Pref. Univ, [2]Osaka Pref. Univ. Coll. Technol)

【背景・目的】都市鉱山や環境中に放散された金属の再資源化において、細菌を用いた金属生成や吸着法が注目されているが、金属を回収するために必要な細菌の濃縮や破砕処理がボトルネックとなっている。そこで、多様な環境に生息し、細菌を主食とする線虫に着目した。線虫が持つ習性を利用すれば、細菌内に生成された微細粒子を回収できる可能性がある。本研究では、モデル金属として白金（Pt）を用いた。Pt を保持した細菌を給餌した線虫の増殖挙動と Pt 粒子の粒径を解析し、さらに、次世代シーケンサー（NGS）を用いて、天然土壌からより有用な線虫のスクリーニング法を検討した。
【方法・結果】本研究では、モデル細菌 *Shewanella algae* JCM13988 株が持つ金属還元能を利用し Pt を保持した細菌を作製した。まず、寒天培地上で、Pt を保持した細菌をモデル線虫である *Caenorhabditis elegans* N2 株に給餌した結果、初期線虫数が 5 頭の場合では、対照と比べて増殖速度が低下した。一方で、初期線虫数を 1500 頭に増加させると、増殖速度が回復し、対照と類似した増殖挙動を示したため、線虫は Pt を保持した細菌を捕食して成長し、増殖できると考えられる。次に、蛍光顕微鏡で線虫体内を観察すると、肛門付近で細菌の消化が見られ、さらに、線虫排泄物を SEM 観察した結果、Pt と思われる微細な粒子が確認されたことから、線虫を用いた細胞破砕および金属抽出が期待できる。一方で、環境中に放散した金属イオンや粒子は、細菌が吸着・吸収することで固定化されるため、線虫を連続的に回収することにより、金属回収量の向上が見込まれ、環境中に放散された有用金属粒子や金属汚染物質を除去できると期待される。また、FACS を用いて線虫から排泄された Pt 粒子の粒径分布を解析した結果、給餌した細菌が生成した Pt 粒子の分布と一致した。一般的に、電気炉焼却を用いた金属抽出法では、焼成により粒径が肥大するが、線虫を用いるとナノサイズのまま回収できると考えられる。以上より、金属還元細菌と線虫を利用することで、常温・常圧下で金属ナノ粒子を生成・回収でき、新たな金属資源循環プロセスの構築に繋がると考えられる。また、地球上に線虫は 50 万種以上存在することから、*C.elegans* より有用な線虫種が天然環境中に生息すると考えた。そこで、NCBI から約 1700 種の線虫ゲノムデータベースを取得し、18S rRNA を対象としたプライマーを独自設計した。得られた標的配列から系統樹を作成し比較することで、複数のプライマー候補から線虫解析に適したプライマーを決定した。この自作したプライマーを用いて、NGS による天然土壌中に生息する線虫のメタゲノム解析を行ったところ、20 種類以上の線虫を属レベルまで分類・同定できた。その結果、体サイズが大きく、高い回収能が期待される *Distolabrellus*、*Pristionchus* 属の線虫を発見した。

Nematoda, Metal, Bioprocess

講演番号：3C01a03
講演日時：3 月 27 日 09:52～ 理学部講義棟 C01 会場

ポットを用いたモエジマシダのヒ素吸収における土壌との相互作用の検討
Study of the interaction between soil and *Pteris vittata.* during arsenic absorbing through a pot experiment

○韓 凝[1]、楊 重陽[1]、ホ インニン[1,2]、簡 梅芳[1]、井上 千弘[1] ([1]東北大学、[2]国立海洋大学)
○Ning HAN[1], Chongyang YANG[1], Ying-Ning HO[1,2], Mei-Fang CHIEN[1], Chihiro INOUE[1] ([1]Tohoku Univ., [2]NTOU)

ファイトレメディエーションは環境修復技術として、環境に優しい、かつ比較的に低価格である利点がある一方、処理できる土壌の深さに制限があることや、汚染を完全に除去するのに長期間の処理が必要など、効率の課題がある。モエジマシダ（*Pteris vittata*）は、2001 年にヒ素の高蓄積植物として発見された以来、広く注目を集められ、実証試験まで行われている。今までモエジマシダのヒ素吸収メカニズムに関する研究が多いが、土壌環境との相互作用に着目した研究はまだ少ない。モエジマシダのヒ素吸収能力が土壌中のヒ素形態に依存することが知られているが、土壌中のヒ素形態は土壌微生物の活動に大きく影響される。また、植物は分泌物を介して、金属形態や微生物群集構造の変化に影響を与えている報告がある。しかし、モエジマシダが土壌中のヒ素や土壌の生物化学的性質にどのように影響するのはまだ明らかになっていない。本研究は、ファイトレメディエーションの効率を上げる新しい方向性を探索することを目指し、モエジマシダと土壌の相互作用をポット栽培試験により解明することを目的として行った。

宮城県気仙沼市の圃場（ヒ素含有量は約 62.76 mg/kg）の土壌を採取し、研究室にモエジマシダのポット栽培実験を行った。ポットの容積は約 800 mL で、一ポット当たり 600 mL の篩を通した土壌を入れ、モエジマシダの苗を植えた。栽培実験は 2019 年 7 月から 3 か月間を行い、月に一回試料を採取して分析に供した。試料として、土壌の部分は、シダ栽培ポットは根圏土とバルク土、シダ栽培していないポットは土壌を採取し、それぞれの pH、水溶性ヒ素濃度と総ヒ素含量を測定した。また、土壌試料の代謝産物および全 DNA を抽出し、LC/MS および次世代シーケンス解析により、代謝産物と微生物群集の経時変化を調べた。植物の部分は地上部と根に分け、バイオマスとヒ素の蓄積量を測定した。

その結果、7 月から 10 月まで、モエジマシダの平均バイオマスは 0.61 g から 3.91 g に増加した。ヒ素を一株あたり平均として 242.53 μg を吸収し、その多くは地上部に蓄積されたことが確認できた。一方、シダを栽培しない土壌およびバルク土に比べ、シダ根圏土壌の pH は低下したことと、根圏中水溶性ヒ素濃度は著しく増加したことがわかった。土壌代謝物に対するメタボロム解析および土壌全 DNA に対する次世代シーケンス解析の結果から、シダの栽培により、土壌代謝物及び微生物群集の組成が大きく変化したことが示唆された。発表ではその詳細について報告する。

Phytoremediation, metabolomics, *Pteris vittata.*

発表責任者：簡梅芳（meifangchien@tohoku.ac.jp）

講演番号：3C01a04
講演日時：3 月 27 日 10:03～ 理学部講義棟 C01 会場

Cd 汚染水田土壌における間断灌漑（3 湛 4 落）が微生物群集活性に与える影響
Effects of intermittent irrigation on microbial community activity in Cd contaminated paddy soil

○永井 健太郎[1]、墨 泰孝[1]、國頭 恭[2] ([1]中部大応生、[2]信大理)
○Kentaro NAGAI[1], Hirotaka SUMI[1], Takashi KUNITO[2] ([1]Chubu Univ., [2]Shinshu Univ.)

水田土壌の汚染元素の中でも Cd と As は特に毒性が高く、対策が急がれる元素である。水田において、Cd と As の毒性を同時に低減する手段の一つとして、間断灌漑が有望視されている。しかし、間断灌漑は酸化・還元状態が短期的に繰り返されるため、土壌微生物群集の活性は大きく攪乱されることが予想される。本研究では、Cd に汚染された水田土壌を異なる水管理で水稲の栽培試験を行い、間断灌漑が水田土壌中の微生物群集の活性に与える影響について調査した。

本研究では、Cd-Zn 汚染土壌をワグネルポットに充填し、ライゾバッグを用いて、根圏, 非根圏内, 非根圏外の計 3 区画に区切った。その後、水稲を移植し、基肥として N, P, K を施用した。処理区として、表土から 4cm 水を張った湛水区、土壌水分量を最大用水量の 60%に調整した落水区、3 日間の湛水と 4 日間の落水を繰り返す 3 湛 4 落区の異なる水管理の処理区を設け、全処理区で 6 週間湛水栽培後、1 週間の中干を行った後に、処理区ごとの水管理で 10 週間栽培を行った。中干前、中干後（出穂前期)、出穂期、出穂後期、栽培終了時に土壌を採取し、土壌中カドミウムの形態別濃度（交換態, 無機結合態, 有機結合態)、細菌・糸状菌数、酵素活性試験（β-D-グルコシダーゼ活性, 酸性ホスファターゼ活性, プロテアーゼ活性)、Biolog 社の炭素基質に関する ECO-plate、窒素基質に関する PM3-plate を用いた細菌群集の基質利用性、可給態リン酸量等の分析に供した。

6 週間の湛水によって、土壌の酸化還元電位（Eh）は 500 mV から-200 mV 程度まで低下したが、中干によって 300 mV 程度まで上昇した。その後、湛水区では 0 mV 程度まで徐々に低下したが、落水, 3 湛 4 落区は栽培開始前と同程度まで上昇した。土壌中の交換態カドミウム濃度は、湛水区では Eh の低下に伴い栽培終了時において、中干後の 1/10 程度まで低下したが、落水, 3 湛 4 落区では 1.0 mg/kg であり、高めの値であった。処理区間で細菌群集の基質利用性を比較すると、3 湛 4 落区では湛水区や落水区に比べて基質の利用性や多様性が低い傾向にあり、酵素活性でも、酸性ホスファターゼ, プロテアーゼ活性において 3 湛 4 落区で低い傾向にあった。この結果から、落水と湛水を繰り返す間断灌漑によって水田土壌中の細菌群集が攪乱されている可能性が考えられた。

今回の実験で得られた結果から、Eh と交換態 Cd 濃度では正の相関関係が見られ、湛水区や 3 湛 4 落区では、湛水時の交換態 Cd 濃度は低下していると考えられ、土壌中のカドミウムの形態は難溶化され、水稲への吸収が抑制された状態にあると推察される。また、微生物群集活性において、湛水, 落水を繰り返す間断灌漑では、土壌環境が安定しないため、細菌群集の基質利用性や酸性ホスファターゼ, プロテアーゼ活性が低下し、活性の変化が現れたと考えられる。

cadmium, microbial community activity, paddy soil

発表責任者：墨　泰孝（sumi11689@isc.chubu.ac.jp）

講演番号：3C01a05
講演日時：3 月 27 日 10:14～ 理学部講義棟 C01 会場

微生物と線虫による土壌浄化技術の創出

Creation of soil purification technology using microorganisms and nematodes

○山田 航平[1]、小田 ちなみ[1]、濵野 樹[1]、倉橋 健介[2]、吉原 静恵[1]、星 英之[1]、徳本 勇人[1]([1]大阪府立大学、[2]大阪府立大学工業高等専門学校)
○Kouhei YAMADA[1], Chinami Oda[1], Itsuki Hamano[1], Kensuke Kurahashi[2], Shizue Yoshihara[1], Hidenobu Hoshi[1], Hayato Tokumoto[1] ([1]Osaka Pref. Univ., [2]Osaka Pref. Univ. Coll. technol.)

【背景・目的】土壌中の重金属は、微生物によって分解されず土壌生物体内に蓄積するため、除去する必要がある。線虫は土壌中の微生物を捕食して遊走するため、光忌避性を利用して土壌から線虫を回収すれば、重金属を除染できる可能性がある。本研究では、カドミウム（Cd）を用いて、微生物による吸収、線虫による捕食と土壌からの線虫回収を一連のプロセスとして、その除染効果を検証した。
【方法・結果】微生物から線虫へ移行した Cd 量を測定した後、培養時間の検討及びモデル線虫と、天然環境中から採取した線虫の Cd 回収率を算出した。加えて、異なる光条件下で回収される線虫種を同定した。土壌中のモデル微生物には、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* を使用した。酵母の培養液に Cd を添加して再度培養したところ、添加した Cd の約 95%が酵母に吸着・吸収された。そのため、土壌中の Cd は、微生物の近傍に固定化されていると推察される。ここで、線虫 *Caenorhabditis elegans*（*C.elegans*）N2 株に Cd を吸着した酵母を給餌した。培養後、線虫体内から Cd が検出され、酵母に吸着された Cd は線虫体内へ移行したと考えられる。次に、Cd を高回収する可能性がある *C. elegans* の変異株を用いて､微生物が保持する Cd が線虫によって回収される培養時間の検討を行った。線虫体内の経時変化に伴う Cd 量を測定すると、24 時間で最大となり、その Cd 量は培養後 48 時間が経過しても同程度であった。従って、線虫の Cd 回収量は 24 時間以内に上限に達すると考えられる。このとき、線虫頭数の変化に伴う Cd 回収率を計測した。その結果、Cd 回収率は線虫頭数とともに増加し、任意の線虫頭数から Cd 回収率を推定できる回帰式が得られた。この回帰式により、線虫頭数を計数すれば、線虫の回収による除染効果を推算できると期待される。ここで、次世代シーケンサー（NGS）を用いて、天然環境中に生息している線虫種から Cd 回収に有用な線虫種を同定し、Cd を吸着した酵母を給餌した。培養後、線虫体内からモデル線虫の Cd 回収量と同程度の Cd 量が検出され、天然環境中の線虫種でも、モデル線虫で作製した回帰式を使用し、Cd 回収率を推算できると考えられる。以上より、重金属の回収に有用な線虫種を NGS により同定し、回帰式を用いて重金属回収率の算出方法を構築できた。また、異なる強度の光を照射し、回収した線虫種を NGS で同定したところ、光強度に依存して、回収される線虫種が変化した。そのため、光強度に依存して汚染土壌から回収できる線虫種による重金属量を測定すると、光強度と重金属回収量の関係を明らかにできる。したがって、異なる線虫種が生息する各土壌環境に対して、照射光量により、最大の重金属回収量をスクリーニングできる技法が確立できた。

nematodas, heavy metal pollution, baioremediation

講演番号：3C01a06
講演日時：3 月 27 日 10:35～ 理学部講義棟 C01 会場

Survivability of a gamma-hexachlorocyclohexane-degrading sphingomonad strain in soil.
○Kafayat YUSUF, Hiromi Kato, Masataka Tsuda, Yuji Nagata (Tohoku Univ.)

[Background] Survivability of pollutant-degrading bacteria in natural environments is a key step for in-situ bioremediation of polluted sites. *Sphingobium japonicum* strain UT26 degrades γ-hexachlorocyclohexane (γ-HCH), a chlorinated pesticide that causes serious environmental problems due to its toxicity and long persistence. The growth of UT26 is very unstable in soil environments, and UT26 occasionally disappears from the soils immediately after the inoculation. To explore possibility of bioaugmentation of γ-HCH-contaminated soil by using UT26, it is important to know factors that govern survivability of UT26 in soil environments. In this study, we examined an effect of (1) deletion of *adhX*, an essential gene for oligotrophic growth of UT26, and (2) co-culturing with other bacteria that was isolated from an indigenous microbial community, on survival of UT26 in a soil environment.

[**Methods]** Bacterial growth in a soil (brown forest soil from Ehime) was compared between (1) UT26 and its *adhX*-deletion mutant (UT26DAX), and (2) mono-culture of UT26 and co-culture with *Burkholderia* sp. strain Bcrs1W, whose transcriptome in the soil has been analyzed. Cells of each strain were harvested after 3 day's incubation on a 1/3 LB plate, and inoculated in ten g of soil that was sterilized by gamma-irradiation with initial cell density at 10^7 CFU/g soil. Survivability of the inoculated bacteria was monitored by counting CFU on 1/3 LB plates. Experiments were performed in triplicates.

[Results and Discussion] Culturable cells of UT26 in the soil gradually decreased from 10^7 at Day 0 to 10^3 CFU/g at Day 9, while UT26DAX drastically decreased from Day 6 and disappeared at Day 9. Previously we demonstrated that over expression of *adhX* confers the ability to grow on minimal salt medium without the supply of any carbon source accompanying with the CO_2-fixation. The results obtained here imply that the *adhX* gene is also important for survival of UT26 in the soil. Furthermore, we observed a positive effect of co-culturing with the strain Bcrs1W, which was able to grow in the soil when inoculated as mono-culture, on the survival of UT26 in the soil. In the co-culture, rapid growth of Bcrs1W was followed by slight increase of UT26 from initial level 10^7 to 10^8 CFU/g soil at Day 6. These data suggest the advantages of co-culturing for long survival of UT26 in soil environments.

Soil, bioaugmantation, organochlorine pesticides

講演番号：3C01a07
講演日時：3 月 27 日 10:46～ 理学部講義棟 C01 会場

Transcriptomic analysis of benzene-degrading nitrate-reducing *Azoarcus* sp. DN11 reveals the involvement of hydroxylation as initial reaction in anaerobic benzene degradation pathway

○Allan DEVANADERA[1], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1,2], Yuki KASAI[3], Yoh TAKAHATA[4], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1,2] ([1]BRC, UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Chuo Univ., [4]Taisei Corp.)

[Introduction] Benzene is a common soil and groundwater pollutant, which causes a major global health concern because of its carcinogenicity. Hydrocarbon-contaminated subsurface sites usually become anoxic which renders the study on anaerobic benzene degradation highly important. Three initiating pathways have previously been proposed for anaerobic benzene ring activation: methylation to toluene, hydroxylation to phenol, and carboxylation to benzoate. However, the genes involved in the intial benzene activation have not yet been identified. *Azoarcus* sp. DN11, a denitrifying bacterium, has been shown to be capable of degrading benzene, toluene, benzoate, but not phenol, under both aerobic and anaerobic conditions (Kasai *et al.*, 2007*, Environ. Sci. Technol.*, 41, 6222-6227). Analysis of DN11 genome showed the presence of putative genes encoding enzymes for anaerobic degradation of toluene, phenol and benzoate, which suggests that DN11 may employ all the three pathways to degrade benzene anaerobically (Devanadera *et al*., 2019 *Microbiol Resour Announc*, 8(11), e01699-18). However, GC-MS analysis using ^{13}C-benzene identified phenol, but not toluene or benzoate, as an intermediate in the anaerobic benzene degradation of DN11. This study aims to compare of the transcriptome of DN11 cells grown on benzene and benzoate using RNA-Sequencing to elucidate the anaerobic benzene degradation mechanism of DN11. **[Methods]** High quality total RNA was extracted from DN11 cells during active anaerobic benzene and benzoate degradation. After depletion of rRNA using Ribo-Zero kit (Epicentre) from the samples, cDNA extraction and library preparation were performed using Illumina TruSeq™ RNA sample preparation kit v2. Sequencing data were generated on MiSeq system (Illumina) with MiSeq Reagent Kit v3 following the manufacturer's protocol. The raw RNA-Seq reads were analyzed using CLC Genomics Workbench software (Version 7.5.2, CLC Bio). High quality RNA-Seq reads were used to analyze the gene expression with the RNA-Seq analysis tool of CLC. RPKM of genes were calculated to compare the levels of genes expressed in benzene- and benzoate-grown cells. **[Results]** Higher transcription of genes involved in the anaerobic phenol degradation pathway were observed in benzene-degrading DN11 cultures as compared to that in benzoate-degrading cultures, suggesting that hydroxylation pathway of benzene was involved in the degradation. On the other hand, genes for the anaerobic toluene metabolism were constitutively expressed as shown by the relatively constant transcription level during growth on benzene and benzoate. Additionally, the expression levels of the toluene degradative genes are lower than that of the phenol genes. Finally, one of the putative benzoate genes *bamY*2 was highly expressed only in cells grown on its respective substrate benzoate.

biodegradation, benzene, Azoarcus

発表責任者：Hideaki NOJIRI（anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3C01a08
講演日時：3 月 27 日 10:57～ 理学部講義棟 C01 会場

Azoxystrobin transformation by *Bacillus licheniformis* strain TAB7 produces azoxystrobin amine as novel metabolite

○Amirah ALIAS[1], Enock MPOFU[1], Keisuke TOMITA[1], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1,2], Kenji TOMITA[3], Joydeep CHAKRABORTY[1], Michal MALON[4], Yusuke OGURA[3], Hirosato TAKIKAWA[3], Kazunori OKADA[1], Toshiaki KIMURA[5], Hideaki NOJIRI[1,2] ([1]BRC, UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Dept. Appl. Biol. Chem, UTokyo, [4]JEOL, Tokyo, [5]Toyota Motor Corp)

[Background and Objectives] Azoxystrobin (AZ, Fig 1) is a broad-spectrum synthetic fungicide, widely used in agriculture, and there are concerns about its fate and effects in the environment. Major transformation products of strobilurin by environmental microorganisms reported so far are carboxylic acid derivative obtained via hydrolysis of the methyl ester group by subtilisin-like proteases. Azoxystrobin is derivative of strobilurin that has common β-methoxyacrylate toxophore that blocks the Q_0 site of Complex III during mitochondrial respiration. *Bacillus licheniformis* strain TAB7 was first isolated from composting livestock waste in Japan and subsequently patented by Toyota Motor Corp as compost deodorant under the commercial name ResQ. Apart from deodorizing properties, TAB7 also has the ability to promote plant growth by synthesizing indole-3-acetic acid (IAA) by tryptophan-dependent pathway via either IAM, IAN, IPyA, or TAM pathway (Mpofu et al, 2019, *Microbiol Resour Announc* 8: 4 e01659-18). Besides, during early screening of agrochemicals transformation, TAB7 also has the ability to transform two agrochemical compounds, AZ (strobilurin) and difenoconazole (azole). In this study, transformation products of AZ were investigated and characterized.

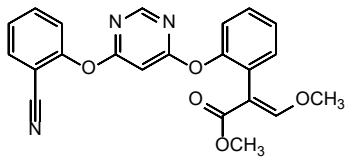


Figure 1. Azoxystrobin

[Methods and Results] *B. licheniformis* strain TAB7 can degrade 60% of AZ (100 ppm) after 30 days of incubation, during resting cell assays in L-broth medium and produced two metabolite peaks, denoted as A and B, identified by HPLC analysis. No other metabolite peak was observed even after 60 days of incubation. The chemical structure of Peak A was elucidated by ESI-MS, HR-MS, ^{15}N-NMR analysis and 2D NMR, viz. NOESY, and has been identified as methyl (*E*)-3-amino-2-(2-((6-(2-cyanophenoxy)pyrimidin-4-yl)oxy)phenyl)acrylate, or (*E*)-azoxystrobin amine (Fig 2). Metabolite peak B, on the other hand, is a mixture of (*Z*)-azoxystrobin and (*Z*)-azoxystrobin amine at 2:5 ratio (Fig 2). To investigate bioactivity of (*E*)-azoxystrobin amine against rice blast fungus and compare the activity of the metabolite against the parent compound, TAB7 was incubated in the presence of AZ (100 ppm) for 30 days and purified (*E*)-azoxystrobin-amine was extracted by HPLC. 60% of NADH-cytochrome *c* oxidoreductase activity of *Magnaporthe oryzae* race 007.0 Ina86-137 was inhibited by (*E*)-azoxystrobin amine at 0.2 mM, as opposed to azoxystrobin at 0.098 mM, suggesting (*E*)-azoxystrobin amine may have lower toxicity than the parent compound.

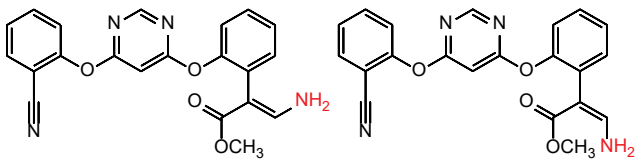


Figure 2. (*E*)-AZ amine (left) and (*Z*)-AZ amine (right)

Strobilurin, *Bacillus licheniformis*, fungicide degradation

発表責任者：Hideaki NOJIRI（anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3C01a09
講演日時：3 月 27 日 11:08～ 理学部講義棟 C01 会場

微生物による蒸気式木材乾燥機廃液の脱色

Microbial decolorization of wastewater derived from timber drier.

小森 香穂、井上 謙吾、亀井 一郎、吉田 ナオト、○清 啓自（宮崎大農）
Kaho Komori, Kengo Inoue, Ichiro Kamei, Naoto Yoshida, ○Keiji Kiyoshi (Univ. of Miyazaki)

【目的】

木材の製材加工における木材乾燥において、乾燥時の割れや曲がりを抑えるために木材に多量の蒸気を噴射する蒸気式乾燥機が広く用いられている。蒸気式乾燥機では、木材の種類によっては蒸気により木材からの抽出成分を含む暗褐色の廃液（以下木材廃液と略す）が多量に排出されている。木材廃液の呈色が木材中のどのような物質に由来するかは不明であり、木材廃液自体も現在は法令上の排出規制の対象とはなっていない。しかしながら、工場から着色した排水が流出しているのは景観的に好ましくなく、近隣住民への配慮からも可能な限り無色・清澄化して排出するのが望ましい。そこで本研究では、杉材乾燥時の木材廃液を対象として、廃液の着色を脱色可能な微生物の取得を目的とした。

【方法・結果】

宮崎県内の製材工場において杉を蒸気式乾燥機に供した際の木材廃液を用いて廃液 YNB 培地（木材廃液 50%、Yeast Nitrogen Base w/o amino acids 0.7 g/L、pH 5.0）を調製し、木材廃液の脱色微生物の単離用培地として用いた。微生物源として土壌を廃液 YNB 培地に添加し、振盪による好気条件、窒素充填を施した嫌気条件の二通りで、それぞれ集積培養後、平板廃液 YNB 培地にて好気、嫌気それぞれで 30℃にて微生物単離を行った。単離した菌株は平板培地上で廃液の脱色によるハローの形成の確認後、試験管での脱色試験に供した。脱色試験で培地の脱色が顕著に生じた株（WWD4.1 株）について ITS1 領域の遺伝子配列を解析し、当株が *Penicillium* 属糸状菌であると同定した。

WWD4.1 株の木材廃液の脱色能力について更に試験した結果、木材廃液に窒素源を少量添加することで pH 5～9 と広い pH で菌体増殖と脱色が確認でき、最短 3 日で脱色可能であった。一方、脱色には菌体の足場となる担体を必要とし、木質の担体において脱色が強く生じる傾向にあった。現在、より効率的な脱色条件について検討している。

Wastewater treatment, Bio-decolorization, Penicillium

発表責任者：清　啓自（kiyoshi.keiji.p8@cc.miyazaki-u.ac.jp）

講演番号：3C01a10
講演日時：3 月 27 日 11:19～ 理学部講義棟 C01 会場

パツリンを分解する糸状菌の単離と機能解析
Isolation and characterization of filamentous fungi capable of degrading patulin
○三田 芽実[1]、中川 博之[2]、古屋 俊樹[1] ([1]東京理科大・理工、[2]農研機構・食品研)
○Megumi MITA[1], Hiroyuki NAKAGAWA[2], Toshiki FURUYA[1] ([1]Fac. Sci. Tec., Tokyo Univ. Sci., [2]Food research institute, NARO)

【背景・目的】
カビが産生する化合物のうち、多くの生物に悪影響を及ぼすものはカビ毒と呼ばれる。パツリン（図 1）はリンゴ果実に着生する *Penicillium expansum* が産生するカビ毒で、細胞の活性酸素種への抵抗性を低下させることにより毒性を示すと考えられている。その作用機序から微生物にも毒性を示すためパツリンを分解する微生物の報告は限られている。とくに、糸状菌については *Byssochlamys* 属の微生物による分解が 1 例報告されているのみで、分解機構も明らかにされていない。本研究では、自然界からパツリンを分解する微生物を探索し、2 株の糸状菌を単離した。さらに、取得した株の属種同定と機能解析を実施した。
【方法・結果】
510 の土壌サンプルからパツリンを炭素源とする液体培地で生育可能な微生物を選抜し、さらに培養液中のパツリンを再現よく減少させる微生物を 2 株単離した。これらの 2 株、TUS-MM1 と TUS-MM2 について、ITS1 領域の配列をもとに属種同定を行ったところ、それぞれ *Acremonium* 属と *Fusarium* 属の糸状菌と推定された。さらに、TUS-MM1 株のパツリン変換活性について詳細に解析した。PSA 固体培地上に生育させた TUS-MM1 株の菌体を純水に懸濁し、遠心分離により菌体と菌体外成分に分けた。菌体を純水で洗浄後、純水に再懸濁してパツリンと反応させたところ、HPLC 分析によりパツリンの減少と変換産物と推定されるピークが確認された。この現象は菌体をオートクレーブ処理後に反応させると観察されなかった。一方、菌体外成分溶液を反応させた場合にもパツリンの減少が確認され、溶液をオートクレーブ処理後に反応させてもパツリンの減少は観察された。これより、菌体だけでなく菌体が細胞外に分泌する成分もパツリンの変換に関与し、これらがパツリンを協調的に分解している可能性が示唆された。

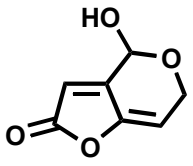


図 1　パツリンの化学構造

biodegradation, mycotoxin, patulin

発表責任者：古屋俊樹（tfuruya@rs.tus.ac.jp）

講演番号：3C01a11
講演日時：3 月 27 日 11:40～ 理学部講義棟 C01 会場

分岐鎖ポリアミンを用いた抗菌粒子の開発

Development of antibacterial particles using branched-chain polyamine

○廣田 裕介[1]、榊原 早津季[1]、福田 青朗[1]、山内 光陽[1]、増尾 貞弘[1]、林 翰佳[2]、藤原 伸介[1]([1]関西学院大理工、[2]台湾海洋大生命)

○ Yusuke HIROTA[1], Satsuki SAKAKIBARA[1], Wakao HUKUDA[1], Mitsuaki YAMAUCHI[1], Sadahiro MASUO[1], Hanjia LIN[2], Shinsuke FUJIWARA[1] ([1]Kwansei Gakuin Univ., [2]Taiwan Ocean Univ.)

高い正電荷を帯びたナノ粒子は菌の増殖を抑制する。その中でも有機物を加熱することで作製されるグラフェン状の炭素性ナノ粒子 (carbon quantum dot: CQD) に、アミノ基を 2 個以上有する脂肪族炭化水素であるポリアミン (polyamine: PA) を固定化する製法 (PA-CQD2) 作られた粒子が高い抗菌性を示すことが報告されている(1)。また、ナノ粒子に固定化せず PA を直接加熱し、グラフェン状のナノ粒子化する製法 (PA-CQD1) も同等に高い抗菌性を示す (2)。過去の研究では比較的短鎖で直鎖状のスペルミジン (spermidine: SPD) が利用されているが、超好熱菌が生産するテトラポッド状の分岐鎖ポリアミン (branched-chain polyamine: BCPA) は、塩基性度も高く、構造も特徴的である。このため、BCPA を固定化した CQD (BCPA-CQD) は SPD-CQD とは異なる抗菌性を示すことが予想された。本研究では作成した BCPA-CQD と SPD-CQD の吸収スペクトル測定し、作成が正しく行われているか確認し、高濃度 (100 ppm) 及び低濃度 (1 ppm) で大腸菌を用いて抗菌活性を比較した。

CQD、PA-CQD1、PA-CQD2 は、250-350nm の吸収スペクトルに差が見られ、製法により構造が異なることが予想された。一方で固定化する PA の種類による吸収スペクトルの違いは見られなかった。抗菌性試験の結果、各 PA-CQD は高濃度添加時に抗菌性を示した。さらに SPD-CQD2 や BCPA-CQD2 は、低濃度添加の場合でも抗菌性を示した。PA を加熱、グラフェン状のナノ粒子化した CQD1 では SPD-CQD1 の方が BCPA-CQD1 よりも高い抗菌性を示した。次に SPD と BCPA を様々な比率で混ぜ合わした混合 PA をナノ粒子化した。これらの抗菌性試験の結果、SPD の割合が高い CQD ほど高い抗菌性を示し、特に SPD のみで作成した SPD-CQD1 は、最も高い抗菌活性が確認された。以上の結果から CQD 作成後に PA を固定化する製法 (PA-CQD2) の方が、PA から直接 CQD を作製する製法（PA-CQD1）よりも高い抗菌性を示し、また SPD の割合が高いほど抗菌性が高くなると思われる。現在、大腸菌以外の細菌を用い抗菌スペクトルを検証している。

(1) Li, YJ. et al., Adv. Healthc. Mater., 5.2545-2554 (2016)

(2) Jian, HJ. et al., ACS Nano., 11.6703-6716 (2017)

carbon quantum dot, branched-chain polyamine, antibacterial activity

講演番号：3C01a12
講演日時：3 月 27 日 11:51～ 理学部講義棟 C01 会場

紫外線 LED を用いた光触媒（TiO_2）によるリグニンの分解
Degradation of lignin by photocatalyst(TiO_2) with UV-LED
○安川 喜仁、辻山 彰一（京府大院　生命環境）
○YOSHITO YASUKAWA, SYOUICHI TSUJIYAMA (Kyoto Prefectural Univ.)

【はじめに】　リグニンはフェニルプロパン類の脱水素重合により生じた 3 次元の網目状構造を持つ難分解性の高分子である。パルプ産業では原料の木材からリグニンを除去する工程で多量のリグニンを含む廃液が発生する。これらが未処理のまま環境中に排出されると高 BOD や高 COD の要因となり、環境への負荷が懸念される。リグニンを処理する手法についてはこれまで数々検討されてきたが、光触媒による方法は低コストである点や環境汚染を引き起こすような化学薬品を使用しない点、リグニンなどの有機物を完全に無機化できる点などから有効であると考えられる。本研究では、近年比較的安価になってきた紫外線 LED を用いてリグニンの光触媒分解を行い、効率良くリグニンを分解できる方法を検討した。

【実験方法】　実験は 30℃に調節したウォーターバス中で行った。水溶性のリグニンスルホン酸を 20 mg 精秤し、100 ml 容ビーカー中の蒸留水 49 ml に溶解させた。TiO_2 25 mg を精秤しリグニン水溶液に懸濁した。ビーカーをステンレス製の容器に入れ、マグネットスターラーで十分に撹拌した。さらに 30%過酸化水素水 1 ml を加え、紫外線パワーLED(360-370 nm)を用いて LED 光照射を開始した。実験中はマグネットスターラーで常に撹拌した。LED 光照射開始後、任意の時間毎にサンプルを採取し、分光光度計でスペクトル測定を行った。また対照実験として、リグニン水溶液に LED 光照射のみを行った場合と、30%過酸化水素水を加えずに LED 光照射を行った場合の 2 条件を行った。

【結果・考察】　スペクトル測定の結果、LED 光照射＋TiO_2＋H_2O_2 の条件においてリグニンのグアイアシル核に由来する 280 nm の吸光度の低下が最も大きくなった。したがって、LED 光照射＋TiO_2＋H_2O_2 の条件において最も効率的にリグニンを分解できたことが分かった。この理由としては、H_2O_2 の添加によりヒドロキシルラジカルが増加したことや、H_2O_2 が光触媒反応における電子捕捉剤として働いたことが考えられる。さらに LED の出力を大きくすることで、リグニンの分解速度が大きくなることが分かった。LED 光照射＋TiO_2＋H_2O_2 の条件において、イオン化示差スペクトルにより各反応時間におけるフェノール性水酸基を定量したところ、反応の進行とともにリグニン量に対するフェノール性水酸基の相対量は増加した。この理由として、TiO_2 による光触媒反応や過酸化水素の分解から生じたヒドロキシルラジカルにより、リグニンの芳香環に水酸基が付加したことが考えられる。また還元示差スペクトルから α-カルボニル基量を算出した結果、リグニンのグアイアシル核の分解と同時に側鎖の酸化や分解が起こることが示唆された。

lignin degradation, photocatalyst, UV-LED

発表責任者：安川喜仁（wi.yasukawa0407bb@gmail.com）

講演番号：3C01a13
講演日時：3 月 27 日 12:02～ 理学部講義棟 C01 会場

平板状銀ナノ粒子を用いた塗料状光半導体による殺菌と光照射の効果

Antimicrobial property of novel paintable photosemiconductor using Ag nanoplate and the effect of light irradiation

○田中 賢二[1]、宮本 樹里[1]、伊東 謙吾[2] ([1]近大産理工生環科、[2]（株）伊都研究所)
○Kenji Tanaka[1], Juri Miyamoto[1], Kengo Itou[2] ([1]Kindai Univ., [2]Ito Research Institute Co.,Ltd.)

【緒言・目的】クリーンな抗菌・環境技術として広く利用されている光触媒は、暗所では機能しないことや紫外光応答型が主流であるなどの課題がある。(株)伊都研究所が開発した銀の平板状ナノ粒子 AgNPL は、そのサイズに応じて紫外から近赤外領域の光を吸収し、太陽電池や近赤外線対策、SERS 分析、バイオセンサーなど様々な光技術分野への利用が期待される。AgNPL(A)とボロン樹脂(B)、クレイ(C)から構成される ABC 複合体は、可視光や近赤外光照射により電気を発生させ、かつ有機溶媒中での分散性に優れているため、物体表面への塗布や薄膜形成が容易な塗料状光半導体として期待される。また、遮光後もしばらくの間放電するコンデンサー的機能も備えているほか、可視光や近赤外光照射下で光触媒に似た抗菌作用を示すことが分かっている。

本会では、ABC 複合体（以下 ABC 光半導体と称す）の抗菌作用に関するこれまでの知見を紹介するとともに、本半導体による殺菌機構が、光触媒で見られるヒドロキシラジカルの発生とは異なる可能性を示唆する結果が得られたので報告する。

【方法・結果】可視光応答型光触媒抗菌加工製品の抗菌性試験方法である JIS R 1752 を参考にし、本半導体を固定化した PET フィルムに検定菌液を暗所／光照射下で一定時間暴露させる方法で生残菌数を比較した。ABC 光半導体は、暗所でも抗菌作用を示し、室内光程度の照度（1000 lx）の可視光や近赤外光の照射下ではより強力な作用を示した。抗菌活性は大腸菌や枯草菌で高く、病原細菌や黒カビ *A.niger* の胞子に対しても確認された。また、可視光の波長によっても抗菌活性は変化した。ABC 半導体は、AgNPL のサイズや A/B/C の混合比、工程などによって性状が異なるが、A/B/C の混合比は光電特性と抗菌活性に大きく影響し、これら 3 成分が特定の比率のときに最も強い活性が得られた。暗所での抗菌活性は、材料の一つである銀自体の作用によるものと当初考えられていたが、本半導体を暗所で保管しておき、さらに検定菌の暴露処理よりも前の作業も暗所下で行う“完全暗所”条件で試験すると抗菌活性が減少した。逆に、事前に可視光を一定時間照射した半導体フィルムに検定菌を暴露させると暗所でも明瞭な抗菌作用が認められた。また、50～150nm の極小サイズもしくは 1000～4000nm の大型サイズの AgNPL を使って作成した半導体は、抗菌活性が大きく減少した。以上の結果より、ABC 光半導体の抗菌力は、光電変換反応による電気発生及びコンデンサー的機能によって遮光後も続く放電に起因し、これらによって菌体が何らかの損傷を受けているのではないかと推察した。

Nano Silver, photosemiconductor, antimicrobe

講演番号：3C01p01
講演日時：3 月 27 日 13:50～ 理学部講義棟 C01 会場

低温硝化槽からのアンモニア酸化細菌の単離と諸性質の検討

Isolation and characterization of ammonia-oxidizing bacteria from a low temperature nitrification tank

○飯山 桃子[1]、牧野 陽介[2]、角野 立夫[1,2]、水木 徹[3]、三浦 健[1,2] ([1]東洋大・生命科学、[2]東洋大院・生命科学、[3]東洋大・バイオナノエレクトロニクス研究センター)
○Momoko IIYAMA[1], Yosuke MAKINO[2], Tatsuo SUMINO[1,2], Toru MIZUKI[3], Takeshi MIURA[1,2] ([1]Faculty of Life Sciences, Toyo Univ., [2]Graduate School of Life Sciences, Toyo Univ., [3]Bio-Nano Electronics Research Centre, Toyo Univ.)

【背景・目的】

硝化反応は、主に独立栄養硝化菌が担っており、土壌や海水など幅広い自然環境に生息することが知られている。また、排水処理においても生物学的窒素除去において重要な役割を果たしている。しかし、硝化菌は増殖速度が遅く、寒天平板上でのコロニー形成が困難であることから、難培養微生物といわれている。さらに、環境要因に依存的で特に温度に影響を受けやすく、15℃以下で硝化機能が極度に低下する。一方、5℃でも硝化活性を示す微生物群集の馴養に成功し[1)]、生物活性炭（BAC）処理において 5℃での硝化機能の向上効果が見られた[2)]。しかしながら、低温で硝化機能を示す細菌について捉えられていないのが現状である。そこで、本研究では硝化反応の律速段階であるアンモニア酸化細菌を低温硝化槽の微生物群集から単離することを目的とした。

【結果・考察】

5℃で硝化活性を示す微生物群集のメタ 16S 解析を行ったところ硝化細菌が検出された。そこで付着担体から限界希釈培養法による純化を繰り返し行った。その結果、最終的に 10 株のアンモニア酸化細菌候補株を取得した。これらの候補株について純度試験した結果、10 株の中 9 株においてコロニーの形成が観察されず、純菌株であることを確認した。単離した純菌株の 16S rRNA および *amoA* 遺伝子配列に基づいた相同性は、アンモニア酸化細菌である *Nitrosomonas europaea* と近縁であった。また本菌株の至適生育温度は 25～30℃、至適 pH は 8 であり、この結果は既知の *N. europaea* と類似していた。一方で、興味深いことに本菌株は既知の *N. europaea* と比較して高いアンモニア濃度耐性を有していた。以上のことから、これまで報告されている *N. europaea* において 5℃（低温）での硝化活性の報告例はなく、本菌株においても既知の *N. europaea* と活性の温度範囲に大きな違いは見られなかった。しかし、単離源である微生物群集においては低温での活性が示されているため、共生関係にある他の微生物によって生育や硝化活性の向上が生じている可能性が示唆された。

【参考文献】

1）小暮基輝、大竹赳、角野立夫 2014. 高濃度アンモニア含有排水で馴養した包括固定化活性汚泥担体の低温活性特性. 日本水処理学会誌. 50（3）: 113-120
2）牧野陽介、太田美乃、森川拓未、角野立夫、三浦健 2018. 低温耐性硝化担体投入型 BAC 処理での硝化に及ぼす栄養塩類の影響. 極限環境生物学会誌. 第 17 巻 年会要旨号: 109

viable but non-culturable, ammonia-oxidizing bacteria, nitrifying bacteria

発表責任者：飯山桃子（s19201600087@toyo.jp）

講演番号：3C01p02
講演日時：3 月 27 日 14:01～ 理学部講義棟 C01 会場

嫌気微生物の物質変換活性に及ぼす微生物蓄電性由来 Mackinawite の影響評価
Effects of Rechargeable Bio-Mackinawite on the substrate-converting function of anaerobic microbial ecosystem
○安池 一貴[1]、工藤 優輝[1]、田代 陽介[1]、二又 裕之[1,2,3] ([1]静大院、[2]静大創造科学技術大学院、[3]静大グリーン科学技術研究所)
○Kazuki YASUIKE[1], Yuki KUDO[1], Yosuke TASHIRO[1], Hiroyuki FUTAMATA[1,2,3] ([1]Grad. Sch. Inter.Sci. Technol. Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Uiv., [3]Res.Inst.Green Sci.Technol. Shizuoka Univ.)

物質変換能力の向上およびその制御は、バイオテクノロジーの根幹であると言っても過言ではない。近年、微生物の代謝に及ぼす鉱物（特に導電性物質）の影響が徐々に解明されており、既知微生物においてでさえ予想外の代謝を発揮することが知られている。これらの知見を更に深めるため、本研究では微生物由来の蓄電性物質 Mackinawite が嫌気微生物生態系の機能に及ぼす影響を評価し、生息する微生物の特性を解明することを目的とした。

汽水湖底泥を摂取源とし、4 mM 乳酸および蓄電性物質 Mackinawite（RBM: Rechargeable Bio-Mackinawite）を添加した系（RBM 系）および RBM 無添加系（control 系）を構築し、時系列的に有機酸、水素およびメタンを測定した。乳酸消費後、乳酸追加を 2 回実施した後に培地上清を新鮮な培地と 95%交換する継代回分培養を数十世代行った。その結果、両培養系において乳酸の分解に伴い酢酸およびプロピオン酸が蓄積し、control 系と比較し RBM 系の変換速度が速い傾向を示した。RBM 系および control 系のプロピオン酸の蓄積量は約 7.0 mM および 7.6 mM と RBM 系の方が若干低く、酢酸消費およびメタン生成速度は RBM 系の方が速かった。PCR-DGGE に基づく MDS 解析の結果、微生物群集構造は RBM 系および control 系のみならず各上清および沈殿物でも異なった。SYBR Green I による蛍光顕微鏡観察では RBM 系において微生物が RBM 上に確認され、電気化学的測定である DPV 測定では RBM 系において control 系で見られないピークが存在した。乳酸分解能力を評価するため、両培養系のギブズ自由エネルギーを計算した結果、control 系では約-64 kJ reaction^{-1} であったのに対し RBM 系では約-148 kJ reaction^{-1} と約 2.3 倍負に大きいことが示された。これらの結果は、RBM を電子授受の場として利用する特異的な微生物群集が形成され、結果的に嫌気バイオプロセスの向上に寄与していることを示唆している。更に、RMB 系沈殿物から分離された I-6 株は、16S rRNA 遺伝子解析の結果、嫌気的酢酸生産菌の一種である *Acetobacterium* 属であり、乳酸当量あたり 2.3 倍量の酢酸を生産した。また、これまで *Acetobacterium* 属細菌は金属から電子を受け取ることが報告されているが、本株は導電性物質に電子を渡すことが証明された。

以上の結果から、導電性物質による嫌気微生物生態系の物質変換能力の向上は嫌気的廃水処理の更なる効率化や電気化学的に微生物代謝を制御する技術として今後の研究が期待される。

Bio-conversion, Extracellular electron transfer, mineral

講演番号：3C01p03
講演日時：3 月 27 日 14:12～ 理学部講義棟 C01 会場

木材腐朽菌による加硫ゴム中の無機物脱離作用

Removal of an inorganic compound in a rubber product by wood rotting fungi

○佐藤 伸、ほあん きむ てぃえん、稲森 渉、濱田 賢作、奥田 尚子 (公立鳥取環境大学)
○ Shin Sato, Tien Hoan Kim, Wataru Inamori, Kensaku Hamada, Naoko Okuda (Tottori University of Environmental Studies)

本研究室ではこれまでに、鳥取県内で採取した木材腐朽菌 2 種が加硫ゴムに対して強く作用することを国産の菌で初めて見出し、これらの菌の作用が加硫ゴムの再資源化を可能にすることが示唆されている。しかしながら、木材腐朽菌で作用させたゴムが培養によってどのように変化していくのか、表面の形態変化と架橋密度の変化、物性の低下に関しての情報は得られているが、ゴムの成分変化については十分に解析できていなかった。本研究では、熱重量分析、熱分解ガスクロマトグラフ質量分析、X 線分析によって、菌処理後に加硫ゴムがどのような組成変化を受けるのか解析を行った。

実験では、300mL 容三角フラスコにブナ木粉・小麦ふすまを主成分とする木粉培地を加え、市販の加硫ゴムシート（60㎜×15㎜×1㎜）を 2 枚置き、オートクレーブで滅菌した後に我々が分離した 2 種の木材腐朽菌をそれぞれ植菌し、25℃で 3～9 ヶ月間培養を行った。培養後、ゴムシートを回収し、洗浄し菌体を取り除いた後にそれぞれの分析に供した。

その結果、熱重量分析から 3 ヶ月間菌処理したゴムシートから加硫ゴムに充填剤として添加されていたと思われる無機塩の炭酸カルシウムの明らかな脱離が見られた。熱分解ガスクロマトグラフ質量分析では菌処理前後で有機成分のうち、揮発成分、並びにポリマー成分に大きな変化がなかったことから、以前の実験で菌処理後に見られた重量変化は炭酸カルシウムの脱離によることが推察された。また 3Ｄ－X 線解析から、菌の作用によって加硫ゴムの表層から深さ 100μｍ以上のエリアで無機塩類が消え、その部分に空隙が出来ていることも観察された。

木材腐朽菌で見られる加硫ゴムの分解は、放線菌で知られるゴム主成分の切断によるゴムの崩壊よりも、むしろゴム中に添加された無機物の脱離と架橋構造の一部変化に起因する部分が大きく、ゴムそのものを再資源化する際にはとても有効に働くことが考えられる。菌処理によって引き起こされている変化については、現在も解析を行っている。

Wood rotting fungi, Rubber, Inorganic compounds

発表責任者：佐藤　伸（s-sato@kankyo-u.ac.jp）

講演番号：3C01p04
講演日時：3 月 27 日 14:23～ 理学部講義棟 C01 会場

機械学習によるろ過膜ファウリング発生の重要因子探索

Machine learning for determining important factors to occur membrane fouling in an effluent treatment

○横山 大稀[1]、朝倉 大河[1]、鈴木 漱星[2]、松本 朋子[1]、菊地 淳[1,2,3]([1]理研 CSRS、[2]横浜市大大学院、[3]名古屋大大学院)
○Daiki Yokoyama[1], Taiga Asakura[1], Sosei Suzuki[2], Tomoko Matsumoto[1], Jun Kikuchi[1,2,3] ([1]RIKEN CSRS, [2]Yokohama city Univ., [3]Nagoya Univ.)

【背景・目的】

陸上養殖等の排水処理においてしばしば問題となるのが、膜が目詰まりを起こすファウリング現象である[1]。ファウリングが発生すると膜の洗浄や交換等に大きなコストが発生してしまう。このファウリング現象は膜上に付着した有機物を核として、微生物が増殖、バイオフィルム化することで進行するといわれている[2]。しかしながら、どのような物質・微生物が原因となってファウリングが進行していくのか、不明な点はまだ多い。本研究では、機械学習によるデータマイニング[3,4,5]の手法を用いて、ファウリング発生に寄与する物質・微生物の探索を試みる。

【方法】

養殖排水処理を念頭に魚の飼育水槽を設置し、水槽水を一定流量でろ過する実験を繰り返した。膜上有機物、微生物群集、水槽中の元素濃度をそれぞれ NMR、次世代シーケンサー、ICP を用いて分析した。これらのパラメータを説明変数、膜上有機物量を目的変数として機械学習を行い、膜の目詰まりに寄与する重要因子の探索を行った。

【結果】

ランダムフォレスト法による機械学習の結果、有機物量が多く目詰まりが進行した膜サンプルでは、糖類（グルコース、ガラクトース等）やアミノ酸・タンパク質（ベタイン、グルタミン等）の割合が多いことが示され、これらの物質が膜ファウリングの原因物質であることが示唆された。さらに水槽中の元素濃度や膜上微生物群集のデータを加えることで、ファウリング発生に寄与する因子を包括的に解析する予定である。

【Reference】

1. Meng et al. (2009) *Water research* 43(6): 1489-1512.
2. Inaba et al. (2017) *npj Biofilms and Microbiomes* 3(1):5.
3. Asakura et al. (2018) *Analytical methods* 10(18): 2160-2168.
4. Oita et al. (2018) *Science of the Total Environment* 636: 12-19.
5. Kikuchi et al. (2018) *Progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy* 104: 56-88.

membrane fouling, machine learning, NMR

発表責任者：横山大稀（daiki.yokoyama@riken.jp）

講演番号：3C01p05
講演日時：3 月 27 日 14:34～ 理学部講義棟 C01 会場

PCB/ビフェニル分解菌 *Alcaligenes denirificans* A41 株のポリヒドロキシアルカン酸合成関連遺伝子の解析

Analysis of the genes related to polyhydroxyalkanoate in a PCB/biphenyl-degrading bacterium, *Alcaligenes detrificans* A41

○南 葉月、石合 志央梨、前田 理久（明治大農）
○Hazuki MINAMI, Shiori ISHIAI, Michihisa MAEDA (Meiji Univ.)

Alcaligenes denitrificans A41 株は，環境汚染物質である PCB をビフェニルと共代謝することで分解できる。A41 株は，アルカリ耐性，有機溶媒耐性，脱窒能をもち，さらにはポリヒドロキシアルカン酸(PHA)を合成することが確認されている。これまでに，ビフェニルを含む多様な炭素源条件下，培養方法による PHA 生産特性が決定されている。また，A41 株のゲノム情報から，PHA 関連遺伝子を *Cupriavidus necator* H16 株などの遺伝子との相同性から検索したところ，PHA 合成に対する遺伝子座(*phaC1, phaB1, phaR* の順で並び，それぞれ PHA synthase, acetoacetyl-CoA reductase，制御因子をコードする)が見いだされ，この発現制御に関しては既に当学会で報告している。さらに，関連する遺伝子として, phasin および PHA depolymerase に関連した遺伝子がそれぞれ 1 つ(*phaP*)および 4 つ(*phaZ1, phaZ2, phaY1, phaY2* と命名)見いだされた。今回は，*phaP* および *phaZ1* の機能を解析したので報告する。

A41 株の *phaP* および *phaZ1* の機能を調べるために，各遺伝子をダブルクロスオーバーによる薬剤耐性遺伝子置換によって破壊した変異株(*ΔphaP* 株および*ΔphaZ1* 株)を作製し，PHA 生産特性および電子顕微鏡(TEM)による PHA 顆粒形状について野生株と比較した。

まず，*ΔphaP* 株は，PHA 生産が検出できず，PHA 顆粒らしきものも全く見られなかった。これまで，フェイシンは PHA 顆粒に結合して安定化していることが知られ，その変異株は顆粒形状の変化は見られるものの全くつくられなくなるということは報告されていない。また，大腸菌では PHA 顆粒形成にフェイシンが必ずしも必要ないこともあり，A41 株における *phaP* 遺伝子の役割について，相補株等を用いた解析を行っている。

次に*ΔphaZ1* 株では，野生株に比べ，PHA 生産特性に大きな相違は見られなかったが，顆粒形状に関しては，細胞内顆粒の大きさが明らかに大きくなっていた。A41 株では PHA 生産をはじめて一定時間が経過すると蓄積率が減少する。この減少が PHA depolymerase によるものと考えており，*ΔphaZ1* 株でこの減少傾向が変化すると期待していたが，結果はそうではなかった。現在，生産された PHA の分子量の決定を行っている。

polyhydroxyalkanoate(PHA), phasin, PHA depolymerase

講演番号：3C01p07
講演日時：3 月 27 日 15:06～ 理学部講義棟 C01 会場

人形峠坑水の鉄処理槽内における細菌群集構造解析
Microbial community analyses of mine water and inside the iron removal tank in Ningyo-touge mine

○羽部 浩[1]、稲葉 知大[1]、青柳 智[1]、愛澤 秀信[1]、佐藤 由也[1]、堀 知行[1]、山路 恵子[2]、小原 義之[3]、福山 賢仁[3]、蔡 惠良[4]、西村 拓朗[4]([1]産総研・環境管理、[2]筑波大・生命環境、[3]原子力機構・人形峠環境技術センター、[4]（株）ナガオカ)
○ Hiroshi HABE[1], Tomohiro INABA[1], Tomo AOYAGI[1], Hidenobu AIZAWA[1], Yuya SATO[1], Tomoyuki HORI[1], Keiko YAMAJI[2], Yoshiyuki OHARA[3], Kenjin FUKUYAMA[3], Huiliang CAI[4], Takuro NISHIMURA[4] ([1]EMRI, AIST, [2]Life Env. Sci., Tsukuba Univ, [3]JAEA, [4]Nagaoka Int. Corp.)

【背景・目的】
休廃止鉱山の第 5 次基本計画に基づき、鉱害防止技術に関する基礎研究、技術開発が産学官連携で推進されており、特に重金属除去作用を有する植物や微生物を利用した自然回帰型坑廃水浄化法に関して効果検証が行われている。人形峠環境技術センターでは、従来の中和処理法と比較し、薬品使用量の削減や殿物の減容化が可能で、かつメンテナンス頻度も低い廃水処理システムに着目し、坑水中の重金属等の除去について実証試験を重ねてきた。本廃水処理システムにおいては、化学的酸化による除鉄のみならず、生物的な反応による鉄除去の関与も推測されたが、除鉄槽内に存在する細菌については解析されていなかった。そこで次世代シークエンサーを用いて、人形峠坑水および除鉄槽内の細菌コミュニティを網羅的に解析した。
【方法・結果】
2018 年 7 月 13 日に人形峠鉱山の坑内水および除鉄試験装置内の試料を採取し、水質分析および菌叢解析を行った。坑内水は、水温 12.6℃、pH 6.3 で、Fe 濃度が 9.42 mg/L であった。本坑内水については、孔径 0.22 μm のメンブレンで濾過することで細菌を回収し、また除鉄槽内の試料についても槽上部より採取して DNA を抽出し、精製 DNA を MiSeq Reagent キット 500 サイクルと次世代シークエンサーMiSeq（Illumina, USA）を用いた大規模塩基配列解析に供した。人形峠坑水のシークエンスデータについて、細菌種（OTU）レベルでの系統解析を行ったところ、最優占種は *Methylobacter tundripaludum*（相対存在量 26.4%）であった。一方、除鉄槽内試料についても OTU レベルでの系統解析を行うと、最優占種は *Methylobacter tundripaludum* の近縁種（18.0%）で、次に多かった *Methylovulum phychrotolerans* の近縁種（11.5%）もメタン酸化細菌であった。興味深いことに、処理対象としていた坑内水中で最優占化していた細菌が、除鉄槽内試料に付着する細菌群集としても最優占種であった。また除鉄槽内では、中性の鉄酸化細菌 *Gallionella* sp.が相対存在量 4.5%で検出されており、槽内での鉄除去において中心的な役割を果たす可能性が考えられた。

green remediation, mine water treatment, iron-oxidizing bacteria

講演番号：3C01p08
講演日時：3 月 27 日 15:17～ 理学部講義棟 C01 会場

金属腐食と微生物群集構造の相関解析
Correlation analysis between metal corrosion and microbiome
○若井 暁、高井 研（海洋機構・超先鋭）
○Satoshi WAKAI, Ken TAKAI (JAMSTEC)

金属材料が微生物の影響を受けて腐食する現象は、微生物腐食として知られている。古くから硫酸塩還元細菌（SRB）による腐食が提唱されてきたが、近年、多くの異なる微生物による腐食の報告がある。これらの多くの微生物による金属腐食解析は、金属鉄や炭素鋼といった比較的腐食が発生しやすい金属材料が用いられてきた。大型構造物では寿命予測に基づき肉厚な炭素鋼を用いることが多いが、近年、耐食性の高いステンレス鋼を薄い肉厚で設計・使用されるシーンが増えてきた。一方で、耐食性の高いはずのステンレス鋼が急速に腐食劣化する現象が、我々の生活を支えるエネルギープラントや生活により近い大型商業施設等で散見される。これらの、ステンレス鋼に対する微生物腐食の理解は、上記のような炭素鋼等を用いた実験デザインから進んでいない。
近年、微生物腐食研究においても、次世代シーケンス解析を用いた微生物群集構造解析の手法が採用されており、報告例として増加傾向にある。一方で、多様な微生物群集と腐食現象を結びつけることは大変困難であるにも関わらず、SRB の検出だけでその環境の腐食微生物として SRB を特定するといった実験デザインに問題のある研究報告も存在する。とは言え、網羅的な微生物群集構造解析技術は、その環境中の微生物の情報を得る方法の一つとして有益なツールであることには違いない。本研究では、演者がこれまでに収集した、金属腐食に関係する約 300 サンプルの微生物群集構造データを用いて、これらの様々な環境・培養サンプルとその腐食性の情報に基づいて統計的な解析を実施し、微生物群集構造と腐食性の相関について検証した。
嫌気的な環境での腐食サンプルでは、SRB と幾つかの微生物の組み合わせで腐食が誘導されている可能性が示され、微好気的な環境での腐食サンプルでは、Firmicutes 門の微生物が優占化しているグループと Proteobacteria 門の微生物が優占化しているグループに分けることが出来た。また、この微好気環境では、強い腐食性との相関が報告されている SRB や鉄腐食性メタン生成菌は検出されなかった。興味深いことに、これらの環境サンプルは淡水環境でステンレス鋼が腐食していた環境に由来するもので、通常の使用条件では塩化物イオンがほとんどない環境でステンレス鋼の腐食は発生することが無く、ステンレス鋼腐食とこれらの微生物群の関与が疑われる。
今後は、これらの微生物群がどのようにしてステンレス鋼に腐食を誘導しているのかの検証を電気化学実験および微生物機能解析から明らかにしていきたい。

Microbiologically influenced corrosion, biocorrosion, metal

発表責任者：若井暁（wakais@jamstec.go.jp）

講演番号：3C01p09
講演日時：3 月 27 日 15:28～ 理学部講義棟 C01 会場

PVA スポンジ担体投入型硝化槽の構築および菌叢構造解析
Development of PVA sponge carrier type nitrification tank and analysis of microflora
○牧野 陽介[1]、飯山 桃子[2]、三浦 健[1,2] ([1]東洋大院・生命科学、[2]東洋大・生命科学)
○Yosuke MAKINO[1], Momoko IIYAMA[2], Takeshi MIURA[1,2] ([1]Graduate School of Life Sciences, Toyo Univ., [2]Faculty of Life Sciences, Toyo Univ.)

【背景・目的】
日本は、水インフラの施設が整備されており、水道水を安全に飲むことができる。しかし、世界的にみると直接水道水を飲める国は少なく、また発展途上国ではインフラ設備が遅れているのが現状である。近年、東南アジアは人口の増加や急激な経済発展に伴い、水使用量が増加傾向にある。一方で、生活雑排水による表面地下水、河川水や雨水の水質の悪化、特に高濃度のアンモニア態窒素（NH_4^+-N）の汚染が問題視されている。東南アジア（インドネシア、ベトナムなど）の河川水質は、平均 NH_4^+-N 1.0 mg/L 程度であり、最大で 15.4 mg/L との報告例がある[1)]。これは利根川の平均 NH_4^+-N 0.09 mg/L と比較しても、非常に高い数値を示している。したがって、健康面からも安全な水を確保するために、簡易的な装置かつ浄水技術の向上は急務の課題である。そこで本研究では、簡易的な硝化処理プロセスの構築および菌叢構造解析を行うことを目的とした。

【結果・考察】
初期 NH_4^+-N 10 mg/L を滞留時間 1 h で 1 mg/L 以下の処理水を得ることを目標とし、滞留時間は 24 h から段階的に短縮した。河川水および土壌を種菌とし、PVA スポンジ担体を投入した RUN1 および RUN2 の 2 系列を立ち上げた。運転開始直後は亜硝酸型硝化が見られたが、RUN1 において 30 日目、RUN2 においては 16 日目に硝酸の増加が見られ、硝酸型硝化で安定した。連続処理運転の結果、RUN1 において最小 NH_4^+-N 0.44 mg/L、RUN2 において 0.38 mg/L の処理水を得ることに成功した。さらに、菌叢構造解析の結果、馴養前後を比較すると 2 系列とも硝化菌の割合が大幅に増加し、亜硝酸酸化細菌（NOB）はアンモニア酸化細菌（AOB）の割合より高かった。

以上のことから、河川水および土壌に生息する微生物から新たな硝化槽の構築に成功した。硝化を担う AOB および NOB が担体内に保持され増殖したことにより、効率良く処理ができたと考えられる。今後、東南アジアの河川水により近づけた原水条件で処理を行う予定である。

なお、本研究は 2019 年度東洋大学井上円了記念研究助成を受けて行われた。

【参考文献】
1）大西晃輝ほか 2013. 巨大都市ジャカルタのチリウン川における水質汚濁特性. 日本水文科学会誌. 40(2)： 39-46

16S rRNA-based metagenomics analysis, nitrification, PVA sponge carrier

発表責任者：牧野陽介（s39101800192@toyo.jp）

講演番号：3C01p10
講演日時：3 月 27 日 15:39～ 理学部講義棟 C01 会場

日本産ウォッシュチーズの微生物叢と生分解性高分子分解活性
Microbial composition and biodegradable polymer hydrolytic activity of washed-rind cheeses
○ガンスフ オリギル、鈴木 美和、橘 熊野、橘 陽子、粕谷 健一 (群馬大学)
○Orgil GANSUKH, Miwa Suzuki, Yuya Tachibana, Yohko Tachibana, Kenichi Kasuya (Gunma Univ.)

チーズをはじめとした食品の容器包装として多用されているプラスチックは、衛生的、軽量、耐腐、食性等の優れた特徴を持ち、望まない微生物の増殖や栄養素の経時変化および風味の退化を防ぎ、賞味期間の延伸が可能となる。一方、プラスチックごみの環境流出により引き起こされる環境汚染が世界的問題となっている。このような問題の解決策として、使用後に自然界に循環される生分解性プラスチックが注目されている。本研究では、生分解性プラスチックの食品容器包装への適用に向けた基礎的研究として、微生物の多様性が高いウォッシュチーズを用い、各種生分解性高分子を分解する微生物の探索を行い、単離株を特徴付けた。本研究では、日本産ウォッシュチーズ 4 種をメタゲノム解析したところ、長野県産および千葉県産チーズの細菌群集は比較的類似しており、これらおよび北海道産チーズの細菌群集はヨーロッパで製造されたウォッシュチーズの表皮の細菌群集と類似していた。東京都産チーズの細菌叢は存在する細菌種が少なく、ヨーロッパのウォッシュチーズがより多くの細菌種から構成されているのとは異なっていた。東京都産チーズは製造過程において日本酒を用いていることが細菌種の多様性を抑制したと結論付けた。また、6 種の生分解性高分子に対する分解活性を調べた結果、千葉県産チーズのみ P(3HB)に対する分解活性を示す細菌が存在したため、本株(MC1 株)を単離した。MC1 株は無胞子グラム陰性の短桿菌で、プロテオバクテリア門に属する *Alcanivorax dieselolei* と高い相同性を示した。*Alcanivorax* 属細菌の MC1 株が P(3HB)を分解するという報告は今回が初めてであったため、詳細な特徴づけを行った。本株は低温で生育及びクリアゾーン形成能を発現しなかった。また、チーズ 4 の存在下で酵素活性が促される可能性を示唆された。この要因として、チーズ 4 の微生物叢解析で明らかとなった *Halomonas* 種および *Marinobacter* 種といった海洋性細菌がチーズ中に P(3HB)を合成することで酵素活性が上昇した可能性を示した。また、P(3HB)分解酵素は、基質結合ドメインにより P(3HB)に結合することで効率的に P(3HB)を酵素加水分解する可能性も示した。以上のことから、P(3HB)をチーズの包装材として使用するには限界があるが、チーズの流通および保存条件である低温域では分解活性を示さなかったため、適用の可能性はあると結論付けた。また、MC1 株をはじめ、チーズ 2 以外にはガンマプロテオバクテリアに属する海洋性細菌が存在することが確認された。チーズが付着した P(3HB)容器包装が海洋環境に流出しても、海洋の生態系に悪影響を及ぼさず、ガンマプロテオバクテリアが有するアルカンヒドロキシラーゼ(*alkB*)により海洋環境に流出した油を除去する、環境汚染のバイオレメディエーションとして活用することができうると推測した。

washed-rind cheeses, biodegradable polymer, alcanivorax sp.

発表責任者：粕谷　健一（kkasuya@gunma-u.ac.jp）

講演番号：3C01p11
講演日時：3 月 27 日 15:50～ 理学部講義棟 C01 会場

プラスチックの生分解試験のための海水の調製
Preparation of seawater for biodegradation test of polymer materials
○中山 敦好、川崎 典起、山野 尚子 (産総研)
○Atsuyoshi NAKAYAMA, Norioki KAWASAKI, Naoko YAMANO (AIST)

【目的】海洋プラスチック問題の解決策の一つとして生分解性材料に注目が集まり、新たな材料開発が進められている。その一方で、海洋生分解試験の標準法や認証制度の整備の必要性も指摘されている。生分解試験法を標準化するには海水の標準化もしくは標準海水の調製が不可欠である。しかしながら、我々は以前、日本各地の海水を用いて各種生分解性樹脂の生分解ラボ試験を行い、採水する場所によって、また季節によって海水の持つ生分解活性に差があることを見出した。ここでは安定した生分解活性を示す海水をいかに調製できるかについて検討した。
【方法】生分解性試験にはﾎﾟﾘ(3-ﾋﾄﾞﾛｷｼﾌﾞﾁﾗｰﾄ), (PHB)、ﾎﾟﾘ(e-ｶﾌﾟﾛﾗｸﾄﾝ), (PCL)、ﾎﾟﾘｱﾐﾄﾞ 4, (PA4)を主として用い、生分解性は消費酸素量にて評価した。海水は海面付近のものを採水し、採水日もしくは翌日に用いた。海水中の一般微生物は希釈海水を寒天平板培地（Difco™ Marine Broth2216）に塗布、生育するコロニー数の計数にて行った。海水中の微生物の希釈は、採水した海水をオートクレーブ処理により滅菌した海水で希釈して得た。
【結果】大阪南港の海水をそのまま用いた場合と、滅菌海水で 10 倍希釈、100 倍希釈した海水を用いた場合とを比較したところ、100 倍希釈の場合は 4 週間後の生分解率は低下するが 10 倍希釈では大きな低下は認められなかった。一方で我々は以前、各地の海水の生分解活性が場所によって大きく異なり、高い生分解活性を示す海水は都市部に面した海水であり、それらの海水中の一般微生物数が多いことから、海水中の一般微生物数が生分解活性に影響を及ぼすと報告した。これらの結果の間には矛盾があるように見えるが、一般微生物数が多い海水は微生物叢が豊かであると推測される。滅菌海水で希釈すると菌数は希釈率に応じて菌数は減るが、菌叢、菌の種類は変わらない。そこで海水中の菌数と菌叢の両方が重要であると考え、大阪南港と川崎市芝浦港との海水を混合し、混合前の海水と生分解活性を比較した。しかしながらその結果は、混合前の 2 つの海水の生分解活性のほぼ平均値に近いものであった。混合によって微生物叢がより豊かになり、生分解活性が大きく向上するとの想定から外れた結果であったが、大阪も川崎もともに生分解活性の高い地域の海水であるため菌叢の豊かさが飽和状態であったためだとと考え、新たに、5 ヶ所の地方の漁港の海水を採水、混合して試験を行ったが、混合による効果は認められなかった。この原因として混合しても菌数は増えないことが考えられたので、混合海水にペプトンを大阪南港の海水の TOC レベル程度まで添加して試験したところ、生分解活性が大きく上がった。これらの結果の検証試験についても合わせ報告する。

Marine, Biodegradation, Seawater

発表責任者：中山敦好（a.nakayama@aist.go.jp）

講演番号：3C01p13
講演日時：3 月 27 日 16:21～ 理学部講義棟 C01 会場

海洋プラスチックデブリから単離されたポリ(3-ヒドロキシブタン酸)分解放線菌の特徴付け

Characterization of a poly(3-hydroxybutyrate)-degrading actinomycete isolated from marine plastic debris

○鈴木 美和[1]、滝澤 玲香[2]、橘 熊野[2,3]、粕谷 健一[2,3] ([1]群馬大理工、[2]群馬大院理工、[3]群馬大食健セ)

○Miwa SUZUKI[1], Reika TAKIZAWA[2], Yuya TACHIBANA[2,3], Ken-ichi KASUYA[2,3] ([1]Gunma Univ., [2]Graduate School of Sci. and Tech. Gunma Univ., [3]Gunma Univ. Center for Food Sci. and Wellness)

【緒言】漁具等のプラスチック廃棄物は，景観や，動物への絡み合いによる生態系の破壊などの海洋環境問題を引き起こしている。解決策の一つとして，生分解性プラスチック製品による代替が望まれているが，市販されている生分解性プラスチック材料の多くは海洋環境中での生分解性を示さない。一方で，微生物産生脂肪族ポリエステルであるポリ(3-ヒドロキシブタン酸)[P(3HB)]は，海洋環境中で容易に生分解されるため，漁具等への活用が期待されている。このような背景から，P(3HB)の海洋生分解機構の解明が求められている。これまでにいくつかの海洋性 P(3HB)分解菌が単離されている。ところで，海洋環境中に流出した汎用プラスチック表面には，周辺海洋環境とは異なる微生物叢(Plastisphere)が形成される。本研究では，P(3HB)分解菌の新たな海洋微生物生息環境の一つとして Plastisphere に着目し，新規 P(3HB)分解菌の単離を行い，さらにこれを特徴付ける。

【結果・考察】千葉県沖ノ島公園の沿岸海水に廃棄されていたプラスチック廃棄物の表面から，P(3HB)分解細菌 OK12 株を単離した。16S rDNA 配列に基づく系統学的解析および生化学的・生理学的解析の結果，本株は *Nocardioides* 属細菌であることが示された。これは *Nocardioides* 属による P(3HB)分解の初めての報告である。本株は 15-40 °C の温度範囲で生育し，至適培養温度および至適 P(3HB)分解温度は 30 °C であった。本株は 0.01-2.4 M の NaCl 存在下で増殖でき，0.17 M NaCl 存在下でもっと増殖速度が大きかった。本株は P(3HB)フィルムを 0.27 mg/cm^2/day の速度で分解した。これは海洋性 P(3HB)分解細菌 *Shewanella* sp. JKCM-AJ-6,1α の分解速度と比較すると，約 6 倍の大きさであった。本株を，P(3HB)を唯一の炭素源として培養した際，培養上清には相対的に低い P(3HB)分解酵素活性（0.031 U/mL）が検出された。本株と P(3HB)フィルムを培養したところ，その表面には OK12 株が吸着し，その量は培養日数とともない増加した。培養上清の P(3HB)分解活性が比較的低いにもかかわらず，本株が高い P(3HB)フィルム分解能力を有する理由として，本株が P(3HB)フィルム表面にバイオフィルムを形成するためであると推定された。つまり，本株がバイオフィルムマトリックス内で活動することにより，P(3HB)近傍で P(3HB)分解酵素を生産でき，さらに系外への酵素拡散が阻止され，相対的に P(3HB)表面において酵素が高濃度で作用できたために，高い P(3HB)分解速度がもたらされたと考えられる。

biodegradable plastic, poly(3-hydroxybutyrate), marine plastic debris

発表責任者：粕谷健一（kkasuya@gunma-u.ac.jp）

講演番号：3C01p14
講演日時：3 月 27 日 16:32～ 理学部講義棟 C01 会場

分光学的視点によるグリーンプラスチックの分解要因解析

Analysis of Decomposition Factors for Biodegradable Plastics by Spectroscopy

○山脇 涼[1]、坪井 裕理[2]、鄭 章代[2]、伊藤 研悟[1,2]、菊地 淳[1,2,3]([1]横浜市立大学大学院、[2]理化学研究所 環境資源科学研究センター、[3]名古屋大学大学院生命農学研究科)
○Ryo YAMAWAKI[1], Yuuri THUBOI[2], Akiyo TEI[2], Kengo ITO[1,2], Jun KIKUCHI[1,2,3] ([1]Grad. Sch. Med. Life Sci., Yokohama City Univ., [2]RIKEN CSRS, [3]Grad. Sch. Bioagri. Sci., Nagoya Univ.)

【背景・目的】プラスチックは現在の生活に欠かせない素材であるが、環境中で難分解なため、廃棄処理に関して国際的な環境問題に発展している。一方、環境中で無機物まで分解されるグリーンプラスチックは、使用中に分解してしまうなど耐久性等に問題がある。また分解速度も高次構造や環境条件により変化する。例えば、ポリ乳酸(PLA)は温度や水分量等の影響を受けることが知られている[1]。そこで、環境条件下では分解されないが特殊な条件下において速やかに分解されるような工夫がなされれば、より実用的なグリーンプラスチックが得られると期待できる。また、それらの評価には NMR などによる多角的なデータ取得と統合データ解析が有効である[2-4]。故に本研究では、高次構造を変化させたグリーンプラスチックを特定環境で分解させ、NMR などの分光測定や機械物性の測定結果から、構造・物性・分解性に寄与する各要因とその関係性の解明を試みた。
【実験方法】本実験では、PLA を用途に合わせて成形して規格を統一し、成型後の熱処理などにより熱履歴を変化させ、各種サンプルを得た。次に、得られたサンプルを 60 ℃の恒温槽内のコンポストに埋没させて分解実験を行い、1 週間ごとにサンプルを回収した。回収前後のサンプルを NMR 等の分光測定に供し、各種スペクトルを得た。加えて、分解実験前のサンプルは 3 点曲げ試験などの物性評価を目的とした計測にも供した。以上の計測により得られたデータから相関解析などを行い、生分解性ポリマーの構造・物性・分解性の要因解析および関係性の関係性の解明を試みた。
【結果・考察】分解前後の各種スペクトルから強度差を求め、スペクトルの変化量を算出した。変化量を熱履歴ごとに判別分析を行ったところ、判別可能であったことから高次構造の影響により分解の程度が異なっていたことが示唆された。そこで分解実験により減少したサンプルの重量とシグナル分離をした各種スペクトルの情報を次元圧縮し、ネットワーク解析により各要因の関係性について見える化に成功した。現在、高次構造の要因をより解明するため NMR の緩和時間を利用した計測を進めている。加えてポリカプロラクトン(PCL)を対象とした分解実験も行っており、同様の手法で関係性の評価を行う予定である。本会では分解に特に寄与した要因についての結果および考察を報告する。
【参考文献】[1] Drumright, R. E., Gruber, P. R. and Henton, D. E. Adv. Mater. 12, 1841–1846 (2000).[2] Bagheri, A. R., Laforsch, C., Greiner, A. and Agarwal, S. Global Challenges 1, 1700048 (2017).[3] Spaccini, R., Todisco, D., Drosos, M., Nebbioso, A. and Piccolo, A. Chem. Biol. Technol. Agric. 3, 4 (2016).[4] Kikuchi, J., Ito, K. and Date, Y. Prog. NMR Spectrosc. 104, 56–88 (2018).

physical properties, solid-state NMR, materials informatics

発表責任者：山脇涼（w195441b@yokohama-cu.ac.jp）

講演番号：3C01p15
講演日時：3 月 27 日 16:43～ 理学部講義棟 C01 会場

ナイロン 4 分解菌の単離とその分解性評価

Isolation of nylon 4-degrading bacteria and the degradation behaviors of nylon 4

○外村 彩夏[1]、森上 佳衣子[1]、橘 弘一郎[2]、山田 美和[3]、本田 正義[4]、阿部 英喜[2]、下田 誠也[1]（[1]熊本県大環境共生、[2]理研 CSRS、[3]岩手大農、[4]東京理科大工）
○ Ayaka HOKAMURA[1], Keiko MORIKAMI[1], Koichiro TACHIBANA[2], Miwa YAMADA[3], Masayoshi HONDA[4], Hideki ABE[2], Seiya SHIMODA[1] ([1]Pref. Univ. Kumamoto, [2]RIKEN, [3]Iwate Univ., [4]Tokyo Univ. Sci.)

【目的】

ナイロン（ポリアミド）類は、高機能なエンジニアリングプラスチックとして広く使われている。その中でもナイロン 4 は、生分解性を有し、原料がバイオマスから合成可能なγ-アミノ酪酸（GABA）であるため、環境調和型プラスチックとして期待されている。ナイロン 4 の実用化のためには、使用時は高機能・高性能を示しながらも、廃棄時には易分解性を示すといった分解の制御が求められ、ナイロン 4 の生分解メカニズムを明らかにする必要がある。そこで、本研究では土壌、海水等の環境中よりナイロン 4 分解菌を単離し、それらの分解性評価を行うことを目的とした。さらに、他のモノマーと共重合することで、熱的および機械的特性の改善が期待されることから、ナイロン 4 分解菌を用いて、共重合体 P(pyrrolidone-*co*-caprolactone)の分解性も評価した。

【方法】

土壌あるいは海水等をサンプルとして集積培養後、0.2%ナイロン 4 含有ミネラル寒天培地を用いてスクリーニングを行い、ナイロン 4 分解菌を単離した。その中で、生育が良好で、寒天培地上のナイロン 4 に対してクリアゾーンを形成した菌株を選抜し、16s rRNA 塩基配列を解析した。次に、ナイロン 4 あるいは共重合体キャストフィルムを作製し、そのフィルムを加えたミネラル液体培地に、単離した菌株を接種して分解試験を行った。1 週間毎に培養液上清およびフィルムを回収して、それぞれ LC/MS 分析、重量測定および SEM 測定を行った。

【結果】

土壌より単離した 8 株について 16s rRNA 塩基配列解析を行った結果、5 株が *Pseudomonas* 属と 91～99%、3 株が *Pseudoxanthomonas* 属と 94～99%の相同性を示した。これまでにナイロン 4 分解菌として *Pseudoxanthomonas* 属は報告されていない。次に、試験管中でのナイロン 4 あるいは共重合体フィルムを用いた分解試験において、フィルム残渣の重量測定を行った結果、これらの菌株は、ナイロン 4 を 13.3～22.4%分解し、共重合体フィルムにおいても分解がみられた。さらに、ナイロン 4 分解試験の培養液上清を回収し、LC/MS 分析を行った結果、ナイロン 4 の末端部分を含む分解産物が検出された。

biodegradable plastic, nylon 4, microbial degradation

講演番号：3C02a01
講演日時：3 月 27 日 09:30～ 理学部講義棟 C02 会場

水草から単離されたセルラーゼ生産菌の同定とその生産される酵素の生化学的解析

Characterization of cellulase-producing bacterium from a waterweed.

○浦田 健司[1]、渡邊 康紀[1]、渡辺 誠也[1,2] ([1]愛媛大院農、[2]愛媛大 CMES)
○kenji URATA[1], Yasunori WATANABE[1], Seiya WATANABE[1,2] ([1]Grad. Sch. of Agricul., Ehime Univ., [2]CMES, Ehime Univ.)

【背景・目的】バイオ燃料は大きく 3 種類に大別されるエネルギー資源である。その中の 1 つが植物バイオマスを用いて生産するバイオエタノールであり，その生産工程には糖化と発酵のステップが存在する。第一世代と呼ばれるバイオエタノールは農作物のデンプンを糖化させて生産されるが，食糧との競合や環境破壊を引き起こしている。一方，未利用バイオマス，特にリグノセルロース系原料を用いた生産（第二世代）ではこうした問題を回避できるが，セルラーゼ酵素による低コストかつ効率的な糖化法の開発が求められる。産業的に汎用されているセルラーゼ酵素は糸状菌 *Trichoderma reesei* のものだが，多様なリグノセルロース原料に共通して適応できるとは言い難い。そこで本研究では，国内淡水湖に異常繁茂が問題化している外国産水草をバイオマス原料として念頭におき，そこからセルラーゼ生産細菌の単離・同定を行い，生産される酵素についての生化学的な解析を行った。
【方法・結果】サンプル（琵琶湖産の水草の乾燥粉末）をカルボキシメチルセルロース（以下 CMC）を含む液体培地に接種し，セルロース分解性菌を 37ºC でスクリーニングした。続いて,プレート上で分離したコロニーを培養し抽出した DNA を鋳型に 16S rRNA を PCR で増幅させ, 塩基配列をシークエンス解析したところ 2 種類の菌が単離できた。両者のうち，より CMC での生育に優れていた細菌の培養上清から粗酵素を硫安分画によって精製し N 末端アミノ酸配列 (25 残基) を決定したところ，土壌細菌 *Paenibacillus elgii* の endoglucanase（WP_063187418）と 99%の相同性があった。そこで, その塩基配列からプライマーを設計しゲノム DNA を鋳型に遺伝子全長を PCR で増幅させ，pGEM-T ベクターに TA クローニングし塩基配列を決定した（以下，Cel_Pb_eg2 遺伝子）。次に，N 末端にヒスチジンタグを付与できる pQE-80L ベクターにクローニングし, 大腸菌を宿主に IPTG で発現誘導させニッケルアフニティクロマトグラフィーで精製した。予想通り全長で見ても WP_063187418 とは 99%似ており，他のセルラーゼでは *Bacillus agaradhaerens* 由来 Cel5A（1HF6）や *Bacillus subtilis* 由来 Cel5a（1LF1）とそれぞれ 67%と 66%の相同性があった。AZCL-He-Cellulose を基質として用いた活性測定の結果，最適 pH は 5.0~6.0，最適温度は 50ºC だった。1HF6 の立体構造［1］をモデルに，触媒作用に関わると予測される重要な残基について変異体（F40Y，G69S，T229S）を作成した。発表では、これらの変異体の生化学的性質についても報告する。
［1］Acta Cryst. 2003,D59,447-452.

endoglucanase, cellulase, bioethanol

発表責任者：浦田健司（urakenchoco7118@icloud.com）

講演番号：3C02a02
講演日時：3 月 27 日 09:41～ 理学部講義棟 C02 会場

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* へのセルラーゼ生産能の付与
Breeding of cellulase-producing *Saccharomyces cerevisiae*
○松崎 浩明、渡邉 翔介、志波 勇介、秦野 琢之 (福山大生命工)
○Hiroaki MATSUZAKI, Shosuke WATANABE, Yusuke SHIWA, Takushi HATANO (Fukuyama Univ.)

近年、エネルギー消費量の増大により化石燃料の枯渇が危惧されている。そこで、バイオマス資源を利用したエネルギー生産が注目されている。しかし、サトウキビやトウモロコシなど食糧となる糖・デンプン系バイオマスの利用は、食糧不足や食糧の価格高騰を招く。本研究では、アルコール発酵酵母 *Saccharomyces cerevisiae* への遺伝子導入によるセルラーゼ生産能の付与により、セルロース系バイオマスから直接バイオエタノールを生産する酵母の育種を目指している。当研究室の過去の研究で *Cryptococcus flavus* 由来のカルボキシメチル(CM)-セルラーゼ(CMC1)や *Saccharomycopsis fibuligera* 由来のβ-グルコシダーゼ(BGL1)の生産能を付与したが、セルロースからのエタノール生産量は十分ではなかった。エンド型とエキソ型など種々のセルラーゼの生産によりセルロース分解効率を高めることが重要であると考えた。そこで、BGL1 および細菌 *Cellulomonas fimi* 由来のエンド型セルラーゼ(cenA)とエキソ型セルラーゼ(cex)の 3 種類のセルラーゼ生産能の付与を検討した。まず、*cenA* 遺伝子と *cex* 遺伝子を *GAP* プロモーター、*MEL1* 分泌シグナル配列と *GAP* ターミネーターとの間に連結した *S. cerevisiae* 分泌発現型 *cenA* と *cex* を持つ YEp 型プラスミド pHM1061 を構築した。また、*BGL1* 遺伝子を *GAP* プロモーター下流に連結した分泌発現型プラスミド pHM1062 を構築した(分泌シグナル配列は *BGL1* の配列を使用)。pHM1061 と pHM1062 を導入した二重形質転換体は、コンゴーレッド染色、MUC 発色法、および *p*-NPG 活性により 3 種類の酵素を分泌生産していることが確認できた。しかし、エンド型セルラーゼの活性（cenA による活性）は低いと考えられた。さらに、*CMC1* 遺伝子を *GAP*プロモーター下流に連結した分泌発現型プラスミド pSC7(分泌シグナル配列は *CMC1* の配列を使用)を導入した三重形質転換体はコンゴーレッド染色により二重形質転換体よりもエンド型セルラーゼ活性が高いと考えられた。この形質転換体は紙片を形が崩れるぐらいまで分解した。

cellulase, *Saccharomyces cerevisiae*, ethanol fermentation

発表責任者：松崎 浩明（matsuzaki@fukuyama-u.ac.jp）

講演番号：3C02a03
講演日時：3 月 27 日 09:52～ 理学部講義棟 C02 会場

セルラーゼ超高生産菌　T1281 株由来セルラーゼを用いた同時糖化発酵（SSF）に向けた検討
Investigation of Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) using cellulase from a cellulase Hyper-Producing T1281 strain.
○加川 雄介、平松 紳吾、山田 勝成（東レ株式会社　先端融合研究所）
○Yusuke KAGAWA, Shingo HIRAMATSU, Katsushige YAMADA (TORAY INDUSTRIES, INC.)

【研究背景・目的】
当社では、食糧と競合しないセルロース系バイオマスを原料とした糖製造と、糖を原料として用いた微生物変換によるポリマー原料などの各種汎用化学品製造の研究に取り組んでいる。その最初のステップであるセルロース系バイオマスから糖化反応による糖製造において、糖を安く製造するためには、糖化酵素であるセルラーゼのコストを低下させる必要がある。そこでオンサイトでのセルラーゼ低コスト生産を目指し、セルラーゼ生産能や分泌能が高い *Trichoderma reesei* QM9414 標準株（NBRC31329）から、非遺伝子組換えでのセルラーゼ高生産変異株の獲得に挑戦した。これまでの結果、セルラーゼの蓄積量が標準株の 20 倍以上、公知の高生産株として知られる *T. reesei* PC-3-7 株（ATCC66589）の 2.5 倍以上、さらに、β-グルコシダーゼの全タンパク質に対する比活性が標準株の 13 倍以上、PC-3-7 株の 4.5 倍以上に向上した当社独自のセルラーゼ超高生産変異株 *T. reesei* T1281 株の獲得に成功した。今回、T1281 株が生産するセルラーゼの用途の 1 つとして、同時糖化発酵（SSF）を行った。
【研究成果】
SSF には、糖化対象物としてサトウキビの搾り残渣であるバガス、エタノール発酵ホストとして *Saccharomyces cerevisiae* OC-2 株（JCM1499）、セルラーゼとして①T1281 株由来セルラーゼ、②PC-3-7 株由来セルラーゼ、③他社遺伝子組換えセルラーゼをそれぞれ用いた。SSF を通し、③他社遺伝子組換えセルラーゼを用いた際のエタノール生産量を得るために必要な①T1281 株由来セルラーゼ量を検討した。その結果、バイオマス 1g あたり③他社遺伝子組換えセルラーゼを 2.5mg 使用した場合のエタノール生産量は、SSF 開始約 40 時間で約 7.0g/L であった。そのエタノール生産量に必要な①T1281 株由来セルラーゼ量は 3.0mg、②PC3-7 株由来セルラーゼ量はその 2 倍量必要であることが判明した。つまり、①T1281 株由来セルラーゼは、③他社遺伝子組換えセルラーゼの約 1.2 倍量を添加すれば、同等のエタノール生産量を示すことが明らかとなった。

Trichoderma, cellulase, ethanol

発表責任者：加川雄介（yusuke.kagawa.t8@mail.toray）

講演番号：3C02a04
講演日時：3 月 27 日 10:03～ 理学部講義棟 C02 会場

セルラーゼによるセルロースの分解性向上に及ぼすベタイン型添加剤の作用機構の解明

Facilitation mechanism of betaine-type additives on saccharification of cellulose by cellulase

○三宅 子龍、山本 真史、吉岡 直哉、甲元 一也（甲南大 FIRST）
○Shiryou Miyake, Masafumi Yamamoto, Naoki Yosioka, Kazuya Koumoto (Konan Univ.)

木くずやバガスなどの非可食系バイオマスから生産されるバイオエタノールは、化石燃料に代わる新たなエネルギー資源として注目されている。バイオエタノールは、バイオマスに含まれるセルロースをグルコースに分解し、微生物発酵させることで生産される。セルロースの分解ではエネルギー消費が少なく、発酵阻害物質の生成も抑制される酵素法が検討されてきたが、分解効率や酵素の製造、使用コストに課題がある。我々の研究室では、ベタイン構造を持つ添加剤がセルラーゼによるセルロースの糖化反応を促進することを以前の年次大会で報告した。しかし、ベタイン型添加剤がセルラーゼに含まれるどの酵素を活性化しているか、その活性化メカニズムについては検討できていなかった。そこで本講演では、セルラーゼに含まれる酵素を分離し、それぞれのベタイン型添加剤による活性化について評価、検討を行った。

［実験方法］

ベタイン型添加剤としてのグリシンベタインのアンモニウム基の炭素鎖をエチルからペンチルに伸長した誘導体を用いた。分離した酵素の活性評価にはセルラーゼ SS（*Trichoderma reesei* 由来　長瀬産業株式会社提供）から精製したセロビオヒドロラーゼ(CBH)とエンドグルカナーゼ（EG）を用い、α-セルロースを基質として用いた。

［研究結果］

セルラーゼ SS からゲルカラムクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーで単離した EG1～EG5 と、CBH1、CBH2 に関して活性の評価を行った。CBH1、CBH2 はセルラーゼ SS に含まれる酵素の５８％を占める主要酵素である。その活性は、ペンチル基を導入したベタイン型添加剤を 30 mM の濃度で添加すると活性が最大となり、CBH1 で 1.3 倍、CBH2 では 2.2 倍に糖化収率が上昇した。この添加濃度は未精製のセルラーゼ SS を活性化させる添加濃度とも一致しており、セルラーゼ SS の活性化には CBH の活性化が大きく寄与していることが明らかとなった。EG1～EG5 においても同様に活性化が見られ、ベタイン型添加剤はセルラーゼ SS に含まれるほぼ全ての酵素を複合的に活性化していることが示された。本研究で得られた結果を利用することで、課題であった非可食系バイオマスの生産性を改善することができると期待される。

Betaine, Biomass, Cellulase

発表責任者：甲元一也（koumoto@konan-u.ac.jp）

講演番号：3C02a05
講演日時：3 月 27 日 10:14～ 理学部講義棟 C02 会場

膜利用発酵リアクターによるエタノール収量向上メカニズムの解明

Mechanism of improved ethanol fermentation yield by membrane-integrated fermentation reactor

○鶴谷 篤生、水野 寛之、井手 深雪、耳塚 孝、平松 紳吾、日笠 雅史、山田 勝成（東レ株式会社）
○ Atsuki TSURUYA, Hiroyuki MIZUNO, Miyuki IDE, Takashi MIMITSUKA, Shingo HIRAMATSU, Masashi HIGASA, Katsushige YAMADA (Toray Industries, Inc.)

【緒言】
持続可能な社会の実現に向けて，バイオマス資源から微生物発酵によって生産されるバイオエタノールが再生可能資源の一つとして注目されている。 東レ株式会社では，独自の連続発酵技術 membrane-integrated fermentation reactor (MFR)を用いて，廃糖蜜から分裂酵母によってバイオエタノール生産を行っている．MFR は原料の供給と MF 膜による発酵液の濾過を連続的に行う菌体リサイクル型連続発酵プロセスである．MFR 発酵はバッチ発酵と比較して高い生産効率が得られるといったメリットがある。 この効果に加えて，廃糖蜜からのバイオエタノール生産では，廃糖蜜中の代表的な糖であるグルコース、フルクトース、スクロースの消費した重量あたりのエタノール収率が向上するという効果が確認されている。 本発表では，エタノール収率向上メカニズム解明を目的として，MFR 発酵中の酵母を分子・生化学的に調査した結果について述べる．

【結果と考察】
トランスクリプトーム解析から，MFR 発酵中の酵母が通常のバッチ発酵では見られない特異な発現パターンを有することが明らかになった。 細胞内外のメタボーローム解析を行った結果，MFR 発酵ではバッチ発酵よりも多くの配糖体を資化している可能性が示唆された。 また，フローサイトメトリーによって様々な発酵形態中の酵母の細胞周期を調査したところ，MFR 発酵では酵母の分裂が停止していることが確認された。 以上の３つの解析結果から，MFR 発酵では資化する物質の増加と細胞分裂の停止に伴う代謝フラックスの変化によりエタノール収率の向上が起きていると推測される。

Fermentation, Molasses, Omics analysis

発表責任者：鶴谷篤生（atsuki.tsuruya.g3@mail.toray）

講演番号：3C02a06
講演日時：3 月 27 日 10:35～ 理学部講義棟 C02 会場

セルロース系バイオマスを原料とする複合微生物系によるエタノール生産条件の検討

Examination of conditions for ethanol production from cellulosic biomass using mixed culture systems

○菰田 恵菜、山中 優花、堀沢 栄 (高知工科大学)
○Keina Komoda, Yuka Yamanaka, Sakae Horisawa (Kochi Univ. Tech.)

近年、地球温暖化防止や二酸化炭素削減などという観点から、カーボンニュートラルであるバイオエタノールが液体燃料として見直され、その中でも食料と競合しないセルロース系原料を用いたエタノール生産が注目を集めている。現在セルロース系原料を用いたエタノール生産では、脱リグニンを含む前処理は主に物理、化学的処理が行われているが、それらは設備の高コスト、消費エネルギーが大きいこと発酵阻害物質の生成などが問題となっている。そこで、脱リグニンや糖化を酵素や微生物によって行う生物的処理法も検討されているが、処理の時間の長さ、酵素の高コストなどが課題である。一貫バイオプロセス(CBP)によるエタノール発酵では、同一の反応槽で脱リグニン、糖化、発酵を行うことで、工程の単純化、施設製造コストの削減など図ることが可能である。エタノール発酵に関しては、酵母が有力であるが、糸状菌にもエタノール発酵能をもつものがみられる。糸状菌はそれ以外にもセルロース分解、リグニン分解能をもつものがある。我々は複合微生物系を用いてバイオマスを原料とした CBP を目指すこととした。一方で、生産力が高く、バイオプロセスが容易な作物の選択も重要である。ダンチク(*Arundo donax*)は温暖な地域の海浜周辺に生育するイネ科の多年草で、旺盛な繁殖力と耐塩性を持つ。非農地で生産できるエネルギー作物としての候補と考えられる。主要成分は木材と類似しているが、リグニンの改変が比較的容易である。本研究では 200ml フラスコを用いた小規模系を用いて、酵母、糸状菌を組み合わせて糖類およびバイオマスを原料として、生産されるグルコースなどの単糖およびエタノール量を測定し、条件検討を行った。

bioethanol, cellulosic biomass, mixed culture

発表責任者：堀沢　栄（horisawa.sakae@kochi-tech.ac.jp）

講演番号：3C02a07
講演日時：3 月 27 日 10:46～ 理学部講義棟 C02 会場

木材腐朽菌を用いたセルロース系バイオマスからのエタノール生産

Ethanol production from cellulosic biomass using wood-rotting fungus

○山中 優花、堀沢 栄（高知工科大学）
○Yuka YAMANAKA, Sakae HORISAWA (Kochi Univ. Tech.)

近年、地球温暖化防止や二酸化炭素削減などの観点から、カーボンニュートラルであるバイオエタノールの生産が活発に行われており、その中でも食料と競合しないセルロース系原料からのエタノール生産が注目を集めている。現在セルロース系原料を用いたエタノール生産では、脱リグニンを含む前処理は主に物理・化学的処理が行われているが、それらはコストが高いことや発酵阻害物質の生成などが問題となっている。そこで、脱リグニンや糖化を酵素や微生物によって行う生物的処理法も研究されている。その一つに木材腐朽菌を用いるという方法がある。木材腐朽菌は、植物細胞壁の主成分であるリグニン、セルロース、ヘミセルロースを分解することができるので、脱リグニン、糖化、発酵の全ての工程に関与できると考えられ、全てを一貫して行うことが可能であり、時間の短縮・コストの削減が期待できる。

本研究では増殖速度の大きいホテイアオイ(*Eichhornia crassipes*)とダンチク(*Arundo donax*)を原料とし、発酵性の高い木材腐朽菌株であるスエヒロタケ(*Schizophyllum commune*) NBRC 4928 を用いて、セルロース系原料からのエタノール生産の可能性について検討した。

発酵試験には 200ml の三角フラスコに液体培地を 60ml 用いた。PDA に前培養したスエヒロタケ NBRC4928 のコロニーを直径 1.2cm のコルクボーラーで打ち抜き、フラスコあたり 4 片を種菌として接種した。フラスコ内を嫌気条件にするため窒素ガスでパージした後、発酵栓を装着したシリコンゴム栓で蓋をし、30℃の暗所にて 90rpm で回転培養を行った。HPLC を用いて培養液中のエタノールの濃度を測定した。

スエヒロタケ NBRC 4928 を用い、両者それぞれを原料として発酵試験を行った結果、ホテイアオイを原料とした場合にはエタノールは得られず、ダンチクを原料とした場合にのみエタノール生産が見られた。また発酵試験に 1%のセルラーゼを加えた場合、ホテイアオイのエタノール生産量が 0g/L から 3.4g/L に増加し、ダンチクは 1.2g/L から 7.9g/L と約 6.6 倍増加した。従ってこれらのバイオマスにおいては糖化速度を増加させることがエタノール生産量の増加につながると考えられた。ホテイアオイを原料とした場合にエタノール生産が見られなかった原因と、発酵試験での糖化効率向上の方法については現在検討中である。

bioethanol, wood rot fungi, Around donax

発表責任者：堀沢　栄（horisawa.sakae@kochi-tech.ac.jp）

講演番号：3C02a08
講演日時：3 月 27 日 10:57～ 理学部講義棟 C02 会場

エタノール固体発酵法による菜種ミールの高付加価値化に関する研究

Study to enhance the added value of Canola meal by Solid-state fermentation

○田島 大貴[1]、栗本 崇志[2]、窪倉 麻莉子[1]、大高 雅人[1]、藤沢 奈津子[1]、大西 章博[1]、藤本 尚志[1]
([1]東農大、[2]日清オイリオグループ株式会社)
○Daiki TAJIMA[1], Takayuki KURIMOTO[2], Mariko KUBOKURA[1], Masato OHTAKA[1], Natsuko FUJISAWA[1], Akihiro OHNISHI[1], Naoshi FUJIMOTO[1] ([1]Tokyo Univ. Agric., [2]The Nisshin OilliO Group, Ltd.)

【背景と目的】

日本における可食油の生産量はこの 10 年間安定しており、このうちの約 60%にあたる 102 万 t が菜種由来であった。また、菜種では原油生産量の約 1.3 倍（平成 30 年度は約 130 万 t）の菜種ミール（油かす）が発生し、主に飼料原料などとして利用されている。しかしながら、粗タンパク質含量が低く粗繊維含量が高いことから、高付加価値化技術の開発が肝要である。

そこで本研究では、菜種ミールへのエタノール固体発酵法の適用を試みる。菜種ミール中の炭水化物や粗繊維を糖化およびエタノール発酵後、エタノールと二酸化炭素として取り除くことで、菜種ミールのタンパク質含量の改善が見込める。また、得られたエタノールはファインケミカル事業の原料としての活用が期待できる。本報では、まず、菜種ミールの発酵性に関する諸性質を検討し、次に、セルラーゼと酵母による固体並行複発酵を試みた。

【実験材料と方法】

発酵原料として菜種ミール（日清オイリオグループ株式会社製）を使用した。糖化用酵素として明治アクレモニウムセルラーゼ F、供試菌株として焼酎用酵母の *Saccharomyces cerevisiae* A30 株を用いた。

菜種ミールのエタノール固体発酵は、500ml 容のガラス容器を用いて実施した。菜種ミールと酵素剤及び酵母を添加し、含水率 50%に調整して 37℃で 7 日間静置して固体発酵を行った。発酵物のエタノール、粗タンパク質、粗脂肪、粗灰分、セルロース、総炭水化物を測定した。

【結果と考察】

培養法による酵母の増殖能を評価した結果、菜種ミールによる酵母の生育阻害は認められず、生育を支持した。また、菜種ミールはセルラーゼによる糖化と酵母によるエタノール発酵によりエタノール生成が可能であることが示された。菜種ミールのエタノール固体発酵では、乾燥重量 100g あたり約 5.2g のエタノール生成が確認された。菜種ミール中の発酵原料に基づくエタノール収率は約 50%であった。このように、菜種ミールへのエタノール固体発酵法の適用が可能であった。

菜種ミールの発酵前後の炭水化物含量は 44%から 40%、セルロースは 11.4%から 9.4%に減少した。また、タンパク質/炭水化物比率は 1.01 から 1.20 に上昇した。菜種ミールに固体エタノール発酵を適用することで、タンパク質含量を改善できることが示された。

Canola meal, Solid-state fermentation, ethanol

講演番号：3C02a09
講演日時：3 月 27 日 11:08～ 理学部講義棟 C02 会場

Behaviors of microbial community on continuous bio-hydrogen production using dynamic membrane bioreactor (DMBR)
○Jeong-Jun YOON (Korea Institute of Industrial Technology (KITECH))

Biological hydrogen production (BHP) is being actively researched as renewable energy. However, BHP in continuous condition can result in unstable performance from several variables, and it is one of the major limitations of continuous processes. Therefore, in this study, productivity of BHP was investigated, and the phenomenon of decrease of productivity was interpreted from the microbiological point of view. The dynamic membrane bioreactor (DMBR) in continuous condition was operated for about 26 days under batch and 12-1 h HRT condition. As a result, maximum production rate and yield were 20.2 L/L/d at 2 h HRT and 1.4 mol-H_2/mol-hexose at 3 h HRT, respectively. Illumina sequencing was conducted to investigate the behavior of microbial community according to each operating condition. As a result, *Firmicutes* phylum containing *Clostridium* sp., which is a representative hydrogen-producing bacteria (HPB), was dominant under most of continuous conditions. Interestingly, the abundance of lactate-producing bacteria (LPB), which is a competitive strain of HPB, was relatively high at the point where unexpected decrease of productivity occurred. This shows the importance of the control of competitive strains such as LPB as well as HPB in the reactor, and by analyzing the correlation between productivity and behavior of microbial community, a strategy for stable operation of DBMR can be derived.

Biological hydrogen production (BHP), Dynamic membrane bioreactor (DMBR), Microbial community

発表責任者：Jeong-Jun Yoon（jjyoon@kitech.re.kr）

講演番号：3C02a10
講演日時：3 月 27 日 11:19～ 理学部講義棟 C02 会場

白色腐朽菌の好気的水素産生に関与するヒドロゲナーゼの解析
Analysis of hydrogenases involved in aerobic hydrogen production by white-rot fungi
○岸川 凜太郎[1]、森 智夫[2]、河岸 洋和[2,3,4]、平井 浩文[2,3] ([1]静大院・総合農、[2]静大・農、[3]静大・グリーン研、[4]静大・創造院)
○ Rintaro KISHIKAWA[1], Toshio MORI[2], Hirokazu KAWAGISHI[2,3,4], Hirofumi HIRAI[2,3] ([1]Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka Univ., [2]Faculty of Agriculture, Shizuoka Univ., [3]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka Univ., [4]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka Univ.)

近年、石油依存性社会からの脱却及び持続可能な循環型社会の構築が求められており、再生可能エネルギーであるバイオ水素生産に関する研究が盛んに行われている。一般的な水素産生微生物は、水素の酸化還元反応を触媒する酵素 hydrogenase によって嫌気条件下で水素を産生することが知られている。当研究室ではこれまでに白色腐朽菌の水素産生について研究を行っており、白色腐朽菌が木質バイオマスから好気的に水素を産生可能であることを見出しており [1)]、白色腐朽菌が酸素耐性 hydrogenase を有している可能性が示唆されている。

白色腐朽菌由来 hydrogenase の機能解析を行うため、水素産生白色腐朽菌から代表的な白色腐朽菌 2 種、*Trametes versicolor* K-41 株及び *Phanerochaete sordida* YK-624 株を選抜し、hydrogenase 様遺伝子 cDNA 配列 (*Tvhyd* 及び *Pshyd*) を決定した。アミノ酸配列の blast 検索を行った結果、種々の真菌由来 [FeFe]-hydrogenase 様遺伝子及び nuclear architecture related1 (Nar1) タンパク質と 60%以上の相同性を示した一方で、代表的な細菌や藻類由来の[FeFe]-hydrogenase とは 30%程度の相同性しか示さなかった。さらにアミノ酸配列の分子系統解析を行った結果、*Tvhyd* 及び *Pshyd* を含む真菌 hydrogenase は単一のクラスターを形成し、[FeFe]-hydrogenase 及び Nar1/NARF の何れのグループにも属さない事が示された。*Tvhyd*、*Pshyd* は共に[FeFe]-hydrogenase の活性中心である鉄硫黄クラスターを保持するために必要な複数のシステイン残基で形成される H-cluster を保存していた。

Tvhyd 及び *Pshyd* が真に hydrogenase をコードしているかを確認すべく、*Tvhyd* あるいは *Pshyd* 組換え大腸菌を作出した。好気条件下で無細胞抽出液を調製し、hydrogenase 活性試験に供した結果、組換え Tvhyd 及び Pshyd は水素産生活性を有しており、さらに酸素耐性を持つことが示唆された。

1) 髙橋沙綾ら、第 63 回リグニン討論会講演集、74-77（2018）

white-rot fungi, hydrogenase, hydrogen production

発表責任者：平井浩文（hirai.hirofumi@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3C02a11
講演日時：3 月 27 日 11:40～ 理学部講義棟 C02 会場

セルロース系バイオマスからの高効率水素生産技術の確立に向けた大腸菌水素生産株の改良
Metabolic engineering of *Escherichia coli* for establishment of highly efficient hydrogen production technology from cellulosic biomass
○寺本 陽彦[1]、清水 哲[1]、須田 雅子[1]、乾 将行[1,2] ([1]RITE、[2]奈良先端大・バイオ)
○Haruhiko TERAMOTO[1], Tetsu SHMIZU[1], Masako SUDA[1], Masayuki INUI[1,2] ([1]RITE, [2]NAIST)

【目的】我々はセルロース系バイオマス由来糖類からの高効率バイオ水素生産技術を確立することを目指し、代謝工学による水素生産大腸菌の改良に取り組んでいる。大腸菌は嫌気発酵条件においてピルビン酸からギ酸を介して水素を生産するが、解糖系上流で生成する NADH を水素生産に利用できないため対糖収率が低いことが課題である。本研究では、NADH 依存的な水素生産経路を導入するため、異種水素生成酵素（ヒドロゲナーゼ）の発現系の構築を行った。また、バイオマス（コーンストーバー）糖化前処理（希硫酸処理）により生成する発酵阻害物質の影響について基礎的検討を行った。
【方法と結果】*Cupriavidus necator* 由来 NADH 依存性[NiFe]-ヒドロゲナーゼ発現用プラスミドを構築し、各種大腸菌代謝改変株に導入した。得られた株の水素生成能を評価するため、密閉容器を用いた嫌気培養における気相中の水素濃度を測定した。炭素源としてグルコースを添加した。まず、野生株（W3110 株）のヒドロゲナーゼを破壊した水素生成能欠損株に上記プラスミドを導入した株が微量の水素を生成することを確認した。次に、NADH 酸化経路（エタノール、乳酸、コハク酸生成経路）の破壊を重ねたところ水素生成量が 180 倍に増加した。しかしながら、形質転換体の間で水素生成量は大きく異なり、水素高生産株の取得効率は著しく低かった。同酵素の異種発現系に用いるプロモーター／ベクターを変更することにより、水素高生産株を安定して取得できるようになり、さらに水素生成速度が 1 桁程度向上した。[NiFe]-ヒドロゲナーゼの機能発現には 6 つの成熟化因子が関与する。異種ヒドロゲナーゼの高発現条件において水素生産がほとんど検出されなくなることから、導入した酵素の合成と成熟化のバランスが活性型酵素として機能するために極めて重要となることが示唆された。一方、乳酸およびコハク酸生成経路を破壊した株を用いたグルコースからの水素生成試験において、コーンストーバー希硫酸加水分解物に含まれる発酵阻害物質（酢酸、フルフラール、5-ヒドロキシメチルフルフラール）の影響を調べた。これらの阻害濃度とコーンストーバー加水分解物中の濃度から、酢酸が主要な阻害物質として働き、フルフラールと 5-ヒドロキシメチルフルフラールの影響は小さいことが明らかとなった。大腸菌を用いたエタノール生産ではフルフラールによる阻害が大きく、酢酸の影響は小さいことが報告されている。水素生産ではエタノール生産の場合と異なり酢酸の副生量が多いことが発酵阻害物質に対する感受性の違いに反映されるのではないかと思われる。
本研究は METI の委託研究の一環として行われたものである。コーンストーバー加水分解物は米国国立再生可能エネルギー研究所（NREL）より提供された。

Escherichia coli, metabolic engineering, hydrogen production

発表責任者：乾　将行（inui@rite.or.jp）

講演番号：3C02a12
講演日時：3 月 27 日 11:51～ 理学部講義棟 C02 会場

紅色非硫黄細菌におけるポリヒドロキシ酪酸生合成関連遺伝子破壊による酢酸からの水素収率の向上

Improvement of hydrogen gas yield from acetate by deletion of genes involved in the polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Rhodobacter sphaeroides*

○清水 哲[1]、寺本 陽彦[1]、乾 将行[1,2] ([1]RITE、[2]奈良先端大・バイオ)
○Tetsu SHIMIZU[1], Haruhiko TERAMOTO[1], Masayuki INUI[1,2] ([1]RITE, [2]NAIST)

【目的】我々は、大腸菌による暗発酵と紅色非硫黄細菌による光発酵を組み合わせたセルロース系バイオマスからの高効率バイオ水素生産プロセスの開発に取り組んでいる。暗発酵水素生産により副生する酢酸から光発酵により水素を生産することにより原料バイオマスあたりの水素収率の大幅な向上が期待される。本研究では、紅色非硫黄細菌 *Rhodobacter sphaeroides* の遺伝子改変により酢酸からの水素生産性を向上させるため、競合経路の一つである細胞内炭素貯蔵物質、ポリヒドロキシ酪酸（PHB）生合成経路の遮断について検討を行った。
【方法と結果】水素生産と競合する水素取り込み経路および炭酸固定経路を遮断し、水素生産反応を担うニトロゲナーゼの発現強化のため同酵素複合体遺伝子群の転写因子をコードする *nifA* を改変した Δ*hup*Δ*cbb**株を親株とし、PHB 合成酵素遺伝子(*phaC*)の破壊を重ねた Δ*hcphaC**株を作製して酢酸からの水素生産を観察したところ、予想に反し、親株と比較して大幅な生育遅延が観察され水素生産は検出限界レベルまで低下した。野生株を親株として *phaC* を破壊した株（Δ*phaC*）も同様の生育不良を示したことから、PHB 生合成が酢酸を炭素源とした生育に重要なことが明らかとなった。しかしながら、ゲノム上で *phaC* の下流に位置する *phaR* の破壊を重ねることにより（Δ*phaCR*）、野生株と異なり PHB の蓄積が検出されないにも関わらず野生株と同レベルまで生育が回復することを見出した。*phaR* の単独破壊の場合、PHB 蓄積量は減少したが生育に影響はみられなかった。*phaR* にコードされる転写因子（PhaR）は PHB の蓄積レベルを制御することが知られているが、上記の結果から、酢酸資化の制御にも関与することが示唆された。これらの結果を踏まえ、上述の Δ*hup*Δ*cbb**株を親株として *phaR* を破壊した Δ*hcphaR**株、Δ*phaC*、Δ*phaR* 両遺伝子を破壊した Δ*hcphaCR**株を作製して酢酸からの水素生産を観察したところ、Δ*hcphaC**株で見られた生育不良は観察されず、水素生産量が Δ*hup*Δ*cbb**株と比較してそれぞれ 52%、60%上昇した。さらに改変型 *nifA* 高発現プラスミドを Δ*hcphaCR**株に導入することにより、水素生産速度および生産量が大きく向上した。本研究は METI の委託研究の一環として行われたものである。

hydrogen production, nitrogenase, polyhydroxybutyrate

発表責任者：乾将行（inui@rite.or.jp）

講演番号：3C02a13
講演日時：3 月 27 日 12:02～ 理学部講義棟 C02 会場

イソブタノール生産コリネ型細菌の開発
Development of isobutanol-producing *Corynebacterium glutamicum*
○長谷川 智[1]、城島 透[1]、須田 雅子[1]、乾 将行[1,2] ([1]RITE、[2]奈良先端大・バイオ)
○Satoshi HASEGAWA[1], Toru JOJIMA[1], Masako SUDA[1], Masayuki INUI[1,2] ([1]RITE, [2]NAIST)

【目的】化石燃料資源の枯渇や地球温暖化などの環境問題を解決するため、持続可能な資源・エネルギーの開発が急務となっている。実用化されている再生可能エネルギーの一つにバイオエタノールがあるが、より熱量が大きく吸湿性の低いブタノールが、次世代のバイオ燃料として、またバイオジェット燃料の原料として、注目されている。イソブタノールの微生物生産は Ehrlich pathway を利用した合成経路が報告されており、アミノ酸のバリンに由来するケト酸を前駆体とした脱炭酸および還元反応により構成される。しかしながら、この合成経路には酸化還元補酵素収支の不一致という問題が存在する。すなわち、解糖系で NADH が生成する反面、前駆体であるアミノ酸由来ケト酸の合成には NADPH を必要とする。また NADPH の供給には好気的な条件が適している一方で、アルコールの合成は NADH を消費する還元反応であるため逆に嫌気（還元）的な条件が望ましい。イソブタノールの効率的生産の実現にはこれらの矛盾の解決が必須となる。これに対して、我々研究グループでは *Corynebacterium glutamicum* を宿主とした還元条件における有用物質の効率的な生産について研究を進めてきており、イソブタノールの前駆体であるバリンについても酵素改変により酸化還元補酵素収支を一致させて高生産を達成している [1, 2)]。本発表では、これらの知見に基づく効率的なイソブタノール生産株の開発について報告する。
【方法と結果】イソブタノール合成経路では、バリン生産株で作成した NADH 型 *ilvC* 変異体を用いて酸化還元補酵素収支を一致させ、また発現強度の異なるプロモーターを用いた発現量の最適化により生産性を改善させた。得られた生産株では（その主要な生合成経路遺伝子 *ppc* の破壊にもかかわらず）コハク酸を著量副生したが、*pckA* の追加破壊によりその副生を大きく抑制することが出来た。その一方で、（還元的コハク酸生成は NADH を余分に消費するため）このコハク酸副生の抑制により菌体内 NADH/NAD^+比が上昇し、糖消費・イソブタノール生産速度が半分以下に低下したが、Entner–Doudoroff pathway 導入による解糖系強化により低下した速度を改善できた。更に PTS 高発現による糖取り込みの強化、および前駆体であるケト酸の利用で競合するバリン合成経路 *ilvE* の破壊により、生産性をさらに向上させることが出来た。本研究は METI の委託研究の一環として行われたものである。
1) Hasegawa S, et al., Appl Environ Microbiol, 2012, 78: 865-875.
2) Hasegawa S, et al., Appl Environ Microbiol, 2013, 79: 1250-1257.

isobutanol, *Corynebacterium glutamicum*, redox balance

講演番号：3C02p01
講演日時：3 月 27 日 13:50～ 理学部講義棟 C02 会場

Clostridium cellulovorans とメタン菌叢による温州ミカン残渣からのメタン発酵

Biomethane production from mandarin lees by using *Clostridium cellulovorans* and methanogens

○田丸 浩[1,2,3]、富田 寿男[1] ([1]三重大院・生資、[2]三重大・先端科学研支バイオインフォ、[3]三重大・スマートセルイノベ研)
○Yutaka Tamaru[1,2,3], Hisao Tomita[1] ([1]Grad. Sch. Bioresor., Mie Univ., [2]Dept, Bioinform., Mie Univ. ARSC, [3]Mie Univ. SCIC)

【目的】国連主導の二酸化炭素排出量削減にむけ、カーボンニュートラルであり、かつ、食料と競合しない第二世代バイオ燃料の研究が進められている。その実用化にむけて、高価な酵素購入を必要としない糖化酵素生産と糖からの発酵を同時に行う CBP（consolidated bioprocessing）が注目されている。本研究では、セルロソーム生産菌 *C. cellulovorans* とメタン発酵菌叢を用いた CBP を構築した。
【方法・結果】オレンジジュース工場では外果皮や絞り粕が残渣として大量に発生しており、果皮に含まれるリモネンによる生育阻害のため、0.2%(v/v)以上のリモネン含有培地では *Saccharomyces cerevisia* 野生ではエタノール生産量が優位に減少していたのに対し、*C. cellulovorans* ではリモネン濃度 0.5%(v/v) のリモネンを含む液体培地においてもセルロース分解能に影響がないことが判明した。さらに、*C. cellulovorans* およびメタン発酵菌叢を 0.5%温州ミカン残渣に投入した結果、12－26 日間で *C. cellulovorans* は前処理をしない外果皮に対して全糖量の 85%が分解され、最終的に 7.1ml の全ガス中にメタン 4.7 ml が得られた。

Clostridium cellulovorans, methanogens, CBP

発表責任者：田丸　浩（ytamaru@bio.mie-u.ac.jp）

講演番号：3C02p02
講演日時：3 月 27 日 14:01～ 理学部講義棟 C02 会場

Anaerobic degradation of bacterial whole cells by methanogenic microbial communities
○Samia Quaiyum[1,2], Kensuke Igarashi[2], Souichiro Kato[1,2] ([1]Hokkaido Univ., [2]AIST Hokkaido)

The bacterial whole cells can be used as carbon and energy sources by other organisms in aerobic and anaerobic environments. In the aerobic environments, degradation of bacterial cells is mainly initiated by activities of eukaryotes such as protozoal grazing. By contrast, the contribution of microorganisms to the degradation of bacterial cells is expected to be much greater in anaerobic environments, since the abundances and activities of eukaryotes are quite small. Although there have been many studies on the degradation of bacterial cells by aerobic microorganisms, such studies for anaerobic microorganisms are quite limited. In this study, we aimed to demonstrate the capability of anaerobic microorganisms to degrade bacterial cells and we assessed which kinds of microorganisms are involved in the degradation process. Methanogenic microbial communities were enriched from two anaerobic digesters and rice paddy field using living cells of four different bacterial strains as the sole carbon and energy sources. Most of the enriched communities produced much higher amount of methane than the control cultures (without inoculum and/or substrate bacteria), which indicates bacterial cells were degraded by anaerobic microorganisms. The survivability and autolysis of the substrate bacteria during 2 months of incubation were examined by measuring the colony forming unit and the amount of remained DNA by quantitative PCR. At least part of the substrate bacteria remained viable or intact in the control cultures without inoculum microorganisms, by contrast, microbial community analysis using next-generation sequencing showed that DNA of the substrate bacteria was completely degraded in most of the enriched cultures. These results suggest that the enriched anaerobic microorganisms actively lysed the substrate bacteria cells. The microbial community analysis also showed that bacteria classified in five phyla (Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria, Verrumicrobia and WWE1), which contained a number of uncultured bacteria with high phylogenetic novelty, were dominated in the enrichment cultures. These bacteria should be further investigated to identify their actual roles in the degradation of bacterial cells. Further studies on anaerobic degradation of bacterial cells will deepen the understanding of carbon cycles in natural environments, and will possibly aid establishment of technologies for reducing waste biomass.

Whole cell, Anaerobic digestion, Methanogenesis

発表責任者：Samia Quaiyum（megh1710@gmail.com）

講演番号：3C02p03
講演日時：3 月 27 日 14:12～ 理学部講義棟 C02 会場

Enrichment of Thermophilic Methanogenic Microflora from Mesophilic Activated Sludge

○ Sumire NAKAKOJI[1], Melly MELLYANAWATY[2], Wiratni S. BUDHIJANTO[2], Masahiro TATARA[1], Yoshiyuki UENO[1] ([1]Kajima Technical Research Institute, Japan, [2]Gadjah Mada University, Indonesia)

In order to startup thermophilic anaerobic reactor, a certain amount of inoculum of thermophilic methanogenic microflora is required. In this study, conventional waste activated sludge (WAS) that was taken under aerobic and mesophilic condition was examined as a seeding source for the enrichment of thermophilic methanogenic microflora. The WAS was diluted to 30,000 mg/L of SS by tap water and incubated at 55 °C in a continuous flow stirred tank reactor (CFSTR). The liquid volume in the reactor was 3.5 L in a 5 L vessel and the pH was maintained at over 7.0 by automatic titration system throughout the operation. After observation of gas evolution along with decreasing VFA concentrations in batch mode operation, garbage slurry (COD: 30,000 mg/L) was semi-continuously fed at preliminary determined specific organic loading rate (OLR), that was calculated from hydraulic retention time (HRT). The OLR was then stepwise increased, and a steady-state was reached at 3.2 g/L-reactor/day of OLR at 9.4 days of HRT.

Gas evolution increased depending OLR as time elapsed. During the steady-state of operation where more than 90% of WAS had been replaced, showing that average COD removal ratio was 75% and biogas containing 70% of methane was produced at approximately 1300 mL/L-reactor/day. Methane conversion ratio was 80% of theoretical amount of methane which is produced from the amount of decomposed COD. The stable reactor performance implied that thermophilic methanogenic microflora, with optimum temperature of 55 °C, was established in the CFSTR.

After this enrichment period, accumulation of thermophilic methanogens was confirmed by quantitative PCR using the specific primers for *mcr* gene, whereas it was less than detected level in the WAS and the garbage slurry. The shift of microbial community from mesophilic WAS to thermophilic methanogenic microflora is now being analyzed by pyrotag sequencing analysis of 16S rRNA gene amplicons that targets the V4 regions. It is concluded that thermophilic methanogenic microflora can be enriched from aerobic and mesophilic sludge as seed source within approximately 3 months of enrichment period.

Anaerobic digestion, Community analysis, Thermophilic methanogen

発表責任者：Sumire NAKAKOJI（nakakoji@kajima.com）

講演番号：3C02p04
講演日時：3 月 27 日 14:23～ 理学部講義棟 C02 会場

Studies on new control strategy for meta-lactic acid fermentation driving with mixed culture system

○SIYUAN YUE[1], Takaharo Mizoguchi[1], Yukihiro Tashiro[1], Kenji Sakai[1], Hirokuni Miyamoto[2]
([1]Grad. Sch. Bioresour. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ., [2]Fac. Horticul., Chiba Univ.)

【Introduction】 Lactic acid has been widely used in medical, food, and general chemical industries. In particular, the demand for optically pure $_{L}$-lactic acid is increasing due to interest in the production of high-quality polylactic acid as a biodegradable and eco- friendly bioplastic. Meta-fermentation is a method driving with complexed microbial system to produce valuable chemicals. We previously succeeded in meta-fermentation production of $_{L}$-lactic acid with 100% optical purity from model kitchen refuse (MKR), simply using the combination of *Bacillus coagulans* MN-07, *B. thermoamylovorans* MN55-6, and *B. hisashii* N-11. In this case, higher concentration of lactic acid and lactic acid selectivity were obtained than that using the original MAR-compost seed. The purpose of this study is to improve meta-fermentation performance further by novel pH control strategy.

【Materials and methods】Model kitchen refuse (MKR) medium was used for the fermentation experiments, which composed of the following compounds per liter: vegetables (66.7 g carrot peel, 66.7 g cabbage, and 66.7 g potato peel), fruit (50 g banana peel, 50 g apple peel, and 50 g orange peel), 70 g baked fish, 50 g rice, and 30 g used tea leaves. After homogenization of the above materials, the medium was sterilized at 121 ˚C for 15 min. The pH of MKR medium was adjusted with 10% ammonia solution. The MKR medium was inoculated with *Bacillus coagulans* MN-07, *B. thermoamylovorans* MN55-6, and *B. hisashii* N-11 , and then incubated (50℃) for 72 hours under anaerobic condition at pH 6, pH 6.5, pH 7, pH 7.5, and pH 8 by constantly control . Organic acids in the broth supernatant were determined using a specific HPLC system (Shimadzu, Kyoto). The $_{L}$-LA optical purity was determined using a biosensor (Oji Scientific Instruments).

【Results and discussion】As a result, the production was much improved by the constant pH control, compared with those by pH swing control. The highest accumulation (24.5 g/L) and productivity (0.341 g/L/h) was achieved at pH 6.5. While the selectivity of lactic acid was highest at pH 6.0 (95.7%). In conclusion, it was found that in meta-fermentation reconstructed with simple selected bacterial strains showed different manner in its fermentation control, compared with the meta-fermentation using an unknown complex microbial system.

Meta-fermentation, L-lactic acid production, Novel pH control

発表責任者：Kenji Sakai（kensak@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3C02p05
講演日時：3 月 27 日 14:34～ 理学部講義棟 C02 会場

新規乳酸ベースバイオポリマーの生合成における培養条件の検討
Culture conditions for biosynthesis of novel lactate-based polymers
○岡本 沙樹[1]、西上 明花[2]、後藤 早希[2]、松本 謙一郎[3]、阿部 英喜[4]、田口 精一[5]、田中 賢二[6]、松崎 弘美[1,2] ([1]熊本県大環境共生、[2]熊本県大院環境共生、[3]北大院工、[4]理研-CSRS、[5]東農大生命科学、[6]近畿大産理工)
○Saki OKAMOTO[1], Haruka NISHIGAMI[2], Saki GOTO[2], Ken'ichiro MATSUMOTO[3], Hideki ABE[4], Seiichi TAGUCHI[5], Kenji TANAKA[6], Hiromi MATSUSAKI[1,2] ([1]Fac. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [2]Grad. Sch. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [3]Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., [4]RIKEN-CSRS, [5]Fac. Life Sci., Tokyo Univ. Agric., [6]Fac. Humanity-Oriented Sci. Eng., Kindai Univ.)

【目的】ポリ乳酸（PLA）は高い透明性を有する優れた生分解性プラスチックであり、通常は、重金属を触媒とした化学重合によって製造されている。近年、環境低負荷な微生物合成系によるポリヒドロキシアルカン酸（PHA）生合成システムを利用した PLA 様物質の新規乳酸ベースポリマーの生合成が報告されている[1)]。これまでに、*Pseudomonas* sp. 61-3 由来改変 PHA 重合酵素遺伝子 [*phaC1(STQK)*] を利用して、乳酸（LA）ユニットと炭素数 4 の 3-ヒドロキシブタン酸（3HB）ユニットからなる共重合ポリエステル P(LA-*co*-3HB)が合成されている。私たちは、それに中鎖長 3-ヒドロキシアルカン酸（3HA）ユニットを導入した P(LA-*co*-3HB-*co*-3HA)や P(LA-*co*-3HA)の生合成に成功した[2)]。本研究では、組換え大腸菌による新規乳酸ベースポリマーの生産性の向上やモノマー組成比の改善を行うため、その培養条件を検討することを目的とした。
【方法および結果】LA ユニットを供給する *Lactobacillus acetotolerans* HT 由来の D-乳酸脱水素酵素遺伝子（*ldhD*）、プロピオニル CoA トランスフェラーゼ遺伝子（*pct*）、3HB ユニットを供給する β-ケトチオラーゼ遺伝子（*phbA*）とアセトアセチル CoA リダクターゼ遺伝子（*phbB*）、中鎖長 3HA ユニットを脂肪酸合成経路から供給する(*R*)-3-ヒドロキシアシル ACP チオエステラーゼ遺伝子（*phaG*）と *Pseudomonas aeruginosa* PAO 由来の(*R*)-3HA-CoA リガーゼ遺伝子（PA3924）を改変 PHA 重合酵素遺伝子 [*phaC1(STQK)*] とともに *lac* プロモーターあるいは、*Cupriavidus necator* 由来のプロモーターの下流に挿入したプラスミドを複数構築した。これらを大腸菌 LS5218 株に導入した。また、これらの遺伝子から *phbAB* 遺伝子を除いたプラスミドを大腸菌 CAG18497 株に導入した。炭素源として 2%グルコース、もしくは 2%キシロースを含む LB 培地にて、30°C、48 時間培養し、合成されたポリエステルの菌体内蓄積率とモノマー組成をガスクロマトグラフィーにより分析した。また、好気的条件として振とうフラスコを、微好気的条件として三角フラスコを用いて培養条件の検討を行った。以上の結果、LA 分率が向上した P(LA-*co*-3HB)と、LA ユニット、3HB ユニット、中鎖長 3HA ユニットからなる新規乳酸ベースポリマーの P(LA-*co*-3HB-*co*-3HA)および P(LA-*co*-3HA)を合成することができた。現在、乳酸ベースポリマーの蓄積率を高めるための検討を行っている。

1)Taguchi, S. *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2008
2) Goto, S. *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, 2019

biodegradable plastics, polyhydroxyalkanoate, lactate-based polymer

発表責任者：松崎弘美（matusaki@pu-kumamoto.ac.jp）

講演番号：3C02p06
講演日時：3 月 27 日 14:45～ 理学部講義棟 C02 会場

アルギン酸を単一炭素源としたポリ(3-ヒドロキシブタン酸)の微生物合成
Microbial production of poly(3-hydroxybutyrate) from alginate as a sole carbon source
○滝田 祐人[1]、森谷 大樹[2]、河合 盛進[3]、鈴木 宏昭[3]、山田 美和[1,2] ([1]岩手大・農、[2]岩手大・院総合科学、[3]トヨタ紡織・新領域開拓部)
○Yuto TAKITA[1], Hiroki MORIYA[2], Sung-Jin KAWAI[3], Hiroaki SUZUKI[3], Miwa YAMADA[1,2] ([1]Iwate Univ., [2]Iwate Univ. Grad. Sch., [3]New Field Pioneering Div. Toyota Boshoku Co.)

【目的】
ポリヒドロキシアルカン酸(PHA)は、バイオマスを原料として微生物が細胞内に合成・蓄積するバイオプラスチックである。さらに、PHA は生分解性を有することから、使用後、環境へ負荷を与えるリスクが低いと期待される。これまで植物由来の糖や油を原料として使用し、PHA を微生物合成する研究がほとんどであったが、当研究室では、廃棄海藻成分を原料とする PHA 合成を目指し、海藻を構成する糖のひとつであるマンニトールからポリ(3-ヒドロキシブタン酸) [P(3HB)]を合成できる *Burkholderia* sp. M5M02[1]や、多様な褐藻類に安定して多く含まれるアルギン酸を単一炭素源として P(3HB)を合成する 2 株の細菌[2]を新たに見出してきた。この 2 株の細菌の 16SrDNA 配列を決定し相同性検索を行った結果、どちらも *Cobetia* 属細菌と推定された。本研究では、我々が見出した 2 株の細菌の形態・生理学的特徴による同定と P(3HB)蓄積率の高い培養条件の検討を目的とした。
【方法・結果】
我々がこれまでに単離した 2 株の細菌の形態・生理学的特徴を明らかとするため、両菌株の顕微鏡観察、グラム染色、生育可能温度・NaCl 濃度・炭素源試験、オキシダーゼ試験を行った。結果、両菌株は、16SrDNA 配列の相同性が最も高かった *Cobetia marina* のタイプ菌と類似した性質を示したが、生育可能な NaCl 濃度や利用できる炭素源の種類が異なっていた。そのため、2 菌株の種までは決定せず、*Cobetia* sp. IU180733JP01(5-11-6-3)および *Cobetia* sp. IU190790JP01(5-25-4-2)とした。さらに、現在、アルギン酸を単一炭素源とする PHA 合成用窒素制限培地で両菌株を培養し、P(3HB)蓄積率が高い培地中のアルギン酸濃度、NaCl 濃度、pH および培養時間を検討している。現状、5-11-6-3 株では、培地中のアルギン酸濃度 3%、pH 5、NaCl 濃度 6%、3 日間、30℃で培養した際に、最大の P(3HB)蓄積率(59.7wt%)、生産量(2.78 g/L)となった。また、5-25-4-2 株では、培地中のアルギン酸濃度 3%、pH 5、NaCl 濃度 5%、2 日間、30℃で培養した際に、最大の P(3HB)蓄積率(44.1wt%)、生産量(2.11 g/L)を示した。よって、両菌株において培養条件を最適化することにより、アルギン酸を単一炭素源とした際の P(3HB)蓄積率、生産量が初期培養条件(5-11-6-3: 蓄積率 5.4wt%、生産量 0.03 g/L, 5-25-4-2: 蓄積率 8.5wt%、生産量 0.08 g/L) よりも著しく向上することが示唆された。
【参考文献】[1] Yamada M, et al., *Fisheries Science* (2018) 84:405-412
[2] 特願 2018-159148

polyhydroxyalkanoate, seaweed, alginate

発表責任者：山田 美和（myamada@iwate-u.ac.jp）

講演番号：3C02p07
講演日時：3 月 27 日 15:06～ 理学部講義棟 C02 会場

高温メタン発酵過程における分子量の異なる生分解性プラスチックの分解特性

Decomposition characteristic of biodegradable plastic in different molecular weights by thermophilic methane fermentation

○曽 厚嘉[1]、増谷 一成[2]、大西 章博[1]、木村 良晴[2]、藤本 尚志[1] ([1]東農大、[2]京工繊大)
○HOU CHIA TSENG[1], Kazunari MASUTANI[2], Akihiro OHNISHI[1], Yoshiharu KIMURA[2], Naoshi FUJIMOTO[1] ([1]Tokyo Univ. Agric., [2]Kyoto Inst. Tech.)

【背景と目的】事業系の食品ロスは年間 300～400 万トン発生しており、大部分が焼却・埋立処分されている。飼料化・肥料化などにより食品廃棄物を再利用する場合は、包装類を分別除去する必要があり、分別過程で除けなかった容器包装類は処理工程で閉塞や故障を起こす原因となっている。現在、これらの容器包装類をポリ乳酸（PLA）などの BDP(生分解性プラスチック)に置き換えようとする社会的な動きがある。しかしながら、BDP の生分解過程における生物学的な知見は少なく、実用性の見込みについては不透明である。本研究では、BDP である PLA の高温メタン発酵過程における分解メカニズムの解析を試みる。これまでの研究で、分子量約 13 万～17 万の高分子 PLA がメタン生産の良質な基質になり得ることが強く示唆された (https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100327)。乳酸消費細菌群が PLA の分解過程で重要な役割を担っていることが示唆された。本報では、分子量の大きく異なる BDP の分解特性を評価した結果について報告する。

【実験材料と方法】実験材料には、高温メタン発酵装置（55℃）の嫌気性汚泥と、Corbion 社製の PLA 粉末（分子量約 17 万）とラクチドの開環重合法より合成した OLA (分子量 1000 及び 3500 のオリゴ乳酸) 粉末を使用した。分解実験は 125ml 容バイアル瓶に PLA または OLA および嫌気性汚泥または超純水を投入し、窒素置換して密封後、55℃で約 100 日間行った。分解実験過程で発生したバイオガスを回収し、ガス生成量、ガス組成を測定した。また、PLA 及び OLA の乾燥重量と乳酸濃度の変化から分解率とメタン収率を求めた。分解後の分子量の変化は GPC を用いて推定した。微生物相の解析は分解実験後の汚泥から DNA を抽出して、PCR-DGGE 法によって行った。

【結果及び考察】超純水に PLA 及び OLA 粉末を添加した分解実験では、PLA の分解率は 82%であった。OLA は、分子量 1000 で 24%、3500 で 65%だった。PLA に比べて OLA の物理的分解率は低かった。また、MLA(乳酸モノマー)の蓄積も確認された。OLA では結晶化が進んだことが示唆された。一方で、高温メタン発酵では、PLA と OLA の分解率は全て 100%であった。これに伴い、約 680～860ml 程度のメタンガスが生成した。メタン収率は約 500ml/g-consumed であった。GPC による解析の結果、超純水による分解過程では、低分子化は進むものの、MLA までの分解が完結していないことが示された。この過程で働く細菌相には PLA と OLA の間で大きな違いは検出されなかった。

biodegradable plastic, polylactic acid, thermophilic methane fermentation

発表責任者：曽厚嘉（44718001@nodai.ac.jp）

講演番号：3C02p08
講演日時：3 月 27 日 15:17～ 理学部講義棟 C02 会場

選択的白色腐朽菌が産する溶解性多糖モノオキシゲナーゼの構造および活性の解析

Investigation of the structure and activity of lytic polysaccharide monooxygenase from selective white-rot fungus

○近藤 敬子[1]、グエン フエン[2]、ワンサミハルジャ アンドリー[2]、小瀧 努[1,2]、三上 文三[3]、渡辺 隆司[4]、永田 崇[1,2]、片平 正人[1,2] ([1]京大・エネルギー理工学研究所、[2]京大・院エネ科、[3]京大・院農、[4]京大・生存研)

○Keiko KONDO[1], Huyen NGUYEN[2], Andry WANGSAMIHARDJA[2], Tsutomu KODAKI[1,2], Bunzo MIKAMI[3], Takashi WATANABE[4], Takashi NAGATA[1,2], Masato KATAHIRA[1,2] ([1]Inst. Adv. Energy, Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. Energy Sci., Kyoto Univ., [3]Grad. Sch. Agriculture, Kyoto Univ., [4]Res. Inst. Sustainable Humanosphere, Kyoto Univ.)

環境問題が深刻化する近年において、化石資源に依存しない循環型社会への切り替えが急速に求められている。木質バイオマスは地球上の豊富な賦存量および食料需要と競合しないといった利点から、化石資源に代わる燃料や化成品の原料として期待される循環型資源である。その主成分であるリグノセルロースは、セルロース、ヘミセルロース、リグニンの 3 成分が会合して構成されており、木質バイオマスの利活用に際しては、各成分の強固な構造と成分間の複雑な相互作用が障害となっている。例えば従来のセルロース精製プロセスでは、強い物理的・化学的処理によりリグニンの構造が損なわれてしまうために、木質バイオマス全体としての利用効率が下がってしまうという問題がある。その解決策として木材腐朽菌が産する酵素を利用した温和な条件による木質バイオマスの物質変換が検討されている。我々は木材腐朽菌の中でもリグニンを優先的に分解する選択的白色腐朽菌である *Ceriporiopsis subvermispora* 由来の酵素に着目している。本研究が対象とする Lytic polysaccharide monooxygenase (LPMO)は多糖のグリコシド結合を酸化的に分解する酵素であり、リグノセルロース中に存在する結晶性の高いセルロースやヘミセルロースにも作用可能である。LPMO は糖質加水分解酵素である各種セルラーゼやヘミセルラーゼと協奏的に働くことでセルロースやヘミセルロースの分解を促進すると考えられている。一方でリグニンに由来する低分子化合物が LPMO の活性に必要な電子供与体として働き得ることから、LPMO とリグニン分解の関連性も示唆されている。我々は *C. subvermispora* 由来の LPMO についてピキア酵母による発現系および精製法を確立した。得られた高純度の LPMO を用い、ジメトキシフェノールを基質とした酸化活性測定を行ったところ、特に弱塩基性下において高い酸化活性を示すことが明らかになった。続いて、微結晶セルロースの分解実験を行った結果、セルラーゼによるセルロースの分解量が LPMO の添加により三割以上向上した。このことから、*C. subvermispora* 由来の LPMO がセルラーゼとの協奏効果を持つことが示された。さらに、LPMO の結晶化条件のスクリーニングを行い、Mg^{2+}イオンおよび Ca^{2+}イオン存在下でそれぞれ針状および長方状の結晶が得られることを見出した。得られた結晶を X 線結晶構造解析に供した結果、既知の LPMO に共通した β-サンドイッチ構造、および 2 つのヒスチジンに保持された Cu^{2+}イオンからなる活性中心を持つことが示された。活性中心の周囲には 3 つのループが位置しており、これらのループが基質との結合を担っていると考えられる。現在はこれらのループと基質の相互作用部位の同定の他、LPMO がセルラーゼによる木材糖化に及ぼす影響の評価を目的として研究を進めている。

Selective white-rot fungi, Lytic polysaccharide monooxygenase, X-ray crystallography

講演番号：3C02p09
講演日時：3 月 27 日 15:28～ 理学部講義棟 C02 会場

リグニン・多糖複合体分解に関与する白色腐朽菌由来グルクロノイルエステラーゼの速度論解析および添加剤耐性

Kinetic analysis and chemical-resistance of white-rot fungal glucuronoyl esterases, which are involved in the degradation of lignin-carbohydrate complex

○坂井 勇太[1]、林 孟宜[1,2]、近藤 敬子[2]、米沢 柚香[1]、檜山 明穂[1]、永田 崇[1,2]、片平 正人[1,2] ([1]京大・院エネ科、[2]京大・エネルギー理工学研究所)
○Yuta SAKAI[1], Meng-I LIN[1,2], Keiko KONDO[2], Yuka YONEZAWA[1], Akiho HIYAMA[1], Takashi NAGATA[1,2], Masato KATAHIRA[1,2] ([1]Grad. Sch. of Energy Sci., Kyoto Univ., [2]Inst. of Adv. Energy, Kyoto Univ.)

【背景】木質バイオマスは主にセルロース，ヘミセルロース，リグニンの 3 成分で構成されており，化石資源代替の化成品やバイオ燃料の原料として注目されている．しかし，木質中の細胞壁にはリグニン・多糖複合体 (LCC)が存在しており，上記構成成分の分解，分離を困難にしている．2006 年に LCC を選択的かつ効率的に分解する酵素であるグルクロノイルエステラーゼ (GE) が発見され，LCC 分解への応用が期待されてきた. 我々は白色腐朽菌 *Ceriporiopsis subvermispora* および *Pleurotus eryngii* 由来の GE (*Cs*GE および *Pe*GE) に着目した．*Cs*GE は酵素活性ドメイン(CE15)のみからなり，*Pe*GE は CE15 の N 端側にリンカーで接続された糖質結合モジュール (CBM)を持つ．CBM は多糖を認識して *Pe*GE の基質親和性を向上させると考えられる. 本研究では *Cs*GE, *Pe*GE の活性ドメイン *Pe*GE(CE15), および CBM を持つ *Pe*GE 全長についてそれぞれ *Pichia* 酵母発現系による発現・精製方法を確立し，酵素活性を検証した．さらに，各種添加剤が GE の活性に及ぼす影響を評価した.
【方法】*Cs*GE，*Pe*GE(CE15)および *Pe*GE 全長をコードした遺伝子を含むベクターDNA をエレクトロポレーション法により，*Pichia pastoris* X-33 株に導入した．形質転換された菌体をグリセロール培地で培養した後，メタノール培地中で発現誘導を行った．発現誘導中は 24 時間ごとに終濃度 0.5% (v/v) メタノールを添加した．3 日間の発現誘導の後，培養上清を回収し，限外ろ過とニッケルアフィニティークロマトグラフィーに供した. 精製された酵素を用い，ベンジルグルクロン酸 (BnGlcA)を基質として活性の速度論解析を行った．加えて，各種添加剤存在下での活性解析を行った.
【結果】*Cs*GE，*Pe*GE(CE15)および *Pe*GE 全長の酵母発現系による発現および精製方法を確立し，高純度な酵素を調製することに成功した．はじめに，*Cs*GE と *Pe*GE(CE15)について BnGlcA に対する活性を速度論的に解析した．その結果，*Pe*GE(CE15)が他の木材腐朽菌由来の GE に比べて顕著に高い酵素活性を持つことが示された．また，各種添加剤の影響を調べた結果，*Pe*GE(CE15)が添加剤への高い耐性を有することが明らかになった．続けて，CBM を含む *Pe*GE 全長の活性解析を行ったところ，*Pe*GE(CE15)の 2 倍以上の酵素効率を示した．このことから，*Pe*GE は全長として用いることで，より高い性能を発揮すると考えられる．以上の結果から，*Pe*GE は活性・添加剤耐性共に優れており，LCC 分解プロセスにおいて高い適用性を持つと期待される．今後は，GE の基質親和性に対する CBM の影響を評価し，かつ実際の木質バイオマス中の LCC に対する GE の活性解析を進める予定である．
【参考文献】Meng-I Lin *et al*., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **102**, 9635-9645 (2018).

Lignin-carbohydrate complex, Glucuronoyl esterase, Carbohydrate binding module

講演番号：3C02p10
講演日時：3 月 27 日 15:39～ 理学部講義棟 C02 会場

草食性陸ガニによるリグニン含有バイオマス分解の可能性について

Biomass degradation activity of herbivorous land crabs, *Chiromantes haematocheir* and *Chiromantes dehaani*

○三宅 克英[1]、久世 悠登[1]、八神 陽一[1]、小野内 健人[1]、馬場 保徳[2] ([1]名城大理工、[2]石川県大)
○Katsuhide MIYAKE[1], Yuuto KUZE[1], Youichi YAGAMI[1], Taketo ONOUCHI[1], Yasunori BABA[2] ([1]Meijo Univ., [2]Ishikawa Pref. Univ.)

【背景及び目的】天然の原生林と海が接した海岸林に生息するアカテガニやクロベンケイガニなどの陸ガニ類は、海岸森林バイオマスの分解者として、海と森の間の物質循環に大きな役割を果たしている。海岸原生林は昔から「魚つき林」と呼ばれるように、豊かな水産資源の供給源ともなっている．森林物質循環の流れや森林河口域の生態系のなかで、両方を行き来するアカテガニやクロベンケイガニは「森と海のつなぎ手」として重要な役割を担っており，海岸生態系や生物多様性保全のための「アイコン」的存在ともなっている．これらの陸ガニ類は落ち葉や木片を食料として利用することが報告されているが，食性の研究はほとんど進んでいない。本研究の目標は、これまで省みられることのなかった陸ガニ類のバイオマス分解能力を解析、同定、抽出し、生物工学的な応用を可能にすることである。これまでの生態観察から、このカニは落ち葉のような柔らかいバイオマスだけでなく、固い切り株なども食料にしている可能性があり、バイオマス有効利用のボトルネックとなっている難分解性リグニン類の分解能力を持っているものと期待している。今回はリグニン類分解活性の指標としてグアヤコール酸化活性および 2, 6-ジメトキシフェノール（2,6-DMP）酸化活性に着目し、この活性の特徴を解析するとともに、全 RNA-seq 解析を行うことによって、遺伝子の単離も試みた。

【結果及び考察】石川県と愛知県の海岸原生林からアカテガニとクロベンケイガニを採集し、その植食性とバイオマス分解活性を調べた。カニは解剖し、肝臓と膵臓の機能を持つといわれている中腸腺、胃、腸を採取し、粗酵素液を調製した。植食性がアカテガニより強いと思われるクロベンケイガニの方が、またオスよりメスの方が強い植食性を示した。リグニン分解活性としてはグアヤコール酸化活性に着目し、各個体の活性を調べたところ、主に中腸腺から検出されることが判明した。またこの活性はアカテガニにおいてはオスよりもメスで高頻度に検出され、クロベンケイガニではほぼ全ての個体から強い活性が検出された。これらの結果はこの活性が陸ガニ類の植食性の強さと強い関連性を持っていることを示していた。一方、2,6-DMP 酸化活性も幾つかの個体から検出されたが、その挙動からグアヤコール酸化活性を示す酵素とは異なる酵素によって反応されていることが明らかとなった。アカテガニの RNA-seq の解析から、リグニン分解酵素として知られるラッカーゼ遺伝子を複数見出し、そのうち最も発現量の多い酵素を大腸菌に生産させて活性を解析した。その結果、この酵素は主に 2, 6-DMP 酸化活性を担っていることが明らかとなった。

1) Katsuhide Miyake, Kaori Ura, Shinnosuke Chida, Yoshiki Ueda, Yasunori Baba, Takasei Kusube, Seiji Yanai: Guaiacol oxidation activity of herbivorous land crabs, *Chiromantes haematocheir* and *Chiromantes dehaani,* Journal of Bioscience and Bioengineering, 128, pp.316-322 (2019).

land crab, lignin, biomass

発表責任者：三宅克英（miyake@meijo-u.ac.jp）

講演番号：3C02p11
講演日時：3 月 27 日 15:50～ 理学部講義棟 C02 会場

Heterologous expression and oxidative activity of four fungal ligninolytic enzymes by *Pichia pastoris*

○KENNETH TEO SZE KAI[1], KEIKO KONDO[2], TAKASHI NAGATA[1,2], MASATO KATAHIRA[1,2]
([1]Graduate School of Energy Science, Kyoto University, [2]Institute of Advanced Energy, Kyoto University)

Lignin is the second most abundant biopolymer available on earth, occupying about 30% of lignocellulosic biomass. Due to the chemically recalcitrant properties of lignin, it is commonly categorized as a waste and normally incinerated for industrial power generation. Valorization of lignin to value-added products require efficient depolymerization or fragmentation of lignin that is difficult to be achieved via chemical/physical treatment, which is commonly accompanied by undesired lignin denaturation. On the contrary, enzymatic treatment by ligninolytic enzymes is a good alternative to overcome these obstacles.

Laccase, lignin peroxidase (LiP), manganese peroxidase (MnP), and versatile peroxidase (VP) are the main extracellular ligninolytic enzymes secreted by white-rot fungi, which is responsible for the degradation of lignin compound in nature. However, the homologous expression system faces the limitation of having a slow growth rate, thereby low enzyme yield. Heterologous *E. coli* expression system also often has limitation in obtaining active fungal enzymes due to the formation of inclusion bodies. On the other hand, the heterologous *Pichia pastoris* expression system has an advantage in enzyme yield as it has a rapid growth rate and efficient expression system for secreted proteins.

In this study, laccase, LiP, MnP, and VP genes were subcloned into *P. pastoris* and individually expressed accordingly. All four ligninolytic enzymes were successfully secreted in the form of active enzyme into the culture medium. The respective activity assay of crude enzymes, which are obtained by ultra-filtration of culture supernatant, was carried out using 2,6-dimethoxyphenol (DMP), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), and veratryl alcohol (VA) as the substrates. All the enzymes displayed activity towards their corresponding substrates. MnP successfully oxidized phenolic DMP in the presence of Mn^{2+}, whereas, LiP showed activity towards the non-phenolic substrate, VA as well as DMP. VP exhibited both Mn^{2+}-dependent and Mn^{2+}-independent oxidation toward DMP and VA, respectively. Apart from that, laccase showed high activity toward ABTS and DMP after the doping of Cu^{2+}. The lignocellulose conversion by the combination of these four enzymes is going to be examined.

Lignocellulosic biomass, White rot fungi, Ligninolytic enzyme

講演番号：3C02p12
講演日時：3 月 27 日 16:01～ 理学部講義棟 C02 会場

リグニンの C_α-C_β 間を特異的に開裂する白色腐朽菌の探索

Screening of white-rot fungi which can cleavage C_α-C_β linkages specifically in lignin

○篠原 桃香[1]、永井 優樹[1]、森 智夫[1]、河岸 洋和[1,2,3]、平井 浩文[1,2]（[1]静大農、[2]静大グリーン研、[3]静大創造院）
○Momoka SHINOHARA[1], Yuki NAGAI[1], Toshio MORI[1], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,3], Hirofumi HIRAI[1,2] ([1]Faculty of Agriculture, Shizuoka Univ., [2]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka Univ., [3]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka Univ.)

【背景・目的】

リグニンはリグノセルロース系バイオマスの主要成分であり、再生可能エネルギーや芳香族化合物の供給源として期待されている。しかし多様な結合様式による構造の複雑さや不均一性が要因となり、付加価値の高い単量体への変換技術が求められている。特に、リグニンからバニリンやシリンガアルデヒドなどのリグニンモノマーを高収率で生産するバイオリファイナリー技術の確立は、低炭素社会の実現に向けて必要不可欠である。白色腐朽菌は単独でリグニンを高度に分解できる唯一の生物であり、リグニン分解酵素と呼ばれるラジカル生成型酸化還元酵素群によりリグニンを分解する事がよく知られている。この反応は非特異的であり、付加価値の高いリグニンモノマーを蓄積することはできない。一方、白色腐朽菌のリグニン分解機構は完全には解明されておらず、既存の知見のみでは説明できない点も多い。そこで本研究では、リグニンモノマーの獲得において鍵反応であると考えられるリグニン中の C_α-C_β 開裂反応を特異的に触媒可能な白色腐朽菌の獲得を目指し、高分子を模した非フェノール性 β-O-4 型二量体リグニンモデル化合物用いて、C_α-C_β 開裂を特異的に行う白色腐朽菌の探索を行った。

【方法・結果】

高分子を模した非フェノール性 β-O-4 型二量体リグニンモデル化合物[1-3]、および C_α-C_β 開裂により生じると予想される分解産物を化学的に合成した。本リグニンモデル化合物を、当研究室が保有する自然界から分離した白色腐朽菌による分解試験に供し、リグニンモデル化合物分解率と C_α-C_β 開裂型分解産物の生成量から C_α-C_β 開裂型分解産物への変換率を算出した。これまでに、全 84 株の白色腐朽菌で分解試験を行い、変換率が高い菌株を数種を選抜した。現在、選抜した白色腐朽菌がどの様なメカニズムで C_α-C_β 間を特異的に開裂するのか、検討中である。

【参考文献】

1) *J. Wood Sci.* **45**, 440-443 (1999).
2) *Appl. Environ. Microb.* **61**, 3407-3414 (1995).
3) *Mokuzai Gakkaishi.* **26**, 426-431 (1980).

white-rot fungi, lignin, C_α-C_β cleavage

講演番号：3C02p13
講演日時：3 月 27 日 16:21～ 理学部講義棟 C02 会場

Transcriptomic analysis of lignocellulose degrading enzymes in *Herbivorax saccincola* A7 on cellulose and xylan fermentation

Sirilak Baramee, ○Takamitsu Arai, Akihiko Kosugi (JIRCAS)

[Aim] *Herbivorax saccincola* A7 has recently been isolated as an alkali-thermophilic anaerobic cellulolytic and hemicellulolytic bacterium from the compost of Ishigaki island. *H. saccincola* A7 was known to possess a strong xylan degradation ability. To understand how the bacterium degrades lignocellulosic biomass, we carried out a comparative gene expression analysis by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis for the growth media using cellulose, xylan, cellulose-xylan mixture, and empty fruit bunch (EFB), respectively, as sole carbon source.

[Results and Discussion] The qRT-PCR analysis was focused on the genes encoding cellulosomal scaffolding proteins and glycosyl hydrolases (GHs) which have an important role in lignocellulose decomposition. As a result, the gene expression of 50 among 61 target enzymes was influenced by the carbon sources. Interestingly, the cellulosomal scaffolding proteins, and cellulose and xylan degrading enzymes of A7 were not induced when xylan was used to the growth medium as a sole carbon source. Meanwhile, the expression level of the enzymes was drastically increased when cellulose-xylan mixture and EFB were utilized as sole carbon sources. These results indicate that the lignocellulose degradation ability of *H. saccincola* A7 may be controlled enzyme expression by cellulosic materials involving lignocellulosic biomass, not by xylan.

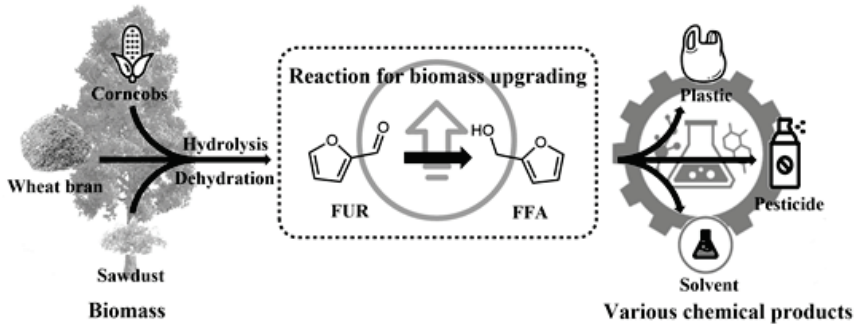
Herbivorax saccincola A7, Cellulase, Xylanase

講演番号：3C02p14
講演日時：3 月 27 日 16:32～ 理学部講義棟 C02 会場

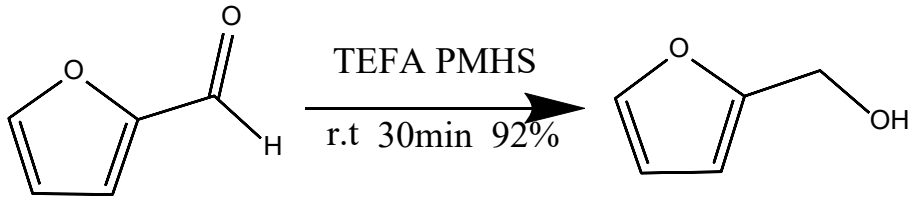
Tetraethylammonium fluoride-mediated a green hydrogen transfer process for selective reduction of biomass-derived aldehydes

○Fusheng XU[1], Zhaozhuo YU[2], Hu LI[2], Hiroyuki KONNO[1] ([1]Yamagata Univ., [2]Guizhou Univ.)

With the depletion of fossil sources and the deterioration of global warming, the demand for clean energy is significantly increased in recent decades. Nowadays, biomass, which is deemed as a sustainable and widespread resource, gets more and more attention of researchers. Various approaches to utilization of biomass for manufacturing high-value compounds have been developed, including e.g., thermal, chemical, biochemical, and electrochemical conversion routes. Because of its tremendous economic effect, the chemical conversion is a more welcoming way. Particularly, the hydrogenation of biomass-derived furfural (FUR) to high-value compounds is a potential approach to upgrade biomass, where FUR molecule has high reactivity due to the presence of aldehyde group and furan ring. In this respect, FUR can be converted to a variety of valuable products (e.g., furfuryl alcohol (FFA), furan, and levulinic acid) through different reactions like hydrogenation, decarboxylation, and ring-opening. Among them, FFA, derivable from the selective hydrogenation of FUR, is an important feedstock of medicines, furan resin, rocket fuel, solvent, varnish, and pigment (Fig. 1). Therefore, it is highly desirable to develop efficient and mild methods for the partial reduction of bio-based FUR to FFA.



Experiment



1)Xu, F.S.; Yu, Z.Z.; Li, Y.; Konno, H.; Li, H.; Yang, S. Curr. Green Chem. 2019, 6(2), 127-134.

biomass conversion, hydrogen transfer, green catalysis

講演番号：3C02p15
講演日時：3 月 27 日 16:43～ 理学部講義棟 C02 会場

ジフェニルエーテル化合物を分解する新規微生物の探索

Screening of microorganisms capable of degrading 4,4'-dihydroxydiphenyl ether

○利根川 聡史[1]、羽部 浩[2]、古屋 俊樹[1] ([1]東京理科大・理工、[2]産総研・環境管理)
○Satoshi TONEGAWA[1], Hiroshi HABE[2], Toshiki FURUYA[1] ([1]Fac. Sci. Tec., Tokyo Univ. Sci., [2]EMRI, AIST)

【背景・目的】リグニンやダイオキシン等の化合物は、ベンゼン環同士が強固なエーテル結合により連結されている。このエーテル結合を切断可能な微生物を見いだせれば、リグニンからの芳香族化合物の回収や環境汚染物質の分解に応用できる可能性がある。ベンゼン環同士のエーテル結合を切断する活性を有する微生物のほとんどは、化合物に対する資化性を指標とした探索により取得されている。しかしこの方法では、エーテル結合切断活性を有していても下流の分解代謝経路を有さない微生物や、活性を有していても化合物により生育が阻害される微生物は、取得されず未発見のままとなってしまう。本研究では、4,4’-ジヒドロキシジフェニルエーテル（4,4’-DDE、図 1）を用い、エーテル結合切断活性を指標とした探索により当該活性を示す新規微生物の取得を試みた。

【方法・結果】日本各地から 512 の土壌サンプルを採取し、一次スクリーニングとして、ニトロフミン酸（リグニン様物質を含む混合物）を炭素源とする固体培地で生育可能な微生物を選択した。その結果、826 株の微生物が取得された。4,4’-DDE のエーテル結合が切断されると、ヒドロキノンを生成することが予想されるため、二次スクリーニングでは、ヒドロキノンと反応して呈色する試薬のロダニンを用いた。具体的には、固体培地上で生育した微生物を 4,4’-DDE を含む溶液に懸濁し、30℃で 72 時間振とう後の反応液にロダニンを添加した。その結果、一次スクリーニングで取得された微生物のうち、5 株の微生物で反応液がロダニンの添加により呈色した。さらに、反応液を HPLC により分析したところ、ヒドロキノンの標品と一致する保持時間に微小ながらピークが検出された。二次スクリーニングで取得した 5 株の微生物について、16S rRNA 遺伝子もしくは ITS1 領域の配列をもとに属種同定を行った結果、3 株は *Streptomyces* 属の細菌、2 株は *Trichoderma* 属と *Gibberella* 属の真菌と同定された。高い変換活性を示した *Streptomyces* sp. TUS-ST3 について、4,4’-DDE との反応液を LC-MS および GC-MS により詳細に解析したところ、2 つの生成物が検出され、ヒドロキノンと 4,4’-DDE の水酸化物と推定された（図 1）。

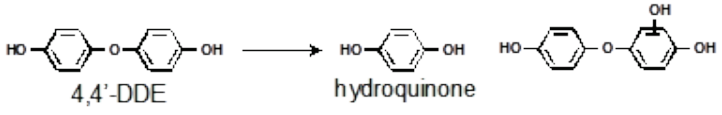


図 1　*Streptomyces* sp. TUS-ST3 による 4,4’-DDE の推定変換反応

biodegradation, ether bond, *Streptomyces*

発表責任者：古屋俊樹（tfuruya@rs.tus.ac.jp）

講演番号：3C02p16
講演日時：3 月 27 日 16:54～ 理学部講義棟 C02 会場

2-フェノキシアセトフェノンのエーテル結合を切断する微生物の機能解析
Characterization of microorganisms capable of cleaving ether bond of 2-phenoxyacetophenone

○大谷 早紀[1]、羽部 浩[2]、古屋 俊樹[1] ([1]東京理科大・理工、[2]産総研・環境管理)
○Saki OYA[1], Hiroshi HABE[2], Toshiki FURUYA[1] ([1]Fac. Sci. Tec., Tokyo Univ. Sci., [2]EMRI, AIST)

【背景・目的】原油由来の芳香族化合物は化学製品の合成原料などに利用されているが、原油は有限の資源であり将来的に枯渇してしまう恐れがある。そこで近年、バイオマス資源のリグニンが芳香族化合物の供給源として注目されている。リグニンはモノリグノールと呼ばれる芳香族化合物が酸化重合した高分子化合物であり、多くのエーテル結合が含まれている。その中でも β-*O*-4 アリルエーテル結合が最も多く含まれており、この結合を切断できればリグニンを低分子化することが可能と考えられる。我々はこれまでに、リグニンの β-*O*-4 アリルエーテル結合に対するモデル化合物として 2-フェノキシアセトフェノン（2-PAP、図 1）を用い、エーテル結合切断活性を指標とした探索により当該活性を示す候補微生物を 8 株取得している [1)]。本研究では、取得した微生物の属種同定と機能解析を実施した。

【方法・結果】これまでに、540 の土壌サンプルからニトロフミン酸（リグニン様物質を含む混合物）を炭素源とする固体培地で生育可能な微生物を選択し、さらに 2-PAP と反応させた際にフェノールを生成する微生物を 8 株取得している。これらの 8 株について、16S rRNA 遺伝子もしくは ITS1 領域の配列をもとに属種同定を行ったところ、*Acinetobacter* 属（4 株）、*Streptomyces* 属（1 株）、*Cupriavidus* 属（1 株）、*Nocardioides* 属（1 株）の細菌と、*Penicillium* 属（1 株）の真菌と同定された。高い変換活性を示した *Acinetobacter* sp. TUS-SO1 について、2-PAP との反応液を HPLC により詳細に解析したところ、3 つの生成物が検出され、これらの化合物はフェノール、アセトフェノンおよび 2-フェノキシ-1-フェニルエタノールの標品と保持時間が一致した。これより、エーテル結合が還元的に切断されていることが示唆された（図 1）。現在、GC-MS により生成物を詳細に解析しているところである。一方、TUS-SO1 株の当該変換活性は、グルコースを炭素源として培養した際にも検出され、構成的に発現していることが示唆された。

1) 大谷早紀、利根川聡史、羽部浩、古屋俊樹、2019 年度日本生物工学会大会（講演要旨集 p.106）.

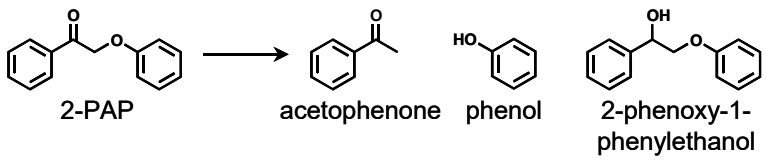


図 1　*Acinetobacter* sp. TUS-SO1 による 2-PAP の変換

biodegradation, ether bond, lignin

発表責任者：古屋　俊樹（tfuruya@rs.tus.ac.jp）

講演番号：3C03a01
講演日時：3 月 27 日 09:30～ 理学部講義棟 C03 会場

N,N,N-trimethylglucosaminium 残基を有する化合物に対する *p*-nitrophenyl *N*-acetyl-β-D-glucosaminide 資化性菌由来β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼの感受性の検討

Investigation of the sensitivity of β-*N*-acetylglucosaminidase from *p*-nitrophenyl *N*-acetyl-β-D-glucosaminide assimilating bacteria to *N,N,N*-trimethylglucosaminium containing compounds

○小出 麻奈、菅沼 笙子、仁戸田 照彦、神崎 浩（岡山大院・環境生命）
○Mana KOIDE, Shoko SUGANUMA, Teruhiko NITODA, Hiroshi KANZAKI (Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okayama Univ.)

【背景・目的】当研究室では，*p*-nitrophenyl *N*-acetyl-β-D-glucosaminide (*p*NP-GlcNAc)を加水分解する糖質加水分解酵素ファミリー20 GlcNAcase の GlcNAcase 阻害剤 TMG-chitotoriomycin に対する阻害感受性が GlcNAcase の基質特異性と明確な相関を持つことを明らかにしていた [1]。また，TMG-chitomonomycin および TMG-chitobiomycin も TMG-chitotriomycin と同じ傾向の阻害選択性を示したことから，非還元末端の *N,N,N*- trimethylglucosaminium (TMG)残基が阻害活性に寄与していると推測された [2]。本研究では，TMG-chitotriomycin アナログである *p*-nitrophenyl *N,N,N*-trimethyl β-D-glucosaminium iodide (*p*NP-TMG)を合成し，既知 GlcNAcase および *p*NP-GlcNAc 資化性菌由来 GlcNAcase に対する阻害選択性を調べた。

【方法・結果】TMG-chitotriomycin 感受性ハスモンヨトウ蛹由来 GlcNAcase と TMG-chitotriomycin 非感受性 *Streptomyces coelicolor* 由来 GlcNAcase について *p*NP-TMG による阻害試験を行ったところ，*p*NP-TMG は TMG-chitotriomycin と同様にハスモンヨトウ蛹由来 GlcNAcase を阻害したが，*Streptomyces coelicolor* 由来 GlcNAcase を阻害しなかった。また，*p*NP-GlcNAc を単一炭素窒素源とした集積培養で得られた *p*NP-GlcNAc 資化性菌 27 菌株のうち，MK26 株についてブイヨン培地および *p*NP-GlcNAc 培地で培養した後，無細胞抽出液を調製し，*p*NP-TMG および TMG-chitotriomycin による阻害試験を行った。その結果，ブイヨン培地でも *p*NP-GlcNAc 分解活性が見られたことから，MK26 株は GlcNAcase を構成的に発現していると推測された。また，*p*NP-GlcNAc 培地ではブイヨン培地に比べて比活性が上昇していたことから，*p*NP-GlcNAc 培地での培養により，構成的に発現している GlcNAcase とは別の GlcNAcase の生産が誘導されることが示唆された。さらに，*p*NP-GlcNAc 培地での培養で得られた無細胞抽出液の *p*NP-GlcNAc 分解活性は，*Streptomyces coelicolor* 由来 GlcNAcase と同様に *p*NP-TMG および TMG-chitotriomycin によりほとんど阻害されなかった。一方，ブイヨン培地での培養で得られた無細胞抽出液の *p*NP-GlcNAc 分解活性は，*p*NP-TMG によりハスモンヨトウ蛹由来 GlcNAcase と同程度阻害されたものの，TMG-chitotriomycin に対する感受性は明らかに低かった。このことから，MK26 株においてブイヨン培地で生産される GlcNAcase は，*p*NP-TMG および TMG-chitotriomycin に対する感受性がハスモンヨトウ蛹由来 GlcNAcase と *Streptomyces coelicolor* 由来 GlcNAcase のいずれとも異なることが明らかになった。

1) H. Shiota *et al.*, *Carbohydr. Res.*, **375** (2013), 2) H. Usuki *et al.*, *Org. Biomol. Chem.*, **9** (2011)

β-*N*-acetylglucosaminidase inhibitor, chitooligosaccharide, *p*NP-TMG

発表責任者：神崎浩（hkanzaki@okayama-u.ac.jp）

講演番号：3C03a02
講演日時：3 月 27 日 09:41～ 理学部講義棟 C03 会場

Pseudoclostridium thermosuccinogenes および *Tepidibacillus decaturensis* 由来 GH15 マルトオリゴ糖 4（6）グルコシルトランスフェラーゼ様タンパク質の機能解析
Functional analysis of GH15 maltooligosaccharide 4 (6) α-D-glucosyltransferase-like proteins
○澤田 桃、佐分利 亘、森 春英（北大院農）
○MOMO SAWADA, WATARU SABURI, HARUHIDE MORI (Hokkaido Univ.)

【背景と目的】
Glycoside hydrolase family 15 (GH15)は，グルコアミラーゼ（GA）等，マルトオリゴ糖（MOS）やイソマルトオリゴ糖(IMO)の非還元末端に作用してβ-Glc を遊離するアノマー反転型加水分解酵素を主要な構成酵素とする．近年 GH15 酵素として，同様の基質に作用してグルコシル転移を触媒するデキストランデキストリナーゼ(DDase)やマルトオリゴ糖 4(6)グルコシルトランスフェラーゼ(M4(6)GT)も見出された．両酵素とも MOS に対しα1-4/α1-6 転移を触媒し，DDase は連続的α1-6 転移により多糖デキストランを，M4(6)GT は逐次的α1-6 転移により各種鎖長の IMO および IMO を含む糖を生成する．M4(6)GT は IMO の加水分解活性も示す．本発表では，機能既知の *Thermoanaerobacter siderophilus* 由来 M4(6)GT(TsM4(6)GT)の類縁酵素として，*Pseudoclostridium thermosuccinogenes* 由来 PtM4(6)GT(TsM4(6)GT の GH15 ドメインと配列同一性 43%)，ならびに *Tepidibacillus decaturensis* 由来 TdM4(6)GT（同 52%）について組換え酵素により機能解析を行った．
【結果と考察】
大腸菌により組換え酵素を生産した．両酵素ともに N 末端の推定シグナルペプチドを除去し，C 末端に His タグを付加した．培養液 1 L の菌体より精製標品 41～63 mg が得られた．両酵素ともにマルトース（G2）を基質として転移反応を触媒した．本反応速度は PtM4(6)GT では pH 4.5 および 37˚C，TdM4(6)GT では pH 4.5 および 50˚C で最大となった．PtM4(6)GT は pH 3.0-8.5（4˚C,20 時間）および 45˚C 以下（pH 4.5，15 分間），TdM4(6)GT は pH 2.5-8.5 および 50˚C 以下で 80%以上の活性を保持した．基質を各種 MOS（12 mM)として初期反応生成物を HPAEC-PAD により解析した．両酵素とも G2 からはα1-4 転移生成物 G3 とα1-6 転移生成物パノースを生成した．基質を G3 とすると，PtM4(6)GT はα1-4 転移生成物 G4 のみを生成したのに対し，TdM4(6)GT はこれに加えてα1-6 転移生成物の 4 糖を生じた．次に 12 mM G5 を基質として長時間反応させ，生成物の経時的変化を TLC により解析した．両酵素ともに，まずはα1-4 転移による MOS の不均化，続いて G2 へのα1-6 転移によるパノースおよびより長鎖の糖の生成，更には Glc へのα1-6 転移による IMO の生成も見られた．PtM4(6)GT の反応では，重合度 10 以上のα1-6 転移産物の生成と蓄積がみられ，PtM4(6)GT の比較的長鎖のα1-6 グルカン生成能が示唆された．TdM4(6)GT の反応では，GA により分解されない産物が反応の初期から認められ，TdM4(6)GT の比較的長鎖の MOS に対するα1-6 転移能が示された．

glycoside hydrolase family 15, transglucosylation, maltooligosaccharide 4 (6) α-D-glucosyltransferase

発表責任者：澤田 桃（samomo@eis.hokudai.ac.jp）

講演番号：3C03a03
講演日時：3 月 27 日 09:52～ 理学部講義棟 C03 会場

麹菌の GH1 に属する菌体内局在型新規 β-グルコシダーゼの酵素学的諸性質

Enzymatic properties of a novel GH1 intracellular β-glucosidase from *Aspergillus oryzae*

○渡部 昭、新谷 尚弘、五味 勝也（東北大院農）
○Akira WATANABE, Takahiro SHINTANI, Katsuya GOMI (Tohoku Univ.)

【目的】我々は、麹菌(*Aspergillus oryzae*)ゲノム情報をもとに未解析の菌体外分泌型新規 β-グルコシダーゼの機能解明をこれまで行ってきており、作製した β-グルコシダーゼ遺伝子の網羅的高発現株から新規な β-グルコシダーゼを精製しその酵素学的諸性質を報告してきた（１、２）。今回は、麹菌の推定 β-グルコシダーゼのうち、菌体内に局在すると考えられる Glycoside hydrolase family 1(GH1)に属する新規 β-グルコシダーゼの機能解明を目的に、昨年度の本大会で報告したグルコース耐性能の高い BglU/Bgl5（３）の酵素学的諸性質についてさらに詳細に解析したので報告する。

【方法・結果】麹菌ゲノムデータベース(DOGAN: http://www.bio.nite.go.jp/dogan/top、AspGD: http://www.aspgd.org/) 及び Carbohydrate-Active Enzymes Database(CAZy: http://www.cazy.org/)を用いた探索結果から、麹菌ゲノム上には既報のあるもの、未解析のものを含めて 25 個の β-グルコシダーゼ遺伝子が存在することが推定されている。このうち、麹菌菌体内に局在すると推定される β-グルコシダーゼは３個あり、その１つである BglU/Bgl5 について目的 DNA 断片を大腸菌発現用ベクター(pCold II)に組み込み、大腸菌で高発現させその酵素学的諸性質を調べた。

BglU/Bgl5 は、合成基質の *p*-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside(*p*NPG)の他、天然のオリゴ糖基質ではセロビオース（β-1,4 結合）に最も高い加水分解活性を示し、その他にラミナリビオース（β-1,3 結合)、ソホロース（β-1,2 結合）に対しても加水分解活性を有していた。また、本酵素の *p*NPG に対する反応速度パラメーターを、GH1 に属する他の真菌類由来の β-グルコシダーゼのものと比較したところ、本酵素の K_m 値は 0.47(mM)、k_{cat} 値は 3.51(S^{-1})であり、K_m 値はほぼ同等であったが k_{cat} 値はやや低い値を示した。この他、糖転移活性の有無を中心とした本酵素の他の諸性質について報告する。

本研究は科学研究費助成事業（基盤研究(C)（一般））の補助を受けて実施された。

（１） K. Kudo et.al., *J. Biosci. Bioeng.*, 2015, 120(6): 614–623
（２） A. Watanabe et.al., *J. Biosci. Bioeng.*, 2016, 121(3): 259–264
（３） 渡部ほか、2019 年度日本農芸化学会大会講演要旨集、p.1688

β-glucosidase, *Aspergillus oryzae*, Glycoside Hydrolase Family 1

講演番号：3C03a04
講演日時：3 月 27 日 10:03～ 理学部講義棟 C03 会場

ビフィズス菌 *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* の特異なアラビノキシラン分解系
Unique pathway of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* for arabinoxylan degradation
○芦田 久、吉原 侑希、米野 雅大（近畿大生物理工）
○Hisashi Ashida, Yuki Yoshihara, Masahiro Komeno (Fuculty of B.O.S.T., Kindai Univ.)

【目的】アラビノースを含有する植物性の多糖やオリゴ糖は、いくつかのビフィズス菌に対して増殖促進効果を示すことが報告されているが、その機構は完全には明らかにされていない。乳児から成人まで幅広い年代のヒト腸管に分布することから好適なプロバイオティクスであると考えられる *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* に対する選択的な増殖効果を示すアラビノオリゴ糖を設計することを最終目的として、本菌がもつアラビノース含有糖鎖加水分解酵素の特異性の解析を進めている。今回は、本菌のゲノム中に存在する糖質加水分解酵素ファミリー43 (GH43)遺伝子クラスター(locus tags BLLJ_1850～BLLJ_1854)のうち未解析であった BLLJ_1850 (BlArafE)と BLLJ_1851 (BlArafD)について解析した。
【方法】両遺伝子を PCR で増幅後 pET23b ベクターに In-fusion 法で挿入し発現プラスミドを作製した。大腸菌 *E. coli* BL21(DE3)を用いて組換え酵素を大量発現させ、解析に用いた。BlArafE と BlArafD は、分子内に GH43 ドメインをそれぞれ 2 つずつもつため、各ドメインの活性中心と予想される酸性残基をアラニンで置換した点変異体を作出した。
【結果および考察】BlArafE と BlArafD は合成基質 pNP-α-L-Araf に対して作用するα-L-アラビノフラノシダーゼであった。BlArafE はアラビノキシランに作用し、アラビノキシロオリゴ糖を用いた解析からα1,3-Araf に作用することが示唆された。点変異体の解析から、これらの活性は N 末端側の GH43 subfamily 22 (GH43_22)ドメインによるもので、C 末端側の GH43_34 ドメインの酵素活性は検出できなかった。BlArafD はアラビノキシランとアラビナンからアラビノースを遊離させた。オリゴ糖を用いた解析により、α1,3-Araf とα1,2-Araf で二重置換されたアラビノキシロオリゴ糖のα1,2-Araf と、アラビナン主鎖のα1,5-Araf に対して作用することがわかった。点変異体の解析から、N 末端側の GH43_UC (unclassified)ドメインが二重置換構造のα1,2-Araf に、C 末端側の GH43_26 ドメインがα1,5-Araf に作用することが明らかになった。これらの結果から、BlArafE の N 末端側 GH43_22 ドメインと BlArafD の N 末端側 GH43_UC ドメインが協調してアラビノキシランの二重置換構造を分解することが明らかになった。
【参考文献】Komeno M, Hayamizu H, Fujita K, Ashida H, 2019. *Appl. Environ. Microbiol.* **85**, e02582-18.

probiotics, prebiotics, bifidobacteria

発表責任者：芦田 久（ashida@waka.kindai.ac.jp）

講演番号：3C03a05
講演日時：3 月 27 日 10:14～ 理学部講義棟 C03 会場

Gum arabic 側鎖末端を分解する *Fusarium oxysporum* 由来 4-*O*-α-L-ラムノシル-β-D-グルクロニダーゼの反応特性解析

Characteristics of a *Fusarium oxysporum* 4-*O*-α-L-rhamnosyl-β-D-glucuronidase acting on the terminal structure of gum arabic side chain

○吉條 美由[1]、近藤 辰哉[1]、中屋 慎[2,3]、竹中 重雄[4]、小竹 敬久[5]、中澤 昌美[1]、上田 光宏[1]、阪本 龍司[1]（[1]阪府大院・生命環境、[2]阪府大院・研究推進機構、[3]大手前栄養製菓学院専門学校・栄養、[4]阪府大院・総リハ、[5]埼玉大院・理工）

○Miyu KICHIJO[1], Tatsuya KONDO[1], Makoto NAKAYA[2,3], Shigeo TAKENAKA[4], Toshihisa KOTAKE[5], Masami NAKAZAWA[1], Mitsuhiro UEDA[1], Tatsuji SAKAMOTO[1] ([1]Graduate School of Life & Environmental Sciences, Osaka Prefecture University, [2]Organization for Research Promotion, Osaka Prefecture University, [3]Department of Nutrition, Otemae College of Nutrition, [4]Graduate School of Comprehensive Rehabilitation, Osaka Prefecture University, [5]Graduate School of Science & Engineering, Saitama University)

【背景】Gum arabic（GA）は優れた乳化特性や被膜性を持つことから、乳化剤や増粘安定剤として産業界で広く利用されている。構造は糖鎖である II 型アラビノガラクタン（AGII）とポリペプチド鎖から形成されている。主成分である AGII は、主鎖 β-1,3 ガラクタンに側鎖として β-1,6 ガラクトオリゴ糖やアラビノース（Ara）、ラムノース（Rha）、グルクロン酸（GlcA）等が結合し、複雑な分岐構造を示す。そのため、詳細な構造は解明されておらず、化学法のみでの構造解析は困難である。そこで、物性改変にも有効なツールとなる酵素に着目した。本研究室ではこれまでに、AGII 高分解菌である *Fusarium oxysporum* 12S 株由来の 8 種の AG II 分解酵素の性質を決定しているが、今回新たに本菌培養上清中に GA より未知オリゴ糖を遊離させる酵素（FoBGlcA）を発見した。本研究では、FoBGlcA の単離および異種発現系の構築、組換え酵素の反応特性解析を行った。

【方法・結果】本菌培養上清より FoBGlcA を単離し、LC/IT/TOF-MS 解析により決定した部分アミノ酸配列を基に *fobglcA* 遺伝子をクローニングし、pPICZαA/*Pichia pastoris* 系で発現させた。アミノ酸配列解析より、本酵素は GH79 C-terminal β-domain を保持することが明らかとなった。しかし、既に性質が決定されている GH79 に属する酵素とは相同性が低く（4–20%）、また系統樹解析の結果からも、本酵素は新規な GH ファミリーを形成する可能性が示唆された。また、構成糖分析や ESI-MS 解析より、未知オリゴ糖をラムノシルグルクロン酸（Rha-GlcA）と同定した。基質特異性解析より、本酵素は GA に高活性を示したが、*p*NP-β-D-GlcA や（4-*O*-Me-）β-D-GlcA を非還元末端に有する β-1,6 ガラクトオリゴ糖への活性は微弱であり、GH79 に属する β-D-グルクロニダーゼとは大きく異なる特異性を示した。これらの結果より、本酵素は非還元末端の Rha を認識して Rha-GlcA を遊離させる、新規な反応様式を有する 4-*O*-α-L-ラムノシル-β-D-グルクロニダーゼであることが判明した。FoBGlcA による GA からの Rha 遊離率は 75%を示し、GA 側鎖において多くの Rha が Rha-GlcA 構造を形成することが明らかとなった。しかし、本研究室保有の L-Rha-α-1,4-D-GlcA リアーゼによる GA からの Rha 遊離率は 93%を示したことから、GA 側鎖中に FoBGlcA の活性を妨害する構造が存在すると推定された。そこで、本研究室保有の AGII 分解酵素や Bio-GelP2 カラムクロマトグラフィーを用いて、非還元末端に Rha-GlcA を有する種々の GA 側鎖由来オリゴ糖を精製した。獲得したオリゴ糖に対する FoBGlcA のキネティクス解析等により、Rha-GlcA の還元末端側に存在するガラクトース残基に結合した Ara 残基が、本酵素の活性を妨害することが示唆された。

Gum arabic, *Fusarium oxysporum*, glycoside hydrolase

講演番号：3C03a06
講演日時：3 月 27 日 10:35～ 理学部講義棟 C03 会場

単細胞性シアノバクテリア由来フマラーゼ（FumC）の生化学解析

Biochemical characterization of fumarase C properties from a unicellular cyanobacterium.

○片山 徳賢[1]、小山内 崇[2] ([1]明治大院農、[2]明治大農)
○Noriaki KATAYAMA[1], Takashi OSANAI[2] ([1]Meiji Univ. Grad. Sch., [2]Meiji Univ.)

【背景と目的】米国エネルギー省が定めるバイオリファイナリーでの重要な 12 品目にはコハク酸やフマル酸、リンゴ酸という C_4 化合物が含まれる。これらは細胞内の代謝産物の重要な中間体であり、食品添加物としての利用や医薬製剤の前駆体、化学工業製品の基幹物質として知られている。フマラーゼ(FumC)は、TCA 回路内のリンゴ酸とフマル酸の相互変換反応を触媒する酵素である。フマラーゼは多くの生物で生化学解析が行われているが、モデルシアノバクテリアである *Synechocystis* sp. PCC 6803 のフマラーゼ（以後 *Sy*FumC と表記）の生化学的特徴については報告がない。そこで本研究では、*Sy*FumC の生化学解析とアミノ酸残基の改変による機能改変を試みた。
【方法】GST タグを付加した *Sy*FumC を *Escherichia coli* を用いて発現させ、回収した *E. coli* の細胞破砕液からアフィニティークロマトグラフィーによって *Sy*FumC の精製を行った。分光光度計を用いて、フマル酸の波長 250 nm における吸収の減少及び増加を測定することで、フマル酸または L-リンゴ酸を基質とする酵素活性を測定した。更に、他のシアノバクテリアとの FumC のアミノ酸配列の比較から、活性部位周辺において特徴的なアミノ酸残基を決定し、314 番目の Ala を変換したタンパク質である *Sy*FumC_A314E を作製し、同様に酵素活性を測定した。また、FumC についての系統解析を行った。
【結果と考察】*Sy*FumC の生化学解析から至適温度及び至適 pH は 30℃、pH 7.5 であるとわかった。また、フマル酸及び L-リンゴ酸に対する K_m 値は、それぞれ 0.24 mM、0.48 mM となり、L-リンゴ酸に対する基質親和性が低いということが分かった。また、k_{cat}/K_m 値は、それぞれ 415.1、90.3 s^{-1} mM^{-1} となった。*Sy*FumC_A314E では、至適温度及び至適 pH は、野生型の酵素と比べて違いがほとんど見られなかったが、フマル酸を基質としたときの k_{cat} 値が 101.2 s^{-1} から 37.8 s^{-1} へと低下した。このアミノ酸置換による k_{cat} 値の低下は、L-リンゴ酸を基質にした場合でも確認された。
以上より、今回改変した活性部位近傍のアミノ酸残基は触媒活性に重要な残基であると考察される。また、系統解析の結果から、窒素固定型と非窒素固定型のシアノバクテリアで系統群が分かれることが分かった。このことから、窒素固定型のシアノバクテリアと非窒素固定型のシアノバクテリアでは酵素の活性や基質特異性に差異がある可能性が示唆された。今後は他種シアノバクテリアのフマラーゼ、特に窒素固定型シアノバクテリアのフマラーゼについても解析を行いたいと考えている。

Cyanobacteria, TCAcycle, Enzyme

講演番号：3C03a07
講演日時：3 月 27 日 10:46～ 理学部講義棟 C03 会場

麹菌が生産するキシログルカンの分解に重要な alpha-xylosidase の同定
Identification of *Aspergillus oryzae* alpha-xylosidase involved in xyloglucan degradation
○松沢 智彦[1]、亀山 昭彦[2]、矢追 克郎[1] ([1]産総研・生物プロセス、[2]産総研・創薬基盤)
○Tomohiko MATSUZAWA[1], Akihiko KAMEYAMA[2], Katsuro YAOI[1] ([1]AIST BPRI, [2]AIST BRD)

麹菌 *Aspergillus oryzae* は植物由来多糖類を分解・資化するために様々な酵素を生産している。本研究ではキシログルカン（植物の種子や細胞壁に含まれているヘミセルロースの一種）を分解する酵素に焦点を当てている。キシログルカンはβ-1,4 グルカン主鎖にキシロースが規則的に枝分かれした構造を基本とし、さらにガラクトースやアラビノースなどが付加している。我々は *A. oryzae* がキシログルカンを分解するために生産しているイソプリメベロース生成酵素をコードする遺伝子（*ipeA* 遺伝子）を同定した。イソプリメベロース生成酵素はキシログルカンオリゴ糖の非還元末端からイソプリメベロース（α-D-xylopyranosyl-(1→6)-D-glucopyranose）を遊離するユニークな酵素で、本酵素をコードする *ipeA* 遺伝子の発現はキシログルカンオリゴ糖存在下において劇的に誘導されることを見出した。そこで、*ipeA* 遺伝子と同様にキシログルカンオリゴ糖存在下において発現誘導される遺伝子を探索し、イソプリメベロース生成酵素と協調的に働いている酵素の同定を目指した。

キシログルカンオリゴ糖存在下における *A. oryzae* の発現解析の結果、Glycoside hydrolase family 31(GH31)に属する酵素をコードする遺伝子（alpha-xylosidase A: *axyA* と命名）の発現がキシログルカンオリゴ糖依存的に劇的に誘導されていることを見出した。本遺伝子がコードする酵素（AxyA）を異種宿主発現し、その酵素学的諸性質を解析した結果、AxyA はイソプリメベロースをグルコースとキシロースに分解するα-キシロシダーゼであることが明らかになった。また、本酵素の種々のキシログルカンオリゴ糖への活性および作用機序、またそれを踏まえた *A. oryzae* のキシログルカン分解機構を明らかにしたので報告する。

xyloglucan, *Aspergillus oryzae*, enzyme

発表責任者：松沢智彦（matsuzawa-tomohiko@aist.go.jp）

講演番号：3C03a08
講演日時：3 月 27 日 10:57～ 理学部講義棟 C03 会場

植物病原性真菌 *Microdochium nivale* 由来菌体外 β-グルコシダーゼの機能解析
Functional analysis of the extracellular ß-glucosidase from phytopathogenic fungus *Microdochium nivale*

○太田 智也[1]、佐分利 亘[1]、ジュウェル リンダ[2]、シャン トム[3]、今井 亮三[4]、森 春英[1]（[1]北大院農、[2]カナダ農務省、[3]ゲルフ大、[4]農研機構）
○Tomoya OTA[1], Wataru SABURI[1], Linda JEWELL[2], Tom HSIANG[3], Ryozo IMAI[4], Haruhide MORI[1]（[1]Hokkaido Univ., [2]Agriculture Canada, [3]Univ. of Guelph, [4]NARO）

【背景】紅色雪腐病菌 *Microdochium nivale* は積雪下でイネ科作物に感染し，雪腐病を引き起こす好冷性子嚢菌であり，秋まきコムギや牧草など越冬性作物の生産に甚大な被害を与えている．本菌の生育に関わる糖質代謝関連酵素に関する知見はほとんどない．発表者らは，これまでに本菌の培養上清に 3 糖以上のラミナリオリゴ糖に作用する GH55 エキソ β-1,3-グルカナーゼを見出し，その酵素化学的諸性質を明らかにした．本研究では新たに培養上清に β-グルコシダーゼを見出し，その機能を解析した．
【方法・結果】*M. nivale* をポテトデキストロース培地にて 18°C で 4 週間液体培養した．培養上清から *p*-ニトロフェニル β-D-グルコピラノシド（pNP-Glc）加水分解活性を指標として各種カラムクロマトグラフィーにより MnBG3A を精製した．培養上清 2.6 L から精製酵素 0.83 U が得られた．本酵素の比活性は 7.57 U/mg（pH 4.6，30°C，1 mM pNP-Glc），分子質量は 94 kDa であった．N 末端アミノ酸配列解析およびトリプシン消化断片の LC-MS/MS 解析により本酵素をコードする遺伝子を決定した．単離 cDNA から推定されるアミノ酸配列により MnBG3A は Glycoside hydrolase family 3（GH3）に分類された．機能解析に十分な酵素量を確保するため，組換え MnBG3A を *Pichia pastoris* 形質転換体により生産した．培養上清より硫酸アンモニウム沈澱および各種カラムクロマトグラフィーにより精製した．培養上清 1.8 L から精製組換え酵素 320 U が得られた．組換え酵素は SDS-PAGE 解析において 129 kDa を示した．本酵素の推定分子質量は 92 kDa であり，Endoglycosidase H 処理によって 98 kDa となったことから，ネイティブ酵素とは異なり組換え酵素は N 型糖鎖付加により高分子化したと判断された．精製酵素標品の pNP-Glc に対する比活性は 45.5 U/mg であり，至適 pH は 5.1，至適温度は 50°C であった．40°C 以下（pH 5.1，15 分間），pH 5.1–10.1（4°C，24 時間）で安定であった．本酵素は各種 pNP 配糖体のうち pNP-Glc および *p*-ニトロフェニル β-D-キシロピラノシド（pNP-Xyl）に作用した．2 mM pNP-Xyl への加水分解速度は 2 mM pNP-Glc への加水分解速度の 0.4%であった．β-グルコビオースに対する反応では，ラミナリビオース，ゲンチオビオース，セロビオース，およびソホロースのいずれに対しても加水分解活性を示した（k_{cat}/K_m 56.4–1410 $s^{-1}mM^{-1}$）．このうちラミナリビオースを最もよい基質とし，次いでゲンチオビオース（k_{cat}/K_m 720 $s^{-1}mM^{-1}$）に高い活性を示した．ラミナリオリゴ糖（2–5 糖）では 3 糖を最もよい基質とした（k_{cat}/K_m 1830 $s^{-1}mM^{-1}$）．これらの結果から，本酵素は 2 糖を分解して単糖を供給する機能を担うことで GH55 エキソ β-1,3-グルカナーゼとともに β-グルカン代謝に関与することが示唆された．

β-glucosidase, *Microdochium nivale*, Glycoside hydrolase family 3

発表責任者：太田智也（t_ota@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：3C03a09
講演日時：3 月 27 日 11:08～ 理学部講義棟 C03 会場

イネ由来 GH1 β-グルコシダーゼ OsTAGG1 のβ→α ループ 4 置換体のグリコン特異性の解析

Glycone specificity of β→α loop 4 mutant of rice GH1 β-glucosidase OsTAGG1

○堀越 秀、佐分利 亘、森 春英（北大農院）
○Shu HORIKOSHI, Wataru SABURI, Haruhide MORI (Grad. Sch. Agric., Hokkaido Univ.)

【背景と目的】

糖質加水分解酵素ファミリー1 (GH1) に属す β-グルコシダーゼ (BGlu) は，β-グルコシドに作用するが，D-フコシド，ガラクトシドおよびマンノシドにも作用するものもあり，多様なグリコン特異性を示す．植物 GH1 BGlu の多くは β-グルコシドよりも β-D-フコシドに高い特異性を示す．イネ由来 GH1 BGlu である OsTAGG1 および OsTAGG2 は 85%と高いアミノ酸配列同一性示すが，OsTAGG1 は β-グルコシドに，OsTAGG2 は β-D-フコシドに高い特異性を示す．このため，両酵素は GH1 BGlu のグリコン特異性を支える分子基盤を明らかにするために好適である．本研究では，OsTAGG1 と OsTAGG2 との構造比較に基づき導入した部位特異的変異酵素の解析を通じてグリコン特異性を決定する構造因子を明らかにすることを目的とした．

【結果および考察】

OsTAGG1 および OsTAGG2 の基質結合部位を形成するアミノ酸配列を比較すると，グリコン特異性が異なるにも関わらず直接的な基質との相互作用によりマイナスサブサイトを形成するアミノ酸残基に違いは見られなかった．プラスサブサイトを形成する触媒ドメイン（TIM バレル）のβ→α ループ 4，ループ 5 およびループ 6 を比較すると，ループ 5 上では一残基のみの相違，ループ 6 上では違いが見られないなど，これらの二つのループは両酵素間でよく似ていたが，ループ 4 の配列には多数の違いが見られた．OsTAGG1 のβ→α ループ 4 上に存在すると推定される L176, S177, V180, A181, S185 および M188 は，OsTAGG2 においてそれぞれ W178, T179, S182, N183, T187 および L189 が相当した．また，OsTAGG1 では M188 の直前に OsTAGG2 にはない G187 の挿入があった．OsTAGG1 において L176 から M188 までのループを OsTAGG2 の W178 から L189 までのループに置換した変異酵素 OsTAGG1-cmr を調製した．1 mM pNP Glc および pNP Fuc に対する速度は，それぞれ野生型 OsTAGG1 では 90.3 s^{-1} および 4.11 s^{-1}，野生型 OsTAGG2 では 235 s^{-1} および 328 s^{-1} であったのに対し，OsTAGG1-cmr では 161 s^{-1}（野生型 OsTAGG1 の 1.8 倍）および 125 s^{-1} (30 倍）であった．pNP Fuc に対する反応速度が著しく上昇したことにより，pNP Fuc に対する pNP Glc 加水分解反応速度は，野生型 OsTAGG1 の 22 倍に対して OsTAGG1-cmr では 1.3 倍に低下した．すなわち，OsTAGG2 型のβ→α ループ 4 の導入によって OsTAGG1 の pNP Fuc 特異性が増加した．これより，OsTAGG1 におけるグリコン特異性は，β→α ループ 4 上の残基により決定されることが示された．

β-glucosidase, glycoside hydrolase family 1, site-directed mutagenesis

発表責任者：堀越秀（shrks@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：3C03a10
講演日時：3 月 27 日 11:19～ 理学部講義棟 C03 会場

シロアリ共生原生生物由来新規 BGL の生産と機能解析

Heterologous expression and characterization of a ß-glucosidase from a symbiotic protist of the lower termite

○齋藤 悠香[1]、平松 紳吾[1]、山田 千晶[1]、山田 勝成[1]、小田切 正人[2]、守屋 繁春[2] ([1]東レ(株)先端融合研、[2]理化学研究所)
○Haruka SAITO[1], Shingo HIRAMATSU[1], Chiaki YAMADA[1], Katsushige YAMADA[1], Masato OTAGIRI[2], Shigeharu MORIYA[2] ([1]Toray Industries, inc., [2]RIKEN)

【背景と目的】
原油代替資源として再生可能なセルロース含有バイオマスを分解し、得られた糖からバイオ燃料やバイオポリマー原料を発酵生産する試みが盛んに検討されている。バイオマス糖化には *Trichoderma* 属菌の糖化酵素が広く利用されているが、この中に含まれるβ-グルコシダーゼ(BGL)量および活性は不十分であり、それを補完する良質な BGL が求められている。一方、木材を唯一の栄養源とするシロアリの共生原生生物群は、セルロース分解効率が非常に高く、バイオマス糖化に有用な酵素の遺伝子源として期待されるが、その難培養性のために解析が困難であり、シロアリ共生原生生物由来 BGL 遺伝子の取得例はこれまでなかった。本研究ではバイオマス糖化を効率的に進める効果のある BGL 遺伝子を、シロアリ共生原生生物群から新規に取得することを目的とした。
【手法と結果】
イエシロアリ後腸に共生する難培養性原生生物の微量な RNA からシングルセルトランスクリプトーム解析法を用いて発現遺伝子を観測し、得られた cDNA ライブラリーの配列情報から GH3 ファミリに属する BGL 候補配列を選定した。アグロバクテリウム法を用いて候補配列を *Trichoderma reesei* に導入し、形質転換体をジャー培養した結果、*Pseudotrichonympha* 属原生生物由来候補配列 Pg9903 形質転換体の培養上清が、非形質転換体酵素の 2 倍の BGL 活性を示した。この Pg9903 形質転換体培養上清を用いて、木材原料粉末セルロースおよびアルカリ処理バガスの糖化反応（35℃24ｈ）を行ったところ、いずれもグルコース収量が非形質転換体酵素に比べて約 1.8 倍に向上した。また、糖化上清の残存活性を pNP-糖分解活性測定で調べたところ、*T. reesei* 由来 BGL に比べて Pg9903 は糖化上清に回収されやすく、また Pg9903 の存在により *T. reesei* 由来の他の糖化酵素の回収性が向上した。また上記 Pg9903 形質転換 *T. reesei* の培養上清および *E. coli* で発現した Pg9903 を用いて、pNP-Glucopyranoside 分解活性測定により、BGL 活性のグルコース阻害耐性を調べたところ、グルコース濃度 80g/L 以下の範囲で他生物種由来 BGL と比べて、高いグルコース阻害耐性が見られた。さらに、アルカリリグニン存在下での同活性測定では、*T. reesei* 由来 BGL より高いリグニン阻害耐性が見られた。以上の諸性質より、新規 BGL・Pg9903 は効率の良いバイオマス糖化に有用であることが示唆された。

β-glucosidase, cellulosic biomass, termite

発表責任者：齋藤悠香（haruka.saito.f3@mail.toray）

講演番号：3C03a11
講演日時：3 月 27 日 11:40～ 理学部講義棟 C03 会場

CGTase を用いた分岐シクロイソマルトテトラオースの合成及びその構造解析
Synthesis and structural analysis of branched cycloisomaltotetraose with CGTase
○鈴木 貴視、川島 晶、藤田 章弘、渡邊 光、森 哲也、西本 友之、阿賀 創、牛尾 慎平 (株式会社林原)
○Takashi Suzuki, Akira Kawashima, Akihiro Fujita, Hikaru Watanabe, Tetsuya Mori, Tomoyuki Nishimoto, Hajime Aga, Shinpei Ushio (HAYASHIBARA CO., LTD.)

【目的】我々は、これまでに *Agreia* sp. D1110 株由来の新規酵素である Cycloisomaltotetraose glucanotransferase (CI4Tase)が、デキストランを基質として 4 分子のグルコース(G1)がα-1,6 結合のみで環状化した構造を有する新規環状四糖シクロイソマルトテトラオース (CI4＜*cyclo*{→6)-α-D-Glc*p*-(1→6)-α-D-Glc*p*-(1→6)-α-D-Glc*p*-(1→6)-α-D-Glc*p*-(1→}＞)を生成することを見出している [1)]。今回、CI4 を糖受容体として、糖転移酵素による分岐 CI4 合成の可能性を明らかにするため、様々な糖受容体に対して糖転移反応を触媒する Cyclodextrin glucanotransferase(CGTase)を用いて CI4 に分岐構造を導入できるかを検討した。

【方法】CI4 を糖受容体、α-Cyclodextrin(α-CD)もしくは澱粉分解物を糖供与体として、CGTase を作用させ、Glucoamylase(GA)消化及びアルカリ処理を行った反応液を HPLC 分析した。続いて、CI4 への糖転移物と考えられたピークを分取し、各種酵素消化や NMR 解析を行い、構造を決定した。

【結果】CGTase による糖転移反応及び GA 消化・アルカリ処理後の反応液を HPLC 分析したところ、CI4 への糖転移物と考えられる 2 つのピークが認められた(未知糖 A、未知糖 B)。LC/MS 分析及び酵素消化の結果、未知糖 A は 1 分子の CI4 に 1 分子の G1 が結合した 5 糖であること、未知糖 B は 1 分子の CI4 に 2 分子の G1 が結合した 6 糖であることが分かった。また、NMR 解析の結果、未知糖 A は CI4 に 1 分子の G1 がα-1,4 結合した、*cyclo*{→6)-α-D-Glc*p*-(1→6)-[α-D-Glc*p*-(1→4)]-α-D-Glc*p*-(1→6)-α-D-Glc*p*-(1→6)-α-D-Glc*p*-(1→}、未知糖 B は CI4 の隣り合わないグルコース残基に G1 が 1 分子ずつα-1,4 結合した、*cyclo*{→6)-α-D-Glc*p*-(1→6)-[α-D-Glc*p*-(1→4)]-α-D-Glc*p*-(1→6)-α-D-Glc*p*-(1→6)-[α-D-Glc*p*-(1→4)]-α-D-Glc*p*-(1→}と決定した。

【結論】CI4 を糖受容体として CGTase の糖転移反応を利用することにより、新規糖質である 2 種類の分岐 CI4 を合成できることが明らかとなった。

[1)]川島ら, 日本応用糖質科学会 2019 年度大会要旨集, 2019, p 50

cycloisomaltotetraose, CGTase, transglycosylation

講演番号：3C03a12
講演日時：3 月 27 日 11:51～ 理学部講義棟 C03 会場

二糖特異的コージビオースホスホリラーゼの同定
Disaccharide-specific kojibiose phosphorylase
○奥村 律奈[1]、板橋 大輝[1]、喜多 春乃[1]、仁平 高則[1]、北岡 本光[1,2]、中井 博之[1]([1]新潟大農、[2]農研機構食品研)
○Rina OKUMURA[1], Taiki ITABASHI[1], Haruno KITA[1], Takanori NIHIRA[1], Motomitsu KITAOA[1,2], Hiroyuki BAKAI[1] ([1]Niigata Univ., [2]NARO)

【目的】ホスホリラーゼは特定の糖質を非還元性末端から加リン酸分解する酵素である。この反応は可逆的であり、且つ本酵素が有する高い位置反応性を利用することにより、糖供与体および糖受容体特異性に応じて多種多様な糖質を選択的に合成することが可能である。一方、合成可能な糖質の種類はホスホリラーゼの種類に依存する。糖加水分解ファミリー65（GH65）は、α-グルコシドを加リン酸分解しβ-グルコース 1-リン酸（βGlc1*P*）を生成するホスホリラーゼが属するファミリーであり、現在まで EC 番号の異なる 8 種類の酵素活性が報告されている。本研究では、合成可能な糖質のバリエーション拡大に向けた新規なホスホリラーゼの発見を目指し、GH65 に属する *Ruminiclostridium cellulolyticum* H10 由来 Ccel_3243 の機能解析を行った。
【方法・結果】Ccel_3243 を His-Tag 融合タンパク質として大腸菌 BL21（DE3）により生産した後、α-グルコシド結合を有する二糖（トレハロース、コージビオース、ニゲロース、マルトース、イソマルトース、スクロース）に対する加リン酸分解（正反応）活性を調べたところ、コージビオースの加リン酸分解のみを確認した。次にグルコースを糖受容体として βGlc1*P* と反応（逆反応）させたところ、二糖の生成を確認したが、三糖以上のオリゴ糖は生成しなかった。そのため、Ccel_3243 を三糖以上のオリゴ糖にも作用する既知のコージビオースホスホリラーゼ（EC 2.4.1.230)とは異なる二糖特異的コージビオースホスホリラーゼと同定した。また逆反応における糖受容体特異性を調べたところ、グルコース以外にガラクトース、キシロース、Ｌ－アラビノース、1,5 アンヒドログリシトールから二糖の生成を確認した。ガラクトースから生成された二糖の構造は予想通り α-グルコシル-1,2-ガラクトースであった。グルコース、ガラクトース、キシロース、Ｌ－アラビノース、1,5 アンヒドログリシトールを糖受容体とした際の反応速度論的解析結果は以下の通りである。

	K_m(mM)	k_{cat}(s^{-1})	k_{cat}/K_m(s^{-1}・mM^{-1})
Glc	0.93 ± 0.09	33 ± 1	36 ± 1
Gal	2.7 ± 0.8	72 ± 8	27 ± 3
Xyl	5.7 ± 0.5	43 ± 2	7.6 ± 0.3
L-Ara	6.4 ± 1.6	91± 12	14 ± 2
1,5AG	0.43 ± 0.24	15 ± 1	33 ± 16

Phosphorylaze, Kojibiose, Glycoside hydrolase family 65

発表責任者：中井　博之（nakai@agr.niigata-u.ac.jp）

講演番号：3C03a13
講演日時：3 月 27 日 12:02～ 理学部講義棟 C03 会場

Catalytic regulation of the vertebrarte CMP-sialic acid synthetase by its C-teminal domain
○Di Wu[1,2], Sakura Toda[1,2], Pierre-Andre Gilormini[3], Yann Guerardel[3], Chihiro Sato[1,2], Ken Kitajima[1,2] ([1]Biosci. Biotech. Center, Nagoya University, [2]Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya University, [3]Unit. Glyco. Struc. Func., Lille Univ 1)

CMP-Sialic acid synthetase (CSS) is prerequisite for the expression of sialic acid (Sia) residues on the cell surface glycoconjugates, because it only provides sialyltransferases with the donor substrate cytidine monophosphate-Sia (CMP-Sia). CSS thus activates free Sia to the corresponding CMP-Sia using CTP. The vertebrate CSSs consist of two domains, *i.e.*, N- and C-terminal domains. The N-domain is a catalytic domain with the evolutionally conserved motifs, and also determines the preferential usage of the Sia species, such as *N*-acetylneuraminic acid (Neu5Ac), *N*-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc), and deminoneiraminic acid (Kdn), depending on animal species. In contrast, nothing has been known about the function of the C-domain except for its involvement in oligomerization of CSS. The objective of this study is to elucidate the role of C-domain in the catalytic activity of CSS. First, the real-time monitoring of the production of CMP-Kdn during the rainbow trout CSS (rtCSS)-catalyzed reaction was performed by ^{31}P-NMR. rtCSS-N, which lacks the C-domain, utilized both Kdn and Neu5Ac with the same efficiency. On the other hand, rtCSS-FL, which contains both N- and C-domains, used Kdn less efficiently than Neu5Ac. These results indicated that C-domain of rtCSS affected the enzymatic activity to Kdn. Second, the activities of rtCSS-FL and rtCSS-N were measured in the presence of different concentrations of CMP-Kdn. CMP-Kdn was shown to inhibit the CMP-Neu5Ac production by rtCSS-FL, but not by rtCSS-N. These results suggest that the product inhibition of rtCSS-FL happens when Kdn was used as a substrate. Third, CMP-Neu5Ac was shown to inhibit the CMP-Neu5Gc production by mouse CSS-FL (mCSS-FL), which can use both Neu5Ac and Neu5Gc, but not Kdn as a substrate. This inhibition was dependent on the presence of C-domain. Taken together, we conclude that C-domain is involved in the product inhibition of the CSS activity from fish and mammals. This product inhibition is a novel regulation of the Sia metabolism.

CMP-sialic acid synthetase, catalytic regulation, C-teminal domain

講演番号：3C03p01
講演日時：3 月 27 日 13:50～ 理学部講義棟 C03 会場

Paenibacillus sp. H2C 株由来菌体内キシラナーゼ Xyn10F の性質および切断様式
Characteristics and cleavage pattern of intracellular xylanase Xyn10F from *Paenibacillus* sp H2C
○奥田 敬子[1]、Undramaa Bat-Erdene[1]、萩原 祐介[2]、三原 康博[2]、八波 利恵[1]、福居 俊昭[1]、中村 聡[1] ([1]東京工業大学、[2]味の素株式会社)
○Keiko OKUDA[1], Bat-Erdene Undramaa[1], Yusuke HAGIWARA[2], Yasuhiro MIHARA[2], Rie YATSUNAMI[1], Toshiaki FUKUI[1], Satoshi NAKAMURA[1] ([1]Tokyo Institute of Technology, [2]Ajinomoto Co., Inc.)

【目的】

Paenibacillus sp. H2C 株はトウモロコシ由来不溶性アラビノキシランを分解・資化する土壌細菌である。H2C 株のゲノム上には、GH ファミリー 5（GH5）、10、11、および 30 に属するキシラナーゼが多数コードされていた。GH10 キシラナーゼはクレフトが比較的浅いため、複雑な構造を有するアラビノキシランの加水分解に有利であると考えられている。H2C 株が生産する GH10 キシラナーゼの 1 つである Xyn10F は、触媒ドメインのみから構成される菌体内キシラナーゼである。本研究では、H2C 株が生産する Xyn10F の性質や切断様式の検討を行い、既に性質が調べられている菌体外キシラナーゼ Xyn10B と比較することとした。

【結果と考察】

種々のキシランおよび pNP 基質を用いて基質特異性を調べた結果、キシラナーゼ活性は Xyn10F に比して Xyn10B の方が高かった。反応至適 pH は両酵素とも pH 6.5 であり、反応至適温度は Xyn10B は 50°C、Xyn10F は 55°C であった。また、Xyn10F は pH 5.5～10.5 で 70% 以上の活性を保持しており、耐アルカリ性が非常に高いことが示唆された。

次に、メタノールからデカノールまでのアルキル鎖長の異なる種々のアルコール存在下（50%）でキシランに対して両酵素を作用させ、反応産物を TLC によって解析した。その結果、両酵素とも加水分解反応と共にアルコール転移反応が起こっている可能性が示唆された。また、Xyn10B に比して、Xyn10F はより広い鎖長範囲のアルコールと反応した。また、50%メタノールおよびエタノール存在下で Xyn10B はほぼ失活したが、Xyn10F は活性を保持していた。このことから、Xyn10F はアルコール転移活性が高く、メタノールやエタノールに対して耐性を有していることが示唆された。

そこで、両酵素の有機溶媒耐性を比較するため、DMSO およびアセトン存在下での活性測定を行った。その結果、Xyn10F は 30%DMSO 存在下および 10% アセトン存在下において、非添加時の約 2 倍の活性を示した。また、Xyn10B は 30% アセトン存在下で失活した一方で、Xyn10F は活性を保持しており、Xyn10F は DMSO およびアセトン耐性を有することが明らかとなった。

次に、両酵素の切断様式を比較するため、各種アラビノキシロオリゴ糖の分解産物を TLC を用いて解析した。その結果、Xyn10F のみが非還元末端のキシロースを遊離したことから、Xyn10F の切断様式は一般的なキシラナーゼとは異なっている可能性が示唆された。

GH10 xylanase, transglycosylation, organic solvent tolerance

講演番号：3C03p02
講演日時：3 月 27 日 14:01～ 理学部講義棟 C03 会場

Xanthomonas campestris WU-9701 由来グルコース転移酵素 XgtA の結晶構造解析
Structural analysis of XgtA, α-glucosyl transfer enzyme, derived from *Xanthomonas campestris* WU-9701

○渡邉 理沙[1]、有村 泰宏[2,3]、曹 偉[1]、石井 義孝[4]、桐村 光太郎[1] ([1]早大・先進理工・応化、[2]ロックフェラー大、[3]早大・先進理工・電生、[4]早大・理工研)
○Risa WATANABE[1], Yasuhiro ARIMURA[2,3], Wei CAO[1], Yoshitaka ISHII[4], Kohtaro KIRIMURA[1] ([1]Dept. Appl. Chem., Fac. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]Rockefeller Univ., [3]Dept. Electr. Eng. Biosci., Fac. Sci. Eng., Waseda Univ., [4]Waseda Res. Inst. Sci. Eng.)

【背景・目的】演者らは、*Xanthomonas campestris* WU-9701 由来のグルコース転移酵素 XgtA（57 KDa, モノマー酵素）について諸性質を明らかにし、遺伝子クローニングと大腸菌における高発現にも成功している[1-3]。XgtA は、α-グルコシダーゼ (EC 3.2.1.20) に分類され、マルトースを糖供与体として、加水分解とともにアルコール性-OH 基やフェノール性–OH 基に対しグルコースを転移する。一方、糖を受容体としないためマルトオリゴ糖などの副生なく、目的の α-グルコシドのみを選択的に合成可能である。本研究では、このような XgtA の特異的性質とその立体構造との相関を明らかにすることを目的として、XgtA の結晶構造解析を行った。
【方法】XgtA の結晶は、100 mM Tris-HCl pH 8.2、26% (w/v) PEG 10000 を含む溶液を用いたハンギングドロップ蒸気拡散法により作製した。得られた結晶は 9.0 mM Citrate-phosphate, 90 mM Tris-HCl pH 8.2, 22.5% (w/v) PEG 10000, 5 mg/ml Maltose, 5 mg/ml Hydroquinone, 15% Ethylene glycol を含む溶液にソーキングし、SPring-8 のビームライン BL41XU において X 線回折データの収集を行った。
【結果】XgtA とアミノ酸配列の相同性が 60%である *Halomonas* sp. H11 由来 HaG (PDB ID 3wy1) を構造モデルとして用いた分子置換法により、1.72 Å の分解能で XgtA の結晶構造 (PDB ID 6aav) を解いた。XgtA の全体構造は、XgtA の属する Glycoside hydrolase family 13 の酵素と類似していたが、XgtA と HaG の構造比較により、XgtA のアミノ酸 217-232 位に該当するループ構造に相違が見られた。当該領域は基質認識部位の近傍に存在し、糖供与体にスクロースを選択せずマルトースのみを選択する XgtA の基質特異性への関与が推察された。

[1] H. Nakagawa *et al*., J. Biosci. Bioeng., **89**, 138-144 (2000).
[2] J. Kurosu *et al*., J. Biosci. Bioeng., **93**, 328-330 (2002).
[3] T. Sato *et al*., J. Mol.Catal. B: Enzymatic, **80**, 20-27 (2012).

crystal structure, α-glucosidase, *Xanthomonas campestris*

発表責任者：桐村光太郎（kkohtaro@waseda.jp）

講演番号：3C03p03
講演日時：3 月 27 日 14:12～ 理学部講義棟 C03 会場

フラクトオリゴ糖を分解する GH32 β-フルクトフラノシダーゼの立体構造解析

Crystal structure of a GH32 β-fructofuranosidase hydrolyzing fructooligosaccharides

○川合 礼華[1]、北村 純一[1]、藤井 匡[2]、栃尾 巧[2]、西河 淳[1]、殿塚 隆史[1] ([1]東京農工大院農、[2]物産フードサイエンス（株）研究開発センター)
○ Reika KAWAI[1], Junichi KITAMURA[1], Tadashi FUJII[2], Takumi TOCHIO[2], Atsushi NISHIKAWA[1], Takashi TONOZUKA[1] ([1]School of Agriculture, Tokyo Univ. Agriculture and Technology, [2]R&D Center, B Food Science Co., Ltd.)

【目的】

フラクトオリゴ糖は、三糖 1-ケストース（Fru-β(2→1)-Fru-β(2↔1)α-Glc）や四糖ニストース（Fru-β(2→1)-Fru-β(2→1)-Fru-β(2↔1)α-Glc）などのフルクトースを構成糖とするオリゴ糖の総称であるが、このうち、1-ケストースは特にプレバイオティクスの機能が高いことが報告されている。我々は、1-ケストースを生産する過程で一緒に生成するニストースなどの高分子量のフラクトオリゴ糖について、これを分解する酵素を環境中のメタゲノムライブラリーより探索した。その結果、糖質加水分解酵素ファミリー（GH）32 に属する β-フルクトフラノシダーゼ（以下 MGFFase）が、特に高分子量のフラクトオリゴ糖を分解することを見出した。本研究では、MGFFase の大腸菌発現系を構築し、X 線結晶構造解析を行ったので報告する。

【方法】

MGFFase の遺伝子を PCR で増幅し、pET44a を用いて Nus タグ融合タンパク質として発現系を構築した。Ni-NTA アガロースによるアフィニティークロマトグラフィーにより精製し、スロンビン処理によってタグを切断後、陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製 MGFFase を得た。ポリエチレングリコール 600 および 3350、イソプロパノール、酢酸アンモニウムにより作製したリザーバーを用いて結晶化した。X線回折強度測定は、高エネルギー加速器研究機構 PF BL5A ビームラインにて行った。

【結果】

MGFFase の立体構造を 1.6-Å分解能で決定した。MGFFase は、N 末端側の β-プロペラドメインおよび C 末端側の β-サンドイッチドメインから構成され、これは他の GH32 酵素と同様であった。MGFFase の活性中心と他の GH32 酵素と比較したところ、基質結合クレフトに他の酵素では見られないトリプトファン残基が存在しており、この残基がフラクトオリゴ糖に対する特異性に重要であると考えられた。

GH32, fructooligosaccharide, β-fructofuranosidase

講演番号：3C03p04
講演日時：3 月 27 日 14:23～ 理学部講義棟 C03 会場

Aspergillus nidulans が生産する２つのβ-D-ガラクトフラノシダーゼの基質特異性および諸性質の解析

Functional analysis of two ß-D-galactofuranosidases from *Aspergillus nidulans*.

○松永 恵美子[1]、豊田 早紀[1]、山田 久恵[1]、田中 大[2]、樋口 裕次郎[1]、竹川 薫[1] ([1]九大院・農、[2]東北医薬大・薬)

○ Emiko MATSUNAGA[1], Saki TOYOTA[1], Hisae YAMADSA[1], Yutaka TANAKA[2], Yujiro HIGUCHI[1], Kaoru TAKEGAWA[1] ([1]Dept. of Biosci & Biotech. Kyushu Univ., [2]Dept. of Infection & Host Defense. Tohoku Med., Pharm Univ.)

多糖や複合糖質の構成糖のひとつである β-D-ガラクトフラノース(Gal*f*)は五員環の糖であり、病原性の原核、真核生物の細胞表層多糖中に存在している。*Aspergillus* 属や *Penicillium* 属などの一部の糸状菌において、Gal*f* はガラクトマンナン、*N*-型糖鎖や *O*-型糖鎖、糖脂質に存在している。Gal*f* 含有多糖の生合成に関しては研究がなされているが、分解に関与する酵素類についてはあまり報告がない。糖鎖の分解に関わる酵素の一つにガラクトフラノシダーゼ(Gal*f*-ase)がある。我々は、Gal*f*-ase を産生する *Streptomyces* 属放線菌を土壌から単離し、その全ゲノム配列を決定して本酵素遺伝子の同定に成功した(1,2)。また、本酵素が Gal*f* 特異的な新奇エキソ型酵素であることも分かった。さらに、本酵素のアミノ酸配列を用いて検索したところ、*A. nidulans* ゲノムに 2 つのホモログ AN2395 、AN3200 が存在することが確認された。両遺伝子を大腸菌にて発現させて精製後、活性を測定した結果、どちらも Gal*f* 特異的な Gal*f*-ase であることが分かった。そこで、本研究では *A. nidulans* の Gal*f*-ase の諸性質について、さらに解析を行った。両 Gal*f*-ase 遺伝子の単独および 2 重破壊株を作製し、細胞内外の Gal*f*-ase 活性を調べたところ、AN2395 と 2 重破壊株の細胞外において Gal*f*-ase 活性の大幅な低下が確認された。この結果から AN2395 Gal*f*-ase は細胞外で機能していることが示唆された。次に、両酵素の Gal*f* オリゴ糖に対する分解速度の比較を行った。2-アミノピリジンにより蛍光ラベルした β1, 5 結合並びに β1, 6 結合の Gal*f* オリゴ糖を作製し、AN2395、AN3200 Gal*f*-ase と反応させ、分解の様子を確認した。その結果、両 Gal*f*-ase ともに β1, 5 および β1, 6 結合のいずれの結合も分解するが、AN2395 は β1, 6 結合を、AN3200 は β1, 5 結合をより早く分解することから、両酵素の基質特異性には違いがあることがわかった。

(1) Matsunaga E et al. PLoS One, 10, e0137230 (2015).
(2) Matsunaga E et al. Biosci. Biotechnol. Biochem., 81, 1314-1319 (2017)

galactofuranosidase, *Aspergillus nidulans*, galactofuranose

講演番号：3C03p05
講演日時：3 月 27 日 14:34～ 理学部講義棟 C03 会場

国際宇宙ステーションで得られた希少糖生産酵素 *Pseudomonas stutzeri* L-rhamnose isomerase 変異酵素の結晶を用いたデオキシ希少糖複合体の構造解析

X-ray structure of *Pseudomonas stutzeri* L-rhamnose isomerase mutant in complex with deoxy rare sugars using the crystal grown in International Space Station

○吉田 裕美[1,3]、吉原 明秀[2,3]、田仲 広明[4]、伊中 浩治[5]、山田 貢[6]、何森 健[2,3]、神鳥 成弘[1,3] ([1]香川大・総合生命研究セ・医、[2]香川大・農、[3]香川大・国際希少糖研究教育、[4]コンフォーカルサイエンス、[5]丸和栄養食品、[6]宇宙航空研究開発機構)

○Hiromi Yoshida[1,3], Akihide yoshihara[2,3], Hiroaki Tanaka[4], Koji Inaka[5], Mitsugu Yamada[6], Ken Izumori[2,3], Shigehiro Kamitori[1,3] ([1]Life Sci. Res. Center & Fac. Med., Kagawa Univ., [2]Fac. Agric. Kagawa Univ., [3]Int'l Inst.Rare Sugar Res. and Educ. Kagawa Univ., [4]Confocal Science Inc., [5]Maruwa Foods and Biosciences Inc., [6]JAXA)

【目的】希少糖生産に利用される *Pseudomonas stutzeri* 由来L-ラムノースイソメラーゼはL-ラムノースと L-ラムニュロース間の異性化反応を触媒するだけではなく、希少糖 D-アルロースから希少糖 D-アロースへの異性化反応をも触媒することができる基質特異性の広い酵素である。演者らは、これまでに野生型酵素と複数の変異酵素を用いた基質複合体構造に基づく触媒反応機構について報告してきた。本酵素は、デオキシ希少糖を基質として認識できるユニークな特徴を持つ。本研究では、地上実験において野生型酵素より高分解能が得られている変異酵素を微小重力環境下で得ることにより、高分解能でのデオキシ希少糖との複合体構造の X 線結晶解析を行うことを目的とした。

【方法】野生型酵素より高分解能が得られている Ser329 を Phe に置換した変異酵素（S329F）を用いて、国際宇宙ステーション(ISS)の微小重力環境下でカウンターディフュージョン法により結晶を得た。これらの結晶を用いて、デオキシ希少糖との複合体のデータ収集を高エネルギー加速器研究機構 PF-AR NE3A にて行った。

【結果】微小重力環境下で得られた結晶は、地上で得られた結晶より分解能が若干向上しており、1-deoxy D-allulose との複合体構造は 1.50Å、1-deoxy L-tagatose との複合体構造は 1.79Å、6-deoxy L-tallose との複合体構造は 1.55Å分解能で構造解析することができた。すべての基質は、それぞれ異なる結合モードで活性部位に結合していた。

L-rhamnose isomerase, deoxy rare sugar, X-ray structure

発表責任者：吉田　裕美（h.yoshi@med.kagawa-u.ac.jp）

講演番号：3C03p06
講演日時：3 月 27 日 14:45～ 理学部講義棟 C03 会場

Paenibacillus glycanilyticus FH11 由来α-1,3-グルカナーゼ触媒ドメインの反応機構と結晶化
Reaction mechanism and crystallization of catalytic α-1,3-glucanase from *Paenibacillus glycanilyticus* FH11

○Intuy Rattanaporn[1]、伊藤 貴文[2]、スヨタ ワサナ[3]、林 順司[4]、矢野 成和[5]、真壁 幸樹[5]、豊竹 洋佑[1]、若山 守[1]、日び 隆雄[2] ([1]立命大生命、[2]福井県大生資、[3]ソンクラ大産業バイオ、[4]徳島大生資産、[5]山形大院理工)
○Rattanaporn Intuy[1], Takafumi Itoh[2], Wasana Suyotha[3], Junji Hayashi[4], Shigekazu Yano[5], Koki Makabe[5], Yosuke Toyotake[1], Mamoru Wakayama[1], Takao Hibi[2] ([1]Ritsumeikan Univ., [2]Fukui prefectural Univ., [3]Prince of Songkla Univ., [4]Tokushima Univ., [5]Yamagata Univ.)

【目的】α-1,3-グルカンは、口腔内の *Streptococcus* 属細菌が生産する菌体外分泌多糖として、あるいは真菌類の細胞壁構成多糖として自然界に存在している。α-1,3-グルカンの加水分解反応を触媒する α-1,3-グルカナーゼは、真菌類由来のグリコシダーゼファミリー71 型（GH71 型）と、細菌由来の GH87 型の 2 種類に分類される（1)。α-1,3-グルカナーゼの研究は、GH71 型酵素に属する *Trichoderma* 属由来の酵素を中心に、諸性質から反応機構が検討されてきた。我々は、GH87 型酵素に着目して研究を進め、これまでに *Paenibacillus* 属ならびに *Streptomyces* 属に新規の α-1,3-グルカナーゼを見出し、それらの諸性質を明らかにしてきた (2, 3)。そのなかで、*P. glycanilyticus* FH11 が触媒ドメインの配列類似性の低い２種類の酵素（AglFH1、AglFH2）を分泌生産することを見出し、その諸性質を報告した。

本報では、加水分解反応における反応機構を明らかにすることを目的として、Agl-FH1 の触媒ドメイン（Cat AglFH1）の *Brevibacillus* 組換え体の構築および、X 線結晶構造解析を試みた。

【方法と結果】Cat AglFH1 に相当する DNA 断片を pNCMO2 ベクターに挿入後、構築したプラスミドで *Brevibacillus chohsinensis* を形質転換し、定法に従い培養することで、Cat AglFH1 を菌体外へ分泌生産させた。α-1,3-グルカナーゼの活性測定は、酵素合成した α-1,3-グルカンを用いて行った。

疎水クロマトグラフィーを用いて精製した Cat AglFH1 と基質として α-アノマー-α-1,3-テトラグルカンを反応させたところ、β-アノマー-α-1,3-トリグルカンとグルコースが生成したことから、本酵素は反転機構により加水分解反応を触媒することが示された。

シッティングドロップ蒸気拡散法を用いて Cat AglFH1 の結晶を作製し、SPring-8 ビームライン BL-26B1 において波長 1.5 Å の X 線を用いて回折強度データを収集した（空間群 $P4_32_12$、格子定数 $a = b = 132.6$, $c = 76.1$ Å）

(1) *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 32(2):30, 2016.　(2) *J. Biosci. Bioeng.*, 77(3), 639-647, 2013.
(3) J. Gen. Appl. Microbiol., 63(5), 296-304, 2017.

Paenibacillus, α-1,3-glucanase, crystallization

発表責任者：若山　守（wakayama@sk.ritsumei.ac.jp）

講演番号：3C03p07
講演日時：3 月 27 日 15:06～ 理学部講義棟 C03 会場

放線菌由来 GH13_30 α-グルコシダーゼの機能解析

Functional analysis of actinomyces GH13_30 alpha-glucosidases

○佐分利 亘、田上 貴祥、壷井 芙美、奥山 正幸、木村 淳夫、森 春英（北大院農）
○ Wataru SABURI, Takayoshi Tagami, Fumi Tsuboi, Masayuki Okuyama, Atsuo Kimura, Haruhide Mori (Hokkaido Univ.)

【背景・目的】α-グルコシダーゼは，基質の非還元末端のα-グルコシド結合を加水分解するアノマー保持型糖質加水分解酵素である．本酵素は広範な生物種に分布し，基質特異性や糖転移活性に多様性が見られる．本酵素が触媒する糖転移反応は工業的なオリゴ糖合成に使用される．アミノ酸配列に基づき，α-グルコシダーゼは主として糖質加水分解酵素ファミリー（GH）13 と 31 に分類される．GH13 はα-アミラーゼを始め，α-グルカンに作用する多様な酵素により構成され，分子系統解析により 42 のサブファミリーへと細分化される．放線菌由来α-グルコシダーゼ様タンパク質により構成されるサブファミリー30（GH13_30）では，ビフィズス菌由来酵素のいくつかの機能が明らかにされているのみで，多くの酵素の機能が未知である．そこで複数の GH13_30 様タンパク質をコードする遺伝子を持つ *Catenulispora acidiphila* および *Xylanimonas cellulosilytica* に注目し，これら推定タンパク質の機能を明らかにすることを目的とした。

【結果・考察】*C. acidiphila* および *X. cellulosilytica* の GH13_30 様タンパク質を大腸菌 BL21 (DE3) により生産した．可溶性画分に組換えタンパク質が得られた *C. acidiphila* 由来 Caci_6968 および Caci_8467，*X. cellulosilytica* 由来 Xcel_0062 および Xcel_2119 を精製し，機能を解析した．Caci_6968 はイソマルトオリゴ糖やパノースなどのα1-6 グルコシド，Caci_8467 および Xcel_0062 はα1-3 グルコシドのニゲロース，Xcel_2119 は種々のα-グルコシドによく作用した． Xcel_2119 は二糖より三糖に著しくよく作用し，α1-4 グルコシドのマルトトリオースを最も良い基質とした．パノース，イソマルトトリオースがこれに続いた．Xcel_2119 は二糖では，スクロースに最も高い活性を示した．アグリコンと加水分解産物を分別定量可能な *p*-ニトロフェニルα-グルコシド（pNPG）を基質として糖転移率を評価した．2 mM pNPG に対して，Caci_6968，Caci_8467，Xcell_0062 および Xcel_2119 の転移率はそれぞれ 88%，29%，26%および 14%であり，Caci_6968 は高い糖転移活性を示した．α1-3 グルコシド特異性を示した Caci_8467 および Xcel_0062 では求核触媒残基の次のアミノ酸残基が Ser で保存されていた．一般に，GH13α-グルコシダーゼの中でα1-4 結合特異的酵素では Ala か Thr，α1-6 結合特異的酵素では Val がこの位置に見られることから，この Ser に注目した．Caci_8467 の Ser213 を Ala に置換した S213A 変異酵素ではニゲロースに対して野生型酵素の 1.3%に k_{cat}/K_m が減少したが，本変異酵素はマルトースにもニゲロースと同等の k_{cat}/K_m を示した．このことから，Caci_8467 において Ser213 がα1-3 グルコシド特異性に重要と考えられた．

alpha-glucosidase, actinomyces, GH13

発表責任者：佐分利 亘（saburiw@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：3C03p08
講演日時：3 月 27 日 15:17～ 理学部講義棟 C03 会場

ニゲロース特異的な Solute-binding protein の発見
Identification of a nigerose-specific solute-binding protein
○田上 貴祥、壷井 芙美、佐藤 宏樹、奥山 正幸、佐分利 亘、森 春英、木村 淳夫（北大・院農）
○Takayoshi TAGAMI, Fumi TSUBOI, Koki SATO, Masayuki OKUYAMA, Wataru SABURI, Haruhide MORI, Atsuo KIMURA (Hokkaido Univ.)

【背景と目的】Solute-binding protein(SBP)は ABC トランスポーターに付属する基質結合タンパク質であり，結合した基質をトランスポーターに渡すことで化合物の輸送を促進している．SBP はオキソアニオンやアミノ酸，糖などの様々な化合物を基質とするものが知られているが，SBP の機能構造相関に関する知見は乏しく, アミノ酸配列類似性のみから SBP の基質特異性を推定することは困難である．本研究では新規機能を有する SBP の探索を目的とし，GH13_30 α-1,3-グルコシダーゼ遺伝子近傍にコードされる SBP の機能解析を行った．
【方法】放線菌 *Kribbella flavida* のゲノム情報から，推定 α-1,3-グルコシダーゼ遺伝子を含む遺伝子クラスター（Kfla4672-4676）に注目した．本クラスターには，GH87 細胞外 α-1,3-グルカナーゼ，ABC トランスポーター，SBP（Kfla4675）および GH13_30 細胞内 α-グルコシダーゼ（Kfla4676）と推定される遺伝子がコードされていた．Kfla4675 および Kfla4676 をそれぞれ大腸菌により生産し, Ni アフィニティークロマトグラフィーで精製した．Kfla4676 の諸性質および基質特異性を解析した．また，Kfla4675 と各種 α-グルコシルオリゴ糖との相互作用を ITC により測定した．
【結果と考察】Kfla4676 の機能解析の結果, 本酵素が α-1,3-グルコシダーゼであることが明らかとなった．各種基質（10 mM）に対する反応速度（μmol/min/mg）は 14.0（pNP α-グルコシド），13.4（ニゲロース）および 19.5（α-グルコシル-(1→3)-マルトース, 3GM）であり，トレハロース，コージビオース，マルトース，イソマルトースおよびスクロースには作用しなかった．また，ITC による測定の結果，Kfla4675 とニゲロースとの相互作用が観察され，その解離定数は 4.9 μM，タンパク質に対するニゲロースの結合比は 0.55 であった．コージビオース，マルトース，イソマルトースおよび 3GM については，リガンド濃度 1 mM の滴定においても熱量変化が観察されなかった．以上の結果から，Kfla4675 はニゲロースに特異的な SBP であると考えられた．本研究結果から，*K. flavida* は細胞外で生成されたニゲロースを Kfla4675（SBP）および ABC トランスポーターで菌体内に取り込み, Kfla4676（α-1, 3 グルコシダーゼ）でグルコースにまで分解していると推察される．*Catenulispora acidiphila* や *Xylanimonas cellulosilytica* においても GH13_30 α-1,3-グルコシダーゼ遺伝子近傍に SBP がコードされており, それらは Kfla4675 と 60%および 79%のアミノ酸配列類似性を示した. これらの SBP は Kfla4675 と同様にニゲロース結合タンパク質であると考えられ，ニゲロースの取込みと分解を担う共通のタンパク質群が放線菌門に広く分布していることが示唆された．

solute-binding protein, nigerose, actinomyces

発表責任者：田上　貴祥（tagami@abs.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：3C03p09
講演日時：3 月 27 日 15:28～ 理学部講義棟 C03 会場

L-アラビノース 1-脱水素酵素の基質特異性の構造基盤の解析
Structural basis for substrate specificity of L-arabinose 1-dehydrogenase

○吉原 健太郎[1]、渡辺 誠也[1,2,3]（[1]愛媛大農、[2]愛媛大院農、[3]愛媛大 CMES）
○Kentaro YOSHIWARA[1], Seiya WATANABE[1,2,3]（[1]Ehime Univ. Fac. Sch. Agr., [2]Ehime Univ. Grad. Sch. Agr., [3]Ehime Univ. CMES）

【背景・目的】窒素固定細菌 *Azospirillum brasilense* 由来の L-アラビノース 1-脱水素酵素（AbAraA）は、細菌のリン酸化を伴わない L-アラビノースの代謝経路の初発反応である L-アラビノースの L-アラビノ-γ-ラクトンへの変換を触媒する（1）。本酵素は、L-アラビノースと 4 位のエピマーの関係にある D-キシロースに対しては約 790 倍も低い k_{cat}/K_m 値を示す。一方、*Caulobacter crescentus* 由来アルドース-ケトース還元酵素（CcAAOR）は AbAraA と同じタンパク質ファミリーに属しているが、幅広い単糖を基質にすることができ L-アラビノースと D-キシロースに対する k_{cat}/K_m 値も比較的近い。すでに報告のある CcAAOR の D-キシロースとの複合体構造（2）と最近我々が決定した AbAraA のアポ構造（3）を比較したところ、AbAraA の Asn173 が基質の C4-OH を認識する重要であることが示唆された。そこで、本研究ではこの残基の AbAraA の基質特異性への関与について検証した。
【方法・結果】8 種類の Asn173 部位特異的変異体を、野生型と同様に大腸菌の系で発現させて精製した。N173A・N173G・N173Q・N173S・N173V の L-アラビノースに対する活性は野生型のそれぞれ 30%・50%・41%・30%・128%と十分残っていた。これらの変異体では L-アラビノースと D-ガラクトース間の活性の逆転が起きていたが、D-キシロースに対する高活性は観察されなかった。N173Y・N173H・N173D 変異体では L-アラビノースに対する活性が消失した。N173Y・N173H は、同じタンパク質ファミリーの他の酵素である CcAAOR とグルコース 6-リン酸脱水素酵素を参考にそれぞれデザインされたものであり予想外の結果だった。変異体実験からは十分な知見が得られなかったため、基質複合体構造の決定をめざし、結晶化を試みた。野生型酵素の共結晶あるいはソーキングで作製した結晶の活性部位にはいずれも電子密度が見られなかったことから、補酵素が基質結合に必要と考えた。Asn173 以外に C4-OH 認識に重要な残基として E147 と H153 があり、E147A はわずかだが活性があることから基質結合能は残っていると考えられた（3）。今後は、本変異体と $NADP^+$ 複合体を共結晶で作製したものを基質にソーキングし、結合の有無を解析する予定である。
【参考文献】

1. Watanabe *et al. J. Biol. Chem*. 2006, 281, 2612-2623;
2. Taberman *et al. Biochem. J.* 2015, 472, 297-307.
3. Watanabe *et al. FEBS Lett.* 2019, 593, 1257-1266.

L-Arabinose 1-dehydrogenase, Substrate specificity, Site-directed mutagenesis

発表責任者：吉原健太郎（e612045z@mails.cc.ehime-u.ac.jp）

講演番号：3C03p10
講演日時：3 月 27 日 15:39～ 理学部講義棟 C03 会場

カイコ由来α-L-fucosidase の糖タンパク質の *N*型糖鎖に対する活性の解析

Analysis of *Bombyx mori* α-L-fucosidase activity on core fucosylated glycoproteins

○中村 駿太郎[1]、宮崎 剛亜[1,2]、朴 龍洙[1,2]（[1]静大院・総合科技・農、[2]静大グリーン科技研）
○Shuntaro NAKAMURA[1], Takatsugu MIYAZAKI[1,2], Enoch Y. PARK[1,2] ([1]Dept. Agric. Grad. Sch. Integr. Sci. Tech., Shizuoka Univ., [2]Res. Inst. Green Sci. Tech., Shizuoka Univ.)

【目的】*N*型糖鎖は糖タンパク質のコンフォメーション、シグナル伝達、抗原性など様々な性質に影響を及ぼす。昆虫の *N*型糖鎖にはコア位の *N*-アセチルグルコサミン（GlcNAc）に α1,6 結合でフコシル化された糖鎖や哺乳動物には認められない α1,3 結合でフコシル化された糖鎖が存在しているが、その代謝や機能は不明な点が多い。カイコ（*Bombyx mori*）のゲノムには α-L-fucosidase の遺伝子として糖質加水分解酵素ファミリー29（GH29）に属するタンパク質（BmFucA）の遺伝子が存在する。我々は BmFucA をクローニングし、α1,6 結合でコアフコシル化された複合型及びパウチマンノース型のピリジルアミノ標識糖鎖からフコースを遊離する活性を持つことを明らかにした[1]。本研究では糖タンパク質の *N*型糖鎖に対する BmFucA の活性の解析を目的とした。

【方法・結果】予測されるシグナル配列を除いた BmFucA をクローニングし、大腸菌 BL21 (DE3) を発現宿主として、GST 融合タンパク質として発現及び精製した。組み換えタンパク質を α1,6 結合でコアフコシル化されている *N* 型糖鎖を持つ糖タンパク質であるウシ由来ラクトフェリンと反応させ、反応溶液を SDS-PAGE に供し、GlcNAc と α1,3 結合または α1,6 結合したフコースに親和性のある FITC 標識ヒイロチャワンタケレクチン（AAL）を用いたレクチンブロットを行った。得られたバンドの蛍光強度を測定したところ BmFucA と反応させたラクトフェリンのバンド強度が反応させていない場合と比較して約 40%低下した。

また、α1,3 結合でコアフコシル化された *N* 型糖鎖を持つ糖タンパク質であるハチ毒由来ホスホリパーゼ A2（PLA2）を使用し、BmFucA と反応後の溶液に α1,3 結合でコアフコシル化された糖鎖を切断出来ない PNGaseF を反応させた。反応溶液を SDS-PAGE に供し、FITC 標識 AAL を用いたレクチンブロットを行った。レクチンブロットにより得られたバンドの蛍光強度を比較すると BmFucA と反応させた PLA2 のバンド強度は反応させていない PLA2 のバンド強度より約 30%低かった。

これらの結果から BmFucA による α1,6 結合または α1,3 結合でコアフコシル化された *N*型糖鎖を持つ糖タンパク質に対する加水分解活性を有することが示唆された。現在はコアフコシル化された *N*型糖鎖を持つ種々の糖タンパク質に対する活性の解析を進めている。

1. 中村駿太郎、宮崎剛亜、朴龍洙、日本応用糖質科学会 2019 年度大会要旨集、 2019 年

glycoprotein, fucose, lectin blotting

発表責任者：宮崎剛亜（miyazaki.takatsugu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3C03p11
講演日時：3 月 27 日 15:50～ 理学部講義棟 C03 会場

カイコ由来α-*N*-アセチルガラクトサミニダーゼの酵素学的性質の解析
Characterization of α-*N*-acetylgalactosaminidase from *Bombyx mori*
○池谷 真里奈[1]、宮崎 剛亜[1,2]、朴 龍洙[1,2] ([1]静大院・総合科技・農、[2]静大グリーン科技研)
○Marina IKEGAYA[1], Takatsugu MIYAZAKI[1,2], Enoch Y. PARK[1,2] ([1]Dept. Agric. Grad. Sch. Integr. Sci. Tech., Shizuoka Univ., [2]Res. Inst. Green Sci. Tech., Shizuoka Univ.)

【研究の背景・目的】真核生物のタンパク質の多くは糖鎖修飾を受けているが、糖鎖の構造は多様性に富むため、未知の点が多い。近年、昆虫も哺乳類や植物と異なる独自の糖鎖を持っていることが明らかになってきており、それに伴って昆虫もユニークな糖質関連酵素を持っている可能性が高いと考えられる。糖質関連酵素は、そのアミノ酸配列の相同性に基づいて多数のファミリーに分類されている。Glycoside hydrolase family 31（GH31）は、α-グルコシドやα-キシロシドをはじめとして様々な糖を基質とする酵素が分類されている巨大なファミリーである。そのため、アミノ酸配列の情報から基質特異性を推測することが難しい場合があり、より多くのタンパク質の機能の解明が求められている。そこで、我々はカイコ由来の糖質関連酵素に着目した。カイコは GH31 に分類されるタンパク質をコードする遺伝子を複数持っているが、その中でも機能解析がなされている GH31 酵素群とのアミノ酸配列相同性が低いタンパク質（BmNag31）を標的とした。このタンパク質は、カイコの持つ他の GH31 酵素よりもバクテリア（*Enterococcus faecalis*）の持つ GH31 酵素との相同性が高く、バクテリアからの水平伝播によってカイコが獲得した酵素であると考えられた。本研究では BmNag31 の酵素学的性質の解明を目的とした。
【実験方法・結果】カイコの cDNA より BmNag31 遺伝子のクローニングを行った。BmNag31 はアミノ酸配列から GH31 触媒ドメイン、フィブロネクチン様ドメイン（FN3）、糖結合モジュール 32（CBM32）の 3 つのドメインで構成されていると考えられた。全長または一部のドメインを欠損させた変異体の大腸菌における異種発現と、アフィニティクロマトグラフィによる精製を行ったところ、MBP 融合タンパク質としての BmNag31 全長と、CBM32 ドメインを欠損させた BmNag31ΔCBM32 精製タンパク質を得ることができた。様々な *p*-nitrophenyl（pNP）グリコシドを基質として反応を行った結果、BmNag31 は、pNP-α-GalNAc に対してのみ加水分解活性を示した。また、BmNag31ΔCBM32 に関して、pNP-α-GalNAc を基質として用いた場合の至適温度は 45–50℃、至適 pH は 6.0–6.5、K_m 値は 0.59（mM）、k_{cat} は 1.4（s^{-1}）であった。CBM32 ドメインの有無は pNP-α-GalNAc を基質とした場合の至適温度、至適 pH、タンパク質の温度安定性には影響を与えなかった。一方、GlcNAc-β-1,3-GalNAc-α-pNP を基質として用いたところ、活性は検出されなかったことから、BmNag31 はエキソ型の酵素であると考えられた。現在、より詳細な基質特異性の解析と、CBM32 ドメインの機能解析を行っている。

α-*N*-acetylgalactosaminidase, horizontal gene transfer, glycoside hydrolase family 31

発表責任者：宮崎 剛亜（miyazaki.takatsugu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3C03p12
講演日時：3 月 27 日 16:01～ 理学部講義棟 C03 会場

カイコ由来スクロース加水分解酵素の基質および阻害剤との複合体構造解析
Structural analysis of *Bombyx mori* sucrose hydrolase complexed with substrate and inhibitors
○宮崎 剛亜、朴 龍洙（静大グリーン科技研）
○Takatsugu MIYAZAKI, Enoch Y. PARK (Res. Inst. Green Sci. Tech., Shizuoka Univ.)

【目的】カイコ（*Bombyx mori*）の中腸には 2 種類のスクロース加水分解酵素（BmSUH および BmSUC1）が発現しており、それぞれ Glycoside Hydrolase family 13 subfamily 17（GH13_17）および family 32（GH32）に属している。GH13_17 には主にマルトオリゴ糖に作用する昆虫由来の α-グルコシダーゼ（マルターゼ）が属しているが、BmSUH はスクロース以外の α-グルコシドに対しての活性が低く、基質特異性が厳密であることが明らかになっている。我々はこれまでに、X 線結晶構造解析によって BmSUH の全体構造および生成物であるグルコースとの複合体構造を明らかにした[1]。そこで、さらに詳細な構造－基質特異性の相関を明らかにするため、酵素の変異体や阻害剤を用いた酵素学的解析および基質や阻害剤との複合体構造解析を行った。
【方法】BmSUH 野生型および変異体を His タグ融合タンパク質として大腸菌 BL21 (DE3) にて組換え発現し、各種クロマトグラフィーによって酵素を精製した。酵素活性は基質の加水分解に伴い遊離したグルコースを glucose oxidase-peroxidase 法によって定量することで測定した。酵素とリガンドとの共結晶はハンギングドロップ蒸気拡散法にて作製し、高エネルギー加速器研究機構 PF ビームラインにて X 線回折強度測定を行い、分子置換法によって立体構造を決定した。
【結果】BmSUH の一般酸塩基触媒残基変異体 E322Q とスクロース（E322Q-Suc）、α-glucosyl fluoride を用いた共有結合中間体（E322Q-GlcF）とフルクトースとの複合体構造（E322Q-GlcF-Fru）を 1.60–1.84 Å 分解能で決定した。 一方、BmSUH のスクロース分解活性は α-グルコシダーゼの阻害剤である 1-deoxynojirimycin（DNJ）、acarbose（ACR）および 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol（DAB）に拮抗的に阻害され、これら阻害剤との複合体構造を 1.75–1.87 Å 分解能で決定した。E322Q-Suc ではサブサイト−1 から+1 にスクロースが結合しており、E322Q-GlcF および E322Q-GlcF-Fru ではグルコース残基が求核触媒残基 Asp247 と共有結合していた。また、DNJ および DAB はサブサイト−1 に結合しており、ACR はサブサイト−1 から+3 にかけて電子密度が観測された。複合体構造から明らかになったフルクトース残基と結合するサブサイト+1 のアミノ酸残基をマルターゼ型に置換したところ、スクロースに対する加水分解活性が低下し、マルトトリオースに対する活性が上昇した。

1) 宮崎剛亜、朴龍洙、日本応用糖質科学会 2019 年度大会（第 68 回）要旨集、2019 年

sucrose, α-glucosidase, glycoside hydrolase family 13

発表責任者：宮崎剛亜（miyazaki.takatsugu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3C03p13
講演日時：3 月 27 日 16:21～ 理学部講義棟 C03 会場

Shinella sp. NN-6 のケトース 3-エピメラーゼの誘導炭素源の検討および D-アルロース生産の最適化

Consideration of induction carbon source for ketose 3-epimerase from *Shinella* sp. NN-6 and optimization of condition for D-allulose production

○鈴木 琢磨[1]、池田 光[1]、森本 兼司[2]([1]香川大学、[2]国際希少糖研究教育機構)
○ Takuma SUZUKI[1], Hikaru IKEDA[1], Kenji MORIMOTO[2] ([1]kagawa univ., [2]International institute of Rare Sugar Research and Education)

[研究背景と目的]
希少糖 D-アルロース生産において最も重要な酵素としてケトース 3-エピメラーゼ (K-3E)が挙げられる。K-3E は高価な D-アルロースなどにより誘導される誘導酵素として知られており、K-3E 調製には多大なコストを要する。当研究室が保有する細菌 *Shinella* sp. NN-6 は K-3E を構成的に発現するため、希少糖生産の低コスト化に寄与することが期待される。また NN-6 株の K3E 活性は、培地中に添加する炭素源によって増減する、すなわち誘導型の K-3E も存在することが当研究室の先行研究により示唆された。そこで本研究では NN-6 株由来 K-3E を用いた D-アルロース生産の条件を最適化した。さらに NN-6 株における生育度や K-3E 活性への誘導炭素源の影響を調べることにより本菌の K-3E 発現条件を明らかにすることを目的とした。

[方法]
D-グルコースを炭素源として培養した NN-6 株を超音波破砕し、上清を粗精製したのちに陰イオン交換樹脂 HPA25L に固定化した。固定化 K-3E をカラムに充填し、様々な流速で 50%D-フルクトースを通液して D-アルロースを生産し、その生産効率や転換率から最適な流速を決定した。
NN-6 株の K-3E 発現条件を解析するために、全ケトヘキソースおよびケトペントースを炭素源として NN-6 株を振盪培養した。NN-6 株の各ケトースに対する資化性および酵素活性および菌体の生育度を比較し、さらに K-3E の発現パターンを確認した。

[結果および考察]
流速 0.2 mL/min でカラムに基質を通液したとき転換率は 19.7%となった。0.2 mL/min 以上の流速ではより高い生産性が得られたが、生産物の分離精製の効率を考慮して 0.2 mL/min を最適流速とした。
NN-6 株はケトペントースに対して生育を示さなかった。一方、ケトヘキソースではすべてで生育が確認され、それらの K-3E 活性は菌体の生育度と相関傾向が見られた。D-アルロースを炭素源として培養すると、D-フルクトース培養時よりも生育度は低かったにもかかわらず、約 1.6 倍の K-3E 活性を示した。この結果から D-アルロースによって誘導される K-3E の存在が強く示唆された。現在、本株の K-3E 発現条件について RT-PCR などにより検討中である。

Shinella sp. NN-6, Ketose 3-epimerase, D-allulose

講演番号：3C03p14
講演日時：3 月 27 日 16:32～ 理学部講義棟 C03 会場

Enterococcus faecium SE4 株由来 L-ラムノースイソメラーゼの諸性質および D-アロース生産への応用

Characterization of L-rhamnose isomerase from *Enterococcus faecium* SE4 and its application to D-allose production

○筒井 馨[1]、森本 兼司[1,2] ([1]香川大院農、[2]国際希少糖研究教育機構)
○Kaoru TSUTSUI[1], Kenji MORIMOTO[1,2] ([1]Kagawa Univ., [2]International Institute of Rare Sugar Research and Education)

【目的】当研究室では、微生物由来の異性化酵素を応用して希少糖生産に関する研究をしている。日本では食品添加物の製造に利用可能な菌や酵素は厚生労働省の食品添加物リストに記載されていないと使用することが難しい。そこで本研究では発酵食品から新たに単離した乳酸菌 *Enterococcus faecium* SE4 株の L-ラムノースイソメラーゼ（L-RhI）の諸性質を明らかにし、D-アルロースから D-アロースの生産に応用が可能かを検討することを目的とした。

【方法と結果】市販のヨーグルト種菌より、*Enterococcus faecium* SE4 株を単離した。本菌を 0.5% L-ラムノースを添加した MRS 培地で培養後、得られた菌体から精製 L-RhI を得た。精製 L-RhI の分子量は 49,000 であり、ゲル濾過クロマトグラフィーでは 186 kDa であったことから本 L-RhI は四量体であることが示唆された。精製酵素及び固定化酵素の諸性質を酵素反応後にシステインカルバゾール法で酵素活性を算出することでそれぞれ検討した。本酵素の至適温度と至適 pH は 70℃、pH 7.0（リン酸ナトリウム緩衝液）であった。本酵素は C-2, C-3 が D-エリスロ型の単糖に活性を示し、D-アロースに対しても活性を示した。固定化 L-RhI の至適温度と至適 pH は 70℃、pH 7.0（リン酸ナトリウム緩衝液）であり、30℃、40℃で熱処理後に 90%以上の活性を保持し、pH 6.0-8.0 で高い安定性を示した。加えて、固定化 L-RhI は D-アルロースを基質として用いたとき、D-アロースの生産が確認され、その平衡比は D-アルロース:D-アロース= 69.9: 30.1 であった。本酵素は相対的に高温で最大活性を示し、中性条件で酵素反応が可能となる。そのため、メイラード反応を抑えつつ食品グレードの希少糖生産に応用可能である。

Enterococcus faecium, L-rhamnose isomerase, rare sugar

講演番号：3C03p15
講演日時：3 月 27 日 16:43～ 理学部講義棟 C03 会場

超好熱アーキア *Pyrobaculum aerophilum* 由来新規ガラクトース 1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼに関する研究

Structural and functional analyses of novel galactose 1-phosphate uridylyltransferase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum aerophilum*

○大志田 達也[1]、林 順司[2]、米田 一成[3]、大島 敏久[4]、櫻庭 春彦[1] ([1]香川大農、[2]徳島大生物資源、[3]東海大農、[4]大阪工大工)
○Tatsuya OHSHIDA[1], Junji HAYASHI[2], Kazunari YONEDA[3], Toshihisa OHSHIMA[4], Haruhiko SAKURABA[1] ([1]Kagawa Univ., [2]Tokushima Univ., [3]Tokai Univ., [4]Osaka Inst. Tech.)

【目的】生体内のガラクトースはルロワール経路を経て，グルコース 1-リン酸へ変換され解糖系へと送られる．この時の反応は，ガラクトキナーゼ，ガラクトース 1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ(GalT)，及び UDP ガラクトース 4-エピメラーゼが共役している．ヒトの生体内において，この 3 種の酵素いずれかが欠損すると，ガラクトースを代謝出来ずガラクトース血症を引き起こす．ルロワール経路において，二段階目の反応を触媒する GalT の構造解析例は大腸菌とヒト由来の酵素のみであり，アーキア由来の GalT の情報はほとんど無い．本研究では，超好熱アーキア *Pyrobaculum aerophilum* から GalT のホモログをコードする遺伝子 PAE1184 を見出し，大腸菌における発現系を構築，機能及び構造解析を行った．
【方法・結果】*P. aerophilum* GalT の機能解析の結果，ホモ 2 量体を形成し，90℃，10 分間の処理でも失活しない高度耐熱性を示した．本酵素を結晶化させ X 線結晶構造解析を行い，大腸菌 GalT の構造をもとに分子置換法により位相を決定した．本酵素は結晶中でも，大腸菌及びヒト由来 GalT と同様に 2 量体を形成しており，主鎖のフォールディングも類似していたが，活性中心の一部を形成する N 末端鎖の構造は全く異なっていた．大腸菌及びヒト由来 GalT は片方のサブユニット由来の N 末端鎖がもう一方のサブユニットに伸張し，隣のサブユニットの基質結合部位の一部を形成する．一方で *P. aerophilum* GalT は, 同一サブユニット内の基質結合部位に伸長することが明らかになった．基質結合状態の構造解析を行うため，活性中心の一部であるヒスチジン 140 に変異を加えることで，不活化させた変異体酵素 H140F，H140G，H140N を作製した．それぞれ変異酵素と UDP-グルコースを混合させ結晶化を行った．このうち，H140F を用いた結晶構造解析にて UDP 結合型の構造を獲得できた．UDP 結合型 H140F 酵素と基質非結合型野生型酵素との構造比較を行うと，活性部位付近に位置する 2 つのアルギニン残基を含むループ構造が，基質結合時に大きな構造変化を生じることがわかった．また，これらアルギニン残基をそれぞれ変異させ活性測定を行ったが，これらは GalT 活性を全く示さなかったことから，これら 2 つのアルギニン残基は基質の結合に重要な役割を担う可能性を示唆している．

galactose 1-phosphate uridylyltransferase, archaea, *Pyrobaculum aerophilum*

発表責任者：大志田達也（05tc16@gmail.com）

講演番号：3C04a01
講演日時：3 月 27 日 09:30～ 理学部講義棟 C04 会場

エタノールアミン型プラズマローゲン特異的ホスホリパーゼ D の精製, 機能解析および遺伝子クローニング

Purification, enzymatic characterization and gene cloning of ethanolamine plasmalogen-specific phospholipase D

○野澤 俊貴、川村 柚葉、王 澤、杉森 大助（福島大理工）
○Toshiki NOZAWA, Yuzuha KAWAMURA, Ze WANG, Daisuke SUGIMORI (Fukushima Univ.)

【背景・目的】

sn-1 位にビニルエーテル結合を持つリン脂質の 1 種であるプラズマローゲン（Pls）は，ヒトの脳神経細胞や心筋細胞に多く含まれ，正常な細胞機能と発達において重要な役割を担う．Pls にはコリン型（PlsCho）とエタノールアミン型（PlsEtn）が存在し，PlsEtn はアルツハイマー症および軽度認知症患者の血中で有意に減少することが報告されている．そのため，PlsEtn はこれら疾患の初期段階を発見するバイオマーカーとして期待されている．現在，^{125}I を用いた HPLC 法あるいは LC／MS 法により分析されているが，煩雑な抽出を伴い多検体同時分析が困難であるため医療現場に導入するまでには至っていない．そのため，新たな診断方法として酵素定量法の開発が強く望まれている。そこで本研究では，PlsEtn の酵素定量法の開発を目指し，PlsEtn 特異的ホスホリパーゼ D（PlsEtn-PLD）生産菌の探索，PlsEtn-PLD の機能解析および遺伝子クローニングを行った．

【方法・結果】

当研究室保有の放線菌 101 株に対して目的 PLD 活性測定による 1 次スクリーニングを行った結果，58 株が PlsEtn に対して PLD 活性を示した．次に，これらの候補株に対して PlsEtn 選択性が高い PLD を生産する菌株を選抜するために基質特異性試験を行った結果，AK461 株が培養上清中に PlsEtn-PLD を生産している可能性を見出した．AK461 株の 16*S* rDNA 解析より，本菌株は *Streptomyces polychromogenes* または *Streptomyces racemochromogenes* に帰属された．AK461 株の培養上清より硫安分画とカラムクロマトグラフィーを用いた PlsEtn-PLD の精製を行った．精製酵素はホスファチジルエタノールアミンなどの構造類似体には作用せず PlsEtn に高い特異性を示した。本酵素 PlsEtn-PLD の至適 pH は 7，至適温度は 37℃，Ca^{2+}要求性であり，SDS-PAGE 分析から分子量は約 50 kDa と推定した．LC-MS/MS による内部アミノ酸配列解析を行った結果，既知 PLD と共通する 4 つの内部アミノ酸配列を有することがわかった．これら配列から PCR プライマーを設計し，推定 PlsEtn-PLD 遺伝子をクローニングした．解読したアミノ酸配列をクエリーとして BLAST サーチを行った結果，*Streptomyces katrae* 由来推定 phospholipase D（PLDsk）と最も高い相同性 92.2%を示した．また，PLDsk と PlsEtn-PLD には，触媒作用に関与する HxKxxxxD（HKD）モチーフが 2 ヶ所含まれていたことから，触媒作用は既知 PLD に似た機序と予想される．

phospholipase D, ethanolamine plasmalogen, *Streptomyces*

発表責任者：杉森大助（sugimori@sss.fukushima-u.ac.jp）

講演番号：3C04a02
講演日時：3 月 27 日 09:41～ 理学部講義棟 C04 会場

エタノールアミン型プラズマローゲン特異的ホスホリパーゼ D の異種組換え発現
Heterologous expression of ethanolamine plasmalogen-specific phospholipase D
○川村 柚葉、野澤 俊貴、王 澤、杉森 大助（福島大理工）
○Yuzuha KAWAMURA, Toshiki NOZAWA, Ze WANG, Daisuke SUGIMORI (Fukushima Univ.)

【背景・目的】
アルツハイマー型認知症および軽度認知症患者において，血中エタノールアミン型プラズマローゲン(PlsEtn)レベルが有意に減少することから，PlsEtn はこれら疾患を診断するためのバイオマーカーとなる。PlsEtn の既存定量法である HPLC 法や LC/MS 法は抽出を伴う煩雑な操作と分析時間やコスト面など利便性に欠けている。そのため，簡便，迅速かつ多検体同時分析可能な PlsEtn の酵素定量法の開発が強く望まれている。前演者が見出した PlsEtn 特異的ホスホリパーゼ D(PlsEtn-PLD)を用いた酵素定量法の有用性が期待できたことから，本酵素の異種組換え発現系の確立を目的として研究を行った。

【方法・結果と考察】
当研究室で PlsEtn-PLD 生産菌として見出された放線菌 *Streptomyces* sp. AK461 株について次世代シーケンサーによるゲノム解析を行った。ゲノム解析の結果，AK461 株ゲノム中には脂質代謝関連遺伝子として 103 遺伝子見出され，そのうち 2 種類の推定 PLD 遺伝子 GM001933, GM002871 が PlsEtn-PLD 遺伝子の候補として予想された。そこで両配列をクエリーとして BLAST サーチによる相同性検索を行った結果，一方は明らかに異なる酵素と考えられ，もう一方は *Streptomyces katrae* と *Streptomyces racemochromogenes* 由来 PLD に対して，それぞれ 92.2%と 89.9%の相同性を示した。この結果から，GM002871 が目的とする PlsEtn-PLD の遺伝子候補として選抜した。また，本遺伝子は前演者がクローニングした遺伝子と完全に配列が一致した。本遺伝子は 1509 bp で，アミノ酸 26 残基からなる Sec 型の分泌シグナルを持ち，推定分子量 52,963 Da，Cys8 残基を含み，推定等電点 pI=6.16 であることがわかった。この遺伝子 *plsetn-pld* を発現ベクターpET24a の *Nde* I-*Hin*d III 間に導入し，宿主大腸菌 BL21(DE3)あるいは SHuffle T7 Express を用いて発現させた。オートインダクション TB 培地を用いた発現の結果，30℃，24 h 培養における BL21(DE3)形質転換体の無細胞抽出液(CFE)中に PlsEtn-PLD 活性が確認された。また，PlsEtn の構造類似体に対する基質特異性試験の結果，本酵素はホスファチジルエタノールアミン，リゾフォスファチジルエタノールアミンなどには作用しないことが確認できた。しかしながら，酵素活性は 0.042 U/mL と微弱であった。現在，大腸菌発現に最適化した全合成遺伝子を用いた大量発現と His タグ付加について検討を行っている。

phospholipase D, ethanolamine plasmalogen, *Streptomyces*

発表責任者：杉森大助（sugimori@sss.fukushima-u.ac.jp）

講演番号：3C04a03
講演日時：3 月 27 日 09:52～ 理学部講義棟 C04 会場

リン脂質改質を目指した好熱性細菌 B157^T 株由来活性型ホスホリパーゼ A_1 組換え体の調製と性質決定

Preparation and characterization of an active recombinant phospholipase A_1 from a thermophilic bacterium B157^T for phospholipid modification

○森 千波、田中 秀典、齋藤 遼、辻本 善之、渡部 邦彦（京府大院生命環境）
○ Chinami MORI, Hidenori TANAKA, Ryo SAITO, Yoshiyuki TSUJIMOTO, Kunihiko WATANABE (Kyoto Pref. Univ.)

【背景・目的】 ホスホリパーゼ A (PLA) は油脂精製や乳化性に優れたリゾリン脂質の製造等に利用されるが、産業利用可能な酵素は宗教上の問題や病原性により限られている。そのため、安定性や位置選択性に優れ、大量調製可能な代替酵素が求められる。好熱性細菌 *Caenibacillus caldisaponilyticus* B157^T 株は細胞外に、リン脂質の *sn*-1 位に特異性を持つ PLA_1 を分泌する [1)]。本菌株の PLA_1 は N 末端に分泌シグナル、C 末端にプロ配列を持つ不活性型 PLA_1 (PlaA-Cpro) として分泌され、細胞外でプロセシングを受け活性型 PLA_1 (PlaA) になると示唆された。しかし、PlaA の大腸菌での大量発現を試みても、活性を持つ組換え PlaA (rPlaA) を得ることは困難であった。そこでプロセシング前の不活性型 PlaA-Cpro を大腸菌で大量発現後 (rPlaA-Cpro) 、*in vitro* でプロセシングすることで rPlaA を調製し、性質決定、リン脂質改質を試みた。

【方法・結果】 rPlaA-Cpro を pET-11a と *Escherichia coli* Rosetta BL21 (DE3) を用いて大量発現させ、菌体破砕後、無細胞抽出液に対して各種操作を行い、電気泳動上でほぼ単一な rPlaA-Cpro 標品を得た。基質として卵黄ホスファチジルコリン (PC) を用い、pH 7、60°C、15 min で酵素反応を行い、遊離脂肪酸 (FFA) を定量することにより活性を評価した。1 U は 1 min 間で 1 μmol の FFA を産生する酵素量とした。

rPlaA-Cpro を Proteinase K でプロセシング (55°C、16 h) することでプロ配列を切断・分解し、得られた rPlaA が活性を持つことを確認した。その後、TOYOPEARL Butyl-650S カラムクロマトグラフィーを用いて rPlaA の精製標品を得た。rPlaA の比活性は約 200 U/mg であり、pH 5-10 で高い活性と最大活性の 50%以上活性を保持する安定性が確認された。

50%MeOH 存在下で酵素反応を行うと、PC は分解され、FFA に加え、脂肪酸メチルエステル (FAME) も生成された。高い MeOH 濃度下での反応性より、rPlaA が高い有機溶媒耐性と、PC から FAME に変換するエステル交換活性を有することが判った。

得られた rPlaA を用いて、更に PC をリゾホスファチジルコリン (LPC) へ加水分解し、アシル基供与体としてトリアシルグリセロール (オリーブオイルまたはココナッツオイル) を添加し再び反応させると、改質 PC が生産されると判った。改質前後の PC の脂肪酸組成を明らかにしたところ、改質 PC の不飽和脂肪酸含有量が、元の PC より有意に増加しており、脂質改変が行われたことが判った。

1)*Int J Syst Evol Microbiol*. **66**. 2684-2690 (2016)

phospholipase A_1, characterization, thermopilic bacterium

講演番号：3C04a04
講演日時：3 月 27 日 10:03～ 理学部講義棟 C04 会場

麹菌由来の新規油脂分解酵素
A novel lipolytic enzyme from *Aspergillus oryzae*
○市川 響太郎、吉田 彩花、塩野 義人、小関 卓也（山形大農）
○Kyotaro Ichikawa, Ayaka Yoshida, Yoshihito Shiono, Takuya Koseki (Fac. Agric., Yamagata Univ.)

【導入】
ステロールエステラーゼ（EC 3.1.1.13）はステロール骨格 3 位の脂肪酸エステルを加水分解する。トリアシルグリセロールリパーゼ（EC 3.1.1.3）として知られるリパーゼは、グリセロールの脂肪酸エステルを加水分解して脂肪酸を遊離させる。また、ステロールエステラーゼとリパーゼはエステル合成反応を触媒し、両活性を有する酵素も見つかっている。本発表では麹菌 *Aspergillus oryzae* RIB40 由来のステロールエステラーゼ/リパーゼと推定される機能未知酵素遺伝子 AO090010000745（*lip0745*）の酵素学的特徴付けについて報告する。なお *lip0745* は、現在までに *A. oryzae* から見出されてきた油脂分解酵素（TGL3、CUTL1、MDGL2、Lip0375）とは相同性がなかった。
【方法】
Lip0745 の発現はメタノール資化性酵母である *Pichia pastoris* GS115 を用いて行い、分泌は *Saccharomyces cerevisiae* 由来のシグナルペプチドである α-factor を用いた。なお N 末端側の 27 アミノ酸残基を欠損させたものを Lip0745⊿27 と名付けた。
【結果】
Lip0745⊿27 は SDS-PAGE で約 60kDa を示し、最適条件は pH7.0、40℃であった。熱安定性は 40℃の 1 時間処理で 84%の残存活性を示し、60℃の処理でも 30%の残存活性を示した。k_{cat}/K_m は 3.5×10^4 ($s^{-1}\cdot mM^{-1}$)と高い触媒効率を示した。なおこれらの試験において、基質は合成基質 α-ナフチルブチレート（C4）を使用した。基質特異性試験では、C4 および C8 を中心に広範囲な鎖長の α-ナフチルエステルを加水分解した。さらに現在までに、短鎖脂肪酸エステルであるトリブチリンおよび酢酸コレステロール、酪酸コレステロールの加水分解が確認された。またエステル交換能を確認すべくトリブチリン、コレステロール混合溶液に Lip0745⊿27 を添加し、室温で 48 時間反応させたところ、生成物の存在が明らかになったため、現在生成物の同定を進めている。
加えて *P. pastoris* による異種発現では、通常 Yeast nitrogen base(YNB)を培地に添加するが、YNB に代替し D-ソルビトールを添加した際に、4 日目培養上清中における C4 の分解活性が約 1.2 倍に上昇したことも併せて報告する。

Aspergillus oryzae, sterol esterase, lipase

発表責任者：市川　響太郎（agri14012@gmail.com）

講演番号：3C04a05
講演日時：3 月 27 日 10:14～ 理学部講義棟 C04 会場

ラビリンチュラ類特有のリパーゼ/ホスホリパーゼのユニークな位置特異性は海洋微生物の種間競争と脂肪酸取り込みに関与する

A thraustochytrid-specific lipase/phospholipase with unique positional specificity contributes to microbial competition and fatty acid acquisition from the environment

○石橋 洋平[1]、青木 敬祐[1]、沖野 望[1]、林 雅弘[2]、伊東 信[1] ([1]九州大農、[2]宮崎大農)
○Yohei ISHIBASHI[1], Keisuke AOKI[1], Nozomu OKINO[1], Masahiro HAYASHI[2], Makoto ITO[1] ([1]Kyushu Univ., [2]Miyazaki Univ.)

ラビリンチュラ類は海洋に広く生息する従属栄養の単細胞真核微生物である。その存在量と普遍性から、海洋生態系における重要な分解者であると考えられているが、有機物分解に関与する分泌型酵素の分子実態は不明である。ラビリンチュラ類が何をどのように摂取しているのかを明らかにすることは、海洋生態系における有機物循環を理解する上で重要である。ラビリンチュラ類とその近縁生物群との比較ゲノムクラスター解析の結果、ラビリンチュラ類に特有の機能未知遺伝子群が見いだされた。本研究ではクラス 3 リパーゼドメインを有する遺伝子に着目し、異種発現および精製リコンビナント酵素を用いた機能解析を行った。その結果、Protein ID:145138 の遺伝子産物が中性脂質トリアシルグリセロール（TG）、リン脂質ホスファチジルコリン（PC）を効率良く分解することが分かった。145138 の局在を調べた結果、この酵素は大部分が培地中に放出される分泌型の酵素であり、環境中の TG や PC を分解することが示された。また、TG を唯一の炭素源とする培地では、145138 欠損株は増殖能が大幅に低下し、逆に過剰発現株では増殖能が向上することが分かった。これらの結果より、145138 はラビリンチュラ類において脂質の分解と資化に関与することが示された。次に、TG に対する位置特異性を検証したところ、このリパーゼは sn-1, 2, 3 位、どの位置の脂肪酸に対しても同程度の効率で分解することが示された。一方、このリパーゼを PC に作用させた結果、sn-1 の脂肪酸が優先的に分解され、sn-2 に脂肪酸が残存する 2-アシルリゾ PC（LPC）が産生された。これらの結果より、この新規リパーゼは TG に対しては厳密な位置特異性を持たず、無作為に脂肪酸を遊離させるが、基質が PC になると sn-1 に対する選択性を示し、ホスホリパーゼ A1 活性を有する、というユニークな性質を持つ事が明らかとなった。興味深いことに、本酵素の反応により生成する 2-アシル LPC は細菌に対して強い抗菌活性を示した。海洋環境中において、ラビリンチュラ類は栄養となる有機物をめぐって細菌と競合していると考えられる。本酵素で見いだされたユニークな位置特異性は、中性脂質の資化と異種競争を有利にする抗菌物質生産に貢献するものと考えられる(Ishibashi et al, Sci. Rep. 2019)。また、本酵素は安定性および比活性が高い、TG を構成する脂肪酸に対する基質特異性が広い、塩および有機溶媒に対する耐性も高いといった有用な性質を持ち、バイオディーゼル生産に直結するエステル交換反応を高効率で触媒することが分かった。脂質に関する基礎および応用研究に活用できる有益な酵素として活躍することが期待される。

Lipase, Marine ecosystem, Positional specificity

講演番号：3C04a06
講演日時：3 月 27 日 10:35～ 理学部講義棟 C04 会場

Burkholderia stabilis 由来コレステロールエステラーゼの診断薬への応用
Application of cholesterol esterase from *Burkholderia stabilis* to a diagnostic reagent
小西 健司[1]、吉田 圭太朗[2]、安武 義晃[2,3]、村松 周治[1]、○酒瀬川 信一[1]、田村 具博[2,3,4] ([1]旭化成ファーマ株式会社、[2] 産業技術総合研究所、[3]Computational Bio Big-Data Open Innovation Laboratory (CBBD-OIL), AIST、[4] 北海道大学)
Kenji KONISHI[1], Keitaro YOSHIDA[2], Yoshiaki YASUTAKE[2,3], Shuji MURAMATSU[1], ○Shin-ichi SAKASEGAWA[1], Tomohiro TAMURA[2,3,4] ([1]Asahi Kasei Pharma Corporation, [2]Bioproduction Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), [3]Computational Bio Big-Data Open Innovation Laboratory (CBBD-OIL), AIST, [4]Hokkaido University)

【目的】
コレステロールエステラーゼは総コレステロールや HDL、LDL、small density lipoprotein cholesterol などの診断を行う体外診断用医薬品に加えられて利用されている。原核生物由来の *Burkholderia stabilis* 由来のコレステロールエステラーゼ（以下、BsCE と記載する）を真核生物由来の *Candida cylindracea* 由来コレステロールエステラーゼ（以下、CcCE と記載する）と比較した。また、BsCE を大量に生産するために、*Burkholderia stabilis* の大腸菌での組換え発現検討を行った。
【方法・結果】
BsCE と CcCE の pH 安定性を比較したところ、BsCE は CcCE に比べ高 pH 領域で安定であることがわかった。また、コレステロールエステルの脂肪酸の長さを変え反応させ、基質特異性を調べたところ、BsCE は CcCE に比べ基質特異性が広いことが分かった。さらに、BsCE を血清中の総コレステロール測定に使用できるかを確認した。BsCE を用いた試薬は市販総コレステロール測定キットとよく相関することがわかった。以上の結果から、BsCE は総コレステロール測定キットに加えて使用できることが示された。
BsCE を大量発現させるために、大腸菌での組換え発現を試みた。その結果、シグナル配列を付加することでわずかに活性発現することが分かったが、大半が不溶性タンパク質であった。BsCE は大腸菌での組換え発現が困難であることが分かり、大量発現のためには新たな発現系が必要であることが示唆された。この成果は、国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）の委託業務の結果得られた。

Burkholderia stabilis, cholesterol Esterase, diagnostic reagent

発表責任者：酒瀬川信一（sakasegawa.sb@om.asahi-kasei.co.jp）

講演番号：3C04a07
講演日時：3 月 27 日 10:46～ 理学部講義棟 C04 会場

Burkholderia stabilis を宿主とした細胞外コレステロールエステラーゼの組換え生産
Production of recombinant extracellular cholesterol esterase using *Burkholderia stabilis*
○吉田 圭太朗[1]、小西 健司[2]、MAGANA-MORA Arturo[1,3]、ROUGNY Adrien[1,3]、安武 義晃[1,3]、村松 周治[2]、村田 里美[2]、熊谷 俊高[4]、油谷 幸代[1,3]、酒瀬川 信一[2]、田村 具博[1,3,5]([1]産総研、[2]旭化成ファーマ、[3]Computational Bio Big-Data Innovation Laboratory, AIST、[4]ファームラボ、[5]北大院農)
○ Keitaro YOSHIDA[1], Kenji KONISHI[2], Arturo MAGANA-MORA[1,3], Adrien ROUGNY[1,3], Yoshiaki YASUTAKE[1,3], Shuji MURAMATSU[2], Satomi MURATA[2], Toshitaka KUMAGAI[4], Sachiyo ABURATANI[1,3], Shin-ichi SAKASEGAWA[2], Tomohiro TAMURA[1,3,5] ([1]AIST, [2]Asahi Kasei Pharma Corp., [3]CBBD-OIL, AIST, [4]FermLab Inc., [5]Hokkaido Univ.)

【背景・目的】
コレステロールエステラーゼ(CEN)は、コレステロールエステルをコレステロールと脂肪酸に加水分解する酵素である。コレステロールは血液中で主にエステルとして存在するため、本酵素は血中コレステロール濃度の測定に利用されており、大きな需要がある。グラム陰性細菌 *Burkholderia stabilis* FERMP-21014 は、脂肪酸の存在下でコレステロールエステラーゼを細胞外に産生するが、生産量が低いこと、培地に脂肪酸の添加が必要なことが酵素生産の課題となっている。本研究では *B. stabilis* を宿主とし、コレステロールエステラーゼを効率的に生産できる発現ベクターを活用した組換え体の開発を目的とした。
【結果】
発現ベクターに導入するプロモーターを取得するため、*B. stabilis* において安定して高活性な構成型プロモーターの探索を試みた。まず 5 つの異なる培養条件下で RNA シーケンス解析を行い、培養条件によらず一貫して高レベルに発現している 9 つの遺伝子を選択した。そしてそれらの遺伝子の上流配列をプロモーターとしてコレステロールエステラーゼ発現ベクターを構築した。これらのベクターを *B. stabilis* へ導入することにより、誘導剤（脂肪酸）を添加しない条件下でコレステロールエステラーゼを生産することに成功した。最も高いプロモーター活性を示したのはアルキルヒドロペルオキシドレダクターゼサブユニット AhpC をコードする遺伝子（BSFP_0720）の上流配列であり、24.3 U mL^{-1} の細胞外コレステロールエステラーゼを生産した。これは脂肪酸を添加しない条件における野生株（0.1 U mL^{-1}）と比較して 243 倍高い生産量であった。さらに、発現株の細胞内にコレステロールエステラーゼの蓄積がほとんど見られないことをウエスタンブロッティングにより確認した。本解析手法は、細菌宿主において安定して活性の高いプロモーターのスクリーニングに役立つことが期待される。この成果は、国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）の委託業務の結果得られた。

Burkholderia stabilis, choleterol esterase, diagnostic reagent

発表責任者：田村具博（t-tamura@aist.go.jp）

講演番号：3C04a08
講演日時：3 月 27 日 10:57～ 理学部講義棟 C04 会場

ラビリンチュラ類から見出された新規ステロールエステル合成酵素の機能解析
Functional analysis of a novel sterol ester synthase discovered from thraustochytrids
○定光 翔平[1]、石橋 洋平[1]、深堀 義朝[1]、林 雅弘[2]、渡辺 昂[1]、沖野 望[1]、伊東 信[1] ([1]九大院農、[2]宮大農)
○ Shohei SADAMITSU[1], Yohei ISHIBASHI[1], Yoshitomo FUKAHORI[1], Masahiro HAYASHI[2], Takashi WATANABE[1], Nozomu OKINO[1], Makoto ITO[1] ([1]Kyushu Univ., [2]Miyazaki Univ.)

真核生物に普遍的に存在するステロールは、細胞膜の強度や流動性の調節、情報伝達場である脂質ラフトの構成など、重要な生命機能を担う脂質の１つである。細胞内において、ステロールは 3 位の水酸基に脂肪酸がエステル結合したステロールエステル（SE）として貯蔵される。SE を合成する酵素としてはアシル-CoA コレステロールアシルトランスフェラーゼ（ACAT)、レシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ（LCAT)、 リン脂質ステロールアシルトランスフェラーゼ （PSAT）などが知られている。海洋真核微生物ラビリンチュラ類では SE が大量に蓄積しているにもかかわらず、その SE 合成機構は不明であった。我々は、トリアシルグリセロール（TG）合成酵素として知られるジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ 2 (DGAT2)のホモログの１つがラビリンチュラでは SE 合成酵素として機能していることを発見した。

ラビリンチュラ類のドラフトゲノムには DGAT2 の複数のホモログ（DGAT2A、DGAT2B）が存在する。質量分析計を用いたリピドミクス解析を実施した結果、DGAT2A 欠損株では TG は顕著に減少していたが、DGAT2B 欠損株においては TG の減少は観察されず、SE が顕著に減少していることが分かった。また、DGAT2B 欠損株に *dgat2b* 遺伝子を再導入した復帰株では、SE 量が野生株レベルまで回復した。次に、出芽酵母に DGAT2B を発現させ、その機能解析を行った。その結果、DGAT2B 発現酵母では TG 量には変化がないが、SE 量が大幅に増加することが分かった。さらに、形質転換酵母のライセートを用いて酵素活性を測定した結果、DGAT2B はアシル CoA とステロールを基質として SE を合成するが、ジアシルグリセロール（DG）は基質としないことが確認された。これらの結果より、DGAT2B は SE 合成酵素として機能することが明らかになった。これまでに DGAT2 およびそのホモログがステロールを基質とするという報告はなく、ラビリンチュラ類より見いだされた DGAT2B が初めての例である。また、この DGAT2B は既知の SE 合成酵素とは全く配列上の相同性はないが、ラビリンチュラ類が属するストラメノパイル生物群に特徴的に保存されていることが分かった。DGAT2B は、ストラメノパイルが進化の過程で独自に獲得した SE 合成酵素と推測される。

ステロールは産業的にも有用な脂質であり、微生物を用いた発酵生産の収率を上げるためには SE 蓄積量を増やすことが重要な課題となる。本研究により明らかとなった新規 SE 合成酵素 DGAT2B は、なぜ DG でなくステロールを基質にするのかという酵素化学的な興味とともに、ステロール生産性向上を目指したラビリンチュラ類の分子育種の良い標的になることが期待される。

Diacylglycerol acyltransferase, Thraustochytrids, sterol ester

講演番号：3C04a09
講演日時：3 月 27 日 11:08～ 理学部講義棟 C04 会場

In vitro and *In vivo* Analysis of FadH Protein from *Shewanella livingstonensis* Ac10 Involved in DHA Conversion

○Yustina Yusuf, Kazuki Hirose, Jun Kawamoto, Takuya Ogawa, Tatsuo Kurihara (Institute for Chemical Research, Kyoto University)

Shewanella livingstonensis Ac10 is a psychrotrophic bacterium producing eicosapentaenoic acid (EPA), a long-chain polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA), at low temperatures. Our previous studies showed that deletion of EPA biosynthesis gene in this bacterium caused growth defects at low temperatures. In addition, supplementation with phospholipids (PLs) containing EPA or docosahexaenoic acid (DHA) in culture medium restored the growth of the EPA-null mutant. Interestingly, EPA-containing PLs were found in the membrane of the EPA-null mutant that grew with supplementation of DHA-containing PLs. This suggested that DHA was converted into EPA in *S. livingstonensis* Ac10. Fatty acids are generally metabolized through β-oxidation pathway that is catalyzed by FadE, FadB, and FadA enzymes. Conversion of Δ^4-unsaturated fatty acids, e.g. DHA, requires additional enzyme, FadH (2,4-dienoyl-CoA reductase). Unlike the biosynthesis mechanisms, the studies on EPA/DHA degradation or conversion in LC-PUFA-producing bacteria are very limited. Therefore, we here aimed to study the FadH protein and elucidate its role in DHA-to-EPA conversion in *S. livingstonensis* Ac10.

S. livingstonensis Ac10 has six putative FadH proteins, Sl_0221, Sl_0453, Sl_1274_, Sl_1301, Sl_1351, and Sl_1692. To examine their involvement in DHA conversion *in vivo,* knock-out mutations on these genes were introduced into EPA-null mutant. PL profiles determined by ESI-MS analysis showed that one of these mutants (Sl_1351 mutant) had much less EPA-containing PLs, suggesting that it lost the conversion ability. To further demonstrate the function of Sl_1351 *in vitro*, we expressed the hexahistidine-tagged Sl_1351 in *E. coli* BL21(DE3) and purified it by affinity chromatography. Acyl-CoA oxidase was used to prepare dienoyl-CoA from DHA-CoA as the substrate. The formation of enoyl-CoA as the reaction product was confirmed by ESI-MS, suggesting that Sl_1351 protein has dienoyl-CoA reductase activity. Both the *in vitro* and *in vivo* analyses showed that Sl_1351 protein is FadH protein in *S. livingstonensis* Ac10 that is crucial for DHA conversion. Further analysis will be conducted to determine the protein expression level and its enzymatic characteristics.

DHA conversion, dienoyl-CoA reductase, ß-oxidation

発表責任者：Tatsuo Kurihara（kurihara@mbc.kuicr.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3C04a10
講演日時：3 月 27 日 11:19～ 理学部講義棟 C04 会場

リゾホスファチジン酸アシル基転移酵素ホモログの比較解析
Comparative analysis of lysophosphatidic acid acyltransferase homologs
久保嶋 美咲、○SUWANAWAT Nittikarn、川本 純、小川 拓哉、栗原 達夫（京大・化研）
Misaki KUBOSHIMA, ○Nittikarn SUWANAWAT, Jun KAWAMOTO, Takuya OGAWA, Tatsuo KURIHARA (ICR, Kyoto Univ.)

【目的】生体膜の主成分であるグリセロリン脂質はグリセロール分子を骨格として、これに極性頭部基および２つの脂肪酸アシル基が結合するが、これらの組み合わせによって多種多様なグリセロリン脂質分子が存在しうる。実際に生体膜は構造的にさまざまなリン脂質から構成されるが、それらは膜タンパク質の膜内でのフォールディングや機能発現、あるいは生体膜の物理化学的な性質を決定する一因であることが知られている。これまでは極性頭部基の役割が主な研究対象であったが、近年の分析技術の発展に伴い、脂肪酸アシル基の多様性とその生理機能が見直されるようになってきている。

リゾホスファチジン酸アシル基転移酵素 (PlsC) はリン脂質の生合成酵素の１つであり、*sn*-2 位への脂肪酸アシル基の導入を担う。我々はこれまでに、低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 が５つの PlsC ホモログを持ち (PlsC1~PlsC5)、PlsC1 がエイコサペンタエン酸に、PlsC4 が分枝鎖脂肪酸に転移活性を有することを報告しており、これらの PlsC ホモログの基質特異性の違いがリン脂質アシル鎖の多様化に寄与することを推察している。PlsC5 の機能は未解明であるが、PlsC4 と相同性が高く、また *plsC4* と *plsC5* がゲノム上でタンデムに並ぶことから、それらの酵素・生理学的な働きや機能的な相互作用は興味深い。*S. livingstonensis* Ac10 におけるリン脂質アシル鎖の多様化機構とその意義を調べるため、本研究では PlsC5 の機能解析および PlsC4 との比較を行った。

【方法・結果】先行研究ではプラスミド挿入による遺伝子破壊の結果、極性効果が観察されたため、ここではこれを回避する目的でゲノム上の *plsC* 遺伝子に点変異を導入した。すなわち、PlsC の触媒残基である His/Asp 残基の Ala 置換変異を導入して酵素の不活化を試みた。それらの変異株から Bligh-Dyer 法により総脂質を抽出し、リン脂質および脂肪酸組成を質量分析により解析した。

解析の結果、PlsC4$^{H95A/D100A}$ 変異株では *sn*-2 位に結合する分枝鎖脂肪酸の割合が著しく低下しており、このことは *plsC4* 破壊株の結果と一致した。一方で、同破壊株に認められた運動性の低下や細胞凝集は Ala 置換変異株には見られず、極性効果を誘発させずに酵素機能を抑えられていることが示唆された。PlsC5$^{H92A/D97A}$ 変異株においては *sn*-1 位に *iso*-pentadecanoyl 基、*sn*-2 位に palmitoleoyl 基をもつリン脂質のみが大きく減少していた。以上のことから、PlsC5 が PlsC4 とは基質特異性が異なり、また、*sn*-2 位だけでなく *sn*-1 位のアシル鎖も識別する可能性が考えられた。Ala 置換変異株の生育や細胞形態、運動性を調べたところ親株と有意な変化が認められず、現在、その他の観点からも表現型の解析を進めている。

Lysophosphatidic acid acyltransferase, Phospholipid synthesis

発表責任者：Tatsuo KURIHARA（kurihara@mbc.kuicr.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3C04a11
講演日時：3 月 27 日 11:40～ 理学部講義棟 C04 会場

高基質特異性 L-グルタミン酸オキシダーゼの活性中心残基 Glu617 への変異導入による機能解析

Functional analysis of active site residue Glu617 of L-glutamate oxidase with high substrate specificity

○矢野 佳果[1]、松尾 慎作[1]、伊藤 菜奈子[2]、今田 勝巳[2]、日下部 均[3]、根本 理子[1]、田村 隆[1]、稲垣 賢二[1] ([1]岡山大院・環境生命、[2]阪大院・理、[3]エンザイムセンサ)

○ Yoshika YANO[1], Shisnsaku MATSUO[1], Nanako ITOU[2], Katsumi IMADA[2], Hitoshi KUSAKABE[3], Michiko NEMOTO[1], Takashi TAMURA[1], Kenji INAGAKI[1] ([1]Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okayama Univ., [2]Grad. Sch. Sci., Osaka Univ., [3]Enzyme Sensor Co. Ltd.)

【目的】放線菌 *Streptomyces* 属由来 L-グルタミン酸オキシダーゼ (LGOX) は，L-Glu の酸化的脱アミノ反応を触媒する FAD 依存性 L-アミノ酸オキシダーゼの一種である。本酵素は L-Glu のみに作用するという極めて厳格な基質特異性を示し，また高活性かつ熱，pH に対して安定であることから，バイオセンサー等に実用化され，国内外で利用されている。我々は LGOX の 305 番目のアルギニン残基 (R305)が LGOX の基質認識の key residue であることを明らかにし, R305 への部位特異的変異導入により，L-His，L-Arg，L-Tyr などに高い活性を示す基質特異性改変酵素の作製に成功した [1,2)]。特に，R305E 変異 LGOX は L-Arg に対して厳格な基質特異性を示し，L-アルギニンオキシダーゼと言える酵素であった。R305E 変異 LGOX の X 線結晶構造解析を行ったところ，基質 L-Arg は Glu305 残基の他に新たに 617 番目のグルタミン酸残基（Glu617）や 433 番目のアスパラギン酸残基（Asp433）と相互作用していることが明らかとなった。本研究では Glu617 の更なる機能解明に向け，E617X 変異 LGOX の作製を行い，性質検討を行った。【方法】クイックチェンジ法による部位特異的変異導入により作製した変異 LGOX 発現ベクターを *E. coli* JM109 に導入し, LGOX 変異酵素を発現, 精製した。酵素活性は, 反応生成物である過酸化水素を定量することで測定した。【結果】7 種の E617X 変異 LGOX および 6 種の R305E/E617X 変異 LGOX を作製し，精製と性質検討を行った。ほとんどの E617X 変異 LGOX において，比活性は減少したものの L-Glu に対して相対的に高い活性を示した。こうした中で E617K 変異 LGOX は L-Tyr に対する高い活性を示した。また，R305E/E617X 変異 LGOX は L-Arg に対して相対的に高い活性を示したが，L-Tyr や L-Lys に対する活性も新たに検出された。以上のことから，Arg305 のみならず Glu617 への変異導入によっても基質特異性を変化させることが可能であることが明らかとなった。現在， E617K 変異 LGOX の結晶化，結晶構造解析に取り組むとともに，更なる変異酵素作製を行っている。

1) Arima, J., *et al., FEBS Journal,* **276**, 3894-3903 (2009)
2) Utsumi, T., *et al., Biochem. Biophys. Res. Commun.,* **417**, 951-955 (2012)

L-glutamate oxidase, biosensor, substrate specificity

発表責任者：稲垣賢二（kinagaki@okayama-u.ac.jp）

講演番号：3C04a12
講演日時：3 月 27 日 11:51～ 理学部講義棟 C04 会場

糸状菌由来 L-リシン α-オキシダーゼの活性中心に存在する Asp212 残基の機能解析
Functional analysis of Asp212 residue in the active site of L-lysine α-oxidase from filamentous fungi

○齋藤 雅哉[1]、松本 侑也[1]、松田 崚汰[2]、北川 征樹[2]、伊藤 菜奈子[2]、今田 勝巳[2]、日下部 均[3]、根本 理子[1]、田村 隆[1]、稲垣 賢二[1] ([1]岡山大院・環境生命、[2]阪大院・理、[3]エンザイム・センサ)
○Masaya SAITO[1], Yuya MATSUMOTO[1], Ryota MATSUDA[2], Masaki KITAGAWA[2], Nanako ITO[2], Katsumi IMADA[2], Hitoshi KUSAKABE[3], Michiko NEMOTO[1], Takashi TAMURA[1], Kenji INAGAKI[1] ([1]Grad. Sch. Environ. & Life Sci., Okayama Univ., [2]Grad. Sch., Osaka Univ., [3]Enzyme Sensor Co. Ltd.)

【目的】糸状菌 *Trichoderma viride* 由来 L-リシン α-オキシダーゼ（LysOX）は L-リシン（L-Lys）の酸化的脱アミノ化反応を触媒する L-アミノ酸オキシダーゼの一種である。本酵素は L-Lys に対する厳格な基質特異性を有し，熱や pH に対して安定であるため L-Lys の微量定量に活用されており，腫瘍細胞への高い抗腫瘍性から医療分野での活用も期待されている。これまでに我々は LysOX-基質複合体の構造解析に成功しており，基質 L-Lys の側鎖アミノ基が Asp212 とは直接,Asp315 とは水分子を介して相互作用することを明らかにした。そこで D212A 変異酵素と D315A 変異酵素を作製したところ，野生型 LysOX と比較して L-Lys に対する比活性は低下したが，基質特異性は大きく変化しなかった。また，D212 および D315 両残基に Ala 変異を導入した二重変異酵素では L-Lys に対する比活性が極端に低下するとともに，芳香族アミノ酸に対する活性を示した。これらのことから，D212 および D315 が基質認識に重要であることが示された。そこで今回は，基質認識に密接に関わる D212 残基に様々な変異を導入し，比活性と基質特異性の変化を詳細に解析した。【方法】部位特異的変異は D212 残基を他のアミノ酸（Glu, Met, Arg, Lys, His 等）に置換する変異導入プライマーを用いたクイックチェンジ法で行った。活性は基質 L-アミノ酸と LysOX の反応産物 H_2O_2 を 4-アミノアンチピリン・フェノール法により定量して測定した。【結果および考察】D212 残基を同じ負電荷を持つグルタミン酸に置換した D212E 変異酵素では，野生型 LysOX と同程度の L-Lys に対する比活性および基質親和力が確認された。メチオニンに置換した D212M 変異酵素では L-Lys に対する比活性と k_{cat}/K_m 値が低下したが，基質特異性は大きく変化しなかった。一方で反対の正電荷を持つアルギニンやリシンに置換した D212R, D212K 変異酵素では L-Lys に対する比活性や基質特異性が大きく低下した。また，D212H 変異酵素では D212R, D212K 変異酵素と同様に基質特異性の低下も確認され，L-Phe, L-Tyr といった芳香族アミノ酸を中心に種々の L-アミノ酸に対する活性が確認された。しかしながら，L-Lys に対する比活性の低下は D212R, D212K 変異酵素ほど顕著ではなく，D212H 変異酵素は L-Lys に対する活性を保持しつつ芳香族アミノ酸にも反応するようになったと言える。このように 212 番残基へ導入するアミノ酸の種類によって酵素の活性と基質特異性が大きく変化したことから，この残基が基質の側鎖認識に非常に重要であることが示された。また，この残基へ様々な変異を導入することで，基質特異性を改変した LysOX の作製が可能であることが示された。

L-lysine α-oxidase, site directed mutagenesis, substrate specificity

発表責任者：稲垣賢二（kinagaki@okayama-u.ac.jp）

講演番号：3C04a13
講演日時：3 月 27 日 12:02～ 理学部講義棟 C04 会場

遺伝子へのランダム変異導入による大腸菌由来システイン合成酵素 OASS-B の基質特異性改変

Modification of substrate specificity of cysteine synthase OASS-B ftom *Escherichia coli* by random mutagenesis experiment

○中村 卓[1]、近藤 輝明[1]、高木 博史[2]([1]長浜バイオ大・バイオサイエンス、[2]奈良先端大・バイオ)
○Takashi NAKAMURA[1], Teruaki KONDO[1], Hiroshi TAKAGI[2] ([1]Nagahama Bio, [2]NAIST)

[研究背景・研究目的]

大腸菌の *cysM* 遺伝子がコードするシステイン合成酵素 OASS-B は、*O*-ホスホ-L-セリン（OPS）を基質としてシステインを合成する超好熱性古細菌や結核菌由来のシステイン合成酵素 *O*-ホスホ-L-セリンスルフヒドリラーゼ（OPSS）と活性部位のアミノ酸残基が類似しており、OPSS の特徴である OPS 認識残基（アルギニン）を有している。しかし、大腸菌 OASS-B は OPS を利用できず、主要な細菌や植物のシステイン合成酵素と同様に *O*-アセチル-L-セリン（OAS）を基質としてシステインを合成する。大腸菌 OASS-B が OPS を利用できない機構を調べるために、*cysM* 遺伝子にランダム変異を導入し、大腸菌の OPS 分解酵素をコードする *serB* と OAS 合成酵素をコードする *cysE* の欠損株でスクリーニングすることで、OPS を利用できる OASS-B 変異体が得られると予想して実験を行った。

[方法と結果]

cysM 遺伝子へのランダム変異導入には、8-oxodG や dPTP 等の人工核酸による変異導入キット（Jena BioScience）と error-prone PCR キット（Invitrogen）を使用した。遺伝子内に平均 3 から 9 個の変異が入った 10^4 オーダーのライブラリを大腸菌 W3110 のΔ*cysE*Δ*serB* 株に導入した。得られた形質転換体を OPS とチオ硫酸を 1 mM 含む M9 培地に播種し、37℃で 1 週間培養した。生育した 1 コロニーからプラスミドを抽出し、*cysM* 遺伝子の塩基配列を決定したところ、5 か所にアミノ酸置換を伴う変異があった。得られた変異型 *cysM* 遺伝子を His-tag 発現用プラスミド pQE80 に組み込み、大腸菌に導入後、発現した OASS-B 変異体を Ni^{2+}キレートアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。精製した酵素を用いて、OPS 20 mM、Na_2S 2 mM、37℃、pH 7.5 の条件で反応を行った後、生成したシステインを酸ニンヒドリン法により呈色し、比活性を算出した。その結果、OASS-B 変異体の OPS によるシステイン合成活性は野生型酵素よりも大幅に向上していた。

O-phospho-L-serine sulfhydrylase, random mutagenesis, substrate specificity

発表責任者：中村　卓（t_nakamura@nagahama-i-bio.ac.jp）

講演番号：3C04p01
講演日時：3 月 27 日 13:50～ 理学部講義棟 C04 会場

芳香族 D-アミノ酸誘導体の光学分割可能な新規祖先型 L-アミノ酸酸化酵素の開発と機能解析

Design and functional analysis of ancestral L-amino acid oxidase which can apply to deracemize to aromatic D-amino acid derivatives

○中野 祥吾、南野 優季、烏田 裕香、長谷部 文人、伊藤 創平（静岡県大食栄）
○ Shogo Nakano, Yuki Minamino, Hiroka Karasuda, Fumihito Hasebe, Sohei Ito (Univ. of Shizuoka)

[Introduction] 今日、特殊環状ペプチドに代表される中分子創薬が注目されつつある。同時に原料となるアミノ酸誘導体には、高い光学純度が求められる。有機合成により得られるラセミ体のアミノ酸誘導体は、アミノ酸酸化酵素と還元剤(NH_3:BH_3) を用いたワンポット合成にて、L-或は D-体への光学分割が可能となる。今日までに基質選択性の広い D-アミノ酸酸化酵素 (DAAO)と還元剤を用いた系により、様々な L-アミノ酸誘導体の光学分割が可能となっている。同様に基質選択性の広い L-アミノ酸酸化酵素 (LAAO) を DAAO の代わりに使用すれば、D-アミノ酸誘導体の光学分割も可能となる。しかし LAAO は安価な発現系を用いた大量発現が 50 年近く達成できておらず、光学分割への応用は進んでいなかった。本研究では大腸菌発現系で大量に取得可能な LAAO を、データベース探索と祖先型設計法（ASR 法）により達成した結果について報告する。
[Material & Methods] 以前の研究で同定した 10 個の L-アルギニン酸化酵素（AROD）の配列（Shogo Nakano *et al.*, 2019, AEM, **85**, e00459-00419）を鋳型とし、Blastp を用いて AROD 発現株内でパラログを探索した。結果 *Pseudoalteromonas* 属に AROD と 20%程度の相同性を有するパラログと考えられる新規アミン酸化酵素様遺伝子を発見した。しかし取得した遺伝子は、大腸菌発現系を用いた可溶性発現ができなかった。そこで、人工 L-アルギニン酸化酵素の開発と同様の手法を試みた。新規アミン酸化酵素様遺伝子のホモログ 751 配列をデータベースより取得後、離散的モチーフ用配列により 6 遺伝子を選抜、ASR 法による高機能化を目的とした祖先型パラログ配列の設計と検証実験を行った。結果、大腸菌の可溶性画分に 50mg/L の収量で精製酵素サンプルを得ることに成功した。
[Results & Discussion] 20 種類の L-アミノ酸を基質として酵素比活性測定を行ったところ、サンプル酵素は 13 種類の L-アミノ酸に反応性を有していたため、祖先型 LAAO(AncLAAO)と命名した。AncLAAO は L 型の Gln, Met, Leu, Glu, Phe 及び Trp に対し高い反応性を有していた（k_{cat} 値が 6.4～33.0 /sec)。次にラセミ体 Phe 及び Trp 誘導体を基質とし、AncLAAO と NH_3:BH_3 を用いた反応系で光学分割を実施した。結果 HPLC スケールで 16 種類、分取スケール（100mg の基質を使用)で 4 種類の誘導体について、高い光学純度（>99% ee）かつ収率（69-85%）で D-アミノ酸誘導体を得ることに成功した。現在 AncLAAO の X 線結晶構造解析を進めており、本酵素が広い基質選択性を有する理由を分子レベルで解明することを進めている。

L-amino acid oxidase, deracemization, artificial design

発表責任者：中野 祥吾（snakano@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：3C04p02
講演日時：3 月 27 日 14:01～ 理学部講義棟 C04 会場

好熱性細菌 *Thermomicrobium roseum* 由来 D-アミノ酸デアセチラーゼの機能解析
Characterization of D-amino acid deacetylase from *Thermomicrobium roseum*
○加塩 健悟[1,2]、佐々本 康平[1,3]、氷見山 幹基[1]、倉田 淳志[2]、中村 努[1]、上垣 浩一[2]([1]産総研、[2]近畿大農、[3]摂南大学院)
○Kengo KASHIO[1,2], Kohei SASAMOTO[1,3], Tomoki HIMIYAMA[1], Atsushi KURATA[2], Tsutomu NAKAMURA[1], Koichi UEGAKI[2] ([1]Natl. Inst. Adv. Ind. Sai. Technol., [2]Kindai Univ., [3]Grad. School Set. Eng. Setsunan Univ.)

【背景・目的】

近年の分析技術の発達に伴い、D-アミノ酸が微生物内だけでなく高等生物内にも存在することが明らかとなった。ヒト体内において、統合失調症やアルツハイマー病との関連が報告され、D-アミノ酸類縁化合物の臨床応用も期待されている。一般的な D-アミノ酸合成は、化学合成したラセミ体を分割する手法が用いられ、副生成物や多量の廃溶媒が発生しない酵素法が注目されている。そこで本研究では、高い安定性を有していると考えられ、産業用酵素としての利用が期待できる好熱性細菌 *Thermomicrobium roseum* 由来 D-アミノ酸デアセチラーゼ（Tr_Daac）の酵素学的性質及び、立体構造と活性の関係の解明を目指した。

【結果・考察】

基質特異性は、種々の *N*-アセチル-D-アミノ酸の分解に伴い生じる酢酸の定量により評価した。本酵素は、親水性・中性 *N*-アセチル-D-アミノ酸に対して高い活性を示し、*N*-アセチル-D-リシンに対して最も高い活性を示した。また、最適温度は約 80℃、最適 pH は pH8.0 であることが判った。温度安定性を円偏光二色性の測定により評価したところ、80 ℃付近でも変性しないことが明らかになった。以上のことから、Tr_Daac は耐熱性を有していることが確認できた。

本酵素の金属要求性を調べるために、EDTA で金属イオンをキレートしたところ、酵素活性が低下した。活性の低下した酵素に種々の金属イオンを添加し活性を測定したところ、亜鉛イオンで最も活性の回復が見られた。このことから、Tr_Daac の活性発現には金属イオンが必要であり、亜鉛イオンが活性の発現に最適な金属イオンであるということが判った。

本酵素の溶液中での会合状態をゲル濾過クロマトグラフィーと動的光散乱法を用いて調べたところ、本酵素は溶液中において三量体で存在していることが示唆された。また、立体構造を明らかにするために結晶化条件の探索を行ったところ、ダイヤモンド型結晶の獲得に成功した。得られた結晶で X 線結晶構造解析を行った結果、構造の解明には至らなかったが、六方晶系の空間群を持つことが判った。これは、分子会合の形が結晶の対称性に反映されている可能性を示唆している。

D-amino acid, D-amino acid deacetylase, deacetylase

講演番号：3C04p03
講演日時：3 月 27 日 14:12～ 理学部講義棟 C04 会場

PDXDC1 は未同定のヒトフェニルアラニンデカルボキシラーゼの有力候補である
PDXDC1 is a strong candidate for the unidentified human phenylalanine decarboxylase

○鈴木 大輔[1]、安藤 秀[2]、鈴木 良雄[2]、佐藤 祐介[1,3]、吉澤 史昭[1,3] ([1]東京農工大学大学院連合農学研究科、[2]順天堂大学大学院スポーツ健康科学研究科、[3]宇都宮大学学術院)
○Daisuke SUZUKI[1], Suguru ANDO[2], Yoshio SUZUKI[2], Yusuke SATO[1,3], Fumiaki YOSHIZAWA[1,3] ([1]Tokyo University of Agriculture and Technology, United Graduate School of Agricultural Science, [2]Juntendo University, Graduate School of Health and Sports Science, [3]Utsunomiya University, Academic Association)

【目的】体タンパク質合成は、摂取タンパク質のアミノ酸のバランスの影響を受ける。摂取タンパク質に制限アミノ酸が存在した場合は、合成に利用されなかった不可欠(必須)アミノ酸は分解される。この特性を利用した指標アミノ酸酸化法（IAAO 法）によってヒトの必須アミノ酸必要量が定められている。IAAO 法は不可欠アミノ酸の不均衡に応答したフェニルアラニン（Phe)の脱炭酸反応を測定に利用する。しかし、測定値のばらつきが大きく、改善が求められている。Phe の脱炭酸反応は、ドーパデカルボキシラーゼ(DDC)、またはフェニルアラニンデカルボキシラーゼ（PheDC）が触媒するとされているが、ヒトを含む高等動物では PheDC は同定されていない。しかし、DDC を阻害しても Phe の脱炭酸反応が進行することが動物実験で示されており、PheDC の存在が示唆されている。また、植物は Phe を選択的に脱炭酸・酸化するフェニルアセトアルデヒドシンターゼ（PAAS)をもつが、この酵素のオルソログは高等動物では確認されていない。本研究の最終目的は、ヒト PheDC を同定することである。
【方法】PAAS のアミノ酸配列をクエリー配列として *in silico* スクリーニングし、ピリドキサール依存性デカルボキシラーゼドメイン含有タンパク質 1 (*PDXDC1*)を候補遺伝子とした。ヒト胎児腎由来細胞株 HEK293 とヒト肝癌由来細胞株 HepG2 の PDXDC1 および DDC のタンパク質発現を、ウェスタンブロット法で調べた。さらに HEK293 を用いて、*PDXDC1* を siRNA でノックダウンして Phe 脱炭酸活性を測定した。また、DDC 阻害剤ベンセラジドが Phe 脱炭酸活性に与える影響を調べた。脱炭酸活性は、細胞ホモジネートをピリドキサルリン酸存在下で Phe と反応させ、反応による Phe の減少量と生成されたフェネチルアミンの量を測定することで評価した。PDXDC1 は脱炭素酵素ドメインの下流に機能未知領域をもち、この領域が脱炭素酵素活性調節に関与している可能性も示唆される。pET28 プラスミドに全長、あるいは機能未知領域を欠失させた PDXDC1 を組み込んで、WT_PDXDC1 と⊿C_PDXDC1を作成した。
【結果・考察】HEK293 では PDXDC1、HepG2 では PDXDC1 と DDC のタンパク質発現が確認された。HEK293 で *PDXDC1* をノックダウンすると、脱炭酸活性は 11.3%に抑制されたことから、PDXDC1 の Phe 脱炭酸反応への関与が示唆された。また、ベンセラジドを用いても HepG2 の Phe の脱炭酸反応は進行したことから、Phe の脱炭酸反応を触媒する DDC 以外の酵素が存在することが示唆された。以上から PDXDC1 が Phe 脱炭酸反応を触媒する酵素である可能性が考えられる。WT_PDXDC1 と⊿C_PDXDC1をそれぞれ *E. coli* BL21(DE3)で発現させて、活性を測定した結果も合わせて発表する予定である。

Phenylalanine, PheDC, Decarboxylase

発表責任者：鈴木大輔（s191989v@st.go.tuat.ac.jp）

講演番号：3C04p04
講演日時：3 月 27 日 14:23～ 理学部講義棟 C04 会場

Pseudomonas putida KT2440 株由来 D-リジントランスポーターによる基質認識
Substrate recognition by D-lysine transporter from *Pseudomonas putida* KT2440
○三原 久明、CHAMPAS Sayamol、山内 美咲、戸部 隆太（立命大・生命）
○Hisaaki MIHARA, Sayamol CHAMPAS, Misaki YAMAUCHI, Ryuta TOBE (Coll. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

【背景・目的】
Pseudomonas putida KT2440 は、D-リジン異化代謝系を有しており、D-リジンを唯一の C 源・N 源とする最少培地で良好に生育する。本菌の D-リジン異化代謝系酵素である D-リジンデヒドロゲナーゼ (AmaD) は、D-リジンから Δ^1-ピペリデイン-2-カルボン酸への変換を触媒するフラビン依存性酵素である。本酵素をコードする遺伝子 *amaD* は、隣接する 5 つの遺伝子 (*dlcR*、*dlcA*、*dlcB*、*dlcC*、*dlcE*) とオペロン (*dlc* オペロン) を構成している。DlcABCE は、ABC トランスポーターと相同性を示すことから、D-リジントランスポーターであると予測された。本研究では、本推定 D-リジントランスポーターの基質認識を決定づけると考えられる基質結合タンパク質 DlcA のアミノ酸基質特異性について調べることを目的とした。

【結果・考察】
dlcA 遺伝子を pET21a に挿入し、*Escherichia coli* C43(DE3) 株を宿主として発現させた。生産された His-タグ融合 DlcA をニッケルアフィニティーカラムを用いて精製した。DlcA の基質アミノ酸に対する解離定数 (K_d) をトリプトファン蛍光法によって解析した。その結果、DlcA の D-リジンに対する K_d は 1 μM であり、L-リジン (K_d = 130 μM) よりも著しく高い親和性を D-リジンに対して示した。一方、D-、L-オルニチンに対する DlcA の K_d は、それぞれ、1 μM、7 μM であり、リジンに対するほどの立体選択性を示さなかった。さらに、アルギニンに対する親和性は両異性体ともに低く、かつ同程度であった（D-アルギニン: K_d = 160 μM、L-アルギニン: K_d = 130 μM）。従って、DlcA はリジンの両異性体のみを厳しく識別することができることが示された。DlcA は、塩基性 L-アミノ酸トランスポーターの基質結合タンパク質として立体構造が既知の *Salmonella typhimurium* のリジン・アルギニン・オルニチン結合タンパク質 (LAO) と約 30%のアミノ酸配列一致を示した。DlcA と LAO とのアミノ酸配列比較から、推定基質結合部位で両者に違いが認められたアミノ酸残基に注目し、DlcA を LAO 型に置換した変異型タンパク質 E29D、A87S、I90S を作製した。E29D は、D-、L-リジン両者ともに対して著しく親和性を低下させ、D/L 選択性を失った。A87S の D-リジンに対する K_d は 40 μM に上昇したが、L-リジンに対する K_d は野生型と同等であった。一方、I90S の D-リジンに対する K_d は 40 μM に上昇したが、L-リジンに対する K_d は 30 μM にまで低下した。以上より、E29、A87、I90 はいずれも D-リジン認識にとって重要であることが示唆された。

lysine, transporter, D-amino acid

発表責任者：三原久明（mihara@fc.ritsumei.ac.jp）

講演番号：3C04p05
講演日時：3 月 27 日 14:34～ 理学部講義棟 C04 会場

メチオニン生合成における新規フィードバック制御機構の発見
Discovery of a novel feedback mechanism in methionine biosynthesis
○長谷部 文人（静岡県大・食）
○Fumihito HASEBE (Univ. of Shizuoka)

【目的】

メチオニンは生育に必須なアミノ酸の 1 つであり、タンパク質や *S*-Adenosyl-L-Methionine (SAM) の合成に使用される。ヒトを含む哺乳類はメチオニン生合成経路を持たない一方で、微生物や植物はメチオニン生合成経路を有する。メチオニン生合成機構に関する新たな知見は、メチオニン関連代謝産物の発酵生産や抗菌剤開発の重要な基盤となる。

細菌のメチオニン生合成において、L-Homoserine のアシル化反応は互いに配列相同性を持たない MetA と MetX が各々担う。MetA や MetX は、代謝系の生産物であるメチオニンや SAM によりフィードバック阻害を受ける例が知られている。しかし、種によって MetX はメチオニンや SAM による阻害を受けないという報告もあり、MetX の活性制御機構には不明瞭な所がある。フィードバック阻害は菌体内成分量の調整に重要な役割を果たすことから、低分子による阻害が観測されない MetX では、未知因子を用いた新規な活性制御機構が存在するのではないかと発表者は考えた。

そこで本研究では、*metX* の近傍に保存されて存在する遺伝子/タンパク質に着目し、MetX に対する新規フィードバック制御機構の探索を行った。具体的には緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)が有する *metX* と近傍に存在する遺伝子を対象とした。

【方法と結果】

大腸菌を宿主として、緑膿菌が有する *metX* と近傍に存在する遺伝子の組換えタンパク質を共発現させた。His タグ付加体 MetX と非付加体の近傍タンパク質を Ni カラムに供し、精製したサンプルを SDS-PAGE に供した。その結果、His タグ付加体の MetX と非付加体の近傍タンパク質が共溶出し、MetX と近傍タンパク質が相互作用することを明らかにした。

取得した組換え酵素・タンパク質を用いて MetX が担う反応を阻害剤候補化合物と共にインキュベートし、反応溶液を LC-MS に供して産物である *O*-Succinyl-L-Homoserine を検出した。その結果、ある低分子化合物が反応を阻害することを明らかにした。

現在、対象とするタンパク質の保存残基のアラニン置換体や N/C 末欠損体の作製を行っており、本大会ではその阻害活性や相互作用への影響評価についても発表する予定である。

amino acid, methionine biosynthesis, feedback inhibition

発表責任者：長谷部文人（ufhasebe@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：3C04p07
講演日時：3 月 27 日 15:06～ 理学部講義棟 C04 会場

ヒトリボヌクレアーゼ H2 の Val143 は触媒活性と基質特異性に重要な役割を果たす

Val143 of human ribonuclease H2 plays an important role in determining catalytic activity and substrate specificity

○馬場 美聡[1]、兒島 憲二[1]、西村 拓人[1]、杉浦 拓也[1]、滝田 禎亮[1]、上原 了[2,3]、CROUCH Robert J.[2]、保川 清[1]（[1]京大院・農、[2]NIH・NICHD、[3]立命大・R-GIRO）
○Misato BABA[1], Kenji KOJIMA[1], Takuto NISHIMURA[1], Takuya SUGIURA[1], Teisuke TAKITA[1], Ryo UEHARA[2,3], Robert J. CROUCH[2], Kiyoshi YASUKAWA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]NIH・NICHD, [3]Ritsumeikan Univ.)

【目的】リボヌクレアーゼ H2（RNase H2）は、RNA/DNA ハイブリッドの RNA を加水分解するヘテロ三量体の酵素である。RNase H2 はさらに、二本鎖 DNA に取り込まれた 1 塩基のリボヌクレオチド（R）の 5’末端側のホスホジエステル結合も加水分解する。ヒト RNase H2 と、RNA/DNA ハイブリッドあるいは 1 塩基の R を有する二本鎖 DNA との酵素・基質複合体の立体構造を予測したところ、活性部位に存在する Val143 が、基質の切断されるホスホジエステル結合の 5’側のヌクレオチドの糖と近接していることが認められた。さらに、RNase H2 のアミノ酸配列のアライメントの結果、Val143 は真核生物で保存されていた。本研究では Val143 に飽和変異導入を行い、Val143 の触媒活性と基質特異性における役割を解析した。
【方法】$(His)_6$ が N 末端に付加したヒト RNase H2 の A、B、C サブユニットの遺伝子を大腸菌でポリシストロニックに発現させ、菌体から三量体を精製した。活性測定の基質には、3’-FITC 標識 18 塩基 RNA（5’-gaucugagccugggagcu-3’）とこれに相補的な 5’-Dabcyl 標識 18 塩基 DNA（5’-AGCTCCCAGGCTCAGATC-3’）から成る二本鎖（R18/D18）、あるいは 1 個のリボヌクレオチド（a と表記）を含む 3’-FITC 標識 18 塩基 DNA（5’-GATCTGAGCCTGGGaGCT-3’）と上記 18 塩基 DNA から成る二本鎖（R1/D18）を用いた。反応は pH 8.0、25℃で行い、反応液の 490 nm 励起時の 515 nm の蛍光を連続測定した。
【結果】Val143 に飽和変異導入を行った 19 種類の変異型酵素を大腸菌で発現させ、菌体から精製したところ、V143C と V143M を除く 17 種類で精製酵素が得られた。Val143 をかさ高い疎水性アミノ酸（F, V, I, L, W）または極性アミノ酸（Y）に置換した変異型酵素の R18/D18 切断活性（活性 A）および R1/D18 切断活性（活性 B）は、野生型酵素（WT）の 15−130%であった。一方、Val143 を荷電性アミノ酸（D, E, K, H, R）、疎水性アミノ酸（A, G）あるいは極性アミノ酸（N, P, Q, S, T）に置換した変異型酵素の活性 A および活性 B は、WT の 0.03−20%であった。活性 A に対する活性 B の割合は、WT を 1 とすると、変異型酵素の値は 0.2−5.7 であった。V143Y と V143W の値（それぞれ 5.6 と 5.5）が高かったことから、大きな側鎖を有するアミノ酸は R の 2’-OH と立体障害を起こすことが示唆された。これらのことから、Val143 は触媒活性と基質特異性に必須ではないが重要な役割を担うことが示された。

ribonuclease H2, saturation mutagenesis, catalytic activity and substrate specificity

発表責任者：馬場美聡（baba.misato.34a@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3C04p08
講演日時：3 月 27 日 15:17～ 理学部講義棟 C04 会場

Acidovorax sp. KKS102 株が有する融合酵素 DahX の tRNA 編集活性
tRNA editing activity of fusion enzyme DahX from *Acidovorax* sp. KKS102
○高橋 由紀子[1,2]、中鉢 千尋[1,2]、野々山 翔太[1,2]、佐藤 優花里[1,2]、永田 裕二[1,2] ([1]東北大院、[2]生命科学)
○Yukiko TAKAHASHI[1,2], Chihiro CHUBACHI[1,2], Shota NONOYAMA[1,2], Yukari SATO[1,2], Yuji NAGATA[1,2] ([1]Tohoku Univ., [2]Life science)

【背景と目的】Haloalkane dehalogenase (HLD) は α/β hydrolase superfamily に属し、ハロゲン化アルキルやシクロアルカン、ニトリルなどの様々な有機ハロゲン化合物のハロゲン基をヒドロキシル基へ置換する。当研究室ではビフェニル/ポリ塩化ビフェニル (PCB) 分解細菌 *Acidovorax* sp. KKS102 株ゲノムより HLD の N 末端側に deaminase (DAM) が融合したタンパク質をコードする遺伝子 *dahX* を見出した (佐藤、日本農芸化学会 2017 年度大会) 。本研究では、以下、DahX の DAM を含む N 末端側 (1-164 a.a.) をドメイン A、HLD を含む C 末端側 (165-463 a.a.) をドメイン B とする。ドメイン A は大腸菌の tRNA 編集酵素 (TadA) と最も高い identity (52%) を示し、脱アミノ化活性に必須な触媒残基を保存していた。ドメイン B は α/β hydrolase superfamily 固有の catalytic triad と HLD 特有の halide stabilizing residues を保存していた。これまでの研究で、大腸菌で大量発現し精製した DahX とドメイン B は HLD 活性を有することを示した。本研究では、DahX が融合型タンパク質として存在する生物学的意義を探索するため、 (1) DahX ホモログを有する細菌及びそのアミノ酸配列の特徴の解析と、 (2) tRNA 編集活性測定方法を確立し、本活性に必須な DahX のアミノ酸領域を同定し、当該活性に融合タンパク質であることが影響するか検討することを目的とした。
【方法と結果】*Acidovorax* 属が含まれる *Burkholderiales* 目に属する細菌株ゲノム配列に対する相同性検索を行った結果、DahX 型の融合タンパク質ホモログは KKS102 株が属するコマモナス科の細菌ゲノムにのみ検出された。これら全ての DahX ホモログのドメイン A は脱アミノ化活性に必須な触媒残基を保存していた。一方、ドメイン B は全て α/β hydrolase superfamily に属するが、halide stabilizing residues の保存性は低かった。すなわち、コマモナス科の DahX ホモログの機能に tRNA 編集活性は必須であるが、ドメイン B は α/β hydrolase superfamily に属する酵素であればよく、HLD 活性は必須ではない可能性が高い。一方、*in vitro* 転写系で合成した KKS102 株の $tRNA^{Arg}_A_{34}CG$ と DahX を反応させ、反応産物から合成した cDNA の塩基配列をサンガーシケンス法により決定した。本実験系において、アデニンが tRNA 編集酵素活性でイノシンに変換されるとグアニンとして読まれるが、34 位のアデニンは DahX の濃度依存的にグアニンに置換されていた。以上の結果から、DahX は 34 位のアデニンをイノシンへ編集する tRNA 編集活性を有すると結論した。現在、DahX のドメイン A が実際に tRNA 編集活性に必須であるか、また当該活性にドメイン B が影響を及ぼすか検討を進めている。

tRNA editing, dehalogenase, deaminase

講演番号：3C04p09
講演日時：3 月 27 日 15:28～ 理学部講義棟 C04 会場

抗菌薬開発に資する *Porphyromonas gingivalis* 由来 Dipeptidyl peptidase 11 の構造解析と阻害化合物探索

Structural analysis and inhibitor discovery of Dipeptidyl peptidase 11 from *Porphyromonas gingivalis* for antibiotics development

○中村 彰宏[1]、阪本 泰光[2]、鈴木 義之[3,4]、渡邉 友里江[5]、關谷 瑞樹[2]、六本木 沙織[2]、櫛引 千里[2]、飯塚 一平[2]、谷 修[6]、阪下 日登志[6]、伊中 浩治[7]、田仲 広明[8]、山田 貢[9]、大田 和敬[9]、本間 宣行[4]、志田 洋介[4]、中西 真弓[2]、野中 孝昌[2]、合田 浩明[5]、田中 信忠[5,10]、小笠原 渉[1,4]([1]長岡技科大・工・技学イノベ、[2]岩手医大・薬、[3]長岡高専、[4]長岡技科大・工・生機、[5]昭和大・薬、[6]産総研・バイオメディカル、[7](株)丸和栄養食品、[8](株)コンフォーカルサイエンス、[9]JAXA、[10]昭和大・分子分析センター)

○Akihiro NAKAMURA[1], Yasumitsu SAKAMOTO[2], Yoshiyuki SUZUKI[3,4], Yurie WATANABE[5], Mizuki SEKIYA[2], Saori ROPPONGI[2], Chisato KUSHIBIKI[2], Ippei IIZUKA[2], Osamu TANI[6], Hitoshi SAKASHITA[6], Koji INAKA[7], Hiroaki TANAKA[8], Mitsugu YAMADA[9], Kazunori OHTA[9], Nobuyuki HONMA[4], Yosuke SHIDA[4], Mayumi NAKANISHI[2], Takamasa NONAKA[2], Hiroaki GOUDA[5], Nobutada TANAKA[5,10], Wataru OGASAWARA[1,4] ([1]Dept. of sci. of tech. innv., Sch. of engr., Nagaoka Univ. of Tech., [2]Sch. of pharm., Iwate Med. Univ., [3]NIT, Nagaoka College, [4]Dept. of bioengr., Sch. of engr., Nagaoka Univ. of Tech., [5]Sch. of pharm., Showa Univ., [6]BMRI, AIST, [7]Maruwa Foods and Biosciences Inc., [8]Confocal Science Inc., [9]JAXA, [10]Center for Molecular Analysis, Showa Univ.)

歯周病は全世界で最も感染者数の多い感染症の一つである。2017 年において世界の歯周病有病者数は約 8 億人にのぼり、心臓病やアルツハイマー病などの全身疾患への関与が報告されている。糖非発酵性嫌気性グラム陰性細菌の *Porphyromonas gingivalis* は歯周病の主な原因菌とされているが、特異的抗菌薬は未だ存在しない。*P. gingivalis* 由来 Dipeptidyl peptidase 11 (PgDPP11) は Family S46 に属するセリンペプチダーゼである。S46 ペプチダーゼは *P. gingivalis* の様な糖非発酵性グラム陰性細菌の生育に重要な酵素であり、ヒトに存在しないことから新規抗菌薬の標的因子として期待されている。しかしながら、今日まで S46 ペプチダーゼの特異的阻害剤は開発されていない。これまでに、我々の研究グループは PgDPP11 の結晶構造と基質認識メカニズムを報告している[1]。本研究では宇宙空間で得られた PgDPP11 の高品質結晶から結晶構造を高分解能で決定し、ドッキングシミュレーションを介し、世界で初めてとなる S46 ペプチダーゼの非ペプチド系阻害化合物を見出した[2]。PgDPP11 の結晶構造は S1 サブサイトにクエン酸イオンが結合した状態で得られた。クエン酸イオンは PgDPP11 の基質である酸性アミノ酸の結合を模倣していたため、クエン酸イオンを元にファーマコフォアをデザインし、*in silico* 阻害剤スクリーニングを実施した。約 400 万の市販化合物を含むライブラリーから選抜された 13 の候補化合物を用いて PgDPP11 に対する競合阻害試験を実施した結果、PgDPP11 に対して 8.45 μM の阻害定数 (K_i) を有する非ペプチド低分子化合物 SH-5 が得られた。SH-5 の PgDPP11 への結合様式は共結晶構造解析により確認された。さらに、SH-5 およびその親油性類似化合物は大腸菌の生育は阻害せず、*P. gingivalis* の成長に対して用量依存的な阻害効果を示した。また、SH-5 は他の病原性細菌由来 S46 ペプチダーゼに対しても阻害活性を有することが実証された。SH-5 およびその親油性類似化合物は S46 ペプチダーゼの選択的阻害剤開発のためのリード化合物として期待される。

1. Sakamoto, Y. *et al. Sci. Rep.* **5**, 11151 (2015).
2. Sakamoto, Y. *et al. Sci. Rep.* **9**, 13587 (2019).

Dipeptidyl peptidase, Substrate recognition, Peptidase inhibitor

発表責任者：中村彰宏（s131073@stn.nagaokaut.ac.jp）

講演番号：3C04p10
講演日時：3 月 27 日 15:39～ 理学部講義棟 C04 会場

担子菌酵母フェニルアラニンアンモニアリアーゼと阻害剤 Z302 との相互作用に関する熱力学的解析と結晶構造解析

A thermodynamic and crystallographic study of yeast phenylalanine ammonia-lyase and novel inhibitor Z302

○中島 崇[1]、山田 直隆[1]、吉村 昂大[1]、姚 閔[2]、沼田 倫征[1]、石野 良純[1] ([1]九州大農、[2]北海道大学先端生命)
○Takashi NAKASHIMA[1], Naotaka YAMADA[1], Takahiro YOSHIMURA[1], Min Yao[2], Tomoyuki NUMATA[1], Yoshizumi ISHINO[1] ([1]Kyusyu Univ., [2]Hokkaido Univ.)

【目的】Phenylalanine ammonia-lyase（以下 PAL）は、植物、酵母および細菌において見出されており、L-Phenylalanine (L-Phe) を脱アンモニアにより *trans*-桂皮酸 (*trans*-cinnamic acid ; *t*-CA) の生成を触媒する。植物においてはシキミ酸経路の代謝物である L-フェニルアラニンに由来するベンゼン環 (C6) に直鎖状プロパン (C3) が結合した、植物の代表的な二次代謝産物であるフェニルプロパノイド化合物とその誘導体の生合成経路における律速酵素としての役割を果たしている。したがって、PAL の阻害剤は除草剤や農作物のポリフェノール合成やリグニン化を抑える生育調整剤としての展開が期待されている。本研究では PAL 阻害剤であるアミノオキシ酢酸 (AOA) 関連化合物の阻害作用機構の解明を目的として、AOA の 2,5-ジクロロアニリド体である *N*-(aminooxy) acetyl-2,5- dichloroaniline (Z302) と担子菌酵母 *Rhodosporidium toruloides* の組み換え PAL (*Rt*PAL) との相互作用を熱力学的解析と結晶構造から明らかにする。

【方法】
担子菌酵母 *Rhodosporidium toruloides* の N 末端ヒスチジンタグ付加の組み換え *Rt*PAL）を大腸菌の発現系を用いて調製し、阻害活性および示差走査熱量 (DSC) を測定した。阻害活性は基質 L-Phe を添加する前に Z302 とプレインキュベートする時間を変えて測定した。DSC のリガンドとして基質である L-Phe と生成物である *t*-CA、AOA 関連化合物の阻害剤 aminooxy-3-phenylpropionic acid（AOPP）および Z302 について測定した。結晶構造解析を目的として、Z302 と *Rt*PAL を混合しプレインキュベートしたのち結晶化条件を探索したところ、初期スクリーニングで結晶が見られた。得られた結晶を種結晶にして成長させた結晶について X 線回折実験を放射光実験施設で行った。

【結果】 Z302 と *Rt*PAL は混合してプレインキュベートする時間によって強く阻害活性が増強される不可逆的な阻害作用を示し、Z302 濃度が高いほど短い時間で阻害活性が増強された。*Rt*PAL の DSC の結果、*Rt*PAL の *T*m が 67℃付近で、可逆的阻害剤 AOPP や生成物 *t*-CA の *T*m はそれぞれ 71℃と 73℃に上昇した。さらに Z302 存在下では PAL と Z302 のモル比が 1:1 となる 7.5-10 μM までは *T*m が 72℃までシフトをして、さらに濃度を上げていくと 78℃へとシフトした。このことから、Z302 は可逆的阻害剤 AOPP や生成物 *t*-CA よりも強く *Rt*PAL に結合していることが示唆された。得られた *Rt*PAL と Z302 共結晶は 2.5Å 分解能の X 線回折データが得られ、構造の精密化を進めている。

enzyme, thermodynamics, crystal structure

講演番号：3C04p11
講演日時：3 月 27 日 15:50～ 理学部講義棟 C04 会場

アミノグリコシド 7”-リン酸基転移酵素-Ia による ハイグロマイシン B 認識機構の立体構造解析

Structural analysis of the substrate recognition of aminoglycoside 7”-phosphotransferase-Ia from *Streptomyces hygroscopicus*

○竹野谷 美穂子[1]、島村 達郎[2]、山中 隆司[1]、足立 祐也[1]、伊藤 晋作[1]、佐々木 康幸[1]、中村 顕[3,4]、矢嶋 俊介[1] ([1]東農大バイオ、[2]京大院医、[3]筑波大生命環境、[4]筑波大 MiCS)
○mihoko TAKENOYA[1], tatsuro SHIMAMURA[2], ryuji YAMANAKA[1], yuya ADACHI[1], shinsaku ITO[1], yasuyuki SASAKI[1], akira NAKAMURA[3,4], shunsuke YAJIMA[1] ([1]Tokyo Univ. of Agric., [2]Kyoto Univ., [3]Tsukuba Univ., [4]Tsukuba Univ. MiCS)

【背景･目的】

ハイグロマイシン B (hygB) は、16S rRNA を標的とするアミノグリコシド系抗生物質であり、分子生物学実験試薬として広く用いられている。hygB は、4 位または 7”位の水酸基がリン酸化されることで薬剤活性が失われる。これまでに 4 位の水酸基をリン酸化する酵素である *Escherichia coli* 由来 Aminoglycoside 4-phosphotransferase-Ia (APH(4)-Ia) について、ATP アナログである 5’-adenylyl-imidodiphosphate (AMP-PNP) と hygB との 3 者複合体結晶構造を我々は報告している。今回、7”位に対するリン酸基転移酵素である *Streptomyces hygroscopicus* 由来 Aminoglycoside 7”-phosphotransferase-Ia (APH(7”)-Ia) の結晶構造解析を行うことで、APH (4)-Ia との基質認識機構の差異を比較することを目指した。APH(7”)-Ia と APH(4)-Ia はどちらも hygB を基質とするものの、アミノ酸配列の相同性は低く、分子置換法により解を得ることができなかった。そこで、セレノメチオニン置換体 APH(7”)-Ia を用い AMP-PNP、hygB との 3 者複合体結晶構造解析を試みた。

【方法・結果】

Se-SAD 法により位相決定を行い分解能 2.4 Å にて結晶構造を解くことに成功した。3 者複合体 APH(7”)-Ia の結晶構造の取得を試みたが AMP-PNP 結合部位には、結晶化試薬であった CHES が観察された。APH(7”)-Ia、hygB、CHES の 3 者複合体全体構造は、APH(7”)-Ia と APH (4)-Ia を含む APH ファミリー酵素と同様の N-lobe と C-lobe の 2 つのドメインからなる構造であった。APH ファミリーや真核生物の蛋白質リン酸化酵素でも保存されている Brenner motif (HxDxxxxN) で APH(7”)-Ia と APH(4)-Ia の立体構造を重ね合わせると、全体的によく重なった。このとき hygB のリン酸基転移部位である 7”位または 4 位の水酸基は、それぞれ Brenner motif 中に保存されている触媒残基のアスパラギン酸の近傍に位置した。一方で hygB 分子の配置は、C-lobe 上においてアスパラギン酸残基から、APH(7”)-Ia と APH (4)-Ia でそれぞれ反対方向に伸びていた。

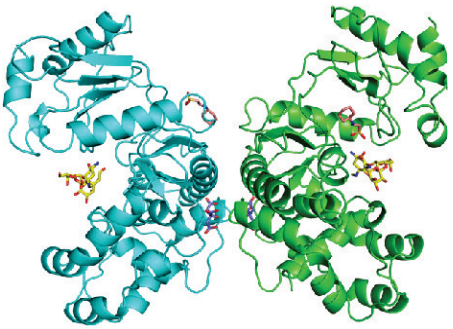


図 1. APH(7”)-Ia の全体構造

Hygromycin B, aminoglycoside phophotransferase, protein crystal structure

講演番号：3C04p13
講演日時：3 月 27 日 16:21～ 理学部講義棟 C04 会場

転写調節因子 NsrR のモリブデン補因子生合成における役割

Role of the transcriptional regulator NsrR in molybdenum cofactor biosynthesis

○藤田 大樹、西田 亮、戸部 隆太、三原 久明（立命大・生命）
○Daiki FUJITA, Ryou NISHIDA, Ryuuta TOBE, Hisaaki MIHARA (Ritsumeikan Univ.)

【目的】グラム陰性細菌の嫌気呼吸に関わる膜結合型酵素複合体である硝酸還元酵素、ギ酸脱水素酵素 (FDH) などはいずれも鉄硫黄クラスター (Fe/S) とモリブデン補因子 (Moco) を有し、complex iron-sulfur molybdoenzyme (CISM) ファミリーに分類される。我々はこれまでに、CISM ファミリーに属する大腸菌 YnfEFGH 複合体が、セレン酸・テルル酸還元酵素であることを見出した。また、本菌のセレン酸・テルル酸還元能欠失株として 6 株 (Δ*ynbA*、Δ*ydaS*、Δ*yjbB*、Δ*yidH*、Δ*moeA*、Δ*nsrR*) をスクリーニングにより選抜した。これら遺伝子欠損株は、いずれも FDH 活性を示さないことから、CISM ファミリー酵素に共通する Fe/S および Moco の生合成、これら補因子のアポ酵素への挿入（成熟）過程、酵素複合体の膜輸送などに支障をきたしていると考えられる。実際に、*moeA* は Moco 生合成においてモリブデン元素の導入に関与することが知られているが、*moeA* 以外の 5 遺伝子 (*ynbA*、*ydaS*、*yjbB*、*yidH*、*nsrR*) の CISM ファミリー酵素への関与については不明である。本研究では、5 遺伝子の内、一酸化窒素 (NO) によって制御される転写調節因子 NsrR をコードする *nsrR* に注目し、その CISM ファミリー酵素との関連について明らかにすることを目的とした

【結果】上記 6 遺伝子欠損株の可溶性膜画分を Native-PAGE で分離し、ホルマザン色素生成を利用したヒドロゲナーゼ (Hyd-1、2、3) 活性染色を行なった。いずれの株においても Fe/S のみを有する Hyd-1、2 の活性は認められたが、FDH と複合体を形成する Hyd-3 の活性は認められなかった。従って、これら欠損遺伝子は、Fe/S 形成には必須ではなく、Moco の生合成あるいは複合体の膜輸送などに関与すると考えられた。次に、5 つの遺伝子 (*ydaS*、*ynbA*、*yjbB*、*yidH*、*moeA*) の各々一つを有するプラスミドをΔ*nsrR* 株に導入し、セレン酸またはテルル酸を含む培地で培養した。その結果、*moeA* を導入した株 (Δ*nsrR*/*moeA*$^{+}$) において、セレン酸・テルル酸還元活性の回復が見られたことから、NsrR による *moeA* の転写制御が示唆された。ゲルシフトアッセイ、レポーターアッセイにより、*moeA* 上流に NsrR 結合サイトが存在することが明らかとなった。また、RT-qPCR の結果、Δ*nsrR* において *moeA* の転写量が減少していたことから、NsrR は *moeA* のアクティベーターとして機能すると考えられた。

molybdenum cofactor, iron-sulfur cluster, transcriptional regulator

発表責任者：三原久明（mihara@fc.ritsumei.ac.jp）

講演番号：3C04p14
講演日時：3 月 27 日 16:32～ 理学部講義棟 C04 会場

新規 8*R*-リポキシゲナーゼ同定とプロテクチン D1 酵素合成への応用

Identification of a novel 8*R*-lipoxygenase and its application synthesis of protectin D1.

○結城 彩花[1]、植村 亜衣子[1]、箱崎 真友佳[1]、矢野 明[1]、馬場 直道[2]、三澤 嘉久[2]、安部 真人[3]、山田 秀俊[1]([1]岩手生工研、[2]備前化成株式会社、[3]愛媛大学大学院農学研究科)
○ Sayaka YUKI[1], Aiko UEMURA[1], Mayuka HAKOZAKI[1], Akira YANO[1], Naomichi BABA[2], Yoshihisa MISAWA[2], Masato ABE[3], Hidetoshi YAMADA[1] ([1]IBRC, [2]Bizen Chemical Co., Ltd, [3]Ehime Univ.)

【背景】イサダ（ツノナシオキアミ）は 8-ヒドロキシエイコサペンタエン酸（8-HEPE)、8-ヒドロキシエイコサテトラエン酸（8-HETE)、10-ヒドロキシドコサヘキサエン酸（10-HDHA）を含有する。これまでに我々はイサダのリポキシゲナーゼ（PK-LOX1；Pacific Krill Lipoxygenase 1）遺伝子を同定し、昆虫細胞での LOX 活性評価系を構築することで、PK-LOX1 がアラキドン酸（ARA)、エイコサペンタエン酸（EPA)、ドコサヘキサエン酸（DHA）をそれぞれ 8-HETE、8-HEPE、10-HDHA に代謝することを示した。然しながら、立体選択性などの PK-LOX1 酵素特性は不明であった。

【目的】PK-LOX1 の酵素特性解明を目的として研究を行った。

【方法】PK-LOX1 組換えタンパク質は昆虫細胞（Sf9 cell）とバキュロウイルスを組み合わせた Bac-to-Bac システムを用いて発現させた。コントロールとして GFP、比較検討として Alox8（マウス 8*S*-リポキシゲナーゼ）を設けた。酵素反応はバキュロウイルス感染 2 日後の Sf9 細胞と脂肪酸を 200_mM Tris-HCl（pH_7.4）Buffer 中で反応させることで実施した。立体選択性、酵素特性（pH、温度、反応時間)、基質特異性について検討し、反応生成物は高速液体クロマトグラフ質量分析装置（LC/Q-TOF-MS）にて解析した。

さらに、創薬シーズであるが DHA の 10 位炭素 *R* 配置特異的酸化酵素が見出されていなかったために酵素合成が達成されていなかった、プロテクチン D1（10*R*, 17*S*-dihydroxyDHA）の PK-LOX1 を用いた酵素合成の可能性について検討した。

【結果と考察】PK-LOX1 の立体選択性解析によって、PK-LOX1 が ARA、EPA、DHA の *R* 配置特異的酸化酵素（8*R*-LOX）であることを明らかにした。これまでに ARA の 8 位酸化酵素として Alox8 が報告されているが、Alox8 は 8*S*-LOX であり 8*R*-LOX は新規である。さらに、Alox8 は EPA よりも ARA に対して高い活性を有するが、PK-LOX1 は EPA に高い活性を示した。また、PK-LOX1 はステアリドン酸、γ-リノレン酸、ドコサペンタエン酸を基質とした場合も水酸化脂肪酸を生成したことから、メチル末端から 12 番目の位置に二重結合を有する脂肪酸の酸化活性を有することが明らかとなった。

PK-LOX1 の、DHA に対して 10*R*-LOX として作用する特性を活かし、17*S*-HDHA を基質として炎症収束性プロテクチン D シリーズの一つを酵素的に合成できることを示した。

多くの酵素合成に用いられているリポキシゲナーゼは植物由来とされているが、脂肪酸に *S* 配置で水酸基を導入するため *R* 配置となる水酸化脂肪酸の酵素合成は難しいとされてきた。本研究により明らかにした PK-LOX1 の特性を活かし、より多くの *R* 配置水酸化物の酵素合成などに利用されるなど、PK-LOX1 の活用の幅が広がることを望んでいる。

8*R*-lipoxygenase, 8*R*-HEPE, protectin D1

発表責任者：山田秀俊（hyamada@ibrc.or.jp）

講演番号：3C04p15
講演日時：3 月 27 日 16:43～ 理学部講義棟 C04 会場

Methylobacterium sp. FD1 株由来ホルムアルデヒドジスムターゼ（Fdm3）の特性解析
Characterization of formaldehyde dismutase (Fdm3) of *Methylobacterium* sp. FD1
○井元 誠志、戸津井 規希、岸本 昇、米光 裕（和歌山高専）
○Seiji IMOTO, Noriki TOTSUI, Noboru KISHIMOTO, Hiroshi YONEMITSU (Nat. Inst. Technol. Wakayama Coll.)

【背景と目的】

ホルムアルデヒドジスムターゼ（Fdm)(EC 1.2.98.1）は、2 分子のホルムアルデヒド（FA）を、それぞれ 1 分子のギ酸とメタノールに酸化還元する酵素である。Fdm は、補酵素 NAD(H) の添加なしに、高濃度ホルムアルデヒド（FA）を効率よく分解できることから、FA 分解技術への応用が期待される。当研究室では、既に FA 分解菌 *Methylobacterium* sp. FD1 株から 2 種の Fdm 遺伝子（*fdm1* および *fdm2*）をクローニングし、大腸菌発現系を用いて生産した Fdm1 および Fdm2 を精製し、それらの特性を明らかにした [1,2]。最近、FD1 株の全ゲノム解析を行ったところ、*fdm1*, *2* 以外に Fdm 遺伝子（*fdm3*）の存在が明らかになった（未発表)。本研究では、*fdm3* をクローニングし、大腸菌発現系を用いて生産した Fdm3 を精製し、特性解析を行ったので報告する。

【方法および結果】

Fdm3 遺伝子（His タグ付き）は FD1 株ゲノム DNA を鋳型に PCR 増幅し、Expresso™ Rhamnose Cloning and Expression System (Lucigen) を用いて大腸菌に導入した。この遺伝子組換え大腸菌の細胞抽出液からの Fdm3 の精製は、金属（Co^{2+}）アフィニティクロマトグラフィーTALON® Metal Affinity Resin (Clontech) を用いて行った。その結果、Fdm3 を高純度に精製することができた。

精製した Fdm3 の至適 pH、至適温度、FA に対するミカエリス定数（*Km*）および最大反応速度（*Vmax*）を調べた結果、至適 pH は 6.0 付近、至適温度は 30 ℃付近であった。なお、Fdm3 は pH3.0 でも至適 pH における活性の 80%を保っており、Fdm1,2 には見られない耐酸性があり、興味深い。また、*Km* は 410 mM で *Vmax* は 3,030 μmol-FA/(min・mg) であった。Fdm3 の *Km* は Fdm1, 2 と同様に FA に対する MIC（最小生育阻止濃度)(約 33 mM) を大きく上回っていた。Fdm3 の構造に関する特性としては、酵素に結合している補酵素は NAD(H) で、四次構造は 4 量体とわかり、Fdm1, 2 と同様であった。現在、Fdm3 の基質特異性や結合金属等を調べている。

1）井元誠志 他，日本農芸化学会 2019 年度大会 講演要旨集，3E2a07 (2019).
2）井元誠志 他，第 71 回 日本生物工学会大会 講演要旨集，3Ja08 (2019).

Methylobacterium, formaldehyde dismutase

発表責任者：米光裕（yonemitsu@wakayama-nct.ac.jp）

講演番号：3C04p16
講演日時：3 月 27 日 16:54～ 理学部講義棟 C04 会場

好気性光合成細菌 *Roseobacter denitrificans* における cyanide insensitive oxidase の生理的機能
Physiological roles of cyanide insensitive oxidase in *Roseobacter denitrificans*

○吉田 昇平[1]、山本 麻衣子[1]、亀谷 将史[1,2]、石井 正治[1,2]、新井 博之[1,2]([1]東大院・農生科、[2]東京大学微生物科学イノベーション連携研究機構)
○Shohei YOSHIDA[1], Maiko YAMAMOTO[1], Masafumi KAMEYA[1,2], Masaharu ISHII[1,2], Hiroyuki ARAI[1,2] ([1]Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo, [2]CRIIM)

【背景・目的】

Cyanide insensitive oxidase(CIO)は、Proteobacteria 門に属するバクテリアで広く保存されている、好気呼吸鎖における末端酸化酵素の 1 つである。CIO は *bd* family の subfamily に属しており、多くのバクテリアにおいてシアン化物イオン(CN^-)存在下でのエネルギー生産に寄与していることが知られている。その他にも CIO は、銅欠乏時や低 pH 条件、定常期で発現が上昇することが知られており、これらの条件で生育に寄与していると考えられている。

酸素非発生型好気性光合成細菌 *Roseobacter denitrificans* OCh114 株も CIO の構造遺伝子である *cioAB* を持っているが、OCh114 株の CIO が他のバクテリアと同様の機能を有しているかどうかはわかっていない。本研究では、OCh114 株が持つ CIO の生理的機能を明らかにし、様々なバクテリアの持つ CIO に関する知見を深めることを目的とした。

【方法・結果】

(1) OCh114 株の *cioAB* 破壊株(*Δcio*)を作製し、野生株と *Δcio* で CN^- 存在条件下での生育試験を行った。その結果、*Δcio* は CN^- に対する感受性が高いことがわかった。(2) 次に低温条件下で両株の生育試験を行った。その結果、低温条件下で *Δcio* の生育が遅れることがわかった。(3) qRT-PCR によって、低温条件と至適生育温度条件下での *cioB* の発現量を比較したところ、低温条件下で *cioB* の発現が上昇することがわかった。(4) 低温条件下では、好気呼吸鎖において活性酸素種(ROS)が発生しやすいことが一般的に知られているので、細胞内 ROS の定量を両株で行った。その結果、*Δcio* の細胞内 ROS 量が上昇することがわかった。(5) これを受けて、ROS 発生剤であるメチルビオロゲンを添加した条件でも両株の生育試験を行ったところ、*Δcio* の生育が遅れた。(6) 光合成における光酸化ストレスの原因も ROS であることが知られているので、白色光照射条件での生育試験も行った。その結果、白色光照射条件では *Δcio* の生育が阻害されることがわかった。以上のことから OCh114 株の CIO は、好気呼吸鎖における過還元状態の解消に寄与していることが示唆された。

cyanide insensitive oxidase, aerobic photosynthetic bacteria, reactive oxygen species

発表責任者：吉田昇平（yoshida-shohei793@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3C04p17
講演日時：3 月 27 日 17:05～ 理学部講義棟 C04 会場

白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来の Class 3 に属するシトクロム P450 の機能解析
Biochemical characterization of self-sufficient cytochrome P450s from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*

○森 玲香、ワイズ 里沙、酒井 杏匠、志水 元亨、加藤 雅士 (名城大学)
○Reini MORI, Lisa WISE, Kiyota SAKAI, Motoyuki SHIMIZU, Masashi KATO (Meijo Univ)

[背景・目的]

これまでに白色腐朽菌である *Phanerochaete chrysosporium* 由来のシトクロム P450（以下 P450 と略記）が芳香族化合物や脂肪酸など様々な化合物を水酸化することが報告されている。*P. chrysosporium* のゲノム中には 154 種の P450 遺伝子がコードされており、この中で Class 3 に属する P450-P450 レダクターゼ融合タンパク質遺伝子は 7 つ（CYP505D1 ~ CYP505D7）存在する。Class 3 P450 の機能については枯草菌 *Bacillus megaterium* 由来の P450BM-3（CYP102A1）や糸状菌 *Fusarium oxysporum* 由来の P450foxy（CYP505A1）について詳細に研究がなされており、飽和脂肪酸の ω-1 ~ ω-3 位を水酸化することが明らかになっている。本研究では、この Class 3 に属する P450 の機能を解析した。

[方法・結果]

P. chrysosporium の培養液中に脂肪酸であるラウリン酸を添加したのち各 CYP505 の転写量を qRT-PCR で定量したところ、 CYP505D6（以下 D6 と略記）の転写量が最も増加した。そこで大腸菌を用いて D6 のリコンビナントタンパク質を調製し、CO 差スペクトルを測定したところ 450 nm 付近に吸収極大を示した。この D6 を各炭素鎖長 9 ~ 18（C9 ~ C18）の脂肪酸・脂肪アルコールと反応させその反応生成物を GC-MS にて同定したところ、1-ドデカノールを除いた C9 ~ C15 の脂肪酸・脂肪アルコールの ω-1 ~ ω-6 位を、1-ドデカノールの ω-1 ~ ω-7 位を水酸化し、広い位置選択性が示された。この広い位置選択性の理由を解明するため D6 と BM-3 のアミノ酸配列を比較したところ、BM-3 において基質との結合に重要な役割を果たすことが報告されているアミノ酸のうち Y51 が D6 では V であった。さらに BM-3 の構造モデリング解析から、活性部位の入り口付近に存在している Y51 を V に置換すると活性部位の入り口が広くなることが推定され、これが広い位置選択性の原因であると予想した。そこで、D6 の V51Y 変異型酵素と BM-3 の Y51V 変異型酵素を調製し、それぞれラウリン酸と反応させたところ、D6 の V51Y 変異型酵素では WT に比べて ω-4 ~ ω-6 位の水酸化脂肪酸が減少した。一方、BM-3 の Y51V 変異型酵素では野生型 BM-3 では生成されなかった ω-4 ~ ω-7 位の水酸化脂肪酸が新たに生成された。これらのことから、D6 の広い位置選択性と基質特異性には V51 が重要であることを証明した。[1)]

さらに qRT-PCR において 2 番目に転写量が多かった CYP505D4（以下 D4 と略記）を D6 と同様の方法で調製したのち、ラウリン酸と反応させその反応生成物を GC-MS を用いて同定したところ、ラウリン酸の ω-2 ~ ω-8 位を水酸化したことから D4 はさらに広い位置選択性を有することが示された。そこで D4 と BM-3 のアミノ酸配列を比較したところ、BM-3 において基質との結合に重要な役割を果たすアミノ酸のうち Y51 と F87 が D4 ではそれぞれ V であった。現在、変異型酵素を調製しこれらアミノ酸の役割を明らかにするとともに、D4 がリグニン分解産物などを基質にするか検討している。

1)Sakai K *et. al.,* (2018) Appl Environ Microbiol, 84, e01091-18.

Phanerochaete chrysosporium, Class 3 P450, CYP505D

講演番号：4A01a03
講演日時：3 月 28 日 09:52～ センター2 号館 A01 会場

α-トコトリエノールが I-10 細胞のテストステロン分泌に及ぼす影響

Effects of α-tocotrienol on testosterone secretion of I-10 cells

○寺田 直史、加藤 英介（北大院農）
○Naofumi TERADA, Eisuke KATO (Graduate School of Agriculture, Hokkaido Univ.)

【背景・目的】テストステロンは、多くの生理機能を有する男性ホルモンである。体内のテストステロン量は、加齢に伴い低下して筋力や認知機能の低下、性機能不全など様々な異常を引き起こす。こうした症状は、加齢男性性腺機能低下（LOH）症候群とよばれて QOL の低下につながることから、高齢化社会の対策課題の一つとなっている。また近年ではストレスなど生活環境に起因する 30 代、40 代男性での LOH 症候群の発症も問題となっており、その対処法が求められている。男性の場合、テストステロンは主に精巣のライディッヒ細胞で合成、分泌される。したがって、ライディッヒ細胞によるテストステロン分泌を促進させることで、LOH 症候群の治療や予防が可能と考えられる。我々は米ぬかに含まれるビタミン E の一種α-トコトリエノール（α-T3）が、ライディッヒ細胞モデルである I-10 細胞に作用してテストステロンの分泌を促進させることを見出している。本研究では、α-T3 によるテストステロン分泌促進機構の解析を行った。

【方法】I-10 細胞を被験物質で一定時間刺激した後、培養上清を回収して I-10 細胞が分泌したステロイドホルモン量を ELISA により定量した。また、刺激後の細胞から Total RNA を抽出してテストステロン生合成関連遺伝子について、定量 RT-qPCR 法によって解析を行った。

【結果】α-T3 添加による I-10 細胞のテストステロン生合成遺伝子発現量の変化を調べたところ、テストステロン生合成経路の律速段階を担う StAR（ステロイド産生急性調節タンパク質）の mRNA 発現量を増加させることがわかった。そこで StAR の発現及び活性化を担う各種タンパク質の阻害剤を用いてステロイドホルモンの分泌に与える影響を調べた結果、α-T3 は cAMP/PKA 経路を介して StAR の発現を増加させるとともに、EGFR（上皮成長因子受容体）を介した MAPK の活性化により StAR をリン酸化することで、ステロイドホルモンの分泌量を増加させていることを明らかとした。しかしながら、α-T3 が直接標的とするタンパク質については依然として不明であるため、現在 I-10 細胞に発現する各種受容体の関与について検討を行っている。

testosterone, α-tocotrienol, I-10 cells

講演番号：4A01a04
講演日時：3 月 28 日 10:03～ センター2 号館 A01 会場

トコトリエノール高含有米「オオナリ」給与豚肉の特性評価
Quality characteristics of pork loin fed with tocotrienol enriched brown rice
○木村 俊之[1]、中島 郁世[2]、山口 弘道[3]、草 佳那子[4]、八日市屋 敏之[5]、佐々木 啓介[2]、斎藤 真二[5]([1]農研機構食品研究部門、[2]農研機構畜産研究部門、[3]農研機構中央農業研究センター、[4]農研機構本部、[5]フリーデン （株））
○ Toshiyuki KIMURA[1], Ikuyo NAKAJIMA[2], Hiromichi YAMAGUCHI[3], Kanako KUSA[4], Toshiyuki YOUKAICHIYA[5], Keisuke SASAKI[2], Shinji SAITO[5] ([1]NFRI, NARO, [2]NILGS, NARO, [3]CRAC, NARO, [4]HQ, NARO, [5]Frieden Co., Ltd.)

【目的】「オオナリ」は 2015 年に農研機構が育成した飼料用米に向く多収のインド型多収 の飼料用米品種であり、発表者らは「オオナリ」にビタミン E、とくにγトコトリエノールが多いことを見出している[1)]。この「オオナリ」は農林水産省の多収性専用品種に指定され、その普及が期待されているが、家畜が摂取した場合の生産物の特性評価は十分にはされていない。そこで本発表では「オオナリ」を飼料として豚に給与した際の豚肉の特性の評価を目的とした。

【方法】2017 年に群馬県みどり市にて栽培、収穫した「オオナリ」を使用した。生後 110 日の豚（三元交雑種）55 頭を 2 群に分け、各群はトウモロコシ主体の慣行飼料（「オオナリ」0%群）とトウモロコシに対し「オオナリ」玄米を全体の 45%まで代替した（「オオナリ」45%群）飼料で 2018 年 7 月下旬より約 2 か月間肥育した。と畜後冷蔵し、翌日部分肉カット、4 日後にロース部分肉から胸最長筋を取り出し、保存試験に供試した。保存試験として胸最長筋を切り出し、スーパーでの販売形態を模して包装し、LED 照明下 4℃条件下でと畜 10 日後まで保存し、肉色、肉汁損失、TBARS 値を経時的に評価した。また、成分分析用にと畜 4 日後に切り分けたロース部（上部および下部）を-80℃に冷凍保管し皮下脂肪、筋間脂肪、胸最長筋に分けビタミン E および脂肪酸組成を分析した。

【結果】飼養成績は平均 1 日増体重が「オオナリ」0%群で 824.1g、45%群で 970.1g、飼料要求率は 0%群で 3.79kg、45%群で 3.89kg となり「オオナリ」の配合割合が多い方が良好であることがわかった。保存試験では、肉色、肉汁損失において「オオナリ」の配合割合による差は見られなかったが、TBARS 値は「オオナリ」45%群が 0%よりも有意に低かった。また、ロース肉中の脂肪酸組成と総ビタミン E 含量に差はみられなかったが、トコトリエノール含量は「オオナリ」45%群が 0%よりも有意に高かった。

1) 中島ら、日本養豚学会誌、印刷中

rice for animal feed, tocotrienol, pork

発表責任者：木村俊之（kmr@affrc.go.jp）

講演番号：4A01a05
講演日時：3 月 28 日 10:14～ センター2 号館 A01 会場

タバコ細胞 BY-2 とヒト細胞 HeLa における PQQ によるオートファジー誘導

Pyrroloquinoline quinone activates autophagy in tobacco BY-2 and HeLa cells

○池本 一人[1]、高橋 明大[2]、松井 陸[2]、井上 悠子[2]、森安 裕二[2]([1]三菱ガス化学（株）新潟研究所、[2]埼玉大学)
○Kazuto IKEMOTO[1], Akihiro Takahahi[2], Riku Matsui[2], Yuko Inoue[2], Yuji Moriyasu[2] ([1]Mitubi Gas Chemical Company, Niigata Research Laboratory, [2]Saitama Univ.)

ピロロキノリンキノンジナトリウムは補酵素ピロロキノリンキノン（PQQ）の水溶性塩であり、機能性食品用途に使用されている[1)]。これまでに認識能力の向上、皮膚の保湿、ミトコンドリア新生や寿命延長等の様々な機能が報告されている。この PQQ は酸化還元することが可能であり、酸化型 PQQ と還元型 PQQ が存在する。機能性食品や試薬として販売される PQQ は酸化型である。そのため、PQQ に関する機能は酸化型で行われ、還元型 PQQ での報告はほとんど行われていない。しかし、機能性として重要な抗酸化性では還元型 PQQ が活性種であることが明らかになっている[2)]。我々は還元型 PQQ を大量製造することに成功し、固体状態で安定であることを確認した[3)]。この２つの PQQ（酸化型と還元型）を使用して機能性評価を行うことにした。

オートファジーは植物や動物において共に重要な働きを有し、真核生物の細胞質の分解プロセスであり、正常な細胞の恒常性にとって重要な現象である。また、細胞飢餓状態時に発現し、食品成分でオートファジーを誘導するものは多くない。

初めに植物細胞である培養タバコ（Nicotiana tabacum L.）BY-2 細胞を使って試験した。この細胞は哺乳類細胞の経路と同様の経路を有し、そのモデルとして使用される。この細胞はオートファジーの指標であるオートファゴソームを観察するためにそこに局在するタンパク質 Atg８に緑色蛍光融合した GFP-Atg8 タンパクを発現するように改変されている。この細胞への酸化型 PQQ と還元型 PQQ を 10-100μM 添加し、栄養リッチな培地中でともに蛍光化されたオートファゴソームが観察された。また、オートリソソームの観察でも同様の結果であった。次に、動物細胞としてヒト卵巣細胞である HeLa 細胞を用いて試験した。PQQ の添加 24 時間後に Cyto-ID Autophagy detection Kit による染色でオートファゴソームの生成を確認した。1.5μM 以上でオートファジーを観察できた。

結論：酸化型 PQQ と還元型 PQQ ともに植物培養細胞 BY-2 とヒト培養細胞 HeLa においてオートファジーを活性化できる。その活性強度に大きな差は見られなかった。

参考文献

1) D. Turk et al., EFSA Journal, DOI: 10.2903/j.efsa.2017.5058
2) K. Mukai, et al., J. Agric. Food Chem.,(2011)1705-1712
3) K. Ikemoto et al., Acta Cryst. (2017).B73, 489-497

PQQ, reduced PQQ, autophagy

発表責任者：池本一人（kazuto-ikemoto@mgc.co.jp）

講演番号：4A01a06
講演日時：3 月 28 日 10:35～ センター2 号館 A01 会場

食餌由来ビタミン K がラット脳における認知機能関連遺伝子の発現に及ぼす影響

The effect of dietary vitamin K on the expression of cognitive-related genes in rat brain

○片倉 しおり、岡田 菜緒、大崎 雄介、スルタナ ハリマ、駒井 三千夫、白川 仁（東北大・院農）
○Shiori Katakura, Nao Okada, Yusuke Osaki, Halima Sultana, Michio Komai, Hitoshi Shirakawa (Grad. Sch. Agri. Sci., Tohoku Univ.)

【目的】ビタミン K（VK）はγ-グルタミルカルボキシラーゼの補因子として働き、血液凝固、骨形成に重要な役割を果たしている。我々は、精巣由来細胞において VK_2 のひとつであるメナキノン-4（MK-4）がアデニル酸シクラーゼ（AC）を活性化し cAMP 量を上昇させ、A キナーゼ（PKA）を活性化することを見出した [1,2]。MK-4 は、高等動物において VK1 やその他の VK から脳を含む様々な組織内で変換・生成される。最近、脳内に大量に存在する VK が注目され、認知機能との関連が示唆されているが、その詳細なメカニズムは明らかになっていない。脳由来神経栄養因子（BDNF）は、記憶や学習の根幹的な役割を担うタンパク質であるが、その発現は PKA-CREB 系により調節されている。本研究では、VK を強化した試験食をラットに給餌し、脳における BDNF や認知機能に関与する遺伝子の発現に与える影響を解析した。
【方法】Wistar 系ラット（8 週齢、雄）にコントロール食（Cont 群 VK_1 0.75 mg/kg diet）、VK_1 添加食（VK_1 群 VK_1 75 mg/kg diet）、MK-4 添加食（MK-4 群 MK-4 75 mg/kg diet）を 28 日間給餌し、海馬および大脳を採取した。蛍光 HPLC 法を用いて、海馬および大脳の VK 量を定量した。また、ウェスタンブロッティング法、定量 RT-PCR 法により、PKA-CREB 系および BDNF の発現量を測定した。
【結果】両 VK 添加食群で海馬の総 VK 濃度が増加し、そのほとんどが MK-4 として存在していた。また添加食摂取による PKA-CREB 系の活性化、BDNF 量の増加が見られた。大脳においても海馬と同様に、添加食摂取により BDNF 量が増加していた。以上より、食餌中に強化した VK は海馬、大脳の MK-4 量を増加させ、PKA-CREB 系を介し BDNF 量を上昇させることで、記憶や認知機能を向上させる可能性が示唆された。

[文献]
1) Ito A, et al. Lipids Health Dis., 2011, 10, 158.
2) Ho H-J, et al. “Vitamin K2 - Vital for Health and Wellbeing″, 2017, pp189-198, InTech, Rijeka, Croatia.

vitamin K, hippocampus, brain-derived neurotrophic factor (BDNF)

講演番号：4A01a07
講演日時：3 月 28 日 10:46～ センター2 号館 A01 会場

PQQ およびキノン化合物による破骨細胞分化に及ぼす影響
Effects of PQQ and related compounds on osteoclast differentiation
○小林 未侑[1]、外山 博英[2]、橘 信二郎[2] ([1]鹿大院・連合農、[2]琉球大・農)
○Miyu KOBAYASHI[1], Hirohide TOYAMA[2], Shinjiro TACHIBANA[2] ([1]Kagoshima Univ., Grad Sch Agric Sci, [2]Univ. Ryukyus, Fac Agric)

【目的】ピロロキノリンキノン（PQQ）は、酸化還元酵素の補酵素として働き、ビタミン B 群に類似の生理活性を有するバイオファクターである。PQQ は、哺乳類において生合成が確認されていないため、身近な食品から摂取されている。摂取された PQQ は、速やかに腸管吸収され、そのほとんどが 24 時間以内に尿中に排出される。そのため血中および各臓器における PQQ 濃度は数十 nM と極めて低いレベルで維持されるが、ヒトの母乳中からは 140～180 ng/mL（0.4～0.5 μM）もの PQQ が検出されている。そこで、我々は母乳中の PQQ 蓄積が新生児の成長や骨格形成に関与すると仮定した。これまでの研究において、酸化型 PQQ（PQQ･2Na）は RANKL 誘導性の破骨細胞分化を阻害することが報告されている。本研究では、PQQ またはキノン類縁化合物であるトリメチル化体 PQQ（PQQ-TME）やコエンザイム Q_{10}（CoQ_{10}）による破骨細胞分化に及ぼす影響を調べ、PQQ の骨代謝制御に関わる生理学的意義を洞察することを目的とする。
【方法】骨吸収の培養細胞モデル実験で一般的なマウス腹膜マクロファージ RAW264.7 細胞株を供試細胞株として用いた。10% ウシ胎仔血清および 1% ペニシリン-ストレプトマイシンを含む DMEM 培地を生育培地として、37℃、5% CO_2 条件下で培養した。単層形成後の破骨細胞への分化誘導は、生育培地に対し、分化誘導因子である RANKL と M-CSF の両誘導剤を添加して行った。このとき、キノン化合物による破骨前駆細胞の分化誘導ステージへの影響を調べるため、前駆細胞への分化誘導刺激の前後および同時刺激を行った。その後、破骨細胞の分化マーカータンパク質である酒石酸耐性酸性ホスファターゼ（TRACP）活性を調べて破骨細胞の分化率（%）を算出した。また、破骨細胞の分化制御に関連する遺伝子群の発現解析は、全 RNA を用いて RT-PCR 法により評価した。PQQ･2Na の溶媒には滅菌超純水を用い、PQQ-TME および CoQ_{10} は 1% DMSO（終濃度 0.1%以下）を添加した PBS を溶媒に用いた。いずれも終濃度 10^{-7}、10^{-5}、10^{-3} mM に調整した培地を使用した。
【結果】PQQ･2Na、PQQ-TME および CoQ_{10} は、いずれも TRACP 活性を濃度依存的に減少させ、破骨細胞の分化抑制効果を示した。PQQ･2Na は、前駆細胞に対して分化誘導剤と同時に添加したときに抑制効果が最も高まり、PQQ-TME および CoQ_{10} は分化誘導刺激前に添加した場合に最も高い抑制効果が見られた。このことから、これらのキノン化合物は骨吸収を抑制し、水溶性キノンと脂溶性キノンで抑制作用ステージが異なることを示唆した。

PQQ, Quinone, Bone metabolism

講演番号：4A01a08
講演日時：3 月 28 日 10:57～ センター2 号館 A01 会場

甲殻類オオミジンコを用いた機能性食品素材 PQQ の体脂肪減少効果の評価

Novel approach using Crustacean waterflea Daphnia magna for evaluating body fat reducing function of functional food PQQ

○MOHAMAD ISHAK Nur Syafiqah、池本 一人（ミツビシガス化学（株）新潟研究所）
○ Nur Syafiqah MOHAMAD ISHAK, Kazuto Ikemoto (Mitsubishi Gas Chemical Company, Niigata Research Laboratory)

ピロロキノリンキノン二ナトリウム塩（PQQ）は、健康において重要な機能性食品素材として近年注目を集めている物質である[1,2]。主な機能として抗酸化作用、脳機能の改善、ミトコンドリア新生等の機能が報告されている。本研究では、モデル生物であるオオミジンコ（*Daphnia magna*）を利用した PQQ の体脂肪減少効果の評価の高速かつ低コストなスクリーニング方法を確立した。

オオミジンコは、生態学から生物医学といった、様々な生物学分野で利用されているモデル生物である[3]。繁殖、取扱いが容易な単為生殖で増殖するため、実験モデルとして利用しやすい。さらに、オオミジンコの体色は透明なので、体内器官を観察しやすい。本研究では、親油性染料であるナイルレッドを使用してオオミジンコの体脂質の量を測定した[4]。また、オオミジンコのゲノム配列が解読されたため、遺伝子の発現変化解析をできる。

まず、オオミジンコを 50uM PQQ 水溶液に 4 日間曝露した。その後、ナイルレッドを使用してオオミジンコを染色した。顕微鏡下で染色された脂質の蛍光を観察し、マイクロプレートリーダーを使用して 485ｎｍ励起／535ｎｍ検出の設定により、相対蛍光を定量した。結果、PQQ 非摂取の個体と比較して PQQ 摂取の個体は、脂質含量が 10-20%減少したことを確認した。一方で、両者のオオミジンコの体長に差はなかった。さらに、PQQ はミジンコの生存率にも影響をしなかった。PQQ を添加したことより、オオミジンコの産卵数が有意に増加していたことから、PQQ には生殖機能の改善効果があることも示唆された。また、PQQ 摂取により約 1.2 倍の運動量の向上が認められた。

結論として、オオミジンコを用いた体脂肪減少機能の評価方法を確立した。この方法により、オオミジンコにおいて PQQ は体脂肪を減少させる効果が確認された。同時に、体長、卵の産出能力に悪影響を及ばさず、運動機能の向上が示唆された。他の機能性食品材料の評価においても、オオミジンコが有用であることが期待される。

1. EFSA Journal, Volume15, Issue11, e05058 (2017)
2. Scientific Reports, Volume 6, Article number: 26723, (2016)
3. J. Limnol., 70(2) Special Insert: 337-344, (2011)
4. Environ Health Perspect., 123(8):813-819 (2015)

Pyrroloquinoline quinone (PQQ), Daphnia, Functional food

発表責任者：モハマドイシャク　ヌルシャフィカ（syafiqah@mgc.co.jp）

講演番号：4A01a09
講演日時：3 月 28 日 11:08～ センター2 号館 A01 会場

The potential roles of vitamin B6 in satellite cell functions

○Thanutchaporn KUMRUNGSEE, Kai Onishi, Takumi Komaru, Noriyuki Yanaka (Hiroshima Univ.)

[Objective] Vitamin B6 (B6) plays a crucial role in muscle functions through regulating energy metabolism and immune system. Although its ergogenic and immune-regulative roles are well studied, there is scarce information on its potential roles in muscle regeneration. In this study, we conducted a preliminary experiment to examine if B6 has any effects on satellite cells (SCs), the muscle stem cells crucial for muscle regeneration.
[Methods] ICR mice (4 weeks old) were divided into two groups (6 mice/group) receiving a basal diet containing a B6-deficient level (1 mg pyridoxine (PN) HCl/kg diet) or a B6-supplement level (35 mg PN HCl/kg diet) for 8 weeks. Single fibers were isolated from EDL muscles and cultured in plating medium (10% horse serum, 0.5% chick embryo extract, and 1% penicillin-streptomycin in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)) at 37°C, for 0, 24, 48, or 72 hr. Subsequently, fixed fibers were co-immunofluorescent stained for Pax7 and MyoD. Without culturing (0 hr), SCs are in quiescent sate and stained positive with only $Pax7^+$. Following 24-72 hr of culture, SCs will be activated and enter cell cycle for proliferation (stained positive with both $MyoD^+Pax7^+$), commitment to differentiation (stained positive with only $MyoD^+$), or self-renew (stained positive with only $Pax7^+$).
[Results&Discussion] Without culturing (0 hr), the number of SCs on single fibers isolated from the muscles of the B6-deficient mice was lower than that in the B6-supplement mice (4.6 vs. 7.4 $Pax7^+$ nuclei/fiber, $p<0.01$), suggesting that B6 deficiency possibly induced a decline in the quiescent population. Next, we determined proliferation, differentiation, and self-renew characteristics of SCs. At 72 hr of culture, the number of $MyoD^+Pax7^+$ clusters on single fibers from the B6-deficient mice was fewer than that in the B6-supplement mice (4.4 vs. 6.8 clusters/fiber, $p<0.01$). However, the number of cells per cluster was similar in both groups. In addition, there was no significant difference in the number of $MyoD^+$ or $Pax7^+$ nuclei between both groups. We hypothesized that the adverse effects of B6 deficiency on SCs is reversible, since DMEM in the medium contained normal levels of B6. To test this hypothesis, single fibers isolated from the muscles of the B6-deficient mice were cultured in the medium contained with or without B6. As a result, the number of $MyoD^+Pax7^+$ clusters on single fibers in the culture without B6 was lower than that with B6 (2.1 vs. 4.4 clusters/fiber, $p<0.05$), and the number of cells per cluster was fewer in the culture without B6 (0.5 vs. 2.2 cells/cluster, $p<0.01$), indicating that SCs cultured without B6 barely proliferated and possibly underwent apoptosis. All results imply that B6 may play a role in activation, proliferation, and apoptosis prevention of SCs. This study is the first to show the effects of B6 on SC functions and will pave the way for new research on the role of B6 in muscle regeneration in the future.

satellite cell, vitamin B6, muscle regeneration

発表責任者：Thanutchaporn Kumrungsee（kumrung@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：4A01a10
講演日時：3 月 28 日 11:19～ センター2 号館 A01 会場

マウス腸オルガノイドを用いた微量栄養素の消化管内作用の解析
Analysis of gastrointestinal effects of micronutrients using mouse intestinal organoids
○湯浅 ほのか[1]、安宅 由佳[1]、小川 剛伸[1]、桝田 哲哉[1]、大木 淳子[2]、岩槻 健[2]、谷 史人[1]([1]京大院農、[2]東農大応生科)
○Honoka YUASA[1], Yuka ATAKE[1], Takenobu OGAWA[1], Tetsuya MASUDA[1], Junko OHKI[2], Ken IWATSUKI[2], Fumito TANI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Tokyo Univ. of Agric.)

【背景・目的】
腸管上皮細胞に対する食品成分が与える影響は、動物個体を用いる試験か、あるいは株化された細胞を単層培養した *in vitro* 試験が用いられることが多い。前者では、生理的条件下で結果が得られるが、ヒトにおける試験は難しく、動物の種差や個体差が大きいという制約がある。後者では、試験は簡便であるが、ヒト結腸由来 Caco-2 細胞に代表されるように、用いられる細胞が限られており、腸上皮を構成する細胞の多様性や生理的環境を単純化しているという弱点がある。近年、幹細胞研究の発展に伴って、人為的に創出された器官に類似した組織体であるオルガノイドという三次元培養系が確立されてきた。本研究では、小腸の陰窩に存在する幹細胞から小腸オルガノイドを作製し、環境中や食品中に含まれるミネラルや微量栄養素の小腸上皮への作用を解明することを目的とした。
【方法】
8～14 週齢の雄性マウス（C57BL/6）から小腸を摘出し、陰窩を単離した。陰窩をマトリゲルに包埋し、成長因子を含む培地中で培養することで小腸オルガノイドを作製した。塩化リチウムを培地に添加して培養し、リアルタイム PCR で遺伝子発現量を測定することで、リチウムによる幹細胞維持の効果について検討した。作製した小腸オルガノイドを 4%パラホルムアルデヒドによって固定し、免疫組織化学染色を行った。
【結果・考察】
マウスの小腸の陰窩より、出芽部分をもつ小腸オルガノイドを作製した。培地に塩化リチウムを 0.001%、0.01%の濃度で添加した場合では、通常の培地中で培養した場合よりオルガノイドの出芽数が増加する傾向が見られた。しかし、0.1%で添加したところ、通常の培養とは異なって球状構造をとり、出芽が見られなかった。遺伝子発現量を測定したところ、幹細胞マーカーである Lgr5 の発現量が 0.01%の塩化リチウムの添加で増加する傾向にあった。一方で、吸収上皮細胞マーカーの Hes1、杯細胞マーカーの Muc2、タフト細胞マーカーの Dclk1、腸クロム親和性細胞マーカーの Tph1 は塩化リチウムの添加により減少する傾向が見られた。また、免疫組織化学染色により、腸内分泌細胞、タフト細胞などのマーカーの発現が確認された。これらの結果から、小腸上皮細胞に対する微量元素の作用についての評価系としてオルガノイドは有用であること、また、水道水中などに微量に含まれているリチウムは幹細胞を維持するはたらきをもつ可能性があることが示唆された。

organoid, micronutrients, gastrointestine

発表責任者：谷史人（tanifumi@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4A01a11
講演日時：3 月 28 日 11:40～ センター2 号館 A01 会場

脂肪肝形成初期段階におけるタンパク質性低栄養によるミネラル代謝への影響

Influence on mineral metabolism by Low-protein diet at early stage of fatty liver formation

○南野 勝彦（羽衣国際大学）
○Katsuhiko MINAMINO (Hagoromo University of International Studies)

【目的】

肝硬変に進展するリスクがある非アルコール性脂肪肝炎(non-alcoholic steatohepatitis; NASH)の発症機序は、肝細胞への中性脂肪の沈着がおこり(first hit)、さらに肝細胞障害(second hit)が加わって発症する、two hit theory が提唱されている。
しかしながら、タンパク質性低栄養が引き起こす NASH の作用機序については、アルブミンが関与すると考えられているものの、その詳細は未だ充分に明らかにされていない。

そこで、本研究では、ラットをもちいてアミノ酸バランスの異なる低栄養およびその改善モデルを作成し、ミネラル代謝へ及ぼす影響について比較検討をおこなった。

【方法】

4 週齢 Wistar 雄ラットを 5 群に分け、AIN93G 組成飼料（C 群)、20% グルテン飼料（G 群)、20% ツェイン飼料 (Z 群)、および 20% グルテン飼料にアミノ酸を添加した飼料 (G＋群)、20% ツェイン飼料にアミノ酸を添加した飼料（Z＋群）を与え 3 週間飼育した。
生化学的変化については、アルブミン / グロブリン比(A/G 比)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ（SOD）活性の測定をおこなった。また、鉄、銅、亜鉛およびマグネシウムの挙動については、摘出した臓器への蓄積およびフンへの排泄量を原子吸光分析法で測定をおこなった。

【結果】

AIN93G 飼料を与えた C 群と比較して G 群および Z 群では予想どおり低成長がみられた。これに対して、G+群では C 群と同程度の体重増加がみられたものの A/G 比の改善は軽微であった。また、Z+群ではある程度の体重増加がみられたものの A/G 比の改善は見られなかった。

ミネラルの挙動については、低成長のみられた G 群および Z 群において肝臓の鉄貯蔵量が低下していたが、G+群および Z+群で改善がみられた。
一方、亜鉛と同様にアルブミンによって輸送される銅の臓器蓄積については、Z 群および Z+群で肝臓での蓄積に減少がみられたが、同様に A/G 比が低い G 群および G+群では変化が見られなかった。

low protein diet, amino acid balance, mineral

発表責任者：南野勝彦（minamino@hagoromo.ac.jp）

講演番号：4A01a12
講演日時：3 月 28 日 11:51～ センター2 号館 A01 会場

潜在的亜鉛欠乏が妊娠期母ラットおよび仔ラットの貧血指標に及ぼす影響

Effects of potential zinc deficiency on anemia index in pregnant mother and littermate of SD rats

○笹川 剛、佐藤 采香、大崎 雄介、白川 仁、駒井 三千夫（東北大農）
○Tsuyoshi Sasakawa, Saika Satou, Yusuke Ohsaki, Hitoshi Shirakawa, Michio Komai (Tohoku Univ.)

【目的】

日本人の妊婦の約 40%が貧血であると言われ、めまいや息切れなどの症状に苦しんでいる人が多いと見積もられている。疫学調査から、貧血患者の血中 Zn 濃度が低い傾向にあることがわかったが、詳しい機構は未だ明らかにされていない。また近年、妊娠期の栄養状態が、生まれた子供の将来の病気発症リスクに関与する説が唱えられているが、貧血に関する詳しい報告はない。本研究では、低 Zn 食が母ラットおよびその仔ラットの貧血指標に及ぼす影響について解明することを目的とした。

【方法】

8 週齢 SD 系雌ラットに Zn 添加食（33.7mg/kg diet, Zn-Sufficient (S)）、または低 Zn 食（8mg/kg diet, Low-Zn (L)）を 3 週間給餌後、妊娠させ、出産まで各々同じ実験食を与えた（それぞれ S 群、L 群）。その後、出生から離乳までの授乳期に、S 群母ラットに Zn 添加食を給餌した群（SS 群）、Low 群母ラットに Zn 添加食を給餌した群（LS 群）、Low 群母ラットに低 Zn 食を給餌した群（LL 群）の 3 群を設けた。離乳後は、全群の仔ラットに Zn 添加食を給餌して 10 週間飼育した。離乳後 10 週目で解剖を行い、血漿亜鉛濃度や各種造血因子（mRNA 量、酵素活性）等を測定した。

【結果】

その結果、Low 群母ラットにおいて、Hb 濃度と血漿亜鉛濃度が対照群よりも低値を示し、Mt-Hb 濃度が高値を示した。また、Low 群において、脾臓における Zinc finger protein である GATA-1 の mRNA 発現量が低値を示した。これらのことから、妊娠期における潜在的な Zn 欠乏によって貧血を呈する可能性が示唆された。また、Low 群母ラットおよびその LL 群仔ラットにおいて、血液中の亜鉛酵素 delta-aminolevulinic acid dehydratase の活性値と尿中 ALA 排泄量が低値を示したことから、Low 群母ラットおよび LL 群での Hb 合成の低下が推察された。

この研究は、一般財団法人「糧食研究会」の支援によって行われた。

Zinc deficiency, Anemia, Hematopoietic

講演番号：4A01a13
講演日時：3 月 28 日 12:02～ センター2 号館 A01 会場

農産物に含まれる亜鉛トランスポーターZIP4 増強化合物の評価・探索

Screening of ZIP4 protein-enhancing compound derived from agricultural food materials

○高橋 正和[1]、大川 楓佳[1]、山内 遥菜[1]、杉本 雅俊[2]、神戸 大朋[3]、片野 肇[1] ([1]福井県大生物資源、[2]福井県食品加工研究所、[3]京都大院統合生命)
○Masakazu TAKAHASHI[1], Fuka OKAWA[1], Haruna YAMAUCHI[1], Masatoshi SUGIMOTO[2], Taiho KAMBE[3], Hajime KATANO[1] ([1]Fukui Pref. Univ., [2]Fukui Food Processing Institute, [3]Kyoto Univ.)

【目的】
亜鉛はタンパク質構成因子や酵素の補因子，細胞内シグナル因子など多彩な役割を持つ必須金属元素である．このため亜鉛欠乏は味覚障害や皮膚炎，消化管粘膜障害，脳神経系の成長遅延，免疫不全など多様な疾患の原因となり，日本でも栄養バランスの低下による潜在的な亜鉛欠乏症が懸念されている．我々は食物からの亜鉛吸収に必須な亜鉛トランスポーター（ZIP4）に注目し，ZIP4 発現増強活性を示す食由来成分として，これまでに大豆サポニン Bb を単離同定し(*Biochem. J.*, **472**, 183, 2015)，さらには水－有機混合溶媒やホウ砂を利用することによって，大豆サポニン Bb ならびにその関連分子について簡便迅速な精製法の開発を報告している(*Anal. Sci.*, **31**, 85, 2015 ; *Anal. Sci.*, **35**, 935-937, 2019)．とくにホウ砂を用いた手法では，分子内に cis 型 diol 構造を持つ大豆サポニンを選択的に単離できる溶解度分別法（選択的沈殿法）が開発されたことから，他の作物にも同様の構造を持つ活性成分が含まれていれば，その単離に到るまで効率よく研究を進めることが可能になると期待された．そこで本研究では，評価対象をこれまで検討してきた大豆以外の作物にも拡大し，特に県内地域で入手しやすいソバやコメなど穀類系作物等に注目して ZIP4 発現増強活性を示す作物や機能成分の評価・探索を行うこととした．

【方法】
対象作物の乾燥粉末にメタノールまたはエタノールを加えて温度と時間を変えながら検討し，効率のよい抽出条件を検討した．えられた抽出物を適宜濃縮して濃度を調整して活性評価を行った．ZIP4 発現増強活性の測定には小腸上皮細胞と同様の ZIP4 発現パターンを示すマウス Hepa 細胞株を用い，各サンプルの効果を，ZIP4 特異抗体を用いた Western blotting 法によって評価した．

【結果】
各種作物を検討した中で，興味深いことにソバ殻粉末に ZIP4 発現増強効果を検出できることが見出された．ソバ殻にはルチンなどが多量に含まれていることから，より詳しく調べるため，抽出温度や抽出時間を種々変更し，抽出される総ポリフェノール濃度を 1 つの指標と考えて Folin 法で検討した．その結果，メタノールとエタノールの間には違いは認められず，いずれにおいてもおおむね 70℃・2 時間で十分な濃度の抽出液を得られることが確認された．得られた抽出液を濃縮し，濃度を調整して改めて ZIP4 発現増強活性を検討したところ，ソバ殻粉末抽出物は，終濃度 0.2 mg/mL において大豆サポニン粗精製標品（市販品名：ソイヘルス）1 mg/mL とほぼ同等の活性を示すことが明らかとなった．これまでに我々は，ソイヘルスをはじめ大豆関連製品に比較的強い ZIP4 発現増強活性を見出しているが，ソバ殻粉末抽出物にもソイヘルスに匹敵する強い ZIP4 発現増強活性を見出したことから，その活性成分本体の構造に興味がもたれた．このほか，大豆以外の豆類系統の作物にも ZIP4 発現増強活性を見出しており，現在探索を拡げている．

zinc transporter, ZIP4, buckwheat

講演番号：4A02a01
講演日時：3 月 28 日 09:30～ センター2 号館 A02 会場

鶏卵の鮮度指標としての卵黄係数（YI）とサルモネラ菌増殖性の関係

Relationship between yolk index (YI) as a freshness of hen egg and Salmonella growth in Egg.

○久保 七彩[1]、山下 真由子[1]、岡 真優子[2]、八田 一[1]([1]京都女子大学　大学院、[2]京都府立大学)
○Nanase Kubo[1], Mayuko Yamashita[1], Mayuko Osada-Oka[2], Hajime Hatta[1] ([1]Graduate School of Kyoto Women's University, [2]Kyoto prefectural University)

【目的】日本は生で卵を食べる国であり、生産から流通、消費における鶏卵の鮮度管理や品質保持は食品衛生における重要な課題である。鶏卵は鮮度低下により卵黄膜が脆弱化し、卵黄膜上に *Salmonella* Enteritidis(SE)菌が存在する場合（In Egg 汚染卵)、鶏卵の中で SE 菌の増殖が起こる。鶏卵の賞味期限は、生食が可能な期限として、その保存温度と卵黄膜上での SE 菌増殖の関係式 （ハンフリー博士の式）から算出される。これまで、本研究室では鶏卵の鮮度測定法、賞味期限の妥当性についての研究を行い、2018 年の本学会において、鶏卵の鮮度指標として世界的に用いられているハウユニット（HU）よりも卵黄係数（YI）がデータのばらつきが少なく、また卵黄膜強度との相関性がよく、賞味期限の設定根拠からも重要な鮮度指標であることを示した。本研究では、さらに鮮度の異なる鶏卵から卵黄を無菌的に分離し、SE 菌液に浸漬し、SE 菌の増殖と鶏卵鮮度（YI）の関係を調べた。

【方法】新鮮な鶏卵を、温度 30℃、湿度 75％（夏場の日本の常温保存を想定）で 0-15 日間、温度 25℃（鶏卵流通マニュアルでの保存上限温度）で 0-4 週間保存し、経時的にその鮮度測定を行った。HU・YI はデジタルエッグテスター（DET6000： 株式会社ナベル）を用い、卵黄膜強度は卵黄を 20ml 容量のビーカーに入れ、テキソグラフ（日本食品開発研究所）で底面積 2.0cm^2 のプランジャーによる卵黄膜の破断荷重(gf/cm^2)として測定した。また、温度 30℃、湿度 75％で 0・3・6・9・12・15 日間保存した卵、および 25℃で 0・1・2・3・4 週間保存した卵の卵黄を無菌的に分離し、10-100CFU/ml の SE 菌液中に浸漬し、24 時間後に、それぞれの菌量を ATP の発光測定法（BackTiter-Glo：プロメガ株式会社）を用いて測定した。

【結果・考察】30℃・25℃で保存した卵は、保存期間に伴い HU・YI・卵黄膜強度が低下した。各日数保存した鶏卵の卵黄を漬けた SE 菌液は、賞味期限を過ぎた鶏卵の卵黄を漬けた場合で大きく菌量が増加した（$P<0.01$)。また、各保存日数における YI と SE 菌増殖量の相関を調べた結果、YI=0.3 未満に鮮度が低下した鶏卵卵黄において SE 菌の急激な増殖が起こることが明らかとなった。本研究において、鶏卵の生食期限を示す賞味期限の妥当性が確認された。さらに、鶏卵の新しい鮮度指標として「YI」を用い、In Egg 汚染卵であっても、生食が可能と判断できるカットオフ値として「YI＝0.3 以上」を初めて提案することができた。今後さらに、種々の保存鶏卵の YI と賞味期限の関係を調べ、このカットオフ値の実証データを集めたい。

Egg freshness, York Index, Salmonella

講演番号：4A02a02
講演日時：3 月 28 日 09:41～ センター2 号館 A02 会場

第 3 世代シーケンサーMinION を用いた、生産現場で活用できる微生物遺伝子同定法の構築

Rapid and accurate identification of microorganisms using nanopore-based sequencing technology that potentially revolutionize the microbiology in breweries

○篠原 雄治、ヨハネス クルニアワン、坂井 浩晃、鈴木 康司、永富 康司 (アサヒクオリティーアンドイノベーションズ株式会社)
○ Yuji SHINOHARA, Kurniawan YOHANES, Hiroaki SAKAI, Koji SUZUKI, Yasushi NAGATOMI (Asahi quality and innovations, LTD.)

酒類・飲料・食品製品の品質保証を行う上で微生物検査は必須であり、微生物検出と微生物同定に分けることが出来る。微生物同定において、PCR や DNA シーケンスなどが行われているが PCR は網羅的な微生物種同定が困難であり、DNA シーケンスは装置が高価であることが課題であった。そこで我々は、これらの課題を解決するべく、第 3 世代シーケンサーMinION に着目した。

MinION は、Oxford nanopore tehchnologies 社（ONT 社）が販売する、一本鎖 DNA 解析が可能なシステムであり、近年注目されている。特徴として、キャピラリシーケンサーと比べると 1/50～1/100 程度の初期投資で購入することができ、簡便で迅速であると言われている。我々は、最終的には生産現場で使用できる技術に落とし込むことを目的として、MinION による微生物同定検証を行った。

まず、迅速性・簡便性を向上させるために、ONT 社推奨プロトコールの改良をおこなった。DNA 抽出を加熱式に変更し、PCR を高速化した結果、DNA の抽出から配列結果が得られるまで 3 時間以内で完了し、ONT 社推奨プロトコールのおよそ半分の時間で微生物同定を可能にした。

次に、同定精度の向上を検討した。一部の真菌において、ONT 社が提供するクラウドサービスでは、供試菌と得られた結果が一致しなかった。そこで、サードパーティーの遺伝子解析ソフトを用いたデータ処理および BLAST サーチを組み合わせることで、正確に同定できることを明らかとした。

また、上記手法を用い、供試サンプルとしてビールを混濁させる乳酸菌、偏性嫌気性菌、酵母等を用いて検証試験を行った。PCR で特定領域を増幅、精製し、MinION によって解析した結果、用いたすべての微生物を問題なく同定することに成功した。

以上、我々は、第 3 世代シーケンサーMinION を用いることで、生産現場でも使用でき、かつ同定精度が高い手法を構築した。今後は本手法により対象製品および対象菌種の拡張を行い、当社の微生物検査レベルの向上を進めていく。

Nanopore, beer Spoilage, identification

発表責任者：篠原　雄治（yuji.shinohara@asahi-qi.co.jp）

講演番号：4A02a03
講演日時：3 月 28 日 09:52～ センター2 号館 A02 会場

安全・簡便な新規活性種調製法を基盤とする衛生管理ならびに防疫対策の開発

Development of Hygiene Managements and Prevention of Epidemics based on the Safe and Simple Preparing Methods for New Active Species

○田村 健治（首都大・産技高専品川）
○Kenji Tamura (Tokyo Metropolitan College of Industrial Technology)

食品工業あるいは農水畜産業などをはじめとする様々な分野を指向した衛生管理あるいは防疫対策に寄与することが可能な以下に示す 3 種類の微生物制御システムを構築した。これらはいずれも、接触酸化に伴う殺滅作用を適用した微生物制御システムであり、滅菌・殺菌・消毒・除菌あるいは消臭などの効果を発現する。

まず、①気相滅菌システム：四酸化二窒素 N_2O_4–二酸化窒素 NO_2 系解離平衡に基づく気相滅菌システム（式(1)）は、医療・医薬・臨床などの高度な衛生状態が要求される対象となる空間あるいは機器類などの完全滅菌を達成することが可能なシステムであり、定期的使用あるいは感染症などの緊急対策時の都度使用に適したシステムである。NO_2 は、呼吸器系に健康被害をもたらす可能性があるため、遠隔操作にて滅菌工程を実施させ、NO_2 濃度のモニタリングによる作業管理を行っている。

$$N_2O_4 \rightleftarrows NO_2 \qquad \text{（解離平衡）} \quad (1)$$

次に、②液相低温殺菌システム：高精度流体制御法に基づく安定化次亜塩素酸水 HClO による液相低温殺菌システム（式(3)）は、食品工業・農水畜産業・臨床・温泉・プールなどにおける洗浄あるいは衛生状態保持ならびに消臭を行うために常時使用するためのシステムである。従来法（式(2)：塩素 Cl_2 の水に対する溶解平衡）による HClO は、存在寿命が非常に短く、調製後直ちに使用することが必須であったが、本法（高精度流体制御法）による HClO は、存在寿命が非常に長く、有機物との接触を避けた遮光条件下では貯蔵・流通が可能である。また、HClO は白血球の好中球で体内合成される物質であるため、人畜無害であることから、3 種類のシステムのうち唯一、作業従事中に使用することが可能なシステムである。

$$Cl_2 + H_2O \rightleftarrows HCl + HClO \qquad \text{（従来法）} \quad (2)$$

$$NaClO + HCl \rightarrow HClO + NaCl \qquad \text{（高精度流体制御法）} \quad (3)$$

さらに、③気相除菌システム：DOPOS（Disposable One-Pot Operating System）由来の二酸化塩素 ClO_2 による気相除菌システム（式(3)）は、最も簡便に用いることが可能なシステムであり、空間除菌を目途とした定期・都度使用の他、発酵工程あるいは醸造工程において、残留すべき酵母菌を残存させながらその他不要な一般細菌の選択的除菌を達成する可能性が期待されており、風水害などの後処理などにも適したシステムである。

$$2MClO_2 + M_2S_2O_8 \rightarrow 2ClO_2 + 2M_2SO_4 \qquad \text{（DOPOS 法）} \quad (3)$$

Hygiene Management, Prevention of Epidemics, Microorganism Control

発表責任者：田村　健治（ktamura@metro-cit.ac.jp）

講演番号：4A02a04
講演日時：3 月 28 日 10:03～ センター2 号館 A02 会場

甘草抽出物及び glabridin によるバイオフィルムの制御

Control of biofilms using licorice extract and glabridin

○塚谷 忠之、黒田 理恵子、川口 友彰、坂田 文彦（福岡県工技セ）
○ Tadayuki TSUKATANI, Rieko KURODA, Tomoaki KAWAGUCHI, Fumihiko SAKATA (Fukuoka Industrial Technology Center)

【目的】

バイオフィルムは、歯周病などの感染症や食品の腐敗・食中毒の大きな要因となることが知られている。近年、安全性の高い食材を対象に抗バイオフィルム素材の探索が活発に行われている。演者らは、これまで水溶性テトラゾリウム塩を用いた微生物検出法と 96 ピン付きマイクロプレート蓋へのバイオフィルム形成法を組み合わせたバイオフィルム殺菌活性測定法を用いることで、グラム陽性菌産生バイオフィルムに対して殺菌活性を有する食材の探索を行ってきた。本研究では、歯周病菌や大腸菌などのグラム陰性菌産生バイオフィルムに対しても殺菌活性を有する食材の探索を行った。

【方法】

(1)検出試薬：電子メディエータ 2-methyl-1,4-naphthoquinone(NQ)及び水溶性テトラゾリウム塩 WST-8 を 10%DMSO 水溶液に溶解し、検出試薬とした。

(2)バイオフィルム形成法：96ウェルマイクロプレートへ最適な培地で調製した微生物懸濁液を分注し、これに96ピン付きマイクロプレート蓋を被せて37℃で一定時間インキュベーションし、ピンへバイオフィルムを形成させた。

(3)バイオフィルム殺菌活性のスクリーニング：96ウェルマイクロプレートへミュラーヒントンブロス(MHB)培地180μl及び試料20μlを分注し、バイオフィルムを形成させた96ピン付きマイクロプレート蓋を被せ、20時間インキュベーションした。次に、96ピン付きマイクロプレート蓋を滅菌生理食塩水で3回洗浄後、検出試薬含有MHB培地へ移し、一定時間反応させた。反応後、マイクロプレートリーダを用いて吸光度測定(460nm)を行い、阻害率90%以上をバイオフィルム殺菌活性ありと判定した。

【結果】

香辛料を除く食材・食品のエタノール抽出液 434 種類を本法へ適用し、歯周病菌 *P. gingivalis*、大腸菌 *E. coli*、黄色ブドウ球菌 *S. aureus* 及びう蝕菌 *S. mutans* のバイオフィルムに対する殺菌活性を測定したところ、甘草のエタノール抽出液が *P. gingivalis*、*S. aureus* 及び *S. mutans* のバイオフィルムに対して 90%以上の殺菌活性を示した。主要活性成分は glabridin と推察された。さらに、ε-poly-L-lysine を併用することで *E. coli* などグラム陰性菌を含めた幅広い菌種のバイオフィルムの制御が可能であることが明らかとなった。甘草抽出物と ε-poly-L-lysine は食品添加物して認められており、その組み合わせは安全性の高いバイオフィルム制御剤として利用が期待できる。

Biofilm, Licorice, Glabridin

講演番号：4A02a05
講演日時：3 月 28 日 10:14～ センター2 号館 A02 会場

A prototype of time temperature indicator for food cold chain monitoring

○Ihaku SOU, Yung-Te HOU, Tzong-Jih CHENG, Li-Chy CHEN, Po-Chuan HSIEH (Taiwan Univ.)

Introduction:

Temperature is a key factor influencing food quality during storage, distribution and consumption chain, it is of importance to monitor and well control it. Time temperature indicator (TTI) is a simple device used for recording and showing the cumulative effect of time and thermal history of monitored product, which can provide real-time visual information about food quality to assure food safety. However, commercial TTIs still exist problems for applying to food industries, such as high cost, risk of toxic substances migration, and hard to keep inactive before use. This study aims to develop a prototype of TTI suitable for food cold chain monitoring based on a non-enzymatic browning reaction of a natural polyphenolic acid by investigating the effect of pH value and temperature on the color response of proposed TTI model.

Method:

Color response of the polyphenolic acid solution was monitored at 420 nm (A_{420}) by a UV-Vis spectrophotometer. All experiments were repeated in triplicate with adjusting pH value in the range of 6.5 - 8.0 (0.2 M phosphate buffer was used) at temperature range of 4 - 50°C controlled by a thermostatic incubator. The Arrhenius activation energy (*E*a) was calculated to indicate the temperature sensitivity of the color response of TTI model at each designated pH value.

Result:

The visible color change of the proposed TTI model over the incubation time could be easily distinguished by naked eye. Initially, the model solution was transparent with light pink, changed into light yellow, then turned into dark green, and finally to dark brown. The increase in pH value significantly accelerated the color development over the incubation time, the Arrhenius activation energy of the proposed TTI model in the pH range of 6.5 - 8.0 was determined to be 87.7 - 15.2 kJ/mol which matches to some typical *E*a values of food quality losses. The low pH nature of the polyphenolic acid stock solution (about pH 3) makes it very stable even kept at ambient temperature for 6 months (no color development). The production cost was estimated to be lower than 0.02 ¥JPY/mL if all food-grade ingredients were adopted. It is concluded that the proposed TTI model reveals high potential of applying to food cold chain monitoring because of its characteristics of cost-effectiveness, non-toxicity and ease of storage.

time temperature indicator, food cold chain monitoring, non-enzymatic browning reaction

講演番号：4A02a06
講演日時：3 月 28 日 10:35～ センター2 号館 A02 会場

さつま砂糖漬けにおける味噌漬け処理が細菌増殖に及ぼす影響
Effect of preserving in miso on the quality of red sea bream made by *Satsuma satozuke*
○小林 聡子、横山 文二、辰野 竜平、古下 学、福田 翼（水産機構水大校）
○Satoko KOBAYASHI, Bunji YOKOYAMA, Ryohei TATSUNO, Manabu FURUSHITA, Tsubasa FUKUDA (National Fisheries Univ.)

【目的】さつま砂糖漬けは、江戸時代の料理集「鯛百珍料理秘密箱」（1785 年）に記載された薩摩地方の保存食である。「鯛百珍料理秘密箱」によれば、さつま砂糖漬けは、タイ魚肉を長期熟成した味噌である三年味噌への漬け込みと砂糖への漬け込みによって製造される。これまでの研究成果より、タイ魚肉を使用したさつま砂糖漬け（以下、味噌漬け）の細菌数は、保存 3 ヶ月間、味噌漬け処理を行わない（以下、未処理）魚肉よりも低かった。一方、さつま砂糖漬けにおける砂糖添加割合は、保存 1 ヶ月目までの細菌数変化に影響を及ぼさなかった。したがって、さつま砂糖漬けにおける三年味噌への漬け込みが細菌数の増殖を阻害しているものと推測した。そこで、本研究では三年味噌、とくに酵母に着目し、さつま砂糖漬けにおける細菌数変化に及ぼす影響を調査した。
【方法】さつま砂糖漬け鯛は、「鯛百珍料理秘密箱」を参考にして製造した。すなわち、まず、三枚におろしたマダイ、カツオ、スズキおよびブリの魚肉重量に対して 5%の食塩を添加し、滅菌した紙タオルに包み 4°C で一昼夜保存した。保存した魚肉を 1 cm 程度に切断した後、吸水シートをに包み、三年味噌漬け込み時と同等の水分となるまで脱水を行った。脱水後、三年味噌漬け込み時と同等の塩分（約 6%）となる様、加塩した。さらに、魚肉重量に対して 20%の砂糖を添加した。魚肉をガラス容器に入れ、容器を密封後、20°C で発酵させた。酵母を接種する場合、酵母の初発菌数が 10^5 CFU/g となる様に調整した酵母懸濁液を添加した。
【結果】さつま砂糖漬けに使用した三年味噌の微生物数を測定した結果、細菌数が 2.9×10^3 CFU/g、乳酸菌数が<10 CFU/g、酵母数が 2.9×10^2 CFU/g であった。そこで、保存 2 ヶ月目の味噌漬けおよび未処理、さらに三年味噌より酵母を単離した。さらに、味噌漬け処理の代わりに吸水シートならびに単離した酵母を人為的に接種したさつま砂糖漬けの製造を試みた。発酵 1 ヶ月目における細菌数は、未処理由来酵母の場合は 1.1×10^8 CFU/g、味噌漬け由来酵母の場合は 1.8×10^7 CFU/g、三年味噌由来酵母の場合は 2.4×10^7 CFU/g であった。一方、発酵 1 ヶ月目における酵母数は、未処理由来酵母の場合は 1.0×10^8 CFU/g、味噌漬け由来酵母の場合は 1.1×10^7 CFU/g、三年味噌由来酵母の場合は 1.2×10^7 CFU/g であった。すなわち、細菌数および酵母数は、いずれも未処理由来酵母よりも味噌漬け由来酵母および三年味噌由来酵母の方が低く、味噌漬け由来酵母および三年味噌由来酵母では差が見られなかった。これらは味噌漬けおよび未処理の結果と一致した。現在、これらの酵母について同定作業を行っている。

traditional food, yeast, fermentation

講演番号：4A02a07
講演日時：3 月 28 日 10:46～ センター2 号館 A02 会場

ツノナシオキアミ魚味噌製造における発酵スターターが品質に及ぼす影響

Effect of fermentation starter on the quality of fish *miso* by *Euphausia pacifica*

○福田 翼[1]、宿名 隼人[1]、藤代 俊久[2]、辰野 竜平[1]、古下 学[1] ([1]水産機構・水大校、[2]いちからコーポレーション)
○ Tsubasa FUKUDA[1], Hayato SHYUKUNA[1], Toshihisa FUJISHIRO[2], Ryohei TATSUNO[1], Manabu FURUSHITA[1] ([1]National Fisheries Univ., [2]Ichikara corporation)

【目的】ツノナシオキアミ（*Euphausia pacifica*）は、東北地方で春季に漁獲される水産物である。ツノナシオキアミは自己消化作用が強く、品質劣化を引き起こしやすいため、食品素材としての利用が限られている。そこで、食塩のみを用いたツノナシオキアミペーストの製造を試みた。その結果、ツノナシオキアミペーストは細菌増殖抑制のため高い塩分条件（15%以上）が必要であり、水産発酵食品が持つ特有の香りが強く、嗜好性が低い事が明らかとなった。そこで、発酵スターターである米麹、酵母および乳酸菌を利用したツノナシオキアミ魚味噌製造を試みた結果、低い塩分条件（5%以上）で、嗜好性の高い香りがする魚味噌製造が可能である事が明らかとなった。そこで発酵スターター添加条件を検討し、ツノナシオキアミ魚味噌の微生物数および化学的特性に及ぼす影響を調査した。
【方法】ツノナシオキアミは、冷凍保存されたものを利用した。発酵スターターとして、麹、酵母（*Zygosaccharomyces rouxii*）および乳酸菌（*Tetragenococcus halophilus*）を使用した。ツノナシオキアミ魚味噌製造は、まず、解凍したツノナシオキアミに食塩を添加した。さらに、食塩を添加した市販米麹（総量に対する麹添加割合：50%）を混合し、最終塩分が 9%となる様に加塩した。発酵スターターの接種条件は、麹のみ（以下、麹添加条件）、麹および酵母（以下、麹+酵母添加条件）、麹、酵母および乳酸菌（以下、麹+酵母+乳酸菌添加条件）の 3 条件とした。また、比較対象としてツノナシオキアミのみ（塩分 9%、以下、コントロール）を製造した。発酵温度は 30ºC とした。
【結果】発酵 1 ヶ月目の細菌数を調査した結果、コントロールは 8.3×10^{6} CFU/g、麹添加条件は 1.2×10^{5} CFU/g、麹+酵母添加条件は 1.0×10^{1} CFU/g、麹+酵母+乳酸菌添加条件は 2.3×10^{0} CFU/g であった。すなわち、麹+酵母添加条件および麹+酵母+乳酸菌添加条件は、麹添加条件よりも有意に差が低かった。しかしながら、麹+酵母添加条件および麹+酵母+乳酸菌添加条件に有意な差は見られなかった。発酵 1 ヶ月目の乳酸菌数を調査した結果、コントロールは 3.3×10^{5} CFU/g、麹添加条件は 8.2×10^{5} CFU/g、麹+酵母添加条件は 2.3×10^{0} CFU/g、麹+酵母+乳酸菌添加条件は 2.4×10^{2} CFU/g であった。すなわち、麹添加条件、麹+酵母+乳酸菌添加条件、麹+酵母添加条件の順に有意に高かった。発酵 1 ヶ月目の酵母数を調査した結果、コントロールは$<1.0\times10^{0}$ CFU/g、麹添加条件は 1.5×10^{3} CFU/g、麹+酵母添加条件は 5.2×10^{4} CFU/g、麹+酵母+乳酸菌添加条件は 3.8×10^{5} CFU/g であった。すなわち、麹+酵母+乳酸菌添加条件は、麹添加条件および麹+酵母添加条件よりも有意に高かった。しかしながら、麹添加条件および麹+酵母添加条件に有意な差は見られなかった。麹+酵母添加条件および麹+酵母+乳酸菌添加条件で得られたツノナシオキアミ魚味噌は、麹添加条件よりも香りに対する嗜好性が良かった。以上の結果より、ツノナシオキアミ魚味噌における酵母および乳酸菌の発酵スターター利用は有用である事が明らかとなった。特に、酵母の役割が重要である事が示唆された。

fermentation, fish *miso*, North Pacific krill

講演番号：4A02a08
講演日時：3 月 28 日 10:57～ センター2 号館 A02 会場

エノキタケ抽出エキスの氷結晶成長抑制効果が冷凍ホイップクリームの品質維持に及ぼす効果

Anti-freeze effect of Enoki Mushroom Extract on the Quality Preservation of Frozen Whipped Cream

○荒井 直樹[1]、藤原 綾子[1]、河原 秀久[2]([1]株式会社カネカ、[2]関西大　生命・生物工)
○Naoki ARAI[1], Ayako FUJIWARA[1], Hidehisa KAWAHARA[2] ([1]Kaneka Corp., [2]Kansai Univ.)

【目的】近年、高齢化世帯の増加、少子化・核家族化の進展といった世帯構造の変化や食品廃棄低減に対する関心の高まり等を背景に、冷凍食品の市場は拡大している。エノキタケの細胞壁を構成する多糖類のひとつであるキシロマンナンは“氷結晶成長抑制物質”として氷結晶生成温度帯における氷結晶の成長（再結晶化）を抑制する。冷凍食品では、凍結解凍および冷凍保管中に起こる氷結晶成長に伴う品質の劣化（冷凍障害）がしばしば問題となっており、その改善にキシロマンナンを含有するエノキタケ抽出エキスを利用する試みが進められている。本研究では、上記のエノキタケ抽出エキスがホイップクリームの冷凍保存に及ぼす効果について検証を行った。
【方法】エノキタケ子実体を熱水処理して不要物質を除去したのち、アルカリ熱処理してキシロマンナンを含むエキスを抽出した。抽出液の氷結晶成長抑制機能はシュークロース・サンドイッチ法により不凍活性（RI 値）として評価し、力価調整して検証に使用した。乳脂肪組成の異なる種々のクリームにエノキタケ抽出エキスを添加してホイップし、急速凍結、緩慢凍結の各冷凍条件で凍結した後、-20℃で保管した。
【結果】冷凍保管（D+37）によるホイップクリームの風味・食感の低下は、乳脂肪含量が高いほど、冷凍条件が緩慢であるほど顕著に起こっており、エノキタケ抽出エキスの添加により乳風味の維持、みずみずしい食感の維持に効果が認められた。エノキタケ抽出エキスを添加したホイップクリームでは無添加の対照よりも水分含量が高く、冷凍保管中の水分の昇華が抑制されていると考えられた。GC-MS 分析により冷凍ホイップクリーム中の風味成分を分析した結果、冷凍保管による遊離脂肪酸、ケトン類、アルデヒド類の増加量に差異は見られなかった一方で、フラン類の増加に対してはエノキタケ抽出エキスの添加による抑制が認められた。Cryo-SEM を用いて構造観察した結果、エノキタケ抽出エキス添加の冷凍ホイップクリームでは無添加の対照と比較して粗大化した氷結晶が少なくなっていた。エノキタケ抽出エキスは、冷凍ホイップクリーム中において水相中で起こる氷結晶の粗大化抑制により脂肪球の網目構造を維持することで、冷凍保管中の水相からの水分および風味成分の昇華を抑制し、解凍後の食感維持に効果を発揮している可能性が示唆された。

anti-freeze, polysaccharide, frozen foods

講演番号：4A02a09
講演日時：3 月 28 日 11:08～ センター2 号館 A02 会場

きのこボールによるビタミン D_2 の取り込みおよび生成に関する研究

Study on uptake and production of vitamin D_2 by mushroom balls

○福田 史織[1]、鮫島 由香[2]、松井 徳光[2]([1]武庫女大院、[2]武庫川女子大)
○Shiori FUKUDA[1], Yuka SAMESHIMA[2], Tokumitsu MATSUI[2] ([1]Grad. Sch. Food Sci. and Nut. Mukogawa Women's Univ, [2]Mukogawa Women's Univ)

【目的】担子菌は回転振とう培養法を用いて培養することできのこボール(球状の菌糸体)を形成し、培地成分をきのこボールに取り込む可能性が示唆されている。これまでに、ビタミンを含む市販飲料(野菜・果汁ミックスジュース)を培地に使用した場合、きのこボール中へのビタミンの取り込みのみならず、さらにビタミン D_2 が生成されることを報告している[1)]。しかし、市販飲料ではなく、基礎培地(マルト培地)で培養したきのこボールがビタミン D_2 を取り込み、新たに生成するかについては試みられていない。そこで本研究では、ビタミン D_2 を含むきのこボールの製造を主目的として、基礎培地を用いてビタミン D_2 の取り込みおよび生成について検討した。
【方法】マルト培地 200ml をオートクレーブ滅菌後、培地にビタミン D_2 濃度(0、0.1、1.0、10.0μg/ml)を添加し、各マルト培地のビタミン D_2 総量をそれぞれ 0、20、200、2000μg に調整した。その後、エノキタケ SA-1 の菌糸を植菌し、25℃で 3 週間回転振とう培養を行い、きのこボールを形成させた。きのこボールと培養後の培地(培養液)中に含まれるビタミン D_2 の定量は HPLC 法を用いて測定した。
【結果および考察】各濃度のビタミン D_2 を添加したマルト培地においてきのこボールが形成され、ビタミン D_2 が検出されたが、各培養液では検出されなかった。ビタミン D_2 無添加培地および 0.1、1.0、10.0μg/ml のビタミン D_2 添加培地で形成されたきのこボール中に含まれるビタミン D_2 量はそれぞれ 0.06、0.27、0.30、0.38μg/g であり、形成されたきのこボール重量から換算したビタミン D_2 総量はそれぞれ 4.50、20.12、20.66、24.11μg であった。0.1μg/ml 以上のビタミン D_2 を添加した培地で形成されたきのこボール中のビタミン D_2 総量は添加したビタミン D_2 濃度に関わらず同程度であり、きのこボール中に取り込まれるビタミン D_2 量に限界があることが推察された。一方、市販飲料培地において培養を行った場合では、培地中のビタミン D_2 含量が 24.0μg であったのに対し、培養後のきのこボールおよび培養液中にはビタミン D_2 が 399.5μg 検出され、著しい増加傾向が認められたことから、きのこボール中でビタミン D_2 が生成されていることが示唆された。ビタミン D_2 はグルコースからピルビン酸に至る解糖系を経て生成されるアセチル CoA からコレステロール合成経路をたどり、エルゴステロールから合成されることが報告されている。市販飲料培地でビタミン D_2 が生成され、マルト培地で生成されなかった原因として、培地中の糖質やビタミンなどの含有栄養素の違いによるものと推察した。市販飲料培地中の豊富な糖質がアセチル CoA となり、さらにビタミン類が補酵素として作用し、ビタミン D_2 の生産に関与していると推察した。

1) きのこ学会第 23 回大会要旨集(p61)2019

mushroom mycelia, mushroom balls, vitaminD_2

発表責任者：福田史織（1928775@mwu.jp）

講演番号：4A02a10
講演日時：3 月 28 日 11:19～ センター2 号館 A02 会場

NMR を用いた採蜜時期の異なる百花蜂蜜の成分組成分析および保存に伴う成分の経時変化追跡
Component analysis of polyfloral honey samples harvested in different months and monitoring of the chemical changes of polyfloral honey during storage by NMR spectroscopy

○住田 喬哉、伊藤 光洋、瀧口 沙希、盧 翌、陸 鵬、張 迷敏、岡本 研、鈴木 道生、降旗 一夫、永田 宏次（東大・院農生科）
○Takaya SUMIDA, Mitsuhiro ITO, Saki TAKIGUCHI, Yi LU, Peng LU, Mimin ZHANG, Ken OKAMOTO, Michio SUZUKI, Kazuo HURIHATA, Koji NAGATA (The Univ. of Tokyo)

【背景・目的】
蜂蜜はミツバチが花蜜を原料として作る保存食であり、主成分はグルコースやフルクトースなどの糖類で、それらは蜂蜜全体の約 8 割を占める。蜂蜜の成分は採蜜時期や蜜源植物などの先天的要因や、採蜜後の保存期間や保存温度などの後天的要因によって違いが生じ、成分組成の違いが蜂蜜の嗜好性や機能性に影響を及ぼす。蜂蜜成分の機能性に関する研究は数多く行われているが、蜂蜜の嗜好性や機能性に影響を及ぼすこれらの先天的および後天的要因による蜂蜜の成分組成の違いや保存中の変化に関する研究はあまり行われていない。こうした背景から本研究では、約 2 年にわたり、特定の蜜箱で採蜜される採蜜時期の異なる百花蜂蜜の成分組成の違いと、百花蜂蜜を採蜜した後の保存に伴う成分の経時変化を追跡することで、蜂蜜中の成分組成がどのように異なり、変化するのかを観察し、蜂蜜成分への気候変動の影響を調べるとともに、蜂蜜の品質管理に貢献することを目的とした。
【方法】
2018 年 5・6・7・8 月および 2019 年 5・6・8 月に採蜜された百花蜂蜜 7 サンプルをそれぞれ重水素化溶媒に溶解させ、500 MHz 核磁気共鳴装置で NMR 測定し、得られた NMR スペクトルから定量計算を行うことで各成分の含量を定量、比較した。また、この 7 サンプルのうち 3 サンプルを 25℃と 37℃で保存し、1 か月ごとに NMR 測定を行い得られた NMR スペクトルから定量計算を行って成分の経時変化を追跡した。
【結果・考察】
採蜜時期の異なる蜂蜜の NMR 測定及び定量計算の結果、採蜜時期によって芳香族アミノ酸と脂肪族アミノ酸の成分組成に大きな差が見られ、発酵産物である乳酸やエタノールの含量にも差があることが判明した。このことから、百花蜂蜜の成分組成は、蜜源植物の時季だけでなく天候にも大きく影響をうけることが示された。異なる温度で保存した蜂蜜を NMR で測定し、定量計算した結果、37℃で保存した蜂蜜では芳香族アミノ酸の減少が観測された。25℃と 37℃両方で二糖類も減少した。二糖類の減少は蜂蜜中の酵素による分解反応が原因であると示唆された。一方、化学シフト 1.8 ppm 付近の未同定物質が 25℃および 37℃での保存に伴い増加することが判明した。この物質は蜂蜜の長期保存によって観測されることで知られるヒドロキシメチルフルフラール (HMF) と増加の仕方が異なることから、蜂蜜の保存期間および保存条件を知るための新たなマーカー成分となる可能性がある。

Honey, NMR, Quality control

発表責任者：永田宏次（aknagata@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4A02a11
講演日時：3 月 28 日 11:40～ センター2 号館 A02 会場

メイラード反応由来変異発がん物質の生成に対する塩類の抑制効果

Inhibitory effect of salts on the formation of mutagens/carcinogens from Maillard reaction

○林 夏衣、島村 裕子、増田 修一 (静岡県大・食品栄養)
○Natsui HAYASHI, Yuko SHIMAMURA, Syuichi MASUDA (University of Shizuoka)

【目的】アミノカルボニル反応（メイラード反応）は、還元糖とアミノ化合物を高温条件下で反応させた際に誘導され、フレーバーの生成等に用いられることから、食品分野において重要な反応である。しかし、このメイラード反応により、アクリルアミド、ヘテロサイクリックアミン類、メチルフルフラール等の変異・発がん物質が生成することから、ヒトに対するリスク評価において、メイラード反応を制御することは重要である。また、日常的に摂取している食品には調味料として塩類が使用されており、さらに塩類の脱水作用、防腐作用、タンパク質の変性・溶解作用等により、食品の加工や保存にも用いられている。本研究では、食品分野において重要なメイラード反応における塩類の制御効果を明らかにするために、メイラード反応由来変異・発がん物質の生成に対する塩類の抑制効果を明らかにすることを目的として行った。
【方法】グルコースとアスパラギンをリン酸緩衝液（pH7.4）に溶解し、各種塩類（NaCl、KCl、$MgCl_2$）を添加した。添加した溶液を 121°C、60 分間加熱してメイラード反応液を作製した。得られた反応液の吸光度（450 nm）を測定した。また反応液を 0.45 μm フィルターでろ過、また固相抽出法（Oasis HLB 及び Oasis Max）を用いて抽出を行い、LC/MS/MS を用いて、生成したメチルフルフラールおよびアクリルアミド量を測定した。また、グルコース、アスパラギン、さらにクレアチニンをリン酸緩衝液（pH7.4）に溶解し、同様に各種塩類を添加して、121°C、60 分間加熱してメイラード反応液を生成した。反応液にブルーコットンを加えて、生成したヘテロサイクリックアミン類を吸着させた後、アンモニア・メタノール混液で溶出し、溶出液の変異原性をエームス試験（+S9mix）を用いて評価した。
【結果・考察】グルコースとアスパラギンをリン酸緩衝液に溶解させた液に各種塩類を添加して加熱したところ、いずれの塩類においても濃度依存的にメイラード反応液の吸光度が減少した。また、メイラード反応液中のアクリルアミドの生成も濃度依存的に抑制した。各塩類のアクリルアミド生成に対する抑制効果を比較したところ、$MgCl_2$ が強い効果を示した。さらにメイラード反応液中のメチルフルフラール量を測定したところ、KCl、NaCl は生成抑制効果を示さなかったが、$MgCl_2$ は、濃度依存的に促進効果を示した。以上のことより、塩類は、その種類・濃度により、メイラード反応における化学物質の生成で抑制または促進効果を示すことが明らかになった。その要因として、塩類のイオン強度、またメイラード反応生成物の生成メカニズムに影響することが示唆された。現在、エームス試験によりメイラード反応液の変異原性に対する塩類の影響について検討している。

Salts, Mutagen, Maillard reaction

講演番号：4A02a12
講演日時：3 月 28 日 11:51～ センター2 号館 A02 会場

γシクロデキストリンを用いたコエンザイム Q10 と R-αリポ酸の 3 成分包接体の作製

Preparation of ternary complex of coenzyme Q10 and R-α-lipoic acid using γ-cyclodextrin

○上梶 友記子、寺尾 啓二（シクロケムバイオ）
○Yukiko UEKAJI, Keiji TERAO (CycloChem Bio)

【背景・目的】ミトコンドリアは生体内のエネルギー産生を担う細胞小器官であり、食事で摂取する糖や脂質を取り込むことで ATP を供給している。その活動にはコエンザイム Q10 (CoQ10) や R-α リポ酸 (RALA) といった機能性成分が必要だが、これらの成分はミトコンドリア機能の正常化に必須であるにも関わらず、加齢と共にその生成量は減少してしまう。そのため、食事やサプリメントで積極的に補う必要がある。しかし、CoQ10 は難水溶性であること、RALA は熱や酸によってポリマー化しやすく胃酸に対する安定性が低いことが、それぞれ経口摂取した際の吸収量を低下させる原因となっていた。そこで、我々はこれらの問題を解決するため、包接作用を有するシクロデキストリン (CD) を用い、溶解性を改善した「CoQ10-γ-CD 包接体」、および熱や酸に対する安定性を改善した「RALA-γ-CD 包接体」を開発した。更に、溶解性や安定性といった物性の改善によって、経口摂取時の吸収性が向上することも明らかにしている。本研究では、CoQ10 と RALA の双方を γ-CD で包接した 3 成分包接体「[CoQ10+RALA]-γ-CD 包接体」の作製方法について検討した。

【方法】RALA-γ-CD 包接体 (RALA 含量: 12.1 % (固形分あたり)) に CoQ10 と精製水を加え、ホモジナイザーにて攪拌した。この乳化液を凍結乾燥し、[CoQ10+RALA]-γ-CD 包接体の粉末を作製した (手法 1)。また、CoQ10-γ-CD 包接体 (CoQ10 含量: 22.7 % (固形分あたり)) に RALA を加えた方法 (手法 2)、および CoQ10、RALA、γ-CD をそれぞれ単独で加えた方法 (手法 3) に関しても同様に作製した。尚、CoQ10 と RALA の比率は、医薬品成分としての用量や健康食品の配合量を参考に推奨摂取量 (CoQ10: 20~30 mg/day、RALA: 50 mg/day) を設定し、CoQ10 : RALA = 2 : 5 (重量比) とした。得られた粉末を用い、70ºC・100 %RH の高温高湿下に静置した際の RALA の安定性、および胆汁酸 (タウロコール酸ナトリウム) 水溶液に対する CoQ10 の溶解性をそれぞれ評価した。

【結果・考察】手法 2 に関しては、攪拌時に懸濁液中で RALA 由来のポリマーが発生した。また、粉末中の RALA 含量は添加量の半分以下に低下しており、包接体の作製は不可であった。一方、手法 1 および手法 3 に関しては、ポリマーの発生は認められず、高温高湿下における RALA の安定性も高かった。加えて、胆汁酸水溶液に対しては、包接体の形成に伴う CoQ10 の溶解性向上が認められ、手法 3 よりも手法 1 の方が高値を示した。このことから、予め RALA を γ-CD で包接し、その後に CoQ10 を添加する手法が効率良く、優れた物性の 3 成分包接体を作製できることが明らかとなった。

cyclodextrin, coenzyme Q10, R-α-lipoic acid

発表責任者：上梶 友記子（yukiko.uekaji@cyclochem.com）

講演番号：4A02a13
講演日時：3 月 28 日 12:02～ センター2 号館 A02 会場

収縮能を有するウシ 3 次元筋組織の構築

Construction of three-dimensional contractile muscle tissue with bovine myocytes

○古橋 麻衣[1,2]、森本 雄矢[2]、島 亜衣[2]、仲村 太志[1]、石川 博[3]、竹内 昌治[2]([1]日清食品ホールディングス（株）グローバルイノベーション研究センター、[2]東京大学大学院　情報理工学系研究科、[3]筑波大学　医学医療系)
○ Mai FURUHASHI[1,2], Yuya MORINOTO[2], Ai SHIMA[2], Futoshi NAKAMURA[1], Hiroshi ISHIKAWA[3], Shoji TAKEUCHI[2] ([1]Nissin Foods Holdings Co., Ltd Global Innovation Center, [2]Graduate School of Information Science and Technology, The University of Tokyo, [3]Faculty of Medicine, University of Tsukuba)

【背景・目的】
世界人口の増加に伴い食肉需要も増大しており、早ければ 2030 年には食肉需要に供給が追い付かなくなるタンパク質クライシスが起こると予想されている。その解決策として代替肉の開発が進められている。培養肉は、代替肉の一種であり、骨格筋細胞を培養し筋肉組織を作製することで作られる。気候変動の影響を受けない安定的な生産が可能で、衛生管理も容易という利点がある。しかし、既存の食肉のような食感を持つ培養肉を実現するためには、生体外で生体組織により近い成熟した三次元筋組織を構築する必要があり、技術的課題は多い。昨年度の本大会では、培養肉の実現を目指した研究成果としてウシ三次元筋組織の構築法について報告した。本年度は、筋肉の機能の一つである「収縮能」を持つ、より成熟したウシ筋組織の作製に成功したので、その方法について報告する。

【方法・結果】
培養肉の材料である筋芽細胞は、分化過程で隣接の細胞同士が融合し、多核の筋管を形成する。さらに筋管中でのアクチン、ミオシンなどの筋収縮関連タンパク質の発現およびサルコメアの形成、筋小胞体によるカルシウム放出機構の構築等を経て筋収縮能を獲得する。牛肉から採取したウシ筋芽細胞をハイドロゲルに包埋し、両端を固定しながら三次元培養を行った。まず、ハイドロゲル素材としてコラーゲンを用いて三次元筋組織を作製、検討した。ビタミン C を添加した分化用培養液で 7 日間培養し、α-actinin に対する抗体による染色を行ったところ、サルコメア中に見られるα-actinin の縞状分布が観察されたが、収縮能は確認されなかった。そこで、培養 3 日目より 1 日 2 時間、電気刺激をかけながら培養した。その結果、およそ 3 本に 1 本の確率で収縮運動が認められた。さらに、フィブリンとマトリゲルを混合したハイドロゲルを用いて三次元筋組織を作製し、同様に電気刺激をかけながら培養した結果、作製したすべての筋組織で電気刺激に連動した収縮運動が確認された。以上より、収縮能を持つ成熟三次元ウシ筋組織の作製に成功した。現在、より大きな筋肉組織での電気刺激培養の検討および大型組織中心部への栄養供給機構の構築を行っている。

cultured-meat, three-dimensional culture, electrical stimulation

講演番号：4A03a02
講演日時：3 月 28 日 09:41～ センター2 号館 A03 会場

褐色様脂肪細胞不活性化を阻害する食品成分スクリーニング系の確立
A screening system for novel food-derived compounds to improve inflammation-induced in brown-like adipocyte

○森川 未織[1]、伊東 侑亮[1]、田中 未央里[2]、井上 博文[2]、後藤 剛[3]、河田 照雄[3]、上原 万里子[1]、高橋 信之[1]([1]東農大院農、[2]東農大応生、[3]京大院農)
○Miori MORIKAWA[1], Yusuke ITO[1], Miori TANAKA[2], Hirohumi INOUE[2], Tsuyoshi GOTO[3], Teruo KAWADA[3], Mariko UEHARA[1], Nobuyuki TAKAHASHI[1] ([1]Tokyo Univ. Agri Grad, [2]Tokyo Univ. Agri, [3]Kyoto Univ.)

現在、肥満は世界中で問題となっており、肥満人口は世界で 6 億人を超えている。その数は過去 40 年間で 6 倍になり、日本でも増加している。肥満は、糖尿病・脂質異常症・心疾患などの生活習慣病をはじめとする様々な疾患の要因となっており、肥満を予防・改善することは健康寿命を延ばす意味でも大変重要である。そのため近年では、肥満の予防・改善に効果がある食品成分の探索に注目が集まっている。

肥満は中性脂肪が脂肪細胞に過剰に蓄積した状態を指すが、この脂肪細胞には大きく分けて白色脂肪細胞、褐色脂肪細胞、ベージュ脂肪細胞の 3 種類がある。白色脂肪細胞は過剰なエネルギーを中性脂肪として貯め、必要な状況で脂肪酸として供給する役割があるのに対して、褐色脂肪細胞・ベージュ脂肪細胞といった褐色様脂肪細胞は蓄積した脂肪を消費して熱産生を行う役割がある。この褐色様脂肪細胞での脂肪消費にはエネルギー産生が伴わないため、褐色様脂肪細胞の活性化は脂肪消費のみを亢進させ、抗肥満につながると考えられている。しかし一方で、肥満や加齢により誘導される慢性炎症が褐色様脂肪細胞を不活性化することが明らかとなっている。したがって、炎症による褐色様脂肪細胞の不活性化を阻害する食品成分であれば、エネルギー消費の低下を抑えることで抗肥満につながると考えられる。そこで抗炎症作用を指標として、褐色様脂肪細胞の不活性化を抑える食品成分のスクリーニングが可能な細胞評価系の確立を本研究の目的とした。

まず、熱産生に関わる脱共役タンパク質 1(uncoupling protein 1:UCP1)の mRNA 発現レベルを褐色様脂肪細胞活性化の指標として、抗炎症作用を評価する実験系を確立させた。遺伝子導入が容易な間葉系中胚葉幹細胞 10T1/2 を用いて、分化誘導処理後、アドレナリン受容体アゴニストであるイソプロテレノール(Isoproterenol:ISO)を添加し、UCP1 の mRNA 量の増加を確認した。次に、ISO 添加の前に炎症性サイトカインである TNFα(Tumor Necrosis Factor-α)で処理することで、ISO 刺激による UCP1 の mRNA の増加が抑制されることを確認した。この系に食品成分を添加することにより、TNFαによる UCP1 の mRNA 発現抑制作用を解除する新規成分のスクリーニングが可能となる。既に抗炎症作用が報告されている食品成分を用いて現在、検討を進めている。また、UCP1 プロモーターにルシフェラーゼ遺伝子をつなげたレポータープラスミドを安定導入した細胞株を作成し、より簡便なスクリーニング系を確立も試みている。さらに 10T1/2 とマクロファージ細胞株 RAW264.7 との共培養系を構築し、より生体内に近い条件でスクリーニングする評価系も検討中である。

brown adipocyte, inflammation, food-derived compounds

発表責任者：高橋信之（nt204885@nodai.ac.jp）

講演番号：4A03a03
講演日時：3 月 28 日 09:52～ センター2 号館 A03 会場

アシタバ由来カルコンは 3T3-L1 脂肪細胞において脂肪分解およびベージュ化を促進する

Ashitaba chalcones promote lipolysis and browning in 3T3-L1 adipocytes

○長谷川 莉沙、劉 軼韵、北風 智也、山下 陽子、芦田 均 (神戸大院農)
○Risa HASEGAWA, Yiyun lIU, Tomoya KITAKAZE, Yoko YAMASHITA, Hitoshi ASHIDA (Grad. Sch. Agri. Sci., Kobe Univ.)

【目的】
近年、肥満は世界で最も一般的な疾患の一つであり、治療や予防は急務の課題である。肥満の予防や改善には脂肪細胞への分化抑制、脂肪分解、白色脂肪細胞のベージュ化の促進が有力な手段である。アシタバに含まれるカルコンである 4-hydroxyderricin (4HD)および xanthoangelol (XAG)は、抗菌作用、抗がん作用、末梢血管拡張作用、肝臓の脂質蓄積抑制作用などをもち、当研究室では、4HD および XAG が脂肪分化を抑制するということを明らかにしている。本研究では、4HD および XAG が脂肪分解と白色脂肪細胞のベージュ化に与える影響を検討することを目的とした。
【方法】
3T3-L1 細胞を 3-isobutyl-1-methylxanthine、dexamethasone、ならびに insulin を用いて分化誘導し、4HD あるいは XAG を 24 時間作用させた。脂肪分解を検討するため、遊離グリセロール量、SudanII染色による脂肪滴量の測定を行った。また、脂肪分解およびベージュ化に関連する因子のタンパク質発現量をウエスタンブロッティングにて検討した。さらに、AMP-activated protein kinase (AMPK) の関与を検討するため、AMPK 阻害剤である Compound C を用いて、4HD あるいは XAG の作用を、各種因子の発現をウエスタンブロッティングで検討した。
【結果】
4HD および XAG を 24 時間作用させた結果、脂肪分解とベージュ化の両方に関わる AMPK のリン酸化が上昇した。4HD および XAG は脂肪滴量を減少させ、さらに 4HD は遊離グリセロールを増加させた。脂肪分解に関わる因子のタンパク質発現量を検討したところ、4HD および XAG は AMPK の下流である acetyl-CoA carboxylase のリン酸化、carnitine palmitoyltransferase 1 の発現量を増加させた。また、ベージュ化に関わる因子である uncoupling protein 1、peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 –α、ならびに PR domain containing 16 の発現量も 4HD および XAG によって増加した。これらのベージュ化に関わる因子の発現量は、AMPK の阻害剤である Compound C を作用することによって減少した。以上のことから、アシタバに含まれるカルコンである 4HD および XAG は 3T3-L1 脂肪細胞において AMPK を介して脂肪分解およびベージュ化を促進し、肥満の予防や改善に寄与することが示唆された。
本研究は科学研究費補助金 17H00818 の助成を受けたものです。

browning, Ashitaba, 3T3-L1

講演番号：4A03a04
講演日時：3 月 28 日 10:03～ センター2 号館 A03 会場

ゲニステインによる NAD+合成関連酵素 NAMPT の発現制御メカニズムの解明
Genistein regulates NAD+ biosynthetic enzyme NAMPT in adipocytes
○渡邉 駿[1]、三谷 畳一[1]、片山 茂[1,2]、中村 宗一郎[1]([1]信州大院・総合理工（農学専攻）、[2]信州大・先鋭領域融合)
○ Shun WATANABE[1], Takakazu MITANI[1], Shigeru KATAYAMA[1,2], Soichiro NAKAMURA[1] ([1]Shinshu Univ., [2]Shinshu Univ. ICCER)

【目的】NAMPT (nicotinamide phosphoribosyltransferase)は NAD+合成経路の律速酵素である。近年、高脂肪食負荷によって脂肪組織中の NAMPT の発現量及び NAD+合成量が低下し、2 型糖尿病の発症につながることが報告されている。従って、脂肪組織中の NAMPT の発現量と NAD+合成量を増加することは、2 型糖尿病の予防・改善に繋がると考えられる。これまでの研究で私たちは、脂肪細胞における NAMPT の発現量を増加する食品因子として、大豆イソフラボンのゲニステインを発見した。さらに、ゲニステインは NAMPT を介して NAD+合成量とインスリン感受性を向上するアディポネクチンの発現量を増加することも見出した。本研究では、ゲニステインが NAMPT の発現を誘導する分子メカニズムの解明を目的とした。
【方法】脂肪細胞のモデル細胞としてマウス線維芽細胞株(3T3-L1)を用いた。NAMPT の転写活性を解析するために、*Nampt* のプロモーター領域を組み込んだレポータープラスミドを作製した。ゲニステインに磁気ビーズを結合したゲニステイン結合担体を作製し、脂肪細胞からゲニステイン結合タンパク質を探索した。9 週齢雄性 ICR マウスに、ゲニステイン(50 mg/kg body weight/day)を 2 週間経口投与し、脂肪組織における NAMPT のタンパク質発現量を解析した。
【結果と考察】レポーターアッセイの結果から、ゲニステイン単独では *Nampt* のプロモーター活性に影響はないものの、ゲニステインは脂肪細胞の転写因子 C/EBPβと協調的に *Nampt* のプロモーター活性を亢進することが示された。また、ゲニステインは内在性、外因性に関わらず C/EBPβのタンパク質発現量を増加した。つまり、ゲニステインは C/EBPβのタンパク質の安定性を向上することで、*Nampt* の発現を亢進することが明らかとなった。ゲニステイン結合担体を用いたプルダウンアッセイの結果、ゲニステインの標的タンパク質として細胞膜タンパク質の一つである Prohibitin 1 (PHB1)を同定した。大腸菌から発現・精製した組換え体 PHB1 を用いたプルダウンアッセイの結果、ゲニステインは PHB1 の SPFH ドメインに直接結合することが示された。PHB1 を siRNA でノックダウンしたところ、ゲニステインによる C/EBPβと NAMPT のタンパク質レベルの増加は抑制された。以上の結果から、ゲニステインは細胞膜上の PHB1 を直接標的として、細胞内のシグナル伝達を活性化し、その結果 NAMPT の発現量を増加することが示された。最後に個体レベルでのゲニステインの効果を検証した結果、ゲニステイン投与マウスの生殖器周辺脂肪組織において NAMPT のタンパク質量が有意に増加することが示された。

adipocytes, nicotinamide phosphoribosyltransferase, soy isoflavone

発表責任者：三谷 畳一（mitani@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：4A03a05
講演日時：3 月 28 日 10:14～ センター2 号館 A03 会場

AhR による体内時計の乱れを介した脂肪肝誘導のメカニズムとポリフェノールによる保護効果
Involvement of circadian disruption in AhR-induced fatty liver and prevention effect of polypfenols against circadian disruption
○野村 拓也[1]、北風 智也[2]、芦田 均[2] ([1]神戸大農、[2]神戸大院農)
○Takuya NOMURA[1], Tomoya KITAKAZE[2], Hitoshi ASHIDA[2] ([1]Fac. of Agric., Kobe Univ., [2]Dept. of Agrobiosci., Grad. Sch. of Agric. Sci., Kobe Univ.)

【目的】 末梢組織には約24時間周期の概日リズムが存在し、この乱れは脂肪肝などの生活習慣病に繋がる。BMAL1は24時間の発現周期を調節する時計遺伝子であり、DNA上のROREに結合するREV-ERBαやRORαによって自身の発現量が調節されている。芳香属炭化水素受容体 (AhR) は環境汚染物資であるベンゾピレン (B[a]P) などにより活性化され、脂肪肝や概日リズムの乱れを引き起こすが、これらの関係性は不明である。BMAL1KOマウスにおいて肝臓への脂質蓄積が増加することから、本研究ではAhRを介した脂質蓄積がBMAL1をはじめとする概日リズムの乱れを介しているという仮説のもと、そのメカニズムの解明とポリフェノールによる保護効果の検証を試みた。
【方法と結果】 マウス肝癌細胞Hepa1c1c7を2時間の血清刺激（50%FBS）で概日リズムに同調させたところ、*Bmal1*は約24時間周期の発現振動を示したが、B[a]Pによってこの発現振幅が低下した。この振幅低下はAhR欠損株Hepa1c1c12では観察されなかった。*Bmal1*のmRNA量が高値を示したB[a]P作用28時間目におけるタンパク質発現量を検証したところ、血清刺激条件下でのみ、B[a]PはBMAL1の発現量を減少させた。AhR阻害剤はB[a]PによるBMAL1の発現減少をキャンセルした。また、B[a]P作用48時間目において、SudanII染色で肝臓への脂質蓄積を評価した結果、血清刺激条件下でのみB[a]Pは脂質蓄積を誘導し、AhR阻害剤によりこの脂質蓄積は抑制された。siRNAを用いてBMAL1をノックダウンした結果、B[a]Pによる脂質蓄積は観察されなかった。また、BMAL1のプロモーター領域に存在するROREを介した転写活性をレポーターアッセイで評価した結果、BMAL1の発現量と同様に、B[a]Pは血清刺激時にのみ転写活性を低下させた。REV-ERBαはROREを介した転写活性を負に制御することから、B[a]PによるBMAL1の発現減少におけるREV-ERBαの関与を検討した。その結果、REV-ERBα阻害剤はB[a]PによるBMAL1の発現減少をキャンセルした。AhRのアンタゴニストとして機能するルテオリンやケンフェロールは、B[a]PによるROREを介した転写活性の低下とそれが誘導するBMAL1の発現量の減少を回復させた。
【考察】 B[a]PはAhRを介して、REV-ERBα依存的にROREを介した転写活性の低下及びBMAL1の発現減少を誘導し、肝臓への脂質蓄積を増加させることが明らかとなった。また、ルテオリンやケンフェロールは、AhRを介した概日リズムの乱れを保護し、これが誘導する脂肪肝を防ぐことが示唆された。
本研究は科学研究費補助金 17H00818の助成を受けたものです。

AhR, circadian rhythm, fatty liver

講演番号：4A03a06
講演日時：3 月 28 日 10:35～ センター2 号館 A03 会場

Cinnamtannin A2 の廃用性筋萎縮に対する作用

Effect for the disuse amyotrophy by Cinnamtannin A2

○鈴木 健太、平嶋 那由多、大山 栞、藤井 靖之、越阪部 奈緒美（芝浦工業大学）
○KENTA SUZUKI, Nayuta Hirashima, Shiori Oyama, Yasuyuki Fujii, Naomi Osakabe (Shibaura Institute of Technology)

【緒言】我々はこれまでに(-)-epicatechin の 4 量体である cinnamtannin A2 (A2)の単回経口投与後に熱産生タンパク質である uncouping protein protein (UCP-1) mRNA 発現が有意に上昇することを見出した。またこの作用はアドレナリンブロッカーの併用によってキャンセルされることから、A2 摂取により交感神経の活動が亢進することが示唆された [1)]。一方、β2 アドレナリン作動薬は骨格筋の肥大を誘導することが示されている [2)]。そこで本実験では、後肢懸垂によって誘発した廃用性筋萎縮モデルマウスを用いて、A2 の骨格筋に対する作用について検証を行うこととした。

【方法】C57BL/6J 雄性マウスを定常状態-vehicle、定常状態-A2、後肢懸垂-vehicle、後肢懸垂-A2 群の 4 群に分け、14 日間被験試薬を強制経口投与した。その後解剖し、後肢骨格筋のヒラメ筋、長趾伸筋、腓腹筋を摘出しこれらの重量の測定及び筋断面積の定量を行った。

【結果】ヒラメおよび腓腹筋において、後肢懸垂によって筋重量は有意に減少した。ヒラメ筋においてこの重量減少が A2 投与によって有意に抑制された。一方、長趾伸筋は各群において筋重量の顕著な変化は見られなかった。これらの骨格筋の凍結切片を作成し HE 染色後、筋断面積を測定した。ヒラメ筋および腓腹筋においては、定常状態-vehicle に比較して、後肢懸垂-vehicle 群で筋断面積ピークの有意な減少が見られた。また、長趾伸筋においては後肢懸垂による筋断面積の変化は見られなかった。一方、ヒラメ筋においては A2 投与によってピーク面積の減少が有意に抑制された。

【考察】以上のとおり、後肢懸垂によって遅筋であるヒラメ筋の重量の低下および筋断面積ピークの減少が認められたが、これらの変化は A2 投与によって抑制された。A2 は交感神経活動を亢進することが確認されていることから、β2 アドレナリン作動薬と同様にアドレナリン受容体を介した筋タンパク質合成の促進及び分解の抑制が関与することが示唆された。発表では、A2 の筋タンパク質合成の促進及び分解経路に対する影響についても併せて報告する。

引用文献
1)Nakagawa Y, et al. *PLos One*, July 2018.
2)Sato S, et al. *J biomed biotechnol,* November 2011

Cinnamtannin A2, muscle disuse atrophy, sympathetic nerve

講演番号：4A03a07
講演日時：3 月 28 日 10:46～ センター2 号館 A03 会場

プロポリス成分の褐色脂肪細胞化誘導と組織温度上昇機構の解明

Propolis-derived component induces the formation of brown-like adipocytes and thermogenesis in inguinal adipose tissue of mice

○兵頭 拓真[1]、西川 翔[1]、青山 広樹[1]、宮田 椋[2]、熊澤 茂則[2]、津田 孝範[1]([1]中部大・応生、[2]静岡県大・食品栄養)
○ Takuma HYODO[1], Sho NISHIKAWA[1], Hiroki AOYAMA[1], Ryo MIYATA[2], Shigenori KUMAZAWA[2], Takanori TSUDA[1] ([1]Chubu Univ., [2]Univ. of Shizuoka)

【目的】白色脂肪組織における「誘導型」褐色脂肪細胞の増加（褐色脂肪細胞化の誘導）は、熱産生によるエネルギー消費を亢進し体脂肪を減少させる。演者らはブラジル産プロポリスの主要成分である Artepillin C（ArtC）が褐色脂肪細胞化を誘導すること、その誘導機構には、ArtC が PPARγ のアゴニストとして作用し、褐色脂肪細胞化誘導に必須の因子である PRDM16 タンパク質の分解抑制が関与することを明らかにしている[1]。熱産生機構には、UCP1 依存性の機構以外にも、クレアチンが関わり UCP1 非依存性で、ベージュ脂肪細胞に特徴的な creatine futile cycle が明らかにされ、この機構の欠失は肥満に繋がることが報告されているている[2, 3]。本研究では、ArtC 投与による褐色脂肪細胞化誘導時における組織温上昇とその機構を明らかにすることを目的とした。

【方法】C57BL/6J マウスに ArtC を 1. 単回経口投与、2. 持続的に経口投与（4 週間）し、直腸及び褐色脂肪組織、鼠蹊部白色脂肪組織（iWAT）温度をデジタル温度計と温度プローブを用いて投与 1 時間後まで継続的に測定した。さらに 2 において、組織温上昇の機構として、Beige 脂肪細胞で特徴的に認められる creatine futile cycle を介した組織温上昇の関与を検討した。

【結果】マウスに ArtC を単回経口投与した場合は、直腸及びいずれの脂肪組織温度にも温度変化は認められなかった。一方、ArtC の持続的な投与では、褐色脂肪細胞化誘導が認められた iWAT において有意な組織温度の上昇が認められ、寒冷刺激による深部体温の低下を有意に抑制した。さらに ArtC を持続投与したマウスにおいては、creatine futile cycle の阻害により iWAT での温度上昇が有意に抑制され、この時 iWAT においては、クレアチンの生合成、取り込みに関わるタンパク質の発現量は有意に増加した。以上のことから、ArtC 投与による褐色脂肪細胞化誘導は白色脂肪組織温度の上昇を伴い、この機構の一つとして creatine futile cycle の関与が考えられた。現在、引き続き詳細な検討を進めている。

[1] *PLoS ONE* (2016) 11: e0162512.
[2] *Cell* (2015) 163: 643-655.
[3] *Cell Metab*. (2017) 26: 660-671.

brown-like adipocyte, propolis, thermogenesis

講演番号：4A03a08
講演日時：3 月 28 日 10:57～ センター2 号館 A03 会場

大豆タンパク質β-コングリシニンと運動の併用による褐色脂肪細胞化誘導作用

The combination of ß-conglycinin and excercise induces brown-like adipocyte formation in mice

○西川 翔、北村 泰聖、小島 拓也、津田 孝範（中部大・応生）
○Sho NISHIKAWA, Taisei KITAMURA, Takuya KOJIMA, Takanori TSUDA (Chubu Univ.)

【目的】

大豆タンパク質β-コングリシニンの摂取は、多様な健康機能をもたらすことが知られている。この中でβ-コングリシニンの摂取が体脂肪蓄積を抑制することが報告されている。他方、「運動」は多様な面で恩恵をもたらすが、運動により白色脂肪組織でベージュ脂肪細胞の増加（褐色脂肪細胞化）が誘導されることが明らかにされている。しかし運動のみの肥満予防、褐色脂肪細胞化の誘導は高強度運動が必要と考えられる。このような背景から、大豆タンパク質の摂取と運動を併用すれば比較的低強度運動、あるいは低用量でも効果（褐色脂肪細胞化誘導）が得られるのではないかと考えた。本研究では、大豆タンパク質 β-コングリシニンと運動の併用による「褐色脂肪細胞化の誘導」作用の検討を行った。

【方法】

実験動物としては C57BL/6J マウスを用い、コントロールとしてタンパク質源をすべてカゼインとした群をコントロール群、タンパク質含有量がコントロール群と同様になるように調製したβ-コングリシニン群について、その含有量を変化させた群を複数設け、4 週間摂取させた。この結果をもとに適切と考えられるβ-コングリシニン含有量を定めた。さらにβ-コングリシニン摂取と運動の併用による褐色脂肪細胞化の誘導作用を評価した。

【結果】

β-コングリシニン食の摂取は、皮下白色脂肪組織において強い褐色脂肪細胞化の誘導が認められた。次に褐色脂肪細胞化を誘導しない含有量の β-コングリシニンを添加した実験食と運動負荷を併用すると、運動負荷のみの群と比較して運動とβ-コングリシニンを併用した群では、褐色脂肪細胞化で認められる多房化形成や UCP1 タンパク質発現量が有意に増加した。以上の結果から、β-コングリシニンの摂取は、運動との併用で褐色脂肪細胞化を誘導すると考えられた。現在、引き続き解析を進め、作用機序の解明を試みている。

soybean protein, exercise, brown-like adipocyte

講演番号：4A03a09
講演日時：3 月 28 日 11:08～ センター2 号館 A03 会場

Fish Oil の肥満予防・改善に関する研究

Anti-obesity effect of fish oil

○石川 瑛未[1]、奥江 紗知子[2]、河野 勇気[1]、三浦 徳[1]、増澤（尾﨑）依[1]、細野 崇[1,2]、関 泰一郎[1,2]
([1]日大 生資科 生命化、[2]日大院 生資科 応生科)
○Eimi ISHIKAWA[1], Sachiko OKUE[2], Yuki KONO[1], Atsushi MIURA[1], Yori OZAKI-MASUZAWA[1], Takashi HOSONO[1,2], Taiichiro SEKI[1,2] ([1]Dept. of Chem. and Life Sci., Coll. of Bioresource Sci., Nihon Univ., Japan, [2]Dept. of Appl. Life Sci., Nihon Univ. Grad. Sch. of Bioresource Sci., Japan)

【目的】Fish oil（FO）は、白色脂肪組織のベージュ化を介してエネルギー代謝を亢進し、抗肥満効果を示すことが報告されている。本研究では FO の肥満予防効果に加えて、肥満マウスへの FO 給餌による肥満の改善効果について比較検討した。
【方法】《実験 1》C57BL/6J マウスを予備飼育後、ラード含有高脂肪食（LD; D12451, リサーチダイエット社製）を与える LD 群と FO 含有高脂肪食（FD; D05122102, リサーチダイエット社製）を与える FD 群に群分けした。LD もしくは FD を給餌して 4 週間飼育し、血液、各種臓器を回収した。
《実験 2》C57BL/6J マウス（10 週齢、雄性）に 8 週間 LD を給餌して作製した食餌誘導性肥満（DIO）モデルマウスを用い、そのまま LD を継続して給餌する DIO-LD 群と飼料を FD に切り替える DIO-FD 群に群分けした。飼料を切り替えて 4 週間飼育後、血液、各種臓器を回収した。実験 1 と実験 2 のマウスの血漿及び肝臓中のトリグリセリド（TG），コレステロール（Cho）を測定した。鼠径部白色脂肪組織は薄切標本を作製後ヘマトキシリン・エオジン染色並びに Ucp-1 タンパク質の免疫染色、qPCR による体熱産生関連遺伝子の発現量を測定した。また、肝臓における脂質代謝関連遺伝子の発現量についても qPCR により測定した。
【結果】《実験 1》FD 群の体重及び白色脂肪組織重量は LD 群と比較して低値を示し、血漿 TG, Cho 濃度及び肝臓 TG 含有量も低値を示した。FD 群の鼠径部白色脂肪組織の脂肪細胞のサイズは LD 群と比較して小さく、体熱産生関連遺伝子（Ucp-1, Dio2, Cidea）の発現量は LD 群と比較して FD 群で高値を示した。肝臓における脂質代謝関連遺伝子（Fas, Srebp1c）の発現は、LD 群より FD 群において低値を示した。《実験 2》DIO-LD 群の体重はわずかに増加した。DIO-FD 群では、DIO-LD 群と比較して体重の増加は緩徐であったが減少することはなく、FD には DIO マウスの肥満を改善する効果はなかった。DIO-FD 群の白色脂肪組織重量及び血漿 Cho 濃度は DIO-LD 群と比較して低値を示す傾向があったが、鼠径部白色脂肪組織における体熱産生関連遺伝子及び肝臓における脂質代謝関連遺伝子の発現には差がなかった。
【結論】通常マウスに FO を給餌すると LD 給餌マウスと比べて著しく体重増加が抑制され、肥満予防効果が示された。一方、DIO マウスに LD もしくは FO を給餌すると、LD 群と比較して FD 群では体重や白色脂肪組織重量の増加は緩徐になるものの肥満を改善することはなく、FO には肥満マウスに蓄積した脂質を積極的に燃焼する作用はないことが明らかになった。

fish oil, obesity, thermogenesis

講演番号：4A03a10
講演日時：3 月 28 日 11:19～ センター2 号館 A03 会場

メタボリックシンドロームにおけるレプチン抵抗性が皮膚中 I 型コラーゲン合成に及ぼす影響
Effects of metabolic syndrome related-leptin resistance on type I tropocollagen synthesis in skin
○山根 拓実、天野 莉夏、鈴木 裕大、瀧澤 絹華、金野 凌介、岩槻 健、大石 祐一（東農大応生科）
○Takumi Yamane, Rika Amano, Yudai Suzuki, Kinuka Takizawa, Ryosuke Konno, Ken Iwatsuki, Yuichi Oishi (Tokyo Univ. of Agric.)

【目的】皮膚は生命活動を維持する上で重要な組織であり、メタボリックシンドローム罹患者では皮膚機能が脆弱化することが報告されている。レプチン抵抗性は、メタボリックシンドロームの発症要因の一つとして考えられているが、レプチン抵抗性と皮膚機能の関連性は不明である。そこで、本研究ではメタボリックシンドロームモデルマウスを用いて、レプチンシグナルが皮膚の主要構成分子である I 型コラーゲン合成に及ぼす影響を検討した。
【方法】実験動物は、レプチン遺伝子が変異していることにより全身でレプチンシグナルが阻害されているメタボリックシンドロームモデルマウスである ob/ob マウスとそのコントロール（WT）マウスを用いた(8 週齢、雄性)。試験群は、WT 群、ob/ob 群及び ob/ob+Leptin（40 ug/day）投与群の 3 群を設け、2 週間後にマウス背部の皮膚をサンプリングし、合成されて間もないと考えられる I 型トロポコラーゲンを生理食塩水中に抽出し ELISA 法で測定した。さらに、マウス由来の初代培養皮膚線維芽細胞をサブコンフルエントに達するまで培養した後、プレートに播種し、スタベーション処理を行った。その後、Leptin（0, 10, 100 ug/mL）を添加し、24 時間後に培地を回収し、I 型トロポコラーゲン量を ELISA 法で測定した。
【結果】体重は、WT 群に比して ob/ob 群で有意な増加を示し、Leptin 投与により改善された。I 型トロポコラーゲン量は、WT 群に比して ob/ob 群で有意な減少を示し、Leptin 投与により改善された。皮膚線維芽細胞においては Leptin の添加濃度に依存して I 型トロポコラーゲン量が有意に増加した。
【考察】以上のことから、メタボリックシンドロームによるレプチンシグナルの阻害が I 型コラーゲン合成を減少させ、皮膚機能の脆弱化を惹起している可能性が示唆された。

Metabolic syndrome, Leptin, Skin

発表責任者：山根拓実（ty204887@nodai.ac.jp）

講演番号：4A03a11
講演日時：3 月 28 日 11:40～ センター2 号館 A03 会場

昆布連続摂取による日本人の体組成、血清脂質および甲状腺ホルモン濃度に及ぼす影響の検討：二重盲検並行群間試験
Effect of daily Konbu intake on the body composition, serum lipid and thyroid hormone levels in healthy adult Japanese: Double-blind, parallel-group trial.
○青江 誠一郎[1]、大歳 紘史[2]、中村 史子[3]、藤原 優[3] ([1]大妻女子大学家政学部、[2](株)マルヤナギ小倉屋、[3]ＣＰＣＣ株式会社)
○Seiichirou Aoe[1], Hiroshi Ohtoshi[2], Fumiko Nakamura[3], Suguru Fujiwara[3] ([1]Faculty of Home Economics, Otsuma Women's University, [2]Maruyanagi Foods Inc., [3]CPCC Company Limited)

【目的】昆布は、アルギン酸、ラミナランなどの食物繊維を豊富に含み、単離したアルギン酸ナトリウムには血清コレステロール低減作用が報告されている。しかし、昆布を摂取した際の影響についてはヨウ素を高濃度に含むためヒト介入試験例はわずかである。本試験では、健康な日本人を対象とし、昆布の連続摂取による影響を評価するため、煮沸処理してヨウ素を低減化した昆布粉末を 8 週間摂取した場合の、体組成、血清脂質ならびに甲状腺ホルモン濃度の変化を評価した。
【方法】試験は、倫理委員会の承認後、同意の得られた 20 歳以上 59 歳以下、BMI が 25 kg/m^2 以上 30 kg/m^2 未満の健康な男女 50 名で行った。事前検査時における内臓脂肪面積、BMI、年齢、性別、LDL-コレステロール濃度を考慮して割付を行い、50 名を 25 名ずつプラセボ群、昆布群の 2 群に、無作為に割当てた。昆布は、真昆布を 60 分間煮沸してヨウ素を低減化して乾燥、粉砕した乾燥昆布とした。昆布粉末 196.7mg を含む錠剤を 1 日 30 粒（毎食 10 粒）8 週間摂取した。試験食品 1 粒あたり、アルギン酸を 109.3mg/粒（3.28g/日）、ヨウ素を 34.3μg/粒（1.03mg /日）であった。8 週間後に体組成検査、血液検査を実施した。体組成は、内臓脂肪面積、BMI、体脂肪率を、血液分析は、総、LDL、HDL-コレステロール、トリグリセリド、甲状腺ホルモン(TSH,F3,F4)濃度を測定した。2 群間の比較は、対応のない t 検定または Welch の検定を行った。
【結果と考察】脱落例が 1 名と遵守事項違反による解析除外が 1 名おり、1 群 24 例ずつとなった。昆布群でアレルギー症状を呈した被験者が 1 例いたが、昆布アレルギーではなかった。体組成は男女差があり、層別に解析した結果、男性の体脂肪率の低下量は、昆布群がプラセボ群に比べて有意に大きかった。同様の傾向が、男性の体重(p=0.06) 、BMI (p=0.07)でも見られた。内臓脂肪面積も低下したが、有意差が認められなかった。これは、摂取期間が短かったこと、100 ㎠以上の被験者が少なかったことなどが原因と考えられた。血清脂質の結果より、脂質異常症の被験者を除いた健常者において、昆布群がプラセボ群に比べて、血清 LDL-コレステロール濃度が有意に低値を示した。総コレステロール濃度も同様の傾向を示した (p=0.05)。血清甲状腺ホルモン濃度の結果より、昆布の摂取による甲状腺ホルモン濃度の上昇は認められなかった。以上の結果、内臓脂肪型肥満傾向の男性において、昆布摂取は、体脂肪率を低下させ、体重を低減させる作用があることが示された。また、血清コレステロール濃度が高めの健常な男女において、昆布摂取は血清コレステロール濃度を改善することが認められた。さらに、1 日 1mg のヨウ素連日摂取は、甲状腺ホルモン濃度に影響しないことが示された。

Konbu, body composition, serum lipids

発表責任者：青江誠一郎（s-aoe@otsuma.ac.jp）

講演番号：4A03a12
講演日時：3 月 28 日 11:51～ センター2 号館 A03 会場

サイリウム種皮由来の食物繊維の機能性の検討―食後血中中性脂肪上昇抑制・食後血糖値上昇抑制・血圧低下作用―

The effects of dietary fiber derived from Psyllium husk –suppression of elevation of serum triglyceride, blood glucose, and lowering of blood pressure–

○吉沼 春香、井池 信子、田辺 創一、仲村 太志（日清食品ホールディングス（株）・グローバルイノベーション研究センター）
○Haruka YOSHINUMA, Nobuko INOIKE, Soichi TANABE, Futoshi NAKAMURA (Nissin Foods Holdings Co., Ltd Nissin Global Innovation Center)

【背景・目的】サイリウムはオオバコ科オオバコ属植物の種子または種皮を指し、食物繊維を豊富に含む食品素材である。サイリウム種皮由来の食物繊維（以下 P-DF）は高い保水力を持ち、吸水・膨潤すると独特の粘稠性を示す。我々は P-DF の摂取により、便中への食事由来の Na 排泄量が有意に増加したことをランダム化二重盲検クロスオーバー比較試験で明らかにしている [1)]。当該試験において便中へのナトリウム排泄量の増加と同時に、便中への脂質・糖質の排泄量が増加したことから、過剰な脂質・糖質・Na を吸収抑制することにより生活習慣病の予防・改善に役立つことが期待された。本研究では脂質・糖質・Na の便中排泄促進を作用機序とした P-DF の「食後の血中中性脂肪値の上昇抑制作用（試験 1)」「食後の血糖値の上昇抑制作用（試験 2)」「高めの血圧を下げる作用（試験 3)」について RCT で検証したので報告する。
【方法】試験 1：空腹時血中中性脂肪が 150mg/dL 未満を示した 20 歳以上 65 歳未満の男女 80 名を対象として、単回摂取のクロスオーバー比較試験を実施した。高脂質食の摂取前に試験食品を摂取し、摂取 6 時間後までの血中中性脂肪値を測定した。試験 2：空腹時血糖値が 125mg/dL 以下を示した 20 歳以上 65 歳未満の男女 50 名を対象として、単回摂取のクロスオーバー比較試験を実施した。高炭水化物食の摂取前に試験食品を摂取し、摂取 120 分後までの血糖値を測定した。試験 3：正常高値血圧（JSH2014）を示した 20 歳以上 60 歳未満の男女 72 名を対象として、12 週間摂取の並行群間試験を実施した。1 日 3 回の食事（朝・昼・夕食）の前に試験食品を摂取し、摂取 0, 4, 8, 12 週後に血圧測定を行った。いずれも試験食品は P-DF3.6g を含む粉末飲料または P-DF を含まない対照粉末飲料とした。なお、全ての試験において被験者には同意を得た上で、倫理的配慮の下、試験を実施した。
【結果】試験 1：血中中性脂肪値は P-DF 摂取により摂取 2, 3 時間後で有意に低値を示し、摂取 6 時間後までの血中中性脂肪値 iAUC(増分曲線下面積)も対照飲料摂取時と比較して有意に低値を示した。試験 2：血糖値は P-DF 摂取により摂取 30 分後で有意に低値を示し、摂取 120 分後までの血糖値 iAUC も対照飲料摂取時と比し有意に低値を示した。試験 3：1 日推定食塩摂取量（尿中 Na から算出）の平均値が被験者平均値以上の高塩分摂取者で、摂取 12 週後の収縮期血圧の変化量について P-DF 摂取群と対照群の間で有意差が認められ、P-DF の摂取によって収縮期血圧が低下することが明らかとなった。以上の結果から、P-DF の摂取が複数の機能性によって生活習慣病予防に寄与することが示された。
1)Yoshinuma H. et al., Jpn Pharmacol Ther. 2019, 47(9), 1509-1518

postprandial serum triglyceride, postprandial blood glucose, blood pressure

講演番号：4A03a13
講演日時：3 月 28 日 12:02～ センター2 号館 A03 会場

スダチ果皮エキスによるメタボリックシンドローム予防効果のランダム化二重盲検試験
Randomized controlled trial: Benefit of Sudachi peel intake on prevention of metabolic syndorome
○堤 理恵[1]、敷島 康普[2]、三浦 宏之[2]、阪上 浩[1] ([1]徳島大栄、[2]池田薬草株式会社)
○Rie TSUTSUMI[1], Yasuhiro Shikishima[2], Hiroyuki Miura[2], Hiroshi Sakaue[1] ([1]Tokushima Univ., [2]Ikeda Yakuso)

【背景】徳島県の特産物であるスダチは香りや味に特徴を有するだけでなく、その果皮にはスダチチンを始めとする特徴的なフラボノイドを有する。我々はこれまでに、ポリメトキシフラボノイドであるスダチチンの抗肥満・抗糖尿病作用をはじめ様々な機能性を報告してきた。今回我々は、メタボリックシンドロームの境界型に分類される人を対象とし、スダチ果皮エキス末を用いて継続摂取が内臓脂肪量や血清脂質値に与える影響について検討したので報告する。
【方法】本臨床試験は、特定非営利活動法人環瀬戸内自然免疫ネットワークの臨床倫理審査委員会の承認を得て行った。試験に用いたスダチ果皮エキス末は、池田薬草株式会社によりスダチ果皮より抽出・精製し。エイムズ試験、ラット急性毒性試験ならびにマウスにおける長期投与試験を行い安全性を確保した。被験者は上記自然免疫ネットワークに被験者登録されている者のうち BMI23kg/m^2 以上の希望者とした。被験食はスダチ果皮エキス末はカプセル形状として 12 週間の継続摂取とし、4 週間毎に身体計測、臍部内臓脂肪・皮下脂肪の CT 測定、血液・尿検査、血圧・脈拍などバイタルチェックを行った。統計解析には GraphPadPrism および JMP　SAS ソフトウェアを使用した。
【結果】脱落例を除いた最終試験参加者は 38 名、男女比 19：19、平均年齢は試験品群 46.5 歳、プラセボ群 46.8 歳であった。全脂肪面積（TFA）および内臓脂肪面積（VFA）は試験品群では摂取開始前と終了後では低下傾向にあり、皮下脂肪面積（SFA）では変化がなかった。VFA/SFA 比は試験品群で摂取開始前と比較して終了後に有意に低下した（p=0.044)。一方で体重、体脂肪率には両群とも変化がなかった。血圧は収縮期血圧には両群とも変化がなかったが、拡張期血圧は試験食品群で低下する傾向が認められた。また、血液検査では総コレステロール、LDL コレステロール、HDL コレステロールうなどの血清脂質値およびインスリン値、HbA1c など糖代謝県連指標には差は認められなかった。
【考察及び結論】これまでの動物試験の結果と一致してヒトにおいても内臓脂肪の減少が認められた。一方で血清脂質などには変化が認められなかった。今後はこれらのデータの層別解析により効果の得られる被験者層を明確化する。スダチチンの作用機序にはエネルギー代謝促進の可能性をこれまでに報告しているが、本試験食では他の有効成分も含有しており、より長期間の摂取によりメタボリックシンドロームの予防効果が得られる可能性が期待された。

sudachi, fat, supplement

発表責任者：堤　理恵（rtsutsumi@tokushima-u.ac.jp）

講演番号：4A03a14
講演日時：3 月 28 日 12:13～ センター2 号館 A03 会場

成人男性におけるフルクトース（果糖）摂取誘導内臓脂肪の蓄積に対するユーカリ葉抽出物の抑制効果試験

Eucalyptus leaf extract suppresses adiposity due to dietary fructose in Japanese adult men

○杉本 圭一郎[1]、藤澤 浩之[1]、中川 一弥[1]、此枝 三郎[1]、山内 俊一[2]([1]長岡香料、[2]柏たなか病院・糖尿病セ)
○ Keiichirou SUGIMOTO[1], Hiroyuki Fujisawa[1], Kazuya Nakagawa[1], Saburo Konoeda[1], Toshikazu Yamanouchi[2] ([1]Nagaoka Co., [2]Kashiwa Tanaka Hospital)

【目的】フルクトース（果糖）の過剰摂取は肥満、高血圧、インスリン抵抗性等を惹起すると報告されており、近年その摂取量増加が問題視されている。ユーカリ（*Eucalyptus globulus*）葉抽出物は、フルクトース過剰摂取に起因する内臓脂肪の蓄積を抑制し、作用機序として腸管におけるフルクトースの吸収を阻害することがラットを用いる vivo 実験により確認されている。パイロット試験として、我々は成人男性を対象に、4 週間フルクトースを摂取させて生ずる内臓脂肪の蓄積に対する ELE の抑制作用について検討した。

【方法】プラセボ対象ランダム化二重盲検交差試験法を用いた。成人男性を対象に、午後 3 時及び午後 9 時に負荷食としてフルクトースを含む飲料または食品を摂取させ（用量 20 g/日）、同時に試験食としてユーカリ群にはユーカリ葉抽出物入りゼラチンカプセル（用量 576 mg/日）を、プラセボ群には乳糖入りカプセルをそれぞれ 4 週間摂取させた。被験者 6 名（平均年齢 47±12 歳、BMI）を 2 群に分け、ウォッシュアウト期間を 4 週間として両群とも体験させた。摂取試験開始日及び試験終了日に検査を実施した。被験者には検査前日より絶食させ、検査項目として問診、理学検査、血液検査、尿検査を実施した。内臓脂肪の定量には CT スキャン及びデュアルスキャン法を用いた。本試験は CPCC 社に委託され、ヘルシンキ宣言に則りチヨダパラメディカルケアクリニック及び AIC 八重洲クリニックにて実施された。

【結果】試験食及び負荷食の摂取率は、全員 90%以上であった。試験期間中、有害事象は認められなかった。内臓脂肪面積は、デュアルスキャン法ではプラセボ群において 12%増加したのに対してユーカリ群では 7%減少し、ユーカリ葉抽出物による内臓脂肪の蓄積抑制作用が確認された。CT スキャン法により求めた数値も同様の傾向を示した。一方、BMI、腹囲、体脂肪率、皮下脂肪面積（CT スキャン法）については両群に有意な差異は認められなかった。血液検査、血液生化学検査においても両群間に有意差は認められなかった。以上より、1 日あたりフルクトースを 20 g 摂取すると 4 週間で内臓脂肪が増加し、1 日あたり 576 mg のユーカリ葉抽出物を摂取することでその増加が抑制されることが明らかになった。

Eucalyptus globulus , fructose, antiobesity

発表責任者：杉本　圭一郎（ksugimoto@npc-nagaoka.co.jp）

講演番号：4A03a15
講演日時：3 月 28 日 12:24～ センター2 号館 A03 会場

サンルージュの食後血糖上昇抑制作用とその関与成分の同定
Inhibitory effect of sunrouge on postprandial hyperglycemia and determining bioactivity-related ingredients
○渡邉 喬嗣[1]、和才 昌史[1]、藤村 由紀[1]、三浦 大典[2]、立花 宏文[1] ([1]九州大農、[2]産総研)
○ Mototsugu WATANABE[1], Masafumi WASAI[1], Yoshinori FUJIMURA[1], Daisuke MIURA[2], Hirofumi TATIBANA[1] ([1]Kyushu Univ., [2]National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)

「サンルージュ」は、日本で最も消費されている「やぶきた」などの緑茶品種と比較して成分組成に大きな違いがあり、高い生体調節作用が期待されている。近年、緑茶の飲用によるメタボリックシンドロームのリスク低減効果がコホート研究やヒト介入試験で報告されているが、有効性を示す具体的な品種や成分組成情報には不明な点が多い。そこで本研究では、サンルージュのメタボリックシンドロームの予防作用を評価するとともに、その作用を担う成分組成をメタボリック・プロファイリング法により明らかにすることを目的とした。

マウス経口デンプン負荷試験では、やぶきた茶葉抽出物の投与によりデンプン負荷後の血糖値上昇の有意な抑制は認められなかったが、サンルージュ茶葉抽出物は有意な血糖値上昇抑制作用を示したことから、サンルージュが抗糖尿病作用を有することが明らかとなった[1)]。

プラセボ対照ランダム化二重盲検クロスオーバー比較試験では、サンルージュの摂取による食後血糖上昇抑制作用が認められたことから[2)]、サンルージュを含む 42 種類の緑茶品種抽出物を用いたメタボリック・プロファイリング法により関与成分の同定を試みた[1)]。その結果、サンルージュは他品種と比べて高いα-グルコシダーゼ活性阻害作用を示したが、やぶきたにおいては当該活性が認められなかった。また、多変量解析により緑茶品種の成分組成とα-グルコシダーゼ活性阻害作用間に高い相関が認められ、その寄与成分としてガレート型カテキン、フラボノール配糖体、アントシアニン類を見出した。なかでも、やぶきたと比較してサンルージュに多い Epigallocatechin-3-*O*-(3-*O*-methyl) gallate (EGCG3"Me) や Epicatechin-3-*O*-(3-*O*-methyl) gallate (ECG3"Me) を新規のα-グルコシダーゼ活性阻害成分として同定した。一方、サンルージュよりもやぶきたに多い非ガレート型カテキン、カフェイン、テアニン含量が高いほど阻害作用が低いことも明らかとなった。以上の結果から、サンルージュの特徴的な成分組成がα-グルコシダーゼ活性阻害を通じた食後血糖上昇抑制作用に関与する可能性が示された。

1) Masafumi W *et al., Scientific Reports*, **8**, (1), 1 - 9, (2018)

2) Masafumi W *et al.*, *薬理と治療*, **45**, (1), 105 - 111 (2017)

Postprandial glycemia-lowering effect, Green tea, Metabolic profiling

講演番号：4A04a01
講演日時：3 月 28 日 09:30～ センター2 号館 A04 会場

加熱穀類に生成するバニリンの分析

HPLC analysis of vanillin in heated cereals

○都築 和香子、今場 司朗、小竹 英一（農研機構）
○Wakako TSUZUKI, Shiro KOMBA, Eiichi KOTAKE-NARA (NARO)

研究目的：

米や小麦等の穀類は収穫後の加工工程で加熱処理を受けることがある。例えば、貯蔵性を上げるために顆粒を加熱乾燥したり、全粒粉をより細かく挽くために炒ったりする。焙煎等で穀類を加熱処理すると「香ばしい香り」がすることは一般的に知られているが、その「香り」と加熱によるバニリン生成との関連性についてはわかっていない。我々の研究室は、すでに HPLC によるバニリンの分析法を確立していたので、本研究では、加熱条件と穀類中のバニリン量の変動との関連性を解明するために、加熱した穀類顆粒等に含まれるバニリン分析に応用した。

研究方法：

各穀類顆粒、米ぬか、小麦ふすま等の各穀類の副産物分画をガラスバイアルに入れて密封し、100-180℃の温度で加熱した。加熱後、溶媒抽出した分画を固相カラムで精製し、バニリン含有分画を HPLC に供して分析した。検出波長は、298nm あるいは 325nm に設定した。本分析で、バニリン以外に、クマル酸やフェルラ酸等の有機酸の分析も同時に行った。

研究結果：

穀類顆粒や穀類副産物を、様々な条件下で加熱したところ、バニリン生成量は、加熱温度と加熱時間に依存して増大することがわかった。また、試料 1g 当たりのバニリン生成量は、米ぬか＞小麦ふすま＞玄米＞小麦全粒の順になっていた。更に、各穀類を加熱したときのクマル酸やフェルラ酸の生成量の変動についても併せて報告する。ヒトのバニリンの感受性の閾値は非常に低く、10^{-6} ppm 以下といわれているが、本研究の HPLC 分析法で検出されるバニリン量は 10 μL 中に 0.1 ng 以上で、ヒトのバニリン感受性閾値より桁違いに多く、加熱後の穀類の香りにバニリンが何らかの影響を与えている可能性が示唆された。

vanillin, cereal, heated

講演番号：4A04a02
講演日時：3 月 28 日 09:41～ センター2 号館 A04 会場

ミルクコーヒーの高温処理が沈殿生成に及ぼす影響
The influence of high temperature treatment on occurrence of precipitate in coffee with milk
○森 夕希子[1]、田丸 竜万[1]、勝野 那嘉子[2]、西津 貴久[2]([1]岐阜大院・自然研、[2]岐阜大・応生)
○Yukiko MORI[1], Ryuma TAMARU[1], Nakako KATUNO[2], Takahisa NISHIZU[2] ([1]Graduate school of Natl. Sci. Tech, Gifu Univ., [2]Gifu Univ.)

【目的】ミルクコーヒーは高温で長期間保存した場合，沈殿を生じることがある。沈殿の発生を抑制するために安定剤が添加されるが，適正量はコーヒー飲料組成により異なる。当研究室ではミルクコーヒーの加熱処理直後の超音波位相速度の増加量に着目し，沈殿発生量が最小となる条件の時に位相速度増分が最小になることを見出し，沈殿抑制に有効な安定剤適正量を推定できる可能性があることを明らかにした。また長期高温保存を行うと位相速度が逆に減少することも明らかにした[1)]。本研究では，この位相速度の変化は沈殿物を構成する凝集体の生成によるものと考え，ローカストビーンガム(LBG)と牛乳によるモデル溶液，およびコーヒー原液を用いて，高温処理による凝集物生成の様子やその組成を明らかにすることを目的とした。
【実験方法】市販牛乳および LBG を用いてミルクコーヒーモデル(LBG 0 %，0.4 %，0.8 %)を調製し，非加熱のモデルおよびオートクレーブで加熱(121 ℃，30 min)し，その後 55 ℃で 2 週間保存したモデルについて沈澱の発生を確認した。遠心分離によって得られた上清および沈澱を SDS-PAGE 分析に供し，上清の全糖量をフェノール硫酸法，沈澱の粗たんぱく質量をケルダール法により測定した。また加熱牛乳に LBG を添加したモデル溶液を調整し，55℃1 日保存後の沈殿発生を確認した。同様に市販牛乳とインスタントコーヒー液(Brix 2.4，2.6，3.0，4.8)を用いて調整し，沈殿の発生を確認した。上清の全糖量をフェノール硫酸法，沈殿の粗たんぱく質量を燃焼法，脂質量をジエチルエーテル抽出，水分を絶乾法により測定した。
【結果および考察】LBG を含むモデル溶液では加熱・高温保存後に沈殿が発生した。また沈殿の主成分は乳由来のたんぱく質であったが，溶液中の LBG 濃度が高くなるほど沈殿に占めるたんぱく質量割合が減少することが明らかになった。また，加熱した牛乳に LBG を添加したモデル溶液については 55℃，1 日保存により沈殿が発生することが確認された。このことから，LBG の関わる凝集体生成は加熱処理時よりも，その後の高温保存期間に起こるものと考えられる。
コーヒー原液を用いたミルクコーヒーの凝集物の組成は大部分がたんぱく質，次いで糖質と脂質であった。Brix 値を高くすると，モデル溶液と同様に沈殿量は増加し，凝集物中のたんぱく質の割合は減少，糖質と脂質の割合がそれぞれ増加することが明らかとなった。
1) Nishizu T., Tamaru R., Katsuno N., Food Colloid Conference (Leeds, UK), 2018.

coffee with milk, precipitate, milk protein

発表責任者：西津　貴久（nishizu@gifu-u.ac.jp）

講演番号：4A04a03
講演日時：3 月 28 日 09:52～ センター2 号館 A04 会場

米粒内の貯蔵タンパク質が冷凍米飯の老化特性に与える影響

Effect of rice protein on freeze-thaw deterioration of cooked rice

○國枝 美沙[1]、橋本 朋子[2]、野口 由里香[2]、勝野 那嘉子[3]、西津 貴久[3]([1]岐阜大院・自然研、[2]日本水産株式会社、[3]岐阜大・応生)
○Misa KUNIEDA[1], Tomoko HASHIMOTO[2], Yurika NOGUCHI[2], Nakako KATSUNO[3], Takahisa NISHIZU[3] ([1]Graduate School of Natl. Sci. Tech. Gifu Univ., [2]Nippon Suisan Kaisha, Ltd., [3]Gifu Univ.)

【目的】　近年，冷凍米飯の需要が高まり，市場拡大が期待されている。急速冷凍により品質が保持され，いつでも手軽に美味しいものを食べられる点が消費者に受け入れられている一方で，冷凍期間が長くなると氷結晶の形成，澱粉の老化，冷凍焼けなどにより食品の外観や風味等を保ちにくい。

先行研究では精白米に含まれる成分と冷凍米飯の老化特性との関係性を品種別に検討した[1)]。その結果，タンパク質含有率と老化度には一定の相関がみられ，重要な因子であることが示唆された。また，各種酵素添加と老化との関係について検討したところ，リパーゼ添加によって老化抑制に効果が認められた。そこで，本研究では平成 30 年度日本産粳米を用い，炊飯時の酵素添加による冷凍中の老化度変化の定量評価とタンパク質の構造変化について検討した。

【方法】　供試米試料として平成 30 年度青森県産まっしぐらを用いた。米（150 g）に 1.35 倍量の水と 2 種類の酵素（リパーゼ 200 U，グルコースオキシダーゼ 1.5 U）を添加し，炊飯前に 1 時間浸漬した。炊飯直後のもの，炊飯後に 4 ℃で 3 日間冷蔵したもの，そして 24 時間周期で-25 ℃と 4℃の間で温度をステップ変動させて 4 日間貯蔵したもの（以下，加速試験区）をそれぞれ凍結乾燥して粉末試料を作製した。粉末試料を XRD（BRUKER，ADVANCED X-RAY SOLUTION D8 ADVANCE）に供し，X 線回折図（Cu K α 線）から老化度を決定した。また，炊飯・貯蔵中に作成した各試料において Ellman 法による遊離 SH 基含量測定を行い，酵素添加によるタンパク質の構造，特に S-S 結合形成の変化と老化度との関係について検討した。

【結果】　2 θ =17 ° にみられる X 線回折ピーク面積を老化度として評価した結果，酵素を添加することで無添加時よりも冷蔵および冷凍米飯の老化抑制傾向が確認された。さらに 2 種類の酵素を混合添加すると，加速試験区における老化度の有意な減少を示すことが明らかとなった。また，添加した酵素が炊飯中の米タンパク質の構造変化に寄与していることが予測されたため，炊飯中の米タンパク質の遊離 SH 基含量を測定した。どの試験区においても 80 ℃付近で遊離 SH 基含量が増加し，その後は徐々に遊離 SH 基含量が減少したが，酵素を添加するとその減少量は大きくなった。S-S 結合の形成は米の吸水を阻害することが知られている[2)]が，貯蔵中の離水にも影響して冷凍米飯の老化が抑制された可能性があると考える。

1)國枝美沙ら，日本農芸化学会 2019 年度大会　2)森高真太郎ら，栄養と食糧 Vol.25 No.1 42-45（1972）

cooked rice, retrogradation, protein

講演番号：4A04a04
講演日時：3 月 28 日 10:03～ センター2 号館 A04 会場

粥および水の添加量がグルテンフリー米粉パンの物理的性質に及ぼす影響について

Effect of rice porridge and water addition on physical properties of gluten-free rice bread

○池田 紗南、勝野 那嘉子、西津 貴久（岐阜大・応生）
○Sana IKEDA, Nakako KATSUNO, Takahisa NISHIZU (Gifu Univ.)

【目的】米粉のみを用いて焼成したグルテンフリー米粉パンは膨張に必要なグルテンを含まないため，膨らみの少ない硬いパンとなる．先行研究から，アルファ化米として粥を添加することで米粉パンの物性が改善される可能性が見出されている [1)]．しかし先行研究では，粥および水の適正量については検討されておらず，また粥添加のクラストに対する影響も不明であった．そこで本研究では，粥添加量および水添加量がクラムとクラストの物性および内部構造に及ぼす影響について検討した．
【方法】米粉パンは次の条件のように粥（岐阜県産コシヒカリ）または水の添加量を変えて，ホームベーカリーSD-BH1000（Panasonic 製）を用いて作製した．水，米粉，粥以外の配合は砂糖 20 g，塩 4 g，サラダ油 17 g，ドライイースト 3.4 g で作製した．
まず粥添加量の影響を検討するために，米粉 300 g のうち，0%，2.5%，5%，7.5%，10%にそれぞれ等しい重量の生米から作製した 8 倍加水粥をバッター調製時に添加してパンを焼成し試料とした．水添加量は粥の水分量と合わせて 275 g となるよう調節した. 次に水添加量の影響を検討するために，5%置換の配合で米粉重量に対して水添加量が 75%，80%，85%，91.7%，100%のパンを焼成し，試料とした．焼成したパンは，20℃，湿度 65%の恒温恒湿器内で 2 時間放冷後，菜種置換法で体積を測定し，さらに恒温恒湿器内に一晩放置した.焼成翌日にクラム・クラストの硬さはテクスチャーアナライザーを用い，内部構造の変化は X 線 μCT 装置を用いて評価した．
【結果および考察】粥添加量が多くなるに従って体積は大きくなり，クラムのヤング率，クラストの破断荷重はともに 5%置換までは減少したが，7.5%置換ではあまり変化はみられず，10%置換では側面・上部の破断荷重が増加した．粥の添加量が多くなるに従って，クラム・クラストとも膜厚・気泡径は減少したが，10%置換の気泡径が増加した．以上の結果から，クラム・クラストの硬さと体積は粥添加量に依存して変化し，7.5%置換で最も物性改善効果が認められた．次に加水量について検討したところ，加水量が多くなるに従って上部のへこみが大きくなり，パンの体積は減少した．加水量の増加に伴って，クラムのヤング率，クラストの破断荷重ともに減少し，膜厚は増加した．気泡径は，91.7%加水までは加水量が多くなるほど減少したが，100%加水では増加した．以上のことから，加水量の増加は，ヤング率や破断荷重を減少させるが，構造の維持が難しくなり体積が減少することが明らかとなった．
1） 白石莉子ら，美味技術学会誌，16（2），13－22，2018.

Gluten-free rice bread, Texture, Internal structure

講演番号：4A04a05
講演日時：3 月 28 日 10:14～ センター2 号館 A04 会場

グルテンフリー米粉パンの香気特性に関する研究

Study on aroma characteristics of gluten-free rice bread

○小笠原 萌、勝野 那嘉子、西津 貴久（岐阜大・応生）
○Moe OGASAWARA, Nakako KATSUNO, Takahisa NISHIZU (Gifu Univ.)

【目的】グルテンはパンの膨らみを維持する上で重要な役割を果たす一方，小麦アレルギーやセリアック病などの原因となるため，世界のグルテンフリー市場は年々拡大している。グルテンフリー米粉パンは，小麦粉を米粉で置き換え，グルテンを添加することなく作製される。グルテンフリー米粉パンの特徴として，小麦パンと比べて香りが弱いことや米臭さがあげられる。本研究では，グルテンフリー米粉パンと小麦パンの香気特性を比較し，米臭さの原因物質とその発生要因を明らかにすることを目的とした。

【実験方法】グルテンフリー米粉パンは，白石らの方法 [1]に従って 8 品種の米粉を用いて作製した。小麦パンは使用するホームベーカリー用の配合で作製した。原料，焼成前の生地，焼成後のパンを GC-FID 測定に供した。香気成分は，SPME 法(使用ファイバー：85 μm Carboxen/PDMS. Stableflex)を用いて抽出した。香気成分の同定には GC-MS を用い，各成分の匂いの確認には GC-O を用いた。また，それぞれのクラムを用いて香気の特徴に関する官能評価を行った。

【結果及び考察】グルテンフリー米粉パンと小麦パンのクラムを用いた官能評価において，香気の特徴として発酵臭をあげたパネルは小麦パンの方が多かった。
グルテンフリー米粉パンのクラムからは，エタノール，2-メチル-1-プロパノールなどのアルコール類，ヘキサナール，ノナナールなどのアルデヒド類，酢酸，イソ酪酸などのカルボン酸類，2-ペンチルフランなどの複素環式化合物が同定された。グルテンフリー米粉パンと小麦パンのクラム香気成分を比較したとき，グルテンフリー米粉パンには，1-ヘキサノールや 1-オクテン 3-オール，ヘキサナール，ノナナールが含まれていたが，小麦パンでは検出されなかった。よって，グルテンフリー米粉パンは脂質酸化によって生成されるアルコール類やアルデヒド類の種類が多いことが明らかとなった。また，グルテンフリー米粉パンの製造工程別に生地の香気成分分析をしたところ，ねかしやミキシングの段階から香気成分の生成が始まっており，米粉に加水した際に発生する香気成分が，最終的なパンの香気にも影響していることが明らかとなった。

1) 白石莉子ら，美味技術学会誌，16(2)，13-22，2018

Gluten-free rice bread, Volatile compounds, Gas chromatography

講演番号：4A04a06
講演日時：3 月 28 日 10:35～ センター2 号館 A04 会場

アカモク添加によるパンの保水性への影響

Effect of water increased Akamoku Bred on Their Physical Characteristics

○村上 香、志田 桃、正岡 智輝（広島工業大生命）
○Kaori Murakami, Momo Shida, Tomoki Masaoka (Hiroshima Institute of Technology)

【目的】我々はこれまでに、海藻アカモク *Sargassum horneri* (Turner) C. Agardh は、ミネラルや食物繊維を豊富に含むことや、湯通し凍結乾燥粉末の経口摂取によるラットの糞便量の増加および血中コレステロール上昇抑制効果を有することを確認し、機能性食品素材としての可能性を示した*。さらに、アカモクはフコイダンやアルギン酸などの保水力のある粘質多糖質を含むため、パン生地に加えることで品質の向上が期待でき、昨年度大会では、1 または 3Baker's%アカモク粉末添加パンの標準パンに対する重量増加を示し、アカモク添加はパンの保水性に影響を与えることが示唆された**。そこで、本研究では、アカモク添加パンへの水分追加による製パン性への影響について調べた。
【方法】材料を混捏後、30℃、40 分間一次発酵させ、ガス抜きをして 2 分割して成型し、それぞれ 0.75 斤食パン型に入れ、40℃、30 分間二次発酵して、180℃のオーブンで 35 分間焼成した。放冷後、スライサーを用いて 2 cm 間隔にカットした。なお、標準の材料に、1Baker's%でアカモク粉末を添加して、水を 5、8.3 および 11.7Baker's%追加で添加した。それぞれ、標準パン、標準アカモクパン、5%加水パン、8%加水パン、および、12%加水パンとした。水分含量は、常圧加熱乾燥法で、テクスチャーは TENSIPRESSER My boy II system を用いて測定した。
【結果・考察】標準パンの重量は 202±1 g に対して、12%加水パンは 190±0 g に有意に減少していた（Tukey $p<0.05$）。これは生地の水分が過剰であったためとまりが悪く、生地の損失につながったことが影響していると考えられた。水分含量では、標準パンは 32.6±1.0%に対して、標準アカモクパンは 33.4±1.8%、5%加水パンは 33.0±1.5%、8%加水パンは 37.0±0.6%、12%加水パンは 38.0±0.5%と増加していた。テクスチャーでは、標準パンに対して、8%および 12%加水パンは硬さおよびガム性が有意に高く、凝集性は有意に低かった（Tukey $p<0.05$）。比容積は、標準アカモクパンは 5.39±0.10 g/cm^3 で軽い食感であったが、8%および 12%加水パンは 4 g/cm^3 に近くなり、やわらかさと重量感のバランスがよい標準的な食感になった。以上の結果より、1Baker's%アカモク粉末添加パンには 8.3Baker's%の水の追加が適することがわかった。

*5th International Dietary Fibre Conference (2012) p.159, International Conference and Exhibition on Nutraceuticals and Functional Foods 2012 (2012) p.155, *J Food Compost Anal*, 24 (2011) 231–236, 2013年度日本農芸化学会大会要旨集 (2013) 3A20p01, **2019年度日本農芸化学会大会要旨集（2019）4B3a01

Seaweed, Bread, Physical Characteristics

講演番号：4A04a07
講演日時：3 月 28 日 10:46～ センター2 号館 A04 会場

ヒメマツタケ抽出残渣由来の抽出液が有する免疫チェックポイント阻害活性

Immune checkpoint inhibitory activity of the extract from *Agaricus blazei* Murrill extract residue

○小堀 一[1]、原田 栄津子[2]、多田 有人[1]、森園 智浩[1]、戸田 雅昭[2]、ダレッサンドロガバザ コリナ[2]、ガバザ エステバン[2] ([1]岩出菌学研究所、[2]三重大医)
○Hajime KOBORI[1], Etsuko HARADA[2], Naoto TADA[1], Toshihiro MORIZONO[1], Toda Masaaki[2], Corina N. D'alessandro-Gabazza[2], Esteban C. Gabazza[2] ([1]Iwade Research Institute of Mycology CO., Ltd, [2]Mie University, School of Medicine)

【背景・目的】ヒメマツタケ（*Agaricus blazei* Murrill）は、ブラジル南部原産のハラタケ属に属する食用および薬用キノコである。岩出亥之助博士が世界で最初に人工栽培法を開発し[1)]、1975 年頃から、株式会社岩出菌学研究所により栽培・提供されている[2)]。ヒメマツタケは様々な生物活性、例えば免疫賦活活性、抗ガン活性、抗アレルギー活性などを示すことが明らかになっており、中でも、多糖体β－(1→6)－D－グルカン−タンパク質複合体（FⅢ-2-ｂ画分）[3)]がマクロファージや NK 細胞、樹状細胞などを活性化して、ガンに対して高い増殖抑制作用をもつことが明らかとなっている[4)]。昨年度の本大会では、ヒメマツタケのアルカリ抽出液を肺ガンモデルマウスに投与した結果、「免疫チェックポイント分子」であるガン細胞上で発現するリガンド、PD-L1（Programmed cell death ligand 1）および PD-L2（Programmed cell death ligand 2）などの発現を低下させる活性（免疫チェックポイント阻害活性）を有することを報告した[5)]。本研究では、免疫チェックポイント阻害活性を有するヒメマツタケ由来の抽出画分の更なる探索を目的とした。その結果、これまで廃棄されていたヒメマツタケの抽出残渣を亜臨界水抽出することで得られた抽出物が、免疫チェックポイント阻害活性を有することが判明した。
【方法・結果】ヒメマツタケ（岩出 101 株）子実体を 80～100℃の熱水で 3 時間抽出することにより得られた熱水抽出残渣を乾燥後、2～5MPa、120～200℃の条件下で 5～240 分間亜臨界水抽出した。抽出懸濁液をろ過することにより、抽出残渣とろ液に分画した。ろ液を凍結乾燥に供し、ヒメマツタケ子実体熱水抽出残渣亜臨界水抽出物を得た。この抽出物を A549 肺ガン細胞に対する *in vitro* での免疫チェックポイント阻害活性試験に供した。その結果、A549 肺ガン細胞における免疫チェックポイント分子（PD-L1、PD-L2）や AXL のいずれに関しても、その発現が有意に抑制されることが明らかとなった。

1）岩出　亥之助，日本菌学会会報，23，(1982)，p. 544-546
2）伊藤　均ら，三重大学地域共同研究センター研究報告，11，(2004)，p. 45-50
3）H. Kawagishi，*et al.*，*Carbohydrate Research*，186，(1989)，p. 449-452
4）水野　卓ら，キノコの化学・生化学，学会出版センター，p. 225
5）原田　栄津子ら，2019 年度日本農芸化学会大会講演要旨集

Agaricus blazei Murrill, subcritical water extraction, immune checkpoint inhibitory activity

講演番号：4A04a08
講演日時：3 月 28 日 10:57～ センター2 号館 A04 会場

高オレイン酸系統大豆を用いた豆腐の構造特性における脂質の影響

Effect of lipids on structural characteristics of tofu made from high oleic acid soy beans

城野 愛巳、○丸岡 早紀、江口 日向子、穴井 豊昭、渡邉 啓一（佐賀大農）
Manami JYONO, ○Saki MARUOKA, Hinako EGUCHI, Toyoaki ANAI, Keiichi WATANABE (Saga Univ.)

【目的】佐賀大学で開発された高オレイン酸系統大豆は、通常の大豆と比較して著しくオレイン酸含量が高い脂肪酸組成を有する。本研究では、高オレイン酸系統大豆を用いて作成した豆腐の構造を、国産大豆の中で最もよく利用されている品種フクユタカと比較し、さらにその構造の違いが脂肪酸組成の違いによるものかを明らかにすることを目的とした。
【方法】豆乳作成のため、乾燥大豆に 3 倍量の水を加え、15℃で 15 時間浸漬後、乾燥大豆の 5 倍量の水を加えて粉砕した。沸騰するまで 10 分間加熱後、90℃以上を保ち 20 分間加熱した後、こし布で絞ったものを豆乳とした。豆腐は、にがりを凝固剤として作製した。また、分離大豆タンパク質（SPI）は、大豆の脱脂粉末を水に懸濁後、pH 8.0 で抽出し、pH を 4.5 に下げ沈殿物として分離した。得られた SPI を pH 7.0 で水に溶解、凍結乾燥後、冷蔵保存した。SPI 粉末に 60 mg/mL となるように水を加え溶解し、大豆油を 5%（v/v）添加し、超音波処理により乳化した。これに凝固剤として $CaSO_4$ を添加し、再構成した豆腐を作製した。タンパク質は、Lowry 法による定量、SDS-PAGE、二次元電気泳動、脂肪酸組成は GC で分析した。豆腐の微細構造は走査型電子顕微鏡（HITACHI SU-1500）を用いて観察した。
【結果・考察】豆乳のタンパク質含量および組成は、高オレイン酸系統とフクユタカに違いは認められなかった。しかし、脂肪酸組成は、フクユタカがオレイン酸 21.1%、リノール酸 56.8%であったのに対し、高オレイン酸系統は、オレイン酸 86.4%、リノール酸 2.3%であった。さらに 8000 倍に拡大した微細構造の観察では、高オレイン酸系統はフクユタカより、100 nm レベルの密度の高い微細構造が見られた。そこで、この構造の違いが、大豆油の違いによるものかを明らかにするために、フクユタカの SPI にフクユタカ及び高オレイン酸系統の大豆油を添加し乳化後、再構成豆腐を作成した。その結果、フクユタカ大豆油と高オレイン酸系統大豆油を用いた豆腐では、微細構造の違いが確認された。8000 倍に拡大するとフクユタカ大豆油では、1 μm 程度の均一な網目状構造が観察された。一方、高オレイン酸系統大豆油では、さらに密度の高い 100 nm 以下の網目構造が観察された。この結果は、2 種の大豆から直接調製した豆乳を用いて作成した豆腐の微細構造の観察結果と一致していた。以上の結果より、この大豆油中の脂肪酸組成の違いが豆腐の微細構造に大きな影響を及ぼすことが示唆された。

tofu, high oleic acid soy beans, soybean oil

発表責任者：渡邉　啓一（watakei@cc.saga-u.ac.jp）

講演番号：4A04a09
講演日時：3 月 28 日 11:08～ センター2 号館 A04 会場

塩類が亜臨界水中での単糖の異性化 に及ぼす影響とその速度論的解析

Effects of salts on the isomerization of monosaccharides in subcritical water

○古城 侑也、谷 史人、小林 敬（京大院農）
○Yuya Furushiro, Fumito Tani, Takashi Kobayashi (Kyoto Univ.)

【緒言】亜臨界水は加圧することにより、100℃以上でも液体状態を保った水のことであり、比誘電率が低く、各種バイオマスからの有用物質の抽出に利用されている。また、亜臨界水はイオン積が大きく、バイオマスに種々の反応を引き起こすことが知られており、糖やアミノ酸などに対して異性化や脱水縮合などの反応を起こすことが、明らかになりつつある。

食品の調理において、食塩は多用されている。一方、亜臨界水の調理への応用も期待されている。しかし、亜臨界水中での食塩が果たす役割についての具体的知見は不足している。そこで、本研究では各種塩類の水溶液を亜臨界状態に保ち、グルコースおよびフルクトースを処理した。そして、その際に生起する反応について、塩類の効果を検討するとともに速度解析を実施した。

【方法】グルコースまたはフルクトースを終濃度が 5%となるように蒸留水またはアルカリ金属、アルカリ土類金属の塩化物の水溶液（0.5 mol/L)に溶解した。糖溶液を管型反応器に通液し、200℃で亜臨界処理を実施した。得られた反応液の原料糖および生成物の濃度を HPLC で測定した。

【結果・考察】グルコースを蒸留水または 0.5 mol/L のアルカリ金属、アルカリ土類金属の塩化物の水溶液中で亜臨界処理(200℃)したところ、塩類を加えることにより、グルコースからフルクトースへの異性化が促進された。また各条件において、グルコースからマンノースへの異性化はほとんど観測されなかった。さらに、各塩類を添加することで処理液の pH の低下が加速した。この結果から、各塩類が単糖の分解による有機酸の生成も促進することが示唆された。同様にフルクトースを蒸留水または 0.5 mol/L のアルカリ金属、アルカリ土類金属の塩化物の水溶液中で亜臨界水処理(200℃)したところ、塩類を添加することにより、フルクトースの分解が促進された。また、アルカリ金属の塩化物を添加した場合よりも、アルカリ土類金属の塩化物を添加した場合の方がグルコースの異性化、有機酸の生成およびフルクトースの分解が促進された。

速度解析に関して、フルクトースの分解をフルクトース濃度と水素イオン濃度に依存する二次反応であると仮定して式を実験値とフィッティングさせた。その結果、塩を添加していない条件、添加している条件共に実験値を良好に表現できた。

【謝辞】本研究は、JSPS 科研費（17K07814）およびソルト・サイエンス研究財団研究助成（No. 1654）により実施した。

subcritical water, isomerization, salt

講演番号：4A04a10
講演日時：3 月 28 日 11:19～ センター2 号館 A04 会場

亜臨界水中での希少糖の合成に及ぼす緩衝液の影響

Effects of the buffer on the formation of rare sugars in subcritical water

○尾西 佑一朗[1]、古城 侑也[2]、平山 祐輔[2]、安達 修二[3]、谷 史人[2]、小林 敬[2] ([1]京大農、[2]京大院農、[3]京都先端大)
○Yuichiro ONISHI[1], Yuya FURUSHIRO[2], Yusuke HIRAYAMA[2], Shuji ADACHI[3], Fumito TANI[2], Takashi KOBAYASHI[2] ([1]Kyoto univ., [2]Kyoto Univ., [3]Kyoto Univ. Adv. Sci.)

【緒言】亜臨界水は、加圧条件のもと、100~374℃で液体として存在する水である。亜臨界水はイオン積が常温の水に比べて大きく、酸または塩基触媒として働くため、種々の反応への応用が期待されている。食品の代表的な成分である糖を亜臨界水処理すると、多糖の加水分解、単糖の分解、並びに異性化が起こる。異性化はアルカリ条件下で還元糖からエンジオールを介し、2 位のエピマーであるアルドース及びケトース間の相互異性化によって進行する。例えばグルコース溶液を亜臨界水処理するとフルクトースとマンノースが、ガラクトース溶液を亜臨界水処理するとタガトースとタロースが生成する。しかし水中で処理しても、異性化糖の収率は著しく低い。そこで本研究では、種々の糖について添加物を加えるなど、反応条件を変化させることで異性化糖の収率の改善を検討した。
【方法】グルコース、ガラクトース、マルトース、アラビノースまたはキシロースを終濃度が所定の濃度（1～20%）となるように蒸留水またはリン酸緩衝液（5~200 mM）、または種々の緩衝液（10 mM）に溶解した。糖溶液を管型反応器に通液し、100~200℃で亜臨界水処理を実施した。得られた反応液の原料糖及び生成物の濃度を HPLC で測定した。
【結果・考察】ガラクトースを水または 10 mM リン酸緩衝液中で亜臨界水処理（100~200℃）したところ、ガラクトースの分解は高温になるほど速く、その分解量は増加した。また、リン酸緩衝液中では、反応はさらに速かった。そして、タガトースが主生成物として生成した。蒸留水中では高温で処理するほどその最高収率は高かったが、分解も速かった。緩衝液中では異性化は促進されたが、タガトースの分解はあまり認められなかった。さらに、少量のタロースの生成も確認された。

ガラクトースをリン酸緩衝液中（5~200mM）において 140℃で亜臨界水処理したところ、タガトースの収率は緩衝液濃度が高いほど増加する傾向が確認されたが、その程度は顕著ではなかった。しかし、タロースの収率は著しく増加した。

グルコース、キシロース、アラビノースの処理においてはそれぞれフルクトース、キシルロース、リブロースが主生成物として生成し、反応挙動はガラクトースと同様であった。グルコース、アラビノースについてはそれぞれ少量のマンノース、リボースが生成した。マルトースの処理では、蒸留水中での加水分解が速く、グルコースが主生成したが、リン酸緩衝液中では、加水分解はあまり進行せず、マルツロースが主生成した。

【謝辞】本研究は JSPS 科研費（17K07814）の助成により実施した。

subcritical water, rare sugar, isomerization

講演番号：4A04a11
講演日時：3 月 28 日 11:40～ センター2 号館 A04 会場

ファージディスプレイ法を用いた過酸化脂質修飾タンパク質抗体の解析

Phage display-based analysis of antibodies against lipid peroxidation-modified proteins

○阿南 優佑、佐々木 栄太、板倉 正典、近澤 未歩、内田 浩二（東大院農生科）
○Yusuke ANAN, Eita Sasaki, Masanori Itakura, Miho Chikazawa, Koji Uchida (Grad. Sch. Agric. and Life Sci., Univ. of Tokyo)

【背景・目的】生体内の脂質が酸化されると様々な炭素鎖長を持つ過酸化脂質が生じる。これらの過酸化脂質には、化学的反応性の高いアルデヒド基を有するものが多く、タンパク質や核酸などの生体分子と反応し、構造変化や機能不全を引き起こす。我々はこれまでに、自己免疫疾患の全身性エリテマトーデス (SLE) モデルマウス血清中の過酸化脂質 4-oxo-2-nonenal (ONE) 修飾タンパク質に対する抗体価の上昇を確認し、そのモノクローナル抗体を作製している (Otaki *et al.*, JBC, 2010)。さらに、その抗体は DNA に対しても交差性を示すことが分かっている。また自己免疫疾患患者やモデルマウスからハイブリドーマ法によって DNA に結合する様々な自己抗体が単離されており、配列に関する研究の報告は多数存在するが、抗体工学的な手法による自己抗体の解析はあまりなされていない。そこで本研究では、ファージディスプレイ法を用いて自己免疫疾患モデルマウスから抗 ONE 修飾タンパク質抗体を作製し、その生理的・病態生理学的意義を解明することを目的とする。

【方法・結果】まず自己免疫疾患モデルである MRL-lpr マウス由来の抗 ONE 抗体を得るために、様々な抗体をファージのコートタンパク質に提示したファージ抗体ライブラリを作製した。抗体は可変領域の V_H と V_L ドメインをリンカーで結合し、一本鎖 (scFv) 抗体とすることで M13 ファージに提示した。ONE 修飾タンパク質に結合する抗体をスクリーニングした結果、8 種類の scFv 抗体が得られ、そのうちの数種類は DNA にも結合した。また DNA に結合する抗体のスクリーニングにより得られた抗体はすべて ONE 修飾タンパク質に結合した。さらにスクリーニングの過程で、V_L ドメインを欠損した V_H ドメインのみの抗体が確認された。そこで、ドメイン単体で抗体が ONE 修飾タンパク質と結合するのではないかと仮定し、得られた scFv 抗体の V_H, V_L ドメインをそれぞれ単体でファージに提示したシングルドメイン抗体 (sdAb) ファージを作製した。ELISA 法により測定したところ、数種類の sdAb ファージにおいて ONE 修飾タンパク質と DNA への結合が確認された。続いて scFv 抗体とその V_H, V_L ドメインをそれぞれ発現し、親和性解析を行ったところ、ONE 修飾タンパク質と DNA 両方に結合する sdAb 抗体が存在した。現在、抗 ONE 抗体の ONE 修飾タンパク質と DNA に対する結合は V_H, V_L ドメインの組み合わせにより獲得されるのか、またはドメイン単体の寄与によるものなのかを検証するために複数の scFv, sdAb 抗体の親和性解析を行っているところである。

Phage display, Lipid peroxidation, Antibody

発表責任者：阿南優佑（y-anan@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4A04a12
講演日時：3 月 28 日 11:51～ センター2 号館 A04 会場

ローヤルゼリーが骨格筋萎縮モデルと筋芽細胞の骨格筋代謝に及ぼす影響
Effects of royal jelly on skeletal muscle metabolism in C2C12 myotubes and mice model of skeletal muscle atrophy.
○岡本 秀人[1]、白川 智彦[2]、松原 琢磨[2]、奥村 暢章[1]、古株 彰一郎[2]([1]株式会社山田養蜂場本社　みつばち健康科学研究所、[2]九州歯科大学　健康増進学講座　分子情報生化学分野)
○Hideto OKAMOTO[1], Tomohiko SHIRAKAWA[2], Takuma MATSUBARA[2], Nobuaki OKUMURA[1], Shoichiro KOKABU[2] ([1]Institute for Bee Products and Health Science, Yamada Bee Company, Inc., [2]Division of Molecular Signaling and Biochemistry, Department of Health Improvement, Kyushu Dental University.)

【目的】ローヤルセリー(RJ)は、ミツバチが作り出す天然物質で、ミツバチの女王蜂化を決定付けることから、古くから老化防止や滋養強壮に有効であることが期待されている。我々は以前の本大会で RJ を若齢期から長期摂取することで、加齢に伴う運動機能低下を予防できることを動物レベルで示してきた。また近年 RJ を 12 カ月飲用した時に高齢者の筋力低下を予防できることが臨床レベルで報告されていることから、RJ が骨格筋機能を調節し健康寿命に寄与することが考えられている。そこで本研究ではマウス除神経性骨格筋萎縮モデルと骨格筋培養細胞を用い、RJ が骨格筋機能に及ぼす影響を検討した。
【方法】4 週齢の雄マウスに、生 RJ をプロテアーゼ分解後凍結乾燥した酵素分解 RJ を、終濃度 0.5%となるように粉末飼料に加え、2 週間投与した。その後右坐骨神経を切除し、左坐骨神経に対しては偽手術を行った。手術 6 日後に腓腹筋を回収し、筋萎縮関連遺伝子や骨格筋分化マーカー遺伝子の発現量を定量的 RT-PCR で解析した。また、マウス筋芽細胞 C2C12 細胞に RJ を添加し、2 日後に WST-8 法と Ki-67 免疫染色にて細胞増殖能を測定した。また、RJ による筋線維分化への影響を検討するために、C2C12 細胞に対して 2%ウマ血清を含む分化誘導培地及び RJ 含有分化誘導培地で 4 日間培養後、ミオシン重鎖を免疫染色し、Fusion index 並びに筋線維の直径を測定した。また、経時的にサンプリングし、筋萎縮関連遺伝子や骨格筋分化マーカー遺伝子の発現量を定量的 RT-PCR で解析した。
【結果と考察】除神経モデルにおいて、萎縮筋の筋線維面積は RJ 投与群で有意に増加した。また RJ 投与群では細胞周期関連遺伝子の Cyclin E1 や骨格筋分化マーカー遺伝子の Myogenin の発現量が増加した。マウス筋芽細胞 C2C12 に RJ を添加したところ、細胞数が増加しており、細胞増殖マーカーである Ki67 陽性細胞数も上昇していた。さらに、筋分化誘導条件下で RJ 処理を行った C2C12 細胞では、RJ の濃度依存的に筋線維数が増加していた。さらに MyoD、Myogenin、Myosin heavy chain (Myhc)などの骨格筋分化マーカー遺伝子の発現量が増加し、Myhc 陽性の筋管細胞形成が亢進した。一方で、RJ 投与マウスや RJ 処理 C2C12 細胞では、Foxo-1、Atrogin-1、MuRF-1 などの骨格筋萎縮関連遺伝子の発現量に有意な変化はなかった。以上の結果から、RJ は細胞増殖や筋分化を促進させることで、除神経性骨格筋萎縮の進行を予防したと考えられる。
【結論】RJ は骨格筋細胞の増殖や分化を調節し、健康寿命に寄与できる素材であることが示唆された。

royal jelly, sarcopenia, skeletal muscle atrophy

発表責任者：岡本秀人（ho1993@yamada-bee.com）

講演番号：4A04a13
講演日時：3 月 28 日 12:02～ センター2 号館 A04 会場

スダチ果皮ポリメトキシフラボンであるスダチチンは，ERK 経路を介して表皮角化細胞の増殖を抑制する
Sudachitin, a polymethoxyflavone from Citrus sudachi, suppresses keratinocyte proliferation via ERK pathway
○安部 庄剛、西谷 真美、湯浅 恵造（徳島大院先端技術）
○Shogo ABE, Mami NISHITANI, Keizo YUASA (Tokushima Univ.)

【目的】徳島県特産物の柑橘類スダチ（*Citrus sudachi*）は，爽やかな酸味と強い香りから料理や加工食品に利用されている。加工食品の製造工程において果皮等の加工残渣が大量に生じ，その処理が問題となっている。柑橘類果皮は，抗酸化活性や抗癌作用などの生理活性を示すビタミンやフラボノイドといった機能性成分を多く含んだ有用植物資源であり，スダチ果皮には，ヘスペリジン，ナリンギン，そしてスダチに特異的なポリメトキシフラボンであるスダチチンなどが含まれており，その有効利用が期待されている。これまでに我々は，スダチチンがヒト表皮角化細胞株 HaCaT 細胞においてアポトーシス誘導能を発揮することを見出しているが，皮膚細胞に対する作用は未だ完全に明らかにされていない。そこで本研究では，スダチチンの表皮角化細胞の増殖に対する効果を検証し，さらにその作用機序を解明することを目的とした。
【方法・結果】まず初めに，スダチチンの表皮角化細胞の増殖への影響を評価するために，皮膚研究モデル細胞として広く利用されている HaCaT 細胞を用いて BrdU 細胞増殖アッセイを行った。その結果，HaCaT 細胞の増殖がスダチチンによって有意に抑制されることが明らかとなった。続いて，スダチチンの細胞増殖抑制の作用機序を明らかにするために，ERK1/2 活性（リン酸化）に及ぼす影響をウエスタンブロッティングにより調べた。スダチチンは ERK1/2 のリン酸化を有意に抑制したのに対して，他の MAPK ファミリーである p38 のリン酸化はスダチチンによって上昇した。一方，同じポリメトキシフラボンであるノビレチンによってERK1/2のリン酸化は上昇した。表皮角化細胞では,EGF ファミリーがその受容体に結合し，細胞内において Raf-MEK-ERK シグナルを活性化することにより細胞増殖に関わっている。そこで，次に血清飢餓後の EGF 処理による ERK 経路活性化におけるスダチチンの効果を調べた。スダチチンは EGF 処理によって活性化された Raf-1，ERK1/2，Elk-1 のいずれも抑制したことから，スダチチンは EGF 受容体あるいは Ras などの Raf 上流のシグナル分子に作用し，細胞増殖抑制効果を発揮する可能性が考えられた。また，EGF は表皮角化細胞の増殖以外に，細胞遊走も促進することが報告されているため，スダチチンの細胞遊走に対する効果についても検討した。*in vitro* 創傷治癒アッセイの結果，スダチチンは EGF によって惹起された細胞遊走を抑制することが明らかとなった。以上の結果より，スダチチンは増殖因子による ERK 経路活性化を阻害することで細胞増殖および細胞遊走を抑制することが明らかとなった。乾癬や角化症は表皮細胞の過増殖が原因の一つとされており，これら皮膚疾患の治療薬開発につながることが期待される。

polymethoxyflavone, keratinocyte, proliferation

発表責任者：安部庄剛（c501944002@tokushima-u.ac.jp）

講演番号：4A04a14
講演日時：3 月 28 日 12:13～ センター2 号館 A04 会場

モロッコ植物由来エッセンシャルオイルのアンチエイジング効果

Anti-aging activity of essential oils derived from Moroccan plants

○平江 衣絵[1]、中村 水玖[2]、LEDRHEM Merieme[3]、BOUAMAMA Hafida[3]、片倉 喜範[1,2,4] ([1]九大農・食化工、[2]九大院・生資環、[3]カディ・エオード大、[4]九大院・農院)
○Kinue HIRAE[1], Miku NAKAMURA[2], Merieme LEDRHEM[3], Hafida BOUAMAMA[3], Yoshinori KATAKURA[1,2,4] ([1]Kyushu Univ., [2]Grad.Sch.Biores.Bioev.Sci.,Kyushu Univ., [3]Cadi Ayyad Univ., [4]Fac.Agric.,Kyushu Univ.)

＜目的＞
我々はこれまでに、長寿遺伝子 SIRT1 をターゲットとしたアンチエイジング食品のスクリーニング系の構築に成功している。本研究では、モロッコに自生する植物由来のエッセンシャルオイルのアンチエイジング効果を検証するとともに、その機能性の検討を行った。
＜方法＞
ヒト SIRT1 プロモーターにより駆動される EGFP 発現ベクター（SIRT1p-EGFP）を、ヒト表皮角化細胞株（HaCaT 細胞）に導入し、安定株を樹立した（HaCaT（SIRT1p-EGFP））。モロッコに自生する植物由来のエッセンシャルオイルを各種準備し、当該細胞に添加した後の EGFP 蛍光強度の変化を、IN Cell Analyzer 1000 を用いて追跡した（1 次スクリーニング）。1 次スクリーニングで活性の認められたサンプルについて、野生型 HaCaT に添加後、内在性 SIRT1 の発現を定量 RT-PCR により定量することにより、その活性の評価を行った（2 次スクリーニング）。上記スクリーニングにより得られた活性サンプルに関しては、HaCaT 細胞のミトコンドリアに与える影響について、MitoTracker Green および Red 試薬を用いて検証した。
＜結果・考察＞
抽出サンプル（有機抽出物、水抽出物、70%エタノール/30％水抽出物、エッセンシャルオイル）を用い検証した結果、いくつかのエッセンシャルオイルが SIRT1 発現を増強することが明らかとなった。ここで活性の認められたエッセンシャルオイルについて、HaCaT 細胞のミトコンドリアに与える影響を評価したところ、ミトコンドリアが活性化されていることが観察された。今後はこのエッセンシャルオイルの HaCaT 細胞におけるミトコンドリア活性化の詳細とその機能性について検討を進める予定である。

essential oil, longevity gene, SIRT1

講演番号：4A04a15
講演日時：3 月 28 日 12:24～ センター2 号館 A04 会場

皮膚に対するオオヤマザクラ（*Cerasus sargentii*）果実エキスの抗シワ効果
Anti-wrinkle effect of Ooyamazakura (*Cerasus sargentii*) fruit extract on human skin
○岩間 直子[1]、河合 貴弘[2]、北村 裕志[2] ([1]（地独）青森産技セ弘工研、[2]六花酒造株式会社)
○Naoko IWAMA[1], Takahiro KAWAI[2], Yushi KITAMURA[2] ([1]AITC Hirosaki Lab., [2]Rokkasyuzo Co., Inc.)

【目的】皮膚の弾力低下及びシワ形成は主に、紫外線等による ROS（活性酸素種）の産生亢進とそれに伴う細胞外マトリックス分解酵素（MMP-1）の誘導によるコラーゲンの分解促進によって引き起こされることが知られている。我々はこれまでに青森県内で植樹されているオオヤマザクラ（*Cerasus sargentii*）の果実のエタノール抽出エキスにおいて、非常に強い抗酸化活性を見出し、皮膚酸化ストレスの緩和作用があることを報告した。今回は活性酸素消去によって期待される MMP-1 産生抑制作用について評価を行い、オオヤマザクラ果実エキスのアンチエイジング化粧品素材としての有用性を検討した。また、オオヤマザクラ果実エキス中の機能性成分の分析及び同定も行った。
【方法】MMP-1 産生抑制作用の評価：ヒト表皮角化細胞（HaCaT keratinocyte）に紫外線（UVB）照射して、MMP-1 の産生・分泌を誘導するサイトカイン等を亢進させたうえでオオヤマザクラ果実エキスを添加し、24 時間培養した。その培養上清でさらに正常ヒト皮膚線維芽細胞を 48 時間培養し、培地中に産生・分泌された MMP-1 の量を ELISA 法により測定した。また、リアルタイム PCR 解析により、オオヤマザクラ果実エキス処理群の皮膚線維芽細胞における MMP-1 の mRNA 発現量の変化を調べた。
オオヤマザクラ果実エキスの成分分析：糖分、タンパク質、総ポリフェノール量について分析を行い、さらに LC-MS による分析を行うことによりポリフェノール成分の同定を行った。
【結果と考察】培地中に分泌された MMP-1 量の変化を測定した結果、UVB 照射処理群において、オオヤマザクラ果実エキスの添加によって MMP-1 産生量が濃度依存的に有意に減少しており、MMP-1 産生抑制作用が認められた。また、UVB 照射処理によって MMP-1 の mRNA 発現量は上昇するが、オオヤマザクラ果実エキスを添加することにより、その発現量上昇が濃度依存的に有意に抑制されることが明らかとなった。
以上の結果から、オオヤマザクラ果実エキスは UVB 等によって表皮角化細胞で生じる MMP-1 産生誘導因子の亢進を抑え、線維芽細胞での MMP-1 産生を遺伝子発現レベルで抑制する効果があり、皮膚のシワ形成や弾力低下の予防に有効な素材であると考えられた。
また、オオヤマザクラ果実エキス成分の分析の結果、糖分が 22～29%、タンパク質が 1%、ポリフェノール成分が 3～5%の割合で含まれており、ポリフェノール成分は主にシアニジン-3-グルコシド、シアニジン-3-ルチノシド、クロロゲン酸の 3 種類であることが同定された。

Anti-wrinkle effect, Ooyamazakura (*Cerasus sargentii*), Matrix Metalloprotease (MMP)-1

発表責任者：岩間直子（naoko_iwama@aomori-itc.or.jp）

講演番号：4A05a01
講演日時：3 月 28 日 09:30～ センター2 号館 A05 会場

Flavan 3-ols は青斑核を介して覚醒状態を維持する

Flavan 3-ols kept awake via locus coeruleus

○藤井 靖之[1]、坂田 純[1]、伏見 太希[1]、松永 祥孟[2]、阿部 啓子[2]、平 修[3]、越阪部 奈緒美[1] ([1]芝浦工大、[2]東京大学、[3]福島大学)
○Yasuyuki Fujii[1], Jun Sakata[1], Taiki Fushimi[1], Shoma Matsunaga[2], Keiko Abe[2], Shu Taira[3], Naomi Osakabe[1] ([1]Shibaura Inst. of Technol., [2]Tokyo univ., [3]Fukushima uniz.)

【目的】我々はこれまでにカテキンとそのオリゴマーの混合物であるflavan 3-ols(FL)を摂食後、マウスの中枢においてストレス応答反応が惹起されることを確認している[1)]。本研究では、FLの単回経口摂取がマウスの行動に与える影響と同時に起こる脳内神経伝達物質の変化について観察した。
【方法・結果】Exp 1 C57BL/6Jマウス（雄性・12週齢）をランダムにvehicle（DW)、FL 50mg/kg 投与群に分け、投与後60分間オープンフィールド法を用いて行動を観察した。Vehicle投与群では、一定時間の探索行動の後、自発行動が著しく減少したのに対して、FL投与群では行動量の顕著な増加が投与後から認められ、この効果は観察期間である60分の間維持された。
Exp 2 被験試薬を単回経口投与直後・15・30・60分後に断頭し、脳サジタル凍結切片を作製した。神経伝達物質をMALDIイメージング分析法を用いて観察したところ、FL 投与直後において青斑核・視床下部視索前野および脳幹においてノルアドレナリンの顕著なシグナルが認められた。また連続切片を用いてノルアドレナリンの合成系 (tyrosine hydroxylase, TH; dopamine β-hydroxylase, DBH)と輸送系 (vesicular monoamine transporter2, VMAT2)のmRNA発現を*in situ* hybridization法で観察したところ、青斑核においてのみこれらの遺伝子群の顕著な発現誘導が見られた。
【結論】これらの結果から、FL の摂食刺激は青斑核に入力され、ノルアドレナリン神経網を発火させ、脳全体に投射されることが示唆された。またFL投与後に顕著なノルアドレナリンシグナルが観察された視索前野には、Sleep Active Neuron(SAN)が存在していることが報告されている[2)]。睡眠はSANの活性化によって誘導され、また反対にノルアドレナリンはSANの活性を低下させ、覚醒を誘導する。本研究の結果は、FL投与によって青斑核-ノルアドレナリン神経網が活性化され、ノルアドレナリンがSANに投射された結果、覚醒の維持が起こったことが示唆された。青斑核-ノルアドレナリン神経網の活性化は、認知・学習・記憶などに強く影響することが知られていることから、引き続きFL投与のこれら脳機能に対する作用について検討する必要があると考えられる。

1) Fujii, Y. et al. Single oral administration of flavan 3-ols induces stress responses monitored with stress hormone elevations in the plasma and paraventricular nucleus. Neurosci. Lett. 682, 106–111 (2018).
2) Saito, X. Y. C. et al. Monoamines Inhibit GABAergic Neurons in Ventrolateral Preoptic Area That Make Direct Synaptic Connections to Hypothalamic Arousal Neurons. J. Neurosci. 38, 6366–6378 (2018).

Flavan 3-ols, Locus ceruleus-noradrenaline systems, Arousal

講演番号：4A05a02
講演日時：3 月 28 日 09:41～ センター2 号館 A05 会場

クエン酸摂取の慢性ストレス負荷モデルにおける効果

Effect of citrate intake on chronic mild stress model

○斎木 朝子[1]、衞藤 史博[2,3]、平光 正典[1]、小林 直之[1]、土屋 陽一[1]、瀬藤 光利[2,3,4]、矢尾 育子[2,4,5]
([1] サッポロホールディングス株式会社　価値創造フロンティア研究所、[2] 浜松医科大学光尖端医学教育研究センターフォトニクス医学研究部、[3] 浜松医科大学細胞分子解剖学講座、[4] 国際マスイメージングセンター、[5] 関西学院大学 理工学部 生命医化学科)
○Asako SAIKI[1], Fumihiro Eto[2,3], Masanori Hiramitsu[1], Naoyuki Kobayashi[1], Youichi Tsuchiya[1], Mitsutoshi Setou[2,3,4], Ikuko Yao[2,4,5] ([1]Frontier Laboratories for Value Creation, SAPPORO HOLDINGS LTD., [2]Preeminent Medical Photonics Education & Research Center, Institute for Medical Photonics Research, Hamamatsu University School of Medicine, [3]Department of Cellular & Molecular Anatomy, Hamamatsu University School of Medicine, [4]International Mass Imaging Center, [5]School of Science and Technology, Kwansei Gakuin University)

【目的】

ストレスケアに対する関心は高く、ストレス緩和作用があるとされる食品も多く報告されている。そのような食品を摂取した時、脳内神経伝達物質の発言及び分布にどのような変化が起こるかについては、未解明の点も多い。一方クエン酸には疲労感を和らげる効果があると言われており、ストレスに対しても緩和効果があることが期待される。本研究では、ストレス負荷及びクエン酸食条件により、脳組織における神経伝達関連物質関連遺伝子の発現と神経伝達物質の分布がどのように変動するか解明し、ストレス負荷及びクエン酸が脳内神経伝達物質に与える影響を検証した。

【方法】

雄性 C57BL/6J マウス 20 匹をストレス負荷／非負荷条件及びクエン酸投与／非投与条件の計 4 群に分けた。クエン酸投与群には 0.3%クエン酸混餌食を自由摂取させた。ストレス負荷群には拘束ストレスを 1 日 2 時間、2 週間反復的に負荷した。試験終了後、各個体の脳組織を採取し、左半球の線条体部位からは RNA を抽出し、RT-PCR 法によって神経伝達物質関連遺伝子の相対発現量を評価した。右半球からは矢状断スライスを調製し、質量分析イメージング法を用いて組織表面上の神経伝達物質を解析した。

【結果】

ストレス負荷＋クエン酸食群は、線条体においてドーパミン合成酵素遺伝子の発現量が増加傾向であった。さらにドーパミン受容体遺伝子発現量は、ストレス非負荷群に比べてストレス負荷群で低下しており、ストレス負荷＋クエン酸投与群ではストレス負荷＋クエン酸非投与群よりも有意に高かった。そこでドーパミンに着目して質量分析イメージング解析を行ったところ、ストレス負荷＋クエン酸非投与群に比べて、ストレス負荷＋クエン酸投与群でドーパミン量が高い傾向を示した。

【結論】

上記の結果から、反復拘束ストレスによって脳線条体のドーパミンシグナル伝達に影響を及ぼすことが推察され、継続的なクエン酸摂取はそれらの影響を緩和することが考えられた。ドーパミンは脳内報酬系や意欲等にも深く関わっているとされ、強いストレスを受けた後のドーパミン系異常を報告する例もある。以上のことから、クエン酸摂食はストレスによる情動への影響を緩和する作用があることが期待された。

Citrate, Imaging mass spectrometry, Dopamine

講演番号：4A05a03
講演日時：3 月 28 日 09:52～ センター2 号館 A05 会場

ローズマリー抽出物摂取による抗ストレス効果の検討

The anti-stress effect of rosemary extract intake in mice

○萱島 知子[1]、海野 美月[2]、海切 弘子[2]、松原 主典[2] ([1]佐賀大教育、[2]広島大院教育)
○Tomoko KAYASHIMA[1], Mistuki UMINO[2], Hiroko KAIKIRI[2], Kiminori MATSUBARA[2] ([1]Saga Univ., [2]Hiroshima Univ.)

【目的】生体内での変性タンパク質の蓄積（アミロイド形成）は、アルツハイマー病といった加齢性疾患の原因となることから、タンパク質の変性を抑制し、アミロイド形成を遅らせることは加齢性疾患の発症抑制や健康寿命の延伸につながる。我々はアミロイド形成タンパク質の一つであるトランスサイレチン（transthyretin: TTR）に注目し検討を行っている。TTR はチロキシンやレチノールの輸送機能を持っているが、アルツハイマー病に関与しているアミロイドβを脳から排出することに加え、抗うつ効果の可能性があることからも注目を集めている。これまで、本大会では TTR を安定化させる食品機能成分の探索・作用機構・加齢性疾患への有効性について報告してきた。本発表では、TTR 安定化効果を持つ食品機能成分を含むローズマリー抽出物を対象とし、抗うつ様効果を含む抗ストレス効果について報告する。
【方法】TTR 安定化作用がある成分を含むローズマリー抽出物を BALB/c マウスに投与し、抗ストレス効果の評価を行った。評価は強制水泳試験で行い、試験終了後、脳での炎症についてミクログリア細胞特異的抗体による免疫組織染色による評価した。また、拘束処置（3 h/d, 10 日間）により過度のストレス状態とした場合の影響についても検討した。
【結果】ローズマリーに含まれるカルノシン酸に TTR 安定化作用を見出していたが、同じくローズマリーに含まれるカルノソールも TTR 安定化作用があることを見出した。そこで、ローズマリー抽出物を用いて、抗ストレス効果について検討を行った。強制水泳実験において、対照群のマウスは 1 週目、2 週目と有意に不動時間が延びたが、ローズマリー摂取群では不動時間の有意な延長は観察されなかった。よって、カルノシン酸とカルノソールを含むローズマリー抽出物は抗ストレス効果があると考えられた。ストレスは脳での炎症を引き起こすことが知られていることから、脳のストレス状態について、炎症マーカーである活性化ミクログリア細胞について免疫染色法により評価した。その結果、ローズマリー抽出物群では活性化ミクログリア細胞が有意に少なかったことから、ローズマリー抽出物の抗ストレス効果は脳での炎症を抑制することによる可能性が示された。

また、過度のストレス状態への影響については、対照群と比べ、ストレス群では処置翌日より体重増加量の有意な低下がみられたが、ローズマリー摂取群では処置 5 日目まで有意な差はみられなかった。しかしながら、その後は対照群の体重増加量に対して有意な低下がみられたことから、過度のストレスに対しての効果は限定的であり、小腸内容物 IgA 量にも差はみられなかった。

Rosemary, stress, microglia

講演番号：4A05a04
講演日時：3 月 28 日 10:03～ センター2 号館 A05 会場

ブローボトル形態冷菓とリラックス効果の関連性評価

Relaxing effect of blow bottle ice cream

○山本 宗[1]、真川 竜太[1]、阪井 直哉[1]、一楽 建二[1]、山崎 英恵[2]([1]江崎グリコ、[2]龍谷大農)
○ So YAMAMOTO[1], Ryuta SANAGAWA[1], Naoya SAKAI[1], Kenji ICHIRAKU[1], Hanae YAMAZAKI[2] ([1]Ezaki Glico Co., Ltd., [2]Ryukoku Univ.)

【背景・目的】菓子や飲料を始めとする加工食品を摂取する目的の１つとしてリラックス効果への期待がある。しかし、食品の摂取がもたらす心理的・生理的影響の評価およびそれらの変化を引き起こす因子の特定など、分析的な観点からの検証は未だ乏しい。冷菓もまたリラックスニーズによる購買が盛んであり、冷菓特有の「冷たさ」や「なめらかさ」がリラックス効果に寄与している可能性がある。そこで本研究では、ブローボトル形態冷菓の喫食によるリラックス効果を感性工学的手法により検証すると共に、「風味」「冷感」「食感」のうち、どの要素がリラックス効果と関連性を有するかを明らかにすることを目的とした。

【方法】被験者は 30～49 歳の男女各 10 名（n = 20)、試験食には一般に販売されているブローボトル型冷菓（江崎グリコ株式会社製）と同一配合の３サンプルを使用した。(a.冷凍前アイスミックス（10℃、以下ミックス）b.ガリガリ食感冷菓（－15℃、以下ガリガリ）c.なめらか食感冷菓（－15℃、以下なめらか）)容器は全て同じ形態のブローボトルに充填し、非盲検クロスオーバー法により試験を実施した。被験者は内田クレペリンテストによる計算課題後に試験食を喫食した。心電図分析による心拍および自律神経指標の変動解析、フリッカー試験による疲労度の測定、Visual Analogue Scale (VAS)による心理状態の評価、サーモグラフィーを用いた喫食後の手表面温度の測定を実施した。

【結果・考察】喫食前後の変化をサンプル間で比較した結果、心拍変動を示す⊿HR 値はミックス群に対してなめらか群で有意に減少した。また、副交感神経指標である⊿RMSSD 値はガリガリ群に対してなめらか群で有意に増加した。フリッカー試験の結果では、なめらか群でのみ喫食による疲労回復傾向が認められた。VAS による心理評価では「元気な状態ですか」「爽快な気分ですか」の設問において、ミックス群に対してなめらか群が有意に高値を示した。サーモグラフィーの結果から、ブローボトル型冷菓喫食時には指先の末梢神経系が冷却されることが確認された。

以上の結果より、なめらか食感冷菓の喫食は生理的な安静状態かつ副交感神経優位な状態をもたらし、比較群に対して高いリラックス効果を示すことが示唆された。これは、ブローボトル型冷菓が与えるリラックス効果において「なめらか食感」が重要な働きを担っていることを意味する。

ice cream, relaxing, Kansei Engineering

発表責任者：山本宗（so.yamamoto@glico.com）

講演番号：4A05a05
講演日時：3 月 28 日 10:14～ センター2 号館 A05 会場

糸状菌の酸ストレス条件下でのアグマチン誘導性
Agmatine inducibility under acid stress conditions in filamentous fungi
○坂根 隆浩[1]、加藤 紗也[1]、福田 青郎[1]、ティラグール ガンジャナ[2]、藤原 伸介[1] ([1]関西学院大理工、[2]カセサート大農)
○Takahiro SAKANE[1], Saya KATO[1], Wakao FUKUDA[1], Gunjana THEERAGOOL[2], Shinsuke FUJIWARA[1] ([1]Kwansei Gakuin Univ., [2]Kasetsart Univ.)

清酒製造に用いられる黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は、固相培地でのみポリアミン生合成中間代謝物であるアグマチン(Agm)を産生し、低 pH 依存的にその産生が促進されることが知られている(1)。この酸ストレス下での Agm 産生が他の類縁糸状菌でもみられるかを検証するため、黄麹菌と同様にデンプン糖化活性を有する糸状菌、*Mucor indicus, Amylomyces rouxii, Aspergillus niger* に着目し、固相培地、液相培地での Agm 産生を調べた。各糸状菌について、固相培地と液相培地それぞれに、乳酸を添加して pH を下げ培養した培養液の上清に含まれる Agm 量を測定した。また、各条件で培養して得た菌体破砕液（粗抽出液）を用いて、Arginine decarboxylase (ADC) 活性の pH 依存性についても調べた。*M. indicus* は固相条件特異的に Agm 産生することが確認された。さらに、乳酸添加条件において Agm 産生量の上昇が見られた。また、固相条件特異的な ADC 活性は、pH 4 において最大になった。同様に *A. rouxii* の Agm 産生について調べたところ、固相条件特異的に Agm を生産した。また固相条件では乳酸添加の有無に限らず pH が低下し、乳酸の添加による Agm 産生量の変動を検証できなかった。また粗抽出液の ADC 活性は、低 pH 依存性を示した。*A. niger* ではどの条件においても、Agm 産生は見られず、ADC 活性も認められなかった。一部の例外を除いて、一般的に糸状菌の ADC 遺伝子は同定されていない。今回、*A. niger* 以外の糸状菌については ADC 活性が見られた。これらの菌では、オルニチン、リジンの脱炭酸酵素が ADC の機能を有すると予想される。*A. niger* についても、既知の ADC 配列はゲノム上には存在せず、また、機能的な ADC は存在しないことが示唆されている (2)。*A. niger* はクエン酸などの有機酸を高生産するが、*A. oryzae*、*M. indicus*、*A. rouxii* の産生はそれほど顕著ではない。*A. niger* は *A. oryzae*、*M. indicus*、*A. rouxii* とは異なる耐酸機構を有すると考えられる。

(1) Akasaka, N., et al., Appl. Environ. Microbiol., 17: 84 (2018)
(2) Kumar S., Appl. Environ. Microbiol., 5593-603 (2015)

agmatine, filamentous fungi, acid stress

講演番号：4A05a06
講演日時：3 月 28 日 10:35～ センター2 号館 A05 会場

高 Resistant Protein 甘酒による角質水分量への影響

Effect of keratinous moisture content for resistant protein rich amazake

○高橋 雅弥[1]、笹村 昂平[1]、佐野 友希[1]、横山 春花[1]、吉田 知華[1]、町田 雅之[1]、尾関 健二[1]、川合 史晃[2]、栗本 将太[2]、中村 雅彦[2]([1]金工大・ゲノム研、[2]厚生産業株式会社)
○Masaya Takahashi[1], Kohei Sasamura[1], Yuki Sano[1], Haruka Yokoyama[1], Chika Yoshida[1], Masayuki Machida[1], Kenji Ozeki[1], Humiaki Kawai[2], Shota Kurimoto[2], Masahiko Nakamura[2] ([1]Genome Biotechnol. Lab., Kanazawa Inst. Technol., [2]Kohsei Sangyo Co., Ltd.)

【背景・目的】Resistant Protein（RP）とはヒトの小腸内で消化・吸収されにくい機能を持つタンパク質である。甘酒や酒粕には RP が含まれており、酒粕発酵物を摂取することで肌のキメ、便通改善、コレステロール低下、肥満抑制効果など健康維持に効果があることが報告されている。しかし、RP を含む甘酒が角質水分量に影響を与えるという報告はないため、RP を高含有した米麹甘酒を用いてヒト飲用試験による角質水分量への効果を検証した。加えて、RP 高含有甘酒飲用による腸内細菌叢への影響についても検討した。

【方法】米麹甘酒 1 日 125 mL（RP 含有量 109 mg）を 4 週間飲用（平均年齢 22 歳,男性 3 名女性 3 名）し、週間単位で両前腕の角質水分量を測定(Corneometer CM825)した。また、RP 高含有甘酒 1 日 125 mL（RP 含有量 565 mg）・4 週間飲用（平均年齢 22 歳,男性 3 名女性 3 名）と、RP 高含有甘酒 1 日 125 mL（RP 含有量 406 mg）・4 週間飲用（平均年齢 23 歳,男性 4 名女性 2 名）を同様に測定した。角質水分量は、室温 20-25℃、湿度 50-60%に設定した環境で、両前腕の内側を 5 区間×5 箇所測定した。1 区間 5 箇所の内、最大値と最小値を省き、5 区間×3 箇所の平均値を算出した。

【結果・考察】通常の米麹甘酒の飲用においては、角質水分量の上昇はほとんど見られなかった。RP 高含有甘酒（RP 含有量 565 mg/125 ml）の飲用において、0 週目との比較を、被験者 6 人の平均値で行なったところ、2 週目で 2.1 ポイント、3 週目で 5.5 ポイント有意に上昇しており、角質水分量を増加させる効果が見られた。また、この効果には速効性が見られた。また、甘酒飲用終了後の 7 週目では 3.8 ポイント、8 週目では 2.5 ポイント有意に上昇しており、角質水分量を高める持続性が見られた。RP 高含有甘酒（RP 含有量 406 mg/125 ml）の飲用においては、3 週目・4 週目で 4.8 ポイント有意に上昇しており、速効性のある効果が見られた。また、甘酒飲用終了後の 7 週目では 8.6 ポイント、8 週目では 8.3 ポイントに有意に上昇しており、角質水分量を高める持続性が見られた。このことから、RP を高含有した米麹甘酒は角質水分量に影響を与えることが示唆された。さらに、RP 高含有の甘酒が腸内細菌叢へ与える影響についての検証も進めており、本発表ではその内容についても報告する。

Resistant Protein, Amazake, Keratinous moisture content

発表責任者：尾関　健二（ozeki@neptune.kanazawa-it.ac.jp）

講演番号：4A05a07
講演日時：3 月 28 日 10:46～ センター2 号館 A05 会場

たんぱく質濃度 2.2 g/100 kcal の市販乳児用ミルクを哺乳した満期産児の発育

Growth of term infants fed a commercial infant formula with a protein content of 2.2 g/100 kcal

○神野 慎治、山崎 香枝、中村 吉孝、木ノ内 俊 ((株) 明治)
○Shinji JINNO, Kae YAMAZAKI, Yoshitaka NAKAMURA, Toshi KINOUCHI (Meiji Co., Ltd.)

市販乳児用ミルク A の変更後の栄養組成（たんぱく質：2.2 g/100 kcal に減量、アラキドン酸：13.2 mg/100 kcal に増量、ドコサヘキサエン酸：20 mg/100 kcal を維持）の妥当性を評価するため、乳児用ミルク A 栄養児（A 児）の発育が母乳栄養児（B 児）と同等であるかを調べた。当観察研究では、1,053 名の乳児を 12 ヵ月齢まで追跡し、99 名の A 児と 295 名の B 児の発育、便性、および健康状態を比較した。A 児の体重、体格指数（BMI）、および頭囲は B 児と同等であった。A 児と B 児の便性状と健康状態にも差は認められなかった。A 児が B 児と同様に発育していたことは、乳児用ミルク A の栄養組成が妥当であることを示唆している。これらの知見は、乳児用ミルクの更なる改良のための根拠となる。

1) Shinji Jinno, Kae Yamazaki, Yoshitaka Nakamura, and Toshi Kinouchi. Growth of term infants fed a commercial infant formula with a protein content of 2.2 g/100 kcal: an observational follow-up study (accepted in 2019, in press). *Biosci Biotechnol Biochem.*

Arachidonic acid, Docosahexaenoic acid, Head circumference

発表責任者：神野　慎治（shinji.jinno@meiji.com）

講演番号：4A05a08
講演日時：3 月 28 日 10:57～ センター2 号館 A05 会場

スケソウダラ魚肉タンパク質摂取による骨格筋量増大作用の機序解明
Molecular mechanisms of Skeletal muscle hypertrophy by Alaska Pollack Protein intake
○山本 衿子[1]、藤谷 美菜[2]、内田 健志[3]、井上 菜穂子[4]、阿部 啓子[1]、岸田 太郎[2]、岡田 晋治[1] ([1]東大院農生科、[2]愛媛大院農・生命機能、[3]日本水産(株)食品機能研、[4]日大・生資)
○Eriko YAMAMOTO[1], Mina FUJITANI[2], Kenji UCHIDA[3], Naoko INOUE[4], Keiko ABE[1], Taro KISHIDA[2], Shinji OKADA[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Ehime Univ., [3]Nippon Suisan Kaisha, Ltd., [4]Nihon Univ.)

(背景・目的)スケソウダラの魚肉タンパク質(Alaska Pollack Protein〈APP〉)は、かまぼこ、ちくわや魚肉ソーセージとして広く利用されている。我々のグループは先行研究において、APP 摂取の影響としてラットの骨格筋量が増大することを見出した。APP の骨格筋量増大作用は、高齢化社会において問題視されているサルコペニア(加齢に伴う筋量、筋力の低下)の発症を抑制する可能性があり、今後の応用が期待される。一方で、APP 摂取による骨格筋量増大の作用機序は未明である。そこで、本研究では、APP の機能性素材としての有用性を裏付けるために、APP 摂取による骨格筋量増大の作用機序を解明することを目的とした。

(方法)5 週齢の SD 系ラット雄を被験動物とし、食餌タンパク質源を APP とした飼料を摂取させた(n=10)。対照としては、タンパク質源がカゼインの飼料を摂取させた(n=10)。摂取開始後 1 日目、2 日目、4 日目、7 日目の各タイムポイントにおいて腓腹筋を採取し、DNA マイクロアレイ解析に供した。既知の骨格筋肥大経路と網羅的遺伝子発現解析結果を照合し、APP 摂取による骨格筋肥大への関与が推測される経路を探索した。その後、骨格筋肥大への関与が示唆された分子の mRNA 量を定量 RT-PCR、タンパク質量をウエスタンブロッティングによりそれぞれ測定した。

(結果)腓腹筋重量は、APP 摂取群がカゼイン摂取群よりも大きく、4 日目で有意傾向($p<0.1$)、7 日目で有意差を示した。網羅的遺伝子発現解析の結果、骨格筋におけるタンパク質合成・分解への関与が知られている「グルココルチコイド伝達経路」および筋分化やタンパク質分解への関与が知られている「炎症性サイトカイン(IL-6)伝達経路」を構成する分子において、遺伝子が多く発現変動していることが示された。定量 RT-PCR、ウエスタンブロッティングによる検証からもこれら経路の関与が示された。以上より、APP 摂取による骨格筋肥大の作用機序の一端を示した。

skeletal muscle, Alaska Pollack, microarray

発表責任者：岡田晋治（asoka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4A05a09
講演日時：3 月 28 日 11:08～ センター2 号館 A05 会場

細胞外セリン欠乏に応答した肝がん細胞株のアミノ酸代謝及び遺伝子発現制御機構
Extracellular serine depletion in hepatocarcinoma leads to cell proliferation arrest and altered gene expression profiles similar to serine-depleted embryonic fibroblasts lacking *Phgdh*
○濱野 桃子[1]、友永 省三[2]、小田 裕昭[3]、加藤 久典[4]、古屋 茂樹[1] ([1]九州大農、[2]京都大農、[3]名古屋大農、[4]東京大農)
○Momoko HAMANO[1], Shozo TOMONAGA[2], Hiroaki ODA[3], Hisanori KATO[4], Shigeki FURUYA[1] ([1]Kyusyu Univ., [2]Kyoto Univ., [3]Nagoya Univ., [4]Tokyo Univ.)

セリンは体内で必要量を合成可能な非必須アミノ酸に分類されている。内在性セリン合成の生理学的意義を理解するために、セリン合成初発酵素である *Phgdh* をノックアウト（KO）したマウス胚から作製した *Phgdh* 欠損線維芽細胞(KO-MEF)の細胞外セリン欠乏時の応答を解析した。細胞内セリン欠乏はグルタチオンの減少を介して細胞内活性酸素種産生による酸化ストレスを惹起し、その下流で炎症反応を媒介する遺伝子発現が誘導された（Hamano et al, 2018）。さらに、セリン欠乏に応答してアミノ酸欠乏応答で活性化する統合ストレス経路を会した細胞死カスケードの活性化や脂質代謝異常を誘発することから、内在性 L-セリン合成は細胞内レドックス制御及び炎症反応、細胞死惹起の抑制に重要であることがわかった。これらの一連の結果は細胞外環境の L-セリンが枯渇した場合には *Phgdh* に依存した *de novo* 合成が細胞増殖に必須であること、細胞内セリンの充足度低下を感知する機構が存在することを示す。しかし、*Phgdh* を有する細胞における細胞外セリン欠乏応答機構は十分に研究なされていない。そこで、本研究では細胞外セリン枯渇が細胞機能に与える影響を明らかにすることを目的に、全身レベルのアミノ酸代謝において中心的な役割を果たす肝臓に由来するがん細胞株 Hepa1-6 を用いてセリン欠乏応答を解析し、KO-MEF と比較検討した。

Phgdh を保持する Hepa1-6 を 6 時間の培地セリン制限条件に曝すと KO-MEF で確認された特徴的な遺伝子の発現誘導が認められた。しかし、培養 6 時間後の顕著な遺伝子発現誘導は一過的であり、調べた遺伝子は全てセリン制限 24 時間でセリン添加条件と同レベルにまで収束し､KO-MEF とは際立った違いを示した。6 時間のセリン制限条件により Phgdh 及びセリン-グリシン変換酵素である Shmt2 の発現が有意に増加し、細胞内グリシン濃度はセリン添加条件と比較して 60%まで減少していた。さらに、グリシン添加条件における細胞増殖能はセリン添加条件と同レベルの増殖能を示したことから、Hepa1-6 においては *de novo* セリン合成系だけでなくグリシン-セリン変換経路からも不足を補うことが示唆された。

以上の結果より、Hepa1-6 も細胞外セリン枯渇を感知し、細胞増殖の停止と一過的な種々の遺伝子発現誘導により、速やかに複数のセリン供給経路を活性化することで細胞内セリン充足度低下を回避する機構を備えていることが明らかとなった。さらにセリン枯渇感知と応答機構の細胞タイプを越えた共通性が示唆された。

Serine deficiency, Fgf21, Serine Hydroxymethyltransferase

講演番号：4A05a10
講演日時：3 月 28 日 11:19～ センター2 号館 A05 会場

出芽酵母における高濃度トリプトファンによるアミノ酸インバランスの解析
Study for amino acid imbalance induced by excess Trp in budding yeast
○大橋 一登（群大・生調研）
○Kazuto Ohashi (Gunma Univ. IMCR)

タンパク質構成アミノ酸は一般に 20 種類で、これらは生体に必須の化合物である。高等動物では、いくつかのアミノ酸は十分量を生合成できないため、外部から摂取する必要がある。その一方で、必要最低限のアミノ酸を摂取しても、摂取するアミノ酸に極端な偏りがあると生育が抑制されるアミノ酸インバランスという現象が知られている。しかし、アミノ酸インバランスの分子機構は不明である。

これまでに真核生物のモデル細胞である出芽酵母の BY4741 株は、最小完全培地においてトリプトファン（Trp）を過剰に与えると生育が抑制されることを見出した。しかし、栄養が豊富な YPD（Yeast Extract, Peptone, Dextrose）培地では、同量の過剰な Trp を添加しても BY4741 株の生育は抑制されなかった。この現象を詳細に検討した結果、過剰な Trp に加えてトリプトン（タンパク質分解物）を与えると出芽酵母 BY4741 株の生育が回復することを見出した。これらの結果から、過剰量の Trp による生育抑制は、アミノ酸インバランスによる生育抑制に相当すると考えられた。また、Trp による生育抑制を回避するには他のアミノ酸が必要であることが予想された。そこで、BY4741 株の栄養要求性に着目し、栄養要求性がない出芽酵母の高濃度 Trp 存在下での細胞増殖を調べた。その結果、栄養要求性がない出芽酵母は高濃度の Trp に耐性を示し、良好な生育が認められた。さらに、BY4741 株が示す栄養要求性の原因である欠損遺伝子をプラスミドで導入し、過剰な Trp への耐性を調べたところ、ロイシン（Leu）合成酵素の導入によって、BY4741 株は高濃度 Trp への耐性を獲得することが分かった。これを裏付けるように、BY4741 株では高濃度 Trp 処理によって細胞内に Leu の前駆体が蓄積していることが分かった。しかし、細胞内 Leu の濃度はほとんど減少していないことも分かってきた。このことから、過剰な Trp によって Leu の要求量が増加することが推測された。

なお、Leu の添加は、トリプトンの添加ほど効果的ではなかったことから、タンパク質の分解によって生じるペプチドに着目し、Leu を含むジペプチドとトリペプチドの効果を検証した。その結果、Leu を含むジペプチドが、Leu よりも効果的に機能していることも分かった。

このように、本研究で見出した実験条件はアミノ酸インバランスの分子機構を理解するうえで有用なモデルであると考えられた。高濃度 Trp によるアミノ酸インバランスの仕組みを明らかにするため、非必須遺伝子欠損株コレクションを用いて、高濃度 Trp に感受性を示す遺伝子欠損株を探索したところ、約 3%の遺伝子欠損株が Trp に強い感受性を示した。これらの遺伝子欠損株には、アミノ酸代謝に関わる遺伝子の欠損株が多く含まれていた。

Tryptophan, aminoacid imbalance, yeast

発表責任者：大橋一登（ohashi@gunma-u.ac.jp）

講演番号：4A05a11
講演日時：3 月 28 日 11:40～ センター2 号館 A05 会場

GABA によるホモカルノシン合成の誘導、および単一筋線維を用いたイミダゾールジペプチドの新規機能性の探索
Induction of homocarnosine synthesis by GABA and exploration of novel functionality of imidazole dipeptide using single muscle fiber

○小丸 拓海[1]、佐藤 可奈子[1]、有馬 岳志[1]、大西 魁[1]、佐藤 三佳子[2]、大石 泰之[2]、Thomas Hawke[3]、矢中 規之[1]、Thanutchaporn Kumrungsee[1]（[1]広島大院統合生命、[2]日本ハム中央研究所、[3]McMaster Univ.）
○Takumi KOMARU[1], Kanako SATO[1], Takeshi ARIMA[1], Kai ONISHI[1], Mikako SATO[2], Yasuyuki OISHI[2], Hawke Thomas[3], Noriyuki YANAKA[1], Kumrungsee Thanutchaporn[1] ([1]Hiroshima Univ., [2]NH Foods Ltd. R&D Center, [3]McMaster Univ.)

[研究目的]イミダゾールジペプチドの一つであるカルノシン(β-alanine-histidine)は、骨格筋において高濃度で存在し、抗酸化作用などを有する機能性物質として注目されている。近年では運動機能の向上を目的としたカルノシンの投与試験が行われているが、血中での不安定性などが問題とされている。本研究では、カルノシンの代替成分として、カルノシンと類似の構造をもつホモカルノシン(GABA-histidine)に着目し、GABA 摂取によって骨格筋におけるホモカルノシン濃度の増加効果を検討した。さらに、イミダゾールジペプチドが運動機能を向上させることから、骨格筋の再生に与える可能性に着目した。骨格筋の再生においては、骨格筋幹細胞である筋衛星細胞が重要な役割を担っており、筋損傷による刺激などによって活性化され、細胞増殖や筋分化によって損傷部位を修復することが知られている。そこで、イミダゾールジペプチドの新たな機能性を明らかにすることを目的とし、筋衛星細胞に与える影響を検討した。
[方法・結果]6 週齢の雄性 ICR マウスを AIN93 標準食群、および 0.5、2、5%GABA を添加した食餌群の 4 群に分けた(n=8)。6 週間自由摂取させた後、骨格筋組織におけるホモカルノシンなどのペプチド含量を LC-MSMS 法により測定した。さらに骨格筋における内在性の GABA 分解酵素がホモカルノシン量を調節しているのかを検討するために GABA 分解酵素阻害剤である vigabatrin を雄性 ICR マウスに 2 週間皮下投与(250mg/kg BW)した。正常食群では GABA、およびホモカルノシンはともに低濃度であったが、GABA 添加食群では、骨格筋の GABA、およびホモカルノシン量は有意に増加し、一方、GABA 摂取による他のイミダゾールペプチド量に変化は認められなかった。さらに GABA 分解酵素阻害剤と GABA 摂取の併用によって骨格筋のホモカルノシン量は相乗的に増加した。さらに、雄性 C57BL マウスの長趾伸筋より単一筋線維を単離し、カルノシン、またはホモカルノシンを含む培地で 24 時間培養した後、筋線維を Pax7 で抗体染色した。カルノシン、およびホモカルノシンを含んだ培地で培養した筋線維では、コントロール培地で培養した筋線維と比較して筋衛星細胞数が有意に増加した。
[考察]骨格筋の GABA 量の増加はホモカルノシン量を上昇させ、GABA 摂取による骨格筋機能に与える影響が示唆された。さらに、カルノシン、およびホモカルノシン存在下で筋衛星細胞の数が上昇していたことから、これらイミダゾールジペプチドが骨格筋の再生に関与する可能性が示唆された。

Imidazole dipeptide, GABA, satellite cell

講演番号：4A05a12
講演日時：3 月 28 日 11:51～ センター2 号館 A05 会場

J774.1 マクロファージ様細胞において mTORC2 シグナルはリソソーム活性を制御する
mTORC2 signaling controls the lysosomal activity in J774.1 macrophage-like cell.
○坂井 麻衣子[1]、大西 康太[2]、増田 真志[2]、大南 博和[2]、奥村 仙示[2]、原 太一[3]、竹谷 豊[2]([1]徳島大学 大学院栄養生命科学教育部 臨床食管理学分野、[2] 徳島大学 大学院医歯薬学研究部 臨床食管理学分野、[3]早稲田大学 人間科学学術院健康福祉科学科 細胞制御学・食品生命科学研究室)
○ Maiko SAKAI[1], Kohta OHNISHI[2], Masashi MASUDA[2], Hirokazu OHMINAMI[2], Hisami YAMANAKA-OKUMURA[2], Taichi HARA[3], Yutaka TAKETANI[2] ([1]Dept. of Clinical Nutrition and Food Management, Graduate School of Nutrition and Bioscience, Tokushima University, [2]Dept. of Clinical Nutrition and Food Management, Institute of Biomedical Sciences, Tokushima University, [3]Lab. of Cellular Regulation/Food and Life Science, Faculty of Human Sciences, Waseda University)

【目的】
生体内に生じた死細胞や侵入微生物は、マクロファージ（Mφ）により貪食された後、リソソームへと輸送され、分解される。従って、Mφのリソソーム活性を適切に調節することは生体恒常性を維持する上で重要である。近年、リソソーム活性の調節に関わる転写因子として transcription factor EB (TFEB) が同定され、注目されている。一方、我々はこれまでに、J774.1 細胞（マウス Mφ様細胞）においては、TFEB を欠損してもリソソーム活性が変化しないことを見出している。そこで本研究では、本 Mφ様細胞のリソソーム活性を制御する未知の分子機構の存在を想定し、その解明を試みた。
【方法と結果】
J774.1 細胞に対して各種シグナル阻害剤を処理し、リソソーム活性への影響を評価したところ、Torin1（mTOR 活性阻害剤）の投与により、リソソームにおけるタンパク質分解が促進されることを見出した。mTOR は、細胞内において２種の複合体（mTORC1、もしくは、mTORC2）を形成し、それぞれ異なるシグナル伝達に関わることが知られている。そこで、本活性発現機構に関与する mTOR 複合体を同定するために、CRISPR/Cas9 system を用いて raptor あるいは rictor の欠損細胞を作出した。各欠損細胞に対して Torin1 を処理したところ、興味深いことに、mTORC2 活性を欠失した rictor 欠損細胞においては、リソソーム活性の亢進が認められなかった。また、rapamycin（mTORC1 選択的阻害剤）を処理した野生型 J774.1 細胞においても、リソソーム活性は増強されなかった。近年、TFEB を代表とする mTORC1 シグナル依存的なリソソーム制御機構が注目されているが、mTORC2 シグナルを介する機序についてはほとんど報告例が無い。
一方、我々は、天然フラボノールの一種であるイソラムネチンが、Torin1 と同様に、mTORC2 シグナルの抑制を介してリソソーム活性を亢進することを見出した。重要なことに、イソラムネチンは mTORC2 活性を抑制する一方で、mTORC1 シグナルには影響を与えなかった。また、転写阻害剤の共処理によりイソラムネチンの活性が顕著に減弱したことから、本機構には遺伝子発現制御が関与している可能性が示唆された。そこで、マイクロアレイを用いて、イソラムネチンを処理した細胞の遺伝子発現を網羅的に解析し、変動した遺伝子群の情報をインフォマティクス解析に供することで、mTORC2 シグナルを介したリソソーム活性化機構に関与する数種の転写因子を予想した。現在、候補転写因子（E2F1, GATA3 等）の欠損細胞を作出し、作用機序への寄与を検証している。

lysosome, macrophage, mTORC2
発表責任者：大西康太（ohnishi.kohta@tokushima-u.ac.jp）

講演番号：4A05a13
講演日時：3 月 28 日 12:02～ センター2 号館 A05 会場

食品による栄養飢餓非依存性オートファジーの分子機構の解明

Elucidation of a starvation-independent autophagy by food

○山越 正汰[1]、矢野 敏史[1]、坂井 麻衣子[2]、藤元 萌[3]、大西 康太[4]、原 太一[1]([1]早稲田大学 人間科学学術院 細胞制御・食品生命科学研究室、[2]徳島大学 大学院栄養生命科学教育部 臨床食管理学分野、[3]東京大学 大学院農学生命科学研究科 動物細胞制御学研究室、[4]徳島大学 大学院医歯薬学研究部 臨床食管理学分野)

○Shota YAMAKOSHI[1], Satoshi YANO[1], Maiko SAKAI[2], Moe FUJIMOTO[3], Kohta OHNISHI[4], Taichi HARA[1] ([1]Lab. of Cellular Regulation/Food and Life Science, Faculty of Human Sciences, Waseda University, [2]Dept. of Clinical Nutrition and Food Management, Graduate School of Nutrition and Bioscience, Tokushima University, [3]Lab. of Animal Cell Regulation, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, the University of Tokyo, [4]Dept. of Clinical Nutrition and Food Management, Institute of Biomedical Sciences, Tokushima University)

[目的]

オートファジーは細胞内のリサイクリングシステムであり、加齢に伴う様々な疾患の予防に機能することが明らかになってきている。よって、オートファジーを亢進させる食品を開発することで、健康寿命の延伸への応用が期待される。オートファジーは、主に栄養飢餓により激しく誘導されることが知られている。一方、栄養飢餓シグナルを標的としたオートファジーの制御は、タンパク質合成阻害などを含む副作用の点から健康維持への応用には注意が必要である。すなわち、オートファジーを標的とした食品の健康増進作用において、栄養飢餓シグナルを介さない制御が重要になると考えられる。そこでわれわれは、オートファジーを活性化する食品を新たに開発し、その栄養飢餓非依存性の制御機構と関与分子を同定したので本発表で紹介する。

[方法]

オートファジーの活性は、分子プローブ（tandem fluorescent-tagged LC3, GFP-LC3-RFP-LC3ΔG など）を用いて解析した。食品の栄養飢餓非依存性のオートファジー制御機構を解析するために、illumina NovaSeq6000 システムを用いたゲノムワイドな RNA-Seq トランスクリプトーム解析を行った。また、応答性の高い遺伝子をピックアップし、CRISPR/Cas9 ゲノム編集システムを用いて遺伝子欠損細胞を作製し、オートファジーへの影響を解析した。

[結果・考察]

オートファジーを活性化する食品を開発し、栄養飢餓に依存しない特徴的な食品性活性化機構が存在することを見出した。そこで、ゲノムワイドなトランスクリプトーム解析を行い、食品性オートファジーに応答する遺伝子を探索した。そして、非常に高い誘導を示す 1 つの転写因子に注目した。本転写因子が食品性オートファジーにどのように関与するかを明らかにするために、遺伝子欠損細胞を作製し、オートファジーへの影響を検討した。その結果、本転写因子が食品性オートファジーの活性化に関与することを見出した。一方、栄養飢餓シグナルの中心的な役割を果たす mTORC1 を介したオートファジーには、本転写因子の欠損が顕著な影響を与えないことが示唆された。以上の結果から、われわれが新たに開発したオートファジー促進食品は、栄養飢餓シグナル非依存性にオートファジーを活性化しており、その制御に転写因子を介した機構が関与することが見出された。

Autophagy, mTORC1-independent signaling pathway, Food function

講演番号：4A05a14
講演日時：3 月 28 日 12:13～ センター2 号館 A05 会場

近赤外蛍光イメージングを用いた *in vivo* オートファジー活性評価法の構築
Establishment of an *in vivo* assay system for monitoring autophagy utilizing NIR fluorescence imaging

○福田 哲平[1]、大西 康太[2]、増田 真志[2]、松﨑 泰教[3]、今野 歩[3]、藤元 萌[4]、大西 愛花[1]、坂井 麻衣子[1]、大南 博和[2]、奥村 仙示[2]、原 太一[5]、平井 宏和[3]、竹谷 豊[2] ([1]徳島大学 大学院栄養生命科学教育部 臨床食管理学分野、[2]徳島大学 大学院医歯薬学研究部 臨床食管理学分野、[3]群馬大学 大学院医学系研究科 脳神経再生医学分野、[4]東京大学 大学院農学生命科学研究科 動物細胞制御学研究室、[5]早稲田大学 人間科学学術院健康福祉科学科 細胞制御学・食品生命科学研究室)

○Teppei FUKUDA[1], Kohta OHNISHI[2], Masashi MASUDA[2], Yasunori MATSUZAKI[3], Ayumu KONNO[3], Moe FUJIMOTO[4], Aika OHNISHI[1], Maiko SAKAI[1], Hirokazu OHMINAMI[2], Hisami YAMANAKA-OKUMURA[2], Taichi HARA[5], Hirokazu HIRAI[3], Yutaka TAKETANI[2] ([1]Dept. of Clinical Nutrition and Food Management, Graduate School of Nutrition and Bioscience, Tokushima University, [2]Dept. of Clinical Nutrition and Food Management, Institute of Biomedical Sciences, Tokushima University, [3]Dept. of Neurophysiology & Neural Repair, Gunma University Graduate School of Medicine, [4]Lab. of Animal Cell Regulation, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, the University of Tokyo, [5]Lab. of Cellular Regulation/Food and Life Science, Faculty of Human Sciences, Waseda University)

【目的】オートファジーは、細胞内に生じた異常分子に対する分解機構の一つであり、生体恒常性の維持に大きく寄与する。その機能不全が様々な疾病の発症要因となることや、逆に、全身でオートファジーを活性化させた遺伝子改変マウスが抗老化様の表現型を示すことから、本活性を適切に調節することができれば、広範囲の疾病や老化現象そのものに対する新規な予防戦略になりうる。しかし、その活性強度を評価するための方法論は未だに発展途上にあり、特に、生きた動物個体のオートファジー活性を定量評価する手法は全く確立されていない。本研究では、生体透過性の高い近赤外蛍光タンパク質を搭載した新規遺伝子プローブを作出し、マウス生体の諸臓器におけるオートファジー活性をリアルタイムで定量評価できる新たな評価系の構築を試みた。
【方法と結果】現在、培養細胞レベルでの活性評価に広く利用されている GFP-LC3-RFP プローブ（Kaizuka *et al.*, *Molecular Cell*, 2016）の測定原理を参照し、新規遺伝子プローブ（miRFP720-LC3-miRFP670-FLAGx3）を設計・作出した。本プローブは、マウス生体外部からの非侵襲的な活性評価を可能にするために、励起/発光波長域の異なる 2 種類の近赤外蛍光タンパク質（miRFP720、miRFP670）で標識されている。まず、このプローブ遺伝子配列をコードする pDNA を、リポフェクション法により HeLa 細胞に導入し、プローブ由来のタンパク質発現をウエスタンブロット法により確認した。また、プローブ発現細胞に対して、オートファジー誘導剤（Torin1, 250 nM）、もしくは、阻害剤（bafilomycin A1, 100 nM）を投与したところ、細胞におけるオートファジー活性の変動に伴って、プローブの発現量が増減することを確認した。続いて、この遺伝子プローブをマウスで発現させるために、HEK293T 細胞を用いて本プローブ遺伝子を搭載したアデノ随伴ウィルスベクター（AAV-PHP.eB）を作出し、雄性 C57BL/6N マウスの眼窩静脈叢に投与した（$1x10^{12}$ vg/匹）。感染後 3～4 週間で、麻酔状態のマウスを IVIS（*in vivo* imaging system）に供し、プローブ由来の 2 種の近赤外蛍光に対して生体外部からのイメージングを試みた。その結果、AAV ベクターを感染させたマウスの脳、及び、肝臓からプローブ由来の 2 種の近赤外蛍光が検出され、非侵襲的な *in vivo* イメージングが可能であることを確認できた。現在、Torin1、bafilomycin A1 をそれぞれ投与したマウスのイメージングを行っており、オートファジー活性に対する *in vivo* 評価系としての妥当性を検証している。
本評価系を確立できれば、種々の生理的条件におけるオートファジー活性の変動を *in vivo* レベルでモニターすることが可能となる。また、本活性を調節する活性成分の探索研究への応用も期待できる。

Autophagy, NIR fluorescence imaging, AAV vector

発表責任者：大西 康太（ohnishi.kohta@tokushima-u.ac.jp）

講演番号：4A06a01
講演日時：3 月 28 日 09:30～ センター2 号館 A06 会場

シソ葉香気成分による免疫抑制効果

Immunosuppressive effect of perilla leaf aroma components

○岡田 光、八代 拓也、西山 千春（東理大）
○Hikaru OKADA, Takuya YASHIRO, Chiharu NISHIYAMA (Dept. of Biol Sci and Tech., Tokyo Univ. of Sci)

［目的］シソの葉は特有の香りと防腐・殺菌作用をもつことから和食において欠かせない食材である。シソの葉の香気成分はペリルアルデヒド、ペリリルアルコール、リモネンであり、なかでも精油の 50%以上を占める主要成分ペリルアルデヒドは強い抗酸化活性を有することから抗がん作用、抗炎症作用など、様々な生理活性が期待されるモノテルペンである。我々を含む研究グループでも、最近、ペリルアルデヒドが炎症性サイトカイン産生を抑制すること、その経口摂取が炎症性腸疾患を改善することなどを報告した。このように、炎症におけるペリルアルデヒドや関連する香気成分の影響は解明されつつあるが、獲得免疫への作用は未解明な部分が多く残されている。獲得免疫を調節する薬剤は自己免疫疾患やアレルギー性疾患に用いられていることから、これらの疾患の予防や緩和に有効な食品素材としての可能性を追究するため、本研究では獲得免疫に対するシソ葉香気成分の影響を解析した。
［方法・結果］OVA（Ovalbumin）反応性の TCR Tg である OT-II マウスから脾臓細胞を調製し、ここに OVA ペプチドを添加して、抗原提示細胞依存的な T 細胞活性化を引き起こす実験系を用い、シソ葉香気成分が及ぼす影響を評価した。T 細胞活性化の指標として、培養上清中の IL-2 濃度を ELISA 法で測定した結果、IL-2 産生量が、ペリリルアルコールやペリルアルデヒド添加によって有意に抑制された。次に、このような作用が、直接 T 細胞を標的としたものか、樹状細胞機能などを制御する結果もたらされるものかを明らかにするため、各免疫細胞への影響を解析した。まず、T 細胞への作用検討として、BALB/c マウスの脾臓細胞からナイーブ CD4 陽性 T 細胞を単離し、細胞分裂をトレース可能な蛍光色素 CFSE で染色した後、抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体による T 細胞活性化を行なった。その結果、抗原提示細胞非存在下において活性化に伴った T 細胞分裂は、ペリルアルデヒドによって抑制されることが判明した。続いて、マウス骨髄由来樹状細胞を調製し、LPS 刺激によって発現が誘導される炎症性サイトカイン（IL-6, IL-12b, TNF-α）と抗原提示関連分子（MHC classII, CD86）の発現レベルを測定し、樹状細胞活性化に対する各成分の影響を検討した。その結果、ペリリルアルコール、ペリルアルデヒドはいずれも LPS 刺激による炎症性サイトカインと抗原提示関連分子の発現上昇を抑制した。
　以上の結果から、シソの葉香気成分のなかでもペリルアルデヒドが最も効果的に獲得免疫を抑制することが明らかとなった。その作用機序としてペリルアルデヒドが T 細胞に直接作用して細胞増殖を抑制することに加え、樹状細胞にも作用して炎症性サイトカインの産生などを抑制することで T 細胞のエフェクター化に間接的に影響することが示唆された。

Dendritic cells, T cells, Perilla leaf aroma components

講演番号：4A06a02
講演日時：3 月 28 日 09:41～ センター2 号館 A06 会場

サリチルアルデヒドによる免疫細胞の機能調節

Regulation of immune cell function by salicylaldehyde

○松原 宏樹、八代 拓也、飯塚 雄輝、笠倉 和巳、西山 千春（東理大）
○ Hiroki MATSUBARA, Takuya YASHIRO, Yuki IIZUKA, Kazumi KASAKURA, Tiharu NISHIYAMA (Dept. of Biol Sci and Tech., Tokyo Univ. of Sci)

植物や微生物が産生する化合物の中には、低分子の揮発性物質が存在し、香料成分として利用され得る。このような天然香料や、天然香料成分の構造をもとに設計された合成香料は、着香を目的に食品や飲料に添加されており、日常的に接する身近な存在である。そのため、香料成分は生体への安全性や許容摂取量が十分に確認されているが、生理活性については不明な点が多い。近年、様々な食品成分に多様な免疫調節作用が見出され、その作用機序が分子レベルで解明されつつある。我々は、食品などへの添加実績のある香料成分の中から、免疫調節能を有する物質を探索し、その分子機構を明らかにすることを目指し、本研究では、アレルギーを引き起こすマスト細胞と、炎症反応や適応免疫応答に関わる樹状細胞を対象にスクリーニングを行い、その作用を細胞、生体レベルで解析した。
世界的に 3000 種類ほど存在する香料成分の中から、構造的な特徴を考慮して約 70 種類を選抜した。マウス骨髄由来マスト細胞（BMMC)の培養液に香料を添加し、IgE 依存的な脱顆粒反応を指標にスクリーニングを行った結果、細胞毒性を示さない濃度で BMMC の脱顆粒反応を用量依存的に抑制する 6 化合物 Salicylaldehyde、Isoamyl salicylate、Benzyl Salicylate、Diacetyl、Mintlactone、cis-jasmone が選出された。フローサイトメトリーの解析から、6 化合物はいずれも BMMC 上の FcεRI 発現レベルを有意に低下させることが確認された。このことから，少なくとも IgE 受容体の発現抑制が IgE 依存的な活性化を抑える一因であると考えられた。さらに、アナフィラキシーモデルを用い、Benzyl Salicylate の経口摂取が生体のアレルギー反応も有意に緩和することを明らかにした。続いて、樹状細胞への影響を調べるため、マウス骨髄由来樹状細胞(BMDC)を調製し、リボポリサッカロイド(LPS)で刺激後、炎症性サイトカインの発現量を測定した。その結果、6 化合物は *Il6* や *Il12b* 発現誘導を抑制したが、特に Salicylaldehyde の効果が顕著であった。BMDC は LPS 刺激によって T 細胞への抗原提示に重要な MHC classⅡや CD86 の発現が増強されるが、Salicylaldehyde は表面分子の発現変化も抑制したことから、適応免疫応答を調節できる可能性が考えられた。そこで OT-II（OVA 特異的 TCR の Tg）マウスから脾臓細胞を調製し、OVA 存在下で培養することにより抗原提示細胞依存的な T 細胞活性化を評価する実験を行った。OVA の添加により活性化した T 細胞は IL-2 を分泌するが、Salicylaldehyde は、この IL-2 産生を有意に抑制することが明らかになった。
本研究により、香料成分から、アレルギーや炎症、適応免疫の細胞応答を調節する化合物が複数見出され、その分子機構の一部が明らかになった。

Dendritic cell, T cell, Salicylaldehyde

講演番号：4A06a03
講演日時：3 月 28 日 09:52～ センター2 号館 A06 会場

ケンフェロールは AhR アンタゴニスト活性を介して腸管樹状細胞の RALDH2 発現を促進する
Kaempferol promotes RALDH2 expression in intestinal dendritic cells through AhR antagonist activity

○綿貫 優実、八代 拓也、山口 昌樹、西山 千春（東理大）
○Yumi WATANUKI, Takuya YASHIRO, Masaki YAMAGUCHI, Chiharu NISHIYAMA (Dept. of Biol Sci and Tech., Tokyo Univ. of Sci)

レチノイン酸合成酵素Retinaldehyde dehydrogenase 2 (RALDH2)は、*Aldh1a2*遺伝子にコードされ、腸管に局在する樹状細胞 (Dendritic cell; DC)に特徴的に発現する。レチノイン酸は、Foxp3の発現誘導を介して免疫寛容の成立に重要な制御性T細胞の分化を促すことから、腸管DCに発現するRALDH2は、T細胞の機能調節を介して腸管の免疫恒常性維持に貢献すると期待される。私たちは、DCにおけるRALDH2の発現を促進する食品成分の探索を進め、玉ねぎなどに含まれるケンフェロールや類縁体ポリフェノールに発現促進効果があることを発見した。本研究ではケンフェロールがRALDH2発現を上昇させる分子機構を解析すると共に、生体の免疫機能に対する有効性を評価した。

ポリフェノール類が受容体型転写因子のリガンドとして機能する例が報告されていたことから、骨髄由来DC (BMDC)においてこれらの候補分子をノックダウン（KD）した結果、Aryl hydrocarbon receptor (AhR)のKDにより*Aldh1a2*遺伝子発現が上昇し、ケンフェロールへの応答が消失した。このことから、AhRは*Aldh 1 a2*発現の負の調節因子であり、ケンフェロールはAhRのアンタゴニストとして作用すると考えられた。同時に、この結果は*Aldh1a2*遺伝子発現を恒常的に抑制する内因性AhRアゴニストの存在を示唆するものであったことから、AhRアゴニスト活性が報告されているトリプトファン代謝産物キヌレニン (Kyn)に着目した。代謝経路の律速酵素であるIndoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)をKDしたところ、RALDH2発現が上昇することが示され、KynがAhRの内因性アゴニストとして*Aldh1a2*遺伝子発現を抑制していることが明らかとなった。腸内細菌もトリプトファンを代謝してIndole化合物を生成し、その一部は宿主細胞に対してAhRリガンドとして作用することが知られている。BMDCをIndole-3-aldehyde (IAld)で処理したところ、RALDH2発現が低下し、腸内細菌代謝産物にもRALDH2発現を抑制する作用があることが明らかとなった。AhRアンタゴニストによるRALDH2の発現上昇が生体のDCでも観察されるか検討するために、合成アンタゴニストCH-223191のマウス腹腔内投与や、ケンフェロール配糖体アストラガリンの経口投与を行った。その結果、いずれの投与においても腸管膜リンパ節DCのRALDH2酵素活性の有意な増加が認められた。

以上まとめると、DCにおいてAhRはKynやIAldと結合することで*Aldh1a2*の転写を負に調節しており、ケンフェロールなどのAhRアンタゴニストは転写抑制の解除によってRALDH2の発現を上昇させることが明らかとなった。またケンフェロールの摂取が、生体内DCにおけるRALDH2活性上昇を介した経口免疫寛容の成立補助に有効であることが示唆された。

Kaempferol, AhR, Dendritic cell

講演番号：4A06a04
講演日時：3 月 28 日 10:03～ センター2 号館 A06 会場

化学発光を利用した非侵襲性腎炎モデルマウスの作製、および glucosyl hesperidin の予防効果

Application of *serum amyloid A3* promoter-*luciferase* mice to image early renal disease and the preventive effect of glucosyl-hesperidin

○八澤 菜央[1]、橋本 孝太郎[1]、仮屋 大志[1]、眞田 洋平[1]、橋本 貴生[1]、van de Loo Fons AJ[2]、Thanutchaporn Kumrungsee[1]、矢中 規之[1] ([1]広島大院統合生命、[2]Radboud Univ.)
○Nao YAZAWA[1], Kotaro HASHIMOTO[1], Taishi KARIYA[1], Yohei SANADA[1], Takao HASHIMOTO[1], Fons AJ van de Loo[2], Kumrungsee Thanutchaporn[1], Noriyuki YANAKA[1] ([1]Hiroshima Univ., [2]Radboud Univ.)

［研究背景、および研究目的］食品機能の評価を目的とした動物試験の実施は、動物愛護の面から大きな社会問題となっている。非侵襲性の実験系の構築は、同一個体の経時的な観察などによる使用動物数の削減や苦痛軽減の観点において極めて重要な課題である。近年、生体内のルシフェラーゼ反応による微弱発光を高感度に分析する *in vivo* イメージングが開発されている。以前発表者らは炎症性マーカー遺伝子である *serum amyloid A3（Saa3）* 遺伝子プロモーターに *luciferase* 遺伝子を連結し、遺伝子組換えを行った Saa3-luc マウスを作製し、肥満時の白色脂肪組織の慢性炎症を体外から非侵襲的に観察することに成功している。一方、慢性腎臓病の罹患者数は年々増加し、腎障害の悪化による人工透析患者数の増加や、血液生化学的な評価法は初期の腎障害を反映しづらいことなどが問題となっている。腎障害の予防や腎機能の改善を指向した食品素材が求められていることから、本研究では、Saa3-luc マウスを adenine 食誘導性腎炎モデルへ応用し、予防効果を有する食品素材の探索を行った。
［研究方法、および結果］8 週齢雄性 ICR に adenine を 0.2%含む食餌（adenine 食）を 3 週間与えた結果、腎尿細管内での 2,8-dihydroxyadenine（2,8-DHA）結晶の沈着、血中尿素窒素（BUN）や creatinine の上昇、および腎臓における Saa3 遺伝子の発現上昇が認められた。adenine 食を Saa3-luc マウスに摂取させたところ、腎臓由来の *luciferase* 活性は上昇した。そこで、Saa3-luc マウスに adenine 食を 1 週間与えたところ、血中 BUN や creatinine が上昇しない病態初期において、*in vivo* イメージング解析によって体外から腎臓由来の化学発光が観察された。この化学発光量は、*collagen* 遺伝子などの組織線維化マーカーの発現量と正に相関していた。Saa3-luc マウスが腎臓疾患早期の効果を指標とした機能性評価に利用可能であると考えられたことから、食品素材の探索を行った結果、glucosyl hesperidin（G-Hes）摂取によって adenine 食により誘導される化学発光の減弱が認められた。そこで ICR マウスに adenine 食に G-Hes を 3%含む餌（G-Hes 食）を 19 日間与えた結果、血中 BUN や creatinine の有意な低下が認められ、また、腎尿細管内の 2,8-DHA の沈着は認められず、間質の線維化も抑制されていた。adenine 誘発腎炎モデルにおいて adenine から 2,8-DHA の生成では肝臓由来 xanthine oxidase（XO）活性が関与すると考えられていることから、hesperetin の milk 由来 XO に対する *in vitro* での阻害活性を検討したところ、IC50 は 10.6 μM であった。さらに、XO 活性は痛風の原因となる尿酸生成に関与することから、9 週齢雄性 ICR に G-Hes(500 mg/kg)を経口投与したところ、potassium oxonate 誘発による血中尿酸値の上昇を有意に抑制した。
［考察］Saa3-luc マウスの腎臓の化学発光は、腎障害初期における間質性変化や線維化遺伝子の発現を反映した評価系であると考えられた。さらに、G-Hes は XO 阻害に基づいて adenine 誘発腎炎モデルの腎障害を予防し、さらに血中尿酸濃度の低下などによる抗痛風効果が期待される。

adenine-induced kidney disease, glucosyl-hesperidin, xanthine oxidase

講演番号：4A06a05
講演日時：3 月 28 日 10:14～ センター2 号館 A06 会場

緑茶カテキン EGCG の抗肥満作用は骨髄細胞特異的 67-kDa ラミニン受容体ノックアウトマウスにおいて消失する

Anti-obesity effect of green tea polyphenol EGCG is attenuated in myeloid cell-specific 67-kDa laminin receptor knockout mice

○村田 京介、福富 拓哉、山田 脩平、冨岡 玲乃、西岡 成汰、熊添 基文、藤村 由紀、立花 宏文（九大院農院・生機科）
○Kyosuke MURATA, Takuya FUKUTOMI, Shuhei YAMADA, Reno TOMIOKA, Seita NISHIOKA, Motofumi KUMAZOE, Yoshinori FUJIMURA, Hirofumi TACHIBANA (Kyushu Univ.)

67-kDa ラミニン受容体 (67LR) はラミニン結合タンパク質として発見された細胞膜タンパク質であり、*Ribosomal protein SA* (*Rpsa*) 遺伝子にコードされる。我々は緑茶カテキンの主成分である (－) -Epigallocatechin-3-*O*-gallate (EGCG) の受容体として 67LR を同定し[1]、EGCG が 67LR を介して抗がん作用[2]などの多彩な生体調節作用を発揮することを明らかにした。肥満に伴う代謝異常の病態基盤である慢性炎症には、マクロファージが重要な役割を担うことが知られている。一方、EGCG は抗肥満作用を示すこと、また、マクロファージにおいて 67LR を介して抗炎症作用[3]を発揮することが示されている。そこで本研究では、マクロファージを含む骨髄細胞特異的 67LR ノックアウトマウスを作製し、EGCG の抗肥満作用における 67LR の関与を生体レベルで検討した。

Cre/loxP システムを用いたゲノム編集により、骨髄細胞特異的 67LR ノックアウトマウスの作製を試みた。交配により得られたマウスの尾由来 DNA を用いて遺伝子型を判定し、対照群となる loxP 配列を持つ flox マウス (*Rpsa*$^{M\phi fl/fl}$;fl/fl)、loxP および Cre 配列を持つノックアウトマウス (*Rpsa*$^{M\phi-/-}$;-/-) を獲得した。マウスの 67LR 遺伝子ノックアウト確認を行ったところ、-/-マウスの骨髄細胞における 67LR ゲノム DNA の組み換えならびに腹腔内マクロファージにおける 67LR 遺伝子発現量の低下を確認した。以上より、骨髄細胞特異的 67LR ノックアウトマウスの作製に世界で初めて成功した。

次に、fl/fl マウスおよび-/-マウスを用いて高脂肪高ショ糖食および EGCG の摂食試験を実施した。その結果、fl/fl マウスにおいては肥満誘導による体重増加が EGCG により抑制されたが、-/-マウスではその作用が消失した。また、肥満の原因の一つとされる脂肪組織におけるマクロファージの浸潤を評価したところ、fl/fl マウスでは EGCG の摂食によりマクロファージの浸潤が抑制されたのに対し、-/-マウスでは EGCG の抑制作用が見られなかった。以上の結果より、緑茶カテキン EGCG の抗肥満作用および抗炎症作用はマクロファージの 67LR を介した作用であることが明らかになった。

1) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 11, 380-381, 2004
2) *J. Clin. Invest.*, 123, 787-799, 2013
3) *J. Biol. Chem.*, 292, 4077-4088, 2017

EGCG, 67-kDa laminin receptor, macrophage

講演番号：4A06a06
講演日時：3 月 28 日 10:35～ センター2 号館 A06 会場

加齢に伴う腸間膜リンパ節樹状細胞における RALDH2 発現の低下は抗原摂取による制御性 T 細胞誘導の低下の一因となる

Age dependent decrease of RALDH2 expression in mesenteric lymph node dendritic cells is involved in decrease of regulatory T cell induction by oral antigen.

○高野 智弘[1]、上滝 隆太郎[1]、朴 知賢[1,2]、塩河 亜弥[1]、好田 正[3]、田之倉 優[1,2]、宮川 拓也[2]、高橋 恭子[4]、足立(中嶋) はるよ[1]、八村 敏志[1] ([1]東大院農生科・食の安全研セ、[2]東大院農生科・応生化、[3]東農工大農・応生化、[4]日大・生資科)
○ Tomohiro TAKANO[1], Ryutaro KOTAKI[1], Jihyun PARK[1,2], Aya SHIOKAWA[1], Tadashi YOSHIDA[3], Masaru TANOKURA[1,2], Takuya MIYAKAWA[2], Kyoko TAKAHASHI[4], Haruyo NAKAJIMA-ADACHI[1], Satoshi HACHIMURA[1] ([1]Res. Cent. Food Safety, Univ. Tokyo, [2]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. Tokyo, [3]Tokyo Univ. of Agriculture and Tech., [4]Nihon Univ.)

【目的】制御性 T 細胞(regulatory T cells; Treg)は過剰な免疫反応の抑制に働く細胞として重要であるが、加齢に伴い新たな抗原に対して誘導される Treg の分化は減少することが報告されており、加齢性疾患の一因となると考えられる。腸管において樹状細胞(dendritic cell; DC)はビタミン A 代謝産物であるレチノイン酸の産生を介して Treg 誘導の促進に寄与することが報告されている。当研究グループでは過去の大会において、腸間膜リンパ節(mesenteric lymph node; MLN) DC の中でもレチノイン酸合成に関わるレチナール脱水素酵素(retinaldehyde dehydrogenase 2;RALDH2)を特に高発現している細胞集団($CD11b^{-}CD103^{+}PD\text{-}L1^{high}$ サブセット)について、加齢に伴い割合が減少し、酵素活性が低下していることを報告済みである。本大会では、加齢に伴うエピジェネティックな遺伝子発現制御による RALDH2 遺伝子発現低下の可能性を検討し、また食物抗原に対する Treg を誘導できる実験系を使用し、加齢に伴う Treg 誘導能の低下におけるレチノイン酸の影響を検討した。

【方法】BALB/c 若齢マウス(2~4 ヶ月齢)、加齢マウス(18~27 ヶ月齢)の MLN から $CD11c^{+}$細胞をセルソーターにより精製し、バイサルファイトシーケンス法により RALDH2 遺伝子プロモーター領域におけるメチル化された CpG モチーフの割合を測定した。卵白アルブミン特異的 T 細胞抗原レセプターを発現する RAG2KO DO11.10 マウスの若齢マウス(2~4 ヶ月齢)および加齢マウス(13~21 ヶ月齢)に卵白含有食を 7 日間自由摂食させ、MLN における $Foxp3^{+}CD4^{+}$T 細胞の割合をフローサイトメトリーにより解析した。また RAG2KO DO11.10 マウスの加齢マウスに卵白含有食を自由摂食させ、試験群にはレチノイン酸を dimethyl sulfoxide (DMSO)に溶解して 7 日間腹腔内投与し、対照群には DMSO を同様に投与した。上記同様、MLN における $Foxp3^{+}CD4^{+}$T 細胞の割合を解析した。

【結果】MLN DC の遺伝子プロモーター領域の CpG サイトは若齢マウスと比較して加齢マウスで有意にメチル化が亢進されていた。RAG2KO DO11.10 マウスにおいて卵白食摂食後、若齢マウスと比較して加齢マウスでは MLN 中の $Foxp3^{+}CD4^{+}$T 細胞の割合が減少していることが観察された。またレチノイン酸の投与により、対照群と比較して $Foxp3^{+}CD4^{+}$T 細胞の割合が増加する傾向が認められた。本研究の結果から、加齢マウスにおいて MLN DC の RALDH2 遺伝子発現のエピジェネティックな発現抑制を一因としてレチノイン酸産生能が減少し、Treg の誘導が低下することが示唆された。

regulatory T cells, dendritic cells, aging

発表責任者：八村敏志（ahachi@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4A06a07
講演日時：3 月 28 日 10:46～ センター2 号館 A06 会場

γ-リノレン酸の乳酸菌代謝産物であるγKetoC は免疫抑制作用を有し皮膚炎を抑制する
γKetoC, a lactic acid bacteria metabolite of γ-linolenic acid, has an immunosuppressive effect and suppresses dermatitis
○八代 拓也[1]、山本 愛日[1]、飯田 真由[1]、大村 さくら[1]、岸野 重信[2]、小川 順[2]、西山 千春[1]([1]東京理科大基礎工、[2]京大院農・応用生命)
○ Takuya YASHIRO[1], Asuka YAMAMOTO[1], Mayu IIDA[1], Sakura OHMURA[1], Shigenobu KISHINO[2], Jun OGAWA[2], Chiharu NISHIYAMA[1] ([1]Tokyo Univ. Sci., [2]Kyoto Univ.)

食事から摂取した脂肪酸は、エネルギー源になるだけでなく、種々の受容体への結合を介して生体調節機能を示す。多価不飽和脂肪酸 (PUFA)には、二重結合の位置により定義されるω3 系とω6 系があり、それぞれ抗炎症作用と向炎症作用を示すことが知られている。近年、腸内に生息する乳酸菌が PUFA を代謝することが見出され、水酸化や、脱水素・異性化反応を介して、宿主の代謝とは異なる脂肪酸を生じることが明らかとなった。これら乳酸菌代謝産物が持つ生理活性が解析されつつあるが、免疫反応への作用は十分には解明されていない。本研究では、リノール酸、α-リノレン酸、γ-リノレン酸を初発物質として乳酸菌代謝を介して得られる水酸化脂肪酸、オキソ脂肪酸、エノン脂肪酸の計 9 種類について、免疫系に及ぼす影響を解析した。

Ovalbumin (OVA)特異的 T 細胞受容体のトランスジェニックマウスから調製した脾臓細胞を OVA と各種脂肪酸添加条件下で培養し、培地中の IL-2 を測定することで T 細胞の活性化を評価した。その結果、初発物質や水酸化脂肪酸、オキソ脂肪酸は IL-2 産生に影響を及ぼさないか僅かに抑制する程度であったのに対し、エノン脂肪酸は 3 種類とも IL-2 産生を著しく抑制した。このことから、エノン脂肪酸には抗原提示に呼応した T 細胞活性化に対し強い抑制作用があることが示された。次に、抗 CD3/CD28 抗体を用いて脾臓由来 Naïve $CD4^+$T 細胞を刺激した際の細胞分裂への影響を解析したところ、エノン脂肪酸処理により T 細胞分裂が低減しており、エノン脂肪酸が直接 T 細胞に作用することが判明した。続いて、マウス骨髄細胞由来樹状細胞を Lipopolysaccharide (LPS)で刺激し、表面分子やサイトカインの発現量を測定した。その結果、LPS 刺激依存的な MHC class II や CD86、TNF-α、IL-6 の発現上昇がエノン脂肪酸、特にγ-リノレン酸由来エノン脂肪酸 (γKetoC)により有意に抑制され、エノン脂肪酸が樹状細胞の機能を抑制することで間接的に T 細胞の分化増殖を抑制することが示された。最後に、生体の免疫応答におけるγKetoC の作用を評価するため、皮膚の免疫疾患である乾癬のマウスモデルを適用した。本モデルではイミキモドの連続塗布により慢性炎症による皮膚の肥厚が認められるが、γKetoC を予め経口摂取させたマウスでは腫れが有意に抑制されていた。

以上の結果から、ω6 に該当するγ-リノレン酸は向炎症作用を示すが、これを乳酸菌が代謝することにより生じるγKetoC には抗炎症作用があることが *in vitro*、*in vivo* 両方の実験から証明された。γKetoC はω7 に相当することから、従来のω3/ω6 の概念に当てはまらないエノン脂肪酸特有の作用機序を有すると考えられる。

γ-linolenic acid, Lactic acid bacteria, Immunosuppression

講演番号：4A06a08
講演日時：3 月 28 日 10:57～ センター2 号館 A06 会場

分岐鎖型短鎖脂肪酸によるマスト細胞依存性アレルギー炎症の抑制
Branched-short-chain fatty acids suppress mast cell-mediated allergic inflammation
○飯塚 雄輝、笠倉 和巳、藤垣 泉、三浦 亮介、八代 拓也、西山 千春（東理大基礎工）
○Yuki IIZUKA, Kazumi KSAKURA, IZUMI FUJIGAKI, Ryousuke MIURA, Takuya YASHIRO, Chiharu NISHIYAMA (Tokyo University of Science)

短鎖脂肪酸（Short chain fatty acid; SCFA）は、食品中に含まれると共に腸内細菌の代謝によっても産生される。近年、SCFAには宿主のエネルギー源としての作用に加え、腸管上皮細胞や血球系細胞の機能を調節する働きもあることが見出され、腸管免疫の恒常性維持に関わる機構として注目されている。このような中、我々は、I型アレルギー反応を引き起こすエフェクター細胞であるマスト細胞のIgE依存的な活性化に対し、SCFAが抑制的に作用することを見出し、酪酸や吉草酸がアレルギー反応を抑制することを報告してきた。一方、SCFAの一種であるイソ酪酸やイソ吉草酸も枯草菌の代謝産物として納豆などに含まれているが、これら分岐鎖型SCFAが免疫応答に及ぼす影響はほとんど知られていない。そこで、本研究では、イソ酪酸とイソ吉草酸に着目し、マスト細胞活性化に伴うアレルギー反応への作用を解析した。
プライマリーマスト細胞として、マウス骨髄由来培養マスト細胞(Bone marrow-derived mast cell; BMMC)を調製した。IgE抗体と抗原を添加するとBMMCはIgE受容体が架橋構造によって凝集されることを引き金に脱顆粒反応を引き起こすが、イソ酪酸やイソ吉草酸の存在下で培養したBMMCは脱顆粒が有意に抑制された。活性化したマスト細胞では炎症性サイトカインやTh2サイトカイン産生が誘導され、遅延相のアレルギー反応を増幅する。これらのサイトカイン産生に対するSCFAの作用を調べたところ、TNF-αについてはイソ酪酸とイソ吉草酸共に、IL-6とIL-13に対してはイソ吉草酸が有意に産生抑制することが明らかとなった。分岐鎖SCFAによる脱顆粒抑制は、BMMCをGi/o型GPCRの阻害剤である百日咳毒素で処理することによって解消された。またGPR109Aに対するsiRNAを導入したところ分岐鎖型SCFAによる抑制効果が減弱化した。これらのことから、分岐鎖型SCFAのマスト細胞活性化抑制効果はGi/o型GPCRを介して発揮され、GPR109Aがその一端を担っていると考えられた。続いて、生体のアレルギー反応に対する分岐鎖SCFAの効果を検証するため、IgE誘導性全身性アナフィラキシーマウスモデルを用いて解析を行ったところ、抗原投与後に惹起される急激な体温低下がいずれの分岐鎖型SCFA経口投与群でも有意に緩和された。さらに、マウス鼻炎モデルへの効果を調べた結果、抗原の経鼻投与によって引き起こされるくしゃみの回数がイソ吉草酸経口投与により有意に減少し、イソ酪酸でも減少傾向が観察された。
本研究より、分岐鎖型SCFAがIgE依存的なマスト細胞活性化を抑制すること、その作用機構としてGPR109Aを含む Gi/o型GPCRが関わることが細胞レベルで示された。さらにアナフィラキシーや鼻炎モデルの解析から、分岐鎖型SCFAの摂取はアレルギー症状を緩和させ、分岐鎖型SCFA、特にイソ吉草酸がI型アレルギー反応の予防や治療に有効な成分であることが示唆された。

Mast cell, Short-chain fatty acid, Allergy

講演番号：4A06a09
講演日時：3 月 28 日 11:08～ センター2 号館 A06 会場

食物アレルギーモデルマウス由来肺細胞の喘息誘導性刺激に対する応答性

Pulmonary immune cell responses to allergic stimuli in mouse model of food allergy

○柳井 梨咲、江上 里砂、斎藤 南那、中川 渉、東 俊哉、鷲谷 絢史、髙橋 輝、津田 真人、細野 朗(日大生資科)
○ Risa YANAI, Risa EGAMI, Nana SAITO, Wataru NAKAGAWA, Shunya AZUMA, Kenji WASHIYA, Akira TAKAHASHI, Masato TSUDA, Akira HOSONO (Nihon Univ.)

【目的】
食物アレルギーは喘息の発症リスクや併発による喘息の症状悪化を誘発することが示唆されている。しかし、食物アレルギー発症により、喘息の原因となる抗原などの刺激に対する肺の免疫系細胞の感受性が亢進する機序は十分に明らかにされていない。本研究では、食物アレルギーモデルマウスを用いて、①肺のアレルギー誘導に関わる免疫系細胞の構成と 2 型サイトカイン産生能、②肺細胞の喘息誘導性刺激に対する応答性を明らかにすることを目的とした。
【方法】
卵白オボアルブミン（OVA）特異的 T 細胞受容体発現トランスジェニックマウスの OVA23-3 マウス（8-12 週齢）を、食物アレルギーを誘導する卵白食群と対照群に分け、それぞれ 20%卵白またはカゼイン含有飼料を 1 週間自由摂取させ、各群のマウスから肺細胞を調製した。肺細胞中の抗原感作型（$CD44^{high}CD62L^{low}$) $CD4^+$ T 細胞、好酸球（$CD11c^-SiglecF^+$細胞）、好塩基球（$Fc\varepsilon RI^+CD49b^+$細胞）、自然リンパ球（$Lineage^-CD25^+$細胞）の割合と細胞内サイトカイン発現をフローサイトメトリーにより解析した。また、調製した肺細胞を上皮細胞由来アラーム物質（IL-25、IL-33）、プロテアーゼ活性を持つアレルゲンであるイエダニ抗原（HDM）の刺激下で 48 時間培養し、2 型サイトカイン（IL-4、IL-5、IL-13）産生量を ELISA 法により測定した。
【結果】
卵白食群の肺細胞では対照群と比較して、抗原感作型 $CD4^+$ T 細胞、好酸球、好塩基球の割合が有意に高く、自然リンパ球の割合も高い傾向を示した。さらに、細胞内サイトカインの解析において、卵白食群の肺細胞は IL-4 と IL-5 発現上昇が認められ、IL-4 発現細胞の中では好塩基球、IL-5 発現細胞の中では自然リンパ球がそれぞれの主要な細胞種であった。次に、肺細胞の喘息誘導性刺激に対する応答性を *ex vivo* 実験系により解析したところ、卵白食群の肺細胞は対照群と比較して、IL-33 または IL-25 刺激に対して IL-5 および IL-13 を高産生し、対照群の肺細胞ではほとんど検出されない IL-4 産生も検出された。さらに、卵白食群の肺細胞は HDM 刺激に対する IL-5 産生が増加した。以上より、食物アレルギー状態の肺では、抗原感作型 $CD4^+$ T 細胞、好塩基球、自然リンパ球などが増加しており、喘息誘導性のアレルゲンの侵入時に、肺上皮細胞が放出するサイトカインを介して、2 型サイトカイン産生が亢進される可能性が推察された。

food allergy, lung, type 2 cytokine

発表責任者：津田　真人（tsuda.masato@nihon-u.ac.jp）

講演番号：4A06a10
講演日時：3 月 28 日 11:19～ センター2 号館 A06 会場

腸間膜リンパ節樹状細胞の抗原提示による T 細胞分化における乳酸菌 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* YRC3780 のバランス調節効果
Lactococcus lactis subsp. *cremoris* YRC3780 modulates the balance of T cell differentiation induced by antigen presentation of mesenteric lymph node dendritic cells
○中川 稜悟[1]、顧 文テイ[1]、高野 智弘[1]、王 イバイ[1]、宇野 智[1]、森永 真実子[1]、内田 健治[2]、鳥居 剛史[2]、元島 英雅[2]、片野 直哉[2]、足立(中嶋) はるよ[1]、八村 敏志[1] ([1]東大院農生科・食の安全研セ、[2]よつ葉乳業・中央研)
○ Ryogo NAKAGAWA[1], Wenting GU[1], Tomohiro TAKANO[1], Yimei WANG[1], Satoru UNO[1], Mamiko MORINAGA[1], Kenji UCHIDA[2], Tsuyoshi TORII[2], Hidemasa MOTOSHIMA[2], Naoya KATANO[2], Haruyo ADACHI (NAKAJIMA)[1], Satoshi HACHIMURA[1] ([1]Res. Cent. Food Safety, Univ. Tokyo, [2]Yotsuba Milk Products)

【目的】アレルギー症状の緩和のためには，その要因である Th2 過剰応答の抑制とともに，Th1，Th2，Th17，Treg といった $CD4^+$T 細胞サブセットの分化のバランス調節が重要と考えられている。本研究で用いた，発酵乳ケフィア由来の乳酸菌 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* YRC3780 株は抗アレルギー作用が期待される乳酸菌として選抜され，シラカバ花粉症における二重盲検試験において症状緩和効果が示唆されている。また本株による免疫応答への影響を in vitro で検討したところ，マウス腸間膜リンパ節（MLN）樹状細胞（DC）において，抗炎症性サイトカイン IL-10，レチノイン酸の生成に関わる RALDH2，TGF-β活性化機能を有するインテグリンαvβ8 の遺伝子発現を増強すること，MLN DC と $CD4^+$T 細胞の共培養系において，$CD4^+$T 細胞の IL-4 産生を抑制し IFN-γ産生を増強すること，$Foxp3^+$Treg を誘導すること，さらには Th17 応答促進/Treg 応答抑制にはたらくケモカインレセプター CCR6 の遺伝子発現を抑制することが明らかになった。このような背景から，本研究では腸管 DC から T 細胞への抗原提示における免疫応答をより網羅的かつ詳細に検討した。
【方法】BALB/c マウスの MLN より MLN DC として $CD11c^+$細胞，卵白アルブミン（OVA）特異的 TCR を発現する RAG2KO/DO11.10 トランスジェニックマウスの脾臓より $CD4^+$T 細胞を，それぞれ MACS 法により精製し，OVA 抗原ペプチド，*L. cremoris* YRC3780 菌体とともに共培養を行い，60 時間後の細胞から蛍光セルソーターにより OVA 特異的 $Kj1.26^+CD4^+$T 細胞を精製し，DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。さらに，本培養系における 48，60 時間後の mRNA 発現量を RT-PCR 法により定量した。また Treg 誘導を促進する TGF-β添加条件についても解析を行った。
【結果】DNA マイクロアレイ解析の結果，*L. cremoris* YRC3780 菌体の添加により，Th1 応答関連遺伝子として，CCR5，IL-18R の遺伝子発現が有意に増加し，TGF-β(+)条件下では T-bet，IFN-γ が有意に増加した。Th2 応答関連遺伝子発現としては GATA-3 が有意に減少した。TGF-β(−)条件下では IL-4 が有意に減少し，TGF-β(+)条件下では OX40，CCR8 が有意に減少した。Treg 応答関連遺伝子発現としては Furin が有意に増加し，TGF-β(+)条件下では IL-10，CD39 が有意に増加した。Th17 応答促進/Treg 応答抑制関連遺伝子発現としては CCR6 が有意に減少した。また T-bet，GATA-3，CCR8 の遺伝子発現については RT-PCR 法においても有意差を確認した。これらのことから，*L. cremoris* YRC3780 株が腸管における DC から T 細胞への抗原提示による免疫応答に作用し，Th1 と Treg の誘導を促進し，Th1/Th2 バランス，Treg/Th17 バランスを調節することで抗アレルギー作用をもたらすことが示唆された。

Lactococcus lactis, dendritic cell, T cell

発表責任者：八村敏志（ahachi@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4A06a11
講演日時：3 月 28 日 11:40～ センター2 号館 A06 会場

Lactobacillus paracasei K71 経口投与による NC/Nga マウスの皮膚炎症状緩和とサイトカイン発現レベル変動

Suppression of picryl chloride-induced contact dermatitis with concomitant alterations in cytokine gene expression in NC/Nga mice by oral administration of *Lactobacillus paracasei* K71

○山本 佳奈[1]、岡本 楓[2]、町田 優莉佳[2]、三原 敏敬[1]、城 斗志夫[2]、原 崇[2] ([1]亀田製菓、[2]新潟大農)

○Kana YAMAMOTO[1], Kaede OKAMOTO[2], Yurika MACHIDA[2], Toshihiro MIHARA[1], Toshio JOH[2], Takashi HARA[2] ([1]Kameda Seika Co., Ltd., [2]Fac. Agric., Niigata Univ.)

【目的】*Lactobacillus paracasei* K71（K71 株）は，動物実験を通じて抗アレルギー作用を有する乳酸菌として酒粕より分離され，アトピー性皮膚炎患者を対象としたヒト介入試験により症状改善効果が確認されている。本研究では，K71 株の抗アレルギー作用機序の解明を目標とし，K71 株による NC/Nga マウスの皮膚炎症状緩和に伴うサイトカイン発現レベルの変動について検討した。

【方法】NC/Nga マウス（♂，6 週齢）は市販の固形餌を自由摂取させ，23±1℃に維持されたコンベンショナルな環境で飼育した。皮膚炎症状は，ピクリルクロライドを耳介部に連続塗布することにより誘発した。K71 株は滅菌処理後に凍結乾燥粉末とし，マウス 1 匹当たり毎日 10 mg を経口投与した。毎週 1 回定期的に耳介部炎症症状スコアと引っ掻き行動を評価し，血中の IgE, IgG1, IgG2a を ELISA 法により定量した。エンドポイントにおいて，脾細胞（脾臓より分離した白血球画分）を抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体を添加して培養し、培養上清中のサイトカインを ELISA 法により定量した。さらに，脾臓，パイエル板，腸管膜リンパ節に存在する Treg 細胞を FACS 解析により検出した。耳介部（炎症部位）におけるサイトカインの mRNA 発現レベルは，リアルタイム RT-PCR 法により評価した。

【結果】ピクリルクロライド塗布開始後 7 週目以降，耳介部における炎症症状スコアと血中 IgE および IgG1 レベルは，K71 株投与群マウスにおいて対照群マウスより有意に低い値を示した。K71 株投与群マウスでは，対照群マウスと比較し，IL-4 などの Th2 サイトカインだけでなく，IFN-γ などの Th1 サイトカインの発現レベルも低下していた。また，K71 株投与により，耳介部（炎症部位）における炎症性サイトカイン（TNF-α など）の発現レベル低下が確認された。K71 株投与群マウスでは引っ掻き行動が減り、耳介部（炎症部位）における IL-31 発現レベルが低下していた。FACS 解析の結果，K71 株投与群マウスのパイエル板，腸管膜リンパ節において Treg 細胞（$CD4^+CD25^+Foxp3^+$）が増加していた。一方，耳介部（炎症部位）において，K71 株投与により IL-10 および TGF-β1 発現レベルが有意に低下していた。本研究により，K71 株投与による NC/Nga マウスの皮膚炎症状緩和に伴い，腸管免疫組織における Treg 細胞の増加が確認されたが，患部では Th1 サイトカインおよび Th2 サイトカインの発現レベル低下に加え，抑制性サイトカイン（IL-10，TGF-β1）の発現レベルも低下していることが確認された。

Lactobacillus paracasei K71, NC/Nga mice, cytokine expression

発表責任者：原　崇（harata@agr.niigata-u.ac.jp）

講演番号：4A06a12
講演日時：3 月 28 日 11:51～ センター2 号館 A06 会場

キニガイグチ（*Tylopilus ballouii*）に含有される抗アレルギー活性物質に関する研究

Variegatic acid from the edible mushroom *Tylopilus ballouii* inhibits TNF-α production and PKCβ1 activity in leukemia cells

○菅谷 紘一[1]、井野 睦美[2]、小野瀬 淳一[1]、阿部 尚樹[1]（[1]東農大院・健康、[2]東農大院・栄養）
○Kouichi SUGAYA[1], Mutsumi Ino[2], Jun-ichi Onose[1], Naoki Abe[1] ([1]Dept. of Nutri. Sci & Food Safety, Crad. Sch. of Agric., Tokyo Univ. of Agric., [2]Dept. of Food & Nutri. Sci, Crad. Sch. of Agric., Tokyo Univ. of Agric.)

[目的]これまでに我々は中国産食用きのこに焦点を当てそれぞれの抗アレルギー活性を検討して来た。今回、キニガイグチ(*Tylopilus ballouii*)が好塩基球系細胞において脱顆粒抑制活性、サイトカイン分泌抑制活性を有する事を見出した。そこでキニガイグチの活性成分を明らかにし、その抗アレルギー活性並びにそのメカニズムについて検討することを目的とした。

[方法] キニガイグチ乾燥子実体(596 g)を 80%含水アセトンに浸漬後濾別しエバポレーターにてアセトンを留去、pH3.0 に調整後、酢酸エチルにて分配抽出し、中・酸性画分(12.7 g)を得た。得られた中・酸性画分をメタノールを溶出溶媒とした Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーを用いて Fr. A から E の 5 画分に分画し、それぞれの画分を抗 DNP-IgE 抗体によって感作させた RBL-2H3 細胞に処理後 DNP-BSA で刺激後の培養上清についてβ-ヘキソサミニダーゼ放出量の測定を行った。β-ヘキソサミニダーゼ放出抑制活性の強かった Fr. D (93.8 mg)を逆相中圧カラムクロマトグラフィーに供して精製を行い化合物 1(53.8 mg)を得た。得られた化合物 1 は NMR に供することで化学構造の検討を行った。さらに化合物 1 について抗原刺激並びに、カルシウムイオノフォアであるイオノマイシン刺激の異なる二つの条件によるβ-ヘキソサミニダーゼ放出量、並びに TNF-α分泌量について測定を行い、PKCβ1 阻害活性についても検討した。

[結果]キニガイグチ乾燥子実体から化合物 1 を単離した。機器分析データ解析から化合物 1 を variegatic acid と同定した。さらに、variegatic acid の抗アレルギー活性について抑制メカニズム解明のため抗原刺激およびイオノマイシン刺激の二つの条件を用いて検討した。その結果β-ヘキソサミニダーゼ放出阻害活性についてはそれぞれ IC_{50} 値 10.4 μM、 22.2 μM を示し、いずれの刺激に対しても濃度依存的に抑制効果を示した。また TNF-α分泌阻害活性についてもそれぞれ IC_{50} 値 16.8 μM、 20.1 μM を与え、いずれの刺激に対しても濃度依存的な阻害効果が認められた。この結果から variegatic acid の抗アレルギー活性の作用点は RBL-2H3 細胞内シグナル伝達経路の細胞内 Ca^{2+}濃度上昇以降にあることが予想された。そこで、細胞内 Ca^{2+}濃度上昇により活性化される PKCβ1 キナーゼに対する影響を検討したところ濃度依存的な抑制を示し IC_{50} 値 36.2 μM を与えたことから、variegatic acid の抗アレルギー活性が、PKCβ1 阻害によりもたらされることが示唆された。今後は、構造的に類似性のあるキノコ由来のテルフェニル骨格を持つ化合物における PKCβ1 阻害活性についても検討する予定である。

Variegatic acid, PKCβ1, RBL-2H3

講演番号：4A06a13
講演日時：3 月 28 日 12:02～ センター2 号館 A06 会場

加熱処理によるフコイダン分解物の抗アレルギー効果への影響
Influence of temperature treatment on anti-allergic property of fucoidan from *Saccharina japonica*
○森田 温子[1,2]、水野 雅史[1,2] ([1]日本農芸化学会、[2]神戸大院農)
○Atsuko MORITA[1,2], Masashi MIZUNO[1,2] ([1]JSBBA, [2]Kobe Univ.)

【目的】本研究室ではこれまでに、受動皮膚アナフィラキシー（PCA）反応試験および卵白アルブミン誘導性アレルギーモデルにおいて、マコンブ由来粗フコイダンを経口投与した場合、I 型アレルギー抑制効果を示すことを明らかにした。また、フコイダンは 50℃、10 分間加熱処理すると、抗アレルギー効果が消失し活性画分も消失していた。しかしながら、加熱処理がフコイダン活性画分に与える影響は未だ詳細が不明であるため、本研究では加熱処理によるどのような活性画分の変化が抗アレルギー効果の消失に関連しているのかについてフコイダン活性画分とその加熱分解物の比較を通して検討した。
【方法】加熱処理による影響は、フコイダン熱分解物を Toyopearl DEAE650M に供し、0, 0.5, 1.0 M の NaCl を含む緩衝液を用いてステップワイズ法によって分析した。抗アレルギー効果は、PCA 反応試験によって評価した。マコンブ由来粗フコイダンに含まれる活性画分を分取し、所定時間加熱処理したものをそれぞれ 4 日間マウスに経口摂取させた後、抗原抗体反応を惹起させ、反応前後の耳介厚の差を耳介浮腫としアレルギー症状の指標とした。
【結果】マコンブ由来粗フコイダンを陰イオン交換クロマトグラフィーによって分画した際に得られた 3 つの画分のうち、0 M の NaCl を含む緩衝液で溶出した画分（F1）にのみ抗アレルギー効果が認められた。加熱処理により活性画分がどのように変化するのかを調べるため、F1 画分を 50℃で加熱処理を行い同様の方法で分画した。結果は、3 つの画分（Fraction1’,2’,3’)が得られ、加熱時間が 30 分までは F1 画分に相当する F1’ 画分が減少し F3 画分に相当する F3’ 画分が増加していたが、60 分後には F1’ 画分が再び増加しており、粗フコイダンのクロマトグラムと類似していた。そこで、60 分間の加熱処理を行った F1 画分をマウスに経口投与し、PCA 反応試験によってアレルギー抑制効果を評価したところ耳介浮腫抑制効果は見られなかった。以上の結果より、アレルギー抑制効果を有する F1 画分は加熱処理によって分解されるが、その挙動は加熱処理時間によって変化することが明らかとなった。また、活性画分を 60 分間加熱処理した画分は粗フコイダンのクロマトグラムと類似の溶出結果を示していたがアレルギー抑制効果は見られなかったことより、60 分間の加熱処理によってフコイダン活性画分には構造の変化が生じていることが示唆された。加熱処理によるフコイダンの構造変化と抗アレルギー効果の消失との関連性について、ゲル濾過クロマトグラフィーや核磁気共鳴（NMR）法を用いた構造解析による分析を進めている。

anti-allergic effect, fucoidan, Ion Exchange Chromatography

講演番号：4A07a01
講演日時：3 月 28 日 09:30～ センター2 号館 A07 会場

Aurantiochytrium sp.1 AJ7869 を用いたステロール生産技術の開発
Development of sterol production process by Aurantiochytrium sp.1 AJ7869
○鈴木 茂雄[1]、KISELEVA Evgenia[1]、西田 裕貴[3]、石橋 洋平[2]、沖野 望[2]、伊東 信[2]([1]味の素株式会社、[2]九大院・農・生命機能、[3]九大院・生資環・生命機能)
○Shigeo SUZUKI[1], Evgenia KISELEVA[1], Yuki NISHIDA[3], Yohei ISHIBASHI[2], Nozomu OKINO[2], Makoto ITO[2] ([1]AJINOMOTO CO., INC., [2]Dept. Biosci. Biotech., Grad. Sch. Biore. Bioenvtl. Sci., Kyushu Univ, [3]Dept. Biosci. Biotech., Grad. Sch. Biore. Bioenvtl. Sci., Kyushu Univ.)

【背景】
スラウストキトリッドは、高度不飽和脂肪酸、アスタキサンチンやスクワレンなどの健康価値の高い機能性脂質を蓄積することが知られている。我々は、スラウストリッドの *Aurantiochytrium* sp.1 AJ7869 株(AJ7869 株)が、細胞内に動物、植物及び真菌類が生産する多様なステロールを高蓄積することを明らかにした。ステロールは、植物ステロールによるコレステロール吸収の抑制効果といった健康価値以外にも、エビ養殖においてコレステロールがその成長に必須であることから、人類の健康と食資源に貢献する重要な素材である。本研究では、AJ7869 株のステロール代謝改変によって、目的のステロールを蓄積可能か確認し、本株のステロール生産の宿主としての有用性を評価することとした。

【結果】
先行研究において、*Aurantiochytrium limacinum* では 24－デヒドロコレステロールレダクターゼ（DHCR24）および 24-C-メチルトランスフェラーゼ（SMT1）がステロール合成の分岐点となることが示されている（石橋ら、2019 年度本大会)。本研究では、ステロール生産能力の高い AJ7869 株を用いて、動物ステロールと植物や真菌ステロールの生合成分岐に関わる遺伝子の特定と各生物由来のステロールを選択的に生産することの可否を検証した。AJ7869 株の両遺伝子(*dhcr24*、*smt1*)の破壊株を作製し、それらの培養評価を実施した。その結果、*dhcr24* 破壊株で動物ステロールのコレステロール生産が消失し、植物ステロールのスチグマステロールの蓄積が野生株の 1.1%から 1.6%（乾燥重量当たり）に向上することが示された。次に、*smt1* 破壊株では、*dhcr24* 破壊株とは対照的にスチグマステロール生産が消失し、コレステロールの蓄積が野生株の 1.3%から 2.7%に向上することが確認された。以上の結果から、AJ7869 株においても *dhcr24* と *smt1* がステロール生合成の動物ステロールと植物真菌ステロールのそれぞれを作り分ける鍵遺伝子であることが明らかになった。本発表では上記の実験結果に加え、*smt1* 破壊株を親株とした動物ステロールの蓄積向上の育種の結果について報告する。

Sterol, Thraustochytrid, Functional lipid

発表責任者：鈴木茂雄（shigeo_suzuki@ajinomoto.com）

講演番号：4A07a02
講演日時：3 月 28 日 09:41～ センター2 号館 A07 会場

出芽酵母によるゲラニオールから他の香気物質への転換に関する研究

Study on conversion of geraniol to other aromatic substances by budding yeast

○前田 勇、大橋 勇敢（宇都宮大院農）
○Isamu MAEDA, Yuka OHASHI (Grad. Sch. Agric., Utsunomiya Univ.)

【目的】

ゲラニオールはブドウやホップに含まれる香気成分であり、ワインやビールの香りの形成において重要である。発酵過程において、ゲラニオールは種々の香気成分に転換されることが知られている[(1)]。出芽酵母では、モノテルペンアルコールのアセチル化は *ATF1* 遺伝子が、ゲラニオールからシトロネロールの転換は *OYE2* 遺伝子がそれぞれ関与することが明らかとなっている[(2)]。しかしながら、これら以外の転換過程に関与する遺伝子はこれまで明らかにされておらず、本研究ではゲラニオールの代謝産物を調べると共に、転換に関与する遺伝子について調べることとした。

【方法】

出芽酵母は、実験用株として *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 とそのアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子欠損株（Euroscarf）、エール醸造株として *S. cerevisiae* NCYC1681（National Collection of Yeast Cultures）を用いた。グルコースを炭素源とした最少培地にゲラニオールを添加し 20℃で 10 日間の培養を行った。培養液からジクロロメタンで代謝産物を抽出し GC-MS による分析を行った。

【結果】

BY4741 と NCYC1681 において培養経過と共にゲラニオールの減少とリナロール、シトロネロール、ゲラン酸、シトロネル酸の増加が認められた。これらの中でリナロールは細胞を移植せずに培地のみで振盪を行った際も認められた。シトロネロールは培養初期に濃度増加が顕著であった。ゲラン酸とシトロネル酸は培養後期に向かうにつれて濃度増加が顕著となった。アルコール脱水素酵素をコードする遺伝子の欠損株の中で親株と同等の増殖が認められた 4 株についてこれらの代謝産物の生成を調べたところ、1 株の培養液ではゲラン酸とシトロネル酸が共に検出されなかった。

【考察】

発酵過程ではゲラニオールから、これまで報告のあったシトロネロールに加えてゲラン酸とシトロネル酸が生成することが示された。濃度の経時的変化からシトロネル酸は、生成したシトロネロールから転換されたと考えられる。リナロールの生成は細胞の代謝に依存しないこと、そしてゲラン酸とシトロネル酸の生成にはアルコール脱水素酵素の遺伝子の一つが関与することが示唆された。

(1) 蛸井 潔, 醸造協会誌, 110, 479-488 (2015)
(2) Damien Steyer, et al., Food Microbiology, 33, 228-234 (2013)

Saccharomyces cerevisiae, terpenoids, geraniol

発表責任者：前田勇（i-maeda@cc.utsunomiya-u.ac.jp）

講演番号：4A07a03
講演日時：3 月 28 日 09:52～ センター2 号館 A07 会場

発酵大豆テンペ抽出物に含まれる脂肪酸とその誘導体の抗菌活性の評価
Evaluation of antibacterial activity of fatty acids and their derivatives in an extract of fermented soybean tempeh

○和久井 美咲[1]、村上 舞[2]、前田 勇[1,2] ([1]宇都宮大院農、[2]宇都宮大農)
○Misaki WAKUI[1], Mai MURAKAMI[2], Isamu MAEDA[1,2] ([1]Grad. Sch. Agric., Utsunomiya Univ., [2]Sch. Agric., Utsunomiya Univ.)

【背景と目的】
テンペとは、大豆を糸状菌 *Rhizopus oligosporus* で発酵させて得られる食品である。これまでの研究で、テンペ中の脂肪酸が抗菌性に関わることがわかっている。本研究では、これら複数存在する脂肪酸を同定し、それらの抗菌性を評価することを目的とした。
【実験方法】
水に浸漬後の大豆を蒸煮した後、*R. oligosporus*の胞子懸濁液を移植し88時間、30℃で発酵させた。その後、凍結乾燥により水分を除き粉砕した後、4℃にてエタノールで 8 時間の抽出を行った。抽出物を遠心分離した後、得られた上清を濾過し抽出物を得た。脂肪酸の同定は、HPLC と LC-MS、GC-MS を使用した。最少発育阻止濃度（MIC）の測定は、枯草菌とメチシリン感受性黄色ブドウ球菌（MSSA）を使用した。
【実験結果】
HPLC による分析では、脂肪酸標品との保持時間の比較により、テンペ抽出物中にはリノレン酸、リノール酸、およびオレイン酸が含まれていることが明らかになった。LC-MS より、リノレン酸 1 分子とグリセロール 1 分子が結合した 1-モノリノレニンと 2-モノリノレニン、リノール酸 1 分子とグリセロール 1 分子が結合した 1-モノリノレインと 2-モノリノレイン、オレイン酸 1 分子とグリセロール 1 分子が結合した 1-モノオレインと 2-モノオレインが検出された。GC-MS より、リノレン酸エチル、リノール酸エチル、オレイン酸エチル、ステアリン酸エチル、パルミチン酸エチルが含まれることが明らかとなった。最少発育阻止濃度（MIC）の測定において抗菌活性を示したのは、リノール酸とリノレン酸であった。リノール酸 MIC は枯草菌では 20 μg/ml、MSSA では 400 μg/ml であり、一方、リノレン酸 MIC は、枯草菌では 10 μg/ml、MSSA では 600 μg/ml であった。検出された全ての脂肪酸エチルエステルでは抗菌活性は認められなかった。
【考察】
テンペ抽出物中のエチルエステルの脂肪酸組成は大豆油の主要な脂肪酸組成と一致したことから、テンペ中の脂肪酸とそれらの誘導体は大豆油から発酵中に遊離したものであると推察される。また、MIC の測定結果より、抗菌性に関与しているのは主にリノール酸とリノレン酸であった。今後は、テンペ抽出物中に含まれる脂肪酸モノグリセリドの抗菌活性の評価を行う予定である。

Tempeh, *Rhizopus*, fatty acids

発表責任者：前田勇（i-maeda@cc.utsunomiya-u.ac.jp）

講演番号：4A07a04
講演日時：3 月 28 日 10:03～ センター2 号館 A07 会場

機能獲得型変異を持つ YabJ タンパク質による納豆菌ポリ-γ-グルタミン酸の生産制御

A gain-of-function mutation in *yabJ* gene involved in gamma-PGA production of *B. subtilis*

○木村 啓太郎[1]、ル　ティ　テゥ ホン[1]、藤本 瑞[2] ([1]農研機構・食品部門、[2]農研機構・生物部門)
○Keitarou KIMURA[1], Hong Le Thi Thu[1], Zui Fujimoto[2] ([1]FRI/NARO, [2]IAS/NARO)

納豆菌は粘り物質（poly-gamma-glutamic acid, γPGA）を生産して納豆に独特のテクスチャーを与える(1)．γPGA 合成酵素遺伝子（*pgsBCA*）の発現は細胞密度応答（Quorum sensing）の制御下にあり，受容体型 2 成分制御系（ComP-ComA）への菌体外低分子ペプチド（ComX）の結合によって定常期に誘導される． 従って，*comP-comA* 遺伝子および転写因子 ComA が直接発現を制御する *degQ* 遺伝子の破壊株は γPGA 非生産となる．また， Quorum sensing 以外にも各種ストレス（高塩濃度や高ｐH など）でγPGA 生産が誘導されることが知られている．γPGA 生産制御に関わる新たな因子を探索するため，*degQ* 遺伝子破壊株の γPGA 生産を回復させる復帰抑制変異のスクリーニングを試みた．

【方法】納豆菌の *degQ* 遺伝子破壊株をエチルメタンスルホン酸で変異処理し，γPGA 生産が回復した抑制変異株を選抜した．次いで，得られた抑制変異株の全ゲノム塩基配列を解析して変異を検出した．相補試験等の遺伝学的実験は定法に従って行った．抑制変異株の遺伝子発現を RNA-seq 法で網羅的に解析した．

【結果と考察】独立に取得した 3 株の抑制変異株には其々３～４個の変異が検出され，その内 *yabJ* 遺伝子のアミノ酸置換変異（S103F）が 3 株に共通であった(2)．原因変異を特定するため変異型 *yabJ* 遺伝子を親株（*degQ* 遺伝子破壊株）に導入し，γPGA 生産と γPGA 合成遺伝子発現の回復を確認した．興味深いことに，変異型 *yabJ* は野生型に対して優性であった．復帰抑制変異株では γPGA 合成を直接制御する転写因子 DegU の発現量が大きく増加しており，RNA-seq 解析の結果，DegU に制御される多くの鞭毛関連遺伝子の発現が劇的に増えていることが判明した．YabJ タンパク質は高度に保存された YjgF/YER057c/UK114 ファミリーに属するエナミン・イミン化合物の解毒（脱アミノ化）酵素であると報告されている．しかし，異説も多く，その機能には不明な点が多く残されている（Niehaus et al., 2015）．今回得られた実験結果から，アミノ酸置換変異（S103F）により *yabJ* 遺伝子産物が脱アミノ反応以外の何らかの機能を獲得して DegU の発現量を増加させたと推定された．現在，変異型 YabJ タンパク質の構造解析を行っている．

(1) Kimura and Yokoyama, (2019) *Current opinion in biotechnology*, 56, 36-42.
(2) Hong L.T.T. et al., (2019) DOI: 10.1016/j.jbiosc.2019.05.014

Bacillus subtilis, poly-gamma-glutamic acid, yabJ gene

講演番号：4A07a05
講演日時：3 月 28 日 10:14～ センター2 号館 A07 会場

ポリヒドロキシアルカン酸重合酵素の連鎖移動反応を介した 3-ヒドロキシ酪酸オリゴマーの分泌生産

Microbial secretion of 3-hydroxybutyrate oligomer by polyhydoroxyalkanoate synthases via chain transfer reaction

○宮原 佑宜[1,3]、廣江 綾香[1,3]、山田 麻里子[1,3]、柘植 丈治[2,3]、田口 精一[1,4]（[1]東京農大、[2]東工大、[3]JST-MIRAI、[4]JST-CREST）
○ Yuki MIYAHARA[1,3], Ayaka HIROE[1,3], Mariko YAMADA[1,3], Takeharu TSUGE[2,3], Seiichi TAGUCHI[1,4] ([1]Tokyo University of Agriculture, [2]Tokyo Tech, [3]JST-MIRAI, [4]JST-CREST)

【背景・目的】　微生物プラスチックであるポリ-3-ヒドロキシ酪酸［P(3HB)］は、ポリヒドロキシアルカン酸（PHA）重合酵素を発現した組換え大腸菌の細胞内で合成、蓄積することが知られている。P(3HB)は植物バイオマスから生合成可能であり、また生分解性を有することから環境、医療分野などで応用が期待されている。高分子材料である P(3HB)とは別に、低～中分子である 3HB オリゴマー（3HBO）は、クモの性フェロモンや土壌微生物の増殖因子といった生理活性物質として自然界に分布している。また、近年、3HBO は病原性細菌に対して抗菌性を示すことが報告されており、材料としての応用が可能である。そこで本研究では、さまざまな PHA 重合酵素を発現させた組換え大腸菌を用いて 3HBO の分泌生産システムの開発を試みた。さらに、*in vitro* 重合系を用いてオリゴマー生成機構に関して調査を行った。

【実験】　大腸菌の野生株（or エタノール生産抑制株）に 3HB モノマー供給遺伝子（*phaA*、*phaB*）を導入し、そこへ、いくつかの PHA 重合酵素遺伝子（*phaC*）を導入した組換え大腸菌を構築した。グルコースを炭素源として培養を行い、培養液中に分泌したオリゴマー生産量を評価した。また、生産したオリゴマーの構造解析は NMR および ESI-TOF-MS を用いて分析した。続いて、オリゴマーの生成機構を調査するために、精製した PHA 重合酵素と 3HB-CoA を用いた *in vitro* 重合を行った。

【結果・考察】　組換え大腸菌を用いて培養を行った結果、使用した全ての重合酵素で培養液中に 3HBO の分泌生産が確認され、驚くべきことに、オリゴマー生産量は使用した重合酵素に依存していた。3HBO の構造解析を行ったところ、カルボキシ末端にエタノールが付加されており、これは、内在性のエタノールが重合反応の連鎖移動（CT）剤として機能し、分子鎖末端に取り込まれたためであると考えられた。そこで、エタノール生産抑制株を宿主として同様の実験を行ったところ、オリゴマーのカルボキシ末端におけるエタノール修飾を極めて低くすることができた。続いて、3HBO の生成機構を調査するために、精製酵素を用いた *in vitro* 重合反応を行った。CT 剤としてエタノールおよび 3HB を重合系中に添加して反応を行うと、それぞれ、エタノール末端およびカルボキシ末端の 3HBO 生成を確認した。その一方で、CT 剤非添加条件では、オリゴマー生成はほとんど確認できなかった。これにより、エタノールや 3HB のような CT 剤がオリゴマー合成に関与していることがわかった。

3-hydroxybutyrate oligomer, *In vitro* polymerization, Secretory production

講演番号：4A07a06
講演日時：3 月 28 日 10:35～ センター2 号館 A07 会場

Bacillus cereus YB-4 由来ポリエステル重合酵素を発現させた組換え大腸菌による 3-ヒドロキシブタン酸オリゴマーの分泌生産

Secretory production of 3-hydroxybutyrate oligomer in recombinant *Escherichia coli* haboring polyhydoroxyalkanoate synthase derived from *Bacillus cereus* YB-4

○後藤 早希[1,2]、宮原 佑宜[1,2]、廣江 綾香[1,2]、山田 麻里子[1,2]、柘植 丈治[2,3]、田口 精一[1]（[1]東農大、[2]JST-MIRAI、[3]東工大院）

○Saki GOTO[1,2], Yuki MIYAHARA[1,2], Ayaka HIROE[1,2], Mariko YAMADA[1,2], Takeharu TSUGE[2,3], Seiichi TAGUCHI[1] ([1]Tokyo Univ. of Agric., [2]JST-MIRAI, [3]Tokyo Tech.)

【背景および目的】生分解性ポリマーであるポリ−3−ヒドロキシブタン酸［P(3HB)］の合成では、ポリヒドロキシアルカン酸（PHA）重合酵素により 3HB モノマーが重合される。最近、PHA 重合酵素遺伝子を導入した組換え大腸菌は、細胞内に P(3HB)を蓄積するだけでなく、培地中に 3HB オリゴマー（3HBO）を分泌することが確認された[1)]。3HBO は、細菌を含む多くの生物種に分布しており、植物の成長因子やクモの性フェロモンなどに含まれる物質である。さらに、カルボキシ末端に望みのジオール基を本重合系で付加した 3HBO は、ポリウレタンなどの高分子材料の基幹物質として利用できる付加価値の高い化合物である。本研究では、効率的な 3HBO の分泌生産を達成するために、*Bacillus cereus* YB-4 由来の PHA 重合酵素をさまざまな大腸菌で発現させ、その活性評価を行った。

【実験】PHA 重合酵素遺伝子を、さまざまな大腸菌に導入して組換え株を作製し、2%グルコース含有 LB 培地で、30˚C、48 時間培養を行った。培養後、上清中に分泌された 3HBO 量は、酵素法により測定した。さらに、細胞内に蓄積した 3HBO も同じく酵素法により抽出したサンプルの濃度を測定した。また、組換え株での PHA 重合酵素発現量を確認するため、超音波破砕して粗酵素液を回収した。つづいて、粗酵素液に含まれる重合酵素の活性を測定するために、バッファー中で 3HB-CoA と混合させ重合反応を行った。酵素活性は、チオエステル結合の吸収波長である 236 nm の減少を追跡することで評価した。

【結果および考察】さまざまな大腸菌の組換え株を培養した結果、宿主の違いにより、分泌された 3HBO 量は異なった（最大 7 倍量）。さらに、組換え株の細胞内に蓄積した 3HBO 量を測定すると、オリゴマーの細胞内蓄積量と細胞外分泌量に正の相関関係がみられた。また、組換え株から抽出した粗酵素液の重合酵素活性を測定した結果、3HBO 生産量が比較的高かった株は、酵素活性値も高くなる傾向がみられた。一方で、生産量が低い株は重合酵素活性値も低く、粗酵素液の重合酵素活性と 3HBO 生産量に相関関係がみられた。これは、重合酵素の発現が向上したことにより、オリゴマー生産量が増加したと推察された。今後、PHA 重合酵素の発現量を確認し、発現の条件検討を行う予定である。

1） Miyahara, Y. et al. (2019) *Biotechnol. J.* DOI:10.1002/biot.201900201

3-hydroxybutyrate oligomer (3HBO), PHA synthase, secretory production

講演番号：4A07a07
講演日時：3 月 28 日 10:46～ センター2 号館 A07 会場

オリゴエステル分泌生産における末端構造の制御および構造解析

Secretory production and structure analysis of microbial oligoesters with diol end groups

○水野 匠詞[1,2]、櫻井 徹生[1,2]、廣江 綾香[2,3]、田口 精一[3,4]、柘植 丈治[1,2]（[1]東工大、[2]JST-MIRAI、[3]東京農大、[4]北大院工）
○ Shoji MIZUNO[1,2], Tetsuo Sakurai[1,2], Ayaka Hiroe[2,3], Seiichi Taguchi[3,4], Takeharu Tsuge[1,2]
([1]Tokyo Tech, [2]JST-MIRAI, [3]Tokyo Univ. of Agric., [4]Hokkaido univ.)

【目的】

微生物を使ってバイオマスから合成できるポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は環境低負荷な材料であり、生分解性能を有している。このことから、PHA は石油由来プラスチックに代わる高分子材料として注目されている。近年、アルコールなどのヒドロキシ基をもつ化合物を PHA 合成時に大量に共存させると、PHA 重合酵素 (PhaC) はアルコールを用いた連鎖移動反応により低分子量のオリゴエステルを生成し、細胞外に分泌されることがわかった（Utsunomia et al., ACS Sustain. Chem. Eng.,5, 2360, 2017）。このオリゴエステルをマクロモノマーとして利用できれば、PHA の生分解性を有する新しい材料を作り出することができる。しかしながら、オリゴエステルの分泌量は依然として低いままである。そこで本研究では、培養上清中に効率よくオリゴエステルを分泌生産させるために、培養条件の検討、種々の連鎖移動剤の添加効果について検討を行った。さらには、詳細なオリゴエステルの構造についても解析し、このオリゴエステルを用いたポリウレタンの合成を検討した。

【方法】

オリゴエステルの生産量を増加させるために、培地組成および種々の連鎖移動剤の添加効果を検討した。本実験では、10 種類のポリオールを連鎖移動剤の候補として選択した。さらに、精製したオリゴエステルの構造を確認するために ^{1}H NMR 分析および ESI-TOF-MS 分析に供した。得られたオリゴエステルをジイソシアネートと反応させることでポリウレタンの合成を検討した。

【結果と考察】

大腸菌を生産宿主として、糖質を炭素源としてオリゴエステルの生産増強について検討を行った。連鎖移動剤としてジエチレングリコール (DEG) を加えた場合に 5 g/L 程度のオリゴエステル生産が確認できた。連鎖移動剤として DEG 以外の他の候補としてプロパンジオールおよびブタンジオールを添加した際に位置異性体の一級アルコールよりも二級アルコールをもつ化合物の方が、オリゴエステル生産に対して増強効果を示すことがわかった。次に、溶媒抽出法により培養上清からオリゴエステルの抽出および精製を行った。^{1}H NMR 分析の結果、両末端に水酸基をもつオリゴエステルが高い割合で生産されていることを確認した。また、ESI-TOF-MS 分析によりオリゴエステルは主に 600 程度（約 8 量体）の分子量を有することがわかった。これらオリゴエステルをマクロモノマーとして利用するために、ジイソシアネートと反応させてポリウレタンの合成を検討した。

Microbial oligoester, Secretory production, Macromonomer

講演番号：4A07a08
講演日時：3 月 28 日 10:57～ センター2 号館 A07 会場

酸ストレスによる抗ウイルス活性物質シネフンギンの増産効果
Effect of Acid-Stress on Anti-viral Sinefungin Production.
○山形 遥、中島 佑里子、根本 理子、稲垣 賢二、田村 隆（岡山大院・環境生命）
○Haruka YAMAGATA, Yuriko NAKASHIMA, Michiko NEMOTO, Kenji INAGAKI, Takashi TAMURA (Grad. Sch. Life Environ. Sci., Okayama Univ.)

［**目的**］放線菌による抗生物質などの二次代謝産物の生産は，温度，pH，培地組成など外的要因の影響を強く受ける。近年，酸性条件下での培養，菌体への熱処理，培地へのアルコール添加など化学的・物理的ストレスにより二次代謝産物の生産性が向上する報告が多数なされている。

核酸系抗生物質は，抗ウイルス活性，抗原虫活性，抗かび活性など優れた生理活性を示すものが多いが，生合成酵素が共通して持つモジュール配列が同定されておらず，生産菌のゲノムを解読しても相同性検索による生合成遺伝子群の同定が困難で，遺伝子工学的アプローチ，つまりプロモーターや転写因子の改変による生産性改善が難しい。本研究では，生合成遺伝子群が未同定の場合でも飛躍的増産を可能にする生物生産技術を開発するために， 核酸系抗生物質シネフンギンを生産する *Streptomyces incarnatus* に酸，熱などのストレスを与え，その増産効果を検討した。さらに本菌のドラフトゲノム解析情報から同定されている *groEL, dnaK* などの品質管理システムのホモログ遺伝子の転写解析を行い，ストレスへの応答機構を検討した。

［**方法**］放線菌 *S. incarnatus* を pH6.0 に調整した SF4 液体培地で培養し，HPLC を用いて培養上清のシネフンギン生産量を測定した。酸ストレス条件では HCl で培地 pH を 4.0 に調整することで，培地 pH のシネフンギン生産への影響を検討した。熱ストレス条件は培養開始より 24 時間を 40℃で培養し， 以降 30℃で培養した。そして定量的 RT-PCR 法により品質管理遺伝子群である *groEL, dnaK* の転写産物を測定した。

［**結果と考察**］中性培地と比較して酸性培地ではシネフンギン生産量が増加した。また，熱ショック（40℃ 24 時間）を与えた菌体も対照区と比較して高生産であった。転写産物の qRT-PCR 解析の結果，酸，熱ストレス条件において *groEL* は培養初期のみ対照区よりも高発現となった。GroEL は新生ポリペプチドや変性したタンパク質のフォールディングを進行する役割を担うので，ストレスを受けて変性したタンパク質が生じやすい状況にある対数増殖期において，一次代謝に関わる酵素群のリフォールディングに寄与したと考えられる。一方で *dnaK* は培養初期だけでなく抗生物質が生産される期間においてもストレスを受けた細胞が対照区よりも有意に *dnaK* 遺伝子が高発現であった。DnaK は主にポリペプチドに結合し凝集を防ぐことでフォールディングを促進するため，ストレスを受けた細胞の培養後期でも高発現しており *dnaK* の高発現がシネフンギン生合成酵素群の安定稼働に寄与して二次代謝産物の高生産をもたらす可能性が示唆された。

nucleoside antibiotics, anti-viral, chaperonin

発表責任者：山形　遥（pxmu1ir7@s.okayama-u.ac.jp）

講演番号：4A07a09
講演日時：3 月 28 日 11:08～ センター2 号館 A07 会場

パームヤシ病原性 Ganoderma boninense に対する抗糸状菌活性の機構解明
Elucidation of mechanism of antifungal activity against palm pathogenic Ganoderma.
○近藤 宜希[1,2]、浅原 理央[2]、中野 貴裕[2]、CHIN Claent fui seung[3]、ZAINUDIN Huzairi[4]、RAMLI Norhayati[4]、田代 幸寛[1,2]、酒井 謙二[1,2] ([1]日本農芸化学会、[2]九大院・生資環、[3]マレーシアサバ大学、[4]プトラ・マレーシア大学)
○Yoshiki KONDOU[1,2], Rio ASAHARA[2], Takahiro NAKANO[2], Claent fui seung CHIN[3], Huzairi ZAINUDIN[4], Norhayati RAMLI[4], Yukihiro TASHIRO[1,2], Kenji SAKAI[1,2] ([1]JSBBA, [2]Grad. Sch. Bioresour. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ., [3]Univ. Malaysia Sabah, Malaysia, [4]Univ. Putra Malaysia, Malaysia)

<緒言>

Ganoderma boniense はパームヤシに感染して幹部腐敗病(BSR)を引き起こす植物病原糸状菌であり、マレーシアのパームオイル産業に甚大な被害を起こしている。一方、パームヤシの廃棄物をメタン発酵させたパーム共コンポストから多機能性細菌 100 株を分離・同定し、その中の 12 株は *G. boniense* に抗糸状菌活性を示す細菌（Anti-G 細菌）であることを報告した（Chin et al., J. Biosci. Bioeng., 2017)。さらに、*Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens* B3、*Bacillus tequilensis* CE4、*Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* TSASi1 は Anti-G の報告はなく、機構も不明である。そこで本研究では、上記 3 株を含む Anti-G 細菌 12 株の機構解明を目的とした。

<実験方法>

まず、*G. boniense* に対する Anti-G 細菌の抗糸状菌活性をペーパーディスク法にて定量的に評価した。TSA 寒天培地に *G. boniense* を接種して 1 日間培養したのち、Anti-G 細菌 12 株をそれぞれペーパーディスクに接種して 7 日間培養し、IE(Inhibition Efficiency)値(%)を抗糸状菌活性として測定した。さらに、キチン含有プレートを用いて Anti-G 細菌のキチナーゼ活性の有無を調査した。さらに、*E. cloacae* subsp. *dissolvens* B3、*B. tequilensis* CE4、*B. subtilis* subsp. *spizizenii* TSASi1 を MiSeq に供し、ドラフトゲノムを得て、抗菌物質の生合成遺伝子を推定した。

<結果>

B. subtilis subsp. *subtilis* P5 株では、培養 2 日後より抗糸状菌活性が検出されて最大 IE 値 54%を示したが、*B. subtilis* subsp. *subtilis* CESi2 株は培養 4 日後より抗糸状菌活性が検出されて最小 IE 値 35%を示した。よって、Anti-G 細菌は株によって、抗糸状菌物質の生成量と生成時期が異なることが示唆された。また、Anti-G 細菌 12 株のキチナーゼ活性を調べた結果、キチナーゼ活性が検出されなかったことから、抗糸状菌活性にはキチナーゼが関与しないことが明らかとなった。さらに、Anti-G 細菌 3 株のドラフトゲノム解析の結果、*B. tequilensis* CE4、*B. subtilis* subsp. *spizizenii* TSASi1 から既知の抗菌物質生合成遺伝子クラスターがそれぞれ 8 個、10 個確認された。一方、*E. cloacae* subsp. *dissolvens* B3 から既知のクラスターは確認されなかったことから、新規の抗菌物質を生合成していることが示唆された。さらなる解析により、Anti-G 細菌の抗糸状菌活性の機構の解明を進める予定である。

Ganoderma boninense, Antifungal activity, Isolated bacteria

講演番号：4A07a10
講演日時：3 月 28 日 11:19～ センター2 号館 A07 会場

カロテノイド生産のためのゲノム組換え大腸菌の創出（２）

Construction of a plasmid-free *Escherichia coli* strain for biosynthesis of carotenoids (2)

○竹村 美保、渡辺 あすか、作野 華誉、三沢 典彦（石川県立大学）
○Miho TAKEMURA, Asuka WATANABE, Hanayo SAKUNO, Norihiko MISAWA (Ishikawa Pref. Univ.)

カロテノイドは、赤、オレンジ、黄色を呈する天然の色素化合物であり、植物や微生物が生産している。カロテノイドは、ヒトの生理機能にとって重要な働きをしていることが報告され、近年サプリメントなどとしての需要が高まっている。現在市場に供給されているカロテノイドは、主に植物や藻類から抽出したものである。一方、希少カロテノイドは、高い生理機能にも関わらず、供給がほとんどされていない。

これまで我々は、天然のカロテノイドのみならず、人工の新規カロテノイドを生産するために、大腸菌を用いたカロテノイド生産システムを構築した。それにより、希少カロテノイドや新規カロテノイドの生産に成功している。このシステムでは、大腸菌に微生物や植物由来のカロテノイド生合成遺伝子をプラスミドとして導入している。この方法は、非常に簡便ではあるが、プラスミド DNA を維持するために、抗生物質を培地中に入れ続けなくてはならず、プラスミド DNA が欠落するリスクが常に存在している。そのため、我々は、カロテノイド生合成遺伝子を大腸菌のゲノムに挿入し、安定的にカロテノイドを生産するシステムの構築を行っている。

現在までに我々は、2018 年度大会において発表したように、カロテノイド生合成経路の上流遺伝子 *idi* および *crtE* を大腸菌ゲノムに挿入することに成功している。その後、大腸菌ゲノムに対して相同組換えを繰り返すことにより、さらに下流遺伝子の挿入を試みた。その中で、挿入位置および組換え方法の検討を行った。その結果、これまで報告されているように、挿入位置によって組換えの起こりやすさに違いがあることが確認できた。また、同時に挿入する薬剤耐性マーカー遺伝子の種類を変えることにより相同組換えを連続的に行うよりも、薬剤耐性マーカー遺伝子を除去した後、再び薬剤耐性マーカー遺伝子を用いて相同組換えを行う方が、効率的に下流遺伝子を挿入していくのに適していることがわかった。本発表では、これらの結果とあわせ、これまでに相同組換えによって得られたカロテノイド生産菌のカロテノイド生産性について報告する。

carotenoid, *Escherichia coli*, genome

発表責任者：竹村美保（mtake@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：4A07a11
講演日時：3 月 28 日 11:40～ センター2 号館 A07 会場

組換え大腸菌を用いたバイオマス由来チロシン誘導体の発酵生産
Fermentative production of tyrosine derivatives using recombinant *Escherichia coli*
○嵯峨 知沙、佐々倉 有麻、桝尾 俊介、高谷 直樹（筑波大・生命環境・微生物サステイナビリティ研究センター）
○Chisa SAGA, Yuma SASAKURA, Shunsuke MASUO, Naoki TAKAYA (Univ. of Tsukuba , MiCS)

【背景・目的】
チロシン誘導体には、医薬品や化粧品、香料などの原料に幅広く利用される産業上有用な化合物が多いが、その大量生産は化学合成に依存している。特に、クマル酸は様々なチロシン誘導体を生産する際の出発物質として、カフェ酸は抗酸化作用などの生理作用を持つ有用物質として、チラミンはカテコールアミン製剤などとして利用される重要な化合物である。本研究では、微生物や植物が有する多様な芳香族アミノ酸の代謝酵素・経路と、大腸菌が有する芳香族アミノ酸の生合成経路を組み合わせた人工生合成経路を構築することで、グルコースを原料とした組換え大腸菌によるチロシン誘導体の発酵生産を試みた。
【方法・結果】
Escherichia coli BL21(DE3)の代謝改変によってチロシン高生産株を作製した。具体的には、フィードバック阻害耐性の 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase 遺伝子（*aroG*^{fbr}）および chorismate mutase/prephenate dehydrogenase 遺伝子(*tyrA*)を高発現させた。さらに酢酸合成に関わる *poxB*、あるいは芳香族アミノ酸の生合成関連遺伝子の転写抑制因子である *tyrR* をそれぞれ破壊した。一連の代謝改変および培養条件の最適化の結果、*tyrR* 遺伝子破壊株（ΔTyrR 株）を用いたジャーファーメンター培養により 19 g/L のチロシンを生産することに成功した（147 時間培養、対糖モル収率 7.4%）。
Rhodotorula glutinis JN-1 由来の phenylalanine/tyrosine ammonia lyase 遺伝子をΔTyrR 株にて高発現させることでクマル酸生産株を作製した。本菌株をジャーファーメンターで 97 時間培養したところ、グルコースを基質として 1.9 g/L のクマル酸を生産することができた（対糖モル収率 1.2%）。さらに、この株にて *Pseudomonas aeruginosa* PA01 由来の 4-hydroxyphenyl acetate 3-monooxygenase 遺伝子（*HpaAC*）を高発現させることで、グルコースを基質として 0.67 g/L のカフェ酸を生産することができた（97 時間培養、対糖モル収率 0.79%）。また、ΔTyrR 株にトマト由来の aromatic amino acid decarboxylase 遺伝子（*LeAADC1A*）を導入した株を用いることによって、3.2 g/L のチラミンを発酵生産することができた（70 時間培養、対糖モル収率 6.3%）。本研究により、組換え大腸菌を用いて様々なチロシン誘導体の生産システムを構築することに成功した。

tyrosine derivatives, *Escherichia coli*, fermentation

発表責任者：高谷　直樹（takaya.naoki.ge@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：4A07a12
講演日時：3 月 28 日 11:51～ センター2 号館 A07 会場

Chromobacterium violaceum VP2 株を使用したビオラセイン生産条件の検討

Conditions of violacein production by *Chromobacterium violaceum* VP2

○高橋 蘭丸、滝口 泰之（千葉工業大学）
○RANMARU TAKAHASHI, YASUYUKI TAKIGUCHI (Chiba Institute of Technology)

1. 背景及び目的

Chromobacterium violaceum が生産する青色色素ヴィオラセインは天然色素であり，抗菌活性や抗腫瘍活性を持っているため，医薬品や化粧品の成分として利用できる．しかし，現在ヴィオラセインは生産量がとても少ないため実用化に向けて収量を高める必要がある．現在，(1) アルギン酸ビーズを用いた菌体固定，(2)ジメチルスルホキシド(DMSO)添加，(3) 超臨界 CO_2 による抽出，(4)クオラムセンシングのオートインデューサーであるアシルホモセリンラクトン (AHL)の添加について検討を行った．

2. 実験方法

当研究室で検索分離した *C. violaceum* VP2 株の前培養したものをキング B 培地 100 ml に添加し，ウォーターバス内で 3 日間，30℃の条件で培養を行った．培養終了時に遠心分離を行って上澄みと菌体に分離し，菌体に滅菌水 50 ml を加え，菌体懸濁液を作製した．アルギン酸水溶液に菌体懸濁液を加え，塩化カルシウム水溶液に加えてゲル化させることで固定化菌体とした．培養終了後，遠心分離後の菌体とビーズにメタノールを加えて色素の抽出を行った．抽出液を濃縮後トヨパール HW-40F カラムを用いて精製後，凍結乾燥によりヴィオラセインの収量を測定した．AHL の抽出は，培養液を遠心分離し，上清にジクロロメタンを加えて行なった．二酸化炭素超臨界抽出装置は SCF-Bpg 型（日本分光）を用いた．圧力と温度を操作して流体の溶解度を変化させヴィオラセインの抽出を検討した．モディファイヤーとしてメタノール，エタノール，水を検討した．

3. 結果及び考察

(1) アルギン酸ビーズ固定化菌体を用いると，ヴィオラセインの収量は 18.7mg となり，非固定化の場合と比べて，収量が 9 倍に上昇した．(2) 培養液に 1%DMSO をキング B 培地に加えると 100ml の培養液からヴィオラセインを 23.3mg 回収することができた．この数値はコントロールの 1.2 倍であった．(3)超臨界抽出では，モディファイヤーに水およびメタノールを用いた場合，抽出が可能となった。また，メタノールを用いた場合，圧力をあげると抽出されるヴィオラセインの色が濃くなったため，抽出効率が上がったと考える．(4) AHL の添加によるヴィオラセインの生産性の向上について現在，検討中である．

Chromobacterium violaceum, Quorum sensing, violacein

講演番号：4A07a13
講演日時：3 月 28 日 12:02～ センター2 号館 A07 会場

シグナル分子シュードレセプター改変における物質生産性プロファイルの解析
Analysis of secondary metabolites profile by modification of signaling molecule pseudo-receptor genes in *Streptomyces*

○見崎 裕也[1]、山本 章治[2]、鈴木 敏弘[2]、岩國 美由季[2]、高橋 譲[2]、稲田 晋宣[3]、木梨 陽康[2]、荒川 賢治[1,2] ([1]広島大院・統合生命、[2]広島大院・先端研、[3]広島大・自然科学セ)
○ Yuya MISAKI[1], Shouji YAMAMOTO[2], Toshihiro SUZUKI[2], Miyuki IWAKUNI[2], Yuzuru TAKAHASHI[2], Kuninobu INADA[3], Haruyasu KINASHI[2], Kenji ARAKAWA[1,2] ([1]Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ., [2]Grad. Sch. AdSM, Hiroshima Univ., [3]N-BARD, Hiroshima Univ.)

［背景・目的］*Streptomyces* 属放線菌における二次代謝産物生産は、シグナル分子を鍵物質とした制御カスケードによって厳密に調節されている。当研究室では、放線菌 *Streptomyces rochei* 7434AN4 株の有する抗生物質生産制御カスケードに注目した研究を展開している。本菌株は独立した生合成過程により合成される抗生物質、ランカサイジン（LC）・ランカマイシン（LM）を主要な二次代謝産物として生産する。これらの生合成遺伝子および制御遺伝子は線状プラスミド pSLA2-L 上に存在する。両抗生物質生産はシグナル分子 SRB (*Streptomyces rochei* butenolide) により制御されている。関与する制御因子として、SRB レセプターSrrA、SARP(*Streptomyces* antibiotics regulatory protein)型アクティベーター(SrrY・SrrZ)、シグナル分子 SRB 合成酵素 SrrX があり、今までに SrrX→SrrA→SrrY (→LC) →SrrZ→LM といった主要経路を明らかにしている。さらに我々は、2 つ目の SRB レセプターSrrB を見出した。SrrB は高い pI 値（=～10）を有し、系統樹解析の結果から、シュードレセプターであることが示唆された。そこで、SrrB の機能解明を目的として研究を行なった［Topic 1］。さらに染色体上のシグナル分子レセプターホモログに注目し、遺伝子破壊株の構築および代謝プロファイルの解析を行った［Topic 2］。

［Topic 1］ 制御遺伝子破壊株の転写発現、抗生物質生産の経時変化測定、SrrB 過剰発現株における抗生物質生産量の解析、および DNase I フットプリントによる SrrA, SrrB の結合サイトの特定を行った結果、以下のような一過性発現制御機構を明らかにした。

① SrrA が SrrY を抑制しているため、抗生物質生産は行われない(培養初期)。
② SRB が SrrA に結合し、*srrY* の転写抑制を解除することで、抗生物質生産を促進する(培養中期)。同時に *srrB* に対する転写抑制が解除される。
③ SrrB により *srrY* の発現が抑制されることで抗生物質生産が抑制される(培養後期)。

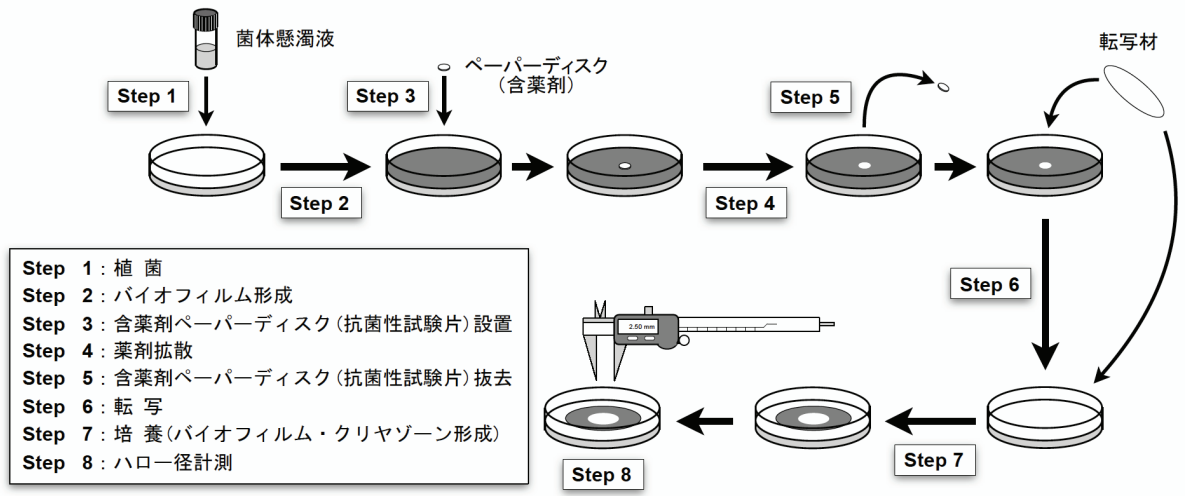
［Topic 2］ 染色体上のレセプターホモログおよび既知のレセプターをもとに系統樹解析を行ったところ、シグナル分子レセプターとして SRO_3381 および SRO_6887 が該当した。またシュードレセプターについては SRO_1739 および SRO_3378 が該当した。2 つのシュードレセプターホモログの遺伝子破壊株を構築し、遺伝子破壊株の代謝プロファイルを比較したところ、SRO_1739 遺伝子欠失株において *p*-coumaric amide の蓄積を確認した。SRO_3378 欠失は代謝プロファイルへの影響を及ぼさなかったものの、胞子形成能を喪失したことから、形態分化に関与する遺伝子である可能性が示唆された。

repressor, regulatory gene, *Streptomyces*

講演番号：4A07a14
講演日時：3 月 28 日 12:13～ センター2 号館 A07 会場

バイオフィルム破壊量の新規定量法、バイオフィルム-レプリカ法
A novel quantitative method of destruction of a biofilm, Biofilm-Replica Method
○小田 忍、川村 祥太、長谷川 誠（金沢工大ゲノム研）
○Shinobu ODA, Shota KAWAMURA, Makoto HASEGAWA (Kanazawa Inst. Technol.)

【目的】菌体外多糖などよりなる高分子マトリクスで被覆されたバイオフィルム(BF)は、薬剤耐性菌症やインプラント感染症、食品汚染や金属腐食、水質汚染や建造物汚染等の様々な社会問題を引き起こしている。BF を薬剤で駆除する技術を開発するには、BF 菌体に対する MIC 測定法、すなわち BF 破壊量を正確かつ簡便に定量化する技術が不可欠である。本研究では、寒天平板上の BF に含薬剤ペーパーディスクを設置して薬剤を BF 中に拡散させた後、この BF を濾紙によって新鮮寒天平板上に転写・培養することで、薬剤で駆除されたゾーンをハローとして検出・計測する BF 破壊量の新規な定量法(バイオフィルム-レプリカ法)のプロトコル化を達成することを目的とした。
【方法】対象薬剤として chloramphenicol(CP)、対象菌として *Pseudomonas putida* NBRC 14164 と *Staphylococcus epidermidis* NBRC 12993 を採用し、下図に示すプロトコルを構築した。図中のステップ 2 のバイオフィルム形成時間、ステップ 4 のペーパーディスク設置時間(薬剤拡散時間)並びに薬剤拡散領域の制限効果、ステップ 7 の転写後培養時間等の影響について詳細な検討を加えた。
【結果】薬剤処理 BF を新鮮寒天平板に転写・培養することで、駆除ゾーンを明瞭にハローとして確認することができたが、特に内径 20 mm のチューブを用いて薬剤拡散領域を制限することが有効であった。ペーパーディスク設置 24 時間まではハロー径の拡大が認められたが、48 時間まで延長するとハローは形成されなくなった。また、転写後培養時間の延長もハロー径の縮小を招いたが、これらの現象は、CP 感受性が低いバイオフィルム菌体の再増殖に起因すると考えられた。



biofilm, antibiotics, multidrug resistance

発表責任者：小田 忍（odas@neptune.kanazawa-it.ac.jp）

講演番号：4A08a01
講演日時：3 月 28 日 09:30～ センター2 号館 A08 会場

細菌の細胞壁に対する光触媒反応の影響
The effect of the photocatalytic reaction to bacterial cell wall
○髙尾 綾乃[1,2,3]、大嶋 佑治[1]、岡本 歩未[1]、落合 剛[2,3]、藤嶋 昭[2,3]、鈴木 智順[1,3]([1]東理大　応生、[2]KISTEC、[3]東理大　総研)
○AYANO TAKAO[1,2,3], YUJI OHSHIMA[1], AYUMI OKAMOTO[1], OCHIAI TSUYOSHI[2,3], AKIRA FUJISHIMA[2,3], TOMONORI SUZUKI[1,3] ([1]Department of Applied Biological Science, Tokyo University of Science, [2]Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology, [3]Research Institute for Science & Technology, Tokyo University of Science)

【目的】 消毒剤や抗生物質などを用いた一般的な殺菌は、高コストかつ人体への影響が懸念されるといった問題点がある。そこで、これらの問題点を解決する殺菌技術として、光触媒反応が期待されている。光触媒による殺菌効果は、二酸化チタン（TiO_2）に紫外線を照射することで産生する活性酸素種（ROS）の強い酸化力によるものであるが、この殺菌メカニズムについては未だ明確な知見が得られていない。グラム陽性細菌はペプチドグリカン層が厚いためにグラム陰性細菌よりも殺菌効果が低いという報告がある一方で、グラム陽性細菌の方が殺菌されやすいという報告もある。このように、ペプチドグリカン層に対する光触媒反応には、相反する報告が存在しているのが現状である。

この問題を解決するために我々は、芽胞を形成せず、ペプチドグリカン層が厚いグラム陽性細菌である *Lactobacillus plantarum* JCM1149^T（intact cells）と、その protoplast cells、そして元から細胞壁を持たない *Mesoplasma florum* NBRC100688^T に対して光触媒反応を行った後、BacLight 蛍光試薬による生存率評価を行った。その結果、ペプチドグリカン層のある intact cells で最も生存率が低下し、protoplast cells と *M. florum* cells の生存率に有意差は確認されなかった。以上の結果から、ペプチドグリカン層は TiO_2 光触媒反応による生存率低下に関与することが示唆された。そこで本研究では、protoplast cells にペプチドグリカン標品を添加して光触媒反応を行い、同様に生存率評価を行うことで、ペプチドグリカンがもたらす影響をより詳細に解明することを目的とした。

【方法】 *L. plantarum* JCM1149^T 細胞懸濁液に細胞壁融解酵素を加えることで、protoplast cells を作製した。ペプチドグリカン標品（Wako）を添加した protoplast cells、添加していない protoplast cells に対して BacLight 蛍光試薬を添加し、TiO_2 コーティングガラス上で UVA を 2 時間照射して、光触媒反応を行った。その後、共焦点レーザー顕微鏡 LSM EXCITER-ZEN 2008 (ZEISS) を用いて観察を行い、細胞膜損傷率に基づいて生存率を算出した。

【結果】 UVA 照射 2 時間後の生存率を比較したところ、標品を添加していない protoplast cells では約 98%であったのに対して、標品を添加した protoplast cells では約 87%まで低下し、これらに有意差が確認された。また、この値はペプチドグリカン層のある intact cells の生存率と有意差は確認されなかった。以上の結果から、ペプチドグリカンは TiO_2 光触媒反応による生存率低下に関与することがより強く示唆された。なお、intact cells に標品を添加した条件、および protoplast cells に対して標品の添加量を変化させた条件についても光触媒反応を行い、併せて報告する予定である。

photocatalysis, bacterial killing mechanism, peptidoglycan

講演番号：4A08a02
講演日時：3 月 28 日 09:41～ センター2 号館 A08 会場

各生育期の細菌外殻構造が光触媒反応に及ぼす影響の解析

Effects of the cell wall structure in each growth phase to the photocatalytic reaction

○槐 あかね[1]、藤嶋 昭[2]、鈴木 智順[1,2] ([1]東理大応生、[2]東理大総研)
○ Akane SAIKACHI[1], Akira FUJISHIMA[2], Tomonori SUZUKI[1,2] ([1]Department of Applied Biological Science, Tokyo University of Science, [2]Research Institute for Science & Technology)

【目的】近年、院内感染や空中浮遊菌による感染症など微生物による人体への影響が問題となっている。それらの解決手段として注目されているのが、安価で環境への負荷が小さい光触媒である。光触媒とは、光のエネルギーを利用して他の物質の化学変化（酸化還元反応）を促進する物質のことであり、最も一般的なものが TiO_2 である。光触媒には、UV 光を照射するとその表面にヒドロキシラジカルなどの活性酸素種が生成し、それらが周囲に存在する有機物を酸化分解するという性質がある。これを利用して、光触媒を塗料や空気清浄機に用いることで有害物質や微生物を分解、除去することができる。しかし、光触媒による殺菌メカニズムの詳細は明らかになっていないという問題が存在する。光触媒殺菌メカニズムに関する研究は様々な観点から進められてきており、いくつかのモデルが提唱されているが、どれもまだ確証を得られていない。そこで本研究では、細菌の生育期に着目し、JIS に基づいた実験系を利用して、各生育期の細菌が TiO_2 光触媒に及ぼす影響の詳細な解析をすることを目的とした。
【方法】本研究では、ガラス表面を NaOH 水溶液浸漬によるアルカリ分解によって親水化し、その乾燥させたガラス表面に光触媒コーティング液をスピンコートして作成した光触媒コーティングガラスを光触媒材料として使用した。作成した光触媒コーティングガラス上に対数増殖期前期・中期・後期・定常期前期のいずれかまで培養した *Escherichia coli* IAM 12119^T 懸濁液を滴下し、JIS に基づいた実験装置で 0～2 時間、UVA 照射(0.25 mW/cm^2)を行った。各生育期に至るまでの培養時間は、作成した *E. coli* の増殖曲線をもとに設定した。その後、実験装置から細菌懸濁液を回収して段階希釈後、寒天平板培地に塗布し、コロニーカウントした。そして、各生育期での経時的なコロニー形成能の低下度合を比較解析した。
【結果】各生育期における細菌への光触媒殺菌効果を解析したところ、グラム陰性細菌である *E. coli* を用いて光触媒実験した際、生育期が進むにつれて死滅しにくくなるということが明らかになった。この原因が、生育期が進むにつれて変化する細胞外殻構造にあると仮定し、細胞外殻構造の異なるグラム陽性細菌である *Lactobacillus plantarum* JCM1142^T に同様の実験を行ったところ、*E. coli* とは反対に、生育期が進むにつれて死滅しやすくなった。現在、細菌の外殻構造は生育期が進むにつれて肥厚化していくのかを、SLP 試薬などを用いて解析しているところであり、これらの結果も合わせて報告する予定である。

photocatalysis, bacteria killing, growth phase

講演番号：4A08a03
講演日時：3 月 28 日 09:52～ センター2 号館 A08 会場

微生物を含む PC グラウトの力学および粘度特性

Mechanical and Viscosity Characteristics of PC Grout Containing Microorganism

○富澤 哲、本田 晴香、松家 武樹（熊本高専）
○Satoshi TOMIZAWA, Haruka HONDA, Takejyu MATSUKA (NIT, Kumamoto College)

【背景と目的】

セメント系建設材料である PC グラウトは橋の強度維持および内部金属の保護に使用されている。PC グラウトのひび割れは、内部金属の腐食を誘発するため、橋梁の寿命は短くなる。しかし、橋梁内部にある PC グラウトの修復は難しい。そこで、我々はひび割れを微生物により塞ぐ PC グラウトの開発を目指した。本研究では、微生物の混合が PC グラウトの強度と粘度に与える影響と微生物の生存調査を目的とした。

【方法と結果】

普通配合 PC グラウト（普通ポルトランドセメント、水、混和剤）を混練し、供試体（φ 50 × 100 mm）を作製した。また、普通ポルトラントセメントの質量あたり 0.5～2%のドライイーストを含む酵母含有 PC グラウト供試体を作製した。混練直後の粘度は BII 形粘度計（東機産業）と JP 漏斗を用いて評価した。供試体作製日から 3、7、28、91 日目に圧縮強度試験（JSCE-G 531-2007）を行い、力学特性を評価した。また、微生物の生存を顕微鏡にて調査した。

普通配合 PC グラウトと酵母含有 PC グラウトについて、塑性粘度と JP 漏斗流下時間を比較した。酵母の含有率が高くなるとともに塑性粘度は向上し、流下時間は長くなった。ドライイーストが吸水したことにより、PC グラウト中の水分量が低下したためと考えられた。PC グラウトの品質管理規定によると JP 漏斗流下時間は 14-23 s と定められている。そのため、酵母含有量は 0.5 %程度がふさわしいと判断できた。しかし、練混ぜた酵母の多くは死滅していた。これはセメントのアルカリ性と硬化熱によるものと考えられた。また、1 %以下の酵母を含む供試体は材齢 7 日までに規定で定められた 30 N/mm2 以上の圧縮強度を示した。

cement, crack repair, yeast

講演番号：4A08a04
講演日時：3 月 28 日 10:03～ センター2 号館 A08 会場

Analysis of orchard field for construction of the database by Soil Fertility Index (SOFIX)

○Pitchayapa Pholkaw, Quoc Thinh Tran, Kiwako Araki, Motoki Kubo (Ritsumeikan Univ.)

【Background】

Agriculture field can be divided into three types; orchard, upland, and paddy fields. Soil management practices are different from the types of field, cultivated crop, and soil environment. In the orchard field, a single variety of plants (apple, grape, tea, etc.) are cultivated for many years under relatively aerobic conditions. Many crop species (wheat, corn, vegetables, etc.) are grown under aerobic conditions in the upland field. Rice is cultivated under relatively anaerobic conditions in the paddy field. The soil fertility index (SOFIX) was developed considering the importance of physical, chemical, and biological factors in soil fertility. From previous research, the database of the upland and paddy fields have been constructed. In the present study, the soil samples of the orchard field were analyzed to construct the database by SOFIX for understanding the suitable soil conditions for orchard field.

【Materials and methods】

The soil samples were collected from 139 orchard fields. The soil samples were analyzed by SOFIX (19 parameters; total carbon (TC), total nitrogen (TN), total phosphorus (TP), total potassium (TK), bacterial biomass, etc.).

【Results】

Average bacterial biomass in the orchard fields was 7.4×10^8 cells/g-soil, ranging from not detected (ND; less than 6.0×10^6 cells/g-soil) to 7.7×10^9 cells/g-soil. Average TC value was 24,000 mg/kg, ranging from 2,670 to 128,100 mg/kg, TN value was 1,500 mg/kg, ranging from 133 to 6,400 mg/kg, TP value was 1,030 mg/kg, ranging from 142 to 5,362 mg/kg, TK value was 5,370 mg/kg, ranging from 1,214 to 18,155 mg/kg , and C/N ratio was 19, ranging from 3 to 85. In addition, the soil properties of the orchard field were compared with the upland and paddy fields. Bacterial biomass in the orchard field was almost same level as the upland field (8.0×10^8 cells/g-soil), but the bacterial biomass was lower than that in the paddy field (12.1×10^8 cells/g-soil). Average TC value in the orchard field was lower than that in the upland field (33,100 mg/kg), but the value was higher than that in the paddy field (15,300 mg/kg). Average TN value in the orchard field was lower than that in the upland field (2,010 mg/kg), but the value was 1.5 times higher than that in the paddy field (1,010 mg/kg). For improvement of fertility of the orchard field, suitable soil conditions (TC, TN, TP, TK, C/N ratio, etc.) were determined.

Orchard field, Bacterial biomass, SOFIX

講演番号：4A08a05
講演日時：3 月 28 日 10:14～ センター2 号館 A08 会場

土壌肥沃度指標（SOFIX）に基づくブドウ栽培に適した土壌の解析

Analysis of soil suitable for grape cultivation based on Soil Fertility Index (SOFIX)

○竹田 利奈、荒木 希和子、久保 幹（立命館大）
○Rina TAKEDA, Kiwako ARAKI, Motoki KUBO (Ritsumeikan Univ.)

【背景・目的】農地は主に「畑」、「水田」および「樹園地」に区別され、それぞれの農地で土壌の管理、栽培作物、環境が異なっている。土壌肥沃度指標（SOFIX）に基づき、土壌中の成分を有機資材を用いて調整し、微生物の生育に適した環境を作ることで、農産物の質や量を向上が期待できる。樹園地においては、樹木を栽培するため、畑と比較すると耕運頻度が少ない。そのため、土壌中の気相が少ないことや、落ち葉や剪定枝の蓄積により全炭素（TC）が高い傾向にある。本研究では、果樹の中でもワイン製造に用いられるブドウ栽培に着目し、土壌環境を調べることで、SOFIX に基づくブドウ栽培に適した土壌環境を明らかにすることを目的とした。

【方法】温室内で 4 カ月間、ポットでブドウ栽培を行った。用いた土壌は、ブドウ園土壌、有機土壌（木質）、有機土壌の 3 種類である。また、果樹の栽培に、より適した土壌を検討するため、ミネラル資材および有機窒素源を添加した系でも同様に栽培を行った。これらの栽培土壌を月に 1 回採取し、土壌成分の分析を行った。また、植物葉の数や面積を計測し、植物成長への効果も観察した。

【結果】ブドウの生育は、有機土壌で最も生育が良く、ブドウ園土壌と有機土壌（木質）ではほぼ同程度であった。各土壌の新葉の面積は、有機土壌、ブドウ園土壌、有機土壌（木質）はそれぞれ、49、46、40 cm^2 であった。また、新葉数はそれぞれ、140、112、120 枚であった。土壌の違いによって、葉の SPAD 値、根の量や形が大きく異なっていたが、植物生育には影響が見られなかった。また、有機窒素源添加による植物成長の違いは見られなかった。一方、ミネラル資材を添加すると、葉面積、葉数や SPAD 値は減少する傾向にあった。

3 種類の土壌の TC は、有機土壌（木質）で最も高く、次いで有機土壌、ブドウ園土壌であった。土壌の TC に伴い、土壌の細菌数は多くなる傾向が見られた。栽培開始時の全リン（TP）、全窒素（TN）、全カリウム（TK）は、有機土壌で最も高く、次いでブドウ園土壌、有機土壌（木質）であった。栽培終了後の TP、TN、および TK は、ブドウの樹の生育によって減少量に違いが見られた。特に、TN や TK は生育が良いほど大きく減少していた。微生物数の高かった土壌と、ブドウの成長の良かった土壌は一致しなかった。これらの結果より、ブドウ栽培は TN や TK を要求する傾向が高いと考えられるため、栽培時にこれらの成分の施肥を重点的に行っていくことが重要であると示唆された。

Orchard field, Bacterial biomass, SOFIX

講演番号：4A08a06
講演日時：3 月 28 日 10:35～ センター2 号館 A08 会場

土壌環境が植物病発症に与える影響の解析

Analysis of relationship between soil environment and plant disease

○雲川 雄悟、前田 憲慶、荒木 希和子、久保 幹（立命館大）
○YUGO KUMOKAWA, KAZUYOSHI MAEDA, KIWAKO ARAKI, MOTOKI KUBO (Ritsumeikan Univ.)

【背景・目的】農業現場において、植物病は作物の収量を大きく減少させる要因の一つである。植物病を引き起こす病原体は多種類存在しており、ウイルスをはじめ細菌、糸状菌、そして原生動物などの微生物が挙げられる。植物病が発生する要因は多数あるが、土壌環境による影響もその一つである。例えば、連作を行うと土壌微生物の減少や均一化が起こり、それにともない病原体の拮抗生物が減少する。その結果、病原体が植物に感染しやすくなる。現在は、植物病を防除する方法が開発されており、農薬を使うことが主流である。また、有機物の添加によって土壌環境を改善し植物病を防除する方法も試みられている。これは、土壌に有機物を添加することで微生物種が増えて活性化し、拮抗生物の増加により病原体の働きを抑制する手法である。また、化学物質を用いないため環境や人体への影響が少ない。本研究では植物病のネコブ病発症を指標とし、植物栽培の土壌環境と植物病発症の関係を解析した。

【方法・結果】ネコブ病を発症したコマツナ根からネコブ病菌（*Plasmodiophora brassicae*）の休眠胞子を抽出し、休眠胞子懸濁液を作製した。(1)コマツナ（*Brassica rapa*）をネコブ病菌胞子懸濁液に浸し、もしくは(2)土壌にネコブ病菌胞子懸濁液を投入し、植物栽培室で栽培した。土壌は、化学的環境の土壌と有機的環境の土壌を使用した。コマツナを収穫後、ネコブ病発病度（DI）、地上部重量、根重量、および土壌中のネコブ病菌休眠胞子数の測定を行った。栽培 4 週目のコマツナの根を観察すると、使用土壌の種類によってネコブ病の発病度に違いが見られた。化学的な土壌では発病度が高く、連作回数の増加と共に発病度の上昇と土壌中のネコブ病菌胞子数が増加した。有機・化学肥料施肥を行った土壌で栽培した場合のネコブ病発病度（DI）についても発表する予定である。

Plant disease, Soil environment, Clubroot disease

講演番号：4A08a07
講演日時：3 月 28 日 10:46～ センター2 号館 A08 会場

熱殺菌土壌における細菌数の回復と肥沃度との関係解析

Relationship between recovery of bacterial counts and fertility in heart-killed soil

○國川 藍、荒木 希和子、久保 幹（立命館大）
○Ai KUNIKAWA, Kiwako ARAKI, Motoki KUBO (Ritsumeikan Univ.)

【背景・目的】近年、品種改良や栽培技術の進歩などにより、農作物が 1 年中入手できるようになった。一方、その弊害として連作障害などといった様々な問題が発生するようになり、土壌病害対策抜きには安定的な生産を維持できない現状となっている。土壌病害対策で最も重要な要因は、土壌病害を発生させない栽培環境作りであり、その対策として臭化メチルやクロロピクリンといった農薬、太陽熱を利用した土壌燻蒸が用いられている。土壌燻蒸後の微生物回復は土壌肥沃度と密接な関係があり、土壌燻蒸と微生物回復とのバランスが重要である。本研究では、熱殺菌を施した土壌における細菌数の回復と土壌の肥沃度との関係解析を行い、土壌の物理性と生物性との関係を明らかにすると共に、土壌の物理性の観点から土壌肥沃度の評価を行うことを目的とした。

【方法】本研究において異なる農地土壌を用いて実験を行った。はじめに、Slow-stirring 法により各土壌サンプルの細菌数を定量し、その値を本実験の初期値とした。各土壌において 3 回オートクレーブ（121℃、20℃）を行い、含水率 30%に保持し、30℃で 7 日間静置した。サンプリングした土壌において細菌数を Slow-stirring 法、菌叢を PCR-DGGE 法で分析した。

【結果】本実験より、全ての土壌サンプルにおいて 7 日以内に細菌数の上昇が認められた。この結果から、3 回のオートクレーブでは土壌は完全に滅菌できないことが明らかになった。また、土壌の肥沃度指標（SOFIX）において高い評価を示した土壌（比較的有機物を多く含んだ土壌）ほど、細菌数が短時間で回復する傾向にあった。団粒構造が形成されている土壌は、透水性、保水性、排水性などに優れ、物理性が良好な土壌である。有機物とその分解産物が多く含まれる土壌ほど、団粒構造が形成されやすいため、有機物が多い土壌では物理性（団粒構造)が向上し、熱処理などの物理的な刺激を受けても完全には死滅せず、早期に細菌数が回復したものと考えられた。また、土壌ごとに菌叢を解析した結果、どの土壌においても熱処理前後の菌叢の相同性が 50%以下となった。このことから、熱処理後の時間経過に伴い菌叢の変化が見られた。本研究より土壌の物理性と生物性は密接な関係があり、土壌肥沃度の改善により土壌の物理性が向上することが示唆された。

bocterial biomass, recovery, soil

講演番号：4A08a09
講演日時：3 月 28 日 11:08～ センター2 号館 A08 会場

生物学的処理および光触媒・Boron-doped diamond 電極ハイブリッド式汚水浄化システムの改良と環境影響評価

Improvement and Environmental impact assessment of hybrid wastewater purification system using biological treatment, photocatalyst and boron-doped diamond electrode

○久保田 智紀[1]、井手口 真理[1]、佐藤 俊樹[1]、落合 剛[2,3]、藤嶋 昭[2]、鈴木 智順[1,2] ([1]東理大応生、[2]東理大総研、[3]KISTEC)
○Tomoki KUBOTA[1], Mari IDEGUCHI[1], Toshiki Sato[1], Tsuyoshi OCHIAI[2,3], Akira FUJISHIMA[2], Tomonori SUZUKI[1,2] ([1]Depertment of Applied Biological Science,Tokyo University of Science, [2]Reserch Institute for Science and Technology, [3]Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology)

〔目的〕 生活排水を生物学的処理した後に、次亜塩素酸による殺菌処理が現在行われているが、この処理によって生成されるトリハロメタンが人体や環境に有害な影響を及ぼすことが懸念されている。これに替わる新たな殺菌技術として光触媒の酸化反応があげられる。光触媒反応による殺菌は酸化チタンに紫外線を照射することで産生する活性酸素種の酸化力を利用したものである。さらに他の殺菌技術として、電気分解反応によって殺菌力をもつオゾンを生成する boron-doped diamond (BDD)電極を利用した水浄化技術がある。そこで本研究では、生物学的処理を行った処理水に対して、これらの水浄化技術を組み合わせた併用処理を行うことで、低コストでより環境への負荷が少ない汚水浄化システムの構築を行うことを目的とした。

〔方法〕 まず、殺菌性能を評価するために、*Escherichia coli* 細胞懸濁液に対して、酸化チタンに UVA を照射して生じる光触媒反応および BDD 電極による電気分解反応および酸化剤生成反応をそれぞれ作用させた。そして、一定時間ごとに細菌懸濁液を回収し、コロニー計数法により経時的な生菌数の減少を計測した。また、本システムの有機物分解能を評価するため、光触媒反応・BDD 電極反応をそれぞれ作用させ、一定時間ごとに全有機炭素量(TOC)を測定した。さらに、本実験系において殺菌作用を示すオゾンや有害物質であるトリハロメタンの生成元となる次亜塩素酸の生成量評価のために、光触媒併用状態と UVA 照射のみの条件で BDD 電極による電気分解反応および酸化剤生成反応を行った。その際、実際の汚水処理場の生物学的処理後の塩濃度を参考にして 0.11% 塩化ナトリウム水溶液に対して上記実験を行った。反応後、発色試薬である SBT(Sulfo-benzyl-tolidine)試薬を用いた比色法によって次亜塩素酸の定量を行った。

〔結果〕 本研究では、生物学的処理と光触媒反応、BDD 電極による電気分解反応を併用したハイブリッド式汚水浄化システムの構築に向けた、殺菌性能および有機物分解能の評価を行った。その結果、*E. coli* を用いた殺菌性能の評価において、BDD 電極を単独で作用させた場合および光触媒と BDD 電極を併用した場合では、反応開始 0.5 時間後に *E. coli* の約 99.9 %が死滅した。また、本実験系において生成した次亜塩素酸の定量を行った結果、反応開始 0.5 時間後の時点で BDD 電極単独では、0.2 ppm の次亜塩素酸が検出されたのに対して、光触媒と BDD 電極併用処理すると、次亜塩素酸が検出されなかった。以上から、本ハイブリッド式汚水浄化システムが高い殺菌効率と環境に対する安全性を合わせもつことが示唆された。

Photocatalyst, Boron-doped diamond electrode, Water purification

講演番号：4A08a10
講演日時：3 月 28 日 11:19～ センター2 号館 A08 会場

Establishment of a NanoBiT-based two- and three- hybrid system in fission yeast
○Fereshteh AZADEH[1], Akihisa MATSUYAMA[2], Minoru YOSHIDA[1,2,3] ([1]University of Tokyo, [2]RIKEN CSRS, [3]CRIIM)

Designing better drugs is of paramount importance to identify a target of a bioactive compound and investigate its underlying mode of action. Many ongoing researches are being undertaken to screen transient molecular interactions in a high throughput manner more efficiently. This could eliminate the dependence of the previous methods on stable strong interactions and abundance of the target in the cell extract. Recently, an ameliorated type of luminescence assay systems originated from deep sea shrimp split luciferase (NanoBiT) has been employed for various purposes. As a result, the desired advantage of this system is that it demonstrates extremely low background signals and it has a potential for identifying reversible as well as weak interactions. It provides a way to detect physical interaction between two proteins fused with two luciferase enzyme moieties called LargeBiT and SmallBiT. The SmallBiT fragment is a 11 amino acid peptide fragment that interacts with LargeBiT by a low affinity. In this regard, our goal is to apply this system in fission yeast as a compound-protein detection platform. Here, a third component, i.e. HaloTag7 protein is fused with LargeBiT and is capable of binding to haloalkanes and altered molecules containing a halogen. The already existing fission yeast ORFeome library containing the potential protein targets of that compound will be incorporated with SmallBiT.
The preliminary step before three-hybrid establishment is setting up the NanoBiT two-hybrid system in fission yeast through several bait plasmid vectors with different orientation of tag attached to interacting protein of interest. The luciferase activity signal of several protein pairs with already known interactions was measured displaying their interaction. As an example, Omt2-Omt2, Hhp1-Tas3, and to a lesser extent Spac806.06c-Spac806.06c protein interactions exhibited intense signals using this system. For as much as, the order of the LargeBiT fragment respect to the protein of interest influences the obtained signals, we inserted each protein into N- and C-terminally tagged bait vectors and introduced them to yeast simultaneously to surmount this issue. This developed system would represent a substitute means of studying protein interactions yet to be identified.

NanoBiT, Fission yeast, Screening system

講演番号：4A08a11
講演日時：3 月 28 日 11:40～ センター2 号館 A08 会場

グラナチシンと結合する分泌タンパク質
A secreted protein that binds to Granaticin

○西山 辰也、榎本 成美、長安 伶奈、上田 賢志（日大生資科）
○ Tatsuya NISHIYAMA, Narumi ENOMOTO, Reina NAGAYASU, Kenji UEDA (College of Bioresource Sciences, Nihon University)

【背景・目的】我々は、先行研究において *Streptomyces coelicolor* A3(2)の培養上清に L-アスコルビン酸および L-システインを酸化する触媒活性があることを見いだし、それが酵素ではなく本菌の二次代謝産物として知られるアクチノロージン(ACT)によるものであることを発見した。これにより、天然低分子化合物に触媒活性をもつものが存在することが明らかになった。

さらに我々は、ACT が ACT 生合成クラスター中にコードされる分泌性のタンパク質 SCO5074 と相互作用することを明らかにした。次に、本タンパク質のホモログをコードする遺伝子が *Streptomyces vietnamensis* のグラナチシン(GRA)生合成遺伝子クラスター中にも存在したことから、GRA についても ACT 同様の触媒活性の有無を調査したところ、顕著な活性が認められたことを前回大会で報告した。本研究では、GRA 生合成クラスター中にコードされる SCO5074 ホモログタンパク質である STVN18850 が、予想通り GRA と結合するかを検証した。

【方法・結果】STVN18850とGRAとの結合を検証するために、大腸菌を宿主として組換えSVTN18850を調製し、SDS-PAGEのバンドを指標に硫酸アンモニウム分画法と各種カラムクロマトグラフィーによって精製した。また、GRAは*S. vietnamensis*の培養上清から酢酸エチルによる抽出、エバポレーターによる乾燥を経た後に、HPLCを用いた逆相クロマトグラフィーによって精製した。精製したタンパク質と、精製したGRAをモル比1：10で混合し、サイズ排除カラムクロマトグラフィーでタンパク質の吸光である280 nmとGRAの極大吸収波長である525 nmを同時に分析したところ、SVTN18850の溶出時間とGRAの溶出時間が一致したため、SVTN18850とGRAとが結合することが強く示唆された。また、同カラムを用いた分子量マーカーの溶出時間から算出すると、組換えタンパク質のみの場合は二量体を形成し、GRAと結合した複合体は六量体を形成する結果となった。GRAとSTVN18850がACT-SCO5074と同様に複合体を形成したことは、同様の複合体を生産する放線菌が他にも広く存在する可能性を想起させるとともに、同複合体を細胞外に分泌することで発揮される特異的な生物機能が存在することを推測させる。

organocatalyst, streptomyces, secondary metabolite

発表責任者：西山　辰也（nishiyama.tatsuya@nihon-u.ac.jp）

講演番号：4A08a12
講演日時：3 月 28 日 11:51～ センター2 号館 A08 会場

The rare earth elements-mediated methanol dehydrogenase switch in a methanotrophic bacterium Methylococcus capsulatus Bath

○RUOYUN XIE[1], Motoko Takashino[2], Kensuke Igarashi[2], Souichiro Kato[1,2] ([1]Hokkaido Univ., [2]National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)

Rare earth elements (REEs) form a chemically uniform group and include scandium (Sc), yttrium (Y), and 15 lanthanides. Although REEs play irreplaceable roles in advanced industries, the bioavailability had long been overlooked. It was recently discovered that most methanotrophs and methylotrophs have specific types of methanol dehydrogenases (Xox-MDHs) contain REEs in their active site, whereas their well-characterized counterparts (Mxa-MDHs) are Ca-dependent. Studies on several model methanotrophs and methylotrophs revealed that they switch the expression levels of Xox-MDH and Mxa-MDH depending on availability of REEs. However, knowledge of the effects of REEs on gammaproteobacterial, type I methanotrophs is still limited. Furthermore, little is known about how microorganisms access insoluble REEs, while REEs mostly present as forms of insoluble oxides in natural environments.

In this study, we investigated how REEs affect gene expressions of two MDHs in a model strain of type I methanotroph, *Methylococcus capsulatus* Bath. The expression levels of genes for two MDHs (*xoxF* and *mxaF*) were determined by the quantitative RT-PCR analysis. The expressions of *xoxF* and *mxaF* were induced and suppressed, respectively, in the presence of light lanthanides (e.g., lanthanum and cerium [Ce]), while non-lanthanide REEs (Sc and Y) and heavy lanthanides (e.g., neodymium and dysprosium) did not show such effects. The “REE switch” pattern of *M. capsulatus* was comparable with that observed for other model methanotrophs. The gene expression analysis under different concentrations of Ce showed that *M. capsulatus* switches the expression of two MDH genes at 10 to 30 nM of Ce, suggesting that *M. capsulatus* senses much lower concentrations of REEs than other methanotrophs. The REE switch of *M. capsulatus* was also induced by insoluble Ce oxide powder. Furthermore, spent culture media of *M. capsulatus* promoted elution of Ce ions from Ce oxides. These observations suggest that *M. capsulatus* would have unprecedented mechanisms for utilizing insoluble REE minerals. This study presents the possibility that *M. capsulatus* has superior abilities to exploit low concentrations and insoluble REEs than other methanotrophs.

rare earth element, methanol dehydrogenase, methanotroph

講演番号：4A08a13
講演日時：3 月 28 日 12:02～ センター2 号館 A08 会場

野菜のにおいを検知する微生物バイオセンサーの開発

Development of the bacterial biosensor to visualize the freshness of vegetables

○南 さやか、諸橋 賢吾（東京理科大・理工）
○SAYAKA MINAMI, KENGO MOROHASHI (Fac. Sci. Tec., Tokyo Univ. Sci.)

【背景・目的】

野菜などの農作物の鮮度低下による廃棄は、自給率の低い日本にとって重大な問題である。廃棄の多くは鮮度低下によるものだが、簡便な野菜の鮮度の定量法は存在しない。そこで野菜の鮮度の定量法の構築を目的とした。その上で着目したのが、揮発性物質と微生物である。野菜の鮮度が低下すると、野菜の細胞膜タンパク質や脂質の分解が起こり、それに伴い放出される揮発性化合物によりにおいの変化が生じる。一方で、微生物は環境変化による化学的ストレスを受けると、遺伝子の発現量を変化させる。以上の事から、野菜の鮮度が低下した際に放出する揮発性化合物の量を、微生物の遺伝子発現量の変化によって可視化することができると考えた。

本研究では特に、D-リモネンの量を大腸菌 *Escherichia coli* で可視化することを試みた。におい物質の 1 つ D-リモネンは、モノテルペン化合物の揮発性化合物であり、レモン様の香りがする。D-リモネンはキャベツの保存期間の経過とともに放出量が増加することが報告されている。また、D-リモネンは高濃度で、抗菌作用を持つため、大腸菌に対してストレスを与えることが予想される。そこで、化学的ストレス応答を起こすが、著しい生育阻害を起こさない程度の D-リモネン曝露による、ゲノムワイドな遺伝子発現解析（RNA-Seq）を行い、D-リモネン応答遺伝子の同定を試みた。D-リモネン曝露で発現量が変化する遺伝子のプロモーター直下に緑色蛍光タンパク質（GFP）遺伝子を構築することで D-リモネン存在量に依存して GFP 蛍光強度が変化する大腸菌の作出を目指す。

【方法・結果】

初めに、生育阻害の起こらない D-リモネン濃度を決定するために、D-リモネン存在下と非存在下で培養した大腸菌のコロニー数を比較し、有意差が無い濃度を大腸菌に曝露する D-リモネン濃度とした。次に、RNA-Seq により D-リモネン応答遺伝子の同定を試みた。決定したリモネン濃度とその 10 分の 1 の濃度で大腸菌を D-リモネンに曝露し、RNA を回収、RNA-Seq 解析を行った結果、D-リモネンに非曝露と曝露の大腸菌の比較で発現量に有意な上昇がみられた 230 個の遺伝子を特定することに成功した。発現上昇量が上位のものから、遺伝子のプロモーター領域の直下に緑色蛍光タンパク質（GFP）遺伝子を構築したプラスミドを作製した。現在は、構築したプラスミドの D-リモネンへの応答性を調べるため、各プラスミドを持つ大腸菌の D-リモネン非曝露、曝露時の蛍光強度の比較を行っている。

biosensor, microbe, vegetable

発表責任者：南さやか（s.maccho.0107v@gmail.com）

講演番号：4A09a01
講演日時：3 月 28 日 09:30～ センター2 号館 A09 会場

PCB 分解菌 *Acidovorax* sp. KKS102 株が示す多段階増殖とレスポンスレギュレーターBphQ の翻訳後修飾
Altered modification of a response regulator BphQ through triauxic-growth phases in a PCB-degrader *Acidovorax* sp. KKS102

○酒井 啓一郎、永田 裕二、津田 雅孝、大坪 嘉行（東北大生命）
○Keiichiro SAKAI, Yuji NAGATA, Masataka TSUDA, Yoshiyuki OHTSUBO (Tohoku Univ.)

Acidovorax sp. KKS102 株は人為起源環境汚染物質であるポリ塩化ビフェニル(PCB)分解菌であり、PCB 分解遺伝子群は *pE* プロモーターより転写される。これまでに *pE* プロモーターは二成分制御因子 BphPQ(BphP:センサーキナーゼ、BphQ:レスポンスレギュレーター)によって活性化されること、およびコハク酸などの抑制炭素源の存在下でカタボライト調節されることを報告している。本大会では、KKS102 株は栄養培地で 3 段階の Growth phase を示すこと、およびレスポンスレギュレーターBphQ がリン酸化以外の翻訳後修飾を受けることを報告する。

【KKS102 株は 3 段階の Growth phase を示す】

KKS102 株を栄養培地で増殖させると、対数増殖期の中頃で生育が 15 分程度停止した後に再開することが見いだされた。この生育停止までの時間は、栄養培地に添加したコハク酸の濃度依存的に長くなったことから、この最初の生育 phase(phase 1 とした)はコハク酸等の本株が特に好む炭素源を資化している phase であると考えられた。また更なる解析により、グリセロールおよびグルコースは明瞭に異なる phase 2 および phase 3 にて代謝されることを示すデータが得られ、本株の生育は少なくとも 3 つの phase に分けられることが示された。

【レスポンスレギュレーターBphQ は phase 1 でアセチル化される】

様々な炭素源添加条件下で KKS102 株を培養し *pE* 活性を測定したところ、phase 2 でのみ *pE* が強く活性化されることが判明した。*pE* プロモーターの活性化因子である BphQ 発現量をウェスタンブロット法で測定したところ、どの Growth phase でも同程度の発現量が見られた。また、これまで BphQ は K108 残基がアセチル化されることによって活性調節される可能性を提唱しているが、BphQ が phase 1 でアセチル化されること、phase 2 ではアセチル化されていないことを示すデータを得ている。また更に、K108 変異体が *pE* を活性化しないことから、phase 1 では BphQ の K108 アセチル化により *pE* が活性化されないことが支持された。

以上の結果を踏まえ、KKS102 株は 3 段階の Growth phase を示し、phase 1 では BphQ はアセチル化により不活性化し、phase 2 では BphQ は活性化して *pE* プロモーターがオンとなるが、phase 3 では未知のメカニズムで BphQ が不活性化し *pE* プロモーターがオフとなる、という制御モデルが考えられる。

catabolite control, two-component system, PCB-degrader

発表責任者：酒井啓一郎（k.sakai@ige.tohoku.ac.jp）

講演番号：4A09a02
講演日時：3 月 28 日 09:41～ センター2 号館 A09 会場

Serratia における small RNA ChiX と Hfq によるキチン分解系の制御
Regulation of chitinase system by small RNA ChiX and Hfq in *Serratia*

小嶋 優常[1]、宗像 直輝[1]、熊木 智耶[2]、堀井 恭子[1]、山岸 拓矢[1]、杉本 華幸[1,2]、○鈴木 一史[1,2]（[1]新潟大院・自然科学、[2]新潟大・農・応生化）
Yujo KOJIMA[1], Naoki MUNAKATA[1], Tomoya KUMAKI[2], Kyoko HORII[1], Takuya YAMAGISI[1], Hayuki SUGIMOTO[1,2], ○Kazushi SUZUKI[1,2] ([1]Grad. Sch. Sci. & Tech., Niigata Univ., [2]Dept. Appl. Biol. Chem., Facul. Agric., Niigata Univ.)

不溶性多糖キチンの分解に優れた細菌である *Serratia marcescens* は、3 種のキチナーゼおよびキチン結合タンパク質 CBP21 を生産し、これらの相乗効果によって効率的にキチンを分解し、その分解産物を利用している。*S. marcescens* 2170 におけるキチン分解酵素群の発現には、転写調節因子 ChiR と、キチン分解産物である $(GlcNAc)_2$ の菌体内への取り込みが必須である。この現象には、キチン分解産物の取り込みに関与するポリン（ChiP）や $(GlcNAc)_2$ 分解酵素（キトビアーゼ）をコードする *chiPQ-ctb* オペロンの 5′非翻訳領域（5′ UTR）と small RNA (sRNA)である ChiX が関与している。ChiX は標的となる *chiP* および *chiR* の 2 種の mRNA の 5′ UTR と塩基対を形成し、転写後の発現制御を行うと考えられる。キチンが存在しない場合、ChiX は *chiR* mRNA と塩基対を形成して *chiR* の翻訳を抑制しているが、*chiP* mRNA がキチン分解産物の $(GlcNAc)_2$ の取り込みにより発現すると、ChiX は *chiP* mRNA と結合し、その結果 *chiR* の翻訳抑制が解除される。ChiX による *chiR* の翻訳抑制の解除には *chiP* 5′ UTR 上にある相補配列が重要であると考えられた。今回、ChiX のターミネーター周辺と相補配列となる *chiP* 5′ UTR の配列を置換して塩基対形成をさせないようにした。さらに、それとは逆に *chiR* 5′ UTR に ChiX のターミネーター周辺と相補となる配列を導入した。これら変異を導入した RNA を発現させ、キチナーゼ発現を調べた。その結果、ChiX のターミネーター直前の 5′側との相補配列が存在する場合、キチナーゼが発現した。すなわち、ChiX による *chiR* の翻訳抑制の解除には *chiP* 5′ UTR 上にある ChiX のターミネーター直前の 5′側の相補配列が重要であることが示唆された。

RNA シャペロンである Hfq は、sRNA を介した遺伝子調節に重要な役割を果たしている。*S. marcescens* の ChiX においても Hfq が関与していると考えられる。この関与を明らかにするため、*S. marcescens* の *hfq* 欠損株の構築を行った。しかし、得られた *hfq* 欠損株は極端に生育が悪く、解析に用いることは不可能であった。我々はキチン分解活性能の高い *Serratia plymuthica* を湖水から分離した。この菌株のキチン分解酵素関連遺伝子を調べた結果、*S. marcescens* と同様であった。そこで、*S. plymuthica* における ChiX の機能解析を行うこととし、*hfq* 欠損株の構築に成功した。

small RNA, ChiX, *Serratia*

発表責任者：鈴木　一史（ksuzuki@agr.niigata-u.ac.jp）

講演番号：4A09a03
講演日時：3 月 28 日 09:52～ センター2 号館 A09 会場

Comamonas testosteroni TA441 のフェノール代謝に関する研究
Study on phenol metabolism in *Comamonas testosteroni* TA441
○新北 大樹、亀谷 将史、石井 正治、新井 博之（東大院）
○Daiki SHIMBOKU, Masafumi KAMEYA, Masaharu ISHII, Hiroyuki ARAI (Tokyo Univ.)

【背景・目的】

フェノールを骨格に持つ難分解性化合物は、近年の産業発展に伴い環境中に大量に排出され環境汚染問題を引き起こしており、フェノール分解菌の代謝機構に関する研究は環境浄化的側面で注目を集めてきた。好気性細菌である *Comamonas testosteroni* TA441 はフェノール分解遺伝子を持つが、同時にその分解遺伝子の発現を抑制するリプレッサー遺伝子を持ち、通常の実験室の培養条件下でフェノールを唯一の炭素源として培養しても生育を示さない。この抑制の生理的意義の理解は、「微生物の潜在能力の顕在化」という観点から環境浄化に応用できると考えられる。

また本菌は、酸素を水に還元する好気呼吸鎖の末端酸化酵素を複数使い分けることも知られている。近年、他の細菌において末端酸化酵素の発現パターンが炭素代謝に影響を及ぼす例が多数報告されている。本菌においても末端酸化酵素と炭素代謝が密接に関わっている可能性が高いが、研究は進んでおらず未解明な点が多い。

以上二つのアプローチから、フェノール分解菌の炭素代謝に関する多角的理解を深めることを目的とした。

【方法・結果】

(1)本菌のフェノール分解の初期反応を担う phenol hydroxylase (PH)の基質親和性が高いことから、低濃度のフェノール分解に適している可能性を考えた。種々の濃度のフェノールを唯一の炭素源として *C. testosteroni* TA441 を培養し、生育測定とフェノール濃度測定を行った。その結果、リプレッサー遺伝子を保有する野生型の株において、2 mM 以下の濃度で培養するとフェノールを分解できることが分かった。次に、抑制をしない条件では生育になんらかの悪影響があると予想し、PH の副反応により活性酸素種(ROS)が発生し、生育阻害が起こる可能性を検証した。*C. testosteroni* TA441 を *p*-ヒドロキシ安息香酸を炭素源として培養し、菌体内で PH を強制発現させ、ROS 発生量の測定と生育の観察を行った。結果として、強制発現させた株において ROS 発生量が増加し生育が悪化したことにより、本菌の抑制機構の生理的重要性が立証された。

(2) *C. testosteroni* TA441 の末端酸化酵素変異株の各種培養条件でのフェノール水酸化酵素遺伝子の発現量を解析し、末端酸化酵素がフェノール代謝に及ぼす影響について検証しており、その結果についても併せて報告する。

Comamonas testosteroni, phenol hydroxylase, terminal oxidase

講演番号：4A09a04
講演日時：3 月 28 日 10:03～ センター2 号館 A09 会場

グリシン誘導性 small RNA GcvB によるサルモネラ増殖抑制機構の解析

Growth inhibition of Salmonella by glycine-inducible small RNA GcvB

○宮腰 昌利（筑波大医）
○Masatoshi MIYAKOSHI (Univ. Tsukuba)

GcvB は腸内細菌科細菌だけでなくγ-プロテオバクテリアに広く保存されている small RNA（sRNA）であり、アミノ酸輸送・代謝に関与する複数の mRNA を転写後レベルで制御する。GcvB は R1 領域と R2 領域で標的 mRNA と塩基対を形成し、遺伝子発現を負に制御することが明らかになっている。さらに、大腸菌では、GcvB が R3 領域で二成分制御系転写因子をコードする *phoP* をはじめとする新たな標的 mRNA を制御することが最近報告された。

GcvB の細胞内存在量は新生転写速度と分解速度によって決定されるが、GcvB の転写はグリシンによって誘導される一方、分解速度はグルタミン酸・アスパラギン酸 ABC トランスポーターをコードする *gltI* mRNA の 3’非翻訳領域（3’UTR）から生成する sRNA SroC に依存する。本研究では、GcvB を過剰発現すると生育遅延が引き起こされ、サルモネラの方が大腸菌よりも顕著に大きい影響を受けることを明らかにした。この生育遅延の影響は、約 200 塩基の GcvB の中でサルモネラと大腸菌で異なる 10 塩基の違いによるものでは無く、むしろ大腸菌 GcvB の方がサルモネラ GcvB よりも強い生育遅延を引き起こした。このことは、大腸菌とサルモネラで GcvB レギュロンに違いがあることを示唆している。その一例として、サルモネラでは *phoP* の 5’非翻訳領域（5’UTR）が大腸菌とは塩基配列が異なるため、GcvB が *phoP* の発現に有意な変化を与えないことを明らかにした。

small RNA, GcvB, phoP

発表責任者：宮腰昌利（mmiyakoshi@md.tsukuba.ac.jp）

講演番号：4A09a05
講演日時：3 月 28 日 10:14～ センター2 号館 A09 会場

放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2)におけるヘムを基盤とした NO 依存性二成分制御系による鉄硫黄タンパク質と共同した抗生物質生産調節機構

Heme-based NO-dependent two component system regulates the antibiotic production in collaboration with Fe-S based protein in *Streptomyces coelicolor* A3(2)

○本間 颯太、伊藤 晋作、矢嶋 俊介、佐々木 康幸（東農大農）
○Sota HONMA, Shinsaku ITO, Shunsuke YAJIMA, Yasuyuki SASAKI (Tokyo Univ. of Agric.)

近年、我々の研究チームは放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2) M145 株において、有機体窒素→硝酸、亜硝酸（NO_2^-）、一酸化窒素（NO)を硝酸還元酵素及び NO ジオキシゲナーゼを介して循環する窒素酸化物代謝サイクルを見出した。また、本代謝サイクルにより生産される NO は本菌における二次代謝及び形態分化を制御するシグナル分子であることが示唆された。しかしながら、NO による二次代謝及び形態分化の制御メカニズムの詳細は未だ不明である。そこで我々は NO による二次代謝の制御メカニズムの解明を目的とした。*S. coelicolor* の近縁種である *Mycobacterium tuberculosis* において、NO に応答するセンサータンパク質（DosS)及びそのレスポンスレギュレーター（DosR)から成る DosS/R 二成分制御系（TCS)が知られている。これまでの研究は *S. coelicolor* において DosS/R-TCS と相同性を示す DevS/R-TCS が存在することを明らかにした。加えて、*devR* 破壊株(*ΔdevR*)における *actII-ORF4* 遺伝子の発現量は野生株（M145)と比べて継時的に低いままであり、本変異株は抗生物質をほとんど生産しなかった。NO 発生剤として NO_2^-を短時間暴露した時の NO 生産能がほとんどない変異株及び*ΔdevR* 株における抗生物質生産経路特異的促進因子 ActII-ORF4 をコードする遺伝子の発現量の変化を検証した。結果、NO 生産能がほとんどない変異株における *actII-ORF4* 遺伝子の発現量は低く、NO_2^-暴露によって発現量が有意に増大したのに対し、*ΔdevR* 株において NO_2^-暴露による発現量の変化はなく低いままであった。この結果は NO を感知した DevS によって活性化された DevR が直接 *actII-ORF4* 遺伝子の発現調節を行う事を示唆した。そこで、DevR と *actII-ORF4* 遺伝子のプロモーター領域（*actII-ORF4p*)の相互作用を検証するために、M145 株及び*Δnar* 株において DevR-FLAG を発現させた株を用いてクロマチン免疫沈降法（ChIP)を行い、続いて ChIP 操作により得た核酸を鋳型に qPCR を行った（ChIP-qPCR)。ChIP-qPCR の結果、M145 株において DevR は *actII-ORF4p* と相互作用する事を示し、一方*Δnar* 株において相互作用をほとんど示さない事が明らかになった。この結果から、細胞内 NO 濃度に依存して DevR-*actII-ORF4p* の相互作用は調節される事が示唆された。一方、本菌には鉄硫黄クラスターと結合する WhiB-like（Wbl)タンパク質が存在し、*in vitro* において NO と Wbl タンパク質の鉄硫黄クラスターが相互作用する事が報告されている。我々は WblA の欠損によって引き起こされる抗生物質の過剰生産が、*devR* 遺伝子の欠損（*ΔdevR/ΔwblA*)により有意に抑えられる事を明らかにした。従って、本菌における NO による二次代謝制御は DevS/R-TCS 及び Wbl タンパク質の協調を介して調節される事が示唆された。

Streptomyces, Nitric oxide, Regulation of secondary metabolism

発表責任者：本間 颯太（44218032@nodai.ac.jp）

講演番号：4A09a06
講演日時：3 月 28 日 10:35～ センター2 号館 A09 会場

ゴム分解性細菌 *Gordonia polyisoprenivorans* VH2 のシグマ因子が制御する光応答メカニズムの解析

Analysis of photoresponse mechanism controlled by sigma factor of rubber-degrading bacterium *Gordonia polyisoprenivorans* VH2

○田島 侑、榮山 新、上田 賢志、髙野 英晃（日大・生資科・生命研）
○Yu TAJIMA, Arata SAKIYAMA, Kenji UEDA, Hideaki TAKANO (Coll. of Bioresour. Sci., Nihon Univ.)

［目的］ *Mycobacterium* の類縁菌である *G. polyisoprenivorans* VH2 株は光に応答してカロテノイド(Crt)生産を開始することが知られているが、従来型の光センサー遺伝子を有していないため、新規な光応答機構を有することが予想されている。これまでに我々は、RNA ポリメラーゼ σ 因子 *sigK2* と隣接遺伝子 *GPOL_c44180* が本光応答に関与する可能性を報告した。本研究では、本菌の σ^{SigK} ホモログ(σ^{SigK1})とその制御に関わる anti-σ 因子 RskA1 の役割に着目し、光応答において σ 因子が果たす役割を解明することを目的とした。

［結果・考察］ *sigK1* と *rskA1* の役割を明らかにするために、高コピープラスミド pNV119 上で各遺伝子を構成的に過剰発現させた形質転換体を作製した。その結果、*sigK1* 過剰発現株は明暗の両条件下において構成的な Crt 生産を示した一方、*rskA1* 過剰発現株の Crt 生産は明暗の両条件下において低レベルであった。この結果を支持するように、ダブルクロスオーバー法によって作製した *rskA1* 破壊株は明暗の両条件下において構成的な Crt 生産を示した。*sigK1* 破壊株は現在までに取得に至っていないが、σ^{SigK1} と *RskA1* が Crt 生産に対してそれぞれ正と負に作用することが強く示唆された。

次に、ランダムトランスポゾン変異法による光応答関連遺伝子の同定を試みた。取得した Crt 構成的生産変異株のトランスポゾン挿入部位を解析したところ、ストレス応答性 σ 因子 *sigB* に隣接する anti-σ 因子 *rsbW* と anti-anti-σ 因子 *rsbV* 遺伝子が 2 重に破壊されていた。各遺伝子破壊株を作製したところ、*rsbW* 破壊株が構成的な Crt 生産を示した。一方、*sigB* と *rsbV* 破壊は Crt 生産に影響を及ぼさなかった。このことから、RsbW が σ^{SigB} 以外の σ 因子を介して Crt 生産を負に制御していることが考えられた。

トランスクリプトーム解析によって転写レベルが増加した遺伝子のセミ定量 RT-PCR 解析を行った。野生株では *sigK2* の転写レベルが明暗において増加した一方、*rsbW* 破壊株においては *sigK2* の転写レベルが明暗において一定であった。このことから、RsbW は SigB を負に制御するだけでなく、SigK2 の制御にも関与していることが示唆された。

以上の結果より、3 つの遺伝子（*GPOL_c44180*、*rskA1*、*rsbW*）が Crt 生産を負に制御していることが明らかになった。Crt 合成遺伝子プロモーターに σ^{SigK} 認識コンセンサス配列が見つかることから、σ^{SigK1} と σ^{SigK2} が中心的な役割を担うことが考えられ、少なくとも 3 つのタンパク質 GPOL_c44180、RskA1、RsbW が σ^{SigK} 群の制御に関わる、複雑な光応答制御メカニズムの存在が示唆された。

Gordonia, sigma factor, light response

発表責任者：高野英晃（takano.hideaki@nihon-u.ac.jp）

講演番号：4A09a07
講演日時：3 月 28 日 10:46～ センター2 号館 A09 会場

ミヤコグサ根粒菌 *Mesorhizobium japonicum* における光誘導性遺伝子の制御と機能
Regulation and function of light-inducible genes in *Mesorhizobium japonicum*
○鈴木 真紀[1]、兼崎 友[2]、吉川 博文[3]、上田 賢志[1]、髙野 英晃[1] ([1]日大・生資科・生命研、[2]東農大・生物資源ゲノム解析セ、[3]東農大・生命科)
○Maki SUZUKI[1], Yu KANESAKI[2], Hirofumi YOSHIKAWA[3], Kenji UEDA[1], Hideaki TAKANO[1] ([1]Coll. of Bioresour. Sci., Nihon Univ., [2]Genome Res. Center, Tokyo Univ. of Agric., [3]Dept. of Biosci., Tokyo Univ. of Agric.)

【背景・目的】光は細胞内で有害な活性酸素種の産生を誘導するストレス因子の一種である。グラム陰性細菌の一部は光酸化ストレスに対する防御応答系を有し、光合成能をもつ *Rhodobacter* 属細菌の RpoE-ChrR 制御系が詳細に解析されている。光依存的な転写を担うシグマ因子 σ^{RpoE} は、複合体形成によってそれを負に制御するアンチシグマ因子 ChrR が受光により発生する活性酸素の影響を受け分解されることで活性化し、活性酸素に対する耐性を付与するフラン脂肪酸の合成遺伝子や光回復酵素遺伝子の転写を開始する。ゲノム情報より、σ^{RpoE}-ChrR 系は植物共生細菌群にも分布することが認められたことから、本研究ではミヤコグサ根粒菌 *Mesorhizobium japonicum* MAFF303099 に着目し、その σ^{RpoE}-ChrR の解析を通じて本菌の光ストレスに対する防御応答機構を理解することを目的とした。
【方法・結果】光誘導性遺伝子群を特定するために、明・暗条件下で培養した *M. japonicum* から抽出した RNA を用いて RNA-seq 解析を行った。その結果、青色光照射により著しく転写活性が上昇した遺伝子が多数確認され、*rpoE-chrR* およびその周辺遺伝子が含まれていた。RNA-seq 解析結果の再現性を確認するために、セミ定量 RT-PCR で解析を行ったところ、*rpoE* 周辺の光誘導性遺伝子群の光特異的な転写活性の上昇が確認された。σ^{RpoE} による転写制御を受けるプロモーター領域を予測したところ、*Rhodobacter* 属細菌で同定されている σ^{RpoE} 認識コンセンサス配列が *mll8087*、*rpoE* および *mll8095* のプロモーター領域に見出された。

光誘導性遺伝子群の発現調節における *rpoE* と *chrR* の役割を明らかにするために、*rpoE* の破壊株を取得した。*chrR* 破壊株はトランスポゾン挿入株を NBRP より入手した。各破壊株における光誘導性遺伝子群の転写レベルを定量 RT-PCR で解析した結果、*rpoE* 破壊株ではその明条件下における転写が野生株と比較して減少していた。一方、*chrR* 破壊株では、野生株の明条件より高いレベルの転写が明暗両条件で認められた。破壊株における光非依存的な転写パターンは野生型遺伝子の導入で光誘導型に回復した。これらのことから、σ^{RpoE} の活性は ChrR によって負に制御されることが示唆された。

野生株と各破壊株の増殖に対する光照射の影響を調べたところ、野生株では増殖阻害が認められた。*rpoE* 破壊株においては培養 2 日目以降から、野生株よりも強い増殖阻害が認められた。対照的に、*chrR* 破壊株では明・暗ともに他の株より増殖が促進される傾向にあった。これらの結果から、σ^{RpoE} が転写制御する遺伝子には、酸化ストレスによる細胞増殖阻害を抑制する機能をもつものがあると考えられた。

photooxidative stress response, light-inducible genes, Rhizobia

発表責任者：高野英晃（takano.hideaki@nihon-u.ac.jp）

講演番号：4A09a08
講演日時：3 月 28 日 10:57～ センター2 号館 A09 会場

フェルラ酸を検出するバクテリアセンサー
Bacterial sensor for ferulic acid
○白濱 里帆、室 佳史乃、上村 直史、政井 英司（長岡技科大・生物）
○Riho SHIRAHAMA, Yoshino MURO, Naofumi KAMIMURA, Eiji MASAI (Nagaoka Univ. Tech.)

【目的】植物細胞壁の主要成分であるリグニンは、地球上で最も豊富に存在する芳香族化合物である。リグニンの生分解は、白色腐朽菌等が分泌するペルオキシダーゼ等による低分子化とそれにより生成する様々な芳香族化合物の細菌による無機化の 2 段階のプロセスに担われると考えられている。一方で、リグニン由来芳香族化合物のフェルラ酸 (FA)やバニリン酸は土壌中に微量にしか検出されず、これら化合物の生成・分解には不明な点が多い。本研究では、環境中でのリグニン由来芳香族化合物の存在と細菌による代謝を明らかにすることを目指し、リグニン由来芳香族化合物代謝のモデル細菌である *Sphingobium* sp. SYK-6 株を宿主に用い、本株の FA 代謝に関わる *ferBA* オペロンの転写制御システムを構成する *ferB* プロモーター (P_{ferB})とフェルロイル-coenzyme A (FA-CoA)をエフェクターとする FerC リプレッサーを利用した FA バクテリアセンサーの開発を行った。
【材料・方法】センサーのレポーター遺伝子には蛍光タンパク質の eGFP、mCherry、EcFbFP に加えて SYK-6 株での発現用にコドン改変した eGFP (eGFPc)、superfolder GFP (sGFPc)、mCherry (mChc)を用いた。蛍光アッセイは、各プラスミドを保持させた SYK-6 株及び *ferB ferB2* 破壊株を 0–50 mM FA を含む LB 又は sucrose とアミノ酸を炭素源とした Wx 最少培地で培養し、経時的に OD_{600} と各蛍光タンパク質に由来する蛍光値を測定した。蛍光強度は OD_{600} あたりの蛍光値とした。
【結果・考察】SYK-6 株で機能するレポーター遺伝子を選定するために、発現ベクターpQF のクメン酸誘導性プロモーターで eGFP、mCherry、EcFbFP 遺伝子を発現させた結果、本株では eGFP と mCherry が機能することが示された。P_{ferB} の下流に eGFP、mCherry、eGFPc、sGFPc、又は mChc を連結して広宿主域ベクターpSEVA231 に導入した。各プラスミドを保持した SYK-6 株において、FA 非存在下の寒天培地上で 10 mM FA 存在下と同程度の蛍光が観察されたことから、プラスミド上の P_{ferB} を抑制するのに必要な FerC の量が不足していると推察された。そこで、「P_{ferB} + 蛍光タンパク質遺伝子」に加えて「構成的 *bla* プロモーター +*ferC*」を導入したプラスミドを構築し蛍光アッセイを行った。その結果、FA 非存在下での蛍光が顕著に抑えられ、eGFPc の系では 0.1 mM FA 存在下において FA 非存在下よりも 9 倍高い蛍光強度が得られた。低濃度の FA を感知するために FA-CoA 変換能を欠損した *ferB ferB2* 破壊株を相同組み換えにより作製した。*ferB ferB2* 破壊株を宿主に用いた結果、eGFPc 及び sGFPc の系で 1 μM FA 存在下において FA 非存在下より 7.6–8.5 倍高い蛍光強度が示された。
本研究は JSPS 科研費 18K14560 の助成を受けて実施された。

biosensor, ferulic acid, transcriptional regulator

発表責任者：白濱里帆（s183313@stn.nagaokaut.ac.jp）

講演番号：4A09a09
講演日時：3 月 28 日 11:08～ センター2 号館 A09 会場

Effects of glucuronoyl esterase on the regulation of hemicellulases in *Neurospora crassa*

○Ruijie WANG[1], Minoru YOSHIDA[1,2,3], Manabu ARIOKA[1,2] ([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]RIKEN CSRS)

[Background] In the plant cell walls, hemicellulose is located on the surface of cellulose and binds the cellulose together with lignin. Due to this characteristic nature, efficient degradation of hemicellulose is crucial in achieving the complete deconstruction of plant biomass. With a strong ability to utilize lignocellulose and clear genetic background, the model filamentous fungus *Neurospora crassa* becomes an ideal organism to study the mechanism of plant biomass saccharification. Glucuronoyl esterase (GE), an enzyme that cleaves the ester linkage between the 4-*O*-methyl-D-glucuronic acid residue of glucuronoxylan and lignin, was reported to stimulate biomass degradation. In fact, our previous results showed that overexpression of GE in *N. crassa* leads to elevated xylanase activity when the cells were grown in the wood extract medium. However, the mechanism of this process remains elusive.
[Purpose] To decipher the hemicellulose utilizing system in *N. crassa*, wild-type, *NcGE*-overexpression (OE), and the mutants deleted for the major transcription factors (*clr1*, *clr2*, and/or *xlr1*) involved in lignocellulose degradation were generated and used to evaluate the expression profiles of xylanases/xylosidases. Also, the enzymatic properties and the cellular localizations of xylanases/xylosidases were/will be studied to investigate the roles they play in the process of xylan utilization.
[Results] By analyzing the transcriptome data, we identified six xylanases and four xylosidases that were predicted to be involved in xylan utilization. Results of qRT-PCR showed an upregulation of these xylanase/xylosidase genes, especially the putative xylanases, in the *NcGE*-OE strain compared to the wild-type strain. Deletion of *clr1*, *clr2*, or *xlr1* downregulated their expression. Interestingly, OE of *NcGE* partially restored their expression in the Δ*xlr1* strain, but not in the Δ*clr1* or Δ*clr2* strains. Enzyme activity assays further confirmed the restored expression of xylanases/xylosidases by *NcGE* OE in the Δ*xlr1* background. Besides, xylanases Xln1, Xln2, Xln5, and Xln6 (NCU05924, NCU08189, NCU02855, and NCU07225, respectively) were successfully produced in *E. coli* and purified. When xylohexaose and other xylooligosaccharides were used as the substrates, xylobiose or xylotriose were mainly generated. Localization analysis of these enzymes is now in progress. In conclusion, we propose that NcGE stimulates plant biomass degradation by releasing hypothetical inducer(s) from wood material, which then activates the transcription factors and boosts the production of hydrolytic enzymes.

glucuronoyl esterase, hemicellulase, Neurospora crassa

発表責任者：Manabu ARIOKA（arioka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4A09a11
講演日時：3 月 28 日 11:40～ センター2 号館 A09 会場

タンパク質の熱変性に好熱菌はどう応答するか
Microbial responses to protein thermal denaturation in the thermophile *Geobacillus kaustophilus* HTA426

○鈴木 宏和、奥村 友太、三河 由依、吉村 俊祐、髙田 真穂、大城 隆（鳥取大学工学部）
○Hirokazu SUZUKI, Yuta Okumura, Yui MIKAWA, Shunsuke YOSHIMURA, Mao TAKATA, Takashi Ohshiro (Faculty of Engineering, Tottori University)

【目的】我々は，好熱菌（*Geobacillus kaustophilus*）細胞を用いた耐熱化変異酵素のハイスループット創出法を研究している。これまでの研究では，本手法によって枯草菌由来の核酸生合成酵素（$BSpyrF_A$）の耐熱化変異体（$BSpyrF_V$）などが得られている。試験管内分析では，$BSpyrF_V$ は 55℃以下において安定で，$BSpyrF_A$ は 45℃以下において安定だった。好熱菌細胞内では，$BSpyrF_V$ は 65℃でも機能したが，$BSpyrF_A$ は機能しなかった。本研究では，$BSpyrF_A$ もしくは $BSpyrF_V$ を産生する好熱菌中の遺伝子発現パターンを RNAseq で解析し，細胞内で熱不安定なタンパク質が産生された場合に，好熱菌がどのような応答をするのか解析した。
【実験と結果】$BSpyrF_A$ もしくは $BSpyrF_V$ を産生する好熱菌を 55℃および 65℃で培養した。菌体濁度 OD_{600} が 1 になった時点の細胞から total RNA を精製し，RNA シークエンス解析に供した。得られたデータから，$BSpyrF_A$ もしくは $BSpyrF_V$ を高温で産生させた場合の遺伝子発現差を評価した。$BSpyrF_A$ を産生させた場合に発現量が大きく増加した遺伝子は，Fe^{3+}イオン透過酵素（二次性能動輸送体）とキノール酸化酵素であった。発現量が大きく減少した遺伝子は，Fe^{2+}イオン輸送体（一次性能動輸送体）とキノン還元酵素であった。キノール酸化酵素とキノン還元酵素は呼吸鎖に関わる酵素で，これは熱不安定酵素の産生により，プールされたキノールの酸化ひいては ATP 合成を促進し，その一方でキノールの供給を抑え，NAD(P)H を温存するといった応答が起こることを暗示する。また鉄取り込み系の発現変動は，Fe^{2+}を減らし，Fe^{3+}を増やす応答に見える。鉄イオンも呼吸鎖に関わり，Fe^{3+}はキノール酸化に，Fe^{2+}はキノン還元に利用されることから，この応答も ATP 合成と NAD(P)H 温存のためと考えられる。これは熱変性タンパク質の分解もしくは巻き戻しにエネルギーと還元力を多く必要とするためと想像でき，これが事実だとすると熱変性タンパク質の産生は好熱菌にとって生育負荷となるはずである。実際に，$BSpyrF_A$ を産生する好熱菌の方が，$BSpyrF_V$ を産生する好熱菌より，生育が遅い傾向にあった。
【考察】*Geobacillus* 属は *Bacillus* 属から高温適応を通じて発生したと考えられている。その過程では，耐熱化指向性のタンパク質進化が繰り返されてきたはずだが，その際の進化選択圧は，各タンパク質の機能に依存したものではなく，細胞にかかる生育負荷だったのかもしれない。また耐熱化変異酵素を産生する好熱菌は，好熱菌の生育速度によって，もしくはキノン酸化還元系や鉄取り込み系の遺伝子発現をモニターすることによって，シンプルに選別できるとも期待される。

Thermophile, Thermodenaturation, *Geobacillus*

発表責任者：鈴木 宏和（hirokazusuzuki@tottori-u.ac.jp）

講演番号：4A09a12
講演日時：3 月 28 日 11:51～ センター2 号館 A09 会場

超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* における芳香族アミノ酸生合成遺伝子群の転写活性化因子の同定
The TK0271 protein activates transcription of aromatic amino acid biosynthesis genes in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*
○金井 保、山本 康之、金関 剛史、跡見 晴幸（京大院工）
○Tamotsu Kanai, Yasuyuki Yamamoto, Tsuyoshi Kaneseki, Haruyuki Atomi (Kyoto Univ.)

Trp 生合成系の転写調節機構は、微生物における代表的な代謝制御機構の１つである。しかしながらアーキアでは、Trp 生合成系の制御機構はほとんど解明されていない。超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* の Trp 生合成系遺伝子群（*trp* オペロン）は、Trp 非存在下で転写が活性化することが報告されている（1）。私たちは、本菌において *trp* オペロンの転写制御に関わる因子を同定することを目的とした。そのために、本菌のゲノム上に存在する計 87 個の転写調節因子のタンパク質を、大腸菌の *in vitro* 転写・翻訳反応系を用いて合成し、*trp* プロモーターに特異的に結合する因子のスクリーニングを行った結果、TK0271 タンパク質を同定した。TK0271 は、Trp/Tyr/Phe など芳香族アミノ酸生合成の共通する前駆体であるコリスミ酸の生合成に関わる *aro* オペロン内の遺伝子であった。TK0271 タンパク質は類縁の Thermococcales 目アーキアに共通して分布することから、本タンパク質を Tar（Thermococcales Aromatic acid Regulator）と命名した。大腸菌を用いて合成した組換え型 Tar は、*trp* プロモーターに特異的に結合し（$K_d \approx 5$ nM）、さらに Tyr/Phe 生合成遺伝子群のプロモーターや *aro* オペロンのプロモーターにも結合した。配列解析の結果、Tar はこれらのプロモーター内に保存されているパリンドローム配列（TGGACA-N_8-TGTCCA）を認識することが判明した。また *in vitro* 転写実験により、Tar はこれらのプロモーターからの転写を活性化する機能をもつことが判明した。続いて、合成培地で培養した *T. kodakarensis* 野生株の transcriptome 解析の結果、Trp、Tyr、Phe のいずれかが存在しない場合に、これらの全オペロンの転写が活性化することが判明した。さらに TK0271 遺伝子破壊株は、全アミノ酸を含む合成培地では宿主株と同程度に生育するが、これらのアミノ酸のいずれかが存在しない場合は、著しい生育悪化観察された。これらの結果から、Tar が *T. kodakarensis* の芳香族アミノ酸生合成遺伝子群の転写活性化に寄与することが示された（２）。

1) Tang, X., Ezaki, S., Fujiwara, S., Takagi, M., Atomi, H., and Imanaka, T., 1999, ***Mol Gen Genet***, 262: 815-821.
2) Yamamoto, Y., Kanai, T., Kaneseki, T., and Atomi, H., 2019, ***mBio***, 10: e01213-19. doi: 10.1128/mBio.01213-19

aromatic amino acids, Archaea, hyperthermophile

発表責任者：金井保（kanai@sbchem.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4A09a13
講演日時：3 月 28 日 12:02～ センター2 号館 A09 会場

ヒト腸内細菌 *Prevotella copri* の 2 つのキシラナーゼの発現解析
Expression analysis of two xylanases from human gut bacteria *Prevotella copri*.
○高木 千尋[1]、林 秀謙[1,2] ([1]前工大院工、[2]前工大工)
○Chihiro Takagi[1], Hidenori Hayashi[1,2] ([1]Grad. Maebashi institute of technology., [2]Maebashi institute of technology.)

【目的】ヒトが摂取した食物繊維は腸内細菌の糖質加水分解酵素により分解され、短鎖脂肪酸に変換される。短鎖脂肪酸は大腸の収縮運動、脂肪蓄積の抑制、炎症性腸疾患の抑制、腸管上皮細胞の発達と代謝などヒトの健康に重要な役割を果たしている。ヒトの糞便より分離した *Prevotella copri* は主要な腸内細菌の一つである。キシランを使用した活性染色により、40 kDa と 80 kDa の二つのキシラナーゼが発現していることが判明した。ゲノム DNA 上には、この二つに相当する *xyn10A* と *xyn10B* 遺伝子が存在していた。本研究では、二つのキシラナーゼ、Xyn10A および xyn10B の培養時の炭素源による発現の違いを明らかにしたので報告する。
【方法】Oat-spelt xylan(OSX)、Beechwood xylan(BWX)、キシロース、グルコースおよびセロビオースで培養を行った。培養後、菌体より抽出したタンパク質を使用し、活性染色、ウエスタンブロッティング、二次元電気泳動を行った。また、菌体より抽出した RNA を鋳型とした RT-PCR により、*xyn10A* および *xyn10B* を含む周辺遺伝子の mRNA の転写領域の決定を行った。
【結果及び考察】キシランを使用した活性染色を行ったところ、組換え Xyn10A と同じ、40 kDa の活性のあるバンドを OSX、BWX 培養時に検出した。一方、組換え Xyn10B と同じ、80 kDa の活性のあるバンドを OSX、BWX、キシロース、セロビオース培養時に検出した。グルコース培養時は 40 kDa、80 kDa どちらのバンドも検出されなかった。抗 Xyn10A 抗体および抗 Xyn10B 抗体を用いたウエスタンブロッティングを行ったところ、Xyn10A は OSX、BWX 培養時に検出した。Xyn10B は OSX、BWX、セロビオース培養時に検出し、キシロース培養時にもわずかに検出した。これらの結果は活性染色と一致していた。また、ウエスタンブロッティングより 40 kDa と 80 kDa のキシラナーゼが Xyn10A と Xyn10B であることが確認できた。Xyn10A と Xyn10B の発現はキシラン培養時に促進され、グルコース培養時には抑制された。また、セロビオースおよびキシロース培養時は、Xyn10A と Xyn10B の発現が異なることから、異なった発現制御が働いている事が考えられる。これらの発現の違いは以前に報告した定量 PCR による *xyn10A* と *xyn10B* の mRNA の発現解析の結果と一致していた。二次元電気泳動より BWX とグルコース培養時における菌体タンパク質の発現パターンを比較した。BWX 培養時においてグルコース培養時には検出されない約 40 kDa と 80 kDa のタンパク質を検出した。この二つは、等電点 pH5～6 のタンパク質であり、Xyn10A および Xyn10B であることが示唆された。*xyn10A* および *xyn10B* の mRNA の転写領域の決定を行ったところ、複数の遺伝子が同時に転写されていた。

Prevotella copri, xylanase, Expression analysis

講演番号：4A09a14
講演日時：3 月 28 日 12:13～ センター2 号館 A09 会場

Komagataella phaffii におけるメタノール誘導性遺伝子発現制御に重要な転写因子 Mxr1 の機能領域の同定

Determination of functional domains in a transcription factor Mxr1 responsible for regulation of methanol inducible gene expression in *Komagataella phaffii*

○井上 紘一、由里本 博也、阪井 康能（京大院農）
○Koichi INOUE, Hiroya YURIMOTO, Yasuyoshi SAKAI (Kyoto Univ.)

【背景・目的】

メタノール資化性酵母 *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) はメタノールによって特異的かつ強力に誘導されるプロモーターを有しており、このメタノール誘導性遺伝子プロモーターは、異種タンパク質生産に広く利用されている。メタノール誘導性遺伝子の発現レベルはメタノール濃度に応じて調節され、培地中メタノール濃度が 0.01 - 0.1 %の時に最も高くなり、さらに高濃度条件になると低下する。我々はこれまでに、細胞表層においてメタノール濃度の感知に寄与する Wsc1, Wsc3 からのメタノールシグナルが、cell wall integrity 経路における Pkc1 から分岐して、メタノール誘導性遺伝子発現に必須の転写活性化因子 Mxr1 に伝達されること、および Mxr1 のリン酸化レベルがメタノール濃度に依存して変化することを 2019 年度本大会で報告した [1)]。本研究では、メタノール濃度依存的な遺伝子発現制御に重要な Mxr1 の機能領域を同定するため、Mxr1 タンパク質のドメイン欠失体やアミノ酸置換体を用いた解析を行った。

【方法・結果】

抗ホスホセリン抗体および抗ホスホスレオニン抗体を用いたイムノブロット解析により、細胞をグルコース培地からメタノール培地に移すと Mxr1 のセリン残基がメタノール濃度非依存的に脱リン酸化され、スレオニン残基がメタノール濃度依存的に 0.1%メタノール培養時に最も多くリン酸化されることがわかった。Mxr1 全長 1155 アミノ酸のうち、N 末端から 525 アミノ酸までを *mxr1Δ* 株で発現した際の *AOX1* mRNA 量は、Mxr1 全長を持つ株と同程度であったのに対し、N 末端から 368 アミノ酸までを発現した株では、メタノール濃度が 0.1%以上の時に *AOX1* mRNA 量が顕著に低下した。このことから、Mxr1 上の 369 から 525 アミノ酸領域に、メタノール濃度依存的な遺伝子発現制御に重要なアミノ酸残基があると推定した。この領域のアミノ酸配列について、他のメタノール資化性酵母が持つ *MXR1* パラログとの比較により、メタノール資化性酵母間で保存されたスレオニン残基を複数見出した。現在は、これらのスレオニン残基のアラニン置換体を用いて、メタノール濃度依存的な遺伝子発現に与える影響を調べている。

1）日本農芸化学会 2019 年度大会 1C2a07

methylotrophic yeast, transcription factor, *Pichia pastoris*

講演番号：4A10a01
講演日時：3 月 28 日 09:30～ センター2 号館 A10 会場

脱窒細菌とセルロース分解菌による脱窒法の検討

Investigation of denitrification methods by denitrifiers and cellulose-degrading microorganisms

○政岡 修平、鈴木 智順（東理大応生）
○Shuhei MASAOKA, Tomonori SUZUKI (Tokyo University of Science, Department of Applied Biological Science.)

【目的】汚水中の窒素化合物は富栄養化や健康被害の原因となるため、排水基準値が定められている。下水処理場では、実際に脱窒菌・硝化菌を利用した窒素除去が行われている。今回は、一つの生態系モデルとして当研究室に設置している循環型汚水浄化槽を利用して，脱窒プロセスに関わる微生物叢の解析、またそれらの微生物とセルロース分解菌を用いて、脱窒プロセスをより向上させるための条件検討を目的として研究を行った。
【方法】循環型汚水浄化槽の嫌気槽から分離された 74 株の細菌を硝酸塩添加培地で培養し，ガス発生や亜硝酸イオン存在の確認を行った。そして，脱窒能を有すると推定された細菌株が脱窒関連遺伝子（*nirS*, *nirK*, *nosZ*）を有していることを PCR 法により確認した。また、選抜された株に対しては 16S rRNA 遺伝子配列による分子系統解析を行い、近縁分類群を推定した。さらに選抜された脱窒細菌の中から 3 株に関して，硝酸塩還元速度を測定し、各株の脱窒能力の違いを確認した。また、脱窒プロセスにおける電子供与体としてグルコースおよびカルボキシメチルセルロースを添加し、硝酸塩還元速度への影響を調べた。最後に、セルロース分解菌と脱窒細菌を使った脱窒プロセス向上の検討を行うために、セルロース分解菌による培養液の TOC 減少量や C/N 比の測定を行った。また、セルロース分解菌に対して脱窒能の有無を確認した。
【結果】分離株 74 株のうち脱窒が確認されたのは 9 株であった。これら細菌株の有している脱窒関連遺伝子（*nirS*, *nirK*, *nosZ*）を PCR 法により確認した結果，*nirS* を有している細菌株は 6 株であった。一方で，*nirK* を有している株は 2 株であった。また，*nosZ* を有している株は 8 株であった。選抜された脱窒細菌を分子系統解析した結果、*Pseudomonas* 属，*Sphingobacterium* 属，*Thiopseudomonas* 属細菌と近縁であることがわかった。脱窒細菌 3 株の硝酸塩還元速度を測定した結果、株によって差が見られた。電子供与体としてグルコースおよびカルボキシメチルセルロースを添加した場合の脱窒速度への影響については当日発表する予定である。セルロース分解菌による培養液の TOC 減少量や C/N 比に関しては、すべての株で減少傾向を示したが、変動の詳細は各株で異なっていた。セルロース分解菌として選抜された株に対して脱窒能の有無を確認したが、どの株も脱窒能を有していないことが分かった。

denitrification, cellulose, wastewater

講演番号：4A10a02
講演日時：3 月 28 日 09:41～ センター2 号館 A10 会場

硝化細菌のコロニー化に影響を与える培養条件の精査
Investigation of culture conditions for colony formation of nitrifying bacteria
○安藤 晃規[1,2]、岡田 若子[1]、宮本 憲二[3]、加藤 康夫[4]、篠原 信[5]、小川 順[1,2]([1]京大院農・応用生命、[2]京大・生理化学、[3]慶大・理工、[4]富山県大・生医工研セ、[5]農研機構)
○Akinori Ando[1,2], Wakako Okada[1], Kenji Miyamoto[3], Yasuo Kato[4], Makoto Shinohara[5], Jun Ogawa[1,2] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Res. Unit Physiol. Chem. Kyoto Univ., [3]Dept. Biosci. Inform., Keio Univ., [4]Biotech. Res. Cent., Toyama Pref. Univ., [5]NARO)

【背景】
土壌における窒素循環は、有機態窒素が従属栄養細菌により分解され、生じたアンモニア態窒素が硝酸態窒素へと変換されることにより成り立つ。しかしながら、窒素循環において重要な役割を担う硝化細菌は、独立栄養細菌であり、分離培養や、大量培養が困難であることなどが課題であった。本発表では、環境からの硝化細菌の分離を容易にするべく、入手可能なアンモニア酸化細菌 *Nitrosomonas europaea* NBRC14298、亜硝酸酸化細菌 *Nitrobacter winogradskyi* NBRC 14297 を対象に、固体培地上での培養条件を精査し、コロニー形成までの培養時間の短縮を試みたので報告する。
【方法・結果】
硝化細菌として *N. europaea* NBRC14298 と *N. winogradskyi* NBRC 14297 を用い、培養には、それぞれ HEPES 培地、Boon 培地を使用した。平板培地を調整する際にはゲランガムを用いた。温度、湿度、振盪速度、培地組成、植菌量、二酸化炭素濃度、微量金属、ゲランガム濃度について至適培養条件の検討を行った。液体培養条件下では、それぞれ亜硝酸イオン、硝酸イオンの生成量を指標に、固体培養では培養日数とコロニーサイズを指標に至適培養条件を評価した。結果、コロニー形成には二酸化炭素、湿度、ゲランガム濃度の影響が大きいことが明らかになった。これまで *N. europaea* と *N. winogradskyi* それぞれ約 0.7 mm、約 0.4 mm のコロニー形成に 1 ヶ月を要していたが、至適培養条件下では、いずれの菌も培養 10 日にて同等サイズのコロニーを形成した。本知見を活用することで、環境中からの硝化細菌の単離を効率化できることが期待される。

nitrifying bacteria, Nitrosomonas, Nitrobacter

講演番号：4A10a03
講演日時：3 月 28 日 09:52～ センター2 号館 A10 会場

有機養液栽培におけるバイオフィルム由来根部成長促進物質の活性評価
Evaluation of root growth promoter from biofilm of organic hydroponics
○黄 穎[1]、内藤 久仁子[1]、加藤 康夫[2]、篠原 誠[3]、安藤 晃規[4,5]、小川 順[4,5]、宮本 憲二[1]([1]慶大・理工、[2]富山県大・生医工研セ、[3]農研機構、[4]京大院農・応用生命、[5]京大・生理化学)
○YING HUANG[1], Kuniko NAITO[1], Yasuo KATO[2], Makoto SHINOHARA[3], Akinor ANDO[4,5], Jun OGAWA[4,5], Kenji MIYAMOTO[1] ([1]Dept. Biosci. Inform., Keio Univ., [2]Biotechnol. Res. Cent., Toyama Pref. Univ., [3]NARO, [4]Div. Appl. Life. Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [5]Res. Unit Physiol. Chem. Kyoto Univ.)

1. 背景・目的

有機質肥料活用型養液栽培（以下、有機養液栽培）は、無機養液栽培と比較して環境負荷を低減でき、有機物を肥料として使用できる水耕栽培の新手法である。本栽培法は、これまで実現が困難とされてきた水中における土壌環境の再現に成功したことから水耕栽培の新しい方法として注目を集めている。有機養液栽培では植物の根圏にバイオフィルムと呼ばれる微生物の群集構造が形成され、有機物を植物が吸収可能な状態にまで変換（硝化）する。これまでに、バイオフィルム中では有機物の硝化から植物への栄養供給までの流れが効率的に行われることや、バイオフィルムが存在することで植物の根の成長促進や病害抑制など興味深い現象が確認されている。

そこで本研究では、根圏と微生物の相互作用を化学物質の観点から解析するために、バイオフィルムからトリプトファン(L-Trp)およびコレステロール(CHO) を植物の根の成長促進物質として単離同定に成功した。そして、Trp および CHO の成長促進メカニズムの解明を目的とした。

2. 方法と結果

ナス科のタバコを対象植物として、最適なアッセイ環境と栽培培地組成を検討し、根（主根、側根）と葉の成長に対する評価方法を確立した。

市販の L-Trp と CHO はタバコの根の成長促進効果（主根伸長、側根促進、根毛促進）を確認できた。中でも最も強い活性を示す L-Trp（10-30 μM）は、葉と根の重量が 1.8 倍と 4 倍、主根長が 3 倍、側根数が 4 倍まで成長促進効果を示した。L-Trp の成長促進効果は 5 種のタバコ（Samsun orient, Basma Xanthi, BY-2, K326, TN90）において全て確認できた。

更に、L-Trp は不定根の形成、暗条件下の生育や発芽に促進効果があることが明らかになった。L-Trp は根により吸収され、葉に蓄積されていることが HPLC 分析により分かった。発芽５日間まで L-Trp で処理したタバコは、L-Trp 無しの培地へ移植しても、根の重量をコントロールより 2.5 倍促進できた。また、３０日間無菌栽培したタバコに関して、L-Trp 添加した場合はコントロールより、根の乾燥重量が 6 倍に、葉の乾燥重量が２倍になった。

これらの結果から、L-Trp はタバコの根の成長を促進することを明らかとなった。

tryptophan, cholesterol, organic hydroponic

発表責任者：宮本　憲二（kmiyamoto@bio.keio.ac.jp）

講演番号：4A10a04
講演日時：3 月 28 日 10:03～ センター2 号館 A10 会場

有機養液栽培でみられた植物の根の形態的特徴

Morphological characteristics of plant roots grown under organic hydroponic conditions

○野崎 守[1]、野村 泰治[1]、北岡 直樹[1]、安藤 晃規[2,3]、宮本 憲二[4]、篠原 信[5]、小川 順[2,3]、加藤 康夫[1] ([1]富山県大・生医工研セ、[2]京大院農・応用生命、[3]京大・生理化学、[4]慶大・理工、[5]農研機構)
○Mamoru NOZAKI[1], Taiji NOMURA[1], Naoki KITAOKA[1], Akinori ANDO[2,3], Kenji MIYAMOTO[4], Makoto SHINOHARA[5], Jun OGAWA[2,3], Yasuo KATO[1] ([1]Biotechnol. Res. Cent., Toyama Pref. Univ., [2]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [3]Res. Unit Physiol. Chem. Kyoto Univ., [4]Dept. Biosci. Inform., Keio Univ., [5]NARO)

【目的】有機養液栽培は、土壌の微生物生態系を養液内に人為的に構築して行う画期的な植物の栽培方法である。本プロセスでは、カツオ煮汁のような有機質を、土壌細菌を用いて好気条件下で硝化（耕水）することにより、直接植物の水耕栽培に使用することができる。この有機養液には、植物育成に必要な硝酸塩が蓄積するが、それだけでなく耕水過程の微生物の活動によって生じる様々な代謝物も含まれる。加えて、有機養液で育てた植物の根の周辺にはバイオフィルムが形成される。このような養液内環境が、病害抑制効果や高施肥性をもたらすことが明らかになってきている。一方で、有機養液栽培では、無機養液栽培と比較して植物の根の形態が異なることが知られていたが、その詳細は解析されていなかった。本研究では有機養液による水耕栽培を行った際の根の形態的特徴とその形成要因について、モデル植物を用いて解析した。

【方法と結果】有機養液と無機養液（Hoagland 水耕液）を用いて、トマト、タバコ、シロイヌナズナ、ミヤコグサの湛液型水耕栽培を行い、その際の根の形態を巨視的および微視的に比較した。有機養液は、水で薄めたカツオ煮汁に牡蠣殻石灰（微量栄養素を含む）と土壌細菌を加えて、通気をしながら 3 週間程耕水したものを用いた。無機養液で育てた植物では、いずれも根毛がほとんど伸長していなかったのに対して、有機養液では、ミヤコグサを除いて、トマト、タバコ、シロイヌナズナにおいて根毛が長く伸長していた。さらに有機養液で育てたトマトの側根では、表皮細胞サイズの著しい低下により根毛密度が高くなっている様子も観察された。これらの形態的特徴は、有機養液から微生物を除去して無菌的に育成したトマトにおいても同様に観察された。検討の結果、トマト側根の表皮細胞サイズの低下による根毛密度の上昇は、有機養液にキレート鉄を加えることで正常に回復することが明らかとなったが、根毛の伸長は有機養液にキレート鉄やその他の栄養塩を加えても観察された。以上の結果から、有機養液は水耕栽培において根毛の伸長を促進する高い活性を持っており、その活性は微生物による直接的な刺激や栄養欠乏とは異なるメカニズムもしくは代謝物により引き起こされていることが示された。

organic hydroponics, plant growth, root morphology

発表責任者：加藤　康夫（ykato@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：4A10a06
講演日時：3 月 28 日 10:35～ センター2 号館 A10 会場

炭素源資化性が異なる複数の窒素固定細菌を利用した高活性型生物窒素肥料の開発に向けた解析
Development of high potential biofertilizer by combination of diazotrophs which fix nitrogen utilizing different carbon sources

○吉留 大輔[1]、近藤 佐紀[1]、鵜沼 廣太朗[1]、葛山 智久[1,2]、日髙 真誠[1,2]（[1]東大院・農生科、[2]東京大学微生物科学イノベーション連携機構）
○ Daisuke YOSHIDOME[1], Saki KONDO[1], Kotaro UNUMA[1], TOMOHISA KUZUYAMA[1,2], Makoto HIDAKA[1,2] ([1]Tokyo Univ., [2]CRIIM)

【目的】
我々は、稲作で使用されている大量の化学窒素肥料の削減を目指し、C 源資化性の異なる窒素固定細菌を複数組み合わせた高活性型の生物窒素肥料の開発を目指している。これまでに、水田土壌で栽培したイネに、糖を資化して窒素固定を行う *Klebsiella oxytoca* NG13 と有機酸を資化して窒素固定を行う *Azospirillum lipoferum* FS を追肥として接種したところ、無接種のイネより籾収量ならびに籾含有窒素量が 2 割程度増大した。そこで、接種した両株がイネの根から分泌される C 源をめぐり水田土壌細菌叢と競合する中で、どの程度窒素固定活性を発揮したのかを、イネ根圏を再現した試験管培養における動態解析を基に明らかにすることを目指した。
【方法・結果】
本試験管培養系の特徴は、①イネ根滲出 C 源組成を再現した培地の使用、②C 源供給と老廃物除去のための培養液の毎日交換、③根の再現のための鉱物繊維の使用、④根圏の溶存 O_2 濃度を考慮した O_2 存在下での培養の 4 点である。まず、本培養系で NG13 株と FS 株をそれぞれ単独培養すると、慣例的なバッチ培養の時と比較してそれぞれ 6 倍、21 倍の窒素固定活性が発揮され、イネ根圏における窒素固定細菌のポテンシャルが明らかとなった。NG13 株は糖を混合有機酸発酵して主に酢酸を生じること、一方で FS 株は根圏にほぼ存在しない酢酸を資化して強い窒素固定活性を発揮することが既に判明している。そこで本培養系で両株を共培養したところ、相加的以上の窒素固定活性が得られ、培養液中の酢酸量は NG13 株単独培養時より減少していた。次に、水田土壌細菌叢存在下の両株の動態を調べた。本培養系で 4 日間水田土壌細菌の混合液を培養して窒素固定活性を測定すると NG13 株と FS 株の共培養時のそれに匹敵し、生物窒素固定活性が高いとされる水田環境と矛盾しない結果となった。そこに NG13 株と FS 株を 10^7cell ずつ接種すると、追肥の肥効期間に相当する 14 日間、水田土壌細菌叢が発揮した窒素固定活性よりさらに 3 割程度高い窒素固定活性を発揮し続けた。
【結論・展望】
以上より、イネ根圏において C 源資化性の異なる NG13 株と FS 株は、根から分泌される C 源を効率よく資化して水田における生物窒素固定活性の増大に貢献することが示唆された。現在、構築した水田土壌細菌叢から窒素固定細菌の単離を進めている。NG13 株と FS 株の組合せ以上に高活性を示す窒素固定細菌の組合せを探索していきたい。

nitrogen fixing bacteria, biofertilizer, carbon metabolism

発表責任者：日髙真誠（mamagoto.from.mcb@gmail.com）

講演番号：4A10a07
講演日時：3 月 28 日 10:46～ センター2 号館 A10 会場

Water-in-oil ドロップレットを用いた乳酸菌スクリーニング手法の検討
A screening method for lactic acid bacteria using water-in-oil droplets

○渡邉 瑞貴、森 浩二、紙野 圭 (製品評価技術基盤機構)
○Mizuki WATANABE, Koji MORI, Kei KAMINO (NITE)

【背景】乳酸菌は、自然界に広く分布すると共に、乳製品や漬け物などの食品にも多く見つかる。発酵食品のスターターとして用いられる他、γ-アミノ酪酸（GABA）やバクテリオシン産生能を持つ株等もあり、産業的に非常に有用で、今後もますます幅広い分野における乳酸菌の活用が期待されている。乳酸菌の分離手法の 1 つとして、炭酸カルシウム（$CaCO_3$）添加培地を用いた方法が古くから知られている。培地中で白濁している $CaCO_3$ が乳酸によって溶けることを利用して、培地に形成されたコロニーが乳酸菌であることを特定する方法である。一方、water-in-oil ドロップレット培養法は、油中に作製した微小水滴（ドロップレット）を用いた培養技術である。本技術は、water-in-oil ドロップレットにより 1 細胞レベルで微生物を区画化し、かつ短時間で大量にドロップレットを作製出来る点が特徴である。このため、増殖が弱い菌種や増殖が遅い菌種でも淘汰されることなく、多様な菌群をハイスループットにスクリーニングすることが出来ると考えられる。そこで我々は、$CaCO_3$ を用いた手法と water-in-oil ドロップレット培養法を組み合わせることで、乳酸菌を選別可能な培養方法を構築し、多様な乳酸菌のスクリーニングへの可能性を検討した。
【方法】Droplet Generator (On-Chip Biotechnologies)を用いて、$CaCO_3$ 粒子と乳酸菌等を封入した water-in-oil ドロップレットを作製し、N_2 ガスで置換した界面活性剤を含むフッ素オイルを入れたバイアル瓶内で、37℃で嫌気的に培養した。培養前後のドロップレットの様子を顕微鏡で観察し比較した。
【結果・考察】ドロップレット作製直後、一定の確率で乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* と $CaCO_3$ 粒子がドロップレットに封入されていることを確認し、4 日間培養した結果、ドロップレット内での細胞の増殖を確認できた。また、細胞の増殖を確認したドロップレットでは $CaCO_3$ 粒子の存在を確認することができなかったことから、*L. plantarum* によって生じた乳酸によって $CaCO_3$ 粒子が溶解したことが推察された。このことから、ドロップレットという微小スケールにおいても、$CaCO_3$ を用いた手法を乳酸菌の識別に適用できる可能性が示唆された。この乳酸菌増殖に確認できた $CaCO_3$ 粒子の溶解現象を利用して、乳酸菌スクリーニングへの応用の可能性を発表する。

lactic acid bacteria, droplet microfluidics, calcium carbonate

発表責任者：渡邉瑞貴（watanabe-mizuki@nite.go.jp）

講演番号：4A10a08
講演日時：3 月 28 日 10:57～ センター2 号館 A10 会場

純粋培養した AM 菌の胞子成熟を促進する物質の探索
Investigation on promoting substances for spore maturation of AM fungi in pure culture
○丸井 汐里、亀岡 啓、秋山 康紀（大阪府大・生命環境）
○Shiori MARUI, Hiromu KAMEOKA, Kohki AKIYAMA (Osaka Prefecture Univ.)

アーバスキュラー菌根菌 (arbuscular mycorrhizal fungi, AM菌) は植物と共生しているときにのみ次世代胞子を形成する絶対共生菌であり，純粋培養は不可能とされてきた。しかし，当研究室においてバクテリア*Paenibacillus validus*の培養液からAM菌*Rhizophagus irregularis*に対する胞子形成誘導物質として分岐脂肪酸12-メチルテトラデカン酸 (anteiso-C15:0) が単離されたことで純粋培養への道が拓かれた。その後，パルミトレイン酸 (C16:1Δ9) に12-メチルテトラデカン酸よりも強い活性が認められた。さらにミリスチン酸 (C14:0)，ペプトン，ストリゴラクトン合成アナログGR24の組み合わせにより胞子形成が飛躍的に向上したが，形成された胞子は小型のものが多く，大型胞子の形成は低頻度であった。そこで本研究では，成熟度の高い大型の胞子形成の向上を目的として，有機炭素源として解糖系やTCA回路に含まれる低級有機酸，そして植物との共生時に根で特異的に生産される物質やAM菌自身の菌体成分についての効果を調べた。また，培養したAM菌の菌体中の脂質組成を分析した。

ペプトン1 mg/ml とミリスチン酸100 μM を含む改変M培地に供試物質を投与して*R.irregularis*を培養し，元の母胞子数に対する次世代胞子の形成率を計測した。(+)-GR24 100 nM に加えて，9種類の有機酸を混合して加えると約9倍，そこに共生根で増加する植物ホルモンであるジャスモン酸メチルを加えると約19倍と大幅に向上した。しかし，形成された胞子は小型であった。AM菌共生・非共生のトウモロコシ根では，非共生根メタノール抽出物酢酸エチル層に強い胞子誘導活性が見られた。AM菌の菌体懸濁濾液では約8倍に増え，大型胞子も多く見られた。菌体懸濁濾液の活性も有機溶媒分画により酢酸エチル層に転溶した。共生根および菌体懸濁濾液の酢酸エチル画分をそれぞれシリカゲルカラム精製に供したところ，共に40%酢酸エチル溶出区に活性が見られた。これらの溶出区についてNMRおよびLC-MS分析を行ったところ，主に脂肪酸が含まれていた。次に，ミリスチン酸の資化について調べた。[1-^{13}C]ミリスチン酸添加培地で増殖させた*R.irregularis*の菌体からクロロホルムーメタノール(2:1)で脂質画分を抽出し，分取シリカゲルTLCによりトリアシルグリセロールとリン脂質画分を得た。それぞれ脂肪酸メチルに誘導し，GC-MSにより脂肪酸組成を分析した。その結果，両脂質において[1-^{13}C]ミリスチン酸メチルのピークが強く見られたことから，菌体の脂質成分として[1-^{13}C]ミリスチン酸が取り込まれたことが分かった。分子イオンの同位体存在比から，トリアシルグリセロール中のパルミトバクセン酸 (C16:1Δ11) やパルミチン酸 (C16:0) にも [1-^{13}C]ミリスチン酸に由来する^{13}C が取り込まれたことから，投与した脂肪酸の伸長，不飽和化が行われていることが示唆された。

arbuscular mycorrhizal fungi, spore formation, fatty acid

発表責任者：秋山康紀（akiyama@biochem.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：4A10a09
講演日時：3 月 28 日 11:08～ センター2 号館 A10 会場

緑膿菌のクォーラムセンシング物質が与える細菌溶菌性捕食細菌デロビブリオ属細菌への捕食阻害原因物質の特定

Identification of a causal compound derived from *Pseudomonas aeruginosa* to inhibit the predatory activity of *Bdellovibrio bacterivorus*

○星子 裕貴[1]、西山 嘉人[1]、ロペスハコメ ルイスエサウ[2]、平野 隆太郎[1]、守屋 多恵[1]、ガルシア コントレラス ロドルホ[2]、前田 憲成[1] ([1]九工大院生命体、[2]メキシコ国立自治大医)

○Yuki HOSHIKO[1], Yoshito NISHIYAMA[1], Luis Esau LOPEZ-JACOME[2], Ryutaro HIRANO[1], Tae MORIYA[1], Rodolfo GARCIA-CONTRERAS[2], Toshinari MAEDA[1] ([1]Kyutech, [2]UNAM, Mexico)

【目的】デロビブリオ属細菌は、大腸菌のようなグラム陰性菌を捕食でき、また黄色ブドウ球菌のバイオフィルムを破壊できることから、多剤耐性菌根絶に向けた新たな「生きた抗菌薬」として医療・食品・環境分野など様々な分野での応用が期待されている。しかし、多剤耐性菌の代表格を担う緑膿菌に対してはデロビブリオ属細菌の捕食の可能/不可能であると意見が二分している。そこで、大腸菌のクォーラムセンシングによって緑膿菌の毒性因子を抑制することができるという報告があるため、大腸菌存在下ではデロビブリオ属細菌は緑膿菌を捕食できるのではないかという仮説の下、予備実験を行った。緑膿菌と大腸菌の共生条件下では、通常捕食できる大腸菌でさえ、デロビブリオ属細菌の捕食活動が阻害されることが分かった。そこで、緑膿菌存在下におけるデロビブリオ属細菌の大腸菌への捕食活動の阻害メカニズムを解明することを目的に、緑膿菌のクォーラムセンシング機構に着眼して追究を行った。今回の発表では、二層平板法を用いたスクリーニング結果と捕食阻害の原因物質を特定したことについて報告する。

【方法】まず、前培養した大腸菌とデロビブリオ属細菌のそれぞれの菌液を混ぜた NB トップアガー(寒天濃度 0.8%)を NB 寒天プレート(寒天濃度 1%)上に流し込んだ。NB トップアガーが固まった後、プレートの中心部に試料溶液を 2 µL 置き、30°C で 3-4 日培養し捕食の阻止円の大きさで、捕食の阻害度を評価した。はじめの実験の試料溶液として、前培養した緑膿菌 PA14 の野生株に加え、緑膿菌のクォーラムセンシングのシグナル分子生産に関わる *lasI*、*rhlI*, *pqsA*, *pqsH* のそれぞれの変異株を用いた。次の実験では、緑膿菌の菌液に重なるようシグナル分子の標準試薬(80 mM)を 2 µL 添加することで捕食の阻止円が補完されるかを確認した。最後の実験では、候補物質となる 80 mM の標準試薬のみをプレートの中心部に添加し、デロビブリオ属細菌の捕食阻害原因物質を特定した。

【結果】はじめに、野生株や他のクォーラムセンシング機構の欠損株を用いた実験では、*pqsA* と *pqsH* のそれぞれの変異株のデロビブリオ属細菌の捕食阻止円が顕著に減少していることが分かった。そこで *pqs* クォーラムセンシング機構に焦点を当て、シグナル分子である 2-heptyl-3,4-dihydroxyquinoline (PQS, *Pseudomonas* quinolone signal)と 4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ)の標準試薬を用いると PQS 添加時は *pqsH* 変異株のみが、HHQ 添加時は *pqsA*, *pqsH* の両変異株の阻止円が補完された。次に、PQS、HHQ それぞれの標準試薬を用いたところ、HHQ のみ顕著に阻害されたことから HHQ がデロビブリオ属細菌の捕食阻害の原因物質の一つであると結論付けた。

Quorum sensing, Bdellovibrio bacteriovorus, Antibiotics

発表責任者：前田憲成（toshi.maeda@life.kyutech.ac.jp）

講演番号：4A10a10
講演日時：3 月 28 日 11:19～ センター2 号館 A10 会場

サワードウ自然発酵を駆動する乳酸菌リレーに pH が果たす役割

Role of pH in lactic acid bacterial relay driving spontaneous sourdough fermentation

○大城 麦人[1,2]、田中 優[1]、善藤 威史[1]、中山 二郎[1] ([1]九州大農、[2]山崎製パン中央研)
○Mugihito OSHIRO[1,2], Masaru TANAKA[1], Takeshi ZENDO[1], Jiro NAKAYAMA[1] ([1]Kyusyu Univ., [2]Yamazaki Baking CO., LTD.)

【背景】サワードウ（Sourdough）とは、穀物粉（小麦粉等）と水の生地状物が乳酸菌や酵母によって自然発酵した伝統的なパン種である。ベーカリーにおいて、サワードウは日々のパン作りの原料として使われるとともに、残されたサワードウに穀物粉と水を加えて再発酵することで継代される。これまでの研究により、サワードウの継代過程で出現する乳酸菌は出現時期によって前半型・中間型・後半型の 3 タイプに分けられ、これら 3 タイプが順にリレーしてサワードウの発酵を進めることが明らかになった(1)。本研究では、サワードウの継代過程において乳酸菌リレーが起きるメカニズムを明らかにするため、乳酸発酵の特徴である pH の変化が乳酸菌リレーを駆動させているという仮説を立て、検証した。
【方法】9 種類のサワードウから継代時間を変えてサンプリングし、得られた 152 サンプルのサワードウを混合して種菌とした。サワードウの pH 域を想定した pH 6.7、5.5、4.5 の 3 つのモデル液体培地、およびサワードウ原料（小麦粉＋水）に種菌を接種し、それぞれを 10 回継代培養した。継代培養のモニタリングは、pH、16S rRNA 遺伝子アンプリコン解析、qPCR による細菌 16S rRNA 遺伝子数の定量により行った。また、pH を変更したモデル液体培地を用いてサワードウから分離した乳酸菌を純粋培養し、測定濁度の経時変化から最大比増殖速度を算出した。
【結果と考察】継代培養における各継代の初発 pH は、使用モデル培地の pH によって異なった。一方、いずれの継代培養も各継代の最終 pH は 4 付近に収束した。サワードウ原料を用いた継代培養の pH 変化は、pH 5.5 の培地を用いた場合に近かった。pH 6.7 のモデル培地を用いて pH の低下を抑制しながら継代培養すると、前半型乳酸菌である *Weissella*、*Leuconostoc*、*Enterococcus*、*Lactococcus* の 16S rRNA 遺伝子が継代の最終まで検出され、前半型乳酸菌を主とした発酵は pH の低下によって終了することが明らかになった。また、前半型乳酸菌の最大比増殖速度は pH 6.7 で高い値を示し、pH の低下に伴って当該速度が低下した。培養工学的観点からこれらの結果を考察すると、継代サワードウの培養環境は複合微生物系の連続培養に近いと考えられ、各乳酸菌の比増殖速度の低下が、サワードウ細菌叢の構造的な変化として強く現れることが示唆された。一方、中間型乳酸菌 *Pediococcus* を主とした発酵は、pH 以外の要因により終了すると考えられた。後半型乳酸菌 *Lactobacillus* による発酵の活性化は、サワードウ環境に起因していると考えられた。
(1) Oshiro et al., J. Biosci. Bioeng., Vol. 128, 170-176, 2019.

naturally fermented food, LAB, microbiome

発表責任者：中山二郎（nakayama@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：4A10a11
講演日時：3 月 28 日 11:40～ センター2 号館 A10 会場

沖縄のサンゴ礁海域における Ruegeria 属細菌分布調査の検討

Investigation of the distribution of Ruegeria sp. in coral reef sea area in Okinawa

○北村 瑠璃子[1]、西川 有美[1]、西村 優菜[1]、三浦 夏子[1]、伊藤 通浩[2]、高木 俊幸[3]、片岡 道彦[1] ([1]阪府大院・生命環境、[2]琉球大熱生研、[3]東大大気海洋研)
○Ruriko Kitamura[1], Yumi Nishikawa[1], Yuna Nishimura[1], Natsuko Miura[1], Michihiro Ito[2], Toshiyuki Takagi[3], Michihiko Kataoka[1] ([1]Grad. Sch. Life & Environ. Sci., Osaka Prefecture Univ., [2]TBRC, Univ. of the Ryukyus, [3]AORI, Univ. Tokyo)

【背景と目的】
海洋細菌 *Vibrio coralliilyticus* はサンゴの細菌性白化などの様々な病気を引き起こす日和見感染菌である。最近我々は、*V. coralliilyticus* に対して生育阻止活性をもつ *Ruegeria* 属細菌を水槽で飼育したアザミサンゴ *Galaxea fascicuralis* に見出した(1)。*Ruegeria* 属細菌は海洋に広く分布していることが知られている。以上から、実際のサンゴ礁海域においても、*Ruegeria* 属細菌が、*V. coralliilyticus* が関与する病気への抵抗性をサンゴに付与している可能性がある。一方で、サンゴ礁海域における *Ruegeria* 属細菌の分布状況に着目した知見はこれまでに例が無い。そこで本研究では海水サンプルおよび海水中に存在する環境 DNA を用いて *Ruegeria* 属細菌の分布を調べることを目的としている。

【方法と結果】
沖縄の瀬底島周辺に存在するサンゴ礁海域から海水のサンプリングを行った。取得した海水サンプルから環境 DNA を抽出し、以前に設計した *Ruegeria* 属細菌特異的プライマー(2)を用いてリアルタイム PCR を行うことで、環境試料中に含まれる *Ruegeria* 属細菌由来 DNA の検出を試みた。その結果、環境試料中から目的の DNA 断片を検出できた。同時に、取得した海水サンプルをプレートに塗布し、海水に含まれる細菌群の培養を行うとともに、新たにコロニーPCR 用に設計した *Ruegeria* 属細菌特異的プライマーを用いて、培養を行ったプレートで得られたコロニーから *Ruegeria* 属細菌のスクリーニングを行った。その結果、*Ruegeria* 属細菌と予想される菌株を複数取得することが出来た。

(1) Miura and Motone et al. *Marine Biotechnol.* 2019:21:1-8.
(2) Kitamura et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* in press

Coral associated bacteria, Ruegeria, Environmental dna

発表責任者：三浦夏子（miura.natsuko@biochem.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：4A10a12
講演日時：3 月 28 日 11:51～ センター2 号館 A10 会場

光合成微生物人工共生体を用いたナノセルロース生産システムの構築

Construction of nanocellulose production system using an artificial symbiosis with photosynthetic microorganism

○櫻澤 熙[1,5]、山中 茂[2]、森川 英明[3]、村上 泰[4]、小笠原 寛[5]([1]信州大院・繊維・応生、[2]信州大・繊維、[3]信州大・繊維・先進繊維、[4]信州大・繊維・化材、[5]信州大・基盤研究支援セ・遺伝子)
○Hikaru SAKURAZAWA[1,5], Shigeru YAMANAKA[2], Hideaki MORIKAWA[3], Yasushi MURAKAMI[4], Hiroshi OGASAWARA[5] ([1]Shishu Univ., Dept. of Text Sci., App Bio Div., [2]Shinshu Univ., Dept of Text Sci., [3]Shinshu Univ., Dept of Text Sci., Adv. Text. and Kansei Eng., [4]Shinshu Univ., Dept of Text Sci., Chem. and Mat., [5]Shinshu Univ., Bas Res Sup Cen., Gene Res Sup Div)

バクテリアセルロース(BC)は、主に *Gluconacetobacter* 属の BC 高生産株を用いて生産され、植物由来のセルロースに比べ線維径が細く、リグニンなどの夾雑物が少ないため分離精製が容易である。しかし、これら菌株を培養するための培地コストが高いなど生産性に問題があり、BC の産業界での利用が進んでいないのが現状である。本研究では、共培養条件下において BC 生産に必要なグルコースと酸素を BC 生産菌に供与する光合成微生物を探索した結果、光合成微生物と BC 生産菌が共生体を形成することを初めて見出したので、その機構解明を目指した。

まず、BC 生産菌との共培養に最適な光合成微生物の組み合わせを探索するために、BC 生産菌である *Gluconacetobacter* 属の *G. xylinus* および *G. hansenii* を、至適培養温度条件の近い、幾つかの光合成微生物と共培養した。今回、中でも生育が良好であった *G. hansenii* と *Chlorella variabilis* の共培養について報告する。通常、絶対好気性菌である *G. hansenii* は、静置培養すると培養液上層部に白色のペリクルを形成するが、共培養時においては、培養液底部に緑色共生体が形成された。共培養開始時の pH 条件を検討したところ、培養 5 日目の BC 生成量は初発 pH6.0～7.5 の範囲で最も高かった。共生体塊形成における明暗条件の影響を調べたところ、培養器をアルミホイルで遮光した暗条件下では培養液底部の緑色共生体は殆ど観察されなかった。また、共培養開始時に終濃度 0.5%グルコースを添加したところ、培養液上層部に白色のペリクルが形成され、培養液底部の緑色共生体は観察されなかった。一方、共培養後 5 日目に共生体形成が確認された培養液に終濃度 0.5%グルコースを添加したところ、培養液底部の緑色共生体量の増加が観察された。本発表では、これらの結果を基に、共生体形成時における *G. hansenii* と、*C. variabilis* の役割について議論したい。

bacterial cellulose, Symbiosis, Photosynthesis

講演番号：4A11a01
講演日時：3 月 28 日 09:30～ センター2 号館 A11 会場

遺伝子組み換え大腸菌によるデンプンからの 1,3-propndiol の直接生産

Development of Engineering Escherichia coli for direct production of 1,3-propandiol from Starch

○佐藤 臨太郎[1,2]、麻生 祐司[1,2] ([1]京都工繊大院、[2]JST-MIRAI 未来社会創造事業)
○Rintaro SATO[1,2], Yuji ASO[1,2] ([1]Kyoto Institute of Tech., [2]JST-Mirai Program)

【目的】遺伝子組み換え大腸菌を用いて1,3-propandiol（1,3-PDO）をグルコースから発酵生産した報告がある。もし、デンプンから1,3-PDOを直接生産できる大腸菌を開発できれば、アップストリームプロセスの簡便化を図れる。そこで本研究では、α-アミラーゼ遺伝子と1,3-PDO生産遺伝子を大腸菌 *Escherichia coli* BW25113に導入することで、デンプンから1,3-PDOを直接生産する大腸菌を作製した。このとき、α-アミラーゼは細胞表層に発現させた。また、グリセロール代謝遺伝子 *tpiA, glpK, gldA* の破壊が1,3-PDO生産に与える効果についても検討した。
【方法】*Streptococcus bovis* 由来α-アミラーゼ遺伝子 *amyA* をクローニングしたプラスミドpVUB3-SBAと、*Saccharomyces cerevisiae* 由来 *gpd1-gpp2* および *Klebsiella pneumoniae* 由来 *dhaB123-gdrAB-dhaT* をクローニングしたプラスミド pSR8 を構築した。次に、BW25113 株を親株として、*tet::sacB* カセット用いて *tpiA, glpK, gldA* 破壊株を作製した。両プラスミドを遺伝子破壊株と非破壊株に導入した。両株を炭素源として 1%グルコースまたはデンプンを含む M9 培地に接種し、30℃、3 日間、微好気条件下で振とう培養した。HPLC により培養液上清中のグリセロールおよび1,3-PDO濃度を測定した。フェノール硫酸法で消費デンプン量を定量した。SDS-PAGE およびタンパク質の発現を解析した。キットを用いて、菌体表層に発現させたα-アミラーゼの活性を測定した。
【結果と考察】1,3-PDO 生産量は、炭素源として 1%グルコースを用いた場合、遺伝子破壊株では培養 72 h 後で 95 mg/L、非破壊株では培養 72 h 後で 148 mg/L であった。一方、炭素源として 1%デンプンを用いた場合、遺伝子破壊株では培養 48 h 後で 120 mg/L、非破壊株では培養 48 h 後で 122 mg/L であった。遺伝子破壊株および非破壊株のα-アミラーゼ活性は、それぞれ 0.22 U/mL、2.53 U/mL であった。よって、炭素源をデンプンとした場合でもグルコースと比べて同程度の 1,3-PDO 生産性を達成できることがわかった。また、グリセロール代謝遺伝子を破壊することで、1,3-PDO 生産性が向上することがわかった。以上の結果から、組み換え大腸菌によるデンプンからの 1,3-PDO 直接生産の有効性が示された。

Escherichia coli, fermentation, 1,3-propandiol

発表責任者：佐藤臨太郎（sato6r@kit.ac.jp）

講演番号：4A11a02
講演日時：3 月 28 日 09:41～ センター2 号館 A11 会場

Methylobacterium extorquens AM1 によるメタノールからのセルロース生産
Cellulose production from methanol by *Methylobacterium extorquens* AM1
○名和 真佑、田中 知成、小原 仁実、麻生 祐司（京都工繊大院）
○Shinsuke NAWA, Tomonari TANAKA, Hitomi OHARA, Yuji ASO (Kyoto Inst. Tech.)

【目的】メタノール資化性菌 *Methylobacterium extorquens* AM1 は培養時に凝集塊を形成する。セルロース合成遺伝子欠損株では凝集塊が形成されないことから、AM1 株はセルロースを生産すると考えられるが、本株のセルロース生産に関する知見はない。そこで本研究では、AM1 株のメタノールからのセルロース生産について調べた。
【方法】炭素源として 0.1～10%メタノール、窒素源として 0.1～10%硫酸アンモニウムを含む 50 mL の無機塩培地（MP 培地）に AM1 株を培養液濁度 OD_{600} ＝ 0.1 となるように接種し、30℃で振とう培養した。このとき、培養 2 日毎に 3 U/mL エンドグルカナーゼおよび 0.3 U/mL セロビオシダーゼを培養液に添加し、生産したセルロースを消化することで凝集塊の形成抑制を試みた。また、酵素非添加の条件でも培養し、培養液への酵素添加による菌体増殖への影響について調べた。グルコース定量キットを用いて培養液中のグルコース量からセルロース生産量を算出した。GC を用いて消費メタノール量を分析した。
【結果と考察】1%メタノールおよび 1%硫酸アンモニウムを添加した培地を用いた場合、菌体増殖性と凝集塊形成が最も高かった。10%メタノールを添加した培地では菌体は増殖しなかったことから、高濃度のメタノールは菌体増殖阻害を示すことがわかった。培養液に酵素を添加しなかった場合、顕著な凝集塊形成が見られた。一方、培養液にエンドグルカナーゼを添加することで凝集塊の形成を抑制できた。また、エンドグルカナーゼおよびセロビオシダーゼを同時に添加した場合、培養液上清中にグルコースの生成を確認できた。これらの結果から、AM1 株はセルロースを生産していることが確認された。1%メタノールおよび 1%硫酸アンモニウムを添加した培地を用いて 6 日間培養した場合、エンドグルカナーゼおよびセロビオシダーゼ添加・非添加時の乾燥菌体重量はそれぞれ 2.71 g/L、2.11 g/L であった。よって、培養液への両酵素添加による菌体増殖阻害の効果はないと考えられた。1%メタノールおよび 1%硫酸アンモニウムを添加した培地を用いて 10 日間培養した場合、エンドグルカナーゼおよびセロビオシダーゼ添加時の OD_{600}、セルロース生産量、消費メタノール量はそれぞれ 6.8、0.33 g/L（グルコース換算）、7.37 g/L（9.30 mL/L）であった。
以上の結果より、AM1 株はメタノールからセルロースを生産すること、1%メタノールおよび 1%硫酸アンモニウムを添加した培地を用いて培養した時に菌体増殖とセルロース生産性が最も高くなること、培養液へのエンドグルカナーゼおよびセロビオシダーゼの添加による菌体増殖阻害の効果はないことがわかった。

Cellulose, Methanol, *Methylobacterium extorquens*

講演番号：4A11a03
講演日時：3 月 28 日 09:52～ センター2 号館 A11 会場

油糧糸状菌 *Mortierella alpina* の分子育種による遊離脂肪酸生産株のリピドーム解析
Lipidome analysis of *Mortierella alpina* with free fatty acid production by molecular breeding
○島田 良美[1]、下平 武彦[2]、相馬 悠希[2]、和泉 自泰[2]、安藤 晃規[1]、岸野 重信[1]、阪本 鷹行[3]、馬場 健史[2]、小川 順[1]、櫻谷 英治[3]([1]京大院農・応用生命、[2]九州大・生医研、[3]徳島大・生物資源)
○Yoshimi Shimada[1], Takehiko Shimohira[2], Yuki Soma[2], Yoshihiro Izumi[2], Akinori Ando[1], Shigenobu Kishino[1], Takaiku Sakamoto[3], Takeshi Bamba[2], Jun Ogawa[1], Eiji Sakuradani[3] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyusyu Univ., [3]Tokushima Univ.)

【緒言】
アラキドン酸の工業生産菌である油糧糸状菌 *Mortierella alpina* は、重量比で最大約 60%の脂質を主にトリアシルグリセロール(TAG)の形態で菌体内に蓄積する。一方、化成品や医薬品など日常生活品の脂肪族化合物原料として脂質を供給する際には、遊離脂肪酸（FFA）の形態がより有利で望ましいこともある。そこで、本菌を宿主として脂質代謝に関わる遺伝子を過剰発現することで、FFA 高生産株の取得を行ってきた [1)]。本研究では得られた FFA 高生産株の菌体内脂質について詳細なリピドーム解析を行ったので報告する。

【方法および結果】
*M. alpina*を宿主とし、発現対象として選択した本菌の脂質代謝に関わる酵素遺伝子チオエステラーゼ *(ACOT8R)*およびリパーゼ *(TGL4)*を ATMT 法にて導入した。ウラシル要求性を示標として選抜した形質転換株の中から、コントロール株よりも菌体内脂質中の FFA 含有率が高い FFA 高生産株を得た。FFA 高生産株では FFA の総脂肪酸に対する割合は 17%程度であり、コントロール株の約 3 倍向上していた。そこで FFA 高生産株の菌体内総脂質を Bligh-Dyer 法により抽出し、ワイドターゲット定量リピドーム解析法(SFC/MS/MS)[2)]により詳細な分析を行った。本法にて各脂質クラスおよび個々の脂質分子について定量した結果、FFA 高生産株ではコントロール株と比べて菌体内の TAG が最大 37%減少しており、ジアシルグリセロール（DAG）は 3-4 倍、FFA は 3 倍に増加していた。菌体内脂質のうち、TAG が減少して DAG と FFA 量が増加したことから、今回選択した遺伝子が *M. alpina* における FFA 生産向上のための重要なターゲットであることが確かめられた。また、GLC/FID の全脂質分析では炭素数 16 から 24 までの飽和脂肪酸の割合の増加が認められていたが、今回の分析で、これら飽和脂肪酸の割合が FFA では 80%程度、TAG では 35%程度であり、脂質クラスにより大きく脂肪酸組成が異なること、FFA では飽和脂肪酸含有率が高くなっていることが判明した。

【参考】
1） 島田良美ら，日本農芸化学会 2018 年度大会，2018 年 3 月名古屋
2） H. Takeda *et al*, *Journal of Lipid Research*, **59**, 1283-1293, 2018

Mortierella alpina, free fatty acid, lipidomics

発表責任者：小川順（ogawa@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4A11a04
講演日時：3 月 28 日 10:03～ センター2 号館 A11 会場

ラビリンチュラ類 *Aurantiochytrium* sp. T7 による ω3-ドコサペンタエン酸(DPA)の生産
Production of ω3-docosapentaenoic acid (DPA) by Labyrinthulea, *Aurantiochytrium* sp. T7
○奥田 知生[1]、安藤 晃規[1,2]、波多野 文美[1]、菊川 寛史[1]、松山 恵介[3]、小川 順[1,2] ([1]京大院農・応用生命、[2]京大・生理化学、[3]長瀬産業株式会社)
○Tomoyo OKUDA[1], Akinori Ando[1,2], Ayami Hatano[1], Hiroshi Kikukawa[1], Keisuke Matsuyama[3], Jun Ogawa[1,2] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Res. Physiol. Chem., Kyoto Univ., [3]Nagase & Co.,Ltd.)

ω3 高度不飽和脂肪酸 （ω3-PUFA）は、脳機能の発達促進やアレルギー抑制など多彩な生理機能を有することが知られており、哺乳類においては生理活性物質の前駆体ともなることから、医薬品原料や食品添加物としての需要が近年急速に高まっている。ω3-PUFA のうち、エイコサペンタエン酸（EPA）やドコサヘキサエン酸（DHA）、α-リノレン酸（ALA） は、天然資源に比較的多く存在することから、生理機能解析や商業利用がすでに進められている。一方、ステアリドン酸（SDA）や ω3-ドコサペンタエン酸（ω3-DPA）、エイコサテトラエン酸（ETA）といった天然に希少な ω3-PUFA は、他の ω3-PUFA と同様に有用な生理機能が期待されているものの、供給が不十分であるために研究が進んでいないのが現状である。例えば、ω3-DPA はタテゴトアザラシなどの抽出油に含まれていることが報告されているが、含有量は総脂質の 5 %以下であり十分な供給は望めない。

近年、細菌や真菌、植物、微細藻類などによる ω3-PUFA の生産に注目が集まっているなか、我々は特に希少 ω3- PUFA の生産に着目し、安価で大量かつ安定的に生産できる供給源として期待されている *Aurantiochytrium* や *Schizochytrium* をはじめとするラビリンチュラ類微生物を対象にスクリーニングを行ない、ω3-DPA を著量蓄積する *Aurantiochytrium* sp. T7 株を取得した。培地の炭素源、窒素源、人工海水濃度、pH 等の培養条件が T7 株の ω3-DPA 生産性に及ぼす影響について検討した結果、2% Glucose、1% Yeast extract、1.8% 人工海水塩、初発 pH5.5 以下の培養条件において高い ω3-DPA 生産性を示すことが明らかとなった。また、培養期間中の残存グルコース濃度と ω3-DPA 生産量の経時変化から、グルコースが枯渇する培養 2 日目以降において ω3-DPA 蓄積量が顕著に増加することを明らかにした。

ω3-polyunsaturated fatty acid, docosapentaenoic acid, Labyrinthulea

講演番号：4A11a06
講演日時：3 月 28 日 10:35～ センター2 号館 A11 会場

鰹節カビ *Aspergillus* 属糸状菌が生産する加水分解酵素の特性解析
Characterization of hydrolytic enzymes from *Aspergillus* spp. isolated from katuobushi
小川 千晶[1]、上村 真理子[2]、中林 麗奈[1]、木村 行宏[1]、横田 仁子[3]、土居 幹治[3]、○竹中 慎治[1]（[1]神戸大院農、[2]神戸大農、[3]マルトモ（株））
Chiaki Ogawa[1], Mariko Uemura[2], Reina Nakabayashi[1], Yukihiro Kimura[1], Satoko Yokota[3], Mikiharu Doi[3], ○Shinji Takenaka[1] ([1]Kobe Univ. Grad. Sch. of Agric, [2]Kobe Univ. Fac. of Agric., [3]Marutomo co.)

【目的】日本の伝統食品である鰹節には、大きく分けて荒節と枯節の 2 種類が存在する。原料のカツオをおろし、煮熟・焙乾ものが荒節であり、*Aspergillus* 属糸状菌（鰹節カビ）を使ってさらに荒節をかび付け発酵させたものが枯節である。鰹節カビは麹菌と比較し、より低水分活性下でも生育できる好乾性糸状菌に分類されることから、微生物遺伝資源としても興味深い糸状菌群である。我々は、これまでに、かび付け時期やサンプルの違いによる好乾性糸状菌の優占種やその変化について解析し、5 種の鰹節カビを見出した[1)]。かび付け工程では、脂質の分解、香味の付与、色相の変化がもたらされることから、鰹節カビが分泌生産する種々の菌体外加水分解酵素が働いていると予想される。そこで、本研究では、脂質分解やタンパク質の分解に関わる菌体外加水分解酵素についてそれらの特性を明らかにすることを目的とした。
【方法】試験菌株:菌叢解析の過程で選抜した 5 種の菌株を用いた(*A. amstelodami* (a)、*A. chevalieri* (c)、*A. pseudoglaucus* (p)、*A. ruber* (r)、*A. sydowii* (s))。培養：鰹節（荒節）粉にて固体培養を行い、粗酵素液を回収した。酵素の精製：イオン交換、疎水、ゲル濾過等の各種クロマトグラフィーによった。酵素活性測定：リパーゼ活性（基質: pNP-butyrate および pNP-palmitate)、プロテアーゼ活性（ヘモグロビンおよびカゼイン)、ペプチダーゼ活性（基質：Leu-pNA）を調べた。タンパク質同定：SDS-PAGE 後、LCMSMS-Mascot 解析によった。
【結果】培養時の水分活性(Aw=0.87 または 0.96)を変え、培養して得られた粗酵素液を DEAE-Toyopearl に供し、リパーゼの溶出パターンを調べた。(a)や(p)種は水分活性の違いにより荷電の異なるリパーゼが含まれていた。(c)種は高水分活性下においてリパーゼ生産に優れていた。(r)種は低水分活性下でリパーゼ生産が増大した。(s)種は低水分活性下では生育が不良であった。また、(c)と(p)種ついては、ペプチダーゼ活性も調べ水分活性依存的に生産性が変化していることがわかった。リパーゼについて精製を進め、電気泳動後のサンプルについてタンパク質同定を行った。(c)種由来サンプルから cutinase、carboxyl esterase、phospholipase B、isoamyl acetate esterase など 5 種を同定できた。一方、(p)種由来サンプルから carboxyl esterase を含む 3 種を同定できた。一方、ペプチダーゼについては、(c)と(p)種において aminopeptidase の他に dipeptidyl peptidase 等を見出すことができた。現在、他の 3 種の鰹節カビについても菌体外酵素のタンパク質同定を進めている。
１）2019 年度 日本農芸化学会本大会（東京)、1C3a02

xerophilic *Aspergillus*, lipase, peptidase

発表責任者：竹中　慎治（stakenaka@people.kobe-u.ac.jp）

講演番号：4A11a07
講演日時：3 月 28 日 10:46～ センター2 号館 A11 会場

シアノバクテリア外膜脱離細胞の諸性質と栄養生産への応用

Outer membrane detached cyanobacteria secrete periplasmic and thylakoid luminal components

○児島 征司（パナソニック（株））
○Seiji KOJIMA (Panasonic corp.)

葉緑体の起源は原始真核細胞内に共生したシアノバクテリアである。自然環境中で独立した生き物として生息するシアノバクテリアを細胞の中に閉じ込め、葉緑体へと変換することにより、植物はシアノバクテリアを「光合成工場」として利用することにおいて史上最も成功した生物の一つとなった。シアノバクテリアから葉緑体への変貌過程では、細胞表層膜の構成因子と性質が大きく変化していることが明らかになっている（1，2)。本講演では、当進化機構を模倣し、応用する取り組みについて発表する。

灰色藻 *Cyanophora paradoxa* が保持する原始的葉緑体は、内膜、ペプチドグリカン、外膜で形成されるシアノバクテリア細胞表層と同様の構造を残しているが、以下の点でシアノバクテリアと大きく異なる。①*Synechocystis* sp. PCC 6803 の Slr1841 等に代表される、シアノバクテリア外膜蛋白質の約８０％を占めるペプチドグリカン結合型外膜チャネル蛋白質が、原始的葉緑体には存在しない。②シアノバクテリアペプチドグリカンにはピルビン酸修飾された糖鎖が共有結合しているが、原始的葉緑体ペプチドグリカンには存在しない。本研究で、*Synechocystis* sp. PCC 6803 を用い、①ペプチドグリカン結合型外膜チャネル蛋白質の発現抑制効果および②ペプチドグリカン結合糖鎖のピルビン酸修飾抑制効果を検証したところ、いずれにおいても外膜の脱離、ペリプラズム及びチラコイドルーメン内腔のタンパク質及び代謝物の分泌が観察された。分泌量はタンパク質等量で約 0.5 g/L であり、*Bacillus subtilis* 等の従属栄養性細菌を培養するのに十分な量であった。当細胞の諸性質及び当分泌成分を用いた他の応用への取り組みについても紹介する。

cyanobacteria, peptidoglycan, outer membrane

講演番号：4A11a08
講演日時：3 月 28 日 10:57～ センター2 号館 A11 会場

結晶化が困難なアルドキシム脱水酵素の変異導入による結晶構造解析
Crystal screening of aldoxime dehydratase from Bacillus sp. OxdB-1 for structural analysis
○松井 大亮[1]、村木 則文[2,3]、Chen Ke[1]、森 智也[1]、青野 重利[2,3]、浅野 泰久[1]([1]富山県大工・生医工研セ、[2]自然科学研究機構・生命創成探究セ、[3]自然科学研究機構・分子研)
○Daisuke MATSUI[1], Norifumi MURAKI[2,3], Ke CHEN[1], Tomoya MORI[1], Shigetoshi AONO[2,3], Yasuhisa ASANO[1] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]ExCELLS, NINS, [3]IMS, NINS)

【目的】アルドキシム脱水酵素 (Oxd) はアルドキシム化合物の脱水反応を触媒し、シアンを使用せずにニトリル化合物を合成できる有益な酵素である[1]。当研究室は様々な微生物から得られた Oxd を用いた光学活性ニトリルの合成を行った結果、特に *Bacillus* sp. OxdB-1 由来 Oxd（OxdB）は複数のアルドキシムに対し他の Oxd よりも優れたエナンチオ選択性を示すことを明らかにした[2]。これまでに様々な条件で結晶化を試みたが結晶の形成が見られていない OxdB の結晶化と構造解析を目的として、タンパク質表面の Lys や Glu 残基を Ala に置換した変異型酵素を用いた結晶化を行った。
【方法】OxdB 遺伝子を pET22b (+) ベクターに挿入し、得られた発現プラスミドを大腸菌 BL21 (DE3) に挿入した。培養後、菌体を超音波破砕し、遠心分離で得られた上清をニッケルアフィニティークロマトグラフィーで精製した。精製酵素をホルムアルデヒド及びジメチルアミンボラン複合体を用いて Lys 残基をメチル化修飾した。OxdB の一次配列を用いて SWISS-MODEL で立体構造を予測し、そのタンパク質表面に位置する Lys や Glu 残基に対し、QuikChange (Stratagene) で Ala に各々置換した。得られた変異型酵素遺伝子の発現系を上記と同様に構築し、培養と精製を行った。Crystal Screen 1,2、Index (Hampton Research)、 PACT Suite (Qiagen) で 20oC の条件でスクリーニングした。
【結果と考察】タンパク質表面に位置するアミノ酸の側鎖の柔軟性が結晶化に影響していると推定し、OxdB の Lys 残基をメチル化修飾し、ゲルろ過カラムクロマトグラフィー通液後の活性画分を用いて結晶化を行った結果、0.2 M $MgCl_2$･$6H_2O$, 0.1 M Bis-Tris pH 6.5, and 25% (w/v) PEG 3,350 の条件で結晶の形成が見られた。X 線結晶構造解析に最適な単結晶を得るために、電荷をもつアミノ酸の Lys や Glu 残基を Ala に置換した変異型酵素を調製した結果、野生型酵素よりも熱安定性が上昇した変異型酵素 K104A や E85A を見出した。精製 OxdB E85A を用いて結晶化を行った結果、0.2 M $MgCl_2$･$6H_2O$, 0.1 M Tris HCl pH 8.5, and 30% (w/v) PEG 4,000 の条件で結晶を得、その結晶を用いて X 線結晶構造解析で 1.55 Å の回折データの取得に成功した。得られた構造情報において、Glu85 を置換した Ala 残基はタンパク質表面に位置し、パッキング時に Gly186 残基の近傍に存在していることから、変異導入による立体障害の減少で結晶の形成が可能となったと推測できた。
【参考文献】[1]H. Sawai et al, *J. Biol. Chem.*, **284**, 32089-32096 (2009)., [2]T. Betke et al, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **56**, 12361-12366 (2017).

aldoxime dehydratase, directed evolution, X-ray crystallography

発表責任者：浅野泰久（asano@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：4A11a09
講演日時：3 月 28 日 11:08～ センター2 号館 A11 会場

イソブチルシアノアクリレートナノ粒子が ヤケイロタケの酵素生産と菌体量に与える影響
Effect of iso-butyl cyanoacrylate nanoparticles on manganase peroxidase production and cell weight by *Bjerkandera adusta*

○神尾 瑞[1]、堀沢 栄[1]、小松 千景[2] ([1]高知工科大、[2]チカミミルテック株式会社)
○ Mizuki KAMIO[1], Sakae HORISAWA[1], Chikage KOMATSU[2] ([1]Kochi University of Tec., [2]Chikami Miltec inc.)

植物の資源変換やバイオレメディエーションの分野で、生物学的な分解に用いるリグニン分解酵素の利用は、環境負荷低減の観点から重要になってきている。我々はリグニン分解酵素の工業利用を目的とし、この酵素を生産する白色腐朽菌株の酵素生産能力を向上させる開発を目指している。我々はこれまでにリグニン分解酵素のひとつであるマンガンペルオキシダーゼ(MnP)の高生産株である *Bjerkandera adusta* Iwa5b を環境中より分離した。しかしこの株は MnP の生産力が高いが、その生産性が安定しないことが問題であった。リグニン分解酵素の生産はストレスによって誘導されることが報告されていることから、抗菌剤などによって菌株にストレスを与えることで、リグニン分解酵素生産量を向上させられないかと考えた。そこで抗菌作用をもつイソブチルシアノアクリレート(IBCA)ナノ粒子(1)を、*B. adusta* Iwa5b 株の培養時に添加したところ、MnP の生産量が増加することが確認された。

本研究では、MnP 酵素生産に優れた白色腐朽菌 5 株を選抜し、IBCA ナノ粒子がこれらの株の MnP 生産に与える影響を調べた。本研究では直径 30 nm および 200 nm の IBCA ナノ粒子を 0.1%w/v 添加した培地で培養し、経時的に培養液を採取し、グアヤコールおよび H_2O_2 を基質として MnP 活性を測定した。その結果、有意に酵素生産量が増加した菌株は見られなかった。次に、抗菌的ストレスが Iwa5b の酵素生産活性化に寄与するのではないかと考え、抗菌剤として用いられる塩化ベンザルコニウムを低濃度で培地に加えた状態の培養では、Iwa5b 株は酵素を全く生産しなかった。Iwa5b 株が増殖するにしたがって、IBCA ナノ粒子(径 200nm)による培地の白濁が減少していたことから、菌株が IBCA ナノ粒子を栄養源として分解しているのではないかと考えた。培養後の菌体量を測定したところ、IBCA ナノ粒子添加条件では、比較対象よりも菌株が増加していることが確認された。以上から、Iwa5b 株は IBCA ナノ粒子によって酵素生産量を増加させる特異的な菌株だと考えられた。またその原因は、抗菌性によるストレスではなく、栄養源として分解することによる菌体量増加が原因である可能性が考えられた。

(1)Shirotake S. et al. Chem Pharm Bull 56(1):137-138 (1984)

cyanoacrylate nanoparticles, manganese peroxidase, *Bjerkandera adusuta*

講演番号：4A11a10
講演日時：3 月 28 日 11:19～ センター2 号館 A11 会場

麹菌菌体外放出系を利用したプロタミンの生産
Production of protamine using the exocytotic secretion system of *Aspergillus oryzae*
○小暮 望音、中島 健介、米田 広平、松田 祐介（関西学院大院・理工・生命）
○Mone KOGURE, Kensuke NAKAJIMA, Kohei YONEDA, Yusuke MATSUDA (Dept.Biosci., Grad.Sch.Sci.Tech., Kwansei Gakuin Univ.)

【目的】麹菌 (*Aspergillus oryzae*) は非常に高いタンパク質分泌能を有し、α-アミラーゼなどの糖化酵素を菌体外に多量に分泌生産する。麹菌の分泌能を利用した異種タンパク質発現系は、夾雑物が少なく、糖鎖修飾されたタンパク質が得られるという利点があるため、有用タンパク質生産の宿主として工業的に利用されているが、小分子機能ペプチドの生産実績は少ない。本研究では、上記の分泌能を利用し、抗菌性ペプチドであるプロタミンの安価・高生産化システム開発を試みた。
【方法】サケ（*Oncorhynchus keta*）由来プロタミンのコード領域を、内在性 α-アミラーゼ（全長及び分泌シグナルのみ）の C 末端側に連結融合した発現コンストラクトを作製した。いずれのコンストラクトにおいても、アミラーゼと目的タンパク質の間には、ゴルジ体局在型 Kex2 様プロテアーゼの切断配列 (kex2GGG : -Lys-Arg-Gly-Gly-Gly-) を挿入し、プロタミンが α-アミラーゼから切り離されて菌体外に分泌されるように設計した。また、プロタミンの発現には、恒常的に駆動するプロモーター (P*enoA142*) を利用した。各コンストラクトをプロトプラスト PEG 法により麹菌 NS4 株に導入し、選抜マーカーである硝酸還元酵素の導入に伴う硝酸同化能の復帰を指標として形質転換体を得た。ゲノミック PCR による二次選抜を行った後、抗 His タグ抗体を用いたウェスタンブロットにより、プロタミンの発現および培地中への分泌を確認した。また高効率分泌に必要な培養時間や培養液組成を検討した。
【結果・考察】プロタミンの発現候補株を用い、72 時間の液体培養を行った。ウェスタンブロットによる発現解析の結果、細胞内画分でプロタミンの顕著な蓄積が見られたが、培地画分では僅かにしか検出されなかった。細胞外へのプロタミン分泌が極めて少なかった理由として、コンストラクトに由来するプロタミンと内在性のα-アミラーゼが分泌経路で競合している可能性が示唆された。そこで、内在性α-アミラーゼがグルコース存在下で顕著に発現抑制されることを利用し､培養液の糖をデキストリンからグルコースへ変更して、分泌経路の競合を避ける戦略構築を試みた。しかし、グルコースを炭素源としてもプロタミンの分泌量は増加しなかった。これらの結果より、プロタミンの性質により分泌システムが阻害されている、発現したタンパク質が細胞内で分解されている、および小分子ペプチド分泌の一般的な問題の可能性などが考えられる。今後は、これらの可能性を精査する。

Aspergillus oryzae, heterologous production, protamine

講演番号：4A11a11
講演日時：3 月 28 日 11:40～ センター2 号館 A11 会場

*N*結合型糖鎖欠損糖タンパク質を分泌生産する黄麹菌 AoGlycoDelete 株の諸性質解析

Analysis of the AoGlycoDelete strain that produces *N*-glycan-deleted glycoproteins in *Aspergillus oryzae*

○李 秋実[1]、田辺 佳奈[2]、小谷 哲也[2]、竹川 薫[1]、樋口 裕次郎[1] ([1]九大院　生資環、[2]AGC (株))
○ Qiushi Li[1], Kana Tanabe[2], Tetsuya Kotani[2], Kaoru Takegawa[1], Yujiro Higuchi[1] ([1]Dept. of Biosci.Biotechnol., Kyushu Univ, [2]AGC Inc)

【背景および目的】近年の医薬品市場ではバイオ医薬品の台頭が世界規模で拡大し続けており、その中の約 7 割を糖タンパク質が占めている。今後もさらにバイオ医薬品の需要が増加していくと考えられる。しかし、哺乳類細胞を用いた生産系の生産コストが高いことと、生産されたバイオ医薬品の糖タンパク質糖鎖の不均一さが課題となっている。また、異なる生物種によって生産された糖タンパク質はヒトにとって抗原となる糖鎖が修飾されるため、薬としての薬効が発揮できなくなることも問題となっている。それらの問題を解決するため、我々は黄麹菌 *Aspergillus oryzae* を用いて、*N*型糖鎖を欠損した末端側に一つの *N*-アセチルグルコサミン（GlcNAc）のみ修飾された GlcNAc タンパク質を分泌生産する株（AoGlycoDelete 株）を作製し、均一糖鎖を持つ糖タンパク質の大量分泌生産を目的にした。
【方法および結果】*Aspergillus oryzae* のゲノムからゴルジ体膜に存在するいくつかのタンパク質を選抜し、それらの膜貫通領域の C 末端側に *Hypocrea jecorina* 由来の endo-N-acetyl-β-D-glucosaminidase T（EndoT、黄麹菌用にコドン最適化）を融合発現するプラスミドを作製し、形質転換により AoGlycoDelete 候補株を得た。それらを親株と共に培養し、その培養上清を SDS-PAGE 後に CBB 染色した結果、AoGlycoDelete 株由来のα-アミラーゼのバンドサイズの減少が確認された。このバンドサイズの減少は、エンドグリコシダーゼである EndoCC で処理したα-アミラーゼのバンドサイズと同様であったことから、AoGlycoDelete 株により生産された糖タンパク質は GlcNAc タンパク質であると示唆された。AoGlycoDelete 株における EndoT の局在を確認するため、EGFP 融合型 EndoT (EndoT-EGFP)発現株を構築し、それをゴルジ体マーカーである mDsRed-AoGos1 と共発現することで EndoT がゴルジ体に局在することが確認された。また、対照株および AoGlycoDelete 株において、アミラーゼである AmyB、グルコアミラーゼである GlaA に HA タグを融合発現する株を作製した。それぞれの株由来の AmyB、GlaA を HA タグ精製し、抗 HA 抗体を用いたウエスタンブロットで確認した結果、AoGlycoDelete 株由来の AmyB、GlaA は対照株よりバンドサイズが減少していた。精製した AmyB、GlaA を EndoCC で処理したところ、AoGlycoDelete 株由来の AmyB、GlaA のバンドサイズが変化しなかったこと、また Intact MS 解析および遊離糖鎖解析により、AoGlycoDelete 株由来の AmyB、GlaA が *N*型糖鎖の欠損が確認されたことから、AoGlycoDelete 株は GlcNAc-AmyB、GlcNAc-GlaA を生産することが確認できた。今後、AoGlycoDelete 株を用いることで、医薬糖タンパク質の分泌生産が期待される。

Aspergillus oryzae, *N*-glycan, Glycoprotein

講演番号：4A11a12
講演日時：3 月 28 日 11:51～ センター2 号館 A11 会場

タンパク質高生産タグを組み込んだエチレン生成シアノバクテリアの改良
Improved enzyme production for higher bio-ethylene production by a cyanobacterium

○神藤 定生[1]、榊原 絢美[2]、森澤 佑太[2]、松井 健史[3]、小池 和好[3]、勝又 聡[3]、細田 晃文[2]、田村 廣人[2]([1]名城大理工、[2]名城大農、[3]出光興産株式会社)
○ Sadanari JINDOU[1], AYAMI SAKAKIBARA[2], YUTA MORISAWA[2], TAKESHI MATSUI[3], KAZUYOSHI KOIKE[3], SATOSHI KATSUMATA[3], AKIFUMI HOSODA[2], HIROTO TAMURA[2] ([1]Meijo Univ. Sci. and Tech., [2]Meijo Univ., [3]Idemitsu Kosan Co.,Ltd.)

エチレンはプラスチックなどの石油化学製品を製造する石油化学工業の基礎原料であり、石油留分の高温分解によって製造される。われわれは炭素循環社会に資するために、CO_2 から光合成的にエチレンを生産するシアノバクテリアを構築し、石油を原料やエネルギー源に用いない、新規なバイオエチレン製造法の基盤技術を確立した。

具体的には、植物由来のエチレン生合成に関わる 1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸(ACC)合成酵素(ACS)および ACC 酸化酵素(ACO)を、嫌気性微生物のバイオマス分解系を模倣した酵素複合体化技術により、複合体化(SOC2)させ、これをシアノバクテリア Synechococcus elongatus PCC 7942 へ導入し SOC2 株とした。結果、当該細菌はバイオエチレンを 0.14 mg/L･OD_{730}･h の速度で生産した。

いっぽう、バイオエチレン生産効率の向上を目的として、SOC2 を構成する 2 種のキメラ酵素サブユニット(ACS-Ctdoc および ACO-Acdoc)の複合体内モル比が１：２となるよう、酵素複合体の酵素組成の変更を行った。さらに、中間反応産物のメチルチオアデノシン(MTA)による ACS の活性阻害を回避させるため、MTA ヌクレオシダーゼ(MTAN)を組み込んだ。以上の特徴をあわせ持った人工酵素複合体 SOC4 を構築し、これを保持するシアノバクテリア SOC4 株から 0.34 mg/L･OD_{730}･h のバイオエチレン生産速度を得た。これは基準株の SOC2 株と比較して、2.4 倍の活性向上であった。

しかし、実用化を目指すとき、光合成細菌のバイオエチレン生産量は微量である。
エチレン生合成に関わる 2 段階の連続反応のうち、ACO の V_{max} 値は ACS の約 270 分の 1 の値をもつ。すなわち、ACO は律速段階であり、かつ、その発現量は少ない。以上の課題に対して、われわれはタンパク質を高生産させる 10 アミノ酸程度のタグ配列を SOC2 株の ACO-Acdoc の N および C 末端に付加した SOC2-タグ株を構築することで ACO の高発現を試みた。結果、バイオエチレン生産活性が 2.4 倍増大し、既存の生産株を超える生産能を獲得した。また、同様に、タンパク質高生産タグを付加した ACO をもつ SOC4-タグ株を構築し、これを保持するシアノバクテリアのバイオエチレン生産効率を GC で定量したので、これらの詳細を報告する。

Synechococcus elongatus, ethylene, dockerin

発表責任者：神藤定生（sjindou@meijo-u.ac.jp）

講演番号：4A11a13
講演日時：3 月 28 日 12:02～ センター2 号館 A11 会場

ピキア酵母株産生ヒト治療用抗体（ヒュミラ）の糖鎖の改変

Sugar chains on adalimumab produced by genetically engineered Pichia pastoris strains

○渋井 達郎、福井 麻由、原 宏佳（日本獣医生命科学大学）
○ TATSURO SHIBUI, Mayu Fukui, Hiroyosi Hara (Nippon Veterinary and Life Science University)

ピキア酵母は増殖力およびタンパク質生産能力が優れているため、組換え宿主として様々なタンパク質の生産に利用されている。当研究室では、目的遺伝子のコピー数をベクター上で増やす方法や *Cre*-変異 *lox*P システムを利用し様々なピキア酵母株に使用可能な再利用可能汎用ベクター系を開発し報告している[1) 2)]。

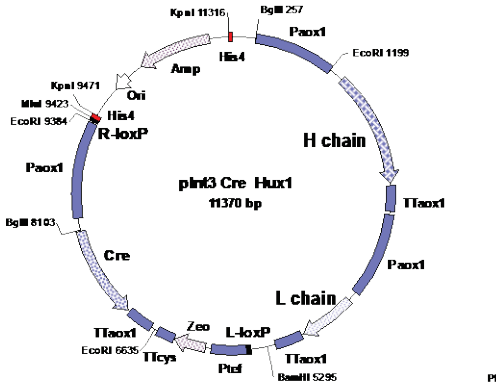
本ベクター系を用い、糖鎖遺伝子改変、プロテーアーゼ遺伝子欠損、分泌関連遺伝子改変等の工学的改変を施した株（G-Man 株：*△och1, △pep4, △yscb, △vps21, his, +gap pro. ManI*, ：GS115 由来）を構築し、更に、抗体医薬品として使用されている adalimumab（抗ＴＮＦαヒト型抗体：Humira）発現用遺伝子を人工合成し、本ベクター系に導入して多重質転換可能な同抗体遺伝子発現ベクター（pInt3CreHu、下図）を構築した。

G-Man 株に pInt3CreHu を複数回導入し、抗体生産株を分離・取得し、機能を持った抗体の生産性および生産抗体の性状等について解析し昨年度報告した。昨年度の生産株では、*ManI* 発現遺伝子を組み込んであるにもかかわらず抗体に付加した糖鎖はマンノースが 8 個ついていた（Man_8 型）。

今年度は、更に再利用可能ベクター中の *ManI* 遺伝子の発現用プロモーター及び発現遺伝子の様式の検討を行ったので結果を報告する。

1) T Shibui *et,al.*“Construction and effects of tandem-repeat expression genes for *Pichia pastoris,* and their incorporation efficiencies and stabilities by electroporation.” CIBTech Journal of Biotechnology, 3, .25-35 (2014)

2) T Shibui *et,al.*“A New Efficient Vector for Repeated Use in *Pichia pastoris*.” International Journal of Research Studies in Biosciences, 3(9), 72-79 (2015)



P. pastoris, recombinant antibody, sugar chain

発表責任者：渋井達郎（tshibui@nvlu.ac.jp）

講演番号：4A11a14
講演日時：3 月 28 日 12:13～ センター2 号館 A11 会場

麹菌 *A. oryzae* のハイドロフォービン HypD の超親水性 C 末端領域がタンパク質安定性に及ぼす影響
Effect of the super hydrophilic C-terminal domain of Hydrophobin HypD from *A. oryzae* on protein stability

○田近 麻友子[1]、天貝 拓海[1]、石倉 幹大[1]、中野 宏軌[1]、井上 美紅[2]、齋藤 堂也[2]、竹内 南優紀[2]、中島 春紫[1,2] ([1]明治大院農化、[2]明治大農化)
○Mayuko TAJIKA[1], Takumi AMAGAI[1], Kandai ISHIKURA[1], Hiroki NAKANO[1], Miku INOUE[2], Takaya SAITO[2], Miyuki TAKEUCHI[2], Harushi NAKAJIMA[1,2] ([1]Grad. Sch. Agric. Chem., Meiji Univ., [2]Dept. of Agric. Chem., Meiji Univ.)

ハイドロフォービンは糸状菌や担子菌が生産する低分子量の分泌タンパク質であり、自己集合して細胞表層を覆うことにより菌体に撥水性などの機能を付与する。ハイドロフォービンは界面活性、凝集性、吸着性などのユニークな特徴からさまざまな応用利用法が検討されている。

筆者らはこれまでに麹菌 *Aspergillus oryzae* から 9 種類のハイドロフォービン遺伝子 *hypA-hypI* を単離している。これらのアミノ酸配列(83-207 アミノ酸)の相同性は低く、8 つの特徴的な Cys 残基の配列パターンを除き、共通の保存領域は確認されていない。この中で *hypD* 遺伝子は分生子形成期と高浸透圧ストレス条件下に転写が誘導されること、および HypD タンパク質は分生子頭のフィアライドで発現して分生子表面に局在することを観察している。一般にハイドロフォービンは疎水性が強く、8 番目の Cys 残基以降は 2-15 アミノ酸で終結するが、HypD には多数の荷電性アミノ酸を含む 93 アミノ酸の長い C 末端領域が存在する。筆者らはこの親水性の領域を Dtail ドメインと呼称し、HypD に特有の機能に関与していると考えている。

Dtail ドメインの機能解析のため設計した Dtail ドメイン欠失体 $HypD_{121}$ は全く生産されなかった。そこで $HypD_{121}$ に荷電性ペプチド His8-tag (HHHHHHHH)または FLAG-tag (DYKDDDDK)を融合したところ、Western blotting により両方の改変 HypD の生産が確認された。以上より、HypD の安定化には C 末端に何らかの荷電性領域が必要なことが示唆された。

改変 HypD の生産量を増やし物性解析を行うため、改変 HypD 生産用麹菌株の好適な培養条件を検討した。野生型 HypD の成熟体に His8-tag を融合した HypDt-His8 および $HypD_{121}$-His8 の生産性について検討を行ったところ、クエン酸ナトリウム緩衝液(pH 4.0)を添加して培養することにより培養上清中の夾雑タンパク質が大幅に減少することを観察した。

hydrophobin, *Aspergillus oryzae*

発表責任者：中島春紫（harushi@meiji.ac.jp）

講演番号：4A11a15
講演日時：3 月 28 日 12:24～ センター2 号館 A11 会場

タンパク質データベースを利用した in *silico* 解析による新規アコニット酸イソメラーゼの探索と活性の検出

Search of novel aconitate isomerases by in *silico* analysis of the protein database and detection of the activities

○小田 祐之亮、滝口 有沙、吉岡 育哲、桐村 光太郎（早大・先進理工・応化）
○Yunosuke ODA, Arisa TAKIGUCHI, Isato YOSHIOKA, Kohtaro KIRIMURA (Dept. Appl. Chem., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

【目的】

アコニット酸イソメラーゼ (EC 5.3.3.7 ; 以下 AI) は、植物や *Pseudomonas* 属細菌等の微生物に存在し、*cis*-アコニット酸と *trans*-アコニット酸の可逆的な異性化反応を触媒する酵素である。しかし、自然界における AI の分布や役割については不明な点が多い。演者らの研究室では、*trans*-アコニット酸を資化し AI 活性を示す *Pseudomonas* sp. WU-0701 を土壌より単離し、AI を精製し酵素的諸性質を明らかにした [1]。また、AI 遺伝子を世界で初めて同定し [1]、AI 遺伝子を高発現させた大腸菌細胞を生体触媒として利用しクエン酸から *trans*-アコニット酸を生産することに成功している [2]。本研究では、in *silico* 解析を利用して細菌由来の複数の機能未知であったタンパクが AI である可能性を見出し、組換え酵素の作製により AI 活性を検出した。

【方法および結果】

Pseudomonas sp. WU-0701 の AI (PwAI) のアミノ酸配列をもとにデータベースに登録されているタンパクとの相同性を検索した。PwAI は、酵素をコードする他の機能既知のタンパクとは 20%未満の相同性しか示さなかった。しかし、ABC 輸送体基質結合タンパクとアノテーションされている一部のタンパク (機能未知) と高い相同性が認められ、とくに *P. oryzihabitans* NBRC 102199 由来のタンパク (WP_027599585.1, PoAI) とは 90% の相同性が見出された [1]。PoAI の遺伝子を大腸菌を宿主としてクローニングし性質を調べたところ、AI 活性を示すことを見出した。また、74% の相同性を示す *Xanthomonas albilineans* GPE PC73 由来のタンパク (WP_045760314.1, XaAI) をコードする遺伝子を合成し、大腸菌を宿主として発現させ性質を調べたところ、AI 活性を示すことを確認した。すなわち、in *silico* 解析を基盤としたアミノ酸配列の相同性をもとに、*Pseudomonas* 属細菌や *Xanthomonas* 属細菌において ABC 輸送体基質結合タンパクとアノテーションされているタンパクから AI を発見した。以上より、タンパク質データベースを利用した in *silico* 解析によって新規な AI を見出すことに成功した。

[1] K. Yuhara, et al., FEBS J., **282**, 4257-4267 (2015). (Editor’s choice.)
[2] K. Koboyashi, et al., Chem. Select, **6**, 1467-1471 (2016).

aconitate isomerase, *trans*-aconitic acid, *Pseudomonas*

発表責任者：桐村光太郎（kkohtaro@waseda.jp）

講演番号：4A12a01
講演日時：3 月 28 日 09:30～ センター2 号館 A12 会場

ビフィズス菌が生産するスクロースアナログ二糖の分解に関わる酵素の研究
Investigation of enzyme involved in the hydrolysis of sucrose analog disaccharides in bifidobacteria.
○保坂 浩貴[1]、系浴 勇真[2]、平野 貴子[1,2]、袴田 航[1,2]、西尾 俊幸[1,2] ([1]日大院・生資科、[2]日大・生資科・生命化)
○Hiroki HOSAKA[1], Yuma ITOYOKU[2], Takako HIRANO[1,2], Wataru HAKAMATA[1,2], Toshiyuki NISHIO[1,2] ([1]Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon Univ., [2]Chem. and Life Sci., College of Bioresource Sciences. Nihon Univ.)

【目的】現在までに様々な機能性オリゴ糖が開発されてきた。それらオリゴ糖の殆どは、グルコース、ガラクトース、フルクトースの 3 種の単糖の組合せから構成されている。我々はこれら単糖以外の糖を構成糖として有する機能性オリゴ糖の開発を目的として研究を行なっている。当研究室では、甘味料として利用されている食用オリゴ糖の一つであるスクロース(Suc)のグルコース残基を様々な単糖へと置換したスクロース類似構造を有するオリゴ糖の合成と、それらのプレバイオティクス機能の評価を行っている。我々はこれまでに、スクロースのグルコース残基がグルコサミン、*N*-アセチルグルコサミン、グルクロン酸、およびグルクロン酸アミドに置き換わったスクロサミン(SucN)、*N*-アセチルスクロサミン(SucNAc)、スクロン酸(SucA)、およびスクロン酸アミド(SucAm)の合成に成功している。現在、それら Suc アナログ二糖のプレバイオティクス機能の評価を行なっており、Suc アナログ二糖によるビフィズス菌の増殖と分解酵素との関係について調査している。本発表では、これまでに得られた結果について報告する。
【方法・結果】ヒト腸内由来の *Bifidobacterium* 属細菌を用いて Suc アナログ二糖に対する資化性試験を行ったところ、*Bifidobacterium longum* subp. *longum* などほとんどの細菌の、各オリゴ糖に対する資化性はスクロースと比較して低かった。しかし、*Bifidobacterium pseudocatenulatum* は SucNAc で特異的に増殖していることが確認できた。また、*Bifidobacterium longum* subp. *infantis* では、合成した全てのスクロースアナログ二糖を良く資化できることが確認できた。上記のオリゴ糖の資化性は種によって異なることが示唆された。このように、各 Suc アナログ二糖を資化している菌に関しては、それら二糖を構成単糖まで分解して利用していることが考えられる。そこで、上記二糖で増殖した *B. infantis* と、増殖しなかった *B. longum* さらに、SucNAc で特異的に増殖した *B. pseudocatenulatum* に注目し、Suc アナログ二糖の資化性をこれらの分解に関わる細胞保持型の酵素の側面から調査した。各オリゴ糖で培養後、菌体増殖期の終盤で菌体を回収し、乾燥菌体を作製した。この乾燥菌体を各オリゴ糖に作用させたところ、Suc で培養した *B. longum* と *B. pseudocatenulatum* では Suc のみで分解が確認できたが、Suc アナログ二糖では分解は確認できなかった。しかし、*B. infantis* では全てのオリゴ糖で分解が確認できた。このことから、*B. longum* や *B. pseudocatenulatum* と *B. infantis* では Suc アナログ二糖の分解に関わる酵素の生産能力が異なることが示唆された。今後は、Suc アナログ二糖の資化に関与する遺伝子や、その酵素についてさらに詳細を調べる予定である。

Bifidobacteria, Sucrose analog disaccharides, Glycosidase

発表責任者：西尾俊幸（nishio.toshiyuki@nihon-u.ac.jp）

講演番号：4A12a02
講演日時：3 月 28 日 09:41～ センター2 号館 A12 会場

N-アセチルスクロサミンおよびスクロース存在下で *Bifidobacterium pseudocatenulatum* が生産する糖質加水分解酵素の諸性質について

Properties of glycoside hydrolase produced by *Bifidobacterium pseudocatenulatum* in the presence of *N*-acetylscrosamine and sucrose

○藤田 宙、平野 貴子、袴田 航、西尾 俊幸（日大院生資科）
○ Sora Fujita, Takako Hirano, Wataru Hakamata, Toshiyuki Nishio (Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon Univ.)

【研究目的】

キチンオリゴ糖やヒトミルクオリゴ糖のように、*N*–アセチルグルコサミン（GlcNAc）を構成糖として含む種々のオリゴ糖には、ビフィズス菌増殖作用など様々な有用生理機能特性があることが報告されている。このことから、当研究室では新規な GlcNAc 含有ヘテロオリゴ糖の合成について検討している。これまでに、GlcNAc とスクロースの混合溶液に糖転移型 β-フルクトフラノシダーゼを作用させることによって、スクロースのグルコース残基が GlcNAc に置換された構造を有する *N*-アセチルスクロサミン（SucNAc）の効率的な酵素合成法の確立に成功している。また、本オリゴ糖の諸性質について調査を行った結果、難消化性オリゴ糖であること示唆され、特定のビフィズス菌に対して特異的に資化されることがわかっている。そこで、それらの菌の 1 つである *B. pseudocatenulatum* について SucNAc の分解に関わる酵素の探索・精製を行ったところ、その酵素はβ-フルクトフラノシダーゼであることが分かった。 本研究では, 本酵素の基質特異性を調べ, 他の微生物由来の同酵素の特異性と比較した結果について報告する。また、スクロース存在下で本菌によって生産される酵素についても言及する。

【方法・結果】

B. pseudocatenulatum を SucNAc 添加培地で嫌気条件下にて培養し、生産された SucNAc 分解酵素を種々のカラムクロマトグラフィーにより精製した。その後、本酵素を様々なオリゴ糖に作用させ、TLC 分析及び HPLC 分析により定性的・定量的にその基質特異性を評価した。その結果、① スクロン酸のようなカルボキシ基を持つものは分解できない、 ② ラフィノースのようなガラクトースが Suc のグルコース残基の 6 位にα-アノマーで結合したものは分解できない、 ③ 2 糖と 3, 4 糖の分解速度を比較すると、3, 4 糖に対する分解能が高いことが分かった。さらに、本酵素の基質特異性を他の同種の酵素と比較するため、*Saccharomyces cerevisiae*、*Microbacterium saccharophilum* K-1、および *Aspergillus niger* 由来 β-フルクトフラノシダーゼを用いて同様の実験を行い基質特異性を調べ、得られた結果を *B. pseudocatenulatum* の酵素に関する結果と比較したところ、それぞれ異なる特異性を有しており、本酵素のみが SucNAc を分解することが分かった。また、本酵素は、他の同種の酵素より 3,4 糖に対する高い分解活性を示した。今後は、他の細菌由来とビフィズス菌由来のβ-フルクトフラノシダーゼとの特異性の違いを明らかにしていきたい。

N-acetylesucrosamine, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* , Glycoside hydrolase

講演番号：4A12a03
講演日時：3 月 28 日 09:52～ センター2 号館 A12 会場

胆汁酸分解と抗生物質耐性に関わる両機能性酵素によるプロバイオティクス

Development of new probiotics by bifunctional enzyme involved in bile acid degradation and antibiotic resistance

○草田 裕之[1]、有田 正規[2]、遠野 雅徳[3]、玉木 秀幸[1] ([1]産総研生物プロセス、[2]国立遺伝研、[3]農研機構畜産研究部門)
○Hiroyuki KUSADA[1], Masanori ARITA[2], Masanori TOHNO[3], Hideyuki TAMAKI[1] ([1]AIST, [2]NIG, [3]NARO)

昨今の大規模な環境ゲノム解析技術の進展により、ヒト腸内微生物群集の組成や多様性は勿論のこと、特定の腸内微生物とヒトの健康や疾患との関連性が急速に解明されつつある。中でも、乳酸菌群はヒトの健康に有益な効果をもたらすプロバイオティクスとして古くから国内外で大きな関心を集めており、これら乳酸菌群がプロバイオティクス機能を保ったままヒト腸内で生存・定着・増殖する手段は、ヒト腸内環境の安定化に重要である。ヒト腸内は、抗生物質の投薬や、消化液の成分で強力な界面活性作用を持つ胆汁酸の影響により乳酸菌群にとって致死的な環境になりうる。本研究では、抗生物質分解活性を持つ新規な胆汁酸加水分解酵素（Bile salt hydrolase, BSH）をプロバイオティクス乳酸菌から分離し、精緻な機能解析を実施した。

Lactobacillus paragasseri は全ゲノム比較解析により *L. gasseri*（ガセリ菌）より再分類された種であり、プロバイオティクス機能を有するとされてきたガセリ菌株の多くは *L. paragasseri* に属することが提唱されている。*L. paragasseri* の基準株である JCM5343^T 株の胆汁酸耐性能を評価したところ、一次胆汁酸や二次胆汁酸を含む多様な胆汁酸に耐性を有することが明らかとなった。次に、本株から BSH 候補遺伝子（LapBSH）を見出し、大腸菌を宿主とした組換え酵素の発現系を構築したところ、LapBSH は多様な抱合型胆汁酸のアミド結合の切断を触媒する BSH 活性を有することが判明した。LapBSH の至適温度は 37℃、至適 pH は 6.0 であり、これらの値は JCM5343^T 株の生育条件（25-45℃, pH4.0-8.0）と一致していた。興味深いことに、LapBSH は β ラクタム系抗生物質分解酵素の Penicillin acylase とも有意な相同性があり、実際に β ラクタム系抗生物質をも Penicillin acylase 活性により分解する「両機能性酵素」であることが明らかとなった。一般的に乳酸菌群は抗生物質に感受性を示すが、JCM5343^T 株は一部の β ラクタム系抗生物質に対する最小生育阻止濃度が 10 μg/mL 以上と緩やかな耐性を示す。本プロバイオティクス乳酸菌株は、LapBSH が胆汁酸耐性と抗生物質耐性という 2 つの重要な微生物機能を担うことで、腸内生存能の向上に寄与している可能性が示唆された。

probiotics, bile salt hydrolase, antibiotic resistance

発表責任者：玉木秀幸（tamaki-hideyuki@aist.go.jp）

講演番号：4A12a04
講演日時：3 月 28 日 10:03～ センター2 号館 A12 会場

マルトトリオース生成アミラーゼを用いたアスコルビン酸配糖体とグリセロール配糖体の合成

Synthesis of ascorbate maltotrioside and glyceryl maltotrioside by maltotriose-forming amylase

○酒井 彩美、掃部 正浩、甲斐 建次、谷 修治、炭谷 順一、川口 剛司（阪府大院生環科）
○Ayami SAKAI, Masahiro KAMON, Kenji KAI, Shuji TANI, Jun-ichi SUMITANI, Takashi KAWAGUCHI (Osaka Prefecture Univ.)

【背景と目的】*Kitasatospora* sp. MK-1785 株が生産するマルトトリオース (G3) 生成アミラーゼは，澱粉を非還元末端から G3 単位で加水分解する活性に加えて，水酸基を有する各種化合物に対して G3 を転移する糖転移活性を有する。現在産業応用されている糖転移酵素は，単糖や不特定のオリゴ糖を転移させるものがほとんどであり，特定のオリゴ糖配糖体の合成を行う酵素はほとんどない。一方，本酵素の糖転移反応によって合成される配糖体は，これまでにない G3 配糖体となるため，化合物に新たな機能を付加できる可能性が考えられる。そこで，本酵素を用いて既存の配糖体よりも有用な G3 配糖体を合成し，構造を決定することを目的とした。ターゲットとしてアスコルビン酸とグリセロールを用いて G3 配糖体を合成することで，アスコルビン酸 G3 配糖体はプロビタミンとしての安定性が高まることが，グリセロール G3 配糖体は強力なアミラーゼ阻害活性を有することが期待される。

【方法と結果】野生型酵素と活性部位近傍のアミノ酸に部位特異的変異を導入した 35 種の変異酵素を用いて，アスコルビン酸またはグリセロール存在下で澱粉を G3 供与体として反応させ，TLC により G3 配糖体を確認した。その結果，アスコルビン酸を G3 受容体とした場合，様々な変異酵素で G3 配糖体の合成が確認された。その中でも特に，F279V/S283R 変異酵素は，野生型や L191R 変異酵素によって合成された G3 配糖体とは異なることが HPLC の保持時間の違いにより示された。F279V/S283R 変異酵素によって合成された G3 配糖体をグルコアミラーゼ処理によりアスコルビン酸グルコシドに変換し，プロビタミンとして有用なアスコルビン酸 2-グルコシドと比較したところ，標品の保持時間と一致したため，アスコルビン酸の 2 位に G3 が付加した配糖体であると判断した。そこで，F279V/S283R 変異酵素を用いてアスコルビン酸 G3 配糖体を合成し，活性炭カラムにより精製を行った。今後はこの G3 配糖体の構造を決定する予定である。また，グリセロールを G3 受容体とした場合も，多くの変異酵素で G3 配糖体が生産されることを TLC により確認した。その中で L191R 変異酵素が特にグリセロール配糖体の生産量が高いことがわかった。現在，反応条件の検討を行っており，今後グリセロール配糖体を精製し，得られた G3 配糖体の構造を決定する予定である。

α-amylase, transglycosylation, glycoside

講演番号：4A12a05
講演日時：3 月 28 日 10:14～ センター2 号館 A12 会場

放線菌 Streptomyces corchorusii 由来タンパク性アミラーゼ阻害剤 Paim の網羅的変異導入による阻害特異性の変換

Alteration of inhibitory specificity of the proteinaceous alpha-amylase inhibitor Paim from Streptomyces corchorusii by saturation mutagenesis

○岩崎 夏帆、谷 修治、炭谷 順一、川口 剛司（阪府大院生環科）
○Natsuho IWASAKI, Shuji TANI, Jun-ichi SUMITANI, Takashi KAWAGUCHI (Osaka Prefecture Univ.)

【背景と目的】ヒトアミラーゼは唾液型（HSA）と膵臓型（HPA）の 2 種類のアイソザイムが存在し，各器官でデンプン性基質に対する消化酵素として分泌される。これらのアミラーゼアイソザイムは血液中でも一定の割合で存在しているが，膵臓に何らかの疾患があると，HPA 量が増減しアイソザイムの割合が変化する。よって，アミラーゼアイソザイムの分別定量を行うことで、膵臓疾患の診断が可能となると考えられる。しかしながら，これらのアイソザイムはアミノ酸配列，立体構造ともに酷似しており，簡便に分別定量を行うことは非常に難しいとされている。

放線菌由来タンパク性アミラーゼ阻害剤は 70~80 アミノ酸程度から構成されるタンパク質で，各種阻害剤間で一次構造が非常に似通っているにもかかわらず，各種動物由来のアミラーゼに対し，さまざまな阻害スペクトルを示す。その中で *Streptomyces corchorusii* 由来タンパク性アミラーゼ阻害剤 Paim は同定された阻害剤の中でヒトアミラーゼアイソザイムのどちらも阻害しないという特徴をもつ唯一の阻害剤である。これまで Paim のランダム変異導入実験において，E55，L58，E60 部位のアミノ酸を置換することでアミラーゼアイソザイムの両方に対する阻害能を有する変異阻害剤が得られた。本研究では，網羅的な変異導入により，HSA と HPA の両方を標的として変異阻害剤の探索を行い，ヒトアミラーゼアイソザイムの片方のみを阻害する変異阻害剤を獲得することを目的とした。
【方法と結果】Paim のアミノ酸配列において，放線菌由来タンパク性アミラーゼ阻害剤間で保存されていないアミノ酸のうち，これまでに検討されたものを除く 42 箇所に対し，saturation mutagenesis を導入し，HSA と HPA のどちらかに阻害活性を示す変異阻害剤の単離を試みた。変異を導入した Paim 遺伝子を大腸菌に導入することで変異ライブラリを作製した。また，スクリーニングにおいて用いた HPA は *Pichia pastoris* を用いて発現させ，培養上清を脱塩濃縮することで調製した。1 か所のライブラリあたり 94~564 株スクリーニングを行い, HPA に対しては 13345 株中 107 株, HSA に対しては 6291 株中 81 株の陽性株を得た。そして，得られた陽性株が保持する Paim 遺伝子のシークエンス解析を行った結果，20 種類の変異阻害剤を獲得した。その中で HSA に対して阻害活性が高い変異阻害剤 H63G，G59A と，HPA に対して阻害活性が高い変異阻害剤 E13G，E13S，E13T について，*Brevibacillus choshinensis* を宿主として調製し，電気泳動的に均一になるまで精製を行った。現在，得られた変異阻害剤の阻害特異性に関する詳細な解析を行っているところである。

alpha-amylase, inhibitor, saturation mutagenesis

講演番号：4A12a06
講演日時：3 月 28 日 10:35～ センター2 号館 A12 会場

ウェルシュ菌による *Clostridium acetobutylicum* の各種セルラーゼの発現

Expression of cellulase-related genes from *Clostridium acetobutylicum* by *C. perfringens* expression system

○川畑 博暉[1]、澤入 駿哉[1]、成谷 宏文[2]、森山 龍一[1]、宮田 茂[1] ([1]中部大学大学院応生、[2]広島大学大学院生物圏科学)

○ Hiroki KAWAHATA[1], Shunya Sawairi[1], Hirofumi Nariya[2], Ryuichi Moriyama[1], Shigeru Miyata[1] ([1]Coll. Biosci. Biotech., Chubu Univ., [2]Grad. Sch. Biosphere Sci., Hiroshima Univ.)

【目的】セルロースは、地球上で最も多く存在する炭水化物である。グルコースがβ-1,4 結合した直鎖状の分子で、その分子間が水素結合し、化学的に安定で加水分解を受けにくい性質を有する。一部の *Clostridium* 属細菌は、各種セルラーゼ複合体である cellulosome を産生し、効率よくセルロースを分解し資化できるが、その遺伝子が極端に AT-rich であるため *Clostridium* 属以外の他の種で発現させることは困難である。一方で、*C. perfringens* はセルロースを資化できないが、現在知られている細菌のなかで最も速い増殖速度を示す菌の 1 種であり、物質生産菌としての高い潜在性を有している。当研究室では、*C. perfringens* にセルロース資化性を付与するために、今までに各種 clostridial cellulosome 構成酵素の *C. perfringens* での発現性を調べてきた。今回、セルロースを効率的に分解する designer cellulosome の構築のために、*C. acetobutylicum* の cellulosome 構成酵素やその他のセルラーゼを発現させ、*C. perfringens* で発現量が高く比活性の高い酵素の選別を試みた。

【方法・結果】*C. acetobutylicum* の cellulosome 構成酵素遺伝子群を、*C. perfringens* の発現ベクターである pCC13 の T7 プロモーター下流に挿入し、各種発現プラスミドを構築した。これらのプラスミドで、キシロースにより T7 RNA ポリメラーゼの発現が誘導される *C. perfringens* mT7VI 株を形質転換した。発現誘導後、培養上清中の発現産物を SDS-PAGE で解析するとともに、酵素活性を調べたところ、CA_C0915 及び CA_C0916 では高い endoglucanase 活性が検出された。一方、CA_C0912 では培養液中に発現産物が観察されなかった。genomic sequencing により open reading frame を解析した結果、CA_C0912 はシグナル配列中でフレームシフト変異を起こしていることが示唆された。そこで、人為的に frame shift を起こした結果、培養液中に発現産物が観察され、endoglucanase 活性が検出された。一方、非 cellulosome 系酵素では、CA_C1075 がβ-glucosidase 活性を示した。

現在、抗生物質の選択圧非存在下で安定的発現のために、*C. perfringens* 13 株の染色体へ各種遺伝子の挿入を試みている。

Clostridium perfringens, cellulase, *Clostridium acetobutylicum*

講演番号：4A12a07
講演日時：3 月 28 日 10:46～ センター2 号館 A12 会場

分泌生産のためのウェルシュ菌用新規発現ベクターの構築

Construction of novel expression vectors with signal sequence for secretory production by *Clostridium perfringens*

○荒川 利行、加藤 実希、矢野 智奈美、宮田 茂（中部大学大学院応生）
○Riyuki ARAKAWA, Miki KATO, Chinami YANO, Shigeru MIYATA (Coll. Biosci. Biotech., Chubu Univ.)

【目的】*Clostridium* 属細菌は多種の有用なタンパク質を生産するが、その遺伝子が極端に AT-rich であるため、大腸菌などの発現系を用いた場合、特に高分子量タンパク質の大量発現は困難である。これらの問題を解消するために、我々は *C. perfringens* を用いた発現系の開発を行ってきた。今までに、フェレドキシン・プロモーターを用いた構成的発現系や T7 プロモーターを用いた誘導的発現系の構築を行ってきた。今回、目的タンパク質の分泌生産のために、*C. perfringens* の発現プラスミドにシグナル配列コード領域をクローニングすることで、分泌発現用の発現プラスミドの構築を行った。

【方法及び結果】 当研究室で開発した *C. perfringens* 発現ベクターpCC13 の T7 プロモーター下流領域に、ε 毒素遺伝子（*etx*）及びシアリダーゼ遺伝子（*nanI*）のシグナル配列をコードする DNA 断片をクローニングし、pCC15 及び pCC16 を構築した。これらのプラスミドに、*C. acetobutylicum* のエンドグルカナーゼ遺伝子（*eglA*）、*C. perfringens* の菌体内シアリダーゼ遺伝子（*nanH*）及び *C. sporogenes* のリパーゼ遺伝子（*CLSPOx_04255*）をクローニングし、キシロース添加により T7 RNA ポリメラーゼが発現する *C. perfringens* mT7VI 株を形質転換した。これらの形質転換株を培養し、発現誘導後、培養上清中のタンパク質及び酵素活性を解析した結果、すべての酵素の分泌生産に成功したことが明らかとなった。

また、ε 毒素遺伝子のプロモーターからシグナル配列をコードする領域に 5 つの phased A-tracts が存在し、大きく bending していることが示唆された。プロモーター選択ベクターpR にこれらの領域をクローニングし、phased A-tarcts に変異を導入した場合の転写活性を調べた結果、プロモーター領域にオーバーラップする 2 つの phased A-tracts に変異を導入すると、高い転写活性を示すことが明らかになった。そこで、pCC13 の T7 プロモーターから開始コドンまでの領域を、ε 毒素遺伝子の変異プロモーターとその下流領域及びシグナル配列をコードする DNA 断片に置換し、構成的発現ベクターpCC14 を構築した。現在、発現量を調べるために、外来遺伝子のクローニングを行っている。

Clostridium perfringens, T7 expression, secretory expression

講演番号：4A12a08
講演日時：3 月 28 日 10:57～ センター2 号館 A12 会場

化学酵素的アミド結合形成法を用いたジペプチド類似体の合成

Dipeptide analog synthesis using chemoenzymatic amide bond formation

佐々木 楓、○鈴木 伸、木野 邦器（早大・先進理工・応化）
Shin SUZUKI, ○Shin SUZUKI, Kuniki KINO (Dept. Appl. Chem., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

【目的】ペプチドは生体内の反応を阻害あるいは活性化することにより生体機能を調節するなど様々な生理活性を示す。近年、その高い機能性からペプチド医薬が注目されているが、加水分解を受けやすく膜透過性が低いなど課題が多い。これらを克服するために、ペプチドアナログやペプチドミメティックが広く利用されている。すなわち、ペプチドを構成するアミノ酸を、類似構造を有する他の分子種に置換すれば上記課題の解決に貢献できると考えられる。我々は基質のカルボキシ基をアデニル化する酵素反応とアミンによる求核置換反応を組み合わせたアミド結合形成法を開発している [1)]。本手法は、(1)基質特異性の異なるアデニル化酵素を利用することで導入するカルボン酸を選択可能であり, (2) L-および D-アミノ酸のほか様々なアミンが求核剤として利用できることから、多様なペプチド類似体の合成に対応可能である。そこで本研究では、アミノ酸の構造類似体であるα-ケト酸を基質とするアデニル化酵素を探索・利用し、α-ケト酸とアミノ酸を構成要素とするジペプチド類似体の合成法開発を目的とした。

【方法・結果】α-ケト酸をアデニル化可能な酵素を探索し、2 種類の非リボソーム型ペプチド合成酵素のアデニル化ドメイン(A ドメイン)に着目した。*Streptomyces tsusimaensis* NBRC 13782 由来 valinomycin synthetase の A ドメイン(Vlm2A) [2)]と *Streptomyces* sp. LZ35 由来の echoside 合成に関与する EchA の A ドメイン(EchA-A) [3)]であり、それぞれピルビン酸とフェニルピルビン酸のカルボキシ基をアデニル化する。そこで、Vlm2A と LZ35 由来 EchA-A のホモログタンパク質である *S. hygroscopicus* NBRC 109436 由来 EchA-A (identity 91%)の 2 種類の A ドメインを用いて検討を行った。まず、各酵素の生理基質であるピルビン酸とフェニルピルビン酸に対し、L-Pro を求核剤として ATP, Mg^{2+}存在下で反応を行った。LC-MS 分析の結果、予想通り pyruvoyl-L-Pro および phenylpyruvoyl-L-Pro の分子量と一致するピークを検出し、目的とするジペプチド類似体の合成を確認できた。さらに Vlm2A の基質特異性を解析したところ、炭素鎖の長いα-ケト酪酸や、興味深いことにピルビン酸に対応するヒドロキシ酸である L-乳酸や D-乳酸、アミノ酸である L-Ala や D-Ala も基質とすることが判明した。この特性を利用することで、α-ヒドロキシ酸を構成要素とするジペプチド類似体の合成にも広く展開可能となる。EchA-A の基質特異性についても詳細を解析中であり、併せて報告する。

1) Hara, R., *et al*., *Sci. Rep*., **8**:2950 (2018)
2) Jaizig, J., *et al.*, *ACS Synth. Biol.*, **3**, 432-438 (2014)
3) Zhu, J., *et al.*, *Gene*, **546**, 352-358 (2014)

peptide analog, chemoenzymatic amide bond formation, ketoamide

発表責任者：木野　邦器（kkino@waseda.jp）

講演番号：4A12a09
講演日時：3 月 28 日 11:08～ センター2 号館 A12 会場

化学酵素的アミド結合形成システムを応用したキラリティー制御可能なジケトピペラジン合成法の開発

Chirality controlled-synthesis of diketopiperazine based on a chemoenzymatic amide bond formation system

○唐鎌 翔大、横田 光希、鈴木 伸、木野 邦器（早大・先進理工・応化）
○Shota KARAKAMA, Mitsuki YOKOTA, Shin SUZUKI, Kuniki KINO (Dept. Appl. Chem., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

【目的】ジケトピペラジン (DKP) は2分子のアミノ酸から構成される最小の環状ペプチドであり、抗菌性、抗腫瘍性、抗高血糖性など多様な生理活性が報告されている。またDKPを構成するアミノ酸のキラリティーの違いによっても異なる生理活性を示すため、キラリティーを制御したDKP合成法の開発は大きな意義がある。一方、DKP がジペプチドエステルからの自発的な分子内環化反応により生成することから、任意のジペプチドエステルの合成が達成できれば対応する DKP も合成可能となる。そこで、我々はこれまでに開発してきたアデニル化酵素を利用する化学酵素的なジペプチド合成法 [1]に着目した。アデニル化酵素により基質アミノ酸のカルボキシ基が活性化され、そこに他方の基質としてアミノ酸が作用すると、求核置換反応によりアミド結合を形成してジペプチドが生成する。L-アミノ酸のみならず D-アミノ酸をも認識するアデニル化酵素を我々は見出しており [2]、求核剤は酵素の基質特異性の影響を受けないため任意のアミノ酸エステルが利用可能であれば、キラリティーが制御された任意のアミノ酸から構成されるDKPの合成が可能であると考えた。
【方法・結果】アデニル化酵素として多様なL, D-アミノ酸を認識する *Brevibacillus parabrevis* IAM 1031 由来 tyrocidine synthetase A のアデニル化ドメインの TycA-A を使用した。基質にL-またはD-Trp、求核剤にL-またはD-Pro-OMeを用いて cyclo (Trp-Pro) の光学異性体4種類の合成試験を実施した。各反応溶液の HPLC 分析の結果、いずれの場合にもDKPと推測されるピークが検出された。LC/MS 分析を行ったところDKPと一致する分子量が検出され、4種類の異性体の合成可能性が示唆された。しかしDKP合成量がμMオーダーと微量であったため、アデニル化反応により生成するピロリン酸による阻害 [3]の可能性を推測し、大腸菌由来ピロホスファターゼ (PPase) を添加した。その結果、DKP の合成量は mM オーダーへと著しく向上した。以後、DKP の拡張を目的とした基質と求核剤の検討では、TycA-A と PPase を共役させて反応を行った。L-Trp および D-Trp を基質した時、上述の L-または D-Pro-OMe 以外に L-Ser-OMe, L-Phe-OMe, L-Trp-OMe が求核剤として作用し、一方、L-Pro-OMe および D-Pro-OMe を求核剤とした場合には、L-または D-Trp 以外に L-Phe, L-Tyr, L-Met および D-Phe, D-Tyr, D-Met を基質した時に、いずれも対応するDKPと思われるピークが確認された。以上、キラリティー制御が可能なアデニル化酵素を利用する汎用性のあるジペプチド合成系において、アミノ酸エステルを求核剤にすると目的のDKPの合成が可能であり、PPaseを添加すると収量が著しく向上することを明らかにした。

1) Hara, R., *et. al*., *Sci. Rep.*, **8**:2950 (2018)
2) Kano, S., *et. al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **85**, e00120-19 (2019)
3) Suzuki, S., *et. al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, **125**, 644-648 (2018)

diketopiperazine, chirality, chemoenzymatic amide bond formation

発表責任者：木野邦器（kkino@waseda.jp）

講演番号：4A12a10
講演日時：3 月 28 日 11:19～ センター2 号館 A12 会場

麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来ルチノシダーゼの糖転移反応および効率的生産
Transglycosylation and efficient production of rutinosidase from *Aspergillus oryzae*
○廣田 瑠花、川﨑 真由、塩野 義人、小関 卓也（山形大農）
○Ruka HIROTA, Mayu KAWASAKI, Yoshihito SHIONO, Takuya KOSEKI (Yamagata Univ.)

【背景】 ルチノシダーゼは、フラボノイドに 6-*O*-α-L-ラムノシル-β-D-グルコシド（ルチノース）がグリコシド結合したフラボノイド配糖体をアグリコンとルチノースに加水分解する。柑橘類の苦味や白濁化の原因であるフラボノイド配糖体を分解することで、飲料の苦味低減や清澄化、機能性を持つフラボノイドの回収などに産業利用が可能である。我々はこれまでに麹菌 *Aspergillus oryzae* RIB 40 由来で GH5 サブファミリー23 に分類されるルチノシダーゼをコードしている遺伝子を特定し、*Pichia pastoris* で分泌させたルチノシダーゼ（AoRut）を取得し、リコンビナント酵素の特徴づけを行った[1)]。今回は他の糸状菌由来ルチノシダーゼで報告されている糖転移反応に関してアルコール類へのルチノースの転移が可能であるか、AoRut の糖転移反応への検討を行った。また *P. pastoris* での酵素タンパク質の分泌において、酵母由来シグナルペプチド であるα-ファクターを用いて分泌させて精製した酵素は SDS-PAGE により 2 本のバンドが確認され、本来の成熟タンパク質の N 末端から 5 アミノ酸残基小さいタンパク質が混合していた。本研究では、単一 AoRut を取得するためαファクターに代わって AoRut 自身のシグナルペプチド を用いたタンパク質発現についても報告する。
【方法】 糖転移反応では糖供与体としてルチン、糖受容体としてメタノール、エタノールを用いた。反応はクロロホルム：メタノール：水＝65:35:8 の展開溶媒を用いて T L C でモニターした。また単一酵素タンパク質取得のため推定シグナル配列を含めた AoRutM を *P. pastoris*KM71H 株で発現させ、各種クロマトグラフィー にて精製を行った。
【結果・考察】 AoRut をルチン、アルコール類と反応させた際には、ルチンのルチノース部分が遊離したケルセチンが U V(254nm)で確認できた。加えて T L C にバニリン硫酸噴霧後ホットプレートで加熱後、U V では検出されないスポットが確認された。このことから AoRut はルチノースの遊離のみならず、アルコール類に対する糖転移能ももつことが示唆された。一方、AoRut 自身のシグナルペプチド を利用した *P. pastoris* の発現ではタンパク質の分泌が確認され、精製した AoRutM は SDS-PAGE においてα-ファクターを用いて分泌させたリコンビナント酵素と同様の大きさを示した。さらに精製後に Endo-H 処理により N 糖鎖除去を行うと、SDS-PAGE にて単一バンドが確認された。このことから AoRut のシグナルペプチド が *Pichia pastoris* でも機能することが示唆された。現在、AoRutM の性質を調べている。
1) Ishikawa et al. Appl.Microbiol.Biotechnol.,102,3193-3201(2018)

Aspergillus oryzae, rutinosidase, transglycosylation

講演番号：4A12a11
講演日時：3 月 28 日 11:40～ センター2 号館 A12 会場

成熟タンパク質へのアミノ酸付加が *Aspergillus oryzae* 由来タンナーゼ TanB の酵素学的性質に及ぼす影響

Effect of amino acid addition to mature protein on enzymatic characteristics of tannase TanB from *Aspergillus oryzae*

○高橋 千尋[1]、市川 響太郎[1]、塩野 義人[1]、新谷 智子[2]、渡部 昭[2]、神崎 浩[3]、五味 勝也[2]、小関 卓也[1] ([1]山形大農、[2]東北大院農、[3]岡山大院環境生命)
○Chihiro TAKAHASHI[1], Kyotaro ICHIKAWA[1], Yoshihito SHIONO[1], Tomoko SHINTANI[2], Akira WATANABE[2], Hiroshi KANZAKI[3], Katsuya GOMI[2], Takuya KOSEKI[1] ([1]Fac.Agric., Yamagata Univ., [2]Grad.Sch.Agric.Sci., Tohoku Univ., [3]Grad.Sch.Environ.Life Sci., Okayama Univ.)

【背景・目的】

タンナーゼはタンニンやカテキン類などの化合物に存在する没食子酸エステルの加水分解を触媒する酵素である。お茶、ビールやワインなどの酒類、果汁などの清澄化や没食子酸獲得のために利用されている。先行研究では、麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来タンナーゼ遺伝子 *AotanB*(AO090023000047)を *A. oryzae* で発現させたものを rAoTanBO、TanB のシグナル配列を酵母由来のαファクターシグナル配列に入れ換えて *Pichia pastoris* で発現させたものを rAoTanBP として、rAoTanBO と rAoTanBP の酵素学的諸性質が比較された。その結果、二つの間には熱安定性や比活性に大きな違いがみられた。また、N 末端アミノ酸配列解析から rAoTanBP にはベクター由来の 6 アミノ酸が残存していることが分かった。この熱安定性や比活性の差異は rAoTanBP の N 末端へのアミノ酸付加が関連していると推察された。そこで本研究では、TanB のシグナル配列を用いて *P. pastoris* で発現させて得られたタンナーゼを rAoTanBM とし、その酵素学的諸性質を rAoTanBO および rAoTanBP と比較した。

【方法】

P. pastoris SMD1168H 株を用いて rAoTanBM を発現させた。培養上清から陰イオン交換およびゲルろ過クロマトグラフィーにより酵素を精製し、精製酵素を用いて特徴づけを行った。

【結果】

N 末端アミノ酸配列解析により rAoTanBM はシグナル配列が rAoTanBO と同様に切除されていることが確認できた。rAoTanBM は最適 pH6.0、最適温度 60℃を示し、熱安定性は 60℃で 90%以上の残存活性がみられた。rAoTanBP は最適温度 40℃、90%以上の残存活性は 40℃まででであったことから最適温度と熱安定性に大きな違いがあることが分かった。タンナーゼ活性は rAoTanBM が rAoTanBP よりも顕著に高かった。先行研究で rAoTanBO は 60℃で 85%の残存活性がみられていたことから rAoTanBM は rAoTanBO の性質に近いことが分かった。発現系を変えることで *P. pastoris* を用いて高いタンナーゼ活性をもつ AoTanB を得ることができた。N 末端へのアミノ酸付加が最適温度や熱安定性に影響していると考えられる。

Aspergillus oryzae, tannase, enzymatic characteristics

講演番号：4A12a12
講演日時：3 月 28 日 11:51～ センター2 号館 A12 会場

高度好塩性古細菌が生産するキシラナーゼの分離とその諸性質解析

Isolation and characterization of xylanase produced by halophilic archaea

○人見 大地[1]、嶋根 康弘[2]、峯岸 宏明[1,2] ([1]東洋大学大学院、[2]海洋研究開発機構)
○Daichi Hitomi[1], Yasuhiro Shimane[2], Hiroaki Minegishi[1,2] ([1]Toyo Univ., [2]JAMSTEC)

【背景・目的】

ヘミセルロースはセルロースに次いで 2 番目に豊富な多糖類であり、年間約 1000 トン生産されている。ヘミセルロースのうち最も含有量が多いキシランとはキシロースを構成糖とし β-1.4 結合によって連なったヘテロ多糖である。キシラン分解酵素として (キシラナーゼ:EC3.2.1.8) と (キシロシダーゼ: EC3.2.1.27) がある。これらキシラン分解酵素はキシリトールの製造過程、医療分野や食品への農業廃物の高度なバイオマス利用分野において特に期待されている酵素の 1 つである。

一方、高度好塩性古細菌は至適増殖に 2.5 M 以上の NaCl を必要とする原核生物で、高度好塩性古細菌が生産する好塩性酵素は高 NaCl 濃度条件下において安定だけでなく、同様に水分活性の低い有機溶媒存在下や熱においても安定性が高いことが示唆されており、産業分野への利用が見込まれる。また好塩性古細菌からのキシラナーゼの報告例は少ない。そこで、本研究では好塩性古細菌が生産するキシラナーゼの探索と諸性質解析を目的とした。

【実験方法】

市販塩サンプル 810 種類を分離源とし、キシラン (Xylan from Beech Wood) を基質として加えた寒天培地を用いて、好塩性古細菌が生産するキシラナーゼの探索を行った。37℃で 2 週間培養し、ハローの有無を確認した。ハローの確認できた菌株を候補株として DNS 法による活性測定を行い生産する粗酵素における至適条件の検討を行った。得られた候補株の 16S rRNA 遺伝子塩基配列における系統解析を行い既知種との相同性を確認した。

【結果・考察】

基質としてキシランを加えた寒天培地を使用し、810 種類の塩サンプルを分離源としてスクリーニングを行った。合計 9 株の候補株を分離することができた。DNS による活性測定の結果 X130、X134 において高い活性を示した。X130 株 NaCl 濃度 27%、温度 70℃、pH 9.5 で最大活性を示した。X134 株は NaCl 濃度 27%、温度 65℃、pH 7.0 で最大活性を示した。また 16S rRNA 遺伝子塩基配列における系統解析の結果、X130 株は *Halomicrobium* 属と X134 株は *Halosimplex* 属と最も相同性が高かった。これら 2 属においてキシラナーゼ活性の報告例はない。これら 2 株において熱安定性を評価し、どちらも高い熱安定性を示した。

xylanase, Halophilic enzymes, Halophilic archaea

発表責任者：人見 大地（seimeiken.hitomi@gmail.com）

講演番号：4A12a13
講演日時：3 月 28 日 12:02～ センター2 号館 A12 会場

分裂酵母胞子表層タンパク質の特性を使った異種タンパク質発現生産系構築への試み

Construction of recombinant protein expression and spore surface display systems in fission yeast

○今田 一姫[1,2]、山口 成美[1] ([1]鈴鹿高専、[2]大阪市大院理)
○Kazuki IMADA[1,2], Narumi YAMAGUCHI[1] ([1]NIT, Suzuka College, [2]Osaka City Univ.)

分裂酵母の胞子は直径約 3 μm の休眠細胞で、胞子の表面は Isp3 タンパク質からなる強固な層で覆われている *isp3*+遺伝子の胞子形成時における RNA レベルは栄養増殖時の 500～1,500 倍にも達し、Isp3 タンパク質は将来の胞子の細胞質となる部分に蓄積する。胞子の細胞膜が完成すると、Isp3 はただちに胞子細胞の外側（子嚢）に放出されて胞子表層に定着し、胞子壁においてほとんど精製済みのような状態で存在するという変わった挙動を示す。我々は、このような Isp3 の特性を利用すれば、異種タンパク質の新しい発現・分泌生産システムおよび胞子細胞表面提示システムが構築できるのではないかと考えた。この系では、分裂酵母を培養するだけで、異種タンパク質が提示された直径約 3 μm の担体としての胞子が得られると考えられる。

Isp3 と緑色蛍光タンパク質（GFP）の融合タンパク質 Isp3-GFP は、胞子細胞膜が閉じた後、胞子細胞外に放出され、胞子壁形成の終盤に胞子表層に結合する。一方、GFP のみでは胞子細胞外に放出されない。そこで、この異種タンパク質発現生産系の構築に向けた第一歩として、Isp3 の一部を GFP と融合させたタンパク質を胞子形成時に発現させることで、胞子細胞外への放出または胞子表層への定着に十分な Isp3 の領域・アミノ酸配列を特定しようとしている。

yeast, protein expression, cell surface display

発表責任者：今田一姫（imada@chem.suzuka-ct.ac.jp）

講演番号：4A12a14
講演日時：3 月 28 日 12:13～ センター2 号館 A12 会場

枯草菌宿主でのグルコースまたはラムノース制御可能なハイブリッド型タンパク質発現系の開発

Hybrid-type protein expression systems controllable by glucose and rhamnose in *Bacillus subtilis*

小松 弘昌、壽原 直杜、○広岡 和丈（福山大生命工・生物工）
Hiroyoshi KOMATSU, Naoto HISAHARA, ○Kazutake HIROOKA (Fukuyama Univ.)

【目的】タンパク質の異種発現系の微生物宿主としては大腸菌が一般的であるが、哺乳類に毒性を示すリポ多糖類を含むため医薬品・食品製造に関わるタンパク質を生産する場合にはこれらの有害物質を除去する必要が生じる。枯草菌は納豆などの発酵食品製造に用いられ安全性が認められているので、これを宿主として植物由来低毒性物質を誘導物質とするタンパク質高発現系の開発を試みている。その一環としてラムノースとグルコースで制御可能な枯草菌宿主タンパク質高発現系を構築し、評価を行なった。

【方法・結果】枯草菌のラムノース異化オペロンの制御領域（P*rhaEW*）と、発現量のさらに高めるために、恒常的に発現する *cdd* 遺伝子の制御領域（P*cdd*）と、定常期に高発現する *ylbP* 遺伝子の制御領域（P*ylbP*）を組み合わせて連結し、種々のハイブリッド型発現誘導系を構築した。各構築を改変型 GFP 遺伝子（*egfp*）と融合させて染色体中に導入した枯草菌株を作製し、それらをグルコースまたはラムノースを炭素源とした培地で培養し、蛍光強度を定量した。その結果、SD 配列を除いた P*rhaEW* と *ylbP* 遺伝子の SD 配列の連結（P*rhaEWylbP*）を保持した菌株において最も厳密に発現制御が可能であることがわかり、SD 配列を除いた P*cdd* と *ylbP* 遺伝子の SD 配列の連結（P*cddylbP*）を保持した菌株をグルコース存在下で培養した場合に EGFP 発現量が最大となった[1]。グルコース存在下での発現量のさらなる向上を目指し、P*cddylbP* をベースに CcpA を介してカタボライト活性化する *ackA* と *pta* の各遺伝子の制御領域を組み込んだ各構築を作製して同様に評価を行ったところ、*ackA* または *pta* の制御領域を *cdd* コアプロモーターの上流に配置した構築では P*cddylbP* よりも若干の発現量の増加がみられたが、それらを下流に配置した構築では逆に発現量が低下する結果となった。この理由として、グルコース存在下で CcpA 複合体が制御領域に結合することで上流に位置する *cdd* プロモーターからの転写が阻害されたことが考えられた。また、コアプロモーターの上流域（UP）も転写活性に大きく影響を及ぼすという報告があることから[2]、P*rhaEWylbP* の UP 領域をリボソーム DNA のものに置換した構築を作製して評価を行った結果、ラムノース存在下で P*rhaEWylbP* よりも発現量が有意に上昇することがわかった。

1) Hirooka K, Tamano A. Biosci Biotechnol Biochem. 2018;82:1942-1954.
2) Zhou C, Ye B, Cheng S, et al. Microb Cell Fact. 2019;18:111.

Bacillus subtilis, protein expression, rhamnose

発表責任者：広岡和丈（hirooka@fukuyama-u.ac.jp）

講演番号：4A12a15
講演日時：3 月 28 日 12:24～ センター2 号館 A12 会場

Bacillus circulans KA-304 由来α-1,3-グルカナーゼの機能解析と構造解析
Functional and structural analysis of α-1,3-glucanase from *Bacillus circulans* KA-304
○大塚 唯[1]、矢野 成和[2]、伊藤 貴文[3]、日び 隆雄[3]、田中 良和[4]、若山 守[5]、真壁 幸樹[2]([1]山形大工、[2]山形大院理工、[3]福井県大生資、[4]東北大院生命、[5]立命館大生命)
○Yuitsu OTSUKA[1], Shigekazu YANO[2], Takafumi ITOH[3], Takao HIBI[3], Yoshikazu TANAKA[4], Mamoru WAKAYAMA[5], Koki MAKABE[2] ([1]Yamagata Univ., [2]Yamagata Univ. Grad. Sch. of Sci. and Eng., [3]Fukui Prefectural Univ., [4]Tohoku Univ., [5]Ritsumeikan Univ.)

【目的】α-1,3-グルカンは、真菌類の細胞壁構成多糖として、あるいは口腔内に棲息する *Streptococcus* 属細菌が生産する菌体粘質多糖として、自然界に存在している。α-1,3-グルカンを加水分解する α-1,3-グルカナーゼは、真菌が生成するグリコシドヒドロラーゼファミリー71 型（GH71 型）と、細菌が生成する GH87 型の 2 種類に分けられる（1)。GH71 型酵素に関しては様々な機能が解析され、加水分解反応における反応機構も研究された。一方で、GH87 型酵素についてはそれらの検討が十分でなかった。我々は、GH87 型酵素について研究を行っており、これまでに、*Bacillus circulans* KA-304 の α-1,3-グルカナーゼ（Agl-KA）のドメイン構造について報告した。本酵素は、*N*-末端から、Discoidin ドメイン I（DS1)、Carbohydrate binding Module 35 型ドメイン（CB35)、Discoidin ドメイン II（DS2)、機能未知ドメイン（UCD)、触媒ドメインで構成されていた。前報で、DS1、CB35、DS2 ドメインの各々が α-1,3-グルカン結合活性を持つこと、それらが協働することで細胞壁への結合力が高まることも報告した（2)。

本報では、加水分解反応における反応機構を明らかにするために、Agl-KA の触媒ドメインのみで構成される欠失変異酵素 AglΔDCD-UCD を用いて、加水分解に必須なアミノ酸残基を調べた。また、AglΔDCD-UCD の構造解析を行うために結晶化を試みた。

【方法と結果】AglΔDCD-UCD は、pET ベクター系を用いて *Escherichia coli* Rosseta-gami B (DE3)で発現させた。α-1,3-グルカナーゼの活性測定は、酵素合成した α-1,3-グルカンを用いて行った。

各種クロマトグラフィーを用いて精製した AglΔDCD-UCD に、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド（EDC）を作用させた。添加量と反応時間を変化させて実験したところ、EDC 添加量と反応時間が増加するにつれて AglΔDCD-UCD の活性は低下した。本結果からアミノ酸側鎖のカルボキシ基が加水分解反応に関与すると考え、AglΔDCD-UCD に含まれるアスパラギン酸とグルタミン酸残基をアラニンに置換した変異酵素を作製して加水分解活性を比較した。その結果、D1067、D1090 と D1091 を置換することで、活性が著しく低下することがわかった。次に、AglΔDCD-UCD の結晶を調製し、x 線結晶構造解析を行った。AglΔDCD-UCD の結晶構造は、到達分解能 1.82 Å で決定した。得られた立体構造を解析した結果、基質結合クレフトと予測される部位に、D1067、D1090 と D1091 が位置していた。

(1) *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 32(2):30, 2016.　(2) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 77(3), 639-647, 2013.

α-1,3-glucanase, glycoside hydrolase family 87, nigero-oligosaccharide

発表責任者：矢野 成和（shige-y@yz.yamagata-u.ac.jp）

講演番号：4A16a01
講演日時：3 月 28 日 09:30～ センター2 号館 A16 会場

C-配糖体分解微生物の単離と産物の同定
Isolation of *C*-glycoside flavonoid metabolizing microorganisms
○渡辺 聖実[1]、草刈 雅和[1]、寺下 柚子[1]、熊野 匠人[1,2]、橋本 義輝[1,2]、小林 達彦[1,2]（[1]筑波大院・生命環境、[2]筑波大・MiCS）
○ Satomi WATANABE[1], Masakazu KUSAKARI[1], Yuzu TERASHITA[1], Takuto KUMANO[1,2], Yoshiteru HASHIMOTO[1,2], Michihiko KOBAYASHI[1,2] ([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]MiCS, Univ. Tsukuba)

【目的】
プエラリンは *C*-グリコシドの一種であり葛餅や葛湯、生薬として知られる葛根の原料となっているクズ属植物の主に根に含まれる化合物である。また、ガンや糖尿病などへの効能が期待されているなど有用な生理活性を持っている。プエラリンはダイゼインの 8 位の炭素に糖の 1 位の炭素が直接結合した *C*-グリコシドと呼ばれる特徴的な構造をとる。*O*-グリコシドが酸やアルカリ、酵素により、糖と非糖部位に分解されやすいのに対し、*C*-グリコシドは安定性が高く分解されにくいという特徴を持つ。一方で、*C*-グリコシドの分解に関する研究はあまりない。そこで本研究では、*C*-グルコシドの一種であるプエラリンを基質として、これを資化する微生物を天然から探索し、その代謝経路を酵素レベルで解明することを目的とした。

【方法・結果】
各地より採取した土壌を用いて、プエラリンを単一炭素源とする液体培地で集積培養を行い、プエラリン代謝能を持つ微生物の単離に成功した。次に、単離した菌株毎に HPLC を用いて代謝活性の比較を行い、プエラリン分解活性を示した複数菌株を 16S rRNA 配列により同定した。その内、最も高いプエラリン分解活性を示した菌を単独培養し、無細胞抽出液を調製してプエラリンと反応させた。その結果、産物と考えられるピークが高速液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS)で検出された。本発表では、プエラリン分解微生物の単離と、反応産物の同定について述べる。

enzyme, microorganism, glycoside

講演番号：4A16a02
講演日時：3 月 28 日 09:41～ センター2 号館 A16 会場

C-配糖体代謝酵素の探索と解析
Screening and characterization of C-glycoside-degrading enzymes
○堀 早苗[1]、寺下 柚子[1]、熊野 匠人[1,2]、橋本 義輝[1,2]、小林 達彦[1,2] ([1]筑波大院・生命環境、[2]筑波大・MiCS)
○Sanae HORI[1], Yuzu TERASHITA[1], Takuto KUMANO[1,2], Yoshiteru HASHIMOTO[1,2], Michihiko KOBAYASHI[1,2] ([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]MiCS, Univ. Tsukuba)

【目的】
植物は様々な化合物を生産し、その中には配糖化されているものも数多く存在する。それらの多くは糖がアグリコンの酸素原子に結合した配糖体で、O-配糖体と呼ばれる。他にも窒素原子に結合したN-配糖体、硫黄原子に結合したS-配糖体、そして、アグリコンの骨格の炭素原子に直接C-C結合したC-配糖体が存在する。O-配糖体は加水分解酵素で分解されることが知られているが、C-配糖体は結合の特異性から、糖を切り離すdeglycosylation反応を触媒する酵素は同定されていない。我々はこれまでに、生育にともなって培地中のカルミン酸（コチニールカイガラムシが生産するC-配糖体、着色料に使用）の赤色の消失が観察される微生物を１株単離し、16SrRNA 遺伝子解析により放線菌の１種であると同定した。また、本菌株の無細胞抽出液反応により、カルミン酸は2段階の反応を経て分解され、C-配糖体 deglycosylationは2段階目の酵素反応の結果生じることが明らかとなった。そこで本研究では、本菌株が有するC-配糖体 deglycosylation反応を触媒する酵素の同定および機能解析を目的とした。

【方法・結果】
以前、本菌株より精製および同定したカルミン酸分解初発酵素の周辺遺伝子情報より、カルミン酸のdeglycosylation反応を触媒する酵素を同定した。各種カラムクロマトグラフィーによって本酵素の精製を試みた結果、SDS-PAGE上で目的酵素のバンドを特定することができた。さらに、精製酵素を初発酵素およびカルミン酸とともにインキュベート後、等量のメタノールで反応停止し、高速液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS)に供して deglycosylation 活性の検出を試みた。その結果、カルミン酸のアグリコンが検出され、deglycosylation活性を確認することができた。

microbiology, deglycosylation, cochineal dye

講演番号：4A16a03
講演日時：3 月 28 日 09:52～ センター2 号館 A16 会場

脳神経疾患予防ならびに脳機能改善に資するチロシン含有ジペプチドの生産

Production of tyrosine-containing dipeptides that contribute to the prevention of cranial nerve diseases and improvement of brain function

○佐怒賀 悠、木野 邦器（早大・先進理工・応化）
○Yu SANUKA, Kuniki KINO (Dept. Appl. Chem., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

【目的】カテコールアミンはチロシンを出発物質として生合成される神経伝達物質として脳機能に関与するが、血液脳関門を通過しないため静脈内投与で中枢に作用することはない。一方、チロシン含有ジペプチドの服用による脳内カテコールアミン代謝の活性化が報告[1)]されているため、当該ジペプチドは脳機能の維持・向上に寄与することが期待される。我々はこれまでに無保護のアミノ酸を連結してジペプチドを合成する L-アミノ酸リガーゼ (Lal) の工業的利用法を検討している。そこでカテコールアミン代謝を活性化するジペプチドとして報告のある Ser-Tyr[1)]を対象に、Lal による合成を検討した。なお、工業的なジペプチド生産において、本反応には等モルの ATP が必要なことと、それを回避するために ATP 再生を可能とする微生物の糖代謝系を組み合わせると、当該微生物によるジペプチドの分解や基質アミノ酸の分解を抑制することが新たな課題となる。本研究では、この 2 つの大きな課題を解決すべく、これまでの我々の研究で明らかになった知見を適用して、簡便な菌体反応系によるチロシン含有ジペプチドの効率的生産プロセスの開発を目指して検討を行った。
【方法・結果】Lal の一種である YwfE は Xaa-Tyr の合成活性を有するため、Ser-Tyr 合成への利用を考えた。精製酵素反応系で Ser-Tyr の合成を確認するとともに、YwfE のタンパク質構造と機能との関係から創製した改変型酵素を利用することで、80 %を超えるモル変換率での Ser-Tyr 合成に成功した。ATP の自己供給が可能な菌体反応系での合成も試みたが、Ser-Tyr が蓄積することはなかった。一方、我々は大腸菌を宿主とする組換え菌を用いた菌体反応系でカルノシン (β-Ala-His) がほとんど分解を受けずに高収率で生産可能であることを報告している[2)]。そこで大腸菌による分解を受けにくいと予想されるβ-Ala-Tyr を対象ジペプチドとして検討を行った。予想通り、大腸菌では Ala-Tyr が分解されるのに対し、β-Ala-Tyr が分解を受けにくいことが判明した。そこで、YwfE 高発現大腸菌による ATP 非添加系での菌体反応を検討したところ、モル変換率約 50 %でβ-Ala-Tyr 生産が可能であることが明らかになった。さらに、Ser-Tyr 合成において有効であった改変型酵素を高発現させた大腸菌を利用したところ、モル変換率 70 %を超える高収率でβ-Ala-Tyr の生産に成功した。反応条件の最適化によってさらなる収率向上の可能性も示されており、その詳細についても報告する。

1) Moriyasu, K., *et al*., *International Journal of Peptides*, **2016**, 1-5 (2016)
2) 駒林ら ； 日本生物工学 2018 年度大会, 3Ma13

dipeptide, L-amino acid ligase, whole cell reaction

発表責任者：木野邦器（kkino@waseda.jp）

講演番号：4A16a04
講演日時：3 月 28 日 10:03～ センター2 号館 A16 会場

バイオプロセスによるフルフラールからの 2,5-フランジカルボン酸生産
2,5-furandicarboxylic acid production from furfural by microbial process

○川鍋 一樹、青野 陸、木野 邦器（早大・先進理工・応化）
○Kazuki KAWANABE, Riku AONO, Kuniki KINO (Waseda Univ.)

【背景・目的】持続可能な低炭素化社会の実現に向け、再生可能なバイオマスを原料とする有用化合物の製造法の開発に大きな期待が寄せられている。化石資源由来の基幹化学品である PET に近い特性を持ちながら優れたガスバリア性、熱安定性や生分解性を有する高性能バイオポリエステルである polyethylene furanoate (PEF) が注目されている。PEF の原料となる 2,5-furandicarboxylic acid (FDCA) は米国エネルギー省が選定したバイオリファイナリーの C6 プラットフォーム化合物であり、医薬、農薬、殺虫剤、抗菌剤、香料などの中間体としての利用価値も高い化合物である。これまでに FDCA は植物由来のグルコースから誘導できるフラン中間体を金属触媒によって酸化する合成法が主流であったが、本法は反応制御が厳しく、副産物を生成する等の問題点がある。酸化酵素を用いる hydroxymethyl furfural (HMF) からの FDCA 合成も報告されているが、バイオマスからの工業的な HMF 合成が課題となっている。一方、リグノセルロースからの大量供給が可能な furfural を酸化して 2-furoic acid (FA) を生成する酵素は広く知られているため、FA に炭酸固定ができれば、furfural からの FDCA 生産が可能になると考えた。FDCA に対して脱炭酸活性を示す UbiD 型脱炭酸酵素の存在が報告されているため [1)]、その可逆的脱炭酸反応を触媒する酵素の存在を予想し、当該酵素の取得を検討した。
【方法・結果】FDCA を合成可能な可逆的脱炭酸酵素を有する微生物の取得を目的に、FDCA を資化する微生物を土壌より探索した。なお、FDCA が細胞内に取り込めずに資化できない可能性も考え、FDCA の前駆体である 5-formyl-2-furoic acid を炭素源とした培地を用いた集積培養を行った。本スクリーニングによって得られた微生物株の炭酸固定反応による FDCA の合成活性を評価したところ、furfural から FA を介して FDCA を合成している可能性のある株の取得に成功した。16S rRNA 解析の結果、本微生物株は *Paraburkholderia fungorum* に分類されるグラム陰性細菌であると示唆された。同種の *P. fungorum* ATCC BAA-463 はゲノム解析が行われているため、当該推定 UbiD/UbiX 型脱炭酸酵素遺伝子の塩基配列を基にプライマーを設計し、取得株から目的の遺伝子断片 *ubiD* 及び *ubiX* を取得した。両遺伝子を高発現させた組換え大腸菌を用いた菌体反応系によって活性評価を行ったところ、FDCA に対して可逆的脱炭酸活性を示し、FA からの FDCA 合成に成功した。本組換え大腸菌を用いた当該 UbiD の基質特異性評価も行っており、また、furfural から FDCA を直接生産する検討内容と併せて報告する。

1) F. Koopman, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.USA*, **107**(11), 4919-4924 (2010).

2,5-furandicarboxylic acid, reversible decarboxylase, furfural

発表責任者：木野邦器（kkino@waseda.jp）

講演番号：4A16a05
講演日時：3 月 28 日 10:14～ センター2 号館 A16 会場

L-アミノ酸オキシダーゼ提示酵母による細胞外での高効率なアンモニア生産
High efficiency ammonia production outside the cells by L-amino acid oxidase-displaying yeast
○渡邉 幸夫、黒田 浩一、植田 充美（京大院・農・応用生命）
○Yukio WATANABE, Kouichi KURODA, Mitsuyoshi UEDA (Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【背景・目的】
アンモニアは、食料の生産に必須な肥料の原料である。また、現在開発が進んでいる水素型社会に必要な水素のキャリアーとしても利用が期待されている重要な物質の一つである。100 年以上にわたってアンモニアはハーバー・ボッシュ法によって作られてきた。しかしながら、この方法は高温・高圧条件が必要なため、化石燃料を大量に消費する。そこで、当研究室が独自に開発した細胞表層工学により、細胞内での同化を防ぎ、酵母細胞外でのグルタミンからの高効率でのアンモニア生産に成功した[1,2]。本研究では、アミノ酸からアンモニアを生産する L-アミノ酸オキシダーゼを提示することにより、グルタミン以外のアミノ酸からも高効率にアンモニアを生産することを試みた。
【方法と結果】
L-アミノ酸オキシダーゼによるアンモニア生産のため、塩基性のアミノ酸からアンモニアを生産する酵素であるアメフラシ由来 L-アミノ酸オキシダーゼ細胞表層提示を行った。L-アミノ酸オキシダーゼの N 末端側に分泌シグナル、C 末端側に GPI アンカー付着シグナルを含んだα-アグルチニンの細胞壁アンカリングドメインと融合して発現させることで、酵母の細胞表層に提示した。FLAG 抗体を用いた抗体染色による蛍光で表層提示を確認した。構築した酵母を培養後、アルギニン溶液に移し、30˚C でアルギニンからのアンモニア生産を行った。その結果、24 時間の反応で約 1.35 g/L（収率 83%）のアンモニアが生産された。また、興味深いことに、L-アミノ酸オキシダーゼの補酵素である FAD の添加をしなかった場合においても FAD 添加時と同等の活性を示したので、アポ酵素が FAD を獲得してホロ酵素になるプロセスも解明が必要であろう。本研究により、L-アミノ酸オキシダーゼを用いた細胞外でのアンモニア生産法も有効に働くことが示唆されたため、塩基性アミノ酸以外の様々なアミノ酸からのアンモニア生産にも応用可能であると考えられる。
[1] 渡邉幸夫ら：日本農芸化学会 2019 年度大会要旨集 p. 561
[2] Y. Watanabe, et al., submitted.

ammonia production, L-amino acid oxidase, cell surface engineering

講演番号：4A16a06
講演日時：3 月 28 日 10:35～ センター2 号館 A16 会場

芳香族化合物を高生産するためのプラスミドフリーなフェニルアラニン高生産大腸菌株の育種
Generation of plasmid-free phenylalanine-producing *Escherichia coli* to produce aromatic compounds in high titers and yields

○岸田 隆寛[1]、駒 大輔[2]、大橋 博之[2]、山中 勇人[2]、森芳 邦彦[2]、長森 英二[1]、大本 貴士[2]([1]大阪工大工、[2]大阪技術研)
○Takahiro KISHIDA[1], Daisuke KOMA[2], Hiroyuki OHASHI[2], Hayato YAMANAKA[2], Kunihiko MORIYOSHI[2], Eiji NAGAMORI[1], Takashi OHMOTO[2] ([1]Fac. of Eng., Osaka Inst, of tech., [2]ORIST)

【背景および目的】

芳香族化合物は多様な医薬品や化成品の原料として用いられる化合物であり、昨今の環境問題の観点から、将来的には再生可能なバイオマス資源から生産することが望ましい。我々のグループでは、フェニルアラニン(Phe)とチロシン(Tyr)の合成能力を強化した大腸菌に、外来生物種に由来する遺伝子を導入することで、チロソールなどの芳香族化合物をグルコースから生産する大腸菌を育種してきた(Koma et al., Appl. Environ. Microbiol. 78:6203-16, 2012)。育種した株は染色体改変株であり、プラスミドを保持していないために(プラスミドフリー株)、培地への抗生物質の添加が不要であるという特徴を有する。

チロソールなどの目的の芳香族化合物の生産量を向上させるためには、Phe や Tyr の生産量をさらに高めることが重要である。これまでに育種した Phe 生産菌は、T7 プロモーターに連結した 10 種類の遺伝子を大腸菌の染色体に導入した株であり、プラスミドフリー株としては最高レベルの収率(約 0.2 g/g-glucose)で Phe を生産するが、理論最大収率(0.55 g/g-glucose)には及ばない。そこで本研究では、遺伝子工学的なアプローチにより Phe 収率のさらなる向上を目指した。

【方法および結果】

中央代謝経路とシキミ酸経路の連絡部に律速段階があると仮定し、その改善に向けた 5 つの異なるアプローチを検討した。この連絡部では、ホスホエノールピルビン酸(PEP)とエリスロース-4 リン酸(E4P)から、3-デオキシ-D-アラビノヘプツロソン酸-7 リン酸(DAHP)が合成される。PEP の細胞内在量を向上させるために、①グルコースの主要な取り込み経路(PTS)に関係する *ptsG* 遺伝子を欠失させた。または、②PEP のピルビン酸への変換に関与する解糖系の *pykA* と *pykF* 遺伝子を欠失させた。一方、E4P の細胞内在量を向上させるために、③*tktA* 遺伝子の発現量を向上させた。または、④解糖系の *pgi* 遺伝子を欠失させ、強制的にグルコースをペントースリン酸経路経由(E4P 経由)で代謝させることを試みた。最後に、DAHP の合成を促進するために、⑤阻害脱感作した $aroG^{fbr}$ 遺伝子の発現量を向上させた(コピー数を増加させた)。これらのうち、②のアプローチで、Phe の対グルコース収率が 14%程度向上した。現在、複数のアプローチを同時に施した菌株の育種も行っており、その結果についても報告する予定である。

aromatic compound, phenylalanine, *Escherichia coli*

発表責任者：駒大輔（koma@omtri.or.jp）

講演番号：4A16a07
講演日時：3 月 28 日 10:46～ センター2 号館 A16 会場

Rhodococcus-Escherichia coli 発現シャトルベクターの宿主域の解析

Analysis of a host range of the *Rhodococcus-Escherichia coli* expression shuttle vector

○山村 栄虎（協和ファーマケミカル株式会社）
○Ei-Tora YAMAMURA (Kyowa Pharma Chemical Co., Ltd.)

【背景・目的】

バイオコンバージョンを利用した製造プロセスは，有機溶剤やレアメタルの使用量の削減，高温・高圧反応の回避または製造工程の簡略化などにつながることが多く，製造コスト削減だけでなく循環型社会の形成に貢献しうる．多くの酵素や微生物が産業利用されているが，その1つに *Rhodococcus* 属放線菌がある．中でも *R. erythropolis* は有機溶剤耐性や高い物質生産能力などの多くの有用な能力があり，次世代宿主として期待されている[1)]．そこで，*R. erythropolis* 由来和合プラスミドを用いて *Rhodococcus* 属放線菌を宿主とする遺伝子発現システムを開発している．

プラスミド pRET1100 を用いて構築したシャトルベクターは多種多様の *R. erythropolis* に遺伝子導入できる．このことを利用し，宿主スクリーニングしたところ，*R. erythropolis* は由来によって活性が大きく異なることをこれまでに報告した[2)]．より良い宿主を得るために，本研究の目的は，*R. erythropolis* 以外の有用な放線菌宿主の探索と宿主域の解析とした．

【方法・結果】

Rhodococcus 属放線菌を中心とした多様の放線菌にシャトルベクターの遺伝子導入を試み評価した．pRET1100 にコードされている新規複製タンパク質 RepT を含む複製領域を解析し，コピー数が 3.5 倍向上したプラスミドを創出した．また，プロモーターをスクリーニングし，*R. erythropolis* で過剰発現する強力なプロモーター *TRR* を取得した．これら新規複製領域およびプロモーター *TRR* を使用して発現シャトルベクターを構築した．産業上有用な酵素の１つである L-1-amino-2-propanol dehydrogenase を評価遺伝子として発現シャトルベクターに組込み，多種の放線菌に遺伝子導入を試みたところ，*R. erythropolis* 以外に 21 種類の放線菌に遺伝子導入できたことから，宿主域が広い発現シャトルベクターであることが示唆された．また，活性については，*R. erythropolis* よりも高活性な宿主を見出すことができた．さらに，構築した発現シャトルベクターは，*Rhodococcus* 属放線菌と大腸菌の両菌株で過剰発現することから，遺伝子発現を解析しやすく汎用性が高い *Rhodococcus*－*E. coli* 発現シャトルベクターと言える．

【参照】

1） 産業技術総合研究所 website (https://unit.aist.go.jp/bpri/bpri-amm/research.html)
2） 山村　栄虎、藤本　昇、日本農芸化学会 2018 年度大会（名古屋、2A10p14）

Rhodococcus erythropolis, gene expression, expression vector

発表責任者：山村　栄虎（eitora.yamamura@kyowa-kirin.co.jp）

講演番号：4A16a08
講演日時：3 月 28 日 10:57～ センター2 号館 A16 会場

酸素発生型光合成で駆動する嫌気発酵プロセス

Anaerbic fermentation driven by oxygen-evolving photosynthesis

○得平 茂樹、肥後 明佳（首都大理）
○Shigeki EHIRA, Akiyoshi HIGO (Tokyo Met. Univ.)

酸素発生型光合成を行うシアノバクテリアは、光エネルギーを利用して二酸化炭素と水を原料に有用物質を生産する細菌として注目されている。これまでに遺伝子工学・合成生物学的手法により様々な物質生産経路がシアノバクテリア内で構築され、二酸化炭素からの物質生産が実現している。しかし、シアノバクテリアを用いた物質生産において、一つの課題が浮き彫りになってきている。それは光合成により必然的に発生する酸素の存在である。酸素は鉄などを補因子としてもつ金属酵素をはじめとして、多くの酵素を失活させてしまう。発酵はもともと嫌気的な環境で起こる現象であり、その過程には多くの酸素感受性酵素が含まれている。これらの酸素感受性酵素の存在が、シアノバクテリアでの物質生産を制限する大きな要因となっている。我々は多細胞性シアノバクテリアの分化細胞を利用することにより、この酸素問題を解決することに成功したので報告する。

Anabaena sp. strain PCC 7120 などの多細胞性シアノバクテリアには、ヘテロシストと呼ばれる分化細胞を形成するものがいる。ヘテロシストは数百の細胞が一列につながった糸状体の中でおよそ 10 細胞に 1 個の割合で形成される。ヘテロシストの機能は窒素固定に特殊化しており、その形成は培地中の窒素化合物の欠乏により誘導される。窒素固定はニトロゲナーゼにより触媒される反応であるが、ニトロゲナーゼは酸素に極めて感受性の高い酵素である。そのため、ヘテロシストでは細胞内酸素濃度を低く維持する必要がある。ヘテロシストは光合成を停止させることで酸素発生を止めるだけでなく、外部からの酸素の流入を防ぐ外膜を形成し、さらに酸素呼吸を活性化する。これらの機構により隣接した細胞が光合成により活発に酸素を発生している条件下においても、嫌気的な細胞内環境を維持し窒素固定を行うことができる。本研究では、酸素感受性酵素を複数含む *Clostridium acetobutylicum* のブタノール生成経路をヘテロシスト特異的に発現させた。ヘテロシストを物質生産細胞として利用することで、酸素発生型光合成と嫌気発酵を同時に行わせることができることが示された。

photosynthesis, anaerobic fermentation, cyanobacteria

発表責任者：得平茂樹（ehira@tmu.ac.jp）

講演番号：4A16a09
講演日時：3 月 28 日 11:08～ センター2 号館 A16 会場

デルタロドプシンによる ATP 再生を伴う物質生産性の向上

Improvement of bioproduction with ATP recycling by delta-rhodopsin

○塩澤 優稀[1]、弘埜 陽子[1]、石井 純[2]、柘植 謙爾[2]、松田 史生[3]、戸谷 吉博[3]、原 清敬[1]([1]静岡県立大院・食栄環、[2]神戸大・先端バイオ工、[3]阪大院・情報)
○Yuki Shiozawa[1], Yoko Hirono[1], Jun Ishii[2], Kenji Tsuge[2], Fumio Matsuda[3], Yoshihiro Toya[3], Kiyotaka Hara[1] ([1]Univ. Shizuoka, [2]Kobe Univ., [3]Osaka Univ.)

【目的】

現在盛んに行われている、微生物を利用した有用物質生産や、遺伝子組換え技術を用いてそれらの生産性を向上させる研究では、細胞内エネルギー物質である ATP の不足による、生産性の頭打ちや、微生物の増殖の低下が問題となることがある。そこで、本研究では有用物質生産によく用いられる出芽酵母の ATP 再生を活性化させるために、高度好塩菌 *Haloterrigena. turkmenica* がもつ光駆動型プロトンポンプの一種であるデルタロドプシンを出芽酵母のミトコンドリア膜に発現させた。これにより、呼吸鎖電子伝達系に加え、デルタロドプシンにもプロトンの濃度勾配を形成させることで、ミトコンドリアの ATP 再生を活性化させることを目的とした。そのため、本研究では、グルタチオンなどの、生合成される際に ATP を消費する物質を生産物の指標として用いた。

【方法】

出芽酵母 BY4741 株のミトコンドリアにデルタロドプシンを発現させた株と、ATP 消費を伴うグルタチオン排出トランスポーター(Gxa1)およびデルタロドプシンを共発現させた株を作製した。デルタロドプシン発現株では、デルタロドプシンがミトコンドリアに局在していることをウェスタンブロッティングで確認した。その後、このデルタロドプシン発現株とデルタロドプシン非発現株を光受容分子(all-trans－retinal)および要求性アミノ酸を含む最小培地にて、光を照射しながら培養し、任意の時間にサンプリングを行った。

【結果および考察】

ウェスタンブロッティングにより、デルタロドプシンのミトコンドリア局在が確認できた BY4741 デルタロドプシン発現株では、24 時間目の細胞内グルタチオン濃度が上昇した。また、Gxa1 とデルタロドプシンを共発現させた株では、細胞内グルタチオン濃度の上昇のみならず、細胞外グルタチオン濃度の上昇もみられた。グルタチオンの合成と排出には ATP の消費を伴うことから、細胞内外のグルタチオン濃度の上昇は、デルタロドプシン発現により ATP 再生が活性化されたことに起因すると考えられる。

rhodopsin, glutathione, ATP

発表責任者：原　清敬（k-hara@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：4A16a10
講演日時：3 月 28 日 11:19～ センター2 号館 A16 会場

Penicillium aurantiogriseum の触媒反応により *Aspergillus ustus* 代謝物から 生成する新規フロイソキノリンアルカロイド

A novel furo-isoqunoline alkaloid formed from *Aspergillus ustus* metabolites by *Penicillium aurantiogriseum* catalyst

○山田 光代、齊藤 太樹、小川 凌太、仁戸田 照彦、神崎 浩（岡山大院・環境生命）
○Mitsuyo YAMADA, Daiki SAITO, Ryota OGAWA, Teruhiko NITODA, Hiroshi KANZAKI (Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okayama Univ.)

【目的】2 種類の微生物の組み合わせ培養により，単独培養では生産されない新たな生理活性物質が生産されることが知られている。当研究室では *Aspergillus ustus* と *Penicillium aurantiogriseum* の組み合わせ培養において，新規フロイソキノリンアルカロイド TS-1 [1]の生産を確認した。また TS-1 とその類縁体である *A. ustus* 代謝物 TS-2 [2], TS-3, TS-4 を単離し，全ての絶対立体配置を含めた構造を決定した [3]。次に TS-1 の生成条件検討のため，*A. ustus* 代謝物の *P. aurantiogriseum* への添加培養を行い，*P. aurantiogriseum* の有する酵素によって *A. ustus* 代謝物が TS-2, TS-4, TS-3 の順に変換されて TS-1 が生成することを明らかとした [3]。今回 TS-3 から TS-1 への変換反応の検討時に，基質として TS-3 を *P. aurantiogriseum* に添加した触媒反応において, TS-1 とは異なる新たな化合物, TS-5 の生産が見られた。そこで本研究では TS-5 の詳細検討を行うことを目的とした。

【方法・結果】*A. ustus* と *P. aurantiogriseum* の組み合わせ培養は，各菌をフィルターで隔てて菌同士が直接接触せず代謝産物のみ行き来する培養法である共生培養で行った。*P. aurantiogriseum* への添加培養は，*A. ustus* 代謝物の EtOAc 抽出物および精製した TS-3 の添加で行った。従来の ODS-HPLC 分析条件では TS-5 と *A. ustus* 抽出物中に含まれる他の化合物との分離が不十分であったことから，まず TS-5 の分離が良好な分析条件を確立した。この分析条件を用いて組み合わせ培養および添加培養の培養液の EtOAc 抽出物を分析した結果, 全ての培養において TS-1 の生産とともに TS-5 の生産が確認された。このことから TS-1 に加え，TS-5 が *P. aurantiogriseum* の有する酵素によって TS-3 が変換されることにより生成する化合物であることが明らかとなった。また HPLC-DAD 分析において，TS-5 が TS-1, TS-2, TS-3 と同じ UV スペクトルを有していたことから，TS-5 もフロイソキノリンアルカロイドであることが分かった。更に TS-5 を含む培養液の EtOAc 抽出物を LC-MS 分析に供した結果, TS-5 の分子量が 258 であると推測され，これは TS-1 の分子量と同じであった。TS-1 は，分子量が 16 小さい TS-3 が *P. aurantiogriseum* の有する酵素により水酸化されることで生成すると分かっていることから，TS-5 も同様に TS-3 の *P. aurantiogriseum* による水酸化反応で生じ，TS-1 とは水酸基の位置が異なる異性体である可能性が示唆された。現在 *P. aurantiogriseum* への *A. ustus* 代謝物 EtOAc 抽出物の添加培養により TS-5 を生成させ，単離構造決定を試みているところである。

[1] 小川・齊藤・仁戸田・神崎, 2016 農化大会 (札幌) 4B002 [2] 齊藤・仁戸田・神崎, 2015 農化大会 (岡山) 4E23a13 [3] 山田・齊藤・小川・仁戸田・神崎, 2019 農化中四国支部第 54 回講演会 D-2

Filamentous fungi, co-culture, bioconversion

発表責任者：神崎 浩（hkanzaki@okayama-u.ac.jp）

講演番号：4A16a11
講演日時：3 月 28 日 11:40～ センター2 号館 A16 会場

光増感剤/組換え大腸菌細胞系を用いた光触媒的水素生産

Photocatalytic hydrogen production using photosensitizer/recombinant *Escherichia coli* whole-cell system

○本田 裕樹、篠原 優佳、藤井 浩（奈良女子大理）
○Yuki HONDA, Yuka SHINOHARA, Hiroshi FUJII (Nara Women's Univ.)

【目的】酵素や微生物といった生体触媒を活用した物質生産系の構築は省エネルギー型プロセスの構築に寄与する。一方、反応にエネルギー（NADH 等からの還元力）の供給を要する酵素反応では、そのエネルギーを如何に安価に反応系に供給し続けるのかが課題となる。演者らは、光エネルギーによって駆動することが可能な生体触媒反応系を構築することで、こうした課題の解決に資する手法の確立を目指している。本講演では、[FeFe]-ヒドロゲナーゼによるプロトン還元による水素生成反応をモデルとして、光増感剤と生体触媒反応（とくに微生物菌体反応）を組み合わせた光水素生産反応について報告する。

【方法および結果】*Clostridium acetobutylicum* NBRC 13948 由来の[FeFe]-ヒドロゲナーゼおよびその修飾酵素遺伝子を有するプラスミドを保持する大腸菌 [1,2]を供試菌とした。当該組換え大腸菌を所定の条件で培養後、回収した菌体をそのまま水素生成生体触媒として反応に供した。窒素雰囲気下で、当該菌体（湿菌体 0.1 g）、光増感剤 2',4',5',7'-tetrabromofluorescein (Eosin Y) (0.1 mM)、電子供与剤 triethanolamine (100 mM)を含む反応溶液（pH 7.5）を調製（30 ml）し、ヘッドスペースを Ar に置換後、反応溶液へ光照射し水素生成量を経時的に測定した。光源には 530 nm LED を用い、反応は 25℃で実施した。当該反応溶液への光照射による水素生成が確認された一方、暗条件では水素生成は検出されなかった。空ベクターを保持した菌体を用いた試験、菌体あるいは光増感剤のみの試験、といった各種の対照試験からは光照射依存的な水素生成は確認できなかった。以上より、光増感剤/組換え大腸菌細胞系による光触媒的水素生成に成功した。本系は、光増感剤と酵素間の電子伝達を促進する電子メディエータの添加が不要なシンプルな反応系であり、530 nm の単色光照射による水素生成の見かけの量子収率 AQY_{530}=11%であった。

【参考文献 1】Y. Honda, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 2016, 55, 8045-8048.
【参考文献 2】Y. Honda, et al., *Appl. Catal. B Environ.* 2017, 210, 400-406.

hydrogen, photosensitizer, hydrogenase

発表責任者：本田裕樹（honda@cc.nara-wu.ac.jp）

講演番号：4A16a12
講演日時：3 月 28 日 11:51～ センター2 号館 A16 会場

微生物の金属硫化物生成能と遺伝子工学的な水素生成能付与を組み合わせた光駆動型水素生成

Light-driven hydrogen formation using metal sulfide precipitated recombinant *Escherichia coli* expressing hydrogenase genes

○篠原 優佳[1]、本田 裕樹[1]、渡邊 源規[2]、石原 達己[2,3]、藤井 浩[1]（[1]奈良女子大理、[2]九州大 WPI-I2CNER、[3]九州大工）
○Yuka SHINOHARA[1], Yuki HONDA[1], Motonori WATANABE[2], Tatsumi ISHIHARA[2,3], Hiroshi FUJII[1] ([1]Nara Women's Univ., [2]WPI-I2CNER, Kyusyu Univ., [3]Fac. Eng., Kyusyu Univ.)

【目的】演者らは、酸化チタン等の無機光触媒と、[FeFe]-ヒドロゲナーゼ遺伝子を導入した組換え大腸菌細胞を組み合わせた無機-生体ハイブリッド系を構築することで、持続可能な社会の実現に向けた光駆動型のクリーンな水素生産システムの開発を目指してきた[1,2]。本講演では、微生物が有する金属硫化物形成能を利用した硫化カドミウム（CdS）生成と、遺伝子工学的な水素生成能の付与を組み合わせることで、特定の条件で培養した微生物細胞をそのまま水素生成光触媒として利用する反応系の実証について、その試みを報告する。
【方法および結果】*Clostridium acetobutylicum* NBRC 13948 由来の[FeFe]-ヒドロゲナーゼおよびその修飾酵素遺伝子を有するプラスミドを保持する大腸菌を供試菌とした。まず、好気的に培養した菌体を回収後、リン酸緩衝生理食塩水に再懸濁し、$CdCl_2$ とシステインを添加して撹拌を続けたところ、菌体が黄色に呈色した。ICP 発光分析、X 線回折、走査型電子顕微鏡観察、エネルギー分散型 X 線分析、拡散反射スペクトル測定の各種測定を通して、菌体が形成した黄色物質が CdS であることを確認した。次に、CdS 形成後の菌体（CdS-大腸菌）を回収後、培養液に再懸濁し、嫌気条件下で遺伝子発現誘導した。回収した CdS-大腸菌を用いて水素生成活性を測定したところ、導入した[FeFe]-ヒドロゲナーゼに由来する活性が確認できた。最後に、CdS-大腸菌、電子メディエータ、電子供与剤を含む反応溶液を調製し、光駆動型水素生産を試みた。ヒドロゲナーゼ遺伝子を発現した CdS-大腸菌からは光照射依存的な水素生成が確認された一方、空ベクターを導入した CdS-大腸菌からは水素生成が検出されなかった。以上より、導入した CdS 形成と[FeFe]-ヒドロゲナーゼ遺伝子導入を組み合わせた微生物触媒による光駆動型水素生成に成功した。

【参考文献 1】Y. Honda, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 2016, 55, 8045-8048.
【参考文献 2】Y. Honda, et al., *Appl. Catal. B Environ.* 2017, 210, 400-406.

hydrogen, cadmium sulfide, hydrogenase

発表責任者：本田裕樹（honda@cc.nara-wu.ac.jp）

講演番号：4A16a13
講演日時：3 月 28 日 12:02～ センター2 号館 A16 会場

Cellulosimicrobium funkei 由来キサンチンオキシダーゼの機能解析
Functional analysis of xanthine oxidase from *Cellulosimicrobium funkei*
小園 伊織[1]、○川村 悠華[1]、竹内 道樹[2]、小園 祥子[1]、日比 慎[2,3]、小川 順[1]（[1]京大院農・応用生命、[2]京大院農・産業微生物、[3]富山県大工・生工研セ）
Iori Kozono[1], ○Yuka Kawamura[1], Michiki Takeuchi[2], Shoko Kozono[1], Makoto Hibi[2,3], Jun Ogawa[1] ([1]Div. Apple. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Ind. Microbaol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [3]Biotechnol. Res., Center, Fac. Eng., Toyama Pref. Univ.)

高尿酸血症は血中尿酸値の上昇に起因する疾病であり、痛風を併発する。その悪性化要因の一つが、食事由来のプリン体による体内尿酸量の増加である。その予防策として食事中のプリン体を低減する方法が挙げられるが、食事療法によるプリン体制限では食品の旨みが減少し、栄養が偏るなどの問題を抱えている。また、ヒト体内の代謝における尿酸排泄量の低下や尿酸生産量の増加も高尿酸血症の主な原因であるため、尿酸排泄促進剤や尿酸生産酵素 （キサンチンオキシダーゼ） 阻害剤が治療薬として用いられているが、肝障害、腎障害などの副作用を伴う可能性がある。本研究では、プリン体代謝酵素を医療用・臨床分析用酵素として応用すべく、微生物由来プリン体代謝酵素の解析を試みた。

プリン塩基の中では、ヒポキサンチンが腸管から吸収されやすく、血中尿酸値の上昇をまねくことが知られている。そこで、腸管でのヒポキサンチン量の低下を実現すべく、ヒポキサンチンを対象に代謝活性を示す微生物の探索を行った。ヒポキサンチン単一炭素源培地で集積培養を行った結果、ヒポキサンチンからキサンチンを経て、尿酸へと酸化する *Cellulosimicrobium funkei* A153 株を見出した（図）。

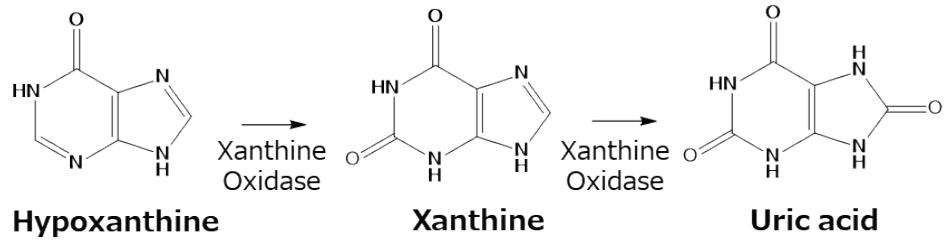


図. *Cellulosimicrobium funkei* A153 株におけるヒポキサンチン代謝

本菌株から上記酸化反応を触媒する酵素を精製した結果、当該酵素がモリブデン含有型のオキシダーゼと FAD 結合タンパク質の 2 つのサブユニットからなるキサンチンオキシダーゼであることが判明した。また、本酵素を *Rhodococcus erythropolis* を宿主として発現することに成功し、His タグ付加タンパク質として得た精製酵素を用いて機能解析を行った。その結果、本酵素がプリン塩基に対して高い基質特異性を示すことが分かった。また、反応の至適 pH は 7.0、至適温度は 55 °C であり、pH6.0～7.0（2 時間の処理）、50 °C 以下（30 分の処理）で 80%以上のキサンチンオキシダーゼ活性を維持できることが分かった。

Xanthine oxidase, Purine, *Cellulosimicrobium funkei*

発表責任者：小川　順（ogawa@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4A17a01
講演日時：3 月 28 日 09:30～ センター2 号館 A17 会場

Lactobacillus plantarum Pne-12 株のヒートショック処理が誘導する種々の応答に関する検討
Various responses induced by heat shock in *Lactobacillus plantarum* Pne-12

○米満 鮎子[1]、矢島 冬紗子[2]、中西 愛美[2]、佐々木 泰子[1] ([1]明治大農、[2]株式会社ピックルスコーポレーション)
○Ayuko YONEMITSU[1], FUSAKO YAJIMA[2], NARUMI NAKANISHI[2], YASUKO SASAKI[1] ([1]Meiji Univ., [2]PICKLES Co., Ltd)

【背景・目的】*Lactobacillus plantarum*(*L. plantarum*)は食品製造の場において有用な乳酸菌であり近年はプロバイオティクスとしても開発されている。 *L. plantarum* PIC-NBN22(Pne-12 株)は白菜のぬか漬けから単離され、漬物や甘酒のスターターとして用いられている。2016 年度本大会において、本菌が低栄養状態では生育速度が遅延することにより酸および胆汁酸ストレス耐性が増加することを報告したが、温度ストレスへの応答に関する詳細は明らかになっていない。今回我々は本菌が熱処理により、その後の低温保存中に生育速度が遅延し、増殖をしない状態に誘導されることを見出した。本研究の目的は、上記の熱処理および冷蔵保存による膜の脂質組成変化への影響を観察するとともに、*L. plantarum* において熱処理で誘導されることが報告されている small heat shock protein(shsp)の機能を調べるために、Pne-12 の sHSP1 の *Lactococcus lactis* における発現を試みることである。多くの乳酸菌は sHSP 遺伝子を 1 つしか保有していないが、*L. plantarum* は 3 つ保有していることが報告されており、当該遺伝子の役割に注目した。
【方法】甘酒の原料となる糀培地を用いて、熱処理後の冷蔵保存時の *L. plantarum* Pne-12 の生菌数(cfu/mL)を観察した。さらに、MRS 培地を用いて同様の実験を行い、実験室レベルでの現象の再現を検討した。その後 Bligh-Dyer 法を用いて細胞膜の脂質抽出を行い、GC-MS 解析により熱処理による脂肪酸組成の変化を観察した。*shsp1* 発現株の温度耐性の変化は、*shsp1* 遺伝子を含む染色体断片を導入した *L. lactis* IL1403 株を用いて検討した。
【結果】糀培地において、熱処理により低温保存中に Pne-12 が増殖せずに生菌数を維持することが観察された。MRS 培地を用いた実験においても同一の現象が見られたため、その後の実験は MRS 培地を用いて行った。膜の脂肪酸組成の割合は熱処理により、対照区と比較してオレイン酸(C18:1)の増加など有意な変化が見られたが、その後の冷蔵保存では両区画ともに各脂肪酸の割合に大きな変化は見られなかった。現在、Pne-12 由来の *shsp1* を *L. lactis* に導入し、その影響について検討を行っている。また、熱処理時とその後の低温保存時におけるストレス関連遺伝子(*shsp, dnaK, groEL, csp, clp*)の mRNA 発現レベルを測定し、Pne-12 の温度ストレス応答へのそれらの関与を考察する。

heat shock, sHSP, cryotolerance

発表責任者：佐々木　泰子（y_sasaki@meiji.ac.jp）

講演番号：4A17a02
講演日時：3 月 28 日 09:41～ センター2 号館 A17 会場

エタノール生産菌 *Zymomonas mobilis* CP4 由来の高温適応株における変異のストレス応答への寄与
Contribution of mutations to stress response in thermo-adapted strains from ethanol-producing bacterium *Zymomonas mobilis* CP4

○久我 昂史[1]、加藤 舜[1]、白丸 優貴[2]、村田 正之[1,2,3]、高坂 智之[1,2,3]、山田 守[1,2,3]（[1]山口大院・創科、[2]山口大・農、[3]山口大・中高温微生物研究センター）
○ Takashi KUGA[1], Shun KATO[1], Yuki SHIROMARU[2], Masayuki MURATA[1,2,3], Tomoyuki KOSAKA[1,2,3], Mamoru YAMADA[1,2,3] ([1]Graduate School of Science and Technology for Innovation, Yamaguchi Univ., [2]Faculty of Agriculture, Yamaguchi Univ., [3]Research Center for Thermotolerant Microbial Resources, Yamaguchi Univ.)

【目的】比較的高温条件下で微生物での物質生産を行うことは、雑菌混入の抑制、酵素反応性の向上、発酵熱の冷却コストの削減といった利点があり、物質生産可能な微生物の適応育種による耐熱化が試みられてきた。我々もエタノール生産性微生物を適応育種し耐熱化株を取得したが、これらの株のゲノムには耐熱化に伴って変異が挿入されていた。それぞれの変異は耐熱化に寄与することが期待されるが、熱以外の環境ストレスに対して変異が影響を与えることも期待できる。我々は、エタノール生産菌 *Zymomonas mobilis* CP4 株から適応育種によって 4 つの耐熱化株を獲得した。それぞれの耐熱化株の生育限界温度は 37℃から 39℃に向上していた。また、ゲノム解析により、シグナル伝達、膜の安定化、核酸代謝、一般的な代謝、ヒスチジン合成、そしてトランスポーターをコードする 13 の遺伝子に変異が確認された。本研究では、これらの変異の様々なストレスに対する表現型への寄与を明らかにすることを試みた。
【方法・結果】耐熱化株に確認された各変異による細胞への影響を解析するため、接合を用いて 13 の変異を野生株 (CP4 株) に個別に導入した一遺伝子変異導入株を構築した。耐熱性へのそれぞれの変異の寄与を明らかとするため、30℃と 38℃の条件でそれらの株を培養し生育観察をするとともに、細胞長、細胞内 ROS 量の比較を行った。その結果、4 つの耐熱化株それぞれにおいて、トランスポーター遺伝子以外の 2 つずつの遺伝子への変異が耐熱性には寄与すること、そして、いずれかの 1 つの変異が細胞長の抑制に寄与することが示された。次に、様々なストレス（塩濃度、25%グルコース、0.1% SDS、エタノール）に対する耐熱化変異の寄与を調べた。100 mM NaCl、250 mM KCl に対しては 4 つの耐熱化株とその耐熱性に寄与する変異のほとんどが生育の向上を示したが、ZCP4_0588 への変異は生育の向上を示さなかった。25%グルコースに対しては 4 つの耐熱化株はともに感受性を示し、シグナル伝達遺伝子 ZCP4_0028 とトランスポーター遺伝子 ZCP4_1702、ZCP4_1703 への変異が感受性の原因であることがわかった。0.1% SDS に対しては、誘導期が長くなるものの、4 つの耐熱化株のうち 2 つが耐性を示し、その特徴はトランスポーター遺伝子 ZCP4_1702 への変異が単独で寄与を示した。エタノールの存在下でも生育比較を行ったところ、グルコースや SDS 添加時ほど明確な違いは現れなかったが、変異ごとに異なる生育を示した。これらの結果から、耐熱化株に生じた変異は遺伝子に応じて耐熱化への寄与のメカニズムが異なっていること、また、いくつかの環境ストレスへの応答に対しても個別に影響を与えていることが示唆された。

Zymomonas mobilis, Thermo-adapted mutation, Stress tolerance

発表責任者：山田守（m-yamada@yamaguchi-u.ac.jp）

講演番号：4A17a03
講演日時：3 月 28 日 09:52～ センター2 号館 A17 会場

緑膿菌バイオフィルム内に出現する変異株の解析・分離
Characterization of spontaneous mutants in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm
○矢野 真弓[1]、伊澤 徹[1]、豊福 雅典[2,3]、野村 暢彦[2,3]（[1]筑波大・生命環境、[2]筑波大・MiCS、[3]筑波大・生命環境系）
○Mayumi YANO[1], Toru ISAWA[1], Masanori TOYOFUKU[2,3], Nobuhiko NOMURA[2,3] ([1]Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]MiCS, Univ. Tsukuba, [3]Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

多くの細菌は実環境中においてバイオフィルム（BF）と呼ばれる三次元構造体を形成する。BF は微生物集団と細胞外高分子物質（EPS）から構成され、BF 状態の細菌では浮遊細菌に比べて多種多様な自然突然変異株が高頻度に出現することが知られている。様々な表現型を有する変異株が出現することにより、集団としての環境適応能力が上がり細菌集団制御における障壁の一つとなっている。BF における変異株出現は細胞内で産生される酸化ストレスに起因するという報告があるものの、BF 形成過程における変異株出現の時間的、空間的分布の詳細は未だ報告されておらず、実環境中において両者の関係は未解明である。本研究では、BF 内部における変異株の出現を時空間的に解析し、両者の関係性を明らかにすることを目標として研究を進めた。

本研究では BF のモデル細菌である緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）PAO1 株を使用した。緑膿菌 BF における自然突然変異株の出現には *recA* が強く関与していることが知られていることから、*recA* プロモーターレポーター株を作製して、一細胞レベルで変異株を可視化した。次に本レポーター株を用いて、フローセル内で BF を形成させ、共焦点レーザー顕微鏡によって BF 構造体および内部細菌の *recA* プロモーター発現を一細胞レベルで観察した。その結果、*recA* は一部の細胞でのみ高発現しており、さらに興味深いことに BF の底面部に *recA* 高発現細胞が局在している様子が観察された。これは BF 内部は低酸素分圧や貧栄養といった不均一な環境が形成されており、多種多様な選択圧が存在するからではないかと考えられる。

次に活性酸素種 （ROS） が BF 内で蓄積することで変異株が出現しているのでないかと考え、BF を ROS 染色剤を用いて染色して可視化を行った。その結果、ROS 染色で強い蛍光を示した菌と *recA* 高発現菌が一致していたことから *recA* 高発現菌には ROS が関与していることが示唆される。加えて、それらの細胞を観察するため BF を回収し、*recA* 高発現細胞を一細胞レベルで分別する系を構築した。今後はこの *recA* 高発現菌を分取し、一細胞レベルで DNA 解析を行う予定である。

biofilm, stress response, mutation

発表責任者：矢野真弓（my.storm.1106@gmail.com）

講演番号：4A17a04
講演日時：3 月 28 日 10:03～ センター2 号館 A17 会場

シアノバクテリアの DnaK と ClpB の協調的シャペロン作用

Cooperative action of cyanobacterial DnaK with ClpB to refold denatured proteins

○仲本 準、平岡 海 (埼玉大理)
○Hitoshi NAKAMOTO, Kai HIRAOKA (Saitama Univ.)

分子シャペロンが、細胞のタンパク質恒常性（proteostasis）を維持することが、モデル生物である大腸菌や酵母などの従属栄養生物を用いて明らかにされてきた。代表的分子シャペロン Hsp70 ファミリーのメンバーである大腸菌 DnaK 等が、DNA 複製、タンパク質の折りたたみ、タンパク質凝集体の可溶化、タンパク質の細胞外分泌等、多様で重要なはたらきをすることが明らかにされている。DnaK は、ATP の結合・加水分解依存的に、その補助因子である DnaJ や GrpE と協調的にはたらく。大腸菌で確立されたこの DnaK (Hsp70) シャペロン系の DnaK や DnaJ は、意外なことに必須ではない。大腸菌の他の DnaK ホモログや J タンパク質（DnaJ などの J ドメインを有するタンパク質）もすべて必須ではないと報告されている。

シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC7942 株には 3 種類の DnaK、10 種類の J タンパク質が存在する。なお、GrpE は大腸菌同様に 1 種類のみ存在し、必須である。我々は、DnaK2、DnaJ2、GrpE から構成されるシャペロン系を構築したが、DnaK2 と DnaJ2 は必須のタンパク質である。これまで詳細に解析されてきた大腸菌 DnaJ は I 型の J タンパク質に属するが、DnaJ2 は II 型に分類される。II 型には亜鉛を結合するシステインに富む領域が存在しない。この領域は変性タンパク質の結合に関与すると報告されているが、DnaJ2 は変性タンパク質の凝集を阻止する活性が低い。

本研究ではまず、DnaK2 シャペロン系における DnaJ2 と GrpE の必須性を調べた。DnaK2 と DnaJ2 が存在すると、熱変性したグルコース-6-リン酸脱水素酵素（G6PDH）の再活性化（再折りたたみ）が起こった。GrpE を加えることによって、再活性化反応の速度も収率も増えた。熱変性したリンゴ酸脱水素酵素（MDH）を基質にすると、DnaK2 と DnaJ2 だけでは再活性化は起こらず、GrpE が無いと起こらなかった。さらに、G6PDH の再活性化反応に比べると、MDH のそれには、顕著なラグタイムが生じた。（今回の実験条件下では）G6PDH とは異なり、MDH は沈殿性の凝集塊を形成する。熱変性 MDH の再活性化における GrpE の必要性と顕著なラグは、DnaK2 による（折りたたみ前の）凝集塊の可溶化のために生じているのでないかと考えた。そこで、凝集塊を溶かすことができる ClpB1 を加えて再活性化反応を解析した。その結果、再活性化反応開始までのラグタイムは著しく短縮され、G6PDH と同様に GrpE が無くとも再活性化反応は起こり、GrpE を添加すると、その速度と収率が顕著に増加した。これらの結果により、DnaK2/DnaJ2 に脱凝集活性があること、その活性の発現には GrpE が必須とされること、ClpB1 と協調的に働くことで、脱凝集→再折りおりたたみの効率が著しく向上することが示された。

Molecular chaperone, DnaK, ClpB

発表責任者：仲本準（nakamoto@mail.saitama-u.ac.jp）

講演番号：4A17a05
講演日時：3 月 28 日 10:14～ センター2 号館 A17 会場

出芽酵母の圧力適応におけるカルシウムの役割
The role of calcium in high-pressure adaptation in *Saccharomyces cerevisiae*
○望月 貴博、神賀 和希、山口 有乃、阿部 文快（青山学院大理工）
○Takahiro MOCHIZUKI, Kazuki KAMIGA, Yuno YAMAGUCHI, Fumiyoshi ABE (Aoyama Gakuin Univ.)

【目的】 圧力はヒトが日常的にさらされている物理的ストレスの 1 つであり、細胞レベルで圧力適応することで恒常性を維持している。しかし、その適応メカニズムについてはあまり理解されていない。我々は出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて、高水圧 (25 MPa; 約 250 気圧) が細胞に及ぼす影響について調べてきた。これまでに、酵母のトリプトファン非要求性株が高圧条件下 (25 MPa; 約 250 気圧) で増殖可能であることや、熱や浸透圧を感知するセンサータンパク質 Wsc1 が圧力を感知し、Mitogen-Activated Protein kinase (MAPK) 経路を活性化することを見出している。また最近、培地中にカルシウムキレート剤 EGTA を添加すると、野生株が高圧感受性を示すことを見出し、細胞内へのカルシウムイオンの流入が高圧下での増殖に重要である可能性が示唆された。そこで本研究では、圧力下における細胞外カルシウムイオンの流入機構とその役割について検討を行なった。

【方法】 圧力下におけるカルシウムイオンの流入について検討するため、酵母のカルシウムチャネルを形成する Mid1 や Cch1 の遺伝子欠損株を高圧条件下 (25 MPa で 48 時間) で培養し、高圧増殖能を比較した。また、圧力依存的に MAPK 経路が活性化するのか検証するため、全細胞抽出物を調製し、抗リン酸化抗体を用いたウエスタンブロッティングを行なった。

【結果】 *mid1*Δや *cch1*Δ株を高圧条件下で培養したところ、野生株と比較して高圧下での増殖能が低下した。このことから、圧力下では Mid1 や Cch1 を介して細胞内にカルシウムイオンが流入していると考えられた。次に、流入したカルシウムイオンが MAPK 経路に影響を与えているのか検証するため、*mid1*Δ株を用いて MAPK である Slt2 の検出を試みた。その結果、野生株と同様に *mid1*Δ株においても圧力依存的に Slt2 はリン酸化されており、流入したカルシウムイオンは MAPK 経路の活性化に関与していないことが示唆された。また、*wsc1*Δ*mid1*Δ株を作製し高圧増殖試験を行なったところ、*wsc1*Δや *mid1*Δ株と比較して *wsc1*Δ*mid1*Δ株は著しい高圧感受性を示した。この結果は、Wsc1 を介した MAPK 経路の活性化とカルシウムイオンに依存したシグナル経路の両方が酵母の高圧増殖に関与している可能性を示唆している。そこで現在、高圧下での増殖に重要なカルシウム依存性経路を同定するため、カルモジュリン経路関連遺伝子 (*CMK1* や *CMK2*) やカルシニューリン構成遺伝子 (*CNA1*, *CNA2* あるいは *CNB1*) の欠損株を用いた高圧増殖試験を行なっている。

Saccharomyces cerevisiae, High pressure, Calcium

発表責任者：望月貴博（mochizuki@chem.aoyama.ac.jp）

講演番号：4A17a06
講演日時：3 月 28 日 10:35～ センター2 号館 A17 会場

可動性因子による緑膿菌の細胞間コミュニケーション制御機構の解明
Cell-to-Cell Communication Is Controlled By Insertion Sequences in *Pseudomonas aeruginosa*

○須澤 由希[1]、遠矢 正城[1]、尾花 望[2,3]、吉澤 晋[4]、木暮 一啓[4]、野村 暢彦[3,5]、豊福 雅典[3,5]（[1]筑波大院・生命環境、[2]筑波大・医・TMRC、[3]筑波大・MiCS、[4]東京大・大気海洋研、[5]筑波大・生命環境系）
○Yuki SUZAWA[1], Masashiro TOYA[1], Nozomu OBANA[2,3], Susumu YOSHIZAWA[4], Kazuhiro KOGURE[4], Nobuhiko NOMURA[3,5], Masanori TOYOFUKU[3,5] ([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Fac. Medicine., TMRC, [3]MiCS., Univ. Tsukuba, [4]AORI., Univ. Tokyo, [5]Fac. Life Environ Sci., Univ. Tsukuba)

Quorum sensing (QS) は微生物間コミュニケーション機構の一つであり、特有のシグナル物質を介して個体群内の細胞密度を感知し様々な遺伝子の転写を調節することから微生物制御のターゲットとなっている。QS を行う代表的な細菌の一つである緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）は優れた環境適応能力により宿主体内のみならず海洋、河川、土壌など非常に幅広い自然環境中に分布している一方で、本機構が環境中でどのように機能しているかについての知見はほとんどない。このことから緑膿菌の自然環境中での動態を理解することは臨床的・生態的に重要であると言える。

本研究においては前述の背景より、異なる水環境から単離された緑膿菌における QS システムの解析を行った。分析の結果、これらの環境単離株の中にはモデル菌株として今までに多くの研究がなされてきた臨床単離株 PAO1 株と比べてシグナル生産量や応答性において異なった性質を示す株が複数存在し、特に貧栄養環境である外洋域からは QS システムの機能が一部欠損した株が多く単離された。このことから、緑膿菌の細胞間コミュニケーション能力が環境に応じて変遷していることが考えられる。こうした QS システムの変遷を明らかにすることは、緑膿菌の病原性の獲得や発揮を理解するためにも重要である。興味深いことに QS 欠損株の中には QS 関連遺伝子（*lasR*）に挿入配列（IS）を持つ株が存在し、その株では集団から二種類のコロニー形態が出現した。本研究では、環境に応じた QS システムの変遷を理解するために、IS と QS の関係を解析することにした。

コロニー形態が異なる二種類の株をそれぞれ単離しシーケンス解析を行ったところ、両者ともにゲノム中の *lasR* 以外の locus に共通の IS を複数有することが明らかとなった。IS が挿入されていない *lasR* を持つ細胞を単離し、継代培養すると *lasR* に IS が挿入された細胞が出現した。また、この株を継代培養すると IS が *lasR* から転出し、完全な *lasR* に戻ることが確認された。このことから、IS は可動性を失っておらず、*lasR* への IS の挿入・転出が QS 活性を変化させることが明らかとなった。興味深いことに、本 IS はメンブレンベシクル(MV)にも含まれており、細胞間で伝播する可能性が示唆された。

QS システムは一般的にエネルギーコストが高いと考えられていることから、IS の挿入・転出による QS の ON-OFF の切り替えは、環境に応じた生存戦略であると予想される。当該 IS の挿入・転出メカニズムを理解することで、QS 制御の新たな糸口が得られる可能性がある。

Pseudomonas aeruginosa, Quorum sensing, Insertion sequence

発表責任者：豊福雅典（toyofuku.masanori.gf@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：4A17a07
講演日時：3 月 28 日 10:46～ センター2 号館 A17 会場

グルタミン酸とアスパラギン酸は高親和性 cAMP ホスホジエステラーゼ遺伝子を高発現するウシグソヒトヨタケの子実体形成遅延を回復する

Glutamic acid and aspartic acid rescue *Coprinopsis cinerea* highly expressing the high-affinity cAMP phosphodiesterase gene from delay of its fruit body formation

○千 菊夫、伊藤 哲、森 裕秋、山本 翔也、小島 宏延、柴田 晶美（信州大農）
○Kikuo SEN, Satoshi ITOH, Hiroaki MORI, Shohya YAMAMOTO, Hironobu KOJIMA, Akimi SHIBATA (Shinshu Univ.)

【目的】 我々は，モデル担子菌ウシグソヒトヨタケ（*Coprinopsis cirerea*）のアデニル酸シクラーゼシグナル伝達経路と子実体形成との関係を明らかにすることに取り組んでいる．なかでも，子実体形成誘導物質 cAMP，cAMP を 5’-AMP に変換する酵素 cAMP ホスホジエステラーゼ（PDE）に注目している. これまでに, ウシグソヒトヨタケに出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の *PDE2*（高親和性 cAMP ホスホジエステラーゼ遺伝子）を導入し，ウシグソヒトヨタケで PDE を高発現させると子実体形成が遅延することを報告してきた[1)]．今回は，PDE を高発現するウシグソヒトヨタケの子実体形成遅延を正常に戻す化合物を探索するとともに，子実体形成におけるそれらの化合物の機能を生化学的側面からも調査した.

【方法】 本研究では，二つのタイプのウシグソヒトヨタケ交配株を供試した．一つは PDE 高発現株（×Okayama-7），もう一つは対照としての野生型株（×Okayama-7）で，これらを代表的栄養培地 MYG 寒天培地上で 28℃にて明暗周期 12 h／12 h の条件で培養し, 子実体形成の進行を観察した. PDE 高発現による子実体形成遅延を正常に戻す化合物の探索に当たっては, 種々の化合物を 10 μ*M*～1 m*M* の濃度で添加した MYG 寒天培地上での PDE 高発現株（×Okayama-7）の子実体形成の進行が，野生型株（×Okayama-7）のそれと同程度に回復するか否かを評価した．添加化合物としては，インドール関連化合物，20 種類の標準アミノ酸，さらにグルタミン酸（L-Glu）およびアスパラギン酸（L-Asp）と類似の構造を持つ化合物について調査した．また，PDE 高発現や培地への化合物添加がウシグソヒトヨタケの生化学的変化に及ぼす効果を調査するために，サイクリック AMP EIA キットを用いて同菌の低分子核酸画分に含まれる cAMP 量を測定した.

【結果】 担子菌スエヒロタケ（*Schizophyllum commune*）の子実体形成を促進するインドール関連化合物は，いずれもウシグソヒトヨタケ PDE 高発現株の子実体形成遅延を抑制しなかった．興味深いことに，標準アミノ酸のうち L-Glu と L-Asp（いずれも側鎖にカルボキシ基を持つ）は，子実体形成遅延を抑制した．L-Glu と L-Asp の類似化合物である γ-アミノ酪酸（GABA）と β-アラニンも同様に遅延を抑制した．cAMP レベルは，野生型株（×Okayama-7）より PDE 高発現株（×Okayama-7）の方が低く，PDE 高発現で cAMP レベルが低下したため子実体形成が遅延したと推測された．また，PDE 高発現株（×Okayama-7）の cAMP レベルは，L-Glu を培地に添加すると高くなることが観察された.

1) 2011 年度日本農芸化学会（京都）大会講演要旨集，p.269, 3C27p11.

Coprinopsis cinerea , cAMP phosphodiesterase, fruit body formation

発表責任者：千 菊夫（kik1000@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：4A17a08
講演日時：3 月 28 日 10:57～ センター2 号館 A17 会場

飢餓における *Roseateles depolymerans* の光合成関連遺伝子転写に関与する σ 32 ホモログの欠損株のトランスクリプトーム解析

Transcriptome analysis of Δσ32 homologue relating to transcription of photosynthesis genes in *Roseateles depolymerans* under carbon starvation

○陶山 哲志 [1]、菅野 菜々子 [2]、千原 康太郎 [1,3]、松倉 智子 [1]、野田 尚宏 [1,3]、花田 智 [2] ([1] 産総研・バイオメディカル、[2] 首都大・院・理、[3] 早稲田大学・理工学術院)
○Tetsushi SUYAMA[1], Nanako KANNO[2], Kotaro CHIHARA[1,3], Satoko MATSUKURA[1], Naohiro NODA[1,3], Satoshi HANADA[2] ([1]BRI, AIST, [2]Grad. Sch. Sci., Tokyo Met. Univ., [3]Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

水圏環境では富栄養と貧栄養の条件がドラスティックに変化することが知られている。微生物にとってこのような環境を生き延びるためには周囲の変化に応じて代謝のシステムを切り換えることが生残に有利に働くと考えられる。淡水環境に生息する絶対好気性細菌 *Roseateles depolymerans* は呼吸基質が欠乏すると光合成装置の de novo 合成を開始し、光エネルギーを利用して飢餓状態を生き延びようとする。昨年度発表のトランスクリプトーム解析から、飢餓応答に関連した σ 因子のうち σ 32 のホモログ(SP70)を欠損させたことによりカロテノイドおよびバクテリオクロロフィルの蓄積が見られなくなった変異株（ΔSP70 株）について、トランスクリプトームの解析を行ったので、これについて報告する。

野生型の *R. depolymerans* はカザミノ酸、コハク酸、ブドウ糖等の呼吸基質を除いて人工的な飢餓条件を与えることにより、24 時間程度でカロテノイドやバクテリオクロロフィルの蓄積を示すようになるが、飢餓 6 時間後には SP70 および光合成関連遺伝子の mRNA の蓄積が観察される。今回は飢餓条件で 6 時間培養した野生株とΔSP70 株のトランスクリプトームを比較した。

TPM(Transcripts Per Million)の比較から、ΔSP70 株で最も顕著に mRNA が減少したのは光捕集蛋白複合体のαおよびβサブユニットをコードする *pufA* および *pufB* 遺伝子であった。また、ΔSP70 株で TPM が野生株の 1/5 以下にまで減少した遺伝子は主に光合成装置のアポ蛋白質をコードする *puf*, *puh* オペロンとバクテリオクロロフィル生合成系の遺伝子をコードする *bch* オペロンに含まれる遺伝子およびそれらに隣接する遺伝子であり、ほとんどが光合成遺伝子クラスターに含まれる遺伝子群であった。本研究の結果から、この σ 32 ホモログが光合成関連遺伝子の転写に関与していることが強く示唆された。σ 32 ファミリーの σ 因子に関しては、ヒートショック応答の他、光酸化ストレスへの適応や鉄－硫黄代謝、共生や寄生に関連した遺伝子の発現に関与する報告が知られるが、光合成関連遺伝子の転写に関する報告は無い。*R. depolymerans* の光合成遺伝子クラスターに関しては転写開始点の存在が推定される領域には既知の σ 32 の認識配列と明らかな相同性を示す配列は見当たらなかった。今後さらに SP70 による *R. depolymerans* の光合成関連遺伝子の転写について掘り下げた検討を進めたいと考えている。

Starvation, Photosynthesis, Transcriptome

発表責任者：陶山哲志（t.suyama@aist.go.jp）

講演番号：4A17a09
講演日時：3 月 28 日 11:08～ センター2 号館 A17 会場

サルモネラ菌の TCS と PTS をつなぐコネクターRcsG の分子機構

Characterization of RcsG, a connector of PTS to TCS in *Salmonella enterica*

○加藤 明宣、深見 知可、萩原 慧（近畿大院農）
○Akinori KATO, Tomoka FUKAMI, Kei HAGIHARA (Kindai Univ.)

コネクターとは、細菌の二成分制御系(TCS)間で複数シグナルの統合を仲介するスモールタンパク質である。例えば、サルモネラ菌において PmrD は PhoP/PhoQ 系のシグナルを伝えることで、PmrA/PmrB 系は Fe^{3+}に加え低 Mg^{2+}に応答し、ポリミキシン B 耐性を付与する。一方、PhoP が活性化する膜局在生スモールタンパク質 MgrB は PhoQ 活性を抑制するフィードバックループを形成する。近年、コリスチン耐性臨床分離株の報告例が増加しているが、グラム陰性菌の内在性因子由来の耐性は、PmrD および MgrB によってリンクされた調節ネットワーク内における変異が主因といわれている。一般にコネクターは互いに相同性を示さない故に細菌ゲノムから新たにそれらを予測することは困難である一方、コネクター・標的 TCS 間の特異的な相互作用を可能としていると考えられる。そこで、コネクターを介する病原性·薬剤耐性調節ネットワークの更なる解明のため、サルモネラ菌の小遺伝子ライブラリーからの遺伝学的なスクリーニングが実施されてきた。これまでに、我々は、糖の取り込み機構であるホスホトランスフェラーゼシステム(PTS)と莢膜多糖の合成を活性化する TCS の RcsC/RcsD/RcsB をリンクするコネクターRcsG を単離した。

今回、RcsG による RcsBCD の活性化機構の詳細についての解明を試みた。自然突然変異体 *rcsJ** において、*rcsG* オペロンの転写は *rcsH* だけではなく、PTS の Enzyme I と HPr をそれぞれコードする *ptsI*、*ptsH* に依存的に上昇した。RcsG は、大腸菌のツーハイブリッドシステムにて RcsD と相互作用を示した。また、RcsB と RcsD の相互作用は RcsG の発現により低下したことから、RcsG は RcsB-P を RcsD から解放すると示唆された。更に、Phos-tag を用いたリン酸化型 RcsB (RcsB-P)の検出を行った。LB 等の通常条件下において RcsB-P は低レベルに維持され、RcsG の発現により僅かに上昇した。これらの結果から、RcsB-P は RcsD に一旦トラップされ、更なる RcsB のリン酸化が制限される”スタンバイ状態”にあり、何らかの糖の存在下で、RcsG が RcsD に結合することで、解放された RcsB-P が莢膜多糖の合成を活性化するというモデルが考えられた。

two-component system, phosphotransferase system, connector

発表責任者：加藤明宣（kato_a@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：4A17a10
講演日時：3 月 28 日 11:19～ センター2 号館 A17 会場

Improvement of thermotolerance of Zymomonas mobilis TISTR548 by increase in expression of genes for heat shock proteins and reactive oxygen species-scavenging enzymes

○Sakunda Anggarini[1], Masayuki Murata[1], Tomoyuki Kosaka[1,2,3], Mamoru Yamada[1,2,3] ([1]Life Science, Graduate School of Science and Technology for Inovation, Yamaguchi Univ. Ube 755-8505, Japan, [2]Department of Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Yamaguchi Univ., Yamaguchi 753-8515, Japan, [3]Research Center for Thermotolerant Microbial Resources, Yamaguchi Univ., Yamaguchi 753-8515, Japan)

Microbes may accumulate reactive oxygen species (ROS) or damaged proteins at a critical high temperature (CHT), which is an upper limit of temperature for survival. Contrary to expectation, there are only a few genes for heat shock proteins (HSPs) and ROS-scavenging enzymes (RSEs) as the thermotolerant gene that is essential at CHT, in mesophiles including *Zymomonas mobilis*. To understand the contribution of HSPs and RSEs to thermotolerance, we examined the effect of enhanced expression of these genes on survival at a CHT in *Z. mobilis* TISTR 548.

For increase in expression of genes for HSPs and RSEs, these genes were connected to the *pdc* promoter by In-Fusion cloning with a vector, pZA22. Each recombinant plasmid was introduced into *Z. mobilis* TISTR 548 and the recombinant strain was subjected to two-step cultivation to determine the CHT. Most transformants were able to improve CHT by about one degree, to reduce ROS and to tolerate to oxidative stress compared to the control. Moreover, they were also subjected to growth experiments under various stress conditions. Increased expression of some of the genes was found to enhance tolerance to acetic acid. These findings suggest that ROS-damaged molecules or unfolded proteins that prevent cell growth are accumulated in cells at the CHT.

critical high temperature, thermotolerance, Zymomonas mobilis

発表責任者：Prof. Mamoru Yamada（m-yamada@yamaguchi-u.ac.jp）

講演番号：4A17a11
講演日時：3 月 28 日 11:40～ センター2 号館 A17 会場

Lactobacillus plantarum 環境単離株における莢膜相変異機構による集団適応機構の解析
Phase variation-derived functional differentiation in biofilm of *Lactobacillus plantarum*
○澁澤 薫[1]、江橋 由夏[1]、尾花 望[2,3]、野村 暢彦[3,4] ([1]筑波大・生命環境、[2]筑波大・医学医療系・TMRC、[3]筑波大・MiCS、[4]筑波大・生命環境系)
○Kaori SHIBUSAWA[1], Yuka EHASHI[1], Nozomu OBANA[2,3], Nobuhiko NOMURA[3,4] ([1]Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Fac.TMRC, Med., Univ. Tsukuba, [3]MiCS, Univ. Tsukuba, [4]Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

実環境中において細菌は、細胞と自身が生産する細胞外マトリクスから構成されるバイオフィルム(BF) を形成し、様々なストレスに対する耐性を獲得する。環境常在菌の BF による原材料の汚染は、食品変敗の原因の一つである。乳酸菌の一種である *Lactobacillus plantarum* は、BF を形成することで食品保存料である有機酸や殺菌剤であるエタノールに対して高い耐性能を獲得することが明らかとなっている。つまり *L. plantarum* の形成する BF およびそのストレス耐性獲得機構の理解は、本菌の制御に重要であると考えられる。

これまでの解析の結果、*L. plantarum* 環境単離株を寒天プレートに塗布すると、厚く黄色い Compact colony (Cc) と平たく赤みのかかった Mucoid colony (Mc) の 2 種類のコロニーが出現し、両者は双方向に相変異することが明らかとなった。Mc は Cc より莢膜形成に関与する *cps2* オペロンの発現が大幅に上昇しており、また、Mc は Cc よりも厚い莢膜を有していた。Cc と Mc のゲノム配列を比較したところ、莢膜合成遺伝子群をコードする *cps2* オペロン上流のプロモーター領域を含む配列が逆位することによってプロモーターの向きが変化し、*cps2* オペロンの ON/OFF が制御されていることが示唆された。*csp2* オペロン上流配列の逆位とそれに伴う Cc および Mc の出現は可逆的であることから、実環境中において *L. plantarum* は Cc と Mc が混合した状態した BF を形成し、生存していると考えられる。そこで本研究では Cc と Mc の複合 BF 形成が *L. plantarum* の生残性に与える影響を解明することを目的とした。

共焦点レーザー顕微鏡観察によって Cc と Mc が単独で形成する BF の構造を比較したところ、Cc の BF は Mc の BF より物質表面への付着性が高いことが明らかとなった。このことから、複合 BF 中において、Cc は底面部に局在し、Mc に覆われていることが予想される。今後は Cc と Mc の蛍光レポーター株を作製し、両者の複合 BF 中での局在の詳細を解析する予定である。また、Cc と Mc のそれぞれのストレス耐性を比較したところ、Mc は Cc よりも高い酢酸耐性を有していた。Cc と Mc を 1：1 で混合して培養し酢酸耐性を解析したところ、混合 BF では Cc のストレス耐性が上昇する傾向が観察された。このことから、*L. plantarum* の莢膜相変異は BF 中に異なる性質の細胞を保持させることによって、集団全体の生存率を上昇させる生存戦略として機能することが推測された。

biofilm, lactic acid bacterium, phase variation

講演番号：4A17a12
講演日時：3 月 28 日 11:51～ センター2 号館 A17 会場

酸応答性ヒスチジンキナーゼセンサーEvgS の活性化機構

Activation mechanism of EvgS, an acid responding histidine kinase sensor

稲田 慎也、芝山 健太、○江口 陽子（近畿大生物理工）
Shinya INADA, Kenta SHIBAYAMA, ○Yoko EGUCHI (Kindai Univ.)

細菌に広く保存される二成分制御系 (TCS) は，環境変化をシグナルとして認識し，その情報を菌体内部へと伝えることで環境変化への適応に関わる。シグナルを最初に認識するセンサーは，ヒスチジンキナーゼ活性およびペアとなるレスポンスレギュレーターへのリン酸基転移活性をもち、シグナルを感知すると，これらの酵素活性を活性化あるいは抑制することで，情報を菌体内部へ伝達する。

本研究では，大腸菌の TCS である EvgS/EvgA 系のセンサーEvgS の活性化機構について検討した。EvgS は弱酸性 pH と高濃度のアルカリ金属イオン(Na^+, K^+)を認識して活性化し(1)，酸耐性遺伝子群の発現を誘導することで対数増殖期の菌に酸耐性能を付与する。この活性化条件は宿主のマクロファージ内の環境に相当し、赤痢菌 (*Shigella flexneri*) ではマクロファージ内に菌が侵入すると EvgS/EvgA 系が活性化し、制御下の薬剤排出ポンプである EmrKY の発現が増大することでマクロファージ内での生残に有利になることが報告されている(2)。我々は、EvgS が弱酸性 pH で活性化するには EvgS の細胞質領域も必要であることを報告してきた(1)。そこで，pH の感知に細胞内 pH（細胞膜でのプロトン濃度勾配）が関与するかを検討するために、低濃度の安息香酸カリウムを酸性培地に添加することで細胞内 pH を徐々に変化させて EvgS 活性を測定した。その結果，安息香酸カリウムの添加による EvgS の阻害は 10 μM から認められたのに対し、細胞内 pH の低下は 1 mM から生じ，細胞内 pH と EvgS の活性化には直接の関連は認められなかったが、EvgS の活性化抑制因子として安息香酸カリウムを新たに見出した。さらに、細胞内 pH 測定時に，嫌気条件下では EvgS が全く活性化しないことを見出した。EvgS の膜貫通領域を切り離した細胞質領域のみでは嫌気条件下での不活性化が認められなかったことから、不活性化には EvgS の細胞質領域が膜に近接する必要があった。嫌気条件下での不活性化には EvgS 細胞質領域の PAS ドメイン内の C671 および C683 が必要であり、システイン間のジスルフィド結合がセンサーのオン・オフに関与することが示唆された。また、好気条件下での活性化には電子伝達系の補酵素であるユビキノンが必要であった。

以上の結果より，EvgS の活性化には弱酸性 pH と高濃度のアルカリ金属イオン以外に好気条件が必要であり、活性化シグナルの認識には電子伝達系の補酵素が関与することを見出した。本活性化条件がマクロファージ内の環境に一致するかを考察したい。

(1) Eguchi & Utsumi *J Bacteriol*, 2014, **196**, 3140-3149
(2) Pasqua et al., *Scientific Reports*, 2019, **9**, 2906

Acid sensor, Two-component signal transduction, Redox

発表責任者：江口陽子（eguchi@waka.kindai.ac.jp）

講演番号：4A17a13
講演日時：3 月 28 日 12:02～ センター2 号館 A17 会場

Adaptation of Kluyveromyces marxianus for increase in ethanol production and stress tolerance
○Sornsiri PATTANAKITTIVORAKUL[1], Tatsuya TSUZUNO[2], Tomoyuki KOSAKA[1,2], Mamoru YAMADA[1,2] ([1]Graduate School of Science and Technology for Innovation, Yamaguchi Univ., Japan, [2]Department of Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Yamaguchi Univ., Japan)

Bioethanol is an alternative energy source that is a renewable and environmental friendly. During fermentation process, yeast cells are exposed to various stresses, including ethanol, acetic acid, osmotic pressure, toxic by-products and high temperature, all of which give negative impact on cell viability and ethanol production. Improvement of strains for tolerance of such stresses is thus crucial. This study aimed to improve a thermotolerant yeast strain, *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042 to be tolerant to various stress by a long-term cultivation.

After repetitive cultivation of the strain as temperature was gradually increased from 40 to 45°C, four adapted strains, ACT001, ACT002, ACT003 and TML001 were obtained. Genome sequencing revealed that they have several mutations. Growth and metabolites of adapted strains were examined in yeast extract peptone (YP) broth containing 16% glucose by shaking flask cultivation at high temperature. All adapted strains produced higher concentration of ethanol than the parental strain and TML001 grew faster than the parental strain and other adapted strains. In addition, characterization of stress tolerance of these adapted strains were compared with that of the parent under various stress conditions. Some adapted strains showed higher tolerance against ethanol, acetic acid, formic acid, low pH, furfural and hydroxymethylfurfural (HMF) tolerance than the parental strain. Therefore, a long-term cultivation is useful for improvement of stress resistance of this strain.

long-term cultivation, Kluyveromyces marxianus, stress tolerance

発表責任者：Prof. Mamoru YAMADA（m-yamada@yamaguchi-u.ac.jp）

講演番号：4A17a14
講演日時：3 月 28 日 12:13～ センター2 号館 A17 会場

栄養条件に応答した骨格筋分泌因子 CXCL10 の発現分泌制御

Nutrition dependent CXCL10 regulation in mouse skeletal muscle

○平岩 絵梨花、篠崎 綾香、石内-佐藤 友里、根建 拓（東洋大学）
○ERIKA HIRAIWA, AYAKA SHINOZAKI, Yuri Ishiuchi-Sato, Taku Nedachi (Toyo Univ.)

近年、骨格筋は運動や代謝における機能だけでなく、ホルモン様物質やサイトカインを放出する内分泌器官としての機能を保持することが明らかとなった。この骨格筋から分泌されるタンパク質やペプチドは総称してマイオカインと呼ばれており、特に運動の効果を周囲の組織や体全体に伝達するために重要であることが示唆されている。一方、骨格筋は栄養摂取条件に応答して筋肉肥大や萎縮が引き起こされるなど、複数の生理学的変化を生じることが示唆されているものの、この際のマイオカイン分泌変動に関する知見は少ない。そこで本研究では、過栄養時のマイオカイン分泌変動を明らかにすることを目的とし、高脂肪食摂取マウスにおけるマイオカイン発現変動および培養骨格筋細胞における各種栄養依存的なマイオカイン分泌動態を調べた。

まず、4 週齢の C57BL/6J マウスを通常飼料あるいは脂肪分 60%カロリー比高脂肪飼料で 10 週間飼育した後、骨格筋（前脛骨筋、長趾伸筋、大腿四頭筋、ヒラメ筋）を採取してマイオカイン遺伝子発現変動を調べたところ、高脂肪食摂取群においてマイオカインの一つである Cxcl10 遺伝子の発現が増加する傾向にあることが分かった。次に、過栄養状態におけるどのような栄養成分が Cxcl10 の分泌増加を促進するか調べるため、マウス骨格筋由来 C2C12 筋管細胞を異なる濃度のグルコースあるいは脂肪酸存在下で 24 時間培養し、Cxcl10 の遺伝子発現および分泌量を調べた。その結果、高グルコース条件下（4.5 g/L glucose)あるいは高飽和脂肪酸（1.0 mM パルミチン酸)条件下で培養することにより、CXCL10 の遺伝子発現量、分泌量ともに有意に増加していることが明らかとなった。さらに高飽和脂肪酸条件下における CXCL10 上昇は不飽和脂肪酸（1.0 mM パルミトレイン酸)の添加によって抑制されることも分かった。すなわち、マウスの血中グルコース濃度の上昇あるいは飽和脂肪酸の存在比が上昇することによって CXCL10 の発現分泌は促進されることが考えられる。

当研究室では､運動によって骨格筋における CXCL10 の発現分泌が減少することを報告してきたが､本研究によって過栄養状態になると CXCL10 の発現分泌は逆に増加することが示された。今回着目した新規マイオカイン CXCL10 は強力な血管新生抑制作用を保持していることが知られている。過栄養を原因とする糖尿病や肥満が生じると血管密度は減少するが、本研究で見出した栄養依存的な骨格筋由来 CXCL10 発現分泌上昇は、このような血管密度減少を説明するメカニズムのひとつかもしれない。

skeletal muscle, myokine, nutrition

講演番号：4A17a15
講演日時：3 月 28 日 12:24～ センター2 号館 A17 会場

酵母を用いた代謝活性化型エピ変異原検出法の構築

Establishment of a yeast-based bioassay system for detection of epigenetic toxicity due to metabolic activated chemical

○杉山 圭一、木下 麻緒、本間 正充（国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部）
○Kei-ichi SUGIYAMA, Mawo KINOSHITA, Masamitsu HONMA (Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences)

【背景および目的】エピゲノム機構の破綻は、ゲノム安定性の低下による発がんの一因とされる。エピゲノム機構となる DNA メチル化やヒストン修飾、また同変化に伴い制御される高次クロマチン構造情報（非ゲノム情報）にかく乱作用を及ぼすエピ変異原活性に、代謝活性化を考慮した細胞レベルの検出系は現時点ではない。一方、ゲノム情報に変化を引き起こす変異原性は、肝臓での代謝活性化を必要とするものも少なくない。我々はヒト DNA methyltransferase （*DNMT*）遺伝子形質転換酵母（*DNMT* 酵母）で発現促進される凝集遺伝子 *FLO1* がエピジェネティック制御下にあることを見出し、この凝集性と同遺伝子発現を指標とした微生物ベースのエピ変異原検出系「FLO assay」の妥当性について検討している [1, 2]。既に FLO assay により、元既存添加物成分のアリザリンやかび毒の一部からはエピ変異原性が検出されている。本研究では、エピ変異原作用が疑われる環境化学物質 Bisphenol A（BPA）を用いて、FLO assay を基盤に代謝活性化を介すエピ変異原検出システムの開発を試みた。
【方法】*DNMT* 酵母には、DNA 維持メチル化酵素 *DNMT1* と新規メチル化酵素 *DNMT3B* 遺伝子発現プラスミドを出芽酵母に同時形質転換した株を用いた。代謝活性化にはラット肝 S9 画分（S9 mix）を使用した。代謝活性化処理後の BPA 存在下にて *DNMT* 酵母を静置培養後、凝集レベルは画像より半定量化し、*FLO1* の転写レベルは RT-PCR および GFP を用いた *FLO1* レポーターアッセイ系により解析した。得られる FLO assay の結果検証の観点から、BPA の主要な活性代謝物である 4-Methyl-2, 4-bis(ρ-hydroxyphenyl)pent-1-ene（MBP）についても、代謝活性化未処理の条件で同様の解析を行った。
【結果および考察】*FLO1* 転写レベルは、*DNMT* 酵母において S9 mix 存在下でのみ BPA（10-40 μM）により抑制されることが明らかとなった。一方、同抑制作用は DNMT の基質となる CpG 配列の一部を TpA に置換したレポーター活性においては減弱した。また、S9 mix 存在下において *DNMT* 酵母の凝集性は BPA により抑制されることを見出した。代謝活性化処理された BPA により得られたこれら一連の FLO assay の結果は、S9 mix 非存在下で MBP を被検物質とした FLO assay の結果と類似性を示すことも確認された。本研究は、代謝活性化を受けた BPA により生じる代謝産物は DNA メチル化を阻害する可能性、即ち代謝活性化を要するエピ変異原の存在と、酵母凝集反応をメルクマールとした FLO assay を基盤に代謝活性化型エピ変異原の検出が可能であることを示唆している。

[1] Sugiyama, K., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **456,** 689-694 (2015).
[2] Sugiyama, K., *et al.*, *Mutagenesis*. **32,** 429-435 (2017).

yeast, epigenetic modifier, metabolic activation

発表責任者：杉山圭一（sugiyama@nihs.go.jp）

講演番号：4A18a01
講演日時：3 月 28 日 09:30～ センター2 号館 A18 会場

分裂酵母の窒素シグナリング因子を介した細胞間コミュニケーションにおける受容機構の解明
Clarifying the mechanism of intercellular communication by nitrogen signaling factors in *Schizosaccharomyces pombe*.

○橋本 莉央[1,2]、八代田 陽子[2]、大澤 晋[1]、平井 剛[3]、森山 裕充[2]、吉田 稔[1,4]([1]理研 CSRS・ケミカルゲノミクス、[2]東京農工大院・農、[3]九州大院・薬、[4]東大院農・応生工、微生物連携機構)
○Rio HASHIMOTO[1,2], Yoko YASHIRODA[2], Shin OSAWA[1], Go HIRAI[3], Hiromitsu MORIYAMA[2], Minoru YOSHIDA[1,4] ([1]Chem. Genomics Res. Gr., RIKEN CSRS, [2]Tokyo Univ. of Agri. & Tech., [3]Kyusyu Univ., [4]Dept. Biotechnol. & CRIIM, Univ. Tokyo)

微生物は様々な栄養環境に適応して生存していくために栄養源の取り込みを巧妙に調節している。分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* は、環境中の窒素源の種類に応じて、それらの取り込みを制御する。資化しやすい窒素源と資化しにくい窒素源が存在している環境では、資化しにくい窒素源の取り込みを制御し、積極的に資化しやすい窒素源を取り込んでおり、この機構を「窒素カタボライト抑制」という。分岐鎖アミノ酸（ロイシン、イソロイシン、バリン）アミノ基転移酵素である Eca39 が欠損している変異株（*eca39Δ* 株）は、分岐鎖アミノ酸を合成できないので分岐鎖アミノ酸を取り込まなければならない。*eca39Δ* 株は、資化しやすい窒素源が存在すると分岐鎖アミノ酸を添加した培地であっても、窒素カタボライト抑制が起こるため、生育することができない。しかし、同一培地にて野生型株の近傍で培養すると生育できるという適応生育現象が観察された（Takahashi et al., 2012)。この現象は、野生株と *eca39Δ* 株間で何らかの細胞間コミュニケーションがあり、*eca39Δ* 株の窒素代謝の変化が起こったことを示す。我々は、分裂酵母から分泌される細胞間コミュニケーション分子であるオキシリピンを同定した。このオキシリピンが *eca39Δ* 株の窒素カタボライト抑制の解除を誘導し、適応生育を引き起こしたので、窒素シグナリング因子（NSF）と命名した（Sun et al., 2016)。NSF による適応生育現象は、ロイシン要求性の *leu1-32* 変異株でも観察することができた。
本研究では、NSF の受容機構に関与する遺伝子を遺伝学的手法により網羅的に探索することで、NSF の関与する適応生育機構を解明することを目的としている。
leu1-32 あるいは *eca39Δ* と非必須遺伝子の二重破壊株を作製し、野生株の近傍で適応生育できない株をスクリーニングしたところ、NSF 作用後に機能するアミノ酸トランスポーターをコードする遺伝子としてすでに同定していた *agp3* のほかに、液胞局在のアミノ酸トランスポーターをコードする *stm1* や G タンパク質共役受容体をコードする *git3* が含まれていた。これらの遺伝子とは逆に、変異によって野生株の近傍でなくても窒素カタボライト抑制が解除されて生育可能となる遺伝子も同定された。NSF を介した窒素代謝制御機構の解明により、分裂酵母のみならず微生物の生存戦略を詳らかにすることが期待できる。

Nitrogen catabolite repression, *Shizosaccharomyces pombe*, Screening

講演番号：4A18a02
講演日時：3 月 28 日 09:41～ センター2 号館 A18 会場

分裂酵母における栄養源感受性変異株の探索と解析

Screening and analysis of nutrient-sensitive mutants in Schizosaccharomyces pome

○三浦 俊一[1]、八代田 陽子[2]、西村 慎一[1,3]、松山 晃久[2,3]、吉田 稔[1,2,3]([1]東大農、[2]理研 CSRS、[3]微生物連携機構)
○Shunichi MIURA[1], Yoko YASHIRODA[2], Shinichi NISHIMURA[1,3], Akihisa MATSUYAMA[2,3], Minoru YOSHIDA[1,2,3] ([1]Tokyo Univ., [2]RIKEN CSRS, [3]CRIIM)

解糖系や TCA 回路などのエネルギー代謝に代表される細胞内の代謝経路は、生命科学黎明期からの生化学的アプローチと近年のゲノム情報の解読によりほとんどが理解されている。ところが細胞が生きていく上で必要であるはずの、細胞外の栄養状態をモニターするシステムや、代謝経路を変調・調節する機構についてはあまり知られていない。我々の研究グループは、分裂酵母には窒素カタボライト抑制（細胞外に「資化しやすい窒素源」と「資化しにくい窒素源」が存在する場合に「資化しやすい窒素源」を優先的に取り込み、「資化しにくい窒素源」の取り込みを抑制するシステム）が存在し、それがフェロモン様分子 Nitrogen Signaling Factor (NSF)により制御されることを報告している。すなわち窒素カタボライト抑制により抑制されている「資化しにくい窒素源」を合成できない変異株の生育が、野生株の近傍では野生株が分泌する NSF により回復する。NSF は周辺に存在する細胞の栄養源取り込みを制御する新しいフェロモン様分子であり、我々は他にも知られていない代謝調節因子が存在すると期待している。

そこで我々は新規の代謝調節機構の発見を目的として、分裂酵母の遺伝子破壊株コレクションを用いた網羅的スクリーニングを行った。まず特定の栄養源の有無による増殖能の変化を指標に変異株（栄養源感受性変異株）の取得を試みた。遺伝子破壊株 3240 株から富栄養培地で生育し、最少培地では生育しない株をスクリーニングした結果、86 株を単離した。これらの中には予想通りアミノ酸代謝に関わる遺伝子が含まれていた一方で、アミノ酸代謝とは直接関係しないと推定される遺伝子の破壊株も数多く含まれていた。

次に取得された 86 株を用いて野生株の存在により適応生育が見られる株を探索したところ、39 株がこの表現型を示した。これは野生株が NSF のようなフェロモン様分子や栄養素自体を分泌している可能性を示唆しており、実際、このうち 6 株はシステインの生合成に関連する遺伝子の破壊株であることからシステインの分泌が疑われた。さらに別の 22 株は、野生株の培養上清の添加により適応生育を示したが、それらのうち 10 株は電子伝達系に関連する遺伝子が破壊されていることから、好気呼吸が適応生育に深く関わっていることが示唆された。本発表ではこれら遺伝子欠損株の単離に至ったスクリーニング過程とその後の遺伝学的な解析について報告する。

Fission yeast, Nutrient sensing, Metabolic regulation

講演番号：4A18a03
講演日時：3 月 28 日 09:52～ センター2 号館 A18 会場

PAF 複合体-SAGA 複合体を介した窒素カタボライト抑制制御機構の解明
Regulation of repression of nitrogen catabolite repression through PAF and SAGA complex
○大澤 晋[1]、八代田 陽子[1]、吉田 稔[1,2] ([1]理研 CSRS・ケミカルゲノミクス、[2]東大院農　応生工、微生物連携機構)
○Shin OHSAWA[1], Yoko YASHIRODA[1], Minoru YOSHIDA[1,2] ([1]Chem. Genomics Res. Gr., RIKEN CSRS, [2]Dept. Biotechnol. & CRIIM, Univ. Tokyo)

カタボライト抑制とは、資化しやすい栄養源を効率よく利用するために、資化しにくい栄養源の代謝や細胞内への取り込みを厳しく抑制する機構である。カタボライト抑制により、多くの微生物は、産業や実験室内での培養において旺盛な生育を示す。一方、様々な栄養が混在している培地においてはカタボライト抑制が生育に不利に働く例が報告されている。そのため、自然界などカタボライト抑制が不利に働く環境下ではその抑制解除機構が重要な生存戦略となると考えられる。

我々はこれまでに分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の窒素カタボライト抑制において、分裂酵母が分泌する新奇脂肪酸誘導体を介した細胞間コミュニケーションによって、窒素カタボライト抑制が解除される現象を見出した。また、分裂酵母非必須遺伝子破壊株ライブラリーを用いたスクリーニングにより、RNA polymerase II-associated factor (PAF) 複合体の構成因子をコードする *prf1*$^{+}$遺伝子が窒素カタボライト抑制解除に重要な機能を示すことも明らかとなった。PAF 複合体は結合する RNA pol II の転写伸長制御だけでなく、Histone H2B ubiquitin ligase complex (HULC) と相互作用し、H2B のユビキチン化 (H2Bub) を制御する。これら PAF 複合体や HULC 構成タンパク質をコードする遺伝子の破壊株の解析により、PAF 複合体と HULC が窒素カタボライト抑制解除に関連することがわかった。また H2Bub を脱ユビキチン化することが報告されている SAGA 複合体は PAF 複合体や HULC とは逆に窒素カタボライト抑制の維持に重要であることも見出した。さらに SAGA 複合体の構成因子である Gcn5 のアセチル化酵素活性も窒素カタボライト抑制の維持に重要であることがわかった。これらの結果から、PAF 複合体や HULC、SAGA 複合体によるユビキチン化やアセチル化制御によって窒素カタボライト抑制が厳密に制御されることが明らかとなった。我々は、PAF 複合体や SAGA 複合体によって転写量が制御され、窒素カタボライト抑制制御に関連する遺伝子を見出すために *prf1*$^{+}$遺伝子破壊株、*gcn5*$^{+}$遺伝子破壊株を用いてトランスクリプトーム解析を行った。その結果、セリンスレオニンキナーゼをコードする *ppk33*$^{+}$遺伝子と機能未知の小胞体膜タンパク質 *spbc1271.08c*$^{+}$遺伝子が窒素カタボライト抑制制御に重要であることが示唆された。

fission yeast, catabolite repression, PAF complex

講演番号：4A18a04
講演日時：3 月 28 日 10:03～ センター2 号館 A18 会場

分裂酵母の細胞形態形成制御因子による胞子形成開始の調節機構の解析
Regulation of sporulation initiation by two signaling pathways involved in the cell morphogenesis in fission yeast
○落合 竜季[1]、森 麻里子[1]、中村 太郎[2]、今田 一姫[1,2] ([1]鈴鹿高専・生物応用化学、[2]大阪市大・院理)
○Tatsuki Ochiai[1], Mariko Mori[1], Taro Nakamura[2], Kazuki Imada[1,2] ([1]NIT, Suzuka College, [2]Osaka City Univ.)

分裂酵母は普段、細胞分裂を行いながら増殖している。しかし、窒素源がなくなると減数分裂の進行に伴って胞子形成を行う。分裂酵母の胞子形成では、母細胞の細胞膜を直接受け継ぐことなく新たに細胞膜を作り、胞子の細胞を形成する生物学的に非常に興味深い現象である。我々は、この分裂酵母の胞子形成開始がどのように調節されているのかを明らかにすることを目的として研究している。

これまでに、胞子形成の開始は減数分裂時特異的に発現する Spo4-Spo6 キナーゼによって制御されていることが知られている。また、細胞質分裂の開始を調節する SIN 経路は、第二減数分裂時 Spo4-Spo6 依存的に活性化されることが分かっている。栄養増殖時、SIN 経路の下流には極性成長を調節する MOR 経路が存在する。そこで我々は、SIN 経路と MOR 経路の胞子形成への関与を調べた。その結果、SIN 経路および MOR 経路は Spo4-Spo6 と同様に胞子形成開始にも必要であることが示唆された。

次に、Spo4-Spo6、SIN 経路、MOR 経路の因子間での遺伝的相互作用を調べた。その結果、MOR 経路に異常を示す *mor2* 変異株に *spo4*$^{+}$ または *spo6*$^{+}$ を含むマルチコピープラスミドを導入すると胞子形成率に回復が見られた。また、*spo4* 変異株に SIN 経路因子の遺伝子（*cdc7*$^{+}$）のマルチコピープラスミドを導入すると胞子形成能が回復した。このことから、MOR 経路は Spo4-Spo6 を、Spo4-Spo6 は SIN 経路を制御し、これによって胞子形成を開始させる可能性が示唆された。これは SIN 経路の下流に MOR 経路が存在する細胞分裂とは異なる制御関係であり、新奇の制御機構といえる。現在、この仮説を局在制御の観点から検証している。

yeast, sporulation, morphogenesis

講演番号：4A18a05
講演日時：3 月 28 日 10:14～ センター2 号館 A18 会場

L-トリプトファンによる分裂酵母 *S. pombe* の生育阻害
Growth inhibition of *S. pombe* by L-tryptophan
○北村 憲司[1,2]、永島 直翔[2] ([1]広島大・自然研セ、[2]広島大・統合生命)
○Kenji KITAMURA[1,2], Naoto NAGASHIMA[2] ([1]N-BARD, Hiroshima Univ., [2]Hiroshima Univ.)

多様な配列のジ・トリペプチドを細胞内に輸送する POT ファミリー輸送体(酵母の Ptr2)について調べる過程で、我々は L-トリプトファン(Trp)を含む直鎖ジペプチドが分裂酵母 *S. pombe* の増殖を強く阻害すること、アミノ酸単量体の L-Trp も弱いながら類似の効果を持つことを見つけた。*S. pombe* の増殖阻害には Trp ジペプチドが細胞内に取り込まれる必要があり、Trp に関連する数種の物質も阻害効果を示した。Trp は蛋白質合成に利用される他、出芽酵母 *S. cerevisiae* では、キヌレニン経路によってキノリン酸（NAD の de novo 合成の基質）に、またはエールリッヒ経路でトリプトフォールにに代謝されるが、*S. pombe* はキヌレニン経路を持たない。*S. cerevisiae* のエールリッヒ経路で最初に働く *ARO8* 及び類似の *ARO9* に相同性を示す *S. pombe* の３つの遺伝子(*aro8a, b, c* と命名)の各々を破壊すると、*aro8a* の破壊株のみフェニルアラニン要求性を示すものの、いずれも生育自体には大きな影響はなかった。フェニルアラニン要求性は *S. cerevisiae* の *ARO8* 遺伝子の強制発現で相補され、*ARO9* 遺伝子でも弱いながら相補した。*S. pombe* の *aro8a* 株は Trp に高感受性になったが、３つの相同遺伝子の同時破壊でも相乗効果や致死性は見られず、*aro8a* は他の２つの相同遺伝子(*aro8b, aro8c*)とは協調せず独自に機能していた。

アミノ酸の Trp による *S. pombe* の増殖阻害は培地の窒素源に影響を受け、質的に劣るプロリンが窒素源だと強い増殖阻害効果があるが、アンモニアでは阻害効果は弱く、またプロリン窒素源時の感受性をキャンセルできるアミノ酸もあった。Trp の効果は殺菌的ではなく、生存率の極端な減少は認められない。Trp 存在下で液体培養を続けると徐々に生育が回復したが、生育した細胞を再度 Trp 含有培地に移すと依然として感受性を示し、耐性細胞が生じて生育したわけではなかった。更に、プロリンが窒素源の場合など、増殖阻害が強い条件では色素が生産されて培地が褐変した。色素生産は *aro8a* に依存し、エールリッヒ経路の後半で働く出芽酵母の *ARO10* を強制発現すると、色調が薄くなるとともに、増殖阻害も弱まった。*aro8a* の発現増強でも阻害が緩和されたので、増殖阻害は Trp 自体か、（存在の証拠はないが）エールリッヒ経路以外の反応で代謝・生成された何らかの物質が原因と考えられる。増殖停止時の細胞周期進行への影響などを含め、Trp の細胞生育阻害の詳しい機構について調べている。

S. pombe, amino acid, growth inhibition

発表責任者：北村憲司（kkita@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：4A18a06
講演日時：3 月 28 日 10:35～ センター2 号館 A18 会場

分裂酵母における長寿命原因遺伝子の同定及び細胞間情報伝達による寿命延長機構の解明

Identification of a responsible gene for chronologically long-lived mutant of fission yeast and elucidation of a mechanism of the life extension by intercellular communication

○唐澤 健太、刈谷 静夏、高久 洋暁、山崎 晴丈（新潟薬大・応生科）
○Kenta KARASAWA, Shizuka KARIYA, Hiroaki TAKAKU, Harutake YAMAZAKI (Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci.)

細胞レベルの寿命研究は　、近年急速に問題になっている高齢化社会における健康寿命の増進にも寄与すると考えられる。これまで寿命研究は、ヒト、サル、マウスなどの哺乳類だけでなく、それよりも下等な線虫、ハエ、酵母などでも研究が行われてきた。これまでに酵母で発見された寿命制御因子・老化機構は他の生物種でも共通性が見られること、また酵母は他の生物と比べ寿命が非常に短いことから、酵母は寿命研究を行う上で有力なモデル生物であると考えられている。酵母の寿命研究は大別して、分裂細胞モデルである複製寿命と非分裂細胞モデルである経時寿命　（栄養源が枯渇してからの生存期間）の研究に分けられる。前回大会では、我々は分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* において、野生型株と比較し経時最長寿命が 2 倍以上である KK268 株を見出したことを報告した [1)]。KK268 株は、増殖期細胞では酸化ストレス・熱ストレス耐性を示したが、定常期細胞ではどちらも野生型株と同程度であった。また、定常期 5 日目以降の KK268 株の培養液で野生型株を培養したところ、野生型株の寿命が延長したことから、KK268 株の培養液に寿命延長を惹起する分泌物質が存在する可能性が考えられた。しかしながら、KK268 株の長寿命原因遺伝子変異及び分泌物質は未同定である。

本研究では KK268 株の長寿命原因遺伝子の同定を行った。KK268 株の全ゲノム配列を読み、野生型株とのゲノム比較解析を行ったところ、蛋白質のアミノ酸置換を伴う塩基の変異が 16 か所で確認された。そこで、すべての変異点に対して、KK268 株の変異点を野生型に戻した株を作製したところ、TATA 結合タンパク質を解離し転写を制御する因子をコードする *mot1*$^{+}$の変異戻し株で野生型と類似した表現型を示すことが確認された。また、野生型株への *mot1*$^{+}$変異導入株においても野生型株と比較し、寿命延長が確認された。続いて、*mot1*$^{+}$変異導入株の培養液で野生型株を培養したところ、KK268 株の培養液で野生型株を培養したものと同等の寿命延長効果が見られた。これらの結果から、KK268 株の長寿命原因遺伝子として *mot1*$^{+}$の変異が考えられた。Mot1 は広範な遺伝子発現に関与すると考えられており、現在，*mot1*$^{+}$変異によって発現が変化する遺伝子を網羅的に解析中である。

1) 唐澤健太ら　2019 年度農芸化学会講演要旨 3C1a01

chronological life span, fission yeast

発表責任者：山崎晴丈（hyamazaki@nupals.ac.jp）

講演番号：4A18a07
講演日時：3 月 28 日 10:46～ センター2 号館 A18 会場

分裂酵母に存在する 2 つの DDK-Dbf4 キナーゼ複合体の役割分担および機能発現メカニズムの解明
Two DDK-Dbf4 kinase complexes in fission yeast

○葉山 菜央、中村 太郎（大阪市大・院理）
○Nao HAYAMA, Taro NAKAMURA (Osaka City Univ.)

【目的】DDK（Dbf4-Dependent-Kinase）はすべての真核生物で保存され、DNA 複製に必須の役割を果たすプロテインキナーゼである。また、DDK は調節サブユニット Dbf4 と複合体を形成し、機能することが知られている。多くの真核生物では DDK 複合体は Cdc7-Dbf4 として 1 セット存在するのに対し、分裂酵母では Hsk1-Him1 と Spo4-Spo6 の 2 セットが同定されている（下図）。Hsk1-Him1 と Spo4-Spo6 はそのアミノ酸配列、構造において高い相同性を持つが、機能は全く異なっている。Hsk1-Him1 は主に DNA 複製の開始に関わるが、Spo4-Spo6 は第二減数分裂の開始および前胞子膜形成に関わる。本研究では、DDK を 2 セット持つ分裂酵母を用いて、DDK の役割分担および、DDK の機能発現メカニズムを解明することを目的とする。

【方法および結果】*hsk1*Δ は致死であり、*spo4*Δ は胞子形成欠損を示すことが知られている。分裂酵母の DDK および Dbf4 について、以下の実験を行った。

① *hsk1*Δ で Spo4 を過剰発現させたところ、致死性が回復した。一方、*spo4*Δ で Hsk1 を過剰発現させても、胞子形成欠損は回復しなかった。

② 既知の組み合わせとは異なる DDK と Dbf4 の間で結合するか調べたところ、Spo4 と Him1 は結合できた。一方、Hsk1 と Spo6 は結合しなかった。

これらの結果から、新たな複合体 Spo4-Him1 が存在する可能性が示唆された。今後は、Spo4-Him1 複合体が持つ機能や、Hsk1 と Spo4 における役割分担について解析を進め、DDK 複合体の機能発現がどのように制御されているのか明らかにしていきたい。

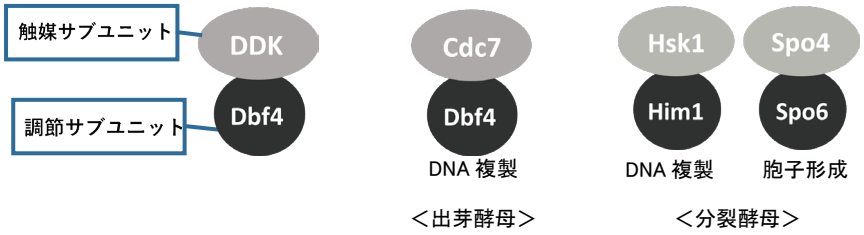


図 DDK-Dbf4 セットの模式図

DNA replication, spore, kinase

講演番号：4A18a08
講演日時：3 月 28 日 10:57～ センター2 号館 A18 会場

出芽酵母 S-アデノシルメチオニントランスポーターSAM3 が関与する寿命延長機構の解析
Analysis of SAM3, which encodes S-adenosyl methionine transporter, in the regulation of lifespan in budding yeast

○近石 祐希[1]、久米 一規[2]、水沼 正樹[2] ([1]広島大工、[2]広島大院・統合生命)
○ Yuuki CHIKAISHI[1], KAZUNORI KUME[2], MASAKI MIZUNUMA[2] ([1]Hiroshima Univ., [2]Hiroshima Univ. Grad. Sch. Int. Sci. for life)

[目的] 近年、モデル生物を用いた解析により寿命は遺伝子レベルでも制御され、それに関わる経路や分子が徐々に明らかになってきた。寿命制御関与メカニズムの理解は、生活習慣病などの加齢による疾患の理解にもつながることから、本制御機構の解明はヒトの健康寿命の延長の基盤研究としても極めて重要である。特に出芽酵母は他のモデル生物より寿命が短く、寿命・老化の基盤研究を進める上で大きなメリットとなるため、老化・寿命研究における最もシンプルなモデル生物として利用されている。

これまでに我々は、メチオニン代謝経路が関与する寿命延長機構を明らかにするために、生体内のメチル基供与体として知られている *S*-アデノシルメチオニン(SAM)を高蓄積する長寿変異株を取得した。この寿命延長は SAM 合成の促進が重要であることを見出した。本メカニズム解明の過程で、細胞膜に局在する高親和性 SAM トランスポーター*SAM3* の破壊株が野生株よりも顕著に長寿となることを見出した。そこで、本研究では*Δsam3* 破壊株の寿命延長機構を解明することを目的とした。

[方法・結果] まず、*Δsam3* 破壊株のストレス耐性について調べたところ、熱ストレスに耐性を示すことがわかった。また、栄養応答経路である TOR(target of rapamycin)経路は翻訳制御やオートファジーなどを介して寿命を制御し、免疫抑制剤 Rapamycin によって阻害されることが知られている。そこで、Rapamycin に対する耐性及びオートファジー活性レベルについても調べた。その結果、Rapamycin に対し強い感受性を示し、オートファジーが促進された。以上の結果から、*Δsam3* 破壊株における寿命延長には TOR 経路が関与することが示唆された。現在、*Δsam3* と TOR 経路との関連、さらに別の経路ついて解析中である。

Budding yeast, longevity, SAM3

発表責任者：近石祐希（b161914@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：4A18a09
講演日時：3 月 28 日 11:08～ センター2 号館 A18 会場

出芽酵母の寿命延長に関わる Ssg1 の機能解析
Functional analysis of the Ssg1 involved in lifespan control of budding yeast
○益村 晃司[1]、久米 一規[2]、水沼 正樹[2] ([1]広島大院・先端研、[2]広島大院・統合生命)
○Koji MASUMURA[1], Kazunori KUME[2], Masaki MIZUNUMA[2] ([1]Hiroshima Univ. Grad. Sch. of Adv. Sci. of Mat., [2]Hiroshima Univ. Grad. Sch. of Int. Sci. for Life)

老化・寿命制御機構の解明は、ヒトの健康寿命や寿命延長のための重要なテーマである。近年、生体内のいくつかの代謝産物が寿命制御に関与することが注目されているが、その制御機構の詳細は未だ不明な点が多い。我々は特に、老化・寿命メカニズム解明の単細胞モデル生物である出芽酵母を用いて研究を行っている。

メチオニン代謝経路において、*S*-アデノシルメチオニン(SAM)は、生体内の主要なメチル基供与体としてタンパク質、核酸、リン脂質など様々な物質のメチル化反応に利用される。SAM はメチル基を供与後、*S*-アデノシルホモシステイン(SAH)となる。SAH は SAM のメチル化反応を競合的に阻害するため、SAH 水解酵素 *SAH1* によって速やかに分解される。我々は、*SAH1* 遺伝子に変異を有する *sah1* 変異株を取得し、顕著な増殖遅延と短命を示すことを見出した。そこで、*sah1* 変異株の増殖遅延の抑圧を指標にスクリーニングを実施し、その抑圧変異株 *SSG1* (Spontaneous Suppressor of Growth-delay in *sah1*)を取得した。期待通り、*SSG1* 変異は *sah1* 変異株の増殖遅延を抑圧し、短命を抑圧するだけでなく野生株より経時的寿命(定常期以降、分裂を停止した細胞が限られた栄養下で生存できる期間)が延長した。さらに、野生株に比べて SAM および SAH を高蓄積した。このことから、Ssg1 は SAM/SAH が関わる新規寿命延長因子であると予想し、Ssg1 の機能を明らかにすることを目的とした。

SSG1 変異の原因遺伝子は機能未知の *YHR032W* 遺伝子であった。興味深いことに、清酒酵母などの実用酵母は元来 *SSG1* 変異を野生型としてもち、実験室酵母の *YHR032W* が変異していたことがわかった。つまり、*SSG1* 変異は本来の機能を取り戻した遺伝子と予想された。次に、変異点を調べたところ *SSG1* 変異は、*YHR032W* 遺伝子内にフレームシフト変異が生じ *YHR032W* より 36 アミノ酸分大きくなっていた。さらに、*SSG1* および *YHR032W* はともに変異点より N 末端側にイオン濃度勾配を利用して多剤を排出する MATE ファミリートランスポーターと相同な配列を持つことがわかった。そこで、Ssg1 の N 末端に EGFP を融合した株を構築し局在を観察した結果、Yhr032W は明確な局在が観察されなかったが、Ssg1 は液胞膜に局在した。Ssg1 が液胞膜に局在したことから、細胞を液胞画分と細胞質画分に分画し、それぞれの SAM/SAH 量を測定したところ、液胞に SAM/SAH が高蓄積した。以上のことから、Ssg1 は SAM および SAH を液胞内に輸送するトランスポーターであると予想し、現在、SAM/SAH の液胞への輸送と寿命延長との関連を解析している。

Budding yeast, lifespan, methionine metabolism

発表責任者：益村晃司（m186862@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：4A18a10
講演日時：3 月 28 日 11:19～ センター2 号館 A18 会場

出芽酵母における経時寿命の一細胞解析
Single-cell analysis of chronological lifespan in *Saccharomyces cerevisiae*
○鈴木 健太[1]、青井 議輝[1,2]、中島田 豊[1,2]、加藤 節[1,2] ([1]広島大院先端研、[2]広島大院統合生命)
○Kenta SUZUKI[1], Yoshiteru AOI[1,2], Yutaka NAKASHIMADA[1,2], Setsu KATO[1,2] ([1]Hiroshima Univ. Graduate school of advanced science of matter, [2]Hiroshima Univ. Graduate school of integrated sciences for life)

【目的】
ヒトの寿命延長を目的として、現在までに多様な生物種を用いて寿命研究が行われてきた。その中でも出芽酵母は、世代時間が短い、ゲノム情報が整備されているなどの利点から優れたモデル生物である。出芽酵母をモデル生物とした寿命研究では、定常期において細胞が死滅するまでの時間である経時寿命がよく用いられる。この経時寿命の延長または短縮に関連する遺伝子がそれぞれ、長寿または短命遺伝子とされている。しかし、この長寿、短命という表現型は細胞を均一な集団とするものであり、個々の細胞に注目すると野生株でも長寿変異株でも細胞集団内において早く死ぬ細胞と遅く死ぬ細胞が存在している。本発表では、この”細胞が死ぬ順番”は何に起因しているのかを明らかにすることを目的として、1 細胞レベルでの寿命研究を行うための生死判別、画像解析技術の開発および、開発技術を用いた研究成果を報告する。
【方法と結果】
1 細胞レベルでの寿命を測定するためには、顕微鏡下で生死判定する必要がある。そこで、Propidium Iodide(PI)を用いた顕微鏡観察による細胞の生存率とコロニー形成能（CFU）を指標として生存率を比較した。その結果、PI に基づく生存率は CFU に基づく生存率と相関があり、1 細胞レベルでの経時寿命測定方法として利用可能であることが示された。また、顕微鏡の位相差写真から細胞を認識し、細胞サイズを測定する自動化システムを ImageJ と MATLAB を用いて開発した。上記技術を用いて、定常期の細胞を観察したところ、定常期初期において、サイズの小さい細胞の PI 蛍光強度が高くなったことから、サイズ依存的な細胞死の存在が示唆された。しかし、PI 添加条件下で死の前後の細胞を観察したところ、細胞は死ぬと収縮し小さくなるという現象を発見した。これは、死んだ後の細胞を観察するだけでは、サイズ依存的な細胞死があるのか、それとも単に死細胞が収縮してしまっただけなのか判断できないことを意味する。そこで、現在、PI を添加したアガロースパッドに定常期細胞を多数固定化し、さらに長期の一細胞タイムラプス観察を行っている。これにより、死細胞の生存時のサイズや生理学的パラメーターを系統的に得ることが可能である。この手法を用いて、サイズ依存的な細胞死が存在するのかどうかを詳細に調べている。

Saccharomyces cerevisiae, Chronological lifespan, Single-cell analysis

講演番号：4A18a11
講演日時：3 月 28 日 11:40～ センター2 号館 A18 会場

翻訳因子 eIF5A による酵母の代謝調節機能の研究
Studies on metabolic regulation by eIF5A, a translation factor, in yeast
○高橋 匠[1]、近藤 直子[2]、白井 温子[2]、ヒルバート マグパンタイ[1,2]、松山 晃久[1,2]、吉田 稔[1,2,3] ([1]東大農、[2]理研 CSRS、[3]東京大学 微生物科学イノベーション連携研究機構)
○Takumi Takahashi[1], Naoko Kondo[2], Atuko Shirai[2], Magpantay Hilbert[1,2], Akihisa Matuyama[1,2], Minoru Yosida[1,2,3] ([1]Univ. of Tokyo, [2]CSRS, [3]CRIIM)

eIF5A（eukaryotic translation initiation factor 5A）は「ハイプシン化」と呼ばれる翻訳後修飾を受ける翻訳伸長因子である。ハイプシン化は 2 つの酵素による二段階反応によって触媒され、一段階目の反応で骨格となるデオキシハイプシンが、二段階目の反応で水酸基がそれぞれ付加されて成熟型となり、プロリンが連続した配列（PPP PPG 等）を含むタンパク質の翻訳を促進させることが近年明らかになっている。また、分裂酵母において二段階目の反応を触媒する Mmd1 をコードする遺伝子を破壊すると、顕著なミトコンドリアの局在異常が観察される。そこで我々は、なぜハイプシン化の異常がミトコンドリアの機能欠損につながるのかを明らかにすべく、*mmd1* 遺伝子破壊株で発現レベルに影響を受けるタンパク質を網羅的にスクリーニングした結果、主に呼吸鎖複合体など、いくつかのミトコンドリアの好気呼吸関連タンパク質が特異的に減少することを見出した。また、*mmd1* 遺伝子破壊株は好気条件下でもアルコール発酵が促進されていることが明らかになった。このことから、eIF5A を介した新規の呼吸代謝機構の存在が明らかになった。

一方で、eIF5A はアセチル化を受けることも分かっているが、その役割についてはほとんど未解明である。当研究室では翻訳後修飾に着目したタンパク質の機能解析を幅広く行ってきた経緯から、eIF5A のアセチル化の役割に早くから注目していた。まず、eIF5A のアセチル化に関連する酵素の同定を試みた結果、主たるアセチル化酵素として Nat9 が、脱アセチル化酵素として Hst2 が機能していることを見出した。興味深いことに、ハイプシン化を阻害するとアセチル化の亢進が見られることから、ハイプシン化とアセチル化の間には何らかの相互作用があることが強く示唆される。

そこで、翻訳におけるアセチル化とハイプシン化の関係性を明らかにするために、アセチル化部位に変異を導入した eIF5A を発現する株を作製し、スクリーニングで影響が見られたミトコンドリアタンパク質の翻訳に対する影響を調べた。その結果、アセチル化が起こらない eIF5A を発現する株では、ハイプシン化の有無に関わらずタンパク質の翻訳が回復した。また、*mmd1* 遺伝子破壊株では、低グルコース培地において生育が低下するが、アセチル化酵素をコードする遺伝子を欠損させることにより、生育が回復する。これらの結果から、*mmd1* 遺伝子破壊株など eIF5A のハイプシン化の欠損で見られる表現型は、アセチル化の亢進によって引き起こされている可能性が示唆された。

Translation, Acetylation, Hypusine

講演番号：4A18a12
講演日時：3 月 28 日 11:51～ センター2 号館 A18 会場

糸状菌の細胞壁多糖α-1,3-グルカンの生合成における細胞内α-アミラーゼ遺伝子の機能解析
Functional analysis of the intracellular α-amylase genes in the biosynthesis of α-1,3-glucan in the cell wall of filamentous fungi

○宮澤 拳[1]、竹内 歩[1]、小泉 亜未[1]、吉見 啓[2,3]、佐野 元昭[4]、中島 佑[1]、阿部 敬悦[1,3]（[1]東北大院農、[2]京大院農、[3]東北大未来研、[4]金沢工大ゲノム研）
○Ken Miyazawa[1], Ayumu Takeuchi[1], Ami Koizumi[1], Akira Yoshimi[2,3], Motoaki Sano[4], Tasuku Nakajima[1], Keietsu Abe[1,3] ([1]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., [2]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [3]NICHe, Tohoku Univ., [4]Genome Biotech. Lab., Kanazawa Inst. Tech.)

α-1,3-グルカン（AG）は *Aspergillus* 属糸状菌における主要な細胞壁多糖の一つである。我々はこれまでに、モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* において AG が菌糸接着因子として機能することを明らかにしてきた。二種の AG 合成酵素遺伝子のうち、通常の生育条件では *agsB* が主に機能することが示されている。本菌の *agsB* 遺伝子座の近傍には細胞内α-アミラーゼ遺伝子 *amyG* (*ANamyG*)が存在する。*ANamyG* は遺伝子破壊により AG 量が顕著に減少することが報告されている [1)]。AG 鎖は、約 200 残基からなる α-1,3-結合のグルカンが、α-1,4-グルカンの短鎖のスペーサーにより隔てられたサブユニット構造が数十回繰り返された構造であることが示されている [2)]。AG 生合成において ANAmyG はスペーサー合成に寄与していると考えられるが、直接的には証明されていなかった。本研究では、*A. nidulans* において細胞内 α-アミラーゼの機能を AG の分子量の観点から明らかにすることを目的とした。また、産業用糸状菌 *Aspergillus oryzae* には、*agsB* 近傍に存在する *amyG* (*AoamyG*)に加えて、別の染色体上にもう一種類細胞内 α-アミラーゼ遺伝子 *amyH* (*AoamyH*)が存在することから、これら二種の細胞内 α-アミラーゼの AG 生合成への寄与についても解析した。

まず、*A. nidulans* において *ANamyG* 遺伝子破壊株を作製し、細胞壁 AG 量を解析した。その結果、先行研究と同様に、*ANamyG* 遺伝子破壊株では AG が野生株比約 80%減少していた。また、*ANamyG* 遺伝子破壊株の AG の分子量は 93.5 ± 1.4 kDa で、野生株（355 ± 165 kDa）よりも顕著に減少していた。このことは *ANamyG* がスペーサーの合成に寄与することを強く示唆している。また、AG 中の 1,4-グルカンを選択的に分解する手法である Smith 分解を *ANamyG* 遺伝子破壊株の AG に対して行ったところ、AG 分子量のさらなる低減が見られた。このことから、ANAmyG のほかにプライマー合成を担う未知因子が存在することが示唆された。ところで、*A. oryzae* の *AoamyG*, *AoamyH* 遺伝子の各単独破壊株および二重破壊株を作製し、細胞壁成分を分析したところ、*AoamyG* と *AoamyH* の各単独破壊株は野生株と同等の AG を有していた一方、二重破壊株では AG が顕著に減少した。このことは二種の細胞内 α-アミラーゼが協調的にスペーサーの産生に寄与することを示唆している。通常の生育状態においては *AoamyG* が主に発現しており、*AoamyH* は微弱な発現に留まる一方、AoAmyH によってのみスペーサーが合成されると推定される *AoamyG* 遺伝子破壊株では正常に AG が合成されていることから、AoAmyG と AoAmyH の反応速度の違いや、加水分解産物の AG 生合成への利用効率の差が想起される。1) He et al. ***Mol. Microbiol.*** (2014) 91(3):579−595;2) Miyazawa et al. ***Front. Microbiol.*** (2018) 9:2623

Fungal cell wall, α-1,3-glucan, intracellular α-amylase

発表責任者：阿部敬悦（kabe@niche.tohoku.ac.jp）

講演番号：4A18a13
講演日時：3 月 28 日 12:02～ センター2 号館 A18 会場

マイクロ流体デバイスを用いた糸状菌の菌糸における可塑性の解析
Plasticity in filamentous fungi analysed by microfluidic devices
○福田 紗弓[1]、柳沢 直樹[2]、高谷 直樹[1]、佐藤 良勝[2]、竹下 典男[1] ([1]筑波大・生命環境・微生物サステイナビリティ研究センター、[2]名古屋大・ITｂM)
○Sayumi FUKUDA[1], Naoki Yanagisawa[2], Naoki Takaya[1], Yoshikatsu Sato[2], Norio Takeshita[1] ([1]Life Enviro Sci, Univ. of Tsukuba, MiCS, [2]Univ. of Nagoya,ITbM)

糸状菌は、菌糸と呼ばれる管状の細胞の先端を伸長させることで生長する。糸状菌は高い酵素分泌能を有し、古くから発酵と醸造に、近年では酵素生産などのバイオ工学に利用されている。一方で、菌糸生長を介して動植物の宿主細胞に侵入し、病原性を示すものも知られている。菌糸細胞には、細胞壁の圧力である壁圧と、細胞膜が細胞壁を逆向きに押す膨圧が存在する。菌糸先端部は柔軟性が高いことが知られ、壁圧と膨圧のバランスが菌糸生長に関わる。「可塑性」とは、外部からの入力に対応して変形する性質や形を変えられる性質のことである。菌糸における可塑性は、米麹やふすま培養における基質への侵入や動植物細胞への侵入に重要であると考えられるが、菌糸に可塑性があるかどうかも未解明である。

我々は菌糸の可塑性を解析するため、微細加工技術を利用して菌糸直径より幅の狭い 1 μm の溝（長さ：50-200 μm）を 80 本持つマイクロ流体デバイスを作製した。このマイクロ流体デバイスに、モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans*、*Neurospora crassa*、麹菌 *Aspergillus oryzae*、植物病原糸状菌 *Fusarium oxysporum*、植物共生菌 *Collettrichum tofieldiae* を倒立顕微鏡下で生育させライブイメージングを行なった。その結果、多くの糸状菌の菌糸が伸長速度を落とすことなく幅 1 μm の溝を通過し、通過後も正常に菌糸生長を続けた。このことは菌糸には可塑性があることを初めて示している。一方で、*N. crassa* の菌糸は溝を通過する際、伸長速度が溝で低下し途中で生長が止まるものや、溝を通過した後に細胞が膨らみ変形し、それ以上生長をすることが出来ず脱極性を示す菌糸が見られた。このような菌糸の可塑性の違いを生み出す要因として、菌糸直径が予想されたが、*N. crassa* の菌糸直径は他の糸状菌と同程度であった。しかし、*N. crassa* の菌糸伸長速度は他の糸状菌よりも速いことが解った。そこで我々は、この生長停止や脱極性を起こす可塑性の違いが菌糸の伸長速度であると仮説を立てた。そのため、菌糸の生長速度が速いことが知られる、糸状菌 *Rhizopus oryzae*（接合菌、クモノスカビ）、*Coprinopsis cinerea*（担子菌）の 2 種を、同様にマイクロ流体デバイスで生育させた。これらの糸状菌でも *N. crassa* と同様に、幅 1 μm の溝における生長停止や通過後の脱極性が見られた。我々は、マイクロ流体デバイスを用いることで、菌糸に可塑性があることを初めて明らかにした。さらに、菌糸の可塑性は糸状菌の種により多様性があることを示し、菌糸の伸長速度が速いほど可塑性が低い、つまり伸長速度と可塑性に相関があることを明らかにした。

fungi, plasticity, microfluidic

発表責任者：竹下　典男（takeshita.norio.gf@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：4A18a14
講演日時：3 月 28 日 12:13～ センター2 号館 A18 会場

キチン分解菌 *Cellulosimicrobium* sp. NTK2 の生育における糖添加の影響
Effects of sugar on the growth of chitin-degrading bacterium *Cellulosimicrobium* sp. NTK2
○東谷 洸里[1]、長田 晴季[2]、美藤 友博[2]、清水 克彦[3]、有馬 二朗[2] ([1]鳥取大院持社創生、[2]鳥取大農、[3]鳥取大 CoRE)
○Akari HIGASHITANI[1], Haruki OSADA[2], Tomohiro BITO[2], Katsuhiko SHIMIZU[3], Jiro ARIMA[2] ([1]Grad. Sch., Tottori Univ., [2]Tottori Univ., [3]CoRE, Tottori Univ.)

キチンは N-acethylglucosamine（GlcNAc）からなる多糖であり、強固な水素結合を形成しているため分解が困難である。一方でキチンの分解物であるキチンオリゴ糖（COS）や GlcNAc からは抗真菌活性やエリシター活性などが報告されており、機能性物質として COS や GlcNAc の生産が望まれている。現在、キチンはカニ殻を材料として強酸や強塩基、有機溶媒による処理を経て単離されており、その分解物も高温・強酸処理や機械による物理的な処理によって調製される。そのため、COS や GlcNAc の生産には環境への負荷という問題が残されており、生物学的な手法による温和な条件でのキチンの分解技術の確立が望まれている。我々はこれまでに、カニ殻や廃菌床のコンポストから、キチンを高度に分解できる放線菌、*Cellulosimicrobium* sp. NTK2（NTK2 株）を単離した。本研究ではキチンや COS、そしてその他の糖が NTK2 株の生育に及ぼす影響について検討した。
NTK2 株は、キチンを添加することで生育が向上する。そこで、キチン以外の糖ではどのような生育挙動を示すのか確かめるため、0.1%の Yeast Extract(YE)に 2%のグルコース、マルトース、デキストリン、メチルセルロース、GlcNAc、COS のいずれかを炭素源とした培地で培養を行った。 その結果、COS を培地に 2%（w/v）以上添加すると、高い生育の促進が観察された。COS には GlcNAc 及び dimer～hexamer のオリゴ糖が混在しているため、どの分子が生育に影響を及ぼすのかは不明であるが、NTK2 株はキチン存在下で培養すると二糖類結合タンパク質を分泌するため、COS 濃度が 2.0%程度に達した時に、キトビオースを生育に利用するための遺伝子発現が引き起こされると考えられた。一方で、グルコースやデキストリンを培地に添加すると、1%以下の濃度においても、NTK2 株の生育阻害が観察された。また、これらの糖の添加は 2%COS を炭素源とした培養においても NTK2 株の生育阻害を示し、その強さは添加する濃度に比例した。これらの結果から、デキストリンやグルコースは COS よりも低濃度で NTK2 株に認識されて取り込まれ、生育に関わる代謝のいずれかを阻害するのではないのかと考えられた。現在、0.1%YE 及び 2%COS 添加 0.1%YE を基準として、これらの糖による阻害の詳細を検討している。

Cellulosimicrobium, chitin oligosaccharide, chitin

講演番号：4A18a15
講演日時：3 月 28 日 12:24～ センター2 号館 A18 会場

線虫の環境因子による寿命制御機構の解析

Analysis of lifespan regulation by environmental factors in C.elegans

○竹尾 俊哉[1]、久米 一規[2]、水沼 正樹[2] ([1]広島大工、[2]広島大院　統合生命)
○Shunya TAKEO[1], Kazunori Kume[2], Masaki Mizunuma[2] ([1]Hiroshima Univ., [2]Hiroshima Univ. Graduate School of Integrated Science of Life)

【目的】 mTOR は、免疫抑制剤・ラパマイシンの標的分子で、栄養状態に応じて細胞の様々な機能を制御している。mTOR は 2 種類の複合体（mTORC1 と mTORC2）が存在する。mTORC1 における変異はがんや糖尿病など老化に伴う疾患に深く関与し、詳細に解析されている。一方、mTORC2 の機能は不明な点が多い。これまでに、我々は線虫を用いて、RNA 干渉によって酸化ストレス耐性や寿命延長に重要な役割を果たす Skn-1(Nrf2 転写因子ホモログ)の活性を上昇させるものをスクリーニングした。その結果、mTORC2 複合体の一つ rictor を同定した。そこで、本研究では、線虫 Rict-1 の機能解析を通して、新規寿命制御機構の詳細を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】線虫の野生株を用いて *rict-1*RNAi を行ったところ、Skn-1 の腸の核への移行が観察された。さらに、高温や酸化ストレスに対して耐性を示した。その表現型は、*skn-1* 変異株では観察されなかったことから、*rict-1*RNAi の効果は Skn-1 を介したものであることが分かった。さらに、高温(25 度)における寿命を測定したところ、Skn-1 依存的に寿命が延長した。

次に、*rict-1*RNAi の結果を確かめるため、*rict-1* 変異株を用いて実験を行った。驚いたことに、*rict-1* 変異株では Skn-1 の腸の核への移行が観察されなかった。RNAi では HT115 という通常の餌(OP50)とは異なる大腸菌を用いるため、HT115 を食餌として与えて同様の実験を行ったところ、*rict-1* 変異株では Skn-1 の腸の核への移行およびストレス耐性を示した。

さらに、寿命を測定したところ、*rict-1* 変異株は、低温(15 及び 20 度)では食餌(OP50,HT115)に関係なく短命であった。一方、高温(25 度)では OP50 を与えても短命であったが、HT115 を食餌として与えた時に寿命が延長することを見出した。この HT115 のどの成分が寿命延長に影響しているかという点に着目して解析を進めている。

Lifespan, *C.elegans*, *rict-1*

発表責任者：竹尾俊哉（b163990@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：4B01a01
講演日時：3 月 28 日 09:30～ 総合学習プラザ B01 会場

薬用植物 *Tamarix gallica* 由来ポリフェノール化合物のアミロイドポリペプチド凝集阻害活性

Inhibitory activities of amyloidpolypeptide aggregations of polyphenols from the medicinal halophyte *Tamarix gallica*

○繁森 英幸[1,2]、HMIDENE Asma Ben[3]、礒田 博子[1] ([1]筑波大生命環境、[2]筑波大 MiCS、[3]筑波大院生命環境)
○Hideyuki SHIGEMORI[1,2], Asma Ben HMIDENE[3], Hiroko ISODA[1] ([1]Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Mics, Univ. Tsukuba, [3]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

【目的】アルツハイマー型認知症（AD）は中枢神経系の変性疾患として、また、2 型糖尿病（T2D）は末梢代謝障害として、それぞれ特徴づけられている。両者の発生率は年々増加しており、最近の研究から、AD および T2D の発症はともに連関していることが示唆されている。アミロイドベータ（Aβ）は、AD 脳におけるアミロイド沈着の成分であり、一方でランゲルハンスの膵島におけるアミロイド形成性ペプチド沈着物の成分は、ヒト膵島アミロイドポリペプチド（hIAPP）として知られている。これらの 2 つのタンパク質は、アミロイド前駆体タンパク質に由来し、高い配列類似性を有している。当研究室の先行研究において、カテコール構造を有する抗酸化ポリフェノール化合物に顕著なAβ凝集阻害活性を見出していることから、hIAPP の凝集も同様の化合物により阻害できるのではないかと想定した。一方で、チュニジア産薬用塩生植物である *Tamarix gallica* は強力な抗酸化活性を有する植物の 1 つであり、ポリフェノール化合物を含んでいることが知られている。そこで本研究では、*T. gallica* からポリフェノール化合物の探索を行い、得られた化合物についてAβおよび hIAPP 凝集阻害活性を調べることを目的とした。
【結果と考察】まず、*T. gallica* の地上部の乾燥粉砕物を 70%エタノールで抽出し、種々の有機溶媒で分配した。次いで $CHCl_3$ および EtOAc 可溶部について、カラムクロマトグラフィーや逆相 HPLC を用いて 10 種類のポリフェノール化合物を単離した。NMR および MS 等の機器分析により、これらのポリフェノール化合物は、フラボノイド化合物である Quercetin や Kaempferol の *O*-メチル体やグルクロン酸結合体であることを明らかにした。
得られた 10 種のポリフェノール化合物について、Th-T アッセイならびに透過型電子顕微鏡（TEM）観察を用いて、Aβ凝集阻害活性ならびに hIAPP 凝集阻害活性を調べた結果、カテコール構造を有すること、ならびにフェノール性水酸基が多い化合物やグルクロン酸結合型化合物の方がより強い活性を示すことを見出した。
以上のことから、チュニジア産薬用塩生植物 *T. gallica* から単離したポリフェノール化合物にAβならびに hIAPP 凝集阻害活性を併せ持つことを始めて見出し、構造活性相関研究からこれらの活性発現に重要な構造部位を特定した。

amyloid ß, human islet amyloid polypeptide, *Tamarix gallica*

発表責任者：繁森　英幸（shigemori.hideyuk.fn@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：4B01a02
講演日時：3 月 28 日 09:41～ 総合学習プラザ B01 会場

イネにおけるテルペノイド型ファイトアレキシン生産の種内多様性

Natural variation of diterpenoid phytoalexin production in rice

○仮谷 佳祐[1]、宇部 尚樹[2]、上野 琴巳[3]、寺石 政義[4]、奥本 裕[4]、森 直樹[4]、石原 亨[3]([1]鳥取大学院・持続性社会、[2]鳥取大学院・連農、[3]鳥取大・農、[4]京都大学院・農)
○Keisuke KARIYA[1], Naoki UBE[2], Kotomi UENO[3], Masayoshi TERAISHI[4], Yutaka OKUMOTO[4], Naoki MORI[4], Atsushi ISHIHARA[3] ([1]Grad. Sch. Sustainability Sci., Tottori Univ., [2]United Grad. Sch. Agr. Sci., Tottori Univ., [3]Fac. Agr., Tottori Univ., [4]Grad. Sch. Agr. Sci., Kyoto Univ.)

目的

植物は病原菌の感染に応答して抗菌活性を有する低分子化合物、ファイトアレキシンを蓄積する。イネでは、フラボノイドのサクラネチン、テルペノイドのモミラクトン類やオリザレキシン類、ファイトカサン類など 15 種類以上のファイトアレキシンが報告されている。これまでに、世界のイネ・コアコレクション (WRC)を用いた分析から、品種ごとにファイトアレキシンの蓄積量が大きく異なることを見出した。さらに、WRC に含まれる品種の中には、テルペノイド型ファイトアレキシンと類似した化合物を蓄積するものがあった。イネのファイトアレキシンの組成は品種ごとに大きく異なっており、これはイネの進化や種内分化の過程を反映していると考えられる。そこで、イネにおける防御関連二次代謝の進化を明らかにするため、これらの化合物を単離・同定した上で、WRC に含まれる様々なイネの品種における蓄積を調べ、イネの系統と化合物の蓄積の関係を明らかにすることを目的とした。

方法・結果

栽培イネ（品種 Jaguary および Basilanon）の葉に 10 分間紫外線を照射し、ファイトアレキシンの蓄積を誘導した。高湿条件で 72 時間インキュベートしたあと、80%メタノールで抽出し LC-MS で分析した。その結果、新奇ファイトアレキシンと推測される化合物 **1**–**3** が検出された。そこで、これらの化合物をカラムクロマトグラフィーと分取 HPLC を組み合わせて精製した。マススペクトルの解析から、**1** および **2** の分子量は 314、**3** の分子量は 316 であることがわかった。NMR の解析から、**1** は二重結合の位置異なるモミラクトン A の異性体であることがわかった。また、化合物 **2** はファイトカサン A に二重結合が一つ導入された化合物であり、**3** は **2** のカルボニル基が還元された化合物と考えられた。化合物 **1** をモミラクトン G、**2** および **3** をファイトカサン G、H と名付けた。WRC に含まれる品種を分析すると、**1** を蓄積する品種は 2 品種のみであったが、**2** はほとんどすべての品種で蓄積していた。現在 **3** の蓄積について分析を進めている。野生イネ（*Oryza rufipogon*)でも、**1** は限られた系統からのみ検出されたのに対し、**2** はほとんどすべての系統で蓄積していた。以上の結果から、イネの進化の過程で **1** が獲得された過程や **2** が失われた過程を明らかにすることは、イネにおけるジテルペノイドファイトアレキシン生合成の進化を考える上で興味深い。

rice, phytoalexin, natural variation

講演番号：4B01a03
講演日時：3 月 28 日 09:52～ 総合学習プラザ B01 会場

タイ産プロポリスの成分的多様性
Component diversity of propolis in Thailand

○向出 和真[1]、本田 沙理[1]、Vongsak Boonyadist[2]、熊澤 茂則[1] ([1]静県大食、[2]ブラパ大薬)
○Kazuma MUKAIDE[1], Sari HONDA[1], Boonyadist Vongsak[2], Shigenori KUMAZAWA[1] ([1]Univ of Shizuoka, [2]Burapha Univ.)

【目的】
プロポリスとは、ミツバチが植物の新芽や樹皮から採集した樹脂状物質を巣箱の隙間に塗布したものであり、巣箱の内部環境を外部の病原細菌等の微生物から守る働きをしていると考えられている。近年、プロポリスは抗酸化活性をはじめとする様々な機能性を有していることが明らかになり、日本では健康食品の素材などに利用されている。本研究では、セイヨウミツバチとハリナシバチが生産するタイ産のプロポリスを研究対象とした。ハリナシバチとは文字通り毒針を持たないミツバチのことであり、インドネシアやタイなどの熱帯地域に生息している。セイヨウミツバチのプロポリスに関する研究は数多く報告されているが、ハリナシバチ由来のプロポリスに関してはほとんど研究されていないのが現状である。また、ミツバチは、巣の周辺に生息する植物の中からプロポリスの材料となる植物（起源植物）を選定するため、プロポリスの形態・成分・生理活性は採集地域によって異なり多種多様である。そこで本研究では、タイで採集されたセイヨウミツバチおよびハリナシバチが生産した 2 種類のプロポリスを分析し、それらの成分を解析することで、その多様性を成分化学的に比較することを目的とした。

【方法】
タイのチェンマイで採集されたセイヨウミツバチ(*Apis mellifera*)由来のプロポリス(以下、チェンマイ産プロポリス)を 70% エタノールで抽出し、HPLC 分析を行った。また、抽出物をオープンカラムクロマトグラフィーにより分画し、分取用 HPLC にて化合物の単離を行った。単離した化合物について NMR,MS を測定し、構造解析を行った。一方、当研究室ではこれまでにタイのチャンタブリーで採集されたハリナシバチ(*Tetragonula pagdeni*)由来のプロポリス(以下、チャンタブリー産プロポリス)の成分研究が行われている。今回、このチェンマイ産プロポリスと、チャンタブリー産プロポリスの成分化学的な比較を行った。

【結果】
タイのチェンマイ産プロポリスからは様々な化合物が単離された。このプロポリスとチャンタブリー産プロポリスとの成分比較を行った結果、構成成分は全く異なり、多様性があることが判明した。

propolis, Thailand, diversity

発表責任者：熊澤茂則（kumazawa@u-shizuoka-ken.ac.jp）

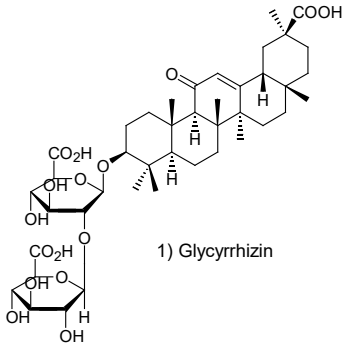
講演番号：4B01a04
講演日時：3 月 28 日 10:03～ 総合学習プラザ B01 会場

甘草グリチルリチン及びその類縁体の高純度試薬の開発
Development of high purity reagents for glycyrrhizin and its analogs

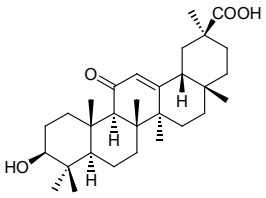
○田村 敦裕、森 拓哉、中塚 進一 (長良サイエンス株式会社)
○Atsuhiro TAMURA, Takuya MORI, Shin-ichi NAKATSUKA (Nagara Science Co., Ltd.)

【背景・目的】グリチルリチン類は多くの漢方薬の中でも代表的な生薬で、多くの類縁化合物が存在していることから、純粋な標準品を作成することが困難である。我々は、それぞれの成分を高純度に精製して、その純度や混合比と薬理活性の関係について研究を進める目的で、高純度構成成分の標準品の作成を目指すことにした。

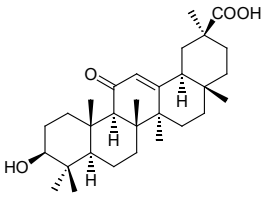
【方法・結果】グリチルリチン類は、特に類縁体の混合物を漢方薬として用いることが多いが、今回、以下の構成成分の 5 種類については少量ではあるが 99%HPLC 純度で精製できた。今後はそれらを標準品として市販する予定で、次いでそれらを混合することで薬理活性の増強作用などについての研究を進める予定である。



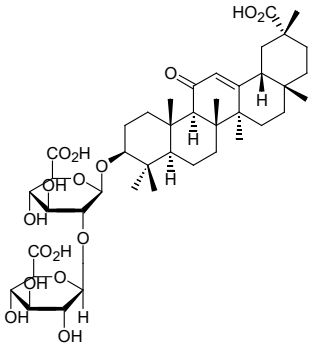
1) Glycyrrhizin



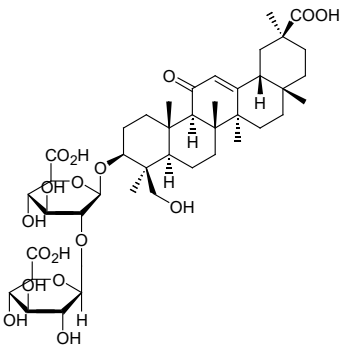
2) Glycyrrhetinic acid



3) 18a-Glycyrrhetinic acid



4) LicoricesaponinH2



5) LicoricesaponinG2

Glycyrrhizin, Glycyrrhetinic acid, Licorice

発表責任者：中塚進一（nagara@nsgifu.jp）

講演番号：4B01a05
講演日時：3 月 28 日 10:14～ 総合学習プラザ B01 会場

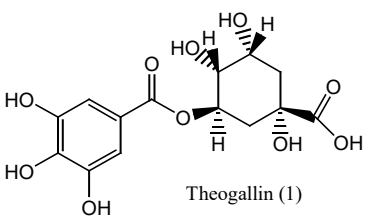
茶テオガリン及びその類縁体の高純度試薬の開発

Development of high purity reagents for tea theogallin and its analogs

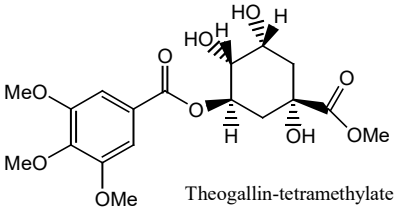
○森 拓哉、田村 敦裕、中塚 進一 (長良サイエンス株式会社)
○Takuya MORI, Atsuhiro TAMURA, Shin-ichi NAKATSUKA (Nagara Science Co., Ltd.)

【背景・目的】緑茶中の旨味成分としてテオガリン関連化合物が知られているが、これらは非常に水溶性が高く分離精製しにくいことが知られている[1)]。これらを逆相系 ODS カラムを用いて HPLC 分析をすると類似の構造とみられる化合物が沢山あり、これらが複雑に混合していることで抹茶等の味覚を構成していると思われる。そこで関連化合物を詳細に分離精製して研究を進めることにした。

【方法・結果】市販の茶抽出物より水抽出物を ODS 分析カラムを用いて分析すると、テオガリン類の他に多くの類縁体化合物が存在すると思われた。そこでまずテオガリンとして報告された化合物の高純度標準品を作ることを目指し、HPLC 分析や NMR による機器分析で 99%純度のテオガリン標準品の作成に成功した。テオガリンはキナ酸のモノガレート体であるが、テオガリンの近辺にはその類縁体と思われる多くの化合物が検出された。これらはテオガリンの母核であるキナ酸に没食子酸やプロトカテク酸が結合した類縁体が存在していると思われる。これらの分離精製や構造解析を行い高純度試薬の精製を検討して、少なくとも 5、6 種類の新規化合物を製造できると考えて構成成分の単離構造決定を進めているので報告する。



Theogallin (1)



Theogallin-tetramethylate (2)

1）Shu Kaneko *et al.*, AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY, **54**, 2688-2694(2006)

Theogallin, Polyphenol, Tea

発表責任者：中塚進一（nagara@nsgifu.jp）

講演番号：4B01a06
講演日時：3 月 28 日 10:35～ 総合学習プラザ B01 会場

仏手柑に含まれるアポトーシス誘導物質

Apotosis-inducing components from *Citrus medica* var. *sarcodactylus*

○夏見 弥侑、奥野 祥治（和歌山高専）
○Miyu NATSUMI, Yoshiharu OKUNO (NIT, Wakayama College)

［緒言］　がんは、正常な細胞の遺伝子が傷つき異常な細胞が無秩序に増殖することにより、正常な性能が失われる病気で日本の最も多い死因である。がんの治療として抗がん剤や放射線、薬物療法が行われており、副作用の少ない治療方法としてがん細胞にアポトーシスを誘導することでがんの予防・治療に効果があると期待されている。近年、アポトーシス誘導物質が植物などから多く報告されている。

仏手柑（*Citrus medica* var. *sarcodactylus*） はミカン科ミカン属、香酸柑橘類の植物であり、その名称は合掌した手の形に類似しているところから名付けられたと言われている。インドが原産であり、日本では和歌山県、鹿児島県であわせて年間約 3 トン生産されているのみである。果肉部が退化し少ないため、生食には向かず、砂糖漬けにして食されたり、頭痛薬や風邪薬など漢方薬として用いられている。これまでに、仏手柑の根茎から抗炎症効果、抗酸化作用、スーパーオキシドアニオン生成の阻害活性を示す数種のクマリンが報告されている。本研究室では仏手柑漢方薬から α-グルコシダーゼ阻害物質として 5,7-Dimethoxycoumarin と Hexadecanoic acid を見出している。しかし、仏手柑果実の化学成分および機能性についての報告はほとんどない。そこで、本研究では仏手柑の化学成分と機能性解明を目的とし、アポトーシス誘導物質の探索について検討する。

［実験操作］　仏手柑 1.9 kg をメタノールで一晩浸漬した後、吸引濾過を 3 回行いメタノール抽出液 (106.9 g)を得た。この抽出液を減圧濃縮したものを水に懸濁し、各溶媒で抽出してヘキサン (1.38 g)、ジクロロメタン (1.21 g)、酢酸エチル (0.87 g)、水 (103.4 g)抽出物を得た。アポトーシス誘導物質の探索はヒト胃がん細胞株 (MKN45) に対する細胞増殖抑制試験を指標として進めた。96 ウェルプレートにがん細胞を 1×10^4 cell いれ、5% CO_2 、37℃で 24 時間静置培養した。次にサンプル含有培地に交換し 24 時間培養した。その後 MTS 試薬含有培地に交換し、2 時間後に 490 nm の吸光度を測定することで細胞増殖抑制率を算出し、がん細胞増殖抑制効果を評価した。

［結果と考察］　仏手柑から得た各抽出物の細胞増殖抑制試験の結果、ヘキサン抽出物とジクロロメタン抽出物が 200 μg/mL において細胞増殖抑制効果を示した。ヘキサン抽出物を中圧カラムクロマトグラフィーにより Fr.1～5 に分画し細胞増殖試験をした結果、Fr.2 と Fr.5 の 200 μg/mL において抑制効果が見られた。また、ジクロロメタン抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより Fr.1～11 に分画し細胞増殖試験をした結果、Fr.4、Fr.6、Fr.7 および Fr.8 の 200 μg/mL において強い抑制効果が見られた。現在、抑制効果が見られた各フラクションから活性物質の単離及び構造決定を行っている。

Citrus medica var. *sarcodactylus*, apotosis, cancer cell

講演番号：4B01a07
講演日時：3 月 28 日 10:46～ 総合学習プラザ B01 会場

ヤエヤマサソリの脱皮殻に含まれる新奇蛍光物質
A fluorescent compound from the exviae of the scorpion *Liocheles australasiae*
○義本 裕介、田中 柾人、宮下 正弘、中川 好秋、宮川 恒（京大院農）
○ Yusuke YOSHIMOTO, Masato TANAKA, Masahiro MIYASHITA, Yoshiaki NAKAGAWA, Hisashi MIYAGAWA (Kyoto Univ.)

【目的】サソリは古代シルル紀から現在に至るまで，ほとんど形態を変えずに繁栄し続けてきた動物である．サソリのもつユニークな形態的特徴として，その表皮の示す強い蛍光がある．この蛍光現象の生物学的意義は現段階では不明であるが，脱皮直後の個体はこのような蛍光を示さないことから，サソリ表皮の形成メカニズムへの関与が示唆されている．これまでに，サソリの死骸から蛍光物質として 2 種の化合物が同定されているが，これらが表皮に特異的に含まれているのかは確認されておらず，サソリ表皮の蛍光を十分に議論できる段階に至っていない．そこで本研究では，日本棲息種サソリであるヤエヤマサソリ（*Liocheles australasiae*）の脱皮殻を用いて，サソリ表皮に特異的に含まれる新奇蛍光物質の探索を試みた．

【方法・結果】石垣島にて採取したヤエヤマサソリ（*L. australasiae*）の飼育中に得た脱皮殻を，各種の溶媒（90% EtOH/H_2O，EtOAc，90% MeOH/H_2O）を用いて抽出した後，合一して濃縮乾固した．得られた粗抽出物を分液（H_2O/*n*-hexane）し，得られた有機層を固相抽出カラム（Sep-pak Plus Silica）を用いて分画した（*n*-hexane/EtOAc = 10/0，8/2，6/4，2/8 および 0/10)．このうち，*n*-hexane/EtOAc = 8/2 の画分が顕著な蛍光を示したことから，これを蛍光 HPLC（励起 270 nm，蛍光 410 nm）および LC/MS によって分析した結果，この画分に 496.2 Da の質量をもつ蛍光物質が含まれることが明らかとなった．この化合物を単離し，NMR，MS/MS 分析に供したところ，フタル酸エステルの環状二量体であると推定された．この化合物を化学合成し，各種分析データを比較したところ，両者が同じ値を示したことから，推定した化学構造が正しいことを確認した．この化合物の蛍光スペクトルを測定したところ，270 nm の励起波長に対して 410～430 nm 付近に蛍光スペクトルのピークが見られた．このピークは粗抽出物を用いて測定した場合と同じであることから，本化合物がサソリ表皮の蛍光成分の一つであることが示唆された．さらに，マダラサソリ（*Isometrus maculatus*）の脱皮殻を用いて同様の実験を行ったところ，同じ化合物が見いだされた．このことから，この化合物がサソリ表皮に共通して存在することが示唆された．

Natural product chemistry, Structural determination, fluorescence

講演番号：4B01a08
講演日時：3 月 28 日 10:57～ 総合学習プラザ B01 会場

マンナン存在下での抗真菌試験に基づく糖結合性天然物の探索

Screening of sugar-binding natural products based on antifungal assay in the presence of mannans

○宮西 航、小鹿 一、中川 優 (名大院・生命農)
○Wataru MIYANISHI, Makoto OJIKA, Yu NAKAGAWA (Nagoya Univ.)

【目的】 近年、糖鎖は多彩な生物学的・病理学的プロセスに関与していることが明らかになりつつあり、糖鎖研究のツール分子としてプラディミシン A (PRM-A、Fig. 1) に代表される糖結合性天然物の需要が急速に高まっている。しかしながら、糖結合性天然物を効率的かつ網羅的に探索するスクリーニングが確立されていないために、PRM-A とその類縁体以外に糖結合性天然物は見出されていない。そこで本研究では、① PRM-A が抗真菌活性を示すこと、② マンナン存在下では PRM-A の抗真菌活性が消失すること、の二点 [1] に着目して、マンナンの添加によって抗真菌活性が消失する天然物を新たな糖結合性化合物の候補として探索することを目的とした。

【方法および結果】 当研究室で保有している海洋生物エキスライブラリー 256 種類を用いて、まず真菌 *Candida rugoga* に対して抗真菌活性を示すサンプルを探索したところ、61 種が 100 μg/mL 以下の濃度で顕著な抗真菌活性を示すことが確認された (Fig. 2)。そこで、次に *Saccharomyces cerevisiae* 由来のマンナン (120 μg/mL) 存在下でこれら 61 種の抗真菌活性を評価したところ、3 種のサンプルにおいて抗真菌活性の消失が見られた。これらの結果より、3 種のサンプル中には PRM-A と同様に真菌の細胞壁マンナンに結合して抗真菌活性を示す化合物が含まれている可能性が示唆されたため、化合物の分離・精製を試みた。現在、3 種のサンプルのうち、沖縄産海綿エキスから糖結合性天然物の候補化合物としてアルカロイドを単離し、その構造解析を進めている。本発表ではその構造決定に関しても報告する。

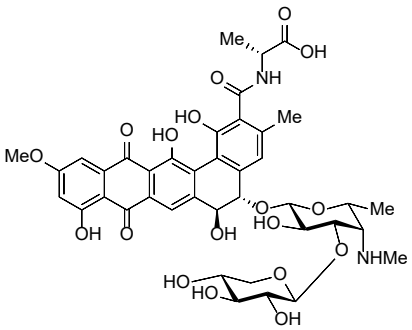


Fig. 1 : Structure of PRM-A

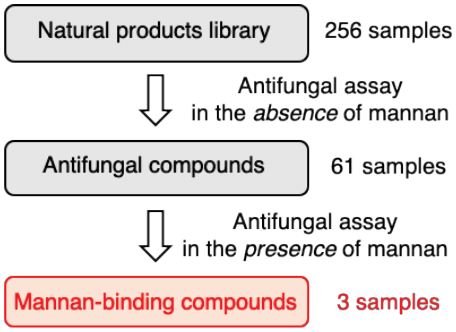


Fig. 2 : Screening of mannan-binding compounds

1) Ueki, T. *et al*. *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 149.

antifungal drug, sugar-binding natural product, Pradimicin

講演番号：4B01a09
講演日時：3 月 28 日 11:08～ 総合学習プラザ B01 会場

ジャバラ由来のα-グルコシダーゼ阻害活性物質の探索

alpha-Glucosidase inhibitor from *Citrus jabara*

○楠本 恵理、奥野 祥治（和歌山高専）
○Eri KUSUMOTO, Yoshiharu OKUNO (NIT.Wakayama college)

［緒言］ 食事によって取り入れた糖類はα-アミラーゼやα-グルコシダーゼなどの糖類分解酵素によってグルコースまで分解され、血液中に吸収された後、インスリンのはたらきによって細胞内に吸収される。しかし、高カロリー食などの不摂生によりインスリンが正常に作用しなくなると血液中の糖濃度が上昇し、糖尿病につながる。平成 28 年に行われた厚生労働省の「国民健康・栄養調査」によると、糖尿病有病者、予備群はいずれも約 1000 万人と推計されている。また、糖尿病による高血糖状態は網膜症や神経障害などの合併症を発症させる原因となっている。そのため、糖尿病患者にとって高血糖状態の緩和が重要な課題である。この課題を解決する手段としてα-グルコシダーゼを阻害し、糖類からグルコースへの分解を遅延させることで小腸でのグルコースの吸収を抑制し、高血糖状態を緩和させることが挙げられる。現在、植物に含まれるα-グルコシダーゼ阻害物質の研究がされており、柑橘類ではブンタン抽出物がα-グルコシダーゼ阻害活性を示す事が報告されている。

ジャバラ（*Citrus jabara*)は和歌山県北山村原産の香酸柑橘である。果汁はジャムやドリンクなどの製品に加工されている。我々の研究室ではジャバラ果皮からがん細胞に対するアポトーシス誘導物質、抗肥満活性物質を見出した。さらに前年度の研究においてジャバラ抽出物がα-グルコシダーゼを阻害することが見出されたが、活性成分の特定には至っていない。そこで、本研究ではジャバラ果皮に含まれるα-グルコシダーゼ阻害活性物質の探索と構造決定及び、阻害機構の解明を目的とする。

［実験］ 活性成分の探索　ジャバラ果皮 671.6 g を 2 L のメタノールに 1 日浸漬し、ろ過した。この操作を 3 回行い MeOH 抽出物 (169.5 g)を得た。これを水(250 mL)と各種有機溶媒(150 mL)で液液抽出し、 各抽出物 Hexane (2.977 g) 、CH_2Cl_2 (1.205 g) 、EtOAc (0.929 g) 、Water (116.5 g) 抽出物を得た。活性物質の探索はα−グルコシダーゼ阻害試験を指標として行った。

α−グルコシダーゼ阻害試験　α-グルコシダーゼ阻害試験は Yeast 由来α-グルコシダーゼを用いて行った。DMSO に溶解した被験物質 10 μL、 0.1 M リン酸緩衝液 190 μL、4×10^{-2} unit/mL α-グルコシダーゼ 100 μL、0.5 mM *p*-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside 100 μL を試験管に加え、37℃で 30 分間インキュベーションした後、0.2 M Na_2CO_3 400 μL を加え、反応を停止した。405 nm の吸光度を測定し、α-グルコシダーゼ阻害率を算出することで評価した。

［結果と考察］ ジャバラ果皮を抽出して得た MeOH 抽出物について α−グルコシダーゼ阻害試験を行った結果、40 μg/mL で約 20%の活性を示した。MeOH 抽出物を液液抽出して得た各抽出物についても同様に試験を行った結果、Hexane 抽出物が 40 μg/mL 60 %以上、EtOAc 抽出物が 40 μg/mL で 30 %以上の活性を示した。現在 Hexane 抽出物と EtOAc 抽出物をカラムクロマトグラフィーで分画することにより活性物質の探索を行っている。

Citrus jabara, alpha-Glucosidase, Inhibitor

講演番号：4B01a10
講演日時：3 月 28 日 11:19～ 総合学習プラザ B01 会場

梅干しに含まれる抗老化活性物質の探索

Inhibition of collagenase activity from pickled *Prunus mume* Sieb *et.* Zucc

○上田 有里子[1]、河野 良平[2]、野村 幸子[2]、宇都宮 洋才[2]、奥野 祥治[1]([1]和歌山高専、[2]和歌山医大)
○Yuriko Ueda[1], Ryohei Kono[2], Sachiko Nomura[2], Hirotoshi Utsunomiya[2], Yoshiharu Okuno[1]
([1]National Institute of Technology Wakayama College, [2]Wakayama Medical University)

[緒言]

シワやタルミなど皮膚老化は、皮膚の弾力性やハリを保つうえで重要な成分であるコラーゲンの減少が原因と言われ、その予防法の手段として、天然物に含まれるコラゲナーゼ阻害活性物質の研究が注目されている。コラゲナーゼは MMP (Matrix Metalloproteinase)の一種であり、通常 MMP 活性は正確に調節されているが、加齢や紫外線などによる活性酸素の生成が過剰な MMP 活性を引き起こし、コラーゲン分解を促進させてしまう。そのため、コラゲナーゼの活性を阻害することはシワやタルミなど皮膚の老化予防に有用な手段である。これまでの研究で、フェノール性化合物がコラゲナーゼ阻害効果に大きく関与することが明らかにされている。

梅 (*Prunus mume*)は中国中南部が原産のバラ科サクラ属の落葉樹であり、古くから伝統的な健康食品として食されてきた和歌山県の特産品である。梅にはさまざまな機能性成分が含まれており、我々の研究室でも抗肥満効果や不妊治療効果、アポトーシス誘導効果などの活性成分を見出している。しかし、コラゲナーゼ阻害活性成分についての報告はない。本研究では、梅干しの MeOH 抽出物がコラゲナーゼ抑制効果を示したため、梅干しに含まれるコラゲナーゼ阻害活性物質の探索を行った。

[実験]

〈活性物質の探索〉 凍結乾燥した梅干し果肉 4.8 Kg をメタノール 6 L に 24 時間浸漬し、ろ過した。これを三回繰り返して MeOH 抽出物を得た。得られた抽出物から減圧濃縮により MeOH を除去し水に懸濁した後、各種溶媒で抽出し、Hexane (4.46 g)、CH_2Cl_2 (5.91 g)、EtOAc (23.7 g)、H_2O (332 g)抽出物を得た。活性物質の探索はコラゲナーゼ阻害試験を指標として行った。

〈コラゲナーゼ阻害試験〉 コラゲナーゼ阻害試験は 96 ウェルマイクロプレートに各濃度に調製したサンプルを 1 ウェルあたり 50 μL 加え、そこにコラゲナーゼ (1×10-2 unit/mL) 100 μL を加え、37 ℃で 10 分間インキュベートした。その後、基質 (1 mM)を 50 μL 加え、37 ℃で 30 分間インキュベートした。基質を加えた直後と 30 分後の蛍光強度を測定し、それらの値からコラゲナーゼ阻害率を算出し評価した。

[結果]

梅干しから得た MeOH 抽出物についてコラゲナーゼ阻害試験を行った結果、200 μg/mL で 20 %の阻害活性を示した。そこで、この MeOH 抽出物を各種溶媒で転溶し、阻害試験を行った。その結果、Hexane 抽出物および EtOAc 抽出物が 200 μg/mL において、それぞれ、90 %、70 %の強い阻害活性を示した。現在、Hexane 抽出物および EtOAc 抽出物についてコラゲナーゼ阻害試験を指標とし、分画を進めている。

Prunus mume, Japanese apricot, collagenase

講演番号：4B01a11
講演日時：3 月 28 日 11:40～ 総合学習プラザ B01 会場

Costus pictus 葉に含まれるリパーゼ阻害物質
Lipase inhibitor from *Costus pictus*
○吉村 奈緒里[1]、大塚 梨沙[1]、吉岡 百合[2]、牧野 祥平[2]、松村 晋一[2]、森本 正則[1]([1]近畿大農、[2]稲畑香料株式会社)
○ Naori YOSHIMURA[1], Risa OTSUKA[1], Yuri YOSHIOKA[2], Shohei MAKINO[2], Shinichi MATSUMURA[2], Masanori MORIMOTO[1] ([1]Kindai Univ., [2]INABATA KORYO CO.,LTD.)

【目的】
オオホザキアヤメ科植物である *Costus pictus* D. Don.は、インスリンプラントとも呼ばれ糖尿病の予防や症状の改善に利用できると考えられている。この植物の摂取は、生活習慣病の改善にも寄与する可能性が考えられることから、本研究では本種の葉部に含まれる有効成分探索の一環として、リパーゼに対する酵素阻害活の評価と活性成分の単離・同定を目的とした。
【方法と結果】
インド産の *C. pictus* 乾燥葉部をメタノールで抽出を行い、メタノール抽出物を調製した。その後、シリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィーを用いた分画を行い、酵素阻害活性を指標として阻害活性物質の精製を行った。
リパーゼ阻害活性は、ブタ膵臓由来リパーゼに対して、基質として 4-methylumbelliferyl oleate を用いて、酵素反応によって遊離する 4-methylumbelliferone の蛍光を蛍光検出 HPLC で分離定量して酵素阻害活性を測定した。HPLC による酵素生成物の分離によって、植物抽出物に内在する蛍光物質の干渉を避けることが可能であった。
C. spicatus 乾燥葉部メタノール抽出をクロロホルムで溶解した時に生じた不溶部と可溶部を比較すると、クロロホルム可溶部により高いリパーゼ阻害活性が認められた。そこで、さらにクロロホルムとメタノールを移動相としてシリカゲルフラッシュクロマトグラフィーを用いて分画を行った。得られた画分において、リパーゼ阻害活性が認められた画分を、さらに酵素阻害活性を指標としてリパーゼ阻害活性物質の精製を行った。今回、*C. pictus* 乾燥葉部メタノール抽出物から得られた化合物と、それらのリパーゼ阻害活性について報告する。

Costus pictus, enzyme inhibitor, lipase

講演番号：4B01a12
講演日時：3 月 28 日 11:51～ 総合学習プラザ B01 会場

Zanthoxylum zanthoxyloides が示す 3T3-L1 前駆脂肪細胞に対する脂肪蓄積抑制物質の単離・同定
Isolation and identification of fat accumulation inhibitor in 3T3-L1 preadipocyte from *Zanthoxylum zanthoxyloides* root

○南川 遥妃[1]、柏木 丈拡[1]、ブックストン トーマス[2]、島村 智子[1]([1]高知大農、[2]ガーナ大森林園芸作物セ)
○Haruhi MINAGAWA[1], Takehiro KASHIWAGI[1], Thomas BUXTON[2], Tomoko SHIMAMURA[1] ([1]Kochi Univ., [2]Ghana Univ.)

【目的】近年、肥満が世界的に深刻化しており、生活習慣病患者の増加が懸念されている。肥満の予防・解消は食事の改善や適度な運動が一般的であるが、脂肪蓄積抑制効果を有する天然由来成分を日常的な食事として摂取することによる肥満予防法が試みられている。本研究ではガーナ産の薬用植物である *Zanthoxylum zanthoxyloides* (ミカン科サンショウ属) が示す 3T3-L1 前駆脂肪細胞への脂肪蓄積抑制活性に関与する活性成分を単離・同定し、その作用機序を明らかにすることを目的とした。
【方法】*Z. zanthoxyloides* の根を 100% MeOH で抽出し、ZZR MeOH 抽出物とした。この抽出物を液液分配、Sep-Pak C_{18} カードリッジ、逆相系 HPLC により順次分画し、活性成分を単離・精製した。各画分の活性は 3T3-L1 細胞に蓄積したトリグリセリド (TG) 量を元に評価した。すなわち 3T3-L1 細胞の分化誘導・脂肪蓄積時に DMSO 溶解のサンプルを終濃度 4 mg eq./mL で添加し分化誘導を行った。細胞を破砕した後、破砕液中の TG 量を測定し、TG 蓄積阻害率を算出した。単離した活性成分は LC-MS および NMR 分析によって構造決定を行った。また RT-qPCR を用いた遺伝子発現量の解析により、作用機序の解明を行った。
【結果】強い TG 蓄積抑制活性を示した ZZR MeOH 抽出物 (83.0%) を液液分配により分画し活性を評価した結果、活性成分は Diethyl ether 層 (62.9%)、Butanol 層 (47.8%) に分配された。分化終了時の細胞形態が両層で異なっていたことから、各層の活性成分は異なる作用機序で TG 蓄積抑制活性を示すと推察された。RT-qPCR により、分化誘導に関与する PPARγ、脂肪滴の形成に関与する Perilipin 1 の発現量を測定したところ、いずれの層においても顕著に発現量が低下していた。また、活性成分を明らかにするため、Diethyl ether 層、Butanol 層を Sep-Pak C_{18} カードリッジを用い分画した。Butanol 層においては Sep-Pak 40% MeOH 画分に最も高い活性 (34.8%) が認められたため、この画分を逆相系 HPLC に供し、保持時間に従って 6 つの画分 (fr. 1～6) に分画した。各画分の活性を評価したところ、Fr. 1～6 それぞれ単独では活性を示さなかったが、全ての画分を混合すると分画前と同等の強い活性を示した。そこで各 Fr.を様々な組み合わせで混合し活性を評価したところ、Sep-Pak 40% MeOH 画分の活性の主要因の 1 つは Fr. 2 であることが明らかになった。次に Diethyl ether 層を Sep-Pak C_{18} カードリッジで分画したところ 100% MeOH 画分に活性が局在していた (39.8%)。この画分を逆相系 HPLC に供し、保持時間に従って 4 つの画分 (Fr. 1～4) に分画を行った。各画分の活性を評価したところ、Fr. 1～4 それぞれ単独では活性を示さず、全てを混合させることで活性を示した。したがって、Diethyl ether 層の活性には複数の成分が関与していることが明らかとなった。現在、Butanol 層、Diethyl ether 層共に活性成分の単離・同定を行っている。

fat accumulation, 3T3-L1 cell, *Zanthoxylum zanthoxyloides*

発表責任者：柏木丈拡（tkashi@kochi-u.ac.jp）

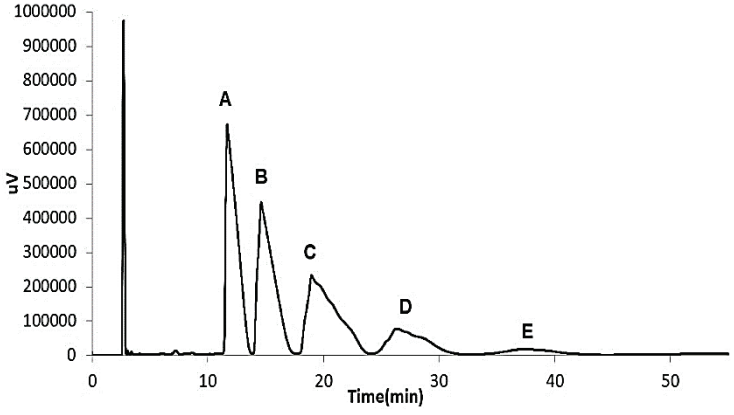
講演番号：4B01a13
講演日時：3 月 28 日 12:02～ 総合学習プラザ B01 会場

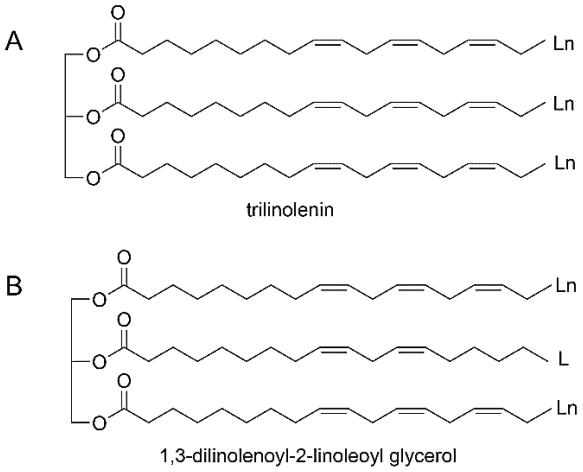
Isolation and Structure Determination of Antidiabetic Compounds from Hexane Extract of Red Kidney Beans (Phaseolus vulgaris L)

○ Anita Maya SUTEDJA[1,2,3], Emiko YANASE[1], Irmanida BATUBARA[2,4], Dedi FARDIAZ[2], Hanifah Nuryani LIOE[2] ([1]Gifu University, [2]IPB University, [3]Widya Mandala Catholic University Surabaya, [4]Tropical Biopharmaca Research Center IPB University)

Red kidney beans (*Phaseolus vulgaris L*) are one of the important legume plants cultivated in Indonesia and other parts of East Asia. This plant contains numerous bioactive compounds, such as polyphenols. Polyphenols are known to have antidiabetic activity. However, their content is low. In our preliminary research, n-hexane extract had moderate α-glucosidase inhibitory activity but had no antioxidant activity. This result suggests that the n-hexane extract contains antidiabetic components different from polyphenols. Hence, the purpose of this study was to isolate the antidiabetic compounds from the hexane extract of red kidney beans and identify their structure.

The n-hexane extract of peeled beans was separated by open column chromatography, which produced six fractions. The ^{1}H NMR analysis of Fr. 2, which was largest fraction, was performed, and the major component was assumed to be TAG. This fraction was then separated by preparative HPLC, and their chemical structures were determined by the combination of GC-MS and UPLC-MS/MS. As a result, the major fatty acids present in these TAGs were α-linolenic acid (ω-3) and linoleic acid (ω-6) and the primary TAGs were LnLnLn (trilinolenin) and LnLLn (1,3-dilinolenoyl-2-linoleoyl glycerol). The α-glucosidase inhibition activity of those TAGs was comparable to acarbose. These results suggest that TAGs have potency as antidiabetics and support the potential suitability of red kidney beans, both as food for diabetics and as a preventive food for diabetes.





red kidney bean, α-glucosidase inhibition activity, triacylglycerol

発表責任者：Emiko YANASE（e-yanase@gifu-u.ac.jp）

講演番号：4B02a01
講演日時：3 月 28 日 09:30～ 総合学習プラザ B02 会場

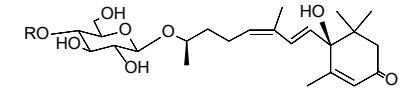
疫病菌の無性生殖阻害物質 lycoside 類の合成研究

Synthetic study on lycosides, inhibitors of asexual reproduction of *Phytophthora*

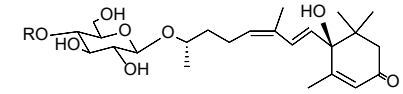
○加藤 史華、小鹿 一 (名大農)
○Fumika KATO, Makoto OJIKA (Nagoya Univ.)

【背景・目的】

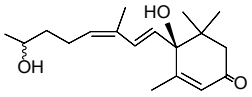
疫病菌 (*Phytophthora* 属糸状菌)はアイルランドジャガイモ飢饉を起こした悪名高い植物病原菌で、無性生殖により急速な被害をもたらす。したがって、その無性生殖を阻害する物質の探索は、作物の安定供給に大きく貢献できる。我々は、疫病菌の培地として用いた野菜ジュースから無性生殖阻害物質として lycoside 類を発見し、ジュース原料野菜のうちトマトに含まれることを明らかにした[1]。また、lycoside 類から糖を除去して得られたアグリコンの活性が lycoside 類より高いことから、その合成を目指すとともに、合成を通じて得られる中間体の活性を調査することを目的とする。



lycoside A：R= β -Glc　lycoside C：R=H



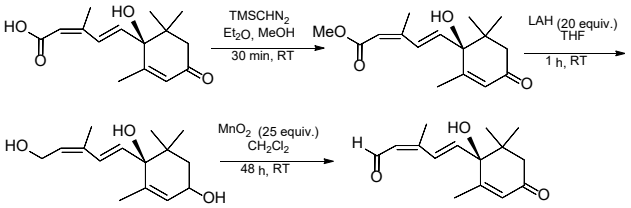
lycoside B：R= β -Glc　lycoside D：R=H



Lycoside アグリコン

【方法・結果】

活性検定は次のように行った。サンプルの DMSO 溶液を加えた 3%V8-1%スクロース培地に疫病菌 *P. capsici* を接種し、6 日間培養した。培地を菌体ごと直径 1.3 cm の円状にくり抜き、遊走子嚢（無性胞子）を顕微鏡下で数えて活性の評価を行った。



Lycoside アグリコンの合成は、植物ホルモンの構造が類似している Abscisic acid（ABA）を出発物質として行った。まず、ABA 対して TMS ジアゾメタンを作用させてメチルエステルに変換した後、水素化アルミニウムリチウムを作用させたところ、ケトンまで還元が進行したトリオール体を得た。その後、このトリオール体を酸化してアルデヒドを得た。現在は、アルデヒドとアセトンのアルドール縮合反応を進めており、合成で得られた中間体について疫病菌無性生殖阻害活性を調べる予定である。

【参考文献】

1）Iwai, R., Han, C., Govindam, S. V., & Ojika, M. *J. Agric. Food Chem.*, **66**, 163-169 (2017).

Phytophthora, lycoside, asexual reproduction

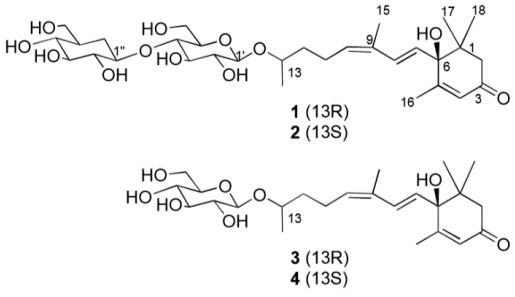
発表責任者：加藤史華（kato.fumika@c.mbox.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：4B02a02
講演日時：3 月 28 日 09:41～ 総合学習プラザ B02 会場

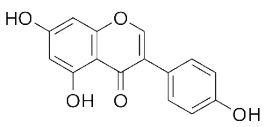
植物由来の疫病菌無性生殖阻害物質と作用機構に関する研究
Inhibition and mechanism of *Phytophthora* asexual reproduction by phytochemicals
○安藤 優花、加藤 史華、田中 愛子、竹本 大吾、小鹿 一 (名大農)
○Yuka ANDO, Fumika KATO, Aiko TANAKA, Daigo TAKEMOTO, Makoto OJIKA (Nagoya Univ)

【背景・目的】

Phytophthora 属植物病原糸状菌である疫病菌は無性生殖により急速に広がり農作物に甚大な被害を与える。したがってその阻害物質の探索は、疫病菌の防除において非常に重要である。我々は疫病菌の培地として用いた野菜ジュースからこのような活性を持つ lycoside 類を発見し、トマト由来の成分であることを明らかにした [1)]。一方、植物の典型的成分であるフラボノイドにも同様の活性を見出した。そこで本研究では、lycoside 類とフラボノイドの疫病菌無性生殖阻害機構の解析を目的とした。また、フラボノイドについては構造活性相関も調べた。



1 ：lycoside A　2 ：lycoside B
3 ：lycoside C　4 ：lycoside D



genistein

【方法・結果】

無性生殖阻害活性検定は次のように行った。サンプルの DMSO 溶液を加えた V8 培地に、PS 培地で前培養した疫病菌 *P. capsici* を接種し、6 日間培養した。コロニーの一部を直径 1.3 cm の円形にくり抜き、遊走子嚢（無性胞子）を顕微鏡下で数えて活性の評価を行った。lycoside A～D は IC_{50}＝2.8～7.5 μM を示した [2)]。一方、フラボノイドの一種がダイズ疫病菌の無性生殖を阻害するという報告に基づき、フラボノイド 11 種類の活性を調べたところ、IC_{50} 値は genistein で 4.6 μM と lycoside 類に匹敵する活性を示した。一方 quercetin では 5300 μM など様々であった。これらの阻害活性物質は菌の生育にほとんど影響しなかったことから、その作用機構を調べた。すなわち、lycoside 類および genistein を作用させた *P. capsici* の菌糸から RNA を抽出し、RNA-seq により発現遺伝子の解析を試みた。現在は解析を行っている。

【参考文献】

１）Iwai, R., Han, C., Govindam, S. V., & Ojika, M. *J. Agric. Food Chem.*, **66**, 163-169 (2017).
２）岩井里佳, 名古屋大学大学院生命農学研究科修士論文 (2014)

Phytophthora, Lycoside, Flavonoid

講演番号：4B02a03
講演日時：3 月 28 日 09:52～ 総合学習プラザ B02 会場

表面増強ラマン分光法を用いた酵素反応の直接検出：アセチルコリンエステラーゼの阻害剤スクリーニングへの適用
Direct detection of enzyme reactions using Surface-Enhanced Raman spectroscopy: Application to screening for inhibitors of acetylcholinesterase
○山口 洋[1]、竹井 弘之[1,2] ([1]東洋大院生命科学、[2]東洋大生命科学)
○Umi YAMAGUCHI[1], Hiroyuki TAKEI[1,2] ([1]Graduate school of Lifesciences, Toyo Univ., [2]Faculty of Lifesciences, Toyo Univ.)

【背景・目的】本研究の目的は、神経伝達系に重要な酵素であるアセチルコリンエステラーゼ(AChE)に対する阻害剤のスクリーニング系を SERS 法（表面増強ラマン分光法）により確立し、アルツハイマー病や重症筋無力症などに治療効果を有する阻害剤を効率的に探索することである。AChE はアセチルチオコリン(ATC)をチオコリンに加水分解することから、チオコリンを SERS 法で検出することにより添加された阻害剤の効果を評価できる。これまで SERS 法で用いられている銀コロイドを用いた検出ではコロイドの凝集が増強率に影響し信号が変動する問題が発生する。そこで、我々はガラス基板上にシリカナノ粒子を単層に吸着、銀を真空蒸着することにより固相化銀ナノ構造基板を作製している。超撥水領域の中央にサイズ 1mm 以下の SERS 領域を形成することにより、サンプルの濃縮効果の利用も目指している。SERS 領域のサイズはサンプル乾燥時の濃縮率に影響を及ぼすことが判明しており、低濃度・微量サンプル測定時の感度向上の可能性について述べる。
【実験方法】(SERS 用銀基板の作製）スライドガラス表面上にシランカップリング剤の APTMS を滴下して加熱乾燥し、粒径 100 nm のシリカナノ粒子の懸濁液を滴下した。５分間静置し、蒸留水で洗い流し乾燥することにより単層状の粒子が得られた。粒子上に銀を 100 nm 真空蒸着して、SERS 用基板を作製した。濃縮効果を用いる場合には、蒸着前に粒子単層を 30%デトリメトキシシランのエタノール溶液に 15 分間浸漬、乾燥することにより超撥水面とした。最後に直径 0.4～1mm のピンホールを介して、銀蒸着を行った。形成されたピンホール状の SERS 領域は若干親水性になり、滴下された水溶性の液滴は SERS 領域のみに濃縮されることになる。
（酵素反応と測定） 5.0×10^{-8} unit/mL の酵素溶液を調製し 3.6×10-4～3.6×10^{-6} M のパラオキソンまたはカルバリル 5.0×10-4～5.0×10-6 M（AChE 阻害剤）と５分間反応させた後、1.0×10^{-4} M ATC と２分間反応させ１μｌの酵素反応液を SERS 用基板に滴下した。その後サンプルを滴下した SERS 基板をラマン顕微鏡（Thermo Fisher Scientific, Nicolet Almega XR）を用いてスペクトルを取得した。測定条件は励起波長 633 nm、露光時間 1 秒、露光回数 16 回とした。
【結果・考察】5×10^{-8}unit/mL という極めて低い酵素濃度で酵素阻害を検出することが出来た。少量のサンプルで阻害剤の評価を行うことによってサンプル量の削減とより再現性の高い測定が可能になると考えられる。今後、他の阻害剤の評価や、固相化されたアセチルコリンエステラーゼによる阻害剤の評価を検討している。

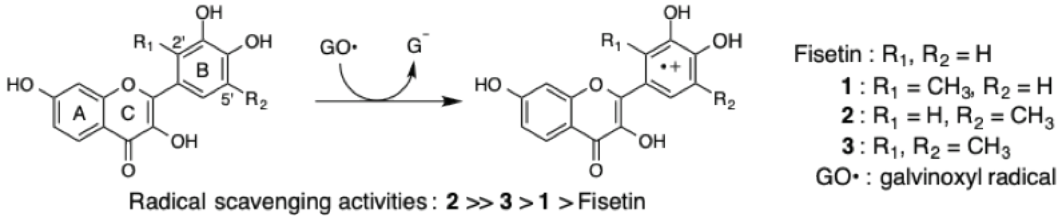
surface enhanced Raman spectroscopy, acetylcholinesterase, superhydrophobic

発表責任者：山口 洋（s39101800215@toyo.jp）

講演番号：4B02a04
講演日時：3 月 28 日 10:03～ 総合学習プラザ B02 会場

C-メチル化フラボノイドのラジカル消去作用
Antioxidative activities of *C*-methylated flavonoid
○福原 潔[1]、中西 郁夫[2]、大久保 敬[3]、今井 耕平[1]、水野 美麗[1]、松本 謙一郎[2]、大野 彰子[4]([1]昭和大薬、[2]量研機構、[3]阪大高等共創院、[4]国衛研)
○Kiyoshi FUKUHARA[1], Ikuo Nakanishi[2], Kei Okubo[3], Kohei Imai[1], Mirei Mizuno[1], Kenichiro Matumoto[2], Akiko Ohno[4] ([1]Showa Univ., [2]QST, [3]Osaka Univ., [4]NIHS)

【目的】我々は、がん予防作用や線虫の寿命延伸作用で注目されているレスベラトロールにメチル基を導入すると強力なラジカル消去作用を示すとともに、遺伝毒性が大きく軽減することを報告した。本研究では、寿命の延伸作用やアルツハイマー病の予防作用で注目されているフィセチンの高機能化を目指して、カテコール構造のオルト位にメチル基を導入したモノメチル体およびジメチル体を合成し、ラジカル消去活性とそのメカニズムを明らかにした。
【方法・結果・考察】メチルカテコールを出発原料とし、Alger-Flynn-Oyamada 反応を用いてフラボノイド骨格を合成後、脱保護してモノメチル体(2'-メチル体:1、5'-メチル体:2)および 2',5'-ジメチル体(3)を得た。これらの化合物について、活性酸素のモデル化合物であるガルビノキシルラジカルに対する反応の速度論的解析を行い、ラジカル消去活性を求めた。その結果、フィセチンはメチル基を導入するとラジカル消去活性が増大し、特に 2 が最も強力な活性を示した。分子軌道計算により最安定化構造を求めたところ、1 および 3 は 2'-メチル基の立体障害により AC 環に対して B 環が大きくねじれた構造を示した。一方、2 は分子全体の平面性が保たれていることから、5'-メチル基はフィセチンの立体構造に影響を与えないことがわかった。強力なラジカル消去作用を有する 2 の O-H 結合の解離エネルギー(BDE)とイオン化ポテンシャル(IP)は、これらの化合物の中でどちらも最小の値を示した。また、これらの化合物のラジカル消去活性は IP と良好な負の相関を示すことから、ラジカル消去反応は一電子還元反応で進行していることが明らかとなった。
以上、フィセチンのカテコール構造のオルト位にメチル基を導入すると強力なラジカル消去作用を示した。メチル基はラジカル消去反応の過程で一電子移動反応によって生成するラジカルカチオン中間体を電子供与効果により安定化するためラジカル消去活性が増強すること、また平面性の高い 2 はラジカルカチオンが分子全体に非局在化するため最も強力なラジカル消去活性を示すことが考えられる。



flavonoid, antioxidant, polyphenol

発表責任者：福原　潔（fukuhara@pharm.showa-u.ac.jp）

講演番号：4B02a05
講演日時：3 月 28 日 10:14～ 総合学習プラザ B02 会場

分子内環固定によるシリビニンの高機能化

Functional improvements of silibinin analogues constrained 3D structure

○水野 美麗、森 一憲、柴沼 質子、福原 潔 (昭和大薬)
○Mirei MIZUNO, Kazunori MORI, Motoko Shibanuma, Kiyoshi Fukuhara (Showa Univ.)

【目的】フラバン骨格を有するポリフェノール類は、多様な生理活性を有することが報告されているが、医薬品への実用化には不十分な活性であることが課題となる。我々はこれら活性の弱さに、分子内の自由回転が寄与していると考えた。自由回転を制御して受容体や酵素の活性中心への親和性が増強することを期待し、環化反応による立体構造の固定化を試みた。当研究室では、catechin 類の立体構造を固定化した新規誘導体を合成した。(+)-catechin(Cat)を環固定化した PCat は分子全体の平面性が高い一方、(−)-epicatechin(EC)の環固定化体(PEC)は平面性が低い。しかし、いずれも環固定化によって、抗酸化活性やＡβ凝集阻害作用、α-グルコシダーゼ阻害作用などが増強することがわかった。本研究では、マリアアザミの種子から抽出される silibinin(Sib)に注目した。これもフラバン骨格を有し、血糖降下作用や抗がん作用、Ａβへの作用など様々な活性を示す。この分子内の自由回転を制御する目的で、Sib のフラバン構造を PCat および PEC に置換した化合物(SibC, SibEC)を設計・合成した。得られたこれらの化合物が有する活性と立体構造の影響について検討を行った。

【方法・結果・考察】

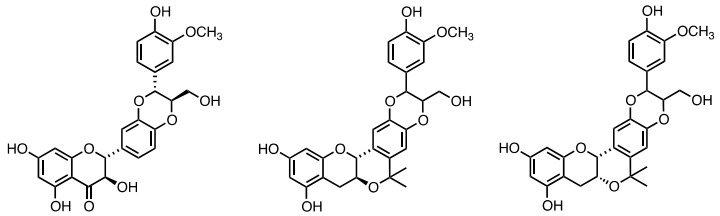
＊合成：Cat および EC の立体構造を固定化した後、各々をカテコール誘導体との縮合反応により新規誘導体 SibC, SibEC を合成した。

＊がん細胞増殖抑制作用：ヒト乳腺がん細胞(MCF-7)及びヒト結腸腺がん細胞(HCT-116)に、各化合物を添加し、その生存率を MTT assay で評価したところ、SibC に強い抑制作用が認められた。

＊α-グルコシダーゼ阻害作用：酵素に対する各化合物の IC_{50} 値を算出したところ、SibC において顕著に阻害活性が増強した。

＊Ａβ凝集阻害作用：Thioflavin-T 法により Ａβ凝集に対する各化合物の阻害程度を評価した。その結果、SibC が最も強力に凝集を阻害していることが明らかとなった。

本研究で検討した活性の大半は、環固定化しかつ分子全体の平面性が高い SibC に強力な活性の増強が認められた。これらの結果より、分子内の自由回転を制御し、かつ平面性の高さが標的部位への親和性に関与していることが示唆される。



silibinin, α-glucosidase, polyphenol

発表責任者：水野　美麗（mizuno@pharm.showa-u.ac.jp）

講演番号：4B02a06
講演日時：3 月 28 日 10:35～ 総合学習プラザ B02 会場

膜透過性が高い環状ペプチドの探索法の検討

Investigation of a screening method of cyclic peptides with high membrane permeability

○井上 雄介、増田 裕一（三重大生物資源）
○Yusuke INOUE, Yuichi MASUDA (Mie Univ.)

【背景・目的】

環状ペプチドの中には、分子サイズが大きいにもかかわらず細胞膜透過性が高いものがある。そのような環状ペプチドの効率的な探索法は、細胞内標的を狙える新たな創薬シードを供給できる。本研究では、膜透過性が高い環状ヘキサペプチド PF1171F（図 1）の環状骨格を基にして、①類縁体混合物の合成、②膜透過性による選別、③機器分析による同定、の 3 ステップ（図 2）により、膜透過性が高い類縁体を見出すことができるかどうかを検証した。

【方法・結果】

これまでの研究により、PF1171F の L-MeLeu、L-Pip、Ant は三次元構造維持および膜透過性に重要であることが分かっている [1]。そこで、残る D-Ala、D-*allo*-Ile、L-Phe の側鎖がそれぞれ異なる類縁体を、各 5 種類ずつ計 125 種合成することにした。これらの類縁体の合成は、我々が確立した PF1171F の合成法 [2] に従い、固相合成によるペプチド鎖の伸長と液相での環化反応により行った。アミノ酸残基の改変部位では、5 種類の Fmoc アミノ酸の等量混合物をそれぞれ縮合した。得られた類縁体混合物を人工膜透過アッセイ（PAMPA）に供し、アクセプター側の溶液に含まれる類縁体を、LC-MS/MS を用いて分離しながら構造解析をした。その結果、PF1171F を含む複数の類縁体が検出され、そのいくつかのアミノ酸配列を決定することに成功した。

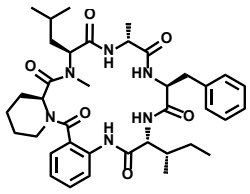


図 1　PF1171F の構造

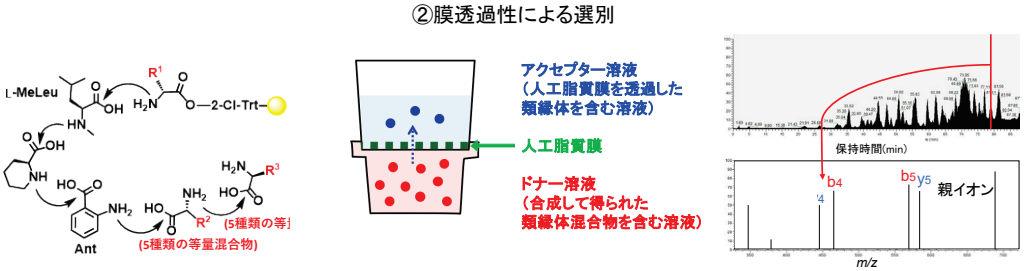


図 2　膜透過性が高い環状ペプチド類縁体の探索法

【参考文献】

1) Masuda, Y. *et al., J. Org. Chem*. **2017**, *82*, 11447.
2) Masuda, Y. *et al., J. Org. Chem*. **2014**, *79*, 7844

cyclic peptide, membrane permeability, LC-MS/MS

発表責任者：増田　裕一（masuda@bio.mie-u.ac.jp）

講演番号：4B02a07
講演日時：3 月 28 日 10:46～ 総合学習プラザ B02 会場

1-デオキシ-D-アルロースの線虫成長阻害活性

Growth-inhibitory activity of 1-deoxy-D-allulose in *C. elegans*

○佐藤 正資[1]、吉原 明秀[2]、砂古口 博文[3]、新谷 知也[4]、George W.J. Fleet[5]、何森 健[2]([1]香川大農、[2]香川大希少糖機構、[3]香川県環保研、[4]愛媛大院連合農、[5]オックスフォード大)
○Masashi Sato[1], Akihide Yoshihara[2], Hirofumi Sakoguchi[3], Tomoya Shitani[4], Fleet George W.J.[5], Ken Izumori[2] ([1]Kagawa Univ., [2]IIRSRE, Kagawa Univ., [3]Kagawa Pref., [4]Ehime Univ., [5]Univ. of Oxford)

【目的】人や家畜の寄生線虫症治療薬（抗線虫薬）に対する薬剤耐性虫の出現が深刻な問題となっている。そのため，従来の抗線虫薬とは異なる作用メカニズムを持つ薬剤の開発が望まれている。

我々はモデル生物である線虫 *Caenorhabditis elegans* の幼虫を用いて希少糖(天然に存在量の少ない単糖異性体)の成長阻害活性を調査し，抗線虫薬候補の探索を行なってきた。その結果，D-フルクトースの C3 エピマーである D-アルロース(D-Alu)や D-グルコースの C3 エピマーである D-アロースが成長阻害活性を示すことを報告している。今回，酵素的に合成した 1-デオキシ-ケトヘキソース立体異性体全 8 種および各種のデオキシ-ケトヘキソース希少糖の線虫成長阻害活性について報告する。

【方法・結果】 *C. elegans* 第一期幼虫(L1)を同調培養により得た。試験容器として 24 ウェルカルチャープレートを用い，各ウェルに試料を含んだ液体培地と L1 約 10 頭を入れ，20℃で静置培養を行った，3 日後，線虫個体を顕微鏡撮影し，その画像ファイルを画像解析ソフト(ImageJ)で処理し，各個体の投影面積値を求めた。対照線虫の平均面積値を基準として，線虫の成長を 50%阻害する濃度(GI_{50}値)を求めた。その結果，試験した異性体のうち 1-デオキシ-D-アルロース (1d-D-Alu) のみに強い成長阻害活性が認められ，GI_{50}値は 5.4 mM と計算された。D-Alu の GI_{50}値は 53 mM であり，D-Alu は 1 位のデオキシ化により約 10 倍，活性が上昇した。5-デオキシ-，あるいは 6-デオキシ-D-アルロースには全く成長阻害活性が認められなかった。このことから D-Alu の活性発現には，5 位と 6 位の水酸基の存在が必須であることが明らかになった。また，強力な解糖系阻害剤である 2-デオキシ-D-グルコースの GI_{50}値は 19 mM となり，1d-D-Alu はこれよりも強い成長阻害活性を示した。しかし，1d-D-Alu はヒト細胞(HuH7)には毒性が認められず，線虫に対する高い選択毒性が期待できる。

1d-D-Alu による線虫成長阻害は，D-リボースあるいは D-フルクトースを培養培地に添加することにより，打ち消すことが出来た。このことから，1d-D-Alu は D-リボースと D-フルクトース代謝を阻害していると考え，ペントースリン酸経路のリボースリン酸イソメラーゼ(RPI)と解糖系のグルコースリン酸イソメラーゼ(GPI)がその阻害ターゲットであると仮説を立てた。現在，両酵素のノックダウン線虫を用いて，この仮説の検証を行なっている。糖代謝経路をターゲットとする抗線虫薬はなく，1d-D-Alu は新規な作用メカニズムをもつ抗線虫薬シーズとなると考えられる。

rare sugar, Caenorhabditis elegans, antinematodal

発表責任者：佐藤正資（sato@ag.kagawa-u.ac.jp）

講演番号：4B02a08
講演日時：3 月 28 日 10:57～ 総合学習プラザ B02 会場

大量合成に適したペプチド液相合成法の開発

Development of Tag-Assisted Liquid-Phase Peptide Synthesis: Application in Large Scale

○高澤 理子[1]、岡田 洋平[1]、久保 大輔[2]、岩永 なつみ[2]、藤田 秀司[2]、鈴木 康介[2]、鈴木 秀明[2]、神谷 秀博[1]、千葉 一裕[1]（[1]東京農工大、[2]JITSUBO 株式会社）
○Rico TAKASAWA[1], Yohei OKADA[1], Daisuke KUBO[2], Natsumi IWANAGA[2], Syuji FUJITA[2], Kosuke SUZUKI[2], Hideaki SUZUKI[2], Hidehiro KAMIYA[1], Kazuhiro CHIBA[1] ([1]Tokyo Univ. of Agri. and Tech., [2]JITSUBO Co., Ltd.)

【背景と目的】ペプチドは、アミノ酸が２から５０個程度連結した分子である。ペプチドの中には生体調節機能を持っているものもあり、これらは難病の治療に役立つことが期待されている。ペプチドを医薬品開発に応用していくうえで、活性試験や臨床試験で必要な量のペプチドを合成する方法が求められている。これまで当研究室では、疎水性タグを合成支持体としたペプチド液相合成法を開発してきた。この合成法は、従来の液相合成法と固相合成法の両者の利点を併せ持つ。具体的には、疎水性タグが溶けるテトラヒドロフラン中で縮合・脱保護反応を効率良く進めることができる。反応終了後はアセトニトリルでタグペプチド（疎水性タグがついたペプチド）を析出させ、簡便にペプチドを濾過精製することができる。しかしながら、タグペプチドを析出させるとき大量のアセトニトリルを消費する。そのため大量のペプチドを合成したとき、アセトニトリルの大量消費による環境負荷が問題となる。そこで本研究では、アセトニトリルの消費量を削減することで、より大量合成に適したペプチド合成法を開発することを目的とした。

【方法と結果】反応終了後の濾過精製操作を減らせば、アセトニトリルの消費量を削減できると考えた。しかしながら縮合後の濾過精製を省略して脱保護反応に進むと、縮合で残存した活性アミノ酸が、脱保護されたペプチドに再縮合してしまうことが懸念された。そこで活性アミノ酸を他のアミンで捕捉すれば、再縮合を抑制できるのではないかと予想し、縮合後の反応液にプロピルアミンを添加した。その結果、活性アミノ酸とプロピルアミンの縮合体の生成により、活性アミノ酸がプロピルアミンによって捕捉されたのを確認することができた。ここで他のアミンを用いて結果を比較しても、特に差は見られなかった。そして縮合および活性アミノ酸の捕捉、脱保護を連続して同じ容器で進めた後、タグペプチドをアセトニトリルで析出させて濾過精製をした。その結果、目的物を 97%の収率で得ることができ、活性アミノ酸が再縮合したペプチドは生成しなかった。そのため縮合反応後の濾過精製操作を省略し、アセトニトリルの消費量を大幅に削減することができた。この合成法を適用して、遺伝性血管性浮腫（Hereditary angioedema; HAE）の治療薬として有用な生物活性ペプチドである Icatibant Acetate を 100 g スケール、99%以上の純度で合成することに成功した。

1) Okada, Y. *et al.*; *Org. Process Res. Dev.* **2019**, 23, 11, 2576-2581.

peptide, LPPS, soluble tag

講演番号：4B02a09
講演日時：3 月 28 日 11:08～ 総合学習プラザ B02 会場

クワ（*Morus sp.*）の葉抽出物による歯周病原細菌に対する抗菌活性

Antimicrobial activity of Mulberry (*Morus sp.*) leaf extract against periodontpathic bacteria.

白井 尊久[1]、○佐藤 祐太郎[1]、石原 和幸[2]（[1]東京歯科大学　歯学部、[2]東京歯科大学　微生物学講座）
Takahisa Shirai[1], ○Yutaroh Satoh[1], Kazuyuki Ishihara[2] ([1]Faculty of dentistry, Tokyo Dental College., [2]Department of Microbiology, Tokyo Dental College.)

【背景・目的】

歯周病は歯周組織の炎症を主徴とし、壮年期以後の葉の喪失の主たる疾患でありながら、さらに最近、糖尿病や心疾患、感染性心内膜炎といった全身疾患への影響も示唆されている。歯周病の治療にはプラークの除去とともに、時に抗菌薬を用いるが、一方でそれは最近の薬剤耐性を引き起こすリスクを含んでいる。このような観点から、口腔細菌叢をコントロールするための新たな方法が求められている。

クワ(*Morus sp.*)の葉はかつて日本の養蚕業において広く利用され、またその栽培方法も極めて容易であることから、簡単に入手することができる。このような植物から抗菌活性物質が得られることは、安定的で安価な供給が想定される。このような観点から我々はクワの葉を用いて、歯周病原細菌として代表的な*Porphyromonas gingivalis*に対する抗菌活性を測定した。

【方法・結果】

クワの葉を液体窒素下で破砕し、アセトンを用いて抽出した。アセトン抽出分画からアセトンを除去し、10%リン酸水溶液にてpHを１以下に調整した。この抽出分画に酢酸エチルを加え、油水分離を用いて酢酸エチル層を回収し、乾固した。

抽出物はヘキサン―アセトン混合溶媒を用いたシリカゲルオープンカラム クロマトグラフィーによって、6個のフラクションに分離された。乾固した各フラクションを培地に溶解させ*P. gingivalis*に対する抗菌活性を測定したところFraction 3に著しい抗菌活性を認めた。このことから、クワの葉には*P. gingivalis*に対する抗菌活性物質を含む可能性が示唆された。現在、この抗菌活性物質を精製・同定する方法を探索している。

antimicrobial, periodontitis, mulberry

発表責任者：佐藤祐太郎（yutarohsatoh@infant-music.com）

講演番号：4B02a10
講演日時：3 月 28 日 11:19～ 総合学習プラザ B02 会場

変性β-1,3-1,6-グルカンに包接された抗菌剤の抗菌活性
Evaluation of antibacterial activity of antibacterial molecules incorporated in renatured-beta-1,3-1,6-glucan
○畦﨑 梨花、甲元 一也（甲南大 FIRST）
○RIKA UNESAKI, KAZUYA KOUMOTO (Konan Univ.)

［研究背景］
医薬品の中には薬効が高くても水溶性が低いため、化学修飾や製剤技術によって可溶化しなければならないものがある。そのような薬剤を可溶化するために、シクロデキストリンをホストとした包接可溶化法がある。しかし、シクロデキストリンにはゲストの構造特異性があり、可溶化できないものが多く存在する。我々の研究室では、難水溶性物質を包接可溶化できる変性β－１，３−１，６－グルカン（r－グルカン）を開発し、過去の年次大会で報告してきた。また、難水溶性物質とｒ－グルカンの包接複合体を凍結乾燥させると、長期保存可能な粉末とでき、加えて、その粉末は室温で撹拌するだけで、高濃度で溶解することも明らかとした。しかし、これまでは包接された物質の機能性についての検討が行えていなかった。そこで本公演では、抗菌剤を包接させた包接複合体を調製し、その抗菌活性についての評価を行ったので報告する。
［実験方法］
ｒ－グルカンには、分岐度の高いＡｕｒｅｏｂａｓｉｄｉｕｍ　ｐｕｌｌｕｌａｎｓ由来の難水溶性のβ－１，３－１，６－グルカンを、抗菌剤としてセフォペラゾン、クラリスロマイシン、エリスロマイシンを用いた。抗菌物質は包接後、凍結乾燥を行い粉末化し、実験直前に溶解させて測定に用いた。包接複合体の抗菌活性の評価方法として、液体培地希釈法とディスク法を用いた。
［研究結果］
用いた抗菌剤は水溶性に乏しいが、包接複合体とすることで水溶性を上昇させることに成功した。例えば、ｒ－グルカンの総グルコース濃度を１０ mMとした場合、セフォペラゾン由来の吸光度はおよそ２倍に上昇した。得られた包接複合体の抗菌活性を液体培地希釈法とディスク法で、ポジティブコントロールを塩化ベンザルコニウム、ネガティブコントロールをグルカンとして評価した。包接複合体としても、アセトンのような水系有機溶媒に溶かして添加した際と同様の抗菌活性を確認することができたことから包接複合体に取り込まれても抗菌活性を失わず発現することが示された。講演ではそれら詳細について報告する。

antibacterial molecules, beta-1,3-1,6-glucan, inclusion complex

発表責任者：甲元　一也（koumoto@konan-u.ac.jp）

講演番号：4B02a11
講演日時：3 月 28 日 11:40～ 総合学習プラザ B02 会場

クマリン骨格形成鍵酵素における基質認識に必要な化学因子の探索
Exploration for chemical structures required for substrate recognition of the *ortho*-hydroxylase, a key enzyme in coumarin formation.
○関口 茉樹、清水 文一（東洋大院生命）
○Maki SEKIGUCHI, BUN-ichi SHIMIZU (Toyo Univ.)

【背景・目的】
植物は二次代謝により、非常に多様な構造を持つ化合物を産生する。クマリン化合物は、2*H*-1-benzopyran-2-oneを基本構造に持つ二次代謝産物で植物界に広く分布している。また抗菌、抗酸化作用を有しており、病原の侵入や傷害で植物組織に誘導蓄積することから、植物の生体防御に関与していると考えられている。植物でのクマリン化合物の生合成は、フェニルプロパノイド経路上の各種桂皮酸類縁体の芳香環のオルト位に水酸基が導入され、側鎖のトランス-シス異性化、ラクトン化を経て、クマリン化合物が生成されることが明らかになっている。実際、シロイヌナズナではクマリン化合物の一種であるScopoletinの生合成におけるオルト位水酸化酵素が2-オキソグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼ（2OGD）の一種であるFeruloyl-CoA 6'-hydroxylase（F6'H1）であることが明らかにされた[1]。F6'H1はその基質としてFeruloyl-CoAのみを認識し、遊離のFerulateやFerulateエステルを基質としない。一方、本酵素のX線構造解析が報告されているが[2]、CoAチオエステル部分の基質複合体は結晶化されておらず、CoAチオエステルの認識に関しては全く不明である。本研究ではF6'H1の基質選択性に着目し、Feruloyl-CoAをミミックしたFeruloyl チオエステル誘導体の有機合成を行い、合成したFerulic Acid誘導体とF6'H1との構造活性相関を検討した。

【方法・結果】
有機合成により、大きさや置換基を考慮した種々の Feruloyl チオエステル誘導体を合成した。方法としては Ferulic acid を出発原料とし塩化チオニルでクロライド化し活性化させたのち、1*H*-Benzotriazole（Bt）とカップリングさせ、カルボン酸の活性化を行い、Feruloyl-Bt を合成した。その後、mercaptoethane など-SH 基を持つ化合物とカップリングさせることで Feruloyl チオエステル誘導体を合成した。得られた Feruloyl チオエステル誘導体および Feruloyl-CoA を大腸菌で発現させた F6'H1 タンパク質溶液に加え酵素活性測定を行い、構造活性相関を検討した。

【参考文献】
（1）Kosuke Kai. et al. *Plant J.*, **55**, 989-999 (2008).
（2）Xinxiao Sun. et al. *Sci. Rep.,*10355 (2015).

Ortho-hydroxylase, Substrate recognition, Ferulate thioesters

講演番号：4B02a12
講演日時：3 月 28 日 11:51～ 総合学習プラザ B02 会場

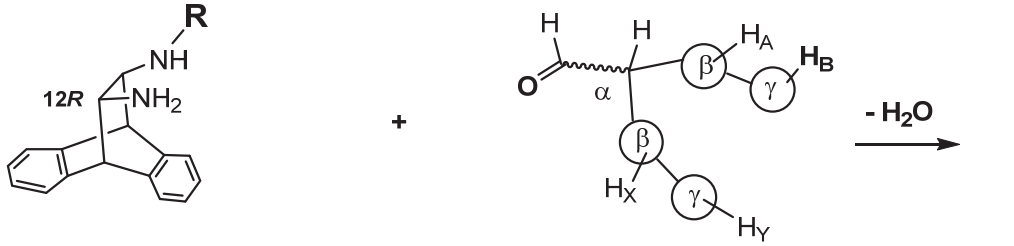
新規なアルデヒドの絶対配置決定法
A new method for determination of absolute configuration of aldehydes
○福士 幸治、ラクサナ アヌグラ　アディ、福田 怜 (北大農)
○Yukiharu Fukushi, Anugerah Adhi Laksana, Satoshi Fukuda (Hokkaido Univ.)

目的　これまで*cis*-11,12-diamino-9,10-dihydro-9,10-ethanoanthracene（RDA）1の誘導体をキラル配位子とした触媒が数多く報告されている[1)]。化合物1のmono-*N*-sulfonyl化合物とアルデヒドとの環状アミナール誘導体を調製し、それら誘導体をNMR解析することで元のアルデヒドの絶対配置が決定できるか検討した。

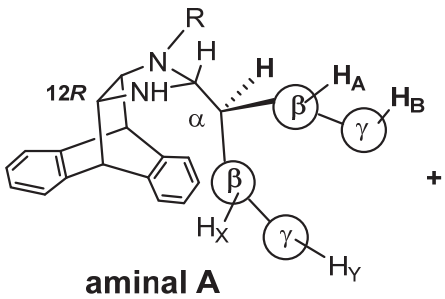
方法と結果　化合物1のmono-*N*-sulfonyl化合物（2-5）とラセミのアルデヒドとのジアステレオマーアミナール誘導体は、シリカゲルTLC板上で容易に分離した。これらジアステレオマー誘導体をNMR解析し結果、化学シフトとNOE相関から一方の誘導体からでも元のアルデヒドの絶対配置が決定できた。また、ジアステレオマー間の対応するプロトンおよびカーボンの化学シフト差には、以下の傾向が認められた。

1) *Tetrahedron Lett.* **57** 3287-3290 (2016)およびその引用文献。

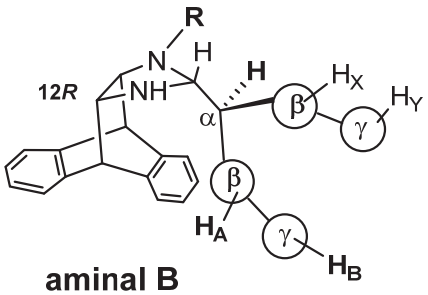
R = 1; H, 2; Ms, 3; Ts, 4;1-Naphtyl (1-Nps), 5; 2-Naphthyl (2Nps)



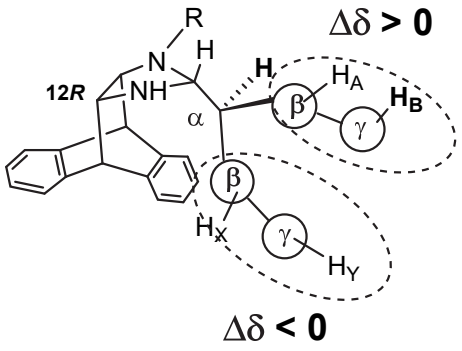
mono-*N*-sulfonyl 12(*R*)-RDA　**racemic α-disubstituted aldehydes**



aminal A　+



aminal B



Δδ = δ aminal A - δ aminal B
(^{1}H and ^{13}C)

"roofed" cis-diamine, chiral aldehyde, absolute configuration

発表責任者：福士幸治（y-fuku@abs.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：4B02a13
講演日時：3 月 28 日 12:02～ 総合学習プラザ B02 会場

ネオニコチノイド系殺虫剤に対する脊椎動物と昆虫間の感受性差をもたらす分子機構
Molecular mechanism of selectivity of neonicotinoids
○神谷 昌輝[1]、嶋田 翔太[2]、冨山 翔[1]、小泉 航[1]、伊原 誠[1]、松田 一彦[1]（[1]近畿大農、[2]近畿大院農）
○ Masaki KAMIYA[1], Shota SIMADA[2], Kakeru TOMIYAMA[1], Wataru KOIZUMI[1], Makoto IHARA[1], Kazuhiko MATSUDA[1] ([1]Kindai Univ., [2]Grad. Sch. Kindai Univ.)

【目的】ニコチン性アセチルコリン受容体（nAChR）は、脊椎動物のみならず昆虫の神経系にも存在する普遍的リガンド作動性イオンチャネルで、興奮性シナプス伝達を媒介する。ネオニコチノイド系殺虫剤は、昆虫の nAChR に対して高活性を示すのに対して、脊椎動物の nAChR に対しては高濃度で処理したときしか作用しない。その原因の一つとして、ヒトと昆虫の nAChR における loop C の YXCC 配列の X 位のアミノ酸の違いが関与している。すなわち、昆虫の α1 サブユニットは本部位にセリンをもつのに対して、脊椎動物の中枢で中心的な役割をはたしている α4 サブユニットはグルタミン酸をもつ。セリンは水素結合を提供するのに対して、グルタミン酸は水素結合を受容する。またセリンに比べてグルタミン酸は立体的に大きく負電荷を帯びる。これらの性質の違いうち、どの性質が昆虫と脊椎動物の nAChR のネオニコチノイド感受性差をもたらしているのか不明である。そこで本研究では、ショウジョウバエ Dα1 サブユニットとヒヨコ β2 サブユニットが形成する nAChR を使用して、この未解明問題の解明を目指した。
【方法】Dα1 サブユニットと β2 サブユニットの cRNA を異なる比率で混合し、アフリカツメガエル卵母細胞にマイクロインジェクションすることにより$(D\alpha1)_3(\beta2)_2$ nAChR と$(D\alpha1)_2(\beta2)_3$ nAChR を発現させた。これらの nAChR に対するネオニコチノイドのアゴニスト活性は膜電位固定法で測定した。
【結果と考察】$(D\alpha1)_3(\beta2)_2$ nAChR および$(D\alpha1)_2(\beta2)_3$ nAChR は loop C の Ser221 をグルタミン酸に変異させることで、両 nAChR に対するイミダクロプリドおよびチアクロプリドのアゴニスト活性は低下したことから、loop C における当該アミノ酸の違いが昆虫と脊椎動物の nAChR のネオニコチノイド感受性の原因の一つとして関与していることが確認された。次に、Ser221 をアラニンに置換すると、試験した nAChR に対するネオニコチノイドのアゴニスト活性は大きな影響を受けなかったことから、セリン残基がもつヒドロキシ基との水素結合の形成はネオニコチノイド感受性を高める上で重要な役割を果たしていないことが判明した。さらに、Ser221 をグルタミン酸と同等のサイズをもち負電荷をもたないグルタミンに置換すると、$(D\alpha1)_3(\beta2)_2$ nAChR に対するネオニコチノイドのアゴニスト活性はあまり変化しなかったのに対して、$(D\alpha1)_2(\beta2)_3$ nAChR に対する本殺虫剤の活性化効率は低下した。したがって、脊椎動物の α サブユニットが loop C にグルタミン酸をもつことによりネオコチノイドに対して低い感受性を示すのは、本アミノ酸残基とネオニコチノイドとの静電的相互作用のみならず、立体的な相互作用もはたらいているためと考えられた。

Neonicotinoid, Drosophila melanogaster, Nicotinic acetylcholine receptor

発表責任者：神谷　昌輝（1611430135m@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：4B02a14
講演日時：3 月 28 日 12:13～ 総合学習プラザ B02 会場

花粉媒介昆虫の標的に対するネオニコチノイド系殺虫剤の作用機構
Mode of actions of neonicotinoids on target sites in pollinators

○小森 勇磨[1]、重藤 渉[2]、神谷 昌輝[1]、小泉 航[1]、伊原 誠[1]、松田 一彦[1] ([1]近畿大農、[2]近畿大院農)
○Yuma Komori[1], Sho Shigetou[2], Masaki Kamiya[1], Wataru Koizumi[1], Makoto Ihara[1], Kazuhiko Matsuda[1] ([1]Kindai Univ., [2]Grad. Sch. Kindai Univ.)

【目的】ネオニコチノイド系殺虫剤は植物での浸透移行性に優れ、種子処理で農作物を害虫による食害から守ることができるため、作物保護に多用されている。ネオニコチノイドは、昆虫のニコチン性アセチルコリン受容体（nAChR）に選択的に作用することで昆虫選択的に殺虫効果を発揮するものの、害虫種特異的に作用するというわけではない。そのため、ミツバチ等の花粉媒介昆虫に対する影響が懸念されている[1]。そこで本研究では、ミツバチ α1 サブユニットとヒヨコ β2 サブユニットがつくる数種の nAChR に対するネオニコチノイドのアゴニスト作用について調べたので報告する。

【方法】ミツバチ α1 サブユニット cDNA は働きバチから単離し、pcDNA3.1(+)ベクターにクローニングした。これを鋳型として cRNA を *in vitro* で合成した。同様に調製したヒヨコ β2 サブユニットの cRNA とともにアフリカツメガエル卵母細胞にマイクロインジェクションすることで nAChR を発現させた。

本 nAChR に対するネオニコチノイドのアゴニスト活性は二電極膜電位固定法で測定し、それぞれの化合物について半数効果濃度の逆対数値 pEC_{50} とアセチルコリンに対する相対最大活性化効率 I_{max} を決定した。

【結果と考察】ミツバチ α1 サブユニットはヒヨコ β2 サブユニットとともに発現させることで nAChR を形成し、アセチルコリン（nAChR）の濃度に応じてサイズの異なる応答を示した。アセチルコリンがアフリカツメガエル卵母細胞に対して誘起するイオン電流のサイズは 2 つのサブユニットの構成比を変えてもほとんど変化しなかった。

イミダクロプリドとクロチアニジンを処理したところ、いずれもパーシャルアゴニストとして作用した。pEC_{50} 値で比較するとイミダクロプリドはクロチアニジンよりも高い活性を示した。一方、I_{max} 値で比較するとクロチアニジンはイミダクロプリドより高い値を示した。ミツバチ α1 サブユニットとヒヨコ β2 サブユニットの構成比を変えるとイミダクロプリドの I_{max} 値は有意に変化したのに対してクロチアニジンの I_{max} 値はほとんど変化しなかったことから、両化合物は本研究で試験した nAChR に対して異なる相互作用をしていると推察された。ミツバチ α1 サブユニット-ヒヨコ β2 サブユニット nAChR の分子モデルを構築したところ、2 種の化合物と nAChR との相互作用において明らかな差が見られた。その差をもとに、これらの化合物の作用機構の違いについて言及する。

1. Matsuda *et al*., *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* in press

Neonicotinoid, Nicotinic acetylcholine receptor, Pollinator

発表責任者：小森　勇磨（1611430026t@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：4B02a15
講演日時：3 月 28 日 12:24～ 総合学習プラザ B02 会場

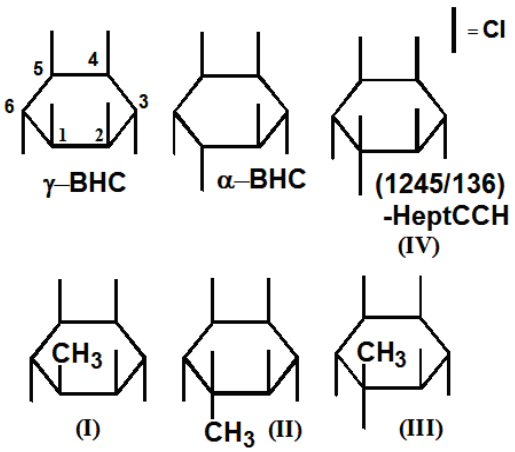
メチル基を付加したγ-BHC 類縁体の殺虫活性と GABA アンタゴニスト活性

Insecticidal and GABA antagonist activities of gamma- and alpha-BHC analogues with an additional methyl group

○田中 啓司[1]、尾添 嘉久[2]、赤松 美紀[3]、松田 一彦[1]([1]近畿大学農、[2]島根大生物資源、[3]京都大農)
○Keiji Tanaka[1], Yoshihisa Ozoe[2], Miki Akamatsu[3], Kazuhiko Matsuda[1] ([1]Kindai Univ., [2]Shimane Univ., [3]Kyoto Univ.)

目的:ベンゼンを光塩素化して得られる BHC(1,2,3,4,5,6-Hexachlorocyclohexane)の殺虫活性主成分であるγ-BHC に比べ、立体異性体の中で最も生成量の多い異性体であるα-BHC の殺虫活性は極めて弱い。α-BHC とγ-BHC の違いは一ヶ所の Cl 原子の配向の違いだけであり、少しの構造の違いでどうしてこの様な大きな活性の違いが現れるのか興味深い。50 年ほど前に、京都大学中島研究室でγ-BHC 骨格上の塩素原子（Cl）をメチル基（CH_3)で置換した類縁体（I）が合成されており、その活性はγ-BHC に比べ少し劣るが、高い活性を維持していることが報告されている。CH_3 基と塩素原子（Cl）は、サイズとしては非常に近いが、電子的な性質には、大きな違いがある。

方法・結果：今回、BHC 骨格上の Cl 原子の一つを CH_3 基に置換した化合物に加え、γ-BHC あるいはα-BHC 上の H 原子の一つを CH_3 基で置換した BHC 類縁体を合成し、それらの殺虫活性と GABA アンタゴニスト活性を調べた。γ-BHC 骨格上の水素原子（H）を CH_3 基で置換した類縁体(II)とα-BHC 骨格上 の水素原子を CH_3 基で置換した類縁体は、お互いの Cl 原子と CH_3 基が反転した構造で、構造と活性との観点で非常に興味深い類縁体である。今回供試した類縁体（II)、(III)の殺虫活性、GABA アンタゴニスト活性は、活性はあるものの、γ-BHC や（I）に比べ劣り、α-BHC や Heptachlorocyclohexane のε異性体（IV）とほぼ同程度の活性であり、BHC 骨格上の Cl 基の意味を考えるうえで、非常に興味がある結果であった。



BHC, GABA antagonist, Insecticidal activity

発表責任者：田中啓司（tkeiji@nike.eonet.ne.jp）

講演番号：4B03a01
講演日時：3 月 28 日 09:30～ 総合学習プラザ B03 会場

超活性海洋天然有機化合物マイトトキシンの標的分子探索
Screening for target molecule of maitotoxin, the most toxic marine natural product
角替 俊輔[1]、チャン キャサリーン[2]、トン エイミーヒンヤン[2]、アウラク カマルディープカウアー[2]、ハスビド アンドレア[2]、松本 健[3]、八代田 陽子[3]、モファット ジェイソン[2]、ブーン チャールズ[2]、山下 まり[1]、村田 道雄[4]、吉田 稔[3,5,6]、○此木 敬一[1]([1]東北大院農、[2]トロント大、[3]理研 CSRS、[4]阪大院理、[5]東大院農・応生工、[6]東大微生物連携機構)
Shunsuke Tsunogae[1], Katherine Chan[2], Amy Hin Yan Tong[2], Kamaldeep Kaur Aulakh[2], Andrea Habsid[2], Ken Matsumoto[3], Yoko Yashiroda[3], Jason Moffat[2], Charles Boone[2], Mari Yotsu-Yamashita[1], Michio Murata[4], Minoru Yoshida[3,5,6], ○Keiichi Konoki[1] ([1]Tohoku Univ, [2]Univ. Toronto, [3]Riken CSRS, [4]Osaka Univ., [5]Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo, [6]CRIIM, Univ. Tokyo)

【目的】渦鞭毛藻 *Gambierdiscus toxicus* より単離されたマイトトキシン（maitotoxin, MTX）[1]は、ペプチド毒を除くとマウスに対する急性致死毒性において史上最強である。その根拠は様々な培養細胞や組織に対して細胞内カルシウム濃度を顕著に増加させることに起因すると推測される。しかし、単離後、約 40 年を経た現在において、詳細は不明である[2]。我々は、化学構造に着目して特異的阻害剤の探索、光親和性標識実験等を進め MTX の作用機序解明を試みたが、確固たる証拠を得るに至らず[3-4]、画期的な戦略を模索してきた。本研究では、一細胞中における全遺伝子を対象とした網羅的探索を実施し、MTX の標的分子同定を目指す。
【方法】（１）遺伝子数が少なく標的分子探索に適している分裂酵母、出芽酵母を用意し、MTX に対する感受性を評価した。続いて、（２）一倍体細胞株である HAP1 を用い、CRISPR スクリーニングを実施した。約 18,000 種類の遺伝子を標的として 71,000 種類のシングルガイド RNA を用意し、CRISPR-Cas9 システムを用いることにより各遺伝子を欠損した約 18,000 個の細胞株ライブラリーを構築した。この細胞群に対して 3-4 日毎に MTX（実験群）および DMSO（対照群）を添加・培養するサイクルを 3 回繰り返した。残存する細胞株よりゲノム DNA を抽出し、次世代型配列解析装置を用いて各遺伝子破壊による MTX 感受性を実験群と対照群で比較定量した。
【結果と考察】（１）分裂酵母、出芽酵母、各々、野生株、薬剤感受性株を用意したが、いずれも MTX に対して非感受性であった。（２）CRISPR スクリーニングの結果、MTX の細胞毒性に関与する遺伝子として、細胞膜構成成分の生合成に関与する一連の遺伝子（候補遺伝子）が同定された。（３）本結果を検証するため、候補遺伝子によりコードされるタンパク質に対する阻害剤を投与する条件で MTX の細胞毒性を調べたが、MTX の細胞毒性に対する影響は観測されなかった。続いて、A549 細胞、HeLa 細胞を用いて、候補遺伝子に対する siRNA を導入して各々、発現量を減少させた。しかしこれまでに、MTX の感受性に影響を及ぼした遺伝子は得られていない。現在、注目する候補遺伝子を増やし、本手法を継続中である。

参考文献：1) Murata, M. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 2060. 2) Gusovsky, F. and Daly, J. W., *Biochem. Pharmacol.* **1990**, *39*, 1633. 3) Konoki, K. *et al.*, *J. Neurochem.* **1998**, 70, 409.4) Konoki, K. *et al.*, *Chem. Res. Toxicol.* **1999**, *12*, 993.

maitotoxin, target identification, CRISPR screening

講演番号：4B03a02
講演日時：3 月 28 日 09:41～ 総合学習プラザ B03 会場

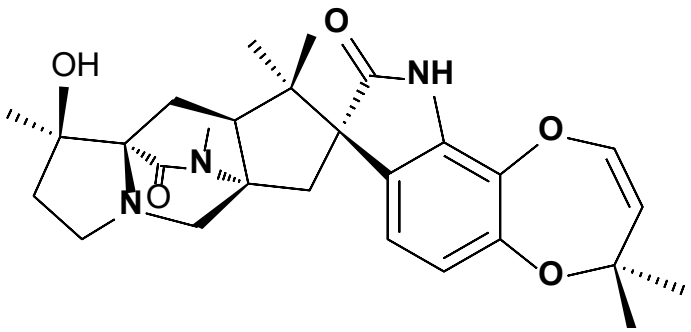
殺線虫活性物質パラヘルクアミドの標的活性の分子構造基盤
Structural basis of the target site activity of the nematicide paraherquamide

○二木 邦浩[1]、小泉 航[2]、伊原 誠[1]、松田 一彦[1] ([1]近畿大院農、[2]近畿大農)
○Kunihiro NIKI[1], Wataru KOIZUMI[2], Makoto IHARA[1], Kazuhiko MATSUDA[1] ([1]Grad. Sch. Kindai Univ., [2]Kindai Univ.)

【目的】一部の線虫は、ヒトも含む動物のみならず植物等にも寄生して様々な被害をもたらすため、重要な防除対象生物となっている。これまで、レバミソールやイベルメクチンなどの殺線虫剤が開発された、抵抗性が発達し、新たな殺線虫剤の開発が望まれている。糸状菌が産生する殺線虫活性物質パラヘルクアミド類はスピロコハク酸イミド構造をもつインドールアルカロイドの一種であり、線虫の神経系で発現するニコチン性アセチルコリン受容体（nAChR）を阻害する。本研究では、N 型 nAChR に比重を置きながらパラヘルクアミドの殺線虫活性発現機構について検討したので報告する。

【方法】線虫の nAChR はアフリカツメガエル卵母細胞に発現させた。パラヘルクアミドのアンタゴニスト活性はアセチルコリンが nAChR を発現させた卵母細胞に誘起するイオン電流を抑制する作用で評価した。パラヘルクアミドと nAChR の相互作用を知るため、アセチルコリン結合蛋白質（AChBP）と本化合物がつくる複合体の共結晶をつくり、その X 線回折像を SPring-8 にて取得した。

【結果と考察】*C. elegans* の N 型と L 型の nAChR に対してパラヘルクアミド A を試験したところ、本化合物は N 型より L 型の nAChR に対して高いアンタゴニスト活性を示した。その分子機構を解明するため、N 型受容体と同様にホモ 5 量体を形成する AChBP とパラヘルクアミド A がつくる複合体の X 線結晶構造を解明したところ、本化合物は AChBP の loop C と特有の相互作用を行うことが判明した。N 型と L 型 nAChR の loop C のアミノ酸配列を比較したところ明白な違いが見られた。そこで、N 型 nAChR の loop C のアミノ酸配列を L 型 nAChR の loop C のアミノ酸配列に置換することにより N 型 nAChR のパラヘルクアミド A 感受性の変化がおこるのか検討した。その結果、本構造変化によって N 型 nAChR のパラヘルクアミド A の感受性は有意に上昇した。この現象は N 型 nAChR とパラヘルクアミド A がつくる複合体のモデルで説明できた。



パラヘルクアミド A

以上の結果から、パラヘルクアミド A の活性発現に nAChR の loop C との相互作用が関与しているものと推察された。

nematicide, nicotinic acetylcholine receptor, Caenorhabditis elegans

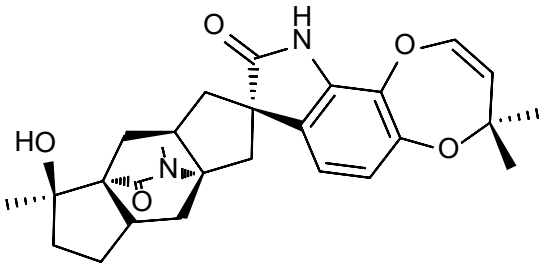
講演番号：4B03a03
講演日時：3 月 28 日 09:52～ 総合学習プラザ B03 会場

パラヘルクアミドの標的選択性の構造因子
Structural factors determining the target selectivity of paraherquamide
○小泉 航[1]、二木 邦浩[2]、伊原 誠[1] ([1]近畿大農、[2]近畿大院農)
○Wataru KOIZUMI[1], Kunihiro NIKI[2], Makoto IHARA[1] ([1]Kindai Univ., [2]Grad. Sch. Kindai Univ.)

【目的】糸状菌が生合成するインドールアルカロイドの一種パラヘルクアミド類は、従来の殺線虫剤とは異なる作用機構で活性を発現すると考えられているが、その詳細は明らかではない。本研究ではゲノムが解読されている線虫 *Caenorhabditis elegans* を活用して標的ニコチン性アセチルコリン受容体（nAChR）とパラヘルクアミド A の相互作用の分子機構を L 型 nAChR に比重を置きながら検討したので、その結果を報告する。

【方法】作用機構の比較するために用いた N 型 nAChR と同様に、L 型 nAChR もアフリカツメガエルの卵母細胞に nAChR のサブユニットをコードする cRNA マイクロインジェクションすることで発現させた。試験には、パラヘルクアミド類の中で最も高い殺線虫活性を示すパラヘルクアミド A を使用した。本化合物は、自身で糸状菌の一種を培養し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーと分取 HPLC を用いて精製することで獲得した。パラヘルクアミド A は nAChR を発現させたアフリカツメガエル卵母細胞に前処理したあとにアセチルコリンとともに共処理した。このとき観測されるイオン電流のピーク値をパラヘルクアミド A 処理前に測定したアセチルコリンが誘起するイオン電流を比較することで本化合物のアンタゴニスト活性を評価した。

【結果と考察】*C. elegans* の L 型 nAChR は N 型 nAChR よりも高いパラヘルクアミド A 感受性を示す。我々は、nAChR のサロゲートであるアセチルコリン結合タンパク質とパラヘルクアミド A がつくる複合体の X 線結晶構造を解明することで、nAChR の loop C と本化合物が特有の相互作用を行うことを見出した。N 型および L 型 nAChR の loop C におけるアミノ酸配列には明らかな違いが認められたことから、L 型 nAChR の loop C のアミノ酸配列を N 型 nAChR の loop C のアミノ酸配列に置換したところ、L 型 nAChR のパラヘルクアミド A 感受性は低下した。別途実施された研究によって、N 型 nAChR の loop C のアミノ酸配列を L 型 nAChR の loop C のアミノ酸配列に変化させることによりパラヘルクアミド A に対する N 型 nAChR の感受性が上昇することが観察されていることから、本アルカロイド化合物の活性発現に nAChR の loop C との相互作用が関与していることが初めて明らかとなった。



パラヘルクアミド A

nematicide, Caenorhabditis elegans, nicotinic acetylcholine receptor

発表責任者：松田一彦（kmatsuda@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：4B03a04
講演日時：3 月 28 日 10:03～ 総合学習プラザ B03 会場

(*R*)-β-tyrosine がシロイヌナズナ根の細胞壁形成酵素に与える影響
Effects of (*R*)-β-tyrosine on cell wall constituents of *Arabidopsis thaliana* root.
○阪本 駿太、井上 貴斗、吉永 直子、小林 優、寺石 政義、奥本 裕、森 直樹（京都大農）
○Shunta SAKAMOTO, Takato INOUE, Naoko YOSHINAGA, Masaru KOBAYASHI, Masayoshi TERAISHI, Yutaka OKUMOTO, Naoki MORI (Kyoto Univ.)

【背景・目的】
イネ（日本晴）が産生する(*R*)-β-tyrosine は双子葉植物に特異的な根の伸長阻害活性を示し，新規な除草剤としての応用が期待される．しかし，その作用機構は未だ明らかではない．そこでシロイヌナズナ根における細胞壁成分の観点から，双子葉植物特有なエクステンシンのイソジチロシン量，およびリグニン量に注目した．イソジチロシン架橋の形成に働く酵素として peroxidase (POD) が，リグニンの形成に働く酵素として POD および phenylalanine ammonia-lyase (PAL) がある．これらの酵素活性に(*R*)-β-tyrosine が与える影響を調べるために，(*R*)-β-tyrosine で処理したシロイヌナズナの POD 及び PAL 活性の測定を行なった．

【方法・結果】
シロイヌナズナの種子を培地に播種し，4℃で 4 日間静置した．インキュベーター (16 時間明期，26℃ / 8 時間暗期，18℃) で 3 日間生育後，(*R*)-β-tyrosine 0, 1, 3, 10, 30 μM を含む培地に移し，4 日間生育させた．その根の長さの計測から，(*R*)-β-tyrosine が持つ根の伸長阻害活性を確認した．また，同条件で生育させたシロイヌナズナを地上部と根に分け，リン酸バッファー (pH 7.0) 中で破砕，遠心分離後，上清を酵素液とした．POD 活性は，グアイアコールおよび過酸化水素を含む反応液に酵素液を加え，室温で 2 分間反応後，470 nm の吸光度測定により評価した．PAL 活性は，フェニルアラニンを含む反応液に酵素液を加え，40℃で 60 分間反応後，290 nm の吸光度測定により評価した．その結果，(*R*)-β-tyrosine 濃度が上昇するに従い，根の POD 及び PAL 活性が上昇した．それに対し，地上部では濃度依存的な変化は見られなかった．また，POD 及び PAL 活性と根の長さの対数に有意に相関があったので，(*R*)-β-tyrosine により活性が上昇した POD 及び PAL が根の伸長阻害に関与すると示唆された．

(*R*)-β-tyrosine, peroxidase, phenylalanine ammonia-lyase

発表責任者：阪本駿太（sakamoto.shunta.44m@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4B03a05
講演日時：3 月 28 日 10:14～ 総合学習プラザ B03 会場

マンノースとの結合におけるプラディミシン A の二糖部分の役割

Role of the disaccharide moiety of Pradimicin A in its binding to mannose

○大矢 柚香[1]、小鹿 一[1]、五十嵐 康弘[2]、伊藤 幸成[3]、中川 優[1,3] ([1]名大院生命農、[2]富山県大生工、[3]理研)

○ Yuzuka OYA[1], Makoto OJIKA[1], Yasuhiro IGARASHI[2], Yukishige ITO[3], Yu NAKAGAWA[1,3] ([1]Nagoya Univ., [2]Toyama Prefectural Univ., [3]RIKEN)

【目的】 Pradimicin A (PRM-A, Fig. 1) は，D-mannose (Man) を含む糖鎖に結合して抗真菌活性を示すユニークな抗生物質である。近年，我々は PRM-A が D-alanine 部分から ABC 環にわたる領域で Man と結合し，PRM-A における二糖部分は Man との結合に直接関与していないことを明らかにしている (Fig. 2)[1]。その一方で，二糖部分をもたない **1** (Fig. 1) は抗真菌活性を示さないことから，Man と結合しない可能性が示唆されている [2]。そこで本研究では，Man との結合における PRM-A の二糖部分の寄与を明確にするため，**1** および D-xylose 部分をもたない **2** (Fig. 1) を調製し，Man 結合活性を評価することを目的とした。

【方法と結果】 PRM-A は Ca^{2+} 存在下で凝集し，この凝集体が Man を特異的に取り込む。取り込まれた Man 量は, 凝集体を酸処理して分解後 ^{1}H-NMR における積分値から算出することができる。そこで，PRM-A の酸加水分解によって調製した **1** および **2** を用いてこの共沈殿試験を行なったところ，**1** および **2** は PRM-A とほぼ同量の Man を取り込むことが明らかとなった。その一方で，D-glucose (Glc) を用いた共沈殿試験では，**1** および **2** ともに Glc とほとんど結合しないことが確認された。これらの結果は，**1** および **2** が Man と特異的に結合することを示唆している。PRM-A および **2** は水に可溶であるのに対して **1** は難溶であることから，PRM-A の二糖部分は Man との結合に直接寄与しているのではなく，水溶性の向上に重要な役割を果たしていると考えられる。

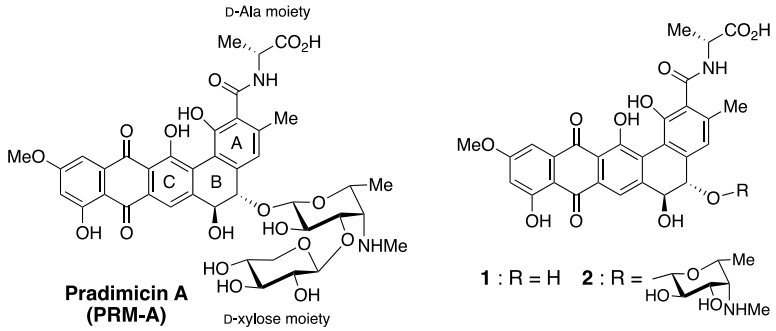


Fig. 1 Structures of PRM-A, **1**, and **2**

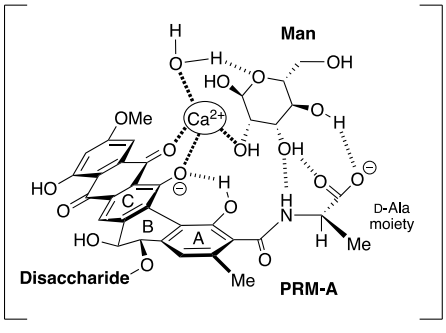


Fig. 2 Binding model of PRM-A with Man

1) Nakagawa, Y. *et al. Cell Chem. Biol.* **2019**, *26*, 950. 2) Ueki, T. *et al. J. Antibiot.* **1993**, *46*, 455.

antibiotic, carbohydrate recognition, Pradimicin

発表責任者：中川優（yu@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：4B03a06
講演日時：3 月 28 日 10:35～ 総合学習プラザ B03 会場

コレラ菌 Na^+輸送性 NADH-キノン酸化還元酵素の阻害剤オーラシンの結合部位の同定

Identification of the inhibitor-binding site in Na^+-pumping NADH-quinone oxidoreductase from *Vibrio cholerae*

○佐野 裕樹[1]、桝谷 貴洋[1]、村井 正俊[1]、BARQUERA Blanca[2]、三芳 秀人[1]([1]京都大学大学院農学研究科、[2]レンセラー工科大学生物科学科)

○ Yuki SANO[1], Takahiro MASUYA[1], Masatoshi MURAI[1], Blanca BARQUERA[2], Hideto MIYOSHI[1] ([1]Graduate School of Agriculture, Kyoto University, [2]Department of Biological Sciences, Rensselaer Polytechnic Institute)

【背景・目的】Na^+輸送性 NADH-キノン酸化還元酵素（Na^+-NQR）は、基質の酸化還元と共役したNa^+の能動輸送を行う膜タンパク質複合体であり、コレラ菌（*Vibrio cholerae*）や緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）など、ATP 合成の駆動力としてNa^+の濃度勾配を利用する細菌に特有の NADH 脱水素酵素である。Na^+-NQR は哺乳類ミトコンドリアに存在するH^+輸送性 NADH-キノン酸化還元酵素（呼吸鎖複合体-Ⅰ）とは進化的にも構造的にも全く異なるため、選択性に優れた抗菌剤の標的分子として注目されている。

オーラシン類の一種である HQNO（図１）は市販されていることから、Na^+-NQR 研究で広く利用されて来たが、阻害活性は高くない。我々は保有するオーラシン類ライブラリーから HQNO の約 1000 倍強力な AD-42 を見出した。NqrB と呼ばれるサブユニットに阻害剤結合部位が存在することを光親和性標識実験で明らかにしているが、アミノ酸残基レベルでの同定には至らなかった。本研究では、新たな光反応性オーラシン類を合成し、阻害剤結合部位をアミノ酸レベルで明らかにすることを目指した。

【方法・結果】2-aryl-5-carboxytetrazole（ACT）基は最近報告された新しい光反応性基で、近傍の求核性アミノ酸残基と高収率で反応する。AD-42 のプレニル側鎖末端に ACT 基を導入した光反応性オーラシン[^{125}I]PAD-4 および [^{125}I]PAD-5 を合成した（図 1）。

コレラ菌から単離したNa^+-NQR を材料として光親和性標識実験を行ったところ、NqrB の直上に位置する親水性サブユニット NqrA と接触する NqrB の領域に両化合物が結合することがわかった。この領域に存在する求核性アミノ酸残基をアラニン置換した変異酵素を作成したところ、酵素活性や光親和性標識の反応効率が顕著に低下する変異酵素を複数取得した。以上の実験結果は、当該領域が阻害剤結合部位を構成し、キノン還元反応にも深く関与することを強く示唆するものである。

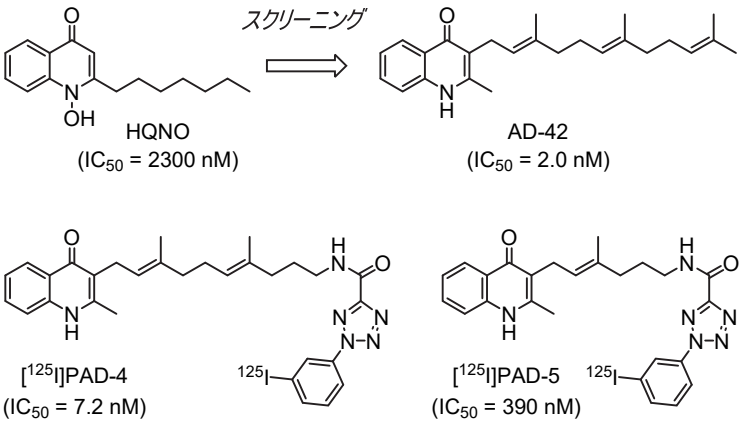


図１．本研究で用いたオーラシン類の構造.

Na^+-pumping NADH-quinone oxidoreductase, aurachin, photoaffinity labeling

講演番号：4B03a07
講演日時：3 月 28 日 10:46～ 総合学習プラザ B03 会場

コレラ菌 Na^+輸送型 NADH-キノン酸化還元酵素の特異的化学修飾法の検討

Site-specific chemical modification of Na^+-pumping NADH-quinone oxidoreductase from *Vibrio cholerae*

○石川 萌[1]、桝谷 貴洋[1]、村井 正俊[1]、BARQUERA Blanca[2]、三芳 秀人[1]([1]京都大学大学院農学研究科、[2]レンセラー工科大学生物科学科)

○Moe ISHIKAWA[1], Takahiro MASUYA[1], Masatoshi MURAI[1], Blanca BARQUERA[2], Hideto MIYOSHI[1] ([1]Graduate School of Agriculture, Kyoto University, [2]Department of Biological Sciences, Rensselaer Polytechnic Institute)

【背景・目的】Na^+輸送性 NADH-キノン酸化還元酵素（Na^+-NQR）は、基質の酸化還元と共役したNa^+の能動輸送を行う膜タンパク質複合体であり、6 つのサブユニット（NqrA～F）と 7 つのコファクターで構成されている。Na^+-NQR はコレラ菌や緑膿菌など多数の病原性細菌に分布する NADH 脱水素酵素であり、本酵素の構造と機能に関する基礎研究は、病原性細菌のエネルギー代謝を標的とする新規な薬剤の開発に資するところが大きい。2014 年に報告されたコレラ菌 Na^+-NQR の X 線結晶構造を参照すると、酵素内電子伝達を司るフラビン（FMN）などのコファクター間の距離が異常に長く（＞25Å）、酵素のターンオーバー中には酵素の大きな構造変化が起こると予想されるが未だに実証されていない。本研究では、いわゆる 1 分子解析などの生物物理学的手法によって Na^+-NQR の構造変化を捉えることを将来的な目標に見据え、酵素の鍵領域であるキノン／阻害剤の結合部位近傍のアミノ酸残基を機能性分子よって特異的に化学修飾する方法論の確立を目指した。

【方法・結果】Na^+-NQR の位置特異的化学修飾の手段として、ligand directed *N*-acyl-*N*-alkyl sulfonamide chemistry（LDNASA chemistry）に着目した。本修飾法は、生理活性化合物（阻害剤）の高い結合親和性を利用してリガンド分子を標的タンパク質に誘導し、リガンド分子内に組み込んだタグを、結合部位近傍の求核性アミノ酸残基との置換反応によって固定させるというものである。LDNASA chemistry は反応性が非常に高いことが報告されており、標的タンパク質を短時間かつ高収率で修飾することが期待できる。

リガンド分子（KDNASA-1）の構造を図 1 に示した。Na^+-NQR の特異的阻害剤の一つである Korormicin を鋳型とし、タグとしてアジド基を採用した。これは、導入されたアジド基（1 次タグ）を足場として、蛍光発色団等の 2 次タグ分子をクリックケミストリーによって導入することを意図したものである。KDNASA-1 を用いて、コレラ菌から単離精製した Na^+-NQR の化学修飾を試みたところ、キノンや阻害剤の結合に関与する NqrB サブユニットが特異的に修飾されることを確認した。

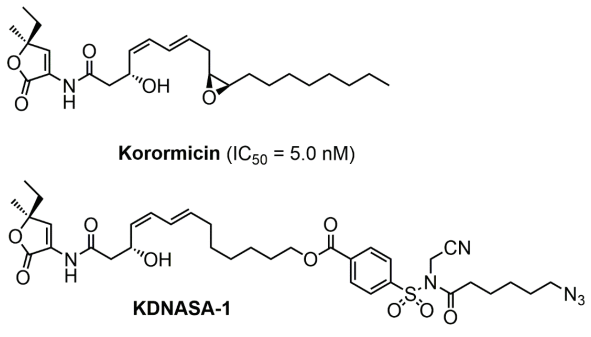


図 1. Korormicin と KDNASA-1 の構造

Na^+-pumping NADH-quinone oxidoreductase, korormicin, protein chemical modification

講演番号：4B03a08
講演日時：3 月 28 日 10:57～ 総合学習プラザ B03 会場

クロイソカイメン抽出物由来電位依存性ナトリウムチャネル阻害剤の探索

Screening of inhibitors against voltage-gated sodium channels from the marine sponge Halichondria okadai

○島田 紀子、長 由扶子、此木 敬一、山下 まり（東北大農）
○Noriko SHIMADA, Yuko Cho, Keiichi Konoki, Mari Yotsu-Yamashita (Tohoku Univ.)

【目的】クロイソカイメン（*Halichondria okadai*）はオカダ酸やハリコンドリン B 等、強力な毒性を示す天然有機化合物の宝庫である。我々は様々な条件にて培養を行い *H. okadai* より、48 種類の共存細菌の純化・培養に成功したが、その培養液から既知化合物数種類と新規化合物 Lysiformine を単離したのみであり[1]、医薬資源となりうる有用化合物の同定に至っていない。

電位依存性ナトリウムチャネル（Na_v）は脳、神経、心筋、骨格筋に発現し、活動電位の起点となり、その伝搬を司る。神経障害性疼痛、癲癇、心臓疾患等、Na_v を原因とする各種疾病治療のリードとなる医薬資源の探索は重要な課題である。本研究では電気生理学的手法を用い、*H. okadai* 抽出物より新規 Na_v 阻害剤を探索することを目的とする。

【方法】（1）電気生理学的手法の一種であるホールセル記録法は、膜電位に依存して細胞外から細胞内へ Na^+ を流入させる Na_v の測定に最適である。理化学研究所細胞材料開発室よりマウス神経芽細胞腫 Neuro 2A (N2A) を譲渡して頂き、ホールセル記録法の材料とした[2]。

（2）細胞外に対する細胞内の相対的電位（膜電位）を−110 mV に設定し、−10 mV に脱分極した際に生じる Na^+ 電流を観測した。また、この電流が Na_v を経由することを確認するため、様々な膜電位における活性化ゲート、不活性化ゲートの開口確率を決定した。

（3）2019 年 5 月 7 日、横須賀市にて収集し、所属先に持ち帰り冷凍保存していた *H. okadai* をアセトンで抽出した。抽出液を減圧濃縮後、ヘキサン、クロロホルム、ブタノールにて順次、抽出した。ホールセル記録法を適用し、Na^+ 電流の大きさや活性化ゲート・不活性化ゲートの開閉確率に影響を与えた画分を見出した。さらに、同画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分画した。

【結果と考察】Na_v 阻害活性が見出されたヘキサン画分、クロロホルム画分、ブタノール画分のうち、ヘキサン画分をシリカゲルクロマトグラフィーで分離した。1:1 ヘキサン−アセトン混合液溶出画分に同活性が保持されていることがわかり、現在、HPLC 精製を進めている。

1. Kikuchi, S. *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **2018**, *74*, 3742.
2. Tsukamoto, T. *et al.*, *Brit. J. Pharmacol.* **2017**, *174*, 3881.

Voltage-sensitive sodium channels, Whole-cell patch-clamp recordings, Halichondria okadai

講演番号：4B03a09
講演日時：3 月 28 日 11:08～ 総合学習プラザ B03 会場

Piperovatine の電位依存性 Na チャネルに対する作用機構
Mode of action of piperovatine against voltage-gated sodium channels

○鈴木 竜也、大和 誠司（住友化学株式会社）
○Tatsuya SUZUKI, Seiji YAMATO (Sumitomo Chemical Co., Ltd.)

コショウ属（*Piper*）植物に含まれる二次代謝産物 piperamides は速効的な殺虫活性を有することで知られている。そのため、古くから piperamides をリード化合物として、多数の類縁体が合成・評価されてきた。Piperamides は昆虫の電位依存性 Na チャネルに作用するとされるが、その機構の詳細は明らかになっていない。我々はこの作用機構を明らかにするため、*Piper piscatorum* 由来の piperamide である piperovatine を電気生理学的手法によって評価した。

本実験では、チャバネゴキブリ（*Blattella germanica*）の電位依存性 Na チャネルとショウジョウバエ（*Drosophila melanogaster*）の tipE サブユニットを共発現させたアフリカツメガエル卵母細胞（*Xenopus* oocytes）による二本刺し膜電位固定法を用いた。イオンチャネルを標的とした生理活性物質の多くがチャネルの状態に依存してその作用を発揮することから、Na チャネルの活性化（開口）状態に着目して実験を行った。

Na チャネルを 25Hz の頻度で繰り返し開口させると（repetitive openings)、その開口回数に依存して、piperovatine は Na 電流を誘発することがわかった。処理濃度 10μM では、100 回の repetitive openings によって piperovatine 誘発電流は最大値に達した。この 25Hz、100 回の repetitive openings 条件下で濃度応答試験を行ったところ、piperovatine の pEC_{50} は 5.7 であった。同じ条件下で Na チャネルの活性化曲線の変化を調べると、piperovatine 10μM 処理後の 50%活性化電位は処理前の-35mV から-45mV にシフトした。以上より、piperovatine が Na チャネルの活性化を促進することが示唆された。

一方、piperovatine によって Na 電流がわずかに抑制されるという一見矛盾するような結果も得られた。そこで、脱分極時間を延長させることにより Na チャネルの不活性化を誘導し、Na 電流の減衰における piperovatine の影響を調査した。速い不活性化状態が発生する条件（数百ミリ秒の脱分極）では、piperovatine は Na 電流の減衰を促した。しかし、遅い不活性化が発生する条件（秒～数十秒の脱分極）では、反対に、piperovatine は Na 電流の減衰を抑制した。これらのことから、piperovatine は Na チャネルの活性化だけではなく、不活性化にも影響を与えることが示された。

以上の結果をまとめると、piperovatine は活性化状態の Na チャネルに選択的に結合し、脱分極時のコンフォメーションでチャネルを固定しているものと考えられた。

piperamides, piperovatine, voltage-gated sodium channels

発表責任者：鈴木竜也（suzukit29@sc.sumitomo-chem.co.jp）

講演番号：4B03a10
講演日時：3 月 28 日 11:19～ 総合学習プラザ B03 会場

アネトールは薬剤排出ポンプの抑制を介してナギラクトン E の抗真菌作用を増強させる

Anthole potentiates antifungal activities of nagilactone E via inhibition of multidrug transporters

○上田 裕貴[1]、田原 悠平[1]、宮田 真人[1]、山口 良弘[1]、荻田 亮[1,2]、藤田 憲一[1] ([1]阪市大・院理、[2]阪市大・健康研セ)
○Yuki UEDA[1], Yuhei TAHARA[1], Makoto MIYATA[1], Yochihiro YAMAGUCHI[1], Akira OGITA[1,2], Ken-ichi FUJITA[1] ([1]Grad Sch Sci, Osaka City Univ., [2]Res. Center Urban Health and Sports, Osaka City Univ.)

【目的】ナギ由来のナギラクトン E は出芽酵母に対して細胞壁の主成分であるグルカンの生合成を阻害することで微弱な抗真菌作用を発揮する。一方、アニスオイルの主成分であるアネトールも微弱な抗真菌作用を示すが、本物質は、モデル薬剤であるドデカノール、タデ由来のポリゴジアールや抗真菌性抗生物質フルコナゾールと併用した場合、薬剤排出の阻害を介してその作用を増幅する。本研究では、ナギラクトン E とアネトールを併用した際に見られる相乗的抗真菌作用が薬剤排出の抑制によるのか検討した。

【方法および結果】*Saccharomyces cerevisiae* BY4741 株を用いて、液体培地希釈法により、各薬剤の最小生育阻害濃度 (MIC) および両薬剤を併用した場合の相乗効果を調べた。その結果、各薬剤を単独で使用した場合、薬剤処理 48 時間後、ナギラクトン E とアネトールの MIC はそれぞれ 500 μM と 2500 μM となった。また両薬剤を併用した場合、最も効果的な組み合わせは 31.25 μM ナギラクトン E と 625 μM アネトールとなり、併用処理は相乗効果を示すことがわかった。次いで、薬剤排出ポンプ関連遺伝子欠損株 14 株に対するナギラクトン E の感受性を調べたところ、脂溶性分子の排出に関わる多剤耐性薬剤排出ポンプ Pdr5p の遺伝子欠損株においてのみ、その感受性が上昇した。さらに、リアルタイム PCR を用いて *PDR5* の遺伝子発現量を測定した。両物質を併用すると薬剤処理時間の経過に伴って *PDR5* の発現量が低下し、培養 72 時間後にはコントロールレベルまで減少した。また、PDR5-GFP 株を用いて、併用処理した細胞における Pdr5p の発現量を間接的に確認した。その結果、GFP 由来の蛍光が消失したので、PDR5p の発現量も減少したと判断した。最後に、急速凍結レプリカ電子顕微鏡法によって各薬剤処理を施した酵母細胞の表面を観察したところ、併用処理した場合には顕著な変化が認められた。

以上の結果より、両物質の併用によっておこる相乗的抗真菌作用にはアネトールによる *PDR5* の発現抑制が関わっている可能性が示唆された。

Saccharomyces cerevisiae, anethole, nagilactone E

講演番号：4B03a11
講演日時：3 月 28 日 11:40～ 総合学習プラザ B03 会場

ヒマシ油由来のヒドロキシ脂肪酸 ricinoleic acid の calcineurin と GSK-3β に対する阻害作用
Inhibition of calcineurin and GSK-3β by ricinoleic acid from castor oil

○吉田 潤[1]、大川 佑介[2]、小山 卓矢[3]、下田 希[2]、上杉 祥太[4]、高木 博史[5]、伊藤 芳明[2,3]、木村 賢一[2,3] ([1]岩手医科大・教養教育、[2]岩手大院・総合科学、[3]岩手大・農、[4]岩手生工研、[5]奈良先端大・バイオサイエンス)
○Jun YOSHIDA[1], Yusuke OKAWA[2], Takuya OYAMA[3], Nozomu SHIMODA[2], Shota UESUGI[4], Hiroshi TAKAGI[5], Yoshiaki ITO[2,3], Ken-ichi KIMURA[2,3] ([1]Center Lib. Arts and Sci., Iwate Med. Univ., [2]Grad. Sch. of Arts and Sci., Iwate Univ., [3]Fac. of Agri., Iwate Univ., [4]IBRC, [5]Grad. Sch. of Sci. and Tech., NAIST)

【目的】ヒマシ油はトウダイグサ科植物のトウゴマ(ヒマ)(*Ricinus communis*)の種子から得られる油脂で、構成脂肪酸の約 90%がヒドロキシ脂肪酸の ricinoleic acid(RA)である。ヒマシ油は古くから医薬品の下剤としてだけでなく炎症や薄毛などの民間薬に用いられてきたが、民間療法における作用機構は明らかにされていない。我々はこれまでに、Ca^{2+}感受性を示す酵母の変異株(YNS17 株)を用いたスクリーニング系で、各種脂肪酸の中で RA に強力な活性を見出した[1)]。本研究では、ヒマシ油や RA の作用機構の解明や新規活性の発見のために、RA の標的分子を明らかにすることを目的とした。
【方法】Calcineurin(CN)阻害活性は、酵母のユビキチンリガーゼ Rsp5 変異株(*rsp5*^{A401E}株)が感受性を示す高温ストレス下における生育回復試験、及び calcineurin assay kit(Enzo Life Sciences)を用いた *in vitro* 試験にて測定した。培養細胞における CN 阻害活性は、ラット好塩基球性白血病細胞 RBL-2H3 における β-hexosaminidase 活性を指標とした脱顆粒抑制試験にて検討した。GSK-3β 阻害活性は、ヒト GSK-3β と合成ペプチド基質を用いた化学発光法による *in vitro* 試験にて測定した。培養細胞における GSK-3β 阻害活性は、ラット肝がん由来細胞 H4IIE におけるグルコース産生抑制試験、及びウエスタンブロット法にて Akt 経路と GSK-3β 基質の活性をリン酸化レベルで解析した。
【結果・考察】RA は、高温ストレス(37℃)を与えた *rsp5*^{A401E}株に対して 0.31 μg/spot まで生育回復活性を示したのに対し、CN の調節サブユニットをコードする *CNB1* 遺伝子を破壊した *rsp5*^{A401E}*cnb1*Δ 株では、同条件下で生育回復活性が消失した。また、RA はヒト CN を基質(RII リン酸化ペプチド)拮抗的に阻害し(K_i =33.7 μM)、抗原刺激した RBL-2H3 細胞の脱顆粒を 50 μM で濃度依存的に抑制した。以上より、RA は直接的に CN を阻害し、RBL-2H3 細胞で CN 活性を抑制することが示唆された[2)]。また、RA はヒト GSK-3β を基質(PGSP-2)拮抗的に阻害し(K_i =1.43 μM)、糖新生活性を誘導した H4IIE 細胞の糖産生を 25 μM で濃度依存的に抑制した。さらに、H4IIE 細胞に RA 100 μM を 1 時間作用させると、Akt 活性化(S473 リン酸化)を介さずに GSK-3β 不活性化(S9 リン酸化)が亢進した。この時、GSK-3β の基質である glycogen synthase のリン酸化が減少し、β-catenin が増加したことから、RA は H4IIE 細胞で GSK-3β を阻害することが示唆された[2)]。以上の結果から、RA の標的分子として CN と GSK-3β が示唆され、RA の抗アレルギーや抗糖尿病の機能性脂質としての可能性を見出すことができた。

1) Attrapadung S. et al., *FEMS Yeast Research,* 10, 38-43 (2010)
2) Yoshida J. et al., *Lipids* in press

Ricinoleic acid, Calcineurin, GSK-3β

発表責任者：吉田 潤（jyoshida@iwate-med.ac.jp）

講演番号：4B03a12
講演日時：3 月 28 日 11:51～ 総合学習プラザ B03 会場

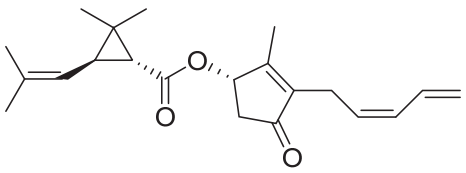
ピレスリン生合成酵素 TcGLIP に対するホスホン酸エステル型阻害剤の絶対配置の解明と構造活性相関

Absolute stereochemistry and structure-activity relationship of phosphonate-type inhibitor of TcGLIP

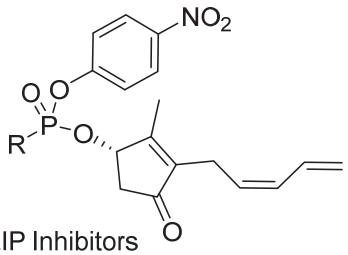
○伊原 誠[1]、小椋 明生[1]、泊口 佳史[1]、松尾 憲忠[2]、田辺 陽[2]、松田 一彦[1]([1]近畿大農、[2]関西学院大理工)
○ Makoto IHARA[1], Akio OGURA[1], Yoshifumi TOMARIGUCHI[1], Noritada MATSUO[2], Yoo TANABE[2], Kazuhiko MATSUDA[1] ([1]Kindai Univ., [2]Kwansei Gakuin Univ.)

【目的】天然殺虫剤ピレスリンは除虫菊によって生合成されるエステル化合物である。ピレスリンは、非メバロン酸経路で合成される酸部分と、オキシリピン経路で合成されるアルコール部が GDSL リパーゼ TcGLIP によってエステル化されることで合成される。これまでに我々は、除虫菊におけるピレスリン生合成機構の理解をめざし、ホスホン酸エステル型の TcGLIP 阻害剤（図）の設計・合成および TcGLIP 阻害活性を報告してきた。しかし、ホスホン酸エステル型の阻害剤は、不斉リン原子を有するため合成される阻害剤はジアステレオマーとなる。

本研究では，それらジアステレオマーの不斉元素の絶対立体配置とおよび置換基 R の違いによる TcGLIP 阻害活性への寄与を検討することを目的とした。



Pyrethrin I



TcGLIP Inhibitors

【方法と結果】TcGLIP の阻害剤は、*p*-ハロベンジル基または鎖長の異なるアルキル基をもつホスホン酸ジクロリドと(*S*)-ピレスロロンとを反応させることで生じるホスホン酸モノクロリドを、*p*-ニトロフェノールと反応させることによって合成した。ジアステレオマー混合物として得られた目的化合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分離した。合成した TcGLIP 阻害剤のうち置換基 R として置換ベンジル基をもつホスホン酸エステルは良質な結晶を与えたため、X 線結晶構造解析によりその絶対立体配置を確定した。TcGLIP は MBP 融合タンパク質として大腸菌で発現させ、アミロースレジンと陰イオン交換樹脂を用いて均一に精製した。本酵素のピレスリン合成活性は、菊酸 CoA と(*S*)-ピレスロロンを酵素基質として反応させたときに生じるピレスリン I を HPLC で定量することにより測定した。合成した化合物の TcGLIP 阻害活性を比較したところ、置換基 R の長さが炭素数 2～8 のアルキル鎖をもつ化合物では炭素数 4 および 5 の化合物が最も高い活性を示し、ベンジル誘導体では *p*-クロロベンジル基をもつ化合物が最も高い活性を示した。一方、リン原子の絶対配置は R の鎖長により阻害活性に対して異なる影響をもたらした。

TcGLIP, pyrethrin, inhibitor

講演番号：4B03a13
講演日時：3 月 28 日 12:02～ 総合学習プラザ B03 会場

モミジガサに含まれる interleukin-2 産生阻害物質
Inhibitors of interleukin-2 production isolated from *Cacalia delphiniifolia*
○上杉 祥太[1]、箱崎 真友佳[1]、植村 亜衣子[1]、熊谷 加奈子[1]、木村 賢一[2]、山田 秀俊[1]、矢野 明[1]
([1]岩手生工研、[2]岩手大・農)
○ Shota UESUGI[1], Mayuka HAKOZAKI[1], Aiko UEMURA[1], Kanako KUMAGAI[1], Ken-ichi KIMURA[2], Hidetoshi YADAMA[1], Akira YANO[1] ([1]IBRC, [2]Fac. of Agri., Iwate Univ.)

【目的】モミジガサ（*Cacalia delphiniifolia*）は、キク科コウモリソウ属の北東北では代表的な山菜の一つである。モミジガサは古くから食されてきた一方で、その健康機能性については報告が極めて少ない。我々はこれまで、モミジガサから抗がん物質を見出してきたが（Kimura *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, 2012)、今回新たに種々の疾患に関与する Ca^{2+}シグナル伝達阻害作用を発見した。Ca^{2+}は、骨や歯の形成、筋収縮など、多くの生命機能に必須な因子であるが、Ca^{2+}シグナルの異常はアレルギー、炎症、糖尿病など種々の疾患とも密接に関連している。そこで本研究では、モミジガサに含まれる Ca^{2+}シグナル伝達阻害物質を単離同定し、ヒト細胞株における作用を明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】Ca^{2+}シグナル伝達に関わる遺伝子変異酵母 YNS17 株（*zds1*Δ *erg3*Δ *pdr1/3*Δ）は、高濃度 Ca^{2+}存在下で生育阻害となる。この酵母株の生育回復を指標として、Ca^{2+}シグナル伝達阻害作用を検出した。岩手県農林水産物抽出物（215 種）からスクリーニングを行い、モミジガサが YNS17 株に生育回復活性を示すことを見出した。そこで、モミジガサに含まれる活性物質を精製し、2 化合物を単離した。MS および NMR 等の各種機器分析の結果、モミジガサからの単離報告がある cacalol(**1**)と decompostin(**2**)であると同定した。これらはいずれも、YNS17 株に対して Ca^{2+}存在下で特異的に生育回復活性を示したことから、本作用における Ca^{2+}の関与を確認した。酵母と哺乳動物細胞の Ca^{2+}シグナルで高度に保存されるホスファターゼの calcineurin は、アレルギーや炎症に関与する。活性物質の calcineurin 経路に対する作用を検証するため、ヒト T 細胞 Jurkat を用いて、calcineurin の下流で発現誘導を受けるサイトカイン interleukin-2（IL-2）の遺伝子発現を real-time PCR、タンパク質発現を ELISA で測定した。その結果、活性物質はいずれも、IL-2 の遺伝子発現とタンパク質発現の両方を阻害することが明らかとなった(IL-2 タンパク質発現量の IC_{50}は、**1** が 9.3 μM、**2** が 9.7 μM)。そこで、calcineurin の酵素活性に対する阻害活性を調べたところ、いずれも活性は弱く、IC_{50}は 50 μM 以上であった。Cacalol は、強力な抗酸化作用を有するため(Shindo *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2004)、IL-2 産生阻害作用と抗酸化作用に関連性があるか否かを検討した。ROS 検出試薬 DCFH-DA を用いて、Jurkat に過酸化水素を作用させた際の細胞内 ROS レベルの上昇に対する、活性物質の抑制効果を調べた。その結果、**1** は過酸化水素による ROS の上昇を抑制した一方で、**2** は抑制しなかった。以上の結果から、今回見出したモミジガサ由来の IL-2 産生阻害物質は、抗酸化作用とは関連性の無い分子機構で Ca^{2+}シグナル伝達を阻害することが示唆された。

Cacalia delphiniifolia, Ca^{2+}-signaling, interleukin-2

講演番号：4B03a14
講演日時：3 月 28 日 12:13～ 総合学習プラザ B03 会場

人工キノン類を用いたミトコンドリア呼吸鎖複合体-I のキノン結合ポケットの構造特性の解明

Exploring the quinone-binding pocket in mitochondrial respiratory complex I using synthetic quinones as molecular probes

○宇野 晋平[1]、桝谷 貴洋[1]、伊藤（新澤） 恭子[2]、志波 智生[3]、稲岡 健ダニエル[4]、村井 正俊[1]、三芳 秀人[1] ([1]京都大農、[2]兵庫県立大生命理学、[3]京都工芸繊維大工芸科学、[4]長崎大熱帯医学)

○Shinpei Uno[1], Takahiro Masuya[1], Kyoko Shinzawa-Itoh[2], Tomoo Shiba[3], Daniel Ken Inaoka[4], Masatoshi Murai[1], Hideto Miyoshi[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Univ. of Hyogo, [3]Kyoto Institute of Technology, [4]Nagasaki Univ.)

【背景・目的】ミトコンドリア呼吸鎖電子伝達系の初発酵素である NADH-キノン酸化還元酵素（呼吸鎖複合体-I）は、基質の酸化還元と共役したプロトン輸送を行う膜タンパク質複合体である。複合体-I の鍵領域であるキノン結合ポケットは、多様な阻害剤の結合部位であり、当該領域の構造と機能を解明することは、複合体-I を標的とする医農薬の開発に資するところが大きい。複合体-I の X 線結晶構造やクライオ EM 構造を参照すると、キノン結合ポケットは、入口の内径が約 4～5Å、奥行きが約 30Åの狭く長い“チャンネル”様の構造をとり、キノンや化学的に多様な阻害剤は、全てこの“**キノン結合チャンネル**”に収容されると予想されている。ところが、我々はチャンネル内径よりもはるかに嵩高い分子が、チャンネル内部に収容されることを報告してきた。本研究では、系統的に合成した“嵩高い”キノン類（oversized ubiquinones, OS-UQ 類）を化学ツールとすることで、キノン結合ポケットの構造特性を検証することを目的とした。

【方法・結果】キノン分子はチャンネル最深部に位置する鉄-硫黄クラスター（N2）まで接近して電子を受容し、“後退り”してチャンネルから出て行くと考えられている。そこで、キノン側鎖末端にチャンネル内径よりも嵩高いブロックを結合させた OS-UQ 類(OS-UQ1～OS-UQ5, 図 1(A))を合成した。ミトコンドリア膜標品（ウシ心筋亜ミトコンドリア粒子, SMPs）における電子受容活性を測定したところ、OS-UQ 類は天然型のキノン類縁体と同等の活性を発揮し、高い阻害剤感受性も示した。興味深いことに、最もスペーサー長の短い OS-UQ1 は、他の類縁体と比較して電子伝達当たりのプロトン輸送量が有意に低下した。これらの結果は「キノン結合ポケットはダイナミックに構造変化し、多様なリガンド分子を収容できる」ことを強く示唆している。

これと並行して、ウシ複合体-I とアフリカトリパノソーマ由来のキノール酸化酵素をプロテオリポソームとして再構成した評価系を用いて、プレニル基をスペーサーとして持つ疎水性の高い OS-UQ 類(OS-UQ6～OS-UQ8, 図 1(B))の電子受容活性を評価した。SMPs での結果とは対照的に、チャンネルの奥行きよりも長い側鎖を持つ OS-UQ8 のみ電子受容活性を示した。現段階ではこの一見矛盾する結果を十分に説明できないが、精製された複合体-I とミトコンドリア膜に内在する複合体-I との間の何らかの構造的な差異を反映しているのかもしれない。

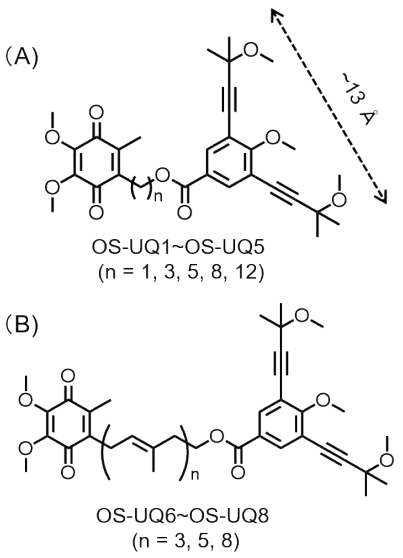


図 1. 本研究で用いた OS-UQ 類の構造

respiratory complex I, ubiquinone, mitochondria

講演番号：4B03a15
講演日時：3 月 28 日 12:24～ 総合学習プラザ B03 会場

抗がん剤候補化合物 IACS-010759 のミトコンドリア呼吸鎖複合体-I における作用機構

Inhibition mechanism of mitochondrial respiratory complex I by IACS-010759, a candidate compound of anticancer agent

○辻 諄人、赤尾 拓海、桝谷 貴洋、村井 正俊、三芳 秀人（京都大学大学院農学研究科）
○Atsuhito TSUJI, Takumi AKAO, Takahiro MASUYA, Masatoshi MURAI, Hideto MIYOSHI (Graduate School of Agriculture, Kyoto University)

【背景と目的】低酸素誘導因子(HIFs)はいわゆる“低酸素応答”を制御するタンパク質であり、特に HIF-1 はがん細胞の増殖に深く関与することから、本因子の産生を抑制する化合物は抗がん剤の有望な候補分子と考えられてきた。2018 年にテキサス州立大学の研究チームは、HIF-1 産生を抑制する低分子化合物 IACS-010759(図 1)を見出した。報告によれば、IACS-010759 の直接的な作用点はミトコンドリア NADH-ユビキノン酸化還元酵素(呼吸鎖複合体-I)であり、本酵素を阻害することで、酸化的リン酸化への依存度の高い脳腫瘍細胞や急性骨髄性白血病細胞における HIF-1 の産生が抑制される。

ロテノイドのような既知の複合体-I 阻害剤は高い抗腫瘍活性を示すものの、通常細胞に対しても顕著な毒性を示すことから、IACS-010759 は腫瘍細胞選択的に細胞毒性を示す新しいタイプの複合体-I 阻害剤である可能性が高い。本化合物の作用機構研究は複合体-I の基礎研究に貢献すると同時に、抗がん剤分子の設計戦略に資するところも大きい。本研究では、IACS-010759 の複合体-I レベルでの作用機構を詳細に明らかにすることを目指した。

【方法と結果】呼吸鎖複合体-I は通常条件下ではキノン還元反応(順反応)を触媒するが、ある特定の条件下では、キノール酸化反応(逆反応)を触媒する可逆的酵素である。IACS-010759 のウシ心筋複合体-I に対する影響を精査したところ、複合体-I の順反応よりも逆反応に対してより強い阻害活性を示すことがわかった。さらに IACS-010759 は、キナゾリン系阻害剤の光親和性標識プローブ[^{125}I]AzQ による複合体-I の特異的標識を抑制しなかった。こうした特性は、既知の複合体-I 阻害剤では見られないユニークなものであった。

IACS-010759 を鋳型として光親和性標識プローブ[^{125}I]IACS-010759-PD1 を合成し(図 1)、ウシ心筋複合体-I に対する光親和性標識実験を行った。その結果、[^{125}I]IACS-010759-PD1 は複合体-I のキノン結合ポケットを構成する ND1 サブユニットに特異的に結合することがわかった。また、本化合物による標識はフェンピロキシメートやキナゾリンなどの既知阻害剤の過剰存在下でも抑制されなかった。以上の結果から、**IACS-010759 は既知阻害剤とは異なる作用機構で複合体-I を阻害する**ことが明らかになった。

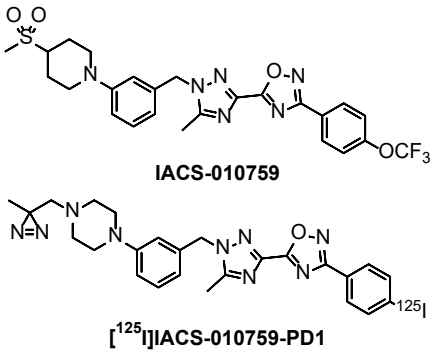


図 1. IACS-010759 とその類縁体の構造.

respiratory complex I, ubiquinone, mitochondria

講演番号：4B04a01
講演日時：3 月 28 日 09:30～ 総合学習プラザ B04 会場

シロイヌナズナにおける糸状菌 *Aspergillus aculeatus* 由来ラムノガラクツロナーゼの過剰発現
Overexpression of rhamnogalacturonase from *Aspergillus aculeatus* in *Arabidopsis thaliana*

○大橋 貴生[1,2]、光吉 祐太朗[1]、間平 由梨佳[1]、梶浦 裕之[1]、三﨑 亮[1]、藤山 和仁[1] ([1]大阪大生国セ、[2]摂南大理工)
○ Takao OHASHI[1,2], Yutaro Mitsuyoshi[1], Yurika Mabira[1], Hiroyuki Kajiura[1], Ryo Misaki[1], Kazuhito Fujiyama[1] ([1]ICBiotech, Osaka Univ., [2]Fac. Sci & Eng, Setsunan Univ.)

ペクチンは植物細胞壁の主な構成成分の一つであり成長時に盛んに合成される一次細胞壁と細胞間隙に豊富に存在し、細胞接着およびセルロース微小繊維間を充填する役割を果たしている酸性多糖である。ペクチンは、ホモガラクツロナン（HG)、ラムノガラクツロナンⅠ（RG-I)、ラムノガラクツロナンⅡの 3 種類の構造領域を持つ。HG 主鎖を加水分解する酵素であるポリガラクツロナーゼは植物および微生物由来の酵素が同定されており、バイオマス利用に関わる応用研究の報告がある。一方で、RG-I 主鎖を加水分解する酵素であるラムノガラクツロナーゼ（RGase）は、真菌類においていくつかの酵素が同定されているものの、バイオマスに対する応用例の報告は無い。そこで本研究では、RGase を用いたバイオマス変換を見据えて、糸状菌 *Aspergillus aculeatus* 由来 RGase（*AaRhgA*）遺伝子に着目し、本遺伝子のシロイヌナズナ過剰発現株を作成し、その表現型解析を行った。

AaRhgA 遺伝子を CaMV35S プロモーターの下流に連結し、植物発現ベクターを構築した。構築した発現ベクターをアグロバクテリウムに導入し、シロイヌナズナに感染させ、形質転換種子を得た。抗生物質耐性を指標に形質転換植物を選抜後、植物体からゲノム DNA を抽出し、PCR 法により *AaRhgA* 遺伝子の挿入を確認した。*AaRhgA* 遺伝子過剰発現株では、野生型株に比べ、植物体の生育が顕著に促進していた。次に、種子から分泌され、RG-I を主成分とするムシレージをルテニウムレッドで染色し、*AaRhgA* 遺伝子過剰発現の影響を観察した。その結果、*AaRhgA* 遺伝子過剰発現株では、ムシレージの中でも低分子化し、最外層に位置するアウタームシレージの量が増大していた。過剰発現された *AaRhgA* 遺伝子がコードしている糸状菌由来 RGase が種子表皮近傍のインナームシレージを分解することで、アウタームシレージの量が増大したと考えられる。以上の結果より、糸状菌由来の RGase を植物に過剰発現させることで、植物の形質、特に RG-I を主成分とするムシレージの形質を人工的に変化させることが可能になった。

Arabidopsis thaliana, *Aspergillus aculeatus*, pectin

講演番号：4B04a02
講演日時：3 月 28 日 09:41～ 総合学習プラザ B04 会場

カイコ由来β1,4-*N*-acetylgalactosaminyltransferase の機能解析

Charactarization of *Bombyx mori* ß1,4-*N*-acetylgalactosaminyltransferase

○西口 直邦、梶浦 裕之、三﨑 亮、藤山 和仁（阪大, ICBiotech）
○Naokuni NISHIGUCHI, Hiroyuki KAJIURA, Ryo MISAKI, Kazuhito FUJIYAMA (ICBiotech, Osaka Univ)

【 目的 】
近年、バイオ医薬品が注目を浴びており、私たちは昆虫を宿主細胞としたタンパク質生産に注目している。宿主に用いる昆虫は、ヒトと異なる *N* 結合型糖鎖付加機能を持つが、未だ機能が解明されていない糖鎖修飾遺伝子が存在する。本研究では、昆虫の一種であるカイコの *N* 結合型糖鎖の構造に関与する新たな糖転移酵素 BmGalNAcT の機能を解析することにより、カイコにおける糖鎖合成経路を解明することを目的とした。
【 方法 】
BmGalNAcT の機能解析を行うため、まずカイコ cDNA より完全長 *BmGalNAcT* を取得した。組換え BmGalNAcT は C 末端に His-tag をもつ分泌型タンパク質として Sf9 細胞で発現させた。Co^{2+}カラムで組換え酵素を精製した後、受容体基質に GN2M3、供与体基質に UDP-GalNAc を使用し、その反応産物を HPLC、質量分析器を用いて測定した。受容体基質に異なる PA 化糖鎖を使用して反応産物の解析を行い、供与体基質にも異なる UDP 糖を使用し供与体の選択性を解析した。
【 結果 】
BmGalNAcT はアミノ酸配列より、420 アミノ酸からなる分子量 48.5 kDa の II 型膜タンパク質であると推測された。組換え BmGalNAcT は糖タンパク質として発現でき、UDP-GalNAc から Mn^{2+}存在下で受容体基質の非還元末端にある GlcNAc に対し、GalNAc 残基をβ1,4 結合で転位する活性を保持していた。受容体基質 GN3M3 に対しても同様の反応が確認された。興味深いことに、BmGalNAcT は UDP-Gal を供与体基質として利用でき、Gal 残基を転移する活性も保持していた。以上の結果より、BmGalNAcT は供与体基質に対し、柔軟な基質特異性を持っていることが示唆された。

Bombyx mori, *N*-Acetylgalactosaminltransferase

発表責任者：藤山和仁（fujiyama@icb.osaka-u.ac.jp）

講演番号：4B04a03
講演日時：3 月 28 日 09:52～ 総合学習プラザ B04 会場

中性領域で働く基質特異性の広い万能シアリダーゼの発見と性質

Identification and characterization of a novel, versatile sialidase from a *Sphingobacterium* that can hydrolyze the glycosides of any sialic acid species at neutral pH

○岩木 佑弥[1,2]、松永 恵美子[3]、竹川 薫[3]、佐藤 ちひろ[1,2]、北島 健[1,2] ([1]名大生物機能セ、[2]名大院生命農学、[3]九大院農)
○ Yuya IWAKI[1,2], Emiko MATSUNAGA[3], Kaoru TAKEGAWA[3], Chihiro SATO[1,2], Ken KITAJIMA[1,2] ([1]Biosci. Biotech. Center, Nagoya Univ., [2]Nagoya Univ., [3]Kyushu Univ.)

シアル酸は糖鎖の非還元末端に存在している酸性 9 炭糖であり、受精、発生、神経形成、免疫など多様な生物学的機能に重要な役割を果たす。シアル酸は炭素 5 位の置換基の違いにより、*N*-アセチルノイラミン酸（Neu5Ac）、*N*-グリコリルノイラミン酸（Neu5Gc）、デアミノノイラミン酸（KDN）の 3 種に大別される。シアル酸の機能を解析するため、細菌由来のシアル酸遊離酵素シアリダーゼが市販され、広く利用されている。しかし、市販細菌シアリダーゼは Neu5Ac、Neu5Gc を遊離するが、KDN を遊離することはできないため、KDN 含有糖鎖の機能解析は困難である。そこで、本研究では KDN を遊離するシアリダーゼの探索を行った。

現在まで KDN のみを遊離させる酵素 KDNase は遺伝子未知だがグラム陰性細菌 *Sphingobacterium* 属でのみ報告されている。そこで、近年報告された *Sphingobacterium* sp. strain HMA12 のゲノム中に、GH33 ファミリーに分類される 4 種類のシアリダーゼ候補遺伝子を見出した。候補遺伝子のリコンビナント酵素のシアリダーゼ活性を測定したところ、1 つの候補から KDN 遊離活性が検出された。さらに基質特異性を調べたところ、KDN だけでなく Neu5Ac、Neu5Gc も遊離する活性を持つことがわかった。また、本シアリダーゼはシアル酸結合様式への特異性も広く、α2,3-、α2,6-、α2,8-、α2,9 結合を遊離することができた。興味深いことに、本シアリダーゼは至適 pH を 6.5-7.0 の中性領域に持ち、酸性領域に至適 pH を持つ市販シアリダーゼと異なる性質を持つ。そのため、生理的条件下で効率よくシアル酸を遊離させることができ、*in vivo* 実験に応用することができる。中性条件下で CHO 細胞表面に本シアリダーゼを作用させ、フローサイトメトリーにより解析した結果、細胞表面のポリシアル酸鎖の減少を確認することができた。

さらに、興味深いことに加水分解反応中間体アナログであるシアリダーゼ阻害剤 DANA 存在下で反応させたところ、Neu5Ac 遊離活性だけでなく KDN 遊離活性へも競合的に阻害した。また、分子モデリングソフト MOE を用いて、最も構造的類似性を持つと予測された真菌 *Aspergillus fumigatus* シアリダーゼを基に構造モデルを作製した。その結果、αNeu5Ac、αKDN 両者共に同一の活性部位とドッキングし、触媒活性に必須のアミノ酸が保存されていることが示唆された。そこでシアル酸のグリコシド結合の加水分解に関与する求核性チロシンの 1 アミノ酸変異体を作製し、Neu5Ac、KDN への活性を測定したところ、両者への活性を失うことがわかった。以上の結果から、本シアリダーゼは 1 つの活性部位で異なるシアル酸分子種を認識することが示唆される。

sialidase, sialic acid, KDN

発表責任者：岩木佑弥（iwaki.yuuya@e.mbox.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：4B04a04
講演日時：3 月 28 日 10:03～ 総合学習プラザ B04 会場

Aspergillus fumigatus のβ-(1→5)-ガラクトフラノース糖鎖生合成の同定と欠損による表現型への影響

Identification of biosynthesis of β-(1→5)-galactofuranosyl chains in *Aspergillus fumigatus* and analyses of the phenotype of the defective strain

○千原 由莉亜[1]、田中 大[2]、太田 一良[1]、岡 拓二[1]([1]崇城大院工、[2]東北医薬大)
○Yuria CHIHARA[1], Yutaka TANAKA[2], Kazuyoshi OHTA[1], Takuji OKA[1] ([1]Grad. Sch. Eng., Sojo Univ., [2]Tohoku Med and Pharma Univ.)

【目的】肺アスペルギルス症の原因菌である *Aspergillus fumigatus* の細胞表層はガラクトマンナン(GM)と呼ばれる糖鎖で覆われている。GM は細胞壁の最表層を覆っていることから宿主細胞や他の微生物との相互作用に関わっていることが示唆されている。本研究室では，*A. fumigatus* の GfsA が GM の生合成に関わる β-(1→5)-ガラクトフラノース（Gal$_f$）転移酵素であることを明らかにしてきた。しかし，Δ*gfsA* 株から抽出した GM 中の β-(1→5)-Gal$_f$ 残基は完全には失われていなかったことから，他の β-(1→5)-Gal$_f$ 転移酵素の存在が示唆された。*A. fumigatus* のゲノム中には *gfsA* のパラログとして *gfsB* および *gfsC* が存在している。一方，Gal$_f$ 転移酵素の活性測定には，糖供与体である UDP- Gal$_f$ が必要不可欠である。しかし, UDP- Gal$_f$ は試薬として販売されていないため入手することが困難である。UDP-Gal$_f$ は UDP-ガラクトースムターゼ（GLF）によって UDP-ガラクトピラノース(Gal$_p$)より生合成されるが，その平衡状態における量比は UDP-Gal$_p$: UDP- Gal$_f$ = 95: 5 であり，大きく UDP-Gal$_p$ 側に傾いている。よって，組換え GLF を用いて UDP- Gal$_f$ を大量に取得することは非常に困難であった。そこで，GLF と Gal$_f$ 転移酵素を同一反応系において反応させる逐次的な反応を用いることによる簡易な Gal$_f$ 転移酵素活性の測定法の確立を行った。本研究では，GfsB および GfsC の残存 β-(1→5)-Gal$_f$ 残基生合成への関与を調べることを目的とした。

【方法・結果】反応系に精製した組換え GLF，還元剤として Sodium Dithionite，UDP-Gal$_p$，Mn^{2+}，4-Methylumbelliferyl (4MU)-β-Gal$_f$ および組換え GfsA，組換え GfsB もしくは組換え GfsC を混合することで逐次的な反応を試みた。その結果，GfsA は 6 つ，GfsB は 2 つ，GfsC は 4 つの Gal$_f$ 残基を 4MU-Gal$_f$ に対して転移する活性を有していた。反応産物の構造解析を行ったところ，β-1,5-Gal$_f$オリゴマーであることが確認された。以上のことから，逐次的な反応による高効率かつ簡便な Gal$_f$ 転移酵素活性の検出法を確立することができたと共に，GfsB および GfsC が GfsA と同様に β-(1→5)-Gal$_f$ 転移酵素であることを明らかにすることができた。また，Δ*gfsAC* 株から抽出した GM では全ての β-(1→5)-Gal$_f$ 残基が失われていた。このことから，*A. fumigatus* の全ての β-(1→5)-Gal$_f$ 転移残基は GfsA および GfsC によって生合成されることが明らかになった。また，Δ*gfsAC* 株では，異常な菌糸の分岐がみられ，コロニーの生育が遅く(親株の 68%)，分生子形成能が低下(親株の 25%)していた。さらに，Δ*gfsAC* 株ではラテックスビーズの菌糸表面への付着率が増加していたことから，β-(1→5)-Gal$_f$ 残基が細胞表層の親水性の保持に関係していることが示唆された。

Aspergillus, cell wall, galactofuranose

発表責任者：岡拓二（oka@bio.sojo-u.ac.jp）

講演番号：4B04a05
講演日時：3 月 28 日 10:14～ 総合学習プラザ B04 会場

Aspergillus fumigatus のガラクトマンナン生合成に関わる新規なα-マンノピラノシド: β- ガラクトフラノース転移酵素の同定

Identification of a novel α-mannopyranoside: β-galactofuranosyltransferase involved in galactomannan biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*

○甲斐 万紀子[1]、守田 湧貴[2]、千原 由莉亜[1]、田中 大[3]、太田 一良[1,2]、岡 拓二[1,2] ([1]崇城大院工、[2]崇城大生物生命、[3]東北医薬大)

○Makiko KAI[1], Yuki MORITA[2], Yuria CHIHARA[1], Yutaka TANAKA[3], Kazuyoshi OHTA[1,2], Takuji OKA[1,2] ([1]Grad. Sch. Eng., Sojo Univ., [2]Sojo Univ., [3]Tohoku Med and Pharma Univ.)

【目的】*Aspergillus* 属糸状菌の細胞壁表層に存在するガラクトマンナン(GM)は α-(1→2)-/α-(1→6)-マンノース(Man)と β-(1→5)-/β-(1→6)-ガラクトフラノース(Gal_f)からなる糖鎖である。GM は細胞壁の最表層を覆っていることから宿主細胞や他の微生物との相互作用に関わっていることが示唆されている。本研究室では，GfsA が GM 中の末端 β-ガラクトフラノース (Gal_f)残基の 5 位の水酸基に対して β-Gal_f を転移する酵素であることを明らかにしてきた。また，CmsA が GM の生合成を担う α-(1→2)-Man 転移酵素であることも明らかにしている。しかし，GM 中の Man 残基に Gal_f 残基を転移する酵素は未だ同定できていない。GM の生合成の場はゴルジ体であり，生合成に関わる糖転移酵素はゴルジ体に局在する II 型膜タンパク質であることが知られている。そこで、本研究ではゲノム情報から絞り込んだ機能未知なゴルジ体局在II型膜タンパク質遺伝子の破壊株を構築し，生育が弱くなった破壊株の責任遺伝子から得られる酵素の解析を行うことで今までに全く知られていない糖転移酵素遺伝子を同定することを試みた。

【方法・結果】糸状菌 *Aspergillus nidulans* の全タンパク質配列（10776 個）より膜貫通領域予測ツール(TMHMM)を用いて膜貫通領域(TM)が 1 つのものを選出したところ、692 個の遺伝子が得られた。そのうちアミノ酸の鎖長が 250 アミノ酸未満であるものを除くと 527 個の遺伝子が選抜された。次に，局在予測ツールによりゴルジ体に局在するものを選抜したところ，57 個の遺伝子が見出された。GM は糸状菌にしか存在しないことから，出芽酵母のオルソログを除き，さらに糸状菌において機能既知の遺伝子を除いたところ，20 個の遺伝子が機能未知なゴルジ体局在 II 型膜タンパク質遺伝子として選抜された。20 個の遺伝子について遺伝子破壊用 DNA 断片を調製し，*A. nidulans* AKU89PyrG 株を形質転換した。その結果，全ての遺伝子破壊株を構築することができた。一方で，20 個の機能未知なゴルジ体局在 II 型膜タンパク質遺伝子に関して大腸菌による組換えタンパク質の発現を試みた。その結果，3 種類の組換えタンパク質を得ることができた。得られた組換えタンパク質について 4-Methylumbelliferyl（4MU）-α-Man を受容基質とした α-マンノピラノシド: β- Gal_f 転移酵素のアッセイ系へ供した。その結果，1 つの組換えタンパク質において新規なピークが検出された。精製した酵素産物を β-ガラクトフラノシダーゼによって消化することを試みた結果，酵素産物は β-ガラクトフラノシダーゼによって消化したところ切断されて 4MU-α-Man に変換された。このことから，この酵素産物は，4MU-α-Man の非還元末端側にガラクトフラノースが β-結合した構造をしていることが明らかになった。また，本酵素の遺伝子の破壊株は親株に比べて小さいコロニー形態を示した。以上のことから，我々は糸状菌の生育に重要な糖鎖の生合成に関わる新規な α-マンノピラノシド: β- Gal_f 転移酵素を見つけることができたと考えている。

Aspergillus, cell wall, galactofuranose

発表責任者：岡拓二（oka@bio.sojo-u.ac.jp）

講演番号：4B04a06
講演日時：3 月 28 日 10:35～ 総合学習プラザ B04 会場

Prevotella melaninogenica の産生する宿主糖タンパク質糖鎖遊離酵素エンド PM の性質
Characterization of endo-β-*N*-acetylglucosaminidase PM responsible for deglycosylation of *N*-glycans from host glycoproteins in *Prevotella melaninogenica*
森 真司、大倉 和貴、宮原 郁子、○伊藤 和央 (阪市大・院理)
Shinji MORI, Kazuki OKURA, Ikuko MIYAHARA, ○Kazuo ITO (Grad. Sch. of Sci., Osaka City Univ.)

【目的】我々は、native な糖タンパク質からアスパラギン結合型糖鎖を遊離するエンド-β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ産生菌の探索を行っており、これまで分離・同定した菌株の殆どは *Prevotella* 属菌であった。また、分離菌の酵素は菌体結合酵素で、native な糖タンパク質から容易に糖鎖を遊離するとともに糖鎖転移活性を示し、コンプレックス型糖鎖の遊離・転移導入のための有用酵素である。また、*Prevotella* 属菌群は、遊離したアスパラギン結合型糖鎖の逐次分解酵素群も発現しており、宿主糖タンパク質糖鎖遊離・分解酵素系が存在する。本研究では、*P. melaninogenica* の産生する酵素をエンド-β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ PM(エンド PM)と命名し、その性質について検討した。
【方法】糖タンパク質から遊離する糖鎖の分析は、TLC および質量分析計によって行った。立体構造の解析は小角 X 線散乱法によって行った。
【結果、考察】エンド PM にはエンド PMα、PMβおよび PMγの 3 つのアイソザイムが存在し、エンド PMα は、末端 Sia、bisecting GlcNAc、コア Fuc の存在に関わらず 2～4 本鎖の多分岐コンプレックス型糖鎖を特異的に native な各種糖タンパク質から遊離した。また、エンド PMβと PMγはさらにハイマンノース型糖鎖も遊離するものと考えられた。エンド PM は抗エンド PMα抗体によって阻害され、アイソザイム間で共通構造が存在するものと考えられた。また、同抗体によって *P. melaninogenica* からエンド PM の他に分子量約 21 万のタンパク質が検出され、これは TFMSA 処理によって消失した。このため、エンド PM の一部は糖鎖修飾を受けているものと考えられた。また、他の *Prevotella* 属菌からも同抗体結合タンパク質が検出され、*Prevotella* 属菌のエンド-β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼは共通構造をとるものと考えられた。また、エンド PM は、PCMB と $HgCl_2$ によって阻害されたが、他のアミノ酸修飾試薬や金属イオンでは阻害されなかった。この阻害は SH 化合物によって可逆的に解除された。このため、エンド PM の遊離 SH 基に Hg^{2+} が結合し、阻害するものと考えられた。また、他の *Prevotella* 属菌由来酵素も Hg 試薬で阻害された。さらに、小角 X 線散乱法によって遺伝子組換発現エンド PMα の立体構造を解析した。この時、$HgCl_2$ 存在下では X 線散乱が変化し、分子形状変換の可能性が示唆された。このため、エンド PM などの *Prevotella* 属菌のエンド-β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼには分子形状維持に重要な遊離 Cys 残基が存在するものと考えられた。一方、*P. melaninogenica* 菌体の蛍光抗体染色から、エンド PM は菌体表層に局在し、不均一に分布しているものと考えられた。

Prevotella melaninogenica, endo-β-*N*-acetylglucosaminidase PM

講演番号：4B04a07
講演日時：3 月 28 日 10:46～ 総合学習プラザ B04 会場

EDEM の大腸菌での発現
Expression of EDEM in E.coli
○相川 順一、伊藤 幸成 (理化学研究所)
○Junichi Aikawa, Yukishige Ito (RIKEN)

＜目的＞
アスパラギン結合型糖鎖(*N*-glycan)を持つ糖タンパク質は、粗面小胞体 (ER) における品質管理機構により機能的なものが選別され、最終的に細胞外や細胞表層などに輸送される。一方、不適切な折りたたみをされたと判断された糖タンパク質は ER-associated degradation により、細胞質に移行し、その後分解される。ここで、ER における糖タンパク質の *N*-glycan はハイマンノース型であり、それらは Glycoside Hydrolase Family 47(GH47)に属する蛋白によっても認識、切断されると考えられる。
そこで、本研究では、GH47 に属するタンパク質のうち、ER degradation-enhancing mannosidase-like protein (EDEM)がハイマンノース型 *N*-glycan を有する糖タンパク質と相互作用する機構を探求するため、組換え型 EDEM を調製することを目的とした。昨年度の大会では、界面活性剤存在下で発現させた S-S 結合形成に関わる酵素と EDEM との融合タンパク質を直接酵素活性測定の系に供したが、活性が検出されなかった。そこで、今回は界面活性剤非存在下で融合蛋白質として発現させ、精製を行ったので、報告する。
＜方法＞
EDEM1/2 を DsbC との融合タンパク質の形で発現可能なプラスミド DNA を構築し、大腸菌の低温発現系に供した。得られた反応液の可溶性画分から、ポリペプチドを TALON レジンにより精製した。
＜結果＞
発現された EDEM 融合タンパク質のは可溶性画分に回収され、アフィニティー精製を行い、溶出画分に融合タンパク質を回収した。現在、生成された EDEM 融合タンパク質を酵素源として、活性測定の系に供し、活性検出を試みている。
[1)] *Glycoconj. J.* **29**, 35-45 (2012); *J. Biochem.* **155**, 375-384 (2014)

Mannosidase, EDEM, ERAD

講演番号：4B04a08
講演日時：3 月 28 日 10:57～ 総合学習プラザ B04 会場

酵母 split-ubiquitin システムを用いたヒト PIG-M の物理的相互作用に関する解析

Analyses on the physical interactions of the human PIG-M using the yeast split-ubiquitin system

○高橋 哲夫、後藤 菜々美（東海大工）
○Tetsuo Takahashi, Nanami Goto (Tokai Univ.)

【目的】

真核細胞の粗面小胞体(rER)膜におけるグリコシルフォスファチジルイノシトール(GPI)アンカーの生合成には 3 種類のドリコールリン酸マンノース(Dol-P-Man)依存性マンノース転移酵素が関与している。最初のマンノース付加に働くα1,4-マンノース転移酵素である GPI-MT-I は 2 種類のサブユニットから成り、それらは PIG-M 遺伝子及び PIG-X 遺伝子によりコードされている(Maeda *et al.*, EMBO J. **20**, 250-261, 2001; Ashida *et al.*, Mol. Biol. Cell **16**, 1439-1448, 2005)。その触媒サブユニットと想定されている PIG-M は多数回膜貫通領域を有しており、*N*-グリカンの前駆体であるドリコール中間体(DLO)生合成に関与する 3 種類の Dol-P-Man 依存性マンノース転移酵素(Alg3, Alg9, Alg12)と膜配向性が類似している。我々は、これまでに DLO 生合成に働く様々なヒト糖転移酵素間の物理的相互作用を酵母 split-ubiquitin システムを用いて解析してきた。そこで今回は Dol-P-Man を共通の基質として要求する DLO と GPI アンカーの両生合成経路の関係性を調べるため、手始めとしてヒト PIG-M(hPIG-M)に関する物理的相互作用の解析を試みた。

【方法、結果及び考察】

ヒト脳由来 cDNA プールより遺伝子特異的プライマーを用いて hPIG-M 遺伝子のコード領域を PCR で増幅した後、酵母 split-ubiquitin システム用のベイト発現ベクター(pBT-N, pBT-C)及びプレイ発現ベクター(pPR-N, pPR-C)にクローニングした。2 種類のベイトコンストラクト(pBT-N-hPIG-M, pBT-C-hPIG-M)を当システムの陰性及び陽性コントロール発現プレイコンストラクト(pDL-Alg5, pAI-Alg5)と組み合わせて酵母 NMY51 株を二重形質転換し、得られたベイト/プレイ共発現株について、レポーター遺伝子(*HIS3, ADE2*)発現検出用の 2 種類の選択培地(SD-LWH 及び SD-LWHA)上で増殖性を観察した。その結果、hPIG-M の両末端は rER 膜の細胞質側に配向していることが判明した。そこでこれらのベイトコンストラクトを、ヒト Dol-P-Man 合成酵素(hDPMS)の 2 種類の膜局在サブユニット遺伝子(hDPM2, hDPM3)のプレイコンストラクト(pPR-N-hDPM2, pPR-C-hDPM2, pPR-N-DPM3, pPR-C-DPM3)と酵母で共発現させレポーター発現の有無を検証した。その結果、hPIG-M の C 末端側が hDPM2 及び hDPM3 の N 末端側と特異的に相互作用していることを示唆するデータが得られた。現在、hPIG-M 同士や、hPIG-M と他のヒト DLO 関連酵素との物理的相互作用の有無を当システムで検証中であり、合わせて結果を報告する予定である。

PIG-M, physical interaction, split-ubiquitin system

講演番号：4B04a09
講演日時：3 月 28 日 11:08～ 総合学習プラザ B04 会場

グライコシンターゼによる抗体への 3 本鎖 a 糖鎖の転移

Transglycosylation of G3a type tri-antennary complex type N-glycan to antibody by glycosynthases

○高島 晶、大隅 賢二、黒河内 政樹、水野 真盛、高田 美生、松田 昭生 (野口研)
○Shou Takashima, Kenji Osumi, Masaki Kurogochi, Mamoru Mizuno, Yoshio Takada, Akio Matsuda (The Noguchi Inst.)

健常人の抗体には、おもに様々な構造をした 2 本鎖複合型糖鎖がそれぞれ一定の割合をもって結合しており、3 本鎖や 4 本鎖の複合型糖鎖が結合した抗体はほとんど存在していない。このメカニズムの詳細はまだ明らかにされていないが、我々は 2 本鎖糖鎖をもつ抗体に *N*-アセチルグルコサミン転移酵素(GnT)などの各種糖転移酵素を作用させて、多分岐複合型糖鎖をもつ抗体を人為的に調製することに成功している。一般に、抗体（IgG）の機能・活性と、抗体に結合している糖鎖の構造には密接な関係があることが知られているが、上記のような多分岐糖鎖をもつ抗体の諸性質についてはまだ不明な点が多く、我々はその解明を目指している。しかし、上記の多分岐糖鎖をもつ抗体の調製方法では、反応時間が長い、大量の酵素を必要とするといった問題があり、より効率よく多分岐糖鎖をもつ抗体を調製する方法が必要である。

近年、GnT-IV によって形成される 3 本鎖 b 型糖鎖のオキサゾリン体と EndoF3 変異体などの糖転移活性を有するグライコシンターゼを用いた糖鎖リモデリング反応において、3 本鎖 b 型糖鎖をもつ抗体が調製できることが報告された。しかし、その他の多分岐糖鎖については転移反応例が報告されていない。そこで本研究では、GnT-V によって形成される 3 本鎖 a 型糖鎖のオキサゾリン体とグライコシンターゼを用いた転移反応が、抗体糖鎖のリモデリングに適用できるのかを検討することにした。

まず 3 本鎖 a 型糖鎖のオキサゾリン体を調製するために、シアリルグリコペプチド(SGP)から調製した G0 型糖鎖をもつ糖ペプチドに、GnT-V とガラクトース転移酵素 B4GalT1 を作用させて、G3a 型糖鎖をもつ糖ペプチドを調製した。これより糖鎖を切り出して、オキサゾリン体にした。この G3a オキサゾリンと、コアフコース含量の高いリツキシマブより調製した抗体アクセプターを用いて、グライコシンターゼによる糖転移反応を実施した。その結果、3 本鎖 b 型糖鎖を転移できる EndoF3 変異体では、ほとんど転移反応が進行しなかったが、EndoS2 変異体を用いた転移反応では、効率よく転移反応が進行した。従って、抗体への 3 本鎖糖鎖の転移には、糖鎖構造の違いによって適切なグライコシンターゼを選択する必要があると思われた。

transglycosylation, antibody, glycosynthase

講演番号：4B04a10
講演日時：3 月 28 日 11:19～ 総合学習プラザ B04 会場

特異的ケミカルプローブ開発を目指したゴルジ体β-ガラクトシダーゼ阻害剤であるイソフラボン誘導体の構造活性相関の解明

Structure-activity relationship of isoflavone derivatives as an inhibitor of Golgi ß-galactosidase for the development of the specific chemical probe

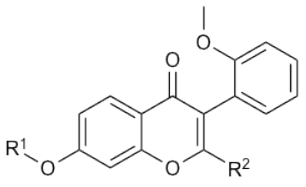
○清水 まるみ[1]、小野寺 千尋[2]、高木 元成[1]、袴田 航[1,2]、平野 貴子[1,2]、西尾 俊幸[1,2] ([1]日大・生資科、[2]日大院・生資科)

○Marumi SHIMIZU[1], Chihiro ONODERA[2], Motonari TAKAGI[1], Wataru HAKAMATA[1,2], Takako HIRANO[1,2], Toshiyuki NISHIO[1,2] ([1]Chem. and Life Sci., College of Bioresource Sciences, Nihon Univ., [2]Graduate school of Bioresource Sciences, Nihon Univ.)

【目的】近年、糖鎖解析手法の発展により、従来の *N*-結合型糖鎖修飾では十分に説明できない糖鎖が報告されている（*Glycobiology,* **25**, 88, 2015）。我々はヒト細胞内において未発見な *N*-結合型糖鎖修飾が存在すると考え探索し、ゴルジ体に未報告な β-ガラクトシダーゼ（β-Gal）活性を発見し報告した（*Bioorg. Med. Chem.* **24**, 1369, 2016）。そこで、本酵素活性を有するタンパク質を明らかにするためにヒトが有する β-Gal 遺伝子を調べた結果、β-Gal 遺伝子は細胞老化マーカーとして知られているリソソーム β-Gal を産生する *GLB1* 遺伝子のみであった。我々は、リソソーム β-Gal の生合成前駆体がゴルジ体で β-Gal 活性を示すと仮定し、その前駆体を単離するケミカルプローブを創製するため、ゴルジ体 β-Gal 阻害剤を探索し「4-3F10」（下図）を得た。本発表では、阻害剤の活性向上を目指した 4-3F10 の構造展開を行い、*in vitro* における阻害活性評価・*in silico* での阻害剤の酵素への結合モデル解析・細胞毒性評価の結果に基づき、ケミカルプローブに適した阻害剤を得ることを目的とした。

【方法・結果】現在、ヒト由来リコンビナント β-Gal は、我々が「ゴルジ体 β-Gal」と考えている「リソソーム β-Gal 前駆体」のみが市販され、「成熟リソソーム β-Gal」は市販されていない。そこで、市販 β-Gal を用いて、4-3F10 およびその誘導体の *in vitro* における阻害活性評価を行った。はじめに、我々が開発したゴルジ体 β-Gal 蛍光基質を用いて、市販酵素がリソソームの pH（3.5）とゴルジ体の pH（6.5）のどちらが適した pH であるか評価した結果、ゴルジ体の pH において、リソソームの pH の約 8 倍の加水分解活性を示した。そこで、本条件下で阻害活性評価を行った結果、阻害剤濃度 25 μM において、4-3F10・化合物 **7**・既知阻害剤（Deoxgalactonojirimycin）がそれぞれ 50.2 %・71.6 %・65.3 % の阻害率を示した。また、化合物 **7** の IC_{50} 値は 12.5 μM であった。続いて、*in silico* での阻害剤の結合様式解析を行った結果、*in vitro* での阻害活性を支持する結果が得られた。さらに、これら阻害剤の細胞毒性について検討を行い、細胞毒性が認められなかったことから、化合物 **7** がケミカルプローブの基本構造として適切であることを確認した。

現在、リソソーム β-Gal 前駆体とリソソーム β-Gal の詳細な基質特異性を明らかとするために必要となる、両酵素の組換え体の作製に着手している。



4-3F10: R^1=2-chlorophenyl, R^2=H
1: R^1=3-chlorophenyl, R^2=H
2: R^1=4-chlorophenyl, R^2=H
3: R^1=2-chlorophenyl, R^2=CF_3
4: R^1=3-chlorophenyl, R^2=CF_3
5: R^1=4-chlorophenyl, R^2=CF_3
6: R^1=methyl, R^2=H
7: R^1=-$(CH_2)_2CH(CH_3)_2$, R^2=H
8: R^1=-$CH_2CH=C(CH_3)_2$, R^2=H
9: R^1=-$CH_2C{\equiv}CH_3$, R^2=H
10: R^1=biphenyl, R^2=H

β-galactosidase, chemical probe, isoflavone

発表責任者：袴田　航（haamata.wataru@nihon-u.ac.jp）

講演番号：4B04a11
講演日時：3 月 28 日 11:40～ 総合学習プラザ B04 会場

細胞レベルでの新規ゴルジ体マンノシダーゼ阻害剤の活性評価と阻害標的解析

Inhibitory activity evaluation and target protein analysis of novel Golgi mannosidase inhibitor at the cellular level.

○小山 亮祐、加納 結衣、袴田 航、平野 貴子、西尾 俊幸（日大院・生資化）
○Ryosuke KOYAMA, Yui KANO, Wataru HAKAMATA, Takako HIRANO, Toshiyuki NISHIO (Grad. school of Bioresource Sciences, Nihon Univ.)

【研究目的】*N*-結合型糖鎖は、真核生物の細胞表面やタンパク質上において様々な生命現象に関与する機能性分子である。近年、糖鎖の持つ機能の中でも細胞間の接着を伴う情報伝達、いわゆる細胞間コミュニケーション（CCC）が、主にその成熟型と呼ばれる糖鎖によって成立していることが報告されている（*Nat. Rev. Can.,* **15**, 540-555, 2015）。本研究では、CCC が特にがんの腫瘍形成や浸潤転移に必須な役割を果たしていることから、細胞表面の *N*-結合型糖鎖の未成熟とし、CCC を不全とすることができれば、新たながんの治療に応用できると考えた。これまでに当研究室では、ゴルジ体マンノシダーゼ（GM）の阻害が『阻害により生じた未成熟な *N*-結合型糖鎖が細胞表面に輸送され CCC を阻害する』報告（*Cancer Sci.,* **99**, 1304-1310, 2008）に基づき、*N*-結合型糖鎖プロセシング経路の酵素群のうち、GM を標的とした阻害剤開発を行い、既知阻害剤よりも低濃度で培養細胞内の GM を阻害する非糖ミミックな GM 阻害剤 AR524 を見出すことに成功した。そこで本発表では、AR524 の細胞レベルでの GM 阻害を細胞内に蓄積した未成熟糖鎖および細胞表面に輸送された未成熟糖鎖の量的変化とその構造を評価することとした。

【研究方法・結果】まず、AR524 が細胞内および表面に未成熟糖鎖を蓄積させるか評価するため、蛍光標識レクチンを用いて未成熟糖鎖を検出し、蛍光顕微鏡で細胞内の蛍光強度・蛍光面積の増加を観察した。その結果、既知 GM 阻害剤が活性を示さなかった 10 μM での未成熟糖鎖の蓄積を観察した。さらに、細胞表面への未成熟糖鎖の輸送を評価するため、細胞表面に蓄積した糖鎖が引き起こす細胞接着不全による細胞長の縮小を観察した。その結果、10 μM にて既知阻害剤以上の細胞長の縮小を観察した。これらの結果から、AR524 が細胞レベルで GM に作用していることが確認された。そこで、次に AR524 が GM を阻害標的とし、その阻害に由来する未成熟糖鎖を蓄積させるか確認するため、認識構造の異なる 3 種の蛍光標識レクチンを用いて細胞表面糖鎖を検出し、その構造をフローサイトメトリーで分析した。その結果、AR524 が既知 GM 阻害剤によって蓄積する糖鎖とは異なる構造の未成熟糖鎖を蓄積させた。このことから、開発した AR524 は、阻害標的が既知阻害剤とは異なるこれまでにない GM 阻害剤であることが明らかとなった。また現在は、AR524 の阻害標的を決定するため、細胞表面に蓄積した未成熟糖鎖を膜タンパク質とともに抽出し、高分解能質量分析法による糖鎖構造解析を試みている。

Golgi mannosidase inhibitor, N-Glycan accumulation, Immature N-Glycan

講演番号：4B04a12
講演日時：3 月 28 日 11:51～ 総合学習プラザ B04 会場

ERp29 による分子シャペロンの二量化と機能評価に関する検討

The study on dimerization and functional evaluation of molecular chaperones mediated by ERp29.

○中尾 仁美[1]、瀬古 玲[2]、伊藤 幸成[2,3]、迫野 昌文[1]([1]富山大院　生命融合、[2]JST, ERATO、[3]理研)
○Hitomi NAKAO[1], Akira SEKO[2], Yukishige ITO[2,3], Masafumi SAKONO[1] ([1]Grad. Sch. of Innovate Life Sci., Univ. of Toyama, [2]JST, ERATO, [3]RIKEN)

【緒言】小胞体において糖鎖修飾を受けた新生ポリペプチド鎖は、糖タンパク質品質管理機構を経て高次構造を形成する。レクチン様分子シャペロン calnexin(CNX)及び calreticulin(CRT)は PDI ファミリータンパク質(PDIs)の一種である ERp57 と協同的に未成熟タンパク質のフォールディングを補助する。これまでに、我々は CNX が ERp57 だけでなく ERp29 とも相互作用することを明らかとした(H. Nakao et al. *BBRC*(2017))。我々は、ERp29 がホモダイマーを形成する性質から、ERp29 は CNX, CRT を連結するリンカーとして機能すると予想した。本研究では、ERp29 を介したシャペロンダイマー形成に関する検討を行った。
【結果と考察】CNX 固定粒子を作製し、ERp29 と c-Myc 融合 CNX(c-Myc CNX)の共存溶液に対してプルダウン実験を実施した。その結果、ERp29 と c-Myc CNX 共存溶液において、CNX 固定粒子に対する c-Myc CNX の特異的な結合が認められた。続いて、CNX と ERp29 の共存溶液に対してクロスリンカーによる分子架橋を行い、電気泳動及びウエスタンブロットを行った結果、CNX と野生型 ERp29 の共存溶液においてのみ CNX と ERp29 を含む新たなバンドが確認された。出現バンドの分子量から、2 分子の CNX と 2 分子の ERp29 で構成される複合体であることが示唆された。さらに、CNX 固定ラテックス粒子を作製し、ERp29 と混合の後、経時的に粒子の沈降を観察したところ、野生型 ERp29 の共存条件においてのみ粒子の著しい沈降が確認された。一方、ERp29 変異体共存条件においては明らかな粒子沈降の変化は現れなかった。また、再分散した粒子溶液に対して過剰量の CNX を添加したところ、粒子の沈降速度の低下が確認された。したがって、ERp29 が粒子上の CNX と結合することで、粒子の凝集化を促進したと予想された。同様に過剰量の CRT を添加した場合も粒子の沈降速度の低下が認められたことから、CNX だけでなく CRT についてもシャペロンダイマーの形成に関与する可能性が示された。以上の結果より、ERp29 がリンカーとしてレクチンシャペロンのダイマー化を補助していることが強く示唆された。
さらなる検討として、CNX の基質結合能に対するダイマー化の影響評価を試みた。過去に疎水性ペプチド KKAFAF がレクチンシャペロンに結合した場合に、シャペロン内の Trp 蛍光の強度が変化することが報告されている(Ronnie Lum et al., *JBC*(2016))。CNX と KKAFAF の混合液の蛍光を測定したところ、トリプトファンに由来する蛍光強度の変化が認められた。CNX と ERp29 を共存させた場合における基質結合性の変化を検討し、その結果もあわせて報告する。

ER resident chaperone, ERp29, Protein disulfide isomerase

講演番号：4B04a13
講演日時：3 月 28 日 12:02～ 総合学習プラザ B04 会場

改変プロテオグリカンの機能性および構造解析

The function and structure analysis of modified proteoglycans

○佐野 栄宏、成田 武文（都産技研）
○Masahiro Sano, Takefumi Narita (TIRI)

[**目的**] プロテオグリカンは糖タンパク質の一つであり、細胞表面や細胞外マトリックスに存在し、様々な機能を担っている。最近の研究から、サケ鼻軟骨由来プロテオグリカンはヒト皮膚線維芽細胞の Erk1/2 を活性化することによって、細胞増殖を促進することが明らかにされている。そこで、プロテオグリカンの生体に対する有効性を高めるために、様々な改変プロテオグリカンを作製し、細胞を用いてその機能性を検証し、構造との相関性を解析した。
[**方法**] **(1)** サケ鼻軟骨由来プロテオグリカンはカルシウムイオンを含んでおり、そのカルシウムイオンを鉄の金属イオンに置換することで、鉄イオン化型プロテオグリカンを作製した。また、酸およびアルカリ処理することにより、改変プロテオグリカンを作成した。
(2) 各改変プロテオグリカンのヒト皮膚繊維芽細胞の遺伝子発現に対する時間依存的な影響を、プロテオグリカン２００μg/ml を添加し、３、６、１２、２４時間後に Real time PCR 装置により調べた。
(3) 各種改変プロテオグリカンの分子量を HPLC 装置により解析した。
(4) 各種改変プロテオグリカンの構造を液中 AFM 装置により調べた。
[**結果**] **(1)** イオン交換プロテオグリカンのカルシウム含有量は、金属イオンに置換される形で減少が見られた。
(2) 鉄イオン型プロテオグリカンは、バーシカンおよびヒアルロン酸合成酵素、MMP-1 の遺伝子発現を増加させることが明らかになった。また、アルカリ処理したプロテオグリカンは、炎症性サイトカインの遺伝子発現を増加させることが明らかになった。
(3) 各種改変プロテオグリカンで分子量の違いが明らかになった。
(4) 各種改変プロテオグリカンの構造が液中 AFM により明らかになった。
[**まとめ**] サケ鼻軟骨由来プロテオグリカンは細胞に対して様々な機能性を持っているが、より高い機能性を持つプロテオグリカンの創出が望まれていた。今回、鉄イオン化型プロテオグリカンは、バーシカンおよびヒアルロン酸合成酵素、MMP-1 の遺伝子発現を増加することが明らかになった。これらの遺伝子発現は細胞増殖に深く関与しているので、これらの遺伝子発現の増加によって、細胞増殖を促進している可能性が示唆された。また、改変プロテオグリカンの分子量および構造の解析結果から、機能性の変化の要因となりうることが示唆された。

Proteoglycan, modified PG, function analysis

発表責任者：佐野栄宏（sano.masahiro@iri-tokyo.jp）

講演番号：4B04a14
講演日時：3 月 28 日 12:13～ 総合学習プラザ B04 会場

ERAD 関連タンパク質欠損植物中で生成する遊離 N-グリカンの構造特性

Structural features of free N-glycans produced in plant mutan lines in which ERAD-related proteins are deleted

古田 佳織[1]、前田 恵[1]、Strasser Richard[2]、○木村 吉伸[1] ([1]岡山大学大学院環境生命科学研究科、[2]University of Natural Resources and Life Sciences, Austria)
Kaori Furuta[1], Megumi Maeda[1], Richard Strasser[2], ○Yoshinobu Kimura[1] ([1]Okayama University, [2]University of Natural Resources and Life Sciences, Austria)

【目的】小胞体(ER)中でミスフォールドした新生タンパク質は，小胞体関連分解（ERAD）機構により ER から細胞質へ逆輸送された後，プロテアソームで分解を受ける。分泌型タンパク質の殆どは ER 中で N-グリコシル化されており，それら糖鎖の微細な構造変化がタンパク質のミスフォード状態とフォールド状態の識別に利用される。植物細胞では，ミスフォールド糖タンパク質上の *N*-グリカンは，ER 内腔でα1,2-Man'ase 4/5（MNS4/5）の作用により特定のα1,2-Man 残基が除去され，α1,6-Man 残基が露出した構造へと変換される。これらミスフォールド糖タンパク質上の糖鎖は，レクチン様受容体 OS9 によって認識され，次いで SEL1L，HRD1から成るディスロコンを経由して細胞質へ逆輸送される [1]。そして，細胞質ではミスフォールドタンパク質から PNGase により還元末端側に GlcNAc を 2 残基有する GN2 型 N-グリカンが遊離し（GN1-FNGs），次いで ENGase により GlcNAc を1残基有する GN1 型遊離 N-グリカン（GN1-FNGs）が生成・蓄積する。本研究では植物タンパク質フォールディングに関わる糖鎖機能研究の一環として， *A. thaliana* の MNS4/MNS5 二重欠損株（MNS4/5），OS9 欠損株，SEL1L 欠損株および HRD1A/B 欠損株が産生するハイマンノース型 (HMT) 遊離 N-グリカン（GN1-HMT-FNGs）の構造特性解析を行った。
【方法】*A. thaliana* の野生株と各欠損株について地上部を液体窒素中で破砕後，オリゴ糖鎖を 0.1N NH_4OH にて抽出した。抽出液を透析後，外液をイオン交換に供して非吸着画分に FNGs を回収した。次いで， FNGs を蛍光標識した後， Con A アフィニティ，RP-HPLC，SF-HPLC により GN1-HMT-FNGs を調製した。これら GN1-HMT-FNGs の構造特性については，ESI-MS，α-Man'ase 消化，部分アセトリシスを組み合わせて解析した。
【結果及び考察】野生株及び MNS4/5 変異株中の GN1-HMT-GNGs の構造特性には差が見られたが，生成量には差が見られないことから，OS9-SEL1L-HARD1A/B 非依存的（糖鎖構造非依存的）な経路で ER から細胞質へ排出されることが示された。HRD1A/B 変異株では GN1-HMT-GNGs の構造特性及び生成量には差が見られず，HARD1A/B 以外のユビキチンリガーゼによるユビキチン化が関与することが示唆された。それに対して，OS9 変異株と SEL1L 変異株では，いずれも GN1-FNGs 生成量が野生株の 2～3 倍量に達しており，構造特性も野生株由来の GN1-FNGs と大きく異なり，α-Man'ase によってよりトリミングされた構造 (Man5/Man4) が主構造であった。これらの結果は，OS9 あるいは SEL1L の欠損により， ERAD 機構が破綻することでオートファジー系が活性化され，ミスフォールド糖タンパク質がオートファゴソーム内で PNGase/ENGase 及び液胞α-Man'ase により分解を受けた可能性を示唆するものであった。興味深いことに，SEL1L 欠損株では，グルコース残基を有する GN1-HMT-FNGs が特異的に見いだされたことから，Glc'ase II の最大活性には SEL1L の存在が必要と考えられた [2]。

[1] Hüttner, S., *et. al.*, *Plant Cell*., **26**, 1712 (2014). [2] Furuta, K., *et al. Glycoconjugate J.* 36, 332 (2019).

free N-glycan, ERDA-related proteins, Arabdopsis thaliana

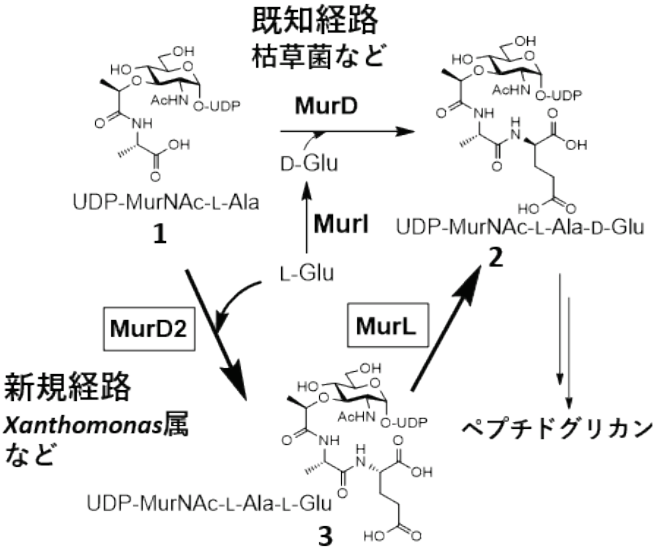
発表責任者：木村吉伸（yosh8mar@okayama-u.ac.jp）

講演番号：4B05a01
講演日時：3 月 28 日 09:30～ 総合学習プラザ B05 会場

新規ペプチドグリカン生合成経路阻害剤の探索
Exploring specific inhibitors of alternative peptidoglycan biosynthetic pathway
清水 庸平[1]、佐藤 洋平[1]、○小笠原 泰志[2]、米田 友貴[2]、猪熊 泰英[2]、大利 徹[2]([1]北大院総合化学、[2]北大院工)
Yohei SHIMIZU[1], Yohei SATO[1], ○ Yasushi OGASAWARA[2], Tomoki YONEDA[2], Yasuhide INOKUMA[2], Tohru DAIRI[2] ([1]Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

【背景・目的】最近当研究室では、植物病原菌である *Xanthomonas* を含む一部の微生物では、細胞壁の構成成分であるペプチドグリカンを新規経路で生合成することを見出した。これまで知られていた経路（既知経路）では、グルタミン酸ラセマーゼによって供給される D-Glu が中間体 UDP-MurNAc-L-Ala (**1**) に縮合することで UDP-MurNAc-L-Ala-D-Glu (**2**) が生成するのに対し、新規経路では MurD2 が L-Glu と **1** の縮合反応により UDP-MurNAc-L-Ala-L-Glu (**3**) を与え、続く新規ペプチドエピメラーゼ (MurL) によるエピメリ化で **2** が生合成される[1]。新規経路は *Xanthomonas* 属細菌および、果実類病原菌の *Xylella* や日和見感染菌 *Stenotrophomonas* 属細菌など一部の微生物のみが有しているため、その阻害剤はこれら病原菌に特異的な農薬、抗生剤になると期待される。そこで、本研究では放線菌培養物ライブラリーから新規ペプチドグリカン生合成経路に特異的な阻害剤を探索した。

【方法・結果】阻害剤の探索は、ペーパーディスクを用いた生育阻止検定により、新規経路保有株の生育を阻害し、既知経路保有株の生育を阻害しないサンプルを選別することで行った。既知経路保有株として *Streptomyces lividans* と *Pseudomonas putida* を、新規経路保有株として *Micromonospora* sp.と *Xanthomonas oryzae* を被検菌に用い、放線菌の培養液 200 サンプルからスクリーニングを行い、最終的に *Streptomyces parvulus* 由来の 1 サンプルを選別した。本サンプル中の活性本体を溶媒抽出や HPLC で精製後、高分解能 MS や NMR、X 線結晶構造解析で活性本体を actinomycin D と決定した[2]。続いて、MurD2 と MurL に対する阻害活性を *in vitro* で調べたところ、前者のみを阻害することを確認した。



[1] R. Feng *et al*. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 4243 (2017).
[2] Y. Ogasawara *et al*. *J. Antibiot.* in press (doi: 10.1038/s41429-019-0252-2)

specific inhibitor, peptidoglycan, actinomycin

発表責任者：大利徹（dairi@eng.hokudai.ac.jp）

講演番号：4B05a02
講演日時：3 月 28 日 09:41～ 総合学習プラザ B05 会場

龍涎香人工合成経路の構築：アンブレインと香気成分の効率的合成と破骨細胞分化誘導活性
Construction of the artificial synthesis pathway of ambergris
山辺 陽太[1]、川越 幸奈[1]、奥野 琴音[1]、上田 大次郎[1]、柿原 嘉人[2]、○佐藤 努[1]（[1]新潟大院自然・農、[2]新潟大・歯）
Yota YAMABE[1], Yukina KAWAGOE[1], Kotone OKUNO[1], Daijiro UEDA[1], YOSHITO KAKIHARA[2], ○Tsutomu SATO[1] ([1]Niigata Univ., [2]Niigata Univ. Dentistry)

龍涎香（りゅうぜんこう）は、紀元前から世界中で高級な香料として利用されてきたほか、漢方薬・伝統薬としても使用されてきた。100 頭に 1 頭ぐらいの確率でマッコウクジラの腸に存在するが、その生産機構は不明である。近年、商業捕鯨が禁止（最近日本で再開したが対象外）になってからは、「幻の香り」となってきている。龍涎香の主成分はアンブレインであり、それ自体香りはないが酸化分解して 31 種類以上の香気成分となり、複合的にいい香りとなる。アンブレインの化学合成は開発されているが、多段階で収量が悪いことがから産業化に至っていない。

我々はセスクアテルペンの生合成研究の過程で *Bacillus megaterium* 由来二機能性セスクアテルペン/トリテルペン合成酵素（BmeTC）を発見し、以前報告したスクアレン-ホペン環化酵素の変異酵素 SHC^{D377C} を 1 段階目、BmeTC を 2 段階目に用いることで、「スクアレン→単環→アンブレイン」の人工経路でアンブレインの *in vitro* 酵素合成に成功した。しかし、収率は 3%程度と極めて低かった。2016 年、我々は、$BmeTC^{D373C}$ が一つの酵素だけでスクアレンからアンブレインを合成（スクアレン→単環/二環→アンブレイン）できることを報告した。2018 年、Moser らは、$BmeTC^{D373C}$ をメタノール資化酵母 *Pichia pastoris* で発現させ、培養条件を最適化させたところ、105 mg/L 培養液の収率でアンブレインを生産した。本研究では、$BmeTC^{D373C}$ のリデザインを行ってアンブレインの収量を大幅に増加させ、アンブレインの香気成分への変換も収率良く達成することに成功したので報告する。

$BmeTC^{D373C}$ において、かさ高い単環や二環構造が酵素活性部位中で二段階目の反応の障害になっているのではないかと考え、単環や二環構造の近傍に位置すると考えられる 6 つの残基の Ala 置換体を作成した。その結果、単環や二環基質に対して WT よりも活性が高い変異 3 種類を見出し、$BmeTC^{D373C}$ に組み込んだところ、$BmeTC^{Y167A/D373C}$ が $BmeTC^{D373C}$ の約 10 倍のアンブレイン生産量（*P. pastoris* の *in vivo* 系で 1 g/L に相当）に向上した。$BmeTC^{Y167A/D373C}$ は、スクアレンや単環基質よりも二環基質と非常に反応性が高く、アンブレイン生成比率も高いことに着目して、新たな二酵素経路（スクアレン→二環→アンブレイン）のワンポット反応を考案した。つまり、1 段階目に WT を用いて 2 段階目に $BmeTC^{Y167A/D373C}$ を用いることで、$BmeTC^{Y167A/D373C}$ のみの系（同じ酵素量）の約 2 倍、つまり $BmeTC^{D373C}$ の約 20 倍のアンブレイン（*P. pastoris* の *in vivo* 系で 2 g/L に相当）を合成することに成功した。

次に、アンブレインの一重項酸素による酸化分解を様々な条件で行い、調香師および GC-MS によって評価したところ、龍涎香の香りを再現することに成功した。収率も既報の 1%から 20%まで上げることができた。従って、スクアレン→アンブレイン→香気成分の効率的な人工合成経路を構築できた。

さらに我々は、酵素合成したアンブレインを用いて様々な薬理活性の解析を進めている。今回、大理石骨病の治療薬の可能性がある破骨細胞分化誘導活性を見出したので、合わせて報告する。

terpenoid, isoprenoid, fragrance

発表責任者：佐藤努（satot@agr.niigata-u.ac.jp）

講演番号：4B05a03
講演日時：3 月 28 日 09:52～ 総合学習プラザ B05 会場

マッコウクジラ腸菅からアンブレイン/オノセロイド生産菌の探索と利用

Search and use of ambrein/onoceroids-producing bacteria from sperm whale gut

近岡 花菜子[1]、川邊 舞[1]、○上田 大次郎[1]、山田 格[2]、田島 木綿子[2]、佐藤 努[1] ([1]新潟大院自然・農、[2]科博)
Kanako Chikaoka[1], Mai Kawabe[1], ○Daijiro Ueda[1], Tadasu Yamada[2], Yuko Tajima[2], Tsutomu Sato[1] ([1]Niigata Univ., [2]National museum of Nature and Science)

龍涎香（りゅうぜんこう）とは、古くから世界各地で利用されてきた、約１％のマッコウクジラの腸から発見される希少価値の高い動物性香料である。龍涎香の主成分はアンブレインであり、それが酸化分解されて生成する様々な揮発性香気成分が複合し、龍涎香特有の魅力的な香りとなる。

マッコウクジラの腸内における龍涎香の生成機構の詳細は明らかになっていない。また、アンブレインの化学合成は多段階の合成ステップが必要な上に収率が非常に低く、産業化には至っていない。さらに、龍涎香は香料としての価値だけではなく、伝統薬・漢方薬として利用されていたほか、媚薬効果に対する根強い信仰があるが、それらの研究はほとんど進んでいない。

そのような背景の中、我々は細菌由来の酵素を用いてアンブレインを酵素合成することに成功した（2014 年農芸化学会）。酵素の本来の働きと異なる人工的な経路で希少物質を合成できた点で学術的に評価されたが、産業化するには程遠い収率のアンブレインしか合成できなかった。

我々は、マッコウクジラの腸内にアンブレイン生産能を持つ細菌が存在するのではないかと考えている。そこで、今回、マッコウクジラにおける龍涎香の生成機構の解明をめざし、マッコウクジラ由来アンブレイン生産菌の探索を試みた。

2016 年 1 月に徳島に漂着したマッコウクジラの腸から候補菌の単離と脂質成分の解析を行った。現在のところアンブレイン生産菌の発見には至っていないが、単離菌の 1 つにテルペノイドを生産する微生物 A を得た。微生物 A はスクアレンや、二環性化合物、オノセロイド（スクアレンの両末端環化化合物）を生産しており、*Bacillus megaterium* の生産する化合物と類似していた。にもかかわらず、微生物 A は環状化合物の生産量が *Bacillus megaterium* の約 10 倍であった。よって、微生物 A は我々がアンブレインの酵素合成に利用している *Bacillus megaterium* 由来テトラプレニル-β-クルクメン環化酵素（BmeTC）と同じ機能を持ち、環化能力の高い酵素を保有している可能性が示唆された。微生物 A について次世代シーケーンサーを用いてゲノム解析を行い、BmeTC のホモログ酵素を見出した。微生物 A 由来 BmeTC ホモログとスクアレンとの酵素反応の結果、オノセロイドの生成が確認され、その反応生成物の量は BmeTC のものと比較して約 2 倍多かった。さらにこの酵素の変異体を作製し、スクアレンとの酵素反応を行った結果、アンブレインの生成が確認された。

今後、この酵素を利用して効率的な酵素合成の検討を行う予定である。また、アンブレイン生産菌の探索も引き続き行っていく予定である。

terpenoid, isoprenoid, fragrance

発表責任者：佐藤努（satot@agr.niigata-u.ac.jp）

講演番号：4B05a04
講演日時：3 月 28 日 10:03～ 総合学習プラザ B05 会場

Class IB terpene synthase: a minor product having new cyclic skeleton and site-directed mutagenesis of putative active site residue

○Rafaella Stepanova[1], Kazuya Asada[1], Daijiro Ueda[1], Hayato Inagi[2], Kunio Miki[2], Masahiro Fujihashi[2], Yoko Yasuno[3], Tetsuro Shinada[3], Tsutomu Sato[1] ([1]Niigata Univ., [2]Kyoto Univ., [3]Osaka City Univ.)

We have recently found a new terpene synthase (BsuTS) from *Bacillus subtilis* that have no Class I motif (DDXXD and NSE) and has no homology with the primary structure of Class I, during the course of our studies on the isolation and biosynthesis of rare class of sesquarterpenes. BsuTS accepts C_{35} heptaprenyl diphosphate as a substrate *in vivo* to produce cyclic tetraprenyl-β-curcumene. We also found that BsuTS homologs (BclTS and BalTS) from *B. clausii* and *B. alcalophilus* utilizes C_{25}-C_{35} as natural substrates to generate an acyclic β-springene (**1**) type terpenes. Recently, 3D-structure of BalTS was elucidated for the first time in this group, and it was shown that the 3D-structure is similar to Class I enzymes, which has no similarity in primary structure. Two new motifs [DYLDNLxD and DY(F,L,W)IDxxED] containing six Asp that are similar in steric position to the class I DDXXD and NSE motifs was proposed as the active site. We propose a new class of terpene synthase isolated from *Bacillus* species as Class IB. In addition, a class IB terpene synthase (BsuTS) was reported that the C-terminal region is important for the product specificity. Such a characteristic is unprecedented in Class I.

In this study, we would like to report the functional studies of BalTS to gain insight into the mechanistic details of Class IB terpene synthases. Analysis of a minor product and site-directed mutagenesis of putative active site residues, which were located close to the substrate analog in the crystal structure, were performed to discuss the catalytic mechanism.

A minor product **2** was also synthesized with major product **1** from GGPP by BalTS. The production ratio of **2** and **1** was almost constant under the several reaction conditions (**1**:**2** = *ca*. 89:11). After incubating BalTS with GGPP, **2** was isolated. Detailed NMR analysis revealed that **2** is a novel monocyclic diterpene. This study revealed for the first time that BalTS has the ability to form cyclic structures. **2** has a new cyclic skeleton of diterpenes, suggesting that genome mining and redesigning of Class IB terpene synthases may increase the number of new terpenes, especially $>C_{20}$ terpenes, that are not produced by Class I family in the future. We would also like to discuss the formation mechanism of **2** and the results of site-directed mutagenesis experiments of putative active site residues.

1) T. Sato *et al*., *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 9734-9737, **2011**. 2) T. Sato *et al*., *ChemBioChem*, 14 (7), 822-825, **2013**. 3) D. Ueda *et al*.,*ChemBioChem*, 16(9):1371-1377, **2015**. 4) M. Fujihashi *et al*.,*Chem. Sci.*, 9, 3754–3758, **2018**.

terpenoid, isoprenoid, terpene synthase

発表責任者：Tsutomu Sato（satot@agr.niigata-u.ac.jp）

講演番号：4B05a05
講演日時：3 月 28 日 10:14～ 総合学習プラザ B05 会場

Mycobacterium 属細菌由来イソプレニル二リン酸生合成経路の解析

Analysis of isoprenyl diphosphates biosynthesis from *Mycobacterium* spp.

○阿部 透[1]、尾崎 真夢[1]、上田 大次郎[1]、邊見 久[2]、佐藤 努[1] ([1]新潟大院・自然、[2]名大院・生命農)
○Tohru ABE[1], Sadamu OZAKI[1], Daijiro UEDA[1], Hisashi HEMMI[2], Tsutomu SATO[1] ([1]Niigata Univ., [2]Nagoya Univ.)

イソプレニル二リン酸は、IPP（C_5）とその異性体である DMAPP（C_5）の縮合から生合成される様々な鎖長の直鎖状イソプレノイドであり、全てのイソプレノイド生合成における中間体である。縮合反応はイソプレニル二リン酸合成酵素（IDS）によって触媒され、*E* 型と *Z* 型二重結合を形成する *E*-IDS と *Z*-IDS が各々存在する（両者は構造類似性のない酵素）。私達は非病原性細菌 *Mycobacterium vanbaalenii* において、糖担体脂質前駆体の *Z,E*-DecPP（C_{50}）と、セスクアテルペンと糖・ミコール酸結合体前駆体の *Z,E*-HepPP（C_{35}）の生合成に関与する二機能性 *Z*-IDS を同定している。また、*Z,E*-HepPP はヘプタプレニル還元酵素（HEPR）によって Octahydro-HepPP に変換されることを前回大会で報告した。しかし、同細菌において *Z*-IDS の基質を供給する *E*-IDS は報告されていなかった。本研究では *M. vanbaalenii* が有する 3 種の *E*-IDS ホモログの機能解析を行った。加えて、HEPR の基質特異性を解析し、本菌のイソプレニル二リン酸生合成経路の解明を目指した。

E-IDS の *in vitro* 解析の結果、Mvan_3536 が GGPPS（C_5→C_{20}）、Mvan_1577 が GGPPS（C_{10}→C_{20}）、Mvan_0992 が SPPS（C_{10}→C_{45}）であることが分かった。一方、*Z,E*-DecPP の前駆体となる GPP（C_{10}）を生成する *E*-IDS は、反応時間や基質濃度を検討したが、見出せなかった。しかし、Mvan_3536 と *Z*-IDS を混合した系で解析したところ、GPP に由来する *Z,E*-DecPP と FPP（C_{15}）/GGPP（C_{20}）に由来する *Z,E*-HepPP の両方が生成した。この結果は、Mvan_3536 から生成した各鎖長のイソプレニル二リン酸が *Z*-IDS の基質として利用されており、生体内の生合成経路を再現していることを強く示唆していた。従って、Mvan_3536 は生体内において GPP/FPP/GGPP 合成酵素として機能していることが示唆された。一方、結核菌 *M. tuberculosis* において Mvan_3536 と Mvan_0992 に系統的に近いホモログ（各々 Rv2173 と Rv0562）は、機能解析不十分な GGPPS と GGPPS（C_5→C_{20}）として報告されており、*M. vanbaalenii* の結果と一致していない。現在、結核菌のホモログについて、再現実験を行っている。

次に、HEPR の基質特異性を解析した。*M. vanbaalenii* では FPP と GGPP から *Z,E*-HepPP が生合成される経路が提唱されているが、今回、HEPR の還元部位はω位と *E* 型二重結合に特異的であり、Octahydro-HepPP は GGPP を経由した経路で生合成されることが明らかとなった。また、よく研究されている好熱性アーキア由来ゲラニルゲラニル基還元酵素も含めて様々な基質に対する特異性を解析した結果、両者で違いが見られた。現在、更に詳細な解析を進めている。

isoprenoid, isopreyl diphosphate synthase, prenyl reductase

発表責任者：佐藤努（satot@agr.niigata-u.ac.jp）

講演番号：4B05a06
講演日時：3 月 28 日 10:35～ 総合学習プラザ B05 会場

ラダラン脂質生合成の推定鍵酵素コバラミン依存性ラジカル SAM 酵素のホロ型発現系の構築

Build the expression holoenzyme system of cobalamin dependent Radical SAM Enzyme that is estimated the key enzyme in ladderane lipids biosynthesis

○美馬 正弥[1]、末宗 周憲[2]、日野 智也[2]、永野 真吾[2]([1]鳥取大・院持続性社会・化学バイオ、[2]鳥取大・院工・化学生物)
○Masaya Mima[1], Hironori Suemune[2], Tomoya Hino[2], Shingo Nagano[2] ([1]Dept. Chem. Biotech., Grad. Schl. Sus., Tottori Univ., [2]Dept. Chem. Biotech., Grad. Schl. Eng., Tottori Univ.)

嫌気的なアンモニア酸化を行うアナモックス細菌は他の天然物には見られない梯子状疎水基を有するラダラン脂質を生産する。歪みの大きな梯子状疎水基の有機合成は非常に困難なため、ラダラン脂質の生合成メカニズムが注目されているがその大部分が未解明である。比較ゲノム解析から長鎖脂肪酸が不飽和化され、これを前駆体としてコバラミン (Cbl)、4 鉄-4 硫黄クラスター (4Fe-4S)、*S*-アデノシルメチオニン (SAM) を補因子とする Cbl 依存性ラジカル SAM 酵素が環化を触媒し生合成されると推定されている (図 1)。本研究ではこの仮説に基づき、本酵素の結晶構造や機能を解析する事でラダラン脂質生合成および梯子状疎水基の構築メカニズムの解明を目指している。

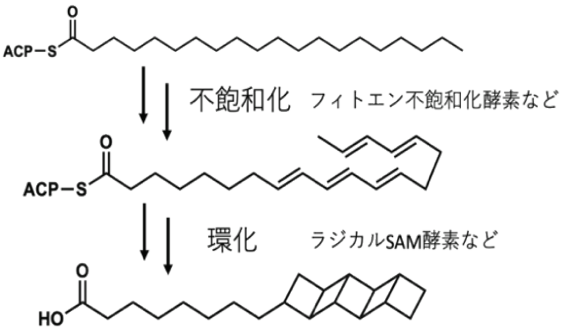


図 1 ラダラン脂質の推定生合成経路

鉄-硫黄クラスター生合成マシナリーの発現ベクター pDB1282 存在下、本酵素を 4Fe-4S 結合型で発現できるが精製中に 4Fe-4S は酸素によって崩壊するためアポ型酵素となる。アポ型酵素に Cbl および 4Fe-4S をそれぞれ化学的に再構成する条件を検討したが、両方の補因子が高い占有率で結合した安定な酵素試料の調製は困難であった。Cbl トランスポーターの発現ベクターpBAD42-BtuCEDFB と pDB1282 共存下で Cbl 依存性ラジカル SAM 酵素 TsrM、Fom3、PhpK を Cbl、4Fe-4S 結合型で発現できることが Booker らにより報告されている[1]。そこで、pBAD42-BtuCEDFB と pDB1282 共存下で Cbl、4Fe-4S 結合型のアナモックス細菌由来ラジカル SAM 酵素の大量発現を試みた。発現誘導を行う際の OD_{600} の値や誘導物質の濃度、大腸菌株を検討し最適化した条件で大量培養すると、大腸菌内に Cbl が取り込まれ、かつ本酵素が可溶性画分に発現していることが確認できた。また固定化金属アフィニティ、陰イオン交換、ゲルろ過クロマトグラフィーによる精製を行い、高純度かつ単分散な酵素試料を得ることができた。精製酵素の紫外可視吸収スペクトルには、Cbl に類似した特徴的な吸収が見られたことから Cbl 結合型として発現していると考えられる。本発表では、精製酵素に含まれる Cbl と 4Fe-4S の定量、発現条件が本酵素の Cbl と 4Fe-4S の占有率に与える効果、及び結晶化スクリーニングについても報告する。

[1] Lanz, N. D. *et al. Biochemistry* **57**, 1475-1490, (2018).

Ladderane lipids, Cobalamin dependent radical sam enzyme, Structural biology

講演番号：4B05a07
講演日時：3 月 28 日 10:46～ 総合学習プラザ B05 会場

トウモロコシの zealactone 生合成前駆体としての 3-オキソカーラクトン酸メチルの同定
Identification of methyl 3-oxocarlactonoate as a precursor for zealactone biosynthesis in maize
○谷口 浩規、秋山 康紀（阪府大院生命環境）
○Hiroki TANIGUCHI, Kohki AKIYAMA (Osaka Pref. Univ.)

【目的】ストリゴラクトン（strigolactone, SL）はシュートの分岐を抑制する植物ホルモンであり，また植物とアーバスキュラー菌根菌との共生における根圏シグナルであることが知られている。SL はカーラクトン（carlactone, CL）を中間体として生合成される。これまでに，3-ヒドロキシカーラクトンや 16-ヒドロキシカーラクトン酸メチルなどの A 環が水酸化された CL が同定されている。その一方で，水酸基の酸化により生成するオキソカーラクトン (oxoCL) の内生存在については報告例がない。トウモロコシ(*Zea mays*)が生産する主要な SL である zealactone は，3-オキソカーラクトン酸メチル（methyl 3-oxocarlactonoate, 3-oxoMeCLA) を中間体として生合成されると推定されているが，その存在は確認されていない。一般に，生合成中間体は速やかに代謝変換されるため内生量が低く検出が難しいことが多い。しかし，3-oxoMeCLA の安定同位体ラベル体を合成し，これが zealactone に変換されることが確認できれば，トウモロコシ内生での 3-oxoMeCLA の存在の強い証左となる。そこで，本研究では 3-oxoMeCLA およびその重水素ラベル体の合成法の開発を行い，トウモロコシ根における zealactone への変換について調べることにより，トウモロコシ内生での 3-oxoMeCLA の存在の可能性を検証した。

【方法および結果】1,4-Dioxaspiro[4.5]decan-8-one を出発物質とした 7 段階の反応による 3-oxoMeCLA の合成法を開発した。この合成ルートにより，CD_3I を標識試薬として，8 段階の反応を経て [18-D_3]-3-oxoMeCLA を合成した。[18-D_3]-3-oxoMeCLA のトウモロコシ根への投与実験を行ったところ，重水素ラベル zealactone への変換が見られた。このことから，トウモロコシ内生での zealactone 前駆体としての 3-oxoMeCLA の存在の可能性が強く示唆された。

strigolactone, zealactone, maize

発表責任者：秋山康紀（akiyama@biochem.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：4B05a08
講演日時：3 月 28 日 10:57～ 総合学習プラザ B05 会場

Evolution of ß-amyrin 11-oxidase activity underlies saponin chemodiversity in *Glycyrrhiza* species

○Much Zaenal Fanani[1], Satoru Sawai[1,2,3,4], Hikaru Seki[1,2], Masato Ishimori[3], Hiroshi Sudo[4], Ery O. Fukushima[1], Kiyoshi Ohyama[2,5], Kazuki Saito[2,3], Toshiya Muranaka[1,2] ([1]Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]RIKEN CSRS, [3]Grad. Sch. Pharm. Sci., Chiba Univ., [4]Tokiwa Phytochemical Co., Ltd, [5]Dept. Chem. Mat. Sci., TITECH.)

Glycyrrhizin is the major bioactive saponin restricted to medicinal *Glycyrrhiza* plants (*Glycyrrhiza uralensis*, *G. glabra*, and *G. inflata*) and used as natural sweetener. The limited occurrences of glycyrrhizin may correlate with the evolution of their biosynthetic enzymes. We previously isolated *CYP88D6* from *G. uralensis* as β-amyrin 11-oxidase catalyzes the formation of 11-oxo-β-amyrin in glycyrrhizin biosynthesis [1]. Other *Glycyrrhiza* species, such as *G. pallidiflora* and *G. macedonica*, however, do not produce glycyrrhizin but produce macedonoside C, with characteristic conjugated double bond at C-11,13 positions, as a major saponin [2]. The underlying molecular basis of 11-oxo-β-amyrin formation in *Glycyrrhiza* species is still not clear. To address this, we functionally characterized CYP88D6 variants from glycyrrhizin-producing and macedonoside C-producing *Glycyrrhiza* species. We found that CYP88D6 variants from both types showed oxidation activity at C-11 of β-amyrin to produce 11-oxo-β-amyrin and dehydrated products, but their product specificity are different and matched well with their major saponin. By performing segment-swapping and amino acid sequence comparison combined with structural analysis of protein model identified key residues involved in 11-oxo-β-amyrin formation. This provide an insight to the contribution of product specificity of β-amyrin 11-oxidase on saponin chemodiversity and highlight the potential for rational design of β-amyrin 11-oxidase to further enhance the production of glycyrrhizin.

[1] Seki et al. (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 14204-14209.
[2] Hayashi et al. (2000) Biol. Pharm. Bull. 23, 602-606.

enzyme evolution, triterpene structural diversity, *Glycyrrhiza*

発表責任者：Toshiya Muranaka（muranaka@bio.eng.osaka-u.ac.jp）

講演番号：4B05a09
講演日時：3 月 28 日 11:08～ 総合学習プラザ B05 会場

イネ科植物における HCAA 生合成酵素 ACT の解析

Characterization of agmatine coumaroyltransferase involved in HCAA biosynthesis in gramineous plant

○山根 美代、松島 芳隆、須恵 雅之（東京農大・農化）
○Miyo YAMANE, Yoshitaka MATSUSHIMA, Masayuki SUE (Tokyo Univ. Agric.)

ヒドロキシ桂皮酸類アミド (HCAA)は高等植物に広く存在する二次代謝産物で、植物体内で防御物質として機能することが知られている。オオムギ属 (*Hordeum*)ではクマロイルアグマチン (CA)やフェルロイルアグマチン (FA)が主な HCAA であり、オオムギ属に特有の防御物質の前駆体としても利用されている。オオムギ(*Hordeum vulgare*)において、これらの HCAA は *N*-アシル基転移酵素であるアグマチンクマロイルトランスフェラーゼ (ACT)の触媒により生合成される。この酵素はさまざまな植物から見出されており、特に同じイネ科植物であるイネやコムギでは、オオムギ *ACT* (*HvACT*)と 80%以上の高い相同性を示す配列が存在することが遺伝子データベースにより示されている。しかしながらイネやコムギが蓄積する CA や FA の量は、オオムギと比べるとごくわずかである。そこで本研究では ACT 類似酵素に着目し、これらの植物における HCAA 蓄積量と酵素活性や発現量の相関などを解析することで、イネ科主要穀物間での耐病性化合物の多様性に関する知見を得ることを目指す。また ACT 類の構造と活性についての解析も併せて行う。

最初に報告されたイネ科 ACT である *HvACT* のほか、コムギやイネで HCAA の蓄積に関与する遺伝子として報告されている *ACT* 様配列 (*TaACT-R-NIL* および *OsAHT*)を単離した。さらに、オオムギ cDNA から *TaACT-R-NIL* 類似遺伝子を、コムギ cDNA から *HvACT* 類似遺伝子を新たに取得した。取得した遺伝子は配列解析ののち、*E. coli* を宿主として異種発現し酵素活性評価に供した。活性評価ではアシル基供与体として *p*-クマロイル-CoA などの桂皮酸類の CoA エステルを用い、アシル基供与体としてはアグマチンのほか、プトレシンなどの植物中にみられるポリアミンや、アグマチンの炭素鎖を 1 つずつ増減させた化合物を用いた。活性評価の結果、今回対象とした ACT のなかでは HvACT が最も高い活性を示した。播種後 24 時間から 96 時間のオオムギ、コムギ、イネ由来の cDNA を鋳型にリアルタイム PCR を行い、単離したそれぞれの *ACT* 遺伝子発現量を調べたところ、*HvACT* の発現量が最も多いことがわかった。*HvACT* 発現量はオオムギを播種後 48 時間で最大となりその後減少した。この発現量の変動は播種 24 時間オオムギにおける CA 蓄積量の変動と一致する傾向を示した。これらの結果より、イネ科植物の HCAA 蓄積量に ACT 活性や発現量が影響しており、高活性かつ高発現の ACT の存在はオオムギの高い HCAA 蓄積量の要因の 1 つであると結論した。

また、HCAA を多く蓄積するオオムギ属ムギクサ (*Hordeum murinum*)の cDNA から *TaACT-R-NIL* に類似する *ACT* 様遺伝子を単離した。この遺伝子についても ACT 活性や発現量を解析し、HCAA の蓄積量との関連について探る予定である。

Hydroxycinnamic acid amides (HCAAs), Acyltransferase, Gramineous plant

講演番号：4B05a10
講演日時：3 月 28 日 11:19～ 総合学習プラザ B05 会場

乾燥耐性を付与するプロピオン酸処理時のイネ（*Oryza sativa*）における代謝変化について
Drought Resilience Found in *Oryza sativa* Treated with Propionic Acid

○手嶋 萌映[1]、吉永 直子[1]、土生 芳樹[2]、寺石 政義[1]、奥本 裕[1]、森 直樹[1]（[1]京都大農、[2]農研機構）
○ Moe TEJIMA[1], Naoko YOSHINAGA[1], Yoshiki HABU[2], Masayoshi TERAISHI[1], Yutaka OKUMOTO[1], Naoki MORI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]NARO)

【背景と目的】

我々は酢酸処理したイネ（*Oryza sativa* Nipponbare）が乾燥耐性を示すことを見出した[1)]. この乾燥耐性とは, 乾燥時に枯死したように見えるが再給水すると新しい葉を出す新規な現象である. これまでに植物中へ取り込まれた酢酸が α-ケトグルタル酸を経由して γ-アミノ酪酸（GABA）に代謝されることを明らかにし, GABA の蓄積と乾燥耐性獲得の関係に注目している[2)]. 昨年度大会では, プロピオン酸処理したイネにも酢酸と同様に乾燥耐性が付与され, GABA が蓄積することを報告した[3)]. 本研究ではさらに, プロピオン酸の ^{13}C ラベル体を用いてプロピオン酸が GABA に変換されるかを調べた.

【方法と結果】

播種後 2 週間生育（明期 16 時間, 暗期 8 時間, 30°C）させたイネを 2,3-$^{13}C_2$ プロピオン酸水溶液（20 mM, 処理区）で 16 時間処理した. 得られた植物体を破砕抽出し, LC/MS および NMR 分析に供した. LC/MS の結果から, 根においてラベル体で標識された GABA を確認した. 酢酸同様, 処理されたプロピオン酸は根から取り込まれ GABA へと変換されると結論した. さらに NMR の解析結果から, 3, 4 位が顕著にラベル化された GABA を確認した. ^{13}C のラベル位置から, 処理したプロピオン酸は細胞内でグリオキシル酸と縮合し 2-ヒドロキシグルタル酸となり, 酸化されて α-ケトグルタル酸となった後, TCA 回路に導入されたものがグルタミン酸を経由して脱 CO_2 により GABA へ変換されたと示唆された.

【参考文献】

1) J-M. Kim, et al. (2017) “Acetate-mediated novel survival strategy against drought in plants.” *Nature Plants* 3 (7) nplants201797.
2) Isaji et al. (2018) “Biosynthesis and accumulation of GABA in rice plants treated with acetic acid.” *Journal of Pesticide Science*. 43-3, 214-219
3) 手嶋ら, 日本農芸化学会 2019 年度大会講演要旨集, 4D2a08 (2019)

drought resilience, *Oryza sativa*, Propionic acid

講演番号：4B05a11
講演日時：3 月 28 日 11:40～ 総合学習プラザ B05 会場

ミニコアコレクションを用いたダイズのハスモンヨトウ抵抗性の解析

A study of the resistance in soybean on *Spodoptera litura* using mini core collection

○中田 隆、平賀 勧、加賀 秋人（農研機構）
○Ryu NAKATA, Susumu HIRAGA, Akito KAGA (NARO)

【背景・目的】

ハスモンヨトウ (*Spodoptera litura*) は ダイズ (*Glycine max*) の重要害虫のひとつである．幼虫はダイズの葉を暴食するため，抵抗性のダイズ品種を用いた効果的な防除方法の確立が求められている．これまで，複数の抵抗性因子を組み合わせる集積系統の開発が試みられている．本研究では，新たな抵抗性因子の発見とその抵抗性機構の解明を目的とした．

【方法・結果】

ダイズのミニコアコレクション (192 系統) を用い，ハスモンヨトウに対する抵抗性と代謝物および遺伝子の解析を行った．まず 192 系統 をハスモンヨトウ幼虫に摂食させ，一定時間後に冷凍して凍結乾燥し，乾燥重を測定した．乾燥重を用いたゲノムワイド関連解析 (GWAS) により，第 9 染色体に抵抗性と関連する領域を認めた．この領域による抵抗性と代謝物の関連を明らかにするため，LC-Orbitrap MS による網羅的代謝分析を行った．まず，全系統を 80% MeOH で抽出し，LC-Orbitrap MS で分析して代謝物のピークプロファイルを得た．そして，Lasso 回帰により乾燥重と関連のあるピークを明らかにした．

Glycine max, *Spodoptera litura*, resistance

発表責任者：中田隆（nakatar369@affrc.go.jp）

講演番号：4B05a12
講演日時：3 月 28 日 11:51～ 総合学習プラザ B05 会場

アーキア型メバロン酸経路におけるホスホメバロン酸デヒドラターゼの特性評価
Characterization of phosphomevalonate dehydratase involved in the archaeal mevalonate pathway

○米山 睦[1]、齋藤 甲斐[2]、保野 陽子[3]、品田 哲郎[3]、吉村 徹[1]、邊見 久[1] ([1]名大院・生命農、[2]大阪市大・理、[3]大阪市大院・理)
○ Mutsumi KOMEYAMA[1], Kai SAITO[2], Yoko YASUNO[3], Tetsuro SHINADA[3], Tohru YOSHIMURA[1], Hisashi HEMMI[1] ([1]Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya Univ., [2]Faculty of Science, Osaka City Univ., [3]Graduate School of Science, Osaka City Univ.)

イソプレノイドは自然界における最大の天然有機化合物群であり、現在までに 80,000 種以上が報告されている。メバロン酸（MVA）経路はイソプレノイド前駆体を合成する経路のひとつである。これまでに、真核生物や一部のバクテリアに存在する古典的 MVA 経路に加え、それとは一部異なった中間体を経由する変形経路がアーキアやバクテリアから見出されてきた。さらに我々は近年、超好熱性アーキア *Aeropyrum pernix* より、大部分のアーキアが保有していると考えられる新奇変形 MVA 経路を発見した。以降、この経路をアーキア型 MVA 経路と称する。本研究の対象であるホスホメバロン酸デヒドラターゼ（PMDh）は、このアーキア型 MVA 経路において 5-ホスホメバロン酸（MVA5P）から 5-ホスホ-*trans*-アンヒドロメバロン酸（tAHMP）を産生する脱水酵素である。

PMDh はアコニターゼスーパーファミリーに属する酵素である。同ファミリーに属する酵素の多くは鉄硫黄クラスターを活性中心に持ち、加水・脱水反応を触媒することが知られている。また、*A. pernix* 由来 PMDh（ApPMDh）に関しては、先行研究によって以下の 3 つの特徴が明らかにされている。1）大サブユニットと小サブユニットから構成される。2）触媒する反応は可逆的であり、その平衡は反応物（MVA5P）に大きく偏っている。3）おそらく鉄硫黄クラスターを有し、酸素存在下ではすぐに失活する。しかし、同酵素の詳細な性質や反応機構は不明であり、本研究ではその解明を目的とした。

本研究ではまず、大腸菌において ApPMDh の大サブユニットと小サブユニットの共発現系を構築し、菌体破砕以降の酵素精製を嫌気条件下で行うことで、安定な ApPMDh を得ることに成功した。さらに、精製 ApPMDh を高濃度の $FeCl_3$/Na_2S とインキュベートすることによって鉄硫黄クラスターの再構成を試みた。結果として、鉄硫黄クラスターに特徴的であるとされる 410 nm 付近の吸光度が大幅に上昇した。また、ApPMDh の活性確認にはこれまで放射標識基質と TLC 分析が利用されてきたが、本研究では非標識基質を用いた活性測定法を確立した。これは、ApPMDh 反応で生じた MVA5P をホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ/ピルビン酸キナーゼ/乳酸デヒドロゲナーゼによって NADH の消費量へと変換し、吸光度測定により定量するというものである。この方法で ApPMDh 活性を測定したところ、鉄硫黄クラスターの再構成を行うことで活性が約 8.5 倍上昇することが確認できた。以上の結果は、ApPMDh が鉄硫黄クラスター様の活性中心を持つことを強く示唆している。また、この活性測定法により明らかにした ApPMDh の温度依存性や熱安定性、pH 依存性などの諸性質についても報告したい。

mevalonate pathway, dehydratase, iron-sulfur cluster

講演番号：4B05a13
講演日時：3 月 28 日 12:02～ 総合学習プラザ B05 会場

Does the archaeal mevalonate pathway exist in an unculturable bacterium, *Candidatus* Promineofilum breve?

○ Riko KURIKI[1], Ryo YOSHIDA[2], Tohru YOSHIMURA[2], Hisashi HEMMI[2] ([1]School of Agriculture, Nagoya Univ., [2]Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya Univ.)

Isoprenoids form one of the largest groups of natural compounds with tens of thousands of known examples. They are a very diverse group and can be found in pharmaceuticals, industrial materials, biofuels, and fragrances.

In eukaryotes and archaea, the isoprenoid precursor isopentenyl diphosphate (IPP) is known to be biosynthesized via the mevalonate (MVA) pathway, while it is synthesized via the methylerythritol phosphate pathway in most bacteria. The MVA pathway utilizes three ATP molecules for the biosynthesis of one IPP molecule; however, a novel archaeal MVA pathway recently discovered by our group uses only two ATP molecules. This more energetically efficient MVA pathway follows the same route as the original MVA pathway until synthesizing mevalonate phosphate (MVAP) from acetyl-CoA. However, in the novel pathway, phosphomevalonate dehydratase (PMDh) dehydrates MVAP, forming *trans*-anhydromevalonate phosphate (tAHMP). It is then converted to isopentenyl phosphate by tAHMP decarboxylase (AMPD), and further phosphorylated into IPP by isopentenyl phosphate kinase.

This research focuses on the elucidation of the functions of PMDh and AMPD homologs found in *Candidatus* Promineofilum breve (P. breve), an uncultivated bacterium classified in the phylum Chloroflexi. Each homolog's *in vivo* activity was tested using a previously established system, where enzymes responsible for the archaeal MVA pathway were co-expressed with biosynthetic enzymes for lycopene, a red-colored carotenoid as a measure of productivity of isoprenoids, in the cells of *Escherichia. coli*. The PMDh homolog from P. breve was shown to be compatible with archaeal PMDh as the cells expressing the bacterial protein produced 2.4 times higher lycopene than in those lacking PMDh. The AMPD homolog from P. breve, also showed compatibility with archaeal AMPD, allowing the cells to produce 2.8 times higher lycopene than those lacking AMPD.

These results suggest that the archaeal MVA pathway is present in P. breve. For further elucidation of enzyme function, *in vitro* enzyme assays using purified proteins are currently being conducted.

Mevalonate pathway, Isoprenoids, Lycopene

発表責任者：Riko Kuriki（kuriki.riko@i.mbox.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：4B06a01
講演日時：3 月 28 日 09:30～ 総合学習プラザ B06 会場

摂食応答性骨格筋 E3 ユビキチンリガーゼ Trim7 の発現制御機構と機能解析

Regulatory and funcitonal analysis of Trim7, skeletal muscle E3 ubiquitin ligase related to feeding response

○青木 悠馬、佐々木 崇、清水 誠、山内 祥生、佐藤 隆一郎（東大院・農生科・応生化）
○Yuma AOKI, Takashi SASAKI, Makoto SHIMIZU, Yoshio YAMAUCHI, Ryuichiro SATO (Dept. of Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. of Agr. and Life Sci., Univ. of Tokyo)

【研究の背景と目的】骨格筋は生体の恒常性維持に重要な役割を果たし、骨格筋量はタンパク質合成と分解のバランスによって決定される。骨格筋の分解においてはユビキチン・プロテアソーム系が主要な役割を担い、E3 ユビキチンリガーゼは分解タンパク質の特異性を決める重要な因子として知られている。近年、我々は絶食時に骨格筋で大きく発現が減少し、再摂食によって発現が上昇する E3 ユビキチンリガーゼとして Trim7(Tripartite Motif　Containing 7)を見出した。骨格筋分解が誘導される条件下で発現が減少する興味深い E3 ユビキチンリガーゼである Trim7 に注目し、その発現制御機構および機能解析に取り組んだ。

【方法と結果】マウス由来筋管細胞 C2C12 を様々な栄養枯渇条件で培養したところ、グルコース枯渇時に Trim7 の発現が顕著に減少することが明らかとなった。また、2-Deoxy-D-glucose を用いて糖代謝を阻害したところ、同様に Trim7 の発現が減少した。これらの結果から絶食による Trim7 の発現減少は糖代謝の抑制によって引き起こされることが示唆された。続いて、Trim7 の骨格筋における機能の解析に取り組んだ。*in vivo* エレクトロポレーション法を利用してマウス前脛骨筋に Trim7 発現プラスミドを導入した結果、筋萎縮誘導転写因子 FoxO1 のタンパク質レベルの低下が認められた。しかし、FoxO1 の標的遺伝子である Atrogin1,MuRF1 などの発現減少は確認できなかった。

【考察】FoxO1 は Akt によってリン酸化されることで核内から核外へ移行し、ユビキチン・プロテアソーム系で分解されることが知られている。摂食時に高発現する Trim7 は Akt によってリン酸化された FoxO1 をユビキチン化して分解に導くことで骨格筋の異化を抑制する働きを担っている可能性がある。また、FoxO1 の標的遺伝子の発現減少が確認できなかったのは、エレクトロポレーションによる生体骨格筋への遺伝子導入効率の低さが一因であると考えられる。より導入効率の高いアデノ随伴ウイルスを用いた遺伝子導入法や遺伝子改変マウスを用いることが解決の一助になる可能性がある。今後、骨格筋 Trim7 の発現制御機構、基質タンパク質および機能の詳細を解析することで、筋萎縮の分子基盤が明らかとなり、筋萎縮の新たな予防・改善策につながることが期待される。

skeletal muscle, e3 ubiquitin ligase, atrophy

発表責任者：青木悠馬（bluetree0322@gmail.com）

講演番号：4B06a02
講演日時：3 月 28 日 09:41～ 総合学習プラザ B06 会場

骨格筋障害・萎縮における ABCA1 遺伝子発現応答の解析

An Analysis of ABCA1 Gene Expression Response in Skeletal Muscle Injury and Atrophy

○小野 敦子、清水 誠、近澤 未歩、山内 祥生、佐藤 隆一郎（東大院・農生科・応生化）
○Atsuko ONO, Makoto SHIMIZU, Miho CHIKAZAWA, Yoshio YAMAUCHI, Ryuichiro SATO (Dept. of Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. of Agr. and Life Sci., Univ. of Tokyo)

怪我や疾患、加齢などによる骨格筋の損傷や萎縮はヒトの運動機能を低下させ、日常生活での動作の障害や寝たきりの原因となり得る。このことから、骨格筋の機能低下のメカニズムの解明は超高齢社会を迎えた我が国において非常に重要である。筋障害・萎縮には酸化ストレスが関与し、酸化ストレスの抑制は筋萎縮を改善させるとの報告がある。本研究では筋障害・筋萎縮モデルマウスを用いて骨格筋機能に関する酸化ストレスシグナルの解明を目指した。

前脛骨筋に神経毒 Cardiotoxin(CTX)を投与した筋障害モデルマウス、坐骨神経の切除又は GR アゴニスト Dexamethasone(Dex)を腹腔内投与した筋萎縮モデルマウスの骨格筋を用いて遺伝子発現解析を行った。その結果、筋障害・筋萎縮により酸化ステロールをリガンドとする核内受容体 LXR の標的遺伝子の発現が上昇することを見出した。ウエスタンブロッティングによる解析の結果、両モデルでの ABCA1 のタンパク質レベルの発現増加を確認した。筋障害・筋萎縮による LXR の応答メカニズムを解析するため、LXR リガンド結合領域のレポータープラスミドと Dex を用いてプロモーターアッセイを行ったが、Dex による LXR の活性の上昇は見られなかった。Dex 腹腔内投与マウスにおいて筋萎縮マーカー転写因子の 1 つ KLF15 の遺伝子発現が上昇したことに注目し、KLF15 が LXR の標的遺伝子 ABCA1 の遺伝子発現に関与すると予想した。マウス ABCA1 の上流 500bp のプロモータープラスミドを作製し、KLF15 を過剰発現させプロモーターアッセイを行った結果、KLF15 によるプロモーター活性の上昇が見られた。ヒト、マウスのプロモーター領域を比較し、KLF15 の結合領域と思われる 3 箇所について更にプロモーターアッセイを行った。ABCA1 は骨格筋に加えマクロファージでも発現しており、筋障害に伴い骨格筋にマクロファージが浸潤することが知られている。筋障害における ABCA1 の発現応答部位を特定するため、Magnetic-Activated Cell Sorting を用い CTX 投与マウス腓腹筋を骨格筋細胞、好中球、マクロファージに分画し、各分画での mRNA の発現変動を解析した。その結果 ABCA1 の発現応答は骨格筋細胞で主に起こっていることが示された。更に LXR の骨格筋での機能を調べるため、マウス骨格筋細胞 C2C12 を用いて LXR のリガンドによる筋障害・筋萎縮抑制効果を検証した。筋線維直径の変化を測定した結果、筋障害・筋萎縮の誘導による筋線維直径の減少が LXR リガンドの添加で回復した。

以上の結果、LXR は筋障害・萎縮によるダメージを緩和することが考えられ、骨格筋機能改善の標的となることが考えられる。

muscle injury, ABCA1, LXR

発表責任者：小野敦子（atsuko-ono@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4B06a03
講演日時：3 月 28 日 09:52～ 総合学習プラザ B06 会場

ヒトおよびマウス骨格筋細胞が分泌するエクソソームの生化学的解析
Biochemical Characterisation of Exosomes Secreted from Human and Mouse Myocytes.
○須藤 優里[1]、櫻井 英俊[2]、佐藤 隆一郎[1]、山内 祥生[1]([1]東大院・農生科・応生化、[2]京大・CiRA)
○Yuri SUDO[1], Hidetoshi SAKURAI[2], Ryuichiro SATO[1], Yoshio YAMAUCHI[1] ([1]Dept. of Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. of Agr. and Life Sci., Univ. of Tokyo, [2]CiRA, Univ. of Kyoto)

【背景と目的】エクソソームは、エンドソームに由来する細胞外小胞と定義づけられた直径 50～200 nm ほどの小胞であり、多くの細胞から分泌される。様々なタンパク質や脂質、mRNA、miRNA を含み、内包物を体液などによる分解から保護して運搬することにより、細胞間・組織間の情報伝達に重要な役割を果たしている。近年、骨格筋細胞が分泌するエクソソームが筋芽細胞における筋分化を促進することや、運動時のヒトにおいて血液循環中のエクソソーム量が増加することが報告され、骨格筋由来のエクソソームが生理的に重要な役割を果たしていることが示唆されている。そこで、我々はマウス骨格筋細胞 C2C12 および京都大学 CiRA によって開発されたヒト iPS 細胞由来骨格筋細胞を用いて、骨格筋細胞が分泌するエクソソームに関する解析を行った。
【方法・結果】C2C12 筋芽細胞および C2C12 筋管細胞の培養上清より超遠心法によってエクソソームの単離を行い、電子顕微鏡で観察したところ、50～200 nm ほどの小胞が確認された。次に、単離したエクソソーム画分をウエスタンブロットに供したところ、Alix、TSG101、CD81 などのエクソソームマーカーが検出された。また、C2C12 の筋分化が進むにつれて、筋特異的に発現するタンパク質がエクソソーム画分に含まれてくることが明らかとなった。ヒト iPS 細胞由来骨格筋細胞の培養上清よりエクソソームを単離し解析を行ったところ、C2C12 筋管細胞と同様に電子顕微鏡による観察で小胞が確認され、ウエスタンブロットによってエクソソームマーカーAlix、TSG101、CD81 に加え筋特異的に発現するタンパク質が検出された。
　筋萎縮がエクソソームの分泌に及ぼす影響についてはほとんど知られていない。そこで、筋萎縮によって骨格筋細胞のエクソソーム分泌が変化するか解析を行った。C2C12 筋管細胞にグルココルチコイドレセプターの合成リガンドであるデキサメタゾンを添加することによって筋萎縮を誘導し、単離したエクソソームのタンパク量を測定した。その結果、デキサメタゾンの添加により C2C12 筋管細胞におけるエクソソームの分泌の減少が認められた。
【結論】以上の結果より、骨格筋細胞由来エクソソームには筋特異的に発現するタンパク質が含まれることが明らかとなった。また、デキサメタゾン誘導性の筋萎縮によって骨格筋細胞のエクソソーム分泌が減少することが示唆された。現在、骨格筋細胞におけるエクソソームの分泌制御機構についてより詳細な解析を行っている。

exosome, skeletal muscle, muscle atrophy

講演番号：4B06a04
講演日時：3 月 28 日 10:03～ 総合学習プラザ B06 会場

N 型糖鎖によるエクソソームの取り込み制御機構の解明

Elucidation of uptake regulation of exosomes by N-glycosylation

○磯貝 樹[1]、廣澤 幸一朗[2]、木塚 康彦[1,2,3]、鈴木 健一[1,2,3]([1]岐阜大学　応用生物科学部、[2]岐阜大学　研究推進・社会連携機構　生命の鎖統合研究センター、[3]科学技術振興機構　CREST)
○Tatsuki ISOGAI[1], Koichiro M. HIROSAWA[2], Yasuhiko KIZUKA[1,2,3], Kenichi G. N. SUZUKI[1,2,3] ([1]Gifu Univ., [2]Center for Highly Advanced Integration of Nano and Life Sciences Gifu University. (G-CHAIN), [3]JST-CREST)

動物、植物、微生物を問わず、すべての細胞の間の情報伝達の担い手として、細胞外小胞のエクソソームが注目されている。例えば、がん細胞から放出されたエクソソームが、他臓器の細胞に取り込まれた後に、がん細胞が転移しやすい環境が形成されるかもしれない、と言われている。また、食品に含まれるエクソソームが体内に入ると、体内の細胞の遺伝子発現を制御している可能性も報告されている。

エクソソームには、miRNA などが含まれていて、標的となる細胞によってエクソソームが取り込まれた後に、その細胞内でエクソソーム由来の miRNA が、遺伝子の発現を制御することが示唆されている。また、近年のオミックス研究によると、エクソソーム膜には、糖脂質のガングリオシドをはじめとしたラフト脂質が豊富であることが知られている。エクソソームと標的細胞との結合には、インテグリンと細胞外マトリックスが関与する場合が多いことが報告されていて、また、インテグリンもその糖鎖により機能制御されていることが示唆されている。しかし、生きている細胞上でどのようにエクソソームと標的細胞との結合が制御されているのか、標的細胞によりエクソソームがどの経路で取り込まれるのかなどは、ほとんど不明である。

そこで我々は、がん(PC3)細胞から放出されたエクソソームを精製し、その膜表面の糖鎖を様々な酵素処理により改変した後、インテグリンのリガンドである細胞外マトリックスへのエクソソームの結合能の変化を１粒子追跡により評価した。

酵素によりエクソソーム表面のシアル酸を除去することで、細胞外マトリックスの Fibronectin や Laminin へのエクソソームの結合量が増加した。一方、エクソソーム表面の N 型糖鎖を除去した場合には、細胞外マトリックスの種類に応じて異なる結合能の変化が見られた。また、エクソソームマーカーよって挙動が異なり、CD63 含有エクソソームの糖鎖改変により、その細胞外マトリックスへの結合能が大きく変化したが、CD81 含有エクソソームではその変化が小さいことが明らかになった。これらの結果は、１）エクソソームには subtype が存在する、２）エクソソーム膜表面の糖鎖の構造がインテグリンのリガンドである細胞外マトリックスへの結合能を制御する、ことを示唆している。本発表では、このように１粒子追跡により得られた結果を元に、エクソソームの細胞外マトリックスへの結合能の糖鎖による制御機構について議論する。

exosome, N-glycosylation, integrin

講演番号：4B06a05
講演日時：3 月 28 日 10:14～ 総合学習プラザ B06 会場

ビネキシンα/ CAP 依存的に接着斑に局在するタンパク質の単離と解析
Isolation and analysis of proteins localized to focal adhesions depending on Vinexin α / CAP
○柴原 正和[1]、阿部 雄一[2]、木村 泰久[1]、木岡 紀幸[1] ([1]京都大学大学院、[2]愛知県がんセンター)
○Masakazu SHIBAHARA[1], Yuichi ABE[2], Yasuhisa KIMURA[1], Noriyuki KIOKA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Aichi Cancer Center)

動物細胞の周囲に存在する細胞外マトリックス(ECM)の「硬さ」が細胞の分化や遊走等の細胞運命を調節することが明らかとなり、近年 ECM の硬さが注目を集めている。細胞-ECM 間接着部位に形成される接着斑は ECM の硬さを感知し(Mechano-sense)、その情報を細胞内部に伝達する(Mechano-transduce)働きがあると考えられている。接着斑を構成するタンパク質組成は ECM の硬さに応じて一部変化することが示唆されている。そのため上記の接着斑の働きを包括的に解明するためには、細胞から接着斑画分を単離し、それらを網羅的に分析することが有効である。SORBS ファミリータンパク質のビネキシンαや CAP は接着斑タンパク質の一種である。これらのタンパク質は別の接着斑タンパク質ビンキュリンと相互作用することで ECM の Mechano-sense に関与している。本研究では SORBS ファミリータンパク質を発現抑制したマウス胎児線維芽細胞にそれぞれビネキシンα、CAP を入れ戻した細胞を用いてビネキシンα、CAP 依存的に接着斑に局在し、それらと協調して、あるいはその下流で Mechano-sense/transduce に関与するタンパク質を同定することを目的とした。

当研究室で開発した超音波を利用した接着斑単離法で接着斑画分を取得し、LC-MS/MS を用いた質量分析法によって単離した接着斑画分に含まれるタンパク質を同定した。ECM タンパク質のフィブロネクチンでコートしたプレート上に接着させた細胞に低張液処理を行った。その後超音波処理を行い、細胞から細胞質, 細胞膜, 細胞小器官等を除去し、残留した画分を接着斑画分として単離した。単離した画分を複数サンプルの同時解析を可能とする TMT 法を用いて質量分析で定量的に評価した。

接着斑画分の単離をウエスタン法で確認した。その結果超音波処理した画分から細胞質(ERK2), ゴルジ体(GM130), 小胞体(KDEL)のシグナルは検出されなかったが、接着斑(パキシリン)のシグナルは検出された。この結果から超音波法によって接着斑を含む画分が単離されたことが確認できた。この画分を質量分析した結果、1337 個のタンパク質が同定・定量できた。このうち 840 個は Horton ら(Nat Cell Biol. 2015;17:1577-1587)が定義したメタアドヒソームに含まれていた。さらに Horton らが定義した 60 個のコンセンサスアドヒソームのうち 49 個が今回定量できたタンパク質に含まれていた。以上から本実験によりインテグリンを起点とする相互作用ネットワークが解析できたことが確認できた。また、ビネキシンαと CAP の発現により接着斑画分に共通して含まれる量が有意に($p<0.05$)変化したタンパク質が 25 個見つかった。これらのタンパク質には、アクチン関連タンパク質も複数含まれていた。今後はこれらのタンパク質の役割について検討していく予定である。

Focal adhesion, Mechanobiology, Proteomics

講演番号：4B06a06
講演日時：3 月 28 日 10:35～ 総合学習プラザ B06 会場

低温処理がマウス細胞に及ぼす影響とベージュ脂肪細胞への分化

Effects of exposure at low temperature on cell defense and differentiation to beige adipocytes in mouse cells

○塩見 尚史、冨士原 由貴（神戸女学院人間科学）
○Naofumi Shiomi, Yuki Fujiwara (Kobe College)

[目的・方法]

褐色脂肪細胞あるいはベージュ脂肪細胞は糖や脂肪の分解が非常に早い細胞で、これらの細胞への分化誘導が 2 型糖尿病の有効な治療手段として期待されている。その分化誘導の手段のひとつが低温処理で、低温環境下では脳からノルアドレナリンが分泌され、前駆褐色脂肪細胞から褐色脂肪細胞への分化、あるいは白色脂肪細胞からベージュ脂肪細胞の分化が報告されている。しかし、その詳細はよくわかっておらず、低温刺激が細胞に直接及ぼす影響については、ほとんど明らかにされていない。そこで、本研究では、筋芽細胞と白色脂肪細胞に低温刺激を与えた場合の耐性機構、および白色脂肪細胞からベージュ脂肪細胞への分化について調べた。

細胞はマウス筋芽細胞 C2C12 とマウス白色脂肪細胞 3T3-L24 を用いた。37℃で培養した細胞を 16℃あるいは 4℃の培地と交換してその温度で 1 時間放置することで低温刺激を与えた。その後迅速にmRNA を精製し、リアルタイム PCR により遺伝子発現量を調べた。また、褐色脂肪細胞（あるいはベージュ脂肪細胞）への分化は、16℃あるいは 4℃で培養する操作を 5 日以上毎日行う長期刺激を与え、その脂肪蓄積量と UCP1 の発現量をオイルレッド法と抗体免疫染色により調べた。

[結果及び考察]

筋芽細胞 C2C12 に 14℃と 4℃で低温刺激を与えた場合、褐色脂肪細胞のマーカー遺伝子の PRDM16、UCP1、Cox8b、CDK5、CIDEA の発現量は 16℃で 10 倍以上、4℃でも 8 倍近く高まった。また、糖代謝関連遺伝子の発現が高まり、脂肪分解の遺伝子が抑制された。しかし、5 日以上毎日寒冷刺激を与える長期刺激を行っても UCP1 の発現が見られず、褐色脂肪細胞へ分化しなかった。一方、白色脂肪細胞では、褐色脂肪細胞のマーカー遺伝子の発現量は 100 倍近く高まり、同様に、糖代謝関連遺伝子、PPAR,C/EBP といった転写因子の発現も高まった。5 日以上毎日行う長期刺激を与えた場合、細胞は褐色がかり、ミトコンドリア量が増えると同時に UCP1 の発現が見られた。このことから、長期の低温刺激により白色脂肪細胞はブライト脂肪細胞へ分化できると考えられる。また低温刺激をやめると遺伝子の発現量は低下し、UCP1 の発現も低下した。　以上のように、低温刺激が与えられた場合、細胞は極めて迅速に身を守ることが必要であり、ノルアドレナリン受容体を介せずに自ら熱を発生させる機構が存在することを新たに見いだした。

beige adipocytes, low temperature, UCP1

発表責任者：塩見尚史（n-shiomi@mail.kobe-c.ac.jp）

講演番号：4B06a07
講演日時：3 月 28 日 10:46～ 総合学習プラザ B06 会場

ショウジュウバエにおけるミトコンドリアへの新規な脂肪酸輸送機構の発見

A novel mechanism for the fatty acid transport into mitochondria in *Drosophila melanogaster*

○長尾 耕治郎、石井 隆太、大平 直義、葭原 啓太、小西 翔、従二 直人、梅田 眞郷（京都大工）
○Kohjiro NAGAO, Ryuta ISHII, Naoyoshi OHIRA, Keita YOSHIHARA, Sho KONISHI, Naoto JUNI, Masato UMEDA (Kyoto Univ.)

細胞内においてトリアシルグリセロール(TAG)として貯蔵されている脂肪酸は、エネルギー産生が必要な時に動員され、ミトコンドリアにてβ酸化を受ける。しかし、長鎖脂肪酸から形成されるアシル CoA はそのままの形ではミトコンドリア内膜を通過することができない。このため、アシル CoA はカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ 1（CPT1）によりアシルカルニチンへと変換されることにより、β酸化の場であるミトコンドリアマトリクスへと輸送される。したがって、CPT1 はミトコンドリアマトリクスへの長鎖脂肪酸の輸送のために必須の酵素であると考えられている。しかし、ショウジョウバエでは CPT1 を欠損してもエネルギー代謝に顕著な異常を生じないことを我々は見出した。そこで、ショウジョウバエには CPT1 を介さない脂肪酸輸送機構が存在すると考え、分子遺伝学的探索を行った。CPT1 発現抑制個体での飢餓時の TAG 消費量を指標とした探索実験の結果、脂質代謝における機能が未知の Solute carrier（SLC）25 輸送体を候補遺伝子として見出し、この輸送体を SLC25-FAT と命名した。筋肉特異的な SLC25-FAT の発現抑制により、胸部および全身における通常飼育時の TAG 含量が増加し、24 時間飢餓時の TAG の消費量が減少した。質量分析装置を用いた TAG 分子種の分析から、SLC25-FAT は CPT1 に依存した経路よりも幅広い鎖長の脂肪酸の代謝に関わることを明らかにした。また、SLC25-FAT と CPT1 をそれぞれ発現抑制したショウジョウバエ個体では飢餓耐性が増強されたが、両者の発現を同時に抑制することにより飢餓耐性は低下した。これらの結果から、ショウジュウバエ個体において、SLC25-FAT と CPT1 は互いに独立した脂肪酸輸送機構に関わると考えられた。そこで、SLC25-FAT の脂肪酸輸送における役割を明らかにするために、培養細胞を用いた解析を行った。共焦点顕微鏡観察およびスクロース密度勾配遠心を用いたミトコンドリア外膜と内膜の分離実験により、SLC25-FAT がミトコンドリア内膜に局在することが明らかになった。さらに、単離ミトコンドリアへの蛍光標識脂肪酸 BODIPY-C12 の取り込み量を測定することにより、脂肪酸輸送活性を評価した。その結果、SLC25-FAT はアシル CoA ではなく遊離脂肪酸のミトコンドリアへの輸送に CPT1 非依存的に関わること、そしてその輸送にはミトコンドリアの膜電位が必要であることが示された。本研究により、ショウジョウバエには CPT1 を介さない新規な脂肪酸輸送機構が存在すること、そしてその機構においてミトコンドリア内膜に局在する SLC25-FAT が重要な役割を果たすことが明らかになった。

fatty acid, triacylglycerol, SLC transporter

発表責任者：長尾耕治郎（nagao@sbchem.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4B06a08
講演日時：3 月 28 日 10:57～ 総合学習プラザ B06 会場

ミトコンドリアマトリクスに局在するプロテアーゼ Lon は mtDNA の遺伝子発現を制御する
Lon protease regulates mtDNA gene expression

○松島 雄一、高橋 和也、瀬戸山 大樹、康 東天（九州大医）
○Yuichi Matsushima, Kazuya Takahashi, Daiki Setoyama, Dongchon Kang (Kyusyu Univ.)

ミトコンドリアマトリクスには Lon、ClpXP、m-AAA の 3 種のプロテアーゼが存在し、これらはバクテリアからヒトまで広く保存されている。Lon、ClpXP はミトコンドリアマトリクスに局在し、m-AAA はミトコンドリア内膜の膜タンパク質でマトリクス側にプロテアーゼ活性を持つ。これらたった 3 種のプロテアーゼがミトコンドリアマトリクスタンパク質を分解することでタンパク質の蓄積などを防ぎ、ミトコンドリア機能を正常に保っていると考えられている。ミトコンドリアマトリクスに存在するタンパク質の多くは Lon、ClpXP、m-AAA のたった 3 種のプロテアーゼによって非特異的に分解されると考えられている。

Lon、ClpXP、m-AAA をノックダウンした HeLa 細胞を解析したところ、Lon をノックダウンした細胞においてのみ、不溶化したミトコンドリアマトリクス局在タンパク質(凝集タンパク質)の蓄積が確認され、同時にそれらのタンパク質の可溶性が減少した。これら可溶性が減少したタンパク質にはミトコンドリアリボソームタンパク質、mtDNA 転写因子/複製因子、mtRNA プロセシング因子など mtDNA の遺伝子発現制御に関わるタンパク質を多く含んでいた。Lon をノックダウンした細胞では実際に mtDNA にコードされている呼吸鎖複合体構成タンパク質が激減していたことから、これら可溶性が減少した遺伝子発現関連因子が関与する遺伝子発現の各ステップの解析を行ったところ、Lon ノックダウン細胞ではそれらの機能が抑制されていること確認した。近年 Lon が呼吸鎖複合体活性の減少を原因とするミトコンドリア病の原因遺伝子の一つであると報告されており、このことからも Lon は mtDNA 遺伝子発現関連因子の可溶化を制御することで mtDNA の遺伝子発現の恒常性に寄与していると考えられた。

mitochondria, mitochondrial DNA, mtDNA

発表責任者：松島雄一（matsush5@cclm.med.kyushu-u.ac.jp）

講演番号:4B06a09
講演日時:3 月 28 日 11:08～ 総合学習プラザ B06 会場

GPI アンカー修飾がエクト型亜鉛要求性酵素の分解に与える影響の解析

Biochemical analysis of the effects of GPI-anchor attachment on zinc ectoenzymes degradation

○我妻 拓実[1]、神戸 大朋[2]([1]京都大農、[2]京都大生命)
○Takumi WAGATSUMA[1], Taiho KAMBE[2] ([1]Depart. of Agriculture, Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. of Biostudies, Kyoto Univ.)

(目的)生体内において亜鉛は必須微量金属元素として幅広い機能をもち、中でも酵素の補因子としての機能は重要である。活性中心に亜鉛を配位する亜鉛要求性酵素は多様なファミリーに分類され、生体内で幅広い生理機能を果たしている。これら亜鉛要求性酵素のうち、細胞外や細胞小器官内腔において機能するエクト型亜鉛要求性酵素は小胞体やゴルジ体をはじめとする早期分泌経路において亜鉛を獲得することがその活性化と安定化に不可欠であることが明らかにされており、早期分泌経路に亜鉛を供給する亜鉛トランスポーターとして ZNT5-ZNT6 ヘテロダイマーと ZNT7 ホモダイマーは重要な働きを果たすことも重ねて明らかになっている。当研究室の報告により、ヒト慢性骨髄性白血病細胞由来である HAP1 細胞において両 ZNT 複合体を欠損させた株では、組織非特異型アルカリホスファターゼ(TNAP ; Tissue Nonspecific Alkaline Phosphatase)は活性を持たず特異的に分解を受けることが明らかにされているが、これらのタンパク質の分解過程における分子機構に関しては明らかになっていない。そこで、本研究では膜結合型の亜鉛要求性酵素に着目し、膜結合様式の相違がタンパク質の分解制御に与える影響に関して解析を行った。

(方法) TNAP と胎盤特異型アルカリホスファターゼである PLAP(Placental Alkaline Phosphatase)はいずれも C 末端部位の GPI アンカーを介して細胞膜に結合する。GPI アンカー部位を持たず膜結合領域が存在しない分泌型 PLAP とウイルス由来の膜結合部位を持つ PLAP キメラ体を作製し、これらのタンパク質を発現させたヒト由来培養細胞を用いて、それらのタンパク質の ZNT 複合体欠損株における挙動を解析した。さらに早期分泌経路における GPI アンカー修飾に必須の働きを果たし20種類以上存在する PIG 酵素群のうち、両 ZNT 複合体を欠損させた HAP1 において、PIG-A または PIG-T を標的として欠損株を作製し、Western Blotting により TNAP タンパク質の挙動を解析した。

(結果・考察) PLAP 変異体タンパク質の ZNT 複合体欠損株における挙動を解析したところ、GPI アンカーの存在が PLAP タンパク質の分解に一部影響を与えている可能性が示唆された。また、両 ZNT 複合体を欠損させた HAP1 においては TNAP タンパク質は特異的に分解を受けるが、両 ZNT 複合体と PIG-A を三重欠損させた株では TNAP タンパク質は一部分解を免れていた。一方で、ZNT 複合体と PIG-T を三重欠損させた株では TNAP タンパク質は特異的に分解された。早期分泌経路における GPI アンカー修飾に重要な働きを果たし20種類以上存在する PIG 酵素群のうち、PIG-A はタンパク質への GPI アンカー修飾における初期反応を触媒し、PIG-T は終期の反応を触媒する酵素であることから、これらの GPI アンカー修飾の相違が両 ZNT 複合体欠損株における TNAP タンパク質の分解制御に一部関与している可能性が示唆された。

enzymes, zinc transporter, GPI-anchor

講演番号：4B06a10
講演日時：3 月 28 日 11:19～ 総合学習プラザ B06 会場

ヒト細胞における CD73 の成熟および活性化は、亜鉛トランスポーターによって制御される
CD73 maturation and activation in human cells is regulated by zinc transporters
○森野 菜穂[1]、神戸 大朋[2] ([1]京都大農、[2]京都大生命)
○ Naho MORINO[1], Taiho KAMBE[2] ([1]Depart. of Agriculture, kyoto Univ., [2]Grad. Sch. of Biostudies, Kyoto Univ.)

【目的】
炎症やアレルギー応答をはじめとする様々な生体反応を引き起こすシグナルとして、ATP やその代謝産物による細胞間情報伝達系であるプリン作動性シグナルが知られる。例えば、ATP や ADP は細胞外で免疫系の活性化などに関わる炎症シグナルを活性化するが、一方でその分解産物であるアデノシンはこれに拮抗する抗炎症シグナルの伝達に関与する。GPI アンカー型膜酵素である CD73 は、唯一の 5'-ectonucleotidase であり、AMP の加水分解による細胞外アデノシン産生の律速酵素であるため、抗炎症シグナルと密接に関係していると考えられている。CD73 は、活性中心に亜鉛イオンを配位し、亜鉛依存的な活性を示す亜鉛要求性酵素であることが知られている。ニワトリ DT40 細胞の CD73 過剰発現株を用いた先行研究では、亜鉛欠乏によって CD73 の酵素活性に著しい低下が認められることに加え、ZNT5、ZNT6、ZNT7 の欠損により酵素活性が消失することも確認されている。ZNT5、ZNT6、ZNT7 は小胞体やゴルジ体といった初期分泌経路内腔へ亜鉛を輸送する機能を担う亜鉛トランスポーターであり、ZNT5 と ZNT6 はヘテロ二量体を、ZNT7 はホモ二量体を形成して機能していることが知られている。このことから早期分泌経路において、これらの亜鉛トランスポーターがエクト型亜鉛要求性酵素である CD73 の活性化に重要な役割を果たすことが示唆されたがその詳細については不明であった。本研究では、CD73 を高発現するヒト膵ガン細胞 MIA Paca2 を用いて、CD73 の亜鉛を介した成熟および活性化過程について実際に解析を行った。

【方法】
CRISPR-Cas9 システムを用いてヒト MIA Paca2 細胞の ZNT5,ZNT7 二重欠損株を作成し、加えてこの株に ZNT5 および ZNT7 を再発現した株を樹立した。これらの細胞について、比色定量および HPLC 解析による酵素活性の測定、ウエスタンブロッティングによるタンパク質の検出、免疫染色およびフローサイトメトリーによる定量的な膜局在の評価等を行った。

【結果と考察】
ZNT5、ZNT7 二重欠損株において、CD73 活性が著しく低下するとともに、細胞膜上の CD73 の発現が消失することが明らかになり、ここに亜鉛を過剰に投与しても回復はみられなかった。また、欠損株に ZNT5 および ZNT7 を再発現させた株においては、酵素活性および細胞膜上の発現が回復した。
以上の解析結果より、CD73 が正しく機能するには ZNT5、ZNT6、ZNT7 を介して亜鉛が供給されることが必要であることが明らかとなった。このことから、これらの亜鉛トランスポーターは、CD73 の成熟および活性化の制御を介して、炎症やアレルギー応答をはじめとする様々な症状に深く関与していることが示唆された。

zinc, inflammation, CD73

講演番号：4B06a11
講演日時：3 月 28 日 11:40～ 総合学習プラザ B06 会場

オルソログ間のキメラタンパク質を用いた抗ガン剤トランスポーターMRP1(ABCC1)の機能解析

Search for regions for substrate recognition of multi-drug transporter MRP1 (ABCC1) utilizing chimeric proteins between bovine and human orthologs.

○田口 善智、横田 瑞希、有賀 佳那（近畿大生物理工　遺伝子工）
○Yoshitomo TAGUCHI, Mizuki YOKOTA, Kana ARUGA (Dept. Gene. Engi., Kindai Univ.)

【目的】MRP1(ABCC1)は、よく保存された ATP 結合領域を共通して有する ABC トランスポーターの一つで、様々な抗ガン剤を細胞内から外へ輸送する。ウシより単離された MRP1 とヒト由来の MRP1 では、アミノ酸レベルでの同一性は９１%あるにもかかわらず、両者の基質特異性は明確に異なる。このタンパク質の基質を認識する部位を同定する目的で、ヒト MRP1 の一部をウシ MRP1 と置換、またはウシ MRP1 の一部をヒト MRP1 と置換した複数種のキメラ MRP1 を作製し、その基質特異性を野生型のヒトおよびウシの MRP1 と比較することによって、ヒトとウシの MRP1 における基質特異性の違いの原因になっている部位を明らかにしようと試みた。

【方法】膜タンパク質である MRP1 は 17 の膜貫通ヘリックスと 2 つの ATP 結合部位をもつ。N 末にある 5 つの膜貫通ヘリックスからなる領域(TMD0)、TMD0 に続く細胞内領域(L0)、L0 に続く 6 つの膜貫通ヘリックスからなる領域(TMD1)と N 末側にある ATP 結合領域(NBD1)を合わせた領域(TMD1+NBD1)、NBD1 に続く 6 つの膜貫通ヘリックスからなる領域(TMD2)、および TMD2 に続く C 末側にある結合領域(NBD2)を、それぞれヒトからウシ、またはウシからヒトに置換したキメラ MRP1 の発現ベクターを構築した。TMD0 と TMD2 はそれぞれをさらに分割して置換したキメラも作製した。構築されたキメラ MRP1 の発現ベクターをヒト由来の培養細胞(HEK293)に導入し、それぞれの安定発現株を得た。キメラおよび野生型の MRP1 を安定発現する細胞の 5 種類の抗ガン剤に対する耐性度のパターンを調べた。

【結果・考察】TMD0 および TMD2 の一部を置換すると、抗ガン剤に対する耐性度のパターンが変化し、基質特異性が変化することが示唆された。一方、それ以外の部位をヒトからウシに置換しても、抗ガン剤に対する耐性度のパターンは大きく変化しなかった。ウシとヒトの MRP1 の基質特異性の違いは、TMD0 および TMD2 の一部の領域に原因があり、これらの領域が複数種の抗ガン剤の基質輸送に関与していることが示唆された。

ABC transporter, MRP1, ortholog

発表責任者：田口善智（taguchi@waka.kindai.ac.jp）

講演番号：4B06a12
講演日時：3 月 28 日 11:51～ 総合学習プラザ B06 会場

コレステロールがヒト多剤輸送体 MDR1 の基質輸送を促進する機構の解析

The Effect of Cholesterol on Substrate Transport of MDR1

○岩村 紗花[1]、木岡 紀幸[1]、植田 和光[2]、木村 泰久[1] ([1]京大農、[2]京大 iCeMS)
○Sahana IWAMURA[1], Noriyuki KIOKA[1], Kazumitsu UEDA[2], Yasuhisa KIMURA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]iCeMS)

【背景・目的】

MDR1(多剤輸送体、ABCB1)は、ABC タンパク質ファミリーに属する多剤輸送体であり、ATP の結合・加水分解によるエネルギーを利用して、構造に類似性の無い様々な脂溶性化合物を細胞外へと排出する。MDR1 は、脳、肝臓、腎臓や小腸に発現し、これらの臓器や生体を有害な化合物から保護している。先行研究では、MDR1 の基質依存的な ATP 加水分解活性が脂質二重膜に含まれるコレステロールによって促進されることが報告された。この活性促進には輸送機質に対する K_M の減少(親和性の上昇)と V_{MAX} の増加(最大活性の上昇)が関与している。K_M の減少に関しては分子量が小さい基質でのみ見られたことから、小さな基質が輸送される場合にコレステロールが基質結合部位を埋め合わせるモデルが提唱された。一方で、V_{MAX} が増加するメカニズムは未だ不明である。そこで、本研究ではコレステロールによって V_{MAX} が増加するメカニズムを明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

ヒト培養細胞株である Free Style293 細胞にて MDR1 を一過的に発現させ、抗 FLAG 抗体を用いたアフィニティー精製により、高純度かつ高品質な MDR1 精製標品を得た。次に、この精製標品を DOPC(±20%(w/w)コレステロール)を組成とする人工脂質二重膜(リポソーム)に再構成し、ATP 加水分解活性を測定した。その結果、基質依存的な活性がコレステロールの添加によって有意に増加することが確認された。また、先行研究では似た構造を持つ基質 rhodamine B と rhodamine 123 依存的な ATP 加水分解活性において、コレステロールによる V_{MAX} の増加が大きく異なることが明らかとされていた。そこで、様々な rhodamine 構造類縁体を基質として、酵素化学的解析を行なったところ、rhodamine のベンゼン環に存在するカルボキシ基のエステル化の有無が、コレステロールによる V_{MAX} 誘導に影響を及ぼすことが示唆された。さらに、rhodamine 構造類縁体以外の複数の基質についても酵素化学的解析を行ったところ、コレステロール非存在下の V_{MAX} とコレステロールによる V_{MAX} 誘導には負の相関があることが明らかとなり、「輸送速度の遅い基質の場合には、コレステロールが輸送速度を大きく増加させる」というメカニズムが示唆された。現在、コレステロールによる V_{MAX} 誘導のより詳細なメカニズムを調べるために、温度依存的な ATP 加水分解活性を測定し、熱力学的な解析を行なっている。

ABC protein, multidrug resistance, cholesterol

講演番号：4B06a13
講演日時：3 月 28 日 12:02～ 総合学習プラザ B06 会場

HDL 形成初期反応解析のための再構成系の構築
Establishment of an in vitro reconstitution system for nascent HDL formation.
○坂田 和樹[1]、木岡 紀幸[1]、植田 和光[2]、木村 泰久[1]（[1]京大院農、[2]京大 iCeMS）
○Kazuki SAKATA[1], Noriyuki KIOKA[1], Kazumitsu UEDA[2], Yasuhisa KIMURA[1]（[1]Kyoto Univ., [2]iCeMS Kyoto Univ.）

＜背景・目的＞

高密度リポタンパク質（HDL）は末梢組織中の過剰なコレステロールと脂質を肝臓へ運ぶ唯一の経路であり、血中 HDL 濃度は動脈硬化のリスクと逆相関するため、HDL は善玉コレステロールとして広く知られている。HDL は ABCA1 という脂質輸送体が血中のアポリポタンパク質 A-I（apoA-I）に細胞内のコレステロールと脂質を受け渡すことによって形成が開始されるが、その詳細な機構は明らかにされていない。ABCA1 による HDL 形成を詳細に理解するためには精製タンパク質を用いて HDL 形成反応を試験管内で解析する技術の開発が必要不可欠である。膜タンパク質の機能解析手法の一つとして、人工脂質二重膜であるリポソームを用いた実験系が汎用的に用いられている。しかし、SUV（small unilamellar vesicle）などの粒径が小さいリポソームは内部に十分量の apoA-I を封入できず、*in vitro* における HDL 形成初期反応を再現できない。そこで、細胞ほどの大きさを持つ巨大リポソーム（GUV）に ABCA1 を再構成し、GUV 内部で初期 HDL を形成させる実験系の構築を目的とした。

＜方法・結果＞

SUV などの小粒径リポソームに適した再構成手法では ABCA1 が凝集し、GUV に再構成されなかった。膜タンパク質の凝集を防ぐには界面活性剤による保護が必要であるが、高濃度の界面活性剤は GUV の崩壊を招く。そこで、臨界ミセル濃度が非常に低い界面活性剤を用いて ABCA1 を精製し、界面活性剤を含まない溶液中でも活性を保持できる条件を確立した。このように精製した EGFP 融合 ABCA1 と蛍光標識 apoA-I 封入 GUV を混合し、共焦点顕微鏡観察によって ABCA1 の GUV 再構成を評価した。しかし、一般的に用いられているフォスファチジルコリンのみからなる GUV では ABCA1 を再構成できなかった。そこで、ABCA1 の再構成に適した脂質組成の検討を行った。その結果、脳由来極性脂質からなる GUV に ABCA1 を再構成できることが明らかとなった。現在は GUV 内で形成される初期 HDL を可視化する方法の検討を行っている。本手法は *in vitro* における HDL 形成初期反応のプラットフォームとなるだけでなく、GUV を用いた様々な輸送体の機能解析に応用可能であると期待できる。

HDL, GUV, ABCA1

講演番号：4B07a01
講演日時：3 月 28 日 09:30～ 総合学習プラザ B07 会場

組織切片を用いたエピゲノム解析
Development of epigenome analysis using tissue-section
○原田 哲仁[1]、前原 一満[1]、田中 かおり[1]、半田 哲也[2]、木村 宏[2]、大川 恭行[1]（[1]九州大生医、[2]東工大科学技術創成）
○Akihito HARADA[1], Kazumitsu MAEHARA[1], Kaori TANAKA[1], Tetsuya HANDA[2], Hiroshi KIMURA[2], Yasuyuki OHKAWA[1]（[1]Kyushu Univ., [2]Tokyo Institute of Technology）

ChIP-seq 技術はゲノムワイドに結合した転写因子やヒストン修飾を同定するための標準的なエピゲノム解析技術である一方で、技術的な課題も存在する。一つ目は、多数の細胞の要求性(>10 million)である。これは免疫沈降の工程そのものが低効率であることに由来する。この制限により、細胞の確保が難しい希少な細胞集団や微量組織のような貴重なサンプルを用いた ChIP-seq 法の適用が限られてしまっている。二つ目の技術的な課題は、組織の ChIP-seq は組織をホモジナイズして免疫沈降するため、アウトプットとしての情報が平均化されるため空間位置情報を失ってしまうことである。それゆえ、病理学的な変化や heterogeneity を評価することが困難である。最近、我々は、ChIP-seq における細胞数の制限と空間位置情報の担保という課題を同時に解決するエピゲノム情報の取得方法として Chromatin Integration Labeling (ChIL)を開発した。本法は、免疫組織化学法を基にしており免疫沈降に依存しないため、原理的に組織切片を用いたエピゲノム解析が可能である。本発表では、ChIL 法の概要と組織を用いたエピゲノム解析例について報告したい。

epigenome, epigenetics, next-generation sequencing

講演番号：4B07a02
講演日時：3 月 28 日 09:41～ 総合学習プラザ B07 会場

カニクイザルにおけるキチナーゼ遺伝子発現解析：マウスおよびヒトとの比較

Gene expression analysis of chitinases in crab-eating monkey: Comparison with mouse and human

○上原 麻衣子、田畑 絵理、小山 文隆（工学院大先進工）
○Maiko UEHARA, Eri TABATA, Fumitaka OYAMA (Kogakuin Univ.)

カニクイザルは非ヒト霊長類モデルとしてよく利用される動物の１つである。カニクイザル、マウス、ヒトなどのほ乳類は、キチンとその合成酵素を有していないが、キチンを分解する２種類のキチナーゼ、acidic chitinase (CHIA) と chitotriosidase (CHIT1) を発現している。CHIA はアレルギー性喘息マウスの肺において多量に発現することが知られており、最近では、胃における消化酵素や、気道における肺機能保持としての役割も報告されている。CHIT1 はゴーシェ病患者の血漿中で酵素量が著しく上昇することが知られている。これらのことから、両キチナーゼは生体内において、いくつかの重要な役割を果たしているとされている。私たちは複数遺伝子を同じスケールで定量できる定量リアルタイム PCR システムを用いて、健常なカニクイザルの主要組織における両キチナーゼおよび対象遺伝子 (GAPDH、Pepsinogen C) の mRNA の発現レベルを解析し、マウスおよびヒトと比較した。カニクイザルにおいて、CHIA は胃、CHIT1 は肺で、最も高く発現しており、各組織における主要転写物であった。マウスとヒトと比較した場合にも、CHIA はカニクイザルの胃で、CHIT1 はカニクイザルの肺で大量に発現していることが明らかになった。次に、私たちは、タンパク質レベルでの両キチナーゼの発現量を明らかにするために、マウス、カニクイザル、ヒトの胃および肺抽出液中のキチナーゼ活性を測定した。カニクイザルの胃抽出液からは、pH 2.0、pH 5.0 条件下で強力なキチナーゼ活性が検出された。カニクイザルの肺抽出液は、pH 5.0 においてキチナーゼ活性が高かった。遺伝子発現解析における、胃および肺の各遺伝子 mRNA レベルの結果から、カニクイザルの胃抽出液のキチナーゼ活性には CHIA、肺抽出液のキチナーゼ活性には CHIT1 の活性が大きく影響していると考えられる。これらの結果から, カニクイザルの CHIA と CHIT1 は強いキチナーゼ活性を有していることが示唆された。

crab-eating monkey, chitinase, gene expression analysis

講演番号：4B07a03
講演日時：3 月 28 日 09:52～ 総合学習プラザ B07 会場

場所嗜好性課題を用いた海馬神経新生エンハンサーによるニコチン依存性薬物記憶忘却の促進

Hippocampal neurogenesis enhancer induce forgetting of nicotine addiction memory

○南 朱夏[1]、喜田 聡[1,2]([1]東京農業大学大学院、[2]東京大学大学院)
○Ayaka MINAMI[1], SATOSHI KIDA[1,2] ([1]Dep. of Bioscience, Tokyo Univ. of Agriculture, [2]Dep. of Applied Biological Chem, Univ. of Tokyo)

薬物依存症は薬物による快情動記憶を原因とする疾患であり、大きな社会問題である。しかし、薬物依存の治療の主流は未だ認知行動療法であり、薬物依存の性状に基づく改善方法は開発されていない。条件づけ場所嗜好性課題は、薬物摂取による快感と文脈（場所）の関連づけ、すなわち、薬物記憶を形成させる薬物依存性モデルである。一方、心的外傷後ストレス障害（PTSD）はトラウマ記憶を原因とする疾患である。我々のグループでは、海馬神経新生エンハンサーによる記憶忘却効果を利用してトラウマ記憶を忘却することで PTSD を改善する方法を提言し、マウスを用いて有用性を実証し、臨床試験を行なっている（elife 2016, Psychopharmacology 2018, Mol Brain 2019)。以上の背景から、新たな薬物依存症治療法の開発を目的として、海馬神経新生エンハンサーによる忘却効果を利用して、マウスにおける薬物記憶の忘却誘導を試みた。海馬神経新生エンハンサーとして NMDA 型受容体非競合的阻害剤かつ認知症治療薬であるメマンチン(MEM)、また、薬物依存モデルとしてニコチン誘導性の条件づけ場所嗜好性課題を用いた。黒い壁に囲まれた黒箱と白い壁に囲まれた白箱が連結した解析装置内をマウスに 1 日 20 分間自由に探索させて、場所に馴化させる学習を 4 日間行った。5 日目から、箱の間に仕切りを入れて往来をできなくした状態で、ニコチン（0.3 mg/kg）投与後 20 分間白箱に滞在させ、この 6 時間後に溶媒を投与し、その後 20 分間黒箱に滞在させた。この条件づけを 5 日間行った（ニコチン群)。一方、対照群には溶媒のみを投与した（トレーニング)。10 日目に仕切りを取り除いた状態でマウスを解析装置に入れ、黒箱と白箱における滞在時間を測定した（テスト)。その結果、ニコチン群では白箱に滞在した時間が対照群よりも有意に長くなり、ニコチン依存性場所嗜好性記憶が認められた。その後、MEM (50 mg/kg) を 1 週間毎に計 4 回腹腔内投与し、MEM 投与によるニコチン依存性記憶の忘却効果を解析した。MEM 処置後に再度テストを行った結果、MEM を投与されたニコチン群では、溶媒を投与されたニコチン群よりも白箱に滞在した時間が有意に短くなり、ニコチン依存性記憶の忘却が認められた。また、MEM 投与 2 日後に BrdU (50 mg/kg) を投与しておき、行動解析後に免疫組織染色を行った結果、MEM 投与による BrdU 陽性細胞数の顕著な増加が観察され、MEM 投与による海馬神経新生促進が確認された。以上の結果から、神経新生エンハンサーによる忘却効果により薬物記憶の忘却が促進されることが示唆され、新たな視点からの薬物依存症改善方法開発の可能性が示された。

Conditioned Place Pleference, Hippocampal neurogenesis enhancer, addiction memory

講演番号：4B07a04
講演日時：3 月 28 日 10:03～ 総合学習プラザ B07 会場

食餌性必須栄養素欠乏による海馬における脳内炎症と神経変性及び海馬依存性記憶障害の関連性の解析

Analysis of the relationship between neural inflammation and neurodegeneration in the hippocampus and hippocampal-dependent memory impairment due to dietary essential nutrient deficiency

○辻 竜平[1,2]、宮原 瑞希[1]、芹田 龍郎[1]、喜田 聡[1,2]([1]東京農業大学院・農・バイオ、[2]東京大学大学院・農学生命科・応用生命化学)
○Ryuhei TSUJI[1,2], Mizuki MIYAHARA[1], Tatsurou SERITA[1], Satoshi KIDA[1,2] ([1]Department of Bioscience, Tokyo University of Agriculture, [2]Graduate School of Agriculture and Life Sciences, The University of Tokyo)

ビタミン、ミネラル、必須アミノ酸など必須栄養素の摂取不足は様々な脳疾患の環境要因となることが示唆されている。ビタミン B1（B1）欠乏は不可逆的な記憶障害を病態とするウェルニッケ・コルサコフ症候群を引き起こすことが知られているため、我々は B1 欠乏による記憶障害の発症メカニズムの解析を進めてきた。まず、B1 欠乏を経験したマウス(B1 欠乏回復マウス)では不可逆的な海馬依存性記憶障害と海馬ニューロンの欠落と樹状突起スパイン密度の減少が観察されることを示し、B1 欠乏による記憶障害の原因が海馬の変性であることを初めて示唆した(Inaba et al.,2016)。一方、学習と記憶に対する食餌性マグネシウム(Mg)欠乏の影響を解析した結果、Mg 欠乏により海馬依存性記憶能力の障害が観察されるものの、B1 欠乏とは対照的に樹状突起スパイン密度の減少は観察されないことが明らかとなった(Serita et al.,2018)。以上の背景から、本研究では、必須栄養素摂取不足が脳機能に与える影響の共通性と多様性を評価するため、次世代シーケンサーを用いて、B1 欠乏処置直後とその回復後のマウス、さらに、Mg 欠乏マウスの海馬トランスクリプトームを解析し、mRNA 量を定量解析することで、それぞれの性状を比較した。B1 欠乏直後の海馬では、炎症関連遺伝子群の有意な発現量の増加が観察され、特に TNFα、IL1α、IL1ß、IL6、TLR2、IL17RA、Ccl7、Spp1、MAPKAPK2 の mRNA 量の顕著な増加が観察され、この結果に一致して、脳内炎症を引き起こす M1 ミクログリアのマーカー遺伝子の有意な発現量の増加も観察された。一方、Mg 欠乏マウス海馬でも炎症関連遺伝子群の発現量の増加が観察され、Ccl7、TLR2、Spp1 の mRNA 量の有意な増加が観察されたものの、B1 欠乏直後に比較してこれらの発現量増加は少なく、TNFα、IL1ß、IL6、MAPKAPK2 及び M1 ミクログリアマーカー遺伝子の発現量の増加は観察されなかった。以上の結果から、Mg 欠乏が海馬に弱い脳内炎症を引き起こすものの、海馬ニューロンの形態に影響を与えないのに対し、B1 欠乏は強い脳内炎症引き起こし、海馬ニューロンの変性も伴うことが示唆された。以上の本研究から、B1 や Mg 欠乏のような必須栄養素摂取不足により共通して海馬脳内炎症と海馬依存性記憶障害が誘導されること、さらに、より強い脳内炎症は海馬の神経変性をも引き起こすことが示唆された。

Vitamin B1, Magnesium, Memory impairments

講演番号：4B07a05
講演日時：3 月 28 日 10:14～ 総合学習プラザ B07 会場

神経炎症性サイトカイン TNFα は海馬依存性記憶の想起を負に制御する
Hippocampal neuroinflammation cytokine TNFα negatively regulates retrieval of hippocampus-dependent memory
○高橋 翔平[1,2]、福島 穂高[1]、喜田 聡[1,2] ([1]東農大院・農・バイオ、[2]東大院・農・応用生命化学)
○Shohei TAKAHASHI[1,2], Hotaka FUKUSHIMA[1], Satoshi KIDA[1,2] ([1]Dep. of Bioscience, Tokyo Univ. of Agriculture, [2]Dep. of Applied Biological Chem, Univ. of Tokyo)

記憶は固定化を経て不安定な短期記憶から安定な長期記憶へと変換される。その後、長期記憶は想起されると不安定な状態に戻り、再固定化を経て再貯蔵される。現在までに、我々は海馬が恐怖条件づけ文脈記憶の固定化と再固定化に中心的役割を果たすことを示してきた。一方、脳内炎症は統合失調症やアルツハイマー病などの病態であることが示唆されている。神経炎症調節因子であるサイトカイン腫瘍壊死因子α（Tumor Necrosis Factor α；TNFα）は脳内ミクログリアから放出され、シナプス変性や長期増強の障害を引き起こすことが知られている。しかし、記憶制御プロセス群に対する TNFα の役割は未だ不明である。以上の背景から、本研究では、行動薬理学的解析を行い、記憶制御に対する海馬 TNFα の役割の解明を試みた。小箱内でマウスに電気ショックを与え(恐怖文脈条件づけ)、24 時間後に小箱に戻し、マウスの恐怖反応であるすくみ反応を示した時間の長さを指標に恐怖記憶を評価した(テスト)。恐怖条件づけ 6 時間前に海馬に TNFα（20 ng/side）を局所投与した場合には、この 24 時間後に長期記憶が認められ、TNFα 投与の影響は観察されなかった。しかし、興味深いことに、テストの 18 あるいは 6 時間前に TNFα を投与した場合、テストにおけるすくみ反応は対照群よりも有意に低くなり、恐怖記憶想起の阻害が示唆された。さらに、この 24 時間後にテストを行った場合にも、すくみ反応は継続して有意な低下を示し、TNFα 投与により再固定化も阻害されることが示唆された。さらに、TNFα 投与の影響を生化学的に評価するため、恐怖記憶想起後の海馬 CA1 領域における神経細胞活性化マーカーc-fos 遺伝子発現を解析した。その結果、TNFα 投与により想起に伴い誘導される c-fos 発現も低下したことから、TNFα により想起障害が導かれることが分子レベルでも裏づけられた。さらに、モリス水迷路課題を用いて海馬依存性空間記憶の想起に対する TNFα 投与の影響を解析した。トレーニングにおいて空間学習をさせた後、プローブテスト 6 時間前に海馬に TNFα を局所投与した結果、プローブテストにおいて TNFα 投与群では空間記憶の想起障害が観察された。以上の結果から、海馬 TNFα は恐怖文脈条件づけ記憶のみならず、海馬依存性記憶の想起を負に制御することが初めて明らかとなった。従って、海馬における脳内炎症が記憶想起障害を導く可能性が示された。

TNFα, inflammation, hippocampus

発表責任者：高橋翔平（44318005@nodai.ac.jp）

講演番号：4B07a06
講演日時：3 月 28 日 10:35～ 総合学習プラザ B07 会場

カルシウムシグナルによる CHERP を介した選択的スプライシング制御機構の解明

Elucidation of alternative splicing control mechanism via CHERP by calcium signal

○石塚 高己、増田 誠司（京都大学）
○Takaki ISHIZUKA, seiji masuda (Kyoto Univ.)

カルシウムは細胞内でシグナル伝達を行うセカンドメッセンジャーとして機能する。カルシウムを介したシグナルの一部は核へ伝達され、標的遺伝子の発現を制御することが広く知られている。しかし遺伝子発現の制御として解析が進んでいるのは転写による制御機構であり、転写後プロセスによる制御に関してはまだ十分に理解されていない。CHERP は細胞内カルシウムの恒常性に寄与するとして同定されたタンパク質である。発見当初は小胞体に関連するタンパク質として考えられていたが、近年主に核内に局在することが判明した。また近年のプロテオーム解析により U2snRNP などのスプライシング因子との相互作用が示されたことから、現在ではスプライシング関連因子と理解されている。

選択的スプライシングは高等真核生物の遺伝子発現機構において高度に制御されたプロセスの一つであり、mRNA 及びタンパク質発現の多様性に大きく寄与している。しかし、選択的スプライシングの制御は現在でも未解明な部分が多い。特にシグナル応答との関係はその大部分が未知な状態で残されている。興味深いことに CHERP はカルシウム結合タンパク質である ALG-2 とカルシウム依存的に結合することが報告されている。我々は、CHERP がカルシウムシグナルを介した選択的スプライシングの制御に関与する因子であると仮説を立てた。本研究では、CHERP による選択的スプライシング制御機構と、CHERP がカルシウムによる遺伝子発現制御に対して与える影響について解析する。

まず、RNA-FISH 法を用いて mRNA の局在を観察した。CHERP のノックダウンにより mRNA は核内に蓄積していた。さらに蓄積した mRNA が核スペックルに局在を示していた。これらのことからスプライシングとの関係が強く示唆された。一方 ALG-2 単体のノックダウンでは核内蓄積は観察できなかったが、ALG-2, CHERP のダブルノックダウンでは CHERP 単体のノックダウンよりも顕著な mRNA の核内蓄積を確認した。このことから CHERP は ALG-2 と共にスプライシングに関与していることが示唆された。

次いで、CHERP, ALG-2 とカルシウムの遺伝子発現制御について網羅的な解析を行うため、RNA-seq による選択的スプライシング解析を行った。その結果、CHERP ノックダウンによって遺伝子全体に広く選択的スプライシングの変化を及ぼしていることを確認した。その中にイントロンを保持した mRNA も多く観察されたことから、RNA-FISH による mRNA 核内蓄積の観察を支持する結果を得た。また RT-PCR の結果から、RNA-seq で検出されたスプライシングの変化が実際に CHERP ノックダウン細胞で起こっていることを確認した。現在カルシウムによる選択的スプライシングの変化と CHERP, ALG-2 による変化の関係について解析中である。本学会ではこれらの進展を含め議論したい。

alternative splicing, calcium signaling

講演番号：4B07a07
講演日時：3 月 28 日 10:46～ 総合学習プラザ B07 会場

１細胞トランスクリプトーム解析によるマウス味細胞の分類

Single-cell transcriptomic analysis of mouse taste cells

○岩槻 健[1]、早津 徳人[2]、岡崎 康司[2]、遠藤 高帆[2]、橋本 浩介[2]、金丸 青里香[2]、山根 拓実[1]、大石 祐一[1] ([1]東農大・応用生科、[2]理研 IMS)
○Ken IWATSUKI[1], Norihito Hayatsu[2], Yasushi Okazaki[2], Takaho Enodo[2], Kosuke Hashimoto[2], Serika Kanemaru[2], Takumi Yamane[1], Yuichi Oishi[1] ([1]Tokyo Univ. Agric., [2]RIKEN IMS)

【背景・目的】

味蕾に存在する味細胞についての研究は、今世紀に入り味覚受容体の発見とともに急速に進んだ。現在までに、味細胞は少なくともⅠ型、II 型、III 型、IV 型の４種類のグループに分類できることが報告されている。しかし、この分類は組織学に基づくものであるため、細胞の性質を全て反映しているわけではない。実際、塩味受容細胞や味前駆細胞については同定する手段が未だない。最近になり、単一細胞から遺伝子発現ライブラリーを構築し次世代シークエンサーを用いて網羅的に遺伝子を読む Single-cell RNA-seq 技術が発達し、味蕾内に存在する一つ一つの細胞の性質決定とクラスタリングが可能になった。今回、同技術によりこれまでの組織化学的、生理学的アプローチでは困難であった個々の味細胞のプロファイリングと新しい味細胞分類を試みる。

【方法】

C57BL/6J マウス 4-6 匹の舌より有郭乳頭および葉状乳頭を採取し、トリプシン/EDTA にて 1 細胞にした後、10x Genomics 社 Chromium システムを用いて Single cell 3’Libray を構築した。MGI 社 MGISEQ2000 によりシークエンスを行い、シングルセルシークエンス解析パイプライン Cell Ranger および Loupe Cell Brower により１細胞レベルでの遺伝子発現情報の可視化・分類を行った。Loupe Cell Brower 上の細胞クラスターにおける遺伝子発現データと、これまでの味細胞研究から得られていた遺伝子発現データの比較解析を行った。

【結果・考察】

有郭乳頭からは約 5 千細胞、葉状乳頭からは約 1 千細胞分の１細胞レベルでの遺伝子発現情報を得た。１細胞あたりの平均検出遺伝子数は約 5 千遺伝子だった。Loupe Cell Brower 上のクラスター解析からは、いずれの味乳頭からもⅠ型、II 型、III 型と考えられるクラスターが得られた。これまでの報告通り、II 型クラスターには甘味、うま味、苦味受容体と味覚シグナルを伝える分子が特異的に発現しており、III 型クラスターには酸味受容体候補の発現が確認できた。一方、ChgA など内分泌細胞のマーカーが III 型味細胞に発現していることや、解析が進んでいない I 型味細胞の新たなマーカー分子となりうるものも多数見出された。また、味細胞様の Dclk1 陽性クラスターも新たに発見されるなど、これまで見落としていた細胞群が本研究で明らかとなっている。今後、味幹細胞から味前駆細胞へ、そして最終的に成熟した味細胞への分化経路をマッピングできたらと考えている。

taste cell, scRNA-Seq, cluster analysis

発表責任者：岩槻健（ki204886@nodai.ac.jp）

講演番号：4B07a08
講演日時：3 月 28 日 10:57～ 総合学習プラザ B07 会場

３次元再構成組織イメージからの位置特異的トランスクリプトーム解析

Position-Specific Transcriptome Analysis from Three-Dimensional Reconstructed Tissue Images

○松永 浩子[1]、有川 浩司[1]、山崎 美輝[2,3]、鈴木 直子[1]、髙橋 清文[1]、我妻 竜太[2]、細川 正人[1,4]、竹山 春子[1,2,3] ([1]早大ナノライフ創新研、[2]早大院先進理工、[3]産総研 CBBD-OIL、[4]先進生命動態研)
○Hiroko MATSUNAGA[1], Koji Arikawa[1], Miki Yamazaki[2,3], Naoko Suzuki[1], Kiyofumi Takahashi[1], Ryota Wagatsuma[2], Masahito Hosokawa[1,4], Haruko Takeyama[1,2,3] ([1]Res. Org. Nano Life Innov., Waseda Univ., [2]Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [3]CBBD-OIL, AIST-Waseda Univ., [4]Inst. Adv. Res. Biosyst. Dynam., Waseda Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ.)

遺伝子の発現状態は、生体組織内において位置特異的に異なるとされている。このため、組織のどこから採取されたのかが明らかである微小組織切片の遺伝子発現分布情報と、顕微鏡下で得られる組織の形態情報を関連づけることができれば、より解像度を深めた空間的な組織構成の理解につながることが期待される。この技術は、生物学的機能の解明や、病理学における病因解明などへの幅広い応用が見込まれる。我々の研究室では、顕微鏡下で対象組織を観察しながら極微小領域を高スループットで採取できる装置の開発を進めてきた。本装置では、先端がナイフ様の加工が施された針を使用し、試料を針先端でパンチングする要領で高速に採取する。採取の位置は、直線状や円弧状、または任意の複数箇所、といったように様々に設定することが可能である。針の内径は 110μｍで、5 分で 48 サンプルの高速自動試料採取を達成している。

我々はこれまでに上記微小組織切片を用いた多角的なアプローチを進めてきた。組織形態に基づいたトランスクリプトーム解析やゲノム変異解析、さらにはオープンクロマチン領域の解析へと得られる情報は多岐にわたる。一方で組織からの薄切を連続的に実施し、薄切片の画像を取得、複数連続画像を並べ薄切前の組織像を再構築する。この再構築された 3 次元組織イメージをもとに採取位置を選定し、相当する座標情報をもとに薄切片から微小組織切片のパンチングを実施した。本手法の特徴は、網羅的採取にも興味対象のみの採取にも対応できる点にある。これまで２次元的な位置特異的遺伝子発現の分布を観察してきたが、本報告では複数切片を縦断して変化する遺伝子発現も併せて捉えた結果を示す。あらかじめ対象を絞って採取された微小組織切片のトランスクリプトーム解析を、平面から立体へと発展させることにより、動物や植物などあらゆる生体組織の機能の理解や医療分野への幅広い応用が期待できる。

Transcriptomics, Position-specific, 3-Dimensional

発表責任者：竹山春子（haruko-takeyama@waseda.jp）

講演番号：4B07a09
講演日時：3 月 28 日 11:08～ 総合学習プラザ B07 会場

組織空間的トランスクリプトーム解析及びゲノム変異解析に向けた微量生体分子の抽出

Simultaneous isolation of DNA and RNA from micro tissue for site-specific transcriptome and genomic analysis

○山崎 美輝[1,2]、細川 正人[3,4]、有川 浩司[4]、髙橋 清文[4]、松永 浩子[4]、竹山 春子[1,2,3,4]（[1]早大院先進理工、[2]産総研 CBBD-OIL、[3]早大先進生命動態研、[4]早大ナノライフ創新研）
○ Miki Yamazaki[1,2], Masahito Hosokawa[3,4], Koji Arikawa[4], Kiyofumi Takahashi[4], Hiroko Matsunaga[4], Haruko Takeyama[1,2,3,4] ([1]Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., [2]CBBD-OIL, AIST-Waseda Univ., [3]Inst. Adv. Res. Biosyst. Dynam., Waseda Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ., [4]Res. Org. Nano Life Innov., Waseda Univ.)

生体組織は、様々な種類の細胞が規則的に配置することで、1 細胞では得られない多様な機能発現を実現している。そのため、生体組織の生命現象を理解するには、組織内の空間情報を用いて細胞の種類や機能を解析することが重要である。空間情報を用いた生体組織の解析は、特にがん研究への応用が期待されている。がん組織は、形態や増殖性、薬剤耐性の異なる細胞集団で構成されており、細胞型の特定が治療の指針や予後因子となりうるからである。

近年では、生体組織を構成する細胞型の検出法として、空間的トランスクリプトーム解析が注目されている。空間的トランスクリプトーム解析では、組織空間で異なる遺伝子発現変動を検出し、組織内での細胞の機能分布を特定する。しかし、細胞型を詳細に理解するには、トランスクリプトーム解析による表現型の検出に加え、ゲノム解析による変異の検出を行うことが重要となる。がん組織における細胞型の不均一性は、ゲノム変異の蓄積が原因だからである。トランスクリプトーム解析では、サンプル間における遺伝子発現の変動に加え、一部の変異遺伝子の配列も検出可能である。ただし、検出可能な変異配列は比較的発現量の多い遺伝子に限られる。そのため、遺伝子の変異を網羅的に検出するには、ゲノム解析が必要となる。しかし、従来の方法ではゲノムと RNA の分離工程における損失量が多く、微小組織に含まれる微量なゲノム及び RNA を同時に抽出し解析することは困難であった。

当研究室では、微小生体組織から再現性のあるトランスクリプトーム情報を得るため、効率的な微量 RNA 抽出法を開発してきた。当処理では、タンパク質分解酵素を用いた細胞溶解および磁気ビーズによる RNA 精製を行う。磁気ビーズを使用して RNA を捕獲する際、ビーズ溶液の上清から他の生体分子の抽出が可能となる。そこで本研究では、この方法を応用して同一の微小組織から効率的に RNA とゲノムの両方を同時に抽出・精製し、組織空間的なトランスクリプトーム解析及びゲノム変異解析を行う方法の検討を行った。

Biological tissue, RNA-seq, Genomics

発表責任者：竹山春子（haruko-takeyama@waseda.jp）

講演番号：4B07a10
講演日時：3 月 28 日 11:19～ 総合学習プラザ B07 会場

Caenorhabditis elegans における変異体形質を決定する原因遺伝子同定法について

Method for identifying causal mutations in *Caenorhabditis elegans* by Whole-Genome Sequencing

○出坂 夏美、瀬川 天太、高木 宏樹、東村 泰希（石川県大・生資環）
○Natsumi DESAKA, Tenta SEGAWA, Hiroki TAKAGI, Yasuki HIGASHIMURA (Ishikawa Pref. Univ.)

【背景・目的】*Caenorhabditis elegans*（*C. elegans*）Bristol N2 株がモデル生物として繁用される利点の一つとして、突然変異株の取得や解析が比較的容易である点があげられる。変異形質を規定する原因遺伝子の同定は、N2 株に対してゲノム中に多くの多型箇所を有する Hawaiian 株との交雑後代における遺伝解析によって行われてきた。しかし、Hawaiian 株と交配した場合、変異体によっては、N2 株と Hawaiian 株間の形質の差異により交雑後代における変異形質の評価が難しく遺伝解析できない可能性がある。本研究では、イネで開発された変異体における原因遺伝子同定法 MutMap 法を適用し、*C. elegans* の突然変異体における迅速な原因遺伝子単離法を確立した。

【方法】*C. elegans* N2 株を 48 mM のエチルメタンスルホン酸（EMS）で 4 時間の突然変異処理を行い、変異処理個体を自殖させた第二世代において変異形質を有する個体を選抜した。変異処理の親系統である N2 株の雄性体と変異形質を有する雌雄同体を交配させ、F1 世代を作出した。F1 個体の個別飼育により F2 世代を獲得した。F2 世代のうち、メンデル分離（野生型：変異体型 ＝3：1）に従う集団のみを N2 株と変異体の交配が成功した集団とみなし、F2 世代以降も F6 世代まで個別飼育を繰り返して組換え近交系（RILs）を育成した。RILs において変異形質を示す 19 系統を選抜し、各系統から抽出した DNA を等量混合することでバルク DNA を調整した。得られたバルク DNA を次世代シーケンサーによる解析に供試し、一塩基多型箇所における変異体 allele の頻度をもとに原因変異箇所を同定した。

【結果・考察】EMS 処理の結果、野生体と比較して体長が長い特徴を示す変異体を獲得した。N2 株の雄性体と変異体型の雌雄同体間の交配によって F2 世代でメンデル分離（野生型:変異体型=116：35）することが確認された。各個体の個別飼育より育成した RILs のうち、変異形質を示す 19 系統より調整したバルク DNA を全ゲノムシーケンスに供試した。その結果、変異形質を規定する原因遺伝子は染色体Ⅲに同定した。現在、サンガーシーケンス法を用いた変異箇所の確認および、同じ遺伝子に変異を有する既知の変異体との交配によるアレリズムテストを実施している。

関連文献　1) Abe A, *et al. Nat Biothechnol*, 30: 174-178, 2012.

Caenorhabditis elegans, Ethyl methanesulfonate, Next Generation Sequencer

講演番号：4B07a11
講演日時：3 月 28 日 11:40～ 総合学習プラザ B07 会場

HP1α クロモドメインを用いた蛍光プローブによる細胞分裂中のクロマチン動態観察

Imaging of chromatin dynamics during mitosis using fluorescent probes containing HP1α chromodomain

○佐々木 和樹[1]、鈴木 律裕[2]、中尾 洋一[2]、吉田 稔[1,3]（[1]理研 CSRS・ケミカルゲノミクス、[2]早稲田大先進理工学系研究科化学・生命科学、[3]東大院農・応生工、微生物連携機構）
○ Kazuki SASAKI[1], Michihiro SUZUKI[2], Yoichi NAKAO[2], Minoru YOSHIDA[1,3] ([1]Chem. Genomics Res. Gr., RIKEN CSRS, [2]Dept. Chem. and Biochemi., Waseda Univ., [3]Dept. Biotechnol. & CRIM, Univ. Tokyo)

エピジェネティクスは、遺伝子の塩基配列によらない発現制御機構である。その中心は、主にヒストンのアセチル化、メチル化、リン酸化や DNA のメチル化などの化学修飾が担っている。ヒストン修飾の変化を評価する方法は、一般的に細胞を破砕もしくは固定する必要があるため、エピジェネティクスの変化がいつ、どのように起こっているのかという詳細な解析を行うことは難しく、特に細胞周期の様なダイナミックに変動しているヒストン修飾の動態に関しては議論の余地があり結論に至っていなかった。そこで、生細胞内でのエピジェネティクスの変化をリアルタイムに解析するために、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を利用したヒストン修飾を検出する蛍光プローブを開発した。この蛍光プローブは、修飾ヒストンと特異的に結合する蛋白質の分子認識に基づいている。HP1αは、H3K9 のトリメチル化(H3K9me3)結合ドメインであるクロモドメイン(CD)と二量化ドメインであるクロモシャドウドメイン(CSD)からなる。H3K9me3 を検出するために、HP1αCD を用いて蛍光プローブを作製し、細胞分裂の際の応答を観察したところ、細胞分裂前期に一過性の蛍光強度比の上昇が見られ、分裂前中期で一度減少した後、分裂後期で再び減少し、分裂終期で間期と同じレベルに戻った。この応答についてさらなる解析をするために、全長 HP1αと HP1αCSD を結合ドメインに用いた蛍光プローブを作製し、細胞周期での蛍光プローブの応答を観察した。全長 HP1αを用いた蛍光プローブでは、分裂前期で蛍光強度比の上昇がみられ、分裂後期で減少した。一方で、HP1αCSD は分裂前期で蛍光強度比の減少がみられ、分裂後期で間期と同じレベルまで回復した。これらの違いを検証するために、ヒストン H3 の修飾ペプチドと HP1αの各ドメインとの結合を調べたところ、全長 HP1αと HP1αCD は H3K9me3 と結合したが、HP1αCSD は結合しなかった。ヒストン H3 は細胞分裂の際にメチル化サイトに隣接する H3S10 がリン酸化されることが知られているため、H3K9me3S10p と HP1αの各ドメインとの結合を調べたところ、全長 HP1αは結合したが、HP1αCD は結合しなかった。この蛍光プローブを用いることによって、細胞分裂の際に先に H3K9me3 が上昇し、それに続いて H3S10 がリン酸化をされることが初めて観察された。作製した蛍光プローブは、連続したヒストン修飾の動態を観察可能にし、細胞分裂に関わるエピジェネテックな作用機序の解明に貢献できるであろう。

Imaging, Epigenetics, HP1α

講演番号：4B07a12
講演日時：3 月 28 日 11:51～ 総合学習プラザ B07 会場

損傷 DNA-核膜孔複合体間相互作用による姉妹染色分体間接着の促進

Interaction of damaged DNA with nuclear pore complex facilitates sister chromatid cohesion

○尾間 由佳子[1,2]、折原 行希[1]、高橋 大輔[1,3]、小西 辰紀[1]、原田 昌彦[1]（[1]東北大・院農・分子生物、[2]学振特別研究員 RPD、[3]学振特別研究員 DC1）
○Yukako OMA[1,2], Yuki Orihara[1], Daisuke Takahashi[1,3], Tatsunori Konishi[1], Masahiko Harata[1]（[1]Lab. of Mol. Biol., Grad. Sch. of Agric. Sci., Tohoku Univ., [2]JSPS Research Fellow RPD, [3]JSPS Research Fellow DC1）

DNA 二重鎖切断（DSB）は最も重篤な DNA 損傷であり、DSB が速やかに修復されない場合、ゲノム再編成や染色体転座を引き起こし、ヒトではがんの原因となる。ショウジョウバエや哺乳類の細胞ではヘテロクロマチン領域に生じた DSB が核構造に係留され、相同組換え修復（HR)を促進することが報告されている。我々はこれまで、出芽酵母において DSB が核膜近傍へ移行して核膜孔複合体（NPC)へ係留されること、またこのような DSB の挙動に SWR1 クロマチン構造変換複合体が必要であることを報告した(1)。SWR1 複合体は高等真核生物においても高く保存されていることから、真核生物における DSB の核構造への係留のメカニズムとその意義について出芽酵母をモデル系として解析を行った。

これまでに出芽酵母において、DNA 損傷により誘導された姉妹染色分体間接着（損傷誘導的コヒージョン）が HR を促進すること、また損傷誘導的コヒージョンの確立には姉妹染色分体間接着因子の1つである Scc1 が SUMO 化酵素 Mms21 により SUMO 化修飾を受けることが必要であることが報告されている。Mms21 は間接的に NPC と相互作用することから、DSB の NPC への係留が Mms21 による Scc1 の SUMO 化を促進し、損傷誘導的コヒージョンの確立に関与する可能性を考え、その検証を行った。ガラクトース添加により単一の DSB を誘導できる酵母株について DSB 領域近傍へ GFP を結合させ、損傷誘導的コヒージョンを蛍光顕微鏡下で解析した。その結果、DSB の NPC 移行欠損株では、損傷誘導的コヒージョンの低下と DNA 損傷誘導時の Scc1 の SUMO 化の低下が認められた。さらに、Mms21 を DSB 近傍へ人為的に結合したところ、コヒージョン形成率が上昇した。また、この変化は SUMO 化部位変異型 scc1 の過剰発現により喪失した。これらの結果から、DSB の NPC への係留により、Mms21 による Scc1 の SUMO 化修飾が促進され、損傷誘導的コヒージョンの確立と正確な HR を進行させることが示唆された。

（1） Horigome, Oma, *et al.*, Mol. Cell, 55:626-639 (2014)

cohesion, DNA damage repair, nuclear pore complex

発表責任者：尾間由佳子（yukako.oma.d8@tohoku.ac.jp）

講演番号：4B07a13
講演日時：3 月 28 日 12:02～ 総合学習プラザ B07 会場

核内 mRNA 代謝制御シグナルの解析-ミトコンドリア呼吸鎖 III の阻害剤はなぜ mRNA 代謝に影響するのか-

Analysis of the regulation of nuclear mRNA metabolism -why the mitochondrial complex III inhibitor affects mRNA metabolism-

○三宅 俊太郎、増田 誠司（京大生命）
○Shuntaro MIYAKE, Seiji MASUDA (Kyoto Univ.)

真核生物では、核内の染色体 DNA を鋳型として最初に pre-mRNA が転写される。その後 pre-mRNA は、核内で各種プロセシングを経て成熟 mRNA となる。プロセシングが完了した成熟 mRNA は、核内から核膜孔を通過して細胞質へと輸送され、細胞質でのタンパク質翻訳の鋳型となる。一方プロセシングを完了していない mRNA は核内に保持される。すなわち、mRNA プロセシングを阻害すると、mRNA は核内に蓄積する。この表現系を利用して mRNA プロセシングを制御できる化合物を探索することができる。本研究では、mRNA プロセシングを制御する化合物を見出し、その制御を通して遺伝子発現にどのような変化をもたらすか、またその標的となっているタンパク質は何か、さらにこれらの化合物の活性・機能との関係はどのようなものか、といった作用機構を明らかにすることを目指して研究を行った。

mRNA プロセシングが阻害されると poly(A)$^+$RNA が核内に蓄積されることを利用して、蛍光 in situ hybridization 法(RNA-FISH 法)によって poly(A)$^+$RNA の局在を観察し、核内蓄積がみられる阻害剤を探索した。阻害剤スクリーニングの結果、ミトコンドリアの呼吸酵素複合体Ⅲの特異的阻害剤の添加により、核内への顕著な poly(A)$^+$RNA 蓄積が引き起こされることを見出した。さらにミトコンドリア呼吸鎖の中でも複合体Ⅲの阻害によってのみ蓄積が生じることから、ピリミジン生合成反応の律速段階酵素である DHODH(デヒドロオロト酸デヒドロゲナーゼ)の機能阻害との関連が示唆された。DHODH 特異的阻害剤の添加によっても同様の poly(A)$^+$RNA 核内蓄積が生じた。加えて、この蓄積はウリジンの添加により解消されたことから、ピリミジン合成阻害が poly(A)$^+$RNA 蓄積を引き起こすことを見出した。ピリミジンの合成阻害により生じる細胞への影響として、複製や転写へのストレスとの関係が示唆された。そこで、複製や転写ストレスを感知する因子として ATM や ATR といったキナーゼとの関連を検討した。高濃度の Caffeine を添加することにより ATM/ATR のキナーゼ活性を阻害するとミトコンドリア呼吸鎖Ⅲや DHODH 阻害によって生じた poly(A)$^+$RNA の蓄積が解消された。

以上のことからスクリーニングにより見出した poly(A)$^+$RNA 蓄積反応は、ミトコンドリア呼吸鎖Ⅲの阻害、ピリミジン合成の阻害、複製・転写ストレス応答といった一連の反応を経ることにより引き起こされることを見出した。現在は ATM/ATR の働きがどのように poly(A)$^+$RNA 蓄積に影響するかについて解析を進めている。本学会ではこれらの結果を踏まえて議論を進めていきたい。

mRNA, DHODH, ATM/ATR

講演番号：4B08a01
講演日時：3 月 28 日 09:30～ 総合学習プラザ B08 会場

シラカバ花粉アレルゲン Bet v 1 のベンサミアナタバコにおける大量発現

High-yield production of the major birch pollen allergen Bet v 1 with allergen immunogenicity in *Nicotiana benthamiana*

○三浦 謙治[1,4]、山田 侑希[1]、木戸口 正典[2,3]、矢田 瑛[1]、中村 貴子[2]、吉田 英樹[1,4]、加藤 幸宣[3]、増子 裕典[2]、檜澤 伸之[2]、藤枝 重治[3]、野口 恵美子[2]([1]筑波大生命環境、[2]筑波大医、[3]福井大医、[4]筑波大 T-PIRC)
○ Kenji MIURA[1,4], Yukii YAMADA[1], Masanori KIDOGUCHI[2,3], Akira YATA[1], Takako NAKAMURA[2], Hideki YOSHIDA[1,4], Yukinori KATO[3], Hironori MASUKO[2], Nobuyuki HIZAWA[2], Shigeharu FUJIEDA[3], Emiko NOGUCHI[2] ([1]Life Environ Sci, Univ Tsukuba, [2]Medicine, Univ Tsukuba, [3]Univ Fukui, [4]T-PIRC)

I 型アレルギーは、アレルゲンによって引き起こされる免疫異常であり、重大な健康上の問題を起こす。シラカバ花粉の主要アレルゲンである Bet v 1 は PR-10（pathogen-related protein、植物が病原体に感染した際に、植物体内で生成されタンパク質）ファミリーに属する。本研究では、アレルギー患者 IgE への結合活性を有する Bet v 1 を植物にて大量に生産させる方法を確立させた。我々は、植物において大量のタンパク質を作製する「つくばシステム」を開発した。このシステムをベンサミアナタバコに用いることで、大腸菌などの異種タンパク質発現システムに匹敵する収量を得ることができることが分かっている。本システムの特徴は、アグロインフィルトレーションとよばれる、アグロバクテリウムにより一過的にタンパク質を発現させる方法を用いるため、遺伝子組換え作業を行う必要がない。このことは、５～６週齢のベンサミアナタバコがあれば、アグロインフィルトレーション後、３～５日で目的のタンパク質を得ることができるという特徴がある。このつくばシステムを用いて、Bet v 1 をベンサミアナタバコにて発現させたところ、アグロインフィルトレーション後５日後に、1.2 mg/g 新鮮重の発現が得られた。この Bet v 1 は植物由来の糖鎖が付加されていることが示唆された。Bet v 1 を精製した後、ELISA によりアレルギー患者の IgE と高い結合特性を示した。これらの結果から、つくばシステムにより免疫原性を保持したシラカバ花粉アレルゲン Bet v 1 を大量かつ迅速に生産することが可能であることが示された。

birch pollen allergen, Tsukuba system, agroinfiltration

発表責任者：三浦謙治（miura.kenji.ga@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：4B08a02
講演日時：3 月 28 日 09:41～ 総合学習プラザ B08 会場

アブシジン酸存在下で増殖と細胞死を共に抑制したタバコ BY-2 細胞からのタンパク質の分泌と培養中の培地中成分の変化

Changes in protein secretion and medium composition from proliferation- and cell death- arrested tobacco BY-2 cells that has been cultured in abscisic acid-containing medium

○井上 智晴[1]、小田 大和人[1]、丸山-仲下 明子[2]、松岡 健[1,2] ([1]九大・院生資環、[2]九大・院農)
○Tomoharu INOUE[1], Yamato ODA[1], Akiko MARUYAMA-NAKASHITA[2], Ken MATSUOKA[1,2] ([1]Kyushu Univ., Grad. Sch. Bio-Environ. Sci., [2]Kyushu Univ., Fac. Agr.)

【背景・目的】植物の多くの組織はある一定の段階まで成長・分化すると、細胞分裂を停止し、そのままの状態で数ヶ月以上の長期間にわたり活動を続ける。タバコ BY-2 細胞は、合成オーキシンである 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) の存在下に継代培養されている細胞株であり、その高い増殖性と容易に遺伝子導入が可能な性質から、組換えタンパク質生産のためのホストとしての利用も進みつつある。一方、細胞増殖には多大なエネルギーを要するため、分裂せずに長い期間活動を続けるという組織中の植物細胞の状態をタバコ培養細胞 BY-2 株でも再現することができれば、物質生産の際のコスト低下を図れる可能性がある。この細胞を 2,4-D 非存在下、アブシジン酸(ABA)またはジャスモン酸(JAS)存在下で培養すると細胞周期が停止することが報告されている(Swiatek, A. et al., Plant Physiol. 128:201-211, 2002)。この情報を参考にして細胞分裂と細胞死が共に ABA 存在下で抑制されることを見出した。この ABA 存在下において、どれだけの期間細胞が生育可能か、その条件でモデルタンパク質の分泌能が保たれているか、また生存期間の差には培地成分の量が関わっているのかについて検討を進めた。

【方法・結果】2,4-D の存在下に定常期まで生育させた細胞を、ホルモンを含まない培地で洗浄後、ABA を含む培地で培養を行い、生細胞の割合をエバンスブルーによる染色性を指標として、また細胞の増殖を培養液中の細胞数を指標として検討した。その結果、2,4-D を含む通常培地では 2 週間程度で死滅する BY-2 細胞が、ABA 培地中では細胞の増殖が抑えられた状態で 1 ヶ月以上死亡率を上昇させずに培養可能なことを見出した。

次いで、ABA 条件下、増殖が停止した細胞がタンパク質分泌能を維持しているかを検討するため、サツマイモ貯蔵タンパク質スポラミンを分泌する形質転換 BY-2 株を用い、培地画分中のスポラミンの存在量を免疫ブロッティングにより検討した。その結果 ABA 培地中にあるタバコ BY-2 細胞においては、一定期間であれば組換えタンパク質の分泌能が維持されていることを見出した。

また、生存と培地中の栄養分の関係を検討するために、培養中の培地におけるショ糖、リン酸イオン、硝酸イオンの濃度変化を検討している。予備的な結果であるが 2,4-D、ABA の両条件においてこれらの成分の培地からの減少の時間経過については著しい差は見られないという結果を得ており、現在この結果の再現性の確認を進めている。

cell death, secretion, cell culture

講演番号：4B08a03
講演日時：3 月 28 日 09:52～ 総合学習プラザ B08 会場

N-Glycan analysis of recombinant ß-glucocerebrosidase produced in root culture
○Naphatsamon UTHAILAK, Hiroyuki KAJIURA, Ryo MISAKI, Kazuhito FUJIYAMA (ICBiotech, Osaka Univ.)

Gaucher disease is a lysosomal storage disorder caused by the insufficient of functional ß-glucocerebrosidase (GCase). Recently, enzyme replacement therapy has been used as the most effective treatment for Gaucher disease type I. Among several host systems, the commercial GCase mostly used is produced in mammalian cells. Plants have advantages on pharmaceutical protein production especially the safety from contamination by human pathogens. This research aimed to produce the functional recombinant GCase in *Nicotiana benthamiana* root culture induced by plant hormones [Indole-3-acetic acid (IAA) or Indole-3-butyric acid (IBA)]. Roots of GCase-producing transgenic plants were induced and cultured in liquid medium supplemented with each plant hormone. The optimization of root growth condition was studied using different plant hormones and cultivation times. Root culture and recombinant GCase were analyzed using dry root weight, GCase activity assay, CBB staining and Western blot. Functional GCase was successfully produced from root culture with the enzyme activity 88.8± 2.9 Units/mg total protein at week 5 after IBA induction (0.1 mg/L). Two steps of chromatography (concanavalin A and phenyl 650M columns) were used for the purification of GCase. The enzymatic activity of purified GCase (2628.2 units/mg total protein) was approximately 15 times higher than the crude protein (186.7 units/mg total protein). For the *N*-glycan analysis, four *N*-glycosylated sites (N270, N146, N59 and N19) of GCase were analyzed using nano LC-MS/MS. The structure $Man_3XylFucGlcNAc_2$ containing plant specific residues was predominant in all glycosylated sites. Our research provides the alternative plant system for recombinant pharmaceutical protein production. This system might be applied for the production of other recombinant proteins in the future.

Root culture, *N*-glycosylation, ß-glucocerebrosidase

発表責任者：FUJIYAMA Kazuhito（fujiyama@icb.osaka-u.ac.jp）

講演番号：4B08a04
講演日時：3 月 28 日 10:03～ 総合学習プラザ B08 会場

光合成能およびワックスエステル生合成能を同時強化した形質転換ユーグレナにおけるパラミロン顆粒形成

Formation of Paramylon Granules in the Transformed Euglena with Enhanced Photosynthesis and Wax Ester Biosynthesis

○西川 由依菜[1]、多保田 真歩[2]、重岡 成[1,2]、田茂井 政宏[1,2]([1]近畿大院農、[2]近畿大農)
○ Yuina NISHIKAWA[1], Maho TABOTA[2], Shigeru SHIGEOKA[1,2], Masahiro TAMOI[1,2] ([1]Grad.Sch.Kndai Univ., [2]Kndai Univ.)

【目的】

産業の発展、人口の増加と共に世界のエネルギー消費量は年々増加しているが、世界のエネルギー供給を支えている化石燃料には限りがある。そこで近年、化石燃料に代わる新たなエネルギーとして微細藻類由来のバイオ燃料が注目されている。微細藻類ユーグレナは、好気条件下では光合成産物としてパラミロン(β-1,3-グルカン)を蓄積し、嫌気条件下ではパラミロンを分解し、ジェット燃料となり得るミリスチルミリステート(C14-C14)を主成分とするワックスエステル(WE)へと変換する。これまでに、WE 高生産株の作出を目指し、カルビン回路で機能する *FBP/SBPase* および脂質生合成経路で機能する *EgTER1* を同時導入した形質転換ユーグレナ株(EgT-FS)を作出した。強光・高 CO_2(350 μmol photons/㎡/s, 0.3% CO_2, 26℃)の独立栄養条件下で培養した EgT-FS 株では細胞内に巨大なパラミロン顆粒が見られ、パラミロン量は野生株の約 2.7 倍に増加していた。一方、嫌気条件下では野生株の約 2 倍の速度でパラミロンが分解され WE へと変換された。しかし、この時の EgT-FS 細胞内には多くのパラミロンが残存しており、パラミロン顆粒の肥大化が、パラミロン分解に影響していることが考えられた。ところで、ユーグレナにおけるパラミロン顆粒サイズがどの様に制御されているかは不明な点が多く残されている。そこで本研究では、パラミロン顆粒形成に及ぼす光合成能および WE 発酵能強化の影響を明らかにするために、種々の条件下における EgT-FS 株のパラミロン顆粒形態およびパラミロン生合成および分解に関わる遺伝子発現解析を行った。

【結果・考察】

強光・高 CO_2 条件、独立栄養培地(CM 培地)で培養した EgT-FS 株から RNA を抽出し、qRT-PCR によりパラミロン生合成および分解に関わる遺伝子(*FBPaseIII*、*GSL2*、*Egce117A*、*gapA*、*TPI*、*enorase*)の発現解析を行った。その結果、野生株と EgT-FS 株間で、生育初期および生育後期のいずれにおいてもこれらの遺伝子発現量に明確な差は見られなかった。ところで、強光・高 CO_2 条件で培養した EgT-FS 株では、光合成能の強化による炭素固定量の増加に伴い、窒素欠乏状態であると考えられることから、$(NH_4)_2HPO_4$ 量を 2 倍にした CM 培地で EgT-FS 株を培養したところ、パラミロン顆粒の肥大化が見られなくなった。この結果は、パラミロン顆粒の肥大化には C/N バランスが関係していることを示唆している。現在、同条件で培養した EgT-FS 株における窒素代謝系に関わる遺伝子発現解析を行うと共に、パラミロンの重合度などパラミロン顆粒の化学特性の解析を試みている。

biofuel, algae, paramylon

発表責任者：田茂井政宏（tamoi@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：4B08a05
講演日時：3 月 28 日 10:14～ 総合学習プラザ B08 会場

光制御による植物を用いた有用タンパク質製造方法の開発

Development of Plant Factory System for Protein Production with Light-Controlled

○田中 裕之[1]、池澤 信博[1]、北原 大輔[1]、竹本 浩[1]、永島 明知[1]、出来島 康方[1]、川端 潤[1]、村瀬 誠[2] ([1]三菱ケミカル、[2]バイオインダストリー協会)
○ Hiroyuki TANAKA[1], Nobuhiro IKEZAWA[1], Daisuke KITAHARA[1], Yutaka TAKEMOTO[1], Akitomo Nagashima[1], Yasumasa DEKISHIMA[1], Hiroshi KAWABATA[1], Makoto MURASE[2] ([1]Mitsubishi Chemical, [2]JBA)

近年、植物を宿主とする有用タンパク質の一過性発現法は、短期間に抗体などの比較的複雑なタンパク質を発現できる事に加え、発現したタンパク質が植物由来である事から安全性の点で優位にある等の理由により注目されている。しかしながら、太陽光により宿主の植物を栽培する場合、季節変動の影響を受ける事で年間を通じ植物の栽培にバラつきが生じるため、栽培毎の有用タンパク質の生産が安定しにくいという課題があった。

そこで、我々は、安定的に植物を栽培し有用タンパク質を発現させるために、光波長、光強度等の環境条件を制御できる人工光型閉鎖系植物工場システムを開発し有用タンパク質の安定生産を実現した。さらに、制御可能な環境条件の１つである光波長に着目し検討した結果、赤色光を一定割合以上含む条件で栽培を行う事で、有用タンパク質の発現効率が向上する事を見出した。その植物体の成分分析をしたところ、植物の生体防御機構に関わるアルカロイドの減少が認められた。なお、植物の一過性発現では、有用タンパク質をコードする遺伝子を含む発現ベクターを有するアグロバクテリウムが植物細胞に感染する事で有用タンパク質が発現する。したがって、赤色光を照射する、あるいは、赤色光以外の照射を弱める事が光ストレスとなり植物の生体防御機構が弱まる事で、アグロバクテリウムに対する感受性が増大し、一過性発現における有用タンパク質の発現効率の向上に寄与したと考えられる。

以上より、植物を宿主とする有用タンパク質の一過性発現法において人工光を用いた光条件は、有用タンパク質の安定生産に寄与するのみならず、有用タンパク質の発現効率の向上に貢献することから、その工業化において重要な制御因子であることが示唆された。

transient expression, plant factory system, light-controlled

発表責任者：田中裕之（tanaka.hiroyuki.mr@m-chemical.co.jp）

講演番号：4B08a06
講演日時：3 月 28 日 10:35～ 総合学習プラザ B08 会場

植物工場ユニット内で栽培したラズベリー葉中ポリフェノール成分の生産量変化

Changes in polyphenol content in raspberry leaves cultivated in plant factory units

○橋本 誠也[1]、輿水 駿[1]、辻 一成[1]、小堀 亮[1]、川崎 崇[2]、齊藤 安貴子[1] ([1]大阪電気通信大学大学院工学研究科先端理工学専攻、[2]京都大学生存圏研究所)
○Seiya HASHIMOTO[1], hayato KOSHIMOZU[1], issei TUJI[1], ryo KOBORI[1], takashi KAWASAKI[2], akiko SAITO[1] ([1]Advanced Science & Engineering, Graduate School of Engineering, OECU, [2]Research Institute for Sustainable Humanosphere, Kyoto University)

【目的】

ラズベリー(*Rubus ideaus*)の葉には、フラバン-3-オール誘導体、フラバン-3-オールのオリゴマーであるプロシアニジン、加水分解型タンニンであるエラグ酸誘導体、ケルセチンなどのフラボノール類など多種類のポリフェノール化合物が豊富に含まれている(1)。ラズベリーの葉は、ハーブティーとして幅広い地域と国で飲用されており機能性が注目されている植物であるが、栽培条件による化合物ごとの含有量変化などの詳細は明らかになっていない。我々はこれまで、ポリフェノール化合物の中でもフラバン-3-オール誘導体や procyanidin に注目し、主に有機合成的なアプローチで市販されていない化合物の確保、および、構造-活性相関研究を行ってきた(2)。これらの背景から、本研究では、栽培法によって上記ラズベリーに含まれる機能性が高いポリフェノール化合物、特にフラバン-3-オール誘導体群の含有量を変化させ、付加価値を付与した生産方法の開発を目的に研究を行っている。ごく最近、植物工場ユニット中で栽培したラズベリーについて、青色 LED 照射して栽培した場合、フラバン-3-オール誘導体や、プロシアニジンを相対的に増加させるとこが確認された(3)。本発表では、葉の成長過程で、ポリフェノール化合物群の含有量がどのように変化するのか、また、青色 LED 光照射の影響について検討を行ったので報告する。

【方法・結果】

ラズベリー（ヒンボートップ種、RAFZAQU）を一定環境下に保った植物工場ユニット中において、根の保持剤として砂を用い液肥（住友２号）で栽培を行った。LED を用いて栽培を行い、照射波長を制御して検討を行った。栽培した葉を新芽がでてから 1 週間から 5 週間目の生育段階に分け、それぞれを室温で乾燥を行いメタノールで抽出を行った。濃縮乾固した後、LCMS を用いて各定量分析・抗酸化活性の指標となるラジカル消去活性測定などを行った。その結果、生育段階で分けた場合は、1 週目が、総ポリフェノール量が多く、ラジカル消去活性が高かった。また照射波長では、白色 LED で栽培したときと比較して、青色 LED で栽培を行った場合、総ポリフェノール量、総プロアントシアニジン量が共に相対的に増加し、ラジカル消去活性もそれに伴い高くなった。LCMS 分析の結果、フラバン-3-オール誘導体(+)-catechin、(–)-epicatechin が縮合した 2 量体である procyanidin B4 が各生育段階で増加していたが、加水分解型タンニン系化合物が減少していた。

参考文献

1, J. Beekwilder, *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 3313 (2005).

2, M. Hamada, *et al*., *Molecules*, **20**, 18870 (2015).

3, R. Kobori, *et al*., *Metabolites*, **9**, 56 (2019).

Raspberry leaf, polyphenol, LED light

発表責任者：齊藤　安貴子（a-saito@osakac.ac.jp）

講演番号：4B08a07
講演日時：3 月 28 日 10:46～ 総合学習プラザ B08 会場

カラスビシャクのムカゴ形成過程とムカゴへの機能性多糖の蓄積

Developmental stages of the propagules of *Pinellia ternata* and the accumulation of functional polysachharides in the propagules

○栗木 淳寛[1]、下川 響[2]、江口 壽彦[3]、田中 宏幸[4,5]、松岡 健[1,2,3,6]（[1]九大農、[2]九大院生資環、[3]九大生環セ、[4]九大院薬、[5]山口理大薬、[6]九大院農）

○Atsuhiro KURIKI[1], Hibiki SHIMOKAWA[2], Toshihiko EGUCHI[3], Hiroyuki TANAKA[4,5], Ken MATSUOKA[1,2,3,6] ([1]Kyushu Univ.,Sch.Agr., [2]Kyushu Univ.,Grad.Sch.Bio-Environ.Sci., [3]Kyushu Univ.,Biotron Appl.Ctr., [4]Kyushu Univ.,Fac.Pharm., [5]Sanyo-Onoda City Univ.,Fac.Pharm., [6]Kyushu Univ.,Fac.Agr.)

カラスビシャク（*Pinellia ternata*）は、日本・中国・朝鮮半島に自生するサトイモ科草本である。その塊茎は、漢方薬の原料である生薬「半夏」に加工される。半夏は制吐作用を有し、この活性を示す成分が主に多糖アラバンであることが知られている（Maki T. *et al.*, 1987 *Planta Medica* 53, 410-414）。アラバンは連続したアラビノース残基を主鎖とする水溶性多糖であり、その生合成には複数の糖転移酵素が関わっていると考えられる。多糖合成に関わるアラビノース転移酵素はシロイヌナズナ（Harholt J. *et al.*, 2006 *Plant Physiology* 140, 49-58）やハナタバコ（Lampugnani ER. *et al.*, 2016 *Plant Physiology* 170, 1962-1974）において報告されている。しかしカラスビシャクにおいて、アラバンの生合成系は全く分かっていない。

またカラスビシャクは葉柄の途中にムカゴをつけるという特徴を持つ。ムカゴを付ける植物は一般的に葉腋や花序に付けるものが多いため、これは構造的に稀有な特徴である。ムカゴは栄養繁殖のための器官であり、これが地上に落ちると塊茎となり新たな個体をつくる。このサイクルから、後に塊茎へと変換されるムカゴにもアラバンが蓄積される可能性が考えられ、実際にムカゴから抽出した多糖画分を対象とした抗アラバンモノクローナル抗体を用いた ELISA により、ムカゴにもアラバンが蓄積していることを確認している。そこで葉柄におけるムカゴの形成と成熟過程における、アラバンの蓄積量の変化と糖転移酵素遺伝子の発現を照らし合わせることで、アラバンの生合成に関する遺伝子を絞り込むことが可能となると考えた。本研究においては、その第一歩として、ムカゴの形成過程の把握を行うこととした。

塊茎から生じた葉を対象に、1 日または 2 日置きに葉柄の長さとムカゴの直径を計測し、またムカゴの色の変化を記録した。これらの情報をもとに、ムカゴができる前の状態から葉が枯れるまでを 7 つのステージに区分した。次いで、各ステージにおけるムカゴ中のアラバン量を定量した。その結果、葉柄とムカゴの生長が完了した後のステージにおいては、ムカゴに含まれるアラバンの量には大きなばらつきが認められた。その原因を検討したところ、ムカゴの直径と含量に相関がある可能性が示唆された。

medicinal plant, functional polysaccharide, plant development

講演番号：4B08a08
講演日時：3 月 28 日 10:57～ 総合学習プラザ B08 会場

国内産生薬植物カラスビシャクの形質転換系

Trial of establish of a system for transformation from a medicinal plant *Pinellia ternata* collected in Japan

○青木 達大[1]、下川 響[1]、江口 壽彦[2]、松岡 健[1,2,3] ([1]九大院生資環、[2]九大生環セ、[3]九大院農)
○Tatsuhiro AOKI[1], Hibiki SHIMOKAWA[1], Toshihiko EGUCHI[2], Ken MATSUOKA[1,2,3] ([1]Kyushu Univ., Grad. Sch. Bio-Environ. Sci., [2]Kyushu Univ., Biotron Appl. Ctr., [3]Kyushu Univ., Fac. Agr.)

カラスビシャクの塊茎を加工した半夏はほぼ 23%の漢方処方に用いられる重要な生薬である。半夏は制吐性を有する多糖アラバンを有効成分として持つ。我々は、アラバンの生合成遺伝子の同定を目指した研究を進めており、この過程において、アラバン生合成遺伝子候補の抑制を行う実験が必須と考えている。そこで我々はまず、国内産カラスビシャクを対象に、形質転換系の構築を進めた。

三角フラスコ内に 6-BA と IAA を含む MS 液体培地を調製し、1 cm 大に切ったカラスビシャクの葉柄 8-10 断片を入れ、100 rpm, 23°C, 明所 16 時間暗所 8 時間の光周期で培養した。培養 1 ヶ月後には全断片上に不定胚が形成され、その 3 週間後には不定胚からの発芽が認められた。発芽断片を、プラントボックス内に調製した MS 固体培地(6-BA, Kinetin, D-Glucitol 含有)上で 25°C, 明所 16 時間暗所 8 時間の光周期で培養すると、1 ヶ月後に葉と葉柄が再生された。その後、ホルモン非含有培地に移すと 2 ヶ月後に発根が見られ、発根個体を新しい培地に移すことで再生個体を獲得した。

この実験と並行して、CaMV35S プロモーターの下流にイントロンを挿入したβ-グルクロニダーゼ遺伝子を持つプラスミド pIG121-Hm (Ohta S. *et al*., 1990 *Plant Cell Physiol*. 31, 805)を導入した *A. tumefaciens EHA105* 株を用いて、感染条件を検討した。*in vitro* での再生個体由来の葉片を希釈した菌液に暗所 4 日間浸漬し、次いで MS 固体培地(6-BA, 1-NAA)上で暗所 1 日間静置培養し、その後 GUS 染色液に浸して保温したところ、GUS 活性に由来する青い発色が認められた。このことは、上記アグロバクテリウムがカラスビシャク組織に感染したことを示している。

次いで、上記 2 条件を組み合わせて感染処理をした葉片を MS 固体培地(Hygromycin, Cefotaxime, 6-BA, 1-NAA 含有)上で選抜したところ、3 個体が得られた。これらの組織を用いてダイレクト PCR で *GUS* と *HPT* 遺伝子断片の増幅を行ったところ、両遺伝子に由来するバンドが見られた系統と *GUS* のバンドのみが見られた個体が存在した。各々をより選択圧の強い培地に移したところ、*GUS* のバンドのみが見られた個体は白化したが、両遺伝子に由来するバンドが見られた個体は生存した。このことは、pIG121-Hm 由来の T-DNA が導入された形質転換体の獲得を示していた。

Pinellia ternata, transformation, plant regeneration

講演番号：4B08a09
講演日時：3 月 28 日 11:08～ 総合学習プラザ B08 会場

遺伝子組換えタバコ植物を台木とした接ぎ木における穂木への外来遺伝子産物の移動
Long-distance transport of transgene products from root stocks to scion in grafted tobacco plants
○梅山 幸子[1]、宮原 平[1]、小口 太一[2]、太田 大策[3]、辻本 恭[4]、小関 良宏[4]、児玉 浩明[1]([1]千葉大院園芸、[2]筑波大生命環境、[3]阪府大院生命、[4]農工大院生命)
○ Yukiko UMEYAMA[1], Taira MIYAHARA[1], Taichi OGUCHI[2], Daisaku OHTA[3], Takashi TSUJIMOTO[4], Yoshihiro OZEKI[4], Hiroaki KODAMA[1] ([1]Grad. Sch. Horticul., Chiba Univ., [2]Faculty Life Environ. Sci., Tsukuba Univ., [3]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref Univ., [4]Grad. Sch. Technol., Tokyo Univ. Agric. Technol.)

【目的・背景】外来遺伝子を用いた育種技術において、近年新たな植物育種技術（new plant breeding techniques; NPBT）が注目されている。NPBT では最終的な成果物には外来遺伝子が含まれず、品種の育成過程もしくは栽培過程で遺伝子組換え技術を用いる。NPBT の 1 つとして、接ぎ木が挙げられる。接ぎ木とは、異なる 2 種類の植物体を切断面で接着して 1 つの個体とする技術であり、果樹では数千年前から使用されている。台木に耐病性の品種を用いることで、トマトの青枯れ病やスイカのつる割れ病のような土壌病害の回避や、乾燥や耐寒性の向上、ケイ酸吸収が著しく少ない台木用カボチャを用いることによる、キュウリのブルームの軽減による品質の向上など、有用な機能を付加することができ、ナス科やウリ科の野菜、果樹において接ぎ木は日常的な技術として利用されている。
遺伝子組換え食品は、可食部において外来遺伝子が存在しているものが対象とされ、実用化にあたっては安全性評価が義務化されている。一方、NPBT によって作り出される新たな植物は、最終産物には外来遺伝子が存在しないため、遺伝子組換え技術の使用の有無の検知は困難である。台木によって穂木の特性が変化することは経験的に知られており、接ぎ木をすることで穂木の形質を改変することが可能である。しかし、台木によって成果物の形質の改変が起こり得るにもかかわらず、成果物の安全性をどう評価するべきかまだ定まっていないのが現状である。そこで、接ぎ木により形質が改変されたモデル植物を作出し、食品としての安全を評価する上で留意すべき点を明らかにすることを目的として実験を行った。
【方法】レポーターとしてホタルルシフェラーゼを発現する形質転換タバコを台木とし、野生株タバコを穂木として用いた。それぞれ 20 cm 程度のサイズの植物を用いて、割り接によって接ぎ木を行った。
【結果・考察】接ぎ木部分から 2.8 cm 離れた穂木の葉の葉柄部分から顕著なルシフェラーゼ活性が確認された。3 cm 程度離れた葉の葉柄においても僅かながら活性が認められた。ルシフェラーゼの活性が認められた葉柄につながる葉では、ルシフェラーゼ活性はほとんど認められなかった。ルシフェラーゼの推定分子量は、約 65 kDa であることから、比較的分子量の大きいタンパク質でも台木から穂木へと移行することが示唆される。本研究では主に外来遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を用い、台木由来の外来遺伝子産物が穂木にもたらす影響について報告する。

grafting, NPBT, RdDM

発表責任者：児玉浩明（kodama@faculty.chiba-u.jp）

講演番号：4B08a10
講演日時：3 月 28 日 11:19～ 総合学習プラザ B08 会場

イネカルス抽出液を利用する無細胞翻訳システムの汎用性の検討

Versatility of cell-free translation system based on rice callus extracts

○鈴木 翔、戸澤 譲 (埼玉大学院・理工)
○Kakeru SUZUKI, Yuzuru TOZAWA (Saitama Univ.)

【背景および目的】 無細胞翻訳系は細胞抽出液を利用して試験管内で機能的なタンパク質を合成する手法であり、細胞毒性の強いタンパク質や膜タンパク質の合成、またタンパク質を少量で多種類調製することが求められる際に特に有効と考えられている系である。現在、様々な真核生物細胞由来の抽出液を用いた無細胞翻訳系が報告されており、特にコムギ胚芽抽出液を利用した無細胞翻訳系は、様々な種類のタンパク質の合成に幅広く利用されている。我々は、遺伝子組換えによる特定因子を含む、あるいはゲノム編集技術や遺伝子相同組換えにより特定の因子を除去または改変したカスタムメイド型の無細胞翻訳用細胞抽出液を調製する基盤技術構築のために、遺伝子操作技術が整備され、かつ全ゲノムが明らかになっているイネ(*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare)のカルスを材料に無細胞翻訳系の構築を進めてきた。カルスは研究室内での大量培養や抽出液の作製が容易であるなどの材料としての利点がある。これまでに、イネカルス抽出液(RCE: rice callus extract)を利用した無細胞翻訳系では一定量のタンパク質合成が可能になったことを報告してきたが、今回、RCE を用いたタンパク質合成の条件のさらなる至適化と、合成したタンパク質の精製や膜タンパク質の合成の条件検討を行い、RCE の汎用性の向上を試みた。

【材料および方法】脱分化培地においてイネ種子胚盤より誘導したカルスを継代培養し、得られた均一なカルスを液体窒素を用いて凍結破砕し、超遠心分離により S30 画分を得た。得られた抽出液と翻訳の鋳型となる mRNA を用いてタンパク質合成を行った。合成されたタンパク質は ^{14}C 標識ロイシンのタンパク質への取込み、または CBB 染色により検出した。

【結果および考察】至適化条件の検討の結果、RCE を用いた無細胞翻訳系でも数百 μg/ml 程度のタンパク質合成が可能となった。合成タンパク質は簡便な His-tag カラムでも夾雑物を含まずに粗精製可能であり、単一の mRNA から複数のタンパク質を合成する 2A peptide システムも利用できることも確認した。さらに、ヒト心筋の 127kDa のサブユニットから構成される 4 量体型の電位依存性 K+チャネル human Ether-a-go-go Related Gene (hERG)タンパク質の全長合成も可能であった。今後は組換えやゲノム編集を用いた抽出液の改良により、様々なタンパク質の合成に対応可能な無細胞翻訳系の構築を目指したい。

cell free protein synthesis, rice, callus

講演番号：4B08a11
講演日時：3 月 28 日 11:40～ 総合学習プラザ B08 会場

緑藻クラミドモナスのデンプン鞘は CO_2 濃縮機構に寄与する
Starch sheath formation is required for the CO_2-concentrating mechanism in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*
○山野 隆志、豊川 知華、福澤 秀哉（京大・院・生命）
○Takashi YAMANO, Chihana TOYOKAWA, Hideya FUKUZAWA (Kyoto Univ.)

微細藻類の光合成による一次生産は、地球上の光合成全体の約 50 %を占めることから、水圏環境における光合成を理解することは重要である。多くの藻類は、CO_2 欠乏ストレス環境においても光合成能を維持するために、膜輸送体やチャネルを用いて細胞外から葉緑体内に無機炭素を能動的に取り込み、CO_2 固定酵素 Rubisco 周囲に CO_2 を濃縮する仕組み CO_2 濃縮機構（CCM）を持つ。Rubisco は、葉緑体ストロマのピレノイドと呼ばれる構造に集積し、複数のデンプンプレートからなるデンプン鞘がピレノイドを取り囲んでいる。近年、ピレノイドは液-液相分離する膜のないオルガネラであることが示され（Freeman et al. *Cell* 2017）、ピレノイドを構成するタンパク質やその物理学的な性質がもたらす CCM への寄与が明らかになってきた。一方、デンプン鞘が CCM に寄与する可能性についても 20 年以上議論されてきたが、その生理学的な証拠はなかった。

CCM に伴って誘導される LCIB タンパク質は、CO_2 濃度の低下に伴いデンプン鞘の外側に不連続かつリング状に局在する（Yamano et al. *Plant Cell Phys* 2010）。LCIB は炭酸脱水酵素の活性中心とよく似た構造を持つことから（Jin et al. *PNAS* 2016）、LCIB は Rubisco によって固定されずにピレノイドから漏れ出た CO_2 を HCO_3^- に変換することで、葉緑体内における無機炭素プールの維持に貢献していると考えられている。我々は、LCIB の局在異常変異株をスクリーニングする中で単離したデンプン鞘を形成しない変異株 4-D1 をきっかけとして、デンプン鞘と CCM の関係性について研究を進めた。4-D1 株では、デンプン合成に必須な *Isoamylase1(ISA1)*遺伝子の第 13 イントロンに DNA タグが挿入されていた。4-D1 株のデンプン蓄積量は野生株の 1 割以下に減少し、デンプンプレートは存在せず、小さい異常デンプン粒がピレノイド周囲に存在していた。4-D1 株と同様にデンプン鞘を形成しない *sta11* 変異株でも LCIB の局在異常が観察された。一方、野生株よりもデンプンプレートが薄いがデンプン鞘は形成できる *sta2* 株では LCIB の局在は正常だった。また、4-D1 株と *sta11* 株では無機炭素への親和性は野生株に比べて有意に低下し CO_2 欠乏条件で生育が遅延したのに対して、*sta2* 株では無機炭素への親和性の低下が軽減し、生育の遅延は見られなかった。

以上の結果から、厚みのあるデンプンプレートによって形成されたデンプン鞘は、ピレノイドの CO_2 の拡散障壁として機能するだけでなく、LCIB をその周囲に正しく局在させることで、漏れ出た CO_2 を効率よく捕まえ、CCM における無機炭素への親和性の上昇に寄与していることが示唆された。

CCM, Pyrenoid, Starch sheath

発表責任者：福澤秀哉（fukuzawa@lif.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4B08a12
講演日時：3 月 28 日 11:51～ 総合学習プラザ B08 会場

緑藻クラミドモナスの脂質蓄積の制御（１）タンパク質リン酸化酵素 TAR1 の機能
Regulation of lipid accumulation in a green alga, Chlamydomonas reinhardtii (1) Function of protein kinase TAR1

新川 はるか[1]、太田 羽藍[1]、梶川 昌孝[1,2]、野村 裕子[3]、小倉 真優[4]、椹木 裕里[1]、山野 隆志[1]、中神 弘史[3]、杉山 直幸[4]、石濱 泰[4]、兼崎 友[5]、吉川 博文[5]、○福澤 秀哉[1]([1]京都大生命、[2]近畿大生命理工、[3]理研、[4]京都大薬、[5]東京農大)
Haruka SHINKAWA[1], Uran OHTA[1], Masataka KAJIKAWA[1,2], Yuko NOMURA[3], Mayu OGURA[4], Yuri SAWARAGI[1], Takashi YAMANO[1], Hirofumi NAKAGAMI[3], Naoyuki SUGIYAMA[4], Yasushi ISHIHAMA[4], Yu KANESAKI[5], Hirofumi YOSHIKAWA[5], ○Hideya FUKUZAWA[1] ([1]Kyoto Univ. Biostudies, [2]Kinki Univ., [3]RIKEN Inst., [4]Kyoto Univ. Pharma., [5]Tokyo Univ. of Agric.)

多くの微細藻は、窒素欠乏により炭素と窒素の比率（C／N 比）が上昇すると、(1)窒素化合物の輸送やその代謝酵素の誘導、(2)クロロフィルや光合成関連タンパク質の分解、(3)トリアシルグリセロール（TAG）やデンプンの蓄積、(4)配偶子誘導などが起こる。C/N ストレス条件で TAG が蓄積する機構を解明するために、我々は緑藻クラミドモナスから TAG 蓄積異常変異株 *tar1-1* を単離し、その変異原因遺伝子が、菌類、動植物に広く保存されるタンパク質リン酸化酵素 dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase（TAR1）をコードする事を示した。この TAR1 は、酢酸存在下かつ N 欠乏条件下で、TAG への蓄積を正に制御する因子であった（Kajikawa 他 *Plant Physiol*. 2015）。しかし、酢酸非存在下の光独立栄養での TAR1 の機能解明は不明であった。

そこで *tar1-1* 変異株を、５％の CO_2 を含む空気を通気して N 欠乏条件におくと、酢酸存在下の場合とは逆に、TAG の蓄積量が野生株よりも約 1.7 倍に増加した（Shinkawa 他 *Plant Cell Physiol*. 2019）。これは *tar1* 変異により、光合成関連タンパク質の分解が抑制され、野生株よりも高い生存性と光合成能を *tar1-1* 変異株が維持できることによると考えられた。C/N ストレス応答におけるタンパク質リン酸化酵素 TAR1 の機能を推定するために、*tar1-1* 変異株と野生株でトランスクリプトームを比較することで、以下の点が推定された。(1) 活性酸素（ROS）除去系の酵素遺伝子群の転写産物量が *tar1-1* 変異株で低下していた。TAR1 は C/N ストレス条件下において ROS の発生を促し、それに伴い光合成関連タンパク質の分解を促進し、光合成活性ならびに細胞生存性を負に制御する可能性が示唆された。過酸化水素の産生量が変異株で低下していた点は、この可能性と符合する。(2) 窒素欠乏で通常引き起こされる配偶子誘導が *tar1-1* 変異株で起こらず交配率が低下するのは、有性生殖の鍵因子 *MID* の発現が *tar1* 変異により誘導できないことが原因である可能性が示唆された。

さらに、TAR1 がリン酸化の標的とするタンパク質を推定する為に、また、比較リン酸化プロテオーム解析を行い、TAR1 のリン酸化標的因子を 18 個推定した。その中には、細胞分裂促進因子活性化タンパク質リン酸化酵素の上流リン酸化酵素 MLTK1 やカルシウム／カルモジュリン依存性タンパク質リン酸化酵素が含まれていた。MLTK1 は MAPKKK ファミリーメンバーに属し、リン酸化活性ドメインと GAF ドメインをもつ。この MLTK1 の挿入変異株 *mltk1-1* は、*tar1-1* と同様に C/N ストレスに応答して独立栄養条件で TAG 蓄積量が野生株の約３倍増加したことから、TAG 蓄積量が TAR1-MLTK1 のリン酸化カスケードにより制御される可能性が示唆された。

photosynthesis, C/N balance, lipid

発表責任者：福澤　秀哉（fukuzawa@lif.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4B08a13
講演日時：3 月 28 日 12:02～ 総合学習プラザ B08 会場

緑藻クラミドモナスの脂質蓄積の制御（２）タンパク質脱リン酸化酵素 PP2C3 の同定
Regulation of lipid accumulation in a green alga, Chlamydomonas reinhardtii(2) Identification of protein phosphatase PP2C3
宮本 明日香[1]、梶川 昌孝[1,2]、新川 はるか[1]、○辻 敬典[1]、山野 隆志[1]、福澤 秀哉[1] ([1]京大生命、[2]近大生命理工)
Asuka Miyamoto[1], Masataka Kajikawa[1,2], Haruka Shinkawa[1], ○Yoshinori Tsuji[1], Takashi Yamano[1], Hideya Fukuzawa[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kindai Univ.)

多くの微細藻類は、N 欠乏条件下で中性脂質 (Triacylglyerol, TAG) やデンプンを高蓄積し、クロロフィルの分解を促進して光合成を抑制するなどの応答を示す。我々はこれまで、緑藻クラミドモナスで、タンパク質リン酸化酵素 TAG accumulation regulator 1 (TAR1) が、酢酸存在下かつ N 欠乏条件（C/N ストレス条件）において、TAG やクロロフィルの蓄積を制御すること (Kajikawa et al., 2015, *Plant Physiol*)、光独立栄養条件での C/N ストレス条件下では、TAR1 が TAG の蓄積を抑制し、クロロフィル分解を促進すること (Shinkawa et al., 2019, *Plant Cell Physiol.*)を報告した。これらの研究により、TAG 蓄積量の制御におけるタンパク質リン酸化カスケードの重要性が示されたが、シグナル受容から TAG 蓄積量の制御に至る経路の全容は不明である。そこで本研究では、*tar1* 変異株（*tar1-1*）と類似した表現系を示す変異体を単離することで、C/N ストレスの検知と TAG 蓄積制御の機構を明らかにすることを目指した。

DNA タグを用いたランダム挿入変異体のライブラリから、高 CO_2（5%CO_2 通気）かつ N 欠乏条件（C/N ストレス条件）で、野生株よりも TAG 蓄積量が多い変異株 *pp2c3-1* を単離した。C/N ストレス曝露後 2 日目で TAG 蓄積量は、*tar1-1* の約 2 倍となった。また、この変異株は、C/N ストレス条件でクロロフィルの分解が抑制され、野生株より高い生存率および光合成活性を維持していた。DNA タグの挿入箇所を調べた結果、タンパク質脱リン酸化酵素をコードする *pp2c3* 遺伝子の第 1 イントロンと第 2 エキソンの境界部分が 26 塩基欠損し、その部位に 1 コピーの DNA タグが挿入されていた。また、正常な *pp2c3* 遺伝子を含むゲノム DNA 断片を変異株に導入したところ表現型が相補したことから、*pp2c3* 遺伝子が変異株 *pp2c3-1* の変異原因遺伝子であることが明らかになった。細胞内局在を調べるために、Venus と融合した PP2C3 をクラミドモナスで発現させたところ、Venus の蛍光は細胞質に局在した。

先行研究で同定されたタンパク質リン酸化酵素 TAR1 に加え、本研究ではタンパク質脱リン酸化酵素 PP2C3 が高 C/N ストレス下で TAG 蓄積を抑制することが判明し、TAG 蓄積制御におけるリン酸化カスケードの重要性が示唆された。今後は、TAR1 によってリン酸化を受けるタンパク質や、PP2C3 によって脱リン酸化を受けるタンパク質を同定することで、C/N 比の変動を検知するリン酸化カスケードの全容解明が期待される。また、陸上植物ではアブシジン酸を介したシグナル伝達系に PP2C3 が関与することから、同様の機構が緑藻でも保存されている可能性が示唆された。

photosynthesis, C/N balance, kinase cascade

講演番号：4B08a14
講演日時：3 月 28 日 12:13～ 総合学習プラザ B08 会場

緑藻クラミドモナスの脂質蓄積の制御（３）脂質蓄積異常株 bbs9-1 の解析
Regulation of lipid accumulation in a green alga, *Chlamydomonas reinhardtii* (3) Analyses of a lipid-accumulating mutant ,*bbs9-1*
○木下 あかり[1]、辻 敬典[1]、新川 はるか[1]、梶川 昌孝[1,2]、山野 隆志[1]、福澤 秀哉[1] ([1]京大生命、[2]近畿大)
○ Akari KINOSHITA[1], Yoshinori TSUJI[1], Haruka SHINKAWA[1], Masataka KAJIKAWA[1,2], Takashi YAMANO[1], Hideya FUKUZAWA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kindai Univ.)

多くの藻類は、窒素欠乏環境においてトリアシルグリセロール (TAG) やデンプンを高蓄積し、クロロフィルの分解など様々な応答を示す。微細藻類を利用したバイオ燃料生産は、代替エネルギー生産手段として着目されているが、C/N バランスの変動を感知して TAG 蓄積量を制御する機構はまだ十分に解明されていない。我々は、緑藻クラミドモナスを用い、C/N バランスに応じて TAG 蓄積量を制御する因子として、Dual-specificity Tyrosine phosphorylation-Regulated Kinase (DYRK) 型タンパク質リン酸化酵素の一種 TAG accumulation regulator 1 (TAR1) を同定した (Kajikawa 他 Plant Physiol. 2015)。*tar1* 変異体 (*tar1-1*) が独立栄養かつ窒素欠乏条件で、TAG を培養液あたり野生株の 1.7 倍蓄積し、クロロフィルおよび光合成活性を野生株よりも高く維持したことから、TAR1 は高 C/N 条件下で TAG 蓄積および光合成を抑制することが明らかになった (Shinkawa 他 Plant Cell Physiol. 2019)。しかし、TAR1 を介したキナーゼカスケードの全体像や、TAR1 以外の TAG 蓄積制御因子については、不明な点が多く残されている。

本研究では、TAG 蓄積量の制御を担う新規因子を明らかにするために、独立栄養かつ窒素欠乏条件において、次の①～③の基準を満たす変異体を 23 株取得した。①TAG 蓄積量が *tar1-1* よりも多く、②デンプン蓄積量が野生株の 50%以上、③クロロフィル残存量が野生株の 10 倍以上。さらにサザンブロット法により、単一コピーの DNA タグが挿入された 13 株を選抜した。Tail-PCR により DNA タグの挿入位置を調べたところ、13 株のうち 1 株では、*Bardet-Biedl syndrome 9* (*BBS9*) 遺伝子に DNA タグが挿入されていた。BBS9 は、鞭毛基部に局在するタンパク質複合体 BBSome の構成因子で、鞭毛や繊毛を保持する生物に広く保存されている。クラミドモナスの BBS9 は、質量 113 kDa の可溶性タンパク質で、オルガネラ移行シグナルや膜貫通ヘリックスは持たず、タンパク質間相互作用に寄与する β プロペラ構造を保持することが予測された。哺乳類では、BBSome が繊毛内外への受容体タンパク質の輸送を担うことが示されており、BBSome を構成するタンパク質の欠損により嗅覚や視覚に異常をきたすことが報告されている。またクラミドモナスにおいても、BBSome を構成するタンパク質の欠損により、走光性に異常が生じることが知られている。今後は、BBS9 が TAG 蓄積量の制御にどのように関与するかについて調べる予定である。

photosynthesis, C/N balance, lipid

講演番号：4B08a15
講演日時：3 月 28 日 12:24～ 総合学習プラザ B08 会場

水耕栽培におけるリン酸イオン，カリウムイオン及び硝酸イオンの自動濃度管理システムの構築
Automatic Management of Nutrient Solution for Hydroponics-Construction of multi-ion stat-

○徐 克彬、阿黒 達也、北隅 優希、加納 健司、白井 理 (京大院農)
○Kebin XU, tatsuya aguro, yuki kitazumi, kenji kano, osamu shirai (Kyoto Univ.)

気象、気候に左右されず、虫害や病原菌による影響を受けにくい水耕栽培は、近年植物工場の中核技術として利用されている。培養液中の養分濃度をモニタリングし、濃度を最適条件に制御できれば生産力および品質の向上が期待される。とくに植物の生育に必須とされる窒素、カリウム、リンを含む培養液の自動管理システムが構築できれば、非常に有用であると考えられる。分光法やクロマトグラフィーとは異なり、前処理を必要とせず、その場でそのまま分析できるイオンセンサは分析法として非常に魅力的である。しかも、持ち運びが簡単で、連続測定が可能であるため有用な手法である。しかし、水耕栽培で主な栄養成分と想定される K^+、NO_3^-、$H_2PO_4^-$のうち、K^+については特性が良く安定なイオンセンサが実用化されているが、NO_3^-および $H_2PO_4^-$についてのイオンセンサは考案されてはいるものの安定性が低く、あまり利用されていなかった。演者らは NO_3^-および $H_2PO_4^-$のイオンセンサの改良に成功したため、本研究ではこれらのセンサを利用して栄養成分の自動管理システム（イオンスタット）の構築を試みた。

本研究では、NO_3^--イオン選択性電極（ISE）と K^+-ISE としては、液膜型の感応膜を用いた電極を利用した。NO_3^-感応膜として、tetraheptylammonium nitrate ($[THpA^+][NO_3^-]$) および nitrophenyl octyl ether (NPOE) を含む polyvinyl chloride (PVC) 薄膜を、K^+感応膜としては、potassium tetrafluorophenyl borate と valinomycin および NPOE を含む PVC 薄膜を用いた。$H_2PO_4^-$-ISE としてはコバルト金属の表面にリン酸化合物 $[Co_3(PO_4)_2 \cdot 8H_2O]$ を電析した電極を使用した。作製した全ての ISE は、10^{-5} ~ 10^{-1} M の濃度領域で各イオン濃度の対数に対して線型に応答した。応答時間は数秒以内であり、共存イオンに対する選択性や安定性もよいことを確認した。

作製した ISE を利用して培養液中の各イオン (K^+、NO_3^-、$H_2PO_4^-$) 濃度のモニタリングを行い、小松菜の生育と伴う各イオンの吸収を確認した。さらに、自動的に栄養成分濃度を一定に保持する植物肥料管理システム (イオンスタット) の構築を試みた。イオンスタットは、作製したイオン選択性電極の電位応答から濃度変動を評価し、濃度が設定した閾値以下になると各イオンを高濃度に含む水溶液を一定量自動的に添加するように設計した。実際に植物の吸収により培養液中の各栄養成分の濃度が閾値まで下がると、肥料溶液が添加され、培養液中の栄養成分濃度をほぼ一定値に制御できることを確認した。

Hydroponics, Ion selective electrode, Ion stat.

講演番号：4B09a01
講演日時：3 月 28 日 09:30～ 総合学習プラザ B09 会場

Osatg7 と高温登熟被害米の完熟種子におけるプロテオーム比較解析

Comparative proteomic analysis in mature grains of *Osatg7* and high temperature damaged rice

○金古 堅太郎[1]、瀬倉 茉莉[1]、岡本 裕哉[1]、花俣 繁[2]、バスラム マルワン[2]、朽津 和幸[3]、三ツ井 敏明[2]（[1]新潟大院・自然科学、[2]新潟大農・応生化、[3]東京理科大理工・応用生物）

○Kentaro Kaneko[1], Mari Sekura[1], Yuuya Okamoto[1], Sigeru Hnamata[2], Marouane Baslam[2], Kazuyuki Kutitsu[3], Toshiaki Mitsui[2] ([1]Grad. Sch. Sci. & Tech., Niigata Univ., [2]Dept. Applied Biol. Chem., Niigata Univ., [3]Dept. Applied Biol. Sci., Tokyo Univ. of Sci.)

イネの登熟期に高温に曝されることで米が白濁化する高温登熟被害が発生する。ここ数年の夏場の高温は、コメどころ新潟の米生産に多大な影響して及ぼしている。特に 2019 年の新潟県産のコシヒカリの一等米率は 20%となり、米生産地新潟県の地位を危うくしている。我々は以前から高温登熟被害米の研究を続けており、高温登熟被害米のプロテオーム解析から白濁部での Amylase アイソザイム、HSP の増加を報告した。そして、高温でも高温登熟被害米の出にくい栽培技術として、登熟前から初期にかけて潅水に過酸化水素を添加する栽培で、高温登熟被害米の低減ができること、登熟中胚乳において、*HSP*、*CAT* の発現上昇と *Amylase アイソザイム*遺伝子が発現低下することで高温登熟被害米の発生を低減できることを報告してきた。

一方で、登熟中のイネに過酸化水素水を与えることで胚乳中のオートファジー活性の指標となる NBR タンパク質レベルが減少していた。そのため、潅水による過酸化水素処理は胚乳のオートファジー活性を高めることができることが示された。さらにイネオートファジー欠損変異体である *Osatg7* の完熟種子は、高温登熟被害米と同様は白濁し、胚乳の高温障害とオートファジーの関連が示唆された。そこで *Osatg7* の完熟種子のプロテオーム解析を行い、以前の高温登熟被害米のプロテオームとの比較を行った。その結果、*Osatg7* 種子のプロテオームは高温登熟被害米と類似した。Amylase アイソザイム、HSP の発現上昇、Sucrose synthase の発現低下を示した。またカタラーゼの発現上昇が *Osatg7* のみ見られた。これらの結果から、高温登熟被害は高温による胚乳のオートファジーの機能低下によって引き起こされると可能性が考えられる。

proteome analysis, heat stress, rice

発表責任者：金古 堅太郎（k-neko@gs.niigata-u.ac.jp）

講演番号：4B09a02
講演日時：3 月 28 日 09:41～ 総合学習プラザ B09 会場

シロイヌナズナの熱ショック応答に及ぼす塩の影響に関する研究

A Study on the effect of salt on heat shock response in Arabidopsis

○坂本 陽[1]、原 正和[1,2] ([1]静岡大院総合、[2]静岡大グリーン研)
○Yo SAKAMOTO[1], Masakazu HARA[1,2] ([1]Shizuoka Univ., [2]Shizuoka Univ. RIGST)

【背景】植物の高温ストレス応答には、熱ショックタンパク質（HSP）の発現、適合溶質の蓄積、活性酸素種消去系の活性化等がある。その中でHSPの誘導はほとんどの植物で顕著に起こる現象であり、植物の熱耐性の向上に重要な役割を担っている。植物が熱ストレスを受けてから、HSP を発現するまでの過程を熱ショック応答（HSR）といい、その機構が研究されている。近年、高温耐性と他のストレス耐性との相関が調査されている。しかし、高温耐性と塩耐性との相関関係に関する一致した見解は得られていないのが現状である。そこで本研究では、高温耐性の指標としてのHSRが、塩によってどのように制御されているかを調査した。
【結果・考察】HSP 遺伝子プロモーターの下流にGUS遺伝子を連結したコンストラクトを導入したシロイヌナズナに、熱や塩による処理を行った。その後、GUS活性を測定し、各処理によるHSR誘導活性を評価した。すると MS 培地などで広く用いられる塩のほとんどにおいて、一定濃度以上でHSRの誘導が抑制された。しかし、熱と塩を処理するタイミングが適切ではないと抑制は起きないため、処理のタイミングの違いが過去の研究結果の差異をもたらしたと考えられる。また、多くの塩の中で$CaCl_2$のみがHSRの誘導を抑制しなかった。$CaCl_2$を他の塩と組み合わせて処理した場合、塩によるHSR誘導の抑制が緩和された。また、生体内でのCa^{2+}の働きを阻害する物質を用いてGUS活性を測定した結果、Ca^{2+}は、HSR自体に必須ではないが、塩によるHSR誘導阻害からの回復に関わっていることが分かった。次に、シロイヌナズナの高温耐性をクロロフィル含量によって評価したところ、塩によって低下した高温耐性が、Ca^{2+}によって回復することを確認した。これにより、熱と塩の複合ストレスは、熱ストレス単独よりも、植物の生育に深刻な影響を及ぼすが、その負の影響はCa^{2+}の投与によって緩和されることが判明した。最後に、シロイヌナズナからのCa^{2+}の漏出を蛍光法によって測定したところ、塩で処理したシロイヌナズナでは、水のみの場合と比べ、Ca^{2+}の漏出が亢進していた。よって、塩は植物体のCa^{2+}を枯渇させることにより、HSRの誘導を阻害している可能性が示された。
以上より、植物に一定以上の濃度の塩を与えると、HSRが阻害されることが分かった。この時Ca^{2+}が漏出するが、あらかじめ外部からCa^{2+}を投与することにより、塩によるHSRの阻害は緩和された。従って、植物のHSRの制御には、Ca^{2+}が重要である可能性が示唆された。

heat stress, salt stress, stress combination

講演番号：4B09a03
講演日時：3 月 28 日 09:52～ 総合学習プラザ B09 会場

新規ミトコンドリア阻害剤 FSL0260 は植物の耐塩性を強化する
Inhibition of mitochondrial complex I by the novel compound FSL0260 enhances high salinity-stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* and rice

○佐古 香織[1,2]、二村 有史[2]、清水 猛[2]、松井 章浩[2]、平野 裕之[2]、近藤 恭光[2]、室井 誠[2]、青野 晴美[2]、田中 真帆[2]、本田 香織[2]、清水 謙志郎[2]、川谷 誠[2]、中野 雄司[2]、長田 裕之[2]、野口 航[3]、関 原明[2]（[1]近大農、[2]理研 CSRS、[3]東京薬大生命）
○ Kaori SAKO[1,2], Yushi Futamura[2], Takeshi Shimizu[2], Akihiro Matsui[2], HIroyuki Hirano[2], Yasumitsu Kondoh[2], Makoto Muroi[2], Harumi Aono[2], Maho Tanaka[2], Kaori Honda[2], Kenshirou Shimizu[2], Makoto Kawatani[2], Takeshi Nakano[2], Hiroyuki Osada[2], Ko Noguchi[3], Motoaki Seki[2]
([1]Kindai Univ., [2]RIKEN CSRS, [3]Tokyo Univ. Pharm. Life Sci.)

塩害は津波や乾燥地における過剰な灌漑が原因で発生する環境ストレスである。現在、世界の灌漑農地の約 20%で発生し発生し、農作物の生育や収量に甚大な被害をもたらしている。2050 年には世界人口が 90 億人を突破すると予測されていることからも、持続的な食料生産実現のためには農作物の高塩ストレス耐性を高める技術の開発が求められている。

我々は理研ケミカルライブラリーNPDepo を用いて植物の耐塩性を高める化合物の探索を実施した。シロイヌナズナを用いて約 400 種の化合物をスクリーニングした結果、耐塩性を強化する新規化合物 FSL0260 を同定した。トランスクリプトーム解析によって FSL0260 はミトコンドリアの代替呼吸系路の遺伝子 *AtAOX1a*、*AtNDB4* の発現を増加させることを見出した。これら遺伝子の発現はミトコンドリア電子伝達系の阻害によって誘導されることが報告されていたことから、FSL0260 によるミトコンドリア阻害活性を検証した。その結果、FSL0260 はミトコンドリア電子伝達系複合体 I の阻害剤であることを明らかにした。さらに、代替呼吸系は活性酸素除去に機能することから活性酸素の蓄積を検証したところ、FSL0260 は塩ストレスによって誘導される活性酸素を抑制することが示された。また、FSL0260 はシロイヌナズナのみならず、イネにおいても活性酸素を除去することで耐塩性を高めることを明らかにした。

Salt stress, mitochondrial inhibitor, *Arabidopsis thaliana*

講演番号：4B09a04
講演日時：3 月 28 日 10:03～ 総合学習プラザ B09 会場

強光ストレス下の植物におけるアスコルビン酸再生機構
Ascorbate recycling in plants under high light stress

○田中 澪[1]、寺井 佑介[2]、上野 祐美[1]、小川 貴央[1,2]、宮城 敦子[3]、川合 真紀[3]、石川 孝博[1,2]、丸田 隆典[1,2] ([1]島根大院・自然科学、[2]島根大・生資科・生命工、[3]埼玉大・理工)
○Mio TANAKA[1], Yusuke TERAI[2], Hiromi UENO[1], Takahisa OGAWA[1,2], Atsuko MIYAGI[3], Maki KAWAI-YAMADA[3], Takahiro ISHIKAWA[1,2], Takanori MARUTA[1,2] ([1]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Shimane Univ., [2]Dept. Life Sci. Biotechnol., Fac. Life Environ. Sci., Shimane Univ., [3]Grad. Sch. Sci. Eng., Saitama Univ.)

［背景］植物はアスコルビン酸を高濃度に蓄積する。その含量は葉などの光合成組織で特に顕著であり、環境ストレス条件でさらに増加する。アスコルビン酸は水溶性抗酸化剤であり、自身の優れた活性酸素種の消去能力に加え、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ（APX）反応やビタミン E 再生への電子供与体としての作用を有し、環境ストレス下での細胞内レドックス制御に極めて重要である。アスコルビン酸は一電子酸化によりモノデヒドロアスコルビン酸（MDHA）となり、このラジカル分子の不均化反応によって二電子酸化型のデヒドロアスコルビン酸（DHA）が生じる。これらの酸化型は不安定であり、アスコルビン酸の高蓄積には酸化型から還元型への再生が不可欠である。

植物は MDHA および DHA にそれぞれ特異的な還元酵素（MDAR および DHAR）を有し、これらの酵素は NADH および還元型グルタチオン（GSH）をそれぞれ電子供与体とする。シロイヌナズナには、それぞれ 5 つおよび 3 つの MDAR および DHAR が存在し、さまざまな細胞内コンパートメントに局在しているが、これらの酵素の再生酵素としての重要性はほとんど未解明である。そこで本研究では、シロイヌナズナのアスコルビン酸再生酵素の包括的な逆遺伝学的解析を行った。

［結果］まず DHAR に着目し、3 つの DHAR 全てを欠損させた三重破壊株（Δ*dhar*）を作出した。Δ*dhar* は DHAR 活性をほとんど示さなかったが、弱光条件では野生株レベルのアスコルビン酸含量を保持した。野生株では強光照射にともなって著しいアスコルビン酸レベルの増加が見られたが、この増加はΔ*dhar* で部分的に阻害されることがわかった。しかし、阻害の程度はわずか（20%未満）であり、野生株とΔ*dhar* の強光ストレス感受性は同程度であった。GSH は DHAR 反応の電子供与体であるが、GSH 自身も DHA 還元能力を有する。この非酵素反応が DHAR の欠損を補う可能性について検証するため、GSH 欠乏株（*pad2*）とΔ*dhar* の四重変異株を作出した。その結果、弱光条件におけるアスコルビン酸含量は野生株とΔ*dhar pad2* で同程度であったが、強光照射下でのアスコルビン酸の蓄積は四重変異株でほぼ完全に抑制された。また、強光下のΔ*dhar pad2* ではアスコルビン酸分解産物（L-トレオン酸）の高蓄積および顕著な葉のブリーチングが認められたことから、GSH 依存的な酵素反応（DHAR）および非酵素反応の協調がアスコルビン酸の高蓄積および強光ストレス耐性に必要不可欠であることが示された。現在、MDAR を個々または複数欠損させた変異株ラインを用いて同様の検証を試みている。

Ascorbate recycling, Arabidopsis, High light

発表責任者：丸田隆典（maruta@life.shimane-u.ac.jp）

講演番号：4B09a05
講演日時：3 月 28 日 10:14～ 総合学習プラザ B09 会場

微細藻類ユーグレナにおけるカロテノイド合成酵素の機能解析と抗酸化系における役割

Functional analysis of carotenoid biosynthetic enzyme and role on antioxidant system in *Euglena gracilis*

○玉木 峻[1]、石川 孝博[2]、篠村 知子[1] ([1]帝京大・理工・バイオ、[2]島根大院・自然科学)
○Shun TAMAKI[1], Takahiro ISHIKAWA[2], Tomoko SHINOMURA[1] ([1]Dept. Biosci., Sch. Sci. Eng., Teikyo Univ., [2]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Shimane Univ.)

【研究背景】

カロテノイドは微生物から動植物まで広く分布する黄～赤色の色素分子であり、光合成における集光、酸化ストレス防御、光走性の制御等に関与することが知られている。本研究グループは、微細藻類ユーグレナ（*Euglena gracilis*）のカロテノイドが強光ストレス応答[1]や光走性の開始[2]に重要であることを明らかにしてきた。同時に、ユーグレナのカロテノイド合成経路の解明を進めており、これまでの研究により、イソペンテニル二リン酸からリコペンへの反応を触媒する *EgcrtE*、*EgcrtB*、*EgcrtP*、*EgZ-ISO*、*EgcrtQ* 遺伝子[1,3,4]、β-カロテンから β-クリプトキサンチンへの反応を触媒する *EgCYP97H1* 遺伝子[5]を同定した。また、ユーグレナではカロテノイド合成と抗酸化酵素アスコルビン酸ペルオキシダーゼ（APX）の光誘導との相関も示唆されている[6]。そこで本研究では、リコペンから β-カロテンへの反応を触媒するリコペン環化酵素（EgLCY）の機能解析および抗酸化系の光誘導における役割解明を試みた。

【結果および考察】

ユーグレナトランスクリプトームデータから *EgLCY* cDNA 配列を取得し、クローン化した。リコペン蓄積大腸菌に *EgLCY* 遺伝子を異種発現させ、カロテノイドの HPLC 分析を行ったところ、β-カロテンの蓄積が確認されたことから、EgLCY がリコペン環化活性を持つことが示された。エレクトロポレーション法によりユーグレナ細胞に二本鎖 RNA を導入し、*EgLCY* ノックダウン細胞を作出したところ、*EgLCY* ノックダウン細胞は白化し、葉緑体の縮退が観察され、増殖速度が顕著に低下した。また、*EgLCY* ノックダウン細胞のクロロフィルおよびカロテノイド含量はそれぞれコントロール細胞の 91、74%低下した。さらに、*EgLCY* ノックダウン細胞の APX 活性はコントロール細胞の 52%低下した。これらの結果から、EgLCY はユーグレナのカロテノイド合成を触媒し、正常な細胞増殖、葉緑体発達、抗酸化系の光誘導に重要な役割を果たすことが示唆された。現在、*EgLCY* ノックダウンが APX 以外の抗酸化系の光誘導に及ぼす影響について解析を進めている。

【参考文献】

[1]Kato *et al. Plant Cell Physiol.* (2019); [2]Kato *et al. Plant J. in press*; [3]Kato *et al. BMC Plant Biol.* (2016); [4]Sugiyama *et al. Plant Cell Physiol. in press*; [5]Tamaki *et al. Plant Sci.* (2019); [6]Madhusudhan *et al. Plant Sci.* (2003).

Euglena gracilis, Carotenoid, Antioxidant system

発表責任者：篠村知子（shinomura@nasu.bio.teikyo-u.ac.jp）

講演番号：4B09a06
講演日時：3 月 28 日 10:35～ 総合学習プラザ B09 会場

シロイヌナズナ *CONSTANS-LIKE* 遺伝子が葉緑体発達に及ぼす影響

Roles of *CONSTANS-LIKE* genes in chloroplast development of Arabidopsis

○木下 寛子、稲葉 靖子、稲葉 丈人（宮崎大農）
○Hiroko KINOSHITA, Yasuko ITO-INABA, Takehito INABA (Univ. Miyazaki)

葉緑体に代表されるプラスチドの起源は、細胞内共生したシアノバクテリアであると考えられている。進化の過程で、シアノバクテリアが持っていた遺伝子の多くは核ゲノムに移行した。そのため、プラスチドの機能発現には核ゲノムにコードされたプラスチドタンパク質遺伝子の発現と、遺伝子産物のプラスチド内への輸送が不可欠である。一方で、外部環境や細胞内環境の変化でストレスを受けたプラスチドが、プラスチド機能と核遺伝子発現を協調させるためのシグナルである「プラスチドシグナル」の存在も明らかになりつつある。このように、プラスチドの分化、発達、維持はプラスチドと核間の複雑な相互作用により制御されている。

シロイヌナズナでは、様々なシグナルに応答して葉緑体の発達を調節する因子として、GOLDEN2-LIKE1（GLK1）が知られている。GLK1 は光合成関連遺伝子の発現を誘導する転写因子であり、葉緑体の発達に不可欠であると同時に、プラスチドシグナルの伝達にも関与している。近年の研究により、GLK1 とストレス応答が類似している転写因子として CONSTANS-LIKE 6（COL6）及び COL16 が同定された。*COL* は開花制御遺伝子 *CONSTANS*（*CO*）に類似した構造を持つ遺伝子で、*CO* は花芽形成の光周期依存促進経路における最も重要な遺伝子と考えられている。しかし当研究室の先行研究により、*col6col16* 二重変異体は開花時期に異常が見られず、その一方で本葉のクロロフィル含量が野生型より高いことが明らかになった。

そこで本研究では COL6 及び COL16 が開花制御よりは葉緑体発達に何らかの役割を果たしているという仮説を立て、分子生物学及び生化学的手法を用いて実験を行った。まず、野生型、*col6col16* 二重変異体、*glk1glk2* 二重変異体、*col6col16glk1glk2* 四重変異体を用いて COL6 及び COL16 が本葉のクロロフィル含量や葉緑体関連遺伝子の発現に及ぼす影響を調査した。次に、これら 2 つのタンパク質が転写レベルで葉緑体関連遺伝子を制御しているか調べるために、レポーター遺伝子を用いてプロトプラストにおける一過的発現解析を試みた。その結果、COL6 および COL16 タンパク質は *LHCB*、*TIC110*、*TOC33*、*GLK1* などのプロモーターを介してレポーター遺伝子の発現を抑制した。これらの結果は、COL6 及び COL16 がシロイヌナズナの本葉において葉緑体形成に負の影響を与えることを示唆した。さらに、RNA-seq により *col6* および *col16* 変異がシロイヌナズナの遺伝子発現に及ぼす影響を網羅的に解析したため、併せて報告する。

Arabidopsis, CONSTANS-LIKE, chloroplasts

講演番号：4B09a07
講演日時：3 月 28 日 10:46～ 総合学習プラザ B09 会場

緑色光吸収型フィトクロムによる葉面積拡大にともなう成長促進

Growth promotion with leaf area expansion by green light-absorbing phytochrome

○吉原 静恵、徳本 勇人（阪府大理）
○Shizue Yoshihara, Hayato Tokumoto (Osaka pref Univ)

葉の表層に到達する可視光のうち 25%を占める赤色光は、葉緑体でクロロフィルに吸収されて光合成反応に利用されると同時に、核のフィトクロムを活性化して光合成装置を発動する。一方、葉の裏側の細胞に届く可視光に含まれる赤色光は 1%にまで減少する。このような光環境で生育する葉の裏側の細胞では、赤色光の不足によって葉緑体における光合成反応は停滞し、核ではフィトクロムが不活性化するため、光合成装置は発動しない。

クロロフィルによる光エネルギーの吸収率は、赤色光が最も高いとされているが、緑色光は葉の内部を何度も散乱して吸収されるため、光合成反応の量子収率は、赤色光と緑色光は同程度になることが知られている。他方、表層と裏側の葉の細胞には赤色光と同量の緑色光が到達している。そこで、フィトクロムを緑色光で活性化するように改変すれば、表層に加えて裏側の細胞でもフィトクロムが光合成装置を稼働し、光合成生産量を増加することができると構想した。

本研究では、葉の裏側の細胞でフィトクロムを活性化するために、植物において、主要な機能を持つフィトクロム B（phyB）の発色団結合領域を、プラシノ藻の緑色光吸収型フィトクロム PHY1 のものと入れ換えることによって改変し、シロイヌナズナ phyB 欠損株に導入した（GphyB 株）。GphyB 株と野生株を比較することにより、GphyB の導入が植物の光合成生産を向上する可能性を検証した。

白色光下で 3 週間生育した結果、GphyB 株の個体あたりの葉の面積は、野生株の 1.2 倍に増加した。また、GphyB 株の含水率 90%は野生株の 89%と同等の値を示しながら、GphyB 株は個体あたりの生重量が野生株の 1.6 倍に増加した。また、緑色 LED を用いた解析によって、この生重量増加は、緑色光によって引き起こされることも確認している。一方、生重量あたりのクロロフィル量は、野生株が 80.5 μg を示したのに対して、GphyB 株のそれは 75.0 μg であり、顕著な差は見られなかった。以上の結果から、GphyB の導入は、細胞あたりのクロロフィル量も、葉の厚さを変えず、表面積を大きくする成長をさせたと考えられる。また、GphyB の導入により、個体あたりの光合成生産量は 1.6 倍まで有意に増加したが、表層と裏側の細胞全てが緑色光をフィトクロム活性化に利用し、細胞の倍加時間を 2 日とした 3 週間の生育では、葉の面積が 1.2 倍に増加すると生育量が 1.6 倍と推算できる。従って、赤色光受容体を GphyB に入れ換える改良は、葉の裏側に局在する細胞でフィトクロムを活性化させ、その結果、光合成装置が駆動し、植物の光合成生産量を増強させたと考えられる。

phytochrome, chlorophyll, green light

発表責任者：吉原　静恵（yoshihara@b.s.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：4B09a08
講演日時：3 月 28 日 10:57～ 総合学習プラザ B09 会場

シロイヌナズナ根の細胞膜を介した低温感受による気孔開閉と光合成効率への影響

Arabidopsis root cold perception via cell membrane influences stomatal opening and photosynthetic efficiency

○菅原 拓也、陽川 憲 (北見工業大学)
○Takuya SUGAWARA, Ken YOKAWA (Kitami Institute of Technology)

低温環境は植物にとって環境ストレスとなり、傷害を引き起こすことが知られている。気温だけでなく、地温も同様に刻々と季節間・日中で変化し、低温環境では地下の根の伸長が抑制される。根は養分や水分の吸収に重要な役割をもつので、根細胞・組織による低温ストレス感知と適応は重要であるが、そのメカニズムについては不明な点が多い。さらに、植物の低温感知で一般的に見られる葉の光合成効率低下や気孔閉鎖について根の機能に着目した研究は少ない。

今回、シロイヌナズナ根を用いて低温処理を行い、低温応答遺伝子解析、根の細胞膜観察、葉部における光合成効率と気孔の状態について解析を行った。また、細胞膜に作用することによって低温応答を模倣するといわれる低濃度のジメチルスルホキシド（DMSO）処理を行い、同様の解析を実施した。結果として、4℃処理と同様に、室温の DMSO 処理においても低温馴化に関連する CBF(C-repeat Binding Factor)遺伝子群の発現誘導が確認された。また、Di-4-ANEPPDHQ 蛍光プローブによる根端メリステム付近の表皮細胞膜の流動性観察では、低温状態で見られる細胞膜の硬化が、室温での DMSO 処理によっても引き起こされることが分かった。シロイヌナズナ根のみへ低温処理を施し、葉の気孔のレプリカ法による顕微鏡観察を行ったところ気孔の開閉に変化が見られ、また、Junior-PAM による測定では光合成効率にも影響が見られた。

本結果に基づいて、根の初期低温感知による細胞膜状態変化から、根―シュート間情報伝達と、葉部での代謝制御にいたるメカニズムについて議論する。

root cold response, membrane, stomata

発表責任者：陽川憲（yokawaken@mail.kitami-it.ac.jp）

講演番号：4B09a09
講演日時：3 月 28 日 11:08～ 総合学習プラザ B09 会場

トウモロコシ根の光応答：根端の異なる領域間での代謝物比較解析
Maize root light response: Comparison of metabolites from three different regions in root apex
○陽川 憲[1]、Frantisek Baluska[2]、Stefano Mancuso[3] ([1]北見工大、[2]ボン大学、[3]フィレンツェ大学)
○Ken YOKAWA[1], Baluska Frantisek[2], Mancuso Stefano[3] ([1]Kitami Inst. Tech., [2]Univ. Bonn, [3]Univ. Florence)

光は植物にとって重要な環境因子のひとつである。植物は生育環境において刻々と変化する光の方向や強度を感じ、成長速度や方向を変化させる、光屈性を有している。植物の根も地上部と同様に、光に対する屈性を示すことが知られている。興味深いことに、地上部に発現している光受容体の全ては、光の届かない土中に生育する根、特に根端部に常時発現している。

発表者はこれまでに、トウモロコシの根が、光の刺激を受けないと重力屈性が開始しないことを見出した。光照射による根端でのオーキシン生合成の結果、重力に応答できることを報告した［Suzuki et al., J Exp Bot, 2016, 67: 4581-91.］。しかし、根が光に応答する間の根端で進行する生理学的プロセスの詳細については明らかになっていない。

今回、既報のオーキシンのほか、光照射間の根端における代謝物の状態を網羅的に明らかにするために、NMR メタボロミクスによる解析を実施した。１時間の光照射処理を行ったトウモロコシ根を先端から３つの領域（根冠～メリステム、移行帯、伸長帯）に分割し比較解析を行った結果、それぞれの部位特異的に、アミノ酸、糖、核酸などの低分子化合物の有意な増減が光によって制御されることが見いだされた。また、PTR-TOFMS(プロトン移動反応質量分析計)を用いた、光照射下におけるトウモロコシ根から揮発される成分のリアルタイム分析の結果についても報告する。今回発見された分子による、根の光応答・屈性への関わりについて議論したい。

Root light response, Maize, metabolomics

発表責任者：陽川　憲（yokawaken@mail.kitami-it.ac.jp）

講演番号：4B09a10
講演日時：3 月 28 日 11:19～ 総合学習プラザ B09 会場

根分泌物を介したシロイヌナズナ個体間の相互作用

A novel mode of plant-plant communication through root exudates

○村田 純、渡辺 健宏、小村 啓（公益財団法人 サントリー生命科学財団）
○ Jun MURATA, Takehiro WATANABE, Hajime KOMURA (Suntory Foundation for Life Sciences)

近年の研究から、植物とその根圏に生育する土壌微生物とは密接に相互作用していることが明らかとなってきた。ところが根粒菌や AM 糸状菌、特定の病原菌などの例を除き、植物がその他大多数の土壌微生物とどのように相互作用しているのか、未解明な点が多く残されている。我々はシロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）とバチルス属微生物（*Bacillus* spp.）とを共培養すると、そのような共培養をしない場合と比較して、主根伸長が阻害される、あるいは顕著な場合は枯死するなど、シロイヌナズナの生長が微生物由来の因子により抑制されることを見出した。主根伸長抑制活性を指標にしたバイオアッセイに基づいて微生物粗抽出液を分画・精製し、活性画分の GC-MS 分析を行った結果、活性化合物の候補として短鎖脂肪酸を見出した。当該化合物の標品をバイオアッセイに供した結果、同脂肪酸はシロイヌナズナの主根伸長を抑制するため、植物生長抑制活性を持つことが示された。

さらに、前培養した 15 個体のシロイヌナズナを 0.5x MS 寒天培地に一列に並べて移植し同バイオアッセイに供した場合、微生物に相対的に近い植物個体（P）のほうが遠い植物個体（D）よりも顕著に植物生長抑制を受ける様子が観察された。当初我々はこの結果を、微生物由来の植物生長抑制因子に対する濃度依存的な応答、つまり微生物から近い位置の植物個体は遠い位置の植物個体と比べて、より高濃度の活性因子の暴露を受けた結果だと捉えていた。しかし興味深いことに、P と D の間の 0.5x MS 寒天培地を除去して微生物とシロイヌナズナを共培養すると、寒天培地を除去しない場合と比べて D の植物の生育が著しく抑制されることを見出した。そこで *Bacillus* 属による生長抑制ストレス条件下で、シロイヌナズナは根分泌物を介した個体間相互作用を行っている可能性について検証することとした。同バイオアッセイに供したシロイヌナズナの根および寒天培地から得た粗抽出液中の低分子化合物を LC-Orbitrap-MS を用いて一斉分析した結果の概要について報告する。

root exudate, rhizosphere

発表責任者：村田 純（murata-j@sunbor.or.jp）

講演番号：4B09a11
講演日時：3 月 28 日 11:40～ 総合学習プラザ B09 会場

亜高山帯に生息しているシラビソ葉におけるクチクラ成分の分析

Analysis of cuticular components in leaves of *Abies veitchii* grown in subalpaine zone

○正木 怜也[1]、生方 正章[2]、岩渕 晴男[2]、種子田 春彦[3]、清水 文一[1]（[1]東洋大院生命、[2]日本電子（株） MS 事業ユニット、[3]東大院理）
○Reiya Masaki[1], Masaaki Ubukata[2], Haruo Iwabuchi[2], Haruhiko Taneda[3], Bun-ichi Shimizu[1]
([1]Toyo Univ., [2]JEOL Ltd., [3]The University of Tokyo)

【背景】

植物の地上部は日光や雨、乾燥等の外的要因に曝されている。このような外的要因によるストレスから植物体を保護するため、植物は体の表面を覆うクチクラと呼ばれる複数の層からなる構造を持つ。このクチクラには長鎖アルカンをはじめ、脂肪酸やアルコール、アルデヒドなどが含まれており、種や生息地、クチクラの層ごとで組成が変化することが明らかになっているが、その違いの生理的意義については不明な点が多く残されている。

一方、亜高山帯に生息する常緑針葉樹であるシラビソは、冬季に土壌や茎の凍結により針葉への水の供給が断たれて強い乾燥ストレスを受ける。このため、シラビソは厚いクチクラの発達とワックス生合成を通して針葉からの水の損失を防ぐ必要がある。本研究では、雪の上に出て強い乾燥ストレスを受けた針葉の背軸側と向軸側のクチクラに含まれるワックスの組成を調べ、乾燥ストレスによる影響を分析した。

【方法】

長野県飯田市茶臼岳山頂付近（標高 2604 m 2018 年 8 月 20 日採取）で採取した風に曝されていたシラビソ葉（3 g 新鮮重量）を実体顕微鏡下で医療用メスを用いて向軸側と背軸側に切り分けた。切り分けた葉を別々の蓋付きビンに入れ 10 ml のクロロホルムで抽出し上清を回収し､遠心乾固させた。残渣にヘキサン 3 ml を加えて超音波処理 1 分間で溶解したものを植物抽出液とした。さらにこの植物抽出液を固相抽出カートリッジで前処理を行い、回収したものを遠心乾固したのち、ヘキサン 100 μl に溶解させ分析試料とし、GC-FID および GC-MS で分析した。

【結果】

冬期において雪に埋もれず風に曝されていたシラビソ葉の向軸側と背軸側で、炭素数 C22～C30 と C33 の直鎖の炭化水素を検出した。この中で向軸側と背軸側両方で定量できた(定量限界以下＜0.1 μg/gFW) C30、C29、C27、C23 では、C29 と C27 で背軸側に有意に多く含まれていた。最も強度の大きいピークを GC-MS（JMS-T200GC AccuTOF™ GCx-plus、日本電子）を用いて EI 法と FI 法を用いて分析したところ、得られたフラグメントイオンから、10-Nonacosanol と決定した。

cuticular, *Abies Veitchii*, secondary alcohol

講演番号：4B09a12
講演日時：3 月 28 日 11:51～ 総合学習プラザ B09 会場

青シソにおける二次代謝関連遺伝子発現のストレス応答と日周変動

Stress response and diurnal change of gene expression for secondary metabolisms in *Perilla frutescens*

平安山 昌史[1]、武川 航大[1]、加川 夏子[2,3]、○華岡 光正[1,3]（[1]千葉大・院園芸・応用生命、[2]千葉大・環境健康フィールド科学セ、[3]千葉大・植物分子科学セ）
Masahumi HENZAN[1], Koudai TAKEKAWA[1], Natsuko KAGAWA[2,3], ○Mitsumasa HANAOKA[1,3]
([1]Grad. Sch. Horticul., Chiba Univ., [2]Center for Env. Health Field Sci., Chiba Univ., [3]Plant Mol. Sci. Center, Chiba Univ.)

【背景と目的】
植物が生産する代謝産物には、生命維持や成長に必要な一次代謝産物とその他の二次代謝産物が存在する。二次代謝産物は主に外敵や環境からのストレスに対する防御応答に際して合成・利用される。植物がストレスを感知すると、特定の二次代謝関連遺伝子の発現量を増加させることでストレスへの適応に向けた二次代謝産物の合成を促進する。これらの二次代謝産物の中にはヒトの健康維持・増進などにも役立つファイトケミカルと呼ばれる物質も含まれる。本研究で用いた青シソも、抗酸化作用などを持つロスマリン酸・ルテオリン・アピゲニン・ペリルアルデヒドといったファイトケミカルを合成するが、植物体内における蓄積量は少なく、安定的な大量確保に向けた産業利用が難しい状態である。そこで本研究では、様々なストレス因子と青シソ二次代謝の関係性を、二次代謝関連遺伝子の発現量に着目することで調査し、ファイトケミカルの合成・蓄積に有効と考えられるストレス条件の検討を目的とした。

【方法と結果】
青シソを 8～13 週間通常生育条件下で生育させた後、茎から切り離した葉に傷害、強光、低温、高温ストレス処理を付与し、二次代謝関連遺伝子の発現パターンをノーザンブロット解析により調べた。また、発現量の増加が見られた条件に関してはさらに HPLC を用いた成分定量解析を行うことで二次代謝産物の含有量変化も調査した。その結果、葉を 1 cm 四方に断片化する傷害ストレス処理によるフェニルプロパノイド代謝経路遺伝子の発現量増加やロスマリン酸含量の増加、4 ℃の低温ストレス処理によるフェニルプロパノイド・フラボノイド代謝経路遺伝子の経時的な発現量増加が確認され、これらのストレス処理が二次代謝経路の活性化に有効であることが示唆された。さらに、通常の生育条件下での二次代謝関連遺伝子発現量の日周変化も調べたところ、明期開始後 4 時間をピークとしたフェニルプロパノイド・フラボノイド代謝経路遺伝子の発現量増加が確認されたことから、効率的な二次代謝産物の合成には、様々なストレスを付与するタイミングも重要であることが示唆された。

Stress response, Secondary metabolisms, *Perilla frutescens*

発表責任者：華岡 光正（mhanaoka@faculty.chiba-u.jp）

講演番号：4B09a13
講演日時：3 月 28 日 12:02～ 総合学習プラザ B09 会場

iTRAQ 法を用いた転写因子 GLK1 相互作用因子の探索

Exploration of GLK1 interacting proteins using iTRAQ

○堀之内 冬紅[1]、湯淺 日菜子[1]、稲葉 靖子[1]、森 仁志[2]、稲葉 丈人[1] ([1]宮崎大農、[2]名大院生命農)
○Tomomi HORINOUCHI[1], Hinako YUASA[1], Yasuko ITO-INABA[1], Hitoshi MORI[2], Takehito INABA[1] ([1]Univ. Miyazaki, [2]Nagoya Univ.)

植物細胞では光や植物ホルモンなどに応答して光合成関連遺伝子が発現し、光合成能のある葉緑体が発達する。また、葉緑体がダメージを受けると葉緑体から核にシグナルが送られ、核ゲノムにコードされる光合成関連遺伝子の発現が抑制される。これらの一連の応答に中心的に関与しているのが転写因子 Golden2-like（GLK）である。

GLK 遺伝子はヒメツリガネゴケから陸上植物に至るまで多くの植物で保存されている。シロイヌナズナには *GLK1* と *GLK2* が存在し、この 2 つの遺伝子には機能の重複が見られる。また、*GLK1* 遺伝子には、葉緑体が発するシグナル「プラスチドシグナル」を核に伝え、核と葉緑体での転写を同調させる働きもある。これまでの研究により、GLK1 は転写レベルおよびタンパク質レベルの制御を受けることが明らかになっている。また、GFP-GLK1 によって相補された *glk1glk2* 二重変異体においては、GFP-GLK1 が約 550kDa の高分子複合体を形成することが明らかになった。GLK1 のみの複合体も同程度の分子質量を示したことから、GLK1 はホモ多量体ではなく他のタンパク質と複合体を形成する可能性が高いと考えられる。

そこで、本研究では免疫沈降法を用いた GLK1 タンパク質複合体の精製と、iTRAQ 法による複合体構成因子の分子同定を試みた。まず、NusA と GLK1 との融合タンパク質（NusA-TEV-GLK1）を大腸菌で発現させ、精製した。さらに、TEV プロテアーゼ処理により NusA 部位を除去し、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて組み換え型 GLK1 タンパク質の分子質量を解析した。その結果、組み換え型 GLK1 の分子質量は形質転換植物中の GLK1 複合体よりも低いことが明らかになり、確かに GLK1 タンパク質が植物体内で高分子複合体を形成することが示された。

次に、*GFP-TEV-GLK1* 遺伝子で相補したシロイヌナズナ *glk1glk2* 二重変異体と抗 GFP 抗体を用いて、GLK1 複合体の精製を試みた。GFP-TEV-GLK1 複合体を免疫沈降したのち、TEV プロテアーゼ処理によって GLK1 複合体を遊離させ、精製した。さらに、iTRAQ 法により GLK1 と相互作用すると考えられるタンパク質を分子同定した。共発現解析や細胞内局在解析により、同定したタンパク質の中から約 15 の候補因子を絞り込んだ。現在、それらの因子の解析を行っており、併せて報告する。

Arabidopsis, GLK1, iTRAQ

講演番号：4B09a14
講演日時：3 月 28 日 12:13～ 総合学習プラザ B09 会場

ズッキーニから同定された汚染物質輸送タンパク質のストレス応答への関与

Involvement of a transporting factor for pollutants identified from zucchini with stress responses

○藤田 健太郎[1]、足助 聡一郎[1]、乾 秀之[1,2] ([1]神戸大院農、[2]神戸大・バイオ)
○Kentaro FUJITA[1], Soichiro ASUKE[1], Hideyuki INUI[1,2] ([1]Grad. Sch. of Agr. Sci., Kobe Univ., [2]Biosignal. Res. Ctr., Kobe Univ.)

【背景】
ウリ科作物では、ダイオキシンなどの残留性有機汚染物質(POPs)を地上部に高蓄積することが知られている。POPs 輸送因子として Major latex-like protein(MLP)がウリ科植物ズッキーニ(*Cucurbita pepo*)から同定された。しかし、その生理機能は今のところ明らかになっていない。本研究では、ズッキーニから取得した *MLP*(*CpMLP*)遺伝子プロモーターに存在するシスエレメントの解析結果より、ストレス応答に関与する配列が多いことに着目した。そこで、本研究では植物ホルモン応答と病原応答に絞り、CpMLP の生理機能の解明を試みた。
【方法】
CpMLP 遺伝子プロモーターの下流にレポーター遺伝子としてβ-グルクロニダーゼ(*GUS*)遺伝子を導入した形質転換タバコを作製した。その形質転換タバコに植物ホルモンを処理し、*CpMLP* 遺伝子のプロモーター活性を評価した。さらに、*CpMLP* 遺伝子を過剰発現した形質転換タバコに植物ホルモンを処理し、CpMLP による植物ホルモン応答遺伝子の発現変動を調査した。
CpMLP 遺伝子形質転換タバコの葉を RNA-sequencing(RNA-seq)解析に供した。これにより、*CpMLP* 遺伝子の発現に伴い、発現が上昇した遺伝子の選抜を行った。発現が上昇した遺伝子についてリアルタイム PCR(qRT-PCR)を行い、RNA-seq の結果の妥当性を確認した。*CpMLP* 遺伝子形質転換タバコに対して灰色かび病菌(*Botrytis cinerea*)を接種し、病斑面積等を測定することで病原応答を評価した。
【結果と考察】
植物ホルモン処理により、形質転換タバコの GUS 活性が変化した。また、植物ホルモン処理による植物ホルモン応答遺伝子の発現が *CpMLP* 遺伝子を過剰発現させた形質転換タバコにおいて変化した。
CpMLP 遺伝子形質転換タバコにおいて、*PR-2* 遺伝子や *PR-5* 遺伝子の発現量が RNA-seq では有意に増加していた。実際に、これらの遺伝子は qRT-PCR においても発現量が有意に増加していた。また、*CpMLP* 遺伝子形質転換タバコでは、灰色かび病菌の病斑面積が減少した。これらの結果から、MLP は環境ストレスに対して応答していると考えられる。

Major latex-like protein, zucchini, stress response

発表責任者：乾秀之（hinui@kobe-u.ac.jp）

講演番号：4B11a01
講演日時：3 月 28 日 09:30～ 総合学習プラザ B11 会場

分子内電子移動過程の制御による Pratosine の電解全合成

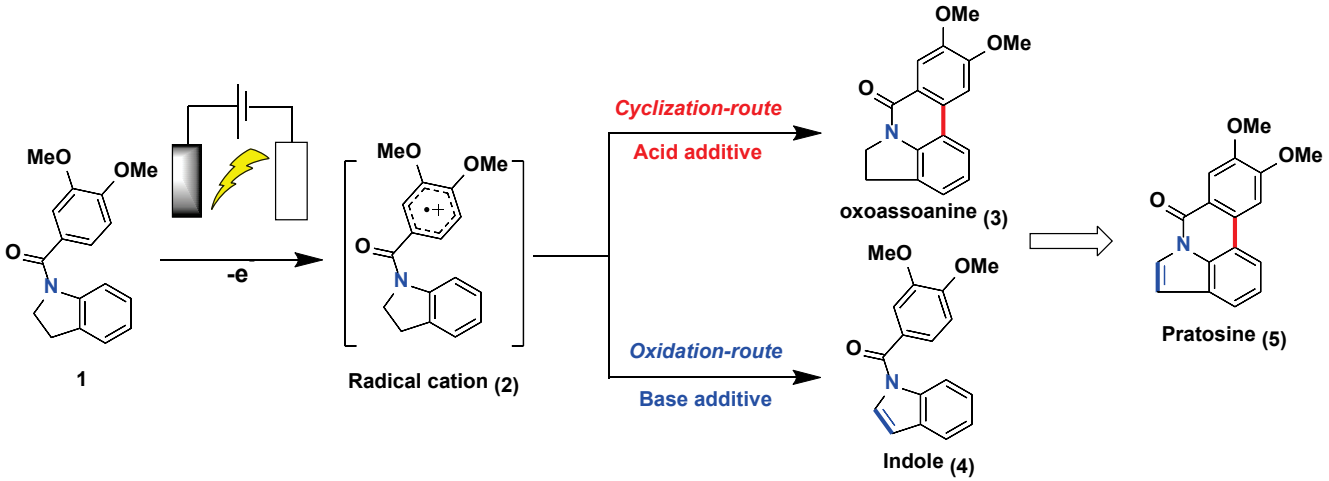
Electrochemical Synthesis of Pratosine by Controlling for the Intramolecular Electron Transfer Pathway

○岡本 一央、千葉 一裕（東農工大）
○Kazuhiro OKAMOTO, Kazuhiro CHIBA (Tokyo Univ. of Agric. and Tech.)

Pratosine はヒガンバナ科植物（*Crinum latifolium*）より単離されたピロロフェナンスリドンアルカロイドであり、インドール環と *N*-ベンゾイル基が sp^2 炭素を介して縮環したシンプルな多環構造は様々な反応開発研究のターゲット分子となっている。これまでに、化学量論量のパラジウムや超原子価ヨウ素を用いた分子内クロスカップリング反応や、逆電子要請型 Diels-Alder 反応による縮環構造の構築が報告されている。また、インドール環の構築に際しては全ての合成例に共通してインドリンに対する DDQ 酸化が用いられている。我々は、陽極酸化を用いて金属試薬や酸化剤を用いない合成経路の確立を目指して研究を行った。

N-ベンゾイルインドリンを基質として用い、溶媒系を MeCN-Bu_4NClO_4（0.01 M）に固定し添加剤の検討を行った。その結果、環化反応にはメタンスルホン酸、インドール合成反応にはコリジンが最も適した添加剤として見出され、目的とする双方の反応を電解により達成することができた。次に溶媒系の検討を行ったところ、環化反応の収率はラジカルカチオン中間体を安定化する $MeNO_2$-HFIP-$LiClO_4$（0.1 M）系において顕著に向上した。最適条件を用いて得られた環化体（oxoassoanine）をインドール合成反応に供することで、目的とする pratosine の電解全合成を達成した。

添加剤として用いる酸、塩基は陽極酸化により生じるフェニルラジカルカチオン中間体の分子内電子移動過程を制御することで異なる反応生成物を与えていると考えられるため、現在はサイクリックボルタンメトリーや Gaussian を用いた反応機構の推定を行っている。



Electrochemistry, Natural Product, C-H activation

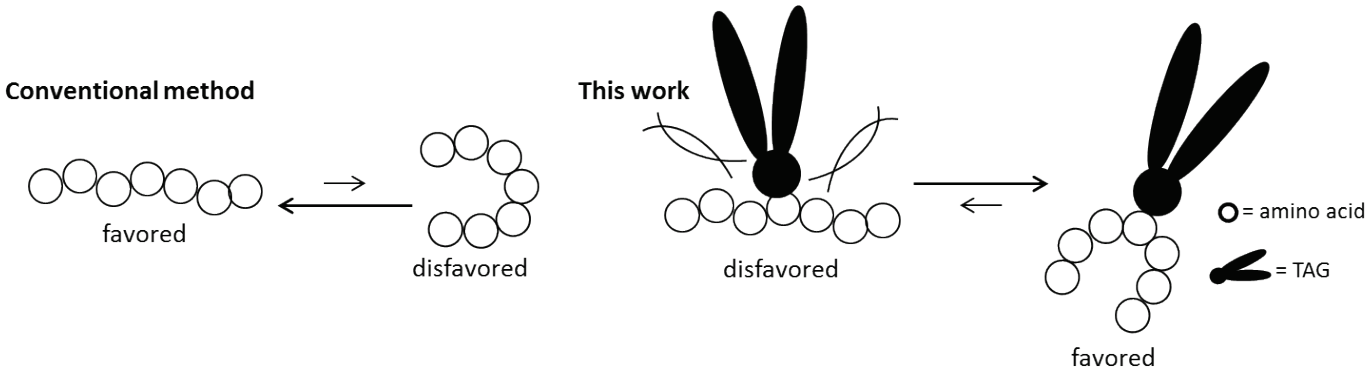
講演番号：4B11a02
講演日時：3 月 28 日 09:41～ 総合学習プラザ B11 会場

ペプチドの分子内環化反応を促進する反応場の構築

Construction of a Reaction Field that Promotes Intramolecular Peptide Cyclization

○山上 紗弓理[1]、岡田 洋平[2]、北野 克和[1]、千葉 一裕[1] ([1]東農工院農、[2]東農工院工)
○Sayuri YAMAGAMI[1], Yohei OKADA[2], Yoshikazu KITANO[1], Kazuhiro CHIBA[1] ([1]Grad. Sch. of Agri. Sci., Tokyo Univ. of Agri. and Tech., [2]Grad. Sch. of Bio-App. and Sys. Eng., Tokyo Univ. of Agri. and Tech.)

【背景】環状ペプチドは構造的特性から鎖状ペプチドよりも活性や分解酵素への耐性が高く、医薬品候補として注目されている。環状ペプチドはまず前駆体となる鎖状ペプチドを合成し、環化反応に供することで得られる。アミノ酸同士を繋ぐペプチド結合は *trans* 型をとりやすく、ペプチド鎖が伸びると両端が離れ分子内のアミノ末端とカルボキシ末端が出会うことが難しくなる。そのため分子内だけでなく分子間でも環化反応が起こる。分子間での反応を抑えるために鎖状ペプチドを大幅に希釈する方法が用いられているが、試薬や溶媒を多量に使用し反応完了に時間を要する。末端が離れる問題を解決するために我々は、ベンジルアルコール誘導体を導入することでペプチド鎖の構造を曲げることを試みた先行研究 [1)]に着目し、当研究室で開発したペプチド合成担体(TAG)[2)]を用いて分子内環化反応のみを選択的に起こすことを目指した。
【方法と結果】まずペプチド配列中央のアミノ酸の N 上に TAG を導入した鎖状ペプチドを合成した。鎖状ペプチドが溶解する 4 種類の溶媒それぞれと 3 種類の異なる鎖状ペプチド濃度の 12 種類の組み合わせで環化反応を行った。その結果、ハロゲン溶媒中 0.5mM で環化反応を行った場合に分子間での反応が最も抑えられた。更に鎖状ペプチドが希釈された状態を作るために鎖状ペプチドを徐々に滴下した。滴下速度を一定にすることで、分子間での反応を起こさず分子内環化反応のみを短時間で完了させることに成功した。



1) M. El Haddadi, F. Cavlier, E. Vives, A. Azmani, J. Verducci, J. Martinez, *J. Peptide Sci.*, **2000**, *6*, 560-570.
2) G. Tana, S. Kitada, S. Fujita, Y. Okada, S. Kim, K. Chiba, *Chem. Comm.*, **2010**, *46*, 8219-8221.

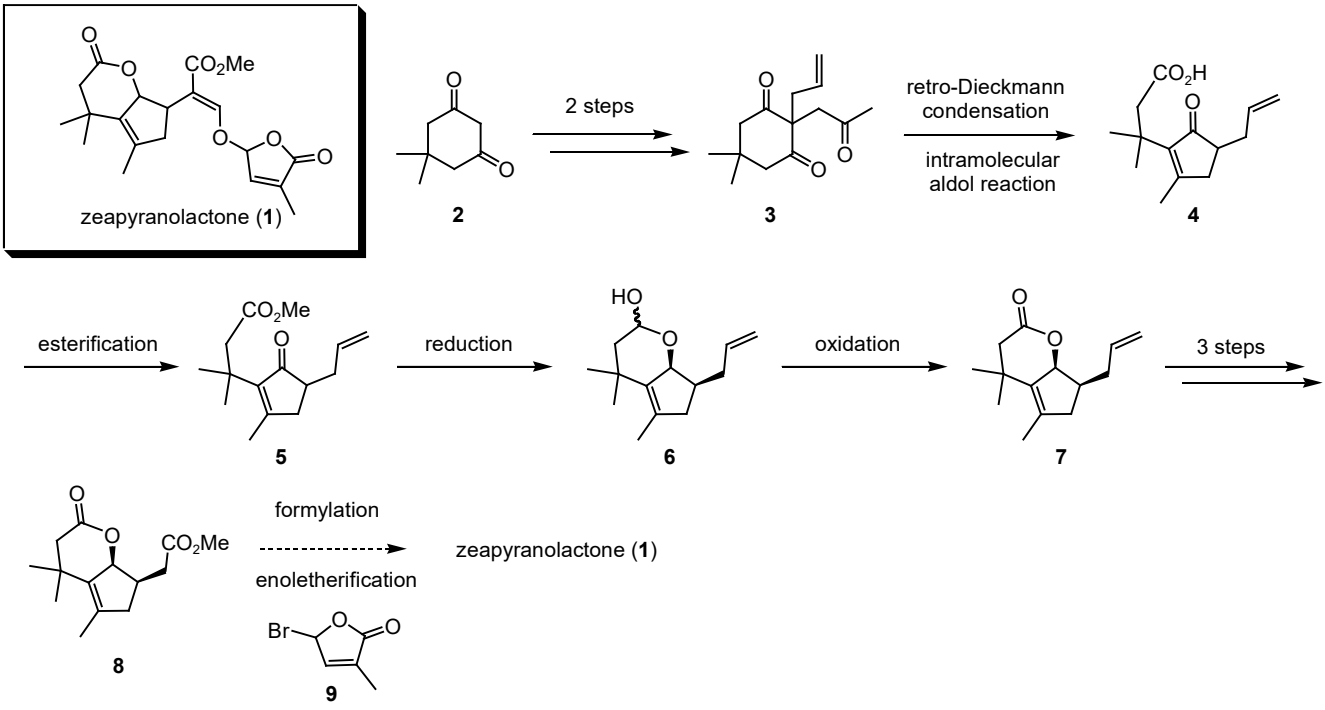
cyclic peptide, solubilizing Tag, liquid phase synthesis

講演番号：4B11a03
講演日時：3 月 28 日 09:52～ 総合学習プラザ B11 会場

Zeapyranolactone の合成研究
Synthetic studies on zeapyranolactone
○山本 舜也、小倉 由資、滝川 浩郷（東大院農）
○Shunya Yamamoto, Yusuke Ogura, Hirosato Takikawa (Tokyo Univ.)

Zeapyranolactone (**1**) はトウモロコシから単離された非典型ストリゴラクトンである。他のストリゴラクトン類と同様に、**1** は根寄生性雑草の種子発芽を誘導することが報告されている。また、**1** はストリゴラクトン類の多様な機能解明のための研究サンプルとなりえる。しかし **1** は天然からは微量しか得られず、量的供給が必要とされており、**1** の合成に着手することとした。

実際の合成を示す。市販の原料 **2** に対し 2 工程の変換を行い、化合物 **3** を得た。この **3** に対し逆ディークマン縮合、分子内アルドール反応をワンポットで行いカルボン酸 **4** を得た。このカルボン酸をエステル化し、還元を行うことで、ヒドロキシ基とアリル基の相対立体配置がおそらく *syn* であるラクトール **6** を得た。さらに、この **6** に対し種々の官能基変換を行うことで化合物 **8** を得た。現在は化合物 **8** に対するホルミル化、続く **9** とのエーテル化によって、zeapyranolactone (**1**)を得るべく検討を行っている。



zeapyranolactone, non-canonical strigolactone

講演番号：4B11a04
講演日時：3 月 28 日 10:03～ 総合学習プラザ B11 会場

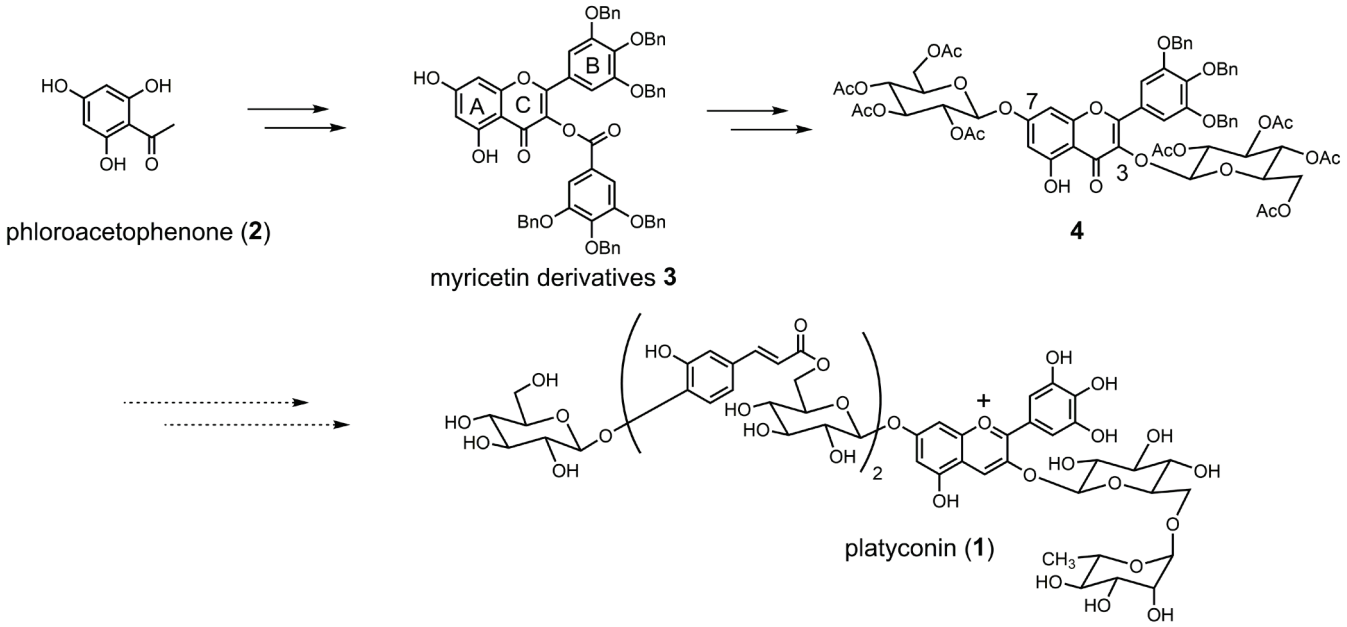
キキョウ花弁に含まれる多アシル化アントシアニン, プラチコニンの全合成研究

Synthetic study on platyconin, a polyacylated anthocyanin isolated from Chinese bell flower

○尾山 公一[1]、清水 俊順[2]、柴 康太[2]、近藤 忠雄[2]、吉田 久美[2] ([1]名大物国セ、[2]名大院情報学)
○Kin-ichi Oyama[1], Toshimichi Shimizu[2], Kota Shiba[2], Tadao Kondo[2], Kumi Yoshida[2] ([1]RCMS Nagoya Univ., [2]Grad. Sch. Info. Nagoya Univ.)

【目的】キキョウ花弁色素プラチコニン(**1**)は、デルフィニジン母核をもつ多アシル化アントシアニンである。単純なアントシアニンの合成はRobinsonらにより行われているが[1)]、多アシル化アントシアニンの化学合成例は未だにない。本研究では、デルフィニジン母核を持つアントシアニンの前駆体となるミリセチン誘導体の合成方法を確立し、Zn還元−空気酸化によるアントシアニンへの変換反応[2)]を鍵反応としてプラチコニンの全合成研究を行った。

【方法と結果】フロロアセトフェノン(**2**)をRubottom酸化によりα-ヒドロキシケトンへと変換した後、改良田辺法によりエステル化[3)]してB環を導入した。Baker-Venkataraman転位によりジケトンへと返還後、ルイス酸触媒により環化してミリセチン誘導体**3**を合成した。**3**を脱保護した後、3位と7位をアセトブロモ糖と相関移動触媒を用いて*β*選択的にグルコシル化して、ジグルコシド体**4**を得た。現在、**4**のグルコース部分へのアシル基の導入と多アシル化アントシアニンへの変換反応[2)]を行っている。



1) Rbinson et al. *J. Chem. Soc.*, **1927,** 242. 2) Oyama et al. *RSC Adv.*, **2019**, *9*, 31435.
3) Oyama et al. *Tetrahedron* **2015**, *71*, 3120.

synthesis of platyconin, Chinese bell flower, polyacylated anthocyanin

講演番号：4B11a05
講演日時：3 月 28 日 10:14～ 総合学習プラザ B11 会場

大豆イソフラボン代謝産物エクオール両エナンチオマーの不斉合成
Asymmetric synthesis of both enantiomers of equol

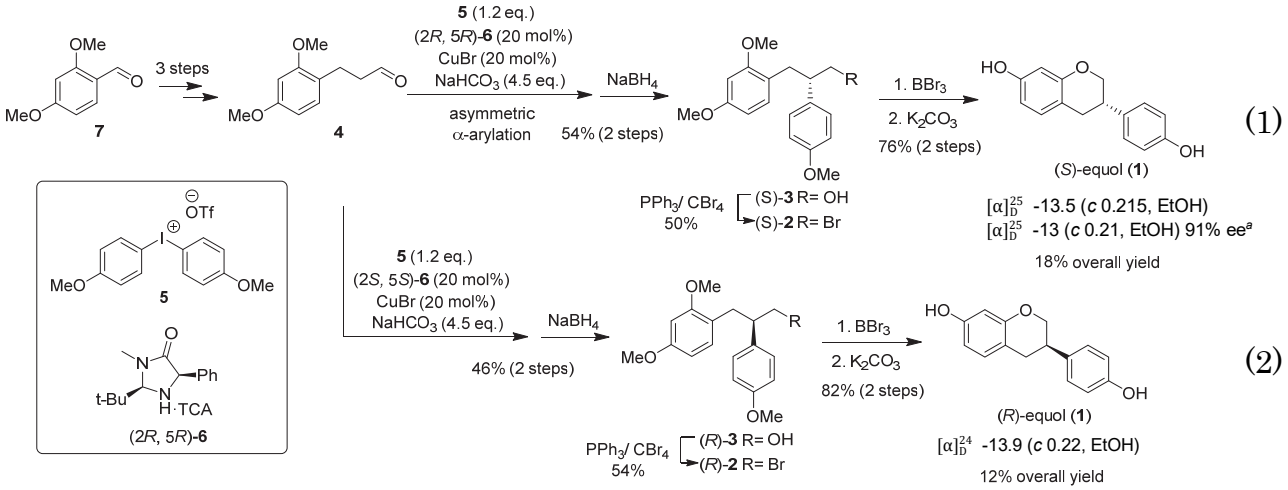
○植村 隆人、斎藤 雄輔、園田 素啓、谷森 紳治 (大阪府立大生環)
○ Takahito UEMURA, Yusuke SAITOU, Motohiro SONODA, Shinji TANIMORI (Osaka prefecture univ.)

［背景・目的］

Equol は、大豆イソフラボンであるダイゼインが腸内代謝によって産生されるフラボノイドであり、高いエストロゲン活性を示す。また近年、抗肝癌活性や抗菌性等を示す誘導体も報告されており、誘導体合成が容易で柔軟性のある両エナンチオマーの選択的な合成法の開発が求められている。我々は MacMillan らによるアルデヒドの α-不斉アリール化を鍵反応とした天然型(*S*)-equol の新規合成法を以前に報告した(式 1、2015 年度 日本農芸化学会中部・関西支部合同大会)。今回、不斉触媒を変えることで、非天然型(*R*)-equol の合成を達成したので報告する。

[方法・結果]

不斉イミダゾリジノン触媒(2*S*, 5*S*)-**6** は、D-フェニルグリシンより 8 段階で合成した。2,4-ジメトキシベンズアルデヒド **7** からドブナー法、$LiAlH_4$ 還元、PCC 酸化により誘導されるアルデヒド **4** に対し、(2*S*, 5*S*)-**6** 触媒の存在下、ジアリールヨードニウム塩 **5** を作用させたところ、アリール化体が得られた(式 2)。アリール化体はただちに還元して 1 級アルコール(*R*)-**3** としたのち、続くアッペル反応による臭素化、脱メチル化、塩基によるエーテル環形成を経て、(*R*)-equol (**1**)に誘導した。現在全収率の向上ならびに誘導体合成を検討している。



[a] Takashima, Y. *et al. Tetrahedron* **2010**, *66*, 197-207.

equol, asymmetric α-arylation, chiral imidazolidinone catalyst

発表責任者：谷森 紳治（tanimori@bioinfo.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：4B11a06
講演日時：3 月 28 日 10:35～ 総合学習プラザ B11 会場

含ベンジル位シクロプロパンカンナビノイド Radulanin J の不斉全合成

Asymmetric Total Synthesis of A Benzylic Cyclopropane-Having Cannabinoid, Radulanin J

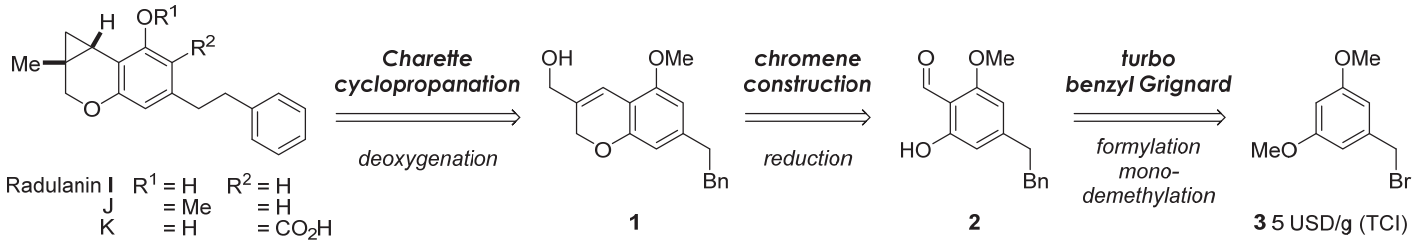
○大江 拓人、姜 法雄、久世 雅樹（神戸大院農）
○Takuto Oe, Bubwoong Kang, Masaki Kuse (Kobe Univ.)

【目的】ファイトカンナビノイドは、植物由来のカンナビノイド受容体アゴニストであり、がんをはじめとする様々な疾患に対する顕著な治療効果を示す。しかしながら、大麻由来のカンナビノイドの多くは、精神作用を持つことから、法規制や高投与量での使用に難があることが、臨床への応用を妨げている。一方で、コケ由来カンナビノイドは、精神作用が抑制されることが明らかにされ脚光を浴びている（*Sci. Adv.* **2018**, 4, eaat2166）。

Radulanin I-K は 1991 年に *Radula Javanica* より単離、構造決定された活性未知のカンナビノイドである（*Phytochemistry* **1991**, 30, 325）。極めて不安定なベンジル位シクロプロパンを持つことが、他のカンナビノイドとは一線を画す点であり、その単離からおよそ 30 年の間化学合成を妨げてきた要因でもある。

我々は、不安定なベンジル位シクロプロパンを終盤で構築することで、Radulanin I-K の初の不斉全合成が可能になると期待し、その達成を目的とした。

【方法・結果】まず、Radulanin I-K の逆合成解析を行った（下図）。Radulanin I-K はアリルアルコール **1** の Charette 不斉シクロプロパン化を経て合成できると考えた。**1** のクロメン環はサリチルアルデヒド **2** とアクロレインとの Baylis-Hillman-オキサ-Michael 連続反応を経て得られると考えた。**2** のビベンジル部分は、独自に開発したターボベンジル Grignard 試薬を用いるアルキル化により構築した後、ホルミル化に続くモノ脱メチル化によって非対称化し、**2** を調製できると考えた。



まず、Radulanin J の合成に着手した。検討の結果、Charette の不斉反応は問題なく進行し、対応するシクロプロパンを定量的かつ高エナンチオ選択的に与えた（96% ee）。続いてアルコールを 2 段階で脱酸素化することで、Radulanin J の不斉全合成を 8 段階、総収率 13%で達成した。現在、各段階の条件最適化、絶対立体配置の決定、および Radulanin I と K の全合成に向けて検討中である。

phytocannabinoid, cyclopropane, total synthesis

発表責任者：姜法雄（kangb@pegasus.kobe-u.ac.jp）

講演番号：4B11a07
講演日時：3 月 28 日 10:46～ 総合学習プラザ B11 会場

アミノ酸骨格を利用したα-アミノ芳香族ケトン骨格の合成

Synthesis of alpha-amino aromatic ketones from alpha-amino acids

○橋本 誠、タクリム ゼトリアナ、黒川 菜摘、橋床 泰之（北大院農）
○Makoto HASHIMOTO, Zetryana P Tachrim, Natsumi KUROKAWA, Yasuyuki HASHIDOKO (Hokkaido Univ.)

α-アミノ芳香族ケトンは医薬や農薬など様々な生理活性物質の合成中間体として知られており，光学活性α-アミノ酸誘導体をアシルドナー，芳香族化合物をアシルアクセプターに用いた Friedel-Crafts（F-C）反応により，α-アミノ芳香族ケトンの立体選択的な合成が達成可能であると考えられる。しかし，この手法によるα-アミノ芳香族ケトン合成はほとんど報告されておらず， 合成したα-アミノ芳香族ケトンの特性に関する詳細な検討もさほどなされていない。そこで，立体選択的なα-アミノ芳香族ケトンの合成について検討を行った。N 末トリフルオロアセチル保護光学活性α-アミノ酸スクシンイミドエステルや酸クロライドを用い，塩化アルミニウム存在下，芳香族化合物を溶媒とし Friedel-Crafts 反応によってα-アミノ芳香族ケトン骨格を合成した。塩化アルミニウムはスクシンイミドエステルの場合 6 等量必要であることが明らかとなった。この反応の立体制御を分子内に 2 つの不斉中心をもつアミノ酸である 4 種のイソロイシン誘導体を基質に用いることで，アミノ酸α位の立体を保持した合成の進行を NMR による確認出来ることを明らかとした。このことからα-アミノ酸を用いた Friedel-Crafts 反応による立体選択的α-アミノ芳香族ケトンの合成が可能であることを明らかとした。アシルアクセプターとして種々置換芳香族が利用可能であり、通常の配向性で生成物が得られた。アシルドナーとして側鎖炭化水素系天然・非天然α-アミノ酸類への適用が可能であった。フェニルアラニン骨格に対してこの Friedel-Crafts 反応を適用したところ、芳香族との分子間反応生成物の他に側鎖芳香環との分子内での環化生成物も同時に得られた。アシルドナーである芳香族化合物を除くことで分子内環化生成物が得られる事を明らかとした。同じ芳香族アミノ酸のチロシン誘導体では分子間反応だけが進行した。メチオニン誘導体では硫黄原子の孤立電子対の影響のため，さらに過剰の塩化アルミニウム等量が必要であった。

Z. P. Tachrim et al, *Molecules*, 22, 1748 (2017), Z. P. Tachrim et al, *Heterocycles*, 97, 877 (2018), K. Natsumi et al, *Arkivoc*, (5), 42 (2019)

α-amino acids, α-amino phenyl ketones, Friedel-Crafts

発表責任者：橋本　誠（hasimoto@abs.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：4B11a08
講演日時：3 月 28 日 10:57～ 総合学習プラザ B11 会場

プレニル基およびゲラニル基を導入したホモイソフラボノイドの合成研究

Study for synthesis of prenylated and geranylated homoisoflavonoids

○鈴木 皓仁[1]、金田 匡[1]、川井 悟[3]、吉澤 結子[2]、常盤野 哲生[2]([1]秋田県大院生資科、[2]秋田県大生資科、[3]東電大理工)
○Akihito SUZUKI[1], MASASHI KANETA[1], SATORU KAWAI[3], YUKO YOSHIZAWA[2], TETSUO TOKIWANO[2] ([1]Graduate School of Akita Prefectural University, [2]Akita Prefectural University, [3]Tokyo Denki University)

【目的・背景】

ホモイソフラボノイド化合物は､イソフラボンの B 環と C 環の間に 1 炭素導入された骨格を持ち、抗ガン作用[1)]、抗酸化活性[2)]、α-グルコシダーゼ阻害活性[3)]などが報告されている。ジフェニルプロパン型のフラボノイド化合物と比較すると、ホモイソフラボノイド化合物は報告例が少なく、非天然物型合成化合物も含め、さらなる構造活性相関の研究が必要であると考えられる。

当研究室では、ホモイソフラボノイドの合成研究の一環として、骨格上にプレニル基などの官能基を導入したときの活性への影響を検討している。当研究室の金田はホモイソフラボノイド A 環上の 8 位を C-プレニル化したとき、α-グルコシダーゼおよびβ-グルクロニダーゼ阻害活性が増加したことを報告している。今回、新たにホモイソフラボノイド A 環上にゲラニル基やアリル基を導入した化合物を合成し、プレニル基を導入したホモイソフラボノイドとの生理活性の比較の検討を行なった。

【実験方法および結果】

それぞれのフェノール水酸基を保護した 3,4-ジヒドロキシベンズアルデヒドおよび 2,4,6-トリヒドロキシアセトフェノンからアルドール縮合によりカルコンを合成した。二重結合を還元したジヒドロカルコンに対し、*N*,*N*-ジメチルホルムアミドジメチルアセタールを作用させ、ホモイソフラボンを合成した。

合成したホモイソフラボンのフェノール水酸基をゲラニルまたはアリルエーテルとした後、クライゼン転位によりホモイソフラボン A 環を C-ゲラニル化および C-アリル化した化合物を合成した。

合成化合物の活性試験はα-グルコシダーゼ阻害活性試験およびβ-グルクロニダーゼ阻害活性試験、前骨髄性白血病細胞 HL-60 に対する増殖抑制活性試験を検討しており、構造と活性の関係について報告をする。

1) Tran, M, H. *et al*., *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **2013**, *77*(*12*), 2378.
2) Xiaoling Z. *et al*., *Food Chem*. **2015**, 186, 63-68.
3) Samson O. *et al*., *S. Afr. J. Bot*. **2013**, 88, 17-22.

homoisoflavone, prenyl, geranyl

講演番号：4B11a09
講演日時：3 月 28 日 11:08～ 総合学習プラザ B11 会場

フルオラスシリカゲル担持型プロリン触媒による不斉アルドール反応：基質範囲と回収・再利用検討

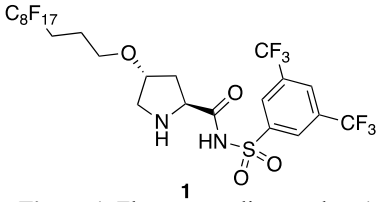
Proline Catalyst Supported on Fluorous Silica Gel for Asymmetric Aldol Reactions：Substrate Scope and Reuse Study

○石原 一輝、大林 里帆、小林 佑基、石原 稿太朗、塩入 孝之、松儀 真人（名城大農）
○ Kazuki ISHIHARA, Riho OBAYASHI, Yuki KOBAYASHI, Kotaro ISHIHARA, Takayuki SHIOIRI, Masato MATSUGI (Meijo Univ.)

プロリンは分子間不斉アルドール反応の触媒として機能することが知られており、[1]置換基修飾を施すことで不斉誘起能の向上が報告されている。[2]

当研究室ではこれまでに、フッ素含量が 40-50% の「ミディアムフルオラス分子」の特性を活用し、均一系反応でありながら、反応後には触媒をフルオラス固相担体に固定化し、回収・再利用できる反応系を見出している。[3]

今回演者は、フルオラスタグを多点導入したミディアムフルオラスプロリン触媒 **1** (**Figure 1**) を合成し、不斉アルドール反応における立体選択性を確認すると共に、当該触媒が固定化回収・再利用可能か調べた。



1

Figure 1. Fluorous proline catalyst **1**

触媒 **1** を用いて、様々な置換基を有するベンズアルデヒドとシクロヘキサノンとの不斉アルドール反応をおこなったところ、いずれの反応においても高立体選択的にアルドール付加体を与えることを確認できた (92-99%*ee*) 。続いて、*p*-ニトロベンズアルデヒドとシクロヘキサノンをモデル基質として用い、上述の反応系における触媒 **1** の回収条件を精査した。その結果、トルエン中で反応をおこなった後に FluoroFlash® (触媒 **1** に対して 30 倍量) を加え、トルエンと同量の水を添加すれば、触媒 **1** が FluoroFlash® に固定化し、ろ過操作により簡便に分離できることがわかった (**Figure 2**) 。さらに、回収した固相触媒 **1** を同反応に繰り返し使用したところ、高い立体選択性を維持したまま、5 回まで再利用できることがわかった (97-99%*ee*) 。

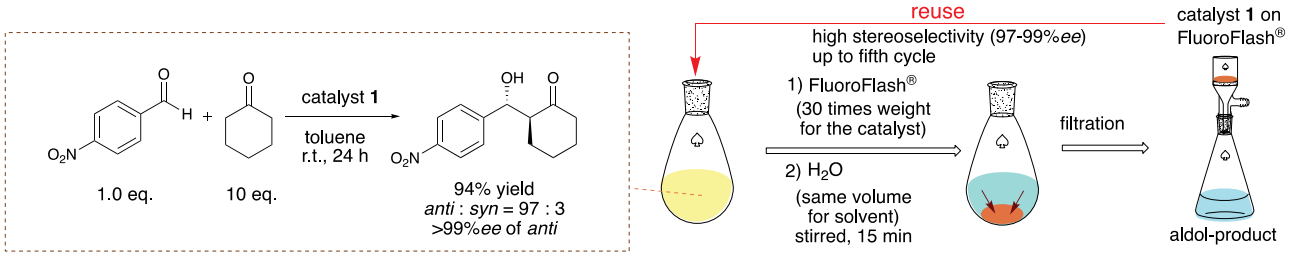


Figure 2. Separation procedure employing medium fluorous strategy

References

1) List, B. *et al*. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2395-2396. 2) Singh, S. *et al*. *ChemistrySelect* **2019**, *4*, 5591-5618. 3) Matsugi, M. *et al*. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 1363-1366.

Proline, Fluorous, Aldol reaction

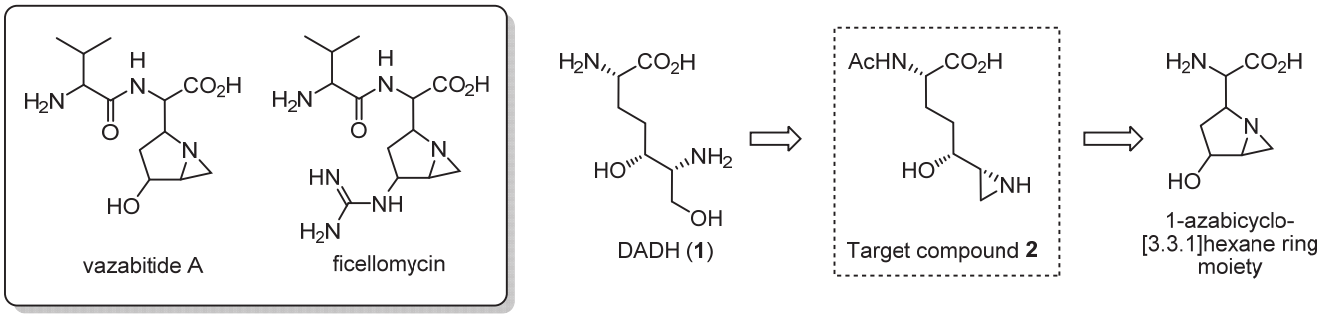
講演番号：4B11a10
講演日時：3 月 28 日 11:19～ 総合学習プラザ B11 会場

含アジリジン天然物の推定生合成中間体の合成研究

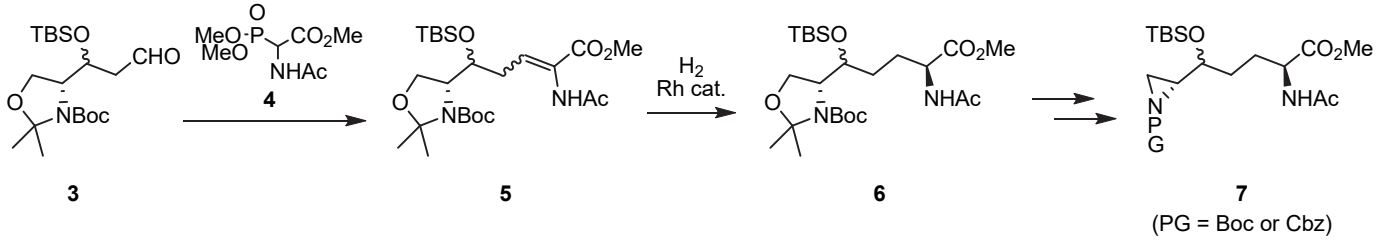
Synthetic study on putative biosynthetic intermediates of aziridine-containing natural products

○岡村 仁則[1]、滝川 浩郷[2]、品田 哲郎[1] ([1]阪市大院理、[2]東大院農生科)
○Hironori OKAMURA[1], Hirosato TAKIKAWA[2], Tetsuro SHINADA[1] ([1]Osaka City University, [2]The University of Tokyo)

Vazabitide A や ficellomycin などの 1-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン環構造を有する天然物は、DADH(**1**)がその生合成中間体であると推定されている[1)]。その推定生合成経路においては、DADH の末端水酸基が硫酸エステルへと変換された後、アジリジン環が形成され **2** を与えるとされている。化合物 **2** における二級水酸基の絶対立体配置は *R* であると推定されているが、決定には至っていない。そこで、**2** を目的化合物として水酸基に関する両ジアステレオマーをそれぞれ合成し、その絶対立体配置の確認を行うこととした。



文献既知のアルデヒド **3**[2)]と Schmit 試薬 **4** との Horner-Wadsworth-Emmons 反応によりデヒドロアミノ酸 **5** を合成した。このものに対し、ロジウム触媒を用いた不斉水素添加反応[3)]を適用することで、高い鏡像体過剰率で中間体 **6** を合成することに成功した。その後、保護基のかけ替えとアジリジン環の構築を経て **2** の全炭素骨格を有する保護体 **7** を合成することに成功した。



1) F. Hasebe et al. *Nature Chemical Biology*, **2016**, *12*, 967-972
2) A. Dubey et al. *Synthesis*, **2011**, 901-904
3) M. J. Burk et al. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4345-4353

aziridine, biosynthetic intermediate, non-proteinogenic amino acid

講演番号：4B11a11
講演日時：3 月 28 日 11:40～ 総合学習プラザ B11 会場

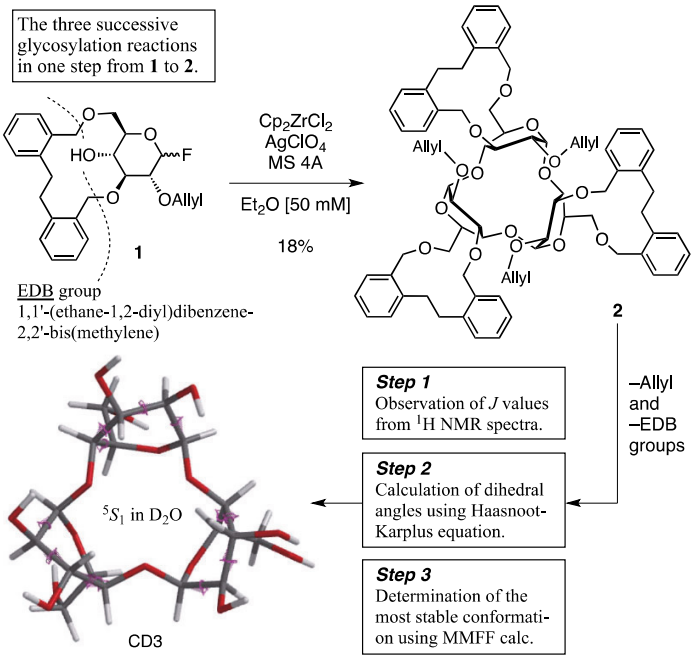
最小シクロデキストリンの改良合成と構造決定
Synthetic and Structural studies of the smallest cyclodextrin

○若森 晋之介、萩森 資、山田 英俊（関西学院大理工）
○Shinnosuke WAKAMORI, Takara HAGIMORI, Hidetoshi YAMADA (Kwansei Gakuin Univ.)

シクロデキストリン（CD）は環状オリゴ糖であり，グルコースが 6～8 個からできた CD6～8 が一般的に知られている。それらより小さい CD3 や CD4 は，グルコースが $^4C_1$ 配座から歪むため，存在しないと考えられてきたが，私たちは両者の化学合成に成功した[1]。

論文で報告した合成では，単糖を一つずつ伸長する確実な経路を採用した。そのため工程が長く，大量供給が困難である。この問題を解決するため，CD3 合成の短段階化を試みた。すなわち，4 位にヒドロキシ基を持ち，3,6 位酸素にピラノース環の立体配座を柔軟化させる EDB 架橋基を導入したフッ化糖 **1** を調製し，**1** のグリコシル化反応による環状三量体 **2** の一挙合成を検討した。その結果，目的の **2** の一挙合成が可能であること，および反応時の **1** の濃度が **2** の収率に影響することを明らかにした。現在の最適条件は **1** の濃度が 50 mM の場合であり，**2** が収率 18%で得られた。

合成した CD3 の立体配座を，以下のように決定した。まず ^{1}H NMR スペクトルから得られる結合定数を読み取り，Haasnoot の改良 Karplus 式を用いて二面角を算出した。この式では，1 つの結合定数から最大 4 つの解が得られる。これまでは，解の適切な組み合わせを探す，またはありえない値を除外して，分子模型を組みながら立体配座を解析していた。しかし手作業だったため，確実性に問題があった。本解析の精度・確度をより高くするため，取りうる二面角の組み合わせのうち，最も安定な立体配座を分子力場計算で得る手法を開発した。本手法を適用して CD3 のグルコースの立体配座を $^5S_1$ に決定し，その構造の歪みを証明した。発表では，単結晶 X 線構造解析の結果も併せて報告する。



1) D. Ikuta, Y. Hirata, S. Wakamori, H. Shimada, Y. Tomabechi, Y. Kawasaki, K. Ikeuchi, T. Hagimori, S. Matsumoto, H. Yamada *Science* **2019**, *364*, 674-677.

organic synthesis, cyclodextrin, conformationally supple glucose

発表責任者：若森晋之介（shinnosuke1010@hotmail.co.jp）

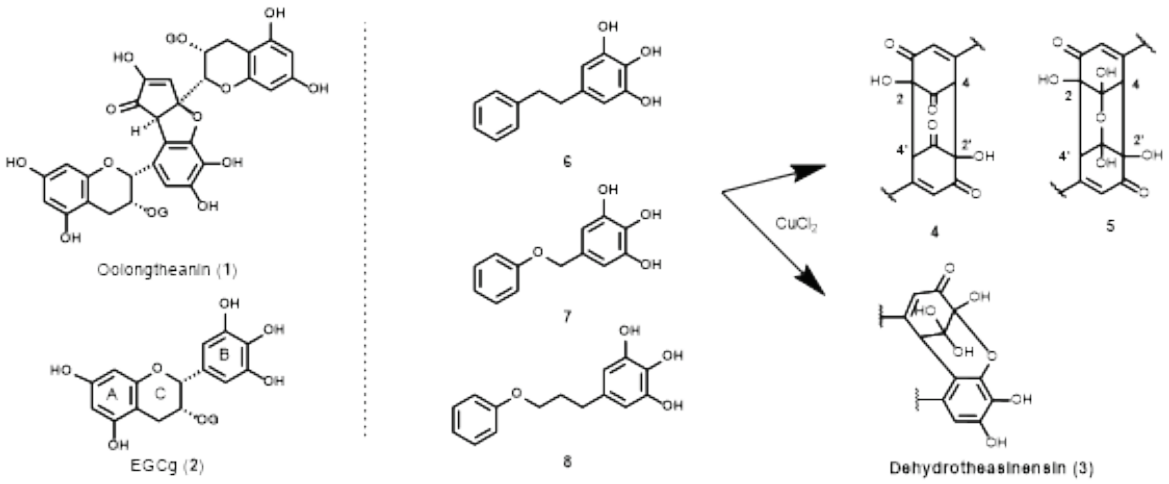
講演番号：4B11a12
講演日時：3 月 28 日 11:51～ 総合学習プラザ B11 会場

カテキンモデルを用いた B 環部の位置選択的酸化反応に関する研究

Study on regioselective oxidation of B ring using catechin model

○落合 悠斗、廣瀬 紗弓、柳瀬 笑子（岐阜大学大学院）
○Yuto OCHIAI, Sayumi Hirose, Emiko Yanase (Gifu Univ)

【目的】ウーロンテアニン(**1**)はウーロン茶等の発酵茶中に含まれる EGCg (**2**)の 2 量体である。我々はこれまでに，ウーロン茶中に含まれる高分子ポリフェノールの構造解明を目的として，**1** の合成及び生成メカニズムに関する研究を行ってきた．**2** の B 環部のモデルとして，5-methyl pyrogallol の酸化反応を行ったところ，**1** の生成中間体である **3**（4-4’位及び 5-O-3’位: Oolong 型）とは異なる結合パターン（2-4’位と 4-2’位: Diketo 型）を形成した **4** や **5** が得られた。これは結合形成の選択性に，結合部周辺のみではなく他の部分が関与している可能性を示している．そこで，モデル化合物を用い酸化重合の位置選択性に寄与している部分構造とメカニズムを明らかにすることを目的とした．



【方法・結果】**3** の形成には，**2** の B 環部だけでなく反応時における A 環部や C 環部の相互作用が必要であると考え，化合物 **6** 及び **7** を設計し合成した．得られた **6** と **7** は塩化銅を用いて酸化し，得られた生成物を精製して各種機器分析により構造解析を行った．また，それらの生成比を ^{1}H-NMR の面積比から算出した．その結果，いずれの場合でも Oolong 型の結合様式を持つ類縁体が生成したが， C 環 1 位に相当する酸素原子を有する **7** では Oolong 型＞Diketo 型であったのに対し，**6** の酸化生成物では Oolong 型＜Diketo 型であった。このことから、**1** の結合様式の形成には A 環の存在と C 環 1 位の酸素原子の存在が大きく関与している可能性が示唆された．次に化合物 **8** を合成し，同様に酸化反応を行った．その結果，その生成物比は **6** の場合と同様であった。このことから，酸素原子と B 環の距離が反応の選択性に重要であることが明らかとなった。

Catechin, oxidation, synthesis

発表責任者：柳瀬笑子（e-yanase@gifu-u.ac.jp）

講演番号：4B11a13
講演日時：3 月 28 日 12:02～ 総合学習プラザ B11 会場

新規のチアゾリジン開環反応を利用した糖タンパク質 Evasin-3 の化学合成

Chemical synthesis of glycoprotein, evasin-3, using a novel thiazolidine ring opening reaction

○片山 秀和[1]、永田 宏次[2] ([1]東海大工・生命化学、[2]東大院農生科)
○Hidekazu KATAYAMA[1], Koji NAGATA[2] ([1]Tokai Univ., [2]Univ. of Tokyo)

【背景・目的】

タンパク質の化学合成には、固相合成によって調製された短鎖ペプチドを縮合するセグメント縮合法が広く用いられている。その方法の一つである Native Chemical Ligation (NCL)法は、C 末端にチオエステル基を有するペプチドと N 末端に Cys 残基を有するペプチドを位置選択的に縮合する方法である。3 つ以上のセグメントを NCL 法で縮合する場合、中間セグメントの分子内環化を阻止するために、その N 末端 Cys 残基を保護しておく必要があり、チアゾリジンがその保護基として広く用いられている。最近になって我々は、弱酸性条件下 2,2'-dipyridyl disulfide (DPDS)を作用させることによってチアゾリジンを開環し Cys 残基へと変換できることを見出した。本研究では、この反応が糖タンパク質化学合成に適用できるかを検討することを目的とし、そのモデルとしてクリイロコイタマダニ由来の糖タンパク質 Evasin-3 を化学合成することにした。

【方法・結果】

Evasin-3 は、66 アミノ酸からなり、2 カ所の N 結合型糖鎖付加モチーフを有している。この配列を、(1-21)、(22-36)、(37-66)の 3 つのセグメントに分割し、それぞれペプチド固相合成法によって調製した。その際、Cys^{22} にはチアゾリジンカルボン酸を、N 結合型糖鎖付加部位である Asn^{25} および Asn^{56} には、GlcNAc で修飾した Asn 誘導体を用いた。

得られた(22-36)および(37-66)セグメントを NCL 法によって縮合し、続いて DPDS によるチアゾリジンの開環を行った。その際、糖鎖部位に目立った副反応は観察されなかった。得られた生成物を(1-21)セグメントとの NCL 反応、続くリフォールディング反応に供することによって、目的とする Evasin-3 が得られた。合成した Evasin-3 は、ヒト CXCL-1 およびヒト CXCL-8 と特異的に結合したことから、Evasin-3 の合成に成功したものと考えられる。



Evasin-3 の一次構造.

Evasin-3, glycoprotein, native chemical ligation

発表責任者：片山　秀和（katay@tokai-u.jp）

講演番号：4C01a01
講演日時：3 月 28 日 09:30～ 理学部講義棟 C01 会場

Dynamics of physicochemical and bacterial characteristics in the autothermal thermophilic aerobic digestion process equipped with two types of aeration systems

○MIN ZHANG, Yukihiro Tashiro, Kenji Sakai (Grad. Sch. of Biosci. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ.)

【Introduction】A unique full-scale autothermal thermophilic aerobic digestion (ATAD) equipped with gas-inducing (GI) agitator has been used to convert human excreta to liquid fertilizer in Chikujo Town, Japan. We have reported that the full-scale ATAD system can produce high-nitrogen liquid fertilizer and forms a unique bacterial community. However, the precise mechanism of nitrogen conservation and transition of bacterial community are still unclear. Thus, the effect of aeration system on physicochemical and bacterial community characteristics in the lab-scale ATAD was investigated. This study might be of special interest to illustrate the mechanisms in the unique ATAD process.

【Materials and methods】Human excreta sludge and liquid fertilizer were collected from a full-scale ATAD plant is in Chikujo Town, Fukuoka Prefecture, Japan. Batch experiments were carried out in two 2.5 L bioreactors with working volume of 1 L. Two types of agitators were applied in the study: a disk turbine (DT) and a gas-inducing (GI). The bioreactors were filled with 950 mL human excreta and 50 mL liquid fertilizer. The digesters were adjusted to the same K_La and circulation of 18.5 h^{-1} and 1000 rpm, respectively. The temperature, DO, ORP, and pH in the ATAD process were automatically measured every half an hour in situ using the above sensors. Bacterial community structures were compared by 16S amplicon analysis using Illumina miseq.

【Results and discussion】To achieve the same K_La value, DT system required much higher air flowrate, suggesting that the GI system shows higher oxygen transfer rate and could reduce heat loss. Lower dissolved oxygen and higher copies number in the first day of GI system indicated that bacterial activity in GI system was higher than that in DT system. GI system showed higher carbon removal rate. Moreover, GI system and DT system showed distinguishable transition of bacteria community structures during these two digestion processes. In conclusion the unique properties of the full-scale ATAD process is caused by the GI agitator system, which would be great potential for liquid fertilizer production from organic wastewater.

autothermal thermophilic aerobic digestion, gas-inducing agitator, bacterial community structure

発表責任者：Kenji Sakai（kensak@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：4C01a02
講演日時：3 月 28 日 09:41～ 理学部講義棟 C01 会場

褐藻を食したヒメハマトビムシの腸管内微生物の探索およびメタゲノム解析
Screening and metagenomic analysis of intestinal microorganisms of *Platorchestia joi* eating brown macroalgae
○中村 晟一朗[1]、馬場 保徳[2]、河井 重幸[2] ([1]石川県大院生物資源、[2]石川県大生物資源研)
○Seiichiro NAKAMURA[1], Yasunori BABA[2], Shigeyuki KAWAI[2] ([1]Ishikawa Pref. Univ., [2]Ishikawa Pref. Univ. Res Inst Biores Biotech.)

【目的】
海洋バイオマスは、広大な排他的経済水域を有する我が国にとって有望な再生可能資源であり、特に褐藻は炭素生産力が高く、魅力的な資源である。褐藻は炭素源としてマンニトールおよび難分解性の多糖アルギン酸やセルロースを含む。

ハマトビムシは節足動物門甲殻綱端脚目の小型甲殻類であり、一部のハマトビムシ（*Talitrus saltator*）は漂着褐藻を食すことが報告されている[1)]。さらに、石川県の海岸ではハマトビムシが漂着海藻の中に群集していることも報告されている[2)]。このハマトビムシが漂着褐藻を食しているならば、その腸管内に褐藻を完全分解して栄養化するシステムを有していると考えられた。本研究では、アルギン酸またはセルロースを分解または資化する微生物の探索ならびにメタゲノム解析を通じて、ハマトビムシによる褐藻の完全分解システムを明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】
石川県柴垣海岸でホンダワラ類と予測される褐藻、海岸砂、およびハマトビムシを採取し、このハマトビムシをヒメハマトビムシ（*Platorchestia joi*）と同定した。また、ヒメハマトビムシが褐藻を食すかどうかを対照区を設けて観察した。その結果、ヒメハマトビムシが褐藻を食すことが分かり、腸管内に褐藻を完全分解して栄養化するシステムを有していると考えられた。

褐藻を食したヒメハマトビムシから腸管を採取し、これを 0.9% (w/v) NaCl 水溶液に懸濁した。懸濁液を、アルギン酸を唯一の炭素源とする選択培地やアルギン酸を含む栄養培地に接種し培養することで、アルギン酸を資化または分解する微生物、およびセルラーゼ活性を持つ微生物を単離した。また、紙を食したヒメハマトビムシからセルラーゼ活性を持つ微生物を単離した。

更に、未滅菌の海岸砂および未滅菌の褐藻を用いて飼育したヒメハマトビムシの腸管、滅菌した海岸砂および滅菌した褐藻または滅菌した紙を用いて飼育した各ヒメハマトビムシの腸管を採取した。これら腸管内微生物に加え、未滅菌の褐藻表面の微生物に対してメタゲノム解析を試みた。

1）K. Crawley *et al.*, *Mar. Biol*, **151**, 1433-1443 (2007)
2）佐藤 綾ら, *日本生態学会誌*, **55**, 21-27 (2005)

brown macroalgae, alginate, metagenomics

発表責任者：中村晟一朗（80207.m4.105y0@gmail.com）

講演番号：4C01a03
講演日時：3 月 28 日 09:52～ 理学部講義棟 C01 会場

水田土壌への牛糞堆肥と竹粉の施用による窒素固定活性と細菌叢の季節変動に関する研究

Study on seasonal changes of nitrogen fixation activity and bacterial community by applying cattle manure and bamboo powder to paddy soil

○AO ZHALAGA[1]、稲場 克弘[2]、平井 英明[1,2]、前田 勇[1,2] ([1]宇都宮大院農、[2]宇都宮大農)
○ZHALAGA AO[1], Katsuhiro INABA[2], Hideaki HIRAI[1,2], Isamu MAEDA[1,2] ([1]Grad. Sch. Agric., Utsunomiya Univ., [2]Sch. Agric., Utsunomiya Univ.)

【目的】
水稲栽培土壌における生物学的窒素固定活性の向上を目的として、土壌への資材の施用が窒素固定活性と細菌叢に及ぼす影響とその季節変動を調べた。本研究では高 CN 比の竹粉に着目し炭素源として竹粉、窒素源として牛糞堆肥を土壌に供給することで、窒素固定細菌による窒素固定が促進されるか否か、細菌叢に変化が認められるか否かを季節ごとに評価した。
【方法】
大学附属農場の圃場にて化学肥料施肥区画、牛糞堆肥施肥区画、牛糞堆肥・竹粉施肥区画の 3 試験区画を設定し、4 月、7 月、11 月の計 3 回について各区画から 3 箇所ずつ土壌のサンプリングを行った。窒素源を含まない培地にて形成されたコロニー数より窒素固定細菌生菌数を評価した。窒素固定を触媒するニトロゲナーゼ活性は、一定量の土壌を取りアセチレン還元法により測定した。細菌叢は、土壌から DNA を抽出し 16S rRNA 遺伝子を標的としたアンプリコンシークエンスを次世代シーケンサーで行うことで解析した。
【結果】
7 月採取土壌では 4 月あるいは 11 月採取土壌と比較し 2-3 倍多い細菌数が確認された。試験区画間の比較では 4 月と 7 月に採取した土壌では有意な差が認められなかったのに対し、11 月採取土壌では牛糞堆肥施肥区画と牛糞堆肥・竹粉施肥区画で化学肥料施肥区画と比較し有意な増加が認められた。ニトロゲナーゼの活性については、7 月採取土壌で 4 月あるいは 11 月採取土壌と比較し 2-3 倍高い活性が確認された。試験区画間の比較では 4 月と 7 月に採取した土壌では同程度の活性が認められ、11 月採取土壌では活性の高い方から牛糞堆肥・竹粉施肥区画、牛糞堆肥施肥区画、化学肥料施肥区画の順となった。細菌叢は化学肥料と牛糞堆肥の施用の違い、4 月から 7 月への季節変動により大きく変動することが明らかとなった。
【考察】
夏場の高温と土壌への灌水による嫌気環境が、窒素固定細菌生菌数とニトロゲナーゼ活性、細菌叢の形成に大きく寄与したものと推察される。施用する資材として化学肥料と牛糞堆肥の違いが生菌数とニトロゲナーゼ活性、細菌叢に及ぼす影響が大きく、竹粉の有無については影響が限定的であると考えられる。

nitrogen fixation, soil bacteria, nitrogenase

発表責任者：前田勇（i-maeda@cc.utsunomiya-u.ac.jp）

講演番号：4C01a04
講演日時：3 月 28 日 10:03～ 理学部講義棟 C01 会場

ポリ乳酸の好気性高温堆肥発酵における微生物叢および有機物分解酵素の解析

Analyses of microbial community structure and organic matter decomposition enzyme activities in aerobic high temperature compost degrading polylactic acid polymers

○石井 紗也加、吉井 貴宏、森屋 利幸、大島 泰郎（共和化工株式会社　環境微生物学研究所）
○Sayaka Ishii, Takahiro Yoshii, Toshiyuki Moriya, Tairo Oshima (Inst. of Environ. Microbiol., Kyowa Kako Co., Ltd)

【目的】堆肥化は生ゴミや下水汚泥、家畜糞尿などの有機性廃棄物を肥料として再利用する技術として古くから用いられている。一方、生分解性プラスチックは堆肥化が可能であるが、従来のプラスチックと同様に焼却などで処理されており、資源循環の観点では生分解性プラスチックの堆肥化処理を促進することが望ましい。生分解性プラスチックのポリ乳酸（PLA）は自然環境下では分解が遅く、分解過程において 50℃以上の熱を必要とすることから、我々は鹿児島県の株式会社山有が開発した発酵温度が 90℃以上に達する好気性高温堆肥発酵に着目し、本堆肥化処理による PLA の迅速な分解について検討している。*Calditerricola* 属などの高度好熱菌は下水汚泥由来堆肥から分離されている [1)] が、本堆肥における PLA 分解微生物や分解酵素に関する知見は少ないことから、本研究では PLA を発酵原料とした好気性高温堆肥発酵のモデル実験を行い、微生物叢や酵素活性などを調べた。
【方法】1cm 片に切断した PLA 包装容器片と好気性高温堆肥を混合し、容量 0.5 L のガラス密閉容器に入れて 55℃、70℃または 78℃で約 40 日間培養した。経時的に発生する炭酸ガスを測定し、PLA 片の分解率を算出した。培養過程の試料から微生物ゲノム DNA と粗酵素を抽出した。真正細菌の 16S rRNA 遺伝子を標的とした PCR および変性剤ゲル電気泳動法（DGGE）により PLA 存在下で優占化する菌群を推定した。SDS-PAGE によるザイモグラフィーを行い、ゼラチンやセルロースなどの加水分解酵素活性を解析した。
【結果および考察】70℃および 78℃での PLA 添加区では培養 3 日後から顕著に炭酸ガスが増加し、2 週間ほどで PLA はほぼ分解された。一方、55℃では 70℃に比べて PLA の分解が遅かった。DGGE 解析の結果、*Calditerricola yamamurae*、*Geobacillus galactosidasius* および *Bacillus kokeshiformis* と相同性の高い菌が 70℃または 78℃において優占化しており、これらが 70℃以上での PLA の分解に関与すると推測された。また PLA の添加により、70℃以上ではセルラーゼ活性が上昇するなど加水分解酵素活性の一部に変化が見られた。PLA の堆肥化過程で生じる微生物叢の変化との関連性について考察する。

1) Moriya, T., Hikota, T., Yumoto, I., Ito, T., Terui, Y., Yamagishi, A., and Oshima, T. 2011. *Calditerricola satsumensis* gen. nov., sp. nov. and *Calditerricola yamamurae* sp. nov., extreme thermophiles isolated from a high-temperature compost. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61: 631~6.

polylactic acid, compost, zymography

講演番号：4C01a05
講演日時：3 月 28 日 10:14～ 理学部講義棟 C01 会場

ゴム添加土壌中の微生物群集構造変化

Changes in soil microbial community structure by addition of rubber particle

○新 朋香、儀武 菜美子、西岡 心、笠井 大輔（長岡技科大・生物）
○Tomoka ARATA, Namiko Gibu, Kokoro Nishioka, Daisuke Kasai (Dept. of Bioeng. Nagaoka Univ. of Tech.)

ポリ(シス 1,4-イソプレン)を基本骨格とする植物資源由来の天然ゴムや石油資源由来の合成イソプレンゴムは、弾性や絶縁性などの優れた物性から様々な工業製品に利用され人類の発展に大きく寄与してきた。近年の世界的な経済成長によって、さらなる需要の拡大も予想されているが、それに伴う廃棄物の増大による環境への影響が懸念されている。廃棄ゴムによる環境課題としては、1 つ目にそれら廃棄物が埋め立てや焼却によって処理されている点、2 つ目に廃棄タイヤの 1 割以上に相当する量がマイクロプラスチックとして環境中に放出されている点が挙げられる。これら課題を解決するために、微生物による環境負荷の少ないゴム分解技術の開発が望まれる。しかし、これまでに得られているゴム分解菌は種類が限られている上、土壌中でのゴム分解を担う微生物叢に関する知見はない。そこで本研究では、土壌中でのゴム分解に関わる微生物叢の解明を目指して、バクテリア・アーキアの群集構造へのゴムの影響を調べた。

ゴム基質として、除タンパク質天然ゴム（DPNR）、合成イソプレンゴム（IR）、加硫ゴム（カーボン含有；CBR）を用いた。土壌重量に対して DPNR と IR は 10%、CBR は 1%となるよう加え、30^{o}C の好気条件下で 40 日間インキュベートし、10 日毎にサンプリングを行った。Fast DNA RSPIN Kit for Soil (MP Biomedicals)を用いて各サンプルから DNA を抽出後、16S rRNA 遺伝子の V4 領域を含む Univ515f-806r プライマーセットを使用し PCR 増幅を行った。その後、MiSeq (Illumina)を用いて増幅産物の DNA シークエンスを行った。得られた 16S rRNA 遺伝子データは、クオリティトリミング、アセンブリを行い、QIIME2 ver.2018.11 により解析した。

門レベルの解析においては、DPNR および IR 添加条件ではゴム未添加条件に比べてグラム陰性菌が多く存在するプロテオバクテリア門が増加していた。DPNR や IR の分解菌としては、これまで放線菌の単離・解析例が多かったのに対して、実環境中ではグラム陰性菌が優占化する傾向にあることが示唆された。一方、CBR 添加条件では放線菌群が含まれるアクチノバクテリア門の優占化が認められた。さらに属レベルでの解析を行った結果、イソプレンゴムの分解能を持つことが示されている *Nocardia* 属が顕著に増加することが明らかとなった。同時に、硫黄酸化細菌として知られている *Sphingomonas* 属の増加が観察された。CBR は、分子内の架橋に関わる硫黄が含まれているため、硫黄酸化能を持つ *Sphingomonas* 属細菌がゴムの脱硫に関わっている可能性が考えられた。

poly(*cis*-1,4-isoprene), Natural rubber, Metagenome

講演番号：4C01a06
講演日時：3 月 28 日 10:35～ 理学部講義棟 C01 会場

大腸菌を用いたパラジウム回収技術の開発

Recovery of palladium by biosorption and bioaccumulation of *Escherichia coli*.

○渡邊 宏樹、山本 兼由（法政大学）
○Hiroki WATANABE, Kaneyoshi YAMAMOTO (Hosei Univ.)

レアメタルのパラジウムは触媒として産業上重要な金属である。しかし、パラジウム国内需要の約30%しかリサイクルできていない。バイオテクノロジーは、低環境負荷・省エネルギー・低コストのメリットに加え、多様な機能を発揮するため、金属リサイクルへの応用が試みられている。本研究はモデル細菌大腸菌を用いたパラジウム回収技術の開発を目指し、パラジウムのバイオソープションとバイオアキュムレーションについて検討した。

まずは大腸菌のパラジウムバイオソープションについて検証を行った。これまでに、真菌や細菌の細胞表層にパラジウムを吸着するバイオソープションが報告されている。そこで、LB 培地で定常期まで培養した大腸菌細胞を集菌し、それを 2 mM パラジウム溶液に加え、パラジウムを大腸菌細胞に吸着させた。その後遠心分離で上清と沈殿に分け、上清の A_{470} によるパラジウム量を測定したところ、2.0×10^9 細胞と混合した上清ではパラジウムが約 25%減少した。同様に、大腸菌以外の 13 種の細菌を GAM 培地で定常期まで培養し、パラジウム吸着実験を行なった。その結果、3 種類の細菌と混合した上清ではパラジウムが約 5%、6 種の細菌では約 10%、3 種の細菌では約 20%減少した。さらに、様々な細胞数の大腸菌をパラジウム溶液に加え、パラジウム吸着実験を行なった結果、1.0×10^{10} 細胞以上を加えたパラジウム溶菌の上清でそのパラジウムが 90%以上減少した。パラジウム溶液に晒した大腸菌細胞を回収し、乾燥後、焼成により精製したパラジウムを定量した結果、大腸菌 1 細胞当たり 0.2 fmol のパラジウムが吸着することを確認できた。つぎに、大腸菌のパラジウムバイオアキュムレーションについて検証を行なった。パラジウムは、大腸菌を含め生体が利用する報告はない。そこで、大腸菌の増殖に影響を及ぼさないパラジウムが含有 LB 培地を調製し、その培地で大腸菌を定常期まで培養した。パラジウム含有培養液から大腸菌細胞を回収し、EDTA 溶液で洗浄後、細胞中に含まれるパラジウムを分離し、原子吸光計で測定した結果、大腸菌 1 細胞当たりに 0.1 μM 程度のパラジウムが存在することが推定された。これらの結果より、モデル細菌大腸菌によるパラジウムのバイオソープションは可能なものの、その特異性や吸着効率の検討が必要であることが示唆された。一方、大腸菌は細胞内にパラジウムを含有することができ、このパラジウム含有能力を応用することで効果的なバイオアキュムレーション技術開発ができることが示唆された。

Escherichia coli, palladium, bioaccumulation

発表責任者：山本兼由（kanyamam@hosei.ac.jp）

講演番号：4C01a07
講演日時：3 月 28 日 10:46～ 理学部講義棟 C01 会場

沈水植物オオカナダモ（*Egeria densa*）に集積するマンガン酸化物―放射光蛍光 X 線分析による化学形態の評価と金属資源回収の試み―

Accumulation of manganese oxide in a submerged plant *Egeria densa* - synchrotron radiation-based X-ray analysis and recovery of metal resource from the environment-

○原田 英美子[1]、奥井 啓介[1]、鋒山 大輝[1]、市之瀬 智生[2]、保倉 明子[2]([1]滋賀県立大・環境、[2]東京電機大・工)
○Emiko HARADA[1], Keisuke Okui[1], Daiki Hokoyama[1], Tomoki Ichinose[2], Akiko Hokura[2] ([1]The Univ. of Shiga Pref., [2]Tokyo Denki Univ.)

【緒言】筆者らはこれまでに、琵琶湖水圏で生育する水生植物オオカナダモ（*Egeria densa*）がレアメタルの一種であるマンガン（Mn）を集積することを明らかにしている[1)]。エネルギー分散型 X 線分析装置を装着した走査型電子顕微鏡（SEM-EDX）による表面分析により、Mn はオオカナダモの植物体表面に付着していることが示されている。オオカナダモの付着微生物 12 株を単離したところ、そのうちの複数が Mn 酸化を有していた。ロイコベルベリンブルー（LBB）を用いた呈色反応により、Mn は水に不溶の酸化型の形態であり、主に植物表面のバイオフィルムに含まれていると考えられた。本研究では、放射光蛍光 X 線分析を用いて、オオカナダモに集積されている Mn の化学形態の測定を行った。さらに、オオカナダモの Mn 集積機構を模倣して環境中から効率的に Mn を回収できる繊維材料の探索を試みた。

【材料及び方法】放射光実験は Photon Factory（高エネルギー加速器研究機構、BL-12C）にて実施し、Mn-XANES（X 線吸収微細構造、X-ray absorption fine structure）スペクトルを測定した。オオカナダモと底泥を琵琶湖水圏の環濠から採取し、凍結乾燥試料を作成した。標準物質のスペクトルを基に、環境試料中の Mn の化学形態の評価を行った。繊維材料を用いた環境からの Mn 回収実験には、ナイロン等の合成繊維、絹（精錬前および精錬後）、綿の各繊維（2 cm 四方）とオオカナダモ（長さ 2 cm）を用いた。琵琶湖水圏の環濠水に繊維材料とオオカナダモを 1 週間から 3 か月浸漬した後回収し、LBB による呈色反応により酸化マンガンの検出を行った。硝酸を用いて金属を抽出し、ICP 発光分光分析装置（ICP-OES）で鉄(Fe)および Mn の濃度を測定した。

【結果および考察】放射光実験の結果、オオカナダモには酸化数の異なる複数の Mn 化合物が含まれていることが示された。また、オオカナダモ表面 Mn-黒色のバイオフィルムが観察される試料から得られたスペクトルは、バイオフィルムが見られない試料のものとは明確に異なっていた。環濠内の 2 か所から得られた底泥に含まれているのはいずれも還元型の Mn 化合物であった。繊維材料の浸漬実験の結果、合成繊維での Mn 含有量は絹および綿の天然繊維を上回っていた。SEM-EDX による観察では、繊維に付着した構造物から Mn が検出された。しかし、無生物材料での Mn 含有量はオオカナダモの値を大きく下回り、無生物材料を用いた Mn の回収は現段階では効果的な手段ではないと考えられた。これらのことから、オオカナダモの Mn 集積には、Mn 酸化作用を持つ微生物とオオカナダモの相互作用が重要であることが推察された。

1）Tsuji K, Asayama T, Shiraki, Inoue S, Okuda E, Hayashi C, Nishida K, Hasegawa H, Harada E (2017) Mn accumulation in a submerged plant *Egeria densa* (Hydrocharitaceae) is mediated by epiphytic bacteria. Plant, Cell and Environment 40: 1163-1173.

Egeria densa, manganese-oxidizing bacteria, synchrotron radiation-based X-ray analysis

発表責任者：原田英美子（harada.e@ses.usp.ac.jp）

講演番号：4C01a08
講演日時：3 月 28 日 10:57～ 理学部講義棟 C01 会場

ファインバブル生成技術を用いた水素細菌の効率的な培養手法の開発と物質生産への展開
Novel cultivation method hydrogen-oxidizing bacteria by using micro-bubble generator

○平野 伸一[1]、山梨 由布[2]、伊藤 司[2] ([1]電中研、[2]群大院理工)
○Shin-ichi HIRANO[1], Yu YAMANASHI[2], Tsukasa ITO[2] ([1]CRIEPI, [2]Gunma Univ.)

【背景および目的】CO_2 の削減と炭素源としての有効活用を両立する CO_2 変換技術の開発が求められている。その１つとして CO_2 を炭素源として増殖する独立栄養微生物の活用が注目されている。一方、太陽光・発電のように CO_2 排出のない再生可能エネルギーの導入が急速に進んでいる。しかし、これら変動型電源は需要超過時に余剰調整力が必要であり、現在、水の電気分解により水素として電気エネルギーを貯蔵、利用する検討が進められている。そこで、水素を CO_2 フリーのエネルギー源として利用する独立栄養微生物：水素細菌による物質生産が有望な CO_2 変換技術の選択肢となりうる。しかし、水素は培養液への溶解度が低いため、通常のバブリング法では通気した水素の大半が水素細菌に使用されず系外に放出され、エネルギー効率が低いという問題がある。そこで本研究では、これまでに水素細菌培養への適用事例の無いファインバブル（直径 100 μm 以下の微細気泡）生成技術を適用し、水素細菌の増殖に与える効果の評価および培養効率の改善を目的とした。気泡の微細化により表面積増大、浮力の低下に起因する培養液中での気泡滞留時間増加による培養効率化が期待される。
【実験手法および結果】本実験では微細気泡発生器（MiBos: Microbubble generator with an oscillating mesh）をガス供給に使用した。MiBos は従来の旋回流で気体と液体を高速混合する方法や液体に高い圧力を与える微細気泡発生装置とは異なり、10μm の孔を持つ多孔板に微小振動を与えることで液体に負荷をかけず微細気泡（直径 10-50μm）を発生できるためダメージ無く微生物を培養できる特徴を有する。培養槽 （300 mL）に搭載した MiBos に混合ガス（$H_2/O_2/CO_2$=8:1:1）を通気し、微細気泡を供給しながら底泥試料より新たに単離した水素細菌 2 種の培養を行った。対照区としては、一般的な水槽用散気管を用いたバブリングによる培養を行った（気泡径 数 mm 以上）。ガス流速は MiBos リアクターで 0.2-0.4 mL/min、通常のバブリングで 200-800 ml/min と大きく異なったが、培養初期においては同様の増殖が見られた。しかし、MiBos リアクターにおいて培養 2 日目以降に水素細菌の増殖が停止する傾向が見られた。そこで、培養液の溶存酸素濃度（DO）を測定したところ、通常のバブリングでは 3 ppm 程度で維持された一方、MiBos では培養１日後より 6ppm 以上に上昇し、O_2 ガスの微細化による DO 上昇が水素細菌の増殖を抑制したと考えられた。そこで、MiBos リアクターに水素ガスのみ微細気泡として供給できるような改造を施し、通常のバブリング法と水素細菌の増殖を比較した。その結果、MiBos リアクターでは通常のバブリングより 1000 倍以上低い水素流量でありながらも同等の増殖速度を維持することに成功し、水素利用効率を劇的に向上させることが可能であった。

Carbon dioxide, Hydrogen, Micro-bubble

発表責任者：平野 伸一（s-hirano@criepi.denken.or.jp）

講演番号：4C01a09
講演日時：3 月 28 日 11:08～ 理学部講義棟 C01 会場

廃棄素材を用いた carotenoid 開裂酸化酵素 2 による crocetin dialdehyde ならびに crocetin の効率的な産生

Effective production of crocetin dialdehyde and crocetin with carotenoid cleavage dioxygenase 2 using the waste material

○角谷 晃司[1,2]、西野 恵理[1]、金丸 真也[1] ([1]近畿大学薬学総合研、[2]近畿大学アンチエイジングセ)
○Koji Kakutani[1,2], Eri Nishino[1], Shinya Kanamaru[1] ([1]Kindai Univ., [2]Kindai Univ. Antiaging Center)

【目的】サフラン(*Crocus sativus* L.)の雌蕊組織には主要成分である crocin や中間代謝物が蓄積し、それらは血流の改善、眼の疲労回復効果や強い抗酸化作用などの様々な生理作用を示す。その中間代謝物である crocetin dialdehyde や crocetin は、zeaxanthin を前駆体として carotenoid 開裂酸化酵素(carotenoid cleavage dioxygenase2:CCD2)によって生成される。しかし、これらの成分はサフランの雌蕊組織でのみ代謝しているため、大量に得ることは困難である。そこで、本研究では、zeaxanthin を多く含む廃棄素材(商品にならない作物など)に着目し、それらから抽出した zeaxanthin と組換え CCD2 を利用した効果的な crocetin dialdehyde ならびに crocetin の産生法について検討した。
【方法】まず、開花後のサフランの雌蕊組織から total RNA を抽出し、RT-PCR により CCD2 遺伝子の増幅を行った。得られた断片を分泌シグナルを有する pBIC ベクターに挿入後、*Brevibacillus choshinensis* HPD31-SP3 株に導入した。培養液中の分泌タンパク質を濃縮後、Histrap カラムを用いて CCD2 を精製し、酵素反応に使用した。基質として用いる zeaxanthin は、卵黄、トウモロコシおよびパプリカなどの zeaxanthin 含量の高い廃棄素材を各有機溶媒で抽出後、Slicael60 カラムにより精製したものを使用した。zeaxanthin から crocetin dialdehyde への変換は CCD2 を、crocetin dialdehyde から crocetin への変換は酵母由来の aldehyde dehydrogenase を使用した。尚、各酵素反応生成物は TLC および HPLC で分析した。
【結果および考察】今回、卵黄、トウモロコシおよびパプリカなどの廃棄素材をアセトン抽出したところ、トウモロコシから純度の高い zeaxanthin（2mg/kg 生重）を得ることができた。組換え CCD2 の調整については、*B. choshinensis* を用いた分泌生産系を試みたところ、培養液中に約 55KDa に活性型のタンパク質生産が確認された。抽出した zeaxanthin に精製 CCD2 を反応し、その反応生成物を TLC 分析したところ、単一のスポットが検出され、2,4-dinitrophenylhydrazine 処理により crocetin dialdehyde であることが示された。さらに、aldehyde dehydrogenase 処理により、crocetin の生成も確認された。
以上、循環資源の再利用として 、zeaxanthin 含量の高い廃棄素材ならびに CCD2 酵素系を活用は、crocetin dialdehyde および crocetin 生産に有効であることが示された。

carotenoid cleavage dioxygenase, crocetin dialdehyde, waste material

発表責任者：角谷　晃司（kakutani@kindai.ac.jp）

講演番号：4C01a10
講演日時：3 月 28 日 11:19～ 理学部講義棟 C01 会場

Actinoplanes sp. OR16 株のイソプレンゴム分解酵素遺伝子の機能解析
Characterization of poly(*cis*-1,4-isoprene) degradation gene in *Actinoplanes* sp. strain OR16
○儀武 菜美子、新 朋香、須田 大登、笠井 大輔 (長岡技科大・生物)
○Namiko GIBU, Tomoka Arata, Daito Suda, Daisuke Kasai (Dept. of Bioeng. Nagaoka Univ. of Tech.)

パラゴムノキ (*Hevea brasiliensis*)が生産する天然ゴムは、ポリ(*cis*-1,4-イソプレン)を基本骨格としている。世界で年間 1,200 万トン以上の生産量を誇り、自動車産業を含む幅広い分野で不可欠な資源である。同時に、年間約 70 万トンの市場規模を持つ石油由来の合成イソプレンゴムも主要産業で幅広く利用されている。しかし、それらの廃棄物の再利用や再資源化は極めて限定的であり、殆どは焼却や埋立てによって処分されている。近年の世界的な経済成長に伴う天然ゴムや合成ゴムの需要拡大から、将来的な廃棄物の増大が予測されており、それらの廃棄物処理の革新が課題となっている。特に、温室効果ガス排出削減や有機性廃棄物の利用用途拡大と言った環境負荷低減の観点から、微生物酵素を用いたゴムの低分子化技術が注目されている。*Actinoplanes* sp. OR16 株は、天然ゴムや合成イソプレンゴムを低分子化し資化することができる。本株のゴム分解酵素系を解明し、ゴム廃棄物処理に応用できれば、それら廃棄物処理を革新できるとともに持続可能社会の実現に寄与できる。そこで本研究では、OR16 株のゴム代謝系の全体像の解明を目指して、本株のゴム代謝に関わる遺伝子の特定と機能解析を行った。

OR16 株の完全ゲノム配列を解読した結果、本株のゲノムは 9.3 Mb の 1 つの環状染色体からなり、8,558 個の CDS を持つことが明らかとなった。また、染色体上には、6 つの 16S-23S-5S rRNA 遺伝子群が推定された。さらに、OR16 株のゲノム上には、既知のゴム分解菌 *Streptomyces* sp. K30 株の菌体外ゴム分解酵素 (Lcp)と 57%、54%、および 48%の相同性を示す 3 つのホモログ (*lcp1*、*lcp2*、および *lcp3*)が見出された。*lcp1* と *lcp2* は、染色体上にタンデムに位置しており、逆転写 PCR 解析から同一の転写単位であることが示された。*lcp1*、*lcp2*、および *lcp3* の機能を明らかにするために、大腸菌を宿主として各遺伝子を発現させた。各精製酵素のポリ(*cis*-1,4-イソプレン)に対する活性を評価した結果、それぞれ有意な活性を示したことから、これら遺伝子が OR16 の天然ゴム分解に関与することが示唆された。さらに、OR16 株のゴム代謝時における各遺伝子の転写誘導性を評価した結果、*lcp1-lcp2* と *lcp3* の転写はそれぞれ約 22 倍と 340 倍に誘導されることが示された。*lcp1-lcp2* と *lcp3* の近傍には、それぞれ TetR 型転写制御因子 (LcpR1 および LcpR2)が見出され、各遺伝子の転写制御に関与すると推察された。これら制御因子の機能解析を行うため、大腸菌組換え体からそれぞれの精製タンパク質を得た。精製 LcpR1 と *lcp1-lcp2* プロモーター領域の相互作用を EMSA によって評価した結果、LcpR1 の特異的な結合が観察された。

poly(*cis*-1,4-isoprene), Natural rubber

講演番号：4C01a11
講演日時：3 月 28 日 11:40～ 理学部講義棟 C01 会場

地下環境を利用したバイオメタン鉱床造成/生産法(Subsurface Cultivation and Gasification; SCG) ～バイオメタン生産成功の条件は何か？～
Subsurface Cultivation and Gasification (SCG) ～What is the condition for the successful generation of biomethane in the SCG?～

○上野 晃生[1]、玉澤 聡[1]、玉村 修司[1]、村上 拓馬[1]、木山 保[1]、猪股 英紀[1]、荒牧 憲隆[2]、青山 秀夫[3]、山口 眞司[3]、長沼 毅[4]、金子 勝比古[1] ([1]幌延地圏環境研究所、[2]（独）香川高専、[3]三菱マテリアル株式会社、[4]広島大院統合生命科学研究科)
○Akio UENO[1], Satoshi TAMAZAWA[1], Shuji TAMAMURA[1], Takuma MURAKAMI[1], Tamotsu KIYAMA[1], Hidenori INOMATA[1], Noritaka ARAMAKI[2], Hideo AOYAMA[3], Shinji YAMAGUCHI[3], Takeshi NAGANUMA[4], Katsuhiko KANEKO[1] ([1]H-RISE, [2]National Institute of Technology Kagawa College, [3]Mitsubishi Material Co. Ltd., [4]Hiroshima University)

【研究背景】幌延地圏環境研究所は、北海道天北炭田の褐炭層や珪藻岩層等に含まれる未利用有機物を微生物によりバイオメタンに変換し回収する技術開発を進め、バイオメタン鉱床造成/生産法(SCG 法)を提唱し[1)]、特許を取得した[2)]。本法は以下の 5 段階から成ることを特徴とする：①堆積岩層または褐炭層の削孔、②高圧水注入による水圧破砕、③H_2O_2 投入による難分解性有機物の酸化分解、④原位置でのメタン生成微生物群の培養、⑤メタンガス生産。本法の最終工程④と⑤では、原位置環境のメタン生成微生物群を利用し、褐炭(Lignite)と H_2O_2 反応溶液(以下、Lig+H_2O_2 溶液)から生じる低分子量有機物からメタンへの変換を行うが、原位置環境でどれだけの量の低分子量有機物を生成する必要があるか、どのような微生物が関わるかを明らかにすることは SCG 法の実用化に向け重要である。本研究は、褐炭層原位置地下水中の微生物群を用い、実験室での培養実験でメタン生成の検証を行った。
【実験方法】褐炭試料は、北海道大学・天塩演習林内の露頭褐炭を用いた。Lig+ H_2O_2 溶液を既報に準じ調製後 TOC を測定した[3)]。嫌気培養用 Hungate チューブを用い、天北猿払炭鉱の地下水に近い塩濃度の培養液を調製後、TOC で 1,000、100、10 mg C L^{-1} の Lig+ H_2O_2 溶液を添加した 3 通りの実験群を設定した。上記褐炭と同層準の天北猿払炭鉱調査で採取した炭層由来地下水を微生物接種源とし($3.8\times10^5\pm1.0\times10^5$ cells ml^{-1})[4)]、培養液に対し 1/10 量を加えた。30℃暗所で静置培養を行いガスクロマトグラフィーにてヘッドスペースガス中のメタンを測定した。培養最終日(160 日目)に培養液より全 DNA を抽出し、16S rRNA および *mcrA* 遺伝子をマーカーとした微生物群集構造解析を行った。
【本研究のまとめ】1,000 mg C L^{-1} の Lig+ H_2O_2 溶液を添加した実験群から約 8 μmol(= 96 μg C L^{-1})のメタンが生成され、メタン変換効率が約 0.01%であることが分かった。一方、100、10 mg C L^{-1} 添加実験群からはメタン生成が検出限界以下であり、SCG 法の成功には一定濃度以上の低分子量有機物が必要であることが分かった。今後、上記のメタン変換効率をどのように上げるか、また、次世代シーケンス解析でどの分類群の細菌やメタン生成アーキアが主要な役割を担っているかを明らかにする予定である。
【参考文献】 [1)]Aramaki *et al.* (2017) Energ Convers Manage 153, 566-575, [2)]特許第 6396068 号 (2018), [3)]Haq *et al.* (2018) Int J Coal Geol 185, 1-11., [4)]Ueno *et al.* (2019) Geomicrobiol J 36, 303-316.

Subsurface Cultivation and Gasification (SCG), lignite, methane

発表責任者：上野　晃生（akio.ueno@h-rise.jp）

講演番号：4C01a12
講演日時：3 月 28 日 11:51～ 理学部講義棟 C01 会場

固体腐植ヒューミンによる生物学的 CO_2 固定・資源化反応の促進
Promotion of biological CO_2 fixation by solid-phase humin
○笠井 拓哉[1]、ラスカー マハスウェタ[1]、粟田 貴宣[2]、片山 新太[1]([1]名大未来研、[2]国総研)
○ Takuya KASAI[1], Mahasweta LASKAR[1], Takanori AWATA[2], Arata KATAYAMA[1] ([1]IMaSS, Nagoya univ., [2]NILIM)

産業革命以降、我々の生活は多くのエネルギーを用いて発展を遂げてきた一方で、それに伴って温室効果ガスの二酸化炭素（CO_2）を大量に排出し続けた結果、地球温暖化が急速に進行している。これは、現在人類が直面している重大な課題の一つであり、CO_2 固定技術の開発が急務になっている。

非光合成独立栄養細菌である酢酸生成細菌は CO_2 を還元し、酢酸を生成できることから、本細菌による CO_2 還元は CO_2 の固定化技術および資源化技術として非常に重要であるが、本 CO_2 固定化技術には水素やギ酸などの電子供与体を供給する必要がある。

固体腐植ヒューミンは土壌や底質など環境中に普遍的に存在し、いかなる pH でも不溶な固体腐植物質である。これまでの研究から、ヒューミンは電子メディエーターとして種間電子伝達に関与すること、ヒューミンによる電子供与により他種微生物の還元反応（脱窒反応やペンタクロロフェノールの脱塩素反応など）を促進することが知られている。そこで我々は、ヒューミンが電子供与体として酢酸生成細菌の CO_2 還元反応にも関与し、CO_2 固定・資源化反応を促進する可能性を考え、ヒューミンが酢酸生成細菌の CO_2 還元反応に与える影響を評価することを目的とした。

本研究では、初めにヒューミンを利用できる酢酸生成細菌群を獲得するために、当研究グループがヒューミン混合培地で維持している嫌気性ペンタクロロフェノール（PCP）脱塩素細菌群を菌源として、炭素源を CO_2 (HCO_3^-)、電子受容体を PCP としたヒューミン添加炭酸バッファー無機培地とヒューミン未添加炭酸バッファー無機培地を用いて嫌気条件で集積培養を行った。得られた酢酸生成細菌群の酢酸生成量を評価するため、培養 15 日目における培地中の酢酸濃度を測定したところ、ヒューミン未添加条件では 0.03 mM 未満であったが、ヒューミン添加条件では約 0.26 mM の酢酸が検出された。さらに、培地中の pH 緩衝液を炭酸バッファーから MOPS バッファーに変更し、同様の実験を行ったところ、MOPS バッファー混合培地ではヒューミン添加・未添加の両条件で酢酸生成が見られなかった。この結果は、先の実験で検出された酢酸がヒューミンに含まれる有機物由来のものではなく、CO_2 還元によって生成されたことを示しており、ヒューミンが CO_2 還元の促進に関与していることが明らかになった。さらに、本研究で使用した嫌気性酢酸生成微生物群の群集構造解析を行ったところ、*Clostridium* 属細菌、*Treponema* 属細菌が CO_2 還元に関与している可能性が示唆された。以上の結果は、ヒューミンによる嫌気的 CO_2 還元反応の促進技術の基礎的知見として非常に重要であると考えられる。

CO_2 fixation, Humic substance, Acetogen

講演番号：4C01a13
講演日時：3 月 28 日 12:02～ 理学部講義棟 C01 会場

Klebsiella sp. YG160 株によるグリセロールから 1,3-プロパンジオールの生産
Production of 1,3-propanediol from glycerol by *Klebsiella* sp. strain YG160.
○矢野 和也、喜多 晃久、中川 克彦、早瀬 伸樹（新居浜高専）
○Kazuya YANO, Akihisa KITA, Katsuhiko NAKAGAWA, Nobuki HAYASE (Niihama NCT)

【研究背景及び目的】
私たちの生活に必要なエネルギー源として、化石燃料に代わる再生利用可能なバイオマス燃料が注目されている。バイオマス燃料の 1 つであるバイオディーゼル燃料はパーム油や菜種油等に含まれる植物由来の脂質であるトリグリセリドをメチルエステル化し、脂肪酸メチルエステルへ変換し、これをエネルギー源としたものである。このバイオディーゼル燃料の生産工程において、グリセロールが副生する。このグリセロールには、触媒や未変換の脂肪酸などの混入があるため、そのまま利用することは難しい。また、グリセロールは高沸点化合物であり、蒸留等による回収は困難であることから、グリセロール廃液は廃水処理や焼却で処分されている。
本研究では、廃棄されているグリセロール廃液中のグリセロールを、微生物の働きにより容易に回収可能な有用有機物に変換することを目指し、グリセロールからエタノール及び 1,3-プロパンジオール(1,3-PDO)を生産する微生物の探索、そして最適な培養条件の検討を行った。
【実験方法及び結果】
グリセロールを炭素源とした寒天培地を用いて、植物や土壌などの分離源から 193 株のグリセロール資化微生物を分離した。分離した菌株を、グリセロールを単一炭素源とした液体培地に植菌し、30℃で培養を行った。HPLC 分析により培養液のグリセロール残存濃度を測定し、グリセロール資化能力を調べるとともに、グリセロールからの代謝産物について解析を行った。その結果、グリセロール資化能力に優れ、顕著に 1,3-PDO を蓄積する YG160 株を得た。16SrRNA の解析の結果より *Klebsiella* 属の細菌であることが明らかになった。YG160 株を用いてグリセロールから 1,3-PDO の生産試験を行ったところ、約 20g/L のグリセロールから約 11g/L の 1,3-PDO を生産した。更に、グリセロール濃度を上げると、生産される 1,3-PDO による生産物阻害を受けることが明らかになった。現在、生産物阻害を低減させる添加物の検討を行うとともに、培地 pH、培養温度、培地組成などを変化させ、グリセロール消費及び 1,3-PDO 生産の最適化について検討を進めている。

1,3-propanediol, glycerol, *Klebsiella*

発表責任者：早瀬 伸樹（hayase@chem.niihama-nct.ac.jp）

講演番号：4C01a14
講演日時：3 月 28 日 12:13～ 理学部講義棟 C01 会場

Nocardia 属細菌のポリイソプレン代謝に関わる遺伝子の単離と機能解析

Identification of poly(*cis*-1,4-isoprene) degradation gens in *Nocardia farcinica* NBRC15532

○鈴木 夏平、佐藤 里咲、儀武 菜美子、笠井 大輔（長岡技科大・生物）
○Natsuhei SUZUKI, Saki Sato, Namiko Gibu, Daisuke Kasai (Dept. of Bioeng. Nagaoka Univ. of Tech.)

パラゴムノキ (*Hevea brasiliensis*)が生産する天然ゴムは、ポリ(*cis*-1,4-イソプレン)を基本骨格としており、弾性や伸張性、加工性等の物性に優れることからタイヤや免震ゴム等の様々な工業製品に利用されている。近年の世界的な経済発展に伴い、それら天然ゴムや化石資源由来の合成イソプレンゴムの需要は増加している。そして、ゴム廃棄物の排出量は将来的に増大すると考えられるが、それらの処理は埋立てや焼却に頼っているのが現状である。温室効果ガスの発生等による環境負荷を低減し、持続可能な社会の形成を実現するためには、環境負荷の少ない廃棄物処理技術の構築が望まれる。これまでに天然ゴムと合成イソプレンゴムを唯一の炭素源として生育できる *Nocardia farcinica* NBRC15532 株を単離した。本株は、細胞外ゴム分解酵素 (Lcp)を用いてイソプレン鎖に酸素分子を添加することでイソプレンゴム低分子化し、末端にアルデヒド基とケト基を持つイソプレンオリゴマーへと変換することが明らかにされている。イソプレンオリゴマーは細胞内に取り込まれた後、アルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH)の作用によって酸化を受けた後にβ酸化経路によって代謝されると考えられている。しかしこれまでに、イソプレンオリゴマーの酸化に関わる酵素とその遺伝子は特定されていない。本研究では、*N. farcinica* NBRC15532 株の天然ゴム代謝系の全容解明を目指して、イソプレンオリゴマーの酸化に関わる ALDH 遺伝子を特定することを目的とした。本研究の成果は、微生物酵素を利用した環境負荷の低いゴム廃棄物処理技術の確立に貢献すると考えられる。

全ゲノム配列の解析から、NBRC15532 株は 6,092 個の ORF を含む 6.4 Mb のゲノムを持つことが示された。本ゲノム上には、推定の ALDH をコードすると考えられる 14 個の遺伝子が見出された。天然ゴム代謝に関与する ALDH 遺伝子を特定するために、網羅的転写量解析を行い、ゴム代謝時における遺伝子の転写誘導性を評価した。その結果、5 つの推定 ALDH 遺伝子 (peg.305, peg.1509, peg.1778, peg.2872, peg.3981)で 2 倍以上の転写誘導性が観察された。各遺伝子産物が Lcp 反応によって生じるイソプレンオリゴマーに対する酸化活性を有しているかを明らかにするために、大腸菌を宿主として各遺伝子を発現させた。得られた組換え体の細胞抽出液から目的タンパク質を精製した。Lcp とポリ *cis*-1,4-イソプレンの反応産物を基質として、NAD^+の還元活性を指標に各精製酵素の ALDH 活性を評価した。その結果、peg.2872 遺伝子産物で有意な NAD^+還元活性 (2.35 mU/mg)が得られたことから、本 ALDH がイソプレンオリゴマーの酸化に関与している可能性が考えられた。peg.2872 破壊株の解析を行うことで、当該遺伝子の天然ゴム代謝への関与を明確にできると考えられる。

poly(*cis*-1,4-isoprene), Natural rubber, aldehyde dehydrogenase

講演番号：4C02a01
講演日時：3 月 28 日 09:30～ 理学部講義棟 C02 会場

好塩性細菌ハロモナスにおける不揮発性腐敗アミンを単一炭素・窒素源とした最小培地中での適合溶質生産特性の解析

Characteristics of compatible solutes production from putrefactive non-volatile amines supplemented in minimal media as sole carbon and nitrogen sources in halophilic eubacterium *Halomonas elongata*

○仲山 英樹、三好 勝之、河本 亮（長崎大院水環）
○Hideki Nakayama, Katsuyuki Miyoshi, Ryo Kawamoto (Nagasaki Univ.)

緒言

中度好塩性細菌 *Halomonas elongata* OUT30018(以下、OUT30018 株)は、リグノセルロース系バイオマス由来炭素源の資化性に優れている。更に不揮発性腐敗アミンに属するチラミンやヒスタミンの資化能力、及びエクトイン生合成機能を有している事が確認されたが、チラミンを用いた場合に高塩条件下でのエクトイン生成量が低くなるという結果が得られた。この原因としてチラミンの炭素に対する窒素比率が低いことが原因であると示唆された。そこで本研究では、塩化アンモニウムを添加して炭素・窒素含有比率を調整することにより、チラミンを単一炭素源とした条件下でのエクトイン生産に最適な炭素・窒素含有比率を決定することを目的とした。

実験

炭素源かつ窒素源としてチラミンを、炭素・窒素含有比率調整用の窒素源として塩化アンモニウムを M63 培地(C,N-free)に添加し、OUT30018 株を培養した。培養中の菌体増殖量（OD_{600}）とチラミン消費量を経時的に測定し、OD_{600} が 1.0 の時点でのエクトインとその他アミノ酸の生産量を HPLC 分析装置により定量した。また、*H. elongata* におけるエクトイン以外のアミノ酸の生産特性を解析するため、OUT30018 株のエクトイン生合成オペロンを欠失させたエクトイン非生産変異株である KA1 株（*ΔectABC*）を用いて、OUT30018 株と同条件下で検証を行った。

結果及び考察

チラミンを炭素・窒素源として OUT30018 株を培養した際、窒素源を強化することでエクトイン生成量が増加したことから、チラミンを原料としたエクトイン生成過程においては、炭素源に対する窒素源比率を高めることが、エクトイン生産効率の向上につながることが示唆された。また、チラミンを単一炭素・窒素源とした場合、ヒスタミンを単一炭素・窒素源とした場合よりもエクトイン蓄積量が多かったことから、OUT30018 株がエクトイン以外適合溶質を生合成できることが示唆された。さらに、OUT30018 株のエクトイン生合成オペロンを欠失させたことにより、6% NaCl 存在下で塩感受性となった KA1 株においても、チラミンを単一炭素源とした条件下では、エクトインを生産できないにもかかわらず、耐塩性を獲得したことからも裏付けられる。

Compatible solute, *Halomonas elongata*, putrefactive non-volatile amines

発表責任者：仲山英樹（nakayamah@nagasaki-u.ac.jp）

講演番号：4C02a02
講演日時：3 月 28 日 09:41～ 理学部講義棟 C02 会場

ハロモナス細胞工場を用いた廃棄バイオマス原料からのγーアミノ酪酸生産

Production of γ-aminobutyric acid from waste biomass using *Halomonas elongata* as cell factory

○鄒 子燕、仲山 英樹（長崎大学院水環）
○Ziyan ZOU, Hideki NAKAYAMA (Nagasaki Univ.)

緒言： 地球温暖化問題への対応は、全世界共通の緊急課題となっており、温室効果ガスの排出を低減することを目的とし、メタンガス、バイオエタノール、バイオディーゼル燃料(BDF)などのバイオ燃料の利用が推奨されている。長崎県雲仙市では、使用済みの廃食用油や菜種など植物油から地熱を活用して製造されるBDF の利用を進めており、ごみ収集車などに軽油の代替として利用されている。工業的に安価な水酸化ナトリウム(NaOH)や水酸化カリウム(KOH)を用いたアルカリ触媒法で BDF が製造できる一方で、10～20% (v/v) の廃グリセリンが副産物として生成する。さらに、廃グリセリンの pH を中和した際に高濃度の NaCl や KCl 等の塩類が生成するために、堆肥の発酵促進用途以外には有効な用途がないため、廃グリセリンの活用法の開発が必要とされている。一方、長崎県の産業廃棄物の6割以上を動物のふん尿と余剰汚泥のバイオマスが占めており、タンパク質やアミン類を含む窒素負荷が高い廃棄バイオマスの処理が必要である。さらに、下水処理水や家畜排水処理水にも水質汚染の原因になるアンモニア態窒素や硝酸態窒素が溶存するため、脱窒処理が必要とされている。

中度好塩性細菌ハロモナス(*Halomonas elongata*)は適合溶質としてエクトインを蓄積する。多様な炭素源を資化できるため、アルカリ触媒法で製造された BDF の副産物である高塩濃度の廃グリセリンを脱塩処理無くそのまま培養基質として利用できる。また、家畜排水に水質汚染の原因になるアンモニア態窒素や硝酸態窒素を培養基質の窒素源として利用できる。そこで、エクトインの替わりに適合溶質としてγ―アミノ酪酸（GABA）を生産する *Halomonas* 細胞工場を創製し、廃グリセリンを炭素源として、さらに排水中のアンモニア態窒素や硝酸態窒素を窒素源として活用し、GABA に再資源化することを目的とする。

実験：*H. elongata* GOP 株に、広範囲の pH 条件で活性を示す変異型グルタミン酸脱炭酸酵素（GAD）をコードする大腸菌由来の *GadBmut* 遺伝子のコドンを *H. elongata* 発現用に最適化した人工遺伝子(*HeGadBmut*)を導入し、組換え *H. elongata* GOP-Gad 株を作製した。そして、長崎県雲仙市で製造された BDF の副産物である廃グリセリンを炭素源として、水質汚染の原因となるアンモニア態窒素や硝酸態窒素を窒素源として添加した改変最小液体 M63 培地を用いて *H. elongata* GOP-Gad 株を培養し、3-6% NaCl を添加した塩ストレス条件下での増殖試験を行うと同時に、HPLC 分析により GABA の生産を確認した。

結果及び考察: 塩ストレス条件下での増殖試験の結果により、組換え *H. elongata* GOP-Gad 株は高塩濃度の環境では廃グリセリンを炭素源、硝酸態窒素、アンモニア態窒素を窒素源として、変最小液体 M63 培地で生育でき、塩濃度の増加により GABA の生産も多くなる。本結果により、高塩環境で GOP-Gad 株は、適合溶質として GABA を細胞内で高効率に *de novo* 生合成できること、さらにバクテリアミルキング法により非侵襲的に GABA を回収できることが示された。今後は、廃グリセリンを炭素源とし、さらに畜産廃水を窒素源として GOP-Gad 株を細胞工場として高効率に GABA を生産するための最適な培養条件を検討する。

waste biomass, *Halomonas elongata*, GABA

発表責任者：仲山英樹（nakayamah@nagasaki-u.ac.jp）

講演番号：4C02a03
講演日時：3 月 28 日 09:52～ 理学部講義棟 C02 会場

酸性耐性をもつ Rhodosporidium fluviale DMKU-RK253 変異株の単離
Isolation of low pH tolerance mutants from Rhodosporidium fluviale DMKU-RK253
○田中 優吏[1]、呉 志展[1]、梶浦 裕之[1]、大橋 貴生[3]、三﨑 亮[1]、リムトン サビトリー[2]、藤山 和仁[1] ([1]阪大, ICBiotech、[2]タイ, カセサート大学、[3]摂南大学 理工学部)
○Yuri Tanaka[1], Chih Chan Wu[1], Hiroyuki Kajiura[1], Takao Ohashi[3], Ryo Misaki[1], Savitree Limtong[2], Kazuhito Fujiyama[1] ([1]ICBiotech, Osaka Univ, [2]Kasetsart Univ, [3]Setsunan Univ)

【　目的　】脂質酵母 *Rhodosporidium fluviale* DMKU-RK253 は菌体内に大量の脂質を蓄積することができるため(REF)、バイオディーゼル生産への利用が期待されている。この株の特徴として粗製グリセロールを炭素源として利用することができる。粗製グリセロールはバイオディーゼルを生産する際、副生成物として得られ、非常に安価な炭素源である。しかし、粗製グリセロールはバイオディーゼルの製造方法により様々な組成、および pH を有するため、炭素源として利用する場合、様々な因子が菌体に対しストレスとなることが予想される。先行研究で *Rhodosporidium* にストレスを与えると脂質量を増加させるというデータもある。そこで本研究では様々なストレス耐性をもつ *Rhodosporidium* 耐性株を取得し、生育、脂質生産量、および組成を解析することとした。
【　方法　】本研究では酸ストレス条件下で *R. fluviale* DMKU-RK253 を生育させ、安定に生育する菌株の単離を行った。今回 YM 培地に酢酸を加えた酸性培地を作製し、*R. fluviale* DMKU-RK253 株を培養し、その後 YM 培地にて復帰培養をおこなった。この操作を 5 回繰り返し、酸耐性株を単離した。野生株と得られた酸耐性株で成長曲線を作製し、またスポットアッセイより詳細な酸耐性の確認を行った。さらに野生株と得られた酸耐性株における脂質生産量を比較した。
【　結果　】0.18 % の酢酸含む YM 培地(pH 4.14)にて、酸耐性株 *R. fluviale* DMKU-RK253 ASS5 を単離した。0.12 %の酢酸を含む培地で他の野生株や耐性株は OD600 が 1.0 を超えるために約 54 時間以上の培養が必要であるのに対し、ASS5 は約 40 時間で OD600 が 1.0 を超え、早い段階で高い増殖を示した。各増殖時間における脂質量、および組成については現在解析を進め変異体の特性を調査する

Rhodosporidium fluviale DMKU-RK253, Growth curve, Biodiesel

発表責任者：藤山　和仁（fujiyama@icb.osaka-u.ac.jp）

講演番号：4C02a04
講演日時：3 月 28 日 10:03～ 理学部講義棟 C02 会場

リパーゼの高発現によるマンノシルエリスリトールリピッドの生産性の向上
Enhanced Production of Mannosylerythritol Lipid by High Expression of Lipase Gene in *Pseudozyma tsukubaensis*

○雑賀 あずさ[1]、菅原 知宏[2]、山本 周平[2]、森田 友岳[1]（[1]産総研・機能化学、[2]東洋紡（株）・敦賀バイオ研）
○Azusa SAIKA[1], Tomohiro SUGAHARA[2], Shuhei YAMAMOTO[2], Tomotake MORITA[1]（[1]ISC, AIST, [2]Tsuruga Inst. Technol., TOYOBO CO., LTD.）

マンノシルエリスリトールリピッド（MEL）は *Pseudozyma* 属に属する担子菌系酵母が菌体外に蓄積する糖型バイオ界面活性剤である。特に、*Pseudozyma tsukubaensis* が生産するジアステレオマー型 MEL-B（MEL-B）は、皮膚に対して優れた保湿効果を発揮することから化粧品用素材として実用化されている。一方、製造コストの低減が、機能性化学品として用途を拡大していくための課題となっている。本研究では、原料である油脂の分解反応を触媒するリパーゼを *P. tsukubaensis* で高発現させることにより、オリーブ油からの MEL 生産量の向上を試みた。まず、*P. antarctica* T-34 株由来のリパーゼ（PaLIPAp）を *P. antarctica* T-34 株由来のグリセルアルデヒド三リン酸デヒドロゲナーゼプロモーター（T34Pgap）の下流に連結したリパーゼ発現ベクターを構築し、*P. tsukubaensis* 1E5 株に導入した。得られた遺伝子組換え株（T34Pgap-PaLIPA 株）を、オリーブ油を炭素源として培養した結果、空ベクター導入株（コントロール株）のリパーゼ活性[0.3U/mg-乾燥菌体重量(DCW)]と比較して、活性が約 9 倍（2.8U/mg-DCW）に向上した。また、T34Pgap-PaLIPA 株の油脂分解量はコントロール株の約 1.3 倍に向上した。MEL-B 生産量を HPLC で評価した結果、T34Pgap-PaLIPA 株の MEL-B 生産量は、コントロール株（31.2g/L）の約 1.3 倍（41.2g/L）に向上した。これらの結果から、リパーゼ活性を強化して油脂分解量を増加させることで、MEL-B 生産量をさらに増大できる可能性が示唆された。そこで、リパーゼ活性のさらなる強化に向けて、高発現プロモーターによるリパーゼ発現量の向上に取り組んだ。*P. tsukubaensis* 1E5 株の RNA シーケンス解析を実施し、油脂培養時に発現頻度の高い２つの遺伝子（ユビキチンおよび伸長因子 EF-1 遺伝子）を選抜した。コントロールとしてグリセルアルデヒド三リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を加え、合計 3 遺伝子のプロモーターを用いて PaLIPAp を発現するベクターをそれぞれ構築し、*P. tsukubaensis* 1E5 株に導入した。その結果、伸長因子 EF-1 プロモーター（E5Ptef）を用いた発現ベクターを導入した遺伝子組換え株（E5Ptef-PaLIPA 株）で、リパーゼ活性がコントロール株の約 22 倍（6.7U/mg-DCW）に向上し、MEL-B 生産量は約 1.9 倍（60.7g/L）に達した。以上の結果から、リパーゼ活性を高めることで、MEL-B 生産量のさらなる増大に成功した。今後、遺伝子組換え株の培養条件を最適化していくことで、MEL-B 製造コストの低減につながることが期待される。本研究は JST の研究成果展開事業 A-STEP により実施した。

Biosurfactants, Mannosylerythritol lipids, Lipase

講演番号：4C02a05
講演日時：3 月 28 日 10:14～ 理学部講義棟 C02 会場

CO_2 からエチレンを生成する新たなバイオプロセスの構築
Construction of novel bioprocess of ethylene production from CO_2
○中村 孝道[1]、谷口 惠梨[1]、白川 和樹[2]、布施 博之[2]、平野 伸一[3]、久留主 泰朗[4]([1]熊谷組技研、[2]芝工大シス理工、[3]電中研、[4]茨城大農)
○ Takamichi NAKAMURA[1], Eri TANIGUCHI[1], Kazuki SHIRAKAWA[2], Hiroyuki FUSE[2], Shin-ichi HIRANO[3], Yasurou KURUSU[4] ([1]Kumagaigumi, [2]Shibaura I.T., [3]CRIEPI, [4]Ibaraki Univ.)

《背景と目的》2°C 目標を達成すべくパリ協定の実施が決定された．その対応策として徹底的な CO_2 排出の最小化が第一に考えられている一方で，大規模発生源から回収した CO_2 を有効利用する CCU（Carbon Capture and Utilization）技術開発による低炭素・炭素循環型社会の実現にも大きな期待がかけられている．これまでに，人工光合成・藻類などのバイオプロセスによる CCU 技術開発が注目されているものの，現時点では CO_2 の処理能力や有用物質生産効率に課題があり実用化のためには大きなイノベーションが必要といえる．そこで，従来とは異なるバイオプロセスによる CCU 技術開発を行い基本技術の選択肢を増やすことが重要であると考え，化成品原料であるエチレンを他のバイオプロセスにより生産する技術開発を目的とした．エチレンは石油や石炭から生産されるのが主流であり，生産に伴い大量の CO_2 を排出するといわれている．CO_2 からエチレンを生産することが可能になれば，CO_2 排出量の大きな削減効果が期待できるとともに CO_2 化学工業という産業分野の創出も期待される．
《方法と結果》CO_2 を炭素源として生育する鉄酸化細菌（*Acidithiobacillus ferrooxidans*, AF-WT）を対象とした．AF-WT はゲノム解析から CO_2 を炭素源として不完全型 TCA 回路により 2-ケトグルタル酸を合成していることが推定されている．エチレン生成酵素（EFE）遺伝子を導入することで，1 ステップで 2-ケトグルタル酸からエチレンを合成する経路構築が可能と考えられた．そこで，AF-WT に対しコドン最適化した EFE 遺伝子を合成し，大腸菌を介して接合伝達により遺伝子導入を行った．得られた組換株（AF-rEF1）は 9K 培地（pH2.0）を用い，5% CO_2 を含む空気をバイアル瓶に密閉して培養を行った．数日培養した後，ヘッドスペースガスを採取し GC-FID によりエチレンガスの分析を行った．野生株（AF-WT）においてはエチレンガスの生成は認められないが，AF-rEF1 においてエチレンガスの生成が確認された．CO_2 利用エチレン生産鉄酸化細菌組換え株の構築に成功した．しかしながら，エチレンガスの生成は極めて微弱であり，CO_2 変換効率には大きな課題がある．現在、恒常的に遺伝子が発現するように設計した新たな組換株（AF-rEF2）を構築しており，エチレンガス生成の確認を行っている．
《今後の展望》鉄酸化細菌は電気培養技術により菌体密度の高度化が可能である．また，電気培養により還元電位を印加し還元力を付与することで，CO_2 の変換効率が上がることも期待される．組換体に電気培養を適用することで，エチレン生産性向上を検討していきたい．

CO_2 utilization, Bioprocess, Chemolithotrophic

発表責任者：中村孝道（takamichi.nakamura@ku.kumagaigumi.co.jp）

講演番号：4C02a06
講演日時：3 月 28 日 10:35～ 理学部講義棟 C02 会場

緑藻 Coccomyxa のゲノム編集技術を用いた油脂生産性増加と細胞壁脆弱化

Increased oil productivity and decreased cell wall thickness in a green alga Coccomyxa by using a forward-genetics-based CRISPR/Cas9 genome editing system

○井出 曜子[1]、早川 准平[2]、小松 さと子[1]、吉満 勇也[1]、原山 重明[2]([1]株式会社デンソー、[2]中央大)
○Yoko IDE[1], Jumpei Hayakawa[2], Satoko Komatsu[1], Yuya Yoshimitsu[1], Shigeaki Harayama[2] ([1]DENSO CORP., [2]Chuo Univ.)

我々は藻類バイオ燃料の実用化に向け、屋外培養に適した緑藻コッコミクサ（*Coccomyxa* sp. KJ 株）を遺伝的に改良する研究を行っている。日本の温泉地から単離された単細胞性緑藻コッコミクサ（*Coccomyxa* sp. Obi 株及び KJ 株）は、pH 3-4 の酸性培地での増殖が速く、他の微生物の混入を最小限に抑えた屋外培養が可能である。また、窒素欠乏などのストレス環境下においてトリアシルグリセロールを主成分とした油脂を大量に細胞内に蓄積する。しかし屋外培養から細胞の回収、油脂抽出、精製、残渣の利用などの過程で課題も多く、育種改良によるバイオ燃料生産コストの低下が必要とされている。

Obi 株及び KJ 株由来の、低クロロフィル、強光耐性、高油脂生産、油脂分解抑制、細胞壁脆弱化などの有用形質を持った突然変異体を複数単離し、次世代シーケンサーを用いたゲノム解析と網羅的な変異解析によってそれぞれの突然変異体の変異遺伝子群を決定し、原因遺伝子候補を選抜した。それらの遺伝子機能を調べるため、CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集によってそれらの候補遺伝子を破壊し、形質を調べた。その結果、緑藻コッコミクサの転写因子、プロテアーゼ、油滴タンパク質をコードする 3 つの遺伝子が、それぞれ異なる経路で油脂生産性に関与することが示された。油脂生産性に関わるこれらの 3 遺伝子のうち、プロテアーゼ遺伝子を破壊することで、光合成活性が増加し、細胞の乾燥重量及び油脂含有率が増加し、細胞が肥大化した。さらに細胞壁の構造が変化し、細胞壁の層の厚みが減少し、細胞破壊が容易になり、油脂抽出率が向上した。また、培養液の泡立ちが減少し、培養、回収時の器壁への付着性が低下した。ゲノム編集により 3 重遺伝子破壊株を作製したところ、低クロロフィル、強光耐性、高油脂生産、油脂分解抑制、細胞壁脆弱化などの性質をすべて持ち、油脂生産性が増加した。したがって、3 重破壊株では油脂生産性の増加に加えて培養、細胞回収の容易さ、油脂抽出効率の改善など複数の要因によって油脂生産コストが低下すると考えられる。

Genome editing, Cell wall, algal biofuel

発表責任者：井出曜子（yoko.ide.j3g@jp.denso.com）

講演番号：4C02a07
講演日時：3 月 28 日 10:46～ 理学部講義棟 C02 会場

酵母を用いたコーヒー抽出残渣からの高付加価値品の生産
Value added chemical production from spent coffee grounds using yeast

○水谷 友梨香[1]、加藤 愛理[2]、関川 貴寛[2,3]、菊川 寛史[2,3]、原 清敬[2,3]([1]静岡県立大院・薬食生命、[2]静岡県立大・食栄・環、[3]静岡県立大院・食栄環)
○Yurika Mizutani[1], Airi Kato[2], Takahiro Sekikawa[2,3], Hiroshi Kikukawa[2,3], Kiyotaka Hara[2,3] ([1]Grad. Sch. Integ. Pharm. Nutri. Sci. Univ. Shizuoka, [2]Sch. Food. Nutri. Sci. Univ. Shizuoka, [3]Grad. Sch. Nutri. Environ. Sci. Univ. Shizuoka)

【背景・目的】
日本のコーヒー輸入量は約 45 万トン(生豆換算, 2018 年)であり、コーヒー飲料製造工場やカフェ、近年ではコンビニエンスストアなどから大量のコーヒー抽出残渣（コーヒー粕）が排出されている。コーヒー粕の一部は肥料化や燃料化が行われているが、製造コストに見合わず、大半は廃棄されているのが現状である。そこで、本研究では、酵母を用いて、コーヒー粕成分から高付加価物質を生産することを目的とした。今回は、具体的な高付加価物質として抗酸化作用を有するアスタキサンチン（ASX）を生産させた。

【方法】
コーヒー粕には、多糖類の他、抗菌作用を有するカフェインやフェノール類が含まれている。そこで、ASX を生産することが知られている赤色酵母（*Xanthophyllomyces dendrorhous*）を用いてカフェインとフェノールに対する細胞増殖と目的産物生産への影響試験を行った。*X. dendrorhous* のカフェイン影響試験については、YM 液体培地に各種濃度のカフェインを含む溶液を添加し、ヒダ付三角フラスコにて 22℃、120 rpm、5 日間振盪培養した。*X. dendrorhous* のフェノール影響試験については、YM 液体培地に各種濃度のフェノールを含む溶液を添加し、ヒダ付三角フラスコにて 22℃、200 rpm、3 日間振盪培養した。カフェイン影響試験、フェノール影響試験を行うにあたり、細胞濃度の測定は 600 nm の吸収を、ASX の定量は高速液体クロマトグラフィーを用いた。

【結果・考察】
培地中のカフェイン濃度が高いほど *X. dendrorhous* の増殖が遅延したが、培養液あたりの ASX 生産はむしろ向上した。これは、ストレス物質であるカフェインに対する細胞の防御反応により、細胞内の ASX の合成量が増加したためと考えられる。また、高濃度のフェノール存在下では、増殖が阻害され、さらには、フェノール濃度依存的に ASX 生産が低下した。よって、コーヒー粕を用いて *X. dendrorhous* の培養を行う際には、カフェインを残存させる一方、フェノールを除去する必要があることが明らかとなった。

yeast, astaxanthin, fermentation

発表責任者：原　清敬（k-hara@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：4C02a08
講演日時：3 月 28 日 10:57～ 理学部講義棟 C02 会場

孟宗竹の総合利用に関する研究(その 5)

Studies on bio-refinery from Moso-bamboo

○王 建鵬[2]、櫻井 友香[1]、矢田堀 裕聖[2]、対馬 克伸[1]、大平 辰朗[3]、平本 茂[2]、椎葉 究[1,2] ([1]東電大理工、[2]東電大理工院、[3]森林総研)
○JIANPENG WANG[2], YUKA SAKURAI[1], YUUKI YATABORI[2], KATSUNOBU TSUSHIMA[1], TATSUROU OHIRA[3], SHIGERU HIRAMOTO[2], KIWAMU SHIIBA[1,2] ([1]Tokyo Denki Univ., [2]Graduate School of Tokyo Denki Univ., [3]Forest Research)

[目的]

モウソウ竹（*Phyllostachys pubescens*）は熱帯および亜熱帯気候で生育するイネ科の常緑多年草である。国内では西日本を中心に広く分布しているが、その用途は竹材、竹炭、竹酢液などに限定されている。よって、モウソウ竹からの新規素材の創出と用途開発は重要な研究課題である。モウソウ竹抽出水は、モウソウ竹の稈部の減圧式マイクロ波水蒸気蒸留抽出によって得られる芳香性の抽出水である。これまでに、モウソウ竹抽出水は抗菌活性、抗ウイルス活性、悪臭消去活性などの機能を有することが報告されている[1)]。今回、モウソウ竹抽出水のさらなる用途拡大を目的とし、高コレステロール血症抑制活性と保水活性の検討を行った。

[方法]

（1）血清コレステロール上昇抑制試験

雄性 C57BL/6J マウスに、高脂肪食とともに竹抽出水を 3 週間飲水として投与し、投与終了後に血清コレステロール値を測定した。

（2）保水活性試験

保水活性は寒天ゲルを用いる水分保持活性により評価した。

[結果]

（1）血清コレステロール上昇抑制作用

竹抽出水は、高脂肪食負荷によって誘導される高コレステロール血症に対して抑制作用を示した。

（2）保水活性

竹抽出水は、4 倍希釈水溶液から原液までの濃度範囲において濃度依存的な保水活性を示した。4 倍希釈水溶液の保水活性は、10%グリセリン水溶液とほぼ同等であった。竹抽出水を ODS カラムで分画し、各画分の保水活性を測定したところ、保水活性は、H_2O 溶出画分が最も高かった。

以上より、竹抽出水は、機能性食品（血中コレステロールが高めの方向けの食品）、食品添加物（保水性向上剤）、機能性化粧品(保湿剤)などに利用できる可能性が示された。

[引用文献]

（1）発明者：大平辰朗、松井直之、河村文郎、抗ウイルス剤、特許第 6155435 号。

ligno-hemicellulose hydrolysates, mice plasma cholesterol, skin moisturizing activity

発表責任者：椎葉　究（shiibak@mail.dendai.ac.jp）

講演番号：4C02a09
講演日時：3 月 28 日 11:08～ 理学部講義棟 C02 会場

水田 MFC における電極周辺土壌への鉄粉散布による出力向上メカニズムの解明
Elucidation of mechanisms for enhanced current generation in rice paddy-field microbial fuel cells supplemented with iron powder

○松元 陽歩[1]、名古屋 美紗[1]、猪鼻 淑乃[1]、土屋 美愉[1]、須賀 恵悟[1]、廣瀬 篤弥[1]、山田 翔平[1]、平野 伸一[2]、伊藤 由紀[2]、田中 姿郎[2]、高妻 篤史[1]、渡邉 一哉[1] ([1]東薬大生命、[2]電中研)
○Akiho MATSUMOTO[1], Misa NAGOYA[1], Yoshino INOHANA[1], Miyu TUCHIYA[1], Keigo SUGA[1], Atsumi HIROSE[1], Shouhei YAMADA[1], Shinichi HIRANO[2], Yuki ITOU[2], Shirou TANAKA[2], Atsushi KOUZUMA[1], Kazuya WATANABE[1] ([1]Tokyo Univ. Pharm. Life Sci., [2]CRIEPI)

有機物を酸化分解し生じる電子を電極等の細胞外電子受容体に放出して生育する微生物は「発電菌」と呼ばれ、土壌などの身近な自然環境中に広く生息する。近年、発電菌を用いた微生物燃料電池(Microbial fuel cell, MFC)の研究開発が精力的に行われており、我々は水田環境中に存在する発電菌を用いた“水田 MFC”の研究を行ってきた。水田においては、イネが光合成により有機物を合成し、その一部が根から根圏土壌中に放出される。水田 MFC においては、イネの根圏にアノード電極、水面にカソード電極を設置し、イネから放出される有機物を発電菌が酸化分解して発生する電子をアノードで回収する。イネの光合成に伴い根圏土壌へ有機物が放出されるため、昼間に出力が上昇し、夜間には低下する（Kaku et al. 2008. *Apple Microbial Biotechnol.* 79:43-49)。水田 MFC は環境センサーの電源として利用可能なことが示されているが、センサーの安定した運転のためには出力のさらなる向上が望まれている。

本研究では、水田 MFC の出力向上を目指し、微生物間および微生物・電極間の電子伝達効率に影響を及ぼすと考えられる鉄化合物微粒子（酸化鉄、水酸化鉄、鉄粉）の根圏土壌への添加を試みた。鉄微粒子をアノードの周辺土壌に散布し、何も散布しない土壌をコントロールとして発電実験を行なった。田植えから稲刈りまでの約 4 ヶ月間、アノードとカソード間の電圧をモニタリングするとともに、月に数回程度ポテンショスタットを用いて分極解析を行った。その結果、鉄粉散布 MFC が最も高い出力を示し、最大出力密度は 168 $mW \cdot m^{-2}$ に達した。一方酸化鉄や水酸化鉄を散布した MFC は、コントロールと同程度の出力（約 70 $mW \cdot m^{-2}$）に留まった。電圧モニタリングにおいて全ての MFC で電圧の昼夜変動が観察されたが、鉄粉散布 MFC の運転開始直後約 1 週間は昼夜変動が見られず、この時の発電は鉄の腐食によるものと考えられた。また、MFC アノードのサイクリックボルタンメトリ解析から、鉄粉散布 MFC のアノード電極微生物の電流生成能が最も高いことが示された。さらに、アノード付着菌叢をシーケンス解析するとともに、電極に付着した鉄微粒子の物性を顕微ラマン分光分析した。その結果、鉄粉散布 MFC のアノード電極において発電菌が属す *Bacillales* が増加し、散布した鉄粉がマグネタイトなどの酸化鉄へ変化していることがわかった。これらの結果から、アノード電極周辺土壌への鉄粉の散布は、電子伝達効率の上昇と発電菌の集積をもたらし、水田 MFC の出力を向上させると考えられた。

exoelectrogen, metabarcoding, energy harvesting

発表責任者：松元陽歩（s158060@toyaku.ac.jp）

講演番号：4C02a10
講演日時：3 月 28 日 11:19～ 理学部講義棟 C02 会場

A novel sensor based on electrochemical reduction of in situ graphene oxide (ERGO) for selective determination of dopamine

○Ning Li[1], Hiroaki Sakamoto[1,2], Eiichiro Takamura[1], Shin-ichiro Suye[1], Haitao Zheng[3] ([1]Dept. Front. Fib. Tech. Sci. Eng., Grad. Sch. Eng., Fukui Univ., [2]Life Sci. Innov., Fukui Univ., [3]Dept. Chem. Eng., Tiangong Univ.)

[Introduction]

Dopamine (DA) is an organic chemical belonging to catechol amine families that are known as one of the brain's neurotransmitters in the human body with the function of ferrying information between neurons. A variety of serious diseases are highly associated with abnormal levels of dopamine, such as Parkinson's disease and schizophrenia. However, DA, ascorbic acid (AA) and uric acid (UA) normally coexist in biological samples and possess the close oxidation potentials which are easily to overlap at almost all kinds of bare electrodes. This trend can be halted by employing different kinds of materials with excellent conductivity to modify bare electrodes, such as graphene-based materials. Herein, a novel electrochemical sensor with high sensitivity and stability for determination of dopamine based on electrochemically in situ reduced graphene oxide (ERGO) modified glassy carbon electrode (GCE) was fabricated.

[Methods]

The fabrication of ERGO/GCE was completed through two simple steps. Briefly, GO film modified electrode (GO/GCE) was obtained by drop casting of GO dispersion dissolved in distilled water on the surface of GCE and subsequently dried under room temperature. GO/GCE was then reduced to ERGO/GCE by cyclic voltammetry (CV) for 24 successive cycles with the scan rate of 100 mV s^{-1}. Fourier transform infrared (FTIR), electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and cyclic voltammetry (CV) were carried out to characterize functional groups and the electrochemical performance of the obtained ERGO. Finally, the as-prepared electrode was employed to detect dopamine by chronoamperometry.

[Results and discussion]

A sensor modified by ERGO material was successfully fabricated by electrochemical method. The developed ERGO/GCE provides more distinct and much wider of the oxidation peak potentials toward simultaneously oxidation of DA (0.182 V vs.$Ag/AgCl_2$), AA (0.015 V vs.$Ag/AgCl_2$) and UA (0.314V vs.$Ag/AgCl_2$). The determination of DA in a wide linear range from 10 μM to 6000 μM with satisfactory stability was achieved by chronoamperometry technique. In addition, the selectivity, repeatability and producibility of the dopamine sensor was also excellent.

dopamine sensor, graphene oxide, electrochemical reduction

講演番号：4C02a11
講演日時：3 月 28 日 11:40～ 理学部講義棟 C02 会場

酵素カスケードシステムを用いたアミノ酸駆動のメンブレンレスバイオ電池の開発

Development of amino acid powered membrane less biofuel cells using multi-enzyme cascade system

○堀永 晃作[1]、里村 武範[1,3]、高村 映一郎[2]、坂元 博昭[2,3]、末 信一朗[1,2,3]、櫻庭 春彦[4]、大島 敏久[5]（[1]福井大学院・工・生物応用化、[2]福井大学院・工・繊維、[3]福井大学・生命セ、[4]香川大農、[5]大阪工大）

○Kousaku HORINAGA[1], Takenori Satomura[1,3], Eiichirou Takamura[2], Hiroaki Sakamoto[2,3], Shin-ichiro Suye[1,2,3], Haruhiko Sakuraba[4], Toshihisa Ohshima[5] ([1]Dept. Appl. Chem. Biotech., Grad. Sch. Eng., Fukui Univ., [2]Dept. Front. Fib. Tech. Sci. Eng., Grad. Sch. Eng., Fukui Univ., [3]Life Sci. Innov., Fukui Univ., [4]Kagawa Univ. Agric., [5]Osaka Inst. Technol.)

［目的］

バイオ電池は、酸化還元酵素を素子として、血中や体外分泌液中のグルコースや乳酸、アミノ酸などが持つ化学エネルギーを電気エネルギーに変換する事ができるデバイスである。バイオ電池は生体内埋込み型医療機器用電源として注目されているが、酵素の安定性や活性の低さに起因する電池の耐久性や低出力という課題を抱えている。我々は、これらの課題を解決するために高い安定性を有する好熱菌由来酵素を用いたバイオ電池の開発を進め長期間可動可能なバイオ電池の開発に成功している。しかしながら低電池出力の課題の解決には至っていない。そこで、4 種類の脱水素酵素（色素依存性 L-プロリン脱水素酵素(LPDH)、NAD^+依存性ピロリン-5-カルボン酸脱水素酵素(P5CDH)、NAD^+依存性グルタミン酸脱水素酵素(GDH)、色素依存性 NADH 脱水素酵素(DI)）を組み合わせた基質の多段階酸化反応経路を設計し、電池出力向上を目指したアノードの開発を進めている。また、酵素活性を向上させた超好熱菌由来マルチ銅オキシダーゼ変異体(mMcoP)を触媒素子としたカソードの開発も進めている。本研究では、多段階酸化反応を行う酵素群と本反応に必要な NAD^+とフェロセンを高分子化合物に修飾したレドックスポリマーを用いたアノード電極とマルチ銅オキシダーゼを修飾したカソード電極を用いたバイオ電池の構築を試みた。

［実験・結果］

LPDH、P5CDH、GDH、DI の 4 種類の好熱菌由来酸化還元酵素とアルギン酸に修飾した NAD^+、多層カーボンナノチューブ(MWCNT)に修飾したフェロセンをグラッシーカーボン電極(GCE)上に固定化した電極を作製した。作製した電極を用いてサイクリックボルタンメトリー測定を行った。その結果、作製した電極において基質の多段階酸化反応を確認することができた。このことから、高分子化合物に修飾した NAD^+、フェロセンは遊離の状態で用いた場合と同様に設計した基質の多段階酸化反応の電子伝達物質として機能していることが確認できた。また、MWCNT を修飾した GCE 上に mMcoP を触媒素子として固定化した電極を作成した。これらの作成したアノード、カソードを用いて電池の出力評価を行ったところ、多段階酸化反応が進むにつれて電池出力の増加が認められた。

biofuel cell, oxidoreductase, thermophile

講演番号：4C02a12
講演日時：3 月 28 日 11:51～ 理学部講義棟 C02 会場

多段階酵素反応型バイオ電池を目指したマイクロフロー型デバイスの構築

Construction of micro fluidic device for multi-enzymatic biofuel cells

○菱井 和樹[1]、小松 丈紘[1]、高村 映一郎[1]、坂元 博昭[1,2]、里村 武範[2,3]、櫻庭 春彦[4]、大島 敏久[5]、天谷 諭[6]、末 信一朗[1,2,3]（[1]福井大学院・工・繊維、[2]福井大学・ライフセ、[3]福井大学・工・生物応用化、[4]香川大農、[5]大阪工大、[6]理研）

○ Kazuki HISHII[1], Tomohiro KOMATSU[1], Eiichiro TAKAMURA[1], Hiroaki SAKAMOTO[1,2], Takenori SATOMURA[2,3], Haruhiko SAKURABA[4], Toshihisa OSHIMA[5], Satoshi AMAYA[6], Shin-ichiro SUYE[1,2,3] ([1]Dept. Front. Fib. Tech. Sci. Eng., Grad. Sch. Eng., Univ. Fukui, [2]Life Sci. Innov., Univ. Fukui, [3]Dept. Appl. Chem. Biotech., Grad. Sch. Eng., Univ. Fukui, [4]Kagawa Univ. Agric, [5]Osaka Inst. Technol, [6]RIKEN)

［緒言］

近年、エネルギーの枯渇や多様性の観点から化石燃料に代わるエネルギー供給源としてバイオ電池（Biofuel cells; BFC）が注目されている。一般的な BFC は食料であるデンプンに含まれるグルコースを基質にしているものが多く、食料との競合やグルコース 1 分子から 2 電子しか得ることできないことが問題である。また、生体触媒である酵素の電極上での活性も BFC の実用化への問題である。

本研究では L-プロリンを開始基質としてピロリン-5-カルボン酸､L-グルタミン酸を介した 2-オキソグルタル酸を経る多段階酵素反応系を触媒する超好熱性アーキア由来の 4 種の脱水素酵素を電極上に固定化し L-プロリン 1 分子から 6 電子を抽出することを目的とした。

そこで高効率な 6 電子酸化反応を達成するために、フローデバイスを用いて多段階酵素反応系に沿った順に配置される様電極上に酵素を固定化し、NAD^+、メディエータを介した電子伝達を行う BFC 用アノードの構築を検討した。さらに、酵素−デバイス間の電子移動効率向上のために His-tag を介した酵素のデバイス上での配向制御固定を行い、高出力なバイオアノードの構築を検討した。

［方法］

カーボン上にスクシンイミド(NHS)基を形成させ、NHS 基とピロリン−5−カルボン酸脱水素酵素(P5CDH)、グルタミン酸脱水素酵素（GDH）の末端アミノ基を架橋反応させ共有結合により無配向的に固定化した。ニトリロ三酢酸 (NTA)基を有するジスルフィド溶液を用いて金電極表面に SAM を形成させ、NTA 基に Ni^{2+}を配位させプロリン脱水素酵素(LPDH)、プロリン脱水素酵素複合体(PDH)を末端に導入されたヒスチジンタグと Ni^{2+}との相互作用により電極に配向固定化した。

［結果］

多段階酵素反応の順序に沿ってマイクロ流路内に酵素を固定化した電極は、単に 4 酵素を混合して固定化したディスク電極と比較して約 21 倍の電流密度を得た。また、6 電子酸化反応では 2 電子酸化反応の 3.6 倍の電流値の増大が確認できたため、フローデバイス上で L-プロリンから 2-オキソグルタル酸までの多段階酵素反応が反応系に沿った順に進行し電極上への電子伝達が行われたと推察され、高効率なマルチステップバイオ電池の構築が期待される。

bio fuel cell, bioanode, bio-device

発表責任者：菱井和樹（hishiik@biofiber-fukui.com）

講演番号：4C02a13
講演日時：3 月 28 日 12:02～ 理学部講義棟 C02 会場

電極表面に固定化された酵素の可動性向上によるバイオ電池の性能向上

Improving the performance of biofuel cell by increasing mobility of hyperthermophilic enzyme immobilized on electrode surface

○高村 映一郎[1]、鈴木 治人[1]、坂元 博昭[1]、里村 武範[1]、櫻庭 春彦[2]、大島 敏久[3]、末 信一朗[1] ([1]福井大工、[2]香川大農、[3]大阪工大)

○Eiichiro Takamura[1], Haruto Suzuki[1], Hiroaki Sakamoto[1], Takenori Satomura[1], Haruhiko Sakuraba[2], Toshihisa Ohshima[3], Shin-ichiro Suye[1] ([1]University of Fukui, [2]Kagawa univ., [3]Osaka Institute of Technology)

［緒言］

生体触媒である酵素を電極素子とするバイオ電池は、燃料が再生可能であることから持続可能なエネルギーの一つとして注目されている。しかし、酵素の長期安定性の低さや出力密度の低さから、実用化には至っていない。本研究室では、優れた長期安定性を有する超熱性アーキア *Aeropyrum pernix* 由来 L-プロリン脱水素酵素（LPDH）に着目してアノード電極を作製してきた。これまでに N 末端に His-tag を付加した酵素を用いて、酵素反応に伴う電子伝達が円滑となる様に配向固定することで無配向固定電極の 90 倍の電流密度を得ることに成功している。また、タンパク質末端に導入されたタグを介して固定化された酵素は電極上で揺れ動いていることも報告されている。我々は酵素分子間の距離を制御することで電極上の酵素の可動性を上昇させ、酵素の酸化還元部位と電極上のメディエータ間の接触性を改善することで触媒電流値の増大にも成功した。本研究では、酵素分子間の距離制御による可動性の上昇を電極との直接電子移動反応が可能な *Pyrobaculum aerophilum* 由来マルチ銅オキシダーゼ（McoP）にも適用し、可動性を制御したバイオアノード、バイオカソードの構築及びバイオ電池の構築を目的とした。

［方法］

1-メチル 2-ピロリドン（NMP）に分散させ MWCNT 溶液をグラッシーカーボン（GC）電極に滴下し、風乾させた。電極を 1-ピレンカルボン酸（PCA），1-ピレン酪酸スクシンイミドエステル（PBSE）混合液に浸漬し、洗浄後に電極を AB-NTA、$NiCl_2$、McoP 溶液の順に浸漬し、His-tag を介して McoP を電極上に固定化した。作製した電極の評価は、3 電極方式にてサイクリックボルタンメトリー(CV)にて行った。

［結果］

McoP 固定化電極の CV 測定を行ったところ、McoP の分子間密度を制御していない電極では基質である酸素の還元電流の増大は 220 μA/cm^2 であった。一方で His-tag を介して McoP を配向固定し、スペーサー（Pyr-COOH）により McoP 間の距離を拡げることで可動性を向上させた電極では 400 μA/cm^2 の増大が確認された。His-tag を介して配向固定化された McoP の分子間距離を制御することでペプチドタグを介して酵素が電極上で揺れ動き、電極表面への接近が容易になったためであると考えられる。

biofuel cell, enzyme immobilization, hyperthemophilic enzyme

発表責任者：高村　映一郎（e_takamr@u-fukui.ac.jp）

講演番号：4C03a01
講演日時：3 月 28 日 09:30～ 理学部講義棟 C03 会場

分子モデリング技術を活用した L-アラビノフラノシダーゼの機能改変
Functional modification of L-arabinofuranosidase using *in silico* analysis
○大橋 博之、駒 大輔、山中 勇人、森芳 邦彦、大本 貴士（大阪技術研）
○Hiroyuki OHASHI, Daisuke KOMA, Hayato YAMANAKA, Kunihiko MORIYOSHI, Takashi OMOTO (ORIST)

【目的】
バイオマスを糖化する際の主要なターゲットはセルロースであり、その糖化効率の向上がバイオマス産業利用の鍵となる。非可食バイオマスでは、セルロース繊維の隙間がリグニンやマトリクス多糖類（ペクチンやヘミセルロースなど）で充填されており、糖化の妨げとなっている。マトリクス多糖類は、多種類の糖残基から構成される複雑な構造を有し、酵素処理による分解に多様な糖加水分解酵素が必要となることが課題である。熱に安定な酵素や、複数の糖を遊離可能な糖加水分解酵素を用いると、バイオマス糖化工程における酵素量や使用酵素の種類の削減が期待されるため、開発・探索が進められている。近年、タンパク質データベースの整備やタンパク質分子モデリング技術の進歩により、結晶構造未知のタンパク質を改変することが可能になりつつある。そこで本研究では、*in silico* 解析を用い、糖加水分解酵素の機能を維持した熱安定性の付与および、基質特異性の改変を試みた。
【方法および結果】
モデルタンパク質として、ダイコン由来アラビノフラノシダーゼ (RsAraf1) を用いた。RsAraf1 は、立体構造や酵素学的性質が解明されていない。まず、RsAraf1 と、Protein Data Bank (PDB) に登録されている結晶構造が既知のタンパク質を相同検索した。その相同検索結果から、RsAraf1 を構成するドメインを予測し、BIOVIA Discovery Studio の分子モデル構築プログラムを用い、RsAraf1 の予測立体構造を構築した。さらに、予測立体構造の酵素活性ポケット、表面電荷、多量体形成能などをシミュレートした。改変部位は、立体構造モデルを用いた *in silico* 解析により決定した。RsAraf1 の 195 位のアラニンをシステインに置換した場合（258 位のシステインとジスルフィド結合を形成)、308 位のアスパラギン酸、339 位のフェニルアラニンをシステインに置換した場合、酵素活性ポケットに影響を与えず、ジスルフィド結合を形成することが予測された。2 つのジスルフィド結合を導入した改変 RsAraf1 を熱処理し、残存活性を調査したところ、未改変 RsAraf1 と比較して耐熱性が向上していた。また、基質特異性は未改変 RsAraf1 と同様であった。また、この改変 RsAraf1 の酵素活性ポケットに関与するアミノ酸配列にアラニン 1 残基を挿入した変異酵素において、キシロシダーゼ活性の向上が確認された。本研究において、構造未知のタンパク質においても、データベースや *in silico* 解析の活用により、目的の機能が付与された改変型酵素の取得が可能であることが確認できた。

glycohydrolase, functional modification, enzymatic saccharification

講演番号：4C03a02
講演日時：3 月 28 日 09:41～ 理学部講義棟 C03 会場

Bifidobacterium bifidum 由来スルフォグリコシダーゼ BbhII の糖鎖結合ドメインの機能解析
Functional analysis of the carbohydrate-binding module of sulfoglycosidase BbhII from *Bifidobacterium bifidum*

○荒井 萌[1]、加藤 紀彦[1]、山田 千早[2]、前渋 貴子[1]、吉田 彩子[3]、西山 真[3]、伏信 進矢[2]、片山 高嶺[1] ([1]京大院・生命、[2]東大院・農生科、[3]東大生物生産工学センター)
○Moe ARAI[1], Toshihiko KATOH[1], Chihaya YAMADA[2], Takako MAESHIBU[1], Ayako YOSHIDA[3], Makoto NISHIYAMA[3], Shinya FUSHINOBU[2], Takane KATAYAMA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]The Univ. of Tokyo, [3]The Univ. of Tokyo, Biotech. Res. Center)

近年の研究から、腸内細菌はヒトの健康や疾患と深い関連を有することが明らかとなってきた。一般に、各菌の腸管での増殖は、腸管内で利用可能なエネルギー源の有無によって影響を受ける。ビフィズス菌は、ヒトミルクオリゴ糖（HMOs）を資化し特に授乳期において優勢となる種（乳児型ビフィズス菌）と、植物由来成分を資化し成人において多く見られる種に大別される。しかし、乳児から成人まで幅広く検出される *Bifidobacterium bifidum* は、HMOs のみならず腸管粘膜層のムチン糖鎖に対しても作用可能な一連の酵素群を有しているため、これらの酵素は本菌とヒトとの一生におよぶ共生に深く関わっていると考えられる。本研究では、ムチンに豊富に存在する硫酸化糖鎖に作用するスルフォグリコシダーゼ BbhII に着目した。

BbhII は *B. bifidum* の細胞表層に発現し 6 位硫酸基を持つ *N*-acetylglucosamine（GlcNAc-6S）を遊離するスルフォグリコシダーゼとして同定された。本酵素は、CBM32 糖鎖結合ドメイン、GH20 触媒ドメイン、C 末端ドメインを有し、GlcNAc-6S との共結晶構造解析において、CBM32 ドメインと GH20 触媒ドメインにそれぞれ 1 分子の GlcNAc-6S が結合することが示された。また、CBM32 ドメインではトリプトファン 183 残基（W183）が GlcNAc-6S との相互作用に重要であることが示唆された。そこで本研究では、本酵素における CBM ドメインの重要性について評価を行った。

まず、野生型あるいは W183 をアラニン残基に置換した W183A 変異型の CBM32 ドメインを精製し、糖リガンドに対する結合性を等温滴定カロリメトリー分析により検討した。その結果、CBM32 ドメインの結合には GlcNAc の 6 位硫酸基が重要であること、さらに W183 が GlcNAc-6S との相互作用に重要な役割を果たしていることが明らかにした。また、遊離の糖基質（*p*NP-β-GlcNAc-6S）およびムチンタンパク質に対する野生型酵素および W183A 変異体あるいは CBM ドメイン欠失変異体それぞれの活性を比色定量、HPLC 分析により測定した。その結果、BbhII バリアント間で遊離の糖基質に対する活性には顕著な差はないが、ムチンに対する活性は CBM32 依存的であることを明らかにした。さらに *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 株を利用して *bbhII* 異種発現株を作製し、菌体を用いて同様に活性測定を行ったところ、やはりムチンに対する活性は CBM32 依存的であることが明らかになった。

Bifidobacterium, sulfoglycosidase, carbohydrate-binding module

発表責任者：片山 高嶺（katayama.takane.6s@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4C03a03
講演日時：3 月 28 日 09:52～ 理学部講義棟 C03 会場

全アミノ酸スキャニング変異導入法を用いた *Bacillus* sp. TAR-1 株由来キシラナーゼの耐熱化

Increase in the thermostability of *Bacillus* sp. strain TAR-1 xylanase using a site saturation mutagenesis library

○鍬田 航平[1]、鈴木 愛美[2]、滝田 禎亮[1,2]、中谷 滉太[2]、李 瞳陽[2]、片野 裕太[2]、兒島 憲二[1,2]、坂直樹[2]、三上 文三[1,2]、八波 利恵[3]、中村 聡[3]、保川 清[1,2]([1]京大・農、[2]京大院・農、[3]東工大・生命理工)

○ Kohei Kuwata[1], Manami Suzuki[2], Teisuke Takita[1,2], Kota Nakatani[2], Tongyang Li[2], Yuta Katano[2], Kenji Kojima[1,2], Naoki Saka[2], Bunzo Mikami[1,2], Rie Yatsunami[3], Satoshi Nakamura[3], Kiyoshi Yasukawa[1,2] ([1]Faculty of Agric., Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ., [3]Dep. of Life Sci. and Technol., Tokyo Tech)

【目的】
キシラナーゼは植物の細胞壁を構成する主要成分の一つであるキシランを分解する酵素で、家畜飼料の消化性向上やパルプ漂白補助剤などに利用されている。一般に、キシランはアルカリ性や高温の条件で水に溶けやすくなることから、産業応用を考えた場合にキシラナーゼへの耐熱性の付与が望まれている。我々は全アミノ酸スキャニング変異導入法を用いて、糖質分解酵素ファミリー10 に属する *Bacillus* sp. TAR-1 株由来キシラナーゼ（XynR）の基質ポケットとその周辺領域（Y44－K115 および A300－N325）に網羅的変異を導入し、耐熱型変異体 S92E を選抜した[1)]。本研究では、S92E の耐熱化機構の解明を試みた。

【方法】
1. 酵素の発現・精製：大腸菌 BL21(DE3)の形質転換菌を 37℃で培養し、IPTG で発現を誘導後、超音波処理した菌体の可溶性画分を陰イオン交換およびゲル濾過クロマトグラフィーにかけた。2. 反応速度論的解析：ブナ材由来キシラン（Beechwood xylan）を基質とし pH 7.8、37℃で反応を行った。経時的に反応液を採取し、還元末端を 3,5-ジニトロサリチル酸により定量した。3. 耐熱性の解析：60℃~85℃で一定時間熱処理後、上記 2 の方法で相対活性（熱処理前に対する熱処理後の活性の相対値）を求めた。4. X 線結晶構造解析：結晶化は蒸気拡散法にて行った。回折データは大型放射光施設 SPring-8 で収集した。結晶構造決定における分子置換には CCP4 の MOLREP を、構造のモデリングには COOT を、精密化には PHENIX の phenix refine を用いた。

【結果と考察】
XynR の野生型酵素（WT）と S92E の反応の至適温度はいずれも 75℃で、至適 pH は WT では 6.0－9.5、S92E では 5.5－11.0 と差はなかった。WT と S92E の K_m はそれぞれ 4.5 mg/mL、12.5 mg/mL、k_{cat} はそれぞれ 42.5 s^{-1}、8.0 s^{-1} で、耐熱化により K_m が 280%に増加した。また WT と S92E の 15 分間の熱処理で相対活性が 50%に低下する温度（T_{50}）はそれぞれ 72.6ºC、75.6ºC で、耐熱化により 3.0℃上昇した。熱失活の活性化エネルギーは、WT と S92E ではそれぞれ 66 kJ/mol、89 kJ/mol であり同程度であった。以上より XynR では S92→E の変異により、活性部位の構造が変化し安定化することにより耐熱性が向上したと考えられる。現在、*Bacillus halodurans* S7 株由来キシラナーゼ XynA[2)]（PDB code 2UWF）をサーチモデルとして WT と S92E の分子置換を行い、構造の精密化を進めている。

【文献】
1) K. Nakatani et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **82**, 1715-1723, 2018
2) G. Mamo et al. *Biochimie* **91**, 1187-1196, 2009

xylanase, thermostability, GH10

発表責任者：鍬田航平（kuwata.kohei.56s@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4C03a04
講演日時：3 月 28 日 10:03～ 理学部講義棟 C03 会場

Thermostabilization of pullulanase by protein engineering

○Yuma KURAKATA, Aki TOMIKI, Tomoko MATSUI (Novozymes Japan Ltd.)

Various industrial applications require thermostability or thermoactivity of enzymes to adapt them to their processes. Pullulanase is a debranching enzyme which can hydrolyze α-1,6 glycosidic linkages of pullulan, amylopectin and other branched polysaccharides. We here report highly thermoactive/stable pullulanase variants generated by protein engineering. We designed variant libraries for pullulanase stabilization by various strategies: molecular dynamics simulation, ancestral sequence reconstruction, etc. Approximately 500 libraries were constructed and screened by measuring the activity at high temperature using dyed amylopectin as a substrate. Obtained promising variants were purified for the detailed characterization. Identified substitutions which have positive effects on thermoactivity/stability improvement were subsequently combined to get further stabilized variants. The latest variant had substantially improved thermoactivity/stability; it showed the highest activity at 80°C under the condition of high concentration of substrate and its Td was above 81°C. Furthermore, the variant also showed high specific activity toward maltodextrins over a wide range of temperature compared with the starting pullulanase.

pullulanase, protein engineering, stabilization

発表責任者：倉方悠馬（ymkk@novozymes.com）

講演番号：4C03a05
講演日時：3 月 28 日 10:14～ 理学部講義棟 C03 会場

Paenibacillus sp. str. FPU-7 由来アルギン酸リアーゼの立体構造
Crystal structure of alginate lyase from Paenibacillus sp. str. FPU-7
○伊藤 貴文、中川 えみ、要田 萌、仲市 あかり、日ビ 隆雄、木元 久（福井県大・生物資源）
○Takafumi ITOH, Emi NAKAGAWA, Moe YODA, Akari NAKAICHI, Takao HIBI, Hisashi KIMOTO (Fukui Pref. Univ.)

【目的】土壌細菌 *Paenibacillus* sp. str. FPU-7 (*P*. str. FPU-7) はキチンを強力に分解する細菌として見出された [1, 2]。現在、本菌において恒常的に発現しているものの機能が未知のタンパク質の解析を行っている。遺伝子上でキチナーゼ遺伝子と近接した機能未知タンパク質について、大腸菌による組換え体を調製し、様々な多糖に対する分解活性や結合活性を検討したところ、新規なアミノ酸配列を持つアルギン酸リアーゼ (PsAly) と同定した。今回、本アルギン酸リアーゼ PsAly の X 線結晶構造解析を行い、立体構造に基づく反応機構の推定を行った。
【方法】組換え PsAly を発現する大腸菌を培養後、タンパク質を抽出し、各種クロマトグラフィーを利用して、目的タンパク質を精製した。市販のキットを利用して、結晶化条件の探索を行ったところ、PEG8000 を含む溶液において結晶が得られた。得られた結晶に対して、放射光実験施設 SPring-8 にて X 線回折実験を行ったところ、0.89 Å 分解能での回折データが収集された。次に、3 ヵ所の Met 残基を SeMet に置換した PsAly を大腸菌によって発現し、野生型と同様に精製後、結晶を調製した。SeMet 置換体結晶と単波長異常分散法により PsAly の立体構造を決定した。そして、アミノ酸配列の保存性やドッキングシミュレーションから触媒中心および反応機構を推定した。
【結果】PsAly の立体構造は大部分が β-シートで構成され、9 段からなる右巻きの β-ヘリックス構造を基本骨格としていた。この β-ヘリックス構造によって、基質が結合する長いクレフト構造が形成されていた。このクレフト上には 6 糖より長い糖鎖が結合することが示唆され、クレフトの中心には 2 ヶ所の金属イオン結合部位が存在した。これらの金属イオンがマンヌロン酸のカルボキシ基と結合することにより C5 位の水素の pK_a を下げ、触媒残基による引き抜きを補助していることも示唆された。基質とのドッキングシミュレーション、アミノ酸配列の保存性、部位特異的変異体の活性、および金属結合部位との位置関係から、Tyr184 と Lys221 が触媒残基候補として推定された [3]。

(1) Itoh, T. Hibi, T., Fujii, Y., Sugimoto, I., Fujiwara, A., Suzuki, F., Iwasaki, Y., Kim, J-K., Taketo, A. and Kimoto, H. ***Appl. Environ. Microbiol.***, 79, 7482–7490, 2013.
(2) Itoh, T., Hibi, T., Suzuki, F., Sugimoto, I., Fujiwara, A., Inaka, K., Tanaka, H., Ohta, K., Fujii, Y., Taketo, A. and Kimoto, H. ***PLoS One***, 11, e0167310, 2016.
(3) Itoh, T., Nakagawa, E., Yoda, M., Nakaichi, A., Hibi, T., Kimoto, H. and Kimoto, H. ***Sci. Rep.***, 9, 14870, 2019.

alginate, alginate lyase, crystal structure

発表責任者：伊藤 貴文（ito-t@fpu.ac.jp）

講演番号：4C03a06
講演日時：3 月 28 日 10:35～ 理学部講義棟 C03 会場

Caldanaerobacter subterraneus 由来 CE-4 酵素の X 線結晶構造解析
X-ray crystallographic analysis of CE-4 deacetylase from *Caldanaerobacter subterraneus*

○佐々本 康平[1,2]、下澤 勇弥[1,2]、氷見山 幹基[1]、森芳 邦彦[3]、大本 貴士[3]、上垣 浩一[1,4]、西矢 芳昭[2]、中村 努[1] ([1]産総研、[2]摂南大学院、[3]大阪技術研、[4]近畿大学)
○Kohei SASAMOTO[1,2], Yuya SHIMOZAWA[1,2], Tomoki HIMIYAMA[1], Kunihiko MORIYOSHI[3], Takashi OHMOTO[3], Koichi UEGAKI[1,4], Yoshiaki NISHIYA[2], Tsutomu NAKAMURA[1] ([1]Natl. Inst. Adv. Ind. Sci. Technol., [2]Grad. School Sci. Eng. Setsunan Univ., [3]Osaka Res. Inst. Ind. Sci. Technol., [4]Kindai Univ.)

【背景・目的】

Caldanaerobacter subterraneus subsp. *tengcongensis* 由来アセチルキシランエステラーゼ（TTE0866）は、Carbohydrate Esterase family 4（CE-4）に分類される。TTE0866 は糖に修飾されたアセチル基を脱アセチル化する酵素であり、分泌シグナル配列（1-22）と機能未知領域（N 末端領域：23-135）及び触媒ドメイン（CE-4：136-324）から構成される。以前我々は、N 末端領域を段階的に欠失させた変異体を調製し欠失による影響について、CD 測定などから評価した。その結果、完全に欠失させた変異体では溶解度が低下し凝集沈殿が起きやすくなる事を明らかにし、昨年度の本学会にて発表した。そこで本研究では、野生型 TTE0866（23-324）の X 線結晶構造解析と N 末端領域単独での CD 測定により、N 末端領域の役割について構造生物学的観点から解明を試みた。

【結果・考察】

野生型 TTE0866 の結晶を用いて、SPring-8 の BL44XU にて分解能 2.2 Å のデータを収集した。分子置換モデルには CE-4 に属する放線菌由来アセチルキシランエステラーゼ（PDB ID : 2CC0 / 配列相同性：39%）を用いた。構造精密化の結果、TTE0866 は既に報告されている CE-4 酵素と同様の触媒残基を有し、活性中心に金属イオンを確認した。しかし、精密化のパラメーターは良好な数値を示したにも関わらず、Gly136 から N 末端側（23-135）の電子密度は観測されなかった。

TTE0866 の結晶中では分子間に空隙が見られ、N 末端側が空隙へ伸長している事が観察された。加えて N 末端領域単独での CD 測定では、不定形タンパク質に特徴的なスペクトルが得られた。これらにより N 末端領域は欠失しているのではなく、結晶内で構造の同一性が乏しいために電子密度が不明瞭であると考えた。また、触媒ドメインの分子表面は疎水性が高く、触媒ドメイン単独では疎水性残基の露出による溶解度の低下や凝集沈殿の可能性が示唆された。これは N 末端領域の欠失変異により得られた以前の結果と合致した。

これらから、N 末端領域は溶液及び結晶中で特定の構造を形成せず、触媒ドメインの分子表面をマスクする事で、タンパク質全体の溶解度向上と凝集防止の役割を担う事が示唆された。

Carbohydrate esterase, X-ray crystallography, Disordered domain

発表責任者：中村　努（nakamura-t@aist.go.jp）

講演番号：4C03a07
講演日時：3 月 28 日 10:46～ 理学部講義棟 C03 会場

麹菌の細胞壁α-1,3-グルカン生合成に関与するα-アミラーゼ AgtA の酵素学的性質の解析
Analysis of enzymological properties of the α-amylase, AgtA, involved in biosynthesis of cell wall α-1,3-glucan in *Aspergillus oryzae*

○小泉 亜未[1]、尾形 慎[2]、矢野 成和[3]、宮澤 拳[1]、吉見 啓[4,5]、佐野 元昭[6]、阿部 敬悦[1,4]（[1]東北大院・農、[2]福島高専・化学バイオ、[3]山形大院・理工、[4]東北大・NICHe、[5]京都大院・農、[6]金沢工大・ゲノム研）
○Ami KOIZUMI[1], Makoto OGATA[2], Shigekazu YANO[3], Ken MIYAZAWA[1], Akira YOSHIMI[4,5], Motoaki SANO[6], Keietsu ABE[1,4] ([1]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., [2]Dept. Appl. Chem. Biochem., Natl. Inst. Tech., Fukushima Coll., [3]Grad. Sch. Sci. Eng., Yamagata Univ., [4]NICHe, Tohoku Univ., [5]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [6]Genome Biotech. Lab., Kanazawa Inst. Tech.)

【背景】糸状菌特有の細胞壁多糖であるα-1,3-グルカン（AG）は細胞壁外層に存在し、感染宿主の防御応答からの回避因子や菌糸の接着因子として機能している。しかし、その生合成機構および制御機構の詳細は未だ不明である。そこで本研究では、麹菌 *Aspergillus oryzae* の GPI アンカー型 α-アミラーゼ AgtA に着目した。AgtA をコードする *agtA* 遺伝子は、主要 AG 合成酵素遺伝子 *agsB* とゲノム上でクラスターを形成している。これまでに当研究室では、*Aspergillus nidulans* の *agtA* 遺伝子を高発現した株で、その細胞壁 AG の分子量が顕著に減少することを報告しており、AgtA は細胞壁 AG の生合成に関与していることが示唆されている [1)]。今回は、細胞壁 AG 生合成機構における AgtA の役割の解明を目指して、*A. oryzae* AgtA の詳細な酵素学的性質を明らかにすることを目的とした。
【方法および結果】初めに、メタノール資化酵母を用いて *A. oryzae* AgtA を異種発現・精製した。その際、組換え AgtA はシグナルペプチドと GPI 結合サイト以降の C 末端側を取り除き、精製用の His-tag を融合して発現させた。AgtA の諸性質を解析したところ、至適温度は 40℃、至適 pH は 5.5 であり、酵素活性に対して金属イオン要求性は見られなかった。一方、2.5 mM の Cu^{2+}の添加により 90%以上の活性阻害が確認された。続いて、AgtA の基質分解様式と反応速度論解析を行うためのオリゴ糖基質（マルトオリゴ糖誘導体）の調製を行った。AgtA の糖転移活性を利用し、*p*NP-α-マルトペンタオシド（G5P）を供与体兼受容体に用いて自己糖転移反応させたところ、生成物として重合度 2～18 の *p*NP-α-マルトオリゴシド（G2P～G18P）の合成を確認した。さらに、TOYOPEARL カラムクロマトグラフィーを用いた精製により高純度（98%以上）の G2P～G8P を得ることに成功した。次に、これらのオリゴ糖誘導体と単糖誘導体（G1P）を含む G1P～G8P に対する AgtA の分解活性を評価した。その結果、AgtA は G1P～G4P に対しては分解活性を示さなかった一方で、重合度 5 以上のオリゴ糖誘導体（G5P～G8P）に対してはエンド型の加水分解能を示した。さらに、G5P～G8P に対する反応速度論解析の結果、触媒効率（1/mM・s）は G6P の時に最大値を示したが、重合度の違いによる大きな差異は観察されなかった。

また非常に興味深いことに、G5P 基質に対する AgtA の加水分解反応に AG 酸分解物であるニゲロオリゴ糖を添加すると基質の分解活性に影響が認められ、基質結合部位以外の糖結合サブサイトが存在する可能性を示唆した。

1)山下雄章ら　日本農芸化学会 2019 年度（平成 31 年度）大会講演要旨集、P. 247。

Aspergillus oryzae, α-amylase, maltooligosaccharide derivative

発表責任者：阿部敬悦（kabe@niche.tohoku.ac.jp）

講演番号：4C03a08
講演日時：3 月 28 日 10:57～ 理学部講義棟 C03 会場

GH15 古細菌トレハラーゼの機能解析
Functional analysis of GH15 *Sulfolobus* trehalases
○坂口 政吉、湯浅 充洋、多田 凌吾、南澤 秋弥、甲田 有梨奈、川喜田 正夫（工学院大先進工）
○Masayoshi Sakaguchi, Mitsuhiro Yuasa, Ryogo Tada, Shuya Minamizawa, Yurina Kota, Masao Kawakita (Kogakuin Univ.)

【目的】トレハラーゼは，非還元性二糖であるトレハロースを加水分解する酵素である。我々は好酸性好熱性古細菌から，4 種のトレハロースを分解する酵素を報告した。これら 4 種の酵素は GH15 ファミリーに分類される。GH15 ファミリーの代表的酵素であるグルコアミラーゼ (GA) の立体構造から，古細菌酵素は N 末端ドメインと C 末端側の触媒ドメインを持つと推定される。そのうち，好酸性クレン古細菌スルフォロバス菌 (*Sulfolobus acidocaldarius*) は，二種のトレハロース分解活性が異なる酵素 (SA1250，SA1816) を持っており，SA1250 はトレハロースに対する分解活性が低い。GA の活性部位は，5 つの保存領域から形成されていることから，本研究では，活性部位を形成していると考えられるアミノ酸配列の違いに注目し，変異導入体を構築，解析し，両酵素の活性の違いについて調べることを目的とした。
【方法】スルフォロバス菌酵素 (SA1250 および SA1816) を研究対象として，細菌酵素を含む 5 種の GH15 酵素の保存領域アラインメント中，SA1250 のみ異なるアミノ酸に注目し，SA1816 および SA1250 のアミノ酸を互いに変換した変異酵素を構築し，トレハロースに対する分解活性を評価した。
【結果】SA1250 および SA1816 の変異酵素を 7 種ずつ解析した。SA1250 変異酵素では，保存領域 4 に位置する 377 番目の Ser 残基を変換した S377D の活性が野生型酵素の活性の 1/4 程度に減少したものの，他の変異酵素は，野生型酵素と変わらない低い分解活性を示した。一方，SA1816 変異酵素では，SA1250 の Ser377 に相当する 369 番目の Asp 残基を Ser 残基へ変換した D369S が低い分解活性を示した。さらに，保存領域 5 に位置するアミノ酸を変換した SA1816 Q539H の分解活性が著しく低下した。このアミノ酸変換に相当する SA1250 H558Q では活性上昇は見られなかった。これらの結果は，両酵素の活性部位形成に関わっているアミノ酸が，それぞれ重要な役割を担っていることを示唆した。残念ながら，分解活性の差異に関わっているアミノ酸は同定できていないが，今後，両酵素の共通点を解析していく。

archaea, GH15 family, trehalase

発表責任者：坂口政吉（bt11532@ns.kogakuin.ac.jp）

講演番号：4C03a09
講演日時：3 月 28 日 11:08～ 理学部講義棟 C03 会場

Falsirhodobacter sp. alg1 が生産するエキソ型アルギン酸リアーゼ AlyFRB の生成物の特徴とその触媒機構

Product of exo-alginate lyase AlyFRB from *Falsirhodobacter* sp. Alg1 and its catalytic mechanism

前原 伸哉[1]、柴田 敏行[1]、田中 礼士[1]、モリ テツシ[2]、○三宅 英雄[1]（[1]三重大院生資、[2]東農工大工）
Shinya MAEHARA[1], Toshiyuki SHIBATA[1], Reiji TANAKA[1], Tetsushi MORI[2], ○Hideo MIYAKE[1]
([1]Grad. Sch. of Bioresources, Mie Univ, [2]Dep. of Biotech. and Life Sci., Tokyo Univ. of Agri. and Tech.)

【背景･目的】

アルギン酸資化性微生物は、複数のアルギン酸リアーゼを発現することでアルギン酸から不飽和ウロン酸のピラノース環が開環した 4-deoxy-L-*erythro*-5-hexoseulose uronic acid（DEH）を生成する。*Saccharophagus degradans* 2-40 が生産する PL17 に属するエキソ型アルギン酸リアーゼ（Alg17C）は、不飽和ウロン酸を生成し、小型タンパク質 KdgF によって DEH を生成することが報告された。一方、*Falsirhodobacter* sp. alg1 は PL15 に属するエキソ型アルギン酸リアーゼ（AlyFRB）を生産するが、KdgF をコードする遺伝子は存在しなかった。また、AlyFRB とアルギン酸を反応させると DEH を生成することを見出した。しかしながら、PL15 のエキソ型アルギン酸リアーゼの生成物の経時変化や詳細な触媒機構はほとんど報告されていない。そこで本研究では、ファミリーの異なる AlyFRB と Alg17C の生成物を経時的に追跡し、それらの生成物の特徴と触媒機構の推定を行った。

【結果】

AlyFRB もしくは Alg17C を低分子化アルギン酸ナトリムと反応させ、それぞれの生成物の経時変化を追跡した。AlyFRB では反応初期に不飽和ウロン酸が急速に生成され、その後、生成された不飽和ウロン酸は徐々に DEH に変換された。一方、Alg17C でも反応初期に不飽和ウロン酸が急速に生成されたが DEH には変換されなかった。次に、AlyFRB と Alg17C の生成物である不飽和ウロン酸を反応させ、その生成物を調べたところ DEH は検出されなかった。これらの結果から同じエキソ型アルギン酸リアーゼでも両者の触媒機構は異なり、AlyFRB はβ-脱離反応によってアルギン酸のグリコシド結合を切断して不飽和ウロン酸を生成した後、速やかにそのピラノース環を開環する触媒が行われることが分かった。

AlyFRB の構造予測を行ったところ、サブサイト+1 周辺では Alg17C と同じ性質のアミノ酸残基が構造上も高く保存されていた。それらのアミノ酸残基に変異を導入し、活性を評価したところ His310 と Tyr364 の変異体の活性は著しく低下した。したがってこれらのアミノ酸残基がβ-脱離反応に伴う触媒残基であると推定した。一方、サブサイト-1 と相互作用するアミノ酸残基は大きく異なっていた。現在、これらのアミノ酸残基に変異を導入し、DEH 生成の触媒機構を調査している。

alginate lyase, DEH, catalytic mechanism

発表責任者：三宅 英雄（miyake@bio.mie-u.ac.jp）

講演番号：4C03a10
講演日時：3 月 28 日 11:19～ 理学部講義棟 C03 会場

非凍結結晶を用いたβ - アミラーゼと基質アナログ複合体構造の pH 変化の解析
Crystallographic analysis of pH dependency of the structure of ß-amylase/complexed with substrate analogs at room temperature

○三上 文三[1,2]、安達 基泰[4]、姜 有那[3]、河村 和広[3]、水谷 公彦[3]、高橋 延行[3]([1]京都大学生存研、[2]京都大学エネ研、[3]京都大学農、[4]日本原子力機構)
○Bunzou Mikami[1,2], Motoyasu Adachi[4], Yuna Kang[3], Hirokazu Kawamura[3], Kimihiko Mizutani[3], Nobuyuki Takahashi[3] ([1]Inst. for Sustainable Humanosphere, Kyoto Univ., [2]Inst. of Adv. Energy, Kyoto Univ., [3]Kyoto Univ. Agric., [4]Japan Atomic Energy Agency)

【目的】ダイズ βーアミラーゼの活性中心には酸、塩基触媒残基である二つの Glu 残基（Glu186 と Glu380）の他に、最大 11Å 移動する 9 残基（96-104）のフレキシブルループと、主鎖の構造がアポ型からプロダクト型に切り換わる 5 残基(340-344)のインナーループの二つの可動ループ、および基質複合体で側鎖の構造が変化する Lys295 が存在する。本酵素の基質アナログとして、グルコース（G1）、マルトース（G2）とマルトペンタオース（G5）を用いて、野生型酵素と変異体酵素について結晶中での複合体構造の pH 変化を追跡した。
【方法】ダイズβ - アミラーゼおよび変異体（E380A、K295A、E186Q/E380Q）の三方晶の結晶は pH 5.4、42%飽和硫安溶液中でハンギングドロップ蒸気拡散法によって作製した。得られた結晶は pH 3.2～9.1 に調整した濃度の異なる G1、G2、G5 を含む母液に５分間以上ソーキングした後に、ガラスキャピラリー中に封じ、SPring-8 のビームライン BL26B1 において室温でＸ線回折データの収集を行った。構造の精密化の計算には主に SHELXL を、モデリングには COOT を使用した。
【結果】回析データの収集は分解能 1.66～1.95 Åで行った。G1 は pH4 では-2 と+2 の２つサイトに結合するが、pH8 では-2、+1 と+2 の３つのサイトに結合し、+1 サイトの結合によってインナーループはアポ型からプロダクト型に構造変化する。+1 サイトへの結合とインナーループの構造変化から求めた pKa の値は 3.9～4.2 であった。G2 は-2～-1 と+1～+2 に連続して 2 分子が結合し、pH4 では-1 サイトのグルコースの環はイス型であるのに対して pH8 ではαアノマーのボート型に歪む。この構造変化から求めた pKa の値は 4.3 付近であった。一方、E380A に結合した G5 は-2～+3 のサイトに結合し、インナーループは常にアポ型であったが、pH 8 以上で、-1 サイトの結合位置が 2Å程度変化することが認められた。この構造変化から求めた pKa の値は 7.9 付近であった。E380A を用いた場合は G1 の結合位置とインナーループの pH による変化は見られず、G2 複合体の-1 サイトのグルコースの環の構造変化も見られないことから、pKa 4 付近の解離基は塩基触媒残基の Glu380 であると推定された。一方、E380A に結合した G5 の結合位置の変化の原因はその pKa 値から酸触媒残基の Glu186 の解離であると推定された。また、K295A 変異体では G1 の結合位置の pH による変化は見られなかった。以上の結果から活性部位における基質アナログの結合とインナーループの構造変化は触媒残基である Glu186 と Glu380 の解離の影響を強く受けていることが明らかになった。

β-amylase, Crystal structure, Enzyme mechanism

発表責任者：三上　文三（b.mikami.kyoto@gmail.com）

講演番号：4C03a11
講演日時：3 月 28 日 11:40～ 理学部講義棟 C03 会場

ブタ血清由来マルターゼ-グルコアミラーゼを構成する２つのサブユニットは独立に機能する
The N- and C-terminal components of porcine serum maltase-glucoamylase function independently.
○渡邊 憲、田上 貴祥、奥山 正幸、木村 淳夫（北大・院農）
○Ken WATANABE, Takayoshi TAGAMI, Masayuki OKUYAMA, Atsuo KIMURA (Hokkaido Univ.)

【目的】マルターゼ-グルコアミラーゼ（MGAM）は 2 つの α-グルコシダーゼ・サブユニットが一次構造上で連結したタンパク質であるが，両サブユニットによる協同的効果など何らかの相互作用は明らかにされていない．本研究ではブタ血清由来 MGAM におけるサブユニット間の相互作用を解明することを目的として，N 末端側サブユニット（NtMGAM；Ser54-Trp921）のみ，C 末端側サブユニット（CtMGAM；Asp927-Trp1820）のみおよび両サブユニットを含む全長 MGAM（FullMGAM；Ser54-Trp1820）の酵素学的諸性質を解析比較した．
【方法】NtMGAM，CtMGAM および FullMGAM にヒスチジンタグを付加した組換え酵素を *Pichia pastoris* により生産し，クロマトグラフィーで精製した．各酵素に対する pH および温度の影響を調べた．また，各種 α-グルコシドに対する加水分解速度を測定し，重合度 2−5 のマルトオリゴ糖（G2−G5）および可溶性デンプンの加水分解における速度パラメーターを算出した．
【結果】G2 の加水分解における至適 pH は 6.6−7.4（NtMGAM），6.0−7.0（CtMGAM）および 6.2−7.0（FullMGAM）であり，pH 安定域は 3.2−9.5（NtMGAM），3.2−10（CtMGAM）および 3.3−9.9（FullMGAM）であった．各温度で処理した後の残存活性から，NtMGAM および CtMGAM はそれぞれ 68°C および 50°C 以下の安定性が観察されたのに対し，FullMGAM は 54°C と 70°C の二段階で残存活性が減少した．全ての組換え酵素は G2−G5 および可溶性デンプンによく作用したが，イソマルトース，スクロース，*p*-nitrophenyl α-グルコシドおよびグリコーゲンをほとんど分解しなかった．G2−G5 および可溶性デンプンの加水分解における k_{cat}/K_m 値（$sec^{-1}mM^{-1}$）は NtMGAM および CtMGAM において，それぞれ 50.5 および 76.6（G2），78.4 および 950（G3），78.8 および 1320（G4），51.9 および 920（G5），17.9 および 872（可溶性デンプン）であり，CtMGAM の活性が NtMGAM のそれを上回っていた．FullMGAM の G2−G5 および可溶性デンプンに対する *s-v* プロットは飽和曲線を示し，「NtMGAM と CtMGAM が独立し作用すると仮定した反応スキーム」から導いた速度式とよく一致した．FullMGAM の G2−G5 および可溶性デンプンの加水分解における k_{cat}/K_m 値（$sec^{-1}mM^{-1}$）はそれぞれ 276，913，1500，960，617 であり，これらは NtMGAM と CtMGAM の k_{cat}/K_m 値の和にほぼ等しいことが判明した．以上の結果から，ブタ血清 MGAM を構成する 2 つの α-グルコシダーゼ・サブユニットは互いに影響せず独立し機能すると考えられる．

α-glucosidase, maltase-glucoamylase, two enzyme-kinetics

講演番号：4C03a12
講演日時：3 月 28 日 11:51～ 理学部講義棟 C03 会場

α-グルコシダーゼを用いたα-マンノシルオリゴ糖の合成

α-Glucosidase-catalyzed synthesis of α-mannoside

○前山 和輝、田上 貴祥、奥山 正幸、木村 淳夫 (北大院農)
○Kazuki MAEYAMA, Takayoshi TAGAMI, Masayuki OKUYAMA, Atsuo KIMURA (Hokkaido Univ.)

【背景・目的】α-グルコシダーゼはα-グルコシド結合の加水分解反応や糖転移反応を触媒する酵素であり,一般的に他のグリコシド結合には作用しない.一方で,*Sulfolobus solfataricus* 由来α-グルコシダーゼ(MalA)については,求核触媒残基変異酵素がβ-マンノシルフルオリド(β-ManF)を糖供与体として様々な受容体にマンノースを転移する活性を示すことが報告されている.一方、天然酵素や野生型酵素によるα-マンノシド結合の合成報告はなく,仮に当該反応が実施可能ならば,種々のα-マンノシルオリゴ糖の合成に有用であると考えられる.そこで本研究では,MalA の類縁酵素である *Aspergillus niger* 由来α-グルコシダーゼを用いたα-マンノシド結合の合成を検討した.
【方法】野生型酵素(ANG)および求核触媒残基を Ser に置換した変異酵素(D490S)を *Pichia pastoris* を用いて生産し,Ni-アフィニティークロマトグラフィーで精製した.D490S または ANG をβ-ManF またはα-マンノシルフルオリド(α-ManF)と各種糖質に反応させ,反応生成物を TLC で分析を行った.糖転移反応が確認された場合は,生成オリゴ糖を活性炭カラムクロマトグラフィーおよび HPLC を用いて精製し,NMR により構造を決定した.
【結果】β-ManF を糖供与体とした D490S の反応では,グルコース,フルクトース,キシロース,マルトース,イソマルトースおよびコージビオースを受容体とした際に糖転移産物が確認された.ガラクトースを受容体とした場合に転位産物は確認されなかった.以上の結果から,D490S が MalA の求核触媒残基変異体と同様にβ-ManF を糖供与体としてマンノシル転移反応を触媒することが明らかになった.　一方,ANG をα-ManF に作用させると,マンノースとフッ化物イオンの生成が認められた.20 mM α-ManF に対する加水分解反応の初速度は 22 sec^{-1} であり,20 mM マルトトリオースに対する初速度の約 1/5300 に相当した。従って,ANG が微弱ながらα-ManF 加水分解活性を有することが明らかになった.次にα-ManF を供与体基質にした糖転移反応を調べた.受容体基質にグルコースおよびキシロースを用いた場合にはオリゴ糖生成が確認されたが,フルクトースおよびガラクトースからは糖転移産物が観察されなかった.グルコースを受容体とした場合の転移生成物は,α-mannosyl-(1→4)-glucose であった.キシロースから得られるオリゴ糖については,現在構造解析を進めている.以上の結果から,ANG がα-ManF を供与体基質にしたα-マンノシド結合の合成反応を触媒することが明らかになった.

α-glucosidase, α-mannoside, *Aspergillus niger*

講演番号：4C03a13
講演日時：3 月 28 日 12:02～ 理学部講義棟 C03 会場

糖転移性を有するβ-N-アセチルヘキソサミニダーゼの探索

Search for beta-N-acetylhexosaminidase with transglycosylation.

○倉掛 昌裕、門田 和也（福山大・海洋）
○Masahiro Kurakake, Kazunari Monden (Fukuyama Univ)

【目的】カニやエビ殻等の成分であるキチンは N-アセチルグルコサミンがβ-1,4 結合した多糖であり医療や食品等に利用されている。キチン分解酵素系の中で N-アセチルグルコサミンを遊離させるβ-N-アセチルヘキソサミニダーゼには糖転移作用を有するものもあり、新規オリゴ糖の合成が期待できる。昨年、土壌より分離したカビ類 A34 株が比較的高い糖転移作用を有するβ-N-アセチルヘキソサミニダーゼを生産し、受容体特異性としてグリセリンへの高い糖転移性を有することを報告した。本研究ではラクトース等より大きな糖類等への受容体特異性を有する酵素の探索を試みた。
【方法】土壌からの菌の分離には 0.5%キチンオリゴ糖（東京化成㈱）、1.5%寒天の平板培地を用いた。分離菌を 0.5%キチンオリゴ糖、0.25%酵母エキスの液体培地 3ml（φ18×180mm 試験管）にて、140rpm、30℃で 3 日間培養し、培養液上清の酵素活性を測定した。酵素活性は 1mM *p*-ニトロフェニル-β-D-N-アセチルグルコサミニドに pH 7、40℃にて 10 分間反応させ、遊離する *p*-ニトロフェノール量を比色法で測定することで求めた。1 分間に 1μmol の *p*-ニトロフェノールを生成させる酵素量を 1U と定義した。糖転移反応では基質に 2%の N,N'-ジアセチルキトビオース（東京化成㈱）を用い、pH7、40℃で 24 時間作用させた。また 8%の受容体を加えて反応させ、各受容体（糖アルコール、糖類等）への糖転移性について調べた。生成糖の分析には GL-C610 カラム（日立化成㈱）を有する HPLC（流速 1.0ml/min、キャリアー　蒸留水、カラム温度 60℃）を用いた。
【結果および考察】土壌からのβ-N-アセチルヘキソサミニダーゼ生産菌の分離を行ったところ、比較的高活性の酵素生産菌 52 株が得られた。これら液体培養液上清を 2%N,N'-ジアセチルキトビオースに作用させて糖転移性について調べた。その結果、基質分解率が低いほど糖転移率は高くなり、糖転移率が 23%以上の菌株酵素の基質分解率は 20%以下であることがわかった。この中でカビ類 M-7 株酵素は基質分解率 16.2%にて糖転移率 87.4%と最もオリゴ糖生成能が高かった。生成したオリゴ糖は、主に 3 糖類のトリアセチルキトトリオースで、その他 4 糖類のテトラアセチルキトテトラオースも生成した。また比較的高活性の 23 株の菌株酵素について、受容体を 2 糖類のラクトースおよびマルトースとして糖転移反応を行ったところ、糖転移性の高い M-7 株酵素より、加水分解性が高く糖転移性を示さなかった放線菌 M-17 株等の菌株酵素において受容体への糖転移物が検出された。このことより基質への糖転移性と、他の受容体への糖転移性が異なることが示唆された。さらに他の受容体への糖転移性について検討した。

acetylhexosaminidase, transglycosylation, acceptor

発表責任者：倉掛昌裕（kurakake@fukuyama-u.ac.jp）

講演番号：4C04a01
講演日時：3 月 28 日 09:30～ 理学部講義棟 C04 会場

キノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素の活性中心サブユニット生合成に関与するセリンプロテアーゼの生化学的・構造学的解析
Biochemical and structural analysis of serine proteinase involved in biosynthesis of active-site subunit of quinohemoprotein amine dehydrogenase
○大関 俊範[1]、中井 忠志[2]、谷澤 克行[1]、岡島 俊英[1] ([1]大阪大学、[2]広島工業大学)
○Toshinori OOZEKI[1], Tadashi NAKAI[2], Katsuyuki TANIZAWA[1], Toshihide OKAJIMA[1] ([1]Osaka University, [2]Hiroshima Institute of Technology)

キノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素(QHNDH)は、各種のグラム陰性細菌において一級アミン類の酸化的脱アミノ反応を触媒するヘテロ三量体酵素である。活性中心を形成する9 kDaのサブユニットQhpCには、３ヶ所分子内チオエーテル架橋およびキノン補酵素システイントリプトフィルキノン(CTQ)と呼ばれる２種類のユニークな翻訳後修飾構造が存在し、3つの修飾酵素が関与する多段階ステップによって生合成される。これまでの解析の結果、まず、細胞質内でラジカルSAM酵素QhpDがAsp/Glu残基とCys残基との間に3ヶ所の分子内チオエーテル架橋を形成し、次にFAD依存性水酸化酵素QhpGが前駆体Trp残基のインドール環を水酸化し、CTQ形成の初発反応を行うと考えている。その後、QhpDとの相互作用に必要であったQhpCのN末端28残基のリーダーペプチドは、サブチリシン様セリンペプチダーゼQhpEによって除去される。このような複数の修飾酵素による多段階のQhpCの生合成反応がどのように制御されているのか解明することが本研究の目的である。今回の発表では、*Pseudomonas putida* QhpEを用いてQhpCに対する反応性を解析した。*Ps. putida*に関しては、QhpCおよびその翻訳後修飾に関わる修飾酵素QhpD、 QhpG、QhpEすべてが、大腸菌発現系を用いて調製されており、それらを用いた試験管内反応による解析が可能である。架橋形成されたQhpCに関しては、QhpDと共発現させ、試験管内反応によって調製することができた。

まず、QhpE と QhpC を混合し、反応物を MALDI-TOF-MS 解析したところ、QhpC の架橋形成の有無に関わらず、リーダーペプチドが切断されることがわかった。さらに、C_{18} カラムを用いた逆相 HPLC 分析によって、リーダーペプチドの解離の時間経過を観測したところ、架橋 QhpC では未架橋 QhpC に比べて、QhpE に対する反応速度が大幅に上昇していることがわかった。QhpE に対する QhpC の解離定数 K_d 値を BLItz™を用いて測定した結果では、架橋形成 QhpC の方が、未架橋の場合と比較して親和性が 2.5 倍に上昇していた。この結果は、HPLC による反応解析の結果と合致している。すなわち、QhpE は QhpC の架橋構造を認識し、その活性が制御されていることが判明した。QhpC の架橋形成と CTQ 形成初発反応にはリーダーペプチドを必要とするため、このような QhpE の反応性は、翻訳されたばかりの未架橋 QhpC のリーダーペプチドが素早く切断されるのを防ぐことに役立っていることが示唆された。また、QhpE を結晶化し、X 線構造解析によって 1.80Å の分解能で構造決定することに成功した。詳細な分子認識についても報告したい。

serine protease, post-translational modification, quinone cofactor

発表責任者：大関　俊範（toshinori-oozeki44@sanken.osaka-u.ac.jp）

講演番号：4C04a02
講演日時：3 月 28 日 09:41～ 理学部講義棟 C04 会場

キノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素オペロンの近傍遺伝子 *Pden_1710* のプロモーター解析
Promoter analysis of *Pden_1710*, a gene neighboring the quinohemoprotein amine dehydrogenase operon

○宮城 尚弥[1]、百﨑 大起[1]、谷澤 克行[2]、岡島 俊英[2]、中井 忠志[1]（[1]広島工業大学 生命学部 食品生命科学科、[2]大阪大学 産業科学研究所 生体分子反応科学研究分野）
○Naoya MIYAGI[1], Daiki MOMOSAKI[1], Katsuyuki TANIZAWA[2], Toshihide OKAJIMA[2], Tadashi NAKAI[1] ([1]Department of Food Sciences and Biotechnology, Faculty of Life Sciences, Hiroshima Institute of Technology, [2]Department of Biomolecular Science and Reaction, Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University)

キノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素（QHNDH）は一級アミンを酸化してアルデヒドを生成する酵素であり、αβγ の３つのサブユニットから構成される。QHNDH は、50 種類以上のグラム陰性菌が保有し、*Paracoccus denitrificans* では *n*-ブチルアミンにより発現が誘導される。QHNDH は γ サブユニット内に特異な翻訳後修飾構造をもち、その修飾反応に必須な酵素遺伝子は QHNDH の構造遺伝子とともに *qhp* オペロンを構成している(1)。一方、*qhp* オペロンの近傍にはアルデヒド脱水素酵素とアサインされた遺伝子（*Pden_1710*）が存在する。*Pden_1710* のホモログは QHNDH をもつ多くの細菌の *qhp* 遺伝子群またはその近傍に共通して存在することから、QHNDH をもつ細菌のアミン代謝において重要な役割を担うことが推測される。本研究では、*Pden_1710* の役割を明らかにすることを目的として、QHNDH が誘導されるブチルアミン存在下において *Pden_1710* の上流領域のプロモーター解析を行った。

まず、*Pden_1710* 上流の遺伝子間領域（322bp）をレポーター遺伝子 *lacZ* の上流に配置したプロモーター活性測定用プラスミド pRK-$P_{pden1710}$-LacZ を構築した。比較対象として、*qhp* オペロンのプロモーター活性測定用プラスミド pRK-P_{A800}-LacZ (1)を用いた。各プラスミドを、*Paracoccus denitrificans* Pd1222 に、エレクトロポレーションにより導入し、テトラサイクリン耐性をもつ形質転換体を得た。続いて、炭素源としてコリン１種類またはコリンとブチルアミンの２種類を含む最少培地を用いて培養し、ONPG 法により LacZ 活性を測定した。その結果、pRK-$P_{pden1710}$-LacZ の形質転換体は、ブチルアミン非存在下ではほとんど LacZ 活性を示さなかったが、ブチルアミン存在下では高い活性（~3.1×10^4 Miller units）を示した。この値は、pRK-P_{A800}-LacZ の形質転換体がブチルアミン存在下で示した活性（~2.8×10^4 Miller units）と同程度であった。以上の結果から、*Pden_1710* の上流には *qhp* プロモーターと同様にブチルアミンにより誘導され、同程度の強度をもつプロモーターが存在することが判明した。このことは、Pden_1710 が QHNDH と同時に強く発現することを意味し、Pden_1710 が QHNDH の生合成または QHNDH による生成物の代謝に関与していることが示唆された。現在、*Pden_1710* の遺伝子破壊を試みており、その結果もあわせて報告したい。

(1) Nakai, T. et al., Biochemistry, 53, 895-907 (2014)

quinohemoprotein amine dehydrogenase, Pden_1710, amine catabolism

講演番号：4C04a03
講演日時：3 月 28 日 09:52～ 理学部講義棟 C04 会場

銅アミン酸化酵素のトパキノン補酵素生合成反応における中間体形成の分光学的解析・速度論的解析
Spectroscopic and kinetic studies of the reaction intermediates formed in cofactor biogenesis of copper amine oxidase

○酒井 克輝[1]、佐々木 康[1]、村川 武志[2]、谷澤 克行[1]、岡島 俊英[1]([1]大阪大学　産業科学研究所　生体分子反応科学研究分野、[2]大阪医科大学　医学部　生化学教室)
○Katsuki SAKAI[1], yasushi sasaki[1], takeshi murakawa[2], katsuyuki tanizawa[1], toshihide okajoma[1] ([1]Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University, [2]Department of Biochemistry, Osaka Medical College)

銅含有アミン酸化酵素は、第一級アミン類の酸化的脱アミノ反応を触媒する酵素であり、ヒトをはじめとする多くの動物、植物、および微生物などに広く存在している。本酵素は、480 nmに極大吸収波長を示す酸化還元補酵素トパキノン（TPQ）を活性中心にもつ。TPQは、特定のTyr残基から自己触媒的な酸化反応によって形成される。その際、前駆体Tyr残基が銅イオンに配位することによって活性化され、さらに連続した酸化反応が起きることが判明している。しかし、銅イオンが配位した直後の初期反応は非常に速く、その詳細なほとんど解明されていない。本研究では土壌細菌*Arthrobacter globiformis* 由来の銅アミン酸化酵素（AGAO）を対象として、この初期反応の詳細を解明することを目的としている。これまでに、活性中心から離れた4残基を改変した変異型酵素（4M-AGAO:N81Q/C315S/N340Q/C636S）において、野生型酵素では見られない400 nm吸収帯をもつ反応中間体（M1）が、TPQ形成(480 nmの吸収増大)に先立って蓄積することを偶然見出している。我々はM1中間体が野生型酵素では全く観測されない初期中間体に対応すると推測し、その解析を行なった

その結果、嫌気条件下では、M1 中間体の可視吸収帯は 30 分以内には消失し、そこに酸素分子を導入すると TPQ が形成されることがわかった。可視吸収を持たない別の中間体の存在も示唆された。TPQ 形成反応の速度論解析の結果、約 70 s で M1 中間体が最大となり、その後 TPQ に変換されることがわかった。さらに、Tyr ラジカルモデル化合物の吸収スペクトルとの比較から、M1 中間体はチロシンラジカルに対応すると推定された。すなわち、4M-AGAO では、Tyr 残基が銅イオンに配位し、電子供与する LMCT（Ligand to Metal Charge Transfer）状態が安定化されていると考えられた。また、M1 中間体の形成が 4 重変異のどの変異の影響に由来するのか解析したところ、2 残基を改変した変異型酵素（2M-AGAO：C315S/C636S）において、4M-AGAO と同様に反応中間体 M1 が観測された。単独の変異や他の 2 残基の組合せでは M1 中間体は形成されなかった。そこで、2M-AGAO において、活性中心である TOQ 前駆体 Tyr382 を Ala に置換した変異体を作製したところ、中間体及び TPQ は形成されなかった。すなわち、活性中心の Tyr 残基が M1 中間体形成に関与していることが示された。加えて、2M および 4M-AGAO 結晶の X 線結晶構造解析を行い、その構造を野生型酵素と比較した。その結果、4M-AGAO と 2M-AGAO では全体構造及び各部位の構造に大きな変化はなかった。変異部位 C315S、C636S 周辺が分子全体のゆらぎなどの変化に寄与し、中間体形成の反応速度に影響を与えている可能性がある。

amine oxidase, Spectroscopic and kinetic studies, reaction intermediates

講演番号：4C04a04
講演日時：3 月 28 日 10:03～ 理学部講義棟 C04 会場

金多孔質と白金ナノクラスターを用いたカビ由来 FAD 依存性グルコース脱水素酵素による直接電子移動型酵素電極反応の実現と解析

Analysis of direct electron transfer-type bioelectrocatalysis of fungus-derived FAD-dependent glucose dehydrogenase using porous gold electrodes and enzymatically implanted platinum nanoclusters

○足立 大宜[1]、藤井 昂洸[2]、本田 通済[2]、北隅 優希[1]、白井 理[1]、加納 健司[1]([1]京大院農、[2]池田糖化工業)
○Taiki ADACHI[1], Takahiro FUJII[2], Michinari HONDA[2], Yuki KITAZUMI[1], Osamu SHIRAI[1], Kenji KANO[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Ikeda Tohka Industries Co., Ltd.)

【目的】

酸化還元酵素反応は電極反応と共役させることが可能であり，これを酵素電極反応と呼ぶ．酵素電極反応は，酵素が電極と直接電子授受を行う直接電子移動（DET）型反応と，メディエータと呼ばれる低分子酸化還元物質を介して電子授受を行うメディエータ電子移動（MET）型反応の 2 種に大別できる．*Aspergillus terreus* 由来の FAD 依存性グルコース脱水素酵素（GDH）は，グルコースに対する高い基質特異性と酸素非感受性を有しており，市販の MET 型血糖値センサに搭載されている．しかし，本酵素の DET 型反応に関する報告は数少ない．GDH の DET 型反応が困難な 2 つの理由として，①電極表面の有効酵素吸着量が少ないこと，②電極反応部位である FAD と電極間の距離が長いために界面電子移動速度が遅いことが考えられる．そこで，本研究では，①表面に酵素程度の大きさの細孔を有する金多孔質電極と，②六塩化白金（IV）酸を電子受容体として GDH 内の FAD 近傍に白金ナノクラスター（PtNC）を生成した GDH-PtNC 複合体を用いることで，GDH の DET 型反応を試み，その現象について考察と解析を行った．

【方法】

まず，0.5 M グルコース溶液中で金平板電極に 1.8 V vs. Ag|AgCl|sat. KCl の電位を 1 時間印加することで金の陽極酸化を行い，金多孔質電極を作製した．次に，グルコースと六塩化白金（IV）酸を含む溶液に GDH を加え，室温で 1 h 反応させることで GDH-PtNC 複合体を作製した．そして，本複合体を修飾した金多孔質電極を作用極として，25 °C, pH 7.0 の条件で電気化学測定を行った．

【結果】

GDH-PtNC 複合体修飾電極は，グルコース存在下で急峻な立ち上がりの酸化電流を記録した．本電極を 8 M 尿素溶液に浸して酵素を失活させた後の再測定では触媒電流が消えたことから，本電流は GDH の DET 型反応を示唆している．得られた電流電圧曲線を速度論的に解析した結果，本現象は，電極の多孔質化に伴い，有効酵素吸着量が上昇するとともに界面電子移動可能な配向を示す酵素の割合が増大したことと，GDH 内部の PtNC が FAD-電極間の距離を縮小し，界面電子移動速度が上昇したことに起因すると考えられる．このように，酵素-PtNC 複合体は，他のフラビン酵素でも新たに DET 型反応を実現するためのツールとして大きく期待できる．

bioelectrocatalysis, FAD-dependent glucose dehydrogenase, direct electron transfer

発表責任者：加納　健司（kano.kenji.5z@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4C04a05
講演日時：3 月 28 日 10:14～ 理学部講義棟 C04 会場

Bacillus smithii 由来高度耐熱性インジゴ還元酵素の生化学的特性解析

Structure and functional analysis of indigo reductase from Bacillus smithii

○米田 一成[1]、吉岡 観紗[1]、櫻庭 春彦[2]、荒木 朋洋[1]、大島 敏久[3] ([1]東海大農、[2]香川大農、[3]大阪工大工)
○Kazunari YONEDA[1], Misa YOSHIOKA[1], Haruhiko SAKURABA[2], Tomohiro ARAKI[1], Toshihisa OHSHIMA[3] ([1]Tokai Univ., [2]Kagawa Univ., [3]Osaka Inst. Tech.)

【目的】

日本の伝統産業である藍染めは藍と呼ばれる蓼（タデ）科植物の葉を発酵させたスクモを原料に用いて、常温高アルカリ条件下で発酵還元により作られる。微生物によるスクモ還元は古来より行われていたが、その実態はほとんど不明であり、職人らの経験と勘に基づいて作業が続けられてきた。そのため同一原料・同一操作に因りながら還元力の異なる染色液ができ、その品質管理が困難な事が報告されている。これまでに藍染め染色液よりインジゴ還元酵素を生産する常温性の好アルカリ性菌の単離や精製酵素の機能解析例はあるが、酵素の不安定性の問題からインジゴ還元酵素の詳細な機能解析や応用には未だに至っていない。そこで、本研究ではインジゴ還元活性を有する好熱性 *Bacillus* 属細菌である、*B. smithii* に着目し、日本の伝統産業である藍建てにおけるインジゴの還元過程を生化学的視点から解明することを目的とした。

【方法・結果】

B. smithii のゲノム情報から耐熱性インジゴ還元酵素と予測される遺伝子（WP_003354211.1; FMN 依存性 NADH アゾ還元酵素）を同定し、コドンの最適化を行った遺伝子を合成した後、タンパク質発現用ベクターである pET15b ベクターにライゲーションを行った。その後、大腸菌 BL21codon plus (DE3)RIPL を用いて IPTG による遺伝子発現を行った。遺伝子発現産物は Talon コバルトアフィニティーカラムで精製を行い、N_2 ガスを用いた嫌気条件下におけるインジゴカルミン（水溶性インジゴ；インジゴ還元酵素のモデル基質）の還元活性を測定した結果、本酵素がインジゴカルミン還元活性を有すことを明らかにした。基質特異性を調べたところ、メチルレッド、メチルオレンジ、アシッドレッド 88、オレンジ II などのアゾ化合物に対しても反応性があることから、本酵素は広基質特異性酵素であることが明らかになった。さらに、100℃、10 分間の熱処理でも全く失活しない耐熱性の高いインジゴ還元酵素であることが明らかになった。酵素の結晶化および X 線回折実験を行ったところ、1.97 Å のデータを取得することができたため、分子置換および、モデル構築を行いインジゴ還元酵素-FMN 複合体の立体構造決定を行った。得られた構造情報に基づいて熱安定性の解明を行ったところ、特にサブユニット間の芳香族アミノ酸インタラクションが重要であることを明らかにした。今後、本酵素の詳細な酵素化学的諸性質の決定および、基質複合体構造の決定を行う予定である。

Indigo reductase, Thermostable enzyme, Aizome (indigo dyeing)

発表責任者：米田一成（kyoneda@agri.u-tokai.ac.jp）

講演番号：4C04a06
講演日時：3 月 28 日 10:35～ 理学部講義棟 C04 会場

リンゴ酸デヒドロゲナーゼの結晶構造に基づく動的反応メカニズムの考察

Dynamic reaction mechanism based on crystal structures of malate dehydrogenase

○下澤 勇弥[1,2]、西矢 芳昭[1]、佐々本 康平[1,2]、氷見山 幹基[2]、中村 努[2]([1]摂南大院　理工　生命、[2]国立研究開発法人産業技術総合研究所)
○Yuya SHIMOZAWA[1,2], Yoshiaki Nishiya[1], Kohei Sasamoto[1,2], Tomoki Himiyama[2], Tsutomu Nakamura[2] ([1]Grad. School. Sci. Eng. Setsunan Univ., [2]AIST)

【背景・目的】　リンゴ酸デヒドロゲナーゼ(MDH)は、$NAD(P)^+$依存的なリンゴ酸からオキサロ酢酸(OAA)への酸化還元反応を可逆的に触媒する。MDH は高い基質特異性を有しており、OAA に構造が類似した基質アナログに対してほとんど反応しない。そのため、AST 測定やリンゴ酸の定量など様々な分析に応用されている。また、MDH は活性部位に 10 残基程度で構成される可動ループを持ち、OAA の結合により溶媒側に開いた Open form から活性部位を覆うような Closed form へ大きく構造変化することが知られている。基質の結合によるこの構造変化は、MDH の触媒反応や基質の認識において重要な役割を持つと予想される一方で、未だ動的反応メカニズムは明らかになっておらず、高い基質特異性との相関性も詳しくわかっていない。

本研究では、中等度好熱菌 *Geobacillus stearothermophilus* 由来 MDH (gs-MDH)を対象とした結晶構造解析により、Apo 構造から触媒反応に至るまでの動的反応メカニズムの解明を試みた。

【結果・考察】　gs-MDH の結晶構造解析の結果、Apo 構造(Open form)、NAD^+結合構造(Open form)、OAA/NAD^+結合構造(Closed form)に加えて、Open form から Closed form への中間構造と考えられる OAA/NAD^+結合構造(Open form)の決定に成功した。以上から、Apo 構造から補酵素結合、基質結合および触媒反応までの各ステップの結晶構造が得られた。

Apo 構造(Open form)と OAA/NAD^+結合構造(Closed form)を比較すると、可動ループの構造変化に伴って触媒残基（His179）が存在するループ構造領域（触媒ループ）の構造変化も観察された。一方で OAA/NAD^+結合構造(Open form)は、触媒ループおよび His179 が Apo 構造と同様のコンフォメーションを形成していた。また、Open form に結合する OAA の β-カルボキシ基は、サブユニット間でランダムに配向し不安定だった一方で、Closed form では閉じた可動ループ上の Arg86 との静電結合により安定化されていた。

以上の結果から、gs-MDH の触媒反応に重要な相互作用が明らかになった。gs-MDH は、Closed form になることで初めて触媒ループの活性型へのコンフォメーション変化と活性部位に結合する OAA の安定化が起こると推察された。また、基質の電荷が構造変化のドライビングフォースになることから、構造変化は基質特異性においても重要な現象であると考えられた。

malate dehydrogenase, conformational change, crystal structure

発表責任者：西矢芳昭（nishiya@lif.setsunan.ac.jp）

講演番号：4C04a07
講演日時：3 月 28 日 10:46～ 理学部講義棟 C04 会場

好熱性アーキア由来色素依存性 D-アミノ酸脱水素酵素のバイオセンサ用素子としての機能評価
Characterization of dye-linked D-amino acid dehydrogenase from thermophilic archaea
○里村 武範[1,2]、江本 慎[1]、黒沢 則夫[3]、大島 敏久[4]、櫻庭 春彦[5]、末 信一朗[1]([1]福井大工、[2]福井大ライフ、[3]創価大、[4]大阪工大工、[5]香川大農)
○Takenori SATOMURA[1,2], Shin EMOTO[1], Norio KUROSAWA[3], Toshihisa OHSHIMA[4], Haruhiko SAKURABA[5], Shin-ichiro SUYE[1] ([1]Fukui Univ., [2]Life Univ. Fukui, [3]Souka Univ., [4]Osaka Inst. Tech., [5]Kagawa Univ.)

[緒言]
色素依存性 D-アミノ酸脱水素酵素（Dye-DADH）は FAD を補酵素とし 2,6-ジクロロインドフェノールのような人工酸化還元色素存在下で D-アミノ酸の酸化反応を触媒する一群の酵素である。本酵素は人工の電子受容体を介して基質である D-アミノ酸由来の電子を電極へ導入することが可能であることから生体あるいは食品中に含まれる D-アミノ酸定量用のバイオセンサ素子としての利用が期待されている。しかしながら、これまで見出されている常温生物由来 Dye-DADH は安定性が低いため応用利用は困難であった。そこで我々は、高い安定性が期待できる好熱菌に着目し Dye-DADH の探索を行い、好熱性アーキア *Sulfurisphaera tokodaii* に Dye-DADH(SuDADH)ホモログを見出すことに成功した。本酵素を大腸菌によるタンパク質発現系を用いて組換えタンパク質の発現を行ったが封入体を形成したため機能同定はできなかった。そこで、好熱性アーキア *Sulfolobus acidocaldarius* を宿主とした組換えタンパク質発現を構築し Dye-DADH ホモログタンパク質の発現を行った結果、高い安定性を有する Dye-DADH 活性を確認できた。本研究では、発現に成功した新規 Dye-DADH の評価と本酵素を電極に固定化した Dye-DADH 修飾電極の機能評価を行った。
[方法]
マルトースで誘導可能な *S. acidocaldarius* 発現用プラスミド pSAVex に SuDye-DADH をコードした stk_16540 遺伝子を導入した pSAVex-stk_16540 ベクターを用いて宿主となる *S. acidocaldarius* SK-1 株の形質転換を行った。得られた形質転換体を前培養した後、5 日間本培養を行った。培養菌体から粗酵素液を抽出し、Ni キレーティングアフィニティークロマトグラフィーと陰イオン交換クロマトグラフィーの二段階で精製を行った。この精製酵素液を用いて諸性質の解析を行った。また、精製酵素をグッラシーカーボン電極上に Ni とヒスチジンタグのアフィニティ結合を介した固定化を行い Dye-DADH 固定化電極を作成し、この修飾電極の評価を行った。
[結果・考察]
アーキアを宿主として発現した SuDye-DADH は高い Dye-DADH 活性を示し、これまで見出されている Dye-DADH の中で最も高い耐熱性、pH 安定性を示した。また、本酵素を固定化した Dye-DADH 修飾電極を用いて D-アミノ酸を検出にも成功した。高い安定性を有した本電極は D-アミノ酸定量用バイオセンサ用電極として高い有用性を示した。

D-amino acid, Dye-linked dehydrogenase, Biosensor

発表責任者：里村武範（satomura@u-fukui.ac.jp）

講演番号：4C04a08
講演日時：3 月 28 日 10:57～ 理学部講義棟 C04 会場

Sulfolobus tokodaii 由来 sulfur oxygenase reductase のクライオ電子顕微鏡を用いた近原子分解能単粒子解析

Near-atomic resolution cryo-EM single particle analysis of sulfur oxygenase reductase from *Sulfolobus tokodaii*

○佐藤 優太[1]、安達 成彦[2]、守屋 俊夫[2]、荒川 孝俊[1,3]、川崎 政人[2]、山田 千早[1,3]、矢吹 崇吏[1]、若木 高善[1]、千田 俊哉[2]、伏信 進矢[1,3] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]高エネ機構・物構研・構造生物、[3]東大微生物連携機構)

○ Yuta SATO[1], Naruhiko ADACHI[2], Toshio MORIYA[2], Takatoshi ARAKAWA[1,3], Masato KAWASAKI[2], Chihaya YAMADA[1,3], Takashi YABUKI[1], Takayoshi WAKAGI[1], Toshiya SENDA[2], Shinya FUSHINOBU[1,3] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]KEK, [3]CRIIM)

【背景】*Sulfolobus tokodaii* は大分県別府温泉から単離された好熱好酸性古細菌である。*Sulfolobus* 属は無機硫黄化合物の酸化による独立栄養的増殖が可能であり、*Sulfolobus tokodaii* もその生育環境には硫黄化合物が豊富に存在していることから、生育に硫黄を利用していると考えられる。*Sulfolobus tokodaii* 由来の酵素 sulfur oxygenase reductase (StSOR)は、元素状硫黄を基質とし、亜硫酸を産生する酸化反応と亜硫酸・硫化水素を産生する不均化還元反応を同時に触媒する。StSOR は水に不溶な元素状硫黄を水に可溶な化合物へと変換することで、この古細菌が元素状硫黄を利用するのに関わっていると考えられる。StSOR は対称性の高い 24 量体からなる巨大な中空球状構造をとることが結晶構造解析から分かっている。このような構造的な特徴はクライオ電子顕微鏡を用いた構造解析に非常に有利であると予想された。本研究では、クライオ電顕を用いた StSOR の単粒子解析を行い、得られた立体構造を結晶構造と比較することで StSOR が持つ機能の更なる理解を目指した。

【方法】大腸菌で異種発現した StSOR を、熱処理およびゲルろ過カラム・陰イオン交換カラムクロマトグラフィにより精製した。精製 StSOR を用いて観察用グリッドを作製し、高エネルギー加速器研究機構に導入された電子顕微鏡 Talos Arctica (200 kV)を用いて粒子画像を撮影した。2,061 枚の粒子画像からピックアップした 273,595 粒子を RELION 上で二次元クラス平均化・三次元再構築し、最終的に 61,798 粒子から分解能 2.35 Å の静電ポテンシャルマップを得た。このマップに立体構造モデルを当てはめ、同一精製ロットから結晶化・X 線回折実験をして得られた分解能 1.73 Å の電子密度マップおよび結晶構造と比較した。

【結果】全体構造およびチムニーと呼ばれる StSOR 内部と溶媒領域をつなぐ構造は、結晶構造・電顕構造の間でよく似ていた。結晶構造で確認された活性中心の非ヘム鉄は、電顕構造でも明瞭に観察された。しかし、結晶構造では 2 つの His 残基の窒素原子、Glu 残基の 2 つの酸素原子、2 つの水分子による六配位だったのに対し、電顕構造では適切な距離に水分子が存在せず配位のパターンが変化していた。また電顕マップにおける活性中心付近に存在する 2 つのシステイン残基には、硫黄原子の先に結晶構造では観察されなかった由来不明の大きなマップが観察された。

【総括】本研究により StSOR の結晶構造・電顕構造が同時に高い分解能で得られたことで、StSOR の構造の相対的な評価が可能になったことに加え、これらの手法によるマップの見え方の違いやそれぞれの持つ長所が示された。

elemental sulfur, archaeal enzyme, cryo-EM single particle analysis

講演番号：4C04a09
講演日時：3 月 28 日 11:08～ 理学部講義棟 C04 会場

超好熱性アーキアにおけるリポ酸生合成遺伝子の同定

Identification of genes involved in lipoate biosynthesis in hyperthermophilic archaea

○佐藤 喬章、蜂須賀 真一、跡見 晴幸（京都大工）
○Takaaki SATO, Shin-ichi HACHISUKA, Haruyuki ATOMI (Kyoto Univ.)

[背景・目的]

アーキアは 16S/18S rRNA の配列を基にした系統学的分類において、バクテリアや真核生物とは異なる第三のドメインに分類される原核微生物群である。またアーキアは、高温、高塩濃度、強酸性などといった極限的な環境で生育する微生物を多く含むと共に、他のドメインのものとは異なる固有の代謝機構を数多く有する。我々は超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* を中心としたアーキアを研究題材として、新規な酵素や代謝経路の同定を目指して研究を進めている。

グリシン開裂系は H-, L-, T-, P-protein の 4 タンパク質から構成され、グリシン由来の炭素をテトラヒドロ葉酸を介して他の化合物に供与する。炭素受容体がグリシンの場合、5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸と H_2O を基質としたヒドロキシメチル化により、セリンを生成する。リポ酸は、グリシン開裂系における補因子の一つであり、2 つの硫黄原子を含む脂肪酸誘導体である。グリシン開裂系においては H-protein とアミド結合しており、そのチオール基を介して炭素転移に寄与する。一般的なリポ酸生合成では、octanoyl transferase (LipB)が脂肪酸合成により生成された octanoyl-acyl carrier protein から octanoyl 基を H-protein 上に転移し、次に lipoate synthase (LipA)が炭素鎖に硫黄を挿入し、H-protein 上でリポ酸が合成される。しかし、超好熱性アーキア *T. kodakarensis* を含む複数のアーキアのゲノム上には既知の *lipA* および *lipB* のホモログがなく、その生合成経路は不明であった。そこで、本研究では *T. kodakarensis* におけるリポ酸生合成遺伝子の同定を目的とした。

[方法・結果]

アーキアのゲノム情報を基にリポ酸生合成遺伝子候補を探索した。*T. kodakarensis* ではないが他のアーキアにおいて、H-protein をコードする遺伝子の近くに存在する 2 つの候補遺伝子を見出した。そこで、選択マーカーに orotidine-5'-monophosphate decarboxylase 遺伝子(*pyrF*)、宿主に *T. kodakarensis* KU216 株（Δ*pyrF*）を用いて、2 つの遺伝子それぞれの単独破壊株および 2 重破壊株の合計 3 種の遺伝子破壊株を作製した。破壊した遺伝子周辺の PCR 解析および DNA シーケンシング解析により、目的の遺伝子型を有する株が作製できたことを確認した。次に、遺伝子破壊株の表現型の解析を行った。セリンを含まない培地における宿主および各遺伝子破壊株の増殖特性を検討したところ、宿主以外はいずれの遺伝子破壊株もリポ酸要求性を示した。これらのことから、これら 2 つの候補遺伝子がリポ酸生合成に関与していることを明らかにできた。

lipoate, Archaea, hyperthermophile

発表責任者：佐藤喬章（takaakisato@sbchem.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4C04a10
講演日時：3 月 28 日 11:19～ 理学部講義棟 C04 会場

In vitro analysis of two lipoate synthase candidates from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*

○Jianqiang JIN, Tsuyoshi Fujiwara, Shinichi Hachisuka, Takaaki Sato, Haruyuki Atomi (Kyoto Univ.)

[Background and Aims]

Lipoic acid is a sulfur-containing cofactor which participates in oxidative decarboxylation and one-carbon metabolism in living organisms. It is covalently bound to the conserved lipoyl domain of a lipoyl carrier protein. Lipoate synthase (LipA) catalyzes the insertion of two sulfur atoms at the C6 and C8 positions of the octanoyl moiety on the octanoyl protein to generate lipoyl protein. LipA belongs to the radical *S*-adenosyl-L-methionine (SAM) superfamily whose members usually contain one [4Fe-4S] cluster involved in the reductive cleavage of SAM. LipA possesses a second [4Fe-4S] cluster (auxiliary [4Fe-4S] cluster) which is the donor of sulfur atoms during the biosynthesis of lipoate. The hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis* does not harbor a classical LipA homolog. Recently, in this organism, two candidate genes for LipA were identified by genetic analysis. In order to examine whether these genes actually encode LipA or not, we carried out an *in vitro* analysis of the corresponding recombinant proteins.

[Results]

The candidate genes were expressed in *Escherichia coli*, and the recombinant proteins were purified by heat treatment at 85°C for 15 min followed by anion-exchange chromatography and gel filtration chromatography. As a result, the two LipA candidate proteins could be purified to apparent homogeneity in SDS-PAGE analysis. The [4Fe-4S] clusters of the purified proteins were reconstituted by chemical methods under an anaerobic environment. Using a chemically synthesized octanoyl peptide as a substrate, a lipoate synthase activity assay was carried out. HPLC analysis of the reaction product implied that the product generated by these proteins was lipoyl peptide. Therefore, the results obtained here suggest that the candidate genes for lipoate synthase actually encode LipA. Further examination of the reaction product and characterization of the enzymatic properties of these recombinant proteins are now in progress.

lipoate, Archaea, hyperthermophile

発表責任者：Haruyuki Atomi（atomi@sbchem.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4C04a11
講演日時：3 月 28 日 11:40～ 理学部講義棟 C04 会場

超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* における機能未知 phosphatase の酵素学的解析
Characterization of putative phosphatases from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*

○道盛 裕太、濱北 宗太郎、下坂 天洋、跡見 晴幸（京大院工）
○Yuta MICHIMORI, Sotaro HAMAKITA, Takahiro SHIMOSAKA, Haruyuki ATOMI (Kyoto Univ.)

Thermococcus kodakarensis は鹿児島県小宝島の硫気孔から単離された、至適生育温度 85℃の超好熱性アーキアである。本菌は絶対従属栄養性、絶対嫌気性のアーキアである。*T. kodakarensis* ゲノム上には 2,306 個の ORF の存在が推定され、それらのうち約半数（1,165 個）が一次構造から機能推定可能であった。

我々はいままでに *T. kodakarensis* の中央代謝やアミノ酸・補酵素の生合成機構に注目し、研究を進めてきた。その結果、本菌は modified Embden-Meyerhof pathway、pentose bisphosphate pathway、アーキア型 CoA biosynthesis pathway など、真核生物や細菌とは異なる酵素や代謝経路を利用することが明らかとなった。これらの研究の中で、我々はゲノム上の kinase と推定されている遺伝子に注目し、それらの発現産物の機能解析を通じて、新しい基質をリン酸化する酵素や構造的に新規な kinase を同定することができた。Pentose bisphosphate pathway の ADP-dependent ribose-1-phosphate kinase、CoA 生合成経路の pantoate kinase などが代表的な例である。

今回我々は *T. kodakarensis* ゲノム上に存在する推定 phosphatase 遺伝子に着目し、それらがコードするタンパク質の phosphatase 活性の有無および基質特異性について検討した。はじめに、phosphatase を筆頭に様々な加水分解酵素を含む HAD superfamily に注目した。*T. kodakarensis* は HAD superfamily protein をコードすると推定される遺伝子を 15 個有しているが、その多くは未解析で、基質は不明なままである。本研究ではそれらのうちの 2 つ、TkHAD1 および TkHAD2 の酵素学的解析を行った。

TkHAD1 は、好熱好酸性アーキア *Thermoplasma acidophilum* において 2-phosphoglycolate phosphatase（PGP）活性を有することが示された TaPGP（TA0175）の *T. kodakarensis* におけるホモログである。TkHAD1 の様々なリン酸化合物に対する脱リン酸化活性スクリーニングを行った結果、2-phosphoglycolate 以外にも複数のリン酸化合物に対し、有意な脱リン酸化活性を示した。一方、TkHAD2 に対して同様のスクリーニングを行った結果、本酵素は 2-phosphoglycolate にのみ有意な活性を示し、特異性の高い酵素であることが示唆された。したがって、酵素学的特性から判断すると *T. kodakarensis* においては TkHAD2 が PGP に相当し、TkHAD1 は別の基質に作用するのではないかと推測される。現在、両遺伝子産物の *T. kodakarensis* における生理的意義について検討している。

Archaea, Phosphatase, Thermophile

発表責任者：跡見晴幸（atomi@sbchem.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4C04a12
講演日時：3 月 28 日 11:51～ 理学部講義棟 C04 会場

低級アルカン水酸化酵素のオペロンに存在するシャペロニン様タンパク質の単離

Chaperonin homologs of short alkane monooxygenase operon

井上 千裕、安部 欣高、山之内 渉、○藤枝 伸宇（阪府大）
Chihiro INOUE, Yoshitaka ABE, Wataru YAMANOUCHI, ○Nobutaka FUJIEDA (Osaka Pref. Univ.)

【背景・目的】メタンやエタン、プロパンなどの低級アルカンを含む天然ガスは重要な資源である。しかし、常温で気体であることから、保存や輸送には液化過程を経る必要があるため、石油・石炭に比べてエネルギー的に不利である。そこで、これらのアルカンをアルコールに直接変換することができれば、液体燃料として保存が可能な上、化学原料としての利用が可能になる。本研究では天然ガスを液体燃料へ変換する手段として、C_1～C_4 の低級アルカンを温和な条件でアルコールに変換する酵素である低級アルカン水酸化酵素に着目した。しかし、この酵素を保持するメタン資化性菌は増殖が遅く、大量生産するためには、増殖の速い大腸菌などでの異種発現が必要である。また、それをコードする遺伝子を含むオペロン上に GroEL（シャペロン）タンパク質のホモログをコードする遺伝子が存在することが知られているが、その機能を始め、構造などの分子論的な性質は未だ明らかになっていない。そこで本研究では、低級アルカン水酸化酵素の大量調製を目指し、GroEL 様タンパク質の単離、及び生化学的解析を行うことを目的とした。

【方法】ゲノムデータベースから得られた 12 種類の GroEL 様タンパク質をコードする DNA を挿入したプラスミドを合成し、大腸菌 BL21(DE3)株に導入して 25℃で IPTG 誘導をかけた。次に遠心分離で上清と沈殿に分け、SDS-PAGE で確認した。可溶性画分に発現した遺伝子については、それぞれの遺伝子の C 末端にヒスチジンタグを付与した DNA を合成し、大腸菌による発現をおこなった。その後、アフィニティークロマトグラフィーで単離し、Blue Native Page によって分子量を測定した。また、ゲルろ過クロマトグラフィーでさらに精製できた GroEL 様タンパク質については、原子間力顕微鏡によって観察を試みた。

【結果・考察】スクリーニングの結果、12 種類のうち、*Mycobacterium smegmatis* 、*Mycobacterium goodii*、*Sulfobacillus acidophilus* 由来の 3 種類の GroEL 様タンパク質が、大腸菌において可溶性画分に発現した。また、これらの GroEL 様タンパク質は Blue Native Page において、大腸菌由来 GroEL と同様のバンドが観察された。この結果から大腸菌由来 GroEL と類似したサブユニット構造をとっていることが示唆された。また、*Sulfobacillus acidophilus* 由来の GroEL 様タンパク質は、ゲルろ過クロマトグラフィーによって精製することができた。さらに、原子間力顕微鏡により観察することに成功した。

Short alkane monooxygenase, Chaperonin, Alkane hydroxylation

発表責任者：藤枝伸宇（fujieda@biochem.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：4C04a13
講演日時：3 月 28 日 12:02～ 理学部講義棟 C04 会場

鉄型ニトリルヒドラターゼの翻訳後活性化アクセサリータンパク質の解析
Analysis of post-translational activation of the nitrile-converting enzyme
○橋本 義輝[1,2]、宇部 優子[1]、土居 志織[1]、熊野 匠人[1,2]、小林 達彦[1,2]([1]筑波大院・生命環境、[2]筑波大・MiCS)
○Yoshiteru Hashimoto[1,2], Yuko Ube[1], Shiori Doi[1], Takuto Kumano[1,2], Michihiko Kobayashi[1,2]([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]MiCS, Univ. Tsukuba)

【背景・目的】　ニトリルをアミドに変換するニトリルヒドラターゼ（NHase)には配位する金属が異なる２種類が存在する。かつて(アクリロニトリルからの)アクリルアミド工業生産の第二世代菌として利用されていた *Pseudomonas chlororaphis* B23 株の NHase は Fe を、現在のアクリルアミド・ニコチンアミド工業生産に利用されている *Rhodococcus rhodochrous* J1 株の NHase は Co をそれぞれ含む。NHase はα, βサブユニットから構成されており、アポ酵素として生成した後、(αサブユニットに存在し金属に配位する)システイン残基の酸化(システインスルフィン酸、システインスルフェン酸への酸化)・金属イオンの配位という翻訳後修飾を受け活性型酵素(ホロ酵素)となる。我々は、Co 型 NHase はこれまでに例のない新規かつユニークな機構で翻訳後活性化されることを発見し、本機構を“Self-Subunit Swapping”と命名した[(1-3)]。
本研究では、未だ分かっていない B23 株の Fe 型 NHase の翻訳後活性化に関わる NhpC の機能の解明を目指して実験を行った。

【方法・結果】　B23 株の Fe 型 NHase のα, β両サブユニット遺伝子（*nhpAB*）のすぐ下流に存在する NhpC は、本酵素の翻訳後の活性発現に不可欠なアクセサリータンパク質であることを見いだしている。NhpC の N 末端領域は ABC ATPase スーパーファミリーと相同性を示し、NTPase におけるヌクレオチドのリン酸基結合配列である P ループ構造が NhpC と相同性をもつ他のタンパク質内で保存されていた。部位特異的変異法により NhpC の P ループ構造中のアミノ酸残基をアラニンに置換した(NHase および NhpC 遺伝子を持つ）発現プラスミドを構築した。大腸菌 BL21(DE3)株に導入し、Fe を含む栄養培地で、IPTG 添加により誘導発現させ培養を行った。集菌後、無細胞抽出液を調製し、SDS-PAGE により NHase の発現が、また、Western 解析により NhpC の発現がそれぞれ確認できた。ガスクロマトグラフィーによる活性測定を行った結果、NHase 活性が認められず、NHase は活性を全く示さないアポ酵素として発現していた。以上のことから、NhpC は NTP を分解しそのエネルギーを用いて NHase の翻訳後活性化因子としての機能を果たしている可能性が示唆された。

(1) ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA***, **105**, 14849 (2008); (2) ***J. Biol. Chem.*, 284,** 14930 (2009); (3) ***Biochemistry*, 49,** 9638 (2010)

nitrile, amide, holoenzyme

シンポジウムプログラム

3 月 26 日（木）9:30 ～ 12:00

2SYa2　変動する 21 世紀の社会で求められる農芸化学分野の研究，開発，人

3 月 26 日（木） 9:30～12:00
共　催：日本学術会議 農芸化学分科会
会　場：A20 会場（センター 2 号館 2404）
世話人：熊谷日登美（日本大学・日本学術会議会員），裏出令子（京都大学複合原子力科学研究所教授）
座　長：佐藤隆一郎（東京大学大学院農学生命科学研究科），藤原葉子（お茶の水女子大学・日本学術会議連携会員）

9:30　挨拶・概要説明 …… 熊谷日登美（日本大学生物資源科学部）
9:35　2SYa2–1　境界領域を探るたのしさ－どこにもつながる農芸化学 …… ○清水　誠[1,2]（[1]東京農業大学，[2]東京大学）
10:00　2SYa2–2　公的研究機関でアイディアを活かす，社会を支える …… ○後藤奈美（酒類総研）
10:25　2SYa2–3　リーダーになる人へ贈る言葉 …… ○辻　智子（㈱吉野家ホールディングス）
10:50　休憩
11:00　2SYa2–4　想像すれば“夢”は必ず実現する …… ○柴田浩志（サントリーウエルネス㈱健康科学研究所）
11:25　2SYa2–5　農芸化学の世界から未来を拓くために …… ○千葉一裕（東農工大農）
11:50　まとめ …… 裏出令子（京都大学複合原子力科学研究所）

2SYa3　天然物研究の現在と未来

3 月 26 日（木） 9:30～12:00
協　賛：JSPS 生合成リデザイン新学術領域研究（研究領域提案型）平成 28～32 年度生物合成系の再設計による複雑骨格機能分子の革新的創成科学
会　場：A21 会場（センター 2 号館 2406）
世話人：渡辺賢二（静県大薬），葛山智久（東大院農）
座　長：渡辺賢二（静県大薬），葛山智久（東大院農），勝山陽平（東大院農）

9:30　2SYa3–1　酸化酵素の誤作動を誘起する分子の開発と高難度酸化反応 …… ○荘司長三[1,2]（[1]名大院理，[2]JST CREST）
9:55　2SYa3–2　カリクリン生合成過程に内在する活性制御機構 …… ○脇本敏幸（北大院薬）
10:20　2SYa3–3　化学合成と酵素変換の融合による多環性アルカロイド群の迅速合成 …… ○大栗博毅（東京農工大工）
10:45　2SYa3–4　複雑骨格を構築する生合成マシナリーの精密機能解析 … ○葛山智久[1,2]（[1]東大農，[2]東大微生物連携機構）
11:10　2SYa3–5　…… 全員によるパネルディスカッション

2SYa4　生命金属科学研究の新たな展開 ～農芸化学との融合～

3 月 26 日（木） 9:30～12:00
協　賛：新学術領域「生命金属科学」
会　場：A22 会場（センター 2 号館 2407）
世話人：鈴木道生（東大・院農），青野重利（分子研），神戸大朋（京大・院生命）
座　長：鈴木道生（東大・院農），青野重利（分子研），神戸大朋（京大・院生命）

9:30　2SYa4–1　メラニン生合成の分子機序 ～生命金属からの考察～ …… ○神戸大朋（京都大生命）
10:00　2SYa4–2　大腸菌におけるスーパーオキシドディスムターゼの銅イオン獲得メカニズム
…… ○古川良明，吉田昂生，草野孝央，高橋愛海（慶應大理工）
10:30　2SYa4–3　**Molecular mechanism of CO biosynthesis responsible for assembly of the active site in NiFe-hydrogenases**
…… ○Shigetoshi Aono（National Institutes of Natural Sciences）
11:00　2SYa4–4　ホウ酸トランスポーターの偏在・分解を制御する選択的エンドサイトーシス
…… ○高野順平（大阪府大生命環境）
11:30　2SYa4–5　キチン分解酵素が炭酸カルシウム結晶の欠陥を制御するメカニズム
…… ○鈴木道生，近都浩之（東大院農）

2SYa5　食品機能による運動機能の改善と向上

3 月 26 日（木） 9:30～12:00
協　賛：フードサイエンスフォーラム
会　場：A13 会場（センター 2 号館 2303）
世話人：榊原陽一（宮崎大農応生科），服部秀美（宮崎大農応生科），榊原啓之（宮崎大農応生科）
座　長：榊原陽一（宮崎大農応生科），榊原啓之（宮崎大農応生科）

9:30　2SYa5–1　イミダゾールジペプチドによる抗疲労効果 ……○服部秀美（宮崎大農）

9:45　2SYa5–2　**Physiological Impacts of Glutathione and Citrulline on Exercise Capacity: Possible Roles in Regulation of Nitric Oxide**
……○Masahiko Morita（Research & Innovation Center, Kyowa Hakko Bio）

10:10　2SYa5–3　食品による運動模倣の可能性 ……○佐々木崇，佐藤隆一郎（東大院・農生科・応生化）

10:35　2SYa5–4　ヒト試験による抗疲労効果の検討
……○有村保次[1]，平井亜優美[1]，長野文子[1]，渡邉睦美[1]，永濵清子[2]，武安智樹[3]
（[1]宮崎大学医学部附属病院臨床研究支援センター食品臨床試験・臨床研究開発部門，
[2]宮崎大学大学院農学工学総合研究科，[3]九州臨床研究支援センター統計・データセンター）

11:00　2SYa5–5　骨代謝性疾患における柑橘由来ポリメトキシフラボノイドの作用
……○稲田全規（東京農工大学大学院 生命工学専攻）

11:25　2SYa5–6　食品の機能性表示と機能性農産物開発 ……○山本万里（農研機構食品研）

2SYa6　老化促進モデルマウスを用いた老化を遅延する食品の開発

3 月 26 日（木） 9:30～12:00
協　賛：老化促進モデルマウス（SAM）学会
会　場：A14 会場（センター 2 号館 2304）
世話人：都築　毅（東北大院農），片山　茂（信州大院農）
座　長：都築　毅（東北大院農），片山　茂（信州大院農）

9:30　2SYa6–1　緑茶成分の脳に対する作用 ……○海野けい子（静岡県大茶学）

10:00　2SYa6–2　**SAMP1 および P8 マウスを用いたアンチエイジング作用を有する食品成分の探索**
……○片山　茂（信州大農）

10:30　2SYa6–3　**SAM マウスの聴覚老化を利用した老化予防食品の評価** ……○大池秀明（農研機構／食品研）

11:00　2SYa6–4　加齢に伴う腸内環境変動と食品素材の機能発現への影響
……○脇田義久（サッポロホールディングス㈱価値創造フロンティア研究所）

11:30　2SYa6–5　**SAMP8 マウスを用いた糖質制限による老化促進を軽減する食品の探索** ……○都築　毅（東北大院農）

2SYa7　バイオエコノミー時代を切り拓く，遺伝子組換え微生物の新しい利用形態「カルタヘナ第一種使用」の可能性を探る

3 月 26 日（木） 9:30～12:00
共　催：NPO 法人環境バイオテクノロジー学会
会　場：A15 会場（センター 2 号館 2305）
世話人：廣田隆一（広島大），加藤祐輔（農研機構）
座　長：廣田隆一（広島大），加藤祐輔（農研機構）

9:30　はじめに ……廣田隆一（広島大院統合生命）

9:35　2SYa7–1　遺伝子組換え微細藻類の開放系利用における審査体制整備について
……○松尾康範，木下浩，井上英俊，清田純也，神野浩二，小口晃央，資延淳二，西嶋桂子，久保寛之（NITEバイオ）

10:00　2SYa7–2　原生動物に捕食される細菌の残存性について ……○中村寛治（東北学院大工）

10:25　2SYa7–3　実用珪藻ツノケイソウ の応用利用に向けた基盤技術の開発
……○伊福健太郎[1]，菓子野康浩[2]（[1]京都大院・生命，[2]兵庫県立大院・生命理学）

10:50　2SYa7–4　生物学的封じ込め技術－生ワクチンへの応用を例として－ ……○加藤祐輔（農研機構・生物研）

11:15　2SYa7–5　合成リン代謝経路による生物学的封じ込め ……○廣田隆一，黒田章夫（広島大院）

11:40　総合討論 ……加藤祐輔（農研機構）

11:50　おわりに ……加藤純一（環境バイオテクノロジー学会）

3月27日（金）9:30 ～ 12:00

3SYa2　プラスチックの問題に対峙し農芸化学がすべきことは何か

3月27日（金） 9:30～12:00
会　場：A20会場（センター2号館2404）
世話人：紙野　圭（NITEバイオ），粕谷健一（群馬大院理工），玉木秀幸（産総研生物プロセス）
座　長：紙野　圭（NITEバイオ），粕谷健一（群馬大院理工），玉木秀幸（産総研生物プロセス）

9:30　3SYa2–1　プラスチック産業の課題に対する微生物・酵素からの取り組み：序に代えて
……○紙野　圭（製品評価技術基盤機構）

9:40　3SYa2–2　微生物由来の芳香族バイオマスを用いた高機能性マテリアルの開発
……○大西康夫[1,2]，高谷直樹[3]，松見紀佳[4]，金子達雄[4]
（[1]東大院・農生科・応生工，[2]東大・微生物イノベ連携機構，
[3]筑波大・生命環境，[4]北陸先端大・先端科技科）

10:08　3SYa2–3　植物バイオマス資源を利用した高性能ポリマー素材の開発 ……○阿部英喜（理研CSRS）

10:36　3SYa2–4　微生物の力を利用したバイオプラスチック合成と分解の新たな技術構築を目指して
……○山田美和（岩手大農）

11:04　3SYa2–5　再生可能原料からのポリヒドロキシアルカン酸共重合体の微生物合成 ….○福居俊昭（東工大生命理工）

11:32　3SYa2–6　海洋時限生分解性プラスチック開発が拓く新しい環境調和型社会
……○粕谷健一，鈴木美和，橘　熊野（群馬大理工）

3SYa3　発酵・醸造技術に活かす真菌のストレス応答研究最前線

3月27日（金） 9:30～12:00
会　場：A21会場（センター2号館2406）
世話人：井澤真吾（京都工繊大・応生），高木博史（奈良先端大・バイオ）
座　長：井澤真吾（京都工繊大・応生），高木博史（奈良先端大・バイオ）

9:30　3SYa3–1　発酵・醸造関連ストレスと酵母の細胞応答 ……○井澤真吾（京都工繊大応用生物）

9:40　3SYa3–2　ボーっと発酵（イキ）てんじゃねーよ！～どうしてお醤油の中で微生物はいきていけるの？～
……○渡部　潤（ヤマサ醤油）

10:10　3SYa3–3　ビール酵母 ***Saccharomyces pastorianus*** のストレス応答
……○野田陽一[1,2]（[1]東大院・農生化・応生工，[2]東京大学微生物科学イノベーション連携研究機構）

10:35　3SYa3–4　白麹の品質を制御するストレス応答機構 ……○二神泰基（鹿児島大農）

11:00　3SYa3–5　ストレス感受性を指標とした高発酵性酵母の育種 ……○下飯　仁（日本醸造協会）

11:30　3SYa3–6　製パンプロセスにおけるパン酵母のストレス耐性機構と育種への応用
……○高木博史（奈良先端大バイオ）

3SYa4　質量分析を用いたバイオ計測の進歩を活用する

3月27日（金） 9:30～12:00
後　援：生物工学会バイオ計測サイエンス研究部会
会　場：A22会場（センター2号館2407）
世話人：松田史生（阪大情報），馬場健史（九大生体防御医学研究所）
座　長：松田史生（阪大情報），馬場健史（九大生体防御医学研究所）

9:30　3SYa4–1　質量分析で1細胞中の代謝物とタンパク質を解析する ……○和泉自泰，馬場健史（九州大生医研）

10:00　3SYa4–2　**Hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry analysis of therapeutic IgG molecules**
……○Susumu Uchiyama[1,2]，Tetsuo Torisu[1]，Kentaro Ishii[1]，
Yuki Yamaguchi[1]，Hiroaki Oyama[1]，Masanori Noda[3]
（[1]Osaka Univ.，[2]ExCELLS，[3]U-Medico）

10:30　3SYa4–3　質量分析で毎日の食事を考える ……○及川　彰[1,2]（[1]山形大農，[2]理研CSRS）

11:00　3SYa4–4　質量分析で生物間相互作用を理解する ……○青木　航[1,2]，植田充美[1,2]（[1]京大農，[2]JST CREST）

11:30　3SYa4–5　質量分析で代謝の流れを見る ……○岡橋伸幸，松田史生（大阪大情報）

3SYa5　精密な食機能デザイン研究を切り拓く先端オミクスソリューション

3 月 27 日（金） 9:30～12:00
後　援：日本フードファクター学会
会　場：A13 会場（センター 2 号館 2303）
世話人：藤村由紀（九大院農院），三浦大典（産総研バイオメディカル研究部門）
座　長：藤村由紀（九大院農院），三浦大典（産総研バイオメディカル研究部門）

9:30　3SYa5–1　メタボロミクスの食品機能解析への応用 ……○福崎英一郎（大阪大院工）
9:55　3SYa5–2　**Retronasal aroma** のリアルタイム計測に関する新たな提案 ……○佐川岳人（エスビー食品）
10:20　3SYa5–3　食の二次機能（香り）デザインにおける複合香気の役割 ……○岸本　徹（酒類総研）
10:45　3SYa5–4　**RIKEN Plant Metabolome MetaDatabase** の開発 ……○福島敦史（理研CSRS）
11:10　3SYa5–5　ターゲットプロテオミクスによる食品機能予測システムの確立を目指して
……○黒木勝久，大田輝，永濱清子，水光正仁，榊原陽一（宮崎大・農・応生科）
11:35　3SYa5–6　食品因子センシング機序に基づいた機能性フードペアリング ……○立花宏文（九州大農）

3SYa6　糖質の視点から理解する微生物と宿主の相互作用

3 月 27 日（金） 9:30～12:00
会　場：A14 会場（センター 2 号館 2304）
世話人：沖野　望（九州大農），藤田清貴（鹿児島大農）
座　長：沖野　望（九州大農），藤田清貴（鹿児島大農）

9:30　3SYa6–1　細菌由来グルクロン酸含有糖脂質合成酵素の機能解析 ……○沖野　望（九州大農）
9:55　3SYa6–2　糸状菌と宿主の相互作用を明らかにするためのガラクトマンナン生合成研究
……○岡　拓二（崇城大生物生命）
10:20　3SYa6–3　**Sensing infection by immune receptors for glycolipids** ……○Sho Yamasaki（Osaka Univ.）
10:45　3SYa6–4　**1** 分子観察によるガングリオシド会合機構と **EGF** 受容体活性制御機構の解明
……○鈴木健一（岐阜大生命鎖）
11:10　3SYa6–5　ヒトの糖質に作用するビフィズス菌酵素の生理機能 ……○片山高嶺（京大生命）
11:35　3SYa6–6　成人型ビフィズス菌の植物糖タンパク質からの糖獲得戦略 ……○藤田清貴（鹿児島大農）

3SYa7　有機合成を使って目指していること―農芸化学における有機合成の役割―

3 月 27 日（金） 9:30～12:00
会　場：A16 会場（センター 2 号館 2306）
世話人：山内　聡（愛大院農），西脇　寿（愛大院農）
座　長：西川俊夫（名大院生命農），矢島　新（東農大生命）

9:30　3SYa7–1　リン脂質の化学合成を基盤とした生理機能解析の展開 ……○安部真人（愛媛大農）
9:55　3SYa7–2　サリチルアルデヒド型イネいもち病菌毒素の合成化学的研究 ……○清田洋正（岡山大院・環境生命）
10:20　3SYa7–3　構造決定を指向した酸化型ステロイドの合成法の開発
……○中崎敦夫，渡邉正悟，松村泰志，河合真穂，橋本圭古，池田　藍，西川俊夫（名大院生命農）
10:45　3SYa7–4　有機合成から生命科学へのアプローチ ……○倉持幸司（東理大理工）
11:10　3SYa7–5　推定生合成機構を模倣した天然物合成
……○榎本　賢[1]，倉沢一輝[1]，高橋和暉[1]，權　垠相[2]，桑原重文[1]（[1]東北大院農，[2]東北大院理）
11:35　3SYa7–6　合成して初めてわかること．事実は小説より奇なり？ ……○滝川浩郷（東大院農生科）

3月27日（金）14:00 ～ 16:30

3SYp1　多様性を基盤にした微生物研究の最前線

3月27日（金）　14:00～16:30
会　場：A19会場（センター2号館2403）
世話人：小林達彦（筑波大 生命環境），西山　真（東大 生物工学セ）
座　長：小林達彦（筑波大 生命環境），西山　真（東大 生物工学セ）

14:00　はじめに ……小林達彦（筑波大 生命環境）
14:03　3SYp1–1　アーキア機能未知遺伝子の機能解明 ……○跡見晴幸，佐藤喬章，金井　保（京大工）
14:31　3SYp1–2　腸内マイクロバイオームの代謝制御による生理活性物質産生を目指したアプローチ ……○松本光晴（協同乳業）
14:59　3SYp1–3　**Understanding the function of human indigenous microbiota** ……○Shinji Fukuda[1,2,3,4]
([1]Inst. Adv. Biosci., Keio Univ., [2]KISTEC-KAST, [3]TMRC, Univ. Tsukuba, [4]Metabologenomics, Inc.)
15:27　3SYp1–4　集団微生物学のすすめ ……○野村暢彦[1,2]，豊福雅典[1,2]，八幡　穣[1,2]，尾花　望[2,3]
([1]筑波大生命環境，[2]筑波大微生物サステイナビリティ研究センター，[3]筑波大トランスボーダー医学研究センター)
15:55　3SYp1–5　境界条件における生命活動の戦略と駆動原理 ……○高井　研（海洋研究開発機構超先鋭）
16:25　おわりに ……西山　真（東大 生物工学セ）

3SYp2　栄養・食品研究の新たな挑戦―哺乳動物実験廃止を乗り越える―

3月27日（金）　14:00～16:30
会　場：A20会場（センター2号館2404）
世話人：永田晋治（東大院新領域），佐藤隆一郎（東大院農生科）
座　長：永田晋治（東大院新領域），佐藤隆一郎（東大院農生科）

14:00　はじめに ……佐藤隆一郎（東大院農生科）
14:10　3SYp2–1　安定な実験系構築を可能にする高性能なiPS細胞増殖用無血清培地の創出 ……○原田英里（味の素株式会社バイオ・ファイン研究所）
14:35　3SYp2–2　ヒト臓器オルガノイドを活用した次世代食品科学研究 ……○高橋　裕，佐藤隆一郎（東大農）
15:00　3SYp2–3　ヒトiPS細胞を活用した食品機能性研究の基盤構築 ……○山内祥生（東京大院農）
15:25　3SYp2–4　遺伝学的手法で紐解く栄養応答的な個体発育の仕組み ……○大原裕也（静県大）
15:50　3SYp2–5　非モデル生物（昆虫）を用いた代謝，内分泌，栄養学研究への応用の可能性 ……○永田晋治（東大院新領域）

3SYp3　細菌細胞表層から放出される膜小胞：機能・形成機構・応用研究の新展開

3月27日（金）　14:00～16:30
会　場：A21会場（センター2号館2406）
世話人：栗原達夫（京大化研），渡部邦彦（京都府大院生命環境），豊福雅典（筑波大生命環境）
座　長：栗原達夫（京大化研），渡部邦彦（京都府大院生命環境），豊福雅典（筑波大生命環境）

14:00　はじめに ……栗原達夫（京大化研）
14:05　3SYp3–1　発酵食品や腸管に由来する細菌の細胞外小胞の特性 ……○倉田淳志（近畿大農）
14:29　3SYp3–2　大腸菌とマクロファージの細胞外小胞による異種細胞間相互作用と炎症機構 ……○岡真優子（京都府大院生命環境）
14:53　3SYp3–3　**Bacterial membrane vesicle formation through cell death** ……○Masanori Toyofuku（Univ. Tsukuba）
15:17　3SYp3–4　ナノ構造の可視化で切り拓く細菌膜小胞の特性と形成機構 ……○田代陽介[1,2]([1]静岡大院総合科技，[2]JSTさきがけ)
15:41　3SYp3–5　膜小胞高生産性細菌におけるタンパク質の膜小胞への輸送機構 ……○栗原達夫（京大化研）
16:05　3SYp3–6　膜小胞の量的コントロールに関する研究－シャペロン遺伝子破壊による膜小胞産生能向上の検討 ……○渡部邦彦（京都府立大院生命環境）

3SYp4　酢酸菌ナノセルロース研究の最前線

3月27日（金）　14:00～16:30
後　援：酢酸菌研究会
会　場：A13会場（センター2号館2303）
世話人：外山博英（琉球大農），田島健次（北大院工），外内尚人（味の素）
座　長：外山博英（琉球大農），田島健次（北大院工），外内尚人（味の素）

14:00　　はじめに ……外山博英（琉球大農）
14:00　3SYp4–1　セルロースナノファイバーの現状について ……○平田悟史（産総研）
14:30　3SYp4–2　酢酸菌におけるセルロース生産能のオン・オフのメカニズム
……○松谷峰之介[1]，ティーラグールガンジャナ[2]，薬師寿治[3,4]，松下一信[3,4]
（[1]東農大ゲノム解析セ，[2]カセサート大理，[3]山口大院創成科学，[4]山口大中高温微セ）
15:00　3SYp4–3　酢酸菌セルロース合成酵素複合体の構造と機能 ……○田島健次（北大院工）
15:30　3SYp4–4　バクテリアセルロース合成酵素の機能再構成 ……○今井友也（京都大生存研）
16:00　3SYp4–5　酢酸菌がシンクロ産生するヒアルロン酸／セルロースの複合素材の創製
……○近藤哲男[1]，高濱　良[1]，加藤歩並[1]，田川聡美[1]，田島健次[2]（[1]九州大農，[2]北海道大工）
16:30　　おわりに ……外山尚人（味の素）

3SYp5　ポリフェノール　～第7の栄養素を目指して～

3月27日（金）　14:00～16:30
後　援：日本フードファクター学会
会　場：A14会場（センター2号館2304）
世話人：越阪部奈緒美（芝工大生命），寺尾純二（甲南女子大医療栄養），下位香代子（静県大食品栄養）
座　長：寺尾純二（甲南女子大医療栄養），下位香代子（静県大食品栄養，越阪部奈緒美（芝工大生命）

14:00　3SYp5–1　ポリフェノールと健康研究の回顧と展望 ……○寺尾純二（甲南女子大医療栄養）
14:10　3SYp5–2　新規フラボノイドを探索するFlavonoidSearchツール
……○櫻井　望[1,2]，秋元奈弓[2]（[1]国立遺伝研，[2]かずさDNA研）
14:40　3SYp5–3　日本人の食事をベースにしたフラボノイド摂取量，含有量，機能性の検討
……○市川陽子（静岡県大食栄）
15:10　3SYp5–4　ポリフェノールが脳機能に与える影響と生体調節 ……○越阪部奈緒美，藤井康之（芝浦工大生命）
15:40　3SYp5–5　ポリフェノールの健康影響：疫学研究からのエビデンス ……○津金昌一郎（国立がん研究センター）
16:10　3SYp5–6　ポリフェノールはどれくらい摂取すれば健康にいいのか？ ……○下位香代子（静岡県大食品栄養）

3SYp6　代謝デザイン時代に対応する産業化に必要な微生物育種戦略

3月27日（金）　14:00～16:30
共　催：日本バイオインダストリー協会新資源生物変換研究会
会　場：A15会場（センター2号館2305）
世話人：中島田豊（広島大学），花井泰三（九州大学）
座　長：中島田豊（広島大学），花井泰三（九州大学）

14:00　3SYp6–1　実験室進化手法を応用した大腸菌のストレス耐性機構の解明とその制御
……○古澤　力[1,2,3]（[1]理研BDR，[2]東大理，[3]ERATO共生進化）
14:30　3SYp6–2　アルコール発酵に適した酵母とは：醸造用酵母から得られる学び ……○渡辺大輔，橋本　渉（京都大農）
15:00　3SYp6–3　酢酸菌の耐熱化育種とストレス耐性機能
……○松下一信[1,3]，松本奈実[1]，松谷峰之介[2]，片岡尚也[1,3]，薬師寿治[1,3]
（[1]山口大院創成科学，[2]東京農大ゲノム解析セ，[3]山口大中高温微セ）
15:30　3SYp6–4　**Putting biotechnology into a company's business strategy.**
……○Rie Kugimiya（Chitose Laboratory Corp.）
16:00　3SYp6–5　実用化を目指した微生物育種・培養プロセス開発事例 ……○水無　渉（三菱ケミカル株式会社）

3SYp7　アグリケミカルバイオロジー：植物圏を支配する化学信号とその応用

3 月 27 日（金） 14:00〜16:30
会　場：A16 会場（センター 2 号館 2306）
世話人：松田一彦（近大院農），浅見忠男（東大院農生），杉山暁史（京大生存圏）
座　長：松田一彦（近大院農），浅見忠男（東大院農生），杉山暁史（京大生存圏）

14:00　3SYp7–1　植物根圏における間接誘導防衛機構の基盤と昆虫制御への応用 ……○松田一彦（近大院農）
14:25　3SYp7–2　根圏ケミカルの新しい機能と作物生産への応用 ……○杉山暁史（京都大生存研）
14:50　3SYp7–3　植物成分で植物病原菌の繁殖を制御する ……○小鹿　一（名大院生命農）
15:15　3SYp7–4　フェアリー化合物の新たな展開 ……○河岸洋和（静岡大グリーン研）
15:40　3SYp7–5　植物の形態と生物間相互作用の選択的制御
……○浅見忠男[1]，伊藤晋作[2]，野村崇人[3]（[1]東大院農生科，[2]東京農大，[3]宇都宮大）
16:05　3SYp7–6　イネいもち病菌の感染防除に関するケミカルバイオロジー研究
……本山高幸，二村友史，○長田裕之（理研環境資源科学研究センター）

3 月 28 日（土）9:30 〜 12:00

4SYa2　新規酵素の開発と核酸増幅法の利用拡大

3 月 28 日（土） 9:30〜12:00
会　場：A20 会場（センター 2 号館 2404）
世話人：保川　清（京大院農），藤原伸介（関西学院大理工），兒島憲二（京大院農）
座　長：保川　清（京大院農），藤原伸介（関西学院大理工）

9:30　4SYa2–1　**One-step RT-PCR using the genetically engineered variant of DNA polymerase with reverse transcriptase activity**
……○Kiyoshi Yasukawa（Kyoto Univ.）

9:46　4SYa2–2　**Detection of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by recombinase polymerase amplification**
……○Kenji Kojima（Kyoto Univ.）

10:04　4SYa2–3　**Multiplexed detection of single nucleotide polymorphisms via solid-phase primer elongation with ferrocene labelled nucleotides**
……Mayreli Ortiz[1]，Anna Simonova[2,3]，Vasoula Skouridou[2]，Ioannis Katakis[1]，Michal Hocek[2,3]，○Ciara K. O'Sullivan[1,3]
（[1]Departament d'Enginyeria Química, Universitat Rovira i Virgili, Spain, [2]Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czech Academy of Sciences, Czech Republic, [3]Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Czech Republic）

10:22　4SYa2–4　**Reagentless electrochemical DNA sensor exploiting gold nanoparticles, isothermal amplification and modified primers**
……Sallam Al-Madhagi[1]，Ciara K. O'Sullivan[1,3]，Mamantos Prodrimidis[2]，○Ioanis Katakis[1]
（[1]Interfibio Research Group, Department of Chemical Engineering, Universitat Rovira i Virgili, Spain, [2]Department of Chemistry, University of Ioannina, Greece, [3]Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats, Passeig Lluís, Spain）

10:40　休憩

10:50　4SYa2–5　**The simplicity of electrophoresis and electrochemical sensor for reliable and field-applicable analysis of Recombinase Polymerase Amplification**
……Himankshi Rathore[1]，Radhika Biyani[1]，Hirotomo Kato[2]，Yuzuru Takamura[1]，Kenji Kojima[3]，Kiyoshi Yasukawa[3]，○Manish Biyani[1,4,5]
（[1]Japan Advanced Institute of Science and Technology, Japan, [2]Jichi Medical University, Japan, [3]Kyoto University, Japan, [4]BioSeeds Corporation, Japan, [5]Biyani Group of Colleges, India）

11:08　4SYa2–6　**Application of Loop-mediated isothermal amplification for the diagnosis of infections diseases**
……○Yasuhiko Suzuki（Hokkaido Univ.）

11:26　4SYa2–7　**High sensitive nucleic acid detection of intraamniotic bacteria, *Ureaplasma* spp., in maternal peripheral blood**
……○Itaru Yanagihara[1]，Tetsu Wakimoto[1]，Yukiko Nakura[1]，Kiyoshi Yasukawa[2]
（[1]Res Inst, Osaka Women's and Children's Hospital, [2]Grad Sch Agric, Kyoto Univ.）

11:44　4SYa2–8　**Noise reduction in DNA amplification using DNA/RNA helicase**
……○Shinsuke FUJIWARA（Kwansei-Gakuin Univ.）

4SYa3　コレステロール・胆汁酸代謝をめぐる食健康科学と腸内細菌学の新展開

3 月 28 日（土） 9:30～12:00
後　援：日本生物工学会スローフード共生発酵工学研究部会
会　場：A21 会場（センター 2 号館 2406）
世話人：中山二郎（九大院農），北垣浩志（佐賀大農）
座　長：中山二郎（九大院農），北垣浩志（佐賀大農）

9:30　はじめに ……中山二郎（九大院農）
9:35　4SYa3–1　腸内フローラにおける胆汁酸代謝と健康と疾病について俯瞰する
……○中山二郎[1]，田中　優[2]，船津結妃[2]（[1]九大院農，[2]九大院生資環）
10:00　4SYa3–2　高脂肪食による菌叢崩壊の要因としての胆汁酸：胆汁酸仮説の証明
……○横田　篤，渡辺真通，藤田祐己，石塚　敏，吹谷　智（北海道大農）
10:30　4SYa3–3　食生活と腸内細菌叢と肝機能 ……○中村　強（福岡女子大国際文理）
11:00　4SYa3–4　コレステロール異化産物胆汁酸の新規機能と胆汁酸受容体 TGR5 ……○佐藤隆一郎（東大農）
11:30　4SYa3–5　日本の発酵食品の基盤，麹に含まれるグリコシルセラミドが胆汁酸と腸内細菌の相互作用に及ぼす影響
……永留真優[1]，北島悠花[1]，浜島弘史[4]，柳田晃良[2]，西向めぐみ[3]，
中村　強[6]，光武　進[1]，永尾晃治[1]，中山二郎[5]，○北垣浩志[1]
（[1]佐賀大学，[2]西九州大学，[3]岩手大学，[4]佐賀県工業技術センター，[5]九州大学，[6]福岡女子大学）
11:55　おわりに ……北垣浩志（佐賀大農）

4SYa4　食欲・食嗜好の分子・神経基盤

3 月 28 日（土） 9:30～12:00
会　場：A22 会場（センター 2 号館 2407）
世話人：佐々木努（京都大院農），岩崎有作（京都府大生命環境），中島健一朗（生理研）
座　長：佐々木努（京都大院農），岩崎有作（京都府大生命環境），中島健一朗（生理研）

9:30　4SYa4–1　腸管の脂質シグナルと摂食行動 ……○五十嵐美樹（東京農工大学）
10:00　4SYa4–2　求心性迷走神経による過食と摂食リズム異常の改善作用 ……○岩崎有作（京都府大生命環境）
10:30　4SYa4–3　炭水化物を嗜好する恒常性維持機構～絶食からの回復に炭水化物が欲しくなる脳内メカニズムに迫る
……○岡本士毅[1]，箕越靖彦[2]，益崎裕章[1]（[1]琉球大医，[2]生理研）
11:00　4SYa4–4　「空腹は最高の調味料」－その神経基盤の解明
……○中島健一朗[1,2]，傅　　欧[1]，岩井　優[3]，成川真隆[3]，三坂　巧[3]，箕越靖彦[1,2]
（[1]生理学研究所，[2]総合研究大学院大学，[3]東大院農・応生化）
11:30　4SYa4–5　単純糖質に対する食欲を調節するメカニズム ……○佐々木努（京都大院農）

4SYa5　ポストコッホ時代の微生物学を目指して

3 月 28 日（土） 9:30～12:00
共　催：文部科学省科研費新学術領域研究「ポストコッホ生態」
後　援：筑波大学微生物サステイナビリティ研究センター，東京大学微生物科学イノベーション連携機構
会　場：A13 会場（センター 2 号館 2303）
世話人：高谷直樹（筑波大生命環境・MiCS），野尻秀昭（東大生物工学セ・CRIIM），大西康夫（東大院・農生科・CRIIM）
座　長：高谷直樹（筑波大生命環境・MiCS），野尻秀昭（東大生物工学セ・CRIIM）

9:30　はじめに ……高谷直樹（筑波大生命環境・MiCS）
9:35　4SYa5–1　開催にあたって～ポストコッホ微生物学が目指すところ
……○高谷直樹[1,2]（[1]筑波大生命環境，[2]筑波大微生物サステイナビリティ研究センター）
10:00　4SYa5–2　超ハイスループットな微生物の単離を可能とするマイクロデバイス ……○佐々文洋（九州大情エレ）
10:25　4SYa5–3　微生物中の分子からの手紙―ラマンスペクトル―を読み解く ……○重藤真介（関西学院大理工）
10:50　休憩
10:55　4SYa5–4　単離培養から紐解く稀少微生物たちの実態と多様性
……○中井亮佑[1]，玉木秀幸[1,2,3]（[1]産総研・生物プロセス，[2]筑波大・生命環境，[3]東京大・生セ）
11:20　4SYa5–5　ポストコッホ微生物学のためのバイオインフォマティクス ……○岩崎　渉，松井　求（東京大理）
11:45　おわりに ……野尻秀昭（東大生物工学セ・CRIIM）

4SYa6　シアノバクテリアと未来を描く

3 月 28 日（土） 9:30～12:00
会　場：A14 会場（センター 2 号館 2304）
世話人：渡辺　智（東京農大 バイオ），朝山宗彦（茨城大 農），兼崎　友（静岡大 グリーン研）
座　長：渡辺　智（東京農大 バイオ），朝山宗彦（茨城大 農），兼崎　友（静岡大 グリーン研）

9:30　4SYa6–1　藻によるモノづくり ～探索・遺伝子・物質生産～ ……○朝山宗彦（茨城大農）

9:55　4SYa6–2　海洋シアノバクテリア由来の生物活性物質
……○末永聖武[1]，岩﨑有紘[1]，森田真布[1]，佐藤英祐[1]，照屋俊明[2]，大野　修[3]
（[1]慶大理工，[2]琉大教育，[3]工学院大先進工）

10:20　4SYa6–3　シアノバクテリア特異的な細胞外多糖合成系の解明
……○前田海成[1]，奥田裕紀子[2]，榎本　元[3]，成川　礼[4]，渡辺　智[1]，池内昌彦[2]
（[1]東京農大バイオ，[2]東大院総合文化，[3]フライブルク大学，[4]静岡大理）

10:45　4SYa6–4　長期高温培養による適応進化実験からシアノバクテリアの可能性を探る
……○兼崎　友[1]，渡辺　智[2]（[1]静岡大・グリーン研，[2]東京農大・生命科学）

11:10　4SYa6–5　宇宙環境における藍藻利用の可能性 ……○横谷香織（筑波大）

11:35　4SYa6–6　タンパク質源としてのスピルリナ大規模栽培と商品化 ……○林　宏恵（株式会社タベルモ）

4SYa7　微生物による有用物質生産「スマートセルインダストリー」の実現を目指す

3 月 28 日（土） 9:30～12:00
会　場：A15 会場（センター 2 号館 2305）
世話人：中川　智（（一財）バイオインダストリー協会），久原　哲（九州大），尾崎克也（（一財）バイオインダストリー協会）
座　長：中川　智（（一財）バイオインダストリー協会），尾崎克也（（一財）バイオインダストリー協会）

9:30　4SYa7–1　スマートセルインダストリーに資するハイスループット微生物構築・評価技術の開発
……○蓮沼誠久[1,2]（[1]神戸大先端バイオ，[2]神戸大科技イノベ）

10:00　4SYa7–2　スマートセル設計システムの概要
……○油谷幸代[1]，荒木通啓[2]，白井智量[3]，亀田倫史[1]（[1]産総研，[2]京都大学，[3]理研）

10:30　4SYa7–3　微生物スマートセル創出プラットフォームの実用化検証 ……○矢追克郎（産総研生物プロセス）

11:00　4SYa7–4　スマートセル創製技術を活用した芳香族化合物生産コリネ型細菌の開発
……○乾　将行[1,2]（[1]RITE，[2]奈良先端大・バイオ）

11:30　4SYa7–5　機能性油脂生産へ向けた情報科学を利用した油脂酵母の改良
……○高久洋暁[1]，山崎晴丈[1]，小笠原渉[2]，矢追克郎[3]，荒木秀雄[4]，荒木通啓[5]，油谷幸代[3,6]
（[1]新潟薬大・応生科，[2]長岡技科大・工，[3]産総研生物プロセス，[4]不二製油，[5]京都大，[6]CBBD-OIL）

講演番号：2SYa2-1
講演日時、会場：3 月 26 日 09:35～ A20 会場

境界領域を探るたのしさ－どこにもつながる農芸化学

Let's enjoy exploring the boundaries

○清水 誠[1,2] ([1] 東京農業大学、[2] 東京大学)
○Makoto Shimizu[1,2] ([1]Tokyo University of Agriculture, [2]The University of Tokyo)

農芸化学科に進学した私は牛乳を扱う研究室で卒論研究を開始し、乳中の脂肪球を覆う膜の解析というテーマのもとで研究者の道を歩み始めた。実は私はこの研究の意義がよくわからないまま学位をとったのだが、この仕事はその後の約 40 年にわたる私の多様な研究、例えば乳がんの診断、乳化性のメカニズム解析、受動免疫食品の開発、食品・栄養素の腸管吸収メカニズム解析、動物細胞培養系を用いた食品評価、という一見つながりのない分野へ私を導き、さらには健康食品の効能・安全性評価、あるいは食の安心のような社会科学的分野にも足を踏み入れさせることになった。このような多様な研究活動を可能にしたのは農芸化学の持つ柔軟性にほかならない。「たとえ食品の研究室に在籍していても、食品研究に縛られず、興味があれば何に手を出してもいい」という教えのもと、境界領域で自由にやっていると、異分野の研究者や企業が近づいてきて、自然と新しい道が開けるということを何度も経験した。一つのことに集中して取り組むことは大切だが、柔軟な発想で異分野にも踏み込むことは決して無駄ではない。農芸化学はそうして発展してきたのだと思っている。

My research career as a NOUGEIKAGAKU scientist started on biochemical analyses of the membrane covering the oil droplets in cow' milk. Although I was unable to understand the importance of this study, this work led me to a variety of research fields, including breast cancer diagnosis, emulsification properties of proteins, passive immune food, intestinal absorption of food and nutrients, evaluation of food substances using animal cell culture systems. Furthermore, it guided me to such applied sciences as regulatory science and risk communication of health foods. A diversity of my research career is strongly dependent on the flexibility of NOUGEIKAGAKU. The word “Even if you are working in a food science laboratory, you can challenge any theme without worrying about the boundary of your research field” given by a mentor was inspiring. Working hard at a boundary will attract other researchers or companies of different field, and a new encounter will show you another way to go. NOUGEIKAGAKU has actually been developing during the past 100 years on such flexible challenges.

explore the boundary, diversity, Nogeikagaku

講演番号：2SYa2-2
講演日時、会場：3 月 26 日 10:00～ A20 会場

公的研究機関でアイディアを活かす、社会を支える
To use our ideas and contribute society in public research institutions

○後藤 奈美（酒類総研）
○Nami Goto (Natl. Res. Inst. Brewing)

公的研究機関では、その機関の目的や社会の要請によって研究テーマが限定される場合が多く、酒類総合研究所の場合、その名のとおり研究課題は酒類に関する事項に限られる。しかし、研究手法については制限されることが少なく、醸造微生物のゲノム解析や新しい育種法の開発のような基盤的な研究から、オフ・フレーバーの発生防止法の開発のような製造現場に直結する研究まで、幅広く研究を実施している。研究成果を上げるには、酒類醸造という伝統を尊重しつつ、新しい手法や考え方を積極的に取り入れていくことが必要である。こうした環境では、各人に与えらえた課題のなかで、どのように自分のアイディアを活かしていくか、研究がどのように社会に貢献するかを常に意識することが大切だと考えている。汎用性のある成果は、共同研究等を通じて他の分野でも活用が期待される。一方、時には研究方針を見直したり、中断する勇気を持つことも必要になる。

さらに、研究成果に加えてその周辺領域の情報や基礎的な情報を社会へ伝えることも重要な仕事である。当研究所では酒類醸造講習を 100 年以上にわたって実施しており、ほとんどの研究職員が講義や実習を担当する。また、近年は日本産酒類の輸出促進に向けた海外への情報発信にも力を入れている。このような仕事には専門的な知識や能力に加え、広い視野と柔軟な思考力が不可欠、と言える。

In public research institutions, research themes are often restricted according to the objectives of the institution or social demand. In the case of the National Research Institute of Brewing (NRIB), our research is restricted to the fields related to alcoholic beverages; however, a wide range of research from fundamental to applied is carried out incorporating new research methodology. In such circumstances, it is important to think about how to use our own ideas and how our research contributes to society.

In addition, it is important to offer research results, as well as related information, to society. NRIB have been carrying out training courses for sake breweries etc, and almost all members of research staff participate in the courses as lecturers. Recently, NRIB also puts effort in international public relations.

To carry out such jobs, a wide perspective and flexible mindset in addition to professional knowledge and skills are indispensable.

public research institutions, idea, social contribution

講演番号：2SYa2-3
講演日時、会場：3 月 26 日 10:25～ A20 会場

リーダーになる人へ贈る言葉
Messages for a new leader

○辻 智子 ((株)吉野家ホールディングス)
○TOMOKO TSUJI (YOSHINOYA HOLDINGS CO.,LTD)

昨今、アカデミアにおいても企業においても「女性活躍」の推進に取り組む事が急務となり、女性活躍の実績作りに懸命です。その結果、大きな舞台に突然立たされ、肩に力が入りっぱなしの女性も多いと思います。

私は大学４年生を卒業後、日本の食品企業へ就職し、９年の勤務の後に退職、米国留学、帰国後には財団法人の研究所、化粧品＆健康食品メーカー、水産会社、外食業界へと、研究職として６回の転職を経験しました。それらの会社生活を振り返って反省する点、それを踏まえて、これからの努力目標とする点などについてお話したいと思います。本セッションで、私のつたない経験をお話しすることで、日々の仕事の中で、周囲を見る目が少し変化し、少しでも肩の力が抜ける人が増えることを期待しています。

In recent years, it has become an urgent task in both academia and companies to promote “active participation by women” and to show achievements in this issue. As a result, some women are suddenly forced to play a big role and feel too much stress. After graduating from the university as a bachelor of agricultural chemistry, I got a job at a Japanese food company, worked for 9 years there and became a postdoctral fellow in the United States.

After returning to Japan, I had been engaged in research at a semi-public research institute, a cosmetics & health food company, a fisheries company and a food service company. In all, I experienced 6 job changes as a researcher.

I would like to talk about the reflecting points in my long company life and my future efforts. I expect that you would have a different view to your surroundings and relax somehow after this session.

active participation by women

講演番号：2SYa2-4
講演日時、会場：3 月 26 日 11:00～ A20 会場

想像すれば”夢”は必ず実現する

Imagination always turns dreams to reality

○柴田 浩志 (サントリーウエルネス（株）健康科学研究所)
○Hiroshi Shibata (Institute for Health Care Science, Suntory Wellness Ltd.)

夢の実現には強く想像することが大切です。夢が夢に出てくるほど考え抜けば、頭の中で思考回路が動き出します。１８９９年の創業以来、サントリーは常に“やってみなはれ”の精神で、幾多の苦難を乗り越えながら積極的に企業活動を推進してきました。私が入社した１９８７年当時、ビール事業は低迷し、食品事業もまだまだ規模が小さく、また医薬品事業は利益を上げるには程遠い状態にありました。さらに大黒柱であるウイスキー事業に陰りが見えはじめ、危機感が高まる中で、将来のサントリーを担う新しい事業を創出することが大きな課題となっていました。そこで、２１世紀の将来を予測し、必ずや“心”と“健康”の時代がやってくると考え、サイエンスの力で新規事業を創造する挑戦が始まります。これが現在のサントリーウエルネスのルーツです。
健康食品事業を立ち上げ、軌道に乗せるためには、競合他社が追随できない独自の研究戦略が必要です。そう考えた我々は、これまでの研究成果から、お酒や飲料等の美味や品質に深く関わっていることを理解していたポリフェノールの健康維持・増進に対する新たな効果に着目し、ポリフェノールサイエンスを事業の核にすることを基本戦略としました。絶えざる挑戦と創造により、偶然の発見からゴマの希少成分であるセサミンと出会った我々は、まさにこれを“自然からの贈り物”と感謝し、その魅力を信じてセサミンの生理機能の発見に向けて研究を加速させます。途中暗中模索の激動期を経ながらも、ようやく今では事業としての花を咲かせるところまでたどり着きました。超高齢社会を迎えるわが国は，今まさにその社会環境や消費者の行動様式が大きく変わろうとしています。我々のミッションは、「一人でも多くのお客様のウエルネスを実現する」こと。健やかに美しく、そして心豊かな毎日を夢見て、人生１００年時代を生き抜くシニアの健康をサポートしたいと考えています。
挑戦と新化、そして未来へ。今に満足することなく、イノベーションの起点をいち早く察知し、最先端のサイエンスと異分野技術の融合により新たな需要と感動を提供して未来価値を創造する。既成概念では誰もが想像できなかった新たな競争ルールを市場に持ち込んでこそ企業研究の存在意義があります。そして、その過程においては研究者の感性、洞察力が大きく影響します。夢を夢で終わらせず、最後まであきらめない考動を奨励する。自分自身が挑戦してみたい夢を持つことで人は強くなれます。苦しい状況でも決断する勇気を持ち、互いに励まし合う優しさがあれば、必ず世界を変えることができるでしょう。悠々と急げ！

To realize your dream, it is important to imagine your dream becoming a reality. When your dream comes out in true dream, a train of thoughts starts running. Since its foundation in 1899, Suntory’s Yatte Minahare spirit has enabled us to overcome numerous hurdles while actively growing our business. When I joined the company in 1987, the beer business was sluggish, the beverage business was still small in scale, and the pharmaceutical business was still far from making a profit. And even the whisky business, Suntory’s breadwinning business, started to show signs of slowing. By making a forecast for the 21st century and predicting the arrival of an era of “mind” and “health,” we had tried to create a new business, using the power of science. This is the origin of Suntory Wellness today.
To establish the health care business, we built up our original research strategy based on polyphenol science. Through many challenges, our ceaseless efforts led us to Sesamin. Being grateful to the “blessing from the nature” and believing the attractiveness of Sesamin, we accelerated our research towards discovering the physiological functions of Sesamin. In Japan, a super aging society, the social environment and consumer behavior are changing greatly. Our mission is to support the wellness of customers. We would like to support the health of the elderly living in the 100-year life era, hoping to lead a healthy, beautiful, fulfilling life.
Challenges and innovations, into the future. We do not satisfy ourselves with the present and create value for future through cutting-edge science and technology in order to generate new demand and excitement. Corporate research has value precisely only when it introduces new ground rules for competing in the market in ways no others have ever before imagined. Through their perception and insight, researchers give significant impacts on this process. Never leave your dream unfulfilled. Keep taking prudent actions until the very end. Having a dream that you want to accomplish, makes you strong. If you have the courage to make a bold decision even in a difficult situation and are kind to encourage others, you sure can change the world. Make haste slowly!

research, challange, dream

講演番号：2SYa2-5
講演日時、会場：3 月 26 日 11:25～ A20 会場

農芸化学の世界から未来を拓くために
To open up the future from the world of Agricultural Chemistry

○千葉 一裕（東農工大農）
○Kazuhiro Chiba (Tokyo Univ. Agric. and Technol.)

農芸化学は生命現象を化学の視点でとらえ、化学物質と化学反応という観点から自然現象を探求することを特徴とする。すなわち生物そのものも含めその基盤には、物質や化学変化を扱うという、学術的にも非常に重要な理念が存在している。これは高度な情報社会の中にいる我々に、なにが重要なのかという足がかりを与えてくれている。また、農芸化学は常に社会との接点の中で研究を推進するという立場をとってきた。そして農芸化学の分野からは、数多くのイノベーションが引き起こされてきた。これは身近に起こる様々な現象に関する好奇心に基づく学究的取り組みや、解明された事実が、社会に直接的なインパクトを与えるに十分であったためではないだろうか。また、その世界に情熱を注ぐ多くの科学者が、実社会にフィードバックすることに対し意欲的であったことも重要な要因である。そのような意味で、農芸化学は長い歴史に支えられ、これから人類が抱える課題にどう立ち向かうかについて、答えを与えてくれる非常に重要な学術領域であると確信している。本講演では演者のこれまでの研究活動を通して実感した、農芸化学を担う人たちの未来への提言をしたい。

Agricultural Chemistry is characterized by the fact that life phenomena are viewed from chemistry, and natural phenomena are being explored from the viewpoint of chemical substances and chemical reactions. In other words, there is a very academic philosophy of dealing with materials and chemical changes including organisms. This gives us a foothold in the advanced information society what is important. Agricultural Chemistry has always taken the position of promoting research in contact with society. And a number of innovations have been triggered from the field. This may be because scholarly approaches based on curiosity about various phenomena that occur in the immediate vicinity and the facts that have been elucidated were sufficient to have a direct impact on society. Another important factor is that many scientists who are passionate about the world were eager to provide feedback to the real world. In that sense, Agricultural Chemistry is supported by a long history and I am convinced that it is a very important academic field that gives answers on how to confront human challenges. In this lecture, I would like to make suggestions for the future of the people responsible for Agricultural Chemistry that I realized through the research activities of the performers.

innovation, entrepreneur, human resource development

講演番号：2SYa3-1
講演日時、会場：3 月 26 日 09:30～ A21 会場

酸化酵素の誤作動を誘起する分子の開発と高難度酸化反応

Tricking Cytochrome P450BM3 into Hydroxylating Non-Native Substrates by Exploiting its Substrate Misrecognition

○荘司 長三[1,2] ([1]名大院理、[2]JST CREST)
○Osami Shoji[1,2] ([1]Nagoya Univ., [2]JST CREST)

シトクロム P450BM3(P450BM3)は，巨大菌由来のヘム酵素で長鎖脂肪酸のアルキル鎖末端部分を水酸化する．長鎖脂肪酸に構造を似せた疑似基質（デコイ分子）を取り込ませると P450BM3 が誤作動し，エタンやプロパンなどのガス状アルカンやベンゼンなどの芳香族化合物を酸化することができる．また，P450BM3 を過剰発現させた大腸菌の培養液にデコイ分子を添加するのみで，ベンゼンをフェノールに高効率に変換できる．最適化条件では，5 時間の反応でフェノールの収率は 59%に達する．フェノールがさらに酸化されたヒドロキノンも 16%の収率で得られ，ベンゼンの転換効率は 75%に達する．デコイ分子の構造の違いによって菌体内反応の活性は大きく変化するが，精製した P450BM3 に対するデコイ分子の効果とは比例しない．デコイ分子自体の毒性は確認されなかったため，菌体内反応の活性はデコイ分子の膜透過性の違いを反映していると考えている．デコイ分子濃度と菌体内反応活性の関連を評価したところ，アルキルプロリンとフェニルアラニンを連結したジペプチド(C7-Pro-Phe)が非常に低い濃度で機能し，5μM でもフェノール収率 40%を超える活性を示した．

Cytochrome P450BM3 (P450BM3) is one of the most promising P450s for construction of biocatalysts because of its high monooxygenase activity. We found that P450BM3 starts to catalyze hydroxylation of nonnative substrates in the presence of perfluorinated carboxylic acids (PFCs) as inert dummy substrates (decoy molecules). PFCs initiate the activation of molecular oxygen in the same manner as with long-alkyl-chain fatty acids and induce the generation of compound I, but the compound I hydroxylates gaseous alkanes and benzene because the C–F bonds of PFCs are not oxidizable. We have succeeded in developing the next generation of decoy molecules by modifying the carboxylate of PFCs with amino acids and succeeded in enhancing the catalytic activity for gaseous alkanes. Amongst the next generation of decoy molecules examined, *N*-perfluorononanoyl-L-leucine (PFC9-L-Leu) was the most effective for hydroxylation of propane (256/min/P450). The crystal structure analysis of PFC9-L-Trp-bound form of P450BM3 showed that the terminal of alkyl chain does not reach to the active site. More recently, we have demonstrated that various carboxylic acids modified with amino acids (*N*-acyl amino acids) as well as amino acid dimers can serve as decoy molecules. Benzene was more efficiently hydroxylated in the presence of these decoy molecules. Decoy molecules can also activate intracellular P450BM3, allowing the use of *E. coli* expressing wild-type P450BM3 as an efficient whole-cell bioreactor.

Cytochrome P450, Decoy molecule, Benzene hydroxylation

講演番号：2SYa3-2
講演日時、会場：3 月 26 日 10:55～ A21 会場

カリクリン生合成過程に内在する活性制御機構

Regulation mechanism of cytotoxicity in calyculin biosynthesis

○脇本 敏幸（北大院薬）
○Toshiyuki Wakimoto (Hokkaido Univ.)

近年の遺伝子配列解析技術の革新、それに伴う天然物の生合成研究の進展によって、天然物に関わる研究領域が著しく深化している。自然界の生き物が作り出す二次代謝産物には生来の機能や意義が備わっていると考えられ、その機能が人類にとって有用な場合に医薬品資源等に利用される。新規な化学構造には新規な機能が宿ることが期待され、これまで数多くの新規天然物が単離、構造決定、合成されてきた。特に人類への貢献が期待される生物活性に基づいて選別された天然物が重点的に研究されている一方で、多くの天然物が有する自然界での本来の機能は未解明なまま取り残されている。近年では天然物の設計図である生合成遺伝子を起点とした生合成マシナリーの解明とともに、異種生物間での生合成遺伝子の分布や天然物の生産制御機構が見出され、その知見から天然物の本来の存在意義を垣間見ることも可能になってきた。我々は海綿由来細胞毒性物質の生合成遺伝子が共生微生物を起源とすることを明らかにしており、その遺伝子にコードされる修飾酵素群の機能から巧妙な生産機構を見出した。強力な細胞毒性物質を介した宿主と共生者間の相互関係を示唆する興味深い知見である。生合成機構の解明から天然物の本来の機能や存在意義に近づくことができるため、天然物に関わる研究領域は今後ますます多面的に発展すると考えている。

The remarkable development of sequencing technology along with biosynthetic study have deepened the research field of natural products. All secondary metabolites are thought to exhibit unique functions, some of which show beneficial activity for humans. Although natural product chemistry has focused primarily on such beneficial natural products, the significance of many natural products in the ecological context remained unclear. The biosynthetic genes of natural products would pave the way for this issue, because they provide much information on the distribution or detailed mechanism of biosynthetic machinery of natural products. We identified the biosynthetic gene cluster of sponge-derived cytotoxin, which originates in symbiotic bacteria. The function of modification enzymes encoded in the biosynthetic gene cluster indicates that a sophisticated biosynthetic mechanism is implemented by the sponge-microbe association. It should be noted that this kind of research had never been conducted without current sequencing technology. I believe that the true role of natural products is important not only for academic interest, but also for uncovering the unexplored role of many natural products.

Calyculin A, Sponge, Symbiont

講演番号：2SYa3-3
講演日時、会場：3 月 26 日 10:20～ A21 会場

化学合成と酵素変換の融合による多環性アルカロイド群の迅速合成

Concise and divergent access to alkaloidal scaffolds by integrating organic and biogenetic synthesis

○大栗 博毅（東京農工大工）
○Hiroki Oguri (Tokyo Univ. of Agriculture and Technology (TUAT))

植物や菌類の二次代謝経路では、シンプルな構築ブロックがモジュラー式に連結された後、主に分子内環化や酸化反応を経て複雑な多環式骨格群が生合成される。演者らは生合成を摸倣しつつ、天然物やそのアナログ群の構造を多様化する迅速合成プロセスを開発している。本講演では、テトラヒドロイソキノリン(THIQ)アルカロイドの化学ー酵素ハイブリッド迅速合成を紹介する。

サフラマイシンやエクテナサイジンに代表される抗腫瘍性 THIQ アルカロイド群は、複雑な五環性母骨格を共有する。本研究では酵素 SfmC を活用し、THIQ アルカロイド群を系統的に構築する化学ー酵素ハイブリッドプロセスを開発した。酵素反応の基質として、チロシン誘導体、長鎖アルキル鎖を有するペプチジルアルデヒドを設計・合成した。酵素 SfmC による五環性骨格の構築とアミノニトリルの導入、二級アミンに対する還元的アミノ化を実施した。酵素変換で得られる中間体を単離せずに連続的に官能基変換を施すアプローチにより、シンプルな合成基質からわずか一日で五環性骨格を迅速合成した。得られた五環性骨格のエステル部位を加水分解して長鎖脂肪酸側鎖を除去した後、キノンへ酸化し、天然物ジョルナマイシン A の 4 ポットでの合成に成功した。更に、酵素変換後に側鎖の除去が可能な官能基を組み込んだ基質群を設計し、サフラマイシン A やその類縁体の合成を実現した。このように酵素変換と化学合成を融合するアプローチにより、THIQ アルカロイド群を系統的に迅速合成する化学–酵素ハイブリッドプロセスを開発することができた。

In this symposium, we will mainly introduce chemo-enzymatic synthesis of tetrahydroisoquinoline (THIQ) alkaloids. By merging synthetic biology with synthetic chemistry, this hybrid approach enables both expeditious assembly of the complex scaffold and flexible structural diversification of the biologically intriguing alkaloids. The common pentacyclic scaffold of the anti-tumor THIQ alkaloids is biosynthesized by non-ribosomal peptide synthetases (NRPSs) involving unique enzymatic Pictet-Spengler cyclizations. Recently, we achieved concise and divergent chemo-enzymatic total syntheses of the THIQ alkaloids by streamlining precise chemical synthesis with *in vitro* engineered biosynthesis. A recombinant enzyme SfmC responsible for the biosynthesis of saframycin A was adapted for the conversions of designer substrates. This approach allowed rapid access to the elaborated pentacyclic skeleton *in a single day* starting from two simple synthetic substrates. Further functional group manipulations allowed operationally simple and expeditious syntheses of jorunnamycin A, saframycin A, and *N*-Fmoc saframycin Y3.

Biosynthesis, Chemoenzymatic Synthesis, Alkaloids

講演番号：2SYa3-4
講演日時、会場：3 月 26 日 10:45～ A21 会場

複雑骨格を構築する生合成マシナリーの精密機能解析

Functional analysis of biosynthetic machinery for constructing complex skeletons

○葛山 智久 [1,2] ([1] 東大農、[2] 東大微生物連携機構)
○Tomohisa Kuzuyama[1,2] ([1]GSALS, UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

一次代謝からの連続的な延長によって生合成される二次代謝産物は、生物、特に微生物と高等植物が進化の過程で長い年月をかけて作り上げてきた多様な構造をもつ生体機能分子である。人類は、これらの二次代謝産物を医薬品などのリード化合物として利用してきた。一方で、そのような多様な二次代謝産物（もっぱら天然物と呼ぶことの方が多い）がどのように生合成されるのかという疑問は、多くの研究者の知的好奇心を刺激してきた。昨今では、様々な天然物の生合成遺伝子クラスター（設計情報）が同定され、生合成酵素（生合成マシナリー）の詳細な機能解析や立体構造解析、さらには計算化学による遷移状態を含めた反応過程の解析も可能となっている。また、天然物の生合成遺伝子の再構築や、酵素の立体構造に基づく論理的な改変によって、「非天然型の天然物」をデザインする研究（生合成リデザイン）も多く見受けられるようになってきた。本発表では、最近の天然物研究の一例として、放線菌が生産するジテルペン化合物 cyclooctatin の生合成研究を紹介する。また、引き続き、４名の講演者に３名の天然物研究者を加えて、「天然物研究の未来」に関するパネルディスカッションを行う。

In this presentation, I will talk about biosynthesis of cyclooctatin, a diterpene having a unique tricyclic C20 diterpene skeleton characterized by a 5-8-5 fused ring system. This diterpene is a potent inhibitor of lysophospholipase, which was isolated from the culture broth of *Streptomyces melanosporofaciens* MI614-43F2. We have demonstrated that diterpene cyclase CotB2 catalyzes the cyclization of geranylgeranyl diphosphate to produce cyclooctat-9-en-7-ol, a tricyclic diterpene alcohol intermediate in cyclooctatin biosynthesis. We proposed a mechanism of the one-pot cyclization reaction, which involves an unusual carbon–carbon bond rearrangement in catalysis. Structural basis of the unusual cyclization reaction will also be presented.

After this presentation, the four speakers and three natural product researchers will hold a panel discussion about “the future of natural product research”.

biosynthetic machinery, terpene, cyclase

講演番号：2SYa4-1
講演日時、会場：3 月 26 日 09:30～ A22 会場

メラニン生合成の分子機序 ~生命金属からの考察~

Molecular mechanism of melanin biosynthesis ~Consideration from the viewpoint of metal cofactors in the tyrosinase family~

○神戸 大朋（京都大生命）
○Taiho Kambe (Kyoto Univ.)

メラニン色素は、色素細胞内でチロシンを出発点とする酵素反応を経て生合成され、その反応にはチロシナーゼ酵素群が必須の役割を果たす。チロシナーゼ酵素群には、チロシナーゼ（TYR）の他に、チロシナーゼ関連タンパク質 1（TYRP1）とチロシナーゼ関連タンパク質 2（TYRP 2）の２つがあり、TYRP1 と TYRP2 は、TYR と高い相同性を示す。これら３つの酵素の中で、TYR に関しては解析が進展しており、活性中心に銅を配位したオキシゲナーゼであること、さらに、この銅を供給する銅トランスポーターが ATP7A であることが実証されている。これに対して、TYRP1 と TYRP2 に関する知見は 20 年以上前からほとんど蓄積されておらず、TYR と相同の構造を持つと示唆されたことから、配位金属は銅であり、同様の機能を有すると信じて疑われてこなかった。このような状況で、先日、TYRP1 の結晶構造が明らかにされ、予想通り TYR と相同な構造を持ち、同じ金属配位アミノ酸残基を有することが報告された。しかしながら、予想に反して、活性中心に配位していた金属が銅ではなく亜鉛であった。現在、TYRP1 と TYRP2 に配位する金属に関しては、情報が錯綜している。我々は、チロシナーゼ酵素群に配位する金属に関して解析を進めており、本発表では、TYR、TYRP1、TYRP2 による協調的なメラニン色素生合成に関して、金属の観点から概観して考察したい。

Melanin biosynthesis requires tyrosinase protein family consisting of tyrosinase (TYR), tyrosinase-related protein 1 (TYRP1) and tyrosinase-related protein 2 (TYRP 2). TYRP1 and TYRP2 show high homology to TYR, all of which belong to type 3 copper protein family. TYR is known to possess two copper ions coordinated at the active center. The copper transporter ATP7A plays a pivotal role in the coordination of TYR with copper. In contrast, the coordination metals for TYRP1 and TYRP2 have not yet been clarified, although it was suggested that they have a homologous structure to TYR, and thus copper ions would be coordinated at their active site for more than 20 years. The crystal structure of TYRP1 was reported in 2017, which showed that TYRP1 has homologous structure to TYR and has the same amino acid residues for coordinating metals, as expected. However, it was a surprising result that the coordinated metals at the active center are not copper ions but zinc ions. Currently, information about the metals coordinated at the active center of TYRP1 and TYRP2 is complicated. We have investigated which metals are coordinated in tyrosinase family proteins. Here, I will overview how TYR, TYRP1, and TYRP2 cooperatively contribute to melanin biosynthesis in terms of metal ions.

Melanin, Tyrosinase, cofactor

講演番号：2SYa4-2
講演日時、会場：3 月 26 日 10:00～ A22 会場

大腸菌におけるスーパーオキシドディスムターゼの銅イオン獲得メカニズム

A copper-acquisition mechanism of superoxide dismutase in Escherichia coli

○古川 良明、吉田 昂生、草野 孝央、高橋 愛海（慶應大理工）
○Yoshiaki Furukawa, Koki Yoshida, Takahiro Kusano, Manami Takahashi (Keio Univ.)

銅は酵素活性の中心として機能する必須微量元素の一つであるものの、活性酸素を生み出す触媒としても機能することから、極めて高い細胞毒性を発揮する。諸刃の剣である銅をうまく利用するために、真核細胞では、銅シャペロンと呼ばれるタンパク質が銅イオンの毒性発現を最小限に抑えつつ、活性中心として銅イオンを要求する酵素に銅イオンを特異的に運搬・供給することが知られている。原核細胞においても、銅イオンを結合して機能するタンパク質はいくつか存在するものの、銅シャペロンの存在は未だに確認されていない。私たちはこれまでに、大腸菌のペリプラズムに局在する主要な銅結合タンパク質である銅・亜鉛スーパーオキシドディスムターゼ（SodC-II）に着目し、原核細胞における銅イオン動態を制御するメカニズムの理解に挑戦してきた。SodC-II は、結合した銅イオンを活性中心として、活性酸素の一種であるスーパーオキシドを除去する酵素で、増殖定常期特異的シグマ因子（σ38）によってその発現が制御されていることから、飢餓などのストレス環境下において機能を発揮すると予想される。しかし、SodC-II を欠損させても、バクテリアの増殖や生存率は影響を受けず、その生理的役割については明らかとなっていない。そこで本発表では、SodC-II の生理的な役割を検討することで、大腸菌において SodC-II が銅イオンを獲得するメカニズムについて議論する。

Copper is one of essential elements, which functions as an active center in cuproenzymes, while copper also exerts cytotoxicity by acting as an efficient catalyst producing reactive oxygen species. To utilize such a useful but toxic copper ion for biological reactions, eukaryotes are equipped with copper chaperone proteins, which bind a copper to reduce its potential toxicity and supply it specifically to copper-requiring proteins. In contrast, prokaryotes also have several copper-requiring enzymes but appear to have no copper chaperone proteins. Our group has hence attempted to understand mechanisms regulating copper dynamics in prokaryotes by noting one of major cuproenzymes, Cu/Zn-superoxide dismutase (SodC-II). SodC-II plays a central role in reducing intracellular levels of superoxide, and its expression is regulated by σ38, which is a primary regulator of stationary phase genes. It is expected that SodC-II may be required for survival under stressed conditions such as starvation; however, knockout of a gene coding SodC-II has no phenotypic changes in *E. coli*. In this presentation, I will show our recent results on physiological functions of SodC-II and discuss a copper acquisition mechanism of SodC-II in *E. coli*.

Superoxide dismutase, copper ion, copper chaperone

講演番号：2SYa4-3
講演日時、会場：3 月 26 日 10:30～ A22 会場

Molecular mechanism of CO biosynthesis responsible for assembly of the active site in NiFe-hydrogenases

○Shigetoshi Aono (National Institutes of Natural Sciences)

Hydrogenases catalyze the reversible redox reactions between H^+ and H_2, for which carbon monoxide (CO)-coordinated metal cofactors act as the active site. Though CO molecule in the active site is known to be biosynthesized enzymatically, detail mechanisms of CO biosynthesis remains unclear. In this work, we have determined the crystal structure of HypX responsible for CO biosynthesis during the maturation of [NiFe]-hydrogenases to find a novel physiological function of coenzyme A (CoA) as a cofactor in CO biosynthesis.

HypX consists of the N- and C-terminal domains linked by a loop with the C-terminal tail. A continuous cavity connecting the N- and C-terminal domains is present in the interior of HypX. In wild-type HypX, CoA is constitutively bound in the C-terminal region of this cavity with a folded conformation. Crystal structure of the A392F-I419F variant and molecular dynamics simulation revealed that CoA can adopt an extended conformation in the cavity. The N-terminal domain of HypX shows a structural homology to enzymes catalyzing the formyl-group transfer reaction including hydrolase domain of the dehydrogenase (FDH-h) that use N^{10}-formyl-tetrahydrofolate (N^{10}-formyl-THF) as a substrate. The catalytic residues for the formyl-group transfer are also conserved in HypX. Soaking experiments revealed that THF derivatives can be bound in the N-terminal domain of HypX. These results indicate that HypX also catalyzes the formyl-group transfer with N^{10}-formyl-THF as a substrate. In the crystal structure of THF-soaked HypX, THF was bound in the corresponding region to the substrate (N^{10}-formyl-THF)-binding site of FDH-h. In the A392F-I419F variant, in which CoA adopts the open conformation, the SH group of CoA was located close to the N^{10}-position of THF, suggesting that CoA acts as an acceptor of formyl group from N^{10}-formyl-THF to form formyl-CoA.

Taken together, we propose the reaction mechanism of CO biosynthesis by HypX as described below. At first, formyl-CoA is formed by formyl-group transfer from N^{10}-formyl-THF to CoA in the N-terminal domain, during which CoA adopts the extended conformation. In the next step, the conformation of formyl-CoA changes from the extended to the folded conformation, by which formyl group in formyl-CoA is accommodated in the active site in the C-terminal domain to produce CO. In the C-terminal domain, putative catalytic residues, Tyr416 and Glu426, are located near the SH group of CoA. These residues will act a general base responsible for decarbonylation of formyl-CoA.

hydrogenase, carbon monoxide biosynthesis, nickel-iron active site

講演番号：2SYa4-4
講演日時、会場：3 月 26 日 11:00～ A22 会場

ホウ酸トランスポーターの偏在・分解を制御する選択的エンドサイトーシス

Selective endocytosis for polar localization and degradation of boric acid transport proteins

○高野 順平 (大阪府大生命環境)
○Junpei TAKANO (Osaka Pref. Univ.)

植物は変動するミネラル栄養環境に膜輸送系を制御して対応している。必須ミネラルの一つであるホウ素はホウ酸の形で植物に吸収されるが、過剰に蓄積すると毒になる。低ホウ素条件時のシロイヌナズナの根の様々な細胞において、ホウ酸チャネル NIP5;1 とホウ酸排出型トランスポーターBOR1 はそれぞれ土壌側と根の中心側の細胞膜ドメインに偏って局在する。これらの偏在性は土壌から中心柱への方向性を持ったホウ酸輸送を可能にする。また、BOR1 は高濃度のホウ酸に応答してユビキチン化され、液胞に輸送されて分解される。これは地上部へのホウ素の過剰蓄積を予防するために重要な応答である。

私たちは NIP5;1 と BOR1 の偏在と分解を規定する細胞内輸送ルートを解析してきた。その結果、クラスリン依存エンドサイトーシスにおける選別因子である AP2 複合体が NIP5;1 と BOR1 の偏在性に必要であることを明らかにした。つまり AP2 複合体による選択的エンドサイトーシスとそれに引き続いたエキソサイトーシス(リサイクリング)が NIP5;1 や BOR1 の偏在性を維持すると考えられる。一方、高ホウ素に応答しユビキチン化された BOR1 の液胞輸送には AP2 複合体は必要でない。植物細胞が複数のエンドサイトーシスを使い分けて輸送タンパク質の偏在性と分解を制御するメカニズムとその生理学的重要性について議論したい。

Boron (B) is essential for plant growth through its function in cross-linking the cell wall pectin. In the roots of *Arabidopsis thaliana* under low B conditions, a boric acid channel NIP5;1 and a borate exporter BOR1 are required for efficient B uptake and translocation. NIP5;1 and BOR1 are located in the plasma membrane (PM) in polar manners toward soil- and stele-side, respectively, in various root cells. The polar-localization of transport proteins is considered to be important for radial transport of nutrients from the soil to the xylem. Besides it essentiality, B is toxic when it is accumulated at mM concentrations in tissues. Importantly, upon high B supply, BOR1 is ubiquitinated and degraded in vacuole via endocytic pathway, to avoid excessive translocation of B. In this presentation, I would like to demonstrate differential mechanisms of endocytosis modulating the subcellular localization and abundance of nutrient transport proteins for nutrient homeostasis in plants.

Arabidopsis, Transporter, Endocytosis

講演番号：2SYa4-5
講演日時、会場：3 月 26 日 11:30～ A22 会場

キチン分解酵素が炭酸カルシウム結晶の欠陥を制御するメカニズム

Crystal defects of calcium carbonate regulated by chitinolytic enzymes

○鈴木 道生、近都 浩之（東大院農）
○Michio Suzuki, Hiroyuki Kintsu (University of Tokyo)

【目的】アコヤガイの貝殻は異なる構造の 2 層から形成されており、外側の層に炭酸カルシウムのカルサイト結晶から成る稜柱層構造を有している。稜柱層において、厚い有機基質の枠組みで囲われた個々の柱状結晶は複数の単結晶性のカルサイト結晶で構成されているが、それらカルサイト結晶の内部にはさらに微量の有機物がネットワーク状に存在している。その微量有機物ネットワークに沿って結晶方位の微小な歪みが形成されることで、結晶が断裂するへき開を防ぎ、貝殻の強度を増していると考えられている。この有機物ネットワークが単結晶に微小な結晶欠陥を引き起こすと考えられているが、有機物ネットワークの構成成分や微小結晶欠陥の形成メカニズムは明らかになっていない。そこで本研究では、有機物ネットワークに着目し、微小結晶欠陥の形成メカニズムを解明することを目的とした。有機物ネットワーク成分を質量分析および赤外分光により解析したところ、キチンとキチン分解酵素が含まれることを明らかにした。稜柱層内ではキチン分解酵素がキチンに作用してネットワーク状のゲルを形成させることで、カルサイトの内部に微小結晶欠陥を引き起こしていることが考えられた。そこで、*in vitro* の炭酸カルシウム結晶形成実験をキチンゲル内で行い、キチン分解酵素がキチンゲルに作用させることで炭酸カルシウムにどのような変化があるのか解析を行った。この結果、キチン繊維がキチン分解酵素で細くなるに連れて、炭酸カルシウム内の結晶欠陥が増大することが示された。また、アコヤガイ生体とキチナーゼ特異的阻害剤であるアロサミジンを用いた *in vivo* での実験を行った。その結果、アロサミジンを投与した個体については貝殻の微細構造が乱れて、特に炭酸カルシウム結晶内の有機物ファイバーの細さに影響を与えることが示された。以上のことからキチン分解酵素が炭酸カルシウム結晶の欠陥形成に何らかの影響を及ぼすことが示された。

The mollusk shells which indicate distinctive microstructures are formed by small amounts of organic matrices controlling the crystal growth of calcium carbonate. The fine microstructures of the shells show superior mechanical properties such as strength or flexibility. The shell of *Pinctada fucata* has the prismatic layer consisting of prisms of single calcite crystals. The calcites contain small-angle grain boundaries caused by a dense intracrystalline organic matrix to improve a mechanical strength. We identified chitin and chitinolytic enzymes as components of intracrystalline organic matrix. The function of those organic matrices in calcium carbonate crystallization was analyzed by in vitro and in vivo experiments.

Chitin, Biomineralization, Calcium carbonate

講演番号：2SYa5-1
講演日時、会場：3 月 26 日 09:30～ A13 会場

イミダゾールジペプチドによる抗疲労効果

Anti-fatigue effect of imidazole dipeptides

○服部 秀美（宮崎大農）
○Hidemi HATTORI (Miyazaki Univ.)

運動などによる筋肉疲労は、大量の酸素消費に伴って発生する過剰な活性酸素種(ROS)による、炎症や組織損傷の誘発や、ミトコンドリアの電子伝達系阻害による ATP 生産の低下によって起こると考えられている。生体には、自ら抗酸化物質や抗酸化酵素を産生し ROS を消去する能力を有するが、活性酸素産生能が抗酸化作用を上回ると酸化ストレスを引き起こす。また筋肉では、ATP 加水分解によるエネルギーを利用して筋収縮が行われ、それにより運動を行うことが可能となる一方で、ATP 加水分解によるプロトンや乳酸によって筋肉の pH が下がると解糖系の酵素の作用を減弱させ、筋収縮を妨げる。筋肉疲労に対して、休息だけでなく抗酸化作用のある機能性食品を摂取することが有効とされている。特に、カルノシンやアンセリンなどのイミダゾールジペプチドは、ラジカル消去能を有し、ヒト臨床試験においても抗酸化作用や抗疲労効果が実証されている。さらに、イミダゾールジペプチドは、pH 低下の抑制効果も有するため、筋収縮を妨げることなく筋肉の活動が持続され、高い運動パフォーマンスが可能となる。本講演では、抗疲労効果を有するイミダゾールジペプチドの作用について紹介する。

Muscle fatigue due to exercise is caused by the induction of inflammation and tissue damage. It is also caused by the reduction of ATP production by the inhibition of the mitochondrial electron transport chain, depending on excessive reactive oxygen species (ROS). When the ROS production activity exceeds antioxidant activity, oxidative stress is caused. Muscle contraction uses the energy released by ATP hydrolysis, which makes it possible to exercise. Conversely, the decrease in pH by lactic acid and by the proton of ATP hydrolysis reduces the action of the glycolytic enzyme and prevents muscle contraction. The intake of functional foods with antioxidant activity as well as rest are effective for muscle fatigue. Especially imidazole dipeptides, such as carnosine and anserine, have a free radical scavenging property and have been reported to exhibit anti-fatigue and antioxidative effects in a clinical study. Moreover, because imidazole dipeptides have an inhibition activity of a pH decrease, muscle activity is continued without preventing muscle contraction. Therefore, it becomes possible to maintain high exercise performance.

Imidazole dipeptides, Anti-fatigue effect, Antioxidant activity

講演番号：2SYa5-2
講演日時、会場：3 月 26 日 09:45～ A13 会場

Physiological Impacts of Glutathione and Citrulline on Exercise Capacity: Possible Roles in Regulation of Nitric Oxide

○Masahiko Morita (Research & Innovation Center, Kyowa Hakko Bio)

Nitric oxide (NO), produced by endothelial NO synthase (eNOS), is a crucial regulator for cardiovascular homeostasis. In the field of exercise physiology, it is widely recognized that NO is a multifunctional modulator of muscle blood flow, energy metabolism and mitochondrial functions during exercise. Recent evidence suggests that NO-enhancing supplement could raise oxygen utilization and nutrient delivery to active muscle, thus contributing to the increased exercise performance and capacity.

L-Citrulline (CIT) is a potent precursor of L-arginine (ARG) and known to be effective in enhancing NO production. Our recent work found that 2.4 g/day of CIT intake for 7 days in healthy trained men reduced time to complete the 4 km cycling time trial and increased power output in high-intensity exercise model.

Glutathione (GSH) is a tripeptide found in plants and animals that acts as the major antioxidant inside our body's cells. Vascular GSH is an important modulator in NO availability, and consequently GSH depletion could be involved in decreased NO signalling due to impaired antioxidant defense system.

Interestingly, we have demonstrated that CIT supplementation with GSH (in the ratio of 10:1) increases blood NO levels more effectively than CIT itself in animal and clinical studies. The underlying mechanism is that GSH may play an important role in extending the life span for NO, probably due to protection against ROS.

In this talk, we will provide recent evidence and clinical utility of CIT plus GSH on exercise training, and briefly summarize the current knowledge on the impact of NO-enhancing sports supplements.

Glutathione, Citrulline, nitric oxide

講演番号：2SYa5-3
講演日時、会場：3 月 26 日 10:10～ A13 会場

食品による運動模倣の可能性

Mimic exercise with functional foods

○佐々木 崇、佐藤 隆一郎（東大院・農生科・応生化）
○Takashi SASAKI, Ryuichiro SATO (The Univ. of Tokyo)

人生 100 年時代を迎えつつある今日、高齢者がいつまでも元気に活躍できる社会を実現することが急務となっている。そのためには国民の健康寿命の延伸が不可欠であり、これを達成するため定期的な運動習慣の確立が推奨されている。実際、身体活動量が多い人や運動を頻繁に行っている人では糖尿病や肥満、高血圧の罹患率が低く、加齢に伴う筋力低下、すなわちサルコペニアの進行も抑制される。しかし体の弱った高齢者や日々を仕事に忙殺される現代人にとって運動習慣の確立は必ずしも容易ではない。現状として我が国における運動習慣を持つ者の割合は男性、女性共に 30%前後に留まっており、ここ 10 年程度横ばいである。今や運動をさらに普及させるだけでなく、その代替案が求められる時期に差し掛かっている。

このような社会的背景のもと、我々は食品成分を活用することで運動の代替とすることを目標とした研究に取り組んでいる。運動がもたらす有益な効果を模倣する食品を我々は「運動機能性食品」と名付けており、活力のある高齢社会を実現するため運動機能性食品の研究・開発がますます重要になると考えている。本講演では、運動が健康を増進するに至る分子メカニズムを概説し、食品を用いて運動機能を模倣するためのいくつかのアプローチと応用の可能性に関して、我々の最新の研究データを交えて紹介したい。

Today, as we are approaching the 100-year life, so there is an urgent need to realize a society in which elderly people can play an active role. To maintain the health of us, especially the elderly, it is recommended to make exercise a habit; however, it is not easy for us. In fact, nearly 70% of Japanese do not have exercise habits.

Under such a social background, we are trying to mimic exercise with functional foods, in order to realize a healthy aged society. In this presentation, I would like to introduce the molecular mechanisms of exercise benefits and some approaches that connect food and exercise, with our latest data.

skeletal muscle, functional food, exercise

講演番号：2SYa5-4
講演日時、会場：3 月 26 日 10:35～ A13 会場

ヒト試験による抗疲労効果の検討

Investigations of anti-fatigue effect by clinical study

○有村 保次[1]、平井 亜優美[1]、長野 文子[1]、渡邉 睦美[1]、永濵 清子[2]、武安 智樹[3] ([1]宮崎大学医学部附属病院臨床研究支援センター食品臨床試験・臨床研究開発部門、[2] 宮崎大学大学院農学工学総合研究科、[3]九州臨床研究支援センター統計・データセンター)

○Yasuji Arimura[1], Ayumi Hirai[1], Ayako Nagano[1], Mutsumi Watanabe[1], Kiyoko Nagahama[2], Tomoki Takeyasu[3] ([1]Clinical Research Support Center of University of Miyazaki Hospital, [2]Interdisciplinary Graduate School of Agriculture and Engineering, University of Miyazaki, [3]Clinical Research Support Center Kyushu)

2016 年に宮崎県寄付部門として宮崎大学医学部附属病院臨床研究支援センターに食品臨床試験・臨床研究開発部門（以下、当部門）が組織された。宮崎県産の食品の機能性について、ヒト試験を実施し検証していくことが主な業務である。これまで、完熟きんかん「たまたま」、鶏肉、牛乳甘酒を使用した試験で抗疲労効果を評価項目として実施した。これらの試験では、健常成人を対象に、身体的過負荷による急性期の疲労と、慢性的に疲労を自覚している疲労感について検討を行った。いずれも抗疲労効果を期待しうる結果となったが、高齢者やスポーツアスリートを対象とした試験は実施しておらず、試験結果の一般化には未だ課題は残っている。昨今の臨床研究に係る課題として、臨床研究法の施行もあり、より信頼性の高い試験実施が求められている。一方で、スマートフォンやタブレット端末等を利用することで、より簡便に試験を実施できる可能性も試みられている。今回、当部門で実施した試験概要について、当部門の試験実施の特徴（特に信頼性の高いデータ収集の取り組み）についても併せて紹介する。さらに、電子的な試験データ収集システム（Electronic Data Capture：EDC）の機能である Electronic Patient Reported Outcomes(ePRO)を使用した経験も踏まえて、抗疲労効果をテーマとしたより簡便な食品のヒト試験の可能性についても検討したい。

The Department of Food Clinical Trial and Clinical Research, endowed department supported by Miyazaki Prefecture, was established in Clinical Research Support Center of University of Miyazaki Hospital in 2016 to investigate the function of foods produced in Miyazaki. We have conducted clinical studies to investigate the anti-fatigue effect using ripe kumquats, chicken meat, and fermented milk. In these studies, we compared acute fatigue caused by physical stress with chronic fatigue in healthy adults. The Anti-fatigue effect could be expected in healthy adults, however, the study for the elderly or sports athletes were not conducted, and there are still problems in generalizing these study results. We will introduce the outline of these studies conducted in our department, together with the characteristics of our department (especially reliable data collection). Furthermore, I would like to discuss the possibility of simpler clinical studies on foods under the theme of anti-fatigue effects, based on experience using Electronic Patient Reported Outcomes (ePRO), which is a feature of the Electronic Data Capture (EDC) system.

Anti-fatigue effect, clinical study, ePRO

講演番号：2SYa5-5
講演日時、会場：3 月 26 日 11:00～ A13 会場

骨代謝性疾患における柑橘由来ポリメトキシフラボノイドの作用

Effects of citrus derived polymethoxyflavonoids on bone metabolic diseases

○稲田 全規（東京農工大学大学院 生命工学専攻）
○Masaki INADA (Department of Life Science and Technology, Tokyo University of Agriculture and Technology)

柑橘由来の天然化合物であるポリメトキシフラボノイドは、抗酸化作用をはじめとした様々な生理活性を持つことが明らかとなっているが、骨代謝に対するこれらの効果については未だ不明な点が多い。これまでに、ポリメトキシフラボノイドを用いた閉経後骨粗鬆症モデルや歯周病モデルにおける作用を検討してきた。その作用機序として、ポリメトキシフラボノイドが骨芽細胞において IκB キナーゼ（Inhibitor of NF-κB kinase, IKK）の活性を阻害し、IκB（Inhibitor of NF-κB） のリン酸化を抑えることで NF-κB（nuclear factor κB）の活性化を抑制し、プロスタグランジン（Prostaglandin, PG）E_2 産生、破骨細胞分化誘導因子（receptor activator of NF-κB ligand, RANKL）の発現および破骨細胞形成を抑制することを見出している。本シンポジウムでは、ポリメトキシフラボノイド（ノビレチン、タンゲレチン、ヘプタメトキシフラボン、テトラメトキシフラボンなど）の骨代謝調節作用について、細胞培養技術より、X 線画像解析や質量分析イメージングを活用した個体解析までの知見を紹介し、食品由来因子の骨代謝調節作用に着目した、骨の健康増進について考察する。

Polymethoxyflavonoids are the natural compounds in citrus fruits, it possesses various biological functions such as anti-oxidative effects, however, the several effects of bone metabolism are still not known. We previously examined that these polymethoxyflavonoids exhibited the bone protective effects against bone diseases such as osteoporosis and periodontitis. In bone osteoblasts, polymethoxyflavonoids suppressed I κ B kinase (IKK) activity and NF-κB activation that lead to inhibit osteoclast differentiation through the decreased production of prostaglandin (PG) E2 and receptor activator of NF-κB ligand (RANKL). In this symposium, we present the summary of the effects of polymethoxyflavonoid (nobiletin, tangeretin, heptamethoxyflavone, and tetramethoxyflavone etc.) how they improved bone metabolism using by the current biological techniques including cell biology, X-ray imaging and mass spectrometry imaging. These results are applying to the discussion for the effects of food-derived polymethoxyflavonoids promote bone health.

Polymethoxyflavonoids, Osteoclast, Bone resorption

講演番号：2SYa5-6
講演日時、会場：3 月 26 日 11:25～ A13 会場

食品の機能性表示と機能性農産物開発

Functional labelling of food and the development of functional agricultural products

○山本 万里（農研機構食品研）
○Mari Maeda-Yamamoto (NARO Food Research Institute)

日本で機能性を容器に表示できる制度は、特定保健用食品、栄養機能食品、機能性表示食品がある。2015 年に施行された機能性表示食品制度は、一般加工食品やサプリメントの他、「生鮮食品（単一の農林水産物のみを原材料とする加工食品も含む）」も対象とされたこと、国ではなく事業者自身が安全性や機能性について責任を持つ届出制であること、機能性としては「身体の特定の部位の表現」や「主観的な指標による評価」が認められたことが「トクホ」と大きく違う点である。

機能性表示食品として届出・受理された食品は 2,488 品目(2019 年 11 月 7 日)であり、ウンシュウミカン、大豆もやし、リンゴ、ほうれん草、カンパチ、トマト、ケール、唐辛子、卵、鶏胸肉、エノキダケ、ブドウなど、39 品目が生鮮食品として届出・受理されている。

筋肉量を維持する機能性成分としては、３－ヒドロキシ－３－メチルブチレート、ロイシン、マスリン酸、スフィンゴミエリン等が、身体的疲労軽減作用を持つ機能性成分としてイミダゾールジペプチド、コエンザイム Q10、GABA、クエン酸、アミノ酸、アリルシステイン等が届出・受理されている。

In Japan, there are three food labelling system that can display functionality in containers; the government-approved "Foods for Specified Health Uses (FOSHU)", the standard-based "Foods with Nutrient Function Claims (FNFC), the registration-based “Foods with Function Claims (FFC)”. FFC is that the manufacturer has taken responsibility for labelling specific health. Under the FFC system, fresh food is targeted, food manufacturers or agricultural producers themselves can clarify the safety and functional scientific evidence and can be sold by registration to the Consumer Affairs Agency in advance. Functionality evaluation based on body part expressions and subjective scores, which was not allowed by FOSHU, can now be used, so the number of functional categories that can be labelled has increased.

There are 2,488 foods (Nov. 7, 2019) that have been registered and accepted as FFC, and 39 foods such as Satsuma mandarin, soy bean sprouts, apples, spinach, amberjack, tomatoes, kale, green pepper, eggs, chicken breast, enoki mushrooms and grapes are registered and accepted as fresh food FFC.

Functional ingredients that maintain such as muscle mass, 3-hydroxy-3-methylbutyrate, leucine, maslinic acid, sphingomyelin, and functional ingredients having physical fatigue reducing action such as imidazole dipeptide, coenzyme Q10, citric acid, GABA, amino acids, allylcysteine have been registered.

foods with function claims, functional agricultural products

講演番号：2SYa6-1
講演日時、会場：3 月 26 日 09:30～ A14 会場

緑茶成分の脳に対する作用

Effects of green tea components on the brain

○海野 けい子 (静岡県大茶学)
○Keiko Unno (Univ. Shizuoka)

認知症は「脳の老化」が最も重要な危険因子であることから、脳の老化予防は認知症対策の重要な戦略である。私たちはこれまでに老化促進モデルマウス(SAM)の中で、加齢に伴い脳機能の低下が促進される SAMP10 を用いることにより、緑茶カテキンが脳の老化を抑制することを明らかにしてきた。緑茶中の主要なカテキンであるエピガロカテキンガレート(EGCG)は、SAMP10 マウスに対し脳の老化を抑制したが、ガレート基がないエピガロカテキン(EGC)には作用が認められなかった。両者の作用の違いの一因として、培養神経細胞を用いた実験から神経細胞の分化誘導能に違いがあることが見出された。またストレスは脳の老化を促進する重要な因子である。SAMP10 は他の系統のマウスに比べてストレス感受性が高いため、長期にわたるストレスを負荷すると寿命の短縮や脳の老化促進が観察される。SAMP10 を用い、茶葉に最も多く含まれ茶特有のアミノ酸であるテアニンが、ストレスによる老化促進を抑制できることを明らかにしてきた。テアニンは脳内で興奮性の神経伝達物質であるグルタミン酸と、抑制性の神経伝達物質であるγ-アミノ酪酸とのバランスの維持に関与していることが考えられる。また SAMP10 には腎臓での糖の再吸収に重要な役割を担っている SGLT2 に変異があるため腎性糖尿を示す系統と、変異がない系統の２系統がある。新たな糖尿病治療薬として SGLT2 阻害薬が注目されていることから、SAMP10 の SGLT2 変異モデルとしての有用性についても紹介する。

Prevention of brain aging is an important strategy for dementia. We have clarified that green tea catechin suppresses brain aging by using senescence-accelerated model mouse, SAMP10. Epigallocatechin gallate (EGCG), the main catechin in green tea, suppressed brain aging in SAMP10 mice, but no effect was observed on epigallocatechin (EGC). EGCG has higher ability in differentiation-inducing in cultured neuronal cells than EGC. Stress is an important factor of promoting brain aging. Since SAMP10 is sensitive to stress, lifespan shortening and promoting brain aging are observed in stressed mice. Theanine, the most abundant amino acid in tea leaves, can suppress the promotion of aging due to stress. Theanine is thought to be involved in maintaining the balance between glutamate and γ-aminobutyric acid. One of SAMP10 strain has a mutation in SGLT2, which plays an important role in glucose reabsorption in the kidney. The usefulness of SAMP10 as an SGLT2 mutation model is also introduced.

green tea, SAMP10, cognitive function

講演番号：2SYa6-2
講演日時、会場：3 月 26 日 10:00～ A14 会場

SAMP1 および P8 マウスを用いたアンチエイジング作用を有する食品成分の探索

Evaluation of food-derived bioactive compounds for anti-aging using SAMP1 and P8

○片山 茂 (信州大農)
○Shigeru Katayama (Shinshu Univ.)

機能性食品の開発においては、ヒトを対象とした食介入試験が求められるが、その前段階として適切なモデル動物を用いた研究が欠かせない。老化促進モデルマウス (Senescence accelerated mouse, SAM) は、寿命、老化度評点、病理学的変化を基準として選抜交配を繰り返しながら確立されたマウス系統群であり、老化研究に広く用いられてきた。短寿命および促進老化を特徴的形質とする SAM prone（SAMP）は系統ごとに特有な老化関連病態を発症する。本研究室ではこれまでに、SAMP1 と SAMP8 を用いて老化予防に資する機能性食品因子の探索を進めてきた。SAMP8 に青汁の原料として知られるケールの搾汁粉末を混合した飼料を長期摂取させることで、認知機能の低下を抑制することを明らかにした。作用機序の一端として、分子シャペロンの HSP70 および転写因子 HSF1 の発現増加が関与することを見出し、活性成分の一つとして 1-Sinapoyl-2-feruloyl gentiobiose を同定した。一方、外見の老化進行が早い SAMP1 を用いた試験では、グルコラファニン高含有の品種改良ケールの長期摂取により、皮膚のコラーゲン合成が促進し、皮膚老化が抑制されることを明らかにした。

本発表では SAMP のモデル動物としての特徴について概説するとともに、SAMP1 と SAMP8 を用いた食品成分の老化予防作用に関する研究事例について紹介する。SAMP の促進老化は多遺伝子によって制御されており、単一遺伝子が規定する遺伝子改変マウスとの大きな違いと言える。健康長寿研究における老化モデル動物として更なる有用性が期待される。

The senescence-accelerated mouse (SAM) model was established from the AKR/J strain as a spontaneous murine model of accelerated senescence. SAMP8 shows an early cognitive impairment that imitates the deterioration of cognitive function in elderly individuals. Phytochemicals can suppress age-related cognitive decline in SAMP8 mice. Previous study reported that supplementation with kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*), a leafy green vegetable, suppressed cognitive decline by up-regulating brain HSP70 levels in SAMP8 mice. Long-term intake of a glucoraphanin-enriched kale suppressed skin aging in SAMP1 mice by enhancing the antioxidant activity and collagen production. The studies using SAMP mice will provide convincing evidence by which dietary bioactive compounds can contribute to the good health in the elderly.

SAMP, anti-aging, kale

講演番号：2SYa6-3
講演日時、会場：3 月 26 日 10:30～ A14 会場

SAM マウスの聴覚老化を利用した老化予防食品の評価
Evaluation of anti-aging foods using hearing loss in SAM mice

○大池 秀明（農研機構／食品研）
○Hideaki Oike (FRI, NARO)

加齢性難聴は、ヒトのみならず動物に普遍的に生じる老化現象の一つである。内耳の蝸牛に存在する有毛細胞や聴覚神経細胞は、一度死滅すると再生しないことから、加齢とともに細胞数が減少し、聴力の低下として表面化することが明らかになっている。難聴には遺伝的素因の影響も大きく、実験マウスにおいては、系統によって加齢性難聴の進行速度が異なっている。例えば、汎用系統では C57BL/6 や DBA/2 などは難聴の進行が早く、CBA/J では遅い。老化促進モデルマウスの SAMP8 系統は、C57BL/6 系統と類似のタイムコースをたどり、１年齢程度で重度の難聴をきたす。ただし、C57BL/6 系統の場合、他の組織における老化の表現型が顕著に検出できるのが２年齢程度であるため、他の老化との普遍性が検証しづらいという問題があった。一方で、SAM マウスの場合、他の老化のタイムコースも早く現れるため、同時に複数の老化への効果を評価することが可能である。本講演では、聴覚の老化を予防する食品の探索から、他の老化現象への普遍性の検証までについて紹介する。

Age-related hearing loss is one of the aging phenotype among animals. Because hair cells and auditory neurons in the cochlea of the inner ear do not regenerate once they die, the number of cells decreases with age, leading to decline of hearing. Hearing loss is also affected by genetic factors, and in experimental mice, the progression of age-related hearing loss varies depending on the strain. For example, C57BL/6 and DBA/2 show faster hearing loss, while CBA/J shows slower progression. SAMP8 strain follows a similar time course to C57BL/6, and becomes severe deaf at about one year old. However, in the case of C57BL/6, it is necessary to wait until about 2 years old to detect other aging phenotypes. Thus, it is difficult to verify the universality of anti-aging property of the anti-aging food. On the other hand, in the case of SAM mouse, other aging time courses are also early, so that it is possible to simultaneously evaluate anti-aging effects of the food. Here, we will introduce research examples from the screening of foods that prevent auditory aging to the verification of universality to other aging phenomena.

aging, hearing, mouse

講演番号：2SYa6-4
講演日時、会場：3 月 26 日 11:00～ A14 会場

加齢に伴う腸内環境変動と食品素材の機能発現への影響

Changes of intestinal microbiome with ageing and its effects on health function of food materials

○脇田 義久（サッポロホールディングス（株）価値創造フロンティア研究所）
○Yoshihisa Wakita (Frontier Laboratories for Value Creation, SAPPORO HOLDINGS LTD.)

食品成分の一部は腸内菌叢による代謝を受けることで健康機能を発揮するが、腸内菌叢が加齢の影響を強く受けることから、食品が有する健康機能の発現には加齢の影響を考慮する必要がある。我々は各種の老化促進マウスを用いて、食品機能と腸内菌叢との関係について検討を進めてきた。

糖代謝改善が知られている大麦を老化促進マウス SAMP8 が生涯摂取した際、約 60 週まで糖代謝ならびに空間認知、歩行能力の改善が認められたが、それ以降は認められなかった。これはβ-グルカンの機能発現に関連すると報告されている *Prevotellaceae* が加齢に伴い減少した時期と一致していた。また、加齢に伴う菌叢変化の大きな特徴として、*Lactobacillus* 属など通性嫌気性細菌の占有率の上昇が認められた。一方、エリオシトリンやヘスペリジンを含むレモンポリフェノールを SAMP1 マウスが生涯摂取した際は、約 70 週齢においても行動量や外観老化度の改善が認められ、且つ加齢に伴う *Lactobacillus* 属の上昇を抑えていた。これらの結果は食品の健康機能が加齢に伴う腸内菌叢変化に影響されること、あるいは逆に加齢による腸内菌叢変化に影響することを示している。

老化促進マウスで見られた加齢に伴う *Lactobacillus* 属を含む通性嫌気性菌の上昇はヒトでも報告されている。また、各種の疾病との関連が報告されている dysbiosis（腸内細菌叢バランスの破綻）においても、通性嫌気性菌の上昇が報告されている。現在我々は、腸管腔における酸素浸潤ならびにフリーラジカル産生が腸内菌叢変動および宿主の健康状態に関係するとの仮説を立て、研究を進めている。これらの研究についても一部紹介したい。

More than 40 trillion bacteria inhabit the colon. A fraction of the ingested food is metabolized by the intestinal microbiome (IM) and the metabolites are used in various physiological functions. Composition of the IM is influenced by the age of the organism; thus, it is imperative to consider the effects of ageing on the utilization of food. We have used senescence-accelerated mice and observed that the utilization of food is influenced by changes in the IM with increasing age and vice versa. The facultative anaerobic bacteria were elevated upon ageing. We hypothesized that the permeation of oxygen in the intestinal lumen and generation of free radicals correlate with the composition of the IM and host health. In this presentation, we will also introduce the experiments analyzing the free radical production capacity in feces.

ageing, intestinal microbiome, free radical

講演番号：2SYa6-5
講演日時、会場：3 月 26 日 11:30～ A14 会場

SAMP8 マウスを用いた糖質制限による老化促進を軽減する食品の探索

Search for foods that reduce aging promotion by carbohydrate restriction using SAMP8 mice

○都築 毅（東北大院農）
○Tsuyoshi Tsuduki (Tohoku Univ.)

老化とは加齢依存的に様々な組織で機能が低下する現象であり、この老化を遅延し、高齢者の QOL を維持する方法が切望されている。そのため、老化遅延を目指した食事や食品の研究が広く行われている。一方、低炭水化物・高タンパク質食は糖質制限食として知られており、食事の量を減らすことなく炭水化物の量を制限し、その分をタンパク質などで補う食事である。糖質制限食は内臓脂肪を減らす効果が報告されたことで注目され、各所で実践されている。しかし、長期の糖質制限を行ったマウスにおいて心血管に悪影響を及ぼすなど、糖質制限食の長期摂取における安全性に疑問が持たれている。そこで我々は、長期間の糖質制限が老化にどのような影響を及ぼすかを明らかにするため、老化促進モデルマウスである SAMP8 を用いて糖質制限食がマウスの老化にどのような影響を与えるかを検討し、糖質制限食は老化促進モデルマウスの老化を促進することを明らかとした。次に、糖質制限食による老化の促進を軽減する方法の確立を目指し、ある種の食素材により老化促進作用を軽減できることを見出した。

This study used senescence-accelerated prone mice (SAMP8) to examine the effects of a carbohydrate-restricted diet on aging and skin senescence, to determine how long-term carbohydrate restriction affects the aging process. Three-week-old male SAMP8 mice were divided into three groups after one week of preliminary feeding: one was given a controlled diet, the other was given a high-fat diet, and the third was given a carbohydrate-restricted diet. Ad libitum feeding was administered until the mice reached 50 weeks of age. Before the end of the test period, a grading test was used to evaluate visible aging in the mice. After the test period, serum and skin samples in mice were obtained and submitted for analysis. As a result, the grading test demonstrated that there was significant progression of visible aging in the carbohydrate-restricted group, as well as a decreased survival rate. Histological examination of the skin revealed that the epidermis and dermis in the carbohydrate-restricted group had become thinner. Analysis of the mechanisms involved demonstrated an increase in serum interleukin-6, aggravated skin senescence, inhibition of skin autophagy and activation of skin mTOR. Therefore, this study proved that a carbohydrate-restricted diet promoted skin senescence in senescence-accelerated mice. In addition, we have found ways to improve these using food ingredients.

SAMP8, carbohydrate restriction, aging

講演番号：2SYa7-1
講演日時、会場：3 月 26 日 09:35～ A15 会場

遺伝子組換え微細藻類の開放系利用における審査体制整備について

Establishment of examination system for open system use of genetic modified microalgae

○松尾 康範、木下 浩、井上 英俊、清田 純也、神野 浩二、小口 晃央、資延 淳二、西嶋 桂子、久保 寛之 (NITE バイオセンター)
○Yasunori MATSUO, Hiroshi KINOSHITA, Hidetoshi INOUE, Junya SEITA, Koji JINNO, Akio OGUCHI, Junji SUKENOBE, Keiko NISHIJIMA, Hiroyuki KUBO (NITE)

遺伝子組換え生物（LMOs）の使用には、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（以下「カルタヘナ法」）」に則り、所管官庁への申請等が必要です。カルタヘナ法は LMOs の使用について、拡散防止措置を執らないで使用する「第一種使用（いわゆる開放系使用）」と、屋内で拡散を防止する意図を持って使用する「第二種使用」とに分けています。NITE は経済産業省が所管する鉱工業利用を目的とした申請について事前審査等を行っておりますが、これまでは第二種使用の確認のみで、第一種使用での承認実績はありません。これは第一種使用の申請に必要な生物多様性影響評価手法（以下「評価手法」という。）が定まっていないことも要因のひとつです。近年、エネルギー、環境など様々な社会的課題の解決のため、LMOs を使用する研究開発が産学官の協力のもと進められています。特に自然光下での組換え微細藻類の大量培養による燃料、化粧品原料の生産等に大きな期待が寄せられています。そのため、LMOs を開放系で安全に使用するための体制の整備、特に評価手法の具体化が急務となっており、NITE は今年度から経済産業省や関係機関と連携し審査体制整備事業に取り組んでいますので、その概要を説明します。

When using living modified organisms (LMOs), it is necessary to apply to the competent ministers in accordance with the Law “Cartagena Act” in Japan. The Cartagena Act separates uses into two types; “Type 1 Use (open system use)” that uses LMOs without preventive measures against their dispersal, “Type 2 Use” with the prevention of dispersal indoors. Although NITE has conducted pre-examination of the Type 2 Use under the jurisdiction of the Ministry of Economy, Trade and Industry (METI), no approval for the Type 1 Use has been recorded. One of the reasons is the lack of the method for a biological diversity risk assessment (hereinafter as “assessment"), required for Type 1 Use. Research and development for the use of LMOs outdoors has been promoted recently to solve various social issues. Especially, the production of fuel and cosmetic ingredients by genetic modified microalgae cultivated under natural light is highly expected. In order to meet the urgent need, the system for the safe use of LMOs outdoors, especially the implementation of the method for the “assessment” are demanded. NITE starts working to establish the system in cooperation with METI and related organizations from this fiscal year.

genetic modified microalgae, Cartagena Act, biological diversity risk assessment

講演番号：2SYa7-2
講演日時、会場：3 月 26 日 10:00～ A15 会場

原生動物に捕食される細菌の残存性について

Survivability of bacteria grazed by protozoa

○中村 寛治（東北学院大工）
○Kanji NAKAMURA (Tohoku Gakuin Univ.)

汚染された土壌・地下水を微生物によって浄化するバイオレメディエーション分野では、特別な分解能力を有する細菌の利用は、バイオオーグメンテーションとして知られ、大きなポテンシャルを持つ技術である。しかしながら、浄化のために環境中に放出された細菌が、その能力を発揮し、浄化へとつながった例は殆ど無い。これは、自然界に放出された細菌が、放出時の個体数を維持できず、急激に減少することによる。これまでの我々の研究から、主な理由は原生動物による捕食であることが分かってきている。また、出現原生動物は、殆どのケースで、鞭毛虫であることも確認されている。そこで、これら原生動物の捕食能力を評価するため、3 種類の単離鞭毛虫を使って、3 種類の細菌がどのレベルまで捕食されるかをそれぞれ評価した。その結果、多くのケースで初期値が 10^8cells/mL オーダーの被食細菌が 1 週間以内に 10^4～10^6cells/mL のオーダーまで捕食され、その後、残存することが明らかになった。また、 1 株の被食細菌を、土着原生動物が生息する河川水に添加したところ、同様に、1 週間以内で 10^5cells/mL レベルまで捕食され、その後、残存した。本結果から、室内で培養した細菌が、汚染物質分解のために環境中に放出された場合、捕食によって短期間に極めて低い濃度まで減少するが、その後は細菌濃度が維持され、長期に亘って環境中に残存する可能性が示された。

Bioaugmention is an attractive treatment method to cleanup contaminated-soil and groundwater by introducing some bacteria that have good degradability of target contaminants in bioremediation field. However, these bacteria cannot work long enough to cleanup contaminants in the field. Our results showed that bacteria introduced were rapidly eaten up by indigenous protozoa like flagellates. Grazing experiments were conducted to evaluate survivability of prey bacteria by using three isolated bacterivorous protozoa, *Spumella* sp. TGKK2, *Ochromonas* sp. TGPH2, and *Bodo* sp. TGKH8. Also three types of prey bacteria were used and their survivability was evaluated, respectively. Concentrations of these bacteria were adjusted to approximately 10^8 cells/mL. Grazing rate and final concentration of prey bacterium were changed by combinations of protozoan and bacterium. In common, initial rapid decreases of prey bacteria were observed, then final bacterial concentrations became stable at a certain level ranging from 10^4 to10^6 cells/mL. A pray bacterium was also used to evaluate grazing ability of indigenous protozoa in river water, and similar trend in grazing was observed.

Bioaugmentation, Protozoa, Grazing

講演番号：2SYa7-3
講演日時、会場：3 月 26 日 10:25～ A15 会場

実用珪藻ツノケイソウ の応用利用に向けた基盤技術の開発

Development of basic technologies to utilize diatoms *Chaetoceros gracilis*

○伊福 健太郎[1]、菓子野 康浩[2] ([1]京都大院・生命、[2]兵庫県立大院・生命理学)
○Kentaro Ifuku[1], Yasuhiro Kashino[2] ([1]Grad. Schl. Biostudies, Kyoto Univ., [2]Grad. Schl. Sci., Univ. of Hyogo)

地球温暖化の進行や近い将来の原油の枯渇に備え、生物由来の再生可能エネルギーや物質生産が注目されている。なかでも微細藻類は次世代の生物資源として期待され、有用藻の探索が進められている。一方、野生株でバイオ燃料をはじめとする化成品を低コストで生産するには限界もあり、有用変異株の単離や形質転換技術の開発がブレークスルーとなる可能性がある。我々は、微細藻類の中でも漁業資源として実際に大量培養されている珪藻（実用珪藻）であるツノケイソウ（*Chaetoceros gracilis*）に着目した。ツノケイソウ は増殖と脂質蓄積の面で優れた性質を示し、かつ、屋外解放系での培養においても環境変化に対する頑健性を示すなど、物質生産のプラットフォームとして優れた性質を示した。そこでツノケイソウ のドラフトゲノムを解析し、その情報をもとに新しい形質転換ベクターと遺伝子導入技術を確立した。そして珪藻が本来産生することができない有用物質の生産にも成功した。さらに最近ではゲノム編集による変異株の作成を進めている。本発表では、これらの技術開発の概要、ならびに研究開発の現状を紹介する。

Diatoms are unicellular eukaryotic microalgae that play important ecological roles on a global scale—Diatoms are responsible for 20% of global carbon fixation and 40% of marine primary productivity. Their unique abilities to form silica-based cell walls and to produce valuable lipids have attracted attention to them as biotechnologically important resources. For both basic biological research and commercial exploitation of diatoms, an efficient genetic transformation system is required. We have developed the multi-pulse electroporation method to achieve nuclear transformation of the centric diatom *Chaetoceros gracilis. C. gracilis* is a practical species commercially used in fisheries and also attracting interest as a feedstock for biofuels production and bio-refinery. Our transformation process is very simple, its efficiency is higher than previously reported diatom transformation system, and the desired mutant can be produced by the genome editing technique. In this presentation, our recent progress to utilize the diatom *C. gracilis* as a platform for useful substance production will be reported.

algae, useful substance production, genome editing

講演番号：2SYa7-4
講演日時、会場：3 月 26 日 10:55～ A15 会場

生物学的封じ込め技術－生ワクチンへの応用を例として－

The art of biological containment: An application for live bacterial vaccines

○加藤 祐輔（農研機構・生物研）
○Yusuke Kato (NARO, NIAS)

生物学的封じ込めとは、「人間の管理下では生きられるが、自然環境中では死滅するように生物を遺伝的にプログラムする技術」である。言い換えれば「生物の生死を操る技術」とも言える。ここでは、生物学的封じ込め技術に関係する様々な手法について、細菌生ワクチンへの応用を例として紹介する。

生存力の強い病原菌を生ワクチンとして用いると、強い免疫を誘導できる可能性が高いが、発病の危険性が高い。また、他個体への感染や環境への定着によって拡散する危険がある。さらに、バイオテロへの悪用が懸念される。そこで、一般に病原性を弱めた菌を生ワクチンに用いるが、発病する危険は少ないかわりに、免疫誘導性は低い、という生ワクチンのジレンマが知られている。このジレンマと環境・バイオテロへの心配を一挙に解決する方法として、生物学的封じ込め技術を用いて細菌の生存力を可変的に制御する試みを進めている。

Biological containment is a genetic technique that programs organisms to grow only in the laboratory and to die in the natural environment. In other words, biological containment is the art of controlling organisms to be dead or alive. Here, various methods related to biological containment are described, using an application for live bacterial vaccines as an example.

A robust vaccine strain can persist in hosts for a long time and strongly induce immunity, but the hosts may develop disease. In addition, other individuals may be infected and the environment may be contaminated. Therefore, an attenuated vaccine strain that can live in hosts for a limited time is normally used. However, the attenuated strain may only weakly induce immunity. This phenomenon is referred to as the “live vaccine dilemma”. Development of a comprehensive solution to address this dilemma and prevent unintended infection of other individuals, environmental contamination, and abuse for bioterrorism is now in progress.

biosafety, live-attenuated vaccine, genetically modified organism

講演番号：2SYa7-5
講演日時、会場：3 月 26 日 11:20～ A15 会場

合成リン代謝経路による生物学的封じ込め
Biological containment system using a synthetic phosphorus metabolic pathway

○廣田 隆一、黒田 章夫 (広島大院)
○Ryuichi Hirota, Akio Kuroda (Hiroshima Univ.)

生物学的封じ込めとは、特定の環境もしくは生育条件以外では生育できなくなるような遺伝的性質を宿主生物に付与し、組換え体の拡散を防止する方法論である。この基本概念は遺伝子組換え技術が誕生した 1970 年代に DNA クローニング技術とともに考案され、実験室環境における拡散防止措置として用いられてきた。それからおよそ半世紀が経つ現在、遺伝子工学技術は合成生物を含めた高度な組換え生物の作出を可能にし、それらの中には多岐の分野にわたって屋外開放環境での利用（カルタヘナ第一種使用）を想定したものが数多く存在する。他方、生物学的封じ込め技術そのものについても国内外で精巧かつ強固な方法が近年開発されており、その性能は非常に高められてきている。演者らは、バクテリアの還元型リン代謝系を利用することで、生命の必須元素である「リン」の代謝系を改変した生物学的封じ込め技術を開発した。本講演では、この手法を含めた生物学的封じ込め技術の第一種使用における実用的利用の可能性や、想定される課題、今後の展望について紹介したい。

Biological containment is a strategy that limits the growth of host organisms only to grow on a specific condition by introducing a genetic program that can regulate cell viability. This concept was developed together with DNA cloning technology in the 1970s and has been used with physical containment in laboratory environments. Currently, genetic engineering has enabled the creation of synthetic or highly engineered organisms that are intended to be used in open environments (Type 1 use in Cartagena Protocol on Biosafety) across a wide range of fields. With regard to biological containment itself, sophisticated and robust methods have been developed, and their performance has been dramatically improved. We developed a biological containment based on re-engineering the metabolism of “phosphorus”, an essential element of life, and by using the bacterial metabolic system for reduced phosphorus compounds. In this talk, I will present the current possibilities, potential issues, and future prospects regarding the practicality of the biological containment system on Type 1 use of Cartagena protocol.

biological containment, phosphorus metabolism, phosphite

講演番号：3SYa2-1
講演日時、会場：3 月 27 日 09:30～ A20 会場

プラスチック産業の課題に対する微生物・酵素からの取り組み：序に代えて
Introductory for the symposium

○紙野 圭 (製品評価技術基盤機構)
○Kei Kamino (NITE)

海洋でのプラスチックごみの話題を見聞きする機会が急速に増えた。マイクロプラスチックの実態は正確に把握する必要があり、そのための取り組みが各国で進められている。一方で、環境問題でありながら同時に産業・経済の問題がその根底にはある。それはバイオエコノミー、サーキュラーエコノミーなどを牽引する欧州の動向と深く関わる日本の産業活動の問題である。プラスチック産業からみればバイオマスベース促進の欧州の動向と重なって、プラスチック産業そのものの将来に深く関わるその技術開発全体の問題だということである。バイオベースと生分解性の異なる切り口のいずれにせよ、素材・化学産業の問題であると同時にバイオによるものづくりの深く関わるところでもある。また生分解性という機能にあっては、環境中での微生物活動、すなわち plastisphere の理解の促進という基盤の整備も求められる。バイオのものづくりと素材・化学のものづくりの間の行き来などと言わず、一体となった取り組みが求められる。ここではこれら背景を簡潔に整理し、本シンポジウムの演者のプラスチックに対する多様な取り組みから紡ぎ出される議論のきっかけとする。

There are more opportunities hear marine litter issue. The environmental issue is eventually involved with economy issue, which is primarily due to European movement of bio-economy or circular economy. Global industries in our country would be intimately affected with the European movement. It is issue of future plastic industries and the research / development. Different axis of the function of biodegradability and the social policy of biomass based, in combined with gap of biotechnology and chemistry / material science made the issue complicated. The symposium would invite diversified papers including biomass-based and biodegradable. The complicated background would be summarized in this talk.

microbe, plastic, degradation

講演番号：3SYa2-2
講演日時、会場：3 月 27 日 09:40～ A20 会場

微生物由来の芳香族バイオマスを用いた高機能性マテリアルの開発

Development of high-performance materials from aromatic compounds produced by microorganisms

○大西 康夫[1,2]、高谷 直樹[3]、松見 紀佳[4]、金子 達雄[4]（[1]東大院・農生科・応生工、[2]東大・微生物イノベ連携機構、[3]筑波大・生命環境、[4]北陸先端大・先端科技科）
○Yasuo Ohnishi[1,2], Naoki Takaya[3], Noriyoshi Matsumi[4], Tatsuo Kaneko[4] ([1]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, The Univ. of Tokyo, [3]Fac. of Life and Environ. Sci., Univ. of Tsukuba, [4]Grad. Sch. of Adv. Sci. and Tech., JAIST)

化石資源に依存しない低 CO_2 排出型社会の実現のために、我が国では多くの研究プログラムが推進されている。バイオプラスチックの開発と利用は、これらの研究プログラムの中でも重要課題の１つに位置付けられているが、海洋プラスチックゴミ問題にも関係するため、近年、大きな注目を集めている。本発表においては、まず、国内のバイオプラスチックに関する研究プログラム課題を俯瞰する。その後、我々が戦略的イノベーション創造プログラム（SIP）「スマートバイオ産業・農業基盤技術」において取り組んでいる、微生物由来の芳香族化合物を用いた高機能性マテリアルの開発について紹介する。

我々のプロジェクトでは、各種の有用芳香族化合物を生産する微生物を合成生物学的手法によって創製するとともに、これらの化合物を用いた高機能・高付加価値品を開発することを目指している。具体的には、微生物発酵によって芳香族アミンを生産するシステムを構築し、これをベースとして合成するバイオマス由来のポリベンズイミダゾール（PBI）等を対象として、(1) アミド構造を導入した PBI 等の高耐熱絶縁材料への応用、(2) Li イオン伝導性を付与した PBI の二次電池固体電解質への応用に取り組んでいる。さらに、基幹芳香族バイオマス材料として期待が高い多価フェノール類の微生物生産技術を構築し、これを用いて高機能性の構造材料を開発することに取り組んでいる。

For creating a low-carbon society, which is independent of fossil resources, many research programs have been launched in Japan. Development and application of bioplastics is an important subject in these research programs and attracts attentions because of marine plastic pollution in recent years. In this presentation, we will overlook recent research projects on bioplastics in Japan. Then, we will talk about our research project on the development of high-performance materials from aromatic compounds produced by microorganisms in the Cross-ministerial Strategic Innovation Promotion Program (SIP).

Bioplastics, High-performance materials, Synthetic biology

講演番号：3SYa2-3
講演日時、会場：3 月 27 日 10:08～ A20 会場

植物バイオマス資源を利用した高性能ポリマー素材の開発

Syntheses of high-performance polymers from biomass resources

○阿部 英喜（理研 CSRS）
○Hideki Abe (RIKEN CSRS)

植物バイオマスを原料として合成されるバイオマスポリマーの高性能化・高機能化を図り、バイオプラスチック材料としての実用化を達成するための基礎研究を推進している。植物バイオマス由来の脂肪族ならびに芳香族化合物をモノマーとして、モノマーの分子構造ならびに連鎖構造の精密制御技術を導入することにより、耐熱性に優れたポリエステル素材の開発に成功してきた。合成したポリエステルの中には、スーパーエンジニアリングプラスチックに匹敵する熱物性を有する素材も見出されている。また、植物バイオマス由来化合物として存在するビニル化合物を原料とした、バイオマス由来新規アクリル樹脂素材の開発にも取り組んでいる。通常、高分子量化が困難とされているα,β-置換型ビニルモノマーに対し、超強酸の有機酸を触媒としたグループトランスファー重合を適用することにより、高分子量の生成物を得ることに成功している。得られたバイオマス由来新規アクリル樹脂は、従来の石油由来アクリル樹脂よりも優れた耐熱性と同等の光学特性を兼ね備えた素材であることがわかってきた。本講演では、これら新規バイオマスポリマー素材の研究開発をもとに、植物バイオマス化合物を如何にして利用して、高性能・高機能な素材を創出するか、その設計指針を提示したい。

Bioplastics, biodegradable and biomass-based polymers, have increasingly become important for development of environmentally benign materials. They can provide a solution to problems concerning energy resources, the global environment and solid waste management. We have promoted the basic research program to provide novel high-performance biomass-based polymer materials from biomass-based chemicals. By designing the monomeric structure and sequential structure, we succeeded in producing several high-heat resistant polyesters from aliphatic and aromatic chemicals obtained from biomass resources. Some of them had the thermal properties comparable to common petrochemical super-engineering plastics. We also embarked on synthesis of novel acrylic resins from biomass-based vinyl monomers. We found that organic acids such as super strong acids catalyzed group transfer polymerization of α,β-substituted vinyl monomers at a C-C double bond to give corresponding polymer molecules. The obtained biomass-based acrylic resins showed higher heat-resistant characteristics and similar optical characteristic to the typical petrochemical-based acrylic resins.

Biomass-based polymers, Heat resistant polymers

講演番号：3SYa2-4
講演日時、会場：3 月 27 日 10:36～ A20 会場

微生物の力を利用したバイオプラスチック合成と分解の新たな技術構築を目指して

Screening of microorganisms for microbial production and degradation of bioplastics

○山田 美和（岩手大農）
○Miwa YAMADA (Iwate Univ.)

我々は、従来使用されてきた石油性プラスチックが引き起こす諸問題解決の一端を担える技術構築を目指している。本講演では、バイオプラスチック生合成や分解能力を有する新たな微生物の探索についてご紹介し、期待される応用先や今後の課題についても言及したい。

【海藻利用を目指したポリヒドロキシアルカン酸(PHA)の微生物合成】

PHA は、一部の微生物が窒素源制限条件において細胞内に合成するバイオプラスチックであり、環境中で水と二酸化炭素に生分解される。植物由来の糖や油を原料として、PHA の生産性の高い微生物合成系が確立されており、工業スケールで生産され始めている。一方で、我々は PHA 合成の原料として海産バイオマスである海藻に着目した。本研究では、廃棄海藻の有効活用を目指し、コンブやワカメが分類される褐藻類中の主な糖質であるマンニトールもしくはアルギン酸を単一炭素源として利用し、PHA を合成する微生物を自然界より探索した。その結果、マンニトール資化性 PHA 合成菌として *Burkholderia* 属細菌(1) を、アルギン酸資化性 PHA 合成菌として *Cobetia* 属細菌（特願 2018-159148）を見出すことに成功した。さらに、見出した菌株を用いて行った PHA 高蓄積な培養条件の検討、海藻を直接培地に添加した際の PHA 合成結果などについても紹介する。

【ポリアミド 4 (PA4) 分解菌の探索】

繰り返し構造内に炭素原子を 4 つ有するポリアミドである PA4 もまた、バイオベースで合成可能なポリマーである。さらに、PA4 は、ナイロンの中で唯一生分解が認められているという興味深い性質を有する。しかし、環境中におけるポリアミド 4 分解微生物の報告はまだ多くはない。そこで、我々は、自然界に存在する新たなポリアミド 4 分解菌を探索し、新たなナイロン 4 分解菌を数株見出すことができた。

Utilization of bioplastics is expected to solve environmental problems caused by mass consumption of petrochemical plastics. Among the bioplastics, our research especially focused on polyhydroxyalkanoate (PHA) and polyamide 4 (PA4). I would like to describe our challenges to find novel microorganisms relevant to microbial production of PHA from seaweeds (1) and biodegradation of PA4 in this presentation.

【Reference】

1. Yamada M, et al., *Fisheries Science* (2018) 84:405–412

polyhydroxyalkanoate, polyamide 4, seaweed

講演番号：3SYa2-5
講演日時、会場：3 月 27 日 11:04～ A20 会場

再生可能原料からのポリヒドロキシアルカン酸共重合体の微生物合成

Microbial synthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from renewable resources

○福居 俊昭（東工大生命理工）
○Toshiaki Fukui (Tokyo Tech.)

プラスチックは現代社会における生活と産業活動に欠かせない素材であるが、近年では流出した廃プラスチックやマイクロプラスチックによる環境汚染、特に海洋汚染の問題が急速にクローズアップされている。また CO_2 排出抑制や持続可能社会の構築に向け、プラスチック原料の石油からの転換も重要である。再生可能資源を原料とし、利用後には環境中の微生物によって分解される生分解性バイオベースプラスチックの実用化と普及が必要視されている。

微生物が貯蔵物質として菌体内に蓄積するポリヒドロキシアルカン酸（PHA）は再生可能なバイオマス資源を原料とするバイオポリエステルであり、また海洋を含む自然環境中で高い生分解性を示す。我々は適度な柔軟性を示すプラスチックとして利用が可能な PHA 共重合体を対象に、PHA 生産菌の解析と代謝改変によりバイオマス原料のみから前駆体添加なしで効率的生合成可能な組換え株の作製に取り組んできた。本講演ではポリ(3-ヒドロキシブタン酸）効率的生産菌としても知られている水素細菌 *Ralstonia eutropha* (*Cupriavidus necator*)を PHA 生産用宿主とし、その利用可能炭素源の拡張、モノマー供給経路の構築などの改変による植物油および糖質からの PHA 共重合体の生合成と今後の展望について紹介する。

Plastics, essential materials in the modern society, are predominantly produced from non-renewable fossil resources and usually difficult to be degraded. Currently, plastic wastes cause serious environmental problems such as pollution of marine environments. Bio-based biodegradable plastics have drawn increasing attention as promising eco-friendly plastic materials.

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are produced by a wide variety of microorganisms as intracellular carbon- and energy-storage materials. PHAs have attracted much attention as they can be produced from renewable biomass resources and show high biodegradability. Our research group has focused on analyses and engineering of PHA-producing bacteria for biosynthesis of PHA copolymers from biomass resources without addition of precursor compounds. In this study, *Ralstonia eutropha*, a hydrogen-oxidizing and PHA-producing bacterium, was engineered for biosynthesis of flexible PHA copolymers from vegetable oils and sugars by expanding substrate-utilization range, establishing monomer-supplying pathways, and so on.

Biodegradable plastics, Biomass, Polyhydroxyalkanoates

講演番号：3SYa2-6
講演日時、会場：3 月 27 日 11:32～ A20 会場

海洋時限生分解性プラスチック開発が拓く新しい環境調和型社会

Marine timing biodegradable plastics would bring a sustainable society to us

○粕谷 健一、鈴木 美和、橘 熊野（群馬大理工）
○Ken-ichi Kasuya, Miwa Suzuki, Yuya Tachibana (Gunma Univ.)

プラスチックごみが引き起こす環境問題に対して，世界中でその対応策が急がれている。生分解性プラスチックは，このような問題の解決策の一つとして再び脚光を浴びている。一方で海洋では，生分解性プラスチック分解微生物数が極端に少ないため，通常速度での分解を望むことが困難である。この問題を克服し，海洋環境において実用的な生分解性プラスチックを創製するためには，プラスチック自体に，分解のきっかけとなる仕組み（トリガー）を仕掛けておく必要がある。このトリガーとしては，非生物学的因子（光，温度，酸化還元電位，酸化剤，化学種等）と生物学的因子（微生物，酵素等）が利用できる。

当研究グループでは，分解開始時期および分解速度が十分に制御された生分解性プラスチックを，時限生分解性プラスチックと定義している。現在，海洋中でのプラスチック生分解に関する基礎研究から得られた知見や，海洋特有の環境因子を分解のトリガーとして利用した海洋時限生分解性プラスチックの設計に取り組んでいる。本講演では当研究グループが提案した海洋生分解速度および分解開始時期制御方法に関する研究事例を紹介する。

Biodegradable plastics use is a promising solution for reducing environmental pollution by plastic debris. Meanwhile, expression of environmental degradability in commercially available biodegradable plastics vary according to the types of exposure environments. Especially, they are degraded little in marine environments. Additionally, it is very difficult to control the rate and starting time of the biodegradation. Considering that about 60 % of plastic debris that leaked to environments eventually reached marine environments, biodegradable plastics should be designed so that they could be also degraded there.

Here, we define biodegradable plastics with a fully controllable biodegradation rate and biodegradation start time as “timing-biodegradable plastics: **TBP**”. We also define biodegradable plastics that are not biodegraded in specific environments as “potentially biodegradable plastics: **PBP**”. **PBP** could be used as base materials to create **TBP**. Therefore, to find **PBP**s in marine environments could be very important in the design of **TBP**.

Biodegradable plastics, Plastic debris, TBP

講演番号：3SYa3-1
講演日時、会場：3 月 27 日 09:30～ A21 会場

発酵・醸造関連ストレスと酵母の細胞応答
Yeast responses to brewing-related stress

○井澤 真吾（京都工繊大応用生物）
○SHINGO IZAWA (Kyoto Inst. Technol.)

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* が産生するエタノールは、高濃度になると酵母自身にとってもストレスとなり生育や代謝にダメージを与える。発酵槽中のエタノール濃度が 10%以上になる清酒やワインの醸造過程終盤では、酵母は数日に渡って高濃度のエタノールにさらされることになるが、この期間の酵母の生態、とりわけストレスへの適応応答などの生存戦略は未解明な部分が多く残されている。醸造過程終盤は酒質や生産性を最終的に左右する段階であり、この間の酵母の生態を知ることは発酵・醸造技術の改良をはかる上でも有用だと考え演者らは研究を行っている。これまでに、高濃度エタノールストレス下やワイン醸造過程では、翻訳活性が強く抑制され新たなタンパク質合成が停止する一方で、*BTN2* などの一部の遺伝子が翻訳抑制下でも優先的に翻訳され発現することが確認されている。また、長期高濃度エタノールストレス下では細胞骨格のアクチンやセプチンにも変化が見られ、bud neck に存在するセプチンリングが消失する一方で、小型のセプチンリングが細胞表面に複数出現することも観察されている。本シンポジウムでは、新たなタンパク質合成が抑制される条件下で酵母がどのように生き残りを図ろうとしているのか読み解くとともに、これらの知見が発酵・醸造技術や育種に活用できないかに考察したいと考えている。

High-concentration ethanol stress is a severe stress even for *Saccharomyces cerevisiae*, and yeast cells are exposed to severe ethanol stress for several days at the late stages of wine- and sake-brewing processes. It has been reported that severe ethanol stress causes pronounced translation repression and the formation of multiple small cortical rings of septin. We are trying to clarify how yeast cells survive severe ethanol stress without active translation. Recently, we found that *BTN2* mRNA can be translated even under the translation repression and its translation product Btn2p aggregates the denatured proteins into the deposition sites under severe ethanol stress. Since the genes preferentially translated under the translation repression play crucial roles in the stress survival strategy, they might be useful for the improvement of yeast strains and brewing technologies.

severe ethanol stress, yeast, translation repression

講演番号：3SYa3-2
講演日時、会場：3 月 27 日 09:40～ A21 会場

ボーっと発酵(いき)てんじゃねーよ！ ～どうしてお醤油の中で微生物はいきていけるの？～

Don't sleep through fermantation! －Why are microorganisms able to survive in soy sauce?－

○渡部 潤 (ヤマサ醤油)
○jun watanabe (Yamasa Corp.)

醤油造りは、蒸煮した大豆に炒熬割砕した小麦を混合し、麹菌を培養するところから開始される。得られた麹は、食塩水と混合され、固液混合の諸味へと姿を変える。諸味中では、麹菌が生産した様々な加水分解酵素により、小麦デンプンや大豆タンパクが分解され、ブドウ糖やアミノ酸が遊離する。これらを栄養源として、醤油乳酸菌や醤油酵母が生育し、乳酸やエタノールを生産する。微生物発酵により基本的な成分が生成した諸味は、熟成を経て醤油らしい風味となる。このような工程で製造される醤油は、食中毒菌を含む多くの微生物が増殖できない為、優れた保存性を有している。これは、醤油に含まれる比較的高濃度の食塩（16-18%）により微生物が利用可能な自由水が減少すること（つまり低水分活性であること）に起因する。従って、醤油諸味を発酵させる醤油乳酸菌や醤油酵母は、このような環境でも生育可能な、特別な性質を備えた微生物であると言える。演者らは醤油乳酸菌や醤油酵母の研究を行う中で、これらの微生物が高塩濃度下でのみ示す現象を見出してきた。本講演では、醤油乳酸菌や醤油酵母の耐塩性機構を紹介し、前述の現象が特殊な環境への適応に寄与する可能性について議論したい。

For the first phase of the soy sauce manufacturing process, *koji* mold is mixed with processed soybeans and wheat, and then it is cultured in appropriate environment to make soy sauce *koji*. The soy sauce *koji* is moved to a tank and mixed with brine to make soy sauce *moromi*. In the soy sauce *moromi*, lactic acid fermentation by *Tetragenococcus halophilus* and ethanol fermentation by *Zygosaccharomyces rouxii* occur successively, and appropriate aging makes soy sauce flavor rich. The resulting soy sauce has a long shelf life because most microorganisms including food poisoning ones cannot grow in it due to high concentration of salt (16-18%). Therefore, it can be said that *T. halophilus* and *Z. rouxii* have special properties for soy sauce fermentation. We have observed some unique phenomena caused only in high salt environment by *T. halophilus* and *Z. rouxii*. In this session, I would like to introduce the salt tolerant mechanisms of *T. halophilus* and *Z. rouxii*, and discuss the possibility that these phenomena may contribute to their adaptation to such environments.

soy sauce, *Tetragenococcus halophilus*, *Zygosaccharomyces rouxii*

講演番号：3SYa3-3
講演日時、会場：3 月 27 日 10:10～ A21 会場

ビール醸造～ビール酵母 *Saccharomyces pastorianus* のストレス応答
Beer fermentation-Stress response of *Saccharomyces pastorianus*
○野田 陽一[1,2] ([1] 東大院・農生化・応生工、[2] 東京大学微生物科学イノベーション連携研究機構)
○Yoichi Noda[1,2] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Collaborative Research Institute for Innovative Microbiology)

酵母を含む真菌類は日本の発酵産業に欠かせない微生物である．特にアルコールを含む飲料の消費の歴史は長く，紀元前数千年前まで遡ることができる．現在ラガータイプのビールの発酵に用いられる出芽酵母である *Saccharomyces pastorianus* は，今からおよそ 500～600 年ごろ前起きたとされる，*S. cerevisiae* と *Saccharomyces eubayanus* の二つの酵母種の融合イベントから生まれたと考えられており，それぞれの酵母から基本的には二本ずつの染色体を引き継いだ異質倍数体 (allopolyploid) である． *S. pastorianus* は現在までのところ，醸造環境のみから見出されている．異質倍数化と，それに引き続く染色体間の種々の組替えや染色体の脱落を起こした細胞の中から，ビール醸造の環境，すなわち低温，高圧，低栄養といったストレスに適応し，さらに人類に好まれる味のビールを生産する株の組み合わせが選抜されてきたと推測されている．すなわち，*S. pastorianus* は，それら様々な染色体構造を持つ細胞の mixture として，ビールの醸造に用いられていると考えられる．我々は，実際に様々なストレスに対応した *S. pastorianus* の染色体の変化が，個々の細胞内の膜蛋白質の局在や量，オルガネラの形態，娘細胞への分配効率などの表現形の変化として現れるのではないかと考えて調べている．また *S. cerevisiae* と *S. eubayanus* からなる二倍体やそれらの異数体を作製し，そのストレス応答や，種々の表現系への影響を調べている．

Saccharomyces pastorianus is a budding yeast which is used for the fermentation of most of the Lager-type beer. It is speculated that it emerged from a hybridization event between two related yeast species, *Saccharomyces cerevisiae and Saccharomyces eubayanus,* which occurred probably 500~600 years ago. Allopolyploid formation and/or subsequent chromosomal rearrangements or loss or gain of extra chromosomes lead to a formation of a variety of cells with different physiological properties, and among them, a population of cells which adapted to the stress environment during the fermentation processes and also produced a beer with tastes favorable to humans were selected. We are currently investigating whether various environmental stresses would affect the amount and/or localization of the membrane proteins and shapes or inheritance of each organelle to the daughter cells in *S. pastorianus*. We are also looking at the phenotypic responses to the environmental stresses of various aneuploid cells derived from *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces eubayanus* strains.

stress response, allopolyploid, chromosome

講演番号：3SYa3-4
講演日時、会場：3 月 27 日 10:35～ A21 会場

白麹の品質を制御するストレス応答機構

Stress response involved in the quality of the white koji

○二神 泰基 (鹿児島大農)
○Taiki Futagami (Kagoshima Univ.)

白麹菌 *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* は、焼酎の製造に用いられる麹菌である。白麹菌は、米や大麦、サツマイモなどの原料に含まれるデンプンを分解する糖質加水分解酵素を供給することに加えて、クエン酸を多量に生産する特徴をもつ。焼酎用の麹造りでは、前半は発酵熱により温度を上げることで高いアミラーゼ活性を引き出し、後半は温度を下げることでクエン酸生産を促す。我々は、この麹の品質を左右する温度管理が、どのような機構で白麹菌の物質生産を制御しているのかについて解析してきた。白麹菌は、温度を上げた状態では、解糖系から分岐するグリセロール合成経路、トレハロース合成経路、ペントースリン酸経路の代謝が促進されており、クエン酸が生じる TCA 回路へのカーボンフローが抑制されているためにクエン酸を高生産できないことが示唆された。すなわち、温度の低下により白麹菌は高温ストレスから解放され、クエン酸の高生産に必要なミトコンドリア局在型クエン酸排出輸送体 *ctpA* と *yhmA* などの発現が上昇し、クエン酸生産が促進されると考えられた。また、これらの遺伝子発現を制御する因子を探索した結果、サーチュイン *sirD* がクエン酸生産とアミラーゼ活性に関与していることが明らかになった。

The white koji fungus, *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* is used for the production of shochu. *A. kawachii* produces a large amount of citric acid, which prevent the growth of contaminant microbes, in addition to the glycoside hydrolases, which degrade starches contained in cereal ingredients such as rice, barley, and sweet potato. During the white koji production, the cultivation temperature is gradually increased and is then lowered. This temperature modulation is important for stimulating α-amylase activity and the accumulation of citric acid. We have been studied how this temperature modulation affect the gene expression and metabolic activity of *A. kawachii* during the koji production process. Our results suggested that the rising temperature is stressful for *A. kawachii* and that heat adaptation leads to reduced citric acid accumulation through activation of pathways branching from glycolysis. In addition, the lowering temperature enhances the expression of genes involved in the citric acid production including the mitochondrial localized citrate transporters encoding *ctpA* and *yhmA* genes, which are required for the citric acid production. Moreover, we found that sitruin *sirD* is involved in α-amylase activity and citric acid production in *A. kawachii* during the koji production process.

shochu, white koji, stress response

講演番号：3SYa3-5
講演日時、会場：3 月 27 日 11:00～ A21 会場

ストレス感受性を指標とした高発酵性酵母の育種

Breeding of yeast strains with higher fermentation ability by screening of stress-sensitive mutants

○下飯 仁（日本醸造協会）
○Hitoshi Shimoi (Brewing Society of Japan)

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、高いエタノール発酵能を持つことから、酒類やパン、バイオエタノールなどの製造に用いられている。エタノール発酵において酵母細胞は、発酵の産物であるエタノール自身の毒性をはじめとする様々なストレスにさらされるので、ストレス耐性が高いことが重要であると考えられてきた。我々は、清酒酵母が清酒醪で高い発酵力を示す原因について研究した結果、清酒酵母はストレス応答のシグナル伝達系に複数の変異があり、急性のストレスにはむしろ感受性であることを見出した。強いストレス応答は増殖や発酵力を弱めることになるので、エタノール発酵では発酵力とストレス耐性とのバランスを適切に保つことが重要である。このことから、発酵力が弱い酵母菌株はストレス応答が強すぎる可能性が考えられた。もしそうであれば、ストレス感受性の変異株をスクリーニングすることで、発酵力の高い酵母を育種することが可能となる。そこで、清酒酵母より清酒発酵力が低いがストレス耐性である実験室酵母について、変異処理後にヒートショック感受性株を取得したところ、それらの中から高頻度で清酒高発酵力変異株を取得することができた。遺伝的解析の結果、高発酵力変異株ではストレス応答に関与する経路に変異が生じていた。同様に、清酒発酵力の弱い野生酵母からストレス感受性変異株を取得することで、親株より清酒発酵力の強い菌株を育種することができた。

Yeast *Saccharomyces cerevisiae* is used in various industries since it has high ethanol fermentation ability. In ethanol fermentation, yeast cells are exposed to environmental stresses including ethanol itself. Thus, it has been considered that higher stress tolerance is one of the favorable properties for yeast strains. However, we found that sake yeast strains, which are used in sake brewing, are stress sensitive because they have mutations in stress response pathways. Because strong stress response gave rise to slow growth and slow fermentation, appropriate balance between fermentation ability and stress response is important in ethanol fermentation. These findings suggest that slow fermentation of some yeast strains is resulted from excessive stress response. Thus, we hypothesized that screening of stress-sensitive mutants is a good way to breed mutants with higher fermentation ability. A laboratory yeast strain, which has lower fermentation ability and higher stress tolerance than sake yeast, was mutagenized and heat shock-sensitive mutants were screened. From these mutants, we easily selected mutants with higher fermentation ability. We applied this method to a wild yeast to breed its mutants with higher fermentation ability.

sake yeast, stress-sensitive mutants, ethanol fermentation

講演番号：3SYa3-6
講演日時、会場：3 月 27 日 11:30～ A21 会場

製パンプロセスにおけるパン酵母のストレス耐性機構と育種への応用

Stress-tolerant mechanisms of baker's yeast during bread-making processes and their application to breeding

○高木 博史（奈良先端大バイオ）
○Hiroshi Takagi (Nara Inst. Sci. Tech.)

製パン過程におけるパン酵母（多くは *Saccharomyces cerevisiae* の二倍体株）の機能としては、１）炭酸ガスによる生地重量の増加、２）生地の構造・質感の形成、３）生地への味・風味の付与などが挙げられる。パン酵母は製パン過程において、冷凍、高浸透圧、高温乾燥などの環境ストレスに曝されながら機能を発揮している。ところが、パン酵母にこれらのストレスが長時間または複合的に負荷されると、細胞内ではタンパク質、核酸、脂質などの構造や機能が損なわれる。また、ミトコンドリア膜の損傷、抗酸化酵素の変性失活などにより細胞内の活性酸素種（ROS）レベルが増加する「酸化ストレス」状態になり、生育阻害や細胞死などが誘導される。細胞は環境ストレスに応答、適応する能力を備えており、酵母においても各ストレスに応答するシグナル伝達経路に関連する遺伝子群の発現を制御することで、細胞保護物質や適合溶質の合成、シャペロンなどのストレスタンパク質の誘導、細胞膜組成の変化、翻訳の抑制など様々な機構でストレスに適応しようとする。本講演では、パン酵母が製パン過程で受ける環境ストレス（製パン関連ストレス）、およびこれらのストレスに対する細胞の応答・適応機構を概説するとともに、我々が見出した酵母のストレス耐性機構（プロリン・アルギニン代謝、ユビキチン・プロテアソームシステム）とパン酵母の育種への応用について紹介する。

During the fermentation of dough and the production of baker's yeast, yeast cells are exposed to numerous and multiple environmental stresses including freezing, air-drying, and high-sucrose, so-called baking-associated stresses. In addition, such stress conditions could induce oxidative stress in yeast cells with an increase in reactive oxygen species level due to the denaturation of proteins including antioxidant enzymes and the severe damage to mitochondrial membrane or respiratory chain. To avoid lethal damage, baker's yeast cells need to acquire a variety of stress-tolerant mechanisms. So far, focused on stress-induced abnormal proteins, we have found and studied novel stress-tolerant mechanisms of yeast. For example, proline and arginine metabolism could enhance stress resistance of yeast by protecting normal proteins from ROS. The other mechanism is involved in repair or degradation of abnormal proteins via ubiquitin-proteasome system. We believe that not only baker's yeast but also other important industrial yeasts with higher tolerance to various stresses could contribute to yeast-based industry for the effective production of bread doughs and alcoholic beverages or the breakthrough of bioethanol production.

baker's yeast, baking-associated stresse, stress-tolerant mechanism

講演番号：3SYa4-1
講演日時、会場：3 月 27 日 09:30～ A22 会場

質量分析で 1 細胞中の代謝物とタンパク質を解析する

Mass spectrometry-based molecular and phenotypic analysis at single-cell resolution

○和泉 自泰、馬場 健史（九州大生医研）
○Yoshihiro Izumi, Takeshi Bamba (Kyushu Univ.)

生命の最小単位である細胞は特異的な機能を持つ細胞集団に分類することができるが，近年の研究から同一細胞集団であっても多様性・不均一性を有することが知られている．この多様性が環境適応や疾患発症の過程において極めて重要な役割を担っていると考えられ注目されている．プロテオームおよびメタボロームは，生命システムを理解するための重要分子であると同時に，ゲノム情報の実行の結果，すなわち高解像度のフェノタイプとしても捉えることができる．しかし，メタボロームおよびプロテオーム分析は，PCR のような観測対象物の増幅操作ができないため，細胞内に存在する膨大な種類の分子種をそのまま検出する必要がある．また，これまで 1 細胞メタボローム解析に適応されてきた細胞種はアフリカツメガエルの初期胚 （直径 1 mm，523 nL）など細胞サイズの大きいものが大半であった．一般的な動物細胞の体積（直径 20 μm，4 pL）は，上記の細胞の 100 万分の 1 程度である．したがって，一般的な動物 1 細胞のメタボローム解析を実施するためには，100 万倍の検出感度の向上および周辺技術の開発が必要不可欠である．そこで，本研究では，一般的な動物細胞を測定試料として，ナノ液体クロマトグラフィータンデム質量分析（nano-LC/MS/MS）を基盤とした代謝物あるいはタンパク質の高感度計測技術および試料調製・試料導入技術を連携・連動させた「高感度分子フェノタイプ解析システム」の開発を行ったので報告する．謝辞：本研究は科学技術振興機構（JST）CREST 「統合 1 細胞解析のための革新的技術基盤（研究課題番号 JPMJCR15G4)」の支援を受け実施した．

Heterogeneous cell population including rare cancer cells (e.g., circulating tumor and stem cells) in blood and tissues is related to cancer development and drug resistance. Thus, information garnered from the analysis of samples extracted from a rare cancer single-cell is expected to advance knowledge of the mechanism of cancer development and the discovery of therapeutic strategy. However, mass spectrometry-based conventional proteomic and metabolomic analyses require large amount of starting materials (e.g., 10^5–10^6 cells) due to technical limitations. The aim of this study is to develop a novel analytical system for single-cell proteomics and metabolomics in mammalian cells by a combination of single-cell sampling, in-line sample preparation techniques, and highly sensitive nanoflow liquid chromatography tandem mass spectrometry (nano-LC/MS/MS).

Single-cell analysis, Metabolomics, Proteomics

講演番号：3SYa4-2
講演日時、会場：3 月 27 日 10:00～ A22 会場

Hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry analysis of therapeutic IgG molecules

○ Susumu Uchiyama[1,2], Tetsuo Torisu[1], Kentaro Ishii[1], Yuki Yamaguchi[1], Hiroaki Oyama[1], Masanori Noda[3] ([1]Osaka Univ., [2]ExCELLS, [3]U-Medico)

Immunoglobulin G (IgG) has been developed and practically used recent 20 years for the treatments of cancer and autoimmune diseases. One of the important characteristics of IgG is a unique higher order structure that is essential for binding to antigen at Fab portion and to Fc receptor expressed on immune cells at Fc portion. Although structural analyses of Fab and Fc portion have been carried out, understanding of IgG full-body remains elusive. We recently analyzed therapeutic IgG1 molecules using hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry (HDX-MS) for the structural understandings of full-length IgG1 in solution. In this presentation, I'll introduce three cases of HDX-MS studies on therapeutic IgG1 molecules. First the interaction analysis of full-length IgG1 and FcRIIIa by HDX-MS will be demonstrated (Yogo, Yamaguchi, et al, (2019) Sci Rep. 16, 11957), from which interaction sites on the two molecules were successfully identified including sites that had been unknown so far, as well as conformational changed regions in each molecule upon the binding. In addition, the results showed interesting feature of IgG1 molecule that not only interaction site but also some regions including a peptide located at CH3 was structurally influenced upon the binding to FcRIIIa, although the peptide in CH3 is distal from the binding site. Second the HDX-MS study on the identification of aggregation initiation region will be introduced (Noda et al, (2018) J. Pharm. Sci. 108, 2323). In this study, we identified a conformationally changed region in a monomeric IgG1 which is dissociated from small soluble aggregates, as a region responsible for the initiation of aggregation. Finally, investigation on the conformational flexibility of a therapeutic IgG1 will be presented (Oyama (2019) J. Pharm. Sci. in press). Comparison of HDX rate in two buffers, sodium acetate and sodium citrate buffers, showed different conformational flexibility even at the same buffer concentration and pH condition. The surface charge measurements indicated that the different flexibility could be attributed to the accumulation of citrate molecules to IgG1. These HDX-MS studies highlight the new features of IgG1, which could be utilized for rational development of IgG1 molecules and formulation for therapeutic purposes.

antibody, structure, mass spectrometry

講演番号：3SYa4-3
講演日時、会場：3 月 27 日 10:30～ A22 会場

質量分析で毎日の食事を考える

Discover our daily meals by mass spectrometry

○及川 彰[1,2] ([1]山形大農、[2]理研 CSRS)
○Akira Oikawa[1,2] ([1]Yamagata Univ., [2]RIKEN)

我々は毎日の食事によって，食品の持つ３つの機能（栄養価，嗜好性，機能性）に関わる成分を含む多数の低分子化合物を体内に取り込んでいる．風味や健康機能性に関わる成分については詳細なデータが存在する一方で，その他の数千以上と考えられる低分子化合物についてはほとんど調べられていない．また，食事のほとんどが調理された食品であるにも関わらず，成分分析の例は調理前の食品によるものがほとんどであり，調理中の成分変化については風味や健康機能性に関わるわずかな成分に限られている．つまり我々は，「得体の知れない数千以上の低分子化合物を含む食品」を毎日食していると言える．メタボローム解析は，狭義では生物が生合成する低分子化合物（代謝物）を網羅的に分析する手法であるが，人工物・天然物に限らず多種類の低分子化合物を含む環境や食品などのサンプル分析にも応用できる．我々の研究室では，質量分析装置を用いたメタボローム解析技術によって，実際の食事に含まれている成分を網羅的に明らかにすることに加え，調理・加工中の食品に含まれる成分の変動を詳細に解明することを試みている．本シンポジウムでは，ドライフルーツや粕汁，カレーなどを用いて行った研究を中心に，「クッキングメタボロミクス」の実例を紹介する．

Our daily meals include a huge number of low molecular compounds containing food ingredients involved with human nutrition, palatability, and health. There are many analysis reports in known compounds accounting for taste or human health in foods, but few reports about other over-thousand compounds. Additionally, most study in food analysis have focused on raw materials, not on cooked foods. In other words, it can be said that we are eating foods including unknown, strange, mysterious over-thousand low molecular compounds everyday! Our laboratory has been trying to analyze raw and cooked foods and reveal changes in levels of food ingredients during cooking or processing by using mass spectrometry-based metabolomic techniques. In this symposium, several case studies such as metabolomic analysis of dried fruits or curry will be shown.

metabolomics, food analysis, cooking

講演番号：3SYa4-4
講演日時、会場：3 月 27 日 11:00～ A22 会場

質量分析で生物間相互作用を理解する

Elucidating biological interactions between organisms by mass spectrometry

○青木 航[1,2]、植田 充美[1,2] ([1]京大農、[2]JST CREST)
○Wataru Aoki[1,2], Mitsuyoshi Ueda[1,2] ([1]Kyoto University, [2]JST CREST)

近年、生命科学の方法論が hypothesis-driven から data-driven へと大きく変わりつつある。その背景にあるのが、高性能な次世代シーケンサーや質量分析器の出現である。これらの技術的革新によりオミックスデータの取得が比較的簡便になるとともに、バイオインフォマティクスパイプラインも整備され、従来考えられなかった規模でビッグデータの蓄積とその解釈が進みつつある。

当研究室は、京都モノテック社と共同で非常に高い分離性能を有する新規分離媒体モノリスカラムの開発を進め、次世代型オミックス技術を展開してきた。この技術を用い、日本酒の発酵プロセス[1)]、植物-微生物間共生[2)]、宿主―病原体相互作用[3)]、がん細胞の薬剤耐性化メカニズム[4)]など、複雑な生命現象を対象に新たな挑戦を試みてきた。例えば、我々が開発したプロテオミクス・メタボロミクス手法を用いてミヤコグサ―根粒菌の根粒形成機構の理解を試みた研究においては、細菌のジベレリン合成遺伝子・合成経路を世界で初めて発見するとともに、根粒菌が主体的に宿主の根粒数を変化させるという、従来の説とは「主従逆転」の現象の発見に繋がっている。本講演では、まずモノリステクノロジーについて概説し、次にアグリバイオ分野における応用について報告する。最後に、タンパク質をターゲットとした次世代型 data-driven science が我々に何をもたらすかを展望する。

Proteome and metabolome analyses using LC–MS/MS are important approaches for a comprehensive characterization of complex biological systems. We have developed a super-long monolithic silica column with Dr. Minakuchi in Kyoto Monotech. The column showed very high separative performance, and nanoLC–MS/MS system equipped with a monolithic column can identify many proteins and metabolites in living cells in one-shot. Using this system, we have analyzed various complex biological phenomena including Japanese Sake fermentation[1)], plant-microbe symbiosis[2)], and host-pathogen interactions[3)]. Our methods provide promising insights into the relationship between organisms with complex interactions.

1) PLoS ONE 13(1), e0190040 (2018).
2) Scientific Reports, 6, 27998 (2016).
3) AMB Express, 5(1), 127 (2015).
4) Molecular Cancer Research, 17(1):212-224 (2019).

Monolithic column, Proteomics, Metabolomics

講演番号：3SYa4-5
講演日時、会場：3 月 27 日 11:30～ A22 会場

質量分析で代謝の流れを見る
Visualization of metabolic flows by mass spectrometry

○岡橋 伸幸、松田 史生（大阪大情報）
○Nobuyuki Okahashi, Fumio Matsuda (Osaka Univ.)

中心炭素代謝は、糖からエネルギーや細胞前駆体を合成する全生物に必須の機能である。これまでに微生物の代謝を利用した有用物質生産が盛んに研究されているほか、近年では、代謝の変化が、がん細胞の増殖や免疫細胞の分化を制御している可能性が示唆され、中心炭素代謝の計測ニーズが一層の高まりを見せている。中心炭素代謝経路の活性を正確に理解するためには、個別の反応に注目するだけでなく、複数の反応から成る代謝ネットワーク中で、炭素源をどの経路で分解し、どのような用途に利用しているのかを”炭素の流れ”として議論する必要がある。これを実現するために、我々のグループでは、^{13}C 標識炭素源を含む培地中で細胞を培養し、質量分析法を使って代謝物中に蓄積した ^{13}C を追跡する ^{13}C 代謝フラックス解析法の構築と汎用化に取り組んできた。代謝フラックスとは、細胞あたり、時間あたりの化学反応量で定義され、翻訳後修飾やアロステリック制御など複雑な制御要因がすべて反映された代謝の最終表現型である。フラックスを計測することで、代謝反応間での活性を定量的に比較できるようになり、活性化・抑制されている代謝反応の効率的な発見が期待できるほか、ATP や NADPH などの補酵素の再生・消費のバランスを知ることも可能になる。フラックスの計測には、取り込み物質・排出物質の収支の把握、細胞内代謝物中に蓄積した ^{13}C 標識の質量分析、それらを計算機上の代謝モデルに当てはめて解析するソフトウェアが必要となる。そこで本発表では、^{13}C 代謝フラックス解析法の原理や実施法、解析における注意点について述べる。さらに、^{13}C 代謝フラックス解析法をアルコール生産大腸菌の育種に応用した事例や、薬剤処理したがん細胞の中心炭素代謝経路のフラックス分布の変化を観測した事例を紹介する。

Central carbon metabolism is an essential function for energy generation and cell biosynthesis from carbon sources. The measurement of the activity of central carbon metabolism provides informative insights of cellular energy and redox status, which are important for metabolic engineering, cancer cell biology, and immunology, etc. To determine the precise metabolic stats in central carbon metabolism, we have been developing ^{13}C-metabolic flux analysis, which enables the measurement of the specific reaction rates through central carbon metabolic pathways. In this presentation, the principle, protocol and application of ^{13}C-metabolic flux analysis for microbial and mammalian cells will be mentioned.

^{13}C metabolic flux analysis, central carbon metabolism, mass spectrometry

講演番号：3SYa5-1
講演日時、会場：3 月 27 日 09:30～ A13 会場

メタボロミクスの食品機能解析への応用

Application of metabolomics for food function analysis

○福崎 英一郎（大阪大院工）
○Eiichiro Fukusaki (Osaka Univ.)

生体内に含まれる代謝物の網羅的プロファイルであるメタボローム情報を説明変数としてより下流のマクロ表現型を定量的に解析するメタボリックフィンガープリンティングは，精密表現型解析戦術である．その応用範囲は基礎生物学に限らず，メディカル，農学，工学の諸分野で活発に応用展開が図られている．さらに，メタボリックフィンガープリンティングは，運用対象は生体に限定されない．当該手法を食品に適用することにより，これまで困難だった複雑な食品機能の記述が可能となり種々の応用展開が期待できる．食品は，多成分から構成される多機能コモディティであり，どの成分がどの機能に関与しているかを限定することは極めて困難である．これは，近代科学の常とう手段である要素還元科学の適用が必ずしも有効ではないことを示している．食品機能をトップダウンアプローチにより解釈する方法としてメタボロームを説明変数とすることによる食品機能評価値の回帰予測が考えられる．加えて，多変量解析により食品機能と食品成分の間の相関が可視化できる可能性がある．当該相関情報の有効活用はひいては，食品産業における生産，収穫後処理，加工，保管，流通のすべてのプロセスの最適化に資する知見が得られることが期待できる．本講演では，多岐にわたるメタボロームの応用例を紹介するとともに，今後の新たな運用に関しても議論したい.

Metabolic fingerprinting is method to explain sample function using metabolome information as explanatory variates. It is thought to be a useful technology as a high resolution phenotype analysis. Its application area is not limited to basic biology, but is including medical, agricultural, industrial, and related areas. Furthermore, the operation of metabolic fingerprinting is not limited to living organisms. A possible application area is Food science and technology. Foods are multifunctional commodities composed of multiple components. Therefore, classical element reductionism is not sufficient technology for elucidation of complicated food functions. In some occasion, metabolome driven top-down approach might be effective to understand complicated food functions although metabolic fingerprinting might involve some black-box. In this talk, I will introduce various examples of food metabolomics application and discuss future new operations.

metabolomics, fingerprinting, food function

講演番号：3SYa5-2
講演日時、会場：3 月 27 日 09:55～ A13 会場

Retronasal aroma のリアルタイム計測に関する新たな提案

Novel concept of a real time analysis of retronasal aroma

○佐川 岳人 (エスビー食品)
○TAKEHITO SAGAWA (S&B FOODS Inc.)

喫食時のフレーバーリリース、すなわち喫食時に鼻孔から抜けてゆく retronasal aroma に対する注目が高まっている。これは、従来から行われている GC-MS を用いた香気成分析の結果だけでは、説明することが難しい事象が存在することが、その理由の一つといえよう。Retronasal aroma を含めたフレーバーリリース計測は、Taylor らによる報告をきっかけにして、現在に到るまで様々な計測システムが提唱されている。しかしながら、この計測には専用の質量分析システムを用いられることが多いことから、この技術を食品産業界において手軽に利用するというものではなかった。そこで我々は、汎用的な質量分析計に DART イオン源と専用デバイス“Volatimeship”を組み合わせるだけで、手軽にフレーバーリリース計測が可能なシステムを開発し、新たな解析手法として、3 次微分に相当する“躍度”を用いた考え方の提案に至っている。さらに、retronasal aroma 計測に最適化された新しいイオン源”ChemZo”とターゲットイオンの選択をサポートする専用ソフトの開発により、より高感度な計測を容易に実施することが可能となった。ここでは、retronasal aroma 計測の可能性について考えたい。

Interest in the retronasal aroma is increasing because it is difficult to explain a food flavor with only gas chromatograph mass spectrometry analysis data. The analytical technique to characterize flavor releasing phenomena, including the retronasal aroma, came to be well known after the study by Taylor. Thereafter, many techniques were proposed and studied to measure flavor release. However, popularization of the technique to the food industry was difficult because it requires a dedicated mass spectrometry system. Therefore, we developed a new system using a conventional mass spectrometry system combined with a direct analysis in real time (DART) ion source and a dedicated device “Volataimeship” for easy measurement of the flavor releasing phenomena. Using this system, we provided a novel concept analysis of a flavor releasing phenomena using 3rd-order differential “jerk”. Moreover, a novel ion source “ChemZo” with dedicated software that supports selecting target ions for analysis made this highly sensitive analysis easy. I will discuss the possibility of retronasal aroma analysis in this session.

retronasal aroma, flavor release, mass spectrometry

講演番号：3SYa5-3
講演日時、会場：3 月 27 日 10:20～ A13 会場

食の二次機能（香り）デザインにおける複合香気の役割

Synergistic Contributions of Aroma Components in the Process of Food Aroma Design

○岸本 徹（酒類総研）
○Toru Kishimoto (NRIB)

食の二次機能である香りのデザインのプロセスにおいては、まずターゲットとしたい特徴（香り）を決定し、分析の前処理工程においてその特徴を確実に抽出した後に、機器分析を経て着目すべき香気成分をリスト化せねばならない。生成機構を理解した上で、それらの成分を工程で制御する方法、またはその香気成分を添加する、という方法によって香りのデザインを行う。オミクス（網羅的）という視点で食品の香りを考察する際には、着目すべき成分の優先順位、それらの複合的・相乗的な寄与、または閾値に達していない成分群は特徴にどのように寄与しているか、ということを考えねばならない。一般に、食のおいしさや複雑さには、香気成分群が複合的、相乗的に寄与するが、オフフレーバー（おいしさを損なう香り）には、ある１成分が単独で寄与していることが多い。１成分がオフフレーバーに寄与している場合にはターゲットとすべき指標を定め易く、工程で閾値以下へと制御することによって香りをデザインする。しかし複合的、相乗的な寄与の場合には、各成分の特徴から寄与を予想することはできず、着目すべき化合物の優先順位を決めることも難しい。本報告では、ターゲット分析（正確な濃度定量、閾値、GC-Olfactometry 分析にて検出された香調など）の結果を基にターゲットとすべき香気成分群の優先順位を決定し、二次機能(香り)のデザインを試みた事例について、既報を基に紹介する。

In the process of designing food aroma, the target characteristics are decided at first, and then the odorants contributing to the characteristics are extracted and analyzed. The priorities of possible contributors to be focused should be listed, and then the contributors are controlled in the manufacturing process based on the formation mechanism. Or the characteristics are designed by adding the listed odorants. From the point of omics solution, the discussions about the priorities of the odorants to be controlled, the synergistic contributions of multiple odorants, the understanding of the sub-threshold component’s contribution, etc. are necessary. When the synergistic contributions of multiple components construct the aroma characteristics, it is difficult to expect and decide the contribution of each odorant and priorities to be controlled. In this presentation, the previous studies that attempted to design the food aroma by using the priority based on the characteristics in GC-olfactometry analysis, results of accurate anlysis, threshold values.

Synergistic Contribution of Odorants, Threshold Value, Construction of Recombinant Model

講演番号：3SYa5-4
講演日時、会場：3 月 27 日 10:45～ A13 会場

RIKEN Plant Metabolome MetaDatabase の開発

RIKEN Plant Metabolome MetaDatabase: an integrated plant metabolome data repository based on the semantic web

○福島 敦史（理研 CSRS）
○Atsushi Fukushima (RIKEN CSRS)

われわれは、JST/NBDC 統合化推進プログラムにおいて、メタボロームデータリポジトリの開発を進めている。理化学研究所では、環境資源科学研究センター（CSRS）が保有するデータをウェブ国際標準規格に沿った機械可読な Resource Description Framework（RDF）形式にし、理研植物メタボロームメタデータベース（http://metabobank.riken.jp/）として登録、公開している。これらメタデータは、生物サンプル情報、分析プロトコル、データ解析手法等について、標準化された語彙（例. Metabolomics Standards Initiative Ontology = MSIO）を利活用しており、食機能科学を含む他分野のデータとの統合を容易にさせる。これら公開されたデータは、将来的に国立遺伝学研究所に設置されるメタボロームリポジトリ MetaboBank において、高品質な初期データとして情報統合される。可能な限り明確なデータ標準化を目指すメタボロームデータリポジトリの開発によって、メタボロームデータ共有の促進およびデータの再利用性向上に関して中心的な役割を果たしたい。

Metabolome data provide new opportunities to gain a deeper understanding of plant metabolism relevant to both, plant and human health benefits. Major public repositories for general metabolome data have been launched over the past decade, but in terms of data sharing, many aspects remain unresolved especially for improving reanalysis, reusability, and reproducibility. In this study, we developed the RIKEN Plant Metabolome MetaDatabase (RIKEN PMM, http://metabobank.riken.jp/), which stores gas chromatography-mass spectrometry-based (i.e. GC-MS-based) metabolite profiling data of plants together with their detailed experimental metadata, including sampling and experimental procedures. Our metadata are described using the Resource Description Framework (RDF) and standardized vocabularies, such as the Metabolomics Standards Initiative Ontology (MSIO), to integrate with other life and biomedical science data on the World Wide Web. The RIKEN PMM implements intuitive and interactive operations for plant metabolome data, including raw data, mass spectra, and metabolite annotations. The RIKEN PMM is suitable not only for scientists who are interested in metabolomic phenotypes but also for researchers who would like to investigate plant metabolomics approaches. Our framework can provide enough metadata required for reanalyzing and reusing the raw data, and will contribute to the development of yet another general-purpose metabolomics repository.

Plant metabolism, Metabolomics, Data sharing

講演番号：3SYa5-5
講演日時、会場：3 月 27 日 11:10～ A13 会場

ターゲットプロテオミクスによる食品機能予測システムの確立を目指して

Targeted proteomics approach to the simultaneous prediction of multiple food functions

○黒木 勝久、大田 輝、永濱 清子、水光 正仁、榊原 陽一（宮崎大・農・応生科）
○Katsuhisa Kurogi, Akira Ota, Kiyoko Nagahama, Masahito Suiko, Yoichi Sakakibara (Univ. Miyazaki)

我々は以前、細胞を用いた食品の機能評価法の一つに、生理活性の指標になるバイオマーカータンパク質発現の定量値を入力値とし、ニューラルネットワークを活用して、情報科学的に食品機能の推定値を出力する方法を開発した。しかし、バイオマーカータンパク質の定量に ELISA 法を用いた場合、抗体 Lot 間の違いによるデータのばらつきや特異性の低い抗体を用いた際の低いデータ信頼性などの問題が生じてしまう。そこで我々は、先行研究で行われてきたタンパク質定量法である ELISA 法と比べて再現性が良く、標的特異性の高い手法として、質量分析装置を用い定量法である MRM(Multiple Reaction Monitoring)法によるバイオマーカータンパク質の定量解析を試みた。さらに、得られたタンパク質定量値を、ニューラルネットワークに入力し、出力値である食品機能の推定値を算出することで、MRM によるタンパク定量値の互換性を評価した。NQO1 や ERK2 などの ELISA 法で測定された 13 分子に追加して、計 21 種類のバイオマーカータンパク質の定量値を未処理区との相対定量値として算出し、得られた値をニューラルネットワークに入力し、推定値を得た。さらに、MRM 測定法を用いたニューラルネットワーク構築に最適なバイオマーカータンパク質の選別を行った。定量解析できたマーカータンパク質の内、HSP70 等の ELISA と相関の高い分子があった一方、p53 など相関の低い分子も確認された。また、BCL2 などいくつかの分子は MRM 法での検出ができなかった。ELISA 法で用いたマーカータンパク質の定量値では最適なニューラルネットワークを構築することができなかったことから、MRM 解析で定量解析できた新規マーカータンパク質を加えて再度、ニューラルネットワークを構築することができた。今後は、再構築したニューラルネットワークを用いて、精度の高い活性値の推定を行っていく。

In the previous study, a model system based on artificial neural network (ANN) was established to estimate multiple functions of food components. The model employed the expression data of biomarker proteins, measured by Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA), as input data. However, the antibody-based quantifications including ELISA have some issues such as lot-to-lot variations and cross-reactivity of antibodies, which causes the poor reproducibility and specificity. Recently, we embarked a new methodology employing liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) with Multiple Reaction Monitoring (MRM) method for quantification of marker proteins instead of the ELISA method. Among ten maker proteins detected in this study, expression data of some proteins was not well correlated to those of ELISA. These results clearly suggested that ANN established in the previous study using ELISA data should be re-constructed using MRM data in order to predict the food functions with precision.

multiple reaction monitoring, biomarker proteins, artificial neural network

講演番号：3SYa5-6
講演日時、会場：3 月 27 日 11:35～ A13 会場

食品因子センシング機序に基づいた機能性フードペアリング

Functional foodpairing based on the food factor sensing mechanism

○立花 宏文 (九州大農)
○Hirofumi Tachibana (Kyusyu Univ.)

食品因子個々の機能性に関する研究は多いが、多種多様な食品因子を同時に摂取することで期待される機能性における組み合わせ効果は不明なままである。一方、生体には体の中に取り込まれた食品因子を感知（食品因子センシング）するしくみが備わっており、食品因子が生理機能を発現する上で重要な役割を担っている。例えば、ビタミン A はレチノイン酸受容体により感知（センシング）されることでその機能を発現する。また、緑茶の主要な生理活性成分であるエピガロカテキンガレート(EGCG)は 67kDa ラミニン受容体(67LR)にセンシングされることで様々な生理作用を発揮する。この EGCG センシングには Akt、PLC、cGMP、MYPT1、eEF1A、PP2A、eNOS、sGC、PKCδ、酸性スフィンゴミエリナーゼ、スフィンゴシンキナーゼ 1、PDE5 といった分子が関与している。我々はビタミン A や柑橘由来ポリフェノールが EGCG センシングに関与する分子に働きかけることで EGCG の生理作用を増強することを見出した。こうした食品因子間の機能的な相互関係を機能性フードペアリングと呼んでいる。本シンポジウムでは、メタボリックプロファイリング的手法を用い緑茶カテキン EGCG に対して機能的な相互作用を示す食品因子を見出した事例を含め、食品因子センシング機序に基づいた機能性フードペアリングを紹介する。

Food factor sensing (FFS) systems are suggested to be critical to acquire the full benefits of food factors. However, the external factor that affects FFS systems are largely unknown. (–)-epigallocatechin-3-*O*-gallate (EGCG) is known to exhibit various biological and pharmacological properties. 67-kDa laminin receptor (67LR) has been identified as a cell-surface EGCG sensor that confers EGCG responsiveness to many cells at physiological concentrations. EGCG induces cancer cell death by increasing Akt kinase activity and intracellular cGMP levels through 67LR. The 67LR/Akt/cGMP pathway has also been proven to be a major pathway of EGCG-induced apoptosis *in vivo*. Moreover, PLC, MYPT1, eEF1A, protein phosphatase 2A, endothelial nitric oxide synthase, soluble guanylate cyclase, protein kinase Cδ, acid sphingomyelinase and sphingosine kinase 1 have been clarified to be EGCG-sensing relating molecules via 67LR. These molecules mediate unique signaling for beneficial effects of EGCG. Some food factors potentiate bioactivities of EGCG by modulating the EGCG-sensing pathways.

Food factor sensing, Functional foodpairing, Food function

講演番号：3SYa6-1
講演日時、会場：3 月 27 日 09:30～ A14 会場

細菌由来グルクロン酸含有糖脂質合成酵素の機能解析

Functional analysis of bacterial glucuronic acid-containing glycolipid synthases

○沖野 望 (九州大農)
○NOZOMU OKINO (Kyusyu Univ.)

リポ多糖をはじめとする細菌由来の複合糖脂質はバリア機能などの重要な役割を有すると共に、感染時に宿主の免疫系を活性化することから、その構造や生物機能に関する研究がなされている。我々は日和見感染菌として有名な緑膿菌がセラミドを脂肪酸とスフィンゴシンに分解するセラミダーゼを生産することを見出して以来、細菌セラミダーゼの生理機能や高次構造に関する研究を行ってきた。最近、我々は緑膿菌セラミダーゼ遺伝子に隣接する溶血性ホスホリパーゼ C（PlcH）遺伝子が、機能未知の糖転移酵素遺伝子（PA0842）とオペロン構造を形成していることに着目して研究を進め、リンが欠乏すると緑膿菌が PlcH を生産して自らのリン脂質を分解してリンを得る一方で、生じたジアシルグリセロールに PA0842 がグルクロン酸を転移し、グルクロノシルジアシルグリセロール (GlcAGD) を合成することを見出した。また、緑膿菌の GlcAGD 合成酵素のホモログをスフィンゴ糖脂質の生産菌である *Z. mobilis* に見出し、当該酵素がグルクロノシルセラミド（GlcACer）合成酵素であることを見出した。本シンポジウムでは、細菌由来の糖脂質合成酵素とその機能に関して我々の最新の知見を報告する。

Bacterial glycolipids, such as lipopolysaccharide, play an important role not only in the functioning of the cell barrier but also in the mechanism of infection (through activation of the host immune system). Motivated by our discovery of neutral ceramidase (CDase) in *Pseudomonas aeruginosa*, an enzyme that hydrolyzes the *N*-acyl linkage in ceramide to sphingosine and fatty acid, we performed a functional and structural analysis of the enzyme. We found that the gene encoding hemolytic phospholipase C (PlcH) is adjacent to that encoding CDase in the genome of *P. aeruginosa* and that it forms an operon with the gene encoding diacylglycerol glucuronosyltransferase (PA0842). We also demonstrated that under phosphate deficiency, PlcH hydrolyzed phospholipids to phosphorylated headgroup and diacylglycerol, and the diacylglycerol formed was converted to glucuronosyl diacylglycerol by the action of PA0842. Furthermore, we found the homologue of the PA0842 gene in the genome of *Zymomonas mobilis* and demonstrated that this protein acts as a ceramide glucuronosyltransferase, which synthesizes glucuronosylceramide from ceramide and UDP-glucuronic acid. In this talk, I will discuss our recent study on bacterial glycolipid synthases and their functions.

glycosyltransferase, *Pseudomonas aeruginosa*, *Zymomonas mobilis*

講演番号：3SYa6-2
講演日時、会場：3 月 27 日 09:55～ A14 会場

糸状菌と宿主の相互作用を明らかにするためのガラクトマンナン生合成研究

A study on galactomannan biosynthesis to elucidate the interaction between filamentous fungi and the host

○岡 拓二（崇城大生物生命）
○Takuji OKA (Sojo Univ.)

チャワンタケ亜門に属する糸状菌はガラクトマンナン (GM) と呼ばれる糖鎖を生合成する。GM は α-(1→2)-/ α-(1→6)-マンノース (Man) 残基と β-(1→5)-/ β-(1→6)-ガラクトフラノース (Gal*f*) 残基からなる糖鎖であり，真菌型 GM と O-Man 型 GM の 2 種類がある。これらの GM は菌糸表面に局在していることから糸状菌とその宿主との相互作用に関わっている可能性が示唆されている。私の研究グループでは, 肺アスペルギルス症の主要な原因となる真菌である *Aspergillus fumigatus* を主な研究対象として GM の生合成に関する研究を進めている。GM はゴルジ体で生合成されて細胞表層に運ばれる。これまでの研究により, GfsA, GfsB および GfsC が β-Gal*f* に対する β-(1→5)-Gal*f* 転移酵素であり, CmsA が α-Man に対する α-(1→2)-Man 転移酵素であること，MgfA が α-Man に対する β-Gal*f* 転移酵素であることを見出してきた。これら糖転移酵素遺伝子の破壊株では菌糸伸長速度の低下や分生子形成能の低下，細胞表層の親水性の低下などが引き起こされた。これらのことから GM が正常な細胞壁の形成に必要不可欠であることや抗真菌薬の標的となることが示されている。本シンポジウムでは，これらの糖転移酵素の酵素的な機能や糸状菌細胞壁形成における役割について紹介したい。

The mycelial surface of filamentous fungi belonging to the subphylum Pezizomycotina is covered with the polysaccharide galactomannan (GM). GM is a sugar chain comprising α-(1→2)-/α-(1→6)-mannosyl and β-(1→5)-/β-(1→6)-galactofuranosyl residues. There are two types of GM, fungal-type and O-mannose-type. These GMs are localized on the hyphal surface, suggesting their involvement in the interaction between filamentous fungi and the host. Our research group is studying the biosynthesis of GM in *Aspergillus fumigatus*, a fungus that is a major cause of pulmonary aspergillosis. GM is biosynthesized in the Golgi apparatus and is transported to the cell surface. Previously, we identified that in GM synthesis, GfsA, GfsB, and GfsC are β-galactofuranoside β-(1→5)-galactofuranosyltransferases, and CmsA an α-mannoside α-(1→2)-mannosyltransferase. Recently, we discovered the novel enzyme MgfA, which is an α-mannoside β-galactofuranosyltransferase. Hyphal growth rates, conidia formation ability, and hydrophilicity of the cell surface layer are reduced when there is a disruption in the gene involved in biosynthesis of GM. These indicate that GMs are essential components of normal cell wall formation and the biosynthetic enzymes of GM become potential drug targets. In this symposium, I would like to discuss the enzymatic functions of these glycosyltransferases and their roles in cell wall formation in filamentous fungi.

Aspergillus, glycosyltransferase, cell wall

講演番号：3SYa6-3
講演日時、会場：3 月 27 日 10:20～ A14 会場

Sensing infection by immune receptors for glycolipids

○Sho Yamasaki (Osaka Univ.)

Our bodies are continuously exposed to injurious insults by infection and tissue damage, most of which are primarily sensed by immune receptors to maintain tissue homeostasis. Although immune recognition of proteins or nucleic acids has been well characterized, the molecular mechanisms by which immune receptors discriminate glycolipids to elicit suitable immune responses have been elusive. Recent studies have demonstrated that C-type lectin (CLR) family functions as immune sensors for adjuvantic glycolipids derived from pathogens and damaged-tissues, thereby driving innate/acquired immunity. In this symposium, we will discuss how these receptors discriminate glycolipid components to shape appropriate immune responses against injurious stimuli.

C-type lectin receptors, glycolipids, innate immunity

講演番号：3SYa6-4
講演日時、会場：3 月 27 日 10:45～ A14 会場

１分子観察によるガングリオシド会合機構と EGF 受容体活性制御機構の解明

Unraveling of regulation mechanisms of ganglioside cluster formation and EGF receptor activation by single-molecule imaging

○鈴木 健一 (岐阜大生命鎖)
○Kenichi Suzuki (GIfu Univ.)

ラフトドメインは細胞形質膜上のシグナル伝達のプラットフォームと言われて久しいが、その構造や機能はまだ不明な部分が多い。その理由として、今までに天然物と同様に振舞う脂質プローブが存在しなかったことが挙げられる。我々は、岐阜大学の木曽研・安藤研との共同研究で、ラフト脂質の代表的分子であるガングリオシドの新しいプローブを開発することに成功した。

我々は、ガングリオシドプローブの１分子イメージングによってラフトの動的組織化を研究してきた。観察したすべてのガングリオシドは動いていて、糖―糖間相互作用によって一過性のホモダイマーを形成することを見出した。また、ガングリオシドホモダイマーがスフィンゴミエリンなどの他のラフト親和性分子をリクルートし、ラフト脂質相互作用で安定化されることを見出した。我々はこれを”ガングリオシドホモダイマーラフト”と呼んでいる。さらに高濃度下では、ガングリオシドホモダイマーはラフト脂質相互作用でさらに集まり、短寿命のホモオリゴマーラフトを形成した。

さらに、GM3 モノマーではなく、GM3 ホモダイマーラフトが EGF 受容体と相互作用し、EGF 受容体のダイマー化と活性化を抑制することを見出した。これらの結果は、一過性 GM3 ホモダイマーラフトは、ラフト組織化と機能のための最も基本的なユニットの一つであることを示唆している。

Raft domains have been drawing extensive attention as signaling platforms, but their structure and function are still enigmatic. This may be partially due to lack of lipid probes which behave like the parental molecules in rafts. Here, we developed new fluorescent probes of representative raft lipids, gangliosides in collaboration with Prof. Kiso and Prof. Ando groups.

We have investigated the dynamic organization of rafts by single-molecule imaging of the ganglioside probes. All of the observed ganglioside probes are mobile, and continually formed transient homodimers based on glycan-glycan interactions. We further found that ganglioside homodimers recruited other raft-associated molecules such as sphingomyelin, and were stabilized by raft-lipid interactions. Therefore, we call these entities “ganglioside homodimer rafts”. Under higher physiological expression conditions, the homodimers of gangliosides coalesced to form the homo-oligomer rafts by raft-lipid interactions with shorter lifetimes.

Furthermore, we found that GM3 homodimer rafts interacted with EGF receptors (EGFRs), which resulted in inhibition of the EGFR dimerization and activation, while GM3 monomers did not. The transient ganglioside homodimer rafts are likely one of the basic units for the organization and function of raft domains.

Rafts, Gangliosides, Single-molecule imaging

講演番号：3SYa6-5
講演日時、会場：3 月 27 日 11:10～ A14 会場

ヒトの糖質に作用するビフィズス菌酵素の生理機能

Physiological role of host glycan-degrading enzymes of *Bifidobacterium* in the guts

○片山 高嶺（京大生命）
○Takane Katayama (Kyoto Univ.)

我々のグループは今から 15 年ほど前に、1,2-α-L-フコシダーゼと endo-α-*N*-アセチルガラクトサミニダーゼというヒト由来の糖質に作用する酵素をビフィズス菌から単離した。それらのアミノ酸配列は機能未知とされていた一部の腸内細菌ゲノムに存在しており、そのことが腸内細菌とヒトとの共生を考えるきっかけとなった。それ以降、腸内細菌が有するユニークな酵素群の構造機能解析を続けてきている。本講演では、ビフィズス菌が有する特異的なグリコシダーゼやトランスポーターの機能解析を中心に、それらが腸管内でのビフィズス菌の生息において果たす役割について最新の成果を紹介する。

In early 2000s, we isolated the novel genes encoding 1,2-α-L-fucosidase and endo-α-*N*-acetylgalactosaminidase from *Bifidobacterium bifidum* and *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*, respectively. Database search revealed that homologs of these enzymes are present in a few gut microbial genomes. These findings prompted us to consider the host glycan-mediated symbiosis between gut microbes and host. Since then, we have conducted research on elucidating structure-function relationship of the enzymes responsible for host-derived glycan degradation in gut microbes, especially bifidobacteria. In this talk, I will briefly summarize the host glycan assimilation pathways that different *Bifidobacterium* species have, and then show how these pathways and the related enzymes contribute to efficient proliferation in the competitive gut ecosystem.

Bifidobacterium, host glycans, degradation

講演番号：3SYa6-6
講演日時、会場：3 月 27 日 11:35～ A14 会場

成人型ビフィズス菌の植物糖タンパク質からの糖獲得戦略

Strategy for carbohydrate acquisition from plant glycoproteins on adult-type Bifidobacteria

○藤田 清貴（鹿児島大農）
○Kiyotaka Fujita (Kagoshima Univ.)

ビフィズス菌は離乳後の食事の変化に伴い乳児型から *Bifidobacterium longum*, *B. adolescentis*, *B. pseudobatenulatum* 等で構成された成人型に移行することが知られている。特に、*B. longum* は植物細胞壁に含まれるアラビノガラクタン・プロテイン（AGP）の分解代謝能力を持っている。AGP は、II 型アラビノガラクタン(II型 AG)と β-アラビノオリゴ糖鎖(β-AOS)が短いペプチド鎖に付加された植物プロテオグリカンである。II型 AG は β-1,3-ガラクタン主鎖に β-1,6-ガラクタン側鎖が付加され、更に様々な糖で修飾された複合多糖であり、β-AOS は L-Arabinofuranose (Ara*f*)が β 結合で 3～4 分子付加されたオリゴ糖である。演者らは、*B. longum* が菌体表層に局在させた様々な分解酵素を用いて、AGP から効率的に二糖を切り出すことを明らかにした。GH30_5 exo-β-1,6-galactobiohydrolase はⅡ型 AG から Galβ1,6Gal を切り出し、GH121 β-L-arabinobiosidase は β-AOS から Ara*f*β1,2Ara を切り出し、3-*O*-α-D-galactosyl-α-L-arabinofuranosidase (GAfase) はアラビアガム由来のⅡ型 AG から Galα1,3Ara を切り出した。また、切り出された二糖は ABC 輸送体を経て菌体内に取り込まれ、菌体内酵素によって単糖にまで分解されることを明らかにした。なお、一連の遺伝子群はオペロンとしてパッケージ化されており、食物繊維の種類に対応して発現誘導されると考えられる。AGP は野菜や果物や穀物の可食部に含まれている水溶性食物繊維であり、アラビアガム AGP やカラマツ AGP は食品添加物としても利用されている。食事を通して日常的に摂取した AGP は、消化されることなく大腸に届き *B. longum* を選択的に増やすプレバイオティクス糖タンパク質として働くと考えられる。本講演では、*B. longum* が持つ AGP 分解代謝システム及び、二糖単位の切り出しから推測される成人型ビフィズス菌 *B. longum* の糖獲得戦略について紹介したい。

Arabinogalactan proteins (AGPs) are complex plant proteoglycans that function as dietary fiber utilized by human intestinal bacteria such as *Bifidobacterium longum*. AGPs are composed of hydroxyproline-linked type II arabinogalactan (AG) chains and β-arabino-oligosaccharides (β-AOS), and the AGP structures have variation among plant species and organs. Recently, we characterized AGP degradative enzymes in *B. longum*. Type II AG and β-AOS were degraded by several enzymes on the bifidobacterial cell surface, and released Galβ1,6Gal and Ara*f* β1,2Ara, respectively. Furthermore, Galα1,3Ara was released from gum arabic AGP by part of *B. longum* strains. In this presentation, I will describe the acquisition strategies of AGP in *B. longum*, as well as features of the AGP degradative enzymes.

Bifidobacteria, arabinogalactan-protein, glycoside hydrolase

講演番号：3SYa7-1
講演日時、会場：3 月 27 日 09:30～ A16 会場

リン脂質の化学合成を基盤とした生理機能解析の展開

Development of physiological function analysis based on chemical synthesis of phospholipids

○安部 真人 (愛媛大農)
○Masato ABE (Ehime Univ.)

【背景と目的】リン脂質は、種々の生体膜の機能に直結する重要な構成成分である。代表的なリン脂質分子には、天然から豊富に回収できる分子種も多い。こうした事情から、従来の全合成では強力な生理活性を有する微量化合物が主なターゲットであった。しかし、近年のリピドミクスをはじめとする脂質生化学分野の著しい発展から、生体膜を構成するリン脂質の分子種が多様であり、生理機能の違いもみられることがわかってきた。このため、脂質分子の詳細な働きを解明するためには、その微細な化学構造の相違を議論する必要がある。そこで講演者らは、分子設計の発展性を持った効率的な化学合成を確立し、幾つかの非天然型の分子を含む有用な分子を創出することを目的として研究を展開してきた。
【方法と結果】リン脂質の合成経路は、天然に倣ってジアシルグリセロールを経由するルートを選定した。任意のジアシルグリセロールを調製したうえで、ホスホロアミダイト法によるリン酸化によって所望のリン脂質へ誘導する方法を確立した。この方法に拠れば、リン脂質の脂肪酸部と極性頭部を互いに独立に設計することが可能となる。これまでにカルジオリピン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジルセリンの合成を達成した。また、本合成方法を活用して光反応性プローブの開発や、エーテル型人工脂質への構造展開を行った。本講演では特にカルジオリピン類の合成と構造活性相関を中心に紹介する。

Phospholipids are important constituents that are linked to the functions of various biological membranes. According to the remarkable development in the lipid biochemistry field including lipidomics, it has been found that the molecular species of phospholipids are so diverse and that physiological functions are also different. In order to elucidate the functions of lipid molecules, it is necessary to discuss the differences in their chemical structures. Therefore, the speaker has researched for efficient organic synthesis of phospholipids, and synthesized useful molecules including some non-natural molecules.

After preparing arbitrary diacylglycerols, phospholylation by the phosphoramidite method afforded desired phospholipids. According to this method, the fatty acid part and the polar head part of the phospholipid molecules can be designed independently. So far, the synthesis of cardiolipin, phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine has been achieved. We also developed photoreactive probes using this synthetic method and expanded the structure to ether type artificial lipids. In this presentation, we will focus on the synthesis and structure-activity relationship of cardiolipins.

Phospholipids, Structure Activity Relationships, Cardiolipin

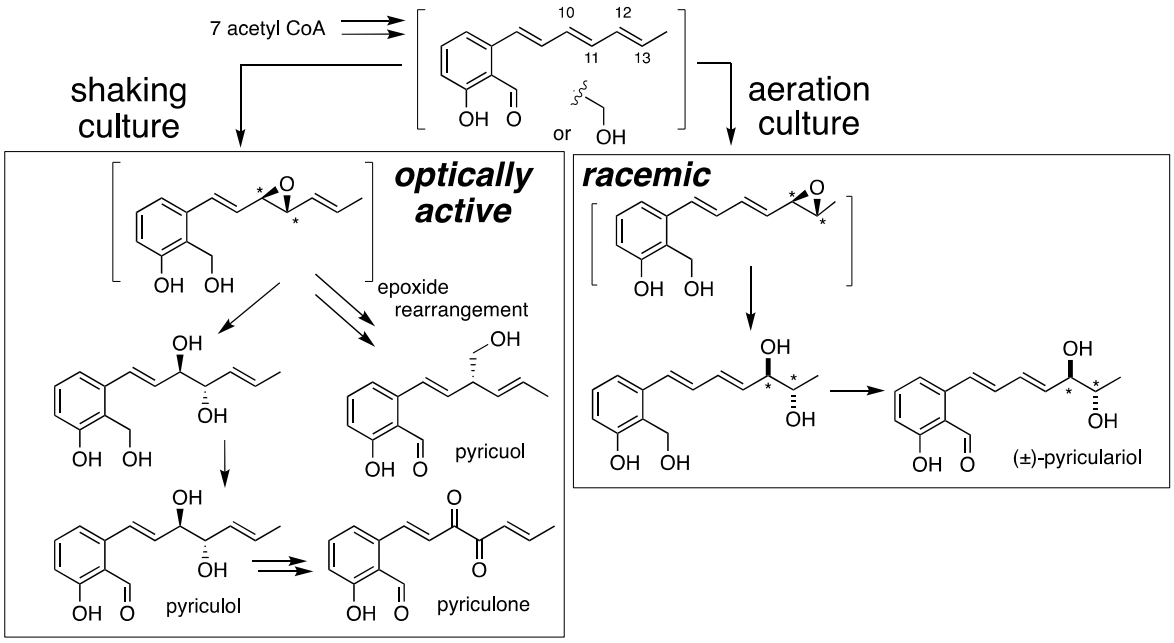
講演番号：3SYa7-2
講演日時、会場：3 月 27 日 09:55～ A16 会場

サリチルアルデヒド型イネいもち病菌毒素の合成化学的研究

Synthetic studies of salicylaldehyde-type phytotoxins isolated from rice blast fungus

○清田 洋正（岡山大院・環境生命）
○Hiromasa Kiyota (Okayama Univ.)

いもち病は古くからイネに深刻な被害をもたらしてきた病害の一つであり、原因となるいもち菌 *Pyricularia oryzae* はイネの葉に褐色病斑を誘導するサリチルアルデヒド型毒素を生産する。私はこれら毒素の合成研究を通じて、毒素の生合成経路や絶対立体配置を明らかにしてきた。いもち菌は、振盪培養条件ではピリキュロールやピリキュオール等の光学活性な毒素を生産する一方、通気攪拌培養の結果生じるピリキュラリオール等はラセミ体であることがわかった。また、病斑形成にはサリチルアルデヒド部分と側鎖アルコール部分の存在が必要であった。



Blast disease is one of the most serious pest for rice. Rice blast fungus, *Pyricularia oryzae*, produces a series of salicylaldehyde-type phytotoxins which cause a dark necrotic spot on a rice leaf . Using shaking incubator, optically active toxins such as pyriculol and pyricuol are produced, while racemic dihydropyriculariol followed by pyriculariol are formed under aerobic conditions. Both salicylaldehyde moiety and alcoholic side chain are important for the necrotic activity.

phytotoxins, total synthesis, biosynthesis

講演番号：3SYa7-3
講演日時、会場：3 月 27 日 10:20～ A16 会場

構造決定を指向した酸化型ステロイドの合成法の開発

Synthesis of oxygenated steroids aiming at structural determination

○中崎 敦夫、渡邉 正悟、松村 泰志、河合 真穂、橋本 圭古、池田 藍、西川 俊夫 (名大院生命農)
○ Atsuo NAKAZAKI, Shogo WATANABE, Taishi MATSUMURA, Maho KAWAI, Keiko HASHIMOTO, Ai IKEDA, Toshio NISHIKAWA (Nagoya Univ.)

高度に酸素官能基化されたステロイド（酸化型ステロイド）には、生体内での恒常性維持や生物間の化学コミュニケーションなどを司る分子が数多く存在する。このような酸化型ステロイドの機能を十分に理解するためには、その構造決定が重要な課題となる（Figure 1）。酸化型ステロイドの一つである内因性ジギタリス様物質（Endogenous Digitalis-Like Factor: EDLF）は、ヒトを含むほ乳類から発見された強心ステロイド群である。その多くは極微量しか得られないため、MS、UV、生物活性を元に構造が推定されているだけで、その構造が決定されたものはほとんどない。我々は、EDLF の構造解明を目的として、ステロイドの各環に酸素官能基を自在に導入できる共通中間体を開発し提唱化合物の合成を検討している [1,2]。本シンポジウムでは、それらの詳細について紹介する。

Structural determination of endogenous digitalis-like factor (EDLF) is an important issue for revealing their biological functions. Aiming at structural determination of those EDLF such as Inagami-Tamura EDLF and 19-norbufalin as shown in Figure 1, we have developed common intermediates for a wide variety of highly oxygenated steroids.[1,2] In this symposium, details of the synthetic studies on the proposed compounds of EDLF candidates will be disclosed.

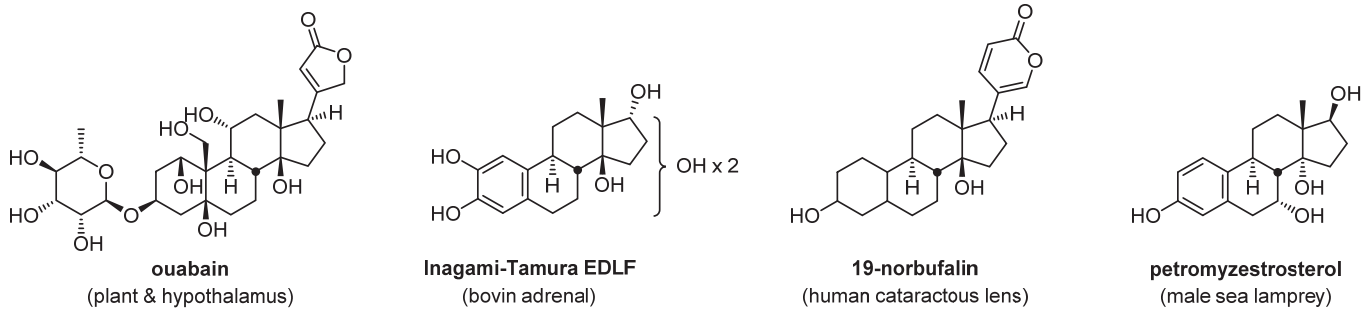


Figure 1. Structures of highly oxygenated steroids and their origins.

References

1. Nakazaki, A.; Hashimoto, K.; Ikeda, A.; Shibata, T.; Nishikawa, T. *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 9097.
2. Watanabe, S.; Nishikawa, T.; Nakazaki, A. *Org. Lett.* **2019**, *21*, 7410.

structural determination, steroids, synthesis

講演番号：3SYa7-4
講演日時、会場：3 月 27 日 10:45～ A16 会場

有機合成から生命科学へのアプローチ
Application of Organic Synthesis to Biological Science

○倉持 幸司（東理大理工）
○Kouji Kuramochi (Tokyo Univ. Sci.)

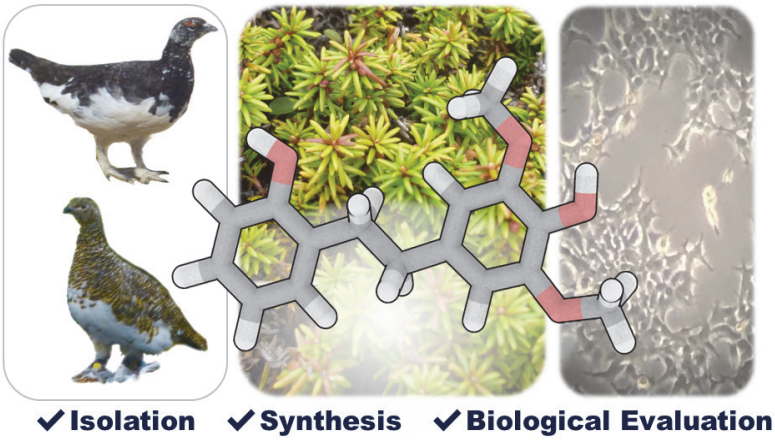
本講演では農芸化学における有機合成の役割の一例として、ニホンライチョウの保全研究に関する研究を紹介する。

特別天然記念物のニホンライチョウは絶滅危惧ＩＢ類（環境省第 4 次レッドリスト）に指定されている。生息域外保全として、これまで動物園などで飼育した個体を野生に放つ取り組みが行われてきたが、成功例は皆無である。その一因が餌の問題である。野生のニホンライチョウは高山植物を常食にしているのに対し、飼育のニホンライチョウは動物性の餌で育てられている。つまり、動物性の餌で育てたニホンライチョウを野に放ったとしても､植物に含まれる栄養素を効率的に代謝･吸収できなかったり、毒性成分を分解できずに、野外で生き残ることができない。

我々はニホンライチョウが餌とする高山植物に含まれる二次代謝産物を解析し、それら代謝産物の活性・機能などの物性を評価することを計画した。本研究では代謝産物の生物活性、腸内分解、代謝、人工飼料への添加などを詳しく精査するため、有機合成により物量を確保することとした。

本発表では、野生ガンコウランに含まれるビベンジルの単離・構造決定、化学合成、生物活性評価に関する研究を紹介する。

Japanese rock ptarmigans frequently eat the leaves and fruits of *Empetrum nigrum* var. *japonicum*. Our group isolated, characterized, and synthesized a bibenzyl derived from this plant. This compound displayed cytotoxic activity against human cancer cells (HCT116 and Hela cells) and leukemia cells (HL-60 cells). The present study suggests that this plant serves as a source of biologically active natural products. Also, our findings provide information on the secondary metabolites in the diet of Japanese rock ptarmigans.



【図】ガンコウラン由来のビベンジルの単離・合成・生物活性.
(引用：*Biosci. Biotech Biochem.* **2020**, *84*, in press. Doi: 10.1080/09168451.2019.1662279)

ptarmigan, bibenzyl, synthesis

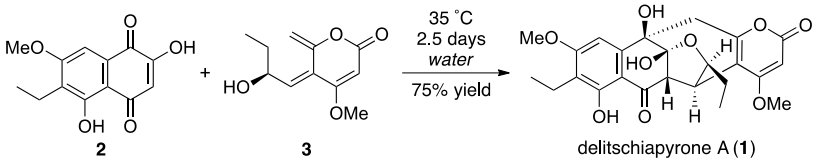
講演番号：3SYa7-5
講演日時、会場：3 月 27 日 11:10～ A16 会場

推定生合成機構を模倣した天然物合成

Bioinspired synthesis of bioactive natural products

○榎本 賢[1]、倉沢 一輝[1]、高橋 和暉[1]、權 垠相[2]、桑原 重文[1] ([1]東北大院農、[2]東北大院理)
○ Masaru Enomoto[1], Kazuki Kurasawa[1], Kazuki Takahashi[1], Eunsang Kwon[2], Shigefumi Kuwahara[1] ([1]Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, [2]Graduate School of Science, Tohoku University)

生合成模倣合成は，複雑な構造を簡便に合成できる可能性があるだけでなく，生産生物が不明な場合や遺伝子情報の入手が困難な場合，生合成に関する具体的な知見を得る数少ない手段となり得る。



Delitschiapyrone A (**1**)は米国南西部において落葉に付着した真菌から単離・構造決定された細胞毒性を示す化合物である。我々は推定生合成中間体 **2** と **3** を調製し，これらの混合物に水を添加して 35 ℃で反応させた。その結果，Diels–Alder 反応，α-ケトール転位およびヘミアセタール形成がカスケードで進行し，**1** が高収率（75%）で得られることを見出した。これにより，最長直線経路 7 工程，通算収率 32%で **1** の初の全合成を達成した。水以外の添加剤を必要とせず温和な温度条件で化学的に提唱生合成経路が進行したことから，我々は自然界においても一連の反応が非酵素条件で進行することにより **1** が生成していると考察している。

本講演では，上記の研究とともに，我々の研究室で現在取り組んでいる agelamadin C, D および E の推定生合成機構を模倣した合成研究についても紹介したい。

Bioinspired synthesis of natural products is a valuable method to obtain information regarding the actual biosynthesis procedure when the biosynthetic origin or gene of the target compound is unavailable.

Delitschiapyrone A (**1**) is a cytotoxic pyrone–naphthalenone adduct isolated from the culture broth of a leaf-associated fungus. The first total synthesis of **1** from a commercially available benzoic acid derivative was achieved in an excellent overall yield of 32% through only 7 steps according to the proposed biosynthetic pathway. A notable feature of the synthesis is a diastereoselective reaction cascade consisting of the Diels–Alder reaction, α-ketol rearrangement, and cyclic hemiacetalization, induced by stirring a heterogeneous mixture of two Diels–Alder substrates (putative biosynthetic intermediates, **2** and **3**) and water at 35 °C, directly furnishing **1** in 75% yield. The Diels–Alder-initiated reaction cascade proceeded in a surprisingly efficient manner at 35 °C (nearly ambient temperature), suggesting that the final stage of the biosynthesis of **1** may occur nonenzymatically in nature.

Synthetic study of dimeric natural products, agelamadins C–E, will also be presented in this symposium.

bioinspired synthesis, delitschiapyrone, agelamadin

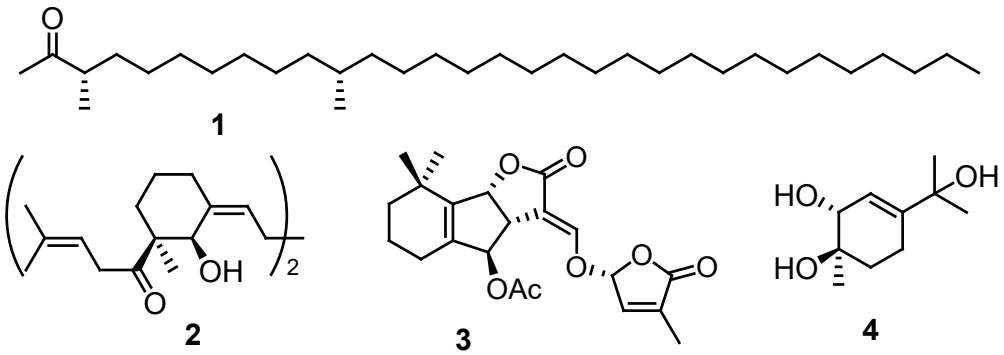
講演番号：3SYa7-6
講演日時、会場：3 月 27 日 11:35～ A16 会場

合成して初めてわかること。事実は小説より奇なり？
Startling facts revealed by “Synthesis” -Truth is stranger than fiction. -

○滝川 浩郷（東大院農生科）
○Hirosato Takikawa (The Univ. of Tokyo)

生物活性天然有機化合物を化学合成する意味・意義や農芸化学という学問領域における有機合成化学の存在意義は、多くの先人達によって語られてきた。これらを改めて語るつもりはないが、特定の分子を正確かつ純粋に化学合成することによって初めて明らかになったと言える予期せぬ結末は数多存在する。我々が巡り合った「事実は小説より奇なり」と言えるような事例を、合成によって真実が明らかになっていった経緯を中心に紹介させていただく。

・チャバネゴキブリの性フェロモン (1)
・カサガイの一種が生産する防御物質リマツロン (2)
・天然ストリゴラクトン アレクトロール (3)
・タイワンハッカ由来のモノテルペンアルコール (4)



1 2 3 4

During our synthetic studies on biologically active natural products, we have encountered unpredictable results on occasion. Some startling facts regarding the following natural products will be discussed.

• The sex pheromone of the German cockroach (1)
• Limatulone, the defensive metabolite of *Achmeia limatula* (2)
• Alectrol, a natural strigolactone (3)
• The monoterpene alcohol isolated from *Mentha haplocalyx* (4)

natural products, synthesis, biologically active

講演番号：3SYp1-1
講演日時、会場：3 月 27 日 14:03～ A19 会場

アーキア機能未知遺伝子の機能解明

Elucidating the function of hypothetical genes in Archaea

○跡見 晴幸、佐藤 喬章、金井 保（京大工）
○Haruyuki Atomi, Takaaki Sato, Tamotsu Kanai (Kyoto Univ)

近年の塩基配列解析技術の発展により、微生物ゲノムの全塩基配列が容易に決定できる時代となり、得られたアミノ酸配列の相同性検索から全遺伝子の機能推定を機械的に進めることが可能である。しかしながら一般に微生物では、配列相同性により機能推定が可能な遺伝子数はゲノム上の全遺伝子の約半数に過ぎず、その結果として、データベース上には膨大な数の機能未知遺伝子が存在する。これらの中には既存の生命機能に寄与する遺伝子も一部は存在するであろうが、その数の膨大さは、我々が未だ認識できていない微生物機能がまだまだ存在することを示唆している。

我々は超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* を対象に研究を進めているが、本菌においてもゲノム解析当初、全推定遺伝子 2,306 個のうち、機能推定できたのは約半数（1,165 個）であった。これまでの研究では、ゲノム情報からは不完全に見える代謝経路に注目し、これらの経路内の missing gene や missing pathway の探索を進めることで、機能未知遺伝子の機能を解明してきた。最近、我々は新たなアプローチとして、*T. kodakarensis* を従来の培養条件とは大きく異なる条件で培養し、増殖の有無や transcriptome の変動を検討している。これらの培養条件で機能未知遺伝子の発現量がどのように変動するのかに関する情報を収集することで、それらの機能同定における大きな手がかりを得ることができると期待している。

Recent improvements in sequencing technology now enable us to determine entire microbial genome sequences at a rapid pace, and the functions of individual genes can be estimated based on amino acid sequence similarity. In most cases however, the number of genes whose functions can be predicted amounts to only half of the total number of genes on the genome, resulting in an enormous accumulation of hypothetical genes/proteins in the databases. Such a large number of hypothetical proteins suggests that microorganisms harbor biological functions that we are still unaware of. The hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*, harbors an estimated 2,306 genes on its genome, and the functions of only 1,165 genes can be predicted based on primary structure. As a means to elucidate the function of genes with unknown function, we have focused on identifying missing genes in metabolic pathways that seem to be absent or incomplete judging from genome annotation. Here we examine the possibilities of other approaches that would provide clues to identify gene function in Archaea.

Archaea, Genome, Gene function

講演番号：3SYp1-2
講演日時、会場：3 月 27 日 14:31～ A19 会場

腸内マイクロバイオームの代謝制御による生理活性物質産生を目指したアプローチ

Upregulation of bioactive metabolite production by controlling gut microbiome metabolism

○松本 光晴（協同乳業）
○Mitsuharu Matsumoto (Kyodo Milk Industry Co. Ltd.)

腸内マイクロバイオーム由来の低分子代謝産物の中には、腸管組織や血中に移行し、宿主の健康維持に多大な影響を与える化合物が存在する。これらの有用化合物を腸管腔内で安定的に産生し生体に供給する技術の構築は、予防医学の観点から重要で、そのためには腸内マイクロバイオームの複雑代謝系を解明し制御する必要がある。ポリアミン、特にスペルミジンは、核酸保護作用やオートファジー促進作用等を有する細胞健全性の維持に不可欠の生理活性物質で、近年、複数のモデル生物で経口投与による寿命伸長効果、認知機能維持、心血管疾患予防などが報告されている。我々は、スペルミジンの前駆体でヒト腸内において最も高濃度のプトレッシンに着目し、*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* LKM512 とアルギニンの併用経口投与が、腸内マイクロバイオームのプトレッシン産生を個体差を超えて誘導することを見出し、ヒト試験で糞便プトレッシンおよび血清中スペルミジン濃度を高め血管内皮機能改善効果を得ることに成功した。さらに、この産生機序として、3 つのタイプの腸内細菌の独立した代謝経路（酸生成、耐酸性機構、エネルギー産生機構）から構成される「腸内ハイブリッド・プトレッシン生合成機構」を遺伝子レベルで解明した。本シンポジウムでは、この生合成機構を発見するまでのメタボロミクス等を駆使したユニークなアプローチ法も紹介する。

Low-molecular weight metabolites produced by intestinal microbiome are constantly absorbed from the intestinal lumen and transported to intestinal epithelial cells and blood and are associated with health and diseases. Putrescine, a precursor of bioactive spermidine, promotes nucleic acid protection and autophagy and is a metabolite produced by the intestinal microbiome. We developed a novel strategy in which the simultaneous intake of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* LKM512 and arginine upregulated putrescine production in the gut by controlling bacterial metabolism beyond its vast diversity and inter-individual differences. Furthermore, we identified a novel pathway for putrescine production from arginine via an agmatine intermediate involving the independent metabolic systems of three types of bacteria (the “hybrid putrescine biosynthesis system”) in the gut. This pathway comprises independent strategies in the individual contributing bacteria and involves commensal bacteria possessing the arginine-dependent acid resistance system, commensal bacteria possessing the agmatine deiminase-associated energy production system, and acid-producing bacteria, including probiotics.

intestinal microbiome, polyamine, probiotics

講演番号：3SYp1-3
講演日時、会場：3 月 27 日 14:59～ A19 会場

Understanding the function of human indigenous microbiota
○Shinji Fukuda[1,2,3,4] ([1]Inst. Adv. Biosci., Keio Univ., [2]KISTEC-KAST, [3]TMRC, Univ. Tsukuba, [4]Metabologenomics, Inc.)

The human indigenous microbiota form a highly complex ecological community together with host cells. The host-microbial ecosystem has a profound influence on human physiology, immunology, and nutrition. It has been reported that imbalance in the structure of host-microbial ecosystem could be a risk factor in human disorders including not merely gut-associated disorders, but also systemic diseases. However, the molecular mechanisms of the host-microbial crosstalk remain obscure. To tackle this issue, we firstly established a highly integrated omics-based approach, metabologenomics, and applied to the human skin, gut and oral microbiota. We found that the 16S rRNA genotype composition of *Cutibacterium acnes*, the most common and abundant bacterium on human skin, is individual specific and remained more stable over time as compared with the skin microbiome profile. Owner identification accuracy of around 90% based on random forest machine learning was achieved by using a combination of *C. acnes* 16S rRNA genotype and skin microbiome profile data. In a large cohort study of colorectal cancer patients together with fecal metabologenomic analysis, we found that the fecal metabologenomic profiles shift from precursor polyps to colorectal carcinoma, and specifically detected oral microbes from the stool samples of colorectal cancer patients. In conjunction with this, we developed a new protocol for fast and easy collection of oral microbiota using mouse-rinsed water. Taken together, information gathering of human indigenous microbiota is necessary to understand a human being as a human-microbiota superorganism.

microbiota, metagenome, metabolome

講演番号：3SYp1-4
講演日時、会場：3 月 27 日 15:27～ A19 会場

集団微生物学のすすめ
An Encouragement of Biofilm

○野村 暢彦[1,2]、豊福 雅典[1,2]、八幡 穣[1,2]、尾花 望[2,3] ([1]筑波大生命環境、[2]筑波大微生物サステイナビリティ研究センター、[3]筑波大トランスボーダー医学研究センター)
○ Nobuhiko Nomura[1,2], Masanori Toyofuku[1,2], Yutaka Yawata[1,2], Nozomu Obana[2,3] ([1]Univ. Tsukuba, [2]MiCS, [3]TMRC)

単細胞生物である微生物も、ほとんどが集団（バイオフィルム(BF)）で存在し、さらに、細胞外にシグナル（言語）を分泌し、細胞間で会話することが明らかになってきた。近年、我々は細菌がメンブレンベシクル（MV）と呼ばれる細胞外膜粒子(20～400 nm)が、一部の細胞が死にながら産生されることを発見した(1)。興味深いのは、その MV には核酸（DNA, RNA)・タンパク質さらに細菌シグナル（言語）などが含まれ、様々な物質の輸送体として機能しているところである。それは、これまでのクォーラムセンシングなどの細菌シグナルが細胞外に放たれ自由拡散による細胞間コミュニケーションとは別に、MV にシグナルが含まれることで遠くまであるいは特異的な細胞間コミュニケーションを細菌は有しているという全く新たな微生物間コミュニケーションの概念を提唱したことで注目されている(2)。興味深いことに、単一の微生物から形成さたバイオフィルムですら、様々な多様性（自然突然変異株）を持つ細胞が出現することもわかってきた。バイオフィルムになることで、環境ストレスに対応するだけでなく、内部の細胞の多様性・不均一性を発現しているようである。そこで我々グループは、微生物の集団の細胞をこわさず生きたまま理解するための新規細胞評価技術―CRIF 法（Confocal Reflection microscopy-assisted single-cell Innate Fluorescence）―を開発したのであわせて報告させていただく(3)。

Biofilms are constructed by bacterial cells and matrix including, EPS, proteins, DNA, and membrane vesicles (MV). In biofilms, microorganisms can talk to each other by using bacterial signals. MVs include DNA, RNA, proteins, and bacterial signals, indicating that MVs are like communication balls in a biofilm. Recently, we reported that the Holin endolysin (HL) system is a universal mechanism for MV induction among bacteria (1). As the HL (induced cell lysis) is genetically programmed, we consider that this is a bacterial programmed cell death. In biofilms, there are interactions such as cell-cell communication and heterogeneity. Further clarifying such mechanisms will lead to a greater understanding of bacterial biofilms and how they may be controlled in their unique environments.

1) Toyofuku M., Nomura N., Eberl, L. (2019) **Nature Reviews Microbiology** 17.
2) Toyofuku, M., *et al.* (2017) **The ISME J** 11.
3) Yawata Y., *et al*., (2019) **Appl. Environ. Microbiol.** 85.

Biofilm, Cell-cell communication, MV

講演番号：3SYp1-5
講演日時、会場：3 月 27 日 15:55～ A19 会場

境界条件における生命活動の戦略と駆動原理

Physical and chemical principal and strategy of fringe biosphere

○高井 研 (海洋研究開発機構超先鋭)
○Ken Takai (JAMSTEC)

深海や地下深部といった太陽光の届かない地球の暗黒環境における生命圏にはゲノム情報以外何ら知見のない未知の微生物が 99%以上を占め、光合成によって駆動される光の生命圏と大きく異なる環境条件に適応した独特の機能を有していることが分かってきた。このような暗黒の生態系における未知の微生物や生理機能は、宇宙におけるダークマターやダークエネルギーになぞらえて、ダークマター生命やダークエネルギー代謝と呼ばれる。また、地球の暗黒環境には、温度、圧力、空間スペースおよび化学環境といった様々な生命活動を制限しうる因子が存在し、現実として生命（圏）の限界が存在する。これら暗黒の限界的生態系における生命活動の多様性や境界条件について、ようやく理論・実験・現場観察の 3 つの立場から迫ることが可能になりつつある。本講演では、暗黒の限界的生態系の生命活動の多様性や駆動原理について紹介するとともに、今後の課題についても考察する。

A broad range of physical and chemical constraints for limits of life, such as temperature, pressure, pH, salinity, physical space, water content and availability of energy and nutrients, have been explored in deep and dark environments of the Earth that potentially host certain boundaries between the habitable and the uninhabitable terrains. In addition, it has become evident that the deep and dark world host a great diversity of microorganisms of which natures remain to be highly unknown other than the potential genome sequences. In this presentation, the presently known limits of life are described, and the possible environments and their physical and chemical characteristics that could signify the limits of life and biosphere on the Earth are introduced. Although the nature and distribution of fringe biospheres that face the boundaries are highly unknown, numerous geomicrobiological explorations have demonstrated the limits of biosphere realistically occur in the subsurface environments and are controlled by certain boundary conditions. Energetic aspects of boundary conditions are quite important and are discussed based on the theoretical estimations and field observations of such fringe biospheres.

Limits of life and biosphere, dark ecosystem, energetics

講演番号：3SYp2-1
講演日時、会場：3 月 27 日 14:10～ A20 会場

安定な実験系構築を可能にする高性能な iPS 細胞増殖用無血清培地の創出

Development of high-performance serum-free medium for iPS cells that enables stable experimental system construction

○原田 英里 (味の素株式会社　バイオ・ファイン研究所)
○Eri HARADA (Ajinomoto Co., Inc.)

ヒト人工多能性幹細胞（iPSC）は、再生医療における細胞リソースとして期待されるとともに、希少疾患の病態・創薬研究、さらには食品・化粧品分野の基礎研究などへとその応用の幅を広げつつある。我々は基礎研究用途に供するため、iPSC 未分化維持・増殖無血清培地 StemFit® AK02N を創出した。従来の iPSC 培養法においては、フィーダー細胞と呼ばれる共培養細胞を必要とし、さらには連日の培地交換が必要であった。一方、本培地を用いた培養系ではフィーダー細胞を使用することなく、また土日の培地交換も省略するスケジュールを組むことが可能となった。これにより、iPSC の維持培養のコストと労力を低減させつつ、安定な培養が可能となった。また、遺伝子的に安定な状態を保ったまま長期間継代が可能であるため、再現性の高い実験系を構築することができる。さらに本培地は、超低密度かつシングルセル播種時において高い細胞生存性能を示すことから、遺伝子導入・編集後の細胞クローニング操作においても、非常に有用である。一方、最近開発された StemFit® AS400 は、無血清培養下での三胚葉分化を可能にする分化基本サプリメントであり、こちらも安定した実験系構築に有用である。本講演では、これらの培地・サプリメントの特長や実験応用例をご紹介したい。

Human induced pluripotent stem cell (iPSC) is not only a promising cell source for regenerative medicine but also an effective tool for basic research in the field of pathology, pharmacology, and food / cosmetic sciences. We have developed a serum-free medium, StemFit® AK02N, for maintenance or expansion of iPSC in basic research. Conventionally, iPSC culture has needed co-culture cell called feeder cell as well as medium changes every day. The culture system using StemFit®, on the other hand, enables feeder-free maintenance of iPSC without medium change on weekends, which makes possible to stabilize the culture while reducing cost and labor. Moreover, StemFit® can keep genetic stability of iPSC over the long-term period, enabling simple establishment of experimental systems with high reproducibility. Furthermore, the medium shows high efficiency in cell cloning after transfection or gene editing since it supports high viability of single dispersed cells seeded at ultra-low density. The recently-developed StemFit® AS400 is a basic supplement in order to formulate the serum-free medium for differentiation into three germ layers, and is also useful for designing stable experimental systems. Here, I will introduce the features and applications of these medium and supplement.

iPS cells, animal-origin free, expansion medium

講演番号：3SYp2-2
講演日時、会場：3 月 27 日 14:35～ A20 会場

ヒト臓器オルガノイドを活用した次世代食品科学研究

Food science using physiologically-relevant human organoids

○高橋 裕、佐藤 隆一郎（東大農）
○Yu Takahashi, Ryuichiro Sato (Univ. Tokyo)

オルガノイドは臓器特異的な幹細胞およびその幹細胞から分化した細胞から成る三次元構造体であり，*in vitro* で培養可能なミニ臓器として知られている。オルガノイドはその生理機能の高さから，特に再生医療や発生学の分野で盛んに研究が行われているが，癌など一部の領域を除いて基礎研究での活用は十分に行われているとは言い難い状況である。その原因として，オルガノイドの扱いは通常の細胞株に比べて煩雑であり，さらに培養・維持には高額なサイトカインを必要とすることが挙げられる。

我々はこれまでに，ヒト iPS 細胞から高効率で腸管オルガノイドを分化させる方法やオルガノイド培養のコストを大幅に削減する方法，簡便で高効率に遺伝子を導入する方法といった，ヒト腸オルガノイドの扱いを容易にするための様々な検討を実施してきた。これらの検討結果は，今後，新規食品成分の生理活性評価やスクリーニングを行う目的でオルガノイドを活用し，機能性食品のヒトでの有効性を検証，担保する上で，大いに役立つものと考えられる。今回のシンポジウムではこれらの取り組みに加え，ヒト腸オルガノイドを活用した，我々の最新の研究成果についても紹介する。

Organoids are known as self-organizing cell clumps which are composed of tissue-specific stem cells and their differentiated cells in three-dimensional cultures. So far, we have developed methods to facilitate development and expansion of human intestinal organoids, including efficient differentiation from iPS cells, production of proliferation medium at low cost, and efficient gene transduction via two-dimensional cultures. We believe these techniques will be a great help to physiologically evaluate the effectiveness of food components and/or nutrients in the intestine, and therefore predict their actions in humans. In this symposium, we would like to introduce our recent studies using human intestinal organoids.

intestinal organoid, human biology, physiologically-relevant model

講演番号：3SYp2-3
講演日時、会場：3 月 27 日 15:00～ A20 会場

ヒト iPS 細胞を活用した食品機能性研究の基盤構築

Toward application of human iPS cells to functional food research

○山内 祥生（東京大院農）
○Yoshio Yamauchi (Univ. Tokyo)

食品機能性研究を発展させていく上で、ヒト細胞を用いた機能性評価並びに機能発現メカニズム解析が重要であるが、がん細胞以外のヒト細胞を利用することは難しいのが現状である。様々な細胞へ分化する能力を有する iPS 細胞は、疾患発症メカニズム解析や創薬研究、治療応用研究などに利用されており、その有用性は広く認識されている。超高齢社会に突入した我が国において、加齢性筋萎縮症（サルコペニア）を予防し、高齢者の身体機能を維持することは、健康寿命を延伸する上で極めて重要な課題である。また、骨格筋は運動機能だけでなく、糖代謝などの代謝においても重要な役割を果たしているおり、筋量維持は代謝疾患の予防などにも寄与する。したがって、ヒトにおける骨格筋維持の分子メカニズムの理解や筋量維持に寄与する食品成分の同定は社会的意義も高い。骨格筋に対する食品成分の機能性などに関する研究は、主にマウス由来筋芽細胞やげっ歯類動物が頻用されている。また、食品業界においては動物実験が困難な状況となってきている。最近、我々はヒト骨格筋細胞に効能を有する食品成分を探索し、その機能発現メカニズムを解析することを目指し、京都大学 CiRA で開発されたヒト iPS 細胞から骨格筋細胞への分化誘導技術を導入し、ヒト骨格筋細胞モデルとして利用している。本シンポジウムでは、このヒト iPS 細胞由来骨格筋細胞を用いた我々の研究について紹介し、食品機能性研究へのヒト iPS 細胞の応用について議論する話題としたい。

For studying food functions for human, it is crucial to evaluate their function in non-cancerous human cells. iPS cells (iPSCs) have the ability to differentiate into various cell types. They are utilized for human disease modeling, drug discoveries, and cell therapies. It is therefore plausible that human iPSCs serve as an excellent model to investigate food functions in human cells. To better understand mechanisms of muscle atrophy such as sarcopenia and to search for food factors beneficial for muscle integrity, we have attempted to utilize a human iPSC-based myogenic differentiation system developed in CiRA, Kyoto University, as a model of human myocytes. This system enables human iPSCs to efficiently differentiate into myocytes. In this symposium, I will present our up-to-date results for discussing application of human iPSCs to functional food research.

iPS cells, skeletal muscle, metabolism

講演番号：3SYp2-4
講演日時、会場：3 月 27 日 15:25～ A20 会場

遺伝学的手法で紐解く栄養応答的な個体発育の仕組み

Drosophila as a genetic model for studying the mechanism of nutrient-dependent growth and maturation

○大原 裕也 (静県大)
○Yuya OHHARA (Univ. of Shizuoka)

ヒトを含めた従属栄養動物は、幼若期において身体サイズを増加させた後、生殖能力を有する大人へと成熟する。幼若個体は外界から摂取した栄養を基に成長し、しかるべきサイズにまで到達すると幼若期から成体期への成熟過程を開始させる。では、生物はいつ、どのような栄養状態に到達すると子供から大人への成熟プログラムを開始するのであろうか？演者らは、この謎に迫るべく、ショウジョウバエをモデルとして遺伝学的および栄養学的な研究を進めている。演者はこれまでに、昆虫の成熟過程・即ち変態過程を惹起するステロイドホルモンであるエクジソンの産生が活性化するには、進化的に保存された栄養応答キナーゼである Target of rapamycin (TOR) の働きが必須であることを見出しており、本発表では TOR の上流・下流を司る分子機構についての研究成果を発表する。さらに近年、演者らは昆虫における発育制御機構に関する研究を基盤として、昆虫を原材料とした養殖魚用の魚粉代替飼料の開発に取り組み始めたので、これについても今後の戦略などを中心に紹介する。

Animals including human are heterotrophic and need to obtain nutrients from the surrounding environment to develop from juvenile to adult stage. Since systemic growth and maturation are coordinated by the endocrine system, understanding how nutrient status affects hormonal signaling pathways in developing animals is key step to reveal underlying mechanisms responsible for juvenile-to-adult transition in animals. We are using fruit fly, *Drosophila melanogaster*, as a model organism to study the endocrine system and nutrient-dependent signaling pathways regulating the onset of metamorphosis. We previously demonstrated that nutrient-responding kinase target of rapamycin (TOR) is essential for biosynthesis of ecdysone, insect steroid hormone required for metamorphosis. Here we show the preliminary data and discuss the possible upstream and downstream factors of TOR, as well as the physiological significance of the regulatory mechanisms. Furthermore, recently we have launched the research project to develop insect-based fishmeal as an alternative protein source for aquaculture. Here we introduce the current research project to test the effect of “Fly meal” in zebrafish development.

Drosophila, Genetics, Nutrient

講演番号：3SYp2-5
講演日時、会場：3 月 27 日 15:50～ A20 会場

非モデル生物(昆虫)を用いた代謝、内分泌、栄養学研究への応用の可能性

Non-model organisms (insects) for understanding of metabolisms and endocrine control

○永田 晋治（東大院新領域）
○Shinji Nagata (GSFS, Univ of Tokyo)

次世代シーケンサーをはじめ様々な解析ツールにより、非モデル生物を用いた研究が簡便になりつつある。この現状は、個々の研究者が、研究対象として都合が良く、かつ便利な生物種を見出して、その生物種を用いて研究するようなアプローチができる時代となった。

本講演では、非モデル昆虫種であるフタホシコオロギ *Gryllus bimaculatus* を使って、研究ツールとしての確立した経緯などをはじめ、最近の私たちの研究成果を紹介する。特に、摂食行動が代謝系や内分泌系で制御されていることを見出したので、それを紹介する。また、今後、非モデル生物種を実験対象とするためには何を重点的に開発すれば良いか、さらには非モデル生物がどのように利用できるか、などについて議論したい。

Next generation sequencer and other available techniques and tools allow us to investigate some issues according to researchers' interests. In this talk, I will introduce how we conducted the non-model insect species, the two-spotted cricket *Gryllus bimaculatus*. I also show our recent findings that communication between peripheral metabolisms and endocrine controls modulate nutrition-selective behavior using this species. I would like to discuss how we can use non-model organisms for life sciences.

Non-model organism, Insect, Endocrine control

講演番号：3SYp3-1
講演日時、会場：3 月 27 日 14:05～ A21 会場

発酵食品や腸管に由来する細菌の細胞外小胞の特性

Characteristics of extracellular vesicles produced by intestinal bacteria and fermented food-derived bacteria

○倉田 淳志（近畿大農）
○Atsushi Kurata (Kindai Univ.)

微生物は、ナノサイズの細胞外膜小胞（Extracellular Vesicles; EVs、粒径 50～100 nm）を生産する。EVs にはタンパク質や核酸、代謝中間体、細胞壁成分が含まれ、これらの構成成分は EVs によってシグナルとして周辺の細胞へ伝達される。一方、動物の腸管や発酵食品では特徴的な微生物が多様な代謝産物を生産しており、これらの代謝産物が我々の健康維持や増進に関与していることは経験的に明らかである。ところが発酵食品や腸管内容物を対象とした EVs の検出はほとんど検討されておらず、発酵食品や腸内の微生物の EVs による宿主への影響は不明な点が多い。そのため現在、発酵食品や腸内の微生物に由来する EVs や、EVs に含まれるシグナル分子は、生体機能の制御因子として活用されていない。そのような中、我々は独自に発酵食品や腸内の微生物から EVs を見いだし、EVs の特徴と機能の一端を明らかにしつつある。本講演では、乳酸菌などの腸内細菌が生産する EVs の特性や構成成分、EVs によって惹起される細胞応答について得られた知見を紹介する。

Generally, most bacteria release extracellular vesicles (EVs) with the size ranging from 50 to 500 nm. These EVs contain specific proteins, DNA, or RNA from the bacteria. The human gastrointestinal tract and fermented foods harbour the complex and dynamic populations of microorganisms. It has been assumed that the EVs released by intestinal bacteria and fermented food-derived bacteria play critical roles in the host-bacteria interactions. Thus, the first objective of this study is to explore EVs-producing bacteria using intestines and fermented foods as isolation sources. The second objective is to analyze components of EVs from bacteria and physiological functions of EVs toward host organisms.

Extracellular vesicles, Intestinal bacteria, Fermented foods

講演番号：3SYp3-2
講演日時、会場：3 月 27 日 14:29～ A21 会場

大腸菌とマクロファージの細胞外小胞による異種細胞間相互作用と炎症機構

The extracellular vesicles from E. coli and macrophages mediate the inflammatory responses

○岡 真優子（京都府大院生命環境）
○MAYUKO OKA (Kyoto Pref. Univ.)

多くの生物が産生する様々な細胞外小胞は生体防御やシグナル伝達に利用されることが知られている。ほ乳動物の細胞から分泌されるエキソソームは、エンドソーム由来の非常に小さな（50-150 nm）膜小胞で、内包するタンパク質や核酸を介してシグナルを伝達する。我々は、大腸菌の感染したマクロファージ（Mφ）から分泌されたエキソソームがナイーブな Mφ に作用して炎症性サイトカインを増大することを見いだした。さらに、この反応には大腸菌の産生する外膜由来細胞外小胞（OMV）が関与しており、このことは病原体との直接の接触ではなく、細胞外小胞を介して間接的にも炎症が誘導されうることを初めて示したものである。しかし、細胞外小胞に含まれる炎症誘導の鍵となる因子（病原性分子）については全く不明である。そこで、大腸菌 OMV 存在下の Mφ 由来エキソソームに存在する OMV によって運搬される病原性分子の同定を試みた。エキソソームにはタンパク質や DNA または RNA の核酸が内包されているため、それぞれの分解酵素を作用させた後、エキソソームによる炎症性因子の誘導を検討した。その結果、タンパク質分解酵素処理エキソソームによる炎症因子の誘導作用が減弱したため、病原性分子の本体はタンパク質であると考えられた。次に、エキソソーム内タンパク質の MS 解析により検出された大腸菌タンパク質を病原性分子の候補とし、これら各遺伝子を欠損した大腸菌株を用いて OMV とエキソソームの 2 つの細胞外小胞により運搬され、炎症性因子を誘導する分子を同定した。

Living thing creates a many kind of extracellular vesicles (EVs) and the EVs are known to have a role of cell-signaling. In mammalian, exosomes are released from intracellular compartments, late endosomes, after fusion with the plasma membrane. These particles are released from viable cells, either constitutively or upon activation of cell secretion, but not from lysed or apoptotic cells. Moreover, exosomes are enriched in various bioactive materials, including proteins, lipids, mRNA, and microRNA. We previously revealed that the exosomes derived from macrophages (Mφ) that were infected with *Escherichia coli*, induced pro-inflammatory factors in uninfected Mφ. The inflammation-inducing exosomes was elicited by the outer membrane vesicles (OMVs) of *E. coli*. This study shows the alternative mechanism for pro-inflammatory signal by two extracellular vesicles mediate.

exosome, macrophage, inflammation

講演番号：3SYp3-3
講演日時、会場：3 月 27 日 14:53～ A21 会場

Bacterial membrane vesicle formation through cell death

○Masanori Toyofuku (Univ Tsukuba)

Membrane vesicles (MVs) are released by most bacteria and are involved in many biological processes, including horizontal gene transfer, virulence and bacterial communication. MVs also have impact on human health and are used as a platform for vaccine development. Recent studies show that MVs are heterogenous that presumably leads to its diverse functions. Still, little is known about the mechanisms of how MVs are formed.

The canonical model for MV formation in Gram-negative bacteria is blebbing of the outer membrane. From the blebbing models, it is hard to understand how cytoplasmic materials such as DNA are enwrapped in MVs. In order to understand the process of MV formation we took advantage of live cell imaging.

Live cell imaging in *Pseudomonas aeruginosa* showed that a subpopulation of the cells undergoes explosive cell lysis and generate MVs from the shattered membrane. Endolysin, an enzyme that degrade peptidoglycan, was found to be critical in this process. Endolysins are conserved among bacteria and we further found that endolysins can induce MV formation also in Gram-positive bacteria through bubbling cell death.

MVs were once thought not be the product of cell lysis. However, our results clearly show that the widely distributed endolysin triggers MV formation through cell death in both Gram-positive and -negative bacteria. The presence of various MV formation routes may generate different types of MVs.

Membrane vesicle, Cell death, Bacterial interaction

講演番号：3SYp3-4
講演日時、会場：3 月 27 日 15:17～ A21 会場

ナノ構造の可視化で切り拓く細菌膜小胞の特性と形成機構

Characteristics and biogenesis of bacterial membrane vesicles developed by visualization of nanostructures

○田代 陽介（静岡大院総合科技）
○Yosuke Tashiro (Shizuoka Univ.)

多くの細菌は、細胞外に直径数十から数百 nm の膜小胞を分泌している。膜小胞には様々な微生物由来の物質が高濃度に内包されており、遺伝子水平伝播、細胞外電子伝達、細胞間情報伝達、病原因子運搬の媒体として機能している。一方、膜小胞の分泌には様々な因子が関与しており、その機構について不明な点が多い。本講演では、今まで膜小胞研究には導入されていなかった観察手法により、膜小胞分泌機構を解析した例を紹介する。

蛍光顕微鏡観察で 50 nm ほどの膜小胞を観察するためには、膜小胞内に特異的に局在する物質を染色する必要がある。そこで膜湾曲部位に局在する特性を持つリン脂質であるカルジオリピンに着目した。その結果、カルジオリピンを染色すると細菌の膜小胞分泌を観察可能であることが蛍光顕微鏡観察により明らかとなった。また、細胞内部構造の観察が可能な急速凍結レプリカ電子顕微鏡法を分泌機構解明に適用した。本手法では細胞の割断面を作製し平均化していない個々の分子を観察可能である。当手法による観察の結果、グラム陰性菌の内膜と外膜の歪みが膜小胞分泌に重要であることが示された。

Many bacteria secrete spherical membranal nanoparticles (20-400 nm in size) from bacterial surface to extracellular milieu. These liposome-like particles are called as “membrane vesicles (MVs)” and have important roles in several biological functions, including efflux of cellular substances, delivery of genetic materials and virulence. While MV biogenesis have been studied in many years, the mechanism of MV secretion has not fully understood. Here I introduce effective technologies to observe MV secretion in bacteria.

To observe MV secretion using fluorescence microscopy, MVs are needed to be detected with the specific fluorescent label. Cardiolipin, which is localized at mitochondrial inner membrane of eukaryotes and cell poles of bacteria, was aggregated at the MV-forming site. Therefore, cardiolipin can be an appropriate marker for observing MV biogenesis in bacteria. In addition, cells were visualized using quick-freeze, deep-etch electron microscopy, which technology is used to visualize biological specimens in an active state as a shot image with spatial resolution of the order of nanometers. In the result, MVs were released at the site of loose outer membrane in Gram-negative bacteria. These visualizing technologies would contribute to understanding unrevealed mechanism on MV biogenesis in bacteria.

Membrane vesicles, Cardiolipin, Phospholipids

講演番号：3SYp3-5
講演日時、会場：3 月 27 日 15:41～ A21 会場

膜小胞高生産性細菌におけるタンパク質の膜小胞への輸送機構
Mechanism of protein transport to exracellular membrane vesicles of a hypervesiculation bacterium
○栗原 達夫（京大化研）
○Tatsuo Kurihara (Kyoto Univ.)

アジの腸管内容物から分離された膜小胞高生産性細菌 *Shewanella vesiculosa* HM13 は分子質量約 49 kDa の機能未知タンパク質（P49）を膜小胞の主要積荷タンパク質として分泌生産する。本菌は細胞外膜小胞生産機構の解析や膜小胞をプラットフォームとした細胞外物質生産系の構築に有用と期待される。本菌の全ゲノム解析の結果、P49 遺伝子近傍にⅡ型タンパク質分泌装置ホモログ（T2SS-2）や膜表層糖脂質生合成関連タンパク質ホモログをコードする遺伝子群が見いだされた。これらの遺伝子群の破壊実験や P49 の *in vitro* 輸送実験から、T2SS-2 が P49 の分泌に関与することや、P49 が膜小胞表層糖脂質との相互作用を介して膜小胞に積み込まれることが示唆された。本講演では、膜小胞のプロテオーム解析やトランスポゾン変異実験を起点とした膜小胞形成関連因子の探索についても紹介する。

Shewanella vesiculosa HM13, which was isolated from the intestinal content of a horse mackerel, abundantly produces extracellular membrane vesicles (EMVs). EMVs of this bacterium contain a single major cargo protein (P49) of unknown function with a molecular mass of about 49 kDa. This bacterium is expected to be useful for studies on the mechanism of biogenesis of EMVs and for construction of extracellular protein production system by using EMVs as a platform. Whole genome sequencing revealed that the genes coding for a homolog of the type II protein secretion system (T2SS-2) and those coding for proteins that are supposed to be involved in the synthesis of membrane-surface glycolipids are located in the vicinity of the P49 gene. Gene disruption analysis and *in vitro* P49 transport assay suggested that T2SS-2 is involved in the secretion of P49 and that membrane-surface glycolipids of EMVs play an essential role in transport of P49 to EMVs. Proteome analysis of EMVs and transposon mutagenesis experiments are also being carried out to elucidate the mechanism of biogenesis of EMVs.

extracellular membrane vesicle, protein secretion, protein transport

講演番号：3SYp3-6
講演日時、会場：3 月 27 日 16:05～ A21 会場

膜小胞の量的コントロールに関する研究－シャペロン遺伝子破壊による膜小胞産生能向上の検討

The study of quantity control of membrane vesicle (MV) production by *Meiothermus ruber* H328 - Improvement of the ability of MV production by chaperone gene disruption-

○渡部 邦彦（京都府立大学）
○Kunihiko WATANABE (Kyoto Prefectural Univ.)

膜小胞 (MV) は、新規な天然キャリアーとしての利用に加えて、精製不要の簡便な抗体作成や腸内細菌による薬剤のドラッグデリバリーシステム (DDS) への応用など多方面で期待されている [1)]。

我々は神戸・有馬温泉から単離した *Meiothermus ruber* H328 を用いて MV の研究を行っている [2)]。本菌株はグラム陰性の好熱性細菌で、産業廃棄物であるトリ羽毛を強力に分解する [3)]。この分解を担うケラチン分解性プロテアーゼをゲノム解析情報から同定し、巨大分子複合体として MV にも含まれることを確認している。MV のより有効な応用のためには量的コントロール、即ち増大が必須である。そこで大腸菌で報告されているシャペロン遺伝子 *degP* の破壊による増大を本菌株でも調査した。本菌株のゲノム情報から *degP* 遺伝子を突きとめ H328 株の遺伝子破壊（*ΔdegP*）株を作製した。蛍光試薬を用いた解析で野生型株（WT）の最大 4 倍の産生増を確認した。産生される MV の TEM 観察から、WT が 100 nm 以上に対し *ΔdegP* 株は数 10 nm のものが多く、質的相違に伴うサイズの違いが示唆された。次いで *ΔdegP* 株で増加するタンパク質が MV に存在する S-layer protein と同定され、MV 量の増加を裏付けることができた。これらの結果より、本菌株においても *degP* 遺伝子欠損が MV 産生能を強化させ、MV の量的コントロールできることが判った。

1) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 9837-9843 (2016) 2) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **78**, 1623–1625 (2014) 3) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **82**, 941-950 (2009) 4) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 2973-2980 (2014)

Membrane vesicles (MVs) are of interest for various biotechnological applications[1)]. We found that MVs are exfoliated from the cell surface of *Meiothermus ruber* H328, a Gram-negative and thermophilic bacterial strain isolated in Arima Hot Spring, Kobe[2)]. The strain H328 was characterized by conspicuous degradation of chicken feathers (main component: keratine)[3)] and its keratinolytic protease also occurs in MVs. To enlarge the utility of MVs, it is necessary to control the ability of MV production in bacteria. As reported in *E. coli*, it was investigated if knockout of a chaperone gene *degP* would affect the MV production ability in the strain H328. The knockout resulted in the increase in MV production maximally by 4-fold while the size of MVs produced by *ΔdegP* strain was smaller than 100 nm observed for those by the wild type strain. The results indicate that the ability of MV production in the strain H328 is enhanced by knockout of the chaperon gene but the increased MVs are suggested to be different in their quality. However, it can be concluded that knockout of the chaperone gene leads to enhancement in MV production and the chaperone has crucial relations with the mechanisms for MV production.

membrane vesicle, chaperone, thermophile

講演番号：3SYp4-1
講演日時、会場：3 月 27 日 14:00～ A13 会場

セルロースナノファイバーの現状について
Current Situation of Cellulose Nanofiber

○平田 悟史 (産総研)
○Hirata Satoshi (AIST)

近年わが国では、セルロースナノファイバーが高強度・軽量複合材料の原料として注目されており、セルロースナノファイバーを混ぜたさまざまな樹脂やその樹脂を用いた自動車が試作されている。一方、セルロースナノファイバーには、高強度・軽量という特性以外にも、増粘制御性、チキソ性、保湿性・保水性など優れた特性が知られており、これを活かした商品が販売されている。ところでわが国では約 20 社がセルロースナノファイバーを商品・サンプルとして販売しているが、その性状はメーカーによって大きく異なり、またその性状を表す基準も統一されていない。
海外においてもセルロースナノファイバーの研究開発・製造は行われており、とりわけ中国での事業化の動きが加速している。日本では研究開発、事業化の対象はセルロースナノファイバーが大半であるが、海外ではセルロースナノファイバーよりも繊維の径が太いセルロースフィラメント、セルロース繊維を酸で加水分解して作るセルロースナノクリスタル、グルコースを原料に酢酸菌で合成するバクテリアセルロースも広く研究されており、また複合材料以外の用途開発、特にバイオメディカル分野、エレクトロニクス分野における用途開発が進んでいる。

In recent years, cellulose nanofiber (CNF) attracts attention as raw materials for high strength and light weight composite, and various resin containing CNF and an automobile body using the resin are produced in Japan. On the other hand, a superior characteristic like thickening controllability, thixotropy, moisture retaining property and water holding property are known for CNF and products having these properties are sold. By the way, approximately 20 companies sell CNF as a product or a sample, however the property greatly varies according to a manufacturer. The standards to express the property are not unified. The R&D and production of CNF are also carried out in the foreign countries, and industrialization are actively performed especially in China. Most activities in Japan are using CNF, however cellulose filamant, which is thicker than CNF, cellulose nanocrystal, which is produced by hydrolysis of cellulose fiber, bacteria cellulose, which is synthesized by microorganism from glucose are widely studied in foreign countries. Application development for biomedical and electronics fields are progressing.

nanocellulose, cellulose nanofiber, cellulose nanocrystal

講演番号：3SYp4-2
講演日時、会場：3 月 27 日 14:30～ A13 会場

酢酸菌におけるセルロース生産能のオン・オフのメカニズム

On and off mechanisms of cellulose producibility in Acetic acid bacteria

○松谷 峰之介[1]、ティーラグール ガンジャナ[2]、薬師 寿治[3,4]、松下 一信[3,4]([1]東農大ゲノム解析セ、[2]カセサート大理、[3]山口大院創成科学、[4]山口大中高温微セ)
○Minenosuke Matsutani[1], Gunjana Theeragool[2], Toshiharu Yakushi[3,4], Kazunobu Matsushita[3,4] ([1]Tokyo Univ. Agric, [2]Kasetsart Univ., [3]Yamaguchi Univ., [4]RCTMR)

Komagataeibacter 属の酢酸菌はセルロースを合成する能力を有しており、バクテリアセルロース生産に用いられている。しかしながらこの能力は容易に失われることが知られている。我々は、セルロース生産能のオン・オフのメカニズムを調べるため、ゲノム既知のセルロース非生産株 *Komagataeibacter medellinensis* NBRC 3288 株を親株として静地培養を繰り返すことで 2 つの個別のセルロース生産株を得た。これら適応株の変異箇所を同定したところ、セルロース生合成オペロン *bcs*B に入った破壊的変異に新たな変異が生じた結果、復帰変異していることが見出された。この易変異性を利用し、より産業的に有用なセルロース生産株の取得を試みた。*Komagataeibacter oboediens* MSKU3 株を高温または高エタノール適応させる過程で得られた 2 つのセルロース非生産変異株 T4 および E3 を用いて上述のように復帰変異株の取得を試みた。*bcsC* に 1 塩基フレームシフトが生じていた E3 においては複数の復帰変異が得られたのに対し、5 塩基欠損変異が生じていた T4 株においては復帰変異を得ることが出来なかった。このことは非生産株への転換時に入る最初の変異が復帰変異の可否に密接に関連することを示唆している。また E3 から得られた複数の変異株は，それぞれ異なるアミノ酸置換を起こしており、親株のセルロースと明らかに異なる生産性や繊維構造を示した。それゆえ、適応的復帰変異法は種々の有益なセルロース生産菌の取得に有益であることが示された。

Komagataeibacter species are known to produce cellulose as a stable pellicle. However, it is also well known to lose this ability very easily. We investigated the on and off mechanisms of cellulose producibility in two independent cellulose-producing strain through a repetitive static culture of a non-cellulose-producing *K. medellinensis* NBRC 3288 parental strain. The genome re-sequencing of two adapted strains revealed that cellulose producing operon was restored by deletion of a nucleotide in its C-rich region. We have also obtained non-cellulose-producing strains of *K. oboediens* MSKU3, E3 and T4, during ethanol and thermal adaptations, respectively. Both strains caused frameshift mutations in *bcsC* gene (1 bp Ins and 5 bp Del). A repetitive static culture generated cellulose-producing revertants from E3 but not from T4. The results suggested that the initial mutations occurred during each adaptation is responsible for the on/off mechanisn of cellulose-producing. These revertants from E3 strains exhibited a large difference of produced BNC in its productivity and also in their fine structure.

Acetic acid bacteria, Cellulose producibility, Revertant

講演番号：3SYp4-3
講演日時、会場：3 月 27 日 15:00～ A13 会場

酢酸菌セルロース合成酵素複合体の構造と機能
Structure and function of cellulose synthase complex from *Gluconacetobacter*

○田島 健次（北大院工）
○Kenji Tajima (Hokkaido Univ.)

Gluconacetobacter hansenii ATCC23769 は、グラム陰性のセルロース合成菌であり、セルロース合成機構解明のためのモデル生物として古くから利用されている。*Gluconacetobacter* においては、セルロース合成酵素遺伝子オペロン（CeS オペロン）が 4 つのタンパク質（CeSA、CeSB、CeSC、CeSD）をコードしている。これら 4 つのタンパク質は、セルロース合成酵素複合体を形成しており、ターミナルコンプレックス（TC）とよばれている。これらのタンパク質の内、CeSA と CeSB は内膜に存在している。CeSA はグルカン鎖の合成に必要であり、CeSB はセルロース合成を制御していると考えられている CeSC は合成されたグルカン鎖が通過する孔を外膜中で形成していると考えられている。CeSD は、機能性ユニットである八量体によって形成された非常にきれいな環状構造を有しており、グルカン鎖を排出するための通路を提供している可能性が示唆されている。CeS オペロンに加えて、セルロース合成関連遺伝子がオペロンの上流、下流の両方に見つかっている。これらの遺伝子よってコードされているタンパク質もセルロース合成に関与しているが、それらの正確な機能については未解明のままである。

本発表では、*Gluconacetobacter* を含むセルロース合成菌由来の TC の構造と機能に関するこれまでの知見を紹介する。

Gluconacetobacter hansenii ATCC23769 is a Gram-negative cellulose-producing bacterium that has been used as a model organism for elucidating cellulose synthetic mechanisms. In *Gluconacetobacter*, cellulose synthase (CeS) operon codes four proteins: CeSA, CeSB, CeSC, and CeSD. These proteins form a cellulose synthase complex, termed a terminal complex (TC). CeSA and CeSB are located in inner membranes. CeSA is required to catalyze synthesis of the glucan chain and CeSB is thought to regulate cellulose synthesis. CeSC is thought to form pores in outer membranes through which synthesized glucan chains can pass. CeSD showed an exquisite cylindrical shape formed by an octamer as a functional unit, suggesting that CeSD could provide passageways for extruding glucan chains. In addition to within the CeS operon, cellulose synthesis related genes are also found both upstream and downstream of the operon. Although proteins encoded by those genes also relates to cellulose synthesis, their exact functions have still remain unknown.

In this presentation, I will introduce information so far about structure and function of TC from cellulose-producing bacterium including *Gluconacetobacter*.

bacterial cellulose, cellulose synthase complex, *Gluconacetobacter*

講演番号：3SYp4-4
講演日時、会場：3 月 27 日 15:30～ A13 会場

バクテリアセルロース合成酵素の機能再構成
Functional reconstitution of bacterial cellulose synthase

○今井 友也（京都大生存研）
○Tomoya Imai (Kyoto Univ.)

セルロースは地球上にもっとも豊富に存在する高分子であり、現在セルロースナノファイバーとして大変注目を浴びている天然高分子材料である。天然セルロースの優れた材料特性は繊維構造かつ最も弾性率の高い結晶系であるセルロースⅠ型結晶構造を取ることによっている。すなわちセルロース合成酵素は高分子を合成する機能とともに、合成したセルロースの高分子鎖をⅠ型結晶の繊維構造という特定の構造として成形する機構をもつことを示している。つまりセルロース合成酵素は高分子構造を常温常圧下で制御する機構をもつ。これは模倣したくなる高度な生物機能である。

我々は、このセルロース合成酵素の高分子構造制御機構をタンパク質の機能として解明することを目的として、現在酢酸菌を実験モデルに使って研究を進めている。本発表では、酢酸菌のセルロース合成酵素複合体を試験管内系と細胞系に機能再構成した例についてご紹介する。現在まで、これらの系でセルロース分子の合成は確認しているが、残念ながら天然セルロースの構造である微小繊維（ミクロフィブリル）構造とセルロース Ⅰ 型結晶の合成には至っていない。この機能欠損（部分的変性）の原因を突き止め、その除去により天然セルロース構造の合成系構築を我々は現在目指しており、その取り組みをご紹介する。

Cellulose is one of the abundant polymers on Earth, and nowadays a lot of attentions is paid to its utilization as represented by “cellulose nanofiber”. The native cellulose has a fiber morphology and crystallized into “cellulose I”, one of the crystallographic polymorphs of cellulose whose elastic modulus is the highest among the known crystallographic cellulose polymorphs. This clearly indicates that cellulose synthase has an active function to control polymerized long chains of cellulose (polymer structure control). This presentation shows functional reconstitution of bacterial cellulose synthase *in vitro* and in *E. coli*, which was conducted for clarifying a mechanism of the polymer structure control function in cellulose synthase. Unfortunately until now, the native structure of cellulose was not successfully produced. This loss-of-function (partial denaturation we call) will be a starting point to reconstitute the native function by complementing the essential factor(s), and some of such trials will be shown on site.

cellulose synthase, enzyme function, polymer structure

講演番号：3SYp4-5
講演日時、会場：3 月 27 日 16:00～ A13 会場

酢酸菌がシンクロ産生するヒアルロン酸／セルロースの複合素材の創製

Synchronized Biosynthesis of Hyaluronic acid / bacterial cellulose nanofiber composite directly secreted from *Gluconacetobacter*

○近藤 哲男[1]、高濱 良[1]、加藤 歩並[1]、田川 聡美[1]、田島 健次[2] ([1]九州大農、[2]北海道大工)
○Tetsuo Kondo[1], Ryo Takahama[1], honami Kato[1], Satomi Tagawa[1], Kenji Tajima[2] ([1]Kyushu Univ., [2]Hokkaido Univ.)

バクテリアセルロース(BC)を生産するグラム陰性菌として知られる酢酸菌は、セルロース分子からのみ成る結晶性高強度ナノ繊維を生産する機構を有しており、近年、遺伝子工学や界面科学、3D プリンティング技術を応用し、材料構築マシンとして利用する試みがなされている。

我々はこれまで、異種由来のカードラン(β-1,3 グルカン)合成酵素を発現した遺伝子組み換え酢酸菌において、菌体から排出されたカードランと BC が複合化し、ゲル状膜(ペリクル)を形成することを見出した[1)]。また、このペリクルの熱分解挙動を、異なる手法で調製した混合物と比較することにより、酢酸菌を介した本プロセスにおいてカードラン-BC 間により強い相互作用が生じたことが示唆された。さらに最近、我々は、生理活性多糖であるヒアルロン酸(HA)合成酵素を酢酸菌で発現させることにより、HA と BC と同時（シンクロ）合成する遺伝子組換え酢酸菌を構築している[2)]。

BC 材料は現在、主に医療分野での応用展開が進んでいるが、細胞との相互作用が弱いことが、組織工学分野への応用における課題となっている。一方、上記の研究で HA と BC の複合ペリクルは、通常の BC ペリクルと比べて細胞接着性が向上したことも示唆された[2)]。さらなる高機能材料の設計へと進展させるためには、この HA と BC の複合化メカニズムの解明が求められる。そこで本発表では、HA の排出経路に注目して上記の酢酸菌シンクロ合成をまとめるとともに、静置培養で得られたペリクルについて、細胞接着性の評価[2)]を併せて考察する。

参考文献: 1) Fang J, Kawano S, Tajima K, Kondo T (2015) *Biomacromolecules* 16:3154–60. 2) 高濱良ら (2019) セルロース学会第26回年次大会 講演要旨集。

This study demonstrated that *Gluconacetobacter xylinus* (*G. xylinus*) can directly secrete nanofibers composed of hyaluronic acid and bacterial cellulose (BC) solely by introducing genetic parts to produce HA. Confocal laser scanning microscopy (CLSM) for engineered Cel-1 mutant, a cellulose non-producing strain (*ccpAx* knockout) that was complemented by *ccpAx-egfp* gene, revealed that recombinant HA secretion in *G. xylinus* is closely related to the inherent BC secretion system. This indicates possibility of HA secretion through cellulose synthase complex (TC). Even though HA concentration was very low in the obtained pellicle, this composite pellicle exhibited enhanced properties of cell attachment and viability. This study laid a foundation for the design of bio-functional composite materials with the engineered cellulose-producing bacteria.

Bacterial nanocellulose, *Gluconacetobacter xylinus*, Synchronized biosynthesis and secretion

講演番号：3SYp5-1
講演日時、会場：3 月 27 日 14:00～ A14 会場

ポリフェノールと健康研究の回顧と展望

Retrospective and perspective of the research on polyphenols and health

○寺尾 純二 (甲南女子大医療栄養)
○Junji Terao (Konan Women's University)

ポリフェノールは植物の二次代謝産物として普遍的に存在する化合物群である。1936 年の Szent Gyorgyi らによるビタミン P の提唱以来、主に食事由来の生活習慣病予防因子として研究されてきたが、最近では長寿に関わる食品成分としても注目されている。ポリフェノールは高分子タンニン類と低分子ポリフェノール類に分類される。低分子ポリフェノール類であるフラボノイド等に関する研究成果が多いが、高分子タンニン類の機能研究も始まっている。フリーラジカル捕捉による直接的な抗酸化活性は、ポリフェノールの生理機能にほとんど関与しない。ポリフェノールは、細胞内シグナル伝達系を直接あるいは間接的に制御することで機能を発揮する。この場合、ポリフェノールは生体内に吸収されて標的部位に蓄積することが前提である。ところが、生体内に吸収されるのは低分子ポリフェノールのごく一部であり、その大部分および高分子タンニン類は吸収されず、糞中に排泄される。しかし、非吸収性ポリフェノール類も重要な機能成分であることが、腸内細菌との関係で明らかになった。すなわち、非吸収性ポリフェノールは腸内細菌叢を変化させることにより、全身の炎症や代謝を改善する。非吸収性ポリフェノールは腸内細菌による異化代謝により低分子に変換された後に、消化管上皮や体内で機能を発揮する。したがって、摂取ポリフェノールがヒトの健康に果たす役割は、以前に思い描いていたよりもはるかに大きいものであり、現在はその全貌を解明する出発点に立っている。

More than eighty years have passed since Szent-Györgyi first proposed that citrus polyphenols should be called as vitamin P. Thereafter extensive studies have been carried out to evaluate the physiological function of dietary polyphenols. Nowadays dietary polyphenols are suggested to contribute to vascular health and longevity. Antioxidant function hardly takes a major part of their beneficial effect. Polyphenols may exert their function by modulating gene expression through cellular signal transduction pathways. However, bioavailability of dietary polyphenols is, in general, very low or negligible, and mostly converted to inactive conjugated metabolites in the blood circulation. Nevertheless, recent studies on the relationship between intestinal microbiota and dietary polyphenols provoke the new ideas on their physiological function. Polyphenols may possess suppressive effect on the progress of chronic diseases by modifying the patterns of intestinal microbiota. Low molecular weight catabolites originating from non-absorbable high-molecular weight tannins may exert novel functions in the body. In this context, the history and perspective of polyphenol research on human health will be overviewed .

polyphenol, health, microbiota

講演番号：3SYp5-2
講演日時、会場：3 月 27 日 14:10～ A14 会場

新規フラボノイドを探索する FlavonoidSearch ツール
FlavonoidSearch tool for discovery of novel flavonoids

○櫻井 望[1,2]、秋元 奈弓[2] ([1]国立遺伝研、[2]かずさＤＮＡ研)
○Nozomu Sakurai[1,2], Nayumi Akimoto[2] ([1]National Inst. Genetics, [2]Kazusa DNA Res. Inst.)

本講演では、メタボローム解析で得られた多段階 MS スペクトルをもとにフラボノイドの非糖部（アグリコン）を予測するツール FlavonoidSearch[1]を紹介する。

フラボノイド類は、C_6-C_3-C_6 からなるジフェニルプロパン構造を母核に持つ、植物を起源としたポリフェノール類の総称で、これまでに 7000 種類以上が報告されている。抗酸化、抗炎症、抗がん、ホルモン様作用など生理活性を持つものも多く、食品機能性成分としても注目されている。演者らはこれまで、液体クロマトグラフィー-質量分析を用いた、対象化合物を限定しない（ノンターゲットな）網羅的代謝物解析（メタボローム解析）のデータから、多段階 MS スペクトルの情報をもとに、フラボノイドのアグリコンを高い正解率で予測するソフトウェア FlavonoidSearch を開発し[1]、パセリなどのありふれた野菜にも、未知構造を持つ新規のフラボノイド候補が多種類存在することを示してきた。さらに食品のメタボロームデータに FlavonoidSearch を適用することで[2]、試料特異的なフラボノイド候補を探索することが可能となっている。これらの情報リソースは新規な機能性フラボノイドの探索に役立つだろう。

We introduce here a computational tool “FlavonoidSearch” which predicts flavonoid aglycones based on the multiple-stage MS spectra obtained by untargeted metabolome analysis [1].

Flavonoids are plant-derived polyphenols which have C_6-C_3-C_6 core structure(s), and approximately 7,000 flavonoids are reported to date. Many flavonoids show bioactivities such as anti-oxidant, anti-inflammatory, anti-cancer, and hormone-like activities, and their potential health benefits attract much attention of researchers. We have previously reported that many candidates of novel flavonoids were found even in commonly consumed vegetables such as parsley using FlavonoidSearch. An application of FlavonoidSearch to the metabolome data obtained from various foods (Food Metabolome Repository) [2] enables researchers to find sample specific flavonoid candidates. These informational resources should promote discoveries of novel functional flavonoids.

[1] Akimoto et al., Scientific Reports 7: 1243 (2017),
http://www.kazusa.or.jp/komics/software/FlavonoidSearch
[2] Sakurai and Shibata, Carotenoid Science 22: 16-22 (2017), http://metabolites.in/foods/

flavonoid prediction tool, untargeted metabolome analysis, mass spectra

講演番号：3SYp5-3
講演日時、会場：3 月 27 日 14:40～ A14 会場

日本人の食事をベースにしたフラボノイド摂取量、含有量、機能性の検討

Consideration of flavonoid intake, content and functionality based on Japanese meal

○市川 陽子（静岡県大食栄）
○Yoko Ichikawa (Univ. Shizuoka)

抗酸化活性などの機能性をもつフラボノイドは、日常的に摂りやすい野菜や果物に多く含まれるため、積極的な摂取による生活習慣病予防効果が期待できる。これまで栄養士等が立案する健康的な食事は、食事摂取基準に基づくエネルギー・各栄養素の量と栄養比率（PFC比率）に整えることが条件であった。今後はそれらに加え、機能性を意識した食材と調理法の選択による、疾病予防を目的としたフラボノイドリッチな食事の設計も考えられる。そのためには、食材・調理法別にフラボノイド等の含有量を示すデータベースの構築が求められる。機能性成分の摂取量の目安については疫学研究の成果が待たれるが、演者らは食事摂取基準に合致した日本人の食事におけるフラボノイドおよび総ポリフェノールの含有量と、その使用食材による傾向を調べた。また通常、ヒトが食事からフラボノイドを摂取する際は調理が加えられる。さらに弁当や惣菜は、調理後、喫食までに時間を要するが、機能性成分の保持状態については報告がない。そこで、調理法および調理後の時間経過が食材中のフラボノイド・総ポリフェノール含有量および抗酸化活性に及ぼす影響について検討を試みている。

Flavonoids are expected to prevent the onset of diseases due to a variety of functions, such as antioxidant activity, and it is easy to consume them daily due to their widespread presence in vegetables and fruits. Healthy diets planned by dietitians were required to have energy and nutrients based on dietary reference intakes (DRIs) and nutrition ratio (PFC ratio). Now, it is possible to design flavonoid-rich meals for disease prevention by selecting ingredients and cooking methods. For this purpose, it is necessary to build a database that shows flavonoids content according to ingredients and cooking methods. Though the proper amount of functional ingredients is unclear, we examined the content of flavonoids and total polyphenols in Japanese diets that consistent with DRIs. Also, when humans ingest flavonoids, foodstuffs are cooked; there is little data about flavonoids existing in food after cooking. Further, boxed lunches or delicatessens purchased at convenience stores or supermarkets takes a long time to arrive at the table of the customer after cooking. However, taking into consideration time until eating, there is no report on the functional component in the meals. Therefore, we investigated the influence of cooking operation and time on content of flavonoids, polyphenol, and antioxidant activity in food after cooking.

flavonoid, Japanease meal, variation by cooking

講演番号：3SYp5-4
講演日時、会場：3 月 27 日 15:10～ A14 会場

ポリフェノールが脳機能に与える影響と生体調節

Effects of polyphenols on the brain function and physiological regulation

○越阪部 奈緒美、藤井 康之（芝浦工大生命）
○Naomi Osakabe, Yasuyuki Fujii (Shibaura Inst.Tech.)

植物性食品に含まれるポリフェノールは、トクホ・機能性表示食品の関与成分として一般に広く用いられている。ここ 20 年の研究により、ポリフェノールのバイオアベラビリティは極めて低いことが確認されたことから、その機能性発現メカニズムは未だ不明である。我々は、ポリフェノールの中でも特に吸収されにくい成分（難吸収性ポリフェノール）が強い渋味を呈することに着目し、その感覚情報が消化管に分布する神経系を介して脳の青斑核に入力されることを初めて確認した。また青斑核に入力された渋味刺激は、視床下部や海馬に投射されることで脳神経活動を活性化し、記憶や覚醒に影響を与えることを明らかにした。青斑核に入力された刺激は脳幹へも投射され、交感神経活動を亢進することによって循環系やエネルギー代謝系を修飾し、末梢において有益な生理学的変化が起こることが分かった。今回の研究結果によって、日常の食事で摂取される食品成分には、医薬品などの化学物質とは全く異なった特有の作用機序、すなわち食品の第二次機能と第三次機能のクロストークによって発現するメカニズムが存在することが明らかとなった。

Polyphenols contained in plant foods are widely used as components involved in FOSHU / Foods with Functional Claims. Since the last 20 years of research on polyphenols, it has been confirmed that the bioavailability of polyphenols was very poor, so the mechanism of their physiological regulation activities has been still unclear. We focused on the potent astringency of polyphenols which were hardly absorbed. We have confirmed that the sensory signal induced by them input to the locus coeruleus via the sensory neuron distributed in the gastrointestinal tract for the first time. In addition, it was clarified that the astringent stimulus, which input to the locus coeruleus, projected to the hypothalamus and hippocampus, consequently it affected memory and arousal. These stimulate was also projected to the brainstem, and it activated the sympathetic nerve system, accordingly modified the circulatory and energy metabolism systems. Our results suggested that food components consumed in daily meals have a unique mechanism of action, that is completely different from medicine. It also suggested that these effects were exhibited by the crosstalk between the secondary and tertiary functions of food.

polyphenol, brain function, autonomic nervous system

講演番号：3SYp5-5
講演日時、会場：3 月 27 日 15:40～ A14 会場

ポリフェノールの健康影響：疫学研究からのエビデンス
Health effect of polyphenol: evidence from epidemiological studies
○津金 昌一郎（国立がん研究センター）
○Shoichiro Tsugane (National Cancer Center)

ポリフェノールの健康影響に関する科学的証拠を示す方法の一つとして人集団を対象とした疫学研究がある。ポリフェノール摂取の有無や量の違いをランダムに割り付けて健康アウトカムとの関連を検証するランダム化比較試験、特定集団のポリフェノール摂取量を把握し、その後の健康アウトカムとの関連を前向きに検証するコホート研究、疾患を罹患したグループと対照グループの過去のポリフェノール摂取量を把握して関連を後ろ向きに検証する症例対照研究などがある。ランダム化比較試験が最も理想的ではあるが、血圧値や症状緩和などの短期的な健康アウトカムに対しては現実的ではあるが、がんや循環器疾患などの重大疾病の予防効果などを検証するためには、大規模集団を長期追跡する必要があり研究実施のハードルは極めて高い。演者らは、中高年男女約 10 万人の食習慣などを把握したり、約 6 万人からは血液の提供を受け保存したりした後に、20 年以上に渡り健康アウトカムを追跡しているコホート研究において、両者の関連を検討している。これまでに、野菜・果物、大豆製品、緑茶・コーヒー、チョコレートなどポリフェノールが多く含まれる食品摂取量、それらから推計したイソフラボン摂取量、保存血液の分析より得られたイソフラボンやカテキンの血中濃度、あるいは、食事由来の抗酸化能推計値などと、がん、循環疾患、糖尿病などの罹患リスクや死亡リスクとの関連を検証してきた。本シンポジウムでは、そこで得られたエビデンスを中心にポリフェノールの健康影響についての現状を紹介する。

Epidemiological studies in human populations are one of the methods of providing scientific evidence of the health effects of polyphenols. Although randomized controlled trials are the most ideal and feasible for short-term health outcomes, it is necessary to follow large-scale populations for a long time in order to test the preventive effects of serious diseases such as cancer and cardiovascular disease. We are examining the health effect of polyphenols using a cohort study with 100,000 middle-aged and elderly men and women that has been following-up health outcomes for more than 20 years. We obtained information on life-style such as dietary habits and blood specimens from 60,000. So far, foods containing a lot of polyphenol such as vegetables and fruits, soybean products, green tea, coffee and chocolate, and isoflavones intake estimated from their soybean product intakes, and blood levels of isoflavones and catechins from the preserved blood, and antioxidant ability estimates from the diet has been tested in relation to the risk of diseases such as cancer, cardiovascular diseases and diabetes. In this symposium, we introduce the current health effects of polyphenols, focusing on the evidence obtained there.

polyphenol, heatlh, epidemiological study

講演番号：3SYp5-6
講演日時、会場：3 月 27 日 16:10～ A14 会場

ポリフェノールはどれくらい摂取すれば健康にいいのか？

How much is recommended levels of intake of polyphenols for health ?

○下位 香代子（静岡県大食品栄養）
○Kayoko SHIMOI (Univ. of Shizuoka)

1980 年代後半に、フランス人は相対的に高脂肪食を多く摂取しているにもかかわらず冠動脈性心疾患の罹患率が低いという疫学研究の結果が報告された。この逆説的な現象は「フレンチパラドックス」と呼ばれ、その原因として赤ワインの摂取量が多いことが挙げられ、赤ワイン中に含まれるポリフェノールの抗酸化性が注目された。これらの報告から 20 数年の間に、フラボノイドの bioavailability、多機能性、種々の疾患に対する予防効果などが報告された。しかし、bioavailability は低く、真のターゲットは何か、推奨摂取量はどれくらいかなど不明な点が多く残されている。食品中のポリフェノール含有量は Phenol Explorer などに収載されており、そのデータベースを基に、疫学調査の結果からポリフェノール摂取量を算出してがんなど種々の疾患との関連が調べられている。本講演では、どれくらい摂取すれば健康にいいのか、推奨摂取量についてのべる。なお、2003 年より 2 年おきに International Conference on Polyphenol and Health(ICPH)がフランス、米国、スペインなどで開催されてきたが、神戸で開催される第 9 回目の会議における最新の知見についても合わせて報告する。

Epidemiological studies in the late 1980s demonstrated that mortality for coronary heart disease (CHD) was low in France, despite high intake of dietary saturated fat. This observation was called French paradox. French people had a high consumption of red wine which contains higher amount of polyphenols with antioxidant properties. Over the past two decade, bioavailability, and chemopreventive activities against many disorders like cardiovascular disease and cancer have been reported. However, much remains to be investigated. What is a real target of polyphenols *in vivo* ? How much is optimal recommended levels of intake for health? The databases on polyphenol contents in foods, polyphenol metabolism and effects of food processing and cookng are provided by Phenol-Explorer. Relationship between polyphenols intake and health outcomes has been investigated using these databases. My talk will focus on optimal recommended levels of intake of polyphenols and also include the introduction of latest research presented at ICPH2019 held in Kobe.

polyphenol, recomended intake, health outcome

講演番号：3SYp6-1
講演日時、会場：3 月 27 日 14:00～ A15 会場

実験室進化手法を応用した大腸菌のストレス耐性機構の解明とその制御

Analysis of stress tolerance mechanisms of Escherichia coli by laboratory evolution

○古澤 力[1,2,3] ([1]理研 BDR、[2]東大理、[3]ERATO 共生進化)
○Chikara Furusawa[1,2,3] ([1]RIKEN, [2]Univ. Tokyo, [3]ERATO)

微生物による物質生産を効率良く行うためには、その表現型を適切に改変する必要がある。これまでにも遺伝子操作などによる様々な改変が試みられてきたが、それらの改変は必ずしもこちらが期待した結果をもたらすとは限らない。これは、その改変が細胞内の複雑なネットワークによって予期しない結果をもたらすためであり、この因果の絡まったネットワークをどのように合理的にデザインできるかは、まだ不明な点が多く残されている。

こうした表現型デザインが持つ困難さの一方で、生物システムは様々な環境に適応・進化をする能力を持つ。この適応進化のプロセスを利用し、ストレス耐性など目的とする表現型を付与することが可能になる。こうした育種を効率的に進めるためには、遺伝子型の変化と表現型の変化がどのように対応し、その変化がどのような拘束条件の下にあるか、といった適応・進化プロセスの基本的な特性が明らかすることが重要であろう。

我々のグループではこうした背景の下で、様々なストレス環境下での大腸菌の進化実験を行い、そこでの表現型と遺伝子型の解析から適応・進化プロセスが持つ性質の探求を行っている。本講演では、その一例として、様々なストレス誘引物質を添加した環境下での大腸菌進化実験の解析と、系統的な進化実験を行うためのラボオートメーションを活用した進化実験技術について紹介する。

For efficient microbial production of useful substances, it is necessary to modify their phenotype appropriately. Although various modifications have been attempted in the past, such as by genetic manipulation, these modifications do not always produce the desired phenotype. This is because the modification provides unexpected results due to complex networks within the cell, and it remains unclear how this causal network can be rationally designed. In contrast, biological systems themselves have the ability to adapt and evolve in a variety of environments. This adaptive evolutionary process can be used to achieve target phenotypes, such as stress tolerance. To utilize the evolutionary dynamics for improvement of bio-productions, we analyze the evolutionary dynamics of bacteria under various stress conditions and exploring the properties of adaptation and evolutionary processes. In this presentation, I would like to present our recent study on a high-throughput laboratory evolution of E. coli under various stress environments by using an automated culture system.

Evolution, Escherichia coli, stress tolerance

講演番号：3SYp6-2
講演日時、会場：3 月 27 日 14:30～ A15 会場

アルコール発酵に適した酵母とは：醸造用酵母から得られる学び
Breeding yeast for alcoholic fermentation: A lesson from sake yeast study

○渡辺 大輔、橋本 渉（京都大農）
○Daisuke Watanabe, Wataru Hashimoto (Kyoto Univ.)

酵母とは、元来、アルコール発酵の母体となる微生物として名付けられたが、現在では一般的に、単細胞性の真菌類の総称として用いられる。酵母の中には、*Saccharomyces cerevisiae* のように発酵力が高い種もあるが、自然界においては発酵力が低い種の方が圧倒的に多い。有史以前にブドウ果汁が自然に発酵することでワインが生まれたという説があるが、ブドウに常在している酵母種を独自に調べたところ、そのほとんどが発酵力の低い種であった。他の広範な生物に対して毒性を示すエタノールを生産し生態系を脅かす *S. cerevisiae* が、なぜこれほど身近になったのかを考える時、酒類を好む人類との共生関係を無視することはできない。つまり、高い発酵力を獲得した *S. cerevisiae* は人類にとって有用だからこそ適応できたと推察される。その最も極端な例が、清酒醸造に用いられる清酒酵母である。演者らは、環境中のストレスに応答してアルコール発酵を阻害しさらなる環境の悪化を防ぐはずの Rim15p-Msn2/4p 経路が、清酒酵母において欠損していることを明らかにした。このような過剰な発酵力と引き換えにストレス耐性の弱まった酵母が自然環境中で生存することは困難であり、清酒造りに携わる人々の存在が選択圧となったのだろう。本発表では、アルコール発酵と酵母、そして人類との関わりについて再考することで、微生物育種戦略への新たなヒントを得たい。

The word “yeast” is originally derived from the Indo-European root “*yes-*”, which means bubbling or foaming during alcoholic fermentation. However, yeasts include both high-fermenting species (such as *Saccharomyces cerevisiae*) and low-fermenting species. Although it is often believed that wine is originated from naturally fermented grape juice, we found that most of yeasts on the grape skin belong to the low-fermenting species. This finding helps us recognize that *S. cerevisiae* is not common under natural environments and has been widely spread via the relationship with human. We also revealed that sake yeast strains of *S. cerevisiae* are defective in the Rim15p-Msn2/4p pathway, a major inhibitor of alcoholic fermentation in response to environmental stresses. Since the yeast strain lacking the stress response machinery cannot survive under harsh natural environments, selection and protection by sake brewers are key evolutionary forces in the establishment of the sake strains. In this presentation, we revisit the association between alcoholic fermentation, yeasts, and human to provide novel hints for the microbiological breeding strategy.

alcoholic fermentation, yeast, Saccharomyces cerevisiae

講演番号：3SYp6-3
講演日時、会場：3 月 27 日 15:00～ A15 会場

酢酸菌の耐熱化育種とストレス耐性機能

Thermal adaptation and stress-tolerance mechanism of acetic acid bacteria

○松下 一信[1,3]、松本 奈実[1]、松谷 峰之介[2]、片岡 尚也[1,3]、藥師 寿治[1,3] ([1]山口大学院創成科学、[2]東京農大ゲノム解析セ、[3]山口大中高温微セ)
○ Kazunobu Matsushita[1,3], Nami Matsumoto[1], Minenosuke Matsutani[2], Naoya Kataoka[1,3], Toshiharu Yakushi[1,3] ([1]Yamaguchi Univ., [2]Tokyo Univ. Agric, [3]RCTMR)

酢酸菌の耐熱化育種（実験室進化）：「実験室進化」は，主に大腸菌を用いて，耐熱性の獲得などのゲノム進化の研究として進められてきたが，近年，ゲノム解析技術の進展と相まって，その手法が発酵微生物の育種に適用されている。特に，種々のストレス耐性（耐熱性，酸耐性，溶媒耐性等）を有する「適応育種」ロバスト化菌株は，安定なバイオプロセスの構築に有益である。私達は，複数の常温性及び耐熱性酢酸菌株の耐熱化育種を進め，すべての株において，その発酵可能温度が 2-3˚C 上昇した，しかも共通して ROS 生成が低下・抑制された耐熱化株を取得している。

比較ゲノム解析に基づく耐熱化機構の解析：これらの耐熱化育種株の変異遺伝子を比較ゲノム解析に基づいて解析すると，細胞表層・膜輸送・転写因子・転写翻訳系遺伝子群に多くの変異が認められ，それらのいくつかがストレス耐性寄与遺伝子として特定されている。1) MarR 転写因子の変異に伴う発現変動を介したエタノール酸化・酢酸耐性能の増強, 2) 排出系輸送体の変異に伴う代謝変動を介した NADPH/NADP 比の増加, 3) 窒素飢餓誘導因子とアミノ酸輸送体変異に伴う細胞内アミノ酸プールの変動を介した耐熱化，4) SpoT 制御ドメインの変異による緊縮応答的細胞構造変化，などである。

ここでは，これらの結果を基に，耐熱化育種酢酸菌のストレス耐性機構について議論するとともに，耐熱化酢酸菌を用いた実証的ロバスト酢酸発酵についても紹介する。

Experimental evolution is now applied to get robust microbes useful for stressful fermentation. We have been bred thermally adapted strains from several mesophilic and thermotolerant acetic acid bacteria. All these adapted strains exhibited robust ability to show reduced ROS generation and to do fermentation at 2-3˚C higher temperatures.

Based on the comparative genomics, we have clarified the mutated genes in all these adapted strains, and specific genes contributing their stress-resistance were identified as follows. 1) Defective mutation in the *marR* gene could induce the increased ability of ethanol oxidation and acetic acid resistance in *A. pasteurianus*, 2) Defective mutation in drug transporter in *G. frateurii* could induce increased NADPH/NADP ratio via metabolic flux change, 3) Mutation in nitrogen-starvation trigger and amino acid transporter genes caused change of intracellular amino acid pool, which induces thermotolerance, 4) Defect of part of regulatory domain in the *spoT* gene induced stringent response-based cell structure change. Thus, in this symposium, I would like to summarize such stress response mechanisms in the thermally adapted strains, together with introduction of demonstrative robust acetic acid fermentation by using the thermo-adapted strains.

本研究はJST-ALCAの支援で行われた。

Acetic acid bacteria, Thermotolerance, Experimental evolution

講演番号：3SYp6-4
講演日時、会場：3 月 27 日 15:30～ A15 会場

Putting biotechnology into a company’s business strategy.

○Rie Kugimiya (Chitose Laboratory Corp.)

In the 1970s, the advent of recombinant DNA technology shook traditional Japanese bioprocess companies and universities communities. The new biotech boom naturally led to a surge in research and development in the field of bioproduction in Japan. Many researchers have attempted to acquire such innovations by visiting major U.S. companies and conducting research at U.S and other countries’ innovative research institutions. The 21st century was called the age of biology.

40 years later, all industries are greatly shifting to be biobased. The raw materials, processes, and business structures of today's industries are all shifting from petroleum-based to bio-based. Of course, in Japan, the Council for Integrated Innovation Strategy, chaired by the Chief Cabinet Secretary, proposed the new national bio-policy in June 2019, aimed at achieving the world's most advanced bio-economic society by 2030. In the same way, countries around the world are investing heavily in biotechnology and stepping up their efforts. Under these circumstances, it is regrettable that Japan has not established an advantage. In fact, many of them are far behind. What should we learn from the past?

In this symposium, I, as a practitioner of bio business and former member of Bio-Industry Subcommittee of METI councils, would like to share my views on what should and should not be done for the social implementation of bio-production businesses.

bioeconomy, business development, business strategy

講演番号：3SYp6-5
講演日時、会場：3 月 27 日 16:00～ A15 会場

実用化を目指した微生物育種・培養プロセス開発事例-2

Example of industrial development using microbial manufacturing for material production-2

○水無 渉 (三菱ケミカル株式会社)
○Wataru Mizunashi (Mitsubishi Chemical Corporation)

持続可能な社会を形成するために、バイオテクノロジーは有力な手段である。本年 6 月、日本政府はバイオ戦略 2019 をまとめ、めざすべき 9 つの市場領域を定めて、開発ロードマップの作成を急いでいる。これまでも何度かバイオブームがおとずれ、一部の成功事例は残すものの大きな飛躍を達成できない状況が続いているように思う。

その理由の一つは、本シンポジウムのテーマとなっている、生物機能を用いたモノづくりにおける生産宿主の限界であり、また生産ボトルネックの解消における限界などがあげられる。

生物機能を用いたモノづくりを酵素変換、発酵生産の切り口から、アクリルアミド、医薬中間体、コハク酸など、幾つかの例を示しながら、工業化における課題を整理して議論を行いたいと考えている。

Biotechnology is the powerful tools to form a sustainable society as environmentally friendly production and using sustainable resources for material production.

In June this year, the Japanese government has announced Bio-Strategy 2019 defining nine market areas to aim for, and has rushed to make development roadmap for those areas.

There seems to be a situation where the bio-boom has been bloomed several times so far, but some of the success stories were succeed, but a big leap cannot be achieved.

One reason for this is the limitations of the production host in manufacturing using biological functions, which is the theme of this symposium, and the limitations in eliminating production bottlenecks.

I would like to talk about some examples of industrial development for manufacturing using organism, such as enzyme conversion and fermentation production, acrylamide, pharmaceutical intermediates, succinic acid, etc. , and happy to discuss what is issue, how to solve and so on.

Enzyme conversion, Synthetic Biology

講演番号：3SYp7-1
講演日時、会場：3 月 27 日 14:00～ A16 会場

植物根圏における間接誘導防衛機構の基盤と昆虫制御への応用

Indirect defense of plants at rhizosphere and its application

○松田 一彦（近畿大院・農）
○Kazuhiko MATSUDA (Grad Sch. of Agric., Kindai Univ.)

植物は身動きできないがゆえに、昆虫や動物よりも多くの防御機構を発達させている。植物の防御機構として二次代謝が良く知られているが、自身の二次代謝だけでは抵抗性を獲得可能な食植者からの攻撃を防ぎきれない。そこで植物は、天敵などの他力を借りて食植者の攻撃を緩和する。こうした「間接誘導防衛機構」の概念は、食植者の攻撃に応じて周囲に放出する揮発性化学シグナルを用いて天敵を誘引するという例で良く知られている。しかし、植物が攻撃を受けるのは地上部だけではない。

演者はこれまでダイズから得られるオカラで培養したときに糸状菌がとりわけ多く産生する殺虫・痙攣・麻痺性物質の標的解明に挑んできた。なかでも、*Penicillium simplicissimum* AK-40 株が産生するオカラミンについては、昆虫などの無脊椎生物の神経系でのみ発現する抑制性グルタミン酸受容体を標的とすることを初めて明らかにするとともに[1]、その生合成経路も解明した[2]。大変興味深いことに、昆虫選択性が高いのはオカラミンだけではなく、他の糸状菌がオカラ培地でつくる昆虫制御活性物質にもあてはまった。これらの知見をもとに、演者は、植物はケミカルシグナルを用いて昆虫や線虫に対する防御物質を微生物につくるよう指令する「根圏での間接誘導防衛機構」を提唱した[3]。本仮説の実証については、本シンポジウムで杉山により紹介される。

オカラミンに対する感受性は昆虫種により変動し、それには標的構造の違いが関与していることがわかりつつある。またその一方で、本化合物と構造が類似する化合物のライブラリ探索も進められている。以上の知見は、植物根圏での間接誘導防衛機構の基盤と応用に関する氷山の一角に過ぎない。

文献
[1]Furutani S. *et al.*, *Sci Rep*. **4**: 6190 (2014).
[2]Kato N. *et al.*, *ACS Chem. Biol*. **13**: 561-566 (2018).
[3]Matsuda K. *Curr Op. Insect Sci*. **30**: 67-72 (2018).

Penicillium simplicissimum AK-40 and some other fungi efficiently biosynthesize insect modulators such as okaramines in the okara medium. Hence, plants including soy plants may secret chemical signals that induce associated microorganisms to biosynthesize defense weapons in the rhizosphere. Such ‘Indirect Defense’ concept is now being applied to pesticide development.

Indirect defense, Rhizosphere, Okaramine

講演番号：3SYp7-2
講演日時、会場：3 月 27 日 14:25～ A16 会場

根圏ケミカルの新しい機能と作物生産への応用

Functions of rhizosphere chemicals and their application to agriculture

○杉山 暁史（京都大生存研）
○Akifumi Sugiyama (Kyoto Univ.)

根圏は「根から影響を受ける領域」と定義される根近傍の土壌である。根圏微生物は植物の生育に密接に関与することから、根圏微生物を農業へ活用するための研究が古くから進められてきた。近年、微生物や代謝物を含めた根圏環境を包括的に解析することが可能となったが、植物が根圏に与える主要な要因の一つである植物代謝物が、どのように根圏に分泌され、分泌された後どのような運命（動態と機能）をたどるのかについては多くが未解明である。特に圃場環境条件で、植物が生育期間を通して根圏環境をどのように維持しているのかを解明することは、根圏での植物微生物相互作用を作物生産に応用する上で重要である。演者らはダイズの分泌する特化代謝物に着目して研究を行ってきた。ダイズはイソフラボンやソヤサポニン類を根圏に分泌する。圃場条件でこれらの分泌を生育期間を通して解析するとともに、シミュレーションと根箱栽培での検証実験を行い、ダイズが特化代謝物の分泌により根圏環境をどのように維持するのか検討した。その結果、ダイズは生育期間を通して根圏ダイゼイン濃度をほぼ一定に保ち、ダイズ根圏に特徴的な微生物叢を形成することを明らかにした。講演では、メタボローム解析により同定された新しい根圏ケミカルも含め、これら根圏ケミカルの作物生産への応用に向けた研究についても紹介する。

Rhizosphere is a small region around roots. Although it is widely recognized that plant specialized metabolites are important in the rhizosphere, there remains largely unknown at the molecular level how these metabolites are secreted, distributed, and metabolized in the rhizosphere to exert their functions. We used daidzein from soybean as a model to analyze the rhizosphere dynamics of plant specialized metabolites. Using hydroponically grown soybeans as well as field-grown soybeans, we analyzed the secretion of these metabolites into the rhizosphere. The dynamics of daidzein in the rhizosphere were then simulated using the analysis of isoflavone decomposition and distribution. The distribution was further validated using the rhizobox. It was also shown that the bacterial communities were altered depending on the concentration of daidzein and that exert influence to shape the rhizosphere bacterial communities. Functions and its potential of novel rhizosphere metabolites identified from metabolomics analysis will also be discussed.

Rhizosphere, Specialized metabolite

講演番号：3SYp7-3
講演日時、会場：3 月 27 日 14:50～ A16 会場

植物成分で植物病原菌の繁殖を制御する
Control of plant pathogen by phytochemicals

○小鹿 一 (名大院生命農)
○Makoto Ojika (Nagoya Univ.)

農作物の安定供給にとって植物病原菌の防除は極めて重要である。疫病菌は *Phytophthora* 属の植物病原糸状菌で、様々な農作物に大きな損害を与えるため多量の薬剤が使われてきた。しかし、化学農薬の過剰な利用は、環境悪化や耐性菌出現に繋がる。我々は化学農薬に代わる天然由来の環境調和型疫病菌制御剤の開発のための基盤的研究を進めており、これまでの成果を紹介する。

我々は野菜ジュースから疫病菌の無性生殖を阻害する成分 lycoside A～D を発見した。これらは疫病菌の成長は抑制せず、無性生殖器官「遊走子嚢」の形成を IC_{50} = 2.1～7.6 μM で阻害した。遊走子嚢からは無数の遊走子が放出され急速に蔓延し、1，2 週間で圃場一帯を枯らすこともあるので、野菜由来成分であり疫病菌の繁殖能力のみを選択的に阻害する lycoside 類は、環境にやさしい疫病菌蔓延制御剤としての可能性が期待された。本研究では、野菜ジュースに含まれる lycoside 類の真の生産作物の特定、作物における分布、大量取得のための化学合成、無性生殖阻害の作用機構などを進めている。一方、他の活性成分を探索した結果、フラボノイドにも活性を見出した。そこで、11 種のフラボノイドの活性を調べたところ、構造のわずかな違いが活性に大きく影響する（IC_{50} = 4.6～5300 μM）ことが分かった。現在、最も活性の高い genistein の作用機序を遺伝子発現解析により調べている。

Phytophthora is a phytopathogenic fungus, which infects various crops and trees. To control it, excessive chemical pesticides have been used, but it not only causes environmental deterioration, but also leads to the emergence of resistant strains. In this research, the development of naturally-derived environmentally friendly agents that replace chemical pesticides is underway.

Lycoside A to D were discovered from a vegetable mixed juice and found to inhibit the asexual reproduction of *Phytophthora*. They inhibited the formation of asexual reproductive organs "zoosporangia" without suppressing the mycelial growth. Since lycosides are vegetables-derived components and selectively inhibit asexual reproduction, it is expected to be an environmentally friendly control agent. Therefore, we are focusing on identification of the true producer of lycosides, the distribution among various crops, chemical synthesis, and the mechanism of action. In addition, we also found the same activity in flavonoids. Eleven tested flavonoids indicated a variety of the activity depending on their structures. Currently, we are investigating the mechanism of action of the most active genistein by gene expression analysis.

Phytophthora, asexual reproduction, lycoside

講演番号：3SYp7-4
講演日時、会場：3 月 27 日 15:15～ A16 会場

フェアリー化合物の新たな展開
New developments in fairy chemicals

○河岸 洋和 (静岡大グリーン研)
○Hirokazu Kawagishi (Shizuoka Univ.)

フェアリー化合物（fairy chemicals, FCs と略称）とは，フェアリーリングを引き起こすコムラサキシメジ（*Lepista sordida*）から得られた 2-azahypoxanthine（AHX）と imidazole-4-carboxamide（ICA), そして AHX が植物に吸収された後の代謝産物 2-aza-8-oxohypoxanthine (AOH) の総称である。その後，FCs 全てがあらゆる植物体に内生することが判明した。また，FCs は植物の成長・分化・形態形成・代謝などを低濃度で調節することから，我々は「FCs は新しい植物ホルモンである」と考え，研究を進めている[1-3]。さらに，FCs は多くの作物に増収効果を示すことから，農業への実用化を目指して民間会社と共同研究を進めている。最近，全く別の分野（医薬，化粧品）への応用が期待される生物活性を見出した。本シンポジウムでは，最近の基礎科学的な成果と実用化への試みについて紹介する。

1) 河岸洋和，フェアリー化合物は植物ホルモンか？，植物の生長調節，52(2), 78-84 (2017)
2) Kawagishi, H., Fairy chemicals – a candidate for a new family of plant hormones and possibility of practical use in agriculture –, Biosci. Biotechnol. Biochem., 82, 752–758 (2018).
DOI: 10.1080/09168451.2018.1445523.
3) Kawagishi, H., Are fairy chemicals a new family of plant hormones?, Proc. Jpn. Acad., Ser. B, 95(1), 29-38 (2019).
DOI: 10.2183/pjab.95.003

"Fairy chemicals (abbreviated as FCs)" is the inclusive term for 2-azahypoxanthine (AHX) and imidazole-4-carboxamide (ICA) obtained from *Lepista sordida* that causes fairy rings, and 2-aza-8-oxohypoxanthine (AOH) that is a common metabolite of AHX in plants. Later, it was found that all FCs were endogenous to every plants tested. In addition, FCs regulate growth, differentiation, morphogenesis, and metabolism of plants at low concentrations, therefore, we consider that "FCs are a new family of plant hormones". In addition, FCs increase yields of various crops and we are now collaborating with a company with the aim of putting FCs to practical use in agriculture. Recently, we found new biological activities of FCs that are expected to be applied to completely different fields (medicine and cosmetics). In this symposium, I will introduce our recent results.

fairy chemicals

講演番号：3SYp7-5
講演日時、会場：3 月 27 日 15:40～ A16 会場

植物の形態と生物間相互作用の選択的制御
Selective regulation of plant morphology and biological interactions
○浅見 忠男[1]、伊藤 晋作[2]、野村 崇人[3] ([1]東大院農生科、[2]東京農大、[3]宇都宮大学)
○ Tadao Asami[1], Shinsaku Ito[2], Takahito Nomura[3] ([1]The Univ. Tokyo, [2]Tokyo Agr. Univ., [3]Utsunomiya Univ.)

植物ホルモンであるストリゴラクトン（SL）は 1970 年代にはアフリカ・地中海沿岸地域における作物生産に壊滅的な被害を与えている根寄生雑草の発芽誘導物質として知られていたが、2008 年に枝分かれを抑制する植物ホルモンとして再発見された化合物である。つまりストリゴラクトン機能を制御することで，植物の枝分かれに伴うバイオマスの増減や発芽に伴う寄生による被害をコントロールできる。また 2005 年には植物の共生菌であり吸収したリン栄養を供給する AM 菌の菌糸の分岐を誘引することで、共生を促進し植物の生育を助ける物質としても報告されている。今回は植物と根寄生雑草間のコミュニケーションに関わる SL 機能を選択的に制御できる化合物を中心に話題提供する。

１） 自殺発芽誘導剤：最も古典的かつ理想的な方法である。 SL アゴニストを用いる方法とエチレンを用いる方法に大別される。この問題点としてはアフリカでは圧倒的に多い天水を利用する地域では散布の時期が著しく限定されることであり、SL 類の不安定さも問題となる。ただしこの不安定さは宿主との選択性（宿主枝分かれを減少させ収率が下がる）に関係する問題を軽減できる。宿主枝分かれを誘導しない根寄生雑草種子発芽選択的な自殺発芽誘導剤として現在開発中のエチレンアゴニストもその一つである。

２） 受容体阻害剤：根寄生雑草の SL 受容体を特異的に阻害する化合物により、根寄生雑草の発芽を阻害できる。しかしながら宿主に過剰な枝分かれを誘導して収率が下がることを防ぐために、根寄生雑草と宿主の受容体との間の選択性を有する化合物を創製する必要がある。

３） SL 生合成阻害剤：SL の生合成を触媒するカロテノイド開裂型ジオキシゲナーゼやチトクローム Ｐ４５０を標的とする化合物を用いる方法は、宿主の SL 濃度減少に伴う過剰な分げつに伴う収率低下を誘導する可能性がある。分げつを誘導しない選択的な化合物を見出した。また直接的な SL 経路の阻害でなく，SL とジベレリンのクロストークを利用した選択的な化学的制御法も開発中である。

As small molecules can be used to unveil plant hormone functions, many chemicals that can dissect plant hormone functions have been developed and accelerate our understanding of plant hormone signaling. In this context, we developed several chemical regulators for strigolactone functions, such as biosynthesis inhibitors, receptor inhibitors and mimics. Here, we will present the development and/or characterization of known or new chemical regulators for SL functions from the viewpoint of the reduction of crop damage by root parasitic weeds.

strigoractone, root parasitic weeds, branching

講演番号：3SYp7-6
講演日時、会場：3 月 27 日 16:05～ A16 会場

イネいもち病菌の感染防除に関するケミカルバイオロジー研究

Chemical biology of the infection control of Pyricuraria oryzae

本山 高幸、二村 友史、○長田 裕之 (理研環境資源科学研究センター)
Takayuki Motoyama, Yushi Futamura, ○Hiroyuki Osada (RIKEN CSRS)

いもち病菌 *Pyricularia oryzae* は、冷夏の時にイネに深刻な被害を与える病害菌である。抗いもち剤として、様々な薬剤が開発されてきたが、薬剤耐性菌の出現が問題となっており、新しい化学構造・作用機作を有する薬剤の開発が望まれている。本シンポジウムでは、*P. oryzae* のイネへの感染を防除するために、抗菌活性は示さず感染に必要な付着器の形成を抑制する化合物 MO-035 と、直接抗菌活性を示す化合物 YO-001A を見出したので、そのスクリーニング法と生物活性について報告する。

１） 化合物アレイを用いて、メラニン生合成酵素 (SDH1) に対する結合化合物として NPD13731 を見出した。さらに、NPD13731 の構造最適化を行うために類縁化合物 65 個を合成し、最も強力な阻害効果を示す MO-035 を見出した。MO-035 は野生型酵素と農薬耐性型酵素の両方に対して同等(IC_{50}＝1.1, 1.4 nM)の阻害効果を示した。MO-035 のイネいもち病菌防除効果を評価したところ、市販の農薬カルプロパミド (MBI-D) は農薬耐性株に対して大きく防除効果が低下するのに対して、MO-035 は野生株と耐性株の両方に対して同等の防除効果を示した。

２） 深層学習 (Deep learning) を導入したスクリーニング法で、*Pyricularia oryzae* の形態変化を誘導する化合物として、放線菌培養液から YO-001A ($C_{42}H_{72}O_{10}$) を見出した (IC_{50}＝1.2 nM)。本化合物はオリゴマイシン A に類似の新規マクロライド化合物で、それが誘導する形態もオリゴマイシン A の誘導する形態に類似していた。ウシ心筋由来のミトコンドリアで YO-001A の作用を評価したところ、電子伝達系の Complex V を阻害することを明らかにした。

Pyricularia oryzae is a pathogen of the rice blast disease and inflicts serious damage to rice during cold summers. Various antifungal agents have been developed, but the emergence of drug-resistant fungi has become a problem. Therefore, the development of new antifungal agents with new chemical structures and/or new modes of action is needed.

In my presentation, I will talk about screening methods for suppressing the rice blast disease and inhibitors discovered by these screenings.

1) Melanin biosynthesis inhibitor, MO-035

Appressorium is essential for the infection of *P. oryzae* in rice. Melanin is accumulated in the appressorium and helps the fungal infection. Melanin biosynthesis inhibitors such as carpropamid were commercialized but are not used today due to the appearance of resistant fungi. We screened for melanin biosynthesis inhibitors by using the chemical array and the melanin biosynthesis enzyme (SDH1). From ca. 30000 compounds, NPD13731 was identified as an inhibitor of SDH1. Furthermore, among the 65 derivatives of NPD13731, compound MO-035 was selected as the strongest inhibitor. MO-035 showed similar inhibitory activity against the wild type (IC_{50} =1.1 nM) and the carpropamid-resistant enzymes (IC_{50} =1.4 nM). MO-035 also exhibited protective effect on rice against pathogenic fungi.

2) Antifungal screening by artificial intelligence (AI) screening

We have established a morphology-based antifungal screening method. Well-known antifungal antibiotics give different morphologies of *P. oryzae* depending on their mode of action. The morphological changes were clustered by AI. By using this AI screening, we have isolated compound YO-001A from an actinomycete culture broth. The chemical structure of YO-001A ($C_{42}H_{72}O_{10}$) was determined to be a new oligomycin-related compound by spectroscopic analyses. This compound showed strong antifungal activity (IC_{50} =1.2 nM) and induced a similar morphology to oligomycin A. Based on the chemical structure as well as the morphological change, the target of YO-001A was expected to be Complex V in the mitochondrial electron transport system. This was confirmed by an *in vitro* assay.

deep learning, antifungal antibiotics, screening

講演番号：4SYa2-1
講演日時、会場：3 月 28 日 09:30～ A20 会場

One-step RT-PCR using the genetically engineered variant of DNA polymerase with reverse transcriptase activity

○Kiyoshi Yasukawa (Kyoto Univ.)

Since the discovery of polymerase chain reaction (PCR) in 1985, a wealth of information has accumulated regarding nucleic acid-related enzymes. In this symposium, we selected some nucleic acid-related enzymes and described the recent advances in their modification along with their application to nucleic acid amplification.

One-step RT-PCR has not been widely used even though some thermostable DNA polymerases with reverse transcriptase (RT) activity were developed from bacterial and archaeal polymerases, which is owing to low cDNA synthesis activity from RNA. In the present study, we developed highly-sensitive one-step RT-PCR using the single variant of family A DNA polymerase with RT activity, $K4pol_{L329A}$ (L329A),[1] from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga petrophila* K4 or the 16-tuple variant of family B DNA polymerase with RT activity, RTX (F38L/R97M/K118I/M137L/R381H/Y384H/V389I/K466R/Y493L/T514I/I521L/F587L/E664K/G711V/N735K/W768R),[2] from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*. Optimization of reaction condition revealed that the activities for cDNA synthesis and PCR of $K4pol_{L329A}$ and RTX were highly affected by the concentrations of $MgCl_2$ and $Mn(OCOCH_3)_2$ as well as by those of $K4pol_{L329A}$ or RTX. Under the optimized condition, 300 copies/μl of target RNA in 10 μl reaction volumes were successfully detected by the one-step RT-PCR with $K4pol_{L329A}$ or RTX, which was almost equally sensitive enough compared with the current RT-PCR condition using retroviral RT and thermostable DNA polymerase. Considering that $K4pol_{L329A}$ and RTX are stable even at 90−100°C, our results suggest that the one-step RT-PCR with $K4pol_{L329A}$ or RTX is more advantageous than the current one.[3]

1) Sano *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.* **113**, 315-321 (2012)
2) Ellefson *et al.*, *Science* **352**, 1590-1593 (2016)
3) Okano *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.* **125**, 275-281 (2018)

DNA polymease, reverse transcriptase, RT-PCR

講演番号：4SYa2-2
講演日時、会場：3 月 28 日 09:46～ A20 会場

Detection of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by recombinase polymerase amplification

○Kenji Kojima (Kyoto Univ.)

Globally, the number of people newly infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) is gradually decreasing, but the number in developing countries, especially in the sub-Saharan Africa region, is still high. Detecting HIV-1 infection at an earlier stage is important for suppressing the infection in such areas. Recombinase polymerase amplification (RPA) is an isothermal reaction that is conducted at a temperature around 40ºC. RPA is based on the use of a recombinase, a single-stranded DNA-binding protein (SSB), and a DNA polymerase with strand displacement activity. Since the first report in 2006[1)], RPA has been widely used to detect various targets. Unlike other isothermal nucleic amplification methods, RPA has the potential to eliminate the use of specialized equipment to provide the required temperature. We presume that RPA might be the most ideal nucleic acid amplification method for use in point-of-care diagnosis. We attempted to establish an RPA assay to detect HIV-1 reverse transcriptase (RT) DNA. We selected the RNase H domain as a target for amplification because the mutation in the RNase H domain is less frequent than in other regions. Examination using the *in vitro* synthesized DNA showed that a result was obtained in 10-min RPA reaction. Currently, we are trying to develop a method that can be performed without any special equipment from the extraction of nucleic acids in biological samples to the detection of amplification products by RPA.

1. Piepenburg O et al. *PLoS Biol.* **4**, e204, 2006.

HIV-1, recombinase polymerase amplification, nucleic acid amplification test

講演番号：4SYa2-3
講演日時、会場：3 月 28 日 10:04～ A20 会場

Multiplexed detection of single nucleotide polymorphisms via solid-phase primer elongation with ferrocene labelled nucleotides

Mayreli Ortiz[1], Anna Simonova[2,3], Vasoula Skouridou[2], Ioannis Katakis[1], Michal Hocek[2,3], ○Ciara K. O'Sullivan[1,3] ([1]Departament d'Enginyeria Química, Universitat Rovira i Virgili, Avinguda Països Catalans 26, 43007 Tarragona, Spain, [2]Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czech Academy of Sciences, Flemingovo nam.2, 16610 Prague 6, Czech Republic, [3]Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Hlavova 8, 12843 Prague 2, Czech Republic)

An approach for the multiplexed detection and identification of single nucleotide polymorphisms exploiting electrode arrays, primer elongation and ferrocene labelled nucleotides is presented. Solid-phase isothermal primer elongation reaction using ferrocene-labelled 2'-deoxyribonucleoside triphosphates (Fc-dNTPs) was exploited for the electrochemical detection of a single nucleotide polymorphism (SNP). Four 5'-thiolated primers, designed to be complementary with the same fragment of the target sequence and differing only in the last base at the 3-OH' end, were self-assembled with 6-mercaptohexanol on individual gold electrodes of an array. Solid phase isothermal primer elongation using recombinase polymerase amplification (double stranded DNA target) for 15 minutes at 37°C and using an optimised ratio of Fc-dNTPs and natural dNTPs. Square wave voltammetry was used to measure the ferrocene present in the elongated primers. Elongation only occurred with the primer containing the base complementary to the single nucleotide polymorphisms present, with an unequivocal electrochemical signal observed. The platform was applied to the multiplexed detection of SNPs associated with osteoporosis using genomic DNA from a fingerprick blood sample, as well as to the detection of SNPs linked with resistance to the antibiotic rifampicin in *Mycobacterium tuberculosis* again using genomic DNA. Results were validated using next generation sequencing. This generic platform was developed as a proof-of-concept for the detection of an individual SNP, and work is ongoing to extend the platform for the multiplexed detection of SNPs, with a plethora of potential applications in clinical diagnostics, detection of antibiotic resistance and forensics.

ferrocene, RPA, SNP

講演番号：4SYa2-4
講演日時、会場：3 月 28 日 10:22～ A20 会場

Reagentless electrochemical DNA sensor exploiting gold nanoparticles, isothermal amplification and modified primers

Sallam Al-Madhagi[1], Ciara K. O'Sullivan[1,3], Mamantos Prodrimidis[2], ○ Ioanis Katakis[1]
([1]Interfibio Research Group, Department of Chemical Engineering, Universitat Rovira i Virgili, Avinguda Països Catalans 26, 43007 Tarragona, [2]Department of Chemistry, University of Ioannina, 45110, Ioannina, Greece, [3]Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats, Passeig Lluís Companys 23, 08010 Barcelona, Spain)

In this work, we designed a reagent-less DNA sensor exploiting a combination of gold nanoparticles, modified primers, and isothermal amplification, and detecting *Karlodinium armiger*, a toxic microalgae, as a model analyte to demonstrate this generic platform. Colloidal gold nanoparticles with an average diameter of 14 nm were prepared by citrate reduction of $HAuCl_4$ and modified with a mixed self-assembled monolayer of thiolated 33-mer DNA probes and (6-mercaptohexyl) ferrocene. Modified primers, exploiting a C3 spacer between the primer-binding site and an engineered single stranded tail, were used in an isothermal recombinase polymerase amplification reaction to produce an amplicon with a central duplex flanked by two single stranded tails. These tails were designed to be complementary to a gold electrode tethered capture oligo probe, and an oligo probe immobilized on the gold nanoparticles, respectively. The time required for hybridization of the target tailed DNA with the surface immobilized probe and reporter probe immobilized on AuNPs was optimized to be 10 minutes, in both cases. Amplification time was further optimized to be 40 minutes to ensure the maximum signal. Under optimal conditions, the biosensor could detect target dsDNA down to 1.6 fM. Furthermore, the developed sensor was successfully applied to the analysis of genomic DNA extracted from real seawater samples.

DNA sensor, isothermal amplification, nanoparticles

講演番号：4SYa2-5
講演日時、会場：3 月 28 日 10:50～ A20 会場

The simplicity of electrophoresis and electrochemical sensor for reliable and field-applicable analysis of Recombinase Polymerase Amplification

Himankshi Rathore[1], Radhika Biyani[1], Hirotomo Kato[2], Yuzuru Takamura[1], Kenji Kojima[3], Kiyoshi Yasukawa[3], ○Manishu Biyani[1,4,5] ([1]Japan Advanced Institute of Science and Technology, Japan, [2]Jichi Medical University, Japan, [3]Kyoto University, Japan, [4]BioSeeds Corporation, Japan, [5]Biyani Group of Colleges, India)

The recombinase polymerase amplification (RPA)-based isothermal nucleic acid amplification strategy is one of the most rapidly developing methods for performing nucleic acid tests outside laboratory settings. However, the reaction mechanism of RPA at low temperature operation results in unavoidable concerns related to nonspecific and off-target binding of the recombinase enzyme that lead to false-positive results, and thus successful RPA signal detection outside the laboratory has yet to be demonstrated. Here, we developed portable one-inch gel electrophoresis system and disposable electrochemical printed sensor (DEPSOR) for simple and reliable analysis of RPA products to discriminate true-positive results from false-positive and/or negative results generated during the RPA reaction. This talk will highlights: First, the applicability of RPA in combination with palm-size electrophoresis for the detection of 18S rRNA gene analysis of cutaneous leishmaniasis near-to-patient. Second, the applicability of RPA in combination with DEPSOR for the detection of *Escherichia coli* in fresh food sample. Third, the applicability of RPA in combination with lateral-flow strip for the detection of RNase H domain of HIV-1 RT. Our results demonstrate that the combination of robust RPA with FTA card-based direct sampling tools and portable electrophoretic and/or electrochemical devices can revolutionize nucleic acid-based molecular diagnostics for people in settings with poor healthcare infrastructure.

Ref.:
1. Anal Methods 2019: 11, 39, 4953-5072
2. Sensors 2017: 17, 45, s17010045.

DEPSOR, leishmaniasis, RPA

講演番号：4SYa2-6
講演日時、会場：3 月 28 日 11:08～ A20 会場

Application of Loop-mediated isothermal amplification for the diagnosis of infections diseases

○Yasuhiko Suzuki (Hokkaido Univ)

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is a nucleic acid amplification method that can detect DNA or RNA with high specificity, efficiency and rapidity under isothermal amplification conditions. In 2012, WHO recognized the feasibility of molecular detection of TB using LAMP, citing its advantages of being simple and having the potential as a POC diagnostic method. In a policy document released on 2016, WHO advised that a commercial MTB-LAMP (such as Loopamp MTBC detection kit, Eiken chemical company, Japan) may be used as a replacement test for sputum microscopy for the diagnosis of pulmonary TB in adults with clinical signs and symptoms consistent with TB.

Efforts around the research and development of LAMP technology have focused mainly on two areas. First is with the practical application of LAMP to various pathogens in clinical settings, and second is the development of simple and rapid methods for detection of positive LAMP reactions. Several methods have been used to detect positive LAMP reactions: i) by using a real-time turbidimeter that detects turbidity arising from magnesium pyrophosphate formation; ii) by using a real-time PCR machine which detects fluorescence; iii) by visual detection by agarose gel electrophoresis; iv) by visual detection using the commercial Eiken fluorescent detection reagent which requires a UV illuminator to detect positive LAMP reactions; v) by visual detection using other nucleic acid binding fluorescent dyes such as pico green, propidium iodide, SYBR green and gel green; vi) by non-fluorescent dyes that can visually detect positive LAMP reactions such as hydroxylnaphthol blue, malachite green, methyl green and leuco crystal violet.

In this symposium, the development of LAMP based gene diagnostic kits for infectious diseases and their applications will be discussed.

Gene diagnosis, Loop-mediated isothermal amplification, Tuberculosis

講演番号：4SYa2-7
講演日時、会場：3 月 28 日 11:26～ A20 会場

High sensitive nucleic acid detection of intraamniotic bacteria, *Ureaplasma* spp., in maternal peripheral blood

○Itaru Yanagihara[1], Tetsu Wakimoto[1], Yukiko Nakura[1], Kiyoshi Yasukawa[2] ([1]Res Inst, Osaka Women's and Children's Hospital, [2]Grad Sch Agric, Kyoto Univ.)

Annually, 15 million neonates are born preterm, and preterm birth complications are responsible for the deaths of 1 million children. There are several causes of preterm birth, and it is generally accepted that one of the leading causes is an ascending bacterial infection from the reproductive organ. The maternal immune system ensures tolerance toward the developing fetus which predisposes to infections caused by certain microorganisms.

Ureaplasma species belonging to Family *Mycoplasmataceae* that are generally harmless to non-pregnant women can pose a threat to pregnant women. However, there is recent growing evidence that infection with *Ureaplasma* species, is a risk factor for adverse pregnancy outcomes, such as bacterial chorioamnionitis, resulting in preterm birth [1]. In our previous report, 42% of the placentas from patients with miscarriage or preterm birth were positive for *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* [2]. Ureaplasmas and mycoplasms are the smallest self-replicating human pathogenic organisms, relatively difficult to cultivate and to identify by the routine clinical laboratory tests.

Moreover, the current diagnostic method for intra-amniotic infection and for detecting the responsible microorganisms requires amniocentesis, which has the risk of causing intrauterine fetal death or preterm delivery. To avoid these complications, the development of a less invasive detection method for intra-amniotic infection is necessary. We attempted to establish safer and more sensitive diagnostic methods for intrauterine infection in maternal blood, and highly sensitive reverse transcriptase (RT) quantitative PCR for *Ureaplasma* 23S ribosomal RNA (rRNA) using SYBR Green I dye was established. The quantification limit of 23S rRNA (SYBR Green) was 5 copies per reaction which were comparable to that of RT quantitative PCR for Ureaplasma 16S rRNA using TaqMan probe. We, therefore, applied this 23S rRNA detection method for maternal blood. Interestingly, *Ureaplasma* 23S rRNA was detected only in the maternal blood form case group (7/13 cases) but not in control group (0/15 cases, $p < 0.01$). The limitation of our study was based on very small sample size. Therefore, a large sample size prospective study is needed to clarify the association of *Ureaplasma* species in maternal blood with pregnancy outcome.

1. Tantengco OAG, Yanagihara I. *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, **45** (2019),1796, Review.
2. Namba F, Hasegawa T, Nakayama M, Hamanaka T, Yamashita T, Nakahira K, Kimoto A, Nozaki M, Nishihara M, Mimura K, Yamada M, Kitajima H, Suehara N, Yanagihara I. *Pediatr. Res.*, **67** (2010), 166.

We acknowledge Dr. Hirokazu Tsuji (Yakult Central Institute) for valuable suggestions.

Ureaplasma, high sensitive nucleic acid detection, reverse transcriptase quantitative PCR

講演番号：4SYa2-8
講演日時、会場：3 月 28 日 11:44～ A20 会場

Noise reduction in DNA amplification using DNA/RNA helicase

○Shinsuke FUJIWARA (Kwansei-Gakuin Univ.)

DNA amplification by PCR or isothermal method including RPA is now essential for molecular genetics. However, unexpected DNAs (noise) sometimes appear due to primer mis-annealing. To avoid nonspecific DNAs in DNA amplification, various approaches such as optimization of the annealing temperature and Mg^{2+} concentration, hot start approaches by the wax or antibody directed against DNA polymerases in addition to primer redesigning were generally attempted. In the present study, thermostable helicases were applied to reduce noise DNAs in DNA amplification. DNA/RNA helicases, which catalyze the unwinding of duplex nucleic acids using the energy of ATP hydrolysis, contribute to various biological functions involving DNA or RNA. Euryarchaeota-specific helicase *Tk*-EshA (superfamily 2) from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis* unwound forked and 3' overhung DNAs was expected to decrease noise DNAs during PCR. Noise reduction by *Tk*-EshA was confirmed when *Taq* DNA polymerase (a family A DNA polymerase, PolI type) and KOD DNA polymerase (a family B DNA polymerase, α type) were used for PCR (1). Noise bands were especially eliminated during *toxA* gene amplification from *Pseudomonas aeruginosa* DNA, which possesses a high GC content (69%). Another type (superfamily 1B) of helicase, *Tk*-Upf1 from *T. kodakarensis,* was also examined for its effectiveness in PCR and digital PCR. *Tk*-Upf1 had the highest unwinding activity toward 5' overhung DNAs. Noise DNAs were eliminated in the presence of *Tk*-Upf1 at concentrations 10-fold lower than those required to yield a comparable reduction with *Tk*-EshA. When a 5' or 3' overhung mis-annealed primer was included as a competitive primer along with specific primers, noise DNAs derived from the mis-annealed primer were eliminated in the presence of *Tk*-Upf1 as well as *Tk*-EshA. In digital PCR, addition of *Tk*-EshA or *Tk*-Upf1 increased fluorescent intensities and improved separation between common and risk allele clusters, indicating that both helicases functioned as signal enhancers. In comparison with *Tk*-EshA, a smaller amount of *Tk*-Upf1 was required to improve the performance of digital PCR (2). As introduced above, helicase would be a useful tool to reduce noise DNAs in PCR.

(1) Fujiwara et al.: Appl. Environ. Microbiol. 82: 3022 (2016)
(2) Hidese et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 495: 2189 (2018)

Archaea, Helicase, PCR

講演番号：4SYa3-1
講演日時、会場：3 月 28 日 09:35～ A21 会場

腸内フローラにおける胆汁酸代謝と健康と疾病について俯瞰する

Overview of gut microbiota and its bile acid metabolism in health and disease

○中山 二郎[1]、田中 優[2]、船津 結妃[2] ([1]九大院農、[2]九大院生資環)
○Jiro Nakayama[1], Masaru Tanaka[2], Yui Funatsu[2] ([1]Grad. Sch., Fac. Agri., Kyushu Univ., [2]Grad. Sch. Fac. Biore. Bioenv., Kyushu Univ.)

腸管において脂質の吸収を補助する、胆汁中の主成分である胆汁酸の二次機能が大変注目されている。胆汁酸は肝臓でコレステロールから生合成され、抱合型胆汁酸として腸管内に分泌された後、腸内細菌により脱抱合された一次胆汁酸となり、腸管から再吸収されるが、一部は消化管下部に移行し、さらに異性化や脱水酸化された二次胆汁酸となり便とともに排出される。この胆汁酸の体内循環は、コレステロールの体内プール調節に直接的な影響を及ぼすのみならず、宿主細胞の核内受容体 FXR や細胞膜受容体 TGR5 を介したホルモン様の作用により、脂質・糖・エネルギー代謝を制御する。一方、胆汁酸は抗菌活性も有し、腸内細菌叢もコントロールしていると考えられる。また、二次胆汁酸は変異原性を有し発ガンプロモーターともなる。化学構造も多様で抱合型から二次胆汁酸まで併せると 20 を超える分子種が存在し、分子種毎に活性が異なる。このように化学的に多様で多面的な活性を有する胆汁酸であるが、各種疾病との関わり合いを調べた研究は数あるものの、健常者も含めて俯瞰的な解析を進めた例は少ない。そのような中、我々は、胆汁酸と腸内細菌叢と健康との関連性について、国内外の健常成人を始め、乳幼児、肝炎患者、代謝異常症患者を調査している。本講演では、それらの調査結果をもとに、乳幼児期の腸内細菌叢形成と胆汁酸代謝との関連性について、そして成人における腸内細菌叢と胆汁酸代謝と健康および各種疾病との関連性について解説する。

Bile acids (BAs) are synthesized from cholesterol in the liver and secreted into intestine as conjugated form. Thereafter, they are deconjugated to form primary BAs by the function of intestinal bacteria and are then reabsorbed, while unabsorbed primary BAs are transported to the colon, then bacterially metabolized to secondary bile acids, and finally excreted in feces. Whereas the circulation of BAs directly affects the cholesterol pool, they also control host homeostasis through nucleic receptor, FXR, or membrane receptor, TGR5 of host cells. Furthermore, BAs may control gut microbiota with their bactericidal activity. Carcinogenic activity of secondary BAs is also well-known. These activities differ among the chemically diverse BA molecules. Whereas biological studies on BAs have been performed mainly in relation to certain diseases, there is little overview of BAs in human gut microbiota. We have been studying on fecal BA profiles in healthy and disease people from newborn to elderly. In this symposium, correlation between gut microbiota and BA metabolism and its relationship to health and diseases are explained using our dataset.

gut microbiota, bile acid, health and disease

講演番号：4SYa3-2
講演日時、会場：3 月 28 日 10:00～ A21 会場

高脂肪食による菌叢崩壊の要因としての胆汁酸：胆汁酸仮説の証明

Bile acid as a responsible factor for high-fat diet-induced gut microbiota alterations: Proof of “bile acid hypothesis”

○横田 篤、渡辺 真通、藤田 祐己、石塚 敏、吹谷 智（北海道大農）
○ Atsushi YOKOTA, Masamichi WATANABE, Yuki FUJITA, Satoshi ISHIZUKA, Satoru FUKIYA (Hokkaido Univ.)

近年、高脂肪食による腸内細菌叢構成の変化が、メタボリックシンドロームや肝臓がんなどの発症に関与していることが報告されており、さらに腸内細菌—腸—脳の相関が生体機能の恒常性維持に関連していることも指摘されています。このように腸内細菌叢と疾病発症の因果関係は盛んに研究されていますが、その前段となる高脂肪食の摂取が菌叢変化をもたらす機構については殆ど考慮されていません。しかしこの点は因果関係を解明する前提条件となるはずです。

私達は強い殺菌活性を持つ胆汁酸が菌叢を制御する宿主因子であると予想し、ラットに胆汁酸を添加した食餌を与える実験によりこのことを証明しました（Islam *et al.*, 2011）。さらにこの菌叢変化は高脂肪食を与えたマウスのそれと酷似していたこと、さらに胆汁酸の分泌量は高脂肪食摂取により増大することから、私たちは胆汁酸が高脂肪食摂取による菌叢変化の主因であるとする「胆汁酸仮説」を提唱しました。今回、その証明のために、ラットを用いて高脂肪食摂取時と胆汁酸添加食摂取時の盲腸内容物の胆汁酸濃度と菌叢変化の関係を詳細に比較検討した結果、仮説の証明に十分なデータを得ることができました。本講演ではそれらの詳細について報告します。

It has been reported that gut microbiota is involved in metabolic disease development including liver cancer especially on a high-fat diet (HFD). Much work has been done on the elucidation of the causal relationship between HFD-induced gut microbiota alterations and host pathophysiology. However, mechanisms underlying HFD-induced gut microbiota alterations remain unclear.

Previously, we anticipated that bile acid is a host factor that regulates the composition of gut microbiota as bile acid generally exhibits strong antimicrobial activity. This was proved to be correct by simple experiments in which rats were fed bile acid-supplemented diet (Islam *et al.*, 2011). As the observed bile acid-induced gut microbiota alterations in rat cecum were quite similar to those induced by HFDs, we hypothesized that bile acid is responsible for HFD-induced gut microbiota alterations as bile acid excretion increases in response to HFD intake (“bile acid hypothesis”). Here, we successfully proved this hypothesis by examining changes in bile acid concentrations and gut microbiota compositions in HFD-fed group and bile acid-fed group and compared them each other using a rat model. The details will be presented in this symposium.

gut microbiota, bile acid, high-fat diet

講演番号：4SYa3-3
講演日時、会場：3 月 28 日 10:30～ A21 会場

食生活と腸内細菌叢と肝機能

Dietary habits, gut microbiota and liver function.

○中村 強（福岡女子大国際文理）
○Tsuyoshi Nakamura (Fukuoka Women's Univ.)

非アルコール性脂肪肝疾患（Non-alcoholic fatty liver disease；NAFLD）は脂肪肝から肝炎（Non-alcoholic steatohepatitis；NASH），肝硬変，肝がんへと進展しうることから，軽視できない重要な慢性肝疾患の一つであるとされる．近年，NASH の発症機序として Multiple parallel hits hypothesis が提唱されている．腸管や脂肪組織に由来するサイトカインなどの炎症性刺激物質や酸化ストレスなどの種々の因子が肝臓に作用し，脂肪肝を経て，あるいは肝組織を刺激し，直接 NASH 病態形成に至ると考えられている．

次世代シーケンサーの登場により腸内細菌叢の解析は急速に進歩し，腸内細菌は腸管疾患のみならず，様々な病態に何らかの影響することが明らかになりつつある．肝疾患においても，肝臓へ流入する血液の約 70%は門脈からの供給（腸管由来）であることから，腸内細菌叢の不均衡は様々な急性及び慢性肝疾患の病因と進行に寄与するとされている．NASH は腸内細菌叢由来のエンドトキシン，すなわち腸内細菌ならびにその代謝物が NASH の発症に寄与している可能性が示唆されている．実際，NASH 患者の腸内細菌叢は健常者や肥満患者等と比較し，変化することが報告されていることから，腸内細菌叢の正常化に伴って，NASH の発症を抑制する可能性が示唆されるものの，NASH と腸内細菌叢との関連は十分に明らかにされていない．

そこで，無味・無臭の食物繊維である水溶性酢酸セルロース[1]（Water Soluble Cellulose Acetate：WSCA）を用い，確実な NASH 発症が確認されている STAM マウス[2]に投与した際の腸内細菌叢への影響を検討するとともに，肝疾患発症に及ぼす影響を検討した．なお，WSCA とはセルロースの水酸基の一部を酢酸エステル化した新規な物質であり，人工消化試験（人工胃液；pH2.0）にて消化されないこと，健常ラットによる１か月間飼育試験でも血液検査値や臓器重量にも大きな影響を与えないことを確認している．次いで，WSCA を STAM マウスに投与した結果，STAM マウスにて悪化した腸内細菌叢をほぼ正常なレベルにまで改善すること，また本マウスの肝障害や高血糖も改善することが確認された．

次いで，佐賀大学教授北垣先生から供与頂いた麹セラミドを，先と同様，STAM マウスに投与し，その影響も検討したので，併せて紹介したい．

1) Genda T, et al.: J.Agric.Food.Chem.2018, 66, 11909-11916　2) Iida A, Nakamura T, et al.: Exp. Anim. (in press).

It is thought that a number of factors, including oxidative stress and inflammatory stimulants such as cytokines from the intestinal tract and adipose tissue, act on the liver to cause fatty liver or stimulate liver tissue to directly induce non-alcoholic steatohepatitis(NASH).

The emergence of next-generation sequencers has led to rapid advances in gut microbiota analysis, revealing that intestinal bacteria are not only involved in intestinal diseases, but also affect various other pathologies. In liver diseases, about 70% of the blood flowing into the liver comes through the portal vein arising from the intestinal tract. Therefore, it is thought that an imbalance of the gut microbiota can contribute to the pathogenesis and progression of various acute and chronic liver diseases. The involvement of endotoxins from the gut microbiota, i.e., intestinal bacteria and their metabolites, has been suggested in the development of NASH. In fact, it has been reported that the gut microbiota of NASH patients differs from that of healthy subjects, obese individuals, and others. This suggests that normalizing the gut microbiota could suppress the development of NASH. However, the association between NASH and the gut microbiota has not been sufficiently studied.

Therefore, we administered water-soluble cellulose acetate (WSCA) a tasteless and odorless dietary fiber, to STAM mice that have been shown to reliably develop NASH, to examine its effects on the gut microbiota, as well as its impact on the development of liver disease. WSCA is a novel substance obtained by acetate esterification of some cellulose hydroxyl groups. It is not digested in artificial digestion tests (artificial gastric juice; pH 2.0), and blood tests on healthy rats, after a 1-month feeding trial, showed no major impacts on blood test values or organ weight. Administration of WSCA to the STAM mice resulted in the improvement of their deteriorated gut microbiota to a nearly normal state, along with alleviation of liver damage and hyperglycemia.

1) Genda T, et al.: J.Agric.Food.Chem.2018, 66, 11909-11916　2) Iida A, Nakamura T, et al.: Exp. Anim. (in press).

Dietary habits, Gut microbiota, Liver function

講演番号：4SYa3-4
講演日時、会場：3 月 28 日 11:00～ A21 会場

コレステロール異化産物胆汁酸の新規機能と胆汁酸受容体 TGR5

Novel functions of cholesterol catabolite bile acid and its receptor TGR5

○佐藤 隆一郎（東大農）
○Ryuichiro Sato (Univ. of Tokyo)

肝臓はコレステロールの主たる合成臓器であり、1 日 600 ㎎～1g 程度のコレステロールを合成する。一方、生体内でコレステロールは燃焼することも、完全分解することもできず、肝臓において胆汁酸へと異化され、最終的には糞へと排泄される。最終異化産物である胆汁酸の機能解析は長いこと行われてこなかったが、21 世紀になり胆汁酸を結合して活性化される核内受容体 FXR、血中胆汁酸を結合する胆汁酸受容体 TGR5 が発見され、胆汁酸は生理活性物質とみなされるようになった。

演者らは胆汁酸の新たな機能を明らかにする目的で受容体 TGR5 に着目して研究を行った。TGR5 は全身で発現が認められる 7 回膜貫通型の GPCR である。骨格筋における機能を明らかにすべく、骨格筋にヒト型 TGR5 を過剰発現させた Tg マウスを開発し、全身性 KO マウスと比較を行った。その結果、欠損マウス骨格筋は野生型に比べて重量が減少し、また欠損マウスの筋力は有意に低下した。その逆に Tg マウスの筋量は増加し、筋力は生後から 21 か月齢まで野生型より有意に上昇していた。また、TGR5 の遺伝子発現は運動負荷により有意に上昇することを認め、運動により一過的に筋肉に生じる小胞体ストレスがその原因となる機構を明らかにした。また、ヒト TGR5 に結合するアゴニスト活性を有する食品成分を探索し、柑橘リモノイドの 1 種であるノミリンを見出した。ノミリン、もしくはその代謝物であるオバキュノンを含む餌でマウスを飼育すると、抗肥満、筋量増強効果が認められた。以上、胆汁酸の新たな機能を TGR5 活性の観点から紹介する。

Liver synthesizes about 600 mg to 1 g of cholesterol per day. Cholesterol cannot be burned or completely degraded in our body, but is catabolized into bile acids in the liver, and finally excreted into feces. Functional analysis of bile acids has not been performed for a long time, but in the 21st century, the discoveries of a nuclear receptor FXR and a bile acid receptor TGR5 provided clear evidence that bile acids are considered to be bioactive substances.

We focused on the receptor TGR5 for the purpose of clarifying novel functions of bile acids. In order to clarify its function in skeletal muscle, Tg mice in which human TGR5 was overexpressed in skeletal muscle were developed and compared with systemic KO mice. In addition, we searched for food ingredients having agonist activity that binds to human TGR5, and found nomilin, a kind of citrus limonoid. The new functions of bile acids are introduced from the viewpoint of TGR5 activity.

Bile acid, Cholesterol, TGR5

講演番号：4SYa3-5
講演日時、会場：3 月 28 日 11:30～ A21 会場

日本の発酵食品の基盤、麹に含まれるグリコシルセラミドが胆汁酸と腸内細菌の相互作用に及ぼす影響

Interaction of koji glycosylceramide, the base for Japanese fermented foods, and bile acids in the intestine.

永留 真優[1]、北島 悠花[1]、浜島 弘史[4]、柳田 晃良[2]、西向 めぐみ[3]、中村 強[6]、光武 進[1]、永尾 晃治[1]、中山 二郎[5]、○北垣 浩志[1] ([1]佐賀大学、[2]西九州大学、[3]岩手大学、[4]佐賀県工業技術センター、[5]九州大学、[6]福岡女子大学)

Mayu Nagadome[1], Yuka Kitajima[1], Hiroshi Hamajima[4], Teruyoshi Yanagida[2], Megumi Nishimukai[3], Tsuyoshi Nakamura[6], Susumu Mitsutake[1], Koji Nagao[1], Jiro Nakayama[5], ○Hiroshi Kitagaki[1] ([1]Saga University, [2]Nishikyushu University, [3]Iwate University, [4]Industrial Center of Saga, [5]Kyushu University, [6]Fukuoka Womens' College)

発酵食品は健康によいという認識は消費者に共有されているにもかかわらずその根拠となるエビデンスは多くない。我々は日本の発酵食品の多くに独自構造の麹グリコシルセラミドが含まれることを明らかにしてきた。そこで麹グルコシルセラミドを抽出・部分精製して肥満マウスに摂食させその影響を調べたところ、肝臓の代謝を活性化して胆汁酸の分泌を増やし、肝臓コレステロールを低下することを明らかにした。

麹グルコシルセラミドは小腸で分解されずに大腸にまで到達すると考えられたことから腸内細菌への影響を調べたところ、善玉菌である *Blautia coccoides* などを増やすことを明らかにした。そのメカニズムを解明するため、二次胆汁酸とグリコシルセラミド、腸内細菌を共培養したところ、グリコシルセラミドには腸内細菌 *Enterococcus faecalis* や *Esherichia coli* を殺菌力のある二次胆汁酸から守ることを明らかにした。

このことから、麹に含まれるグリコシルセラミドは腸内細菌を二次胆汁酸から守り、最終的に肝臓コレステロールを低下させる働きがあることが明らかになった。この健康作用は日本の発酵食品全般に敷衍できると考えられる。

We have previously elucidated that Japanese traditional fermented foods contain abundant koji glycosylceramide in common. Extracted and semi-purified koji glycosylceramide was fed to obese mice, and it was elucidated that liver metabolism was activated, secreted bile acids were increased and liver cholesterol was decreased in koji glycosylceramide-fed mice. Since the major portion of koji glycosylceramide seemed not degraded in the intestine, it was considered that koji glycosylceramide reached the colon. Therefore, intestinal microbial flora was investigated, and it was elucidated that beneficial microbes such as *Blautia coccoides* was increased in koji glycosylceramide-fed mice. It was considered that koji glycosylceramide protects intestinal microbes such as *Enterococcus faecalis* and *Esherichia coli* from secondary bile acids. These health functions are considered to be shared among Japanese traditional fermented foods.

Biosci Biotechnol Biochem., 83(8):1514-1522 (2019).
Springerplus, 5(1):1321 (2016).

Fermented foods, Glycosylceramide, Bile acids

講演番号：4SYa4-1
講演日時、会場：3 月 28 日 09:30～ A22 会場

腸管の脂質シグナルと摂食行動

Intestinal lipid-derived signals and feeding behavior

○五十嵐 美樹（東京農工大学）
○Miki Igarashi (Tokyo University of Agriculture and Technology)

腸管は単に栄養素を吸収するだけでなく、摂取された栄養素を感知し、消化管ホルモンや神経系シグナルメディエーターを介して代謝や摂食行動を調節する機能を持つ。肥満者の腸管では栄養素を感知する能力や消化管ホルモンの分泌などの低下がみられ、腸管の機能の重要性が示唆される。私達が注目しているシグナルメディエーターであるオレオイルエタノールアミド（OEA）は食欲抑制に働くが、脂肪酸センサーの一つである CD36 に食事由来のオレイン酸が感知されることで生合成が開始されることが報告されている。我々はマウスの腸管に直接油脂（大豆油）を注入する実験を行い、正常動物の腸管では油脂に含まれるオレイン酸を感知して短時間で OEA が生合成され、その後の摂食パターンが変化することを明らかにした。一方、肥満動物の腸管では油脂を注入しても OEA の生合成が起こらず、正常なマウスとは異なる摂食パターンが観察された。また、脂質感知が OEA 生合成の律速であることに加えて、食事由来のオレイン酸が OEA の前駆体であることが報告されている。そこで、現在は食事中のオレイン酸量の違いが摂食パターンに影響を及ぼすかについて研究を進めている。本シンポジウムでは、摂食調節因子としての OEA の機能解析を中心に、最近の研究成果をご紹介させていただく予定である。

Gastrointestinal tract plays an important role in initiating hormonal and neuronal control for energy metabolism in responding to the nutrients. Oleoylethanolamide (OEA) has been reported as a lipid-derived satiety factor in the gut, and dietary fat stimulates OEA synthesis through a fatty acid sensor CD36. Recently, our research focuses on understanding how dietary fat controls biosynthesis of OEA and feeding behavior in mice. Intraduodenal infusion of lipids or oleic acid stimulated jejunal OEA production and subsequently altered feeding behavior. In contrast, obese mice became insensitive to lipids, and intestinal OEA production was reduced compared to lean mice. In addition to its role as a lipid mediator, dietary oleic acid has been reported as a precursor of OEA in the gut. Therefore, we are currently trying to determine whether dietary oleic acid levels modify feeding behavior in mice. In this talk, I will introduce our recent work on OEA as a satiety factor, especially its signaling mechanisms and relation to feeding behavior.

lipid-derived signals, feeding behavior, gut

講演番号：4SYa4-2
講演日時、会場：3 月 28 日 10:00～ A22 会場

求心性迷走神経による過食と摂食リズム異常の改善作用

Improvement of overeating/arrhythimic overeating by vagal afferent nerves

○岩崎 有作（京都府大生命環境）
○Yusaku Iwasaki (Kyoto Pref. Univ.)

過食、そして、非活動期（ヒトでは夜間）の多量の食事は肥満の成因である。しかし、過食・摂食リズム異常を治療する有効な薬剤及び機能性食品は未だ確立されていない。希少糖の 1 種でゼロカロリーの甘味料 D-Allulose（アルロース）が、腸ホルモン Glucagon-Like Peptide-1（GLP-1）の分泌を強く誘導することを見出した。そして、アルロースによる腸 GLP-1 分泌は、内臓感覚神経の求心性迷走神経に発現する GLP-1 受容体を介して摂食量を低下させた。興味深いことに、非活動期前の継続的なアルロース投与は、高脂肪食負荷肥満マウスの摂食リズム異常を是正し、肥満・糖尿病を改善した。従って、GLP-1 を分泌促進させる薬品/食品成分には過食・摂食リズム異常を改善する効果があることが示され、今後の創薬・機能性食品開発分野への応用が期待される。

Overeating and arrhythmic feeding (midnight eating in humans) cause an increase in obesity. However, the effective drugs and/or functional food factors for treatment of overeating/arrhythmic feeding have not been developed yet. Recently, we have demonstrated that D-allulose, which is one of rare sugars and non-calorie sweetener, releases intestinal hormone glucagon-like peptide-1 (GLP-1). GLP-1 release by D-allulose reduces food intake via GLP-1 receptor signaling and via input from the vagal afferents to the brain. Moreover, when administered in a time-specific manner, chronic D-allulose corrects arrhythmic overeating and ameliorates obesity and diabetes. Therefore, GLP-1 releasers including D-allulose, novel drug and functional food factors might be effective in treating arrhythmic overeating, obesity and diabetes.

vagal afferent nerves, food intake, GLP-1

講演番号：4SYa4-3
講演日時、会場：3 月 28 日 10:30～ A22 会場

炭水化物を嗜好する恒常性維持機構～絶食からの回復に炭水化物が欲しくなる脳内メカニズムに迫る

Carbohydrate preference regulating in the hypothalamus tones nutritional homeostasis

○岡本 士毅[1]、箕越 靖彦[2]、益崎 裕章[1] ([1]琉球大医、[2]生理研)
○Shiki Okamoto[1], Yasuhiko Minokoshi[2], Hiroaki Masuzaki[1] ([1]Univ. Ryukyus, [2]NIPS)

我々は、食物をどのようにして選んでいるのか？「美味しさ」によって食物を選ぶ以外にも、生体恒常性を維持するために体が必要とする栄養素を多く含む食物を積極的に選択し摂食する、食嗜好性制御機構が存在する。絶食による全身エネルギー飢餓状態を改善するため、高脂肪食と高炭水化物食を自由に再摂食させると、本来高脂肪嗜好性であるC57BL/6Jマウスが、高炭水化物食を積極的に摂食し、速やかに低血糖の回復と高ケトン体血症の改善をもたらす。この食嗜好性の行動変化を制御するニューロンは、室傍核吻側に存在する一部のAMPキナーゼ反応性コルチコトロピン放出ホルモン（CRH）産生ニューロンであった。

本講演では、炭水化物嗜好性制御CRHニューロンがもたらす行動変容の生理的意義を全身エネルギー代謝の観点と合わせて概説する。

Food selection is essential for metabolic homeostasis and is influenced by the nutritional state, food palatability, and stress. However, the molecular mechanism responsible for selection between a high carbohydrate diet (HCD) and a high-fat diet (HFD) remains obscure. Recently, we identified neurons specifically induced the carbohydrate intake which regulates the complex behavior of the selection between an HCD and an HFD. The activation of AMP-activated protein kinase in a subset of CRH-positive neurons in the paraventricular hypothalamus mediates the fasting-induced increase in HCD selection, resulting in a rapid recovery from the energy crisis.

Food preference, AMPK, CRH

講演番号：4SYa4-4
講演日時、会場：3 月 28 日 11:00～ A22 会場

「空腹は最高の調味料」－その神経基盤の解明

How hunger makes food tastier: a neural network in the hypothalamus

○中島 健一朗[1,2]、傅 欧[1]、岩井 優[3]、成川 真隆[3]、三坂 巧[3]、箕越 靖彦[1,2]（[1]生理学研究所、[2]総合研究大学院大学、[3]東大院農・応生化）
○Ken-ichiro Nakajima[1,2], Ou Fu[1], Yuu Iwai[3], Masataka Narukawa[3], Takumi Misaka[3], Yasuhiko Minokoshi[1,2] ([1]NIPS, [2]SOKENDAI, [3]Univ. of Tokyo)

摂食は動物にとって生命を維持するため最も重要な行動の 1 つである。また、人類は高度な知能や技術を駆使して豊かな食文化を築いてきた。食行動を規定する要因のうち、味覚は栄養豊富な食物を積極的に摂取し、腐敗物や有毒成分を忌避するなど、食物の価値の判断基準として重要な働きを担う。興味深いことに味の好みや感じ方は常に一定ではなく、空腹時には変化する（＝普段より美味しく感じる）ことが経験的に知られていた。しかし、その原因は不明であった。

この疑問を解決するため、我々は脳基底の視床下部に存在し、主要な摂食促進神経としてはたらくアグーチ関連ペプチド産生神経(AgRP 神経)の味覚における役割に注目した。マウスはヒトにおける基本味（甘・旨・酸・塩・苦）を識別できることから、遺伝子改変マウスにおいて AgRP 神経またはその下流の神経の活動をコントロールし、いわば脳内に人工的に空腹状態を作った際の味覚嗜好性を行動試験により検証した。その結果、AgRP 神経を起点とした神経ネットワークには好きな味用の経路と嫌いな味用の経路の 2 種類があり、これらが空腹時に活動することで、味の感じ方や好みが変化することが明らかになった。

Animals including human prefer sweet taste because they signal calorie-rich food, and avoid bitter and sour tastes because they signal spoiled food. However, these basic preferences are modified by internal states such as hunger. Here we found that starved mice have a greater preference for sweetness and a decreased sensitivity to aversive tastes. We next focused on hypothalamic Agouti-related peptide (AgRP)-expressing neurons because they play a central role in the brain to trigger appetite under fasting. Using optpgenetic and chemogenetic approaches, both of which are able to manipulate the activities of AgRP neurons or its downstream neurons in taste evaluation tests, we succeeded in identification of two neural circuits (one for appetitive taste and the other for aversive taste) originating from AgRP neurons that regulate taste preferences under fasting.

Although people have known hunger makes food tastier empirically, our present results show the neural mechanism behind the hunger-induced taste modification.

Appetite, taste, hypothalamus

講演番号：4SYa4-5
講演日時、会場：3 月 28 日 11:30～ A22 会場

単純糖質に対する食欲を調節するメカニズム

Molecular and neural basis for simple sugar appetite

○佐々木 努 (京都大農)
○Tsutomu Sasaki (Kyoto Univ.)

栄養とは、生物が体外から栄養素を摂取し、体を構成したり生活活動を行ったりするのに役立たせる現象である。つまり、生体恒常性を維持するためには、体のニーズに応じて「栄養素に対する食欲とその摂取」を調節する仕組みが必要である。体調に応じて食べたいものが変わったり、特定栄養素の欠乏状態になるとその栄養を素含む食事を食べたくなると言ったことは、現象論として知られている。しかし、特定栄養素の欠乏および摂取による補給を感知する機構を含め、「栄養素に対する食欲」を調節するメカニズムは未解明である。

生体恒常性に基づく食欲の研究は、これまでエネルギー収支を中心に展開されてきた。しかし、エネルギー産生栄養素をエネルギー源（カロリー）と一括りにしてエネルギー収支の観点で解釈しようとすると、各栄養素は判別できなくなる。つまり、「栄養素に対する食欲」は、エネルギー収支にもとづく食欲とは別個に存在することが推察される。

栄養素に対する食欲のメカニズム研究の一環として、我々は単純糖質に対する食欲を調節する Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21)-オキシトシン(OXT)系を同定した (Matsui S, Sasaki T* *et al.*, *Nature Communications*, 2018)。そこで本講演では、「単純糖質に対する食欲」を調節 suru 臓器連関・脳内神経回路に関する研究の最新成果について報告する。

Nutrition is the process of providing or obtaining the food necessary for health and growth. In other words, homeostasis is maintained by the regulatory system that controls appetite for and intakes of nutrients to meet the bodily needs. Phenomenologically, we know what we want to eat changes upon our physical condition. However, the molecular and neural basis that regulates appetite for nutrients remain elusive.

The mechanisms that regulate homeostatic feeding has been elucidated from the energy balance perspective. However, when macronutrients are simply deemed as “calories”, distinctions between nutrients will be lost. Therefore, appetite for nutrients, independent of caloric control, must exist.

Our group has elucidated that the FGF21-oxytocin axis regulates appetite for simple sugars (Matsui S, Sasaki T* *et al.*, *Nature Communications*, 2018). In this presentation, I will give update on our findings on organ cross-talk and neurocircuits that regulates the simple sugar appetite.

nutrient preference, homeostasis, organ cross-talk

講演番号：4SYa5-1
講演日時、会場：3 月 28 日 09:35～ A13 会場

開催にあたって～ポストコッホ微生物学が目指すところ

Toward new microbiology in the post-Koch era

○高谷 直樹 [1,2] ([1] 筑波大生命環境、[2] 筑波大微生物サステイナビリティ研究センター)
○Naoki Takaya[1,2] ([1]Univ. Tsukuba, [2]Microbiology Research Center for Sustainability (MiCS))

令和元年から科研費・新学術領域研究「超地球生命体を解き明かすポストコッホ機能生態学」が発足した。本領域は、農芸化学研究者が中心となって推進している微生物学関連の異分野融合型の研究拠点である。本シンポジウムでは、この拠点の取組の紹介とともに、微生物・理工・情報分野の拠点メンバーによる話題提起を行う。

微生物は、地球上の生きているバイオマスの半分を占めると言われ、種の数も動植物や昆虫を凌ぐ数百万種以上と言われる。従って、地表環境と生物が相互作用し恒常性を維持する超地球生命体を理解するためには、微生物を知ることが重要である。しかし、近年の研究から、99%以上の微生物が未分離であることが分かってきた。本領域では、微生物の新たな分離技術を駆使して、これまでのコッホによる微生物の分離手法の限界を打破し、未だ分離されていない微生物種と機能を解明することを目指している。さらに、得られた情報をもとに、微生物の種と機能およびその生育環境を基軸とした新たな生態系モデルを構築する。この取り組みを通して、超地球生命体の構築原理を解明するための生態系の基盤を創生するとともに、微生物が関わる様々な技術と科学の進展にも貢献する。

The Earth is home to a system of super-terrestrial organisms, where the terrestrial environment and diverse living organisms interact. The number of microbial species ranges in the millions, much greater than the numbers of animal, plant, and insect species. Therefore, understanding microbes is essential for understanding the overall ecology of super-terrestrial living organisms. This symposium introduces the brand-new project “Post-Koch Ecology” supported by Kakenhi for Scientific Research on Innovative Areas.

We will create a novel post-Koch microorganism isolation technique that integrates science, engineering, and microbiology to find microorganisms that have yet to be isolated. Furthermore, we will use functional informatics to take full advantage of ecological and information science to establish a novel ecological system model that is centered on microorganism species as well as their functions and growing environment. This post-Koch functional ecology model will be the basis for elucidation of principles of the super-terrestrial organism system.

Microorganism, screening, ecology

講演番号：4SYa5-2
講演日時、会場：3 月 28 日 10:00～ A13 会場

超ハイスループットな微生物の単離を可能とするマイクロデバイス

Micro device for high throughput microorganisms isolation, culturing and analysis

○佐々 文洋 (九州大情エレ)
○Fumihiro Sassa (Kyushu Univ)

現在の微生物学研究で用いられている培養機器の基本構造の多くはコッホやパスツールツールの時代に開発されたものであり、改良の余地を多く残している。培養分析を行う際には、扱う培地・溶液の容量は多くの場合 mL オーダーであり、1 - 100 細胞程度の微小な代謝では分析に十分な代謝物濃度を得ることができない。また、これらのツールを用いて一人の実験者が同時に分離・培養し、分析できる微生物は数 10～数 100 個程度に限定される。本年度より発足した新学術領域「ポストコッホ機能生態学」で目指す、一つの生態系の微生物種とその生理的機能の多様性の網羅的解明のためには、従来とは桁違いの数のサンプルを処理可能な微生物分離・培養・解析システムの構築が必要である。

講演者らはこれまでに、半導体製造で用いられる微細加工技術を取り入れることで、ナノリットルスケールでの培養と微小コロニーの長期観察が可能な微生物用のマイクロ培養デバイスを開発してきた。これは一回の操作で数万の細菌の同時独立培養、や生体情報（千本単位のグロースカーブなど）の一括取得に成功している。

本講演ではこれまでに開発してきた微生物培養マイクロデバイスとその解析方法・結果、及びポストコッホ機能生態学で今後行うデバイス開発の展望について述べる。

Basic structure of most tools for microorganisms culture was developed in age of Koch and Pasteur. In culturing and analysis with these tools, typically mL order of medium or solution was used. It is difficult to obtain enough concentration of metabolite from small number of bacterial cells with such amount of medium. And more, the number of analysis, isolation and culturing by human hand with the tools is limited to several hundred per day. Drastically larger number of analysis from conventional methods were required for the project “Post-Koch Ecology” which aimed to entire analysis of a ecosystem.

We have developed a micro device for high density bacterial culturing and analysis which can be culture 100,00 order of isolated bacteria with a 3-inch device by employing micro fabrication technique.

In this talk, we show developing the high-density bacterial culturing micro devices and results from the device and discuss plan for device development in the project “Post-Koch Ecology”.

micro device, isolation, cell culturing

講演番号：4SYa5-3
講演日時、会場：3 月 28 日 10:25～ A13 会場

微生物中の分子からの手紙―ラマンスペクトル―を読み解く
Deciphering Letters from the Molecule in Microorganisms

○重藤 真介（関西学院大理工）
○Shinsuke SHIGETO (Kwansei Gakuin Univ.)

分離培養に依拠したコッホ型の微生物学から脱却し、地球上の微生物の 99%以上を占める未分離微生物の解明を加速するため、「ポストコッホ微生物学」の創成が強く望まれている。我々はポストコッホ微生物学の核となる新たな微生物解析手法として、「分子からの手紙」を受け取り読み解くラマン分光によるアプローチを提案する。ラマンスペクトルデータの超高次元化（ラマンスペクトルビッグデータ）を図ることで、土壌などの環境試料中の多種多様な微生物の種と生理機能の識別を目指す。本講演では、これまでに我々がおこなってきた、ポストコッホ微生物学への展開につながるラマン分光の微生物への応用研究について、以下に挙げるトピックスを中心に紹介する。

(1) 多変量データ解析 MCR-ALS を用いた糸状菌菌糸のラマンハイパースペクトルイメージング
(2) ラマンスペクトルデータの機械学習によるプラスミド保持株・非保持株の判別
(3) チップ増強ラマン分光を用いた細菌メンブレンベシクルの１粒子表面化学分析

これらの研究例を通じて、ラマン分光の持つ高いポテンシャルを示すとともに、ポストコッホ微生物学開拓における戦略についても触れたい。

The vast majority of microorganisms existing on the Earth has eluded the conventional Koch-type microbiology and remains as microbial dark matter. To accelerate elucidation of such microbial dark matter and establish post-Koch microbiology, we propose to use Raman spectroscopy, which is capable of obtaining and reading “letters from the molecule” in living microbial cells. By analyzing Raman spectral big data with state-of-the-art informatics techniques, we aim to understand the species and functions of various microorganisms in environmental samples such as soil. In this Symposium talk, I will present our recent achievements that illustrate the high potential of Raman spectroscopy toward post-Koch microbiology. The topics to be covered include:

(1) Raman hyperspectral imaging of hyphae of a filamentous fungus using MCR-ALS
(2) Differentiation between plasmid-harboring and non-harboring cells based on machine learning of Raman spectral data
(3) Surface chemical analysis of single bacterial membrane vesicles using tip-enhanced Raman spectroscopy

Raman microspectroscopy, hyperspectral imaging, spectral big data

講演番号：4SYa5-4
講演日時、会場：3 月 28 日 10:55～ A13 会場

単離培養から紐解く稀少微生物たちの実態と多様性

Exploration and mining of rarely cultivated microorganisms in the environment

○中井 亮佑[1]、玉木 秀幸[1,2,3] ([1]産総研・生物プロセス、[2]筑波大・生命環境、[3]東京大・生セ)
○Ryosuke Nakai[1], Hideyuki Tamaki[1,2,3] ([1]AIST, [2]Univ. Tsukuba, [3]Univ. Tokyo)

環境 DNA 解析技術の革新と普及が微生物の“超”多様性を導く一方で、21 世紀を迎えてなお、自然界に存在する環境微生物の圧倒的大多数が培養困難である。新たに発足した新学術領域で目指す微生物を基盤とした「ポストコッホ機能生態学」を創成するためには、ボトルネックたるこれら難培養性微生物の実態解明が必要である。講演者らは、培養頻度のきわめて低い稀少微生物を単離する趣向を凝らした培養法を開発・研究してきた。例えば、フィルター濾過によるサイズ選別を活用しながら、極小アクチノバクテリア（*Aurantimicrobium* 属細菌）や高次分類基準で新しい微生物（*Oligoflexia* 新綱細菌等）を可培養化した。この研究により、稀少微生物の少なくとも一部が超微小な細胞サイズを有することを見出した。また、古典的培養法の再考、すなわち培地の支持体・成分・調製法の検討にも取り組み、一例を挙げると、培地調製法の改良によって稀少系統 *Gemmatimonadetes* 門細菌のコロニー形成が改善されることを実証した。本講演では、一見地味ではあるが、稀少微生物の単離に繋がった“培養のコツ”を概観するとともに、ポストコッホ技術との分野横断的融合が生み出すシナジー、そして今後の展望を述べたい。

The advent of high-throughput “omics” technology has greatly expanded our knowledge of microbial diversity. However, the majority of microorganisms in the environment have not grown in the laboratory, even in this revolutionized sequencing era. To explore such “microbial dark matter,” we have developed novel strategies to isolate and cultivate the unseen microorganisms. To date, we have succeeded in recovering and culturing some fastidious bacteria (e.g., members of the novel proteobacterial class *Oligoflexia*) through size-selective filtration. We have also improved conventional culture techniques, and one of our previous studies has demonstrated that a simple modification in media preparation can improve the colony-formation ability of microorganisms, including members of the rarely cultured phylum *Gemmatimonadetes*. In this talk, we will review the “bacterial cultivation tips” found through these previous trials, and discuss about the promise of innovative cultivation approaches targeted in the newly launched scientific project “Post-Koch Ecology.”

microbial diversity, uncultured bacteria, isolation

講演番号：4SYa5-5
講演日時、会場：3 月 28 日 11:20～ A13 会場

ポストコッホ微生物学のためのバイオインフォマティクス
Bioinformatics for Post-Koch Microbiology

○岩崎 渉、松井 求（東京大理）
○Wataru Iwasaki, Motomu Matsui (UTokyo)

ポストコッホ生態系を解き明かすためには「生態系の成り立ち」と「微生物と環境の相互作用」の両方の理解が不可欠である。しかし、自然界に存在する大部分の微生物が未解明である、生態系をめぐる環境の情報が不足している、という二つの理由から、いずれの理解もほとんど進んでいなかった。新学術領域研究「超地球生命体を解き明かすポストコッホ機能生態学」の中で、我々は、他研究班と連携をとりながら生態学と情報学の新たな複合領域である「機能インフォマティクス」を創出することで、ポストコッホ生態系の解明を目指している。本講演では、特に微生物生態系を解明するためのバイオインフォマティクス技術に関して、我々のこれまでの研究を紹介するとともに、今後の展開について議論を行いたい。

To understand “Post-Koch” ecosystems, it is needed to know how ecosystems develop and how microbes and environments interact each other. However, because most microbes in natural ecosystems are still unknown and data for revealing environment-microbiome interactions are still insufficient, those objectives have been difficult to be achieved. In the Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas Post-Koch, we will integrate ecology and informatics to explore the functional informatics field for understanding the Post-Koch ecosystems. In this talk, we will present bioinformatics technologies to reveal microbial ecosystems and facilitate discussion toward those objectives.

Bioinformatics, Genomics, Microbial ecology

講演番号：4SYa6-1
講演日時、会場：3 月 28 日 09:30～ A14 会場

藻によるモノづくり ～探索・遺伝子・物質生産～
Algal Biorefinery ～search・gene・production～

○朝山 宗彦 (茨城大農)
○Munehiko Asayama (Ibaraki Univ.)

モデル光合成微生物であるシアノバクテリア（藍藻）の先祖は，太古の地球に酸素をもたらし，植物葉緑体の起源となった生き物である． その光合成能は， 植物の数十倍とも言われ， 無機物より有用有機物を作りだすことのできる優れた生産者であることから，近年，藻によるモノづくり（藻バイオリファイナリー）に関する研究が世界中で活発に行われている．

こうした背景を踏まえ， 本講演では, 藍藻を含む有用な微細藻類の探索から， 遺伝子発現や機能の解析を通して，天然藻や遺伝子組換藻を活用した有用物質（バイオ燃料，バイオプラスチック，色素，多糖など）生産ならびに商品開発など実用化を目指した事例も紹介しながら，その苦労や魅力について語る．

Cyanobacteria (blue-green algae) are model microorganisms that have strong photosynthetic capabilities and are used as a resource in biorefineries to produce fuels, fertilizers, feed, fiber, and food *etc*. Therefore, algae research has been actively conducted around the world.

Based on this background, in this lecture, hardships and attractiveness would be talked about search for useful microalgae involving cyanobacteria, gene expression and the functional analyses, and production and their developments of useful materials (biofuels, bioplastic, pigments, polysaccharides) for biorefinery.

microalgae, biorefinery, useful material production

講演番号：4SYa6-2
講演日時、会場：3 月 28 日 09:55～ A14 会場

海洋シアノバクテリア由来の生物活性物質
Bioactive Substances from Marine Cyanobacteria

○末永 聖武[1]、岩﨑 有紘[1]、森田 真布[1]、佐藤 英祐[1]、照屋 俊明[2]、大野 修[3]([1]慶大理工、[2]琉大教育、[3]工学院大先進工)
○Kiyotake Suenaga[1], Arihiro Iwasaki[1], Maho Morita[1], Eisuke Sati[1], Toshiaki Teruya[2], Osamu Ohno[3] ([1]Keio Univ., [2]Univ. of Ryukyu, [3]Kogakuin Univ.)

海洋生物からは多様な化学構造をもつ生物活性物質が数多く単離されており、医薬品のリード化合物や生命科学研究試薬となる新規物質の探索源として期待されている。演者らは、有用物質の探索限として、海洋シアノバクテリアに注目している。鹿児島県奄美諸島、沖縄県各地で海洋シアノバクテリアを採集して抽出分離を行い、異常アミノ酸や *N*-メチル酸を含むペプチド、脂肪酸と結合したリポペプチド、マクロリドなど多数の新規物質を発見している。これらの物質の中には、ヒト腫瘍細胞に対する顕著な増殖阻害、抗マラリア活性、熱帯病原虫に対する毒性などの生物活性を示す。本講演では、ヒト腫瘍細胞に細胞死を誘導するマクロリド、ビセリングビアサイド類や、ナガナ病の原因原虫に対して顕著な毒性を示すホシノラクタム類を中心に、単離構造決定や作用機構、化学合成など演者らの研究について述べる。

Marine organisms are rich source of biologically active compounds that are useful for therapeutic agents and research tools. We have particularly focused on marine cyanobacteria as a source of novel bioactive molecules. We have collected marine cyanobacteria at Amami Islands in Kagoshima prefecture and various islands in Okinawa prefecture, and found a lot of new compounds with unique chemical structures such as peptides with unusual amino acids, lipopeptides with fatty acid moieties, and macrolides. Some of those substances show biological activities such as growth inhibitory activities against cancer cells, and anti-malarial activities, and protozoa that cause tropical diseases. We are going to talk about our studies on cytotoxic macrolides biselyngbyasides and hoshinolactams with potent antitrypanosomal activity.

bioactive substances, marine cyanobacteria, tropical diseases

講演番号：4SYa6-3
講演日時、会場：3 月 28 日 10:20～ A14 会場

シアノバクテリア特異的な細胞外多糖合成系の解明

Identification of cyanobacterial exopolysaccharide biosynthesis systems

○前田 海成[1]、奥田 裕紀子[2]、榎本 元[3]、成川 礼[4]、渡辺 智[1]、池内 昌彦[2]([1]東京農大バイオ、[2]東大院総合文化、[3]フライブルク大学、[4]静岡大理)
○Kaisei Maeda[1], Yukiko Okuda[2], Gen Enomoto[3], Rei Narikawa[4], Satoru Watanabe[1], Masahiko Ikeuchi[2] ([1]Tokyo Univ. of Agri., [2]Univ. of Tokyo, [3]Univ. Freiburg, [4]Shizuoka Univ.)

細胞外多糖(EPS)は主に微生物が細胞外に放出・蓄積する多糖であり、微生物の固着性やストレス耐性などの重要な機能に関わる。また、EPS はセルロースや寒天に代表されるように、食品・工業材料・医薬品などとして幅広く応用利用されている。酸素発生型光合成をおこなう原核生物であるシアノバクテリアにおいても、多種多様な EPS の存在とその生態への寄与が知られている。しかし、EPS 合成メカニズムについてはほとんど明らかにされていない。シアノバクテリアの EPS 合成系の解明は、EPS の多様性や生態環境における微生物マットやブルーム形成の理解にとどまらず、シアノバクテリアを用いた EPS の応用研究にも繋がると考え、我々は研究を進めてきた。

本発表においては、シアノバクテリア特異的な EPS 合成基質の合成酵素、細胞外セルロース合成系、細胞外硫酸多糖合成系について述べる。また、これらの研究で得られた知見をもとに、シアノバクテリア EPS の応用利用の可能性についても議論する。

Exopolysaccharides (EPSs) are extracellular polysaccharides produced by microorganisms, and are involved in important functions such as adhesion of cells and stress tolerance. In addition, EPSs are widely utilized as food, industrial materials and medicine, as represented by cellulose and agar. Cyanobacteria that perform oxygen-generating photosynthesis are known to produce a wide variety of EPSs playing an important role in ecology. However, little is known about the EPS biosynthesis mechanisms.

In this presentation, we will describe three cyanobacteria-specific topics for EPS biosynthesis: NDP-sugar pyrophosphorylase, extracellular cellulose biosynthesis, and extracellular sulfated polysaccharide biosynthesis. In addition, based on these studies, we will discuss about possible application of cyanobacterial EPSs.

cyanobacteria, exopolysaccharides, biofilm

講演番号：4SYa6-4
講演日時、会場：3 月 28 日 10:45～ A14 会場

長期高温培養による適応進化実験からシアノバクテリアの可能性を探る

Identification of genomic variants during long-term adaptaion in a cyanobacterium.

○兼崎 友[1]、渡辺 智[2] ([1]静岡大・グリーン研、[2]東京農大・生命科学)
○Yu KANESAKI[1], Satoru WATANABE[2] ([1]Shizuoka Univ., [2]Tokyo Univ. of Agric.)

近年、微生物を材料としたバイオマス物質生産系の開発が盛んに進められている。しかし有用な形質を持った生物種の探索は大変であり、またそこからの有用形質株の選抜や育種はさらに困難な作業である。様々な遺伝子改変技術が開発される一方で、自然突然変異の累積により実験室進化を試みる研究も盛んになっているがシアノバクテリアにおいて研究例は限られている。研究室でよく用いられる常温性のシアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942 は、生育上限温度は 43℃であることが知られており、それ以上の高温条件に曝すと分裂異常によりフィラメント状になり細胞増殖の抑制が観測される。また僅か 20 分間、50℃に曝しただけでも細胞の生存率は 50%まで低下する。これまでにシアノバクテリア *S. elongatus* PCC 7942 において、多くの熱ショックタンパク質群やいくつかの高温誘導性遺伝子の発現制御因子が見つかっているが、遺伝子組換え実験系を用いても 45℃以上での連続培養に成功した例はない。どれほどの変異の蓄積が *S. elongatus* PCC 7942 の生育上限温度の突破に必要なのかは生物進化的にも応用生物学的にも興味深いテーマである。

我々は全ゲノムリシーケンス解析でゲノム情報を再確認した *S. elongatus* PCC 7942 TUA 株をベースに、高温順化を繰り返しながら長期培養をおこない、高温ストレスにおける生育限界を超える突然変異株を作出できるかどうか試みている。その結果、培養開始より 2 ヶ月の段階で 45℃の壁を越えた培養が可能になり、4 ヶ月の段階で 48℃での連続培養が可能な変異株が取得できた。またこのような自然突然変異株は思った以上に容易に作出できることも分かってきた。これまでに高温耐性との関わりが報告されていない複数の遺伝子座への変異が見つかったため、分子生物学的手法により高温耐性の獲得に寄与した遺伝子座の同定を進めた結果、候補が絞られてきた。このような自然突然変異の累積により得られる適応進化株は遺伝子組換えによらない微生物育種法として様々な応用が可能と思われる。

The genome sequence of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (strain JGI) was determined in 2005. The *S. elongatus* PCC 7942 is the mesophilic photosynthetic organism. We tried long-term adaptive evolution to obtain mutants which are able to proliferate more than a growth limit of high temperature, 43℃. We successfully obtained several spontaneous mutants which are able to growth more than 45℃ on the BG-11 agar plate. These mutants showed unique transcriptional profile comparing to that of wild-type cells. We identified all spontaneous mutated loci in the genome of the mutant cells by resequencing analysis. By verification of the mutations, we found that a responsible gene associated to the phenotype of cellular thermo-tolerance. The result of this study also enabled us to understand genomic instability, heterogeneity, and microevolutionary events during long-term cultivation of the cyanobacterium. This issue is particularly important, especially when cyanobacteria are used in metabolic engineering. Differences in genetic background would also affect the efficiency of biomass production by cyanobacteria.

cyanobacteria, genome analysis, long-term experimental evolution

講演番号：4SYa6-5
講演日時、会場：3 月 28 日 11:10～ A14 会場

宇宙環境における藍藻利用の可能性

Utilization of cyanobacteria in extraterrestrial environments

○横谷 香織（筑波大）
○Kaori Tomita-Yokotani (Univ.of Tsukuba)

宇宙環境でシアノバクテリア（藍藻）を利用する可能性について考える時、まず太古の地球の大気の酸化にこの生物が深く関与していることを除いては語れない。宇宙環境は、好気生物が必要とする酸素を含む大気はなく真空で、生物にとって極めて危険な宇宙放射線が飛び交う。唯一、エネルギーとして利用できる太陽光は、光合成微生物の藍藻にとって、生存維持の可能性を期待できる要素である。逆に、太陽光が到達する惑星で僅かでも水が存在すれば、繁茂が可能であるとも考えられる。

生物の惑星間の移動の可能性や、地球上生物がどの程度宇宙で生存が可能であるのかについて、これまでに国際宇宙ステーション（ISS）外の曝露装置を利用した、「たんぽぽ」計画の中で検証された例がある。他国でも藍藻の曝露実験がなされている。これらの実験の結果や、現在進行中の実験について、簡単に説明したい。現在までに得られている結果から、藍藻は過酷な宇宙環境の多くの要素に高い耐性を備えていることや、宇宙空間をある程度の期間、移動できる可能性が考えられる。

昨今、現在の地球の成り立ちや生物の機能を知る手がかりを得る手法のひとつとして、宇宙が研究の場として利用されるようになってきている。宇宙の場は、地球の成り立ちの詳細の検証の場として役立つと供に、究極な過酷環境における利用の可能性の検証は地球が人類にとって過酷な環境に陥った場合にも、過酷環境内で居住の場を開拓する技術に発展する可能性を備えることから、全ての技術が、現在の地球上の過酷な場にも還元することが可能である。究極な過酷環境における利用の可能性の検証は、火星環境を想定した藍藻の利用の可能性についても総合的に考察したい。

Cyanobacteria, also Known as blue-green algae were the first organisms to evolve oxygenic photosynthesis, and changed the Earth's atmosphere from anoxic to oxic. Some organisms, such as cyanobacteria, are potential candidates for introduction into closed bio-ecosystems with assuming extraterrestrial environments. A terrestrial cyanobacterium, which is well known to have high tolerances for extraterrestrial environments, was used as a material for "Space Experiment". Herein, I discuss the results of this study and the plan of next space experiments, and the total contribution made by the candidate organisms from the perspective of closed bio-ecosystems for extraterrestrial environments.

cyanobacteria, space experiment, utilization

講演番号：4SYa6-6
講演日時、会場：3 月 28 日 11:35～ A14 会場

タンパク質源としてのスピルリナ大規模栽培と商品化

Potential protein source of future -The large scale cultivation and commercialize of raw Spirulina-

○林 宏恵 (株式会社タベルモ)
○Hiroe Hayashi (Taberumo Corporation)

2050 年、世界の人口は 97 億人に達し、食糧危機の訪れが懸念される中、人間に必須の栄養素であるタンパク質の需給バランスは、2030 年にも崩れると予測されている。株式会社タベルモは、限られた土地や水から、最も効率的にタンパク質を生産できる藻類スピルリナを活用することで、タンパク質危機の解決し、人々が持続的に健康に暮らせる世界の実現を目指している。

弊社では、生食できるほど新鮮で衛生的な冷凍製品化の技術を確立したことにより、タベルモ®（生スピルリナ）を、2015 年から発売し市場に提供してきた。2019 年 10 月には新たにブルネイの 1ha の土地に、建物総面積 3500m2 の生産工場を竣工し、今後は株式会社ちとせ研究所の持つスピルリナを効率的に大量栽培できる PhotoBioReactor (PBR)栽培技術を導入することで、これまでより安価で安定したスピルリナの供給を目指している。現在、スピルリナが食品としてより多くの人々に受け入れてもらえるよう「藻を食べる文化」の普及を進めており、その一環としてタベルモ®を使った商品を開発し販売を進めている。

As the global population grows and dietary habits change in accordance with economic development in emerging countries, worldwide protein demand is expected to increase substantially in the future. There are forecasts that the balance of protein supply and demand will collapse as early as in 2030. Spirulina is a kind of algae which contains condensed nutrients essential for human and enables high biomass production of protein in the limited area with the limited water. Tabérumo corporation aims to solve the protein crisis and realize sustainable food supply and health for humans by producing Spirulina and creating the new culture / eating habit of Spirulina. Our raw Spirulina “Tabérumo” is a product that maximizes the strength of Spirulina’s odorless fresh taste and rich nutrients. After we established the strict safety and hygiene cultivation technology to create a high-quality spirulina which is safe to be consumed raw, we came to market with the product in 2015. We launched cultivation and processing facility in Brunei Darussalam this year. The large-scale cultivation of spirulina using PhotoBioReactor (PBR) which is developed by Chitose Laboratory Corp. will enable to provide the most affordable and the stable supply.

spirulina, algae, protein

講演番号：4SYa7-1
講演日時、会場：3 月 28 日 09:30～ A15 会場

スマートセルインダストリーに資するハイスループット微生物構築・評価技術の開発

Development of high-throughput microorganism construction and evaluation technology that contributes to smart cell industry

○蓮沼 誠久[1,2] ([1]神戸大先端バイオ、[2]神戸大科技イノベ)
○Tomohisa Hasunuma[1,2] ([1]Kobe Univ. EGBRC, [2]Kobe Univ.)

近年の次世代シーケンサーの開発，分析装置の高解像度・高感度化，遺伝子・タンパク質配列解析等の情報解析技術の進展により，バイオ関連データが爆発的に増加している。他方，ゲノム編集や DNA 合成に代表される遺伝子工学ツールに革新が起こり，バイオ操作を自動で行うラボオートメーションが実装されつつある。そこで，ビッグデータから抽出した有用情報を活用し，先端的な遺伝子工学で生物代謝を改変する Engineering Biology の社会実装が世界的に進んでいる。バイオ生産に資する細胞株の構築において、①バイオデータを利用して計算機内で組換え微生物の代謝等を設計する Design 工程、②カタログ化した DNA パーツとロボティクスを活用して多様な組換え微生物を短時間で構築する Build 工程、③目的物質の生産性を短時間で評価する Test 工程、④評価結果と当初設計の差異を計算科学的に解析する Learn 工程、を有機的に連携させることで DBTL とし、従来の開発期間を短縮させることに成功しつつある。NEDO スマートセル PJ では「高度に機能がデザインされ，機能の発現が制御された生物細胞」をスマートセルと定義し，スマートセルを用いた次世代産業「スマートセルインダストリー」への展開を目指している。本講演では，スマートセルインダストリーに資するハイスループット微生物構築・評価技術の開発について紹介する。

With the advent of next generation sequencer, the genome information explosively increased. Development of lots of genetic tools including genome editing has enabled precise control of gene expression. We are trying to develop strategies for breeding Japanese unique industrial microorganism ″smart cell″ at ultra-high speed by the consolidation of advanced biotechnology and information analysis. The first challenge is the development of “high throughput synthesis, analysis and evaluation technology” consisting of “long-chain DNA synthesis technology” to effectively modify genes of microorganisms, “high throughput microorganism construction technology”, and “high-precision omics analysis” necessary for designing in silico cell models. The second is to develop “metabolic pathway design technology” for new substance production and substance productivity improvement. We are aiming to build a platform that integrates the technologies and systematize it. I will introduce our recent progress on the Design-Build-Test-Learn cycle which can be applied for producing high functional substances with microorganisms.

Metabolic Engineering, Metabolomics, High throughput technology

講演番号：4SYa7-2
講演日時、会場：3 月 28 日 10:00～ A15 会場

スマートセル設計システムの概要

Computational Approach for Smart Cell Production

○油谷 幸代[1]、荒木 通啓[2]、白井 智量[3]、亀田 倫史[1] ([1]産総研、[2]京都大学、[3]理研)
○Sachiyo Aburatani[1], Michihiro Araki[2], Tomokazu Shirai[3], Tomoshi Kameda[1] ([1]AIST, [2]Kyoto Univ., [3]RIKEN)

近年、ゲノム編集技術をはじめとした各種バイオテクノロジー技術の進展により、生体細胞を用いた「バイオものづくり」の分野の世界的競争が激化している。この分野で先行している欧米では、宿主細胞改変のため大量データ取得を前提とする機械学習を基盤とした情報科学技術を利用している。本プロジェクトでは、機械学習のみを利用した時の短所である「大量データ」と「宿主依存型」の 2 点を解消し、我が国独自の情報解析技術や優位に立っている情報生物学的手法を統合的に組み合わせたスマートセル設計システムを開発している。

開発中のスマートセル設計システムでは、「文献等からの知識抽出・学習技術」「代謝経路設計技術」「発現制御ネットワーク構築技術」「導入遺伝子配列設計技術」「酵素改変設計技術」の 5 つの情報解析技術を基盤としている。これら情報解析技術の理論的基盤は既にプロジェクト参画者によって論文発表されており、理論体系としては確立されてきたものである。本プロジェクトでは、このように理論的に裏打ちされた各種技術の実用化利用を目的とし、生産現場において様々な課題を有する実証課題群と連携している。開発してきた理論基盤を各実証課題におけるスマートセル設計用に改良・改変を行うとともに、得られた結果を物質生産現場へフィードバックすることで、より実践的に利活用できる情報解析技術の開発を行ってきた。本講演では、開発してきた情報解析技術を紹介するとともに、いくつかの実証課題への適用例と具体的成果について紹介する。

To realize smart cells for bioproduction fields, we are developing computational system for analyzing several types of biological data sequentially. In our developing system, we utilize several types of computational approaches: “Knowledge based machine learning”, “Metabolic pathway design”, “Regulatory network analysis”, “DNA sequence design” and “Molecular Dynamics simulation”.

Our system can analyze the several types of biological data, including genomic data, gene expression profiles, sample conditions, phenotypic data and so on, comprehensively. We can suggest the optimal solutions for high efficiency in host microorganisms. We evaluated the accuracy of our system by some real bioproduction problems. In this presentation, I’ll show you the outline of our developing system and applied computational techniques. Furthermore, I’ll introduce some application examples of our system.

Computational Pathway Design, Network Analysis, Molecular Dynamics Simulation

講演番号：4SYa7-3
講演日時、会場：3 月 28 日 10:30～ A15 会場

微生物スマートセル創出プラットフォームの実用化検証

Proof of concept for the microbial smart cell creation platform

○矢追 克郎（産総研生物プロセス）
○Katsuro Yaoi (AIST)

NEDO「植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発」プロジェクトでは、「物質生産性を高度に高めた細胞（スマートセル）」を創出する「スマートセル創出プラットフォーム」の構築を行っている。DBTL（Design - Build - Test- Learn）サイクルというコンセプトを活用しており、「Design」領域では、代謝経路設計、酵素選択や改変、遺伝子発現制御などスマートセル設計のための情報解析技術の開発を行っている。「Build」領域では、長鎖 DNA 合成やハイスループットな組換え微生物構築技術を利用し、「Test」領域の技術で構築株の生産性解析や各種オーミックス解析を行う。得られたデータを「Learn」領域の技術である AI などを活用し、その学習成果をあらためてデザインに活かす、という DBTL サイクルをまわすことで、効率的な微生物育種を目指している。そして、DBTL サイクルを用いたスマートセル創出プラットフォームを、実際に企業等のターゲットについて適用する「検証課題」を実施している。本講演では、これら検証課題の中から、いくつかの具体的事例を紹介する。

New Energy and Industrial Technology Development Organization (NEDO) launched the project “Development of Production Techniques for Highly Functional Biomaterials Using Smart Cells of Plants and Other Organisms (smart cell project)”. Smart cells are living organisms and cells designed for high functionality and expression of those functions. In this project, we develop the microbial smart cell creation platform using the Design–Build–Test–Learn (DBTL) cycle concept. In the “Design” step, we develop information analysis technologies for smart cell design, such as metabolic pathway engineering, computational enzyme selection and modification techniques, and gene expression control. In the “Build” step, we use long DNA construction and high-throughput recombinant microorganism production techniques to construct the designed smart cells. In the “Test” step, productivity analysis and various -omics analyses are conducted on the constructed cells. AI technology is utilized in the “Learn” step, and its results are integrated to improve the design. Efficient microbial breeding can be performed using the DBTL cycle. In addition to developing the technologies underlying each of these steps, we validate the effectiveness of the smart cell creation platform through application to specific industrial processes as proof of the concept. In this talk, I will introduce some results of this proof-of-concept application.

smart cell, DBTL cycle, synthetic biology

講演番号：4SYa7-4
講演日時、会場：3 月 28 日 11:00～ A15 会場

スマートセル創製技術を活用した芳香族化合物生産コリネ型細菌の開発
Development of genetically engineered *Corynebacterium glutamicum* for the production of aromatic compound using Smart Cell technology
○乾 将行[1,2] ([1]RITE、[2]奈良先端大・バイオ)
○MASAYUKI INUI[1,2] ([1]RITE, [2]NAIST)

地球規模で深刻化する環境課題に対し、循環型社会の実現を目指した物質生産技術の開発が求められている。RITE はこれまでにコリネ型細菌(*Corynebacterium glutamicum*)を活用したバイオ生産技術の開発を行ってきた。今回、この菌を生産宿主とし、有用芳香族化合物の 1 つを生産ターゲットとして生産株の開発を進めた。この化合物は産業的な利用価値が高いもののこれまで生物を利用して高濃度生産された例はない。微生物全般に対して毒性を示すことと、糖からの代謝経路のステップ数が多く複雑なことがその原因だと考えられる。また、コリネ型細菌は元々この目的芳香族化合物の生産経路を持たない。そこで、NEDO スマートセルプロジェクトにおいて開発されている複数のスマートセル創製技術を駆使することにより、高生産株の短期間育種を試みた。各技術が提案する代謝改変指針に基づきコリネ型細菌の育種を進めたところ、糖を原料とした目的芳香族化合物の生産が可能になると共に大幅な濃度向上を確認した。また、特筆すべき点として各スマートセル創製技術は併用可能であることが挙げられる。それぞれ代謝改変指針を導き出すアプローチが全く異なるため、生産株育種の過程で各技術の成果を 1 つの生産株系列に積み重ねることが可能である。これにより野生株から順次生産性が大きく向上していく成果を得た。本講演では各スマートセル創製技術を適用した結果と今後の展開について紹介する。

RITE has developed fermentation technologies based on genetically engineered *Corynebacterium glutamicum* strains in the NEDO Smart Project. Our target in this project is an aromatic compound, which has not been produced in high concentration by fermentation until now even though it has high value in industrial fields. To create a *C. glutamicum* overproducer of the target compound, we collaborated with several Smart Cell design teams in the project. Each of the design teams is developing the Smart Cell design system based on each original technology. According to suggestions of genetic modifications from the design teams, we engineered genes of *C. glutamicum* strains to have modified metabolic pathways. As the results, the target producer strains were created within a short period of time, and the target productivities were greatly improved by the suggestions. In this presentation, we introduce the application of the Smart Cell design system and the processes of producer strains breeding.

Corynebacterium glutamicum, Smart Cell technology, aromatic compound

講演番号：4SYa7-5
講演日時、会場：3 月 28 日 11:30～ A15 会場

機能性油脂生産へ向けた情報科学を利用した油脂酵母の改良

Improvement of oleaginous yeast using computational approach for production of functional bioactive lipid

○高久 洋暁[1]、山崎 晴丈[1]、小笠原 渉[2]、矢追 克郎[3]、荒木 秀雄[4]、荒木 通啓[5]、油谷 幸代[3,6]([1]新潟薬大・応生科、[2]長岡技科大・工、[3]産総研生物プロセス、[4]不二製油、[5]京都大、[6]CBBD-OIL)
○Hiroaki Takaku[1], Harutake Yamazaki[1], Wataru Ogasawara[2], Katsuro Yaoi[3], Hideo Araki[4], Michihiro Araki[5], sachiyo Aburatani[3,6] ([1]Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., [2]Nagaoka Univ. Tech., [3]AIST, [4]FUJI OIL HOLDINGS INC., [5]Kyoto Univ., [6]CBBD-OIL)

omega-3 系多価不飽和脂肪酸は健康に重要な役割を持ち、その 1 つのエイコサペンタエン酸 (EPA)は動脈硬化予防効果を有する。omega-3 系多価不飽和脂肪酸の世界的需要が急増して市場規模は拡大しているが、ω-3 系脂肪酸原料の魚油は、乱獲により供給量が減少続けている。このような状況を考慮し、我々は、乾燥菌体重量の 70%まで油脂を蓄積できる油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* に注目し、omega-3 系多価不飽和脂肪酸を高生産する油脂酵母の開発を試みた。

１．脂肪酸組成の改変・・・我々はリノレン酸までしか合成できない油脂酵母 *L. starkeyi* に EPA を合成させるため、スマートセル基盤技術「文献等からの知識の抽出・学習技術」を活用して、EPA 生合成経路の導入、続いて EPA 含有率向上のため、酵素を選択して *L. starkeyi* の改変を行った。その結果、*L. starkeyi* における EPA 生産に成功し、その含有率も上昇した。

２．油脂生産性の向上・・・我々は野生株と油脂蓄積変異株のオーミクスデータを取得後、比較ゲノム解析、スマートセル基盤技術「発現制御ネットワーク構築技術」を活用することで、新規油脂生産制御因子を見出し、油脂生産性を約 2 倍向上させることに成功した。

Eicosapentaenoic acid, one of omega-3 polyunsaturated fatty acids that have important roles in health, is effective for the prevention of arteriosclerotic diseases. While the global demand for omega-3 polyunsaturated fatty acids has increased rapidly and the market scale has expanded, the supply of fish oil, a raw material for omega-3 fatty acids, continues to decrease due to overfishing. Considering this situation, we focused on the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*, which can store intracellular lipids within cells to up to 70% of their cell dry weight, and developed the oleaginous yeast with high production of omega-3 polyunsaturated fatty acids.

1. Modification of fatty acid composition・・・To synthesize EPA in *L. starkeyi* that can only synthesize to linolenic acid, we introduced the EPA biosynthesis pathway into *L. starkeyi* and subsequently modified *L. starkeyi* by selecting enzymes to improve EPA content using smart cell-based technology “Knowledge based machine learning”. As a result, EPA production in *L. starkeyi* was successful and its content increased.

2. Enhancement of lipid productivity・・・After obtaining omics data of wild type and mutants with lipid accumulation, we found novel lipid production controlling factors using comparative genomic analysis and smart cell-based technology “Regulatory Network Analysis”. We succeeded in improving lipid productivity about 2 times.

Lipomyces starkeyi, oleaginous yeast, eicosapentaenoic acid

分野融合連携（他学会連携）シンポジウム

学術活動強化委員会では，他学会との連携を強化するために，他学会との共同企画で分野融合連携（他学会連携）シンポジウムを開催してきました．2020 福岡大会でも，日本農芸化学会とも関連が深い，日本抗加齢医学会（食品機能分野），日本農薬学会（天然物化学分野）と 2 つのシンポジウムを開催いたします．皆様，奮ってご参加ください．

3 月 27 日（金）9:30 ～ 12:00

3TJa1　SDGs 時代における農薬研究

3 月 27 日（金） 9:30～12:00
共　催：日本農薬学会
会　場：A19 会場（センター 2 号館 2403）
世話人：中川好秋（京大院農・応生科），野下浩二（秋県大・生資科），太田広人（崇城大・生物生命）
座　長：太田広人（崇城大・生物生命），石原　亨（鳥取大・農），坂本君年（弘前大・農生），野下浩二（秋県大・生資科）

9:30　はじめに ……野下浩二（秋県大・生資科）

9:40　3TJa1–1　新規イソキサゾリン系殺虫剤フルキサメタミドの創製
……○三田猛志[1]，古川裕貴[1]，岩佐基悦[1]，菊池隆正[1]，菰田充弘[2]，旭　美穂[2]
（[1]日産化学株式会社物質科学研究所，[2]日産化学株式会社生物科学研究所）

10:10　3TJa1–2　新規除草剤シクロピリモレートの創製と作用機構
……○志野真実子，濱田崇宏，重松由夫，平瀬寒月，番場伸一，塚本芳久，門谷淳二
（三井化学アグロ株式会社）

10:40　休憩

10:50　3TJa1–3　**Discovery of isofetamid: the phenyl-oxo-ethyl thiophene amide SDH inhibitor with unique biological performance** ……○Kuni Fushikida（ISHIHARA SANGYO KAISYA, LTD.）

11:20　3TJa1–4　農薬を利用した環境汚染物質による作物汚染の低減法 ……○乾　秀之（神戸大バイオ）

11:50　おわりに ……中川好秋（京大院農・応生科）

3 月 28 日（土）9:30 ～ 12:00

4TJa1　見た目のアンチエイジング

3 月 28 日（土） 9:30～12:00
共　催：一般社団法人日本抗加齢医学会
会　場：A19 会場（センター 2 号館 2403）
世話人：米谷　俊（近畿大農），堤　浩子（月桂冠），藤井健志（カネカ）
座　長：米谷　俊（近畿大農），堤　浩子（月桂冠），藤井健志（カネカ）

9:30　4TJa1–1　見た目から見たアンチエイジング ……○山田秀和（近畿大学 奈良病院）

10:00　4TJa1–2　食品脂質による肌の保全 ～セラミドとカロテノイド～
……○菅原達也（京大院・農）

10:30　4TJa1–3　年を重ねても若い皮膚：抗酸化対策と再生医療 ……○市橋正光[1,2]（[1]神戸大学，[2]アーツ銀座クリニック）

11:00　4TJa1–4　加水分解コラーゲン摂取による変形性関節症改善効果
……○野村義宏（農工大・農・硬蛋研）

11:30　4TJa1–5　骨粗鬆症に対する新時代のホルモン補充療法 TSEC ～いつまでも美しい姿勢を保つために～
……○太田郁子（倉敷平成病院）

講演番号：3TJa1-1
講演日時、会場：3 月 27 日 09:40～ A19 会場

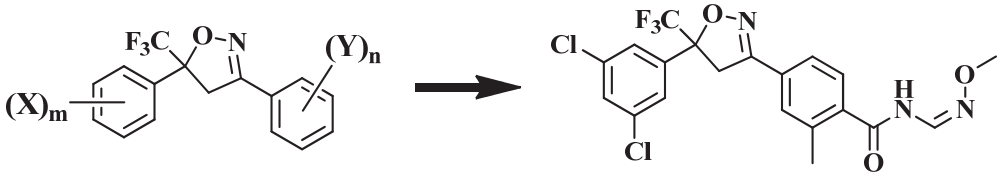
新規イソキサゾリン系殺虫剤フルキサメタミドの創製
Creation of a Novel Isoxazoline Class of Insecticide, Fluxametamide

○三田 猛志[1]、古川 裕貴[1]、岩佐 基悦[1]、菊池 隆正[1]、菰田 充弘[2]、旭 美穂[2] ([1]日産化学株式会社物質科学研究所、[2]日産化学株式会社生物科学研究所)
○Takeshi MITA[1], Yuki FURUKAWA[1], Motoyoshi IWASA[1], Takamasa KIKUCHI[1], Mitsuhiro KOMODA[2], Miho ASAHI[2] ([1]Nissan Chemical Corporation Chemical Research Laboratories, [2]Nissan Chemical Corporation Biological Research Laboratories)

フルキサメタミドは、日産化学株式会社が発明した新規母核“イソキサゾリン系”に属する殺虫活性化合物である。果樹・野菜類のチョウ目、アザミウマ目害虫に対して卓効を示すとともに、ハエ目、コウチュウ目、ダニ類及び一部のカメムシ目害虫に対しても効果を示し、First-In-Class の汎用性殺虫剤として上市された。一方、ミツバチ、マルハナバチ等の訪花昆虫に対する安全性は高い。

我々は自社独自新規農薬母核創出 project において、その新規性、特徴的な立体構造及び合成スループットの良さの観点から 3,5-bis(substituted-aryl)-5-(trifluoromethyl)isoxazoline 1 に着目、置換基 $(X)_m$ 及び $(Y)_n$ を種々検討する中で速効的な殺虫活性を示す化合物を多数見出した。これらの中から殺虫活性、安全性試験データ、原材料の調達性とコスト、製造プロセスなどを総合的に勘案し、フルキサメタミドを開発化合物として選抜した。

本発表では、我々の探索戦略、構造活性相関、フルキサメタミドの作用機作等について述べる。



1　　fluxametamide

Fluxametamide, developed by the Nissan Chemical Corporation, is an insecticide comprising a novel isoxazoline class of chemistry. This novel insecticide has excellent activity against *Lepidoptera* and *Thysanoptera* pests on fruits and vegetables. Furthermore, this is effective against a wide range of pests such as *Diptera*, *Coleoptera*, *Acarina*, and some species of *Hemiptera*. While at the same time, fluxametamide is not toxic to insects pollinating flowers.

In the course of our research aimed at creating a new chemical class used as a pesticide, we focused on 3,5-bis(substituted-aryl)-5-(trifluoromethyl)isoxazoline 1 in terms of novelty, characteristic stereostructure and good throughput of synthesis. After the optimization of both substituents $(X)_m$ and $(Y)_n$, fluxametamide was selected as a candidate for development.

In this presentation, the strategy of our research, the structure–activity relationship (SAR) and the mode of action of fluxametamide are discussed.

Fluxametamide, Isoxazoline, Insecticide

講演番号：3TJa1-2
講演日時、会場：3 月 27 日 10:10～ A19 会場

新規除草剤シクロピリモレートの創製と作用機構

Discovery and mode of action of cyclopyrimorate, a novel herbicide

○志野 真実子、濱田 崇宏、重松 由夫、平瀬 寒月、番場 伸一、塚本 芳久、門谷 淳二 (三井化学アグロ株式会社)
○Mamiko SHINO, Takahiro HAMADA, Yoshio SHIGEMATSU, Kangetsu HIRASE, Shinichi BANBA, Yoshihisa TSUKAMOTO, Junji KADOTANI (Mitsui Chemicals Agro Inc.)

シクロピリモレート(サイラ®/CYRA®)は、三井化学アグロ(株)が見出した水稲用の新規除草剤である。水田雑草の防除には、分岐鎖アミノ酸生合成経路に存在するアセト乳酸合成酵素(ALS)の阻害剤が広く使用されてきた。しかしながら、その使用を継続したことにより ALS 阻害剤に抵抗性を示す雑草が日本各地で出現し、問題となっている。シクロピリモレートは、ALS 阻害剤の抵抗性雑草に対しても高い除草効果を示すことから、水田雑草の防除に大きく貢献することが期待される。

本報では、シクロピリモレートの創製経緯とその作用機構について報告する。シクロピリモレートは、リード化合物の 3-クロロ-6-(2-メチルフェノキシ)-4-ピリダジノールから、フェニル基置換基やピリダジン環水酸基を変換することにより見出された。本剤は植物に対して特徴的な白化作用を示し、光合成に必須のプラストキノン生合成経路に存在するホモゲンチジン酸ソラネシルトランスフェラーゼ(HST)を阻害することが明らかとなった。HST は新規作用点であり、シクロピリモレートは 20 年以上ぶりに新規作用点を有する除草剤として上市される。

Cyclopyrimorate is a novel rice herbicide discovered by Mitsui Chemicals Agro Inc. To control rice weeds, inhibitors of acetolactate synthase (ALS), which exists in the biosynthesis pathway of branched-chain amino acids, have been widely used. However, long-term use of ALS inhibitors developed resistant weeds in various regions of Japan, and they are problematic in rice production. Cyclopyrimorate shows high efficacy against biotypes resistant to ALS inhibitors, thus being expected to contribute to effective control of rice weeds.

We report the discovery and mode of action of cyclopyrimorate. Starting from a lead compound, 3-chloro-6-(2-methylphenoxy)-4-pyridazinol, cyclopyrimorate was obtained by optimization of substituents on the phenyl ring and the pyridazine ring. Cyclopyrimorate caused bleaching symptoms against plants, and its target site was suggested to be homogentisate solanesyltransferase (HST), an enzyme in the plastoquinone biosynthesis pathway. HST is a novel target site for commercial herbicides. Cyclopyrimorate will be on the market with a novel mode of action for the first time in over 20 years.

Cyclopyrimorate, herbicide, homogentisate solanesyltransferase.

講演番号：3TJa1-3
講演日時、会場：3 月 27 日 10:50～ A19 会場

Discovery of isofetamid: the phenyl-oxo-ethyl thiophene amide SDH inhibitor with unique biological performance

○Kuni Fushikida (ISHIHARA SANGYO KAISYA, LTD.)

The United Nations World Population Prospects estimates the world's total population continues to grow and reaches 10.9 billion by 2100, which is 42% larger than current global population (approximately 7.7 billion). In such circumstance, maximizing the food supply from limited cropland to feed the increasing world population is becoming urgent problem. One of the threats to decrease crop yield is diseases caused by phytopathogenic fungi and efficient control of these devastating pathogens is a key component of sustainable food supply but global climate change and increasing world trade in agricultural products likely cause worldwide distribution of problematic phytopathogens and make their efficient control difficult. Chemical fungicides have been playing important roles in the modern agricultural practices and among them, succinate dehydrogenase inhibitors (SDHI) represent highly active and broad spectrum fungicides with excellent safety profiles to untargeted organisms. After the first introduction of SDHI fungicides in 1960's, successive industrial efforts have been creating newer and broader spectrum SDHI fungicides with higher intrinsic activities. Although SDHI fungicides are recognized as efficient disease management tools and used widely, their continuous usage is leading to emergence of SDHI resistant isolates and loss of efficacy. Isofetamid is a novel SDHI fungicide discovered and being developed globally by ISHIHARA SANGYO KAISYA, LTD. By virtue of its unique phenyl-oxo-ethyl thiophene amide backbone and its possible structural flexibility, isofetamid exhibits broad spectrum disease control performance even on those caused by SDHI resistant fungi. Isofetamid-containing products are now registered in Asian, European, North and South American countries and expected to offer new management tools for farmers and to contribute to sustainable agriculture. Discovery story, chemical and biological characteristics of isofetamid will be presented.

isofetamid, fungicide, SDHI

講演番号：3TJa1-4
講演日時、会場：3 月 27 日 11:20～ A19 会場

農薬を利用した環境汚染物質による作物汚染の低減法

Reduction of environmental pollutants in crops treated with pesticides

○乾 秀之 (神戸大バイオ)
○Hideyuki Inui (Kobe Univ.)

殺虫剤ディルドリンやヘプタクロルなどの残留性有機汚染物質（Persistent organic pollutants、POPs）は、使用が禁止されて 40 年以上経過するにも関わらず難分解性のため農耕地の土壌などに残留し、作物に取り込まれ、それを摂取したヒトに毒性を発現する。特にウリ科植物は、土壌中の POPs を根を介して取り込み、可食部を含む地上部に蓄積するという特徴的な性質を持つ。我々はこのメカニズムの一端を分子レベルで解明し、これを基にした汚染物質の蓄積を低減できる新しい技術の開発を試みた。これまでに、ウリ科植物の根において POPs と結合し、導管液を介して地上部に輸送する POPs 体内輸送因子の存在と役割を明らかにしてきた。この輸送因子の遺伝子発現を抑制し、存在量を減少させることは地上部への汚染物質の輸送を低下させることに繋がる。さらに、POPs と輸送因子の結合を阻害することにより、輸送する汚染物質量を低下させることができる。このような作用を引き起こす化学物質として我々は農薬を選択した。既存の農薬を使うことにより、新しい化合物を探索し、安全性試験など行う必要がなく、汚染物質による汚染のない安全な作物の栽培が可能となる。反対に、輸送因子遺伝子の発現を誘導する農薬は、POPs のファイトレメディエーションに利用できる。本研究は、農薬の新しい利用法を提案するものである。

The environment surrounding us is facing on serious pollution caused by the release of chemicals that are used by human beings. One of these chemicals is persistent organic pollutants (POPs) that have specific characteristics, such as extremely high chemical stability. These are troublesome for health of wildlife and humans because of bioaccumulation occurred through the food web. As crop contamination is one of the first steps to take up contaminants into a human body, it is important to reveal mechanisms on uptake of POPs. We identified a transporting factor for POPs in Cucurbitaceae family, such as cucumber, pumpkin, and zucchini. It was also revealed that the expression of the genes of the transporting factors and the binding of them toward POPs are key factors for crop contamination. In contrast, these steps are good targets to develop new techniques for decrease of crop contamination. Namely, the suppression of the genes of the transporting factors and the inhibition of their binding to POPs make it possible to reduce it. We selected pesticides as chemicals that exhibit these functions because they have been already widely used for crop cultivation and risk evaluation has finished.

Pesticide, Persistent organic pollutants, Cucurbitaceae family

講演番号：4TJa1-1
講演日時、会場：3 月 28 日 09:30～ A19 会場

見た目から見たアンチエイジング

〇山田 秀和 (近畿大学 奈良病院)

見た目は第４の資産であると指摘されて以降、その評価が重要性を増している。さらに、ゲノム研究の急速な進歩とデープラーニングを含む画像解析の進歩から、見た目からの SNP の変化を推測する研究も臨床段階になっている。表現形としての見た目は、ゲノムを基盤として、環境因子 (EXPOSOME) に大きく影響されることが明らかである。結局、DNA 配列のみではなく、Epigenome の重要性が指摘されている。現に、がんや認知症や心血管疾患は、老化の結果として起こる。漸く、WHO の ICD11 にも老化関連疾患の概念が収載された。Epigenetic Clock の発展や、アンチエイジング薬の開発から、“エイジング (老化) は病”との立場をとるよう米国 FDA に進言する状況になってきている。老化時計は、最大寿命の観点からみるものと、加速度の立場からみるものに分かれるが、見た目は、そのどちらでもはっきりと関連すると思われる。見た目は皮膚・容貌・体形に分けて論じるのが、それぞれの表現形を説明するのに良い。 このため、見た目の老化は、最大寿命の観点からの老化と外部環境 (光老化) の双方が関与する。光と健康の問題は、外的環境因子の代表であろう。特に光老化に関しては、紫外線を中心に促進の議論がされるが、ビタミン D との関連で、健康への観点も注意が必要だ。老化は、multigenetic factor で起こると考えられており、今のところは多様な因子への介入が必要であろう。なお、ヒトでは、ダサチニブとケセルチンで、老化細胞を除去すると有効性が高いとの報告がある。老化速度の関連では、運動・食事・精神 (脳・睡眠)・狭義の環境を調整することで、老化を遅くすることが可能と思われる。最近の Proteomics clock によれば、34 歳、60 歳、78 歳にタンパクの構成の変化が大きいとされており、60 歳までの体形変化での指摘と近似している。DNA のメチル化時計でも、濃縮度で見る系では、ネアンデルタール人と現代人では 1 歳程度の違いしかなく、38 歳程度とチンパンジーと似ている。実際の我々ヒトは、フリーラジカルによる酸化ストレスの回避や免疫能力や中枢神経 (脳) の発達が最大寿命に関連している可能性がある。このため、アンチエイジング薬の開発で現在使用できるマーカーとしては、全体像としての Epigenetic clock であり、それぞれの CpG アイランドの DNA 配列についての考察が可能となろう。基礎研究では、遺伝子操作で数個の DNA の発現調節が可能となりつつあり、疾患の改善とともに、マウスレベルでは寿命延長も可能となっている。当然、臓器特異性の検討も重要であるが、倫理的議論の上でのヒューマントランスフォーマーが可能になるかもしれない。

講演番号：4TJa1-2
講演日時、会場：3 月 28 日 10:00～ A19 会場

食品脂質による肌の保全 ～セラミドとカロテノイド～

○菅原 達也（京都大学大学院 応用生物科学専攻）

65 歳以上の老年人口がすでに 25%を超え、超高齢社会を迎えている我が国において、健康寿命の延長と高齢者の QOL 向上が喫緊の課題といえる。外面的な美しさや若々しさを保つことは、高齢者のみならず、活発な社会活動と QOL 向上のためにも、健康の維持と同様に極めて重要である。皮膚は、外的環境と生体内を物理的に仕切るバリアとして重要な機能を担うが、私たちの体表面を覆う外面的容貌に寄与する要素の一つでもある。したがって、皮膚の性状や機能を維持することは、病原体やアレルゲンの体内への侵入を防ぐことで健康の維持に重要であり、外面的容貌を美しく保つことにも寄与することで、心体ともに健康的な生活を維持することにつながる。そこで私たちは、機能性脂質として「スフィンゴ脂質」と「カロテノイド」に着目し、皮膚の機能の保全と改善を目指した食品機能研究を進めている。

スフィンゴ脂質はスフィンゴイド塩基を構成成分とする脂質の総称であり、真核生物の細胞膜を構成する成分でもある。一方、その骨格構造ともいえるセラミドは、角質細胞間脂質の主要成分であり、皮膚バリア機能に重要な役割を担う。これまでの様々な研究から、食品素材由来スフィンゴ脂質を経口摂取することによる皮膚バリア機能改善効果が確認されている。しかしながら、経口的に摂取されたスフィンゴ脂質の吸収率は極めて低く、厳密には皮膚のものと化学構造も異なるため、皮膚の構成要素として再利用されている可能性は低い。皮膚バリア機能改善効果の詳細なメカニズムについては、未だ明らかとはいえないものの、実験動物や培養細胞を用いた検討から、表皮のスフィンゴ脂質合成の亢進が関与している可能性も示されてきている。

また、皮膚の老化現象は加齢に加えて、外的要因の影響も受ける。とくに紫外線によって引き起こされる深いシワの形成や表皮の肥厚化は、光老化とよばれている。私たちは、アスタキサンチンやシフォナキサンチンなどの海洋由来カロテノイドの経口摂取よって、皮膚の光老化が効率的に抑制されることを見出している。経口摂取されたカロテノイドは、真皮層や表皮層にまで到達できることも確認しており、皮膚で効率的に機能を発揮できる食品成分と考えられる。

このような機能性脂質を食品成分として摂取することによって、皮膚の性状や機能を保全することが期待されるが、そのメカニズムは間接的かつ複雑であることも予想される。これらをより効率的に利用するためには、消化管吸収、体内動態や代謝を含めた作用機序の詳細な解明が必須といえる。

講演番号：4TJa1-3
講演日時、会場：3 月 28 日 10:30～ A19 会場

年を重ねても若い皮膚：抗酸化対策と再生医療

○市橋 正光[1,2] ([1]神戸大学、[2]アーツ銀座クリニック)

２０２０年現在、人の一生は１００年ほどと言われる。しかし、７０歳をすぎると老化の加速度が一気に速まる。少なくとも人生最後の３０年は老化との戦いである。見た目の皮膚など外見だけではなく、内蔵諸臓器も年齢に相関してそれぞれ個別に老化度を早めるので、一人ひとり違った老化症状を示す。９０歳で全臓器の機能が高く、健康で、若者に負けず社会で活躍している人は極めて少ない。私が目指す若い皮膚の維持は８５歳であるが、これも極めてハードルは高い。特に太陽光線の影響を強く受ける顔、首、前腕から手背の皮膚は、ハリが無くなり、弾力性を失い、深いシワと同時に色素斑が多発し典型的光老化症状を示す。一方、紫外線をほとんど浴びない皮膚は、菲薄化し、たるみ、また、小じわと乾燥が特徴的である。諸蔵器の幹細胞数が減少、更に機能が低下するため、臓器それぞれの機能と構造を維持している諸細胞の数と機能が低下し、組織構造・機能の維持が困難となり老化に至ると考えられる。一人ひとりがそれぞれ違った臓器別の老化度を示すが、見た目の老化度は全身所蔵器の老化度をかなり反映している。

幹細胞や各組織の主要細胞の老化を早める原因の一つは活性酸素と考えられている。細胞が最大限の機能を発揮し、また長く生存するには活性酸素対策に加え、細胞が生きている組織の微小環境の最適化が重要と考えられる。したがって、現時点で可能な抗老化対策は、細胞が住んでいる環境のホメオスタシス維持である。その手段の一つが、活性酸素対策、効率の良いエネルギー生成、および組織で損傷を受け老廃物となったタンパク質の効率良い排除システムの維持と考えられる。

皮膚の抗酸化は、経口摂取或いは経皮的に外部より抗酸化物質を取り込ませるだけでなく、細胞が本来持っている抗酸化機構を活性化させることである。現時点では、抗酸化能を持つ食物摂取に加え、サプリメントとして、カシスを始めとする各種ポリフェノール、カロテノイドやビタミン C、E、やコエンザイム Q、α―リポ酸、また、筆者が最近研究している白金とパラジウムのナノコロイド（PAPLAL）の摂取、また皮膚塗布による徹底した紫外線 B, A およびブルーライトへの対策である。太陽紫外線による皮膚の光老化は２０歳ころから出始めるが、その予防対策は小児期からである。私は、目には見えない全身諸臓器の予防も当然ながら小児期から始めることが重要と考えている。

皮膚の老化をかなり満足できるまで改善、若くするには、幹細胞および幹細胞の分泌小胞（エクソソームなど）を経皮注入或いは全身投与が良いと報告されている。本講演では自家線維芽細胞や幹細胞による肌の若返りについて、文献的な考察を交え私見を述べる。

講演番号：4TJa1-4
講演日時、会場：3 月 28 日 11:00～ A19 会場

加水分解コラーゲン摂取による変形性関節症改善効果

○野村 義宏（東京農工大学 農学部硬蛋白質利用研究施設）

加水分解コラーゲンの機能性食品としての利用は古く、漢方の「阿膠」にはじまる。ロバの脱毛した皮を加熱抽出・乾燥したものであり、造血、益気、婦人病改善、強筋骨、滋養強壮、免疫力増強が効能であり、温経湯や黄連阿膠湯などの漢方薬に処方されている。加水分解コラーゲンの安全性は FDA の GRAS にも掲載されており、他のタンパク質に比べても抗原性の低いタンパク質である。また、血中に吸収される特有のペプチド(Pro-Hyp)が同定されてから、加水分解コラーゲン摂取による種々の機能の解明が進んできた。また、動物種により、血中で検出されるペプチドの組成に違いがあることも報告されている。栄養学的にはコラーゲンは必須アミノ酸が少ないことから、タンパク質価はゼロであり、その摂取効果に疑問がもたれていた。しかし、加水分解コラーゲン摂取により種々の効果が報告されるようになり、以前ほどの疑義が少なくなっている。そこで、本講演では、加水分解コラーゲン摂取による変形性関節症(OA)の改善効果について講演する。

本研究室では、Dunkin-Hartley モルモットおよび STR/Ort マウスを用いて、種々の食品因子による OA 改善効果を検証してきた。14 か月齢 Dunkin-Hartley モルモットに加水分解コラーゲンを 30 日間連続投与し、OA 症状の改善効果を認めた。特に、関節部の軟骨細胞数が増加し、プロテオグリカンの分解抑制が確認できた。

STR/Ort マウスは、25 週齢以降の雄マウスの後肢に OA 症状を発症する。加水分解コラーゲン投与により、膝関節表面の軟骨構造の改善が確認できた。また、滑膜の線維芽様細胞に対して、加水分解コラーゲン摂取で血液中に確認できるペプチド(Pro-Hyp および Hyp-Gly)の添加により、産生するヒアルロン酸の産生能に影響を与え、分子量の増加を認めている。

加水分解コラーゲンは、基本的には食事から摂取可能であるが、摂取量を確保する必要がある場合には無理がある。安全性が担保出来る機能性素材であり、消化性が良く、無味・無臭であることから、他の機能性素材と併用されることが多く、その併用効果に関する研究報告も存在する。加水分解コラーゲン摂取により血中移行する食事由来のペプチドの同定以降、それらのペプチドが体中の細胞に作用し、コラーゲンやヒアルロン酸の産生に影響を与える事で、種々の効果を示す可能性が考えられる。Pro-Hyp のようなジペプチドが環状構造を示す事で新たな機能も見出されている。機能性食品としての注目度の高い加水分解コラーゲンは、その原料、部位の違いによる作用の違いも指摘されており、さらなる研究が期待される。

講演番号：4TJa1-5
講演日時、会場：3 月 28 日 11:30～ A19 会場

骨粗鬆症に対する新時代のホルモン補充療法 TSEC ～いつまでも美しい姿勢を保つために～

〇太田 郁子（倉敷平成病院 婦人科）

更年期という言葉は本邦にしか存在せず、海外では周閉経期または閉経期として扱われている。つまり一般に更年期症状が発現すると言われている閉経前期ではなく、閉経が基準になる。これは更年期症状に比して、閉経を境として、骨粗鬆症、認知症、動脈硬化症といった死因につながるエストロゲン低下に起因する疾患が始まるからに他ならない。特に骨粗鬆症は本邦の女性の死因はがんについて第 2 位に位置し、早期から対応が求められる。骨粗鬆症は現在本邦においては整形外科で 65 歳以降の女性が骨折後に治療されているのが現状であるが、本来閉経を迎えた時点で婦人科が骨密度測定等を施行し、介入すべきであると考える。骨粗鬆症の治療のうち、早期ではエストロゲンや SERM 剤が推奨されているが、すでに骨折がある骨粗鬆症患者の二次予防としてはビスフォスフォネートが主に使用されているのが現状である。

腰椎圧迫骨折および大腿骨骨折は一度骨折を経験すると二度と元の姿勢には戻れない。姿勢は二足歩行を取る人間にとって非常に重要である。脊椎動物のみが横隔膜を有するが、横隔膜を有することで腹腔臓器は低酸素に晒されることになった。さらに二足歩行になったことで、脊柱や肋骨は梁としての役割を失い、腹腔臓器はぶら下がるように縦に配置され、さらに低酸素環境に晒されているといえる。これを姿勢筋と強いアパタイトで構成された脊柱と骨盤で維持しているのである。いったん最適な姿勢が骨折により失われると腹部の低酸素環境はその制御を失い、呼吸器疾患、循環器疾患、消化器疾患、腎泌尿器疾患が併発する。

今回婦人科から診た骨粗鬆症の現状と婦人科の閉経後医療として開発された新たな骨粗鬆症治療 TSEC: Tissue selective estrogen complex についてその意義と効果、使用法について述べる。TSEC は閉経直後から長期に渡って投与が可能であり、さらに骨粗鬆症の一次予防として最初の骨折を予防するのに最適であると思われる。最後に美しい姿勢は二足歩行を獲得した我々人間固有のものである。そして系統発生の進化の過程で試行錯誤され獲得された形質であり、美観的のみならず、健康にとっても不可欠なものであることを付け加えたい。

ランチョンシンポジウムプログラム

3月27日（金）12:30～

3LSY1　科学オリンピック（生物・化学）における若手科学人材の育成

3月27日（金） 12:30～13:30
会　場：A18（センター2号館 2308）
世話人：江坂宗春（広大院統合生命科学），小原章裕（名城大 農学部）
座　長：小原章裕（名城大 農学部），東田英毅（㈱ちとせ研究所）

12:30　3LSY1-1　はじめに - 科学オリンピックと若手人材育成 -
……○江坂宗春（広島大院統合生命科学，JABEE対応委員会委員長）

12:35　3LSY1-2　「化学オリンピックにおける若手人材育成」……○三好徳和（徳島大学院 社会産業理工学研究部）

13:00　3LSY1-3　「生物学オリンピックにおける若手人材育成」……○中島春紫（明治大学 農学部）

13:25　3LSY1-4　閉会の挨拶 ……○松田　幹（名大院生命農学，日本農芸化学会理事）

3LSY2　男女共同参画ランチョンシンポジウム（フォーラム）「女性のキャリア・ダイバーシティーに係わる耳寄りな話を聞いてみよう」

3月27日（金） 12:30～13:20
後　援：男女共同参画学協会連絡会
会　場：ビッグさんど

12:30　開会の挨拶 ……野尻秀昭（東京大学生物生産工学研究センター）

12:35　3LSY2-1　「女性研究者に求められるキャリア・ダイバシティー」
……市　育代（お茶の水女子大学基幹研究院自然科学系）
これまで4つの大学に赴任し，女性研究者にもキャリア・ダイバシティーは重要だということを感じてきました．これまでの経験も踏まえ，女性研究者に求められるキャリア・ダイバシティーについて一緒に考えたいと思います．

3LSY2-2　「ライフイベントに負けない研究テーマの選び方」……稲葉靖子（宮崎大学農学部）
研究を軸に据えた生き方を模索する女性にとって，研究テーマの設定はとても大切です．多岐に渡るライフイベントの中で，どうしたら良いのでしょう？ 答えは簡単ではありませんが，一緒に考えてみませんか？

3LSY2-3　「在宅勤務について」……西村麻里江（農業・食品産業技術総合研究機構）
在宅勤務が本格的に導入されはじめました．良い点，注意点について事例と共にそれぞれの立場から情報共有したいと思います．

3LSY2-4　「“よきモノづくり”のための基盤研究」……久保田浩美（花王㈱）
家事や育児は“よきモノづくり”のための基盤研究の宝庫です．暮らしに関わる研究に取り組む一人として，その研究と生活の楽しみについてお話してみたいと思います．

3LSY2-5　「企業での研究のおもしろさ」……土屋友理（キリンホールディングス㈱）
現象の謎を解明していくワクワク感，チームワークで実用化を目指して新しいモノを生み出す楽しさ，など日々仕事で感じていることをお話しします．

3LSY2-6　「節目をデザインしてキャリアをつなげる」……梶原伸子（㈱吉野家ホールディングス）
現在まで人生の節目をいくつかくぐり，企業での食品開発者としての経験を積んできました．思い出深いいくつかの節目について振り返り，共有できればと思います．

3LSY2-7　「“東風吹かば”の地で大学研究者をしながら3人の子供を育てた話」
……酒井謙二（九州大学大学院農学研究院）
あまりお役に立たないでしょうが，連れあいが大分大学を定年退職するのを機に長野出身の私と神奈川出身の連れあいで大学教員をしながら3人の子供を育てた話しをしてみようと思います．

3LSY2-8　「大学の女性研究者として思うこと」……丸山明子（九州大学大学院農学研究院）
研究も教育も終わりがない中，女性の役割が多岐にわたるのも事実です．育児期を過ぎ，これまでの経験やその時々に感じたことについてお話する中で，何か前向きな気持ちを共有できればと思います．

3LSY2-9　「科学の仕事場で見てきたさまざまな景色」……石野園子（九州大学大学院農学研究院）
1980年代からいろいろな職場，働き方で科学にかかわってきました．まっすぐな進路ではなかったけれど，その時々に感じたこと，体験の厚みがもたらしてくれたこと，など話題を提供できれば幸いです．

3LSY2-10　「ポスドクの子育てと社会制度のはなし」……千葉洋子（理化学研究所環境資源科学研究センター）
出産に伴い産休・育休・保活を行いました．それに伴い雇用形態によって受けられる社会サービスや保育園への入りやすさが変わることを実感したので，共有させていただければと思います．

13:15　閉会の挨拶 ……熊谷日登美（日本大学生物資源科学部）

講演番号:3LSY1-1
講演日時、会場:3 月 27 日 12:30～ A19 会場

科学オリンピックと若手人材育成

World olympic for science and developing young scientific human resources

〇江坂 宗春（広島大院統合生命科学）
〇Muneharu Esaka (Hiroshima Univ.)

日本農芸化学会は、JABEE 対応委員会を組織し、公益財団法人農学会教育推進委員会のもとで、JABEE 農学一般関連分野の審査に加わるとともに、JABEE 講習会や JABEE 普及指導活動等を行っている。

さて、スポーツの祭典、国をあげてのビッグイベント東京オリンピック 2020 がいよいよ来年度開催される。

科学界でも、若手科学者養成を目指した科学オリンピック世界大会が、次々に日本で開催される。国際生物学オリンピックについては 2020 年度に、国際化学オリンピックについては 2021 度に日本で開催される。

今回、国際生物学オリンピック、国際化学オリンピックに関わるキー人物に若手科学人材の育成の観点から講演・討論をいただきシンポジウムとしたい。

The Japan Society for Agricultural Chemistry has organized a JABEE Response Committee, participated in the JABEE Agricultural Science General Promotion Examination under the Agricultural Society Education Promotion Committee, and holds JABEE Workshop, JABEE Extension Guidance Activities, etc.

The sports festival, the big event Tokyo 2020 will be held next year.

In the scientific community, the World Olympic for Science, aimed at training young scientists, will be held in Japan one after another. The International Biology Olympiad will be held in Japan in 2020, and the International Chemistry Olympiad in Japan in 2021.

Thus, we would like to make a symposium with key persons involved in the International Biology Olympics and the International Chemistry Olympics, giving lectures and discussions from the perspective of developing young scientific human resources.

JABEE, World olympic for science, young scientific human resources

講演番号：3LSY1-2
講演日時、会場：3 月 27 日 12:35～ A19 会場

化学グランプリ・オリンピックにおける若手人材育成

The Education of Human Resources in the Chemistry Grand Prix / Olympiad

○三好 徳和（徳島大学）
○Norikazu Miyoshi (Tokushima Univ.)

化学グランプリ・オリンピック事業は、全国の中高生に化学への興味・関心を喚起し、意欲・能力を高めること、加えて世界にも通用する若い化学者を育成することを目的として、「夢！化学-21」委員会*と日本化学会が主催し 1999 年より開催している。

国際化学オリンピックの国内予選も兼ねている「化学グランプリ」の一次選考においては高校の学習指導要領の範囲に基づいて出題している。一方、「国際化学オリンピック」の試験内容は日本の指導要領範囲を遙かに上回っており、バカロレアの DP(IB Diproma Programme)の HL(Higher Level)に相当する。これが、先進諸国の高校の世界標準である。しかしこと化学分野に関して言えば、日本では大学においても化学を専攻する学科以外は DP/HL の内容を学修していないのが現状である。

21 世紀になり、持続可能な社会作りのためにはイノベーションを起こす科学人材養成が不可欠と考える。2021 年に開催される「国際化学オリンピック」が、日本の高等学校の学修レベルを含め、改めて次世代の化学ひいては科学人材育成を如何にすべきか考える契機になってくれればと愚考する。

*「夢！化学-21」委員会は、日本化学会、化学工学会、日本化学工業協会、新化学技術推進協会の 4 団体で構成している。

Since 1999, “Chemistry Make Dream in 21st Century” Committee and the Chemical Society of Japan have been holding “The Chemistry Grand Prix / Olympiad” Project to awake an intrigue and to increase the interest, motivation and ability in chemistry of junior and senior high school students in Japan.

The first round examination of the “Chemical Grand Prix” to qualify domestic selective ones of the International Chemistry Olympiad is made based on the scope of the high school learning guidelines. On the other hand, the examination content of the “International Chemistry Olympiad” is far beyond the scope of Japanese guidelines, and corresponds to the HL (Higher Level) of the DP (IB Diproma Programme) of Baccalaureate. This is the general standard for high schools at advanced countries in the world. However, so far as the chemistry field is concerned, the contents of DP / HL are not still studied at universities in Japan besides the departments majoring in chemistry.

In the 21st century, we think that it is essential to educate scientific human resources that can innovate to create a sustainable society. I think that the “International Chemistry Olympiad at Osaka-Japan in 2021” should give us the opportunity to ponder about how to educate the next generation of human resources in chemistry and sciences, including the level of Japanese high school.

Chemistry Grand Prix / Olympiad, education of human resources, HL/IBDP

講演番号：3LSY1-3
講演日時、会場：3 月 27 日 13:00～ A19 会場

生物学オリンピックにおける若手人材育成
Young human resource development at the International Biology Olympiad

○中島 春紫（明治大農化）
○Harushi Nakajima (Meiji Univ.)

高校生の科学の祭典である国際生物学オリンピックの日本代表選考は、毎年 4,500～5,000 人が参加するマークシート方式の予選から始まります。上位 80 名が合宿方式の本選に参加して、実験や研究施設を体験し、成績優秀者 15 名が代表選考試験に臨み、最終的に 4 名が選抜されます。

日本は 2005 年の北京大会から参戦しており、4 名の代表選手には Jury とよばれる運営・翻訳要員が同行して、毎年 7 月の国際大会に臨みます。

開会式が終わると代表選手は Jury と隔離され、実験問題では丸一日かけて 90 分間の生物学実験 4 つに取り組み、理論問題では午前と午後に 5 時間以上かけてみっちりと難問に挑みます。試験の合間には、遠足や各種の交流会など充実したスケジュールが組まれています。試験が終わると Jury が代表選手に会うことが許されますが、力を出し切った生徒たちのキラキラした笑顔が印象的です。

盛大な終了式では、個人成績の上位 1 割が金メダル、次の 2 割が銀メダル、次の 3 割が銅メダルを授与されます。ノーサイドとなった各国の生徒たちが晴れ晴れと交流し、記念撮影を交わす行事は感動的でもあります。

多感な高校生の時期に、日本代表の看板を背負って世界の大舞台を踏み、海外の優秀な高校生と交流する機会を得ることは、人材育成の面で多大な意義があると信じています。実際、日本代表を経験した学生の多くは研究者への道を歩み、さらには、毎年数名が Jury として日本選手団の引率にあたるようになっています。

2020 年の第 31 回大会は、日本が再びホスト国となり 7 月 3 日～11 日の日程で、長崎のハウステンボスを会場として開催の予定であり、着々と準備が進められています。
日本農芸化学会会員の皆さまのご支援をよろしくお願いいたします

The International Biology Olympiad (IBO) is big science festival for high school students. The four members of Japanese National Team will be selected from 4,500 – 5000 qualifiers, qualifying rounds of the top 80, and final selection. It is significant in terms of human resource development to have the opportunity to interact with excellent overseas high school students by taking the stage of the world with a Japanese representative's signage during the high school years. The 31st IBO in 2020 is scheduled from July 3 to 11 at Huis Ten Bosch in Nagasaki. Thank you for your support.

International Biology Olympiad, young human resource, education

ランチョンセミナー　プログラム

本大会のランチョンセミナーのチケットは，事前の申し込み制です．
申込は，(https://cloud.dynacom.co.jp/form/g/jsbbaoffice/f_32/index.php) より，2 月 10 日～ 2 月 25 日の期間で行います．
それぞれ抽選を行い当選結果をメールにてお知らせします．
各ランチョンセミナー・ランチョンシンポジウム会場前では，聴講資格を確認させていただきます．
各日 12:30 を過ぎると無効になり，キャンセル待ちの方に案内を致します．
聴講資格をお持ちでない方は，ランチョンセミナー・ランチョンシンポジウムに参加できません．ただし，空席がある場合はこの限りではありません．

3 月 26 日（木）12:30 ～ 13:20

LS 1-1　日東薬品工業株式会社　　A14 会場（センター 2 号館　3F　2304）

座長：小川　順（京都大学大学院農学研究科）

ポストバイオティクスって，健康未来の救世主！
ポストバイオティクスから考える油の新機能と健康未来

國澤　純（医薬基盤・健康・栄養研究所）

LS 1-2　サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社　　A15 会場（センター 2 号館　3F　2305）

司会：三輪 俊夫（サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社）

HPLC 検出器を使いこなす！
～ユニバーサル検出器 CAD と食品分析での活用例～

浜野 瑞奈（サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社）

LS 1-3　株式会社リバネス　　A18 会場（センター 2 号館　3F　2308）

研究を社会実装するためのプロジェクトを生み出すリバネスの挑戦
～ 農芸化学のみなさまと仕掛けたいこと ～

宮内 陽介（株式会社リバネス）

LS 1-4　味の素株式会社　　A20 会場（センター 2 号館　4F　2404）

司会：中沼 新吾（味の素株式会社）

血漿アミノ酸プロファイルに基づく，様々な疾患リスクのスクリーニング
～ アミノインデックス®の挑戦 ～

安東 敏彦（味の素株式会社）

LS 1-5　株式会社島津製作所　　A21 会場（センター 2 号館　4F　2406）

司会：岡本 真美（株式会社島津製作所）

『LC・LC/MS 最新分析ソリューションご紹介　～培養モリタリング／発酵モニタリング～』
1. 誰でも！簡単に！培養上清成分の高速一斉分析！

黒田 博隆（株式会社島津製作所）

2. デュアルインジェクション機能による多角的データの一元管理と分析業務の効率化

松本 恵子（株式会社島津製作所）

3月27日（金）12:30 ～ 13:20

LS 2-1　アサヒカルピスウェルネス株式会社　　A14会場（センター2号館　3F　2304）

司会：弘田 辰彦（アサヒクオリティーアンドイノベーションズ株式会社）

機能性乳酸菌 ***Lactobacillus gasseri*** CP2305株の脳腸相関を介した心理的ストレス緩和作用

澤田 大輔（アサヒクオリティーアンドイノベーションズ株式会社）

LS 2-2　日本ウォーターズ株式会社　　A16会場（センター2号館　3F　2306）

司会：窪田 雅之（日本ウォーターズ株式会社）

漢方薬の薬物動態研究に高分解能質量分析計を利用した新たな挑戦

松本 隆志（株式会社ツムラ）

LS 2-3　タカラバイオ株式会社　　A19会場（センター2号館　4F　2403）

司会：大場 利治（タカラバイオ株式会社）

タカラバイオのPCRへの取組みと今後の展望

大門 尚志（タカラバイオ株式会社）

LS 2-4　三洋貿易株式会社　　A20会場（センター2号館　4F　2404）

～最新のバイオプロセス器材の紹介～
各種バイオプロセスセンサーおよびバイオプロセス機器・技術他

福田 鉄平（三洋貿易株式会社）

LS 2-5　ライカマイクロシステムズ株式会社　　A21会場（センター2号館　4F　2406）

司会：田中 晋太朗（ライカマイクロシステムズ株式会社）

次世代 高速イメージング～クリアリング技術と蛍光寿命～

1. 最先端デジタルイメージング

鶴巻 宣秀（ライカマイクロシステムズ株式会社）

2. 高速蛍光寿命イメージング

長利　卓（ライカマイクロシステムズ株式会社）



「ポストバイオティクスって、健康未来の救世主！」

日本農芸化学会2020年度大会
日東薬品工業株式会社ランチョンセミナーLS1-1

座長 小川　順　先生
（京都大学大学院農学研究科　教授）

日時 2020年3月26日(木)
12:30～13:20

講師 國澤　純　先生
（国立研究開発法人　医薬基盤・健康・栄養研究所
ワクチン・アジュバント研究センター センター長）

会場 A14
(センター2号館3F)

講演タイトル ポストバイオティクスから考える油の新機能と健康未来

（注１：声に出して読まないとわからない要旨？です。ご了承ください）
ハチ　「旦那。てーへんだ！てーへんだ！」
旦那　「おっ、どうしたハチ」
ハチ　「いやー、時代が良くなって寿命がのびたってよろこんでたらよー。
どうやらいいことばかりじゃーねえってよ。」
旦那　「ほう。って、いったいどう言うことだい？」
ハチ　「それがって旦那、寿命が延びても、年くって病気にばっかなってたら、
医療費が倍になっちまうそうな！」
旦那　「ほう、なんと医療コストが倍になると・・・。」
ハチ　「そう、もう泣きたくなるよ・・・。コスト倍よーって、クスン・・・。」
ハチ　「・・・こすとばいよってクスン・・・、・・・コストバイオッテクスン、・・・」
旦那　「おっ、ポストバイティクス！（注２）
ハチもなかなか良いことを言うじゃないか、ポストバイオティクスっていうと、
あの、それ、健康未来の救世主ってヤツじゃねえか！」
ハチ　「へー、それって超カッチョイー感じ！　腸活って良い感じ・・・。」
旦那　「こらハチ、ダジャレをかぶせてくるな・・・って、
おあとがよろしいようで・・・デンデン」

注２：腸内細菌代謝物。特に、食事成分の腸内細菌代謝物。
健康増進に資する生理活性を有し、かつ、食事成分に由来するがゆえに
腸内細菌叢に負荷を与えにくい。例として食事に由来する脂肪酸リノール酸の
腸内細菌代謝物HYAがある。HYAは、抗肥満、インスリン抵抗性改善、
腸管上皮バリア保護、抗炎症など、生活習慣病に有効な健康機能を有する。
機能性食品素材、医薬シーズとして期待されている。詳しくは本ランチョンにて解説。」

NOSTER®
Connecting life & gut microbiome.

日東薬品工業株式会社

thermo scientific

日本農芸化学会2020年度大会 ランチョンセミナー LS-1-2

HPLC検出器を使いこなす!
～ユニバーサル検出器CADと食品分析での活用例～

日 時　3月26日(木)　12:30～13:20

会 場　A15(九州大学 伊都キャンパス センター2号館3F 2305教室)

演 者　浜野　瑞奈
サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社
クロマトグラフィー&MS事業部　CMSアプリケーション部

セミナー要旨

HPLCは、さまざまな検出器を活用することで幅広い化合物の定性・定量を行うことができますが、化合物の構造や化学的特性によっては、最適な検出感度が得られない場合もあります。本講演では、UV検出器などの汎用検出器の原理や特長を解説します。また、昨今注目を集めている荷電化粒子検出器(CAD)についても、その検出原理や定量性などの特長を解説し、CADを用いた分析事例として、食品をターゲットとしたアプリケーションデータを中心にご紹介します。



Corona Veo荷電化粒子検出器と
UltiMate 3000 LCシステムの組み合わせ

荷電化粒子検出器
Thermo Scientific™ Corona™ Veoの特長

- RI検出器やELSDよりも高感度な検出が可能
- 重量依存の応答性を得られるため、UV検出器よりも正確なマスバランスを実現
- Thermo Scientific UltiMate™ 3000 LCシステムの組み合わせにより、より高速な分析をを実現
- メーカーを問わず、LCシステムと接続が可能

© 2019 Thermo Fisher Scientific Inc. 無断複写・転写を禁じます。 LCMS199_A1912SO
ここに記載されている会社名、製品名は各社の商標または登録商標です。
ここに記載されている内容は予告なく変更することがあります。
ここに記載されている製品は研究用機器であり、医療機器ではありません。

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社

分析機器に関するお問い合わせはこちら

TEL：0120-753-670　FAX：0120-753-671
Analyze.jp@thermofisher.com
facebook.com/ThermoFisherJapan　@ThermoFisherJP
thermofisher.com

ThermoFisher SCIENTIFIC

Leave a Nest

日本農芸化学会2020年度大会
ランチョンセミナー（LS1-3）

研究を社会実装するためのプロジェクトを生み出すリバネスの挑戦
～農芸化学のみなさまと仕掛けたいこと～

日時：2020年3月26日（木）　12:30 – 13:20
会場：A18（教室番号2308）

リバネスでは、多様な分野の研究者、企業、さらには町工場など、異分野どうしの知識を組み合わせて新たな研究を生み出すことにチャレンジし続けています。

本セミナーでは、研究者と大企業、ベンチャー、町工場と連携することで研究の幅を広げる取組み、研究者自身が自分の研究成果を社会実装するためのプログラム、研究キャリアの多様性を広げて研究人材が活躍する場を作る取組みを中心にお話しさせていただきます。
話者がセンター長を務める農林水産研究センターを例に、分野横断的な研究を積極的に推進するにあたり、研究者や企業とどのように組んでいきたいかについてお話しします。

農芸化学会に参加しているアカデミア、企業の方々と、研究成果の事業化や新規の共同研究プロジェクトの創出などを一緒に生み出していきたいと考えています。こうした機会を探している方は、ぜひ本セミナーにご参加ください。

[リバネスがアカデミアの研究者と取組んでいる主なプロジェクト]

LNest Grant
リバネス研究費
40歳以下の研究者を対象にした、アカデミアと企業のつながりを創出する研究助成

Hyper Interdisciplinary Conference
アカデミア、大企業、ベンチャー、町工場、生産者、中高生らが集まり新しい研究を生み出すための場

Exploring Deep Tech & Solving Deep Issue
TECH PLANTER
アカデミアの研究者が持つ研究成果の社会実装を加速する、シーズの発掘・育成プログラム

L-RAD
未採択の研究申請書を生かした企業との共同研究の創出

SCIENCE CASTLE
国内外で開催中の中高生のための学会

CDF Career Discovery Forum
未来の仲間を集め、未来のキャリアを創造/想像する場

共催：株式会社リバネス
https://lne.st　E-mail：info@Lne.st

Eat Well, Live Well.

AJINOMOTO

日本農芸化学会2020年度大会

ランチョンセミナー LS-1-4



血漿アミノ酸プロファイルに基づく、様々な疾患リスクのスクリーニング

～ アミノインデックス®の挑戦 ～

アミノ酸を測る。今のからだを知る。

aminoindex®

アミノインデックス®

日 時 2020年3月26日（木） 12時30分～13時20分

会 場 A20（九州大学 伊都キャンパス センター2号館4F 教室番号2404）

演 者 安東（あんどう） 敏彦（としひこ） / 味の素株式会社 アミノインデックス事業部

血漿中アミノ酸濃度バランスは常に一定になるようにコントロールされているが、多くの疾病では臓器での代謝が変化し、血漿中アミノ酸濃度バランスも影響を受けることが報告されている。実際、生理学的な状態と関連したアミノ酸濃度の具体的な異常は、肝不全、腎不全、癌、糖尿病、筋肉機能不全、先天的アミノ酸代謝異常などを含めて、様々な病気で報告されている。このことから、逆に、ある疾病によって引き起こされる血漿中アミノ酸濃度バランスの変化から疾病の有無を知ることができるのではないかと考えられた。しかし過去の研究では、特定の代謝異常等を除いて単一のアミノ酸濃度の動きから栄養状態や疾病の有無を判断することは難しいとされてきた。そこで、複数のアミノ酸の組み合わせを統計的に解析する新しい検査法が開発された。

2011年、アミノインデックス®は、がんに罹患している可能性を評価する検査法として実用化された。その特長は、**①一度の採血で、複数のがんを同時に検査できる、②早期のがんにも対応している、③採血による検査であり健康診断で同時に受診できる**、という点である。

さらに近年、「アミノインデックス技術」を用いて、生活習慣病のリスクを評価する方法が開発された。この検査は、**10年以内に脳卒中・心筋梗塞を発症するリスク、4年以内に糖尿病を発症するリスク、現在の血液中の必須・準必須アミノ酸の低さ、の3項目を評価**する。この検査結果に基づき、タイプ別に生活改善を提案することで疾患のリスクを下げることがこの検査の目的である。

以上のようにアミノインデックス®は、様々な疾患のリスクを評価するのに有用であり、今後、ますます多くの健診現場で活用されることが期待されている。

共催：味の素株式会社

SHIMADZU
Excellence in Science

日本農芸化学会2020年度大会

ランチョンセミナーのご案内

LS-1-5 LC・LC/MS最新分析ソリューションご紹介 ～培養モリタリング／発酵モニタリング～

日時 2020年3月26日(木) 12:30～13:20

会場 A21(九州大学 伊都キャンパス センター2号館4F 教室番号2406)

講演1

誰でも!簡単に!培養上清成分の高速一斉分析!

黒田　博隆　(株式会社島津製作所)

培養上清には糖、アミノ酸、ビタミン、核酸関連物質、有機酸などの培地成分や、細胞、酵母、大腸菌等の培養対象から分泌される代謝物といった多様な成分が含まれます。従来、培養上清成分の分析は化合物群毎に手法を変えて実施され、非常に手間がかかりました。
この度、この課題を解決すべく、培地成分／分泌代謝物から成る125成分を20分以内に一斉分析できる手法を開発しましたので、その手法と応用例についてご紹介します。

講演2

デュアルインジェクション機能による 多角的データの一元管理と分析業務の効率化

松本　恵子　(株式会社島津製作所)

デュアルインジェクション機能は超高速液体クロマトグラフNexeraシリーズのユニークなオプション機能です。
全く異なる2種の化合物群の定量が必要などの理由で、異なる分析条件で2回分析が必要になるケースがあります。
デュアルインジェクションシステムは、独立した2流路を1つのプラットフォームに搭載し、2種類の異なる条件のクロマトグラムを同時に採取します。
微生物の代謝物である有機酸や糖を同時に測定する発酵モニタリングを取り上げ、分析効率を大きく改善した事例をご紹介します。

司会：**岡本　真美**　(株式会社島津製作所)

お問合せ
(株)島津製作所　分析計測事業部　グローバルマーケティング部
〒604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1　TEL:075-823-1352

日本農芸化学会 2020 年度大会
ランチョンセミナー　（LS-2-1）

機能性乳酸菌 *Lactobacillus gasseri* CP2305 株の脳腸相関を介した心理的ストレス緩和作用

日時　3 月 27 日(金)　12：30～13：20
会場　A14（教室番号 2304　センター2 号館 3F）

演者　澤田　大輔
アサヒクオリティーアンドイノベーションズ株式会社
コアテクノロジー研究所　乳酸菌技術部

近年、生体の恒常性維持において、腸内エコシステムの重要性が明らかになってきている。腸内エコシステムとは、宿主の腸管神経、内分泌系細胞群、腸管免疫系と腸内細菌叢との緊密な異種生物間相互作用によって構成される複雑な腸内生態系である。特に、腸内細菌叢と腸管神経、中枢神経との情報交換は非常に注目が集まっており、宿主の消化管と脳との双方向性な関連として知られる「脳腸相関」から「脳-腸-腸内細菌軸」として概念が拡張され、把握され始めている。よって、mind-alternating organism とも称される腸内細菌は、脳腸相関の情報伝達経路を媒介して、宿主の精神症状や脳機能までをも修飾している可能性が示唆されている。

Lactobacillus gasseri CP2305 株（以下、CP2305 株）はヒト腸管修飾性を特徴とする乳酸桿菌である。CP2305 株を用いた介入研究では、CP2305 摂取群で腸内細菌叢、短鎖脂肪酸、糞便性状等の腸内環境を改善すると伴に、自律神経活性を調節することを明らかにした。また、学術試験ストレスを課した被験者への CP2305 株の摂取においても、ストレスに伴う不安感や睡眠の質の低下を改善することを確認した。更に睡眠時脳波の測定により、CP2305 株摂取群では、睡眠潜時を短縮し、深い睡眠時に多く出現するデルタ波を増加することで、ストレスに伴う睡眠の質の低下を改善している可能性が示されている。

心身の鍛練を要する長距離ランナーへの CP2305 株の介入研究についても紹介し、菌体の生死を問わないパラプロバイオティックス乳酸菌の機能性と宿主の精神症状における重要性について考察したい。

共催：アサヒカルピスウェルネス株式会社

日本農芸化学会2020年度大会ランチョンセミナー

日本ウォーターズ

LS-2-2
漢方薬の薬物動態研究に高分解能質量分析計を利用した新たな挑戦

演者：**松本隆志 様**
株式会社ツムラ
漢方研究開発本部 ツムラ漢方研究所
漢方システムバイオロジー二部 薬物動態グループ

日時：**2020年3月27日（金）12:30〜13:20**

会場：**A16**（九州大学 伊都キャンパス 教室番号: 2306 センター2号館3F）

漢方薬は古来より日本で発展を遂げ、これまでヒトの様々な疾患の治療に用いられてきました。近年、漢方薬の作用機序を解明するため、数多くの薬理研究及び薬物動態研究がなされてきました。しかしながら、多成分系である漢方薬の作用機序を包括的に明らかにすることは容易ではなく、薬物動態研究においては主要成分や製剤中含量の多い数種の成分に限定した分析（targeted LC-MS/MS分析）がなされてきました。本セミナーでは、漢方薬の薬物動態研究に高分解能質量分析計を利用し、投与後の血中に存在する成分の網羅的な分析（non-targeted LC-MS/MS分析）を行った事例をご紹介致します。また、高分解能質量分析計を利用した質量分析イメージング分析による漢方薬成分の組織分布を明らかにした事例についてもご紹介させて頂きます。



日本ウォーターズ株式会社 www.waters.com
東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12 第5小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118
大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10 新大阪トヨタビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734
ショールーム 東京 大阪
サービス拠点 東京 大阪 札幌 福島 静岡 富山 名古屋 徳島 福岡

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

日本農芸化学会2020年度大会　ランチョンセミナー LS-2-3

タカラバイオのPCRへの取組みと今後の展望

演者：大門　尚志　博士（医学）
タカラバイオ株式会社　テクニカルサポート

3月 27日（金） 12:30-13:20
A19会場
（教室番号2403 センター2号館4F）

PCRが実用化されてから30周年を迎え現在では様々な分野で利用されています。
長年PCRを使用してきたベテラン研究員でも基礎知識を学ぶ機会が少なく、日常的に利用している場合もあります。本セミナーでは「いまさら聞けないPCR」としてPCR条件設定の検討方法や、目的によるPCR酵素の使い分けについて系統的に説明し、PCR全般の基礎情報を講演させて頂きます。

PCRは応用範囲が広く様々な有用例があります。特にリアルタイムPCRなどは日常的に利用されている研究室も多いと思います。この機会にPCRを用いた種々の応用技術とその応用範囲について、網羅的にまとまった話しを聞いてみるのはいかがでしょうか？
さらにタカラバイオが30年前日本に初めてPCR技術を導入してからの取り組みと今後の展望についてお話しさせて頂きます。



東京支店　TEL 03-3271-8553　FAX 03-3271-7282
関西支店　TEL 077-565-6969　FAX 077-565-6995
テクニカルサポートライン
TEL 077-565-6999　FAX 077-565-6995
Website　http://www.takara-bio.co.jp
Facebook　http://www.facebook.com/takarabio.jp

SANYO
TRADING CO.,LTD.

日本農芸化学会2020年度大会

三洋貿易株式会社

ランチョンセミナー

3月 27日（金）12:30～13:20

会場　＜ A20＞
教室番号２４０４ センター２号館４F
講演番号：LS-2-4





バイオプロセスラマン
ProCellics

～最新のバイオプロセス器材の紹介～
各種バイオプロセスセンサーおよびバイオプロセス機器・技術他

【講演内容】
弊社では、長年バイオセンシング器材におけるリーディングカンパニーの一つ　独国　PreSens社製品、その他様々な特長ある細胞培養装置、バイオプロセス器材を取り扱っております。
　本講演では、次の特長あるバイオプロセス器材製品群を紹介いたします。

- （蛍光式）光学式バイオプロセスセンサー（DO/pH/CO2）
- （固定化酵素式）グルコース・乳酸（糖代謝）モニター
- （ラマン分光法式）バイオプロセスラマン（グルコース・乳酸・グルタミン・アンモニウムイオン・生細胞・アミノ酸他）モニター
- その他新製品 in situ　バイオプロセス 潅流アクセサリ

三洋貿易株式会社
科学機器事業部
〒101-0054　東京都千代田区神田錦町２丁目 11 番地
TEL　03-3518-1196　　FAX　03-3518-1237
e-mail:　info-si@sanyo-trading.co.jp
URL:　http://www.sanyo-si.com

日本農芸化学会2020年度大会ランチョンセミナー
LS-2-5

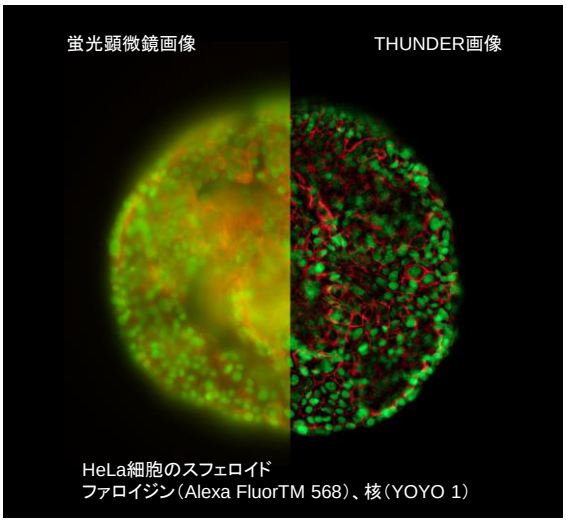
ライカマイクロシステムズ株式会社

次世代 高速イメージング
クリアリング技術と蛍光寿命

日時：　2020年3月27日（金）　12：30～13:20
会場：　A21会場（教室番号2406　センター2号館4F）

最先端デジタルイメージング
演者：　鶴巻　宣秀　ライカマイクロシステムズ株式会社

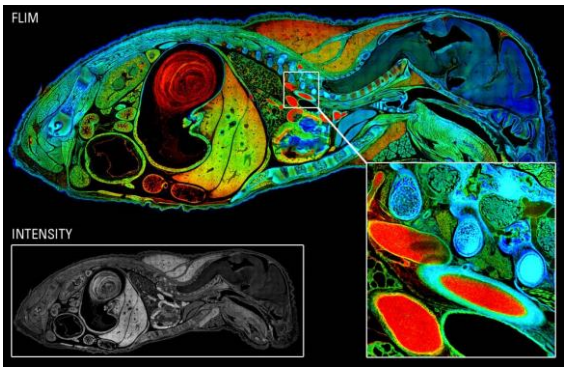
最先端のデジタルイメージング技術である、THUNDER は WideField 顕微鏡の利点すべてを発揮しながら、散乱光を含んだ一平面や z スタックで厚みのある画像に対して有効にアプローチできます。これを可能にしたのが、ライカ独自の Computational Clearing 技術です。焦点の合っていないボケ要素をリアルタイムに除去し、微細構造を見ることを可能にしました。これは今まで Leica が培ってきた高い光学技術とデジタル技術の融合がもたらした画期的な技術革新です。本講演では、この最先端デジタルイメージング技術を紹介します。



HeLa細胞のスフェロイド
ファロイジン（Alexa FluorTM 568）、核（YOYO 1）

高速蛍光寿命イメージング
演者：　長利　卓　ライカマイクロシステムズ株式会社

蛍光寿命は蛍光物質ごとに異なる値を持ち、その蛍光分子がおかれている環境によっても変化します。蛍光寿命情報を利用することで、蛍光色素濃度差に影響されない機能イメージング（pH,Ca2+など）やFRET、細胞内の代謝、微小環境、分子間相互作用などの機能解析、アンミキシングや無染色イメージングなど、幅広いアプリケーションを可能にします。本講演では、共焦点顕微鏡と蛍光寿命イメージング（FLIM）機能を「完全に統合した」、ライカSP8 FALCONによる先進の高速蛍光寿命イメージング技術を紹介します。



ヘマトキシリン・エオジン染色したマウス胚の高解像度タイルスキャン画像（3.0x1.0cm, 722視野, 1.9 億画素）。蛍光寿命イメージング（FLIM）データをもとに、蛍光寿命の違いを疑似色により表示。蛍光寿命の分布状況や変化から、蛍光物質が存在している微小環境など生体内情報を得ることができる。

THUNDER、FALCONによる次世代高速イメージングの動画がみれる製品情報はこちら（ライカマイクロシステムズのホームページへ）

本書の内容の一部または全部を無断で複写複製(コピー)及び転載することは、法律で認められた場合を除き、権利の侵害となりますので、あらかじめ本会あて許諾を求めてください。
Copyright © 2020 by Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry

日本農芸化学会2020年度大会講演要旨集 (オンライン)
Program & Proceedings (online) of the Annual Meeting 2020 Fukuoka of
Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry
2020年3月5日公開　Published online 5 March 2020　ISSN 2186-7976

発行者　公益社団法人日本農芸化学会　JSBBA　http://www.jsbba.or.jp/
PUBLISHER　113-0032 東京都文京区弥生2-4-16 学会センタービル2階　Phone 03-3811-8789

データ作成者 株式会社ダイナコム　DYNACOM　http://www.dynacom.co.jp/
ASSISTS　261-7125 千葉県千葉市美浜区中瀬2-6-1WBG マリブイースト25階　Phone 043-213-8131
小宮山印刷工業株式会社　KOMIYAMA PRINTING　http://www.kopas.co.jp/